

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit  
Institut für Säugetiergenetik  
Neuherberg

**Untersuchungen zur Regulation des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors:  
Antagonistische Wirkungsweise von Prox1 und Six3**

Johannes Lengler

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ. Prof. Dr. Dr. A. Bacher  
Prüfer der Dissertation:  
1. apl.-Prof. Dr. J. Graw  
2. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Die Dissertation wurde am 16.05.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 07.07.2000 angenommen.

### Erklärung

Diese Dissertation wurde von Herrn Professor Dr. J. Graw betreut.

### Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

München, den 15.05. 2000

Johannes Lengler

„Nicht die Dinge beunruhigen die Menschen, sondern ihre Meinung über die Dinge. Wenn wir also auf Schwierigkeiten stoßen, in Unruhe und Kummernis geraten, dann wollen wir die Schuld niemals auf einen anderen schieben, sondern nur auf uns selbst, das heißt auf unsere Meinung von den Dingen.“  
(Epiktet)

### Danksagung

Ich danke besonders Herrn Prof. Dr. J. Graw für die Überlassung des Themas und die ständige Diskussionsbereitschaft. Herrn Prof. Dr. Rudi Balling danke ich für die Diskussionsbereitschaft und Unterstützung. Bei Herrn Dr. D. Ernst und Priv. Doz. Dr. Jerzy Adamski bedanke ich mich für die Diskussionsbereitschaft.

Ein weiterer Dank geht an Dr. R. A. Quinlan, Dr. P. van den IJssel und Dr. R. Dahm für die Zusammenarbeit in Dundee.

Den Doktoranden N. Klopp und R. Lutz danke ich für die vielen anregenden Diskussionen und für das angenehme Arbeitsklima. Herrn R. Breitling danke ich für die Durchsicht des Manuskripts. Ich danke Frau Dr. Möller, Herrn Dr. J. Gerber, Frau Dr. B. Angeletti, Herrn J. Glöckner für das angenehme Arbeitsklima. Den Technischen Assistentinnen E. Bürkle und M. Stadler danke ich für die nette Zusammenarbeit und die Unterstützung im Labor.

Besonders danke ich meinen Eltern, die mir aus der Ferne stets zur Seite standen.

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Zusammenfassung</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1 Einleitung</b>   | <b>2</b>  |
| 1.1 <i>Augenlinse der Vertebraten</i>   | 2         |
| 1.2 <i>Kristalline</i>  | 3         |
| 1.2.1 $\alpha$ -Kristalline   | 4         |
| 1.2.2 $\beta$ - und $\gamma$ -Kristalline   | 6         |
| 1.3 <i>Linsenspezifische Expression der <math>\gamma</math>-Kristalline</i>                             | 7         |
| 1.3.1 Allgemeine Transkriptionsfaktoren der $\gamma$ -Kristalline                                       | 8         |
| 1.3.2 Linsenspezifische Promotorelemente der $\gamma$ -Kristalline                                      | 9         |
| 1.3.3 Regulation der $\gamma$ -Kristalline durch Sox1   | 9         |
| 1.3.4 Regulation von Kristallinen durch Pax-6   | 10        |
| 1.4 <i>Rolle der Homeodomänen-Proteine Prox1 und Six3 in der Augenlinsenentwicklung der Vertebraten</i> | 11        |
| 1.4.1 Bedeutung des Prox1 für die Elongation der Linsenfasern   | 11        |
| 1.4.2 Bedeutung des Six3 in der Augenentwicklung  | 13        |
| 1.5 <i>Zielsetzung</i>  | 15        |
| <b>2 Material</b>   | <b>16</b> |
| 2.1 <i>Chemikalien und sonstige Reagenzien</i>  | 16        |
| 2.2 <i>Oligonukleotide</i>  | 17        |
| 2.3 <i>Plasmide</i>   | 18        |
| 2.4 <i>Enzyme</i>   | 18        |
| 2.5 <i>Bakterienstämme</i>  | 18        |
| 2.6 <i>Zelllinien</i>   | 19        |
| 2.7 <i>Medien und Lösungen</i>  | 20        |
| 2.8 <i>Antikörper</i>   | 24        |
| 2.9 <i>Zellkulturgefäße</i>   | 24        |
| 2.10 <i>Geräte</i>  | 24        |
| <b>3 Methoden</b>   | <b>25</b> |
| 3.1 <i>Rechner-unterstützte Sequenzanalyse</i>  | 25        |
| 3.1.1 Vector NTI  | 25        |
| 3.1.2 MatInspector  | 25        |
| 3.1.3 ExPASy  | 25        |
| 3.1.4 NCBI  | 26        |
| 3.2 <i>Allgemeine molekulargenetische Methoden</i>  | 26        |
| 3.2.1 Transformation kompetenter Bakterien  | 26        |
| 3.2.2 Präparation von Plasmid-DNS   | 27        |
| 3.2.3 Analyse von Nucleinsäuren   | 27        |
| 3.2.4 Reinigung von Nucleinsäuren   | 29        |
| 3.2.5 Klonierung und Subklonierung von Nucleinsäuren  | 30        |
| 3.3 <i>Allgemeine proteinbiochemische Methoden</i>  | 32        |
| 3.3.1 Proteinpräparation  | 32        |
| 3.3.2 Proteinbestimmung   | 32        |
| 3.3.3 SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli  | 33        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.3.4    | Proteinnachweis  | 33        |
| 3.4      | <i>Nachweis von Protein-DNS-Wechselwirkungen</i>   | 35        |
| 3.4.1    | Gel-Retardation  | 35        |
| 3.4.2    | Protein-Präzipitation  | 37        |
| 3.5      | <i>Zellkultur</i>  | 39        |
| 3.5.1    | Kultivieren von Zellen   | 39        |
| 3.5.2    | Transfektion von Zellen  | 40        |
| 3.5.3    | Immunologischer Proteinnachweis (in Zellen)  | 41        |
| 3.5.4    | Reporteranalyse  | 41        |
| <b>4</b> | <b>Ergebnisse</b>  | <b>44</b> |
| 4.1      | <i>Der <math>\gamma</math>F-Kristallinpromotor der Maus</i>  | 44        |
| 4.1.1    | Phylogenie der $\gamma$ -Kristallinpromotoren  | 44        |
| 4.1.2    | Der $\gamma$ F-Kristallinpromotor der Maus als Stellvertreter der $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren der Nager                | 46        |
| 4.2      | <i>Aktivität des <math>\gamma</math>F-Kristallinpromotors in Epithelzelllinien aus der Augenlinse</i>                        | 48        |
| 4.2.1    | Zeitreihe des $\gamma$ F-Kristallinpromotors in Linsenepithelzelllinien  | 48        |
| 4.2.2    | SV40-Promotor und $\gamma$ F-Kristallinpromotor im selben Zellsystem   | 50        |
| 4.2.3    | Konzentrationsreihe des (-226/+45) $\gamma$ F-Kristallinpromotors im Zellsystem  | 52        |
| 4.3      | <i>Funktionsanalyse des <math>\alpha</math>A-Kristallins und HSP27 am DOTIS des <math>\gamma</math>F-Kristallinpromotors</i> | 54        |
| 4.3.1    | Endogene Expression des $\alpha$ A-Kristallins und des Hsp25 in der Augenlinse der Maus                                      | 55        |
| 4.3.2    | Die $\alpha$ A-Kristallinexpression in N/N1003A- und CD5A-Zellen   | 55        |
| 4.3.3    | Subzelluläre Lokalisation von $\alpha$ A-Kristallin und HSP27 in N/N1003A-Zellen   | 56        |
| 4.3.4    | Bovines Linsenextrakt und rekombinantes $\alpha$ A-Kristallin in ihrer Interaktion mit DOTIS                                 | 57        |
| 4.3.5    | Funktion des $\alpha$ A-Kristallins und des HSP27 am $\gamma$ F-Kristallinpromotor   | 58        |
| 4.4      | <i>Funktionsanalyse des PROX1 am <math>\gamma</math>F-Kristallinpromotor</i>   | 62        |
| 4.4.1    | Prospero-Bindestelle   | 62        |
| 4.4.2    | Endogene Expression von PROX1/Prox1 in der N/N1003A- und CD5A-Zelllinie  | 62        |
| 4.4.3    | Transiente PROX1-Expression in der CD5A-Zelllinie und im Retikulozytenlysat  | 63        |
| 4.4.4    | PROX1-Aktivierung des $\gamma$ F-Kristallinpromotors   | 65        |
| 4.5      | <i>Funktionsanalyse des Six3 am <math>\gamma</math>F-Kristallinpromotor</i>  | 67        |
| 4.5.1    | <i>In vitro</i> -Expression von Six3 im Retikulozytenlysat   | 68        |
| 4.5.2    | Six3-Bindung am $\gamma$ F-Kristallinpromotor  | 68        |
| 4.5.3    | Endogene Expression von Six3 in den CD5A- und N/N1003A-Zelllinien  | 70        |
| 4.5.4    | Six3 Repression des $\gamma$ F-Kristallinpromotors   | 71        |

---

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 4.6      | <i>Antagonistische Regulation des <math>\gamma</math>F-Kristallinpromotors durch PROX1 und Six3</i>                                  | 73         |
| <b>5</b> | <b>Diskussion</b>  | <b>75</b>  |
| 5.1      | <i>Charakterisierung der <math>\gamma</math>DEF-Kristallinpromotoren</i>   | 75         |
| 5.1.1    | $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoraktivität in biologischen Systemen  | 76         |
| 5.1.2    | Stellung der $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren in der $\gamma$ -Kristallin-Familie   | 78         |
| 5.1.3    | Bedeutung der Promotorelemente der $\gamma$ DEF-Kristalline  | 79         |
| 5.2      | <i>Bedeutung der Bindung bovinen <math>\alpha</math>-Kristallins an den <math>\gamma</math>DEF-Kristallinpromotoren</i>              | 84         |
| 5.2.1    | $\alpha$ -Kristalline zeigen in der potentieller DNS-Bindungsdomäne Homologie zu den kleinen Hitzeschockproteinen                    | 84         |
| 5.2.2    | Einfluss des $\alpha$ A-Kristallins und der Vertreter der kleinen Hitzeschockproteine auf den $\gamma$ F-Kristallinpromotor der Maus | 86         |
| 5.2.3    | Bedeutung des $\alpha$ A-Kristallins als zytoplasmatisches Protein   | 89         |
| 5.2.4    | Vergleich der Interaktionen bovinen $\alpha$ -Kristallins und rekombinanten $\alpha$ A-Kristallins der Maus an DOTIS                 | 90         |
| 5.3      | <i>Prox1 ist ein Aktivator der <math>\gamma</math>DEF-Kristalline</i>  | 91         |
| 5.3.1    | DNS-Interaktion des Prox1  | 91         |
| 5.3.2    | Prox1 ist sowohl an der $\gamma$ -Kristallin-Regulation als auch an der Elongation der Linsenfasern beteiligt                        | 92         |
| 5.4      | <i>Six3 ist ein Repressor der <math>\gamma</math>DEF-Kristalline</i>   | 95         |
| 5.4.1    | DNS-Interaktion des Six3   | 95         |
| 5.4.2    | Six3 ist ein Schalter der $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren  | 99         |
| 5.5      | <i>Modell zur Regulation der <math>\gamma</math>DEF-Kristalline</i>  | 100        |
|          | <b>Literaturverzeichnis</b>  | <b>104</b> |
|          | <b>Abbildungsverzeichnis</b>   | <b>113</b> |
|          | <b>Verzeichnis der Diagramme und Tabellen</b>  | <b>114</b> |
|          | <b>Anhang</b>  | <b>115</b> |
|          | <b>Abkürzungen</b>   | <b>120</b> |

## Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der linsenspezifischen Regulation der  $\gamma$ -Kristalline der Vertebraten. Davon wurde der proximale  $\gamma$ F-Kristallinpromotor stellvertretend für Untersuchungen herangezogen.

Im Gegensatz zur Beobachtung von E. Krausz (Dissertation 1996) zeigte das  $\alpha$ A-Kristallin in Genreporterassays keinen dosisabhängigen Effekt auf den  $\gamma$ F-Kristallinpromotor. Entsprechend war der Promotor nicht durch homologe Vertreter der gemeinsamen  $\alpha$ -Hsp-Superfamilie zu induzieren, wie durch das HSP27 des Menschen oder das Hsp17.9 von *Petroselinum crispum*.

Außerdem wurde der Effekt der Homeodomänen-Proteine PROX1 und Six3 an den  $\gamma$ -Kristallinpromotoren charakterisiert. Promotoranalysen mit *MatInspector* weisen auf eine Bindestelle des Prospero-Proteins hin. Dieses Protein ist eng verwandt zu den Vertretern der Vertebraten Prox1/PROX1, die an der Elongation der Linsenfaser beteiligt sind. In Reporteranalysen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Grundaktivität des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors bei Kotransfektion des *PROX1* in die CD5A-Linseneithelzelllinie bis zum Zehnfachen gesteigert werden kann. Die Aktivität des Promotors in der N/N1003A-Linseneithelzelllinie wurde nur verdoppelt. Meine Untersuchungen zeigten, dass in den CD5A-Zellen im Gegensatz zu den N/N1003A-Zellen keine endogene Prox1/PROX1-Expression vorliegt, und erklären damit die unterschiedlichen Aktivierungen in den Zelllinien.

In Kotransfektionsexperimenten wurde eine starke Repression des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors auf weniger als 20 % seiner Ausgangsaktivität durch Six3 gezeigt. Dieses Homeodomänenprotein interagiert mit dem  $\gamma$ F-Kristallinpromotor zwischen bp -214 und -115. Dadurch können weitere Zielgene dieses Entwicklungsfaktors gefunden werden, die beispielsweise am Krankheitsbild der Holoprosencephalie beteiligt sind, das auch durch Mutationen im SIX3 hervorgerufen wird.

Beide an der Augenlinsenentwicklung beteiligten Homeodomänenproteine Prox1 und Six3 wirken antagonistisch auf die  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren. Mit diesen beiden Regulatoren wurde ein Modell zur Regulation der  $\gamma$ DEF-Kristalline erstellt, das deren Expression in der Linse erklären kann.

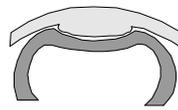
## 1 Einleitung

### 1.1 Augenlinse der Vertebraten

Das Auge ist ein Sinnesorgan zur Aufnahme und Weiterleitung optischer Eindrücke. Das Licht passiert zuerst die Hornhaut, wird an der Linse gebrochen und auf die Netzhaut projiziert. Die Augenlinse liegt in einer Mulde des vorderen Glaskörpers. Sie ist mit ihren Zonulafasern rundum im Ziliarkörper verankert. Dieser wiederum ist mit dem Augapfel verbunden. Dort setzen Muskeln an, welche die Linse zur Akkomodation verformen können. Durch die Verformbarkeit der Linse wird die Schärfe des Abbilds auf die Retina geregelt. Die Augenlinse wird nicht innerviert und besitzt

keine Verbindung zum Blutkreislauf. Dadurch bleibt ihre Transparenz gewährleistet. Neben Nervenzellen und Herzmuskelzellen sind Linsenzellen die einzigen Zelltypen, die im Lauf der Entwicklung nicht ersetzt oder ausgetauscht werden.

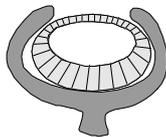
*Linsenplakode*



*Linsengrube und Augenbecher*



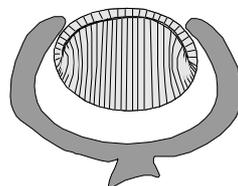
*Abschnürung des Linsenvesikels*



*Beginn der Elongation primärer Linsenfaser*



*Entstehung der sekundären Linsenfaser im Kortex*



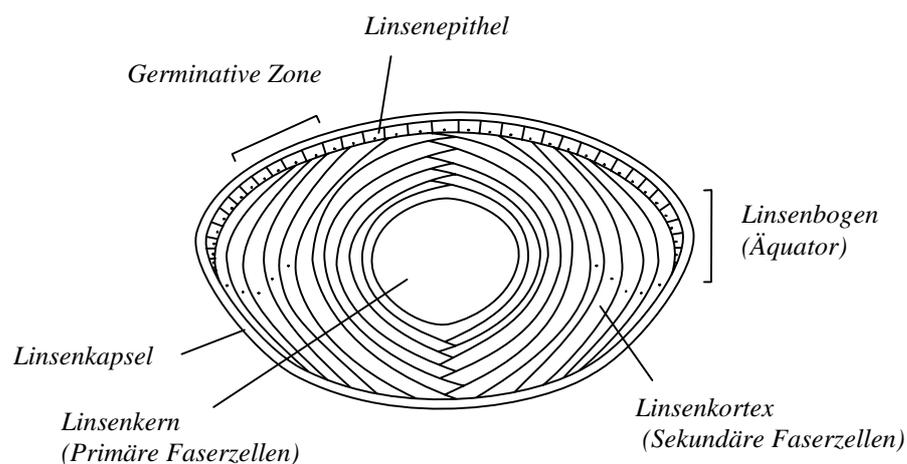
**Abbildung 1.1: Linsenentwicklung der Vertebraten.**

Die Vertebratenlinse entwickelt sich aus der Linsenplakode. Es bildet sich eine Linsengrube, die sich zum Linsenvesikel abschnürt. Dieses wird von posterior mit primären Faserzellen gefüllt, die den späteren Linsenkern bilden.

Die Augenlinse entsteht aus dem Ektoderm. Es tritt mit dem sich entwickelnden Augenbecher in Kontakt. Das Epithel verdickt sich, bildet zuerst die Linsengrube aus und schnürt sich später als Linsenbläschen ab (Abbildung 1.1). Im Lauf der Linsenentwicklung elongieren die posterioren Zellen des Linsenbläschens, füllen es aus und differenzieren zu primären Linsenfaserzellen. Aus diesen Zellen besteht der spätere Linsenkern. Die anterioren Zellen des Linsenbläschens dagegen bleiben als einschichtiges Linsenepithel bestehen und

schieben die aus der Proliferation entstandenen Zellen zum Äquator. Aus den Epithelzellen der Äquatorregion entwickeln sich die sekundären Linsenfaser. Sie werden von den Faserzellen, die sich noch bilden, zur Mitte gedrängt und lagern sich konzentrisch am Linsenkern an (Abbildung 1.2). Während dieser Wanderung werden die Zellorganellen einschließlich Zellkerne bis auf die Ribosomen abgebaut (Hockwin, 1971; Kuwabara und Imaizumi, 1974). Das Cytoskelett bleibt erhalten.

Während der Linsenentwicklung werden Kristalline – die linsentypischen Proteine – stark exprimiert. Sie füllen die Faserzellen aus. Diese Entwicklung ist für die Transparenz der Augenlinse von Bedeutung. Die Faserzellen werden über *gap junctions* von den Epithelzellen versorgt (Evans et al., 1993; Piatigorsky, 1981). Die Proliferation des Linsenepithels führt dazu, dass die Augenlinse mit zunehmendem Alter noch immer leicht anwächst. Primäre und sekundäre Fasern und Epithel sind von einer festen Kapsel aus Glykoproteinen umhüllt (Abbildung 1.2).



**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung eines anterior-posterioren Schnitts durch die adulte Augenlinse.**

Die anterioren Epithelzellen teilen sich in der ringförmigen germinativen Zone. Am Linsbogen beginnen sie zu differenzieren und bilden dann die sekundären Faserzellen. Der Linsenkern besteht aus den primären Faserzellen, die ihre Zellkerne und Organellen abgebaut haben.

## 1.2 Kristalline

Die Augenlinse ist mit 30 – 35 % Proteinanteil eines der proteinreichsten Organe des menschlichen Organismus. Kristalline sind Strukturproteine, die 90 % der wasserlöslichen Fraktion der Linse repräsentieren. Die Kristalline der Vertebraten werden gemäss ihrer Entdeckung von drei Hauptfraktionen aus der Augenlinse in drei

Proteinfamilien eingeteilt: 1. die  $\alpha$ -Kristalline, 2. die  $\beta$ -Kristalline und 3. die  $\gamma$ -Kristalline (Mörner, 1893). Davon werden die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kristalline zur  $\beta/\gamma$ -Superfamilie zusammengefasst. Daneben gibt es eine Reihe taxonspezifischer Kristalline, die meist noch eine enzymatische Funktion aufweisen (Piatigorsky et al., 1994). Bei Vögeln beispielsweise werden statt der  $\gamma$ -Kristalline die  $\delta$ -Kristalline exprimiert. Sie wirken auch als Argininsuccinatlyase.

### 1.2.1 $\alpha$ -Kristalline

Zwei Gene codieren für die  $\alpha$ -Kristalline, das  $\alpha$ A- und das  $\alpha$ B-Kristallin. Beide Gene enthalten drei Exons ähnlicher Größe. In Nagern und anderen Säugetierarten führt ein alternatives Spleißen der RNS eines zusätzlichen Exons zur Isoform des  $\alpha$ A<sup>ins</sup>-Kristallins.

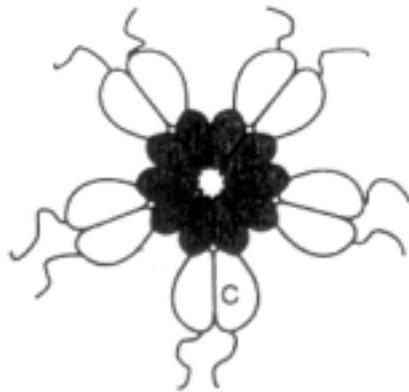
Die Untereinheiten des  $\alpha$ -Kristallins - das  $\alpha$ A- und  $\alpha$ B-Kristallin – weisen auf Proteinebene eine Identität von 57 % auf (de Jong et al., 1993). Die Sequenzen der interspezifischen  $\alpha$ A- beziehungsweise  $\alpha$ B-Kristalline unter den Vertebraten ist weit höher (>95 %). Sie sind evolutionär mit den kleinen Hitzeschockproteinen verwandt (*small heat-shock proteins*, sHsps; Ingolia und Craig, 1982), die wie die  $\alpha$ -Kristalline zur Aggregatbildung tendieren. Beide Proteinfamilien werden in der  $\alpha$ -Hsp-Superfamilie zusammengefasst, deren Gemeinsamkeit vorwiegend in einem etwa 80 Aminosäuren langen C-terminalen Bereich liegt, der „ $\alpha$ -Kristallin Domäne“ bezeichnet wird (Caspers et al., 1995). Phylogenetisch stehen die  $\alpha$ -Kristalline den Vertretern der  $\alpha$ -Hsp-Superfamilie aus dem Tierreich näher als den Vertretern des Pflanzenreichs.

Das  $\alpha$ A-Kristallin darf als linsenspezifisches Protein betrachtet werden. Es wurde zwar in geringer Expression in der Milz und im Thymus beobachtet, liegt aber in großen Mengen in der Augenlinse vor (Kato et al., 1991<sup>⓪</sup>; Krausz et al., 1996). Wegen der Linsenspezifität wurde sein Promotor exemplarisch in Maus und Huhn charakterisiert (Sax und Piatigorsky, 1994; Cvekl et al., 1994). Im Gegensatz dazu ist das  $\alpha$ B-Kristallin auch im Herz- und Skelettmuskel, in der Niere und in geringeren Mengen in Hirn und Lunge zu beobachten (Dubin et al., 1989; Kato et al., 1991<sup>⓪</sup>).

In der Linse der Säuger liegt das  $\alpha$ -Kristallin als multimerer Komplex von näherungsweise 800 kDa vor, dessen Untereinheiten das  $\alpha$ A- und das  $\alpha$ B-Kristallin mit je 20 kDa sind. Das native  $\alpha$ -Kristallin wird niemals als Monomer oder als Oligomer

niederen Molekulargewichts vorgefunden (Smulders et al., 1998). Offenbar ist seine multimere Struktur mit hohem Molekulargewicht der stabilste energetische Zustand. Wegen des hydrophoben Charakters seiner N-terminalen Domäne wird angenommen, dass die  $\alpha$ -Kristallin Untereinheiten amphiphatisch sind und zu einer dynamischen Mizellenstruktur multimerisieren (Abbildung 1.3; Smulder et al., 1998; Clauwaert et al., 1989). Ein nicht linsenspezifischer Befund belegt, dass das  $\alpha$ -Kristallin die Funktion von kleinen Hitzeschock-Proteinen bei der Hitzeschockantwort übernehmen kann (Klemenz et al., 1991).

Die Funktion der  $\alpha$ -Kristalline ist die Chaperonaktivität. Sie beruht auf der Fähigkeit, denaturierende und destabilisierte Proteine zu binden. Auf diese Weise wird Aggregation und Präzipitation dieser Proteine verhindert (Horwitz et al., 1992; Jakob et



**Abbildung 1.3: Pitted-Flexiball-Modell zur Struktur des  $\alpha$ -Kristallins.**

Die  $\alpha$ A- und  $\alpha$ B-Kristallin-Untereinheiten besitzen je zwei Domänen. Die N-terminalen Domänen liegen im Inneren des Komplexes, wogegen die C-terminalen Domänen an der Peripherie sind. Sie bilden den polaren Mantel um einen hydrophoben Kern. Die hydrophilen C-terminalen Extensionen sind frei beweglich an der Oberfläche. Spezifische Interaktionen der C-terminalen Domänen führen zur Bildung von Tetrameren. Die hydrophobe Wechselwirkung zwischen den N-terminalen Domänen sorgen für eine micellenartige Kohäsion zwischen den Blöcken der Tetrameren (entnommen aus Smulders et al., 1998).

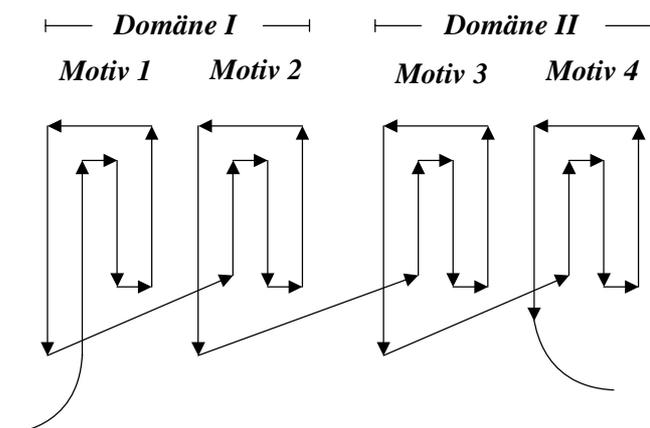
al., 1993). Die Substratspezifität der  $\alpha$ -Kristalline ist gering (Horwitz et al., 1992; Rao et al., 1993).

Neben der Chaperonaktivität wurde eine Wechselwirkung des  $\alpha$ -Kristallins mit DNS gezeigt (Singh et al., 1998). Für einige  $\gamma$ -Kristallinpromotoren wurde ein Promotorelement beschrieben, an welches  $\alpha$ -Kristalline binden (Pietrowski et al., 1994). Die Bindesequenz wurde mit DOTIS bezeichnet (*downstream of transcription initiation site*; Abbildung 1.5). Genreporter Untersuchungen am  $\gamma$ E-Kristallinpromotor zeigten ein Aktivierung seiner Aktivität in Abhängigkeit des  $\alpha$ A-Kristallins (Krausz, Dissertation, 1996).

### 1.2.2 $\beta$ - und $\gamma$ -Kristalline

Aufgrund der Verwandtschaft der  $\beta$ - zu den  $\gamma$ -Kristallinen werden beide Proteinfamilien in einer gemeinsamen  $\beta/\gamma$ -Kristallin-Superfamilie zusammengefasst. Die  $\beta$ -Kristalline liegen als Oligomere mit einem Molekulargewicht bis 200 kDa im Fall von Oktameren vor (Siezen et al., 1986). Ihr Molekulargewicht als Monomere liegt zwischen 22 und 28 kDa. Im Gegensatz dazu kommen die  $\gamma$ -Kristalline nativ als Monomere mit einem Molekulargewicht von 20 kDa vor. Der Grund dafür ist eine unterschiedliche Domänenpaarung.

Einige  $\gamma$ -Kristalline haben 4 *Griechische Schlüsseln*, die je aus 4 antiparallele  $\beta$ -Faltblättern bestehen. Diese *Griechischen Schlüsseln* sind paarweise in zwei Domänen des Proteins angeordnet (Abbildung 1.4; Blundell et al., 1981; Bax et al., 1990). Das Modell wurde mit Röntgenkristallographie am  $\gamma$ B-Kristallin des Rinds entwickelt. Inzwischen gibt es auch 3D-Strukturen von  $\gamma$ -Kristallinen, zum Beispiel dem  $\gamma$ F-Kristallin des Rinds, die davon abweichen (White et al., 1988 und 1989). Bovines  $\gamma$ F-Kristallin zeigt im ersten *Griechischen Schlüssel* 4, im zweiten 3, im dritten 3 und im vierten 4  $\beta$ -Faltblätter. Da die  $\gamma$ -Kristalline intramolekulare Domänenpaarung aufweisen, liegen sie monomerisch vor. Im Gegensatz dazu interagieren diese Domänen der  $\beta$ -Kristalline intermolekular, was zu Homo-, Heterodimeren und Multimeren führt.



**Abbildung 1.4:** Schematische Darstellung der Struktur der  $\beta/\gamma$ -Kristalline.

Die  $\beta/\gamma$ -Kristalline bestehen aus vier *Griechischen Schlüsseln*. Zwei dieser Motive stellen eine Domäne dar (Lubsen et al., 1988). Die Eigenschaften des Verbindungspeptids zwischen beiden Domänen unterscheiden sich in  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kristallinen. Dadurch wird die Domänenpaarung beeinflusst (siehe Text).

Eine Ausnahme stellt das  $\beta$ s-Kristallin dar. Es wurde den  $\beta$ -Kristallinen zugeordnet, weil es chromatographisch in dieser Fraktion vorliegt. Später wurde festgestellt, dass es als Monomer vorkommt. Es wird jetzt als  $\gamma$ s-Kristallin bezeichnet (van Rens et al., 1989).

Zur Unterscheidung der beiden Kristallin-Familien dient auch der N-Terminus. Er ist in den  $\beta$ -Kristallinen blockiert und in den  $\gamma$ -Kristallinen frei. Ein weiteres Kriterium ist die genomische Struktur. Die  $\beta$ -Kristalline bestehen typischerweise aus sechs Exons, wobei die erste nicht translatiert wird, das zweite für den N-terminalen Arm und die anderen vier für je einen Griechischen Schlüssel codieren (Hogg et al., 1987). Im Gegensatz dazu bestehen die  $\gamma$ -Kristalline aus drei Exons. Das erste Exon codiert immer für drei Aminosäuren. Das zweite und dritte Exon für je eine Domäne des Proteins (Lok et al., 1984). In der Ratte liegen alle sechs  $\gamma$ -Kristalline – die  $\gamma$ A-F-Kristalline – als Gencluster vor, das sich über ungefähr 50 kbp erstreckt (den Dunnen et al., 1989). Dieses Gencluster wurde auch im Genom der Maus auf Chromosom 1 (Skow et al., 1988) und des Menschen auf Chromosom 2 (den Dunnen et al., 1985) gefunden. Die  $\beta$ -Kristalline hingegen sind zumindest beim Menschen und bei der Maus über drei Chromosomen verteilt (Hulsebos et al., 1995).

### 1.3 Linsenspezifische Expression der $\gamma$ -Kristalline

Die  $\gamma$ -Kristallingene sind mit Ausnahme geringer Expression in der Retina (Jones et al., 1999) linsenspezifisch exprimiert. In der Linse der Maus beginnt ihre Expression ab Tag 12,5 der Embryonalentwicklung (E 12.5) in den primären Linsenfaser und später in den sekundären (van Leen et al., 1987; Santhiya et al., 1995). Die  $\gamma$ -Kristallinexpression erreicht eine Woche nach der Geburt in der Maus ihr Maximum (Goring et al., 1992). Im Gegensatz dazu ist ihre Expression beim Menschen pränatal. Der Grund dafür ist die unterschiedlich lange Embryonalentwicklung des Menschen und der Maus.

Die sechs  $\gamma$ -Kristalline sind intraspezifisch einander ähnlich. Die Identität dieser Strukturproteine bei der Maus ist mehr als 80 % (Graw et al., 1993). Im Gegensatz zur Maus werden beim Menschen nur vier  $\gamma$ -Kristalline exprimiert. Vögel besitzen keine  $\gamma$ -Kristalline.

Die sehr homologen  $\gamma$ DEF-Kristallingene der Maus und der Ratte wurden intensiv untersucht. Es wurde beobachtet, dass der 5'-flankierende Bereich von Nucleotid -226 bis +45 des  $\gamma$ F-Kristallings notwendig für optimale Promotoraktivität in der Linse ist (Abbildung 1.5). In diesem Promotorbereich liegen verschiedene Promotorelemente. Ihre Bedeutung für die Regulation der  $\gamma$ -Kristalline ist teilweise bekannt.

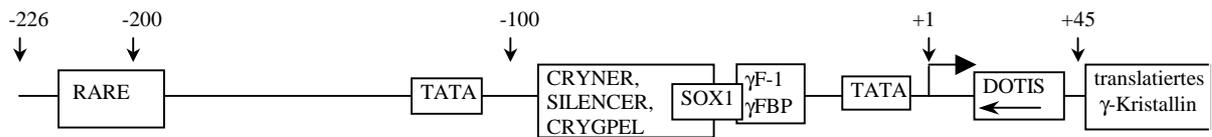


Abbildung 1.5: Übersicht der bekannten Elemente am  $\gamma F$ -Kristallinpromotor.

|               |   |           |                                       |
|---------------|---|-----------|---------------------------------------|
| RARE          | <i>retinoic acid response element</i>                         | -208/-189 | Tini et al., 1993                     |
| TATA          | <i>TATA-box</i>   | -112/-107 |                                       |
| CRYNER        | <i><math>\gamma</math>-crystallin nested repeats</i>          | -87/-59   | Stöger et al., 1997                   |
| SILENCER      |   | -76/-58   | Peek et al., 1992                     |
| CRYGPEL       | <i>common <math>\gamma</math>-crystallin promoter element</i> | -67/-54   | Graw et al., 1993                     |
| SOX1          | <i>Sox1 binding site</i>                                      | -63/-44   | Kamachi et al., 1995                  |
| $\gamma F$ -1 | <i><math>\gamma F</math>-crystallin activator element 1</i>   | -46/-36   | Liu et al., 1991; Goring et al., 1993 |
| $\gamma$ FBP  | <i><math>\gamma F</math>-binding protein</i>                  | -46/-36   | Liu et al., 1994                      |
| TATA          | <i>TATA-box</i>   | -24/-19   |                                       |
| DOTIS         | <i>downstream of transcription initiation site</i>            | +14/+34   | Pietrowski et al., 1994               |

### 1.3.1 Allgemeine Transkriptionsfaktoren der $\gamma$ -Kristalline

In den  $\gamma$ -Kristallinpromotoren liegen allgemeine Promotorelemente vor. Die TATA-Boxen beispielsweise weisen darauf hin, dass diese Gene nicht konstitutiv als Haushaltsgene exprimiert werden. Beim Menschen handelt es sich beim  $\gamma E$ -Kristallinen um ein Pseudogen, da es in der TATA-Box eine Punktmutation aufweist (Brakenhoff et al., 1990 und 1994).

Ein weiteres gut untersuchtes Promotorelement in den  $\gamma$ DEF-Kristallinen ist das *retinoic acid response element* (RARE; Tini et al., 1993). Mit diesem Element interagieren die Retinsäurerezeptoren RAR $\alpha$  und RXR $\beta$ . Sie aktivieren als Heterodimer die Expression von  $\gamma$ -Kristallinen. Beide werden allerdings diffus im gesamten Embryo exprimiert und sind nicht linsenspezifisch (Dolle et al., 1990; 1994). In Zellkultur sind dazu zwei Antagonisten bekannt, der *thyroid hormon receptor* (T<sub>3</sub>R; Tini et al., 1994) und der *orphan receptor* (ROR; Tini et al., 1995). Mittels Retinsäure kann in das Wechselspiel dieser vier Retinsäurerezeptoren eingegriffen werden und die  $\gamma$ -Kristallinexpression erhöht werden. Die physiologische Bedeutung von Retinsäure ist noch unklar.

### 1.3.2 Linsenspezifische Promotorelemente der $\gamma$ -Kristalline

Das  $\gamma$ F-1-Element liegt in allen  $\gamma$ -Kristallinpromotoren vor. In Reporterassays wurde gezeigt, dass das  $\gamma$ F-1-Element in primären Linsenzellen die  $\gamma$ F-Kristallinpromotorexpression erhöht (Liu et al., 1991). An dieses Element bindet das  $\gamma$ FBP. Das Protein stammt aus der cDNS-Bank des Huhns, welches keine  $\gamma$ -Kristalline besitzt ( *$\gamma$ F-binding protein*; Liu et al., 1994). Das Homologe *Hic1*-Gen der Maus hingegen wird nicht linsenspezifisch exprimiert (Grimm et al., 1999). Trotzdem konnte das  $\gamma$ FBP in Kotransfektionsexperimenten als Repressor des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors charakterisiert werden.

Ein ebenfalls bifunktionales *Silencer*-Element wurde im  $\gamma$ D-Kristallin der Ratte untersucht. Dieses Element wurde dem *HSV-tk*-Promotor vorgeschaltet in Zellen transfiziert. Dabei wurde eine Repression beobachtet (Peek et al., 1990). In Linsenzellen dagegen verstärkt dieses *Silencer*-Element gewebespezifisch die Promotoraktivität (Peek et al., 1992).

Die *gamma-crystallin-nested repeats* liegen in den  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren der Nager. Die Bindung eines Linsenproteins, das nicht näher charakterisiert wurde, konnte am Einzelstrang dieses Promotorbereichs gezeigt werden (*Cryner*; Stöger et al., 1997).

Zudem wurde ein Element beschrieben, das charakteristisch für die  $\gamma$ -Kristallinpromotoren ist. Das Promotorelement wurde *common gamma-crystallin promoter element* bezeichnet und liegt in allen bekannten  $\gamma$ -Kristallinpromotoren von Mensch, Maus und Ratte vor (*Crypel*; Graw et al., 1993). Die *Cryner*-, *Silencer*-, *Crypel*-Elemente und die Sox1-Bindestelle, die im folgenden Kapitel beschrieben wird, überlappen sich (Abbildung 1.5)

### 1.3.3 Regulation der $\gamma$ -Kristalline durch Sox1

Das Testis-bestimmende Gen *Sry* ist ein Gründermitglied der *Sox*-Genfamilie (*Sry-related HMG box*), die für Transkriptionsfaktoren codiert. Sie enthalten eine HMG-Domäne, mit der sie DNS binden können. Zur Subfamilie der Gruppe B gehören die Gene von *Sox1*, *Sox2* und *Sox3*, die für Proteine mit großer Ähnlichkeit codieren. Ihrer HMG-Domänen weisen untereinander eine Identität von 96 % auf (Collignon et al., 1996).

In der Maus wird die Expression von Sox2 in allen sensorischen Plakoden beobachtet, einschließlich der, aus welcher sich die Linse entwickelt. Sox2 wird allerdings im Linsenvesikel nicht exprimiert. An seine Stelle tritt dort Sox1. Es wurde gezeigt, dass in Explantaten aus der Hühnerlinse die Bindung des Sox1-Proteins an den  $\delta$ 1-Kristallin *enhancer* für seine linsenspezifische Aktivität erforderlich ist. Das gleiche gilt für den  $\gamma$ F-Kristallinpromotor der Maus (Kamachi et al., 1995). Dazu kommt, dass eine spezifische Bindung des Sox1 an alle  $\gamma$ -Kristallinpromotoren der Maus gezeigt wurde. Die Deletion des *Sox1*-Gens in der Maus führt zur Microphthalmie und zu Katarakt. Die Linsenfasern können nicht elongieren, weil höchstwahrscheinlich keine  $\gamma$ -Kristalline exprimiert werden (Nishiguchi et al., 1998). *Sox1* ist deshalb ein kritisches Gen in der Entwicklung der Linse bei Säugern und reguliert direkt die Expression von  $\gamma$ -Kristallinen.

#### 1.3.4 Regulation von Kristallinen durch Pax-6

Das Pax-6 besitzt drei funktionale Domänen. Die Paired-Domäne, die nach dem homologen Paired-Protein aus *Drosophila* benannt wurde, besteht ihrerseits aus zwei Unterdomänen, die zur Spezifität der DNS-Bindung des Pax-6 beitragen (Jun et al., 1996; Epstein et al., 1994). Die Homeodomäne dient zur Dimerisierung des Proteins, wie zur Bindung an DNS. Die PST-Domäne ist für die Aktivierung der Transkription wichtig (Glaser et al., 1994).

In der Maus wird Pax-6 früh im Oberflächenektoderm des Kopfs (E 8.0) exprimiert. Es ist im Linsenvesikel (E 9.75) und später in den Zellen ektodermalen Ursprungs des Auges zu beobachten (E 15.5, Grindley et al., 1995; Walther und Gruss, 1991).

Im  $\gamma$ D-Kristallinpromotor der Ratte konnte keine Pax-6 Bindestelle gefunden werden (Dirks et al., 1996<sup>2</sup>) und andere  $\gamma$ -Kristallingene wurden noch nicht auf Pax-6-Bindestellen untersucht. Dagegen tritt Pax-6 als Transaktivator bei der Expression zahlreicher anderer Kristallingene in Erscheinung, wie zum Beispiel bei den  $\alpha$ A- (Cvekl et al., 1995<sup>2</sup>),  $\alpha$ B- (Gopal-Srivastava et al., 1996),  $\delta$ - und  $\zeta$ -Kristallinen (Richardson et al., 1995). Im Unterschied dazu reprimiert es beim Huhn die Expression des  $\beta$ B1-Kristallingens, das für die Linsenfasern zelltypspezifisch ist (Duncan et al., 1998).

Verschiedene Mutationen im *paired/Pax-6*-Gen wurden beschrieben, wie zum Beispiel bei *Drosophila* die *eyeless* (Quiring et al., 1994) und bei der Maus die *small*

*eye* Mutante (Hill et al., 1991). Beim Menschen führt eine Mutation im *Pax-6*, die zum Krankheitsbild der Anirida (Ton et al., 1991). Wegen seiner konservierten Sequenz und Funktion in der Augenentwicklung wurde *Pax-6* als „master control gene“ bezeichnet (Halder et al., 1995). Mutationen im *Pax-6* führen zu Defekten in der Augen- und in der Linsenentwicklung, weil dieses Gen für die Induktion der Linse die vom Ektoderm des Embryos ausgeht, für die Entwicklung der Riechplakode, des Vorderhirns (Stoykova et al., 1997) und des Epithels der Kornea (Koroma et al., 1997) benötigt wird. Mit *Pax-6* konnten ektopische Augen in *Xenopus* induziert werden (Altmann et al., 1999).

#### **1.4 Rolle der Homeodomänen-Proteine Prox1 und Six3 in der Augenlinsenentwicklung der Vertebraten**

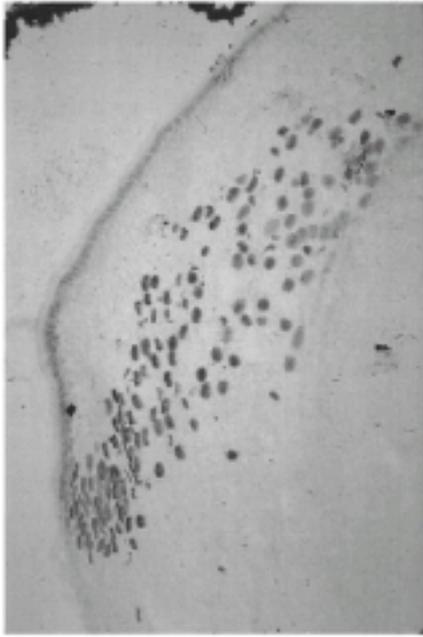
Die beiden Homeodomänen-Proteine Prox1 und Six3 wurden in der Vertebraten vor wenigen Jahren entdeckt (Oliver et al., 1993 und 1995). Aus ihren Expressionsmustern, die in der Maus weitestgehend bekannt sind, und aus nachfolgend beschriebenen Experimenten an transgenen Tieren steht fest, dass beide Gene an der Augen- und Linsenentwicklung teilnehmen. Zentrales Thema dieser Arbeit ist die Frage, ob Prox1 und Six3 an der  $\gamma$ -Kristallin-Regulation beteiligt sind. Deshalb werden sie in den folgenden beiden Kapiteln im Hinblick auf die Linsenentwicklung beschrieben.

##### **1.4.1 Bedeutung des Prox1 für die Elongation der Linsenfasern**

*Prox1* ist ein Homeobox-Gen, das zum *prospero* aus *Drosophila* verwandt ist. Die DNS-Sequenz wurde ermittelt, an die das Prospero-Protein bindet (Hassan et al., 1997). DNS-Elemente, an die das Prox1 der Vertebraten bindet, sind bislang noch nicht bekannt. Die Prospero-Homeodomäne weist allerdings zu den Prox1-Homeodomänen, die unter den Vertebraten identisch sind, eine hohe Identität auf (65 %; Tomarev et al., 1996).

Im Huhn entsprechen die  $\delta$ -Kristalline im zeitlichen Ablauf der Augenentwicklung den  $\gamma$ -Kristallinen der Maus. Die *Prox1*-Transkription im Huhn beginnt kurz vor der Expression des  $\delta$ -Kristallingens. Deshalb wird vermutet, dass Prox1 für die Aktivierung der  $\delta$ -Kristalline und vielleicht auch der  $\gamma$ -Kristalline benötigt wird (Tomarev et al., 1996).

*Prox1* wird in der Linse, aber auch in anderen Geweben, wie zum Beispiel bei der Maus in der Retina, in den Neuronen der subvetrikulären Region des ZNS, im lymphatischen System und im Pankreas exprimiert (Belecky-Adams et al., 1997; Oliver et al., 1993; Torii et al., 1999; Wigle et al., 1999<sup>®</sup>). In der Augenentwicklung der Maus



**Abbildung 1.6: Prox1-Expression in der Linse.**

Immunfärbung der Linse einer 10 Tage alten Wildtyp Maus werden mit polyklonalem Antikörper gegen *Prox1* durchgeführt. *Prox1* ist in den Zellkernen des Epithels und der Faserzellen zu erkennen (entnommen aus Tomarev et al., 1998).

wird *Prox1* zum ersten Mal in der Linsenplakode (E 9.5) beobachtet. Später liegt es im Linsenvesikel (E 10.0), und in den Linsenfasern vor (E 12.5). Im Linsenepithel konnte bis E 18.0 *Prox1*-Expression nur schwach nachgewiesen werden (Oliver et al., 1993; Tomarev et al., 1998). In der 10 Tage alten Maus ist *Prox1* noch immer in den Kernen der Linsenfasern und auch schwach im Epithel vorzufinden (Abbildung 1.6; Tomarev et al., 1998).

Das Gen wurde in der Maus ausgeschaltet (Wigle et al., 1999<sup>®</sup>), weshalb diese mitten in der Embryonalentwicklung an Entwicklungsdefekten stirbt. Dabei war zu beobachten, dass der Beginn der Linsenvesikelbildung in der mutierten Maus nicht verändert ist. Später (E 13.5) ist die Elongation der primären Linsenfasern betroffen. Die Linse bleibt hohl, weil die Faserzellen kaum von posterior elongieren. Die mutierte Linse ist im Vergleich zur Wildtyp-Linse kleiner. Die Inaktivierung des *Prox1* verursacht eine anomale Zellproliferation, eine verminderte Expression an Zellzyklus-Inhibitoren (*Cdkn1b* und *Cdkn1c*) und eine veränderte Apoptose. In den *Prox1*<sup>-/-</sup>-Mäusen werden einige  $\gamma$ -Kristalline unterschiedlich exprimiert. Es war beispielsweise für die  $\gamma$ BD-Kristalline im Gegensatz zu den  $\gamma$ EF-Kristallinen keine mRNS zu beobachten (Wigle et al., 1999<sup>®</sup>). Möglicherweise sind die  $\gamma$ -Kristalline als

Strukturgene ein wichtiges Element der Elongation der Faserzellen. Dabei ist noch nicht klar, ob Prox1 in den mutierten Mäusen direkt die  $\gamma$ -Kristalline reguliert.

#### 1.4.2 Bedeutung des Six3 in der Augenentwicklung

Das Homeobox-Gen *sine oculis* (*so*) aus *Drosophila* wird für die Entwicklung des Auges benötigt (Seimiya und Gehring, 2000) und hat einige Homologe in den Vertebraten, die sogenannte *Six*-Genfamilie. Unter diesen wird das *SIX3/Six3* als funktional ortholog zum *sine oculis* angesehen, weil es während der Augenentwicklung stark exprimiert wird (Granadino et al., 1999). Zwischenzeitlich konnte in phylogenetischen Analysen, die auf einem Vergleich der Nukleoidsequenzen basieren, gezeigt werden, dass die sechs *Six*-Gene (*Six1-6*) zwei eng verwandte Vorgänger mit identischer Homeobox in *Drosophila* haben, das *sine oculis* und das *optix*. Die nächsten Verwandten zu *sine oculis* sind in den Vertebraten die Gene *Six1*, *Six2* und *Six4*, *Six5*. Dem *optix* stehen die Gene *Six3*, *Six6* am nächsten. Mit *Six3* und *Six6* handelt es sich um paraloge Gene, die zueinander enger verwandt sind als zu den anderen Vertretern der *Six/so* Familie (Gallardo et al., 1999).

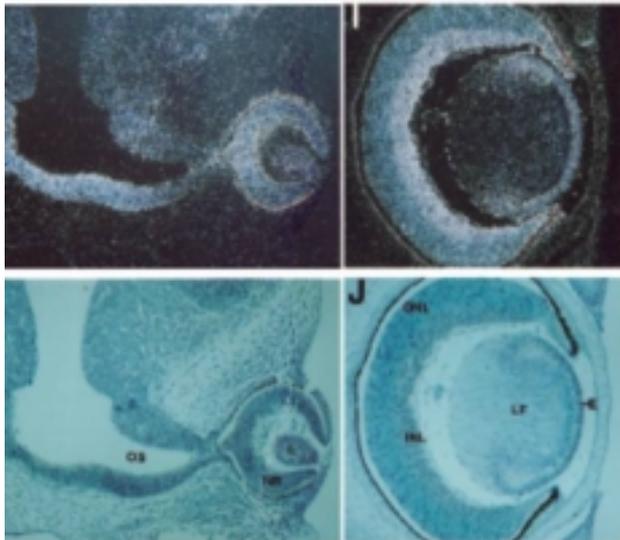
Auch die Expressionsmuster von *Six6* und *Six3* in der Maus sind sehr ähnlich. *Six6* wird allerdings nicht so sehr wie *Six3* im Gehirn und in den Augenanlagen exprimiert. In der Linse fehlt es ganz (Jean et al., 1999).

