

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Chemie

Lehrstuhl für Biotechnologie

Untersuchungen zu den molekularen Determinanten der Kataraktentstehung und der Substratbindung von α B-Kristallin

Philipp Werner Norbert Schmid

Vollständiger Abdruck der, von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Matthias Feige

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Johannes Buchner
2. Prof. Dr. Bernd Reif
3. Prof. Dr. Tobias Madl

Die Dissertation wurde am 20.03.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 17.07.2019 angenommen.

1 Einleitung	1
1.1 Die morphologische Entwicklung der Augenlinse in Vertebraten.....	1
1.2 Die Proteinfamilien der Kristalline	2
1.2.1 Die α -Kristalline	5
1.2.2 Die β - und γ -Kristalline.....	7
1.3 Das derzeitige Modell zur Entstehung von Katarakt	9
1.4 Problemstellung	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide	13
2.1.2 Nährmedien	14
2.1.3 Enzyme, Protein- und DNA-Größenstandards	14
2.1.4 Synthese von Oligodesoxyribonukleotiden und Genen.....	15
2.1.5 Chemikalien.....	15
2.1.6 Verbrauchsmaterialien.....	18
2.1.7 Geräte und Chromatographiesäulen.....	19
2.1.8 Computerprogramme	22
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Elektrophoretische Methoden.....	23
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	27
2.2.3 Produktion und Reinigung rekombinanter Proteine.....	30
2.2.4 Inkorporation von pCNF in humanes α B-Kristallin	36
2.2.5 Kovalente Modifikation von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen	37
2.2.6 Herstellung von RCM- α -Lactalbumin.....	38
2.2.7 Spektroskopische Methoden	38
2.2.8 Quartärstruktur Analyse.....	43
3 Ergebnisse und Diskussion	46
3.1 Untersuchungen zur Entstehung von Katarakt.....	46

3.1.1 Biochemische Charakterisierung des Proteoms von Wildtyp-Mäusen	47
3.1.2 Die <i>in vitro</i> Eigenschaften von Katarakt-assoziierten Kristallinvarianten	56
3.1.3 Biochemische Charakterisierung des Proteoms von Kataraktmutanten	66
3.1.4 Kleinwinkel-Röntgenstreuung von murinen Linsen und Linsenextrakten.....	77
3.2 Inkorporation von pCNF in humanes α B-Kristallin als FRET-Sonde.....	79
3.2.1 Die unnatürliche Aminosäure pCNF als Grundlage eines Tripel-FRET-Systems.....	79
3.2.2 Einbau von pCNF in humanes α B-Kristallin durch <i>Genetic Code Expansion</i>	81
3.2.3 Biochemische Charakterisierung von α B-pCNF	83
3.2.4 Bindung von Proteinsubstraten an α B-pCNF	86
4 Zusammenfassende Diskussion	93
4.1 Molekulare Determinanten der Kataraktentstehung.....	93
4.1.1 Das Proteom in der Augenlinse von Wildtyp-Mäusen ändert sich mit dem Alter	93
4.1.2 Katarakt-assoziierte Kristallinvarianten sind thermodynamisch destabilisiert	94
4.1.3 Das Proteom in der Augenlinse von Kataraktmäusen zeigt eine signifikant höhere Plastizität im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen	97
4.2 Die thermodynamische Destabilisierung und Aggregation von mutierten Kristallinen ist nicht der Grund für erblichen Katarakt	98
4.3 Die Dynamik der Substratbindung von α B-Kristallin	102
4.3.1 Die unnatürliche Aminosäure pCNF dient als positionsspezifische FRET-Sonde in α B-Kristallin	102
4.3.2 Anwendbarkeit des Systems zur Untersuchung der Substratbindung von α B-Kristallin mit verschiedenen permanent entfalteten Substraten.....	104
5 Zusammenfassung	106
6 Summary	109
7 Abkürzungsverzeichnis.....	112
8 Literaturverzeichnis	115
9 Publikationsliste.....	127
10 Anhang	128