*Six3* wird in der Maus früh mit der Entwicklung der Neuralplatte (E 6.5) exprimiert und ist während der Augenentwicklung zu beobachten (Oliver et al., 1995). Seine Expression findet im Linsenvesikel (E 9.5) und später in der Linse statt. Es wird am E 12.5 noch im proliferierenden Linsenepithel und in den Faserzellen exprimiert. Einen Tag später zieht es sich langsam aus den Linsenfasern zum Epithel zurück und wird dort noch stark gebildet. Dieser Zeitraum fällt mit der  $\gamma$ -Kristallinexpression in der Maus zusammen. Die  $\gamma$ -Kristalline werden umgekehrt zu *Six3* in den Linsenfasern und nicht im Linsenepithel gebildet (E 14.5; Santhiya et al., 1995). Später (E 18.0) ist *Six3* in der Augenlinse nicht mehr nachzuweisen.

Mit *Six3* war es möglich ektopisch Linsen im Medaka-Fisch zu induzieren (Oliver et al., 1996). Damit ist gezeigt, dass *Six3* Zellen aus dem Stadium der Blastula zu Linsenzellen differenzieren lässt, in denen dann  $\gamma$ -Kristalline nachweisbar sind.

Mutationen im *Six3* können beim Menschen ernsthafte Erkrankungen auslösen oder sich letal auswirken. *De novo* Mutationen in der Homeobox dieses Gens wurden gefunden, die Holoprosenzephalie verursachen (Wallis et al., 1999). Eine Auswirkung dieser Krankheit ist eine Fehlentwicklung der Augenlinse, die zur Microphthalmie oder zur deformierten Linse führen kann.

Die durch Mutationen in der *Six3*-Homeodomäne verursachten Erkrankungen sind mit großer Gewissheit auf die Wechselwirkung mit DNS und die Wirkung des Proteins auf noch unbekannte Zielgene zurückzuführen. DNS-Sequenzen, an die *Six3* oder das sehr ähnliche *Six6* binden sind bis dato noch nicht bekannt. Es konnte zwar in DNS-Bindungsstudien eine Interaktion des *Six2*, *Six3*, *Six4* und *Six5* mit dem regulatorischen Element des Gens für die  $\alpha 1$  Untereinheit der Natrium-Kalium-ATPase (*Atp1a1*) nachgewiesen werden. Allerdings interagieren nur *Six2*, *Six4* und *Six5*, nicht *Six3* mit diesem Promotorelement spezifisch (Kawakami et al., 1996). Ebenso ist die Wirkungsweise des *Six3* auf die Transkription beispielsweise als Aktivator oder Repressor bestimmter Gene noch nicht aufgeklärt.



**Abbildung 1.7: *Six3*-Expression in Linse.**

*Six3* wird während der Augenentwicklung des visuellen Systems exprimiert. Die beiden linken Abbildungen zeigen das Auge der Maus zum Zeitpunkt E 11.5. Rechts ist die Linse am E 14.5 dargestellt. Oben ist die *in situ* Hybridisierung zu *Six3* im Dunkelfeld, unten im Hellfeld abgebildet. Anfangs (E 11.5) ist *Six3* in der sich entwickelnden Linse zu sehen, später (E 14.5) wird seine Expression nur noch im Linsenepithel und in der *bow region* beobachtet (entnommen aus Oliver et al., 1995).

## 1.5 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der linsenspezifischen Regulation der  $\gamma$ -Kristalline der Vertebraten.

Da eine Bindung und Aktivierung der  $\gamma$ -Kristallinpromotoren durch die  $\alpha$ -Kristalline am Promotorelement DOTIS beobachtet wurde (Pietrowski, Dissertation, 1995; Krausz, Dissertation, 1996), sollte zunächst gezeigt werden, ob die  $\gamma$ -Kristalline mittels kleiner Hitzeschockproteine induziert werden können. Der Effekt des  $\alpha$ -Kristallins sollte mit dem HSP27 des Menschen und dem Hsp17.9 von *Petroselinum* aus dem Pflanzenreich verglichen werden, die alle der  $\alpha$ -Hsp-Superfamilie angehören.

Zusätzlich werden zwei mögliche Faktoren, die beiden Homeodomänen-Proteine Prox1 und Six3, funktional am  $\gamma$ -Kristallinpromotor untersucht. Prox1 ist an der Elongation der Linsenfasern beteiligt (Wigle et al., 1999<sup>o</sup>). Deshalb sind die  $\gamma$ -Kristalline als ein Hauptbestandteil der Linsenfasern gute Kandidaten dafür, von Prox1 reguliert zu werden. Six3 ist bei der Entwicklung der Augenlinse von Bedeutung (Oliver et al., 1995). Erst dann, wenn die Six3-Expression in den Linsenfasern nachlässt, setzt die  $\gamma$ -Kristallinexpression ein. Aus diesem Grund ist Six3 möglicherweise bei der Regulation der  $\gamma$ -Kristalline von Bedeutung. Die Untersuchung des Einflusses von Prox1 und Six3 auf einen  $\gamma$ -Kristallinpromotor tragen zum Verständnis der zelltypspezifischen Regulation der  $\gamma$ -Kristalline bei.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien und sonstige Reagenzien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma, Deisenhofen und Merck, Darmstadt in p. a. Qualität bezogen. Mit Hilfe der Katalognummern sollen Verwechslungen ausgeschlossen werden. Die Firma Boehringer ist mittlerweile Bestandteil der Firma Roche, wobei die Katalognummern beibehalten wurden.

|   |   |
|---|---|
| Advantage <sup>TM</sup> PCR-Pure Kit                | Clontech, Heidelberg  |
| Agarose (Elektrophoresegrad)                        | Gibco Brl, Eggenstein   |
| Agarose (Small DNA Low Melt)                        | Biozym, Oldenburg   |
| Ampicillin  | Sigma, Deisenhofen; #A2804  |
| Biotin-16-2',3'-ddUTP                               | Boehringer Mannheim; #1427598   |
| Bacto-Tryptone                                      | Difco Laboratories, Detroit, USA; vertrieben von Otto Nordwald, Hamburg; #0123-17-3 |
| Bacto-Hefeextrakt                                   | Difco; #0140-01   |
| Coomassie Brilliant Blue G-250                      | Serva, Heidelberg ; #42655  |
| Dithiothreitol (DTT)                                | Sigma #D9779  |
| Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (1x), flüssig | Gibco Brl; #31885-023   |
| DNS-Molekulargewichtsstandard 3 und 8               | MBI Fermentas, St. Leon-Rot   |
| dNTP-Sets   | Pharmacia, Freiburg; Promega, Mannheim  |
| Dual-Luciferase <sup>TM</sup> Reporter Assay System | Promega, Mannheim; #1960  |
| Dynabeads M-280 Streptavidin                        | Deutsche Dynal GmbH, Hamburg  |
| Ethidiumbromid                                      | Peqlab Biotechnologie, Erlangen   |
| Filmaterial (Kodak XAR)                             | Eastman Kodak Company, New York, USA  |
| Fötales Kälberserum                                 | Gibco Brl; #10084-168   |
| Fungizone Lösung                                    | Gibco Brl; #15290-018   |
| Gentamycin, flüssig                                 | Gibco Brl; #15710-049   |
| Glycogen  | Boehringer Mannheim; #901393  |
| Kanamycin   | Sigma; #K0879   |
| Kaninchenserum                                      | Gibco Brl; #16120-032   |
| Magermilchpulver                                    | Nestle Deutschland AG, Frankfurt am Main  |
| MicroSpin <sup>TM</sup> G-25 Columns                | Pharmacia   |
| MicroSpin <sup>TM</sup> S-300 HR Columns            | Pharmacia   |
| Minimum Essential Medium (MEM) (1x), flüssig        | Gibco Brl, #31095-029   |
| NP13 (Detergenz)                                    | Atlas Chemie, Essen   |
| Nucleobond AX zur Plasmidisolierung                 | Macherey-Nagel, Düren   |
| NucleoSpin Kit                                      | Macherey-Nagel  |
| PCR-TOPO Cloning Kit                                | Invitrogen; NV Leek, Niederlande  |
| Penicillin/Streptomycin-Lösung                      | Gibco Brl; #15070-022   |
| Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)          | Biomol, Hamburg   |
| poly(dI-dC)   | Pharmacia, Freiburg; #27-7880   |
| Ponceau S   | Sigma; #P3504   |
| Profection Mammalian Transfection Systems           | Promega; #E1200   |
| Radiochemikalien                                    | Amersham & Buchler, Braunschweig  |
| RNAzol <sup>TM</sup> B                              | BIOZOL Diagnostica, Eching  |
| RSA (Rinderserumalbumin)                            | GIBCO BRL, Eggenstein   |
| SDS-Blotting-Membran (Nitrozellulose)               | BioRad Inc., München; #162-0170   |
| SDS-Blotting-Membran (PVDF)                         | Pall GmbH, Dreieich; #PVM020C3R   |
| TA Cloning Kit                                      | Invitrogen  |
| Tetracyclin   | Sigma; #T8032   |

|  |                            |
|--|----------------------------|
| TNT Quick Coupled<br>Transcription/Translation Systems | Promega; #4610             |
| T-Primed First-Strand Kit                              | Pharmacia; #27-9263-01     |
| Trypsin-EDTA (10x), flüssig                            | Gibco Brl; #35400-027      |
| Tween-20   | Sigma, Deisenhofen; #P7949 |
| Wasserstoffperoxid                                     | Fluka, Deisenhofen         |

## 2.2 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonucleotide wurden von U. Linzner (AG BioDV, Institut für Säugetiergenetik, GSF) hergestellt. Zur Sequenzierung werden die vektorspezifischen Primer (T7, T3, SP6) verwendet. Für PCR-Reaktionen werden folgende Primer eingesetzt.

### Amplifikation eines Fragments des *Six3/SIX3*-UTRs (*Mus*, *Homo*)

*Six3* 3'UTR (5') (22549) 5'-AGA ACA AAC CGA AAT CAG GAT AC-3'  
*Six3* 3'UTR (3') (22550) 5'-CAC ACT CCC ACC CCA GCC AA-3'

### Amplifikation eines Fragments des *Prox1/PROX1* des Exon IV und Exon V (*Mus*, *Homo*, *Oryctolagus*)

*Prox1* EIV-V(5') (19660) 5'-AAT GAC TTT GAG GTT CCA GAG AGA TTC CTG-3'  
*Prox1* EIV-V(3') (19661) 5'-CAA AGA TGT TGA TCC TTC CTG GAA GAA G-3'

### Amplifikation eines Fragments des *Hsp25* (*Mus*)

*hsp25* (5') (14289) 5'-CCG GAA TTC CAT GAC CGA GCG CCG CGT-3'  
*hsp25* (3') (14291) 5'-ATG CCC CGG GAT ATC ACT TGG CTC CAG ACT TCC  
 C-3'

### Amplifikation eines Fragments des $\beta$ -Actin-Gens von Exon III bis Exon V (*Mus*, *Homo*, *Oryctolagus*)

$\beta$ -Actin (5') (21920) 5'-CCT CCC TGG AGA AGA GCT A-3'  
 $\beta$ -Actin (3') (21921) 5'-CTG ATC CAC ATC TGC TGG AAG GTG G-3'

Zerlegung des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors (*Mus*) in 9 überlappende Sequenzen. Die hier aufgeführten, paarweise komplementären Einzelstränge wurden, wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, hybridisiert und im GRA-Assay (Kapitel 3.4.1) bzw. für die Protein-Affinitätsbindung (Kapitel 3.4.2.3) eingesetzt.

-214/-165 (18047) 5'- ATC AAG TGA CCC TTT TAA CCA GGT CAG TGA  
 TTT GTC ATC CAT TCG AAA GC - 3'  
 -165/-214 (18048) 5'- GCT TTC GAA TGG ATG ACA AAT CAC TGA CCT  
 NGT TAA AAG GGT CAC TTG AT - 3'  
 -184/-145 (18049) 5'- TTT GTC ATC CAT TCG AAA GCT CTG GAG AGT  
 CTA AGA TAA A - 3'  
 -145/-184 (18050) 5'- TTT ATC TTA GAC TCT CCA GAG CTT TCG AAT  
 GGA TGA CAA A - 3'

|           |         |  |
|-----------|---------|--|
| -164/-115 | (18051) | 5'- TCT GGA GAG TCT AAG ATA AAA CAT ACA ATA<br>ACC CAC ACC TCC CCC ATA GT - 3' |
| -115/-164 | (18052) | 5'- ACT ATG GGG GAG GTG TGG GTT ATT GTA TGT<br>TTT ATC TTA GAC TCT CCA GA - 3' |
| -134/-95  | (18053) | 5'- ACC CAC ACC TCC CCC ATA GTC ATT ATA TAG<br>AAA AGA GAG G - 3'              |
| -95/-134  | (18054) | 5'- CCC TCT TTT TCT ATA TAA TGA CTA TGG GGG<br>AGG TGT GGG T - 3'              |
| -114/-65  | (18055) | 5'- CAT TAT ATA GAA AAG AGA GGG GAA AAA AAG<br>TGC CCT GTC CCA CTG CGG GC - 3' |
| -65/-114  | (18056) | 5'- GCC CGC AGT GGG ACA GGG CAC TTT TTT TCC<br>CCT CTC TTT TCT ATA TAA TG - 3' |
| -84/-45   | (18057) | 5'- TGC CCT GTC CCA CTG CGG GCC CCT TTT GTG<br>CTG TTC CTG C - 3'              |
| -45/-84   | (18058) | 5'- GCA GGA ACA GCA CAA AAG GGG CCC GCA GTG<br>GGA CAG GGC A - 3'              |
| -64/-15   | (18059) | 5'- CCC TTT TGT GCT GTT CCT GCC AAC ACA GCA<br>GAC CTC CTG CTA TAT AGA CC - 3' |
| -15/-64   | (18060) | 5'- GGT CTA TAT AGC AGG AGG TCT GCT GTG TTG<br>GCA GGA ACA GCA CAA AAG GG - 3' |
| -34/+6    | (18061) | 5'- GAC CTC CTG CTA TAT AGA CCC TGC TCC CAG<br>CCC CAC ACA C - 3'              |
| +6/-34    | (18062) | 5'- GTG TGT GGG GCT GGG AGC AGG GTC TAT ATA<br>GCA GGA GGT C - 3'              |
| -14/+36   | (18063) | 5'- CTG CTC CCA GCC CCA CAC ACT CAA CAG CAC<br>CAT CCC ATC TGA CCT GCC AA - 3' |
| +36/-14   | (18064) | 5'- TTG GCA GGT CAG ATG GGA TGG TGC TGT TGA<br>GTG TGT GGG GCT GGG AGC AG - 3' |

### 2.3 Plasmide

|              |                                    |
|--------------|------------------------------------|
| pBSKS        | Stratagene, Amsterdam, Niederlande |
| pcDNA3.1     | Invitrogen                         |
| pCR 2.1      | Invitrogen                         |
| pEBFP        | Clontech                           |
| pRL-SV40     | Promega                            |
| pTracer-SV40 | Invitrogen                         |
| Rc/CMV       | Invitrogen                         |

### 2.4 Enzyme

Alle Enzyme werden mit den vom Hersteller mitgelieferten Puffern eingesetzt.

|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm | Boehringer Mannheim; #713023   |
| Alkalische Shrimp Phosphatase         | Roche; #1758250  |
| DNase I, RNase frei                   | Boehringer Mannheim; #776785   |
| Restriktionsendonucleasen             | GIBCO BRL; Boehringer Mannheim; New England Biolabs (NEB); Pharmacia |
| RNaseA                                | Sigma, #R4875  |
| RNase-Inhibitor                       | Boehringer Mannheim; #799017   |
| Taq-Polymerase                        | GIBCO-BRL; #18038-26   |
| T4-DNA-Ligase                         | Boehringer Mannheim; #481220   |
| T7-RNA-Polymerase                     | Boehringer Mannheim; #881767   |

### 2.5 Bakterienstämme

Die folgenden Bakterienstämme sind Abkömmlinge des Laborstammes *E. coli* K12. Die aufgelisteten Gene bezeichnen mutierte Allele.

|               |   |
|---------------|---|
| DH5 $\alpha$  | <i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> ( $r_k^- m_k^+$ ), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , $\Delta(lacZY A-argFV169)$ , $\Phi80\delta lacZ\Delta M15$ (Stratagene).   |
| JM107         | <i>mcrA-</i> , $\Delta(lac-proAB)$ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , F'[traD36 <i>proAB</i> , <i>laqI</i> <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15]; (Stratagene).  |
| JM109         | <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> ( $r_k^- m_k^+$ ), <i>mcrA-</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , $\Delta(lac-proAB)$ , <i>thi</i> , <i>supE44</i> , F'[traD36 <i>proAB</i> , <i>laqI</i> <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15]; (Stratagene).  |
| JM110         | <i>rpsL(str<sup>r</sup>)</i> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>thi-1</i> , <i>lacY</i> , <i>galK</i> , <i>galT</i> , <i>ara</i> , <i>tonA</i> , <i>tsx</i> , <i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>supE44</i> , $\Delta(lac-proAB)$ , F'[traD36 <i>proAB</i> , <i>laqI</i> <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15]; (Stratagene).              |
| Top10F'       | F'(lacI <sup>q</sup> , <i>Tn10(tet<sup>r</sup>)</i> , <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrCB)$ , $\Phi80lacZ\Delta M15$ , $\Delta lacX74$ , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara-leu)7697$ , <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL(Str<sup>r</sup>)</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i> ; (Invitrogen). |
| XL1-Blue MRF' | $\Delta(mcrA)183$ , $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ , <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>laqI</i> <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15, <i>Tn10(tet<sup>r</sup>)</i> ]; (Stratagene).  |

## 2.6 Zelllinien

### N/N 1003A

Die Linsenepithelzelllinie N/N1003A wurde aus *New Zealand White* Kaninchen isoliert (Reddan et al., 1986). Die Primärkultur verhält sich, ohne immortalisiert worden zu sein, wie eine Zelllinie. Sie besitzt eine epitheliale Morphologie mit einer Teilungsrate von 24 Stunden und wurde als genetisch stabil beschrieben (Reddan et al., 1986). Die Zelllinie wurde 1995 im ISG/GSF eingeführt.

### CD5A

Die CD5A-Zelllinie ist aus dem Augenlinsenepithel eines 5 Monate alten Patienten, der dem plötzlichen Kindstod erlag. Sie stammt aus dem Labor von R. Quinlan (Universität Dundee, Großbritannien). Ihr Expressionsmuster in der RT-PCR war für Pax-6,  $\alpha A$ -, und  $\alpha B$ -Kristallin positiv, für  $\beta B1$ -,  $\beta B2$ -,  $\gamma C$ -Kristallin, Filensin und CP49 negativ (persönliche Mitteilung, R. Quinlan, Dundee). Die Zelllinie wurde 1997 im ISG/GSF eingeführt.

### MAC67

Die MAC67 Zelllinie ist eine Linsenepithelzelllinie aus einem 35 jährigen Patienten mit Katarakt. Sie wurde, wie die CD5A-Zelllinie, auf endogene Expression von Pax-6,  $\alpha A$ -,  $\alpha B$ -Kristallin,  $\beta B1$ -,  $\beta B2$ -,  $\gamma C$ -Kristallin, Filensin und CP49 charakterisiert. Die MAC67 Zelllinie zeigt bis auf seine fehlende  $\alpha A$ -Kristallinexpression das gleiche Expressionsmuster wie die CD5A-Zelllinie (persönliche Mitteilung, R. Quinlan, Dundee). Die Zelllinie wurde 1997 im ISG/GSF eingeführt.

## 2.7 Medien und Lösungen

### Lösungen zur Agarosegelelektrophorese

|                              |  |
|------------------------------|--|
| 6x DNS-Ladepuffer            | 30 % Glycerol<br>0,2 % Bromphenolblau<br>0,2 % Xylencyanol<br>in Tris/HCl (pH 7,5) |
| 6x DNS-Ladepuffer            | 30 % Glycerol in Wasser  |
| EDTA-Stammlösung             | 0,5 M EDTA; pH 8,0   |
| TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer) | 10 mM Tris/HCl (pH 7,0)<br>1 mM EDTA   |
| 5x TBE (Tris-Borat-Puffer)   | 0,45 M Tris<br>0,45 M Borsäure<br>10 mM EDTA                                       |
| Ethidiumbromidstammlösung    | 10 mg/ml Ethidiumbromid in Wasser lösen,<br>lichtgeschützt bei 4 °C lagern.        |

### Medien und Stammlösungen zur Kultivierung von *E. coli* Bakterienstämmen

|  |   |
|--|---|
| LB-Medium (Luria-Bertani)                            | 1 % Bacto-Tryptone<br>0,5 % Bacto-Hefeextrakt<br>1 % NaCl<br>mit NaOH auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren  |
| LB-Agar  | 15 g/l LB-Medium<br>Difco-Agar, autoklavieren   |
| SOC-Medium   | 2 % Bacto-Tryptone<br>0,5 % Bacto-Hefeextrakt<br>10 mM NaCl<br>2,5 mM KCl<br>10 mM MgSO <sub>4</sub><br>mit NaOH auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren<br>20 mM Glucose sterilfiltrieren |
| X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactosidase) | 20 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid<br>lichtgeschützt bei -20 °C lagern.   |
| IPTG (Isopropylthio-β-D-Galactoside)                 | 200 mg/ml IPTG in Wasser lösen, sterilfiltrieren,<br>bei -20 °C lagern.   |

### Antibiotika Stammlösungen

|             |                   |
|-------------|-------------------|
| Ampicillin  | 10mg/ml in Wasser |
| Kanamycin   | 10mg/ml in Wasser |
| Tetracyclin | 10mg/ml in Wasser |
| Zeozin      | 10mg/ml in Wasser |

Zur Selektion mit Antibiotika wird den Selektionsmedien 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin, 25 µg/ml Zeocin oder 12,5 µg/ml Tetracyclin zugesetzt. Zur

blau/weiß-Selektion von Bakterienkolonien setzt man 40 µl X-Gal- und 4 µl IPTG-Stammlösung den LB-Agarplatten (d 75 mm) zu.

### Lösungen zur Herstellung hitzekompetenter Bakterien

|               |  |  |
|---------------|--|--|
| TB1           | 12 g<br>9,9 g<br>30 ml<br>1,5 g<br>ad 1 l<br>Eisessig auf pH 5,8 einstellen, sterilfiltrieren.     | RbCl<br>MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O<br>1 M Kaliumacetat, pH 7,5<br>CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O<br>Wasser |
| TB2           | 1,2 g<br>150 g<br>20 ml<br><br>11 g<br>ad 1 l<br>Mit NaOH auf pH 6,8 einstellen, sterilfiltrieren. | RbCl<br>Glycerol<br>0,5 M MOPS-Acetat<br>(pH 6,8)<br>CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O<br>Wasser                          |
| 2x TSS-Lösung | 20 % (w/v)<br>10 %<br>100 mM   | PEG<br>DMSO<br>MgCl <sub>2</sub><br>HCl (pH 6,5)   |

### Lösungen zur Plasmidpräparation

|                         |                         |                                      |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| GET (Glucose-EDTA-Tris) | 50 mM<br>10 mM<br>25 mM | Glucose<br>EDTA<br>Tris-HCl (pH 8,0) |
| alkalische SDS-Lösung   | 0,2 N<br>1 %            | NaOH<br>SDS                          |
| Hochsalzlösung          | 3 M<br>1,8 M            | Kaliumacetat<br>Ameisensäure         |

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)

### Lösungen zur Polyacrylamidgelelektrophorese

|                                |  |   |
|--------------------------------|--|---|
| 10 % SDS (Sodiumdodecylsulfat) | 10 % (w/v) in Wasser lösen             |   |
| 10x Anodenpuffer               | 0,2 M                                  | Tris-HCl (pH 8,9)                                     |
| 5x Kathodenpuffer              | 75 ml<br>26,88 g<br>15 ml<br>ad 300 ml | 2 M Tris-HCl (pH 8,9)<br>Tricin<br>10 % SDS<br>Wasser |
| Acrylamidlösung (40 %)         | 380 g<br>20 g<br>ad 1 l                | Acrylamid<br>Bisacrylamid<br>Wasser                   |
| APS (Ammoniumpersulfat)        | 0,1 g/ml                               | APS in H <sub>2</sub> O, bei 4 °C lagern              |
| Gelpuffer I                    | 3 M                                    | Tris-HCl (pH 8,5)                                     |

|                   |  |  |
|-------------------|--|--|
|                   | 3 ml<br>ad 100 ml                      | 10 % SDS<br>Wasser   |
| 2x Laemmli-Puffer | 50 %<br>4 %<br>0,2 M<br>0,1 %<br>0,1 % | Glycerol<br>SDS<br>Tris-HCl (pH 6,8)<br>Serva Blue<br>$\beta$ -Mercaptoethanol |

### Lösungen zur Färbung von Proteinen

|   |                                  |   |
|---|----------------------------------|---|
| Coomassie Färbelösung   | 5g<br>450 ml<br>100 ml<br>ad 1 l | Coomassie Brillant Blue<br>G250<br>Methanol<br>Eisessig<br>Wasser                     |
| Entfärbelösung  | 50 %<br>10 %<br>ad 1 l           | Methanol<br>Eisessig<br>Wasser  |
| Ponceau S Färbelösung   | 1 g<br>15 g<br>15 g<br>ad 50 ml  | Ponceau S<br>Trichloressigsäure<br>5-Sulfosalicylsäure<br>Wasser                      |
| Silbernitrat-Lösung (10 %)  | 0,1 g/ml                         | AgNO <sub>3</sub> in Wasser   |
| Formalin (37 % Formaldehyd)   | 370 g/l                          | Paraformaldehyd in Wasser<br>mit konzentrierter NaOH bei<br>50 °C lösen. HCl (pH 7,0) |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Natriumcarbonat, 2 %)                  | 20 g/l                           | in Wasser   |
| Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (Natriumthiosulfat, 10 %) | 100 g/l                          | in Wasser   |

### „Westernblot“-Lösungen

|          |                            |  |
|----------|----------------------------|--|
| PBS-T    | 0,1 %                      | Tween-20 in PBS                              |
| Puffer A | 150 ml<br>200 ml<br>ad 1 l | 2 M Tris-HCl (pH 10,0)<br>Methanol<br>Wasser |
| Puffer B | 10 ml<br>200 ml<br>ad 1 l  | 2 M Tris-HCl (pH 10,0)<br>Methanol<br>Wasser |
| Puffer C | 12,5 ml<br>ad 1 l          | 2 M Tris-HCl (pH 10,0)<br>Wasser             |

### Lösungen für den Gel-Retardationsassay

|                                    |                         |                                       |
|------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|
| 3x Bindepuffer nach Shastry (1993) | 450 mM<br>60 mM<br>24 % | KCl<br>HEPES-HCl (pH 7,9)<br>Glycerol |
|------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|

|                        |           |                          |
|------------------------|-----------|--------------------------|
|                        | 15 mM     | MgCl <sub>2</sub>        |
|                        | 6 mM      | EDTA                     |
|                        | 120 mg/ml | Poly(dI-dC)              |
| 3x Bindepuffer (2)     | 150 mM    | Tris HCl (pH7,9)         |
|                        | 0,3 mM    | EDTA                     |
|                        | 0,03 %    | NP13 (Detergenz)         |
|                        | 3 mM      | DTT                      |
|                        | 30 %      | Glycerol                 |
|                        | 210 mM    | NaCl                     |
| Lauf- und Gelpuffer    | 35 mM     | Tris-Essigsäure (pH 7,7) |
|                        | 10 mM     | NaAcetat                 |
|                        | 5 mM      | EDTA                     |
| Polyacrylamidgel (6 %) | 1,8 g     | Acrylamide               |
|                        | 0,09 g    | Bisacrylamide            |
|                        | ad 30 ml  | Wasser                   |
|                        | 240 µl    | APS (10 %)               |
|                        | 20 µl     | TEMED                    |
| 10x Auftragpuffer      | 4 mM      | Tris-HCl (pH 7,9)        |
|                        | 50 %      | Glycerol                 |
|                        | 0,25 %    | Bromphenolblau           |

### Protein-Präzipitation

Bindepuffer wie im Gel-Retardationsassay

|             |        |                   |
|-------------|--------|-------------------|
| Waschpuffer | 50 mM  | Tris HCl (pH 7,9) |
|             | 0,1 mM | EDTA              |
|             | 0,01 % | NP13              |
|             | 1 mM   | DTT               |
|             | 10 %   | Glycerol          |
|             | 70 mM  | NaCl              |
|             | 200 mM | KCl               |

### Lösungen zur Calciumphosphat-Transfektion

|  |   |  |
|--|---|--|
| 2x HBS (HEPES-Buffered Saline)         | 50 mM   | HEPES (pH 7,1)                                   |
|  | 280 mM  | NaCl   |
|  | 1,5 mM  | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 |
|  | NaOH (pH 7,05)                                |  |
| Calciumchlorid-Stammlösung             | 2M  | CaCl <sub>2</sub> in Wasser,<br>sterilfiltrieren |
| PBS-Puffer (Phosphate-Buffered Saline) | 8 g   | NaCl   |
|  | 1,44 g  | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 |
|  | 0,24 g  | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 |
|  | ad 1 l Wasser, mit HCl auf pH 7,3 einstellen. |  |

### Sonstige Puffer

|            |                |                   |
|------------|----------------|-------------------|
| PCR-Puffer | 100 mM         | Tris/HCl (pH 8,3) |
|            | 15 mM          | MgCl <sub>2</sub> |
|            | 500 mM         | KCl               |
|            | optional 0,1 % | Glycerin          |

|         |  |
|---------|--|
| RNase A | 10 mg/ml in 10 mM Natriumacetat (pH 5,2)<br>lösen; 15' auf 100 °C erhitzen und auf<br>Raumtemperatur abkühlen; mit 0,1<br>Volumenanteilen 1 M Tris/HCl (pH 7,4) pH<br>einstellen; bei -20 °C lagern. |
|---------|--|

### Lösungen für die Affinitätsbindung

|                |  |  |
|----------------|--|--|
| 3* Bindepuffer | 150 mM<br>0,3 mM<br>0,03 %<br>30 %<br>210 mM           | Tris HCl (pH 7,9)<br>EDTA<br>NP13 (Detergenz)<br>Glycerol<br>NaCl        |
| 3* Waschpuffer | 150 mM<br>0,3 mM<br>0,03 %<br>30 %<br>210 mM<br>600 mM | Tris HCl (pH 7,9)<br>EDTA<br>NP13 (Detergenz)<br>Glycerol<br>NaCl<br>KCl |

## 2.8 Antikörper

|   |   |
|---|---|
| Anti- $\alpha$ A-Kristallin (Kaninchen IgG) | van den Ijssel, Universität Dundee, Großbrit.               |
| Anti-HSP27 (Kaninchen IgG)                  | van den Ijssel, Universität Dundee, Großbrit.               |
| Anti-Prox1 (Kaninchen IgG)                  | Tomarev, NEI/NIH, USA                                       |
| Ziege-anti-Kaninchen IgG (AP-gekoppelt)     | Jackson Immuno Research, vertrieben von<br>Dianova, Hamburg |

## 2.9 Zellkulturgefäße

|   |  |
|---|--|
| 10 cm Zellkulturplatten                 | Falcon   |
| 6 cm Zellkulturplatten                  | Falcon   |
| 35 mm Zellkulturplatten (6 er Platten)  | Falcon   |
| 22 mm Zellkulturplatten (12 er Platten) | Nunc, vertrieben von der Fisher Scientific<br>GmbH, Nidderau |
| 50 ml Zellkulturflächen                 | Nunc   |
| 260 ml Zellkulturflächen                | Nunc   |
| 15 ml Röhrchen                          | Nunc   |
| 14 ml Röhrchen                          | Nunc   |
| 2 ml Reaktionsgefäße                    | Eppendorf, Hamburg   |
| 1,5 ml Reaktionsgefäße                  | Eppendorf  |

## 2.10 Geräte

|  |                                |
|--|--------------------------------|
| Agarose Gelelektrophoresekammer          | Gibco BRL, Eggenstein          |
| Bakterienbrutschrank                     | WT-Binder, Bottmingen, Schweiz |
| Bakterienschüttler                       | Infors, München                |
| Geltrockner, Modell 583                  | Bio-Rad, München               |
| Heizblock (Thermostat 5320)              | Eppendorf, Hamburg             |
| Kühltischzentrifuge (Universal 16 R)     | Hettich, Tuttlingen            |
| Kühlzentrifuge (Sorvall RC-5B)           | Sorvall, Bad Homburg           |
| Lichtmikroskop (Axiovert 35)             | Zeiss, Oberkochen              |
| Luminometer (Autolumat LB953)            | Berthold, Bundoora, Australien |
| PCR-Gerät (Robocycler Gradient 40 Combo) | Stratagene, Amsterdam          |
| Photometer (Ultrospec III)               | Pharmacia, Freiburg            |
| Polyacrylamid Gelelektrophoresekammer    | Biometra, Göttingen            |
| Szintillationszähler (Easycount)         | Scotlab, UK                    |
| Tischzentrifuge (Biofuge pico)           | Heraeus, Hanau                 |
| Zellkulturbrutschrank                    | Heraeus                        |
| Zellkultur Sterilbank                    | Gelaire, Opera, Italien        |

### 3 Methoden

Sämtliche Chemikalien, Lösungen und Oligonukleotide, die verwendet wurden, sind im Kapitel 2 zu finden. Die Reaktionen wurden, sofern nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

#### 3.1 Rechner-unterstützte Sequenzanalyse

Die Vorbereitung von Experimenten mit Nucleinsäuren und Polypeptiden wird mit Hilfe eines Personal-Computers durchgeführt. Dabei kommen die beiden kommerziellen Programme Vector NTI und *MatInspector*, sowie die im weltweiten Netz kostenfrei zugänglichen Programme von ExPASy und des NCBI zum Einsatz.

##### 3.1.1 Vector NTI

Das Computerprogramm Vector NTI Suite 5.5 ist geeignet, Restriktionskarten zu entwerfen, Primer zu entwickeln, cDNS zu translatieren und den Entwurf von Klonierungen zu unterstützen. Sequenzen aus der Datenbank sind im Vergleich darstellbar (AlignX), und der Verwandtschaftsgrad kann bestimmt werden.

##### 3.1.2 *MatInspector*

Zur Analyse der  $\gamma$ -Kristallinpromotoren auf potentielle Bindestellen von Transkriptionsfaktoren wird das Computerprogramm *MatInspector professional* ([http://genomatix.gsf.de/cgi-bin/mat\\_fam/mat\\_fam.pl](http://genomatix.gsf.de/cgi-bin/mat_fam/mat_fam.pl)) eingesetzt. Mit diesem Programm wird die DNS-Sequenz hinsichtlich kurzer Bindestellen, die mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit an der Bindung beteiligt sind und als „core“-Matrix, bezeichnet werden, vorsortiert und anschließend mit der gesamten Bindematrix aus der Literatur verglichen (Quandt et al., 1995). Die Wahrscheinlichkeit, mit der einem regulatorischen Motiv eine Funktion zukommt, wird wiedergegeben. Die Parameter für die „core“-Matrix und die gesamte Bindematrix werden, falls nicht extra beschrieben, automatisch gewählt.

##### 3.1.3 ExPASy

ExPASy (Expert Protein Analysis System, <http://www.expasy.ch>) ist ein Server des schweizerischen Instituts für Bioinformatik. Mit diesem Server ist es möglich, Proteinsequenzen hinsichtlich des Molekulargewichts, des isoelektrischen Punktes, der Hydrophobizität, der sekundär Struktur etc. zu analysieren. Auf diese Weise bekommt

man einen ersten Eindruck über die Eigenschaften eines Proteins, das biochemisch und molekulargenetisch noch wenig oder gar nicht untersucht ist.

### 3.1.4 NCBI

Die öffentliche Datenbank NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) bietet ein breites Spektrum an Suchprogrammen zur Bewältigung der Datenfülle aller bekannten DNS-Sequenzen unterschiedlicher Spezies und der schnell wachsenden Menge der Literatur im Bereich der Medizin und Biologie. Diese Datenbank wurden für den Vergleich von Sequenzen mit den bis jetzt bekannten Genomen eingesetzt (BLAST) und bietet dazu ein vielfältiges Angebot zur Analyse von DNS-Sequenzen (GenBank) und zur Literatursuche (*PubMed*).

## 3.2 Allgemeine molekulargenetische Methoden

Grundlage für molekulargenetisches Arbeiten ist es, eine bestimmte DNS zu vervielfältigen und zu verändern. Dazu wird das gewünschte Plasmid in Bakterien transformiert, darin amplifiziert und aus ihnen präpariert. Die DNS wird analysiert und aufgereinigt. Danach ist es möglich, die DNS zu modifizieren und neu zu klonieren.

### 3.2.1 Transformation kompetenter Bakterien

Vektoren werden in Bakterienstämme transformiert und auf diese Weise amplifiziert. Dafür wird ein Bakterienstamm (DH5 $\alpha$ , JM107, JM109 oder JM110) auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und anschließend übernacht bei 37 °C inkubiert. Mit einer einzelnen Kolonie werden 2 ml LB-Medium angeimpft und wieder übernacht bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien werden 1:100 in 50 ml SOC- oder LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 inkubiert. Die Bakteriensuspension wird im Ethanol-Trockeneisbad auf 0 °C abgekühlt und anschließend 5 min bei 4° C und 5000 U/min (Sigma, Typ: 3K18, Rotor: Nr.12150) abzentrifugiert.

Zur Herstellung **hitze-kompetenter Bakterien** wird das Pellet in 16 ml eisgekühltem TB1-Puffer resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert. Danach wird das Pellet in 4 ml TB2-Puffer resuspendiert. Die kompetenten Zellen können in 200  $\mu$ l Aliquots in flüssigem Stickstoff gefroren und bei –80 °C gelagert werden. Zur Transformation werden 100  $\mu$ l kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut mit 5 ng Plasmid-DNS oder 2  $\mu$ l Ligationsansatz vorsichtig gemischt, eine halbe Stunde auf

Eis inkubiert, anschließend für 60 s einem Hitzeschock (42 °C) ausgesetzt und gleich danach für 2 min auf Eis gekühlt. Die Bakteriensuspension wird bis auf 1 ml Gesamtvolumen mit LB-Medium aufgefüllt und eine Stunde bei 37 °C geschüttelt.

Zur Herstellung **chemokompetenter Bakterien** (Chung et al., 1989) wird das Pellet in 4 ml LB-Medium resuspendiert und zur Aufbewahrung eingefroren. Durch die Zugabe einer 2x TSS-Lösung erhält man kompetente Bakterien. 100 µl kompetenter Zellen werden mit 20 bis 200 ng Plasmid-DNS 20 min inkubiert.

Abschließend werden je 100 µl transformierter Bakteriensuspension auf Selektivmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Man erhält Klone, deren Plasmide präpariert und analysiert werden.

### 3.2.2 Präparation von Plasmid-DNS

Nach der Beschreibung einer Plasmid-Präparation nach Birnboim (1979) werden 0,8 ml LB mit je einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht in 2 ml Reaktionsgefäßen kultiviert. Die Zellen werden abzentrifugiert und das Zellpellet in 150 µl kaltem GET-Puffer resuspendiert. Die Suspension wird 5 min auf Eis inkubiert und mit 200 µl alkalischer SDS-Lösung versetzt. Nach vorsichtigem Durchmischen werden 150 µl kalte Hochsalzlösung zugesetzt. Die Proben werden 10 min zentrifugiert und 400 µl der Überstände werden mit 200 µl Phenol und 200 µl Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) gut durchmischt. Eine 3 min Zentrifugation trennt die wässrige von der phenolhaltigen Phase. Die wässrige Phase wird abgenommen und mit Ethanol gefällt (Kapitel 3.2.4.1). Nach 15 min Zentrifugation (Universal 16 R, Hettich, Rotor: 1617; 5000 U/min, 4 °C) wird das Pellet getrocknet und in 40 µl TE-Puffer aufgenommen.

Alternativ werde Plasmid-DNS mit dem NucleoSpin Kit (Macherey-Nagel) isoliert. Zur Herstellung größerer Mengen an Plasmid werden 30 bzw. 100 ml Bakteriensuspension nach Herstellerangaben über Nucleobond-Säulen (AX-100; AX-500) gereinigt.

### 3.2.3 Analyse von Nucleinsäuren

Zuerst wird von einer DNS Präparation die Konzentration bestimmt. Dann werden Restriktionsverdau oder Polymerasekettenreaktion zur genaueren DNS-Analyse vorbereitet (Kapitel 3.1.1) und mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt. Falls eine exaktere Analyse notwendig ist, folgt die DNS-Sequenzierung.

### 3.2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Für die Quantifizierung der DNS-Konzentration wird die Extinktion bei den Wellenlängen 260 und 280 nm gemessen. Die Messung bei 260 nm erlaubt die Berechnung der Konzentration der Nucleinsäure in der Probe. Eine OD von 1 entspricht näherungsweise 50 µg/ml Doppelstrang-DNS, 40 µg/ml Einzelstrang-DNS, sowie RNS und 20 µg/ml Einzelstrang-Oligonucleotiden. Das Verhältnis aus den Extinktionen 260 und 280 nm ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) erlaubt eine Abschätzung der Reinheit der Nucleinsäure. Reine Präparationen von DNS und RNS weisen einen  $OD_{260}/OD_{280}$ -Wert zwischen 1,8 und 2,0 auf. Im Falle einer Protein- oder Phenolkontamination ist das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  signifikant kleiner als die angegebenen Werte und die photometrische Bestimmung ist nicht möglich (Sambrook et al., 1989).

### 3.2.3.2 Restriktionsendonuclease

Die Restriktionsendonucleasen werden mit dem vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer verwendet. Eine Einheit der gewünschten Restriktionsnuclease wird pro µg Plasmid-DNS in 25 µl Endvolumen eine Stunde lang verdaut und anschließend nach Zugabe von DNS-Laufpuffer auf einem Agarosegel aufgetragen (Kapitel 3.2.3.4).

### 3.2.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wird zur spezifischen Amplifikation einer DNS-Sequenz herangezogen, die zwischen zwei bekannten DNS-Abschnitten liegt. Benötigt wird dafür ein DNS-Molekül als Matrize, zwei Oligonucleotide, die als „Primer“ der PCR dienen, Desoxyribonucleide (dNTPs) und eine thermostabile Polymerase. Zuerst wird durch Erhitzen des Reaktionsansatzes der Doppelstrang des „Templates“ aufgeschmolzen (Denaturierung, 95 °C, 5 min), die Temperatur zur Anlagerung der „Primer“ abgesenkt (Primer-Hybridisierung, zwischen 40 °C und 65 °C, 60 s) und anschließend auf die Temperatur von 72 °C erhöht (Elongation, 60 s), bei der die thermostabile Polymerase den jeweils komplementären Strang synthetisieren kann. Der entstandene Doppelstrang wird ab jetzt nur noch 60 s denaturiert, und die gesamte Prozedur 10 bis 45 mal wiederholt. Abschließend wird für 10 min elongiert, um eine vollständige Replikation zu gewährleisten.

Die PCR-Reaktionen werden in einer Robocycler Gradient 40 Combo Maschine (Stratagene) durchgeführt. Eine 20 µl Reaktionsmischung enthält im einzelnen: 10 ng genomische DNS, cDNS oder Plasmid-DNS, 2 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM), 2 µl 10x

PCR-Puffer, 2 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM Stammlösung), je 2 µl Primer (50ng/µl), 0,2 µl Taq-Polymerase (Gibco) und ein entsprechendes Volumen Wasser. Die Primer-Hybridisierungstemperatur wird für jedes Primerpaar mittels des Computerprogramms OligoED (T. Werner, AG BioDV, ISG/GSF) ermittelt und experimentell optimiert.

### 3.2.3.4 Agarosegelelektrophorese

Nucleinsäuren werden in TBE-Puffer gelelektrophoretisch aufgetrennt. Je nach den aufzutrennenden Fragmentlängen wird die Konzentration des Agarosegels zwischen 0,8 und 4 % ausgewählt (Tabelle 3.1). Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 V und einer Dauer von 1 – 2 Stunden. Anschließend wird das Gel in einer Ethidiumbromidlösung (1µg/ml) gefärbt und im UV-Licht (366 nm) fotografiert. Mischungen aus DNS-Fragmenten bekannter Länge werden zur Standardisierung der Proben eingesetzt.

|  |       |         |           |            |
|--|-------|---------|-----------|------------|
| Konzentration des Agarosegels [%]        | 0,8   | 2       | 3         | 4          |
| Agarose [%]                              | 0,8   | 2       | 2         | 2          |
| Agarose mit niedrigerem Schmelzpunkt [%] | -     | -       | 1         | 2          |
| Trennbereich [kbp]                       | 1 - 6 | 0,3 - 1 | 0,2 - 0,6 | 0,07 - 0,4 |

**Tabelle 3.1: Agarosegele zur Auftrennung von DNS-Fragmenten unterschiedlicher Länge.**

### 3.2.3.5 Sequenzierung von Nucleinsäuren

Plasmide und PCR-Produkte werden mittels der Kettenabbruchreaktion nach Sanger et al. (1977) sequenziert. Die Sequenzierung wird von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) mit Hilfe eines ABI 373A Sequenzierers (Applied Biosystems) durchgeführt.

## 3.2.4 Reinigung von Nucleinsäuren

Nucleinsäuren dürfen für Restriktionen oder Modifikationen keine Verunreinigungen durch Chloroform (Kapitel 3.2.1), Salze, Vektorfragmente, Oligonucleotide etc. enthalten. Dafür bewähren sich die Reinigungsmethoden der Alkoholfällung und der DNS-Präparation aus dem Agarosegel.

### 3.2.4.1 Ethanol- und Isopropanolfällung

Die Alkoholfällung von Nucleinsäuren wird unter Zugabe von Ethanol und einer geringen Menge einwertiger Kationen ermöglicht. Im einzelnen werden zu 1 Volumen

DNS-Lösung 0,1 Volumenanteil 4 M Lithiumchlorid- oder 3 M Natriumacetatlösung und 2,5 Volumina kaltes Ethanol (100 %; -20 °C) zugesetzt, 60 min bei -80 °C eingelagert und anschließend abzentrifugiert (15 min, 4 °C, 12000 g). Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit kaltem Ethanol (70%) gewaschen und erneut unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert. Der Überstand wird vollständig abgesaugt und das Pellet in Vakuum getrocknet. Danach wird die DNS in Wasser aufgenommen.

Bei der Isopropanolfällung werden im Vergleich zur Alkoholfällung die 2 Volumina Ethanol durch ein Volumen Isopropanol ersetzt.

#### **3.2.4.2 DNS-Präparation aus dem Agarosegel**

Das gewünschte DNS-Fragment wird aus dem Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel unter UV-Licht ausgeschnitten. Das DNS-Fragment wird unter Hochsalzbedingungen aus dem Gelstück gelöst und an eine SiO<sub>2</sub>-Matrix gebunden. Nach zwei Waschschrritten kann die DNS mit H<sub>2</sub>O eluiert werden. Für diese Aufreinigung wird das Advantage<sup>TM</sup> PCR-Pure Kit (Clontech) nach Angaben des Herstellers verwendet.

#### **3.2.5 Klonierung und Subklonierung von Nucleinsäuren**

Um die codierende Sequenz eines Gens für Analysen zu erhalten, wird die mRNA aus dem entsprechenden Gewebe präpariert, ihr komplementärer DNS Strang produziert und mit PCR die gewünschte DNS vervielfältigt. Diese kann nach geeignetem Restriktionsverdau in Vektoren ligiert und so amplifiziert werden.

Liegt im Gegensatz dazu die entsprechende cDNS bereits in einem Vektor vor, kann sie in einen anderen Vektor umkloniert werden. In diesem Fall spricht man von Subklonierung.

##### **3.2.5.1 Präparation von Ribonucleinsäuren**

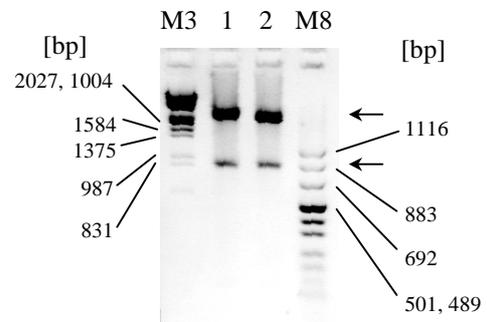
Für die Präparation von RNS werden die Zellen nach ihrer Ernte in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C eingelagert. Der Aufschluss der Zellen sowie die Präparation ihrer RNS erfolgt mit dem RNeasy Kit (Qiagen) und ist vom Hersteller beschrieben. Es ist darauf hinzuweisen, dass die Arbeit mit RNS wegen der stabilen RNasen sehr große Sorgfalt erfordert. Deshalb werden alle dafür benötigten Lösungen, ausgenommen Tris-haltige Lösungen, mit 0,01 % DEPC behandelt, um die RNase zu inhibieren.

### 3.2.5.2 Erststrangsynthese von cDNS

Für das Umschreiben von mRNA in cDNS werden reverse Transkriptase, Oligo-d(T)-Primer und Gesamt-RNS aus Zellen benötigt. Zur Durchführung wird das T-Primed First-Strand Kit (Pharmacia) verwendet und pro Reaktionsansatz 5 µg Gesamt-RNS in einem Endvolumen von 33 µl eingesetzt. Ein Aliquot der Synthese (4 µl, 60 min, 37 °C) wird mit einer Elektrophorese eines 1 % Agarosegels überprüft (Abbildung 3.1). Zu einem Volumen Syntheseprodukt werden 9 Volumina Wasser zugesetzt, und diese cDNS-Lösung aliquotiert und eingefroren. Für nachfolgende PCR-Reaktionen werden 2 µl der cDNS als Template eingesetzt.

**Abbildung 3.1: RNS-Präparation aus Linseneithelzellen.**

M3 und M8 bezeichnet die DNS-Molekulargewichtsstandards 3 und 8. In den Spuren 1 und 2 sind RNS-Präparationen der CD5A und der N/N1003A-Zelllinien aufgetragen. Die Pfeile weisen auf die Signale ribosomaler RNS hin. Die *messenger* RNS erscheint als feines Signal in allen Größen.



### 3.2.5.3 Ligation

Zur Vorbereitung wird Vektor-DNS mit der entsprechenden Restriktionsnuclease geschnitten und anschließend das Restriktionsenzym durch Hitze inaktiviert. Danach werden überhängend („sticky-ended“) bzw. glatt endende („blunt-ended“) DNS-Fragmente mit alkalischer Shrimp Phosphatase inkubiert. Das Erwärmen des Reaktionsansatzes inaktiviert die alkalische Shrimp Phosphatase. Durch Zusatz des gewünschten DNS-Fragments und der T4-DNS-Ligase wird die Ligation ermöglicht, dessen Produkt in Bakterien transformiert werden kann. Die einzelnen Schritte sind im Detail in Tabelle 3.2 beschrieben.

|           |  |  |
|-----------|--|--|
| <b>1.</b> | <b>Vektor-DNS Spaltung</b><br>Vektor-DNS<br>Restriktionsendonuclease<br>Reaktionspuffer (10*)<br>Endvolumen<br>Inkubation<br>Hitze-Inaktivierung                             | 50 ng<br>3,0 Einheiten<br>0,7 µl<br>4,8 µl<br>10 min, 37 °C<br>15 min, 65 °C           |
| <b>2.</b> | <b>Dephosphorylierung</b><br>Dephosphorylierungspuffer<br>Alkalische Schrimp Phosphatase<br>Endvolumen<br>Inkubation<br>(„blunt-ended“ DNS-Fragmente)<br>Hitze-Inaktivierung | 0,9 µl<br>1,0 Einheiten<br>6,7 µl<br>10 min, 37 °C<br>(60 min, 37 °C)<br>15 min, 65 °C |
| <b>3.</b> | <b>Ligation</b><br>DNS-Fragment<br>Ligationspuffer (10x)<br>T4-DNS-Ligase<br>Endvolumen<br>Inkubation  | 150 ng<br>1,5 µl<br>5 Einheiten<br>15 µl<br>60 min, RT                                 |

Tabelle 3.2: Durchführung von Ligationen.

### 3.3 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

Eine wichtige Information zur Identifizierung von Proteinen ist ihre Proteingröße. Um sie zu bestimmen, wird zunächst ein Proteinlysate hergestellt und dessen Proteinkonzentration bestimmt. Anschließend kann die Proteingrößen durch SDS-Gelelektrophorese ermittelt werden. Der sichere Nachweis eines bestimmten Proteins wird durch die Analyse im Westernblot erreicht.

#### 3.3.1 Proteinpräparation

Die Bakterien oder Zellen werden in einem Lyse-Puffer suspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 37 °C aufgetaut. Nach drei Zyklen des Einfrierens und Auftauens werden die nicht löslichen Zelltrümmer abzentrifugiert. Überstand und Pellet werden für die Proteincharakterisierung verwendet.

#### 3.3.2 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösungen wird das Verfahren von Lowry im BioRad D<sub>C</sub> Protein Assay Kit eingesetzt (Lowry et al., 1951). Dafür werden

5  $\mu\text{l}$  Proteinlösung pro Proteinbestimmung und eine Eichgerade von 0 bis 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  RSA benötigt. Die Proteinnachweisreaktion wird photometrisch bei 750 nm gemessen.

### 3.3.3 SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli

Die analytische Auftrennung von Proteinen wird mit vertikalen Polyacrylamid-SDS-Gelen durchgeführt (Laemmli et al., 1970; Studier et al., 1973). Dafür wird die Biorad Gelelektrophoresekammer und polymerisiertes Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) als Trennmedium verwendet.

Der Zusatz von Glycerin im Trenngel ermöglicht, dass unmittelbar nach dem Trenngel das Sammelgel gegossen werden kann (Tabelle 3.3). Nachdem beide Gele auspolymerisiert sind, werden die Proben kurz in Laemmli-Auftragspuffer aufgeköcht und aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgt bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA pro Gel (Dauer ca. 45 min).

|                               | Sammelgel (4 %)    | Trenngel (10 %)    |
|-------------------------------|--------------------|--------------------|
| Wasser                        | 2700 $\mu\text{l}$ | 1800 $\mu\text{l}$ |
| Gelpuffer                     | 470 $\mu\text{l}$  | 3000 $\mu\text{l}$ |
| Glycerin (50 %)               | -                  | 2500 $\mu\text{l}$ |
| Acrylamid/Bisacrylamid (40 %) | 350 $\mu\text{l}$  | 2500 $\mu\text{l}$ |
| TEMED                         | 5 $\mu\text{l}$    | 20 $\mu\text{l}$   |
| APS (10 %)                    | 20 $\mu\text{l}$   | 50 $\mu\text{l}$   |

**Tabelle 3.3: Herstellung von Polyacrylamid-SDS-Gelen.**

### 3.3.4 Proteinnachweis

Nachdem zelluläre Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt worden sind, können sie Coomassie-blau oder – um eine bis zwei Größenordnungen sensitiver – mit Silbernitrat angefärbt werden. Im Gegensatz dazu bietet der immunologische Proteinnachweis bei geeignetem Antikörper die Möglichkeit, ein einziges Protein aus dem gesamten Zelllysate spezifisch nachzuweisen.

#### 3.3.4.1 Coomassie-Blau Färbung

Coomassie-Blau färbt die Proteine im Polyacrylamidgel reversibel an. Dazu wird das Proteingel 15 min in der Färbelösung und anschließend das blaue Gel solange in Entfärbelösung aufgeköcht, bis ein Proteinbandenmuster sich vom transparenten Hintergrund abhebt. Zur Aufbewahrung wird das Gel in Einmach-Fix (Aldi-Süd, München) eingeschlagen und im Vakuum getrocknet (45 min, 55 °C).

### 3.3.4.2 Silberfärbung

Bei der Silberfärbung wird das Proteingel zuerst entwässert, fixiert, mit einer Natriumthiosulfatlösung als Oxidans vorbehandelt und in einer Silbernitratlösung imprägniert. In einer Natriumcarbonatlösung wird das Silbernitrat, das sich in Protein eingelagert hat, zu Silber reduziert. Sobald die braune Silberfärbung sichtbar wird, soll die Reaktion mit Essigsäure (1 %) gestoppt werden. Das Gel kann danach in Vakuum getrocknet werden (Nesterenko et al., 1994).

### 3.3.4.3 Immunologischer Proteinnachweis (im „Westernblot“)

Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgt durch die „Westernblot“-Analyse. Dazu werden die Proteine in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (3.2.2) und auf eine PVDF-Membran (oder Nitrozellulosemembran) elektrophoretisch transferiert und fixiert. Der Transfer des Proteins erfolgt im Semi-Dry-Verfahren (modifiziert nach Kyhse-Andersen, 1984). Anschließend kann das Protein immunologisch auf der Membran nachgewiesen werden.

#### Transfer von Proteinen auf Membranen

Sechs Whatman-Filterpapiere und die PVDF-Membran werden auf Gelgröße zurechtgeschnitten und je zwei der Filter in Puffer A, B und C, sowie die Membran in Puffer C getränkt. Der Stapel wird mit dem Gel, wie in Abbildung 3.2 gezeigt, in der Blot-Apparatur zusammengesetzt und eine Stunde bei einer Stromstärke von  $1,2 \text{ mA/cm}^2$  ausgesetzt. Der Erfolg des Transfers wird durch Coomassie-Blau-Färbung des Gels sowie durch Ponceau S-Färbung der Membran überprüft. Letztere erreicht man, indem man mit einer Verdünnung der Ponceau S-Stammlösung im Verhältnis 1:10 die Membran inkubiert (5 min). Diese Färbung ist reversibel, sie wird mit PBS entfernt, so dass die Membran für weitere immunologische Nachweise verwendet werden kann.

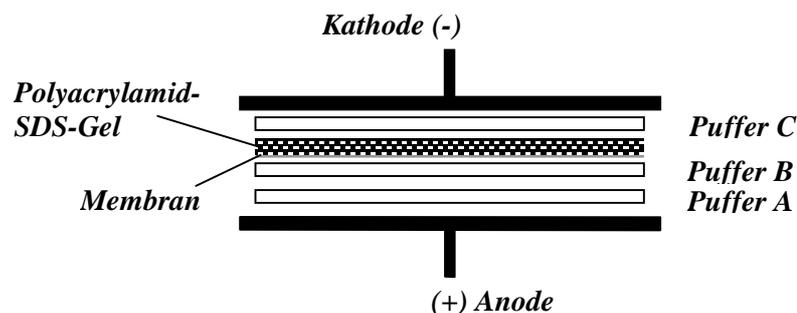


Abbildung 3.2: Aufbau eines „Westernblots“

### **Immunologische Nachweisreaktion**

Die Membran wird in 5 % gelöstem Magermilchpulver eine Stunde inkubiert, das die Membran mit unspezifischen Proteinen absättigt. Nach 3 Waschschrritten mit PBS wird ein primärer Antikörper (Verdünnung, 1:1.000) zugegeben (1 h, RT), der gegen das nachzuweisende Protein gerichtet ist. Weiteren drei Waschschrritten mit PBS folgt der sekundäre Antikörper (Verdünnung, 1:100.000), der gegen die konstante Region des primären gerichtet ist. Der sekundäre Antikörper ist mit einer Enzymaktivität gekoppelt, die spezifisch nachweisbar ist. In dieser Arbeit wurde ein Peroxidase gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet, der mit der in Kapitel 2.8 beschriebenen Lösung nachgewiesen werden kann.

### **3.4 Nachweis von Protein-DNS-Wechselwirkungen**

Die spezifische Wechselwirkung eines Proteins mit DNS wird durch dessen Retardation in der Gelelektrophorese nachgewiesen. Alternativ kann die Affinität des Proteins zur DNS durch Präzipitation des dabei entstehenden Komplexes untersucht werden (Kapitel 3.4.2).

#### **3.4.1 Gel-Retardation**

1981 beschrieben Fried und Crothers, sowie Garner und Revzin erstmals den inzwischen klassischen Nachweis einer Protein-DNS-Wechselwirkung, den Gel-Retardationsassay (GRA). Danach bindet ein Transkriptionsfaktor innerhalb eines DNS-Fragments spezifisch an seine Bindestelle. Trennt man den Komplex mittels Gelelektrophorese auf, wird er im Gegensatz zum freien DNS-Fragment größer sein. Er wandert aufgrund seiner größeren Oberfläche und Ladung langsamer durchs Gel. Deshalb spricht man von Gel-Retardation.

##### **3.4.1.1 DNS Markierung mit [<sup>32</sup>P]-ATP**

Zur Detektion einer Protein-DNS-Wechselwirkung wird das DNS-Fragment radioaktiv markiert. Dazu wird das gewünschte Oligonucleotid mit der T4-Polynukleotidkinase (PNK) durch eine Austauschreaktion mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP am 5'-Phosphatende markiert (Sambrook et al., 1989).

Das Oligonucleotid wird mit 10x PNK-Puffer, PNK und [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP inkubiert (Tabelle 3.4) und anschließend durch eine MicroSpin™ G-25 Gelfiltrationssäule vom freien [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP getrennt. Von einem Aliquot des Eluats werden die Zerfälle in

einem Szintillationszähler gemessen (Easycount 4000, Scotlab). In den GRA-Assay werden in etwa 10 fmol des markierten Oligonucleotid (100.000 cpm) pro Experiment eingesetzt. Es kann bei 4 °C 4 Wochen lang aufbewahrt werden.

|                                   |         |
|-----------------------------------|---------|
| DNS                               | 4 pmol  |
| 10x PNK-Puffer                    | 2 µl    |
| PNK                               | 2 µl    |
| [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P] ATP | 2 µl    |
| Endvolumen                        | 20 µl   |
| Inkubation                        | 30 min, |
| Aktivitätsmessung                 | 37 °C   |
|                                   | 1 µl    |

1 µl enthält 3,33 pmol [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP  
mit einer Radioaktivität von 0,37 MBq.

**Tabelle 3.4: Reaktionsansatz zur [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP-Markierung von DNS.**

### 3.4.1.2 Protein-DNS Komplexbildung (GRA)

Das gewünschte Protein wird als Bestandteil des Zellextrakts, Gewebeextrakts oder in aufgereinigter Form im GRA-Assay eingesetzt. Die einzelsträngigen radioaktiven DNS-Fragmente werden zuerst denaturiert (5 min, 95 °C) und rasch eisgekühlt. Anschließend wird das Protein zugegeben und das Gemisch auf Eis, dann bei Raumtemperatur inkubiert (je 15 min). Auf diese Weise wird eine Rehybridisierung der aufgeschmolzenen DNS verhindert und damit ein besserer Zugang des Proteins an Einzelstrang-DNS gewährleistet. Benötigt man dagegen ein doppelsträngiges DNS-Fragment, werden die komplementären Oligonucleotide äquimolar gemischt, erhitzt (5 min, 95 °C), durch langsames abkühlen hybridisiert (1 °C / min) und mit Proteinextrakt inkubiert. Beide Verfahren werden in einem Gesamtvolumen von 50 µl unter Bedingungen des Bindepuffers (Kapitel 2.7) durchgeführt.

### 3.4.1.3 Auftrennung und Detektion des Protein-DNS Komplexes

Man setzt der Probe aus DNS und Protein den Auftragpuffer zu. Anschließend wird der Protein-DNS Komplex mittels Gelelektrophorese über ein nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel (8 %) aufgetrennt (18 – 50 mA, 3 – 18 h, 6 - 8 °C). Das radioaktive Gel wird vakuumgetrocknet und abgelichtet. Dazu wird ein Röntgenfilm in einer Kassette aufgelegt (-80 °C, 24 h). Die Filme werden anschließend in einer Entwicklungsmaschine automatisch entwickelt (Agfa, Gevomatic 60).

### 3.4.2 Protein-Präzipitation

Protein-DNS-Wechselwirkungen werden herkömmlich im GRA-Assay oder im *footprint*-Experiment nachgewiesen. Hier wird eine Methode beschrieben, die es ermöglicht, ohne aufgereinigtes Ausgangsprotein eine Interaktion des gewünschten Proteins aufgrund seiner DNS-Affinität spezifisch nachzuweisen. Dazu wird das Protein markiert und mit matrixgebundenen DNS-Sequenzen inkubiert. Bindet das Protein die DNS-Sequenz, so kann es mit der Matrix gefällt werden (Ren et al., 1994). Dieser Vorgang ist einer Immunpräzipitation vergleichbar.

#### 3.4.2.1 Herstellung matrixgebundener DNS-Sequenzen

An das 3'(OH)-Enden der DNS wird kovalent Biotin gebunden. Das Biotin an den DNS Molekülen kann spezifisch an Streptavidin binden. Letzteres ist an eine Matrix (Kapitel 2.1) gekoppelt, die präzipitierbar ist.

Im einzelnen kondensiert man mittels terminaler Transferase das Biotin an die 3'(OH)-Enden der Nucleinsäuren (Tabelle 3.5). Mit einer Glycogen-EDTA-Lösung wird die Reaktion abgestoppt und anschließend Ethanol gefällt (Kapitel 3.2.4.1). Nach Zugabe der streptavidinhaltigen Polystyrolmatrix wird der Komplex magnetisch präzipitiert (1 min). Das Pellet wird in Bindepuffer (Kapitel 2.7) resuspendiert. Je nach Bedarf wird zur Erzeugung eines DNS-Doppelstranges die komplementäre DNS hybridisiert (Kapitel 3.4.1.2). Ein mit Lämmli-puffer versetztes Aliquot wird in einer Agarosegelelektrophorese eingesetzt, um den Erfolg der Koppelung der DNS an die Matrix und die Fragmentlänge sicherzustellen. Die restliche Suspension wird für die Protein-Präzipitation eingesetzt und kann 4 Wochen (4 °C) aufbewahrt werden.

|                           |               |
|---------------------------|---------------|
| Reaktionspuffer 5x        | 4 µl          |
| CoCl <sub>2</sub> -Lösung | 4 µl          |
| Oligonucleotid            | 100 pmol      |
| Biotin-16ddUTP-Lösung     | 1 µl          |
| Terminale Transferase     | 50 Einheiten  |
| Inkubation                | 15 min, 37 °C |
| Glycogen-EDTA-Lösung      | 2 µl          |

**Tabelle 3.5: Markierung von DNS mit Biotin.**

#### 3.4.2.2 Proteinherstellung und [<sup>35</sup>S]-Methionin-Markierung

Eine einfache Möglichkeit zur gleichzeitigen Herstellung und Markierung geringer Mengen an Protein ist die Proteinbiosynthese im Reticulocytelysat. Dazu wird

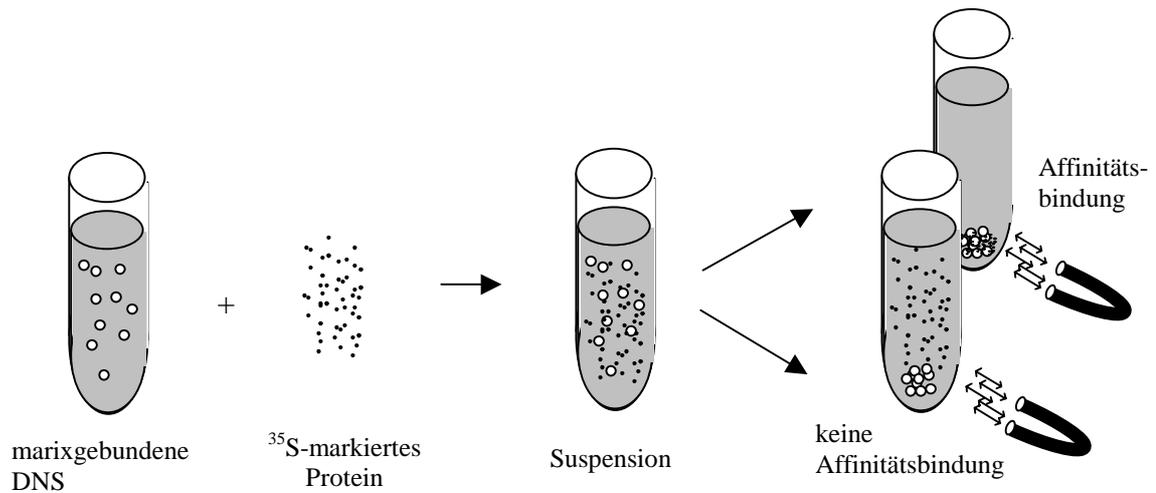
eine entsprechende DNS-Matrize transkribiert, translatiert und das dabei entstehende Polypeptid radioaktiv markiert.

Ein T7-Promotor wird der DNS vorgeschaltet, die für das entsprechende Protein kodiert. Das Produkt wird in das Reticulocytenlysat eingesetzt, dessen Methionin durch [<sup>35</sup>S]-Methionin ersetzt wird. Eine T7-RNS-Polymerase transkribiert eine mRNS, die im Reticulocytenlysat des Kaninchens sofort translatiert werden kann. In das synthetisierte Protein wird [<sup>35</sup>S]-Methionin eingebaut. Deshalb kann es nach einer SDS-Gelelektrophorese (Kapitel 3.3.3) mittels Röntgenfilm überprüft werden. Anschließend wird das Lysat in der Protein-Präzipitation (Kapitel 3.4.2.3) eingesetzt. Es ist 4 Wochen lagerbar (-80 °C).

Diese Methode der gekoppelten Transkription und Translation wird mit dem TNT Quick Coupled Transcription/Translation System von Promega durchgeführt und ist im Protokoll des Herstellers beschrieben.

#### **3.4.2.3 Protein-DNS Affinitätsbindung**

Das Reticulocytenlysat, welches das gewünschte Protein radioaktiv markiert enthält, wird in dem Experiment zur Affinitätsbindung verwendet. Matrixgebundene DNS-Sequenzen werden bei Raumtemperatur und unter Bindepufferbedingungen zugegeben. Das markierte Protein und ein 50-facher Überschuss freier, unspezifischer DNS-Sequenzen werden zugesetzt. Das Protein kann spezifisch seine Bindungsstelle der DNS-Sequenz binden, die an paramagnetische Matrixkügelchen gekoppelt ist. Durch einen Magneten wird dieser Matrixkomplex präzipitiert. Das Pellet wird 3 mal mit Waschpuffer, der aus Bindepuffer mit 200 mM zugesetzter KCl-Lösung besteht, resuspendiert und gewaschen. Die Überstände und das Pellet werden in einer SDS-Gelelektrophorese analysiert. Erscheint das radioaktive Protein im Pellet, so hat die Bindung an der spezifischen Sequenz stattgefunden. Erscheint es jedoch im Überstand, bildete sich der Protein-DNS Komplex nicht aus (Abbildung 3.3).



**Abbildung 3.3: Affinitätsbindung von Protein mit matrixgebundener DNS.**

Matrixgebundener DNS wird Protein zugesetzt, das im Retikulozytenlysat [ $^{35}\text{S}$ ]-markiert wurde. Die DNS-Matrix wird mit einem Magneten präzipitiert. Das markierte Protein erscheint im Fall spezifischer Bindung an der DNS-Sequenz im Pellet. Andernfalls wird es im Überstand beobachtet.

Experimente, in denen nach erfolgter Protein-DNS Komplexbildung ein Überschuss an freier – nicht matrixgebundener – DNS Bindesequenz zugegeben wird, untermauert das Experiment der Protein-Präzipitation. In dem Fall wird das markierte Protein, welches die Matrix über die DNS gebunden hat, durch eine freie, konkurrierende DNS-Sequenz wieder in Lösung gebracht. Lag im umgekehrten Fall kein Protein-DNS Komplex vor, ist auch kein Freisetzung markierten Protein zu beobachten.

### 3.5 Zellkultur

Für alle verwendeten Zelllinien wird L-Glutaminhaltiges Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM, GibcoBRL) benutzt. Dazu werden 2,5 ml Gentamycin (10 mg/ml) und 50 ml hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum gegeben. Lediglich für die N/N1003A-Zelllinie wird neben den beschriebenen Bedingungen alternativ auch Minimum Essential Eagle Medium (MEM) mit Earle's Salzen und Kaninchenserum verwendet, wobei letzteres nicht durch Hitze inaktiviert wurde.

#### 3.5.1 Kultivieren von Zellen

Die Zelllinie aus dem Stickstofftank wird in einem Ethanolbad (70 %) rasch aufgetaut und durch Zentrifugation (2000 U/min, 8 min, Heraeus) vom DMSO-haltigen

Medium befreit. Die Zellen werden im entsprechenden Medium resuspendiert, auf eine Zellkulturplatte (10 cm) ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Sobald die Zellen eine Konfluenz von mehr als 95 % aufweisen, werden sie zweimal mit PBS gewaschen, dann möglichst schonend, meist notwendigerweise durch den Einsatz von Trypsin abgelöst und auf drei neue Zellkulturplatten verteilt. Die Dauer von Passage zu Passage ist abhängig von der Zelllinie. N/N1003A-Zellen benötigen beispielsweise 3 bis 4 Tage, CD5A-Zellen dagegen gewöhnlich nur die Hälfte der Zeit bis sie ausreichend konfluent für die nächste Passage sind.

Zum Konservieren von Zellen wird die Zellkulturplatte passagiert. Statt die Zellsuspension auszusäen, wird sie in Medium, dem 10 % DMSO zugesetzt worden sind, in einem Isopropanol gefüllten, 4 °C vorgekühlten Gefäß (Nalgene) auf -80 °C gestellt. Dieses Verfahren gewährleistet einen Temperaturabfall von 1 °C pro Minute. Anschließend können die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

### **3.5.2 Transfektion von Zellen**

Alle verwendeten Linsenepithelzelllinien werden mit Calciumphosphat transfiziert. In der Calciumphosphat vermittelten Transfektion wird DNS mit CaCl<sub>2</sub> und einem Phosphatpuffer gemischt. Dabei bildet sich ein feines Präzipitat, das über die kultivierten Zellen verteilt wird (Graham et al, 1973).

Ein bis zwei Tage nach Aussaat der Zellen haben sie eine Konfluenz von 40 – 50 % erreicht. Das Medium wird gewechselt und die Transfektionsansätze vorbereitet, indem man DNS, Wasser und Calciumchlorid mischt. Dieser Lösung wird Hespuffer unter ständigem Schütteln tropfenweise zugesetzt. Die resultierende Lösung bleibt eine halbe Stunde bei Raumtemperatur und wird nach kurzem Durchmischen auf die Zellen geträufelt. 4 Stunden später wird das Medium entfernt und den Zellen ein Glycerolschock (30 s) verabreicht, der zu effizienterer DNS Aufnahme führt. Die Zellen werden, falls nicht anders darauf hingewiesen, nach 48 Stunden geerntet. Alternativ werden die Transfektionskomponenten, wie Hespuffer und Calciumchlorid von der Firma Promega erworben.

|                   |          |   |            |         |
|-------------------|----------|---|------------|---------|
| DNS               | 2,42 µg  | / | pγ226LucII | 2,0 µg  |
| CaCl <sub>2</sub> | 14,5 µl  |   | pcDNA3.1   | 0,4 µg  |
| Endvolumen        | 117,6 µl |   | pRL-SV40   | 0,02 µg |
| 2x HBS            | 117,6 µl |   |            |         |

**Tabelle 3.6: Beispiel eines Transfektionsansatzes.**

### 3.5.3 Immunologischer Proteinnachweis (in Zellen)

Der Vorteil des immunologischen Proteinnachweises in Zellen gegenüber dem im Westernblot ist die zusätzliche Information über Lokalisation des Proteins in der Zelle. Diese Methode wird ergänzend zur Analyse im Westernblot eingesetzt.

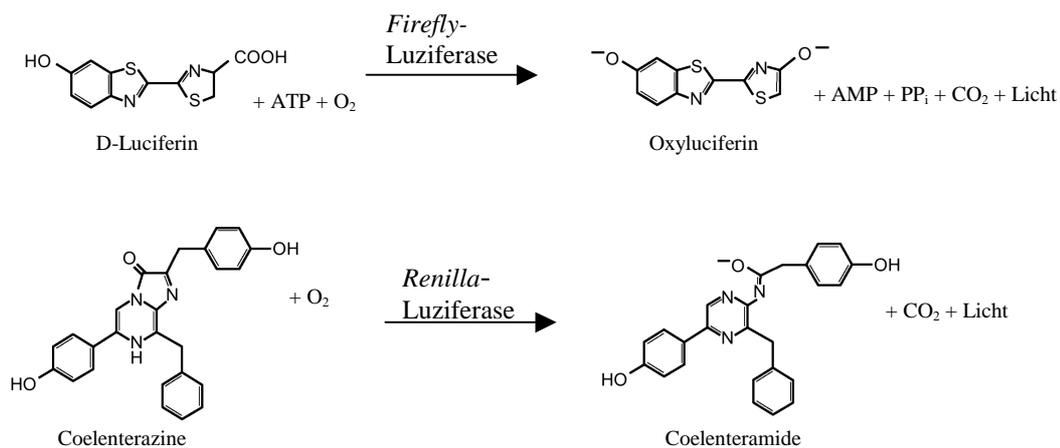
Dazu wäscht man die Zellen mit PBS und fixiert sie mit eisgekühltem Aceton und Methanol (1:1, 20 min). Anschließend werden die Zellen mit einer Natriumazid-Lösung 3 mal gewaschen und mit Ziegen Serum blockiert (20 min). Die Zellen werden im primären Antikörper (1:100, 1 h, RT) inkubiert und nach dreimaligem Waschen mit PBS mit dem fluoreszenzmarkierten, sekundären Antikörper inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten kann die Färbung unterm Fluoreszenzmikroskop photographiert werden.

### 3.5.4 Reporteranalyse

Die Reporteranalyse dient dem Aktivitätsnachweis von Promotoren. Ihre Reaktion auf Transkriptionsfaktoren kann in Zelllinien dosisabhängig getestet werden.

#### 3.5.4.1 Nachweis von Reportervektor und Kontrollvektor

Zur Analyse eines Promotors im Zellsystem wird ihm eine Firefly-Luziferase nachgeschaltet. Die Transfektionseffizienz wird mittels Renilla-Luziferase unter Kontrolle eines CMV-Promotors ermittelt. Transfiziert man nun beide Konstrukte in eine Zelllinie wird die *Firefly*-Luziferase (*Photinus pyralis*) und die CMV kontrollierte *Renilla*-Luziferase (*Renilla reniformis*) abhängig von den Eigenschaften der Zelllinie exprimiert. Beide Enzyme setzen mit D-Luziferin und Coelenterazinen unterschiedliche Substrate um, die im gleichen Zellysat unabhängig voneinander gemessen werden können (Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.4: Biolumineszenz-Reaktionen katalysiert durch die *Firefly*- und *Renilla*-Luziferasen.**

Der Lysepuffer für den Zellaufschluss, sowie die Substrate für den Aktivitätsnachweis beider Luziferasen werden mit dem Dual-Luciferase<sup>TM</sup> Reporter Assay System von Promega vertrieben. Das Nachweisverfahren ist detailliert im technischen Handbuch dazu beschrieben. Zur Reporteranalyse werden in den beschriebenen Experimenten kleine Kulturschalen benutzt (*12-wells*, Nunc). Insgesamt wurden pro Transfektionsansatz 2,42 µg DNS eingesetzt. Davon sind, falls nicht anders angegeben, 2 µg Reporterplasmid, 0,02 µg Kontrollplasmid und 0,4 µg pcDNA3.1 Vektor (Tabelle 3.6). Die Zellen werden in 200 µl PLB (Promega) lysiert. 10 µl davon werden im Luminometer (AutoLumat LB953, Berthold) unter Zugabe der Substrate gemessen. Aus dem Quotienten der Aktivität der Firefly und der Renilla Luziferasen wird die relative Luziferaseaktivität bestimmt. Sechs Messungen gleicher Transfektionsbedingung werden zu einem Mittelwert mit Standardabweichung verrechnet.

### 3.5.4.2 Kotransfektion von Expressions- und Reportervektor

Ein Ansatz, den Effekt eines Transkriptionsfaktors auf einen Promotor zu untersuchen, ist, dessen cDNS unter Kontrolle eines CMV-Promotors zu stellen, um ihn auf diese Weise überzuexprimieren. Dafür werden Reportervektor (2 µg), Kontrollvektor (0,02 µg) und Expressionsvektor (0,4 µg) gemeinsam transfiziert. Setzt man statt eines Expressionsvektors mit cDNS einen bis auf die cDNS identischen Expressionsvektor ein, erhält man eine unterschiedliche Antwort des Reporters, falls die

auf der cDNS enthaltene Information Einfluss auf den Promotor hat. In einigen Experimenten wird das Verhältnis des Expressionsvektors mit cDNS zu dem Expressionsvektor ohne cDNS variiert, ohne die Gesamtmenge (0,4  $\mu\text{g}$ ) beider zu verändern (Tabelle 3.7).

|                         |                             |
|-------------------------|-----------------------------|
| 2 $\mu\text{g}$         | Reportervektor              |
| 0,02 $\mu\text{g}$      | Kontrollvektor              |
| x $\mu\text{g}$         | Expressionsvektor mit cDNS  |
| (0,4 - x) $\mu\text{g}$ | Expressionsvektor ohne cDNS |
| 2,42 $\mu\text{g}$      | Gesamtmenge DNS             |

**Tabelle 3.7: Transfektionsansatz zur Überprüfung des dosisabhängigen Einflusses eines Effektors.**

Der Effektor ist der Expressionvektor auf dem eine entsprechende cDNS (beispielsweise von PROX1 oder Six3) enthalten ist, die den Reportervektor beeinflussen kann. Die Menge des Effektors kann variiert werden. Wählt man  $x = 0$  erhält man als Negativkontrolle kein Protein durch den Expressionvektor.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Der $\gamma$ F-Kristallinpromotor der Maus

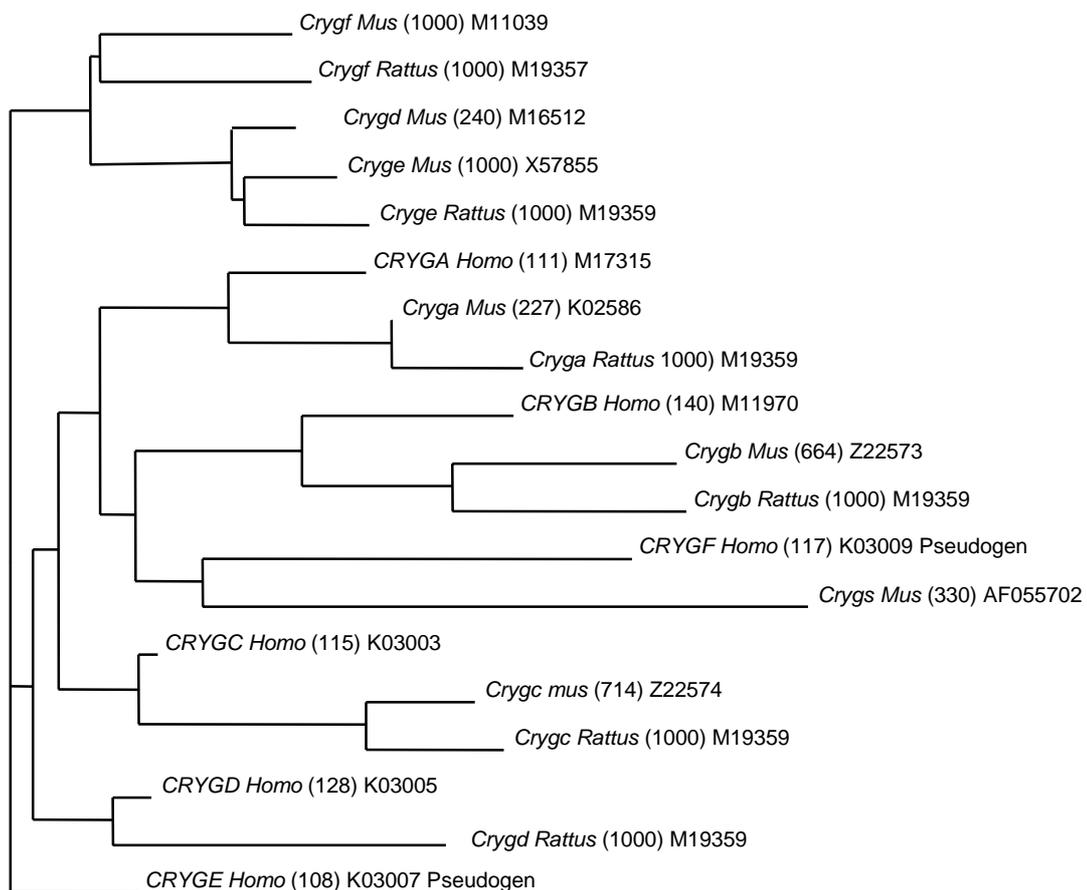
Die  $\gamma$ -Kristalline werden linsenspezifisch exprimiert (Kapitel 1.3). Ihrer Regulation in Linsenepithelzelllinien wurde zuerst am  $\gamma$ F-Kristallinpromotor in transienten Transfektionen untersucht (Meakin et al., 1989). Deshalb wurde in diesem Kapitel die phylogenetische Stellung des Promotors innerhalb der  $\gamma$ -Kristalline studiert. Der Vergleich der  $\gamma$ -Kristallinpromotoren zeigt, dass der  $\gamma$ F-Kristallinpromotor stellvertretend für eine Subfamilie der  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren charakterisiert werden kann. Datenbankanalysen geben Anhaltspunkte, welche Transkriptionsfaktoren für die Regulation des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors und seiner nächsten Verwandten in Frage kommen.

#### 4.1.1 Phylogenie der $\gamma$ -Kristallinpromotoren

Die  $\gamma$ -Kristalline werden in den terminal differenzierten Linsenfasern gefunden und sind zueinander sehr homolog (Papaconstantinou, 1967; McAvoy, 1978<sup>Ⓢ</sup>). Nachfolgend werden ihre Promotoren aus Mensch, Maus und Ratte im phylogenetischen Stammbaum verglichen (Abbildung 4.1). Dafür wird das Computerprogramm AlignX eingesetzt und die  $\gamma$ F-Kristallin-Sequenz dem Vergleich aller  $\gamma$ -Kristallin-Sequenzen zugrundegelegt. Die Sequenzen werden vom ATG stromaufwärts aus der GenBank verwendet. Maximal werden 1000 Nucleotide zum Vergleich herangezogen. Meistens ist die Zahl der bekannten Nucleotide der Promotoren bei der Maus und beim Menschen niedriger. Zudem handelt es sich bei den beiden menschlichen Nucleinsäuresequenzen zum  $\gamma$ E- und  $\gamma$ F-Kristallin um Pseudogene. Grund dafür ist zum einen, eine mutierte TATA-Box (Brakenhoff et al., 1990 und 1994), und zum anderen ein fehlender Promotor. Die zum Stammbaum gehörende, detaillierte Darstellung auf Nucleinsäureebene ist im Anhang zu finden.

Die Promotorsequenz des  $\gamma$ S-Kristallins der Maus und des menschlichen  $\gamma$ F-Kristallin Pseudogens sind in diesem phylogenetischen Stammbaum wenig eingebunden (Abbildung 4.1). Dagegen gilt für die anderen  $\gamma$ -Kristallinpromotoren, dass gleichnamige Promotoren interspezifisch verwandter sind als ungleichnamige intraspezifisch. Die  $\gamma$ A-Kristallinpromotoren, zum Beispiel, zeigen im gesamten Vergleich größere Homologie zueinander, also zwischen den Spezies, als zu den

anderen  $\gamma$ -Kristallinpromotoren, selbst wenn sie aus derselben Art stammen. Ferner ist ihre Identität unter den Nagern höher, als die Identität zwischen Maus und Mensch, beziehungsweise Ratte und Mensch. Mit der interspezifischen Homologie der  $\gamma$ B- und  $\gamma$ C-Kristallinpromotoren verhält es sich vergleichbar, wie für die  $\gamma$ A-Kristallinpromotoren beschrieben wurde. Lässt man die beiden Pseudogene des Menschen beiseite, dürfen auch die interspezifischen Homologien der  $\gamma$ E- und  $\gamma$ F-Kristallinpromotoren von der Ratte und der Maus, wie oben erwähnt, interpretiert werden. Lediglich die  $\gamma$ D-Kristallinpromotoren machen eine Ausnahme. Der  $\gamma$ D-Kristallinpromotor der Maus ist mit den  $\gamma$ E-Kristallinpromotoren näher verwandt, als mit den gleichnamigen Promotoren vom Menschen und von der Ratte.



**Abbildung 4.1: Phylogenetischer Stammbaum der  $\gamma$ -Kristallinpromotoren von Mensch, Maus und Ratte.**

Die Zahl der Nucleotide, die zum Vergleich herangezogen wird, ist in Klammern gefasst. Danach folgt die Zutrittsnummer der GenBank jeder Sequenz. Eine detaillierte Darstellung auf Ebene der Nucleinsäuren ist im Anhang zu finden.

Auffällig ist die hohe Homologie unter den  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren der Nager. Mit Ausnahmen des  $\gamma$ D-Kristallinpromotor der Ratte ist bei den  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren festzustellen, dass sie in jeder Hinsicht – unabhängig, ob intra-, interspezifisch, gleich- oder ungleichnamig – einen hohen Verwandtschaftsgrad zueinander aufweisen.

#### **4.1.2 Der $\gamma$ F-Kristallinpromotor der Maus als Stellvertreter der $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren der Nager**

Die Analyse mittels AlignX zeigt eine hohe Homologie in der proximalen Promotorregion der  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren der Maus sowie der  $\gamma$ EF-Kristallinpromotoren der Ratte (Abbildung 4.2). Während die Identität der distalen (-1000/-231)  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren sehr niedrig ist (29 %), sind im Gegensatz dazu die proximalen (-230/+50) Sequenzen hoch konserviert (83 %).

Diese homologen Sequenzen enthalten folgende aus der Literatur bekannten Elemente: ein *retinoic acid response element* (RARE, Tini et al., 1993), die  *$\gamma$ crystallin nested repeats* (CRYNER, Stöger et al., 1997), ein *Silencer*-Element (Peek et al., 1990), eine Sox1-Bindestelle (Kamachi et al., 1995), ein  $\gamma$ F-1-Element mit einer Bindestelle für das  $\gamma$ F-Bindeprotein ( $\gamma$ F-1,  $\gamma$ FBP, Liu et al., 1994) und stromabwärts des Transkriptionsstartes das DOTIS (*downstream of transcriptional initiation site*, Pietrowski et al., 1997). Abgesehen vom DOTIS-Element, das nicht im  $\gamma$ F-Kristallinpromotor der Ratte enthalten ist und dem RARE-Element, für das die Promotorsequenz im  $\gamma$ D-Kristallinpromotor der Maus noch nicht bekannt ist, sind alle regulatorischen Elemente in den fünf  $\gamma$ -Kristallinpromotoren vorhanden.

Ferner werden die  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren von Maus und Ratte auf weitere Bindestellen für Transkriptionsfaktoren mit dem Computerprogramm *MatInspector* untersucht. Dafür wird die Konsensussequenz der 5 homologen Promotoren herangezogen (AlignX). Distal liegt nur eine gemeinsame Bindestelle für SOX5 vor, während im proximalen Promotorbereich 29 Bindestellen für Transkriptionsfaktoren erscheinen (siehe Anhang). Fünf davon sind Homeodomänenbindestellen, die alle zwischen Position -213 und -129 positioniert sind und darunter wiederum bindet die Paired-Domäne von Pax-6 (Epstein et al., 1994). Zusätzlich ist eine Bindestelle für das *Drosophila*-Protein Prospero (PROSPERO, Hassan et al., 1997) zu finden, das homolog zum Prox1 der Vertebraten ist. Pax-6 und Prox1 sind die einzigen

Transkriptionsfaktoren, die in der Augenlinse exprimiert werden, an ihrer Entwicklung beteiligt sind (Walther und Gruss, 1991; Oliver et al., 1993) und zugleich in der Promotoranalyse mit *MatInspector* als Bindepartner erkannt werden.

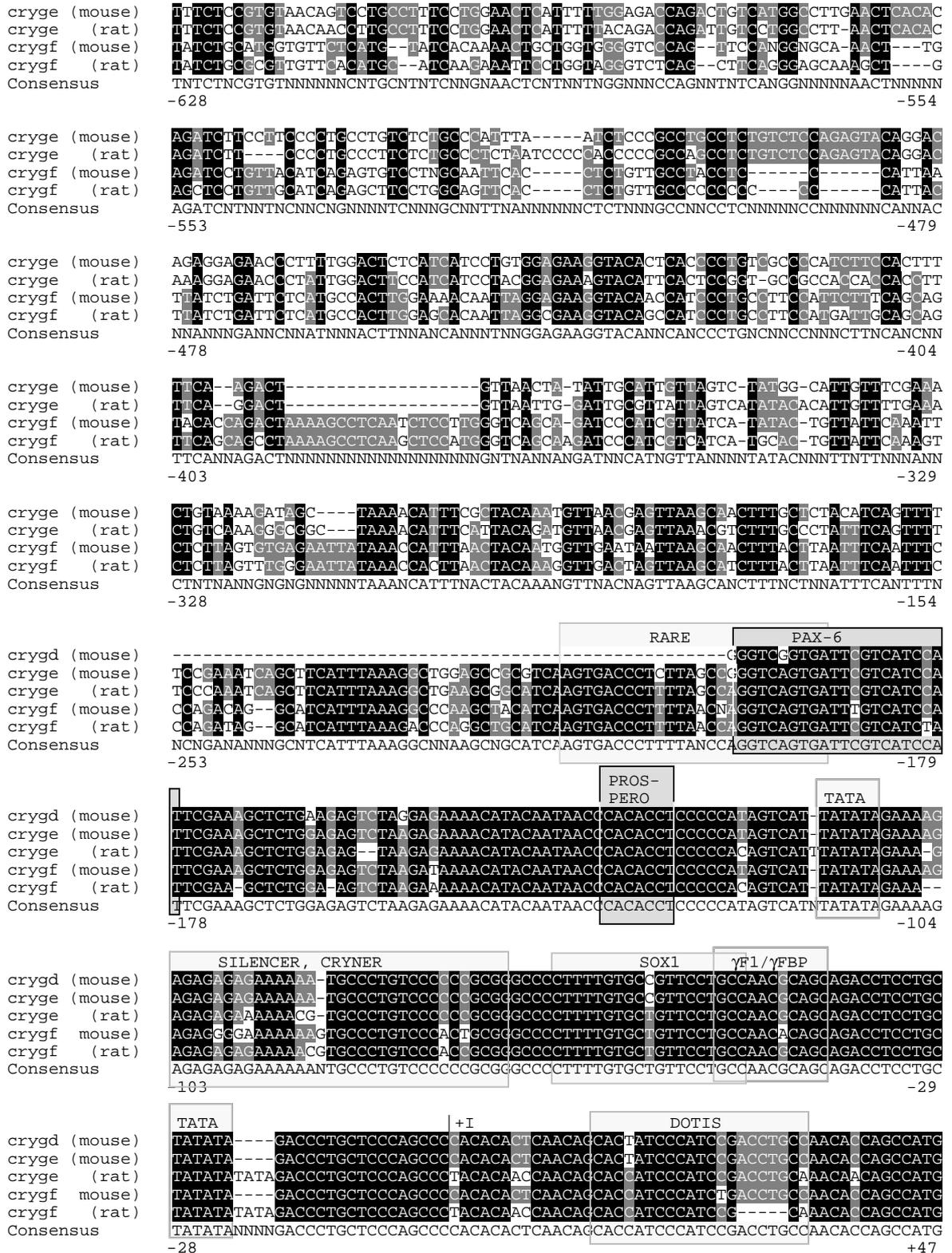


Abbildung 4.2 (Beschreibung folgende Seite)

**Abbildung 4.2 (vorherige Seite): Vergleich der  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren der Nager.**

Die erste Darstellung die mit AlignX erhalten wurde, wurde nachträglich manuell verbessert. Nucleinsäuren, die in mehr als 80 % der Sequenzen erscheinen, sind schwarz unterlegt. Nucleinsäuren, die in 50 – 80 % der Sequenzen identisch sind, wurden grau unterlegt. Die Promotoren sind im Bereich von bp –230 bis zum Start-Codon zu 83 % identisch. Nach bp –230 fällt die Identität der Promotoren bis bp –600 auf 37 % und bis bp –1000 auf 29 % ab (letzteres nicht abgebildet). Die hellgrau gerahmten Promotorelemente sind in der Literatur beschrieben, die dunkelgrau gerahmten Promotorelemente werden vom *MatInspector* erkannt (siehe Text).

Wegen der hohen Homologie und der daraus resultierenden gemeinsamen Bindestellen der  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren darf der  $\gamma$ F-Kristallinpromotor zu Untersuchungen des Promotorbereichs zwischen bp –230 und +50 als ihr Stellvertreter herangezogen werden.

**4.2 Aktivität des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors in Epithelzelllinien aus der Augenlinse**

Die Analyse des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors im Zellkultursystem setzt eine entsprechende Zelllinie voraus, in der seine Aktivität nachweisbar ist. In epithelialen Zelllinien, die nicht aus der Linse stammen, beispielsweise, zeigt der  $\gamma$ F-Kristallinpromotor keine Aktivität. Im Gegensatz dazu ist er in einigen Epithelzelllinien aus der Augenlinse aktiv (Meakin et al., 1989). Die menschliche CD5A-Zelllinie und die Kaninchen N/N1003A-Zelllinie eignen sich, wie in den nachfolgenden Experimenten beschrieben wird, um den  $\gamma$ F-Kristallinpromotor zu untersuchen. Zeit- und Konzentrationsreihen zum  $\gamma$ F-Kristallinpromotor geben Aufschluss, in welchen Grenzen seine Aktivität im jeweiligen Zellsystem zuverlässig und gut nachzuweisen ist. Ebenso wird überprüft, inwieweit die Transfektionskontrolle Einfluss auf das Genreportersystem nimmt.

**4.2.1 Zeitreihe des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors in Linsenepithelzelllinien**

Zuerst muss die Aktivität des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors getestet und das zeitliche Optimum der Aktivität festgestellt werden. Dazu werden Reportervektoren mit und ohne Promotor in die CD5A-, beziehungsweise in die N/N1003A-Zelllinie transfiziert und ihre Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt.

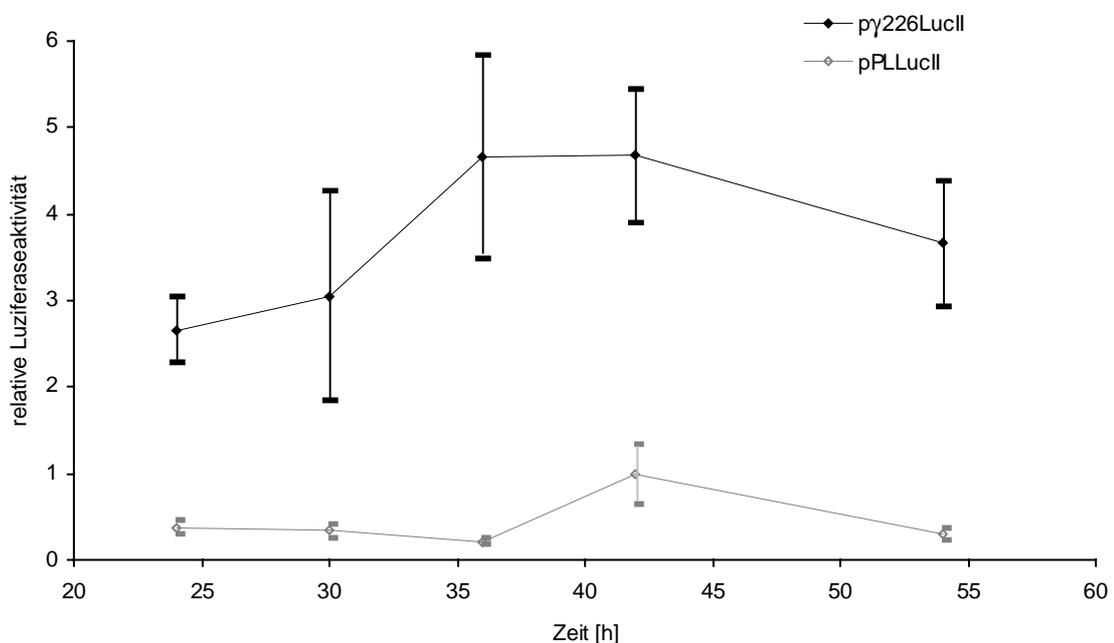
Das Plasmid p $\gamma$ 226LucII enthält den (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotor. Im Gegensatz dazu fehlt dem pLLucII-Vektor dieser Promotor, er ist aber ansonsten mit p $\gamma$ 226LucII identisch. Für jeden Zeitpunkt werden jeweils zweimal drei Kulturschalen

mit p $\gamma$ 226LucII und pPLLucII transfiziert. Die Zeitpunkte der Ernte liegen zwischen 24 und 108 Stunden.