10.1 Anhang - Tabellen.....	128
10.2 Anhang - Abbildungen	134
11 Danksagung	140
12 Eidesstattliche Erklärung	141

1 Einleitung

Das humane Auge ist auf makro- und mikroskopischer Ebene eines der am besten untersuchten und in seiner Funktionsweise verstandenen Organe. Es ist das zentrale Sinnesorgan, welches uns eine aktive Interaktion mit unserer Umwelt ermöglicht. Von uns umgebenden Objekten reflektiertes Licht wird durch das Zusammenspiel aus Augenhornhaut (lat. *Cornea*) und -linse (lat. *Lens*) auf einen Punkt der Netzhaut (lat. *Retina*) fokussiert. Im Bereich des „gelben Flecks“ (dt. Makula, lat. *macula lutea*), dem des schärfsten Sehens, wird die optische Information durch Photorezeptoren in chemische Signale umgewandelt und durch das Hirn verarbeitet um ein Bild unserer Umgebung zu erzeugen. So leistungsfähig und komplex das Auge von Wirbeltieren auch ist, so anfällig ist es für umwelt- oder alterungsbedingte Schäden. Eine der häufigsten Augenerkrankungen ist der „graue Star“ (lat. *cataract*, dt. Katarakt). Der Katarakt ist die Trübung der Augenlinse und gilt weltweit als häufigste Ursache für eine Erblindung (1). Die erste schriftliche Erwähnung des Wortes Katarakt findet sich in einem um 1160 n. Chr. in Toledo oder Sevilla entstandenen „Augenbüchlein“ und wird als „vom Hirn herabgetropfte“ Substanz bezeichnet (2). Es gibt aber auch Hinweise, dass die erste Behandlung von Katarakt durch einen Chirurgen namens Sushruta bereits 600 v. Chr. in Indien stattfand (3). Seit Ende des 19. Jahrhunderts sind das Auge und die es aufbauenden Komponenten Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Forschung (4). Neben dem tiefgreifenden histologischen Verständnis, welche Zelltypen am Aufbau der Augenlinse beteiligt sind, existiert heute ein fundiertes Wissen über die in der Augenlinse vorkommenden Proteine (5). Dennoch sind die genauen molekularen Vorgänge auf Proteinebene bei der Entstehung von Katarakt bislang noch unvollständig verstanden. Der folgende Abschnitt soll eine kurze Zusammenfassung über die Entstehung des Kataraktes geben, mit einem Fokus auf möglichen molekularen Ursachen, die nach heutigem Wissenstand die Kataraktgenese bedingen könnten.

1.1 Die morphologische Entwicklung der Augenlinse in Vertebraten

Neben der Hornhaut ist die Augenlinse zentraler Bestandteil des dioptrischen (lichtbrechenden) Apparates. Die Augenlinse entwickelt sich während der Embryogenese aus einer Abschnürung des Oberflächenektoderms, dem Linsenbläschen. Während der folgenden embryonalen Entwicklung verlängern sich die Zellen an der Hinterwand des Linsenbläschens und werden zu primären Linsenfasern, die das Lumen des Linsenbläschens ausfüllen. An dem so entstandenen Linsenkern werden ausgehend von den Epithelzellen der Äquatorialzone kontinuierliche neue, sogenannte sekundäre Linsenfasern angelagert. Am Ende des Wachstums und der Zelldifferenzierung besteht die Augenlinse in Wirbeltieren aus hauptsächlich zwei Zelltypen, die vom Oberflächenektoderm abstammen: den Epithelzellen und den Linsenfasern (primäre und sekundäre). Während die Bildung sekundärer Faserzellen aus der Wachstumszone des vorderen Linsenepithels ein Leben lang anhält, sind die Zellen des zentralen Linsenkerns so alt wie der Organismus selbst. Durch die ständige