In der CD5A-Zelllinie erhält man in Transfektionen mit p $\gamma$ 226LucII nahezu eine Verdoppelung der relativen Luziferaseaktivität, wie man an der Ernte nach 24 Stunden im Vergleich zu der nach 36 oder 42 Stunden erkennen kann (Diagramm 4.1). Bis zum Erntezeitpunkt von 54 Stunden fällt die Aktivität um 20 % leicht ab. Verglichen mit dem p $\gamma$ 226LucII liegt die Luziferaseaktivität des pPLLucII mindestens um den Faktor 5 niedriger auf mehr oder weniger konstantem Niveau.

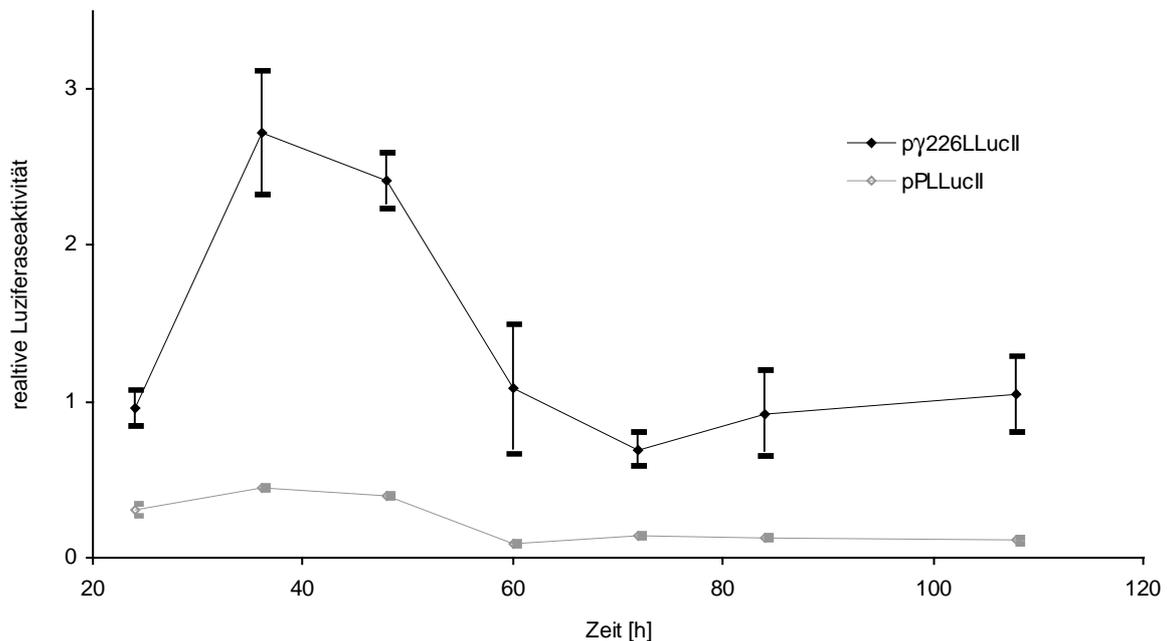
Der Verlauf der Aktivität des p $\gamma$ 226LucII in der N/N1003A-Zelllinie ist ähnlich wie in der CD5A-Zelllinie. Das Optimum des Genreporters liegt ebenso bei 36 Stunden. 72 Stunden nach der Transfektion ist die relative Luziferaseaktivität bereits auf ein Drittel des Optimums zurückgefallen (Diagramm 4.2). Auch in der N/N1003A-Zelllinie ist die pPLLucII Aktivität auf in etwa gleichbleibendem, niedrigem Level.

In beiden Zelllinien – N/N1003A und CD5A – ist die Richtzeit der Ernte in später beschriebenen Experimenten 42 Stunden. Damit liegt der Erntezeitpunkt am oder unmittelbar nach dem Aktivitätsoptimum des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors.



**Diagramm 4.1: Zeitabhängigkeit der (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotoraktivität in der CD5A-Zelllinie.**

Der Reportervektor p $\gamma$ 226LucII, der den (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotor enthält, und das promotorlose Reporterplasmid pPLLucII wurden in CD5A-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden nach bestimmten Zeiten (24 h, 30 h, 36 h, 42 h und 54 h) geerntet und die relative Luziferaseaktivität bestimmt.



**Diagramm 4.2: Zeitabhängigkeit der (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotoraktivität in der N/N1003A-Zelllinie.**

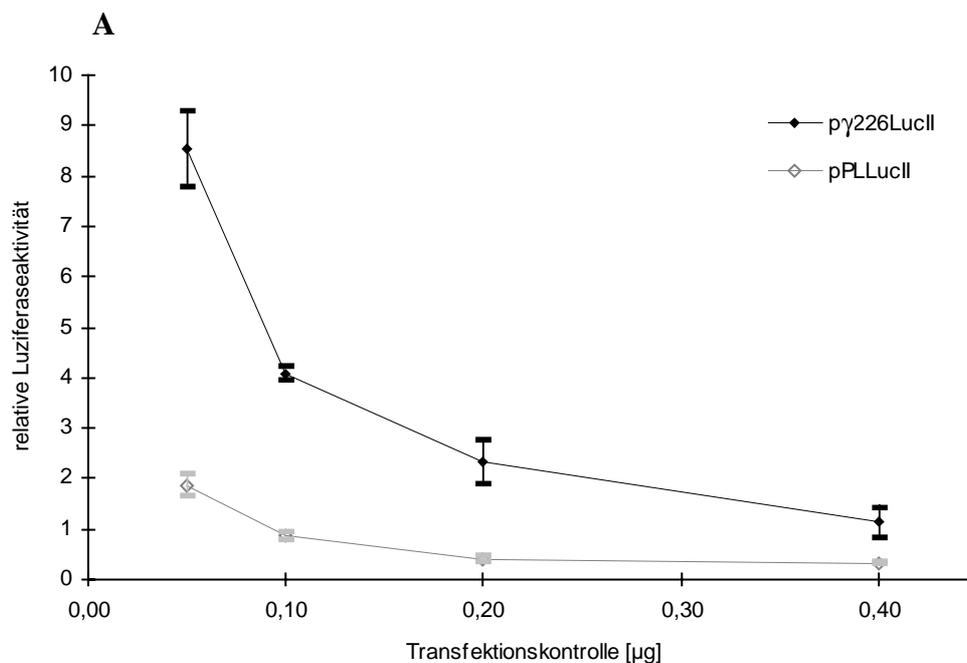
Die Reportervektoren p $\gamma$ 226LucII und pPLLucII wurden in N/N1003A-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden nach bestimmten Zeiten (24 h, 36 h, 48 h, 60 h, 72 h, 84 h und 108 h) geerntet und die relative Luziferaseaktivität bestimmt.

#### 4.2.2 SV40-Promotor und $\gamma$ F-Kristallinpromotor im selben Zellsystem

In jedem Transfektionsexperiment wird eine Kontrolle eingesetzt, die eine Information über die Effektivität der Transfektion gibt. Dazu wird in diesen Experimenten das Plasmid pRL-SV40 verwendet. Dieser Vektor steuert mit seinem SV40-Promotor die *Renilla*-Luziferase, die unabhängig von der *Firefly*-Luziferase des Reportervektors detektiert werden kann (Kapitel 3.5.4.1). Dieser SV40-Promotor kann den zu untersuchenden Promotor transaktivieren oder mit ihm um Transkriptionsfaktoren konkurrieren. Folgendes Experiment gibt Aufschluss darüber, ob der pRL-SV40-Vektor Einfluss auf den  $\gamma$ F-Kristallinpromotor nimmt.

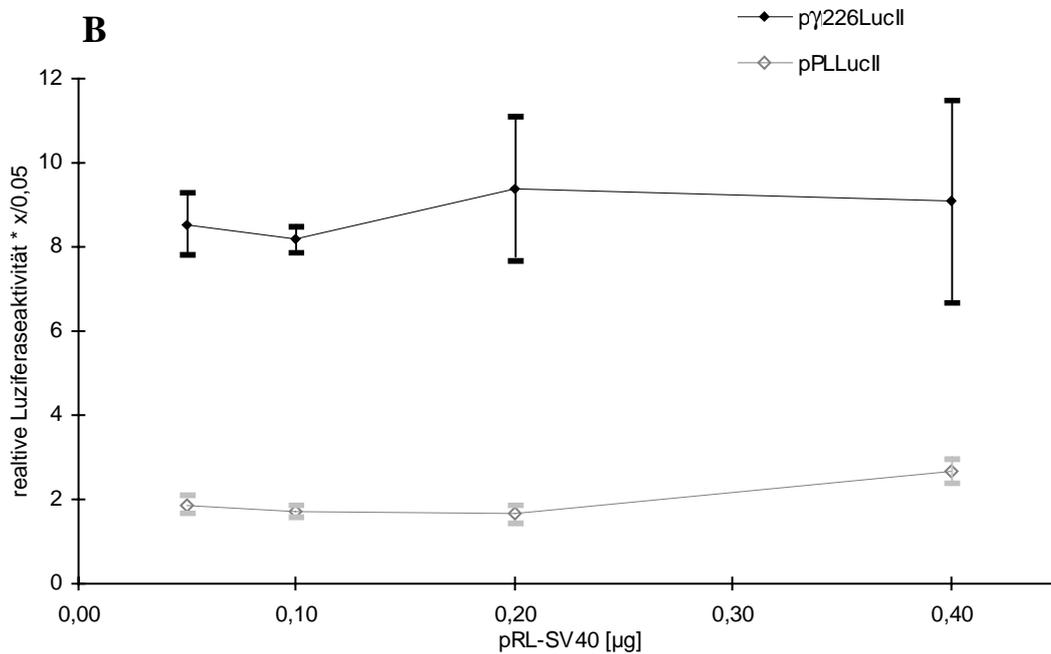
In jedem Transfektionsansatz wird die p $\gamma$ 226LucII Menge mit 2  $\mu$ g konstant gehalten und pRL-SV40 zwischen 0,02 und 0,16  $\mu$ g eingesetzt. Die relative Luziferaseaktivität fällt mit steigender Menge transfizierter Transfektionskontrolle (Diagramm 4.3 A). Indem man die relative Luziferaseaktivität mit der Menge der Transfektionskontrolle multipliziert, erhält man die von der eingesetzten Menge der

Transfektionskontrolle unabhängige relative Luziferaseaktivität. Sie bleibt konstant (Diagramm 4.3 B). Das bedeutet, dass die Aktivität des Reporters vom Kontrollplasmid unbeeinflusst bleibt. Deshalb übt der SV40-Promotor bzw. der gesamte pRL-SV40 keinen Einfluss auf den (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotor aus. Die Transfektionen des pPLLucII-Plasmids enthalten keinen (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotor und dürfen zum Vergleich herangezogen werden. Die Transfektionsansätze mit den Vektoren, pPLLucII und p $\gamma$ 226LucII, lassen in ihrer relativen Luziferaseaktivität vergleichbare Tendenz erkennen. Das Niveau der relativen Luziferaseaktivität des pPLLucII dagegen liegt verglichen mit p $\gamma$ 226LucII um den Faktor 4 – 5 niedriger. Dieses Ergebnis korreliert mit Kapitel 4.2.1.



**Diagramm 4.3 A:  $\gamma$ F-Kristallinpromotor bei variierender Menge an Transfektionkontrolle.**

Die Reportervektoren p $\gamma$ 226LucII und pPLucII wurden in CD5A-Zellen transfiziert. Dazu wurden verschiedene Mengen (0,05  $\mu$ g, 0,1  $\mu$ g, 0,2  $\mu$ g und 0,4  $\mu$ g) des Kontrollplasmids pRL-SV40 kotransfiziert. A) Die relative Luziferaseaktivität wurde **abhängig** von der Menge des Kontrollplasmids bestimmt.



**Diagramm 4.3 B:  $\gamma$ F-Kristallinpromotor bei variierender Menge an Transfektionkontrolle.**

Die Reportervektoren p $\gamma$ 226LucII und pPLucII wurden in CD5A-Zellen transfiziert. Dazu wurden verschiedene Mengen (0,05  $\mu$ g, 0,1  $\mu$ g, 0,2  $\mu$ g und 0,4  $\mu$ g) des Kontrollplasmids pRL-SV40 kotransfiziert. A) Die relative Luziferaseaktivität wurde **unabhängig** von der Menge des Kontrollplasmids bestimmt.

#### 4.2.3 Konzentrationsreihe des (-226/+45) $\gamma$ F-Kristallinpromotors im Zellsystem

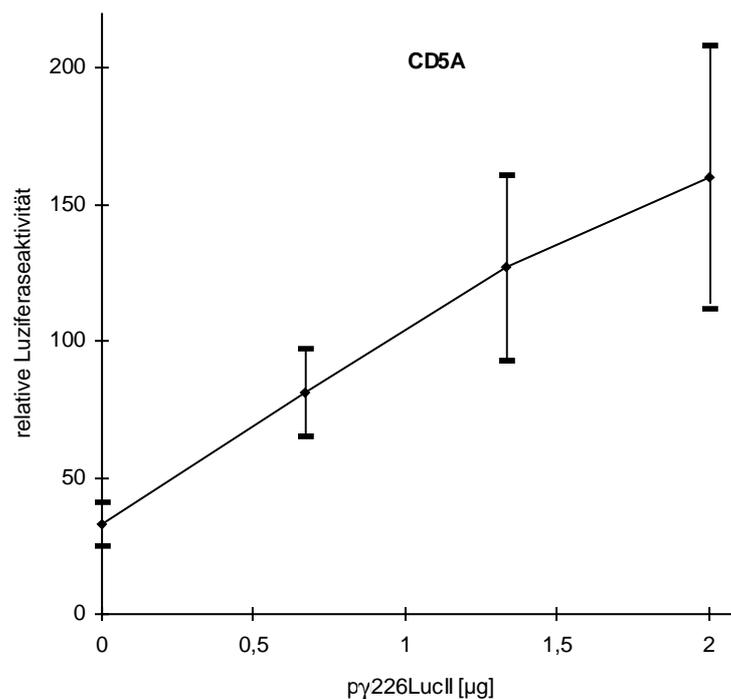
Unterschiedliche Mengen der Reportervektoren werden in den Linsenepithelzellen CD5A und N/N1003A eingesetzt. Damit wird festgestellt, ob mit steigender Menge des Reporters (p $\gamma$ 226LucII) die Luziferase-Antwort im gleichen Maß zunimmt. Auf diese Weise kann überprüft werden, ob die Zahl endogener Transkriptionsfaktoren für den (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotor ausreicht.

Dazu werden 0 bis 2  $\mu$ g des p $\gamma$ 226LucII-Plasmids in die CD5A-, wie in die N/N1003A-Zelllinie transfiziert. Ebenso wird das Kontrollplasmid pPLucII eingesetzt. In den CD5A-Zellen steigt die relative Luziferase Aktivität linear mit zunehmender Menge transfizierten p $\gamma$ 226LucII-Plasmids (Diagramm 4.4). Die gleiche Tendenz ist für das Kontrollplasmid pPLucII auf fünfmal niedrigerem Level zu beobachten.

Im Gegensatz dazu erreicht der  $\gamma$ F-Kristallinpromotor in der N/N1003A-Zelllinie bei einer Menge von 1  $\mu$ g p $\gamma$ 226LucII seine Sättigung. Um dieses Phänomen

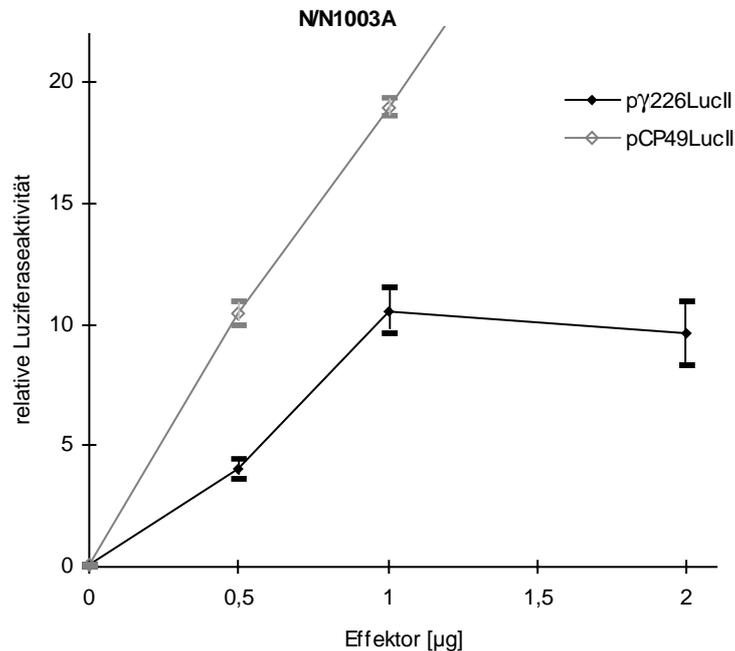
zu überprüfen wird der CP-49-Promotor im pLLucII-Vektor als Positiv-Kontrolle verwendet. Dabei ist ein linearer Anstieg der relativen Luziferase Aktivität bei steigender Menge des CP-49LucII-Plasmids zu beobachten (Diagramm 4.5).

Zur Sättigung der (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallin Aktivität in der N/N1003A-Zelllinie ist darauf hinzuweisen, dass es sich dabei im Gegensatz zum über 1 kbp langen CP-49-Promotor um das aktivste Fragment des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors handelt (Lok et al., 1989). Zudem wird die N/N1003A-Zelllinie um 2 Größenordnungen effizienter im Vergleich zur CD5A-Zelllinie transfiziert. Das bedeutet, dass entsprechend mehr Faktoren von der größeren Menge der Promotoren absorbiert werden. Für spätere Experimente zur Regulation des (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotors werden Mengen des Reporters eingesetzt, deren Aktivität im linearen Bereich liegt.



**Diagramm 4.4: Konzentrationsabhängigkeit der (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotoraktivität in der CD5A-Zelllinie.**

Der Reportervektor pγ226LucII wurde in zunehmender Menge in CD5A-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden nach 42 h geerntet und die relative Luziferaseaktivität bestimmt.



**Diagramm 4.5: Konzentrationsabhängigkeit der (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotoraktivität in der N/N1003A-Zelllinie.**

Der Reportervektor p $\gamma$ 226LucII wurde in zunehmender Menge in N/N1003A-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden nach 42 h geerntet und die relative Luziferaseaktivität bestimmt.

#### 4.3 Funktionsanalyse des $\alpha$ A-Kristallins und HSP27 am DOTIS des $\gamma$ F-Kristallinpromotors

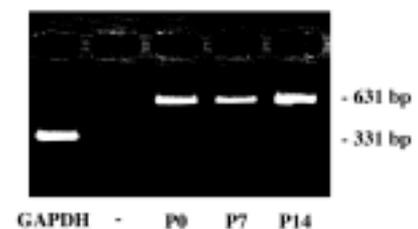
Die Bindung des  $\alpha$ A-Kristallins wurde an den Matrizenstrang der  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren unterhalb des Transkriptionsstarts beobachtet (Pietrowski et al., 1994). Diese Wechselwirkung wurde mit bovinem  $\alpha$ -Kristallin erreicht. Dabei ist noch unklar, ob das über 95 % identische rekombinante  $\alpha$ -Kristallin der Maus eine vergleichbare Interaktion aufweist. Die  $\alpha$ -Kristalline sind Vertreter der  $\alpha$ -Hsp-Superfamilie („ $\alpha$ -crystallin—small heat-shock protein“, de Jong et al., 1998). Trifft die funktionale Bindung rekombinanten  $\alpha$ A-Kristallins am DOTIS-Element zu, bietet dies die Möglichkeit, den  $\gamma$ F-Kristallinpromotor auf Induktion durch kleine Hitzeschockproteine zu prüfen. Deshalb wird ein Teil der nachfolgenden Experimente nicht nur für das  $\alpha$ A-Kristallin, sondern auch für das nahe verwandte Hsp25 der Maus, beziehungsweise das HSP27 des Menschen durchgeführt.

### 4.3.1 Endogene Expression des $\alpha$ A-Kristallins und des Hsp25 in der Augenlinse der Maus

Die endogene Expression des  $\alpha$ A-Kristallins in der Augenlinse ist bekannt (Kato et al., 1991<sup>®</sup>). Das nahe verwandte Hsp25 wird in diesem Experiment auf seine endogene Expression in der Augenlinse untersucht. Im Fall der endogenen Expression dieses nahen Verwandten des  $\alpha$ A-Kristallins kann man dem Vergleich beider Proteine in Genreporteranalysen zusätzliche physiologische Bedeutung beimessen. Die RT-PCR zum Hsp25 der Maus zeigt, dass dessen Transkript in der Augenlinse junger Mäuse nachgewiesen werden kann (Abbildung 4.3).

#### Abbildung 4.3: Endogene Expression des Hsp25 in der Augenlinse der Maus.

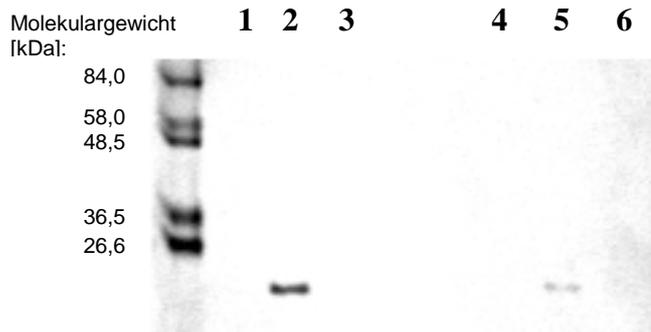
RT-PCR-Reaktionen wurden mit 40 Zyklen durchgeführt. Ein 631 bp Fragment wurde für das Hsp25 in der Linse neugeborener, ein und zwei Wochen alter Mäuse amplifiziert. Für die negativ Kontrolle wurden die gleichen Hsp25 Primer ohne Matrize eingesetzt. Zur positiv Kontrolle wurde ein 331 bp langes DNS-Fragment der GAPDH amplifiziert.



### 4.3.2 Die $\alpha$ A-Kristallinexpression in N/N1003A- und CD5A-Zellen

Aus der Literatur ist eine endogene Expression des  $\alpha$ A-Kristallins in der Linsenepithelzelllinie N/N1003A des Kaninchens bekannt (Reddan, 1986). Drei Jahre später verloren die Zellen diese Eigenschaft (Meakin, 1989). Deshalb wurden unsere Passagen der N/N1003A-Zelllinie auf endogene  $\alpha$ A-Kristallinexpression im Immunoassay untersucht. N/N1003A-Zellen werden mit einem Plasmid transfiziert, das  $\alpha$ A-Kristallin exprimiert. Als Kontrolle werden Zellen untransfiziert eingesetzt. Die Färbung mit polyklonalem Antikörper gegen das  $\alpha$ A-Kristallin zeigt, dass kein endogenes  $\alpha$ A-Kristallin in den N/N1003A-Zellen nachweisbar ist (Abbildung 4.4). Im Gegensatz dazu zeigen cryaa-pcDNA3.1 transfizierte Zellen das Protein bei einem Molekulargewicht von 20 kDa. Das stimmt mit dem theoretischen Wert von 19,79215 kDa (Swiss-Prot, Zutrittsnummer P02490) überein. Der größte Teil des Proteins erscheint in der wasserlöslichen Fraktion .

Im Gegensatz zu den N/N1003A-Zellen exprimieren CD5A-Zellen endogen  $\alpha$ A-Kristallin (persönliche Mitteilung, R. Quinlan, University of Dundee).



**Abbildung 4.4: Expression transient transfizierten  $\alpha$ A-Kristallins in der N/N1003A-Zelllinie.**

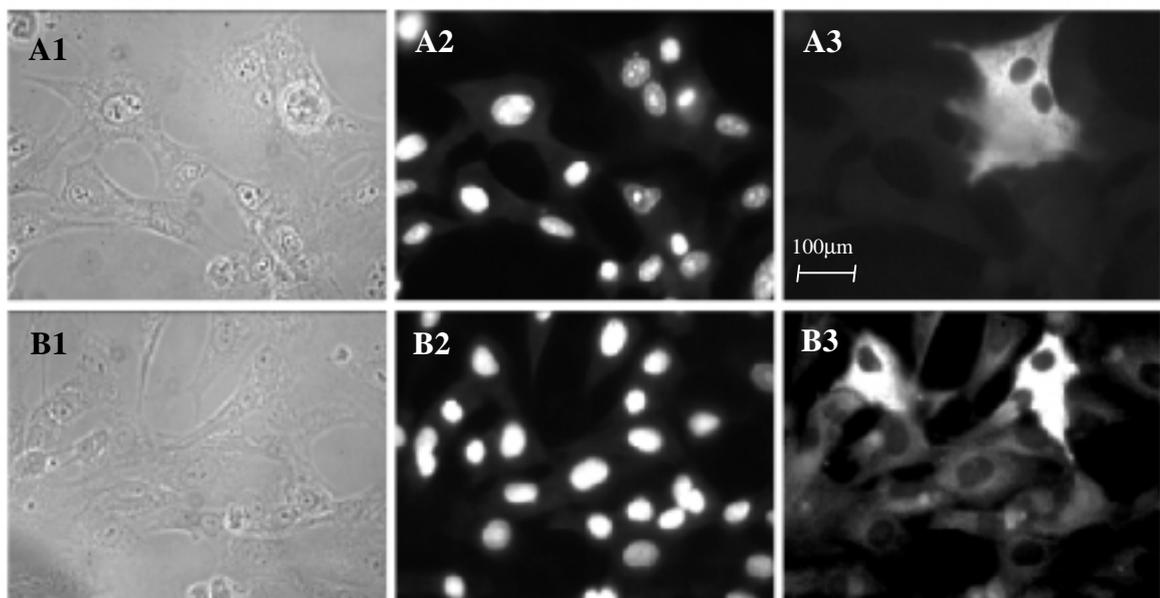
Für die Analyse im „Westernblot“ wurde gegen das  $\alpha$ A-Kristallin gerichteter, polyklonaler Antikörper eingesetzt. In den Spuren 1 - 3 wurde die lösliche Fraktion, in den Spuren 4 - 6 die Pellets aus Gesamtzellextrakt der N/N1003A-Zellen aufgetragen. 1,3 und 4,6 sind untransfizierte N/N1003A-Zelllysate. In 2 und 5 wurden die N/N1003A-Zellen mit cryaa-pcDNA3.1 transfiziert.

### 4.3.3 Subzelluläre Lokalisation von $\alpha$ A-Kristallin und HSP27 in N/N1003A-Zellen

Die immunologische Detektion in gesamten Zellen klärt die subzelluläre Lokalisation des  $\alpha$ A-Kristallins bzw. des HSP27 auf. Auf diese Weise erhält man Aufschluss, ob die Proteine im Zellkern vorliegen, in dem sich ihr Bindepartner, DOTIS, befindet.

Dazu wird das  $\alpha$ A-Kristallin im pcDNA3.1-Expressionsvektor in die N/N1003A-Zelllinie transfiziert und anschließend immunologisch in den Zellen nachgewiesen. Dafür wird ein polyklonaler Antikörper eingesetzt, der gegen das  $\alpha$ A-Kristallin gerichtet ist. Es bestätigt sich, dass das  $\alpha$ A-Kristallin in untransfizierten N/N1003A-Zellen nicht nachzuweisen ist (vergleiche Kapitel 4.3.2). Zellschalen, die nicht mit cryaa-pcDNA3.1 transfiziert wurden, sind nicht abgebildet. Allerdings sind die nicht gefärbten Zellen in A3 dieser Abbildung mit denen untransfizierter Schalen zu vergleichen (Abbildung 4.5). Die transfizierten Zellen hingegen zeigen ein starkes Signal im Zytoplasma. In den Zellkernen ist kein  $\alpha$ A-Kristallin nachweisbar. Die Einstellung der korrekten Fokussierungsebene ist in der Kernfärbung mit Propidiumiodid erkennbar.

Nach dem gleichen Verfahren wird das HSP27 in der N/N1003A-Zelllinie exprimiert und mit einem entsprechenden polyklonalen Antikörper nachgewiesen. Das HSP27 ist – vergleichbar zum  $\alpha$ A-Kristallin – im Zytoplasma lokalisiert. Die schwache Färbung nicht transfizierter Zellen ist entweder auf eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit anderen Proteinen oder auf eine endogene Expression des Hsp25 in dieser Zelllinie zurückzuführen. Die schwach gefärbten Zellen in Abbildung 4.5 sind mit denen untransfizierter Schalen zu vergleichen.



**Abbildung 4.5: Subzelluläre Lokalisation des  $\alpha$ A-Kristallins und des HSP27 in N/N1003A-Zellen.**

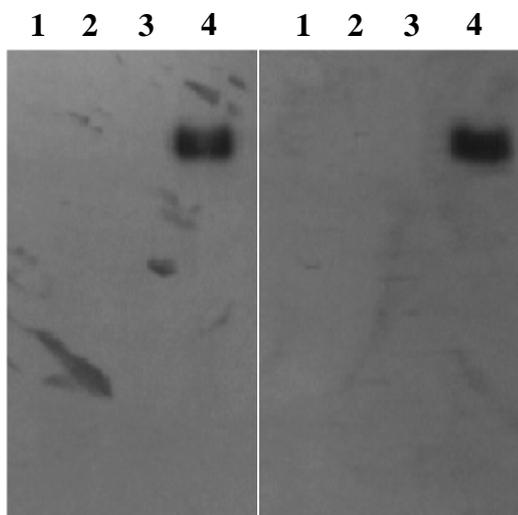
(A1 – A3) zeigen N/N1003A-Zellen, die transient mit dem Expressionsvektor transfiziert wurden, der für das  $\alpha$ A-Kristallin kodiert. In (B1 – B3) wurde HSP27 exprimierender Vektor transfiziert. Die Kerne wurden mit Propidiumiodid gefärbt (A2 und B2). Die Immunfärbungen wurden mit polyklonalen Antikörpern durchgeführt, die gegen das  $\alpha$ A-Kristallin (A3) und das HSP27 (B3) gerichtet sind.

#### **4.3.4 Bovines Linsenextrakt und rekombinantes $\alpha$ A-Kristallin in ihrer Interaktion mit DOTIS**

Das  $\alpha$ A-Kristallin ist rekombinant in N/N1003A-Zelllinien exprimierbar (Kapitel 4.3.2 und 4.3.3). Es liegt vorwiegend löslich vor und ist im Gesamtzellextrakt enthalten. Gesamtzellextrakt wird in das folgende Experiment im Gel-Retardationsassay eingesetzt. Zur negativen Kontrolle kann die untransfizierte Zelllinie herangezogen werden. Die Positiv-Kontrolle wird mit nativem, bovinen Linsenextrakt (Pietrowski,

1997) ermöglicht. Zur DNS-Bindung wird die Matrize des DOTIS eingesetzt. Der komplementäre DNS-Strang ist die dazu entsprechende Negativkontrolle.

Der Gel-Retardationsassay bestätigt die aus der Literatur bekannte Bindung bovinen Linsenextrakts an den Matrizenstrang des DOTIS (Abbildung 4.6). Der Nicht-Sinnstrang zeigt erwartungsgemäß keine Bindung. Im Gegensatz zur Bindung des bovinen Linsenextrakts kann für transfizierte N/N1003A-Zellen am nicht codierenden Strang des DOTIS keine Bindung gezeigt werden. Somit ist die Interaktion rekombinanten  $\alpha$ A-Kristallins mit DOTIS nicht nachweisbar.



**Abbildung 4.6: Gel-Retardationsassay zum DOTIS.**

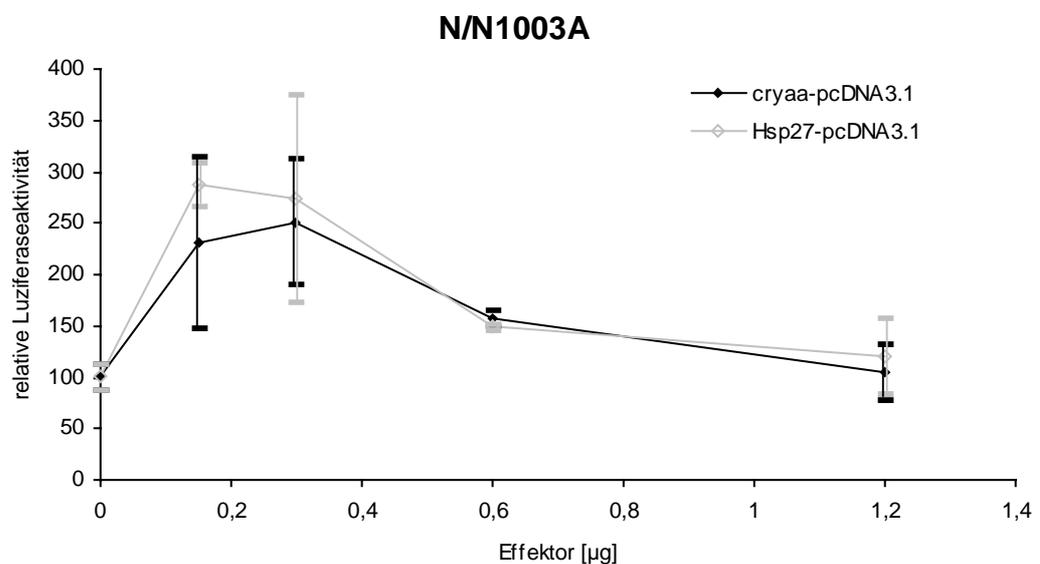
cryaa-pcDNA3.1 wurde in N/N1003A-Zellen transfiziert. Dieses Zellysate (1, 2) und boviner Linsenextrakt (3, 4, Sigma) wurden mit dem codierenden (1, 3) und dem nicht codierenden DOTIS DNS-Einzelstrang inkubiert. Links wurde für die Bindung der Puffer nach Shastry (1993) eingesetzt. Rechts wurde der Gel-Retardationsassay mit Puffer (2) (Kapitel 2.7) durchgeführt.

#### 4.3.5 Funktion des $\alpha$ A-Kristallins und des HSP27 am $\gamma$ F-Kristallinpromotor

Nach den Experimenten zur Aktivität des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors in Epithelzelllinien der Linse (Kapitel 4.2) wird zunächst eine erste Versuchsanordnung beschrieben, die eine Charakterisierung des  $\alpha$ A-Kristallins und des HSP27 ermöglichen sollte. Aus der Vielfalt der kombinatorischen Möglichkeiten Effektor, Reporter und Kontrolle ins Verhältnis zu setzen, orientierte ich mich zunächst an der Dissertation von E. Krausz (1996). Danach wurde der Einfluss des  $\alpha$ A-Kristallins auf den  $\gamma$ F-Kristallinpromotor in N/N1003A-Zellen überprüft. Dazu wurde je eine konstante Menge von 1,2  $\mu$ g des p $\gamma$ 226LucII-Plasmids mit 0 – 1,2  $\mu$ g des Expressionsplasmids cryaa-pcDNA3.1 in N/N1003A-Zellen kotransfiziert. Die ermittelte relative Luziferaseaktivität im Transfektionsansatz mit 0  $\mu$ g cryaa-pcDNA3.1 wurde 100 %

gesetzt. Damit ist eine Veränderung der  $\gamma$ F-Kristallinpromotor Aktivität in den Kotransfektionsexperimenten leichter ersichtlich.

Für das  $\alpha$ A-Kristallin steigt die Promotoraktivität bei Transfektion bis zu 0,3  $\mu$ g cryaa-pcDNA3.1 auf das 2,5-fache der basalen Promotoraktivität an und fällt mit 0,6  $\mu$ g und mehr in der Transfektionsreihe wieder auf das Niveau der basalen Promotoraktivität ab. Die Standardabweichung ist im Bereich hoher Promotoraktivität groß. Aus diesem Grund wurden die Transfektionen, die Effektor enthalten, mit denen, die keinen Effektor enthalten, in einem zweiseitigen, gepaarten t-Test verglichen. Dieser t-Test widerlegt die Nullhypothese mit der Grenze von 5 % nicht, dass die relativen Promotoraktivitäten der Transfektionen mit und ohne cryaa-pcDNA3.1 aus der gleichen Grundgesamtheit stammen. Für HSP27 wurde vergleichbares wie für das  $\alpha$ A-Kristallin beobachtet. Spätere DNS-Präparationen der einzelnen Komponenten und deren Einsatz in Kotransfektionsexperimenten ließen diese beiden Resultate sowohl bei der Ernte nach 72 h als auch nach 42 h nicht reproduzieren (Kapitel 5.2.2).



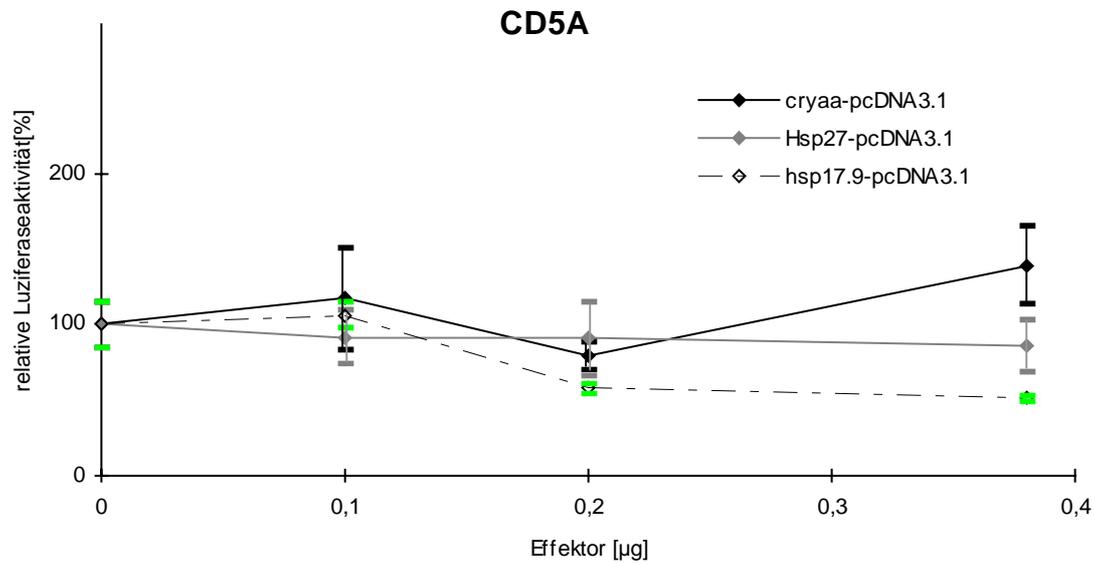
**Diagramm 4.6: Einfluss des  $\alpha$ A-Kristallins und des HSP27 auf den (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotor in N/N1003A-Zellen.**

1,2  $\mu$ g des Reportervektors p $\gamma$ 226LucII wurde in N/N1003A-Zellen transfiziert. Dazu wurden steigende Mengen (0  $\mu$ g, 0,15  $\mu$ g, 0,3  $\mu$ g, 0,6  $\mu$ g und 1,2  $\mu$ g) des  $\alpha$ A-Kristallin oder des HSP27 Expressionsplasmids kotransfiziert. Die Zellen wurden nach 72 h geerntet und die relative Luziferaseaktivität bestimmt. Die Richtzeit der Ernte von 48 h wurde erhöht, um dadurch potentielle postranslationale Modifikationen zu ermöglichen (Kapitel 5.2.4).

Der kritische Bereich aus den oben geschilderten Experimenten zur Untersuchung des Einflusses von  $\alpha$ A-Kristallin und HSP27 auf den  $\gamma$ F-Kristallinpromotor liegt zwischen 0 und 0,4  $\mu$ g des jeweiligen Expressionsplasmids. Dazu wird je eine konstante Menge des p $\gamma$ 226LucII-Plasmids mit 0 – 0,4  $\mu$ g des Expressionsplasmids cryaa-pcDNA3.1, respektive HSP27-pcDNA3.1 kotransfiziert.

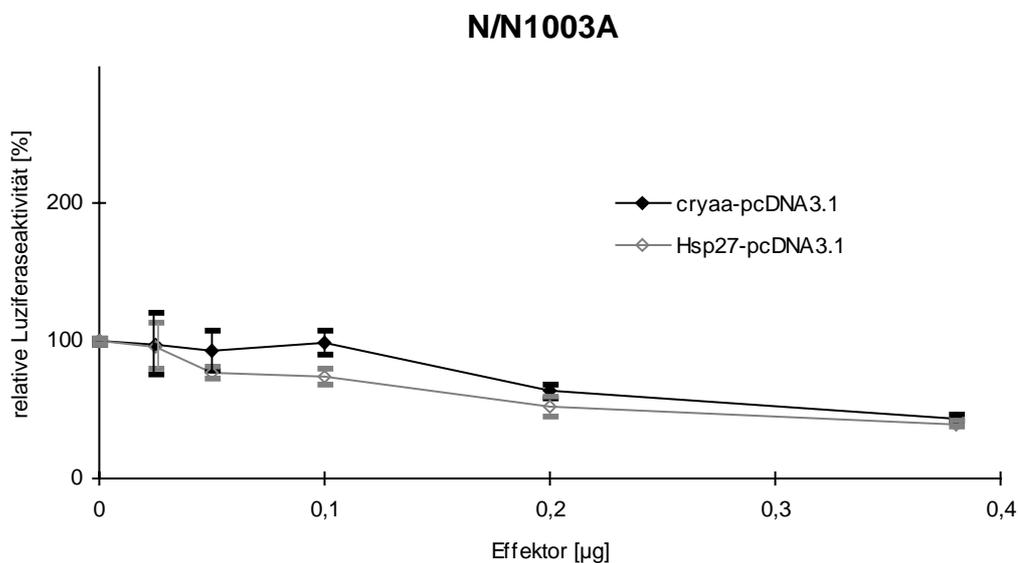
Die Promotoraktivität bleibt bei der Kotransfektion von cryaa- und HSP27-pcDNA3.1 in der CD5A-Zelllinie (Diagramm 4.7) nahezu unverändert. Bei keiner definierten Menge kotransfizierten  $\alpha$ A-Kristallins beziehungsweise HSP27 ist eine Veränderung der Promotoraktivitäten in der CD5A-Zelllinie zu beobachten. Die Promotoraktivität bleibt reproduzierbar auf dem basalen Level von 100 %, welches der Promotoraktivität ohne Kotransfektion eines Expressionsplasmids gleichkommt. Neben dem  $\alpha$ A-Kristallin und dem HSP27 ist auch das dazu entfernt verwandte hsp17.9 aus *Petroselinum crispum* gezeigt. Für dieses Protein ist kein Einfluss in der CD5A-Zelllinie auf den  $\gamma$ F-Kristallinpromotor erkennbar.

In der N/N1003A-Zelllinie wurde die Menge des Reporters in den Transfektionen halbiert, da für 1,2  $\mu$ g eine Sättigung in der  $\gamma$ F-Kristallinpromotoraktivität zu beobachten war (Diagramm 4.5). Die Kotransfektionen von cryaa- oder HSP27-pcDNA3.1 mit 0,6  $\mu$ g p $\gamma$ 226LucII in die N/N1003A-Zelllinie zeigen eine schwache Repression des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors (Diagramm 4.8). Berücksichtigt man allerdings die Daten der Transfektionskontrolle pRL-SV40, stellt man im Vergleich mit der CD5A-Zelllinie eine 100-fach höhere Aktivität der Renilla-Luziferase fest. Das bedeutet, dass viel mehr DNS transfiziert wird, die dann den Zellhaushalt mit der Aufgabe belastet, immer mehr  $\alpha$ A-Kristallin beziehungsweise HSP27 zu produzieren. Deshalb lässt möglicherweise der gesamte Stoffwechsel nach (vergleiche Kapitel 5.2.2).



**Diagramm 4.7: Der Einfluss des  $\alpha$ A-Kristallins, des HSP27 und des hsp17.9 auf den (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotor in CD5A-Zellen.**

Der Reportervektor p $\gamma$ 226LucII wurde in CD5A-Zellen transfiziert. Dazu wurden steigende Mengen (0  $\mu$ g, 0,1  $\mu$ g, 0,2  $\mu$ g und 0,38  $\mu$ g) des  $\alpha$ A-Kristallin, HSP27 oder hsp17.9 Expressionsplasmids kotransfiziert. Die Zellen wurden nach 42 h geerntet und die relative Luziferaseaktivität bestimmt.



**Diagramm 4.8: Einfluss des  $\alpha$ A-Kristallins und des HSP27 auf den (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotor in N/N1003A-Zellen.**

Der Reportervektor p $\gamma$ 226LucII wurde in N/N1003A-Zellen transfiziert. Dazu wurden steigende Mengen (0  $\mu$ g, 0,025  $\mu$ g, 0,05  $\mu$ g, 0,1  $\mu$ g, 0,2  $\mu$ g und 0,38  $\mu$ g) des  $\alpha$ A-Kristallin oder HSP27 Expressionsplasmids kotransfiziert. Die Zellen wurden nach 42 h geerntet und die relative Luziferaseaktivität bestimmt.

#### 4.4 Funktionsanalyse des PROX1 am $\gamma$ F-Kristallinpromotor

Das Prox1 der Maus ist in der Augenlinse exprimiert und hat eine wesentliche Bedeutung bei der Elongation der Linsenfasern (Wigle et al., 1999<sup>o</sup>).  $\gamma$ -Kristalline sind als Strukturproteine an dieser Elongation beteiligt. In den  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren liegt je eine Prospero-Bindestelle vor. Zur Untersuchung des Einflusses des PROX1/Prox1, dem Vertebraten-Homologen von Prospero, auf den  $\gamma$ F-Kristallinpromotor, werden Linsenepithelzelllinien auf ihre endogene PROX1/Prox1-Expression untersucht. Die PROX1-Expression mit PROX1-pcDNA3 wird im zellfreien System und im Zellsystem geprüft und die Funktion des PROX1 am  $\gamma$ F-Kristallinpromotor in Zellkultur charakterisiert.

##### 4.4.1 Prospero-Bindestelle

Prospero ist das *Drosophila*-Homologon zum Prox1 der Vertebraten. Seine Bindestelle ist bekannt (Hassan et al., 1997). Eine Prospero-Bindestelle ist mit dem Computerprogramm *MatInspector* zwischen dem *retinoic acid response element* und der distalen TATA-Box zu finden (Abbildung 4.2). Dafür wird die Consensussequenz der Prospero-Bindestelle als JUPAC-Reihe, CWYNNCY, eingesetzt. Diese Bindestelle tritt als CACACCT in allen  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren der Nager auf. Möglicherweise nimmt auch PROX1/Prox1 diese Bindestelle aufgrund seiner verwandtschaftlichen Beziehung zu Prospero war. Zudem wird Prox1 in der Augenlinse exprimiert (Kapitel 1.4.1).

##### 4.4.2 Endogene Expression von *PROX1/Prox1* in der N/N1003A- und CD5A-Zelllinie

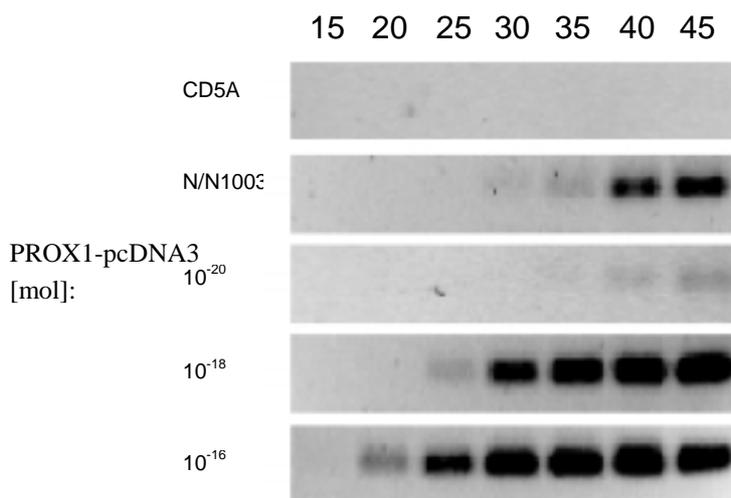
Zur Untersuchung der endogenen Expression von *PROX1/Prox1* in den CD5A- und N/N1003A-Linsenepithelzelllinie wird deren Level an *PROX1/Prox1* mRNA überprüft. Dazu wird die mRNA in einer Erststrangsynthese zu cDNA umgeschrieben und dieses Produkt anschließend mit spezifischen Oligonucleotiden mittels PCR nachgewiesen. Da die Prox1-cDNA für Kaninchen nicht bekannt ist, werden die Oligonucleotide in einen Bereich gelegt, der zumindest für die Maus und den Menschen homolog ist. Die Amplifikation genomischer cDNA darf ausgeschlossen werden, da das resultierende 108 bp PCR-Fragment intronübergreifend konzipiert ist (Kapitel 2.2). Die

endogene und durch transiente Transfektion induzierte Expression des gesamten Proteins wird später in Kapitel 4.4.3 immunologisch überprüft.

Die Positiv-Kontrolle wird mit PROX1-pcDNA3 Plasmid durchgeführt. Davon werden 1.000, 100.000 und 10.000.000 Moleküle pro Reaktionsansatz eingesetzt und somit ein Eindruck der Sensitivität dieser PCR vermittelt. Je ein PCR-Reaktionsansatz wird nach 15, 20, 25, 30, 35, 40 oder 45 PCR-Zyklen gestoppt.

In der CD5A-Zelllinie ist keine Expression an *Prox1* selbst nach 45 PCR-Zyklen nachzuweisen (Abbildung 4.7).  $\beta$ -Actin als Positiv-Kontrolle zeigt eine intakte RNS-Präparation (nicht dargestellt).

Im Gegensatz zur CD5A-Zelllinie exprimiert die N/N1003A-Zelllinie endogen *Prox1*. Pro Reaktionsansatz treten offensichtlich zwischen 1.000 und 100.000 *Prox1*-mRNS Moleküle auf. Außerdem ist damit gezeigt, dass diese Primerbindestellen beim Kaninchen zwischen Mensch und Maus homolog sind.



**Abbildung 4.7: RT-PCR zur endogenen Expression von PROX1/Prox1 in CD5A- und N/N1003A-Zellen.**

Die RT-PCR wurde mit 15 bis 45 Zyklen durchgeführt. Ein 108 bp Fragment, das für einen Teil von Exon IV und Exon V des *PROX1/Prox1*-Gens kodiert, konnte in N/N1003A-Zellen, jedoch nicht in der CD5A-Zelllinie amplifiziert werden. Zum Vergleich wurden verschiedene Mengen an PROX1-pcDNA3 Plasmid als Matrize eingesetzt.