Neubildung von sekundären Linsenfaserzellen während des Wachstums, kommt es zu einem schichtartigen Aufbau der Linse, der an die Jahresringe von Bäumen erinnert (6). Die Faserzellen im Kern bilden die älteste Schicht, die aufgelagerten, äußeren sekundären Linsenfaserzellen die Jüngste (7). Zur Vermeidung von Streulichteffekten werden die Organellen (v.a. Zellkerne und Mitochondrien) von Linsenfaserzellen während der Differenzierung aus Epithelzellen abgebaut. Derzeit werden verschiedene, redundante Wege diskutiert, die den Abbau von allen zytoplasmatischen Organellen, wie etwa dem Zellkern, Golgi-Apparat und endoplasmatischen Retikulum, sowie den Mitochondrien ermöglichen. Darunter fallen u.a. autophagische, mitophagische und nukleophagische Prozesse (8,9). Die Versorgung der Zellen im Inneren der Linse mit Stoffwechselprodukten geschieht über plasmatische Zell-Zellverbindungen (*gap junctions*) aus den vorderen Epithelzellen (10). Störungen in diesem Abbauprozess können die funktionale Integrität der Augenlinse beeinträchtigen und zu Katarakt führen.

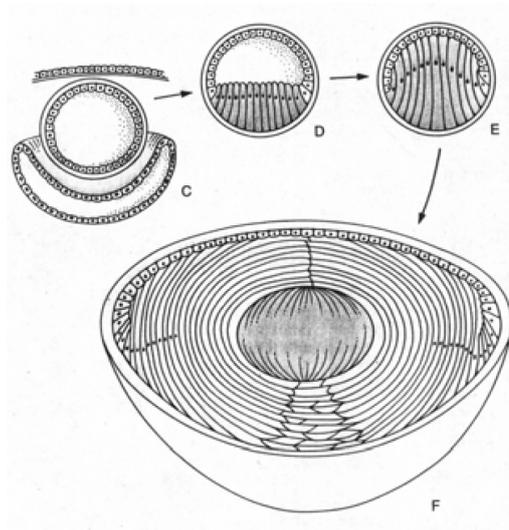


Abbildung 1: Verkürzte Darstellung struktureller Schlüsselereignisse während der Entwicklung der Augenlinse in Vertebraten. Das Linsenbläschen entsteht durch eine Abschnürung aus dem Oberflächenektoderm (C). Die vom hinteren (posterioren) Linsenepithel in das Lumen hineinwachsende primäre Linsenfaser (D) bilden den Linsenkern (E). Durch Anlagerung von sekundären Linsenfaserzellen aus der Wachstumszone des vorderen (anterioren) Linsenepithels setzt sich das Linsenwachstum in Schichten fort (F). Während der Ausdifferenzierung der Linsenfaserzellen werden alle zytoplasmatischen Organellen schrittweise entfernt. Zellkerne sind als schwarze Punkte dargestellt. (Verkürzt nach Jaffe und Horwitz (11), mit freundlicher Genehmigung von Elsevier, Amsterdam, NLD)

1.2 Die Proteinfamilien der Kristalline

Neben den histologischen und zellbiologischen Besonderheiten der Augenlinse, ist diese auch in ihrer Proteinkonzentration und -zusammensetzung in den Linsenfaserzellen einzigartig. Während eine Zelle gewöhnlich einen Wasseranteil von etwa 95 % besitzt, ist dieser in den Faserzellen der Augenlinse auf etwa 65-70 % reduziert (12). Die daraus resultierende Steigerung des Proteingehalts auf 35-30 % bedingt eine sehr hohe Proteinkonzentration von bis zu 450 mg/ml (13). Von den Proteinen in der Augenlinse wiederum machen die Kristalline etwa 90 % der Gesamtheit aus (14,15). Die Kristalline

wurden erstmals 1893 von Mörner beschrieben (4) und wurden im Laufe der weiteren Forschung in drei Gruppen, die α -, β - und γ -Kristalline unterteilt. Diese gehören zu zwei Proteinsuperfamilien: den kleinen Hitzeschockproteinen (sHsp) und den β/γ -Kristallinen, die vermutlich aus einem frühen gemeinsamen Vorfahren entstanden sind (16). In der Augenlinse von Mäusen kommen insgesamt 18 verschiedene Proteinisoformen aus der Familie der α , β , und γ -Kristalline vor. Diese unterteilen sich in drei α -Kristalline, sieben β -Kristalline und 8 γ -Kristalline (siehe Abbildung 2). Zusammengefasst in die Proteinfamilien, machen die α -Kristalline 15-25 %, die β -Kristalline 25-32 % und γ -Kristalline 43-60 % des Gesamtkristallingehalts in der Augenlinse von Nagern aus. Allerdings ändern sich die relativen Anteile der Kristalline zu einander mit dem Alter, was eine gewisse Plastizität des murinen Augenlinsenproteoms verdeutlicht (17,18).

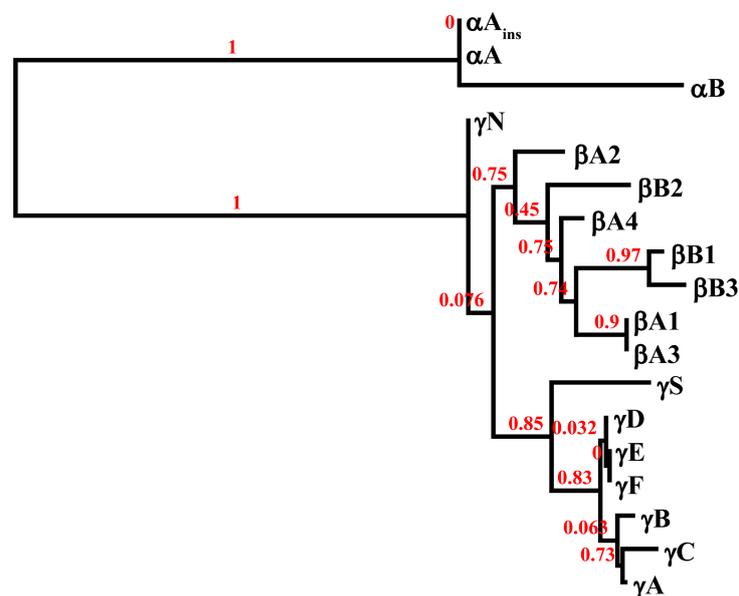


Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum der Kristalline in der Augenlinse von Mäusen. Die murine Augenlinse enthält insgesamt 18 Kristallinisoformen, diese unterteilen sich in drei α -Kristalline, 7 β -Kristalline und 8 γ -Kristalline. Die phylogenetische Auftragung zeigt die enge Verwandtschaft der β/γ -Kristalline. Die zur Familie der kleinen Hitzeschockproteine (sHsp) gehörenden α -Kristalline stehen in vermutlich entfernter Verwandtschaft zu den β/γ -Kristallinen. Der Stammbaum wurde anhand der annotierten PBD-Primärsequenz der in der murinen Augenlinse vorkommenden Kristallinisoformen mit der „One Click“ Einstellung des Programms *Phylogeny.fr* erstellt (19).

Gemeinsamkeit aller Kristalline ist eine ähnliche Primärstruktur, die eine molekulare Masse von etwa 20-28 kDa ergibt. Hinsichtlich der höheren Strukturebenen treten jedoch signifikante Unterschiede auf, auch innerhalb der eng verwandten β - und γ -Kristallinisoformen (Abbildung 3). Während die γ -Kristalline sowohl in Lösung als auch in Proteinkristallen ausschließlich als Monomere vorkommen, bilden die β -Kristalline di- und tetramere Strukturen (20,21). Dabei sind Homo- und Heterooligomere möglich (22). Die α -Kristalline assemblieren ebenfalls in Homo- und Heteromeren, allerdings in deutlich höher geordneten Strukturen von 12 bis 48 Untereinheiten (23,24). Die in der murinen Augenlinse vorkommenden Heterooligomere aus αA , αA_{ims} und αB werden zusammengefasst als αL -Kristallin bezeichnet.

In Tabelle 1 ist eine kurze Übersicht über Schlüsselpublikationen zu den Kristallinen gezeigt. Die zwei Superfamilien (sHsps und β/γ -Kristalline) sind unter 1.2.1 und 1.2.2 genauer beschrieben.