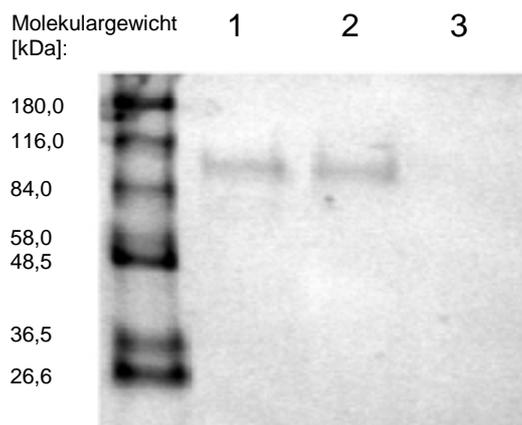
#### 4.4.3 Transiente PROX1-Expression in der CD5A-Zelllinie und im Retikulozytenlysat

Da die CD5A-Zelllinie kein endogenes PROX1 exprimiert, wird PROX1-pcDNA3 in diese Zelllinie transfiziert, um dessen Expressionsprodukt auf seine Richtigkeit zu überprüfen. Als Positiv-Kontrolle wird die N/N1003A-Zelllinie verwendet, die endogen *Prox1* exprimiert (Kapitel 4.4.2). Negativkontrolle ist die untransfizierte CD5A-Zelllinie.

Freundlicherweise wurde unserer Arbeitsgruppe von S. Tomarev (NEI/NIH, Bethesda, USA) eine kleine Menge polyklonalen *Prox1* Antikörpers zur Verfügung

gestellt. Damit konnte ich die Zelllinien im „Westernblot“ immunologisch analysieren. Das Prox1 Signal erscheint bei einer Größe von 90 kDa lediglich in N/N1003A-Zellen, nicht jedoch in CD5A-Zellen (Abbildung 4.8). Werden die CD5A-Zellen allerdings mit PROX1-pcDNA3 transfiziert, ist es auch in der Zelllinie in dieser Größe nachweisbar. Die Sequenz des Prox1 aus Kaninchen ist nicht bekannt. Die theoretischen Molekulargewichtsgröße des humanen PROX1 von 83,16226 kDa stimmt mit dem exogenen menschlichen PROX1 aus den CD5A-Zellen nicht exakt überein (ExpASy, Zutrittsnummer: Q92786). Eine Größe von 90 kDa im „Western Blot“ wird allerdings auch für das Maus Prox1 beobachtet (Rio-Tsonis et al., 1999) und dessen theoretische Molekulargewicht beträgt 83,12616 kDa (Swiss-Prot, Zutrittsnummer: NP\_032963). Die endogene Prox1-Expression bestätigt die Untersuchung mittels RT-PCR. Die durch transiente Transfektion erhaltene PROX1-Expression zeigt, dass der Expressionsvektor PROX1-pcDNA3 in der CD5A-Zelllinie intakt exprimiert wird.

Ferner kann die intakte Expression des PROX1 mit PROX1-pcDNA3 im Retikulozytenlysat nachgewiesen werden (Abbildung 4.9). Da lediglich das neusynthetisierte Protein Radioaktivität enthält, darf die Spur als Kontrolle aufgefasst werden, in der Six3-pcDNA3.1 exprimiert wird. Hier erscheint kein Signal, das eine vergleichbare Molekulargewichtsgröße mit dem Reaktionsansatz aufweist, der PROX1-pcDNA3 enthält.

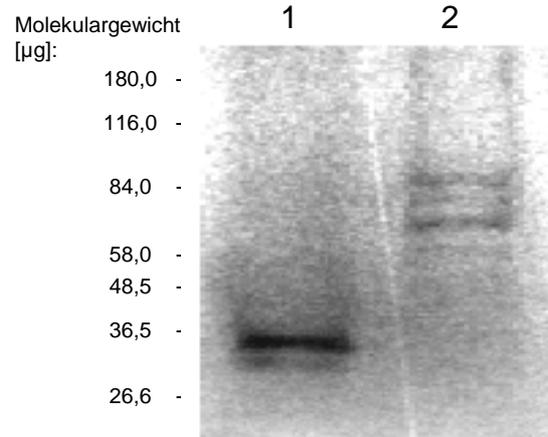


**Abbildung 4.8: „Westernblot“ Analyse zum PROX1/Prox1 in CD5A- und N/N1003A-Zellen.**

Zellysate von N/N1003A-Zellen (1), PROX1-pcDNA3 transfizierten CD5A-Zellen (2) und untransfizierten CD5A-Zellen (3) wurden mit einem Antikörper immungefärbt, der gegen den C-terminalen Teil (aa 546 – 736, erhalten von S. I. Tomarev, NEI/NIH) des menschlichen PROX1 gerichtet ist. Der Antikörper erkennt eine 90 kDa-Bande in den N/N1003A-Zellen und in den mit PROX1-pcDNA3 transient transfizierten CD5A-Zellen. Die CD5A-Zellen zeigen keine endogene PROX1-Expression.

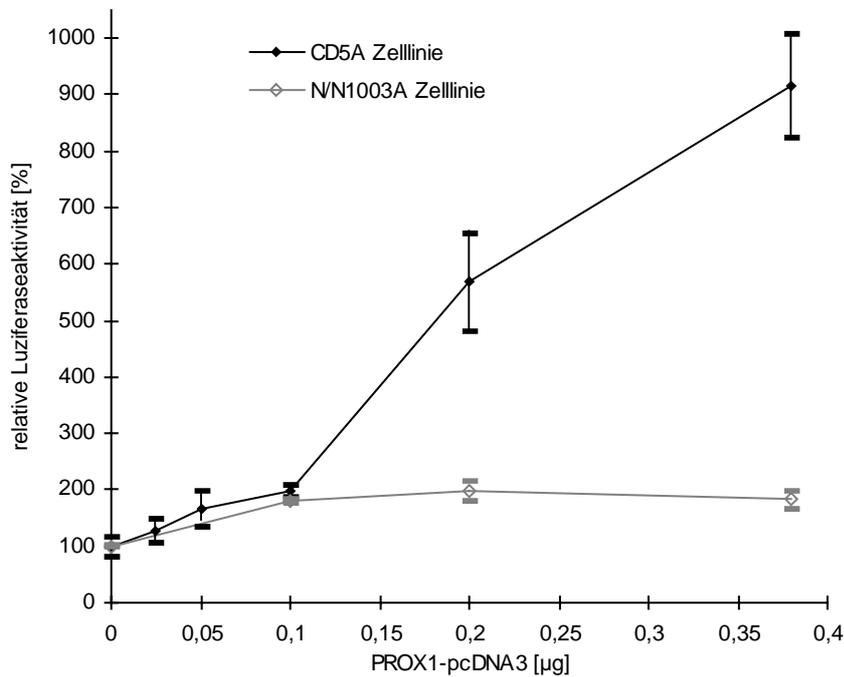
**Abbildung 4.9: *In vitro*-Expression von PROX1 und Six3.**

PROX1-pcDNA3 (2) und Six3-pcDNA3.1 (1) wurden im Retikulozytenlysat, welches [<sup>35</sup>S]Methionin enthält, transkribiert und translatiert. Eine 90 kDa-Bande für das PROX1 und eine 37 kDa-Bande für das Six3 sind zu erkennen. Kürzere Peptide, als das 90 kDa Signal des PROX1, entstehen, wenn das zweite oder dritte AUG als Startcodon erkannt wird.

**4.4.4 PROX1-Aktivierung des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors**

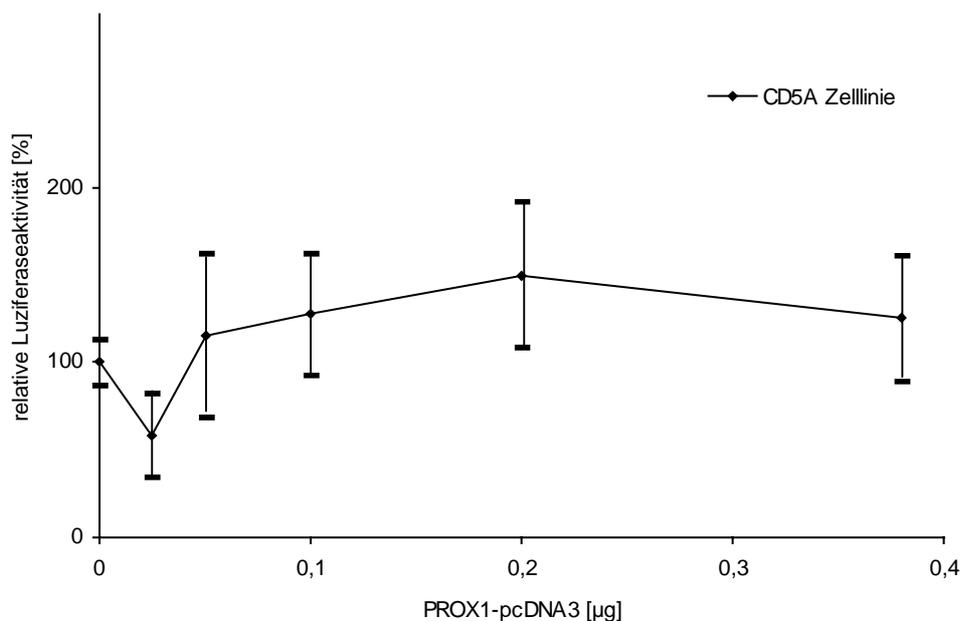
Die Regulation des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors durch PROX1 wird in transienten Kotransfektionen untersucht. Dazu eignet sich besonders die menschliche CD5A-Zelllinie, da sie kein endogenes PROX1 exprimiert (Kapitel 4.4.2). Eine konstante Menge des p $\gamma$ 226LucII-Plasmids wird zusammen mit 0 – 0,4 µg des Expressionsplasmids PROX1-pcDNA3 in diese Zelllinie kotransfiziert. Die Transfektionsreihe enthält die Kontrolle mit 0 µg PROX1-pcDNA3. Mit der Aktivität dieses Reaktionsansatzes werden die anderen Luziferaseaktivitäten normiert und erscheinen als Vielfaches der Basis Promotoraktivität des (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallins. Als weitere Kontrolle dienen vergleichbare Reaktionsansätze, die statt des p $\gamma$ 226LucII-Plasmids den pLLucII-Vektor enthalten. Reguliert PROX1 spezifisch den (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotor, sollte die Aktivität des pLLucII unbeeinflusst bleiben.

In der CD5A-Zelllinie verdoppeln 100 ng des PROX1-Expressionsvektors die Aktivität des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors (Diagramm 4.9). Größere Mengen an PROX1-pcDNA3 verstärken die Aktivierung, bis sie ein Plateau bei 400 ng und 10-facher Stimulation erreicht. Im Gegensatz dazu hat PROX1 keinen Einfluß auf pLLucII, das Reporterplasmid ohne (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotor (Diagramm 4.10).



**Diagramm 4.9: Aktivierung des (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotors durch PROX1.**

Der Reportervektor p $\gamma$ 226LucII wurde in CD5A und N/N1003A-Zellen transfiziert. Dazu wurden steigende Mengen (0  $\mu$ g, 0,025  $\mu$ g, 0,05  $\mu$ g, 0,1  $\mu$ g, 0,2  $\mu$ g und 0,38  $\mu$ g) des PROX1-pcDNA3-Expressionsplasmids kotransfiziert. Die Zellen wurden nach 42 h geerntet und die relative Luziferaseaktivität bestimmt.



**Diagramm 4.10: Effekt des PROX1 auf das Reporterplasmid ohne (-226/+46)  $\gamma$ F-Kristallinpromotor.**

Der Reportervektor pLLucII wurde in CD5A-Zellen transfiziert. Dazu wurden steigende Mengen (0  $\mu$ g, 0,025  $\mu$ g, 0,05  $\mu$ g, 0,1  $\mu$ g, 0,2  $\mu$ g und 0,38  $\mu$ g) des PROX1-pcDNA-Expressionsplasmids kotransfiziert. Die Zellen wurden nach 42 h geerntet und die relative Luziferaseaktivität bestimmt.

Zum Vergleich wird die Aktivierung des (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotors durch PROX1 in der N/N1003A-Zelllinie durchgeführt. Wie in Kapitel 4.4.2 erwähnt, exprimiert diese Zelllinie endogen PROX1. Deshalb ist bei Überexpression des PROX1 lediglich eine schwache oder keine Stimulation des (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotors zu erwarten. Das Experiment wird vergleichbar, wie für die CD5A-Zellen beschrieben, durchgeführt. 100 ng an PROX1-pcDNA3 verdoppeln in der CD5A-Zelllinie wie in N/N10003A Zellen die Promotoraktivität. Im Gegensatz zur CD5A-Zelllinie ist keine weitere Stimulation des (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotors in der N/N1003A-Zelllinie möglich. Der Grund dafür ist höchstwahrscheinlich die endogene Expression an PROX1 in der N/N1003A-Zelllinie.

Im Kontrollexperiment wurde das Plasmid pLLucII in die CD5A-Zelllinie transfiziert. Das kotransfizierte PROX1 verändert die basale Reporteraktivität kaum (Diagramm 4.10). Da das pLLucII-Plasmid im Vergleich zum p $\gamma$ 226LucII lediglich eine geringe Aktivität hat, sinkt die absolute *Firefly*-Luziferaseaktivität. Man nähert sich der Grenze der Messgenauigkeit. Deshalb vergrößern sich die Fehlerbalken.

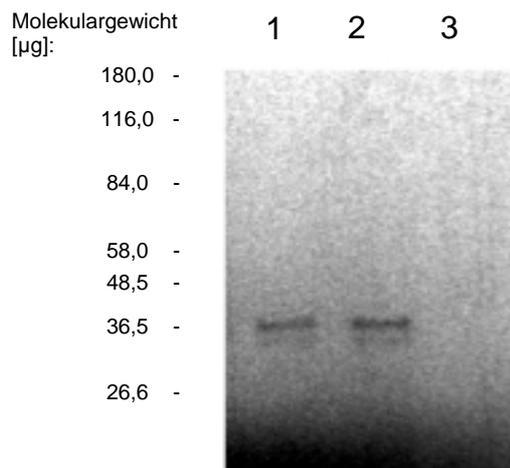
#### 4.5 Funktionsanalyse des Six3 am $\gamma$ F-Kristallinpromotor

Six3 ist an der frühen Augenlinsenentwicklung beteiligt. Seine Expression in der Augenlinse der Maus wird ab E 14.5 reduziert (Oliver et al., 1995). Zu dieser Zeit setzt verstärkt die Expression der  $\gamma$ -Kristalline ein (Klopp, Dissertation, 2000). Deshalb wird die Hypothese formuliert, dass das Abschalten von Six3 die  $\gamma$ DEF-Kristallinexpression steuert. Six3 reprimiert demnach die  $\gamma$ DEF-Kristalline. Sobald diese Repression aufgehoben wird, können die  $\gamma$ -Kristalline exprimiert werden. Die  $\gamma$ DEF-Kristalline haben im proximalen Promotor einen Bereich zwischen den Positionen -213 und -129, an den nach *MatInspector* Homeodomänenproteine binden können (Kapitel 4.1.2). Eine spezifische Bindestelle ist zur Zeit noch nicht bekannt. Deshalb wird das Protein exprimiert und in Bindestudien eingesetzt. Ferner wird im Zellsystem die Funktion des Six3 am  $\gamma$ F-Kristallinpromotor überprüft. Dazu werden Linsenepithelzelllinien zuerst auf ihre endogene Six3-Expression untersucht. Anschließend kann die Funktion des Six3 am  $\gamma$ F-Kristallinpromotor in Zellkultur charakterisiert werden.

#### 4.5.1 *In vitro*-Expression von Six3 im Retikulozytenlysat

Zur funktionalen Analyse des Six3 am  $\gamma$ F-Kristallinpromotor muss dieses Protein in geeigneter Menge hergestellt werden. Die cDNS aus der Maus wurde uns freundlicherweise von P. Gruss (MPI, Göttingen) zur Verfügung gestellt, das EcoRI-Fragment daraus wurde in den pcDNA3.1 Vektor kloniert. Anschließend wurde überprüft, ob dieses neu entstandene Plasmid Six3 korrekt exprimiert. Dazu wird das Six3-pcDNA3.1 Plasmid in das Retikulozytenlysat eingesetzt.

Das neusynthetisierte Protein erscheint bei etwa 36 kDa (Abbildung 4.10). Die theoretische Molekulargewichtgröße des murinen Six3 von 35,59275 kDa (Swiss-Prot, Zutrittsnummer Q62233) stimmt deshalb mit dem Signal im SDS-Gel überein. In der Kontrolle wurde dem Retikulozytenlysat pcDNA3.1-Vektor zugesetzt, welcher sich in der fehlenden Six3-cDNS vom Six3-pcDNA3.1 unterscheidet. Dort ist kein Signal erkennbar.



**Abbildung 4.10: *In vitro*-Expression von Six3.**

Six3-pcDNA3.1 (1 und 2) wurden im Retikulozytenlysat, welches [ $^{35}$ S]-Methionin enthält, transkribiert und translatiert. Das Signal erscheint bei 36 kDa und entspricht dem Six3 Protein mit der Zutrittsnummer Q62233 (333 aa, 35,59275 kDa). Zur Kontrolle (3) wurde ins Retikulozytenlysat pcDNA3.1 eingesetzt.

#### 4.5.2 Six3-Bindung am $\gamma$ F-Kristallinpromotor

Six3 ist ein Homeodomänenprotein, das in der Augenlinse exprimiert wird. Zur Zeit ist nicht bekannt, welche DNS-Sequenz dieser Transkriptionsfaktor spezifisch bindet. Die computerunterstützte Analyse mit *MatInspector* ergab sechs Homeodomänenbindestellen, die zwischen der Position -213 und -129 im  $\gamma$ F-Kristallinpromotor liegen (Kapitel 4.1.2). Deshalb wurde untersucht, ob das Six3 als linsenspezifisches Homeodomänenprotein mit dem proximalen Teil des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors interagiert.

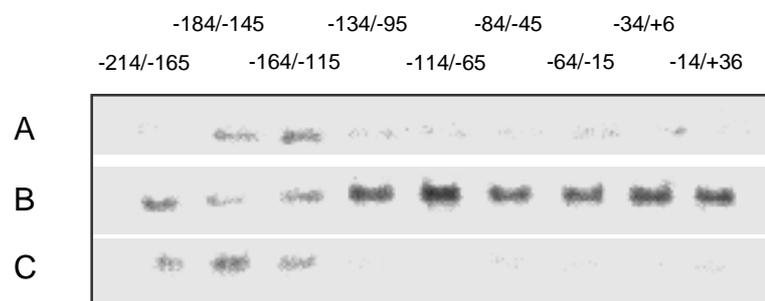
Dazu wird das Six3-Protein in ausreichender Menge im Retikulozytenlysat hergestellt. DNS-Fragmente des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors werden an pelletierbare,

paramagnetische Kügelchen gebunden und mit dem *in vitro* exprimierten Six3 inkubiert. Das Pellet wird anschließend im SDS-Gel analysiert. Bindet Six3 an eines der DNS-Fragmente, ist ein Signal zu erwarten.

Zur Kontrolle wird Six3 mit immobilisierten (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotor präzipitiert. Anschließend setzt man die oben erwähnten DNS-Fragmente - dieses Mal nicht matrixgebunden – als Konkurrenz-DNS ein. Nur die DNS-Fragmente, mit denen Six3 spezifisch interagiert, setzen das Protein frei. Demnach erscheint Six3 im Überstand, wenn es mit einem  $\gamma$ F-Kristallinpromotor-Fragment in Wechselwirkung tritt, und im Pellet, wenn dies nicht der Fall ist.

Six3 zeigt eine spezifische Wechselwirkung mit den matrixgebundenen Fragmenten (-184/-145) und (-164/-115) des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors (Abbildung 4.11 A). Diese beiden immobilisierten Sequenzen ermöglichen die Präzipitation des Proteins. Mit den restlichen  $\gamma$ F-Kristallin-Fragmenten (-214/-165), (-134/-95), (-114/-65), (-84/-45), (-64/-15), (-34/+6) und (-14/+36) hingegen ist diese Präzipitation nicht möglich.

In der Kontrolle dazu wird (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallin gebundenes Six3 spezifisch durch 50-fachen Überschuss ungebundener Nucleotide freigesetzt, welche für den Promotorbereich (-214/-165), (-184/-145) oder (-164/-115) stehen (Abbildung 4.11 C, Kapitel 3.4.2.3). Diese Konkurrenzreaktion gelingt nicht für die anderen DNS-Fragmente. Umgekehrt ist in den Reaktionsansätzen, in denen erfolgreich Six3 freigesetzt wurde, im Pellet des (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotors ein schwächeres Signal erkennbar als in den übrigen Pellets (Abbildung 4.11 B).



**Abbildung 4.11: Affinitätsbindung und Präzipitation des Six3 mit DNS-Sequenzen.**

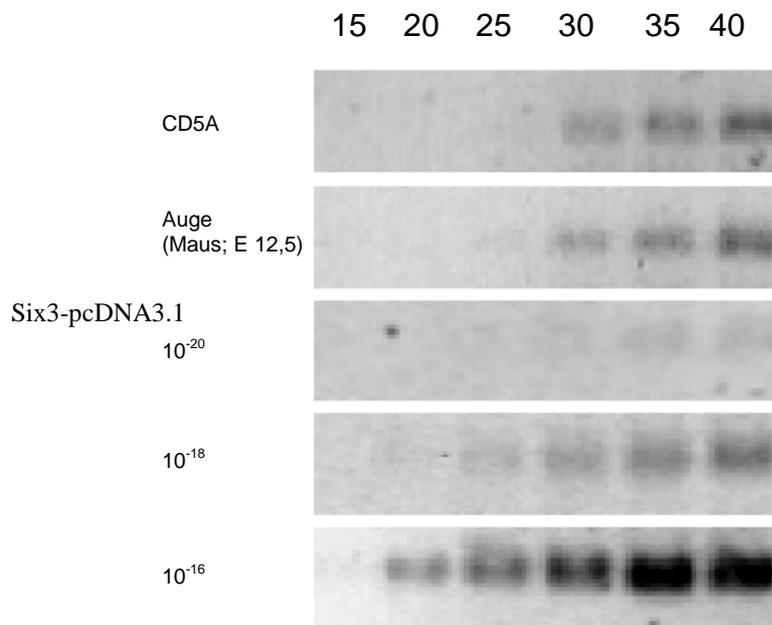
Die immobilisierten Sequenzen (-184/-145) und (-164/-115) des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors präzipitieren spezifisch Six3 (A). Im Kontrollelexperiment wurde Six3 an immobilisiertes (-226/+46)  $\gamma$ F-Kristallin gebunden. Die ungebundenen DNS-Sequenzen (-214/-165), (-184/-145) und (-164/-115) verdrängen das Six3 aus dem Pellet (B) in den Überstand (C). Deswegen interagiert Six3 mit dem  $\gamma$ F-Kristallinpromotor zwischen den Nucleotiden -214 und -115.

### 4.5.3 Endogene Expression von *Six3* in den CD5A und N/N1003A-Zelllinien

Die endogene Expression von *Six3* in den Zelllinien CD5A und N/N1003A wird untersucht, indem die RNS aus den Zellen präpariert wird und dazu komplementäre DNS als Erststrang synthetisiert wird. Anschließend kann in einer PCR-Reaktion mit spezifischen Primern *Six3* nachgewiesen werden. Da die *Six3*-cDNS für Kaninchen und somit für die N/N1003A-Zelllinie nicht bekannt ist, werden die Oligonucleotide in einem Bereich gewählt, der zumindest für Maus und Mensch identisch ist. Die schwierige Amplifikation GC-reicher codierender Sequenzen im *Six3* (68 %) wird umgangen, indem ein 70 bp Fragment aus dem 3'-UTR des *Six3* amplifiziert wird, welches geringer im GC-Gehalt (45 %) ist. Das daraus resultierende DNS-Fragment ist nicht intronübergreifend. Deshalb wird zur Kontrolle ein Teil der RNS-Präparation als Template verwendet. Nur dann kann Verunreinigung durch genomische DNS ausgeschlossen werden, wenn dieser Reaktionsansatz nach der PCR kein Signal liefert. In einer Sequenzierungsreaktion wird die Richtigkeit des entstandenen Fragments überprüft.

Mit *Six3*-pcDNA3.1 Plasmid wird die Positiv-Kontrolle der PCR-Reaktionen durchgeführt. Dazu werden 1.000, 100.000 und 10.000.000 Moleküle dieses Vektors pro Reaktionsansatz eingesetzt. Auf diese Weise erhält man eine Vorstellung von der Sensitivität dieser PCR. Die PCR-Reaktionen werden nach 15, 20, 25, 30, 35 und 40 Zyklen gestoppt.

In der N/N1003A-Zelllinie ist keine Expression von *Six3* nachzuweisen. Da die *Six3*-Sequenz des Kaninchens nicht bekannt ist, kann dieses Resultat entweder auf eine von Maus und Mensch abweichende Sequenz zurückzuführen sein oder *Six3* wird in der N/N1003A-Zelllinie nicht exprimiert. Für die CD5A-Zelllinie hingegen wurde mit dieser Methode eine endogene Expression von *Six3* beobachtet. Pro Reaktionsansatz treten zwischen 1.000 und 100.000 Moleküle auf. Zum Vergleich konnte das 70 bp Fragment in vergleichbarer Intensität für das Auge der embryonalen Maus gezeigt werden. Eine Sequenzierung des PCR-Fragments von *Six3* aus CD5A-Zellen ergab zu 100 % Übereinstimmung mit der *Six3* Sequenz aus der GenBank (Zutrittsnummer NM005413, Position 1489 - 1558).



**Abbildung 4.12: RT-PCR zur endogenen Expression von *Six3* in CD5A-Zellen und im Auge der embryonalen Maus.**

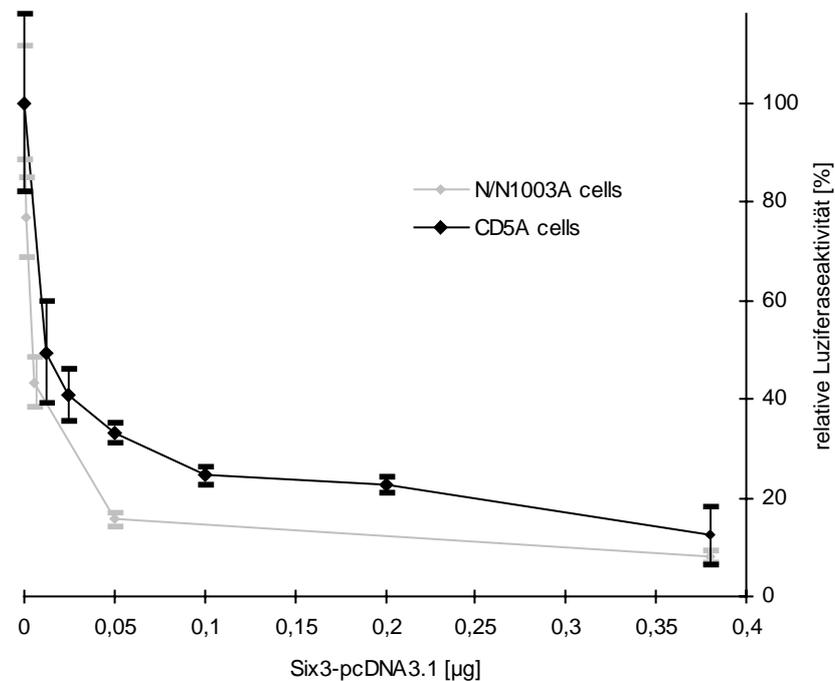
Die RT-PCR wurde mit 15 bis 40 Zyklen durchgeführt. Ein 70 bp Fragment aus dem Bereich des 3' UTRs des *Six3*-Gens konnte in CD5A-Zellen und im Auge der Maus (E12,5), jedoch nicht in der N/N1003A-Zelllinie amplifiziert werden. Zum Vergleich wurden verschiedene Mengen an *Six3*-pcDNA3.1 Plasmid als Matrize eingesetzt.

#### 4.5.4 *Six3* Repression des $\gamma$ F-Kristallinpromotors

*Six3* wird als Kandidat für die Regulation des  $\gamma$ F-Kristallins an dessen Promotor in transienten Kotretransfektionen im Zellsystem untersucht. Dafür stehen besonders die beiden Zelllinien des Linseneithels N/N1003A und CD5A zur Verfügung, da sie zu Beginn eingehend studiert wurden (Kapitel 4.2). Zur konstanten Menge des p $\gamma$ 226LucII-Plasmids als Reportervektor werden 0 – 0,4  $\mu$ g des Effektorplasmids *Six3*-pcDNA3.1 kotretransfiziert. In der Transfektionsreihe entsprechen 0  $\mu$ g des Effektors der basalen Aktivität des unbehandelten Promotors. Das pLLucII-Plasmid kann statt des p $\gamma$ 226LucII-Plasmids in die Kontrollreihe eingesetzt werden, weil es zum p $\gamma$ 226LucII-Plasmid bis auf den fehlenden (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotor identisch ist. Im Falle einer spezifischen Regulation des *Six3* des (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotors sollte die pLLucII Aktivität unverändert bleiben.

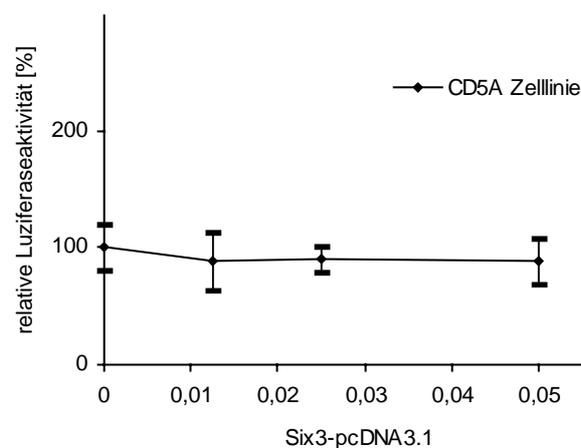
Für die Transfektion in die CD5A-Zelllinie reichen bereits 6 ng des *Six3*-Expressionsplasmids aus, um die Aktivität des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors um 40 % zu reprimieren im Vergleich zur Promotoraktivität ohne *Six3*-pcDNA3.1 (Diagramm 4.11). Größere Mengen des *Six3*-Expressionsvektors verstärken diesen Effekt, bis die Repression eine Sättigung von 90 % bei 380 ng erreicht. Im Vergleich zu den CD5A-Zellen erhält man eine ähnliche etwas stärker abfallende dosisabhängige Antwort der

Repression der Transkription in kotransfizierten N/N1003A-Zellen aus Kaninchen. Zur Kontrolle werden kritische Dosen (0 – 0,05  $\mu\text{g}$ ) Six3-pcDNA3.1 mit pLLucII transfiziert. Dabei ist kein Effekt des Six3 am promotorlosen Reporterplasmid zu beobachten (Diagramm 4.12).



**Diagramm 4.11: Repression des (-226/+45)  $\gamma\text{F}$ -Kristallinpromotors durch Six3.**

Der Reportervektor p $\gamma$ 226LucII wurde in CD5A und N/N1003A-Zellen transfiziert. Dazu wurden steigende Mengen (0 ng, 0,6 ng, 6 ng, 50 ng und 380 ng) des Six3-Expressionsplasmids kotransfiziert. Die Zellen wurden nach 42 h geerntet und die relative Luziferaseaktivität bestimmt.



**Diagramm 4.12: Effekt des Six3 auf das Reporterplasmid ohne (-226/+46)  $\gamma\text{F}$ -Kristallinpromotor.**

Der Reportervektor pLLucII wurde in CD5A-Zellen transfiziert. Dazu wurden steigende Mengen (0  $\mu\text{g}$ , 0,0125  $\mu\text{g}$ , 0,025  $\mu\text{g}$  und 0,05  $\mu\text{g}$ ) des Six3-Expressionsplasmids kotransfiziert. Die Zellen wurden nach 42 h geerntet und die relative Luziferaseaktivität bestimmt.

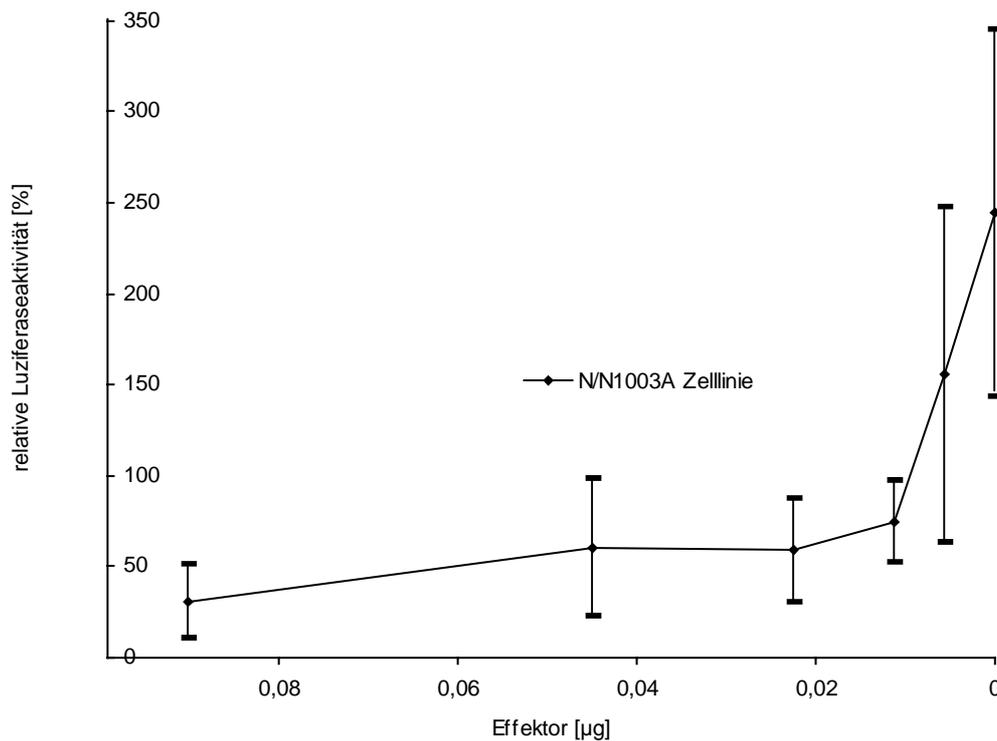
#### 4.6 Antagonistische Regulation des $\gamma$ F-Kristallinpromotors durch PROX1 und Six3

PROX1 aktiviert den (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotor (2.4), Six3 reprimiert ihn. Aus histologischen Expressionsdaten ist bekannt, dass Six3 in der Augenlinse lange vor der Expression des  $\gamma$ F-Kristallins einsetzt und im Laufe der Embryonalentwicklung in der Augenlinse zurückgeht (um E 14.5, Kapitel 1.4.2). Prox1 hingegen wird erst ab E 9.5 in der Linse exprimiert und wurde auch in 10 Tage alten Mäusen exprimiert (Kapitel 1.4.1). Diese Situation wird im folgenden Experiment in Zellkultur nachgestellt. Dabei soll geklärt werden, ob der  $\gamma$ F-Kristallinpromotor trotz zusätzlichem PROX1 durch Six3 stillgehalten werden kann. Ebenso ist von Interesse, wie sich der Promotor verhält, wenn die Menge des Six3 und somit die Repression unter dem Einfluss von zugesetztem PROX1 zurückgenommen wird.

Konstante Mengen des p $\gamma$ 226LucII-Plasmids (2  $\mu$ g) und des PROX1-pcDNA3 Plasmids (300 ng) werden in die N/N1003A-Zelllinie transfiziert. Dazu werden verschiedene Mengen (90 – 0 ng) des Six3-pcDNA3.1 Vektors kotransfiziert. Die Promotoraktivität der Transfektionsansätze mit dem p $\gamma$ 226LucII-Vektor, aber ohne den Expressionsplasmiden PROX1-pcDNA3 und Six3-pcDNA3.1 werden auf 100% normiert.

Die Aktivität des PROX1 stimulierten (-226/+46)  $\gamma$ F-Kristallinpromotors steigt mit abnehmender Menge Six3 in der N/N1003A-Zelllinie sukzessive an (Diagramm 4.13). Bei der maximal eingesetzten Menge von 90 ng Six3-Expressionsplasmid liegt die relative Luziferaseaktivität bei 1/3 im Vergleich zur basalen Promotoraktivität. Wird die Six3-Expression komplett zurückgenommen (0 ng Six3-pcDNA3.1), steigt die Luziferaseaktivität auf das 2,4-fache der basalen Promotoraktivität an. Die Stimulation des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors durch 300 ng PROX1-pcDNA3 wird mit einer Menge Six3-pcDNA3.1 zwischen 6 und 11 ng kompensiert. Unter diesen Bedingungen wird eine Aktivität erreicht, die dem unbehandelten (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotor gleichkommt. Geht man von der PROX1 vorstimulierten Promotoraktivität aus, liegt bei 90 ng kotransfizierten Six3-pcDNA3.1-Expressionsvektor eine auf weniger als 1/7 verminderte Aktivität des (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotors vor.

In Kapitel 4.5 wurde die Six3 Repression des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors ohne Stimulation durch PROX1 beschrieben. Die basale Promotoraktivität von 100 % bei 0 ng kotransfizierten Six3-pcDNA3.1 fällt in diesem Experiment auf 1/7 bzw. 1/14 der Aktivität bei 60 bzw. 380 ng des Expressionsplasmids. Der durch Six3 erzielte Effekt bleibt also unabhängig von PROX1 der gleiche.



**Diagramm 4.13:** Der durch PROX1 vorstimulierte (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotor wird durch Six3 reprimiert.

Der Reportervektor p $\gamma$ 226LucII und der Expressionsvektor PROX1-pcDNA3 wurde in N/N1003A-Zellen transfiziert. Dazu wurden abnehmende Mengen (90 ng, 45 ng, 22,5 ng, 11,25 ng, 5,625 und 0 ng) des Six3-Expressionsplasmids kotransfiziert. Die Zellen wurden nach 42 h geerntet und die relative Luziferaseaktivität bestimmt.

## 5 Diskussion

Der Vergleich der Aminosäure- und der Promotorsequenzen der homologen  $\gamma$ -Kristalline lässt die Beschreibung einer  $\gamma$ DEF-Kristallin-Subfamilie zu, der die  $\gamma$ DEF-Kristalline der Maus und die  $\gamma$ EF-Kristalline der Ratte angehören (Kapitel 5.1.2). Genreporter-Assays wurden am  $\gamma$ F-Kristallinpromotor durchgeführt, der aufgrund seiner Homologie als ein Stellvertreter der  $\gamma$ DEF-Kristallin-Subfamilie ist. In dieser Subfamilie sind die Bindestellen für linsenspezifische Proteine, wie das  $\alpha$ -Kristallin, Sox1, Pax-6, Prox1 und Six3, konserviert (Kapitel 5.1.3). Rekombinantes  $\alpha$ A-Kristallin bindet im Gegensatz zu bovinem  $\alpha$ -Kristallin nicht am  $\gamma$ F-Kristallinpromotor und zeigt entsprechend keine Wirkung an diesem Promotor (Kapitel 5.2). Im Gegensatz dazu aktiviert das Protein PROX1 des Menschen, das in seiner Homeodomäne zum Vertreter aus Maus identisch ist, den  $\gamma$ F-Kristallinpromotor. Prox1 ist an der Elongation der Linsenfasern beteiligt (Wigle et al., 1999<sup>®</sup>). Sein Einfluss auf  $\gamma$ -Kristallinpromotoren legt nahe, dass die Elongation durch die gesteigerte  $\gamma$ -Kristallinexpression gefördert wird (Kapitel 5.3). Im Unterschied zu Prox1 reprimiert Six3 den  $\gamma$ F-Kristallinpromotor. Der Vergleich der Expressionsmuster von Six3 und den  $\gamma$ -Kristallinen in der Linse der Maus zeigt, dass beide zueinander komplementär exprimiert werden. Mit dem Rückgang der Six3-Expression beginnt die Expression der  $\gamma$ -Kristalline (Oliver et al., 1995; Klopp, Dissertation, 2000). Diese Beobachtung *in vivo* wird durch die Bindung des Six3 an den  $\gamma$ F-Kristallinpromotor und die Repression der Promotoraktivität in Zellkultur erklärt. Zudem ist auf diese Weise gezeigt, dass Six3 in der Linse  $\gamma$ -Kristalline direkt reguliert (Kapitel 5.4.2). Die Wirkungsweise von Prox1 und Six3 an den  $\gamma$ F-Kristallinpromotoren führen zusammen mit Pax-6 und den bekannten Regulatoren des Sox1 und der Retinsäurerezeptoren zu einem neuen Modell der  $\gamma$ DEF-Kristalline in der Linse (Kapitel 5.5).

### 5.1 Charakterisierung der $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren

$\gamma$ -Kristalline sind Indikatoren für terminal differenzierte Linsenzellen (van Leen et al., 1987). In Linsenepithelzelllinien wurde ihre Regulation exemplarisch am  $\gamma$ F-Kristallinpromotor untersucht, der Stellvertreter der  $\gamma$ DEF-Kristallin-Subfamilie ist. In allen Vertretern dieser Subfamilie liegen drei neu identifizierte Promotorelemente vor, an die Regulatoren der Augenentwicklung – Pax-6, Prox1 und Six3 – binden können.

### 5.1.1 $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoraktivität in biologischen Systemen

In der Literatur liegen verschiedene Arbeiten zu den  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren vor. Ihre Funktion wurde zuerst in den folgenden drei Systemen untersucht:

1. In Primärkulturen des Linsenepithels aus Huhn (Lok et al., 1985),
2. in transgenen Mäusen (Goring et al., 1987),
3. in der N/N1003A-Zelllinie aus Kaninchen (Meakin et al., 1989).

Die Expression exogenen  $\gamma$ -Kristallins wurde zuerst in Primärkulturen des Linsenepithels aus Huhn nachgewiesen (Lok et al., 1985). Später konnte in der transgenen Maus die Linsenspezifität des (-759/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotors gezeigt werden (Goring et al., 1987). 1989 wurde erstmals in einer stabilen Zelllinie – der N/N1003A-Zelllinie – die Aktivität eines  $\gamma$ -Kristallinpromotors gezeigt. Diese N/N1003A-Zelllinie exprimiert kein endogenes  $\gamma$ -Kristallin, dennoch ist die Aktivität des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors nachweisbar (Meakin et al., 1989).

Die Untersuchung an Primärkulturen bietet den Vorteil, mit einem System zu arbeiten, das sehr nahe am lebenden Objekt liegt und das dazu vergleichsweise einfach in Transfektionsexperimenten untersucht werden kann. Dafür eignen sich die primären Linsenepithelzellen des Huhns, da diese Zellen in einem ringförmigen Zellpolster, das als *chick lens annular pad* bezeichnet wird, gehäuft vorliegen und noch teilungsfähig sind (Ireland et al., 1993). Für die Arbeit mit  $\gamma$ -Kristallinen in diesen primären Linsenepithelzellen muss allerdings die Nähe zu den physiologischen Bedingungen in Frage gestellt werden, weil in Vögeln keine  $\gamma$ -Kristalline, sondern stattdessen  $\delta$ -Kristalline exprimiert werden. Natürlich könnte man Zellen des Linsenepithels auch aus anderen Spezies kultivieren, allerdings wäre beispielsweise eine Präparation des Epithels aus den vergleichsweise kleinen Linsen der Maus sehr aufwendig.

Sehr nahe an physiologischen Bedingungen für Promotorstudien sind transgene Tiere als Modellsystem. Für die Untersuchung von Genen aus Vertebraten eignen sich besonders Mäuse wegen ihrer kurzen Generationszeiten. Dabei treten allerdings zwei Probleme auf. Zum einen ist es auf diese Weise schwierig, den Einfluss eines Transkriptionsfaktors auf einen  $\gamma$ -Kristallinpromotor dosisabhängig zu testen. Zum anderen ist beispielsweise eine *Prox1*<sup>-/-</sup>-Mutante letal (Wigle et al., 1999<sup>®</sup>). Ebenso ist eine *Six3*<sup>-/-</sup> Mutante höchstwahrscheinlich nicht überlebensfähig, wenn man zugrundelegt, dass eine Punktmutation in diesem Gen beim Menschen

Holoprosenzephalie verursacht und in vielen Fällen zum Abbruch der Embryonalentwicklung führt (Wallis et al., 1999).

Flexibler im Vergleich zu den eben erwähnten Systemen ist das Experimentieren mit Zellkulturen. Auf diese Weise können viele verschiedene Parameter zur Untersuchung eines Promotors eingesetzt werden. Zelllinien werden zwar, nachdem sie aus dem gesamten Organismus gewonnen wurden, außerhalb des Organs kultiviert und verlieren dadurch den Kontakt zu ihren physiologischen Nachbarn, dennoch bieten sie ein Maximum an Variabilität für dosisabhängige Reporter-gen-Untersuchungen. Innerhalb von wenigen Tagen kann die Promotoraktivität beobachtet werden, wie an der Zeitreihe des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors (Kapitel 2.2.1) zu sehen ist. So können Bedingungen relativ kurzfristig verändert oder optimiert werden.

Lediglich in Linsenepithelzelllinien konnte die Aktivität exogener  $\gamma$ -Kristallingene nachgewiesen werden. So wurde gezeigt, dass Epithelzelllinien wie die fibroblasten-ähnliche NIH-3T3 oder die Fibroblastenzelllinie des Bindegewebes L-929, die beide aus der Maus stammen, nicht genügen, um die Expression des  $\gamma$ E-Kristallinpromotors zu untersuchen (E. Krausz, 1996). Im Gegensatz dazu konnte in der N/N1003A-Linsenepithelzelllinie aus Kaninchen eine Aktivität des  $\gamma$ -Kristallinpromotors beobachtet werden (Meakin et al., 1989; Krausz et al., 1996).

Für meine Arbeit stellte R. Quinlan (Institut für Biochemie, Dundee, Großbritannien) freundlicherweise eine Reihe neuer humaner Linsenepithelzelllinien zur Verfügung: Die CD5A, CE11558, CE11560 und die MAC67 Zelllinien. Diese Zelllinien wurden zusammen mit der N/N1003A-Zelllinie in transienten Transfektionsexperimenten auf  $\gamma$ F-Kristallinexpression untersucht. Davon eigneten sich die N/N1003A und die CD5A-Zelllinien, weil in ihnen die exogene  $\gamma$ F-Kristallinpromotoraktivität mit vergleichsweise geringer Schwankungsbreite gezeigt werden kann und deutlich über der Nachweisgrenze liegt. Deshalb wurde der Reporter-gen-assay nur in den beiden Zelllinien, N/N1003A und CD5A, nicht in den CE11558, in den CE11560 oder in den MAC67 Zellen etabliert. Die Zeitreihe zum  $\gamma$ F-Kristallinpromotor in 2.2.1 zeigt optimale Aktivitäten des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors zwischen 36 und 42 Stunden in den CD5A- und N/N1003A-Zellen. Auch nach 54 Stunden ist noch Aktivität nachzuweisen, so dass in Kotransfektionsexperimenten längere transiente Expressionen ermöglicht werden, um potentielle posttranslationale Modifikationen zuzulassen (Kapitel 5.2.4). Ein vergleichbarer Zeitraum ist

beispielsweise aus Genreporterassays zum  $\delta$ -Kristallinpromotor und Pax-6 bekannt (Duncan, 1998). Neben der Zeitreihe wurde in Kapitel 4.2.2 überprüft, inwieweit die Transfektionskontrolle einen systemeigenen Einfluss auf das Genreportersystem ausübt. Da das Plasmid, das zur Kontrolle der Transfektionseffizienz eingesetzt wurde, einen SV40-Promotor enthält, darf nicht von vornherein ausgeschlossen werden, dass dieser starke Promotor die Reporterantwort verändert. Er könnte zum Beispiel transaktivierend auf den  $\gamma$ F-Kristallinpromotor wirken, oder umgekehrt, wichtige Transkriptionsfaktoren abziehen. Das Experiment dazu zeigt, dass der  $\gamma$ F-Kristallinpromotor vom Kontrollplasmid unbeeinflusst bleibt (Diagramm 2.3).

$\gamma$ -Kristalline werden weder in der N/N1003A noch in der CD5A-Zelllinie endogen exprimiert. Dennoch ist eine Aktivität transient transfizierter  $\gamma$ -Kristallinpromotoren nachzuweisen (Diagramme 2.1 und 2.2, Lok et al., 1985; Meakin et al., 1989). *In vivo* werden diese Promotoren nur in terminal differenzierten Linsenfasern, nicht in Linsenepithelzellen genutzt. Man geht davon aus, dass in den Linsenepithelzellen alle zur Aktivierung der  $\gamma$ -Kristallinpromotoren wichtigen Faktoren vorhanden sind. Endogenes  $\gamma$ -Kristallin kann jedoch erst abgelesen werden, wenn die terminale Differenzierung der Linsenepithelzellen zu Linsenfaserzellen vollzogen ist, weil dann möglicherweise für die  $\gamma$ -Kristallinexpression wichtige chromosomale Bereiche offengelegt werden (Lok et al., 1985). Die endogene  $\gamma$ -Kristallinexpression könnte jedoch auch durch Methylierung verhindert werden (Peek et al., 1991).

Ein weiterer Grund dafür, dass in den Linsenepithelzelllinien keine endogene  $\gamma$ -Kristallinexpression stattfindet, ist die Länge des Promotors *in vivo*. Die längsten  $\gamma$ -Kristallinpromotorkonstrukte, mit denen in Reporterassay gearbeitet wurde, sind aus dem  $\gamma$ F-Kristallinpromotor und liegen 1281 Basen vor dem Transkriptionsstart. Eine sukzessive Verkürzung steigert kontinuierlich die Promotoraktivität, vielleicht, weil dadurch reprimierende Elemente entfernt werden. Möglicherweise liegen im Genom weiter distal zusätzliche reprimierende Elemente, welche den Promotor stumm halten.

### 5.1.2 Stellung der $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren in der $\gamma$ -Kristallin-Familie

Die Promotoren der  $\gamma$ -Kristalline von Vertebraten wurden phylogenetisch verglichen (Abbildung 4.1). Dafür stehen zur Zeit die Promotorsequenzen von Mensch, Maus und Ratte zur Verfügung. Da vom Rind bislang nur die Sequenz des  $\gamma$ S-Promotors bekannt ist und diese schon 76 bp oberhalb des Transkriptionsstarts endet,

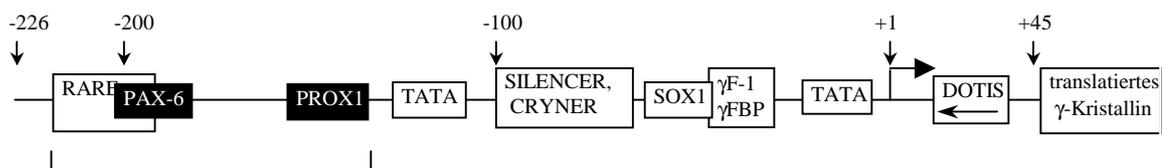
wurde diese Spezies nicht im Vergleich berücksichtigt. Die  $\gamma$ E- und  $\gamma$ F-Kristalline des Menschen sind Pseudogene (2.1.1). Ihre gleichnamigen Promotoren der Nager sind zueinander ähnlicher als zu den anderen Kristallinen. Den  $\gamma$ E- und  $\gamma$ F-Kristallinpromotoren wiederum steht der  $\gamma$ D-Kristallinpromotor der Maus, nicht der Ratte am nächsten. Dieses phylogenetische Abbild spiegelt sich in einer Studie zum Exon 3 der  $\gamma$ -Kristalline wider (Graw et al., 1993). Dazu wurde das letzte und variabelste Exon der Vertreter der  $\gamma$ -Kristallin-Familie zur Beurteilung des Verwandtschaftsgrads herangezogen. Dabei fällt Exon 3 des  $\gamma$ D-Kristallins der Ratte insofern aus dem Rahmen, da es ebenfalls im Gegensatz zum Promotor zu den  $\gamma$ E- und  $\gamma$ F-Kristallinen eng verwandt ist. Nimmt man Promotor und codierende Sequenzen der  $\gamma$ -Kristalline als Kriterien, ist es möglich, eine Subfamilie der  $\gamma$ DEF-Kristalline der Nager zu beschreiben, der die  $\gamma$ DEF-Kristalline der Maus und die  $\gamma$ EF-Kristalline der Ratte angehören.

Die Subfamilie der  $\gamma$ DEF-Kristalline zeigen Promotoren, die besonders im proximalen Bereich untereinander sehr ähnlich sind (Kapitel 4.1.2). Wegen der hohen Übereinstimmung in den beschriebenen Promotorelementen kann jeder dieser proximalen Promotoren vom Gesichtspunkt der Phylogenie stellvertretend für die anderen vier angesehen werden.

### 5.1.3 Bedeutung der Promotorelemente der $\gamma$ DEF-Kristalline

Der  $\gamma$ F-Kristallinpromotor ist im Vergleich zu den andern  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren der Nager am besten untersucht (Meakin et al., 1989; Lok et al., 1985, 1989; Goring et al., 1987; Yu et al., 1990, 1990; Tini et al. 1993; Liu et al., 1994). 5' Deletionen des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors führen zu einem Anstieg seiner Aktivität. Diese Aktivitätszunahme wurde durch sukzessive Verkürzung des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors von -759 bis auf -226 erreicht. Diese Tendenz wurde ebenfalls von E. Krausz (1996) für den  $\gamma$ E-Kristallinpromotor beobachtet (Tabelle 5.1). Die hohe Identität der beiden proximalen Promotoren von mehr als 90 % schlägt sich demnach auch in ihrer Funktion nieder. Die unterschiedlicheren distalen Promotoren (Homologie weniger als 40 %; Abbildung 4.2) enthalten reprimierende Elemente, die nicht genauer beschrieben sind. Verkürzt man beide Promotoren auf ein Fragment, das kleiner ist als (-226/+45) des  $\gamma$ F- bzw. (-219/+37) des  $\gamma$ E- Kristallins, fällt ihre Aktivität auf ein Fünftel und weniger ab.

Dafür wird das *retinoic acid response element* (RARE, Abbildung 5.1) verantwortlich gemacht. Die Deletion des RARE führt zu diesem Rückgang der  $\gamma$ F-Kristallinpromotoraktivität (Meakin et al., 1989; Lok et al., 1989; Tini et al., 1993). In Primärexplantaten war die Promotoraktivität mit Retinsäure stimulierbar, solange dieses Element im  $\gamma$ F-Kristallinpromotor enthalten war (Tini et al., 1993). Der *thyroid hormon receptor* (T3R) nimmt ebenfalls Einfluss auf dieses Promotorelement. Er bindet das RARE-Element spezifisch und wirkt als Antagonist zur Retinsäure (Tini et al., 1994). Ein Jahr später zeigten Tini et al. einen weiteren Bindungspartner, den *orphan receptor* (ROR). Er ist in der Lage, mit einer Hälfte der invers repetitiven Sequenz des RARE-Elements zu interagieren. Zudem ist der ROR-Rezeptor zum *retinoic acid receptor* (RAR) verwandt. Wegen dieser unterschiedlichen antagonistischen Regulationen am RARE handelt es sich dabei um ein sehr wichtiges Element im  $\gamma$ F-Kristallinpromotor.



**Abbildung 5.1: Schematische Übersicht der  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren der Nager.**

Die Kernpromotoren der  $\gamma$ DEF-Kristalline von Maus und der  $\gamma$ EF-Kristalline von Ratte sind sehr ähnlich. In allen können die dargestellten Promotorelemente identifiziert werden. Eine detaillierte Darstellung ist in Kapitel 4.1.2 (Abbildung 4.2) abgebildet. Die Spange kennzeichnet den Promotorbereich, in dem mit *MatInspector* gemeinsame mögliche Bindestellen für Proteine mit Homeodomänen erkannt wurden.

Überlappend zum RARE liegt eine Pax-6 Bindestelle in den  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren vor (Abbildung 5.1). Im Gegensatz dazu fehlt diese Pax-6 Bindestelle im  $\gamma$ D-Kristallinpromotor der Ratte (siehe Anhang; Dirks et al., 1996<sup>Ⓞ</sup>), der, wie oben beschrieben, nicht zur Subfamilie der  $\gamma$ DEF-Kristalline gehört. Die Pax-6 Bindestelle könnte für die Expression der  $\gamma$ -Kristalline von Bedeutung sein. Zwar wird im  $\beta$ B2-Kristallin eine Pax-6 Bindestelle, die *in vitro* gefunden wurde, *in vivo* nicht genutzt (Dirks et al., 1996<sup>Ⓞ</sup>), aber in einigen Studien anderer Kristallingenen kommt diesem Transkriptionsfaktor eine funktionelle Bedeutung zu. So zeigt Pax-6 in den Promotoren der  $\alpha$ A-Kristallingene von Maus und Huhn (Cvekl et al., 1994; Gopal-Srivastava et al., 1996), des  $\zeta$ -Kristallingens vom Meerschweinchen und des  $\delta$ 1-Kristallin des Huhns eine Aktivierung (Cvekl et al., 1995<sup>Ⓞ</sup>; Richardson et al., 1995). Diese Bindestellen sind cis-aktivierende Promotorelemente (Cvekl et al., 1994). Pax-6

bindet an die Elemente mit seiner Paired-Domäne und wurde als *trans*-aktivierender Faktor charakterisiert.

Im Gegensatz dazu wird das  $\beta$ B1-Kristallin durch diesen Transkriptionsfaktor reprimiert (Duncan et al, 1998). Alle veröffentlichten Pax-6-Bindestellen sind wie bei den  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren im proximalen Promotorbereich zu finden. Lediglich das  $\delta$ 1-Kristallin hat sein *enhancer*-Element im dritten Intron. Während der embryonalen Entwicklung findet die erste Pax-6-Expression bei der Bildung des optischen Vesikels statt (Walther und Gruss, 1991). Mit der Entstehung der Augenlinse zieht sich die Pax-6-Expression aus den Linsenfasern zum Linsenbogen zurück und ist in der adulten Linse vorwiegend nur noch im Epithel nachzuweisen. Das bedeutet, dass Pax-6 möglicherweise als Repressor an der  $\gamma$ -Kristallinexpression beteiligt sein könnte.

Als Nachweis wäre beispielsweise die Protein-DNS-Wechselwirkung in einem *footprint*-Experiment und eine funktionale Genreporterstudie in Linsenepithelzelllinien notwendig. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass Pax-6 in diesen Zellen endogen exprimiert wird (Krausz et al., 1996). Deshalb könnte man Pax-6 in „antisense“-Orientierung in einen Expressionsvektor klonieren und in Linsenzellen mit dem  $\gamma$ F-Kristallinpromotor kotransfizieren. Bei der Expression entsteht die Gegenstrang-RNS, welche die endogene Pax-6 mRNA bindet und auf diese Weise die Translation verhindert. Wirkt Pax-6 als Repressor, dann wird seine Inhibition verhindert und deshalb ein Anstieg der  $\gamma$ F-Kristallinpromotoraktivität zu erwarten.

In allen  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren liegt eine Prospero-Bindestelle vor. Die Prox1-Proteine der Vertebraten, die auch als Prospero-ähnliche Proteine bezeichnet werden, sind besonders in ihrer Homeodomäne homolog zu ihrem Verwandten aus *Drosophila* (Tomarev et al., 1998; Zinovieva et al., 1996). Deshalb darf angenommen werden, dass die Prospero-Bindestelle vom Prox1 der Vertebraten erkannt wird. Die mittels Zielerkennungssassay (*target detection assays*) erhaltene Sequenz der Prospero-Bindestelle beschränkt sich auf 7 Nucleotide (Hassan et al., 1997). Nimmt man das Resultat zur Grundlage, tritt diese Bindestelle statistisch etwa alle 500 Basenpaare auf. Da sie in allen  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren konserviert ist, ist die Interaktion von Prox1 mit diesem DNS-Element wahrscheinlich. Die physiologische Bedeutung des Prox1 bei der Elongation der sekundären Linsenfasern unterstützt den Gedanken, dass Prox1 die  $\gamma$ -Kristalline aktiviert und mit den Promotoren in Kontakt tritt (Wigle et al., 1999<sup>®</sup>). Dazu wurde in dieser Arbeit eine Aktivierung des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors durch Prox1

beobachtet (Diagramm 4.9). Damit nimmt Prox1 höchstwahrscheinlich Einfluss auf alle  $\gamma$ -Kristallinpromotoren der  $\gamma$ DEF-Kristallin-Subfamilie. Möglicherweise werden die  $\gamma$ ABC-Kristalline ebenfalls durch Prox1 reguliert, da in Prox1<sup>-/-</sup>-Mäusen keine mRNS für das  $\gamma$ B-Kristallin nachgewiesen werden konnte und die Expression der  $\gamma$ AC-Kristalline vermindert ist (E 14.5; Wigle et al., 1999<sup>o</sup>). Da sich diese Interpretation auf RT-PCR bezieht, die nicht quantitativ durchgeführt wurden, und weil die  $\gamma$ ABC-Kristallinpromotoren zur Subfamilie der  $\gamma$ DEF-Kristallingene wenig homolog sind, ist diese Beurteilung Prox1 reguliert alle  $\gamma$ -Kristallingene noch mit Unsicherheit behaftet (Abbildung 5.5; Abbildung 4.1).

Die *gamma-crystallin-nested repeats* (Cryner, Abbildung 4.2) bestehen aus zwei kurzen, invertierten Wiederholungen. Sie stellen ein weiteres mögliches Element dar, das für die proximalen  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren beschrieben wurde (Graw et al., 1993). Ihre Deletion führt zum Anstieg der  $\gamma$ E-Kristallinpromotoraktivität. Es wurde gezeigt, dass ein Linsenprotein den Einzelstrang dieses Bereichs spezifisch bindet, ohne dass dieses Protein bisher näher charakterisiert werden konnte (Stöger et al., 1997).

Als weiteres regulatorisches Element wurde 1990 das *Silencer*-Element im  $\gamma$ D-Kristallin der Ratte charakterisiert, das ebenso in den anderen  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren der Nager vorkommt. Dieses *Silencer*-Element wirkt in Linsenzellen als gewebsspezifischer *enhancer* und in Zellen außerhalb der Linse als *Silencer*. Im letzten Fall wurde das (-85/-67)  $\gamma$ D-Kristallinpromotorfragment aus Ratte einem HSV-tk-Promotor vorgeschaltet und damit in Zellen transfiziert (Peek et al., 1990).

Ein Promotorelement, das eine zum *Silencer* vergleichbare Bifunktionalität aufweist, ist das weiter proximal gelegene  $\gamma$ F-1-Element (Liu et al., 1991). Es stellte sich in Reportergerneassays in primären Linsenzellen als aktivierendes Element heraus. Daran bindet *in vitro* das  $\gamma$ F-Kristallin Bindeprotein ( $\gamma$ FBP; Liu et al., 1994). Dieses Protein wurde allerdings in Kotransfektionsexperimenten in Zellkultur als Repressor charakterisiert. Der Grund dafür ist möglicherweise die Bindung des  $\gamma$ FBPs als Repressor in undifferenzierten Linsenepithelzellen, was der Situation außerhalb der Linse gleichkommen könnte. Fraglich bleibt die physiologische Bedeutung, da das  $\gamma$ FBP aus der cDNA-Bank des Huhns stammt und die keine  $\gamma$ -Kristalline besitzen. Das homologe Hic1-Protein wurde bislang noch nicht in seiner Wirkung auf die  $\gamma$ -

Kristallinpromotoren untersucht. Allerdings ist das Maus *Hic1*-Gen nicht in der Augenlinse exprimiert (Grimm et al., 1999).

Eine weitere Bindestelle ist in allen Promotoren der  $\gamma$ -Kristalline für Sox1 zu finden. Eine direkte Interaktion des Sox1 mit den  $\gamma$ -Kristallinpromotoren wurde nachgewiesen (Nishiguchi et al., 1998; Kamachi et al., 1995). Die Sox1<sup>-/-</sup>-Maus zeigte Microphthalmie und Katarakt. Im Wildtyp war die Sox1-Expression in den Faserzellkernen der sich entwickelnden Linse der Maus nachzuweisen. Eine Stimulation des  $\delta$ D1-Kristallinpromotors konnte ebenfalls in Huhn durch Sox1, Sox2 und Sox3 gezeigt werden. Sox2 und Sox3 werden allerdings nicht in der Linse exprimiert (Kamachi et al., 1998).

Ferner sind in den  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren die TATA-Boxen enthalten, die als allgemeine Transkriptionsmotive bekannt sind. Eine Mutation in der TATA-Box im  $\gamma$ E-Kristallins des Menschen führt zur Stilllegung dieses Gens (Brakenhoff et al., 1990 und 1994).

Unterhalb des Transkriptionsstarts wurde in den  $\gamma$ DEF-Kristallinen ein Promotorelement identifiziert, das sogenannte *downstream of transcriptional initiation site* (DOTIS, Pietrowski et al., 1994). Das Element, mit dem das  $\alpha$ -Kristallin in Wechselwirkung tritt, liegt lediglich im  $\gamma$ F-Kristallinpromotor der Ratte modifiziert vor. Hier sind 3 Nucleotide deletiert, so dass das  $\alpha$ -Kristallin in diesem Fall nicht binden kann (Pietrowski et al., 1994). Dieses Element wird für die Aktivierung des  $\gamma$ E-Kristallinpromotors durch das  $\alpha$ A-Kristallin verantwortlich gemacht (Krausz et al., 1996). In Kapitel 5.2.2 wird diskutiert, ob die Bindung des  $\alpha$ -Kristallins an den  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren eine physiologische Bedeutung hat.

Die Computeranalyse aus Kapitel 4.1.2 ergibt im proximalen Promotor weitere mögliche Bindestellen allgemeiner oder nicht in der Linse exprimierter Transkriptionsfaktoren. Dennoch soll darauf hingewiesen sein, dass sich sämtliche Bindestellen für Homedomänen-Proteine im Bereich zwischen dem RARE-Element und der distalen TATA-Box befinden. In diesem Bereich zeigt auch Six3 seine Interaktion mit dem  $\gamma$ F-Kristallinpromotor (Abbildung 4.11).

Zusammenfassend liegen alle bekannten und neuen Promotorelemente in sämtlichen  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren vor. Ihre Regulationen sind, wie oben beschrieben, nur teilweise bekannt. Der  $\gamma$ F-Kristallinpromotor ist der Promotor, der in

den meisten Arbeiten zur  $\gamma$ -Kristalline Regulation Verwendung fand. Da im (-226/+46)  $\gamma$ F-Kristallin die wichtigsten Promotorelemente enthalten sind, würde man mit einem vergleichbaren Fragment aus dem  $\gamma$ E-Kristallinen der Maus oder Ratte, aus dem  $\gamma$ F-Kristallin der Ratte oder dem  $\gamma$ D-Kristallin der Maus die gleichen Regulationen erwarten.

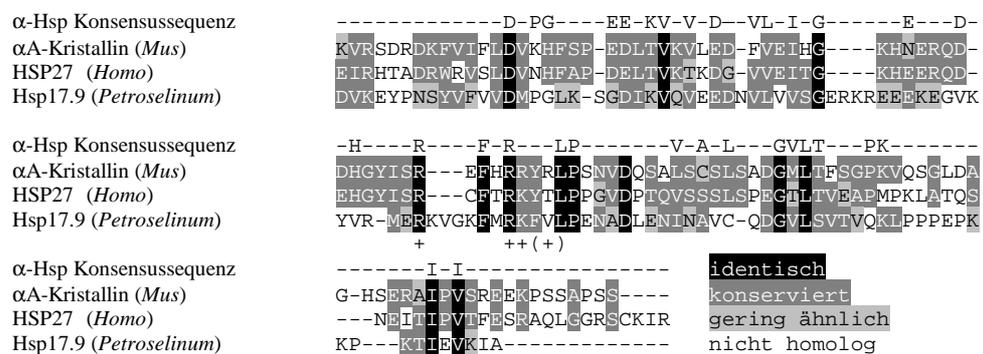
## **5.2 Bedeutung der Bindung bovinen $\alpha$ -Kristallins an den $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren**

Die  $\alpha$ -Kristalline werden in der Augenlinse in großen Mengen exprimiert. Die Expression des  $\alpha$ A-Kristallins ist weitgehend linsenspezifisch. Lediglich in der Milz und im Thymus konnten noch geringe Expression nachgewiesen werden (Krausz et al., 1996; Kato et al., 1991<sup>o</sup>; Srinivasan et al., 1992). Die engsten Verwandten der  $\alpha$ -Kristalline sind die kleinen Hitzeschockproteine. Sie weisen im C-Terminus die höchste Homologie zu den  $\alpha$ A-Kristallinen auf. Innerhalb dieser sogenannten  $\alpha$ -Kristallindomäne wird ein Bereich für die Wechselwirkung mit DNS vorhergesagt (Singh et al., 1998). Für das  $\alpha$ -Kristallin wurde eine Interaktion mit den  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren beobachtet (Pietrowski et al., 1994). Deshalb wurde in dieser Arbeit die Funktion des  $\alpha$ A-Kristallins mit der kleiner Hitzeschockproteine an den  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren verglichen.

### **5.2.1 $\alpha$ -Kristalline zeigen in der potentieller DNS-Bindungsdomäne Homologie zu den kleinen Hitzeschockproteinen**

Die  $\alpha$ -Kristalline bilden hauptsächlich Aggregate mit Chaperonaktivität (Horwitz et al., 1992; Merck et al., 1992; Takemoto et al., 1994; Smulders, et al., 1998). 1998 wurde von K. Singh eine weitere Funktion postuliert:  $\alpha$ -Kristalline haben eine Funktion im Zellkern, welche die Bindung an DNS einschließt. Grund dieser Annahme war eine DNS Bindungsstudie an einer Sequenz, die allerdings keine Ähnlichkeit zu DOTIS hat. Die Datenbankanalysen weisen auf einen Bereich im C-Terminus der  $\alpha$ A- und  $\alpha$ B-Kristalline hin, der strukturelle und sequenzielle Ähnlichkeit zu verschiedenen DNS-bindenden Proteinen, auch Homeodomänenproteinen zeigt, wie zu Antennapedia, Human-Engrailed 1, Klenow-Fragment, zur HIV1-RT und zur DNS Polymerase  $\beta$  der Ratte (Singh et al., 1998). Gerade dieser Bereich, der unter den  $\alpha$ -Kristallinen Homologie zeigt, wird für die DNS Bindung verantwortlich gemacht. Der

Sequenzbereich zeigt Homologie zu den kleinen Hitzeschockproteinen aus dem Tierreich, die gegenüber kleinen Hitzeschockproteinen aus dem Pflanzenreich abnimmt (de Jong et al., 1998; Abbildung 5.2). Sämtliche Vertreter der  $\alpha$ -Hsp-Superfamilie weisen eine Konsensussequenz auf (Abbildung 5.2; Caspers et al., 1995). Das  $\alpha$ A-Kristallin der Maus ist zu dem bovinen quasi identisch. Es zeigt hohe Homologie auf Proteinebene zum HSP27 von *Petroselinum crispum* (>40 %) und geringe Homologie zum Hsp17.9 (20 %). Die homologe Domäne im C-terminalen Bereich dieser Proteine ist in der Abbildung 5.2 dargestellt.



**Abbildung 5.2: Vergleich der Primärstrukturen von  $\alpha$ A-Kristallin, HSP27 und Hsp17.9.**

Oben ist eine Konsensussequenz für die Superfamilie der  $\alpha$ -Hsp-Familie angegeben (Caspers et al., 1995). Mit „+“ sind die positiv geladenen und zugleich nach außen gerichteten Aminosäuren markiert (Augusteyn et al., 1985). Fett gedruckt sind Aminosäurereste, die gemäß der oben beschriebenen Datenbankanalyse mit DNS interagieren (Singh et al., 1998).

Eine Wechselwirkung bovinen  $\alpha$ -Kristallins mit dem DOTIS-Element wurde gezeigt (*downstream of transcription initiation site*; Pietrowski et al., 1994). Dieses DOTIS-Element liegt unterhalb des Transkriptionsstarts in den  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren der Nager vor. In Zellkulturexperimenten mit der N/N1003A-Zelllinie wurde eine Aktivierung des  $\gamma$ E-Kristallinpromotors durch das rekombinante  $\alpha$ A-Kristallin der Maus beobachtet (Krausz, Dissertation, 1996).

Deshalb wurde der Effekt des  $\alpha$ A-Kristallins mit dem der homologen kleinen Hitzeschockproteinen am  $\gamma$ F-Kristallinpromotor verglichen. Der  $\gamma$ F-Kristallinpromotor ist zum  $\gamma$ E-Kristallinpromotor sehr homolog (vergleiche Kapitel 5.1.3) und enthält das DOTIS Element, das für die Steigerung der Promotoraktivität verantwortlich gemacht wird (Pietrowski et al., 1994; Krausz, Dissertation, 1996).

### **5.2.2 Einfluss des $\alpha$ A-Kristallins und der Vertreter der kleinen Hitzeschockproteine auf den $\gamma$ F-Kristallinpromotor der Maus**

Kotransfektionen in Zellkultur wurden in Vorexperimenten so konzipiert, wie sie bereits von E. Krausz in seiner Dissertation durchgeführt wurden (1996), bis auf zwei Unterschiede. Erstens wurden die Transfektionen nicht mit Lipofektamin, sondern mit der Kalziumphosphat-Methode durchgeführt. Mit beiden Methoden erhält man ausreichend transfizierte Zellen für die Messung der Luziferaseaktivität im Genreporterassay. Zweitens wurden Luziferasen im Reportersystem der Chloramphenicoltransferase und der  $\beta$ -Galaktosidase vorgezogen, weil sie weitaus sensibler sind (de Wet et al., 1985). Als Resultat ergab die (-226)  $\gamma$ F-Kristallinpromotoraktivität in der N/N1003A-Zelllinie in Abhängigkeit des  $\alpha$ A-Kristallins eine Optimumkurve mit der maximalen Stimulation um den Faktor 2,5 (Abbildung 4.6).

Für die folgenden Genreporterassays wurde folgendes Ergebnis zur Bestimmung der Promotoraktivität berücksichtigt. Es stellte sich heraus, dass die (-226/+45)  $\gamma$ F-Kristallinpromotoraktivität in der N/N1003A-Zelllinie nicht linear mit der entsprechenden Reporterkonzentration zusammenhängt (Abbildung 4.5). Ein linearer Zusammenhang gilt zwar für die niederen Konzentrationen des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors, steigert man allerdings die Menge des transienten Effektors weiter, so erreicht man eine Sättigung.

Dieses Phänomen wurde in der CD5A-Zelllinie nicht beobachtet, da die Transfektionseffizienz in dieser Zelllinie im Vergleich zur N/N1003A-Zelllinie um den Faktor 100 geringer ist. Das bedeutet, dass in der Kalziumphosphat-Transfektion wesentlich mehr Plasmid beladene Partikel in die N/N1003A-Zelle aufgenommen werden. Es werden so viele Promotoren eingeschleust, bis deren Aktivität bei weiter zunehmender Menge nicht mehr ansteigt. Sie bleibt konstant. Möglicherweise werden linsenspezifische Transkriptionsfaktoren des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors knapp. Kotransfiziert man unter diesen Bedingungen der Promotorsättigung das  $\alpha$ A-Kristallin, ist unschwer vorzustellen, dass bei wenigen Transfektionen die Effizienz etwas niedriger liegt. Da die Reporteraktivität gesättigt ist und damit konstant bleibt, fällt nur noch die Aktivität der Transfektionskontrolle ins Gewicht. Daher spiegelt die relative Luziferaseaktivität im Fall konstanten Reporters und schwankender Transfektionskontrolle nur noch die Aktivität der Kontrolle wider. Sind also wenige

Ansätze schwach transfiziert, zeigen sie höhere relative Luziferaseaktivität und umgekehrt. Diese abweichenden Transfektionsansätze wurden auch anhand der hohen Standardabweichungen beobachtet (Diagramm 4.6). Die Aktivierung des  $\gamma$ F-Kristallinpromotor durch das  $\alpha$ A-Kristallin oder durch das HSP27 musste im Zusammenhang mit der Promotorsättigung in der N/N1003A-Zelllinie neu überdacht werden (Diagramm 4.5). Als Konsequenz wurde die Menge an Reporterplasmid für weitere Transfektionen in dieser Zelllinie halbiert und somit ein Bereich ausgewählt, in dem die Reporteraktivität linear ansteigt.

In weiteren Transfektionsexperimenten ließ sich eine Aktivierung des Promotors durch das  $\alpha$ A-Kristallin oder durch das HSP27 nicht mehr beobachten (Diagramm 4.7). Einen Effekt hätte man erwartet, weil das nahezu identisch bovine  $\alpha$ -Kristallin diesen Promotor bindet. Zudem ist bekannt, dass die  $\alpha$ -Kristalline mit den  $\gamma$ -Kristallinen *in vivo* kolokalisiert in der Linse vorliegen (Kuwabara und Imaizumi, 1974) und in überlappenden Zeiträumen exprimiert werden. Der Vertreter der kleinen Hitzeschockproteine der Maus, das Hsp25, wird ebenso in der Augenlinse exprimiert (Abbildung 4.3). Auch deshalb könnte man einen Einfluss am  $\gamma$ F-Kristallinpromotor vermuten. Berücksichtigt man allerdings das Ergebnis aus den Koexpressionen mit dem  $\alpha$ A-Kristallin, ist die gleichbleibende Promotoraktivität bei der Koexpression mit dem HSP27 verständlich.

| Zelllinie    | -629 | -629<br>$\Delta$ DOTIS | -514 | -325 | -219 | -163 | -124 | -77 | -25 | promotorloser<br>Reporter |
|--------------|------|------------------------|------|------|------|------|------|-----|-----|---------------------------|
| N/N1003A     | 5,0  | 1,8                    | 7,6  | 9,8  | 12,1 | 1,6  | 1,2  | 2,9 | 1,4 | 1                         |
| $\alpha$ TN4 | 3,8  | 1,4                    | 3,0  | 6,1  | 8,1  | 1,5  | 0,8  | 2,4 | 1,2 | 1                         |
| NIH3T3       | 1,4  | -                      | -    | 1,8  | 1,4  | -    | -    | -   | -   | 1                         |

**Tabelle 5.1: Funktionelle Analyse des  $\gamma$ E-Kristallinpromotors (Krausz, Dissertation, 1996).**

Verschiedene  $\gamma$ E-Kristallinpromotorkonstrukte wurden im Genreporterassay untersucht. Das erste 5' Nukleotid jedes Konstrukts ist in der oberen Zeile erfasst. Alle Konstrukte enden mit Position +37 nach dem Transkriptionsstart des  $\gamma$ -Kristallins. Lediglich das Konstrukt, das mit  $\Delta$  DOTIS gekennzeichnet ist, endet mit Position +8. Die relativen Promotoraktivitäten wurden auf den promotorlosen Reporter normiert. Sämtliche Standardabweichungen liegen unter 20 % und sind nicht dargestellt.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Beobachtungen dieser Arbeit wurde in früheren Experimenten eine lineare Steigerung der Promotoraktivität in Abhängigkeit des  $\alpha$ A-Kristallins bis zum Faktor 5 beobachtet (Krausz, Dissertation, 1996).

Eine Erklärung für dieses unterschiedliche Ergebnis ist möglicherweise eine Veränderung der N/N1003A-Zelllinie. Diese Zelllinie änderte sich nach den Anfangspassagen. Die Zelllinie wies zwar nach 170 Teilungsraten noch Linsenspezifität auf (Reddan et al., 1986), die sich unter anderem durch die Expression endogenen  $\alpha$ A-Kristallins auszeichnete, aber in späteren Passagen der gleichen Zelllinie war kein  $\alpha$ A-Kristallin mehr nachweisbar (Meakin et al., 1989). Die Passagen an N/N1003A-Zellen, die in der Arbeit von E. Krausz und in meiner Arbeit Verwendung fanden, zeigten kein endogenes  $\alpha$ A-Kristallin (Krausz et al., 1996; Abbildung 4.4). Morphologisch blieben sie im Lauf der Kultivierung, von Beginn bis Ende dieser Arbeit, gleich (Abbildung 4.5 A1 und B1). Dennoch kann eine Änderung linsenspezifischer Eigenschaften nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Da die Zelllinie als stabile Zelllinie charakterisiert wurde, sind jedoch endogene Veränderungen unwahrscheinlich (Reddan et al., 1986).

Anhand von Deletionskonstrukten wurde der  $\gamma$ E-Kristallinpromotor in der N/N1003A-Zelllinie charakterisiert. Eine vergleichbare Funktionalität konnte in der  $\alpha$ TN4-Zelllinie gezeigt werden (Tabelle 5.1). Diese Linsenepithelzelllinie unterscheidet sich von der N/N1003A-Zelllinie dadurch, dass sie endogen  $\alpha$ A-Kristallin exprimiert (Krausz et al., 1996). Um zu zeigen, dass der  $\gamma$ E-Kristallinpromotor durch das  $\alpha$ A-Kristallin am DOTIS reguliert oder aktiviert werden kann, wurden von E. Krausz zwei Promotorkonstrukte entworfen. Das eine enthält den (-629/+37)  $\gamma$ E-Kristallinpromotor einschließlich dem DOTIS, das andere ist bis auf das fehlende DOTIS identisch. Diese beiden Konstrukte wurden in der N/N1003A-Zelllinie und in der  $\alpha$ TN4 Zelllinie verglichen. Mit dem DOTIS entfällt die Bindestelle für das  $\alpha$ A-Kristallin als potentielle Transkriptionsfaktor in der  $\alpha$ TN4 Zelllinie, nicht aber in der N/N1003A-Zelllinie. Deshalb würde man erwarten, dass sich die relativen Promotoraktivitäten der zwei Konstrukte in der N/N1003A-Zelllinie weniger und im Gegensatz dazu in der  $\alpha$ TN4 Zelllinie mehr unterscheiden. Tatsächlich aber fiel der Vergleich der Aktivität beider Konstrukte in beiden Zelllinien gleich aus. Es wurde für die N/N1003A eine Relation der Promotoraktivitäten des Konstrukts mit zu dem ohne DOTIS von 2,8 zu 1 ähnlich wie in der  $\alpha$ TN4 Zelllinie mit 2,7 zu 1 beobachtet (Tabelle 5.1). Das erklärt zwar keineswegs die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Arbeit mit denen der Dissertation von E. Krausz, sie gibt aber einen Hinweis, dass das DOTIS-Element keine funktionale Bedeutung im Zusammenhang mit dem  $\alpha$ A-Kristallin hat.

Andererseits ist es ebenso möglich, dass der  $\gamma$ E-Kristallinpromotor ohne DOTIS im eben angeführten Experiment nicht mehr funktionstüchtig ist. Immerhin entfernt man mit der durchgeführten kompletten Deletion des Elements eine Sequenz, die zwischen Transkriptionsstart und der kodierenden Sequenz liegt. Das könnte beispielsweise eine schwächere Affinität der RNS-Polymerase oder eine RNS mit geringer Halbwertszeit verursachen. Dafür spricht, dass sich die Aktivität des promotorlosen Reporterkonstrukts kaum von der des (-629/+8)  $\gamma$ E-Kristallinpromotors ohne DOTIS unterscheidet. Dem steht lediglich gegenüber, dass ein intakter Promotor eine Aktivität zeigen kann, die durchaus unter der eines promotorlosen Reporters liegt. Das wäre dann der Fall, wenn Repressoren einen Promotor stillhalten und im Gegensatz dazu ein promotorloses Konstrukt vergleichsweise hohes Hintergrundrauschen aufweist.

### 5.2.3 Bedeutung des $\alpha$ A-Kristallins als zytoplasmatisches Protein

Das exogene  $\alpha$ A-Kristallin liegt im Zytoplasma, nicht in den Zellkernen der transfizierten N/N1003A-Zellen vor (Abbildung 4.5, A3). Diese Lokalisation des Proteins im Zytoplasma macht eine Interaktion dieses Proteins mit DNS unter physiologischen Bedingungen unmöglich. Insofern ist es gut erklärbar, dass der  $\gamma$ F-Kristallinpromotor in Zellkultur nicht stimuliert werden kann. Das gleiche trifft für das nahe verwandte HSP27 zu, da dieses Protein auch nicht im Zellkern, sondern nur im Zytoplasma zu detektieren war (Abbildung 4.5, B3).

Die subzelluläre Lokalisation des  $\alpha$ A-Kristallins im Zellkern zeigt, dass es für dieses Protein keinen bisher bekannten Mechanismus gibt, der es in den Zellkern befördert. Das  $\alpha$ A-Kristallin enthält beispielsweise kein Signalpeptid, wie viele Kernproteine. Aus diesem Grund erscheint eine Regulation von  $\gamma$ -Kristallinpromotoren durch das  $\alpha$ A-Kristallin in Zellkultur unwahrscheinlich. Da in den differenzierten Linsenfasern der Augenlinse keine Zellkerne vorzufinden sind (Kuwabara und Imaizumi, 1974), stößt das Zellkultursystem mit intakten Zellkernen in der Frage einer Promotorregulierung an seine Grenzen. Andererseits geht mit dem Zellkernabbau in den Linsenfasern ein DNS Abbau einher (R. Lutz, ISG/GSF, persönliche Mitteilung), was bedeutet, dass die Proteinexpression in den kernlosen Zellen verloren geht.

#### 5.2.4 Vergleich der Interaktionen bovinen $\alpha$ -Kristallins und rekombinanten $\alpha$ A-Kristallins der Maus an DOTIS

In Zellkultur zeigte sich die  $\gamma$ F-Kristallinpromotoraktivität unabhängig von der  $\alpha$ A-Kristallin beziehungsweise der HSP27 Expression nicht verändert. Aus diesem Grund wurde die Bindung nativen  $\alpha$ -Kristallins aus Rind an DOTIS überprüft und mit der Interaktion des rekombinanten  $\alpha$ A-Kristallins verglichen.

Die Bindung eines Proteins aus bovinem Linsenextrakt an DOTIS konnte nachgewiesen werden. Das bovine Linseextrakt besteht zu etwa einem Drittel aus  $\alpha$ -Kristallinen. In früherer Arbeit wurden die Kristalline auf die Bindung an DOTIS untersucht. Dabei war das  $\alpha$ -Kristallin die einzige Fraktion, mit der eine Interaktion mit diesem Element nachgewiesen werden konnte (Pietrowski et al., 1994). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass in dem hier beschriebenen Experiment vom bovinen Linsenextrakt lediglich das  $\alpha$ -Kristallin an dieses Promotorelement bindet.

Im Vergleich dazu zeigen Proben  $\alpha$ A-Kristallin transfizierter Zellen keine Wechselwirkung mit DOTIS (Abbildung 4.6). Das würde erklären, warum das  $\alpha$ A-Kristallin die  $\gamma$ F-Kristallinpromotoraktivität nicht verändert. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob möglicherweise posttranslationale Modifikationen des  $\alpha$ A-Kristallins eine Rolle spielen, die in der N/N1003A-Zelllinie und auch in der CD5A-Zelllinie nicht stattfinden. Zur Aktivierung der  $\alpha$ -Kristalline wäre zum Beispiel eine Phosphorylierung vorstellbar. Es wurde gezeigt, dass die  $\alpha$ -Kristalline an unterschiedlichen Serinresten phosphoryliert werden können (Voorter et al., 1989; Groenen et al., 1994). Rekombinantes  $\alpha$ A- und  $\alpha$ B-Kristallin konnte allerdings nicht durch *in vitro*-Phosphorylierung mit Proteinkinase A für die Bindung an DOTIS modifiziert werden (Krausz et al., 1996). Deshalb ist die Proteinkinase A abhängige Phosphorylierung entweder nicht notwendig um DNS zu binden, oder es bedarf weiterer Modifikationen der  $\alpha$ -Kristalline, die noch nicht bekannt sind, um eine Bindung *in vitro* zu ermöglichen. Zudem wurde gezeigt, dass bei der Autophosphorylierung des  $\alpha$ -Kristallins die Bindung am DOTIS verloren geht (Pietrowski und Graw, 1997).

Zusammenfassend weisen die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse darauf hin, dass in Linsenepithelzelllinien kein Effekt rekombinanten  $\alpha$ A-Kristallins (und auch HSP27) auf die  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren beobachtet werden kann,

1. wegen der fehlenden Bindeeigenschaft rekombinanten  $\alpha$ A-Kristallins an das DOTIS-Element,
2. wegen seiner zytoplasmatischen Lokalisation,
3. wegen der unveränderten  $\gamma$ F-Kristallinpromotoraktivität in den Kotransfektionsexperimenten.

Der letzte Punkt ist schwer mit der früheren Arbeit von E. Krausz (Dissertation 1996) in Einklang zu bringen. Die Hypothese, dass  $\alpha$ -Kristalline Transkriptionsfaktoren sind, die am DOTIS die  $\gamma$ -Kristallinexpression regulieren, trifft wahrscheinlich nicht zu.

Um sicherzugehen, könnte ein klärendes Experiment in einer transgenen Maus durchgeführt werden, die einen nachweislich intakten  $\gamma$ -Kristallinpromotor mit einer Punktmutation im DOTIS hat, durch welche die Bindung bovinen  $\alpha$ -Kristallins verhindert wird. Für einen derartigen Promotor sollte in einem System ohne  $\alpha$ A-Kristallin, beispielsweise der N/N1003A-Zelllinie, vergleichbare Aktivität nachgewiesen werden, wie für einen nicht mutierten Promotor. Mit derartigen Konstrukten könnte man in transgenen Mäusen klären, ob beide  $\gamma$ -Kristallinpromotoren unterschiedlich reguliert werden.

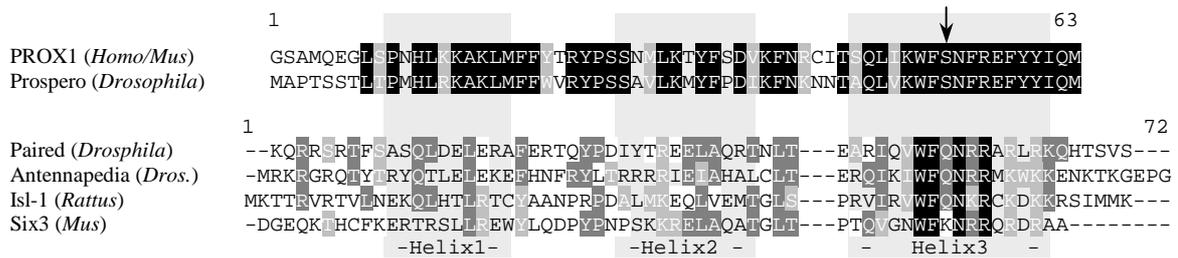
### 5.3 Prox1 ist ein Aktivator der $\gamma$ DEF-Kristalline

Prox1 ist ein Homeodomänenprotein, das bei der Elongation der Linsenfasern von Bedeutung ist (Wigle et al., 1999<sup>®</sup>). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es die  $\gamma$ DEF-Kristalline reguliert und dabei höchstwahrscheinlich direkt mit deren Promotoren in Wechselwirkung tritt.

#### 5.3.1 DNS-Interaktion des Prox1

Wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben wurde, liegt in den  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren eine Prospero-Bindestelle vor. Prox1 bindet wahrscheinlich dieses Promotorelement, weil es besonders in seiner Homeodomäne eng verwandt zu seinem Vertreter aus *Drosophila* ist (Abbildung 5.3). Die Prox1 Homeodomänen aus Mensch, Maus und Huhn sind identisch, zu *Drosophila* liegt eine Identität von 65 % vor (Tomarev et al., 1996).

Die Prox1/Prospero-Homeodomäne weist im Vergleich zu den meisten Homeodomänen drei Unterschiede auf (Abbildung 5.3). Erstens enthält sie keine basischen Aminosäuren in den ersten 11 N-terminalen und den letzten 7 C-terminalen Peptiden in der Homeodomäne. In den meisten Homeodomänen liegen im Gegensatz dazu drei, vier oder fünf basische Reste an diesen Enden vor. Zweitens enthalten die Prox1/Prospero-Proteine drei weitere Aminosäuren in der Schleife zwischen der 2. und 3. Helix im Vergleich zur klassischen Homeodomäne. Und zuletzt ist der 9. Aminosäurerest der dritten Helix der Prox1/Prospero-Homeodomänen ein Serin. Mit diesem Rest wird die DNS-Bindenspezifität der Homeodomänen klassifiziert (Abbildung 5.3; Treisman et al., 1989). Er ist in vielen Homeodomänen eine Glutaminsäure. Die Prox1/Prospero-Familie grenzt sich von anderen Homeodomänen ab und weist ihre eigene Bindenspezifität auf. Die hohe Homologie des Vertreters aus *Drosophila* zu denen der Vertebraten ist ein Kriterium ähnlicher Bindung an DNS. Deshalb darf die Prospero-Bindestelle als deutlicher Anhaltspunkt einer PROX1/Prox1 Bindung verwendet werden.



**Abbildung 5.3: Vergleich der Homeodomänen PROX1/Prox1 der Vertebraten und Prospero von *Drosophila*.**

Verglichen sind die Homeodomänen des PROX1 des Menschen (Zutrittsnummer NP002754, identisch zu Maus Prox1 Homeodomäne) und des Prospero aus *Drosophila melanogaster* (Zutrittsnummer P29617). Schwarz unterlegt sind identische Aminosäuren. Homologe Aminosäurereste wurden grau markiert. Der Pfeil zeigt die Aminosäureposition, an die für die DNS-Bindenspezifität charakteristisch ist (Treisman et al., 1989).

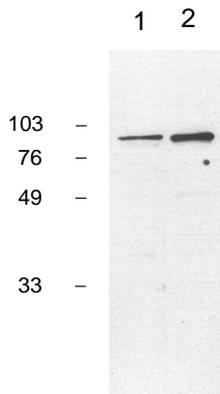
Verschiedene Homeodomänen wurden stellvertretend mit denen des PROX1 und Prospero verglichen (Ippel et al., 1999). Der Bereich der Helices ist grau unterlegt (ExpASy, Schweizerisches Institut für Bioinformatik).

### 5.3.2 Prox1 ist sowohl an der $\gamma$ -Kristallin-Regulation als auch an der Elongation der Linsenfasern beteiligt

Die Wirkungsweise des Prox1 auf die Expression von  $\gamma$ -Kristallinen wurde im Zellkultursystem untersucht. Dafür eignete sich besonders die CD5A-Zelllinie, da sie endogen PROX1 nicht exprimiert (Abbildungen 4.7 und 4.8). Das ist bemerkenswert, weil PROX1 im Linsenepithel der Maus exprimiert wird (Abbildung 1.6). Entweder ist

das beim Menschen nicht der Fall, oder die Zelllinie hat die linsentypische Eigenschaft verloren, Prox1 endogen zu exprimieren.

Die transiente Expression des menschlichen PROX1 in der CD5A-Zelllinie mit einem eukaryontischen Expressionsvektor liefert eine Proteingröße von knapp 90 kDa Molekulargewicht (4.4.3; Zinovieva et al., 1996). Der Vergleich mit der Immunfärbung des Prox1 aus Kaninchen (N/N1003A-Zelllinie, Abbildung 4.8), aus Maus und Huhn (Rio-Tsonis et al., 1999, Abbildung 5.4) lassen keinen Größenunterschied erkennen.



**Abbildung 5.4:** „Western blot“ Analyse mit Prox1 Antikörper.

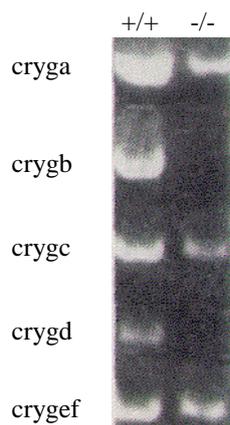
In Spur 1 wurde das gesamte Extrakt des Auges der Maus aufgetragen (20  $\mu$ g). In Spur 2 wurde Kernextrakt aus Embryonen des Huhns verwendet (8  $\mu$ g). Die Prox1 Bande ist in beiden Spezies bei 90 kDa zu erkennen (entnommen aus Rio-Tsonis et al.,1999). Der Vergleich mit dem endogenen Prox1 aus der Kaninchen Zelllinie und dem transient exprimierten menschlichen PROX1 zeigt identische Größe (Kapitel 4.4.3; Abbildung 4.8).

Im Retikulozytenlysat zeigt humanes PROX1, das mit dem gleichen Expressionsvektor exprimiert wurde, neben der vollen Länge des Proteins noch zwei kürzere Fragmente (Abbildung 4.9). Die verschieden langen Expressionsprodukte im Retikulozytenlysat sind auf mögliche Unterschiede im Beginn der Translation zurückzuführen. Dabei werden neben dem Startmethonin zusätzlich das zweite und dritte ATG als Startcodons erkannt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass transient transfiziertes PROX1 in der CD5A-Zelllinie korrekt exprimiert wird und die  $\gamma$ DEF-Kristalline reguliert. In Kotransfektionen war eine Aktivierung des  $\gamma$ F-Kristallinpromotors durch PROX1 nachweisbar (Kapitel 4.4.4). Betrachtet man die N/N1003A-Zelllinie, so exprimiert sie endogen Prox1. Kotransfiziert man transient *PROX1*, ist eine Steigerung der  $\gamma$ F-Kristallinpromotoraktivität zu beobachten. Diese Aktivierung fällt im Vergleich zur N/N1003A-Zelllinie in den CD5A-Zellen weit stärker aus, weil sie diesen Faktor endogen nicht exprimieren. Die Steigerung der Promotoraktivität des  $\gamma$ F-Kristallins steht stellvertretend für die  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren (Kapitel 5.1.2). Da die anderen  $\gamma$ -Kristallinpromotoren zu dieser Subfamilie wenig homolog sind, kann über ihre Regulation durch Prox1 spekuliert werden. Auf welche Weise Prox1 die  $\gamma$ DEF-

Kristalline reguliert, ist unklar. Am wahrscheinlichsten bindet es die Promotorregion im Bereich der Prospero-Bindestelle (Kapitel 5.1.3).

Prox1 spielt eine wichtige Rolle bei der Elongation der Linsenfasern der Maus (Wigle et al., 1999<sup>0</sup>). Die Expression dieses Homeodomänenproteins wurde ab E 9.5 der Embryonalentwicklung im gesamten Linsenvesikel, am E 12.5 und danach im anterior proliferierenden Epithel und in den Faserzellen beobachtet. Wird das für Prox1 codierende Gen ausgeschaltet, ist die Elongation der Linsenfasern stark vermindert. Das  $\gamma$ D-Kristallin wird nicht exprimiert (E 14.5) und die  $\gamma$ EF-Kristallinexpression bleibt konstant (Abbildung 5.5). Die Prox1 Inaktivierung führt zur anomalen Zellproliferation, zur Verminderung der Zellzyklus-Inhibitoren Cdkn1b und Cdkn1c, zur veränderten Expression des E-Cadherins und zur veränderten Apoptose. Noch während der Embryonalentwicklung sterben diese Mäuse (Wigle et al., 1999<sup>0</sup>).



**Abbildung 5.5:  $\gamma$ -Kristallinexpression in Prox1<sup>-/-</sup>-Mäusen.**

Die RT-PCR Analyse der mutierten Linse zeigt im Vergleich zur Wildtyplinse schwächere  $\gamma$ -Kristallinexpression (E 14.5; entnommen aus Wigle et al., 1999<sup>0</sup>).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Prox1 die  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren in den Linsenepithelzelllinien aktiviert. Deshalb ist in Prox1<sup>-/-</sup>-Mäusen zu erwarten, dass die  $\gamma$ DEF-Kristalline schwächer oder gar nicht exprimiert werden. In Übereinstimmung mit dieser Annahme exprimieren mutierte Mäuse keine  $\gamma$ D-Kristalline (Wigle et al., 1999<sup>0</sup>). Für die Prox1<sup>-/-</sup>-Mäuse wurde wie in den Wildtypmäusen eine Expression der  $\gamma$ EF-Kristalline beobachtet. Diese  $\gamma$ -Kristallinexpressionen in der Linse wurden mit RT-PCR überprüft (Abbildung 5.5; Wigle et al., 1999<sup>0</sup>). Über eine Quantifizierung der  $\gamma$ -Kristallinexpression liegen allerdings zur Zeit noch keine Daten vor. Deshalb ist es noch nicht möglich die  $\gamma$ -Kristallinexpression in der Linse von Prox1<sup>-/-</sup>-Mäusen im Detail zu vergleichen. Untersucht man die  $\gamma$ DEF-Kristallinexpression quantitativ, dann würden

die Zellkulturdaten dieser Arbeit für eine verminderte oder keine Expression dieser Gene in der *Prox1*<sup>-/-</sup>-Maus sprechen.

Als erste Zielgene sind die  $\gamma$ DEF-Kristalline bekannt, die durch *Prox1* reguliert werden. Mit dem Modellsystem der  $\gamma$ DEF-Kristallin-Regulation ist die Grundlage geschaffen, nach weiteren Zielgenen des *Prox1* zu suchen und diese in entsprechenden Zelllinien zu charakterisieren, um seine Rolle als Transkriptionsfaktor nach und nach aufzuklären. Kandidaten dafür wären beispielsweise die Zellzyklus-Inhibitoren *Cdkn1b* und *Cdkn1c*, da sie in *Prox1*<sup>-/-</sup> Mäusen reprimiert werden (Wigle et al., 1999<sup>9</sup>). Deshalb wäre in Reportergermanalysen ihre Aktivierung durch *Prox1* und in *footprint*-Analysen eine Bindung des *Prox1* an deren Promotoren zu erwarten, vorausgesetzt es reguliert diese Gene direkt.

#### 5.4 Six3 ist ein Repressor der $\gamma$ DEF-Kristalline

*Six3* ist an der Induktion der Augenlinsenentwicklung beteiligt (Oliver et al., 1996). Es bindet und reprimiert die  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren (Kapitel 5.4.1 und 5.4.2). Das Aufheben der *Six3* Repression führt zur  $\gamma$ -Kristallinexpression. Wegen des temporären, komplementären Expressionsmusters des *Six3* und der  $\gamma$ -Kristalline in der Augenlinse ist dieser Transkriptionsfaktor ein Schalter dieser Strukturgene (Kapitel 5.4.2).

##### 5.4.1 DNS-Interaktion des Six3

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *Six3* mit dem Promotorabschnitt des  $\gamma$ F-Kristallins zwischen Position -214 und -115 spezifisch in Wechselwirkung tritt. In diesem Bereich sind auch alle mit *MatInspector* vorhergesagten Bindestellen für Homeodomänen-Proteine zu finden (Kapitel 4.1.2, Abbildung 5.1), obwohl in dieser Datenbank lediglich Proteine enthalten sind, deren einzige Gemeinsamkeit mit *Six3* sich auf die strukturelle Homeodomäne beschränken. Die Interaktion des *Six3* mit DNS wird mit großer Wahrscheinlichkeit durch die Homeodomäne ermöglicht (Wallis et al., 1999). Die Homeodomäne dieses Proteins ist vom Menschen bis zum *Xenopus laevis* identisch und selbst in *Drosophila melanogaster* zu 94 % konserviert (Abbildung 5.6). Das spricht dafür, dass auch seine Funktion hoch konserviert ist.

Eine spezifische Interaktion für andere Vertreter der *Six*-Proteinfamilie konnte mit dem regulatorischen Element (ARE) des Gens für die  $\alpha 1$  Untereinheit der Natrium-

Kalium-ATPase (*Atpl1*) nachgewiesen werden (Kawakami et al., 1996). Danach binden die Homeodomänen von Six2, Six3, Six4 und Six5 dieses zur Regulation der Natrium-Kalium ATPase notwendige Promotorelement, wobei lediglich Six2, Six4 und Six5 damit spezifisch interagierten. Die Homeodomänen weisen hohe Homologie untereinander auf (Abbildung 5.6).

|                     | 1       | 60   |
|---------------------|---------|--|
| Six1 ( <i>Mus</i> ) | DGEETS  | YCFKEKSRGVLREWYAHNPYSPREKRELABATGLTITQVSNWFKNRRQRDRAA  |
| Six2 ( <i>Mus</i> ) | DGEETS  | YCFKEKSRSVLREWYAHNPYSPREKRELABATGLTITQVSNWFKNRRQRDRAA  |
| Six3 ( <i>Mus</i> ) | DGEQKTH | CFKEKTRSLREWYLDPEYPSKRELAQRTGLTITQVSNWFKNRRQRDRAA      |
| Six4 ( <i>Mus</i> ) | DGEETVY | CFKEKSRNALKELYKQNRYPSPAEKRELAKITGLTITQVSNWFKNRRQRDRNP  |
| Six5 ( <i>Mus</i> ) | DGEETVY | CFKEKSRRAALNACYRGNRYSPDEKRRLATLTGLTITQVSNWFKNRRQRDRITG |
| Six6 ( <i>Mus</i> ) | DGEQKTH | CFKEKTRHLLREWYLDPEYPSKRELAQRTGLTITQVSNWFKNRRQRDRAA     |

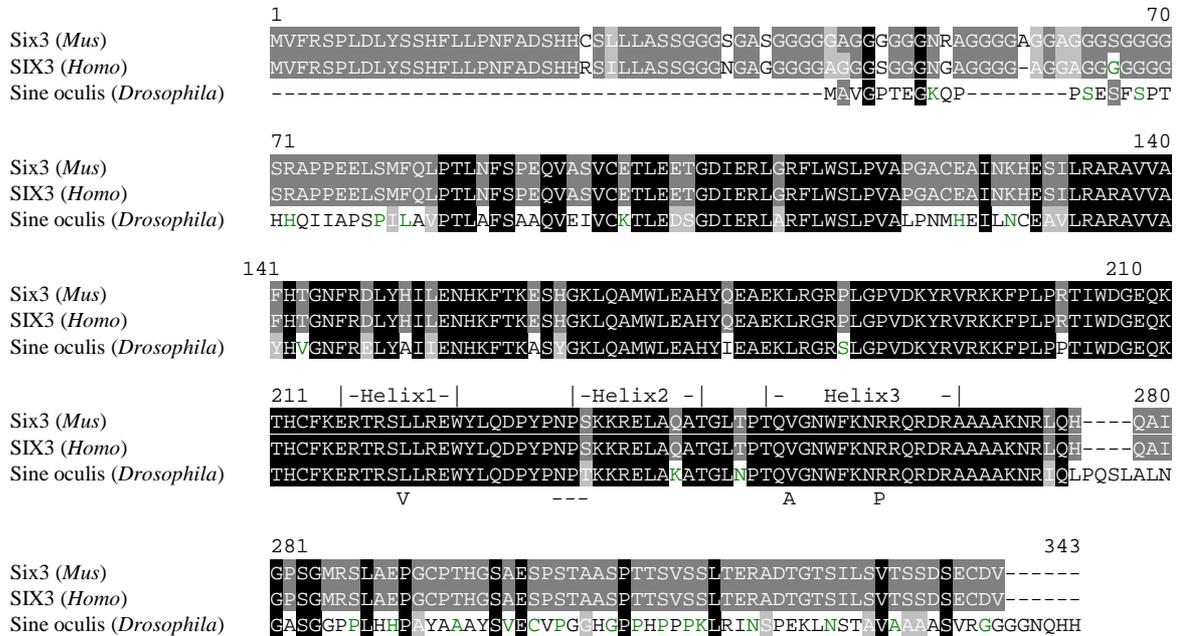
**Abbildung 5.6: Vergleich der Homeodomänen der Six-Proteinfamilie aus Maus**

Verglichen sind die Homeodomänen des Six1, Six2, Six3, Six4, Six5 und Six6 der Maus (Zutrittsnummern: Q62231, Q62232, Q62233, Q61321, BAA11824, AAD48911). Schwarz unterlegt sind identische Aminosäuren. Homologe Aminosäurereste wurden grau markiert.

Eine Interaktion des SIX3 mit anderen Genen wird aus den Beobachtungen von menschlichen Holoprosenzephalie Patienten deutlich. In einigen Fällen konnte diese Krankheit auf Mutationen im SIX3 zurückgeführt werden (Wallis et al., 1999; Nanni et al., 2000). Diese Mutationen liegen alle in der Homeodomäne dieses Proteins und verursachen Austausch von Aminosäuren (Abbildung 5.7). So führt die *de novo* Mutation von C zu G an der Position 678 auf DNS-Ebene zum Aminosäureaustausch von L zu V in der ersten Helix der Homeodomäne. Beide Aminosäuren sind zwar biochemisch ähnlich, jedoch ist diese Position in allen *SIX3*-Genen sowie im *sine oculis* konserviert. Deshalb führt diese biochemisch geringfügige Veränderung zu schwerwiegenden Krankheitsbildern, die sich im Gesichtstyp, in der Spaltlippe und in der Mikrocephalie äußern.

Eine weitere Mutation mit dem Phänotyp der alobaren Holoprosencephalie wird durch den Austausch von Valin zu Alanin bewirkt (Abbildung 5.7; Wallis et al., 1999). Diese Position ist ebenfalls in allen Homeodomänen des *SIX3*/*Six3* und im *Sine oculis* konserviert. Die Mutation liegt in der 3. Helix, die direkt mit der großen Rinne der DNS interagiert. Die hydrophobe Gruppe des Valins wird für die geeignete Faltung dieser Helix verantwortlich gemacht (Wallis et al., 1999), denn für das Waardenburg Syndrom konnte eine vergleichbar positionierte V47F Mutation für den Verlust der Fähigkeit des PAX-3 nachgewiesen werden, DNS zu binden (Abbildung 5.3 B, Fortin et al., 1997).

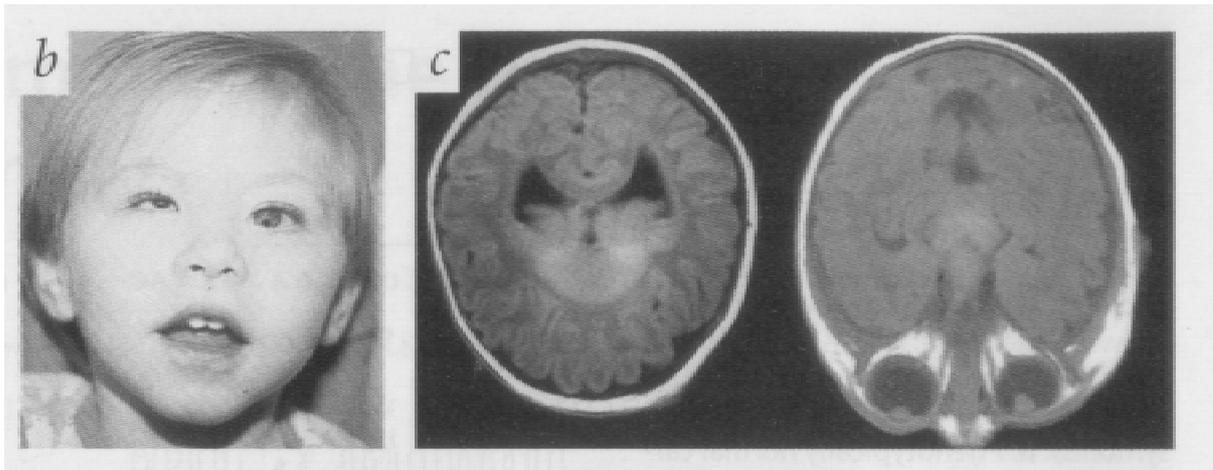
Es wurde auch ein Verlust von 3 Aminosäuren, dem Asparagin, Prolin und Serin, vor und aus der 2. Helix beobachtet (Wallis et al., 1999; Abbildung 5.7). Der Phänotyp dazu ist nicht bekannt. Jedoch sagt eine Strukturanalyse mittels ExPASy eine Zerstörung der Homeodomäne des Six3 voraus.



**Abbildung 5.7: Homologie von Six3 und Sine oculis.**

Verglichen sind die SIX3/Six3 Proteine von Mensch und Maus mit dem Sine oculis aus *Drosophila melanogaster* (Zutrittsnummern: O95343, Q62233, AAD39863). Schwarz unterlegt sind identische Aminosäuren. Homologe Aminosäurereste wurden grau markiert. Im Vergleich sind die 3 Helices der Homeodomänen gekennzeichnet (ExPASy, Schweizerisches Institut für Bioinformatik). Ebenso sind die beim Menschen beschriebenen Aminosäureaustausche angegeben (Wallis et al., 1999). In Abbildung 5.9 ist ein räumliches Modell der SIX3/Six3 Homeodomäne dargestellt.

Die für diese Arbeit interessanteste Mutation des SIX3 ist eine *de novo* Mutation, die den Aminosäureaustausch von Arginin zu Prolin in der 3. Helix der Homeodomäne bewirkt (Abbildung 5.7, Wallis et al., 1999). Das Krankheitsbild beinhaltet neben der semilobaren Holoprosenzephalie, auch Mikrophthalmie und ein Iriskolobom (Abbildung 5.8). Man nimmt an, dass das Arginin an der Protein-DNS-Wechselwirkung in der großen Rinne beteiligt ist. Dafür spricht, dass durch die positionell vergleichbare R53G Mutation im PAX-3 die DNS Bindung zerstört und das Waardenburg-Syndrom verursacht wird (vergleiche Abbildung 5.3, Fortin et al., 1997).



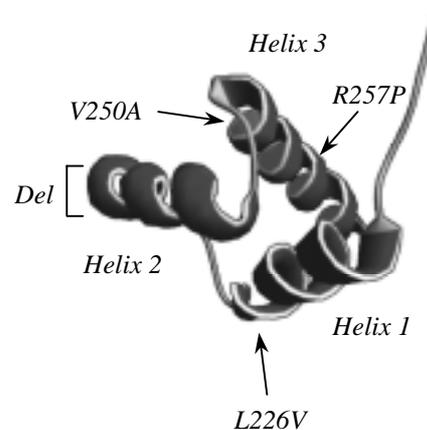
**Abbildung 5.8: Photographie und Darstellung des Gehirns eines Patienten mit Holoprosenzephalie und einer Mutation im SIX3.**

b) Der Patient leidet an Mikrozephalie, Mikrophthalmie und einem Kolobom. Das rechte Auge zeigt eine Makula, das linke Auge ein Iriskolobom. c) Rechts ist im Kernspintomogramm des gleichen Patienten am rechten Auge die Mikrophthalmie mit triangulär deformierter Linse zu erkennen. Links ist die anteriore Hälfte der Hirnhemisphären verwachsen. Die posteriore Hälfte der Hirnhemisphären sind durch eine Art Interhemisphäre getrennt.

Mit den Krankheitsbildern der Holoprosenzephalie wird dargelegt, welche Bedeutung die Homeodomäne des Six3 hat. In Übereinstimmung damit konnte exemplarisch die Bindung des Six3 an den  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren gezeigt werden. Die Repression der  $\gamma$ -Kristalline in Zellkultur durch Six3 erklärt zwar, dass sich eine Mutation in diesem Protein auf die Augenlinse und auf die  $\gamma$ -Kristallin-Regulation auswirken kann (Abbildung 5.8). Eine weitere Eingrenzung der Six3 Bindestelle ist zur Aufklärung weiterer Zielgene notwendig, um das komplexe Krankheitsbild der Holoprosenzephalie molekulargenetisch besser zu verstehen.

**Abbildung 5.9: Modell zur SIX3 Homeodomäne.**

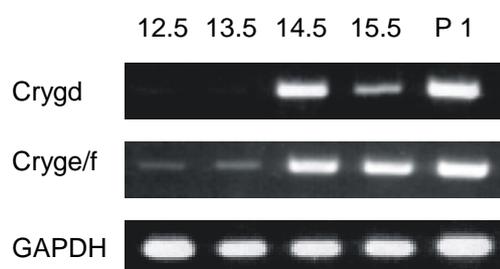
Grundlage für die Modellierung der SIX3 Homeodomäne des Menschen (von Aminosäure 209 – 265) sind Röntgenkristallstrukturen des ternären Komplexes aus PBX1, dem Homeobox-Protein HOX-B1 und DNS, sowie der Homeodomäne des Isl-1 der Ratte (ExPASy). Die beim Menschen beschriebenen Mutationen sind angegeben (Wallis et al., 1999).



#### 5.4.2 Six3 ist ein Schalter der $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren

Zur Untersuchung der Wirkung des Six3 im Zellsystem wurde seine korrekte Synthese durch einen eukaryontischen Expressionsvektor im Retikulozytenlysatsystem überprüft (Diagramm 4.11). In Zellkultur konnte eine Repression am  $\gamma$ F-Kristallinpromotor für Six3 gezeigt werden. Die Repression durch diesen Transkriptionsfaktor fällt in den N/N1003A-Zellen etwas stärker aus. Ein Grund dafür ist, dass der Faktor in dieser Zelllinie im Gegensatz zur CD5A-Zelllinie nicht endogen exprimiert wird (Abbildung 4.12).

Durch Six3 werden  $\gamma$ -Kristalline reprimiert. Die  $\gamma$ -Kristalline liegen in Linsenzellen vor, die terminal differenziert und nicht mehr teilungsfähig sind. Six3 ist an der frühen Augenentwicklung beteiligt, zu einer Zeit, in der starke Proliferation stattfindet. Die  $\gamma$ -Kristalline spielen erst dann eine Rolle, wenn die Linse entwickelt ist. Gerade dann, wenn Six3 nicht mehr exprimiert wird, wird die Expression der  $\gamma$ -Kristalline nicht weiter durch diesen Faktor zurückgehalten. Ihre Transkription beginnt (Abbildung 5.11) und die einst proliferierenden Linsenzellen differenzieren zu elongierenden Linsenfaserzellen.



**Abbildung 5.10: Expression der  $\gamma$ DEF-Kristalline in der Augenlinse.**

RT-PCR-Reaktionen wurden für die  $\gamma$ DEF-Kristalline durchgeführt. Vor E 12.5 war keine  $\gamma$ DEF-Kristallinexpression zu beobachten. Kontrolle ist die RT-PCR zur GAPDH, einem Haushaltsgen. Diese Abbildung wurde freundlicherweise von N. Klopp zur Verfügung gestellt (entnommen aus seiner Dissertation, 2000).

Die Six3 Repression in Zellkultur erklärt die Beobachtung der beginnenden Expression der  $\gamma$ -Kristalline, die mit abnehmender Expression an Six3 in der Augenlinse korreliert. Im einzelnen wird Six3 in der frühen Embryonalentwicklung der Maus angeschaltet (E 6.5; G. Oliver et al., 1995). Zu diesem Zeitpunkt bilden sich erst die Augenanlagen. Später ist Six3 in den Linsenfaserzellen und in den Zellen des Linsenepithels (E 12.5) exprimiert; ab E 14.5 wird die Expression von Six3 in den Linsenfaserzellen beobachtet, bis es in der Linse am Tag vor der Geburt (E 18.0) nicht mehr

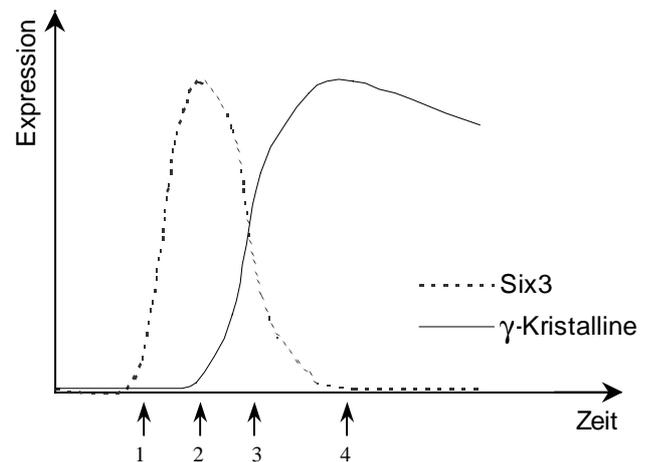
nachzuweisen ist. Dieser Zeitraum fällt mit der beginnenden Expression der  $\gamma$ DEF-Kristalline um E 12.5 zusammen (Klopp, Dissertation, 2000; Abbildung 5.10), die bis E 14.5 stärker zunimmt. Eine Ursache dafür ist die Repression des Six3, die in dieser Entwicklungsphase nach und nach aufgehoben wird.

**Abbildung 5.11: Komplementäre Expression von Six3 und den  $\gamma$ -Kristallinen.**

(1) Zuerst setzt die Expression des Six3 in den Augenanlagen ein (Oliver et al., 1995). (2) Während der Linsenentwicklung ist es dort stark exprimiert.

(3) Die primären Linsenfasern elongieren mit abfallender Expression des Six3. Gleichzeitig beginnt die Expression der  $\gamma$ -Kristalline (Abbildung 5.10).

(4) Sie erreicht ihren Höhepunkt, sobald keine Six3-Expression zu beobachten ist und nimmt mit zunehmenden Alter ab.



### 5.5 Modell zur Regulation der $\gamma$ DEF-Kristalline

In diesem Kapitel wird ein Modell erklärt, das die linsenspezifische Regulation der  $\gamma$ DEF-Kristalline beschreibt und dabei die beiden neuen Regulatoren Prox1 und Six3 berücksichtigt (Abbildung 5.12). Vorneweg möchte ich zwei Einschränkungen machen. Erstens, seit vorigem Jahr ist bekannt, dass die  $\gamma$ -Kristallinexpression nicht nur linsenspezifisch ist, sondern auch in Spuren in der Retina der 10 bis 18 Tage alten Maus nachgewiesen wurde (Jones et al, 1999). Zweitens, in dieser Arbeit wurde der proximale  $\gamma$ -Kristallinpromotor untersucht. Wahrscheinlich sind weiter stromaufwärts noch nicht bekannte Repressoren zusätzlich an der  $\gamma$ -Kristallin-Regulation beteiligt (Kapitel 5.1.1; Krausz, Dissertation 1996; Meakin et al., 1989).

Die starke linsenspezifische Expression der  $\gamma$ -Kristalline unterliegt dem Wechselspiel folgender Faktoren:

1. Das RARE ist ein antagonistisch reguliertes Promotorelement. Seine beiden Aktivatoren, RAR $\beta$  und RXR $\alpha$ , werden beide im Auge exprimiert (Dolle et al., 1990; 1991). Diese Kernrezeptoren können das RARE binden und bewirken

einen starken Anstieg der  $\gamma$ DEF-Kristallinexpression (Tini et al., 1993). Im Gegensatz dazu hat der T<sub>3</sub>R-Rezeptor eine dazu antagonistische Funktion (Tini et al., 1994). Die Retinsäure-Rezeptoren sind nicht linsenspezifisch.

2. Pax-6 wird im optischen Vesikel, im zukünftigen Linsenektoderm und in der Linse exprimiert. In der adulten Linse wird das Protein fast ausschließlich im Epithel nachgewiesen (Walther und Gruss, 1991). Seine Wirkung am  $\gamma$ -Kristallinpromotor ist bislang unbekannt. Zwei Gründe sprechen allerdings dafür, dass Pax-6 die  $\gamma$ -Kristalline reprimiert. Zum einen zieht sich seine Expression ins Linsenepithel zurück und ist in den Faserzellen kaum noch nachweisbar (um E 14.5 der Maus; Walther und Gruss, 1991). Das fällt mit dem Beginn der  $\gamma$ -Kristallinexpression zusammen (Klopp, Dissertation, 2000). Zum anderen konnte beim Huhn die Repression der  $\beta$ -Kristallinogene gezeigt werden. Die Expressionsmuster des Pax-6 und der  $\beta$ -Kristalline sind in der Linse des Huhns komplementär (Duncan et al., 1998). Ähnlich verhält es sich mit der Expression des Pax-6 und der  $\gamma$ -Kristalline in der Linse, so dass es möglicherweise ein Repressor der  $\gamma$ -Kristalline ist. Die mit *MatInspector* gefundene Pax-6 Bindestelle bekräftigt die Vermutung, dass Pax-6 an der  $\gamma$ DEF-Kristallin-Regulation beteiligt ist (Kapitel 4.1.2).
3. Das Homeodomänen-Protein Six3 ist für die Entwicklung der Augenlinse von Bedeutung. Es zieht sich wie Pax-6 mit fortschreitender Linsenentwicklung ins Linsenepithel zurück (E 14.5) und wird später in der Linse nicht mehr beobachtet (Oliver et al., 1995). Die Repression der  $\gamma$ -Kristalline konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Da es wie Pax-6 komplementär zum  $\gamma$ -Kristallin exprimiert wird, erklärt die Aufhebung seiner Repression das Anschalten der  $\gamma$ -Kristallinexpression.
4. Prox1 wird als weiteres Homeodomänen-Protein vor Beginn der Linsenbildung in den Augenanlagen gebildet und ist für die Elongation der Linsenfasern von Bedeutung (Wigle et al., 1999<sup>o</sup>). In der adulten Linse ist es in den Zellkernen der Linsenfasern und der Linsenepithels nachzuweisen (Tomarev et al., 1998). Die beobachtete Aktivierung des  $\gamma$ -Kristallinpromotors zeigt, dass die  $\gamma$ -

Kristallinexpression und die Linsenfaserelongation in engem Zusammenhang stehen. Eine Aktivierung der  $\gamma$ -Kristalline durch Prox1 im Linsenepithel wird anfangs durch Six3 und möglicherweise immer durch Pax-6 als Repressor verhindert.

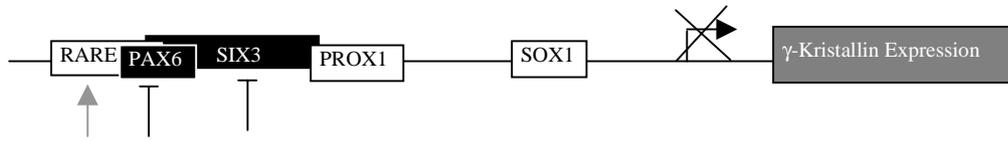
5. Das HMG Protein Sox1 wird in der Linse zeitgleich mit der Entstehung der Linsenfaser exprimiert (Kamachi et al., 1995, 1998). Die Sox1-Expression in der Linse beginnt vor der Expression der  $\gamma$ -Kristalline. Die  $\gamma$ -Kristallinpromotoren werden durch Sox1 aktiviert (Kamachi et al., 1995). Seine Deletion führt zu Mikrophthalmie und Katarakt.

Sox2 und Sox3 werden im Gegensatz zu Sox1 nicht in der Linse exprimiert. Das DC5 *enhancer*-Element der  $\delta$ -Kristallins des Huhns ist durch Sox1 aktivierbar. Sox2 und Sox3 können diese Funktion übernehmen, allerdings ist ihre Aktivierung dieses Elements deutlich schwächer (Kamachi et al., 1998). Möglicherweise ist diese Funktion auf die  $\gamma$ -Kristallinexpression übertragbar. Das würde die schwache  $\gamma$ -Kristallinexpression in der Retina erklären, in der Prox1, Pax-6 und Six3 ebenfalls exprimiert werden.

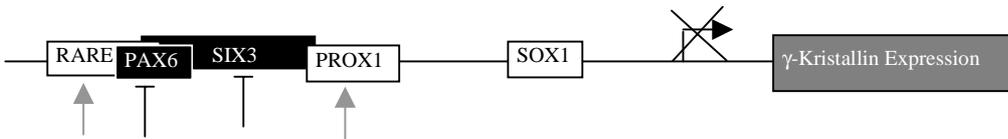
Die  $\gamma$ -Kristallingene werden während der Zeit der Augenentwicklung und der Linsenentstehung nicht exprimiert (Abbildung 5.12). Dafür sind die beiden Augenentwicklungsgene Pax-6 und Six3 verantwortlich. Sobald die Expression beider Gene aus den Faserzellen verschwindet, werden die  $\gamma$ -Kristalline angeschaltet. Dafür sind zusätzlich die Aktivatoren Prox1 und Sox1 notwendig. Deren regulatorische Wirkung gewinnt erst an Bedeutung, wenn die Repression durch Pax-6 und Six3 aufgehoben ist. Im Epithel dagegen liegt zwar Prox1-Expression vor, dort wird jedoch kein  $\gamma$ -Kristallin exprimiert, weil der Aktivator Sox1 dafür fehlt und Pax-6 in diesen Zellen die  $\gamma$ -Kristallingene reprimiert. Das Pax-6 blockiert die  $\gamma$ -Kristallinexpression und wird in dieser Aufgabe im Epithel anfangs noch von Six3 unterstützt (in der Maus bis mindestens E 14.5; Oliver et al., 1995). Außerhalb der Augenlinse werden kein  $\gamma$ -Kristalline exprimiert, weil nirgendwo im gesamten Organismus ihre beiden Aktivatoren Sox1 und Prox1 zugleich exprimiert werden.

### Modell zur Regulation der $\gamma$ DEF-Kristallin Expression

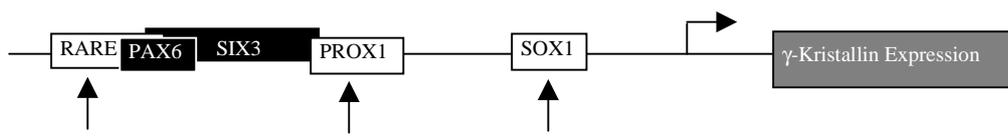
*Vor und während der frühen Augenentwicklung*



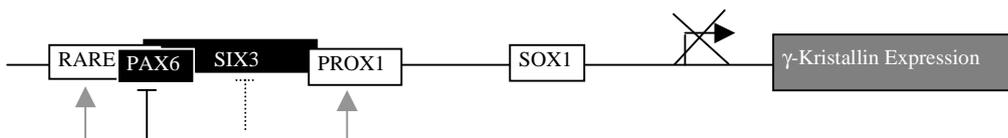
*Vor und während der frühen Linsenentstehung*



*Während und nach der Elongation der Linsenfasern*



*Linsenepithel*



**Abbildung 5.12: Regulationsmodell der  $\gamma$ DEF-Kristallinogene während der Linsenentwicklung.**

Die Schritte der  $\gamma$ DEF-Kristallin-Regulation ist an den Eckdaten der Expression der Regulatoren orientiert. Die Übergänge sind fließend. Retinsäure-Rezeptoren, Prox1 und Sox1 sind Aktivatoren, Pax-6 und Six3 sind Repressoren der  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren. Vor Beginn der Augenentwicklung sind die Retinsäurerezeptoren, Pax-6 und Six3 exprimiert. Noch vor der Linsenentstehung kommt Prox1 hinzu. Bis zur frühen Linsenentstehung werden die  $\gamma$ DEF-Kristalline durch die zwei Repressoren stummgehalten. Mit der Entstehung der Linsenfasern wird Sox1 als weiterer Aktivator exprimiert. Die zwei Repressoren, Pax-6 und Six3, fallen weg. Dadurch wird die  $\gamma$ -Kristallinexpression in den Faserzellen eingeleitet. Im Linsenepithel bleibt die Expression der  $\gamma$ -Kristalline während der gesamten Linsenentwicklung stumm. Six3 wird zu Beginn der Linsenentwicklung im Epithel exprimiert und ist dort später nicht mehr zu beobachten.

**Literaturverzeichnis**

- C. R. Altmann, R. L. Chow, R. A. Lang, and A. Hemmati-Brivanlou. Lens induction by Pax-6 in *Xenopus laevis*. *Dev.Biol.* 185 (1):119-123, 1997.
- R. C. Augusteyn, R. Seifert, L. Tai, and C. H. Thompson. Monoclonal antibodies to bovine alpha-crystallin. *Curr.Eye Res.* 4 (1):13-20, 1985.
- B. Bax, R. Lapatto, V. Nalini, H. Driessen, P. F. Lindley, D. Mahadevan, T. L. Blundell, and C. Slingsby. X-ray analysis of beta B2-crystallin and evolution of oligomeric lens proteins. *Nature* 347 (6295):776-780, 1990.
- T. Belecky-Adams, S. Tomarev, H. S. Li, L. Ploder, R. R. McInnes, O. Sundin, and R. Adler. Pax-6, Prox 1, and Chx10 homeobox gene expression correlates with phenotypic fate of retinal precursor cells. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 38 (7):1293-1303, 1997.
- H. C. Birnboim and J. Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7 (6):1513-1523, 1979.
- T. Blundell, P. Lindley, L. Miller, D. Moss, C. Slingsby, I. Tickle, B. Turnell, and G. Wistow. The molecular structure and stability of the eye lens: x-ray analysis of gamma-crystallin II. *Nature* 289 (5800):771-777, 1981.
- R. H. Brakenhoff, H. J. Aarts, F. H. Reek, N. H. Lubsen, and J. G. Schoenmakers. Human gamma-crystallin genes. A gene family on its way to extinction. *J Mol.Biol.* 216 (3):519-532, 1990.
- R. H. Brakenhoff, H. A. Henskens, M. W. van Rossum, N. H. Lubsen, and J. G. Schoenmakers. Activation of the gamma E-crystallin pseudogene in the human hereditary Coppock-like cataract. *Hum.Mol.Genet.* 3 (2):279-283, 1994.
- G. J. Caspers, J. A. Leunissen, and W. W. de Jong. The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved "alpha-crystallin domain". *J Mol.Evol.* 40 (3):238-248, 1995.
- C. T. Chung, S. L. Niemela, and R. H. Miller. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86 (7):2172-2175, 1989.
- J. Clauwaert, H. D. Ellerton, J. F. Koretz, K. Thomson, and R. C. Augusteyn. The effect of temperature on the renaturation of alpha-crystallin. *Curr.Eye Res.* 8 (4):397-403, 1989.
- J. Collignon, S. Sockanathan, A. Hacker, M. Cohen-Tannoudji, D. Norris, S. Rastan, M. Stevanovic, P. N. Goodfellow, and R. Lovell-Badge. A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2. *Development* 122 (2):509-520, 1996.
- A. Cvekl, C. M. Sax, E. H. Bresnick, and J. Piatigorsky. A complex array of positive and negative elements regulates the chicken alpha A-crystallin gene: involvement of Pax-6, USF, CREB and/or CREM, and AP-1 proteins. *Mol.Cell Biol.* 14 (11):7363-7376, 1994.
- A. Cvekl, C. M. Sax, X. Li, J. B. McDermott, and J. Piatigorsky. Pax-6 and lens-specific transcription of the chicken delta 1-crystallin gene. *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92 (10):4681-4685, 1995<sup>®</sup>.
- A. Cvekl, F. Kashanchi, C. M. Sax, J. N. Brady, and J. Piatigorsky. Transcriptional regulation of the mouse alpha A-crystallin gene: activation dependent on a cyclic AMP-responsive element (DE1/CRE) and a Pax-6-binding site. *Mol.Cell Biol.* 15 (2):653-660, 1995<sup>®</sup>.

- W. W. de Jong, J. A. Leunissen, and C. E. Voorter. Evolution of the alpha-crystallin/small heat-shock protein family. *Mol.Biol.Evol.* 10 (1):103-126, 1993.
- W. W. de Jong, G. J. Caspers, and J. A. Leunissen. Genealogy of the alpha-crystallin--small heat-shock protein superfamily. *Int J Biol.Macromol.* 22 (3-4):151-162, 1998.
- J. R. de Wet, K. V. Wood, D. R. Helinski, and M. DeLuca. Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82 (23):7870-7873, 1985.
- J. T. den Dunnen, R. J. Jongbloed, A. H. Geurts van Kessel, and J. G. Schoenmakers. Human lens gamma-crystallin sequences are located in the p12-qter region of chromosome 2. *Hum.Genet.* 70 (3):217-221, 1985.
- J. T. den Dunnen, J. W. van Neck, F. P. Cremers, N. H. Lubsen, and J. G. Schoenmakers. Nucleotide sequence of the rat gamma-crystallin gene region and comparison with an orthologous human region. *Gene* 78 (2):201-213, 1989.
- R. P. Dirks, H. J. Kraft, S. T. Van Genesen, E. J. Klok, R. Pfundt, J. G. Schoenmakers, and N. H. Lubsen. The cooperation between two silencers creates an enhancer element that controls both the lens-preferred and the differentiation stage-specific expression of the rat beta B2-crystallin gene. *Eur J Biochem.* 239 (1):23-32, 1996<sup>o</sup>.
- R. P. Dirks, E. J. Klok, S. T. Van Genesen, J. G. Schoenmakers, and N. H. Lubsen. The sequence of regulatory events controlling the expression of the gamma D-crystallin gene during fibroblast growth factor-mediated rat lens fiber cell differentiation. *Dev.Biol.* 173 (1):14-25, 1996<sup>o</sup>.
- P. Dolle, E. Ruberte, P. Leroy, G. Morriss-Kay, and P. Chambon. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. *Development* 110 (4):1133-1151, 1990.
- P. Dolle, V. Fraulob, P. Kastner, and P. Chambon. Developmental expression of murine retinoid X receptor (RXR) genes. *Mech.Dev.* 45 (2):91-104, 1994.
- R. A. Dubin, E. F. Wawrousek, and J. Piatigorsky. Expression of the murine alpha B-crystallin gene is not restricted to the lens. *Mol.Cell Biol.* 9 (3):1083-1091, 1989.
- M. K. Duncan, J. I. Haynes, A. Cvekl, and J. Piatigorsky. Dual roles for Pax-6: a transcriptional repressor of lens fiber cell- specific beta-crystallin genes. *Mol.Cell Biol.* 18 (9):5579-5586, 1998.
- J. A. Epstein, T. Glaser, J. Cai, L. Jepeal, D. S. Walton, and R. L. Maas. Two independent and interactive DNA-binding subdomains of the Pax6 paired domain are regulated by alternative splicing. *Genes Dev.* 8 (17):2022-2034, 1994.
- C. W. Evans, S. Eastwood, J. Rains, W. T. Gruijters, S. Bullivant, and J. Kistler. Gap junction formation during development of the mouse lens. *Eur J Cell Biol.* 60 (2):243-249, 1993.
- A. S. Fortin, D. A. Underhill, and P. Gros. Reciprocal effect of Waardenburg syndrome mutations on DNA binding by the Pax-3 paired domain and homeodomain. *Hum.Mol.Genet.* 6 (11):1781-1790, 1997.
- M. Fried and D. M. Crothers. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 9 (23):6505-6525, 1981.
- M. E. Gallardo, J. Lopez-Rios, I. Fernaud-Espinosa, B. Granadino, R. Sanz, C. Ramos, C. Ayuso, M. J. Seller, H. G. Brunner, P. Bovolenta, and de Cordoba Rodriguez. Genomic cloning and characterization of the human homeobox gene SIX6 reveals a cluster of SIX genes in

- chromosome 14 and associates SIX6 hemizygoty with bilateral anophthalmia and pituitary anomalies. *Genomics* 61 (1):82-91, 1999.
- M. M. Garner and A. Revzin. A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res* 9 (13):3047-3060, 1981.
- T. Glaser, L. Jepeal, J. G. Edwards, S. R. Young, J. Favor, and R. L. Maas. PAX6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. *Nat.Genet.* 7 (4):463-471, 1994.
- R. Gopal-Srivastava, A. Cvekl, and J. Piatigorsky. Pax-6 and alphaB-crystallin/small heat shock protein gene regulation in the murine lens. Interaction with the lens-specific regions, LSR1 and LSR2. *J Biol.Chem.* 271 (38):23029-23036, 1996.
- D. R. Goring, J. Rossant, S. Clapoff, M. L. Breitman, and L. C. Tsui. In situ detection of beta-galactosidase in lenses of transgenic mice with a gamma-crystallin/lacZ gene. *Science* 235 (4787):456-458, 1987.
- D. R. Goring, M. L. Breitman, and L. C. Tsui. Temporal regulation of six crystallin transcripts during mouse lens development. *Exp Eye Res.* 54 (5):785-795, 1992.
- D. R. Goring, D. M. Bryce, L. C. Tsui, M. L. Breitman, and Q. Liu. Developmental regulation and cell type-specific expression of the murine gamma F-crystallin gene is mediated through a lens-specific element containing the gamma F-1 binding site. *Dev.Dyn.* 196 (2):143-152, 1993.
- F. L. Graham and van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52 (2):456-467, 1973.
- B. Granadino, M. E. Gallardo, J. Lopez-Rios, R. Sanz, C. Ramos, C. Ayuso, P. Bovolenta, and de Cordoba Rodriguez. Genomic cloning, structure, expression pattern, and chromosomal location of the human SIX3 gene. *Genomics* 55 (1):100-105, 1999.
- J. Graw, A. Liebstein, D. Pietrowski, T. Schmitt-John, and T. Werner. Genomic sequences of murine gamma B- and gamma C-crystallin-encoding genes: promoter analysis and complete evolutionary pattern of mouse, rat and human gamma-crystallins. *Gene* 136 (1-2):145-156, 1993.
- C. Grimm, R. Sporle, T. E. Schmid, I. D. Adler, J. Adamski, K. Schughart, and J. Graw. Isolation and embryonic expression of the novel mouse gene Hic1, the homologue of HIC1, a candidate gene for the Miller-Dieker syndrome. *Hum.Mol.Genet.* 8 (4):697-710, 1999.
- J. C. Grindley, D. R. Davidson, and R. E. Hill. The role of Pax-6 in eye and nasal development. *Development* 121 (5):1433-1442, 1995.
- P. J. Groenen, K. B. Merck, W. W. de Jong, and H. Bloemendal. Structure and modifications of the junior chaperone alpha-crystallin. From lens transparency to molecular pathology. *Eur J Biochem.* 225 (1):1-19, 1994.
- G. Halder, P. Callaerts, and W. J. Gehring. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in Drosophila. *Science* 267 (5205):1788-1792, 1995.
- B. Hassan, L. Li, K. A. Bremer, W. Chang, J. Pinsonneault, and H. Vaessin. Prospero is a panneural transcription factor that modulates homeodomain protein activity. *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94 (20):10991-10996, 1997.
- R. E. Hill, J. Favor, B. L. Hogan, C. C. Ton, G. F. Saunders, I. M. Hanson, J. Prosser, T. Jordan, N. D. Hastie, and Heyningen van, V. Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox- containing gene. *Nature* 354 (6354):522-525, 1991.

- O. Hockwin. Age changes of lens metabolism. *Altern.Entwickl.Aging Dev.* 1:95-129, 1971.
- D. Hogg, M. B. Gorin, C. Heinzmann, S. Zollman, T. Mohandas, I. Klisak, R. S. Sparkes, M. Breitman, L. C. Tsui, and J. Horwitz. Nucleotide sequence for the cDNA of the bovine beta B2 crystallin and assignment of the orthologous human locus to chromosome 22. *Curr.Eye Res.* 6 (11):1335-1342, 1987.
- J. Horwitz. Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89 (21):10449-10453, 1992.
- T. J. Hulsebos, D. J. Gilbert, O. Delattre, L. J. Smink, I. Dunham, A. Westerveld, G. Thomas, N. A. Jenkins, and N. G. Copeland. Assignment of the beta B1 crystallin gene (CRYBB1) to human chromosome 22 and mouse chromosome 5. *Genomics* 29 (3):712-718, 1995.
- T. D. Ingolia and E. A. Craig. Four small Drosophila heat shock proteins are related to each other and to mammalian alpha-crystallin. *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 79 (7):2360-2364, 1982.
- H. Ippel, G. Larsson, G. Behravan, J. Zdunek, M. Lundqvist, J. Schleucher, P. O. Lycksell, and S. Wijmenga. The solution structure of the homeodomain of the rat insulin-gene enhancer protein isl-1. Comparison with other homeodomains. *J Mol.Biol.* 288 (4):689-703, 1999.
- M. E. Ireland, K. Tran, and L. Mrock. Beta-adrenergic mechanisms affect cell division and differentiation in cultured chick lens epithelial cells. *Exp Eye Res.* 57 (3):325-333, 1993.
- U. Jakob, M. Gaestel, K. Engel, and J. Buchner. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol.Chem.* 268 (3):1517-1520, 1993.
- D. Jean, G. Bernier, and P. Gruss. Six6 (Optx2) is a novel murine Six3-related homeobox gene that demarcates the presumptive pituitary/hypothalamic axis and the ventral optic stalk. *Mech.Dev.* 84 (1-2):31-40, 1999.
- S. E. Jones, C. Jomary, J. Grist, J. Makwana, and M. J. Neal. Retinal expression of gamma-crystallins in the mouse. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 40 (12):3017-3020, 1999.
- S. Jun and C. Desplan. Cooperative interactions between paired domain and homeodomain. *Development* 122 (9):2639-2650, 1996.
- Y. Kamachi, S. Sockanathan, Q. Liu, M. Breitman, R. Lovell-Badge, and H. Kondoh. Involvement of SOX proteins in lens-specific activation of crystallin genes. *EMBO J* 14 (14):3510-3519, 1995.
- Y. Kamachi, M. Uchikawa, J. Collignon, R. Lovell-Badge, and H. Kondoh. Involvement of Sox1, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction. *Development* 125 (13):2521-2532, 1998.
- K. Kato, H. Shinohara, N. Kurobe, S. Goto, Y. Inaguma, and K. Ohshima. Immunoreactive alpha A crystallin in rat non-lenticular tissues detected with a sensitive immunoassay method. *Biochim.Biophys.Acta* 1080 (2):173-180, 1991<sup>o</sup>.
- K. Kato, H. Shinohara, N. Kurobe, Y. Inaguma, K. Shimizu, and K. Ohshima. Tissue distribution and developmental profiles of immunoreactive alpha B crystallin in the rat determined with a sensitive immunoassay system. *Biochim.Biophys.Acta* 1074 (1):201-208, 1991<sup>o</sup>.
- K. Kawakami, H. Ohto, T. Takizawa, and T. Saito. Identification and expression of six family genes in mouse retina. *FEBS Lett.* 393 (2-3):259-263, 1996.
- R. Klemenz, E. Frohli, R. H. Steiger, R. Schafer, and A. Aoyama. Alpha B-crystallin is a small heat shock protein. *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88 (9):3652-3656, 1991.

- N. Klopp. Ursachen erblicher Katarakte: Charakterisierung von Mutationen in den gamma-Kristallinen bei Mensch und Maus. *Dissertation* (TU München), 2000.
- B. M. Koroma, J. M. Yang, and O. H. Sundin. The Pax-6 homeobox gene is expressed throughout the corneal and conjunctival epithelia. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 38 (1):108-120, 1997.
- E. Krausz, R. C. Augusteyn, R. A. Quinlan, J. R. Reddan, P. Russell, C. M. Sax, and J. Graw. Expression of Crystallins, Pax6, Filensin, CP49, MIP, and MP20 in lens- derived cell lines. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 37 (10):2120-2128, 1996.
- E. Krausz. Funktionelle Charakterisierung eines regulativen Elementes zwischen Transkriptions- und Translationsstart im gamma-E-Kristallinpromotor. *Dissertation* (TU München), 1996.
- T. Kuwabara and M. Imaizumi. Denucleation process of the lens. *Invest Ophthalmol.* 13 (12):973-981, 1974.
- J. Kyhse-Andersen. Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem.Biophys.Methods* 10 (3-4):203-209, 1984.
- U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (259):680-685, 1970.
- J. D. Lee, D. H. Lee, S. S. Park, D. H. Shin, H. C. Chung, and J. H. Lee. Oncogene expressions detected by in situ hybridization of squamous metaplasia, dysplasia and primary lung cancer in human. *J Korean Med Sci.* 4 (3):121-127, 1989.
- Q. Liu, F. Shalaby, M. C. Puri, S. Tang, and M. L. Breitman. Novel zinc finger proteins that interact with the mouse gamma F- crystallin promoter and are expressed in the sclerotome during early somitogenesis. *Dev.Biol.* 165 (1):165-177, 1994.
- Q. R. Liu, M. Tini, L. C. Tsui, and M. L. Breitman. Interaction of a lens cell transcription factor with the proximal domain of the mouse gamma F-crystallin promoter. *Mol.Cell Biol.* 11 (3):1531-1537, 1991.
- S. Lok, L. C. Tsui, T. Shinohara, J. Piatigorsky, R. Gold, and M. Breitman. Analysis of the mouse gamma-crystallin gene family: assignment of multiple cDNAs to discrete genomic sequences and characterization of a representative gene. *Nucleic Acids Res.* 12 (11):4517-4529, 1984.
- S. Lok, M. L. Breitman, A. B. Chepelinsky, J. Piatigorsky, R. J. Gold, and L. C. Tsui. Lens-specific promoter activity of a mouse gamma-crystallin gene. *Mol.Cell Biol.* 5 (9):2221-2230, 1985.
- S. Lok, W. Stevens, M. L. Breitman, and L. C. Tsui. Multiple regulatory elements of the murine gamma 2-crystallin promoter. *Nucleic Acids Res.* 17 (9):3563-3582, 1989.
- O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. R. Ryandall. Protein Measurements with the Folin phenol reagent. *J Biol.Chem.* 193:265-276, 1951.
- N. H. Lubsen, H. J. Aarts, and J. G. Schoenmakers. The evolution of lenticular proteins: the beta- and gamma-crystallin super gene family. *Prog.Biophys.Mol.Biol.* 51 (1):47-76, 1988.
- J. W. McAvoy. Cell division, cell elongation and the co-ordination of crystallin gene expression during lens morphogenesis in the rat. *J Embryol.Exp Morphol.* 45:271-281, 1978<sup>o</sup>.

- J. W. McAvoy. Cell division, cell elongation and distribution of alpha-, beta- and gamma-crystallins in the rat lens. *J Embryol.Exp Morphol.* 44:149-165, 1978<sup>®</sup>.
- S. O. Meakin, M. L. Breitman, and L. C. Tsui. Structural and evolutionary relationships among five members of the human gamma-crystallin gene family. *Mol.Cell Biol.* 5 (6):1408-1414, 1985.
- S. O. Meakin, J. R. Reddan, L. C. Tsui, and M. L. Breitman. A rabbit lens epithelial cell line supports expression of an exogenous crystallin gene characteristic of lens fiber cell differentiation. *Exp Eye Res.* 48 (1):131-137, 1989.
- K. B. Merck, W. A. Haard-Hoekman, B. B. Oude Essink, H. Bloemendal, and W. W. de Jong. Expression and aggregation of recombinant alpha A-crystallin and its two domains. *Biochim.Biophys.Acta* 1130 (3):267-276, 1992.
- C. T. Mörner. Untersuchungen der Proteinsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges. *Zeitschrift für Physiologische Chemie* 18:61-106, 1894.
- L. Nanni, L. A. Croen, E. J. Lammer, and M. Muenke. Holoprosencephaly: molecular study of a California population. *Am J Med Genet.* 90 (4):315-319, 2000.
- M. V. Nesterenko, M. Tilley, and S. J. Upton. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem.Biophys.Methods* 28 (3):239-242, 1994.
- S. Nishiguchi, H. Wood, H. Kondoh, R. Lovell-Badge, and V. Episkopou. Sox1 directly regulates the gamma-crystallin genes and is essential for lens development in mice. *Genes Dev.* 12 (6):776-781, 1998.
- G. Oliver, B. Sosa-Pineda, S. Geisendorf, E. P. Spana, C. Q. Doe, and P. Gruss. Prox 1, a prospero-related homeobox gene expressed during mouse development. *Mech.Dev.* 44 (1):3-16, 1993.
- G. Oliver, A. Mailhos, R. Wehr, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and P. Gruss. Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development* 121 (12):4045-4055, 1995.
- G. Oliver, F. Loosli, R. Koster, J. Wittbrodt, and P. Gruss. Ectopic lens induction in fish in response to the murine homeobox gene Six3. *Mech.Dev.* 60 (2):233-239, 1996.
- J. Papaconstantinou. Molecular aspects of lens cell differentiation. *Science* 156 (773):338-346, 1967.
- R. Peek, Logt P. van der, N. H. Lubsen, and J. G. Schoenmakers. Tissue- and species-specific promoter elements of rat gamma-crystallin genes. *Nucleic Acids Res.* 18 (5):1189-1197, 1990.
- R. Peek, R. W. Niessen, J. G. Schoenmakers, and N. H. Lubsen. DNA methylation as a regulatory mechanism in rat gamma-crystallin gene expression. *Nucleic Acids Res.* 19 (1):77-83, 1991.
- R. Peek, H. J. Kraft, E. J. Klok, N. H. Lubsen, and J. G. Schoenmakers. Activation and repression sequences determine the lens-specific expression of the rat gamma D-crystallin gene. *Nucleic Acids Res.* 20 (18):4865-4871, 1992.
- J. Piatigorsky. Lens differentiation in vertebrates. A review of cellular and molecular features. *Differentiation* 19 (3):134-153, 1981.
- J. Piatigorsky, M. Kantorow, R. Gopal-Srivastava, and S. I. Tomarev. Recruitment of enzymes and stress proteins as lens crystallins. *EXS* 71:241-250, 1994.

- D. Pietrowski, M. J. Durante, A. Liebstein, T. Schmitt-John, T. Werner, and J. Graw. Alpha-crystallins are involved in specific interactions with the murine gamma D/E/F-crystallin-encoding gene. *Gene* 144 (2):171-178, 1994.
- D. Pietrowski. Untersuchung und Charakterisierung von Protein/DNA Wechselwirkungen des gamma-E-Kristallinpromotors mit Proteinen aus der Augenlinse. *Dissertation* (LMU München), 1995.
- D. Pietrowski and J. Graw. Autokinase activity of alpha-crystallin inhibits its specific interaction with the DOTIS element in the murine gamma D/E/F-crystallin promoter in vitro. *Biol.Chem.* 378 (10):1183-1186, 1997.
- K. Quandt, K. Frech, H. Karas, E. Wingender, and T. Werner. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* 23 (23):4878-4884, 1995.
- R. Quiring, U. Walldorf, U. Kloter, and W. J. Gehring. Homology of the eyeless gene of Drosophila to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans. *Science* 265 (5173):785-789, 1994.
- P. V. Rao, J. Horwitz, and J. S. Zigler, Jr. Alpha-crystallin, a molecular chaperone, forms a stable complex with carbonic anhydrase upon heat denaturation. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 190 (3):786-793, 1993.
- J. R. Reddan, A. B. Chepelinsky, D. C. Dziedzic, J. Piatigorsky, and E. M. Goldenberg. Retention of lens specificity in long-term cultures of diploid rabbit lens epithelial cells. *Differentiation* 33 (2):168-174, 1986.
- L. Ren, H. Chen, and E. A. Sternberg. Tethered bandshift assay and affinity purification of a new DNA-binding protein. *Biotechniques* 16 (5):852-855, 1994.
- J. Richardson, A. Cvekl, and G. Wistow. Pax-6 is essential for lens-specific expression of zeta-crystallin. *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92 (10):4676-4680, 1995.
- K. Rio-Tsonis, S. I. Tomarev, and P. A. Tsonis. Regulation of Prox 1 during lens regeneration. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 40 (9):2039-2045, 1999.
- J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis. Molecular Cloning. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 1-3, 1989.
- F. Sanger, S. Nicklen, and A. R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 74 (12):5463-5467, 1977.
- S. T. Santhiya, S. M. Abd-alla, J. Loster, and J. Graw. Reduced levels of gamma-crystallin transcripts during embryonic development of murine Cat2nop mutant lenses. *Graefes Arch.Clin Exp Ophthalmol.* 233 (12):795-800, 1995.
- C. M. Sax and J. Piatigorsky. Expression of the alpha-crystallin/small heat-shock protein/molecular chaperone genes in the lens and other tissues. *Adv.Enzymol.Relat Areas Mol.Biol.* 69:155-201, 1994.
- C. M. Sax, A. Cvekl, M. Kantorow, B. Sommer, A. B. Chepelinsky, and J. Piatigorsky. Identification of negative-acting and protein-binding elements in the mouse alpha A-crystallin - 1556/-1165 region. *Gene* 144 (2):163-169, 1994.
- M. Seimiya and W. J. Gehring. The Drosophila homeobox gene optix is capable of inducing ectopic eyes by an eyeless-independent mechanism. *Development* 127 (9):1879-1886, 2000.

- B. S. Shastry. Site-specific interaction of a partially purified human lens factor(s) with conserved sequences of the human gamma crystallin gene. *Arch.Biochem.Biophys.* 306 (2):476-485, 1993.
- R. J. Siezen, R. D. Anello, and J. A. Thomson. Interactions of lens proteins. Concentration dependence of beta- crystallin aggregation. *Exp Eye Res.* 43 (3):293-303, 1986.
- K. Singh, B. Groth-Vasselli, and P. N. Farnsworth. Interaction of DNA with bovine lens alpha-crystallin: its functional implications. *Int J Biol.Macromol.* 22 (3-4):315-320, 1998.
- L. C. Skow, M. E. Donner, S. M. Huang, J. M. Gardner, B. A. Taylor, W. G. Beamer, and P. A. Lalley. Mapping of mouse gamma crystallin genes on chromosome 1. *Biochem.Genet.* 26 (9-10):557-570, 1988.
- R. H. Smulders, M. A. van Boekel, and W. W. de Jong. Mutations and modifications support a 'pitted-flexiball' model for alpha-crystallin. *Int J Biol.Macromol.* 22 (3-4):187-196, 1998.
- A. N. Srinivasan, C. N. Nagineni, and S. P. Bhat. alpha A-crystallin is expressed in non-ocular tissues. *J Biol.Chem.* 267 (32):23337-23341, 1992.
- T. Stoger, R. C. Augusteyn, and J. Graw. The Cryner element in the murine gamma-crystallin promoters interacts with lens proteins. *Ophthalmic Res.* 29 (3):161-171, 1997.
- A. Stoykova, M. Gotz, P. Gruss, and J. Price. Pax6-dependent regulation of adhesive patterning, R-cadherin expression and boundary formation in developing forebrain. *Development* 124 (19):3765-3777, 1997.
- F. W. Studier. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. *J Mol.Biol.* 79 (2):237-248, 1973.
- L. Takemoto. Release of alpha-A sequence 158-173 correlates with a decrease in the molecular chaperone properties of native alpha-crystallin. *Exp Eye Res* 59 (2):239-242, 1994.
- M. Tini, G. Otulakowski, M. L. Breitman, L. C. Tsui, and V. Giguere. An everted repeat mediates retinoic acid induction of the gamma F- crystallin gene: evidence of a direct role for retinoids in lens development. *Genes Dev.* 7 (2):295-307, 1993.
- M. Tini, L. C. Tsui, and V. Giguere. Heterodimeric interaction of the retinoic acid and thyroid hormone receptors in transcriptional regulation on the gamma F-crystallin everted retinoic acid response element. *Mol.Endocrinol.* 8 (11):1494-1506, 1994.
- M. Tini, R. A. Fraser, and V. Giguere. Functional interactions between retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor (ROR alpha) and the retinoic acid receptors in the regulation of the gamma F-crystallin promoter. *J Biol.Chem.* 270 (34):20156-20161, 1995.
- S. I. Tomarev, O. Sundin, S. Banerjee-Basu, M. K. Duncan, J. M. Yang, and J. Piatigorsky. Chicken homeobox gene Prox 1 related to Drosophila prospero is expressed in the developing lens and retina. *Dev.Dyn.* 206 (4):354-367, 1996.
- S. I. Tomarev, R. D. Zinovieva, B. Chang, and N. L. Hawes. Characterization of the mouse Prox1 gene. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 248 (3):684-689, 1998.
- C. C. Ton, H. Hirvonen, H. Miwa, M. M. Weil, P. Monaghan, T. Jordan, Heyningen van, V, N. D. Hastie, H. Meijers-Heijboer, and M. Drechsler. Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox- containing gene from the aniridia region. *Cell* 67 (6):1059-1074, 1991.
- Ma Torii, F. Matsuzaki, N. Osumi, K. Kaibuchi, S. Nakamura, S. Casarosa, F. Guillemot, and M. Nakafuku. Transcription factors Mash-1 and Prox-1 delineate early steps in differentiation of

- neural stem cells in the developing central nervous system. *Development* 126 (3):443-456, 1999.
- J. Treisman, P. Gonczy, M. Vashishtha, E. Harris, and C. Desplan. A single amino acid can determine the DNA binding specificity of homeodomain proteins. *Cell* 59 (3):553-562, 1989.
- R. W. Van Leen, K. E. van Roozendaal, N. H. Lubsen, and J. G. Schoenmakers. Differential expression of crystallin genes during development of the rat eye lens. *Dev.Biol.* 120 (2):457-464, 1987.
- G. L. van Rens, J. M. Raats, H. P. Driessen, M. Oldenburg, J. T. Wijnen, P. M. Khan, W. W. de Jong, and H. Bloemendal. Structure of the bovine eye lens gamma s-crystallin gene (formerly beta s). *Gene* 78 (2):225-233, 1989.
- C. E. Voorter, W. A. Haard-Hoekman, E. S. Roersma, H. E. Meyer, H. Bloemendal, and W. W. de Jong. The in vivo phosphorylation sites of bovine alpha B-crystallin. *FEBS Lett.* 259 (1):50-52, 1989.
- D. E. Wallis, E. Roessler, U. Hehr, L. Nanni, T. Wiltshire, A. Richieri-Costa, G. Gillesen-Kaesbach, E. H. Zackai, J. Rommens, and M. Muenke. Mutations in the homeodomain of the human SIX3 gene cause holoprosencephaly. *Nat.Genet.* 22 (2):196-198, 1999.
- C. Walther and P. Gruss. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113 (4):1435-1449, 1991.
- H. E. White, H. P. Driessen, C. Slingsby, D. S. Moss, W. G. Turnell, and P. F. Lindley. The use of pseudosymmetry in the rotation function of gamma IVa- crystallin. *Acta Crystallogr.B* 44 ( Pt 2):172-178, 1988.
- H. E. White, H. P. Driessen, C. Slingsby, D. S. Moss, and P. F. Lindley. Packing interactions in the eye-lens. Structural analysis, internal symmetry and lattice interactions of bovine gamma IVa-crystallin. *J Mol.Biol.* 207 (1):217-235, 1989.
- J. T. Wigle, K. Chowdhury, P. Gruss, and G. Oliver. Prox1 function is crucial for mouse lens-fibre elongation. *Nat.Genet.* 21 (3):318-322, 1999<sup>o</sup>.
- J. T. Wigle and G. Oliver. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 98 (6):769-778, 1999<sup>o</sup>.
- C. C. Yu, L. C. Tsui, and M. L. Breitman. Homologous and heterologous enhancers modulate spatial expression but not cell-type specificity of the murine gamma F-crystallin promoter. *Development* 110 (1):131-139, 1990.
- R. D. Zinovieva, M. K. Duncan, T. R. Johnson, R. Torres, M. H. Polymeropoulos, and S. I. Tomarev. Structure and chromosomal localization of the human homeobox gene Prox 1. *Genomics* 35 (3):517-522, 1996.

**Abbildungsverzeichnis**

|   |     |
|---|-----|
| Abbildung 1.1: Linsenentwicklung der Vertebraten  | 1   |
| Abbildung 1.2: Schematische Darstellung eines anterior-posterioren Schnitts durch die adulte Augenlinse.                                    | 3   |
| Abbildung 1.3: Pitted-Flexiball-Modell zur Struktur des $\alpha$ -Kristallins   | 5   |
| Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Struktur der $\beta/\gamma$ -Kristalline.   | 6   |
| Abbildung 1.5: Übersicht der bekannten Elemente am $\gamma^F$ -Kristallinpromotor.  | 8   |
| Abbildung 1.6: Prox1-Expression in der Linse  | 12  |
| Abbildung 1.7: <i>Six3-Expression</i> in Linse.   | 14  |
| Abbildung 3.1: RNS-Präparation aus Linsenepithelzellen.   | 31  |
| Abbildung 3.2: Aufbau eines „Westernblots“  | 34  |
| Abbildung 3.3: Affinitätsbindung von Protein mit matrixgebundener DNS.  | 39  |
| Abbildung 3.4: Biolumineszenz-Reaktionen katalysiert durch die <i>Firefly</i> - und <i>Renilla</i> -Luziferasen.                            | 42  |
| Abbildung 4.1: Phylogenetischer Stammbaum der $\gamma$ -Kristallinpromotoren von Mensch, Maus und Ratte.                                    | 45  |
| Abbildung 4.2 (vorherige Seite): Vergleich der $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren der Nager.   | 48  |
| Abbildung 4.3: Endogene Expression des Hsp25 in der Augenlinse der Maus.  | 55  |
| Abbildung 4.4: Expression transient transfizierten $\alpha$ A-Kristallins in der N/N1003A-Zelllinie.  | 56  |
| Abbildung 4.5: Subzelluläre Lokalisation des $\alpha$ A-Kristallins und des HSP27 in N/N1003A-Zellen.                                       | 57  |
| Abbildung 4.6: Gel-Retardationsassay zum DOTIS.   | 58  |
| Abbildung 4.7: RT-PCR zur endogenen Expression von <i>PROX1/Prox1</i> in CD5A- und N/N1003A-Zellen.   | 63  |
| Abbildung 4.8: „Western blot“ Analyse zum PROX1/Prox1 in CD5A- und N/N1003A-Zellen.   | 64  |
| Abbildung 4.9: <i>In vitro</i> -Expression von PROX1 und Six3.  | 65  |
| Abbildung 4.10: <i>In vitro</i> -Expression von Six3.   | 68  |
| Abbildung 4.11: Affinitätsbindung und Präzipitation des Six3 mit DNS-Sequenzen.   | 69  |
| Abbildung 4.12: RT-PCR zur endogenen Expression von <i>Six3</i> in CD5A-Zellen und im Auge der embryonalen Maus.                            | 71  |
| Abbildung 5.1: Schematische Übersicht der $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren der Nager.  | 80  |
| Abbildung 5.2: Vergleich der Primärstrukturen von $\alpha$ A-Kristallin, HSP27 und Hsp17.9.   | 85  |
| Abbildung 5.3: Vergleich der Homeodomänen PROX1/Prox1 der Vertebraten und Prospero von <i>Drosophila</i> .                                  | 92  |
| Abbildung 5.4: „Western blot“ Analyse mit Prox1 Antikörper.   | 93  |
| Abbildung 5.5: $\gamma$ -Kristallinexpression in Prox1 <sup>-/-</sup> -Mäusen.  | 94  |
| Abbildung 5.6: Vergleich der Homeodomänen der Six-Proteinfamilie aus Maus   | 96  |
| Abbildung 5.7: Homologie von Six3 und Sine oculis.  | 97  |
| Abbildung 5.8: Photographie und Darstellung des Gehirns eines Patienten mit Holoprosenzephalie und einer Mutation im SIX3.                  | 98  |
| Abbildung 5.9: Modell zur SIX3 Homeodomäne.   | 98  |
| Abbildung 5.10: Expression der $\gamma$ DEF-Kristalline in der Augenlinse.  | 99  |
| Abbildung 5.11: Komplementäre Expression von Six3 und den $\gamma$ -Kristallinen.   | 100 |
| Abbildung 5.12: Regulationsmodell der $\gamma$ DEF-Kristallingene während der Linsenentwicklung.  | 103 |
| Abbildung 6.1 (Anhang): Detaillierte Ansicht des Phylogenetischen Stammbaums der $\gamma$ -Kristallinpromotoren von Mensch, Maus und Ratte. | 117 |

## Verzeichnis der Diagramme und Tabellen

|   |     |
|---|-----|
| Diagramm 4.1: Zeitabhängigkeit der (-226/+45) $\gamma$ F-Kristallinpromotoraktivität in der CD5A-Zelllinie.                                       | 49  |
| Diagramm 4.2: Zeitabhängigkeit der (-226/+45) $\gamma$ F-Kristallinpromotoraktivität in der N/N1003A-Zelllinie.                                   | 50  |
| Diagramm 4.3: $\gamma$ F-Kristallinpromotor bei variierender Menge an Transfektionkontrolle.  | 52  |
| Diagramm 4.4: Konzentrationsabhängigkeit der (-226/+45) $\gamma$ F-Kristallinpromotoraktivität in der CD5A-Zelllinie.                             | 53  |
| Diagramm 4.5: Konzentrationsabhängigkeit der (-226/+45) $\gamma$ F-Kristallinpromotoraktivität in der N/N1003A-Zelllinie.                         | 54  |
| Diagramm 4.6: Einfluss des $\alpha$ A-Kristallins und des HSP27 auf den (-226/+45) $\gamma$ F-Kristallinpromotor in N/N1003A-Zellen.              | 59  |
| Diagramm 4.7: Der Einfluss des $\alpha$ A-Kristallins, des HSP27 und des hsp17.9 auf den (-226/+45) $\gamma$ F-Kristallinpromotor in CD5A-Zellen. | 61  |
| Diagramm 4.8: Einfluss des $\alpha$ A-Kristallins und des HSP27 auf den (-226/+45) $\gamma$ F-Kristallinpromotor in N/N1003A-Zellen.              | 61  |
| Diagramm 4.9: Aktivierung des (-226/+45) $\gamma$ F-Kristallinpromotors durch PROX1.  | 66  |
| Diagramm 4.10: Effekt des PROX1 auf das Reporterplasmid ohne (-226/+46) $\gamma$ F-Kristallinpromotor.  | 66  |
| Diagramm 4.11: Repression des (-226/+45) $\gamma$ F-Kristallinpromotors durch Six3.   | 72  |
| Diagramm 4.12: Effekt des Six3 auf das Reporterplasmid ohne (-226/+46) $\gamma$ F-Kristallinpromotor.   | 72  |
| Diagramm 4.13: Der durch PROX1 vorstimulierte (-226/+45) $\gamma$ F-Kristallinpromotor wird durch Six3 reprimiert.                                | 74  |
|   |     |
| Tabelle 3.1: Agarosegele zur Auftrennung von DNS-Fragmenten unterschiedlicher Länge.  | 29  |
| Tabelle 3.2: Durchführung von Ligationen.   | 32  |
| Tabelle 3.3: Herstellung von Polyacrylamid-SDS-Gelen.   | 33  |
| Tabelle 3.4: Reaktionsansatz zur [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]ATP-Markierung von DNS.   | 36  |
| Tabelle 3.5: Markierung von DNS mit Biotin.   | 37  |
| Tabelle 3.6: Beispiel eines Transfektionsansatzes.  | 41  |
| Tabelle 3.7: Transfektionsansatz zur Überprüfung des dosisabhängigen Einflusses eines Effektors.  | 43  |
| Tabelle 5.1: Funktionelle Analyse des $\gamma$ E-Kristallinpromotors (Krausz, Dissertation, 1996).  | 87  |
| Tabelle 6.1 (Anhang): Analyse der Promotoren der $\gamma$ DEF-Kristallin-Subfamilie mit <i>MatInspector</i> .                                     | 119 |

6 Anhang

crygf mus (1) -----AACAGCATGTAACCGCATACACTCATCATGATCTCTAAAATAAACAAACCAGTAAGCCTTTAATTCAT

crygf rat (1) GGGAGTACTTAGAGAACAGTGGTTTGTACCCCTCCCTGTGCACACTCTGCAGTGAAGCTCAACGTTAAGGGTTGC

cryge mus (1) -----TGTTGAGGGCAGCGTCTTTACAGGTTGTGTGGTTCCAAATGTCT--CCTTACAGGTTGTTTGTAC

cryge rat (1) -----GTCTTTACAGGTTGTTTGAATCCAAATGTCT--CCTTACAGGTT----GTTAC

cryga rat (1) -----AAACCAACAGTTTGGTGAGGGAAAACACAGA

crygf mus (69) AGCTAAATA--ATGGCTACGGAGAACTATTTA--GAAACCCT----TACTAGAGATCTCCAAACTGAATTCAGCA

crygf rat (76) CATGACTT-----GGAACTGAGAA--AGAGAATATATTG-----GAGGTGCAAAATGGACAGAGGCCAGAGAC

cryge mus (67) CGTGCATTT--ATCGGCAGCTCGAACAACTGATGTTTTGCT---GCGAAGTCAATACAAGTAGAACTTACCA

cryge rat (50) CTTGCTTTT--ATTAGCAGCTCGAACAAACCGATGTCTTGTCT---GCAAAGTCAATGCAAATAGAACTTACCC

cryga rat (32) CAAGTCTGAGCACTGGTTTTAAGAACAAAAGGTAATCCTGGAAGAAGAGTGGTAACAGGAAGAATGGCTGTCTTC

crygb rat (1) -----TGTCAGTACTCATTTGTGAAAAGAATCATATTT

crygc rat (1) -----GTGTGTGTATGTGTGTTTATTAGCAAGGCTCTGCTGGCATCTATGAGACATTTGATTTTGATAA

crygd rat (1) -----TAGATGGCCGGCTTCTGGGCAGTTATCCCTTCTCTCA

crygf mus (136) TCCAGAACAGTCCACGAATCCGACAGACTTATCNCNTGGGCTTA---TCTCTTTGCCAACACTCTAGAGCTGT-GG

crygf rat (138) TACCAAAACAACCCACAGGTCACAACA--GTCCCATACTGTTT-----TCTGCCTGAAATGC-CACAATA-GC

cryge mus (136) GTGTAAGGAGGCTGTGAGTACCCTG--TGACCCAGGACTTAAATCTCTT-GCCTGCACT---GAGAGAG-GC

cryge rat (119) GTGTAAGGAGGCGTGAGTACCCTGT--GAACGCCAAGACTTAA-----GCCTGCGCT---GATTGAG-GC

cryga rat (107) TCCTAACAGTGTGAGATCTATTTAGACCAAGAAGAAA---TGTTTACCTTATCATCATCATATAT-AT

crygb rat (33) TCTTAAATAGCAAATAAATCAGCAGTCCCTGAAACTGTCACTTTACGTCAGCAGGCGGCCCCATGGTTCC

crygc rat (64) ACAAAATAGCTAAAAGTATTTTTAAAGTACCGTTAGTCAATTTGGGCCCAAGGACAGTCAAGTCTCAGCA-GC

crygd rat (37) CTGCAGCCATGACTCCTCTAGTCCGTTTCTCGGAGTGAAAGGCTCTGTTTATGCTGTCTTCCGAGTGAAGT

crygf mus (207) CTAGGGTTCTCTCCCATCCACAGGGATGATGGGGAT-----GACTCTGAAGTAGAGAGAAGAAACCT-CCTAG

crygf rat (202) ACAGTGTGGTTGGAGCACCCAGGGTGGTCAAGATGATGGGGGTGACTGTGGGGTAGGAGAGAGACCAGCCTAG

cryge mus (204) CTGGGGGAGAGCCCCAAGCAGATGGGTGTGGTCTCA-----CACTCTGAGGAACAGAACTGAGGTGT-CTAAC

cryge rat (180) GTGGAGAAGGAGGCCAAGCAGATGGCGTGGTCTCATCA--CACTCTGGGAACAGAACTTAGGTGT-CTAAA

cryga rat (178) ATATGCATATCGCATTAG

crygb rat (108) CACAACACTACATGTATAAGGCACACTGTCAAGGAACCCCTCA--CACTCCTCCACCCCCACTCCACCCACCCTC

crygc rat (138) CTCTGGGTGGCTGTAGGTTGTCTTTGTTCAAACAAATCACTTTGAATAACCTTGTCTGAGGGACTTATTAATG

crygd rat (112) GTCTCCAGATCCCCCTGGACCTGCACCTTGGGAATTGGTTTCCATTTATAACTTAAGTGTGATGAGGTTTT

crygf mus (275) GAGTCAGAGCCTAAACCACAGGACGAAGCGGTATTTGCTCCCTGAAACAGCAGAAAAGACATTTCTGCAATCTGA

crygf rat (277) GAGACAGAACCTAAACCCTGTACAAGCAGTCTTGTCTCCCTGAAACAGCAGAAAAGACATGCTGTAAACCCGA

cryge mus (272) T--TTAGCATTACTTAGTCCCGTTAGTTGTGTGGTCCCTAGCTGATCAGCACAAAAGC--TTATAAGAAAGCTC

cryge rat (251) T--TTAGCGTTCCCTCAGTCCCGTTAGTTCTCTGGTCTTAGCCGATCAGCATGGAGCTTATAAGAAAGGCTCTC

cryga rat (250) ATATATGCTTTTAAACCATTAACTTAAACATCACACATTTAAAATTCACTTACTGCTTTT--ATCTGCTGAATTC

crygb rat (181) CACGCTCCACCTCCCATGCCAAATCTTGGCGGTATGTACCCATTATCCGAAGTCTGAGAAAAGTTAGTGGTGGGT

crygc mus (1) -----CTGCAGAGGCTCAAATCTCACTCTTACATGGGAA

crygc rat (213) ACATGTTTATATCTAACAGCTGAATAGCAGGCTCTAGGCAGAGGCGTGGATCAGGTGAC--TCTGACACAGGAG

crygd rat (187) T--TTGTGTCTTTGGTGGATCAGGTTTTTCTCATTCTCAGACTTTCTCTTTGGTCTGCGATTAAGCACC

crygf mus (350) AATTTCAAATGTATCTG-----CATG-----GTGTTCTCATGTATCACAAAACCTCTGGTGGGG

crygf rat (352) GATTTCAAACGTATCTG-----CGCG-----TTGTTTACATGCATCAAGAAATCTCTGTAGGG

cryge mus (343) TTTTGTGTTGCTTTTT-----CAAG-----ATTTCTCCGTGTAAACAGTCTGCCTTTCTGGA

cryge rat (324) TTTTTCGTTGATTTTTTTTTTTTTTTTTCAGACAGG--ATTTCTCCGTGTAAACACTTGCCTTTCTGGA

cryga rat (324) TAATATAAATATATAATA-----GAAA-----TTTAAAATTTTAAAATCAAAGGAAGAAATAA

crygb mus (1) -----AAGCTTCC

crygb rat (256) GCTAGGAAAGTTTCTGTCTGGATCTGGGACGNCATCAGCAGAGNAAGATTTAAAAGTGGAGGAGCATAAGAA

crygc mus (35) GTATAGAGCCTTCCCTGGCCTTGGGAATGAAGCAAT-----TCATACATGTTTGTGAGTCTGGGCTCATGAA

crygc rat (286) GTATAC-GTCTTCCCTGGCCTTGGGAAGCAAGTAATCTACTTTTCTGATCTTTGACGGCTTTGGGCTTCAAC

crygd rat (259) TTAAGCTATTTTCCCTTTCAGATGCAGAACACACATTGCCAAAAGAGATGGTCTATTTGCTCCTGCTTCCA

crygf mus (404) TCCAGTTCANGNGCAA--ACTTGA-GATCCTGTTACATCAGAGTGTCTINGCAATTCACCTCTGTTGCCTA

crygf rat (406) TCTCAGCTTCAGGGAGCAA--AGCTGA-GCTCCTGTTGCATCAGAGCTTCTGGCAGTTACCTCTGTTGCCCC

cryge mus (397) ACTCATTTTGGAGACCAG--ACTGTC-ATGGCCTTGAACCTCACACAGATCTTCC--TTCCCTGCCTGTCT--

cryge rat (393) ACTCATTTTACAGACCAG--ATTGTC-CTGGCCTT-AACTCACACAGATCTTCC---C--CGGCCCTTCT--

cryga rat (382) AACGAAGGCCCTTATATAA--ACTTAC-CTACCATTCACTGATGACCAGGGTTGACATTTTAGTCTATACACAG

crygb mus (9) TTAGTGTAAAGTTTCACTTTTAAAAAATTTAAACTAGCTGCATATGTATCAGAAGA-TGNCCAGCCGCCAT

crygb rat (331) TAGCTGTTCTTTTCCCCAG--TCAGGGCCATAACAA--GGTCTTCACTGTCATTTGAACTCTGTTCTAGGTGCAA

crygc mus (104) CATAGGAATTTTTCCCAT--CTTAAACAAGCTATATAAACCAGAGGTGGATTTTACTCACAACTCTGTGAAAC

crygc rat (360) CATAGAAATTTTTTCTTTGTTCTTAACTCAAGCTGG-TTACCAGGGACGGATTTGACTCACGACTGTGAAAC

crygd rat (334) ACAAGTCTCAAGAAATAC-----TGAAGACTGTTTTGACTCATTGGGAATTTTCAAGTTTGGTTTGGTTT

crygf mus (475) --CCTCCCATTAATTATCTGATT-CTCATGCC-----ACTTGAAAA

crygf rat (477) CCCCCCATTAATTATCTGATT-CTCATGCC-----ACTTGAGCA

cryge mus (464) --CTGCCATTTAATCTCC-----CGCCTGCC-----TCTGTCTCCA

cryge rat (455) --CTGCCCTTAATCCCCACCCCGCCAGCC-----TCTGTCTCCA

cryga rat (453) GTCTAATCTTTTTATCTTAAA--CATGTGCA-----AGTTTCAAAA

crygb hum (1) -----

crygb mus (83) CAGTGAAAG--AGAGGCCATTGGTCTGTGCAACTTTAT-----ATGCCTCAGTACAGGGG

crygb rat (403) GGGTGGAGAAGAGACATCAAACTGCAGCTACAATTTTTCAGACCGTCCCCAGCAAACATTAATAATCATA

crygc mus (176) CACCAAGGAG-AAAGTACTGTTAGGCTCTAGA-----TCAAAATCCA

crygc rat (434) CACCAAGGTG-GAAGCTAGCTTAGGCTCTAGAGTATCAGCTCAACATAGCCTGGAAAAGCAAGATCCAATCTA

crygd rat (403) G-TCACAGAGAAAGTATGAAATT-CTATGAACTCCCTTCGTAAAATAATCCCAATTTCTTACGACTTTAATTTCTA

crygf mus (514) CAATT-AGGAGAAGGTACAACCATCCCTGCCTTCCATTCT-----TTCAGCAG-TACACCAGACTA-AAAG  
 crygf rat (518) CAATT-AGGCGAAGGTACAGCCATCCCTGCCTTCCATGAT-----TGCAGCAG-TTCAGCAGCCTA-AAAG  
 cryge mus (499) GAGTACAGGACAGAGGAGAACCCTTTTGACTCTCATCATC-----CTGTGGAGAAAGGTACACTCACCCC-TGTC  
 cryge rat (495) GAGTACAGGACAAAGGAGAACCCTATTGGACTTCCATCATC-----CTACGGAGAAAGTACATTCACTCC-GGTG  
 cryga rat (492) CATCAAACCCCCA--TACTACAGGTAAAGACATGCAACTGT-----CTTTCATTAGAGAAATTTGTTTA-TTTT  
 crygb mus (138) AACACCAGGGCCAAGAATCGGGAGTGGGTGGGTAGGGGAGTGGGGGAGGGTATGGGGGACTTTTGGGATAGCAA  
 crygb rat (478) GAATCTTGAATTT-GAACTAACTTTATGCTTTTCAGAATATTTCTCGATTAATCTCCCTGACTCTCTCTTA  
 crygc mus (217) GATTTGTGCCCTACACCAACCAGCAAAACCAGAAAAGAAG-----GGGGAAGGGGAATAGGGTTGCCTG-TCTC  
 crygc rat (508) GGTTTGTGTCCTGTACTGAACAAGCAAAACCCTGTAAGAAAAGCAGGGGGAAGAGGAATAAGATCGCCTGGTCTC  
 crygd rat (476) AAGAGGACTTGATCTCCAAGGGCTTGAATTTTACCATT-----CAGTTGAGTCTATTCTTTCTTATTAAAT

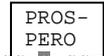
crygf mus (577) CCTCAATCTCCTTGGGTC---A-GCAG--ATCCCATCGTTATCATATACTGTTTATTCAA-----ATTCTCTT-  
 crygf rat (581) CCTCAAGCTCCATGGGTC---AGCAAG--ATCCCATCGTCATCATGCCTGTTTATTCAA-----AGTCTCTT-  
 cryge mus (568) GCCCATCTTCCACTTTT---T-CAAG--A-CTGTTAACTATATGTCATTGTTTGTCTATGGC---ATTGTTTCG  
 cryge rat (564) CCGCCA-CCACCACCTTT---T-CAGG--A-CTGTTAAATGGATTGCGTTATTGTGTATATACACATTTGTTT  
 cryga rat (559) TCTGCTGCTGCCCTTGG---TGCCCTG--AGTGCGGCTCTGGAACGCG-TGTAATTCTCAT---GAGCTCCCA  
 crygb mus (213) TGAAAATGTAATGAGGAAAATACCTATAAATTTTTTTTTTAAATTTAAACATGCATCAAATCCGAAGCAGCGA  
 crygb rat (552) CTCGAGATTCCTTACTGTTTAAAGTTTTCGCTTTAAAAAAAAGTTTAAAGCATAACACAAAATCCGAAGCAGCGT  
 crygc mus (286) TGTCGCACTACTCAGTGT---TTGCAGGAATCCAGCCTTCTCAACCCAGGGATTCTCTACAAATGCACAGA  
 crygc rat (583) TGTTGCCTAGTCTGCTGAGTATTCGAAGAATCCAGCATTTCTCAATCTGGGGTACTTCTACGAATGCAGCAGA  
 crygd rat (546) CATATTCAGAGTTGGGGCACCACGAGTAGCATAACAGATCTTACAGACA-ACTTACACTTACATTAAGACGTTAT

crygf mus (638) -----AGTGTGAGAATTA---TAAACCATTTAACTACAATGGTTGATAAATTAAGCAACTTTACTTAAATTTCA  
 crygf rat (643) -----AGTTTGGGAATTA---TAAACCATTTAACTACAAGGTTGACTAGTTAAGCATCTTTACTTAAATTTCA  
 cryge mus (633) -----AAACTGTAAAAGATAG-CTAAAACATTTTCGCTACAAATGTTAACGAGTTAAGCAACTTTTGTCTACATCA  
 cryge rat (630) -----AAACTGTCAAAGGGCGGCTAAAACATTTTCATTTACAGATGTTAACGAGTTAAGCAACTTTTGTCTACATCA  
 cryga rat (623) -----CAAACGGAGGGCCACCCTCCACTCAGCAGTTTCTATAGGCAACACTGCAAAACCGTTCGCTACATAATG  
 crygb mus (288) CAGTTGCTAAATCAGATTTCTCCAGAGAGTCAATTTGAGCCGAGTAACTATAAAATAAACGCACAGAATCAGA  
 crygb rat (627) CAGTTGCTAAATCAG-ATTTGCTTTGAGAAGTCCGTTAAGCCGAGTAACTATAAAGTAAACGCATAGAATTAGA  
 crygc mus (357) TCCCCCCCCCCCCCACCACCCACCCACCCAGATTTCACCAAGTATAATGGAATCAAATGTTAGGACATGGACT  
 crygc rat (658) -----TT-----CTCCAGATTTACCAAGTATAATGGAATCAAATGTTAGGACATGGACT  
 crygd rat (620) CTCTCCCCACTTAAACATTTATGTTTTGTCCACCTAACAAAGAAGATGTGGTCTGTCTGTGAAATGGCTGAA

crygf mus (703) ATTTCCCAGACAG----CATCATT---AAAGGCCAAGCTACATCAAGTGACCTTTTAAACNAGGTCAGTGAT  
 crygf rat (708) ATTTCCCAGATAG----CATCATT---AAAGCCCAGGCTGCATCAAGTGACCTTTTAAACNAGGTCAGTGAT  
 crygd mus (1) -----GGTCCGTGAT  
 cryge mus (702) GTTTTTCCGAAATC--ACTTCATT---AAAGGCTGGAGCCGCGTCAAGTGACCTCTTAGCCGGTTCAGTGAT  
 cryge rat (700) GTTTTTCCGAAATC--ACTTCATT---AAAGGCTGGAGCCGCGTCAAGTGACCTTTTAAACNAGGTCAGTGAT  
 cryga rat (693) CATTTCTAGAGCGC--TTCATAGGGTGAGAAGCGCCCTTTGCTCCTCAAGGTCATAATGGCTCTGCTGACTTGA  
 crygb mus (363) GCTTCGCTCATTCTTTTCAAACAAGAGCAAAGACTTTTCTCATTGATGGCAACAACAACAGCTTTAGTGAA  
 crygb rat (701) GCTTCGCTCATTCTTTTCAAACAAGAGCAAAGACTTTTCTCATTGATGGCAACAACAACAGCTTTAGTGAA  
 crygs mus (1) GGAACAAATGCACCAGACAAAATCTGGTTTTGAATTTTTTAAACGTTTGGCTGGGTTTTGGGTGCCCTGATTCA  
 crygc mus (432) GCAGGTCAAAGTTCAACTGATGTGCTGATAAATTTAAAAAACACTAAGAATCTGAATAAAGCAACACTGAGCA  
 crygc rat (710) TCAGGTCAAAGTTCAGCTGATGTGCTGATAAATTTAAAAAACGGTAAGAATCGGAATAAAGCAACCTGAGCA  
 crygd rat (695) TCCTGCTCCTATT----ATTAATAAACAATGTGCCAAATTACTTTGTTTCAAACAATCTCAATAGCATCAGCT



crygf mus (771) TTG---TATCCATTCCAAAGCTCTGGAG-AGTCTAAGATAAAACATACATAACCCACACCTCCCCCATAGTCA  
 crygf rat (776) TCG---TATCTATTCCAA-GCTCTGGAG--AGTCTAAGAAAACATACATAACCCACACCTCCCCACAGTCA  
 crygd mus (12) TCG---TATCCATTCCAAAGCTCTGGAG-AGTCTAAGGAAAAACATACATAACCCACACCTCCCCCATAGTCA  
 cryge mus (772) TCG---TATCCATTCCAAAGCTCTGGAG-AGTCTAAGAGAAAAACATACATAACCCACACCTCCCCCATAGTCA  
 cryge rat (770) TCG---TATCCATTCCAAAGCTCTGGAG-AG--TAAGAGAAAAACATACATAACCCACACCTCCCCACAGTCA  
 cryga mus (1) -----CTTCCCTGAGATAGTGAGGCA-ACCCGAAAATGCCAGAGAGACGAGAGCCCTTACCCCGTATCC  
 cryga rat (766) ATT---CTTTCTCTGAGCTAGTAAGGCAACTCGAAAATGCCAGAGAGATGAGAGCCCTTACCCCATGATCC  
 crygb mus (438) TT---AGAGCAACCCCAACCTACCAGAAAGAATGAGAGTAAACCATTCAGCCACCCCAATGAGCAGAGGGAGG  
 crygb rat (774) TT---AGAGCAACCCCAACCTACCAGAAAGAATGAGAGTAAACCATTCAGCCACTCAATGAGCAGAGGGAGG  
 crygs mus (76) GCAGAGCTACATGTCAGTAGGGCTGGCGAGCATTACAGGGGCCACAGAGCTCTCTTTATTTTATAATCCCAA  
 crygc mus (507) GC---TATCTA--GCACAGCGTTGGACACACCCAGAGACCAGGCGAATCTCAGTACCAGCCTACTGAATGCA  
 crygc rat (785) GCTAGCTATCCA--GGCAGCGTTGGACACACTAGAGACCAGGCGAATCTCAGTACCAGCCTACTGAATGCA  
 crygd rat (765) GGTG--ATTGCAACCCCAATACTCCACAGTGAATAGAACCAAAACCCCATGATCATCCGTGGTTATGACAGCA  
 Consensus (901) NNNNNNNCNCNANNNGNNNNNNNGGANNANNNNANNNNANNANANNNNANNNNNNCNCNNNNNNNNCNCN





| Name der Familie/Matrix<br>weitere Information                                      | Position             | Kern         | Matrix       | Sequenz                      |
|---|----------------------|--------------|--------------|------------------------------|
| V\$SORY/SOX5_01<br>Sox-5  | 660 - 669 (-)        | 0.819        | 0.875        | ntaaCANTgc                   |
| V\$IRFF/IRF1_01<br>interferon regulatory factor 1                                   | 752 - 764 (-)        | 1.000        | 0.882        | nnaaantGAAAtn                |
| V\$BARB/BARBIE_01<br>barbiturate-inducible element                                  | 779 - 793 (+)        | 1.000        | 0.881        | atttAAAGgcnaag               |
| V\$RPOA/DTYPEPEPA_B<br>polyA signal of D-type LTRs                                  | 779 - 788 (-)        | 0.750        | 0.816        | gCCTTtaat                    |
| V\$EBOX/USF_Q6<br>upstream stimulating factor                                       | 798 - 807 (-)        | 0.863        | 0.915        | gtCACTtgat                   |
| <b>V\$EBOR/NKX25_01</b><br><b>homeo domain factor</b><br><b>Nkx-2.5/Csx, tinman</b> | <b>799 - 805 (+)</b> | <b>1.000</b> | <b>1.000</b> | <b>tcAAGTg</b>               |
| V\$RORA/RORA1_01<br>RAR-related orphan receptor<br>alpha1                           | 812 - 824 (+)        | 1.000        | 0.948        | ttancaGGTCag                 |
| V\$GFII/GFII_01<br>growth factor independence 1                                     | 814 - 837 (-)        | 1.000        | 0.935        | ggatgacgAATCactgacctgnt      |
| <b>V\$PAX6/PAX6_01</b><br><b>Pax-6</b>  | <b>819 - 839 (-)</b> | <b>0.779</b> | <b>0.795</b> | <b>atggatgACGAatcactgacc</b> |
| V\$APIF/TCF11MAFG_01<br>TCF11/MafG heterodimers                                     | 819 - 840 (-)        | 1.000        | 0.826        | aatggaTGACgaatcactgacc       |
| V\$CREB/CREB_02<br>cAMP-responsive element binding<br>protein                       | 827 - 838 (-)        | 1.000        | 0.929        | tggaTGACgaat                 |
| <b>V\$CLOX/CDP_02</b><br><b>transcriptional repressor CDP</b>                       | <b>828 - 842 (+)</b> | <b>0.795</b> | <b>0.834</b> | <b>ttcgtcATCCattcg</b>       |
| V\$TCFF/TCF11_01<br>TCF11/KCR-F1/Nrf1 homodimers                                    | 831 - 843 (+)        | 1.000        | 0.985        | GTCAatccattcga               |
| <b>V\$CDCR/CDPCR3HD_01</b><br><b>cut-like homeodomain protein</b>                   | <b>831 - 840 (-)</b> | <b>0.929</b> | <b>0.935</b> | <b>aatgGATGac</b>            |
| V\$LDPS/LDSPOLYA_B<br>Lentiviral Poly A downstream<br>element                       | 859 - 874 (-)        | 0.843        | 0.902        | tgtATGTtttctctta             |
| V\$EVII/EVII_05<br>ectopic viral integration site 1<br>encoded                      | 863 - 873 (+)        | 0.750        | 0.805        | agaaaaCATAc                  |
| <b>V\$HNF1/HNF1_01</b><br><b>hepatic nuclear factor 1</b>                           | <b>866 - 880 (-)</b> | <b>1.000</b> | <b>0.807</b> | <b>gGTTAttgtatgttt</b>       |
| V\$SORY/SOX5_01<br>Sox-5  | 869 - 878 (+)        | 1.000        | 0.870        | cataCAATaa                   |
| V\$RREB/RREB1_01<br>Ras-responsive element binding<br>protein 1                     | 878 - 891 (+)        | 1.000        | 0.862        | aCCCAcacctcccc               |
| V\$TCFF/TCF11_01<br>TCF11/KCR-F1/Nrf1 homodimers                                    | 896 - 908 (+)        | 1.000        | 0.982        | GTCAattnatag                 |
| V\$EVII/EVII_02<br>ectopic viral integration site 1                                 |                      |              |              |                              |

|  |                |       |       |                       |
|--|----------------|-------|-------|-----------------------|
| encoded                                  | 907 - 917 (+)  | 1.000 | 0.851 | agaaAAGAgag           |
| V\$IRFF/IRF2_01                          |                |       |       |                       |
| interferon regulatory factor 2           | 908 - 920 (+)  | 0.750 | 0.839 | gaaaagaGAGAgn         |
| V\$MZF1/MZF1_01                          |                |       |       |                       |
| MZF1                                     | 936 - 943 (-)  | 1.000 | 0.980 | cggGGGGa              |
| V\$AP2F/AP2_Q6                           |                |       |       |                       |
| activator protein 2                      | 938 - 949 (+)  | 1.000 | 0.927 | ccCCCGcgggcc          |
| V\$GREF/GRE_C                            |                |       |       |                       |
| Glucocorticoid response element          | 946 - 961 (+)  | 0.856 | 0.819 | ggccccttTGTGctg       |
| V\$EGRF/EGR2_01                          |                |       |       |                       |
| Egr-2/Krox-20 early growth response gene | 965 - 976 (-)  | 1.000 | 0.837 | ctGCGTtggcag          |
| V\$TBPF/TATA_01                          |                |       |       |                       |
| cellular and viral TATA box elements     | 988 - 1002(+)  | 0.891 | 0.892 | ctaTATAnatagacc       |
| V\$MINI/MUSCLE_INI_B                     |                |       |       |                       |
| Muscle initiator                         | 1011 - 1031(+) | 0.921 | 0.879 | agccccacaCACTcaacagca |
| V\$CMYB/CMYB_01                          |                |       |       |                       |
| c-Myb                                    | 1020 - 1037(-) | 1.000 | 0.922 | ggatggtgctGTTGagtg    |

**Tabelle 6.1: Analyse der Promotoren der  $\gamma$ DEF-Kristallin-Subfamilie mit *MatInspector*.**

Zur Untersuchung der  $\gamma$ DEF-Kristallinpromotoren auf mögliche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren wurde ihre Konsensussequenz im Computerprogramm *MatInspector professional* eingesetzt. Die Trefferausschlussquote wurde mit 79 % Übereinstimmung zur Bindematrix des jeweiligen Transkriptionsfaktors festgelegt. Der Referenzpunkt der Bindestellenpositionen ist 1000 Nukleotide vor dem Startcodon. Fett markiert sind potentielle Homeodomänenbindestellen. Unterstrichen wurde Pax-6 als einziger linsentypischer Transkriptionsfaktor.

## Abkürzungen

|                    |   |                 |  |
|--------------------|---|-----------------|--|
| aa                 | Aminosäurereste                             | ISG             | Institut für Säugetiergenetik                        |
| AG                 | Arbeitsgruppe                               | IP TG           | Isopropyl- $\beta$ -D-thio-Galactopyranosid          |
| al                 | andere                                      | k               | Kilo   |
| AP                 | alkalische Phosphatase                      | kbp             | Kilobasenpaare                                       |
| APS                | Ammoniumpersulfat                           | l               | Liter  |
| ATP                | Adenosintriphosphat                         | LB              | Luria-Bertani  |
| BioDV              | Biologische Datenverarbeitung               | m               | Meter  |
| bp                 | Basenpaar                                   | M               | Mol  |
| Bq                 | Bequerel, Zerfall pro Sekunde               | MEM             | Minimum Essential Eagle Medium                       |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grad Celsius                                | min             | Minuten  |
| CMV                | Cytomegalovirus                             | n               | nano   |
| cpm                | Zerfälle pro Minute                         | NEI             | National Eye Institute                               |
| CTP                | Cytosintriphosphat                          | NIH             | National Institutes of Health                        |
| dATP               | Desoxyadenosintriphosphat                   | NTP             | Nucleosidtriphosphat                                 |
| dCTP               | Desoxycytosintriphosphat                    | OD              | optische Dichte                                      |
| DMEM               | Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium       | $^{32}\text{P}$ | Phosphorisotop                                       |
| DEPC               | Diethylpyrocarbonat                         | PAA             | Polyacrylamid  |
| dGTP               | Desoxyguanosintriphosphat                   | PBS             | salzhaltiger Phosphatpuffer                          |
| Da                 | Dalton                                      | PBS-T           | Tween-20 in PBS                                      |
| DNS                | Desoxyribonucleinsäure                      | PCR             | Polymerase-Kettenreaktion                            |
| DTT                | Dithioerythriol                             | PLB             | passive Lysispuffer                                  |
| dTTP               | Desoxythymidintriphosphat                   | RNA             | Ribonucleinsäure                                     |
| dNTP               | Desoxyribonucleosidtriphosphat              | RNase           | Restriktionsnuclease                                 |
| E                  | Tag der Embryonalentwicklung bei der Maus   | rpm             | Umdrehung pro Minute                                 |
| EDTA               | Ethylendiamintetraacetat                    | RSA             | Rinderserumalbumin                                   |
| g                  | Gramm                                       | RT              | reverse Transkription                                |
| GET                | Glucose-EDTA-Tris                           | s               | Sekunde  |
| GTP                | Guanosintriphosphat                         | $^{35}\text{S}$ | Schwefelisotop                                       |
| GRA                | Gel Retardationsassay                       | SDS             | Natriumdodecylphosphat                               |
| GSF                | Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit | TAE             | Tris-Acetat-EDTA-Puffer                              |
| HBS                | salzhaltiger HEPES-Puffer                   | TBE             | Tris-Borat-EDTA-Puffer                               |
| HMG                | Gruppe hoher Mobilität                      | TBS             | salzhaltiger Tris-Puffer                             |
| HSV-tk             | Herpes-Simplexvirus-Thymidinkinase          | TE              | Tris-EDTA  |
| ins                | Insertion                                   | Tris            | Tri(hydroxymethyl)-aminomethan                       |
|                    |   | U               | Einheit  |
|                    |   | UTP             | Uraciltriphosphat                                    |
|                    |   | UTR             | untranslatierter Bereich                             |
|                    |   | UV              | Ultraviolett   |
|                    |   | V               | Volt   |
|                    |   | X-Gal           | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galactosidase |

## Sonderzeichen

|          |       |
|----------|-------|
| $\alpha$ | alpha |
| $\beta$  | beta  |
| $\gamma$ | gamma |
| $\delta$ | delta |
| $\mu$    | mikro |
| $\zeta$  | zeta  |

## Abkürzungen häufig verwendeter Protein- und Gennamen

|               |  |
|---------------|--|
| $\alpha$ -Hsp | $\alpha$ -crystallin/small heat-shock proteins                   |
| Hsp25         | small heat-shock protein, <i>Mus musculus</i> (25 kDa)           |
| HSP27         | small heat-shock protein, <i>Homo sapiens</i> (27 kDa)           |
| hsp17.9       | small heat-shock protein, <i>Petroselinum crispum</i> (17,9 kDa) |
| Pax-6         | Paired related homeobox gene 6                                   |
| Prox1         | Prospero related homeobox gene 1                                 |
| sHsp          | small heat-shock protein   |
| Six3          | sine oculis related homeobox gene 3                              |
| Sox1          | Sry related HMG box gene 1                                       |