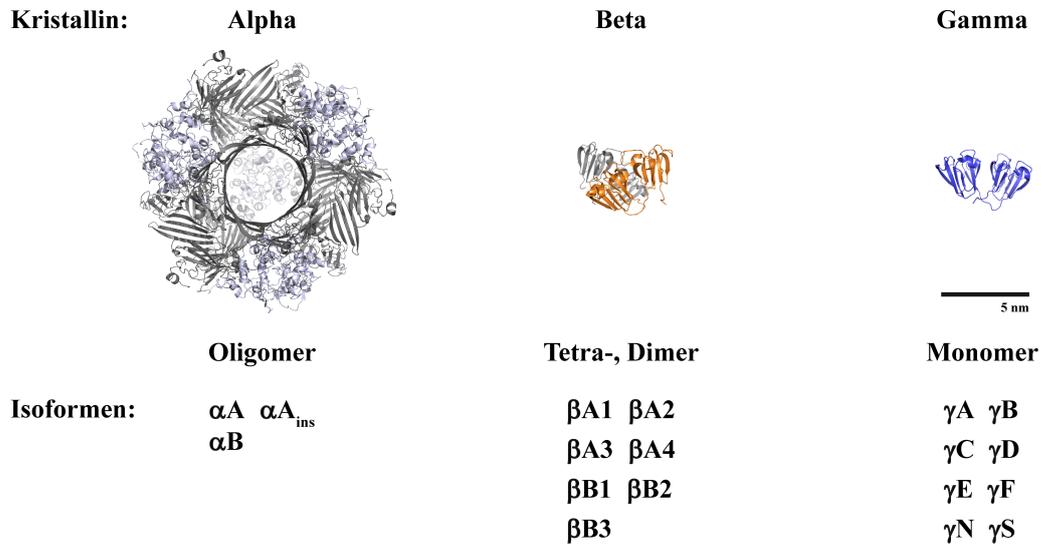


Abbildung 3: Übersicht über die drei wichtigsten Proteinklassen in der murinen Augenlinse. Die Proteine werden zwei Superfamilien zugeordnet - den kleinen Hitzeschockproteinen (α -Kristalline) und den β/γ -Kristallinen. Die drei Proteinklassen sind hauptsächlich für die physikochemischen Eigenschaften der Linse verantwortlich. Die α -Kristalline bilden in Lösung Heterooligomere mit einer breiten Verteilung der Komplexgröße. β -Kristalline kommen als Homo- und Heterotetra- bzw. -dimere vor, während γ -Kristalline immer im monomeren Zustand vorliegen. Neben der apparenten Quartär- bzw. Tertiärstruktur unterscheiden sich die Proteinklassen auch in der Anzahl der Isoformen (α -Kristalline: 3 Isoformen, β -Kristalline: 7 Isoformen und γ -Kristalline: 8 Isoformen). Die Abbildung wurde mit PyMol auf Grundlage der jeweiligen PDB-Struktur erstellt. Als repräsentatives α -Kristallin wurde die Struktur von humanem αB -Kristallin (hellgrau, grau; PDB-ID 2YGD) gewählt, da bislang keine hochaufgelöste Struktur von αL -Kristallin (der in der Linse vorkommenden Mischung aus αA , αA_{ins} und αB) bekannt ist. Die N-terminale Region des 24-mers ist in weiß dargestellt und wichtig für die Ausbildung von höhergeordneten Strukturen. Aus der Klasse der β -Kristalline ist humanes $\beta B1$ -Kristallin (Dimer: orange, grau; PDB-ID 1OKI) und murines γC -Kristallin (blau, PDB-ID: 2V2U) gezeigt. Die Maßstabsskala (5 nm) wurde mit der *Distance*-Funktion von PyMol ermittelt.

Tabelle 1: Ausgewählte Schlüsselpublikationen zu den Kristallinen.

α -Kristalline

Spector <i>et al.</i> , 1971	Der Anteil an α -Kristallin nimmt altersabhängig in der HMW-Fraktion zu	(25)
Horwitz, 1992	α -Kristalline agieren als molekulare Chaperone	(26)
Tardieu, 1998	Die Quartärstruktur von α -Kristallin ist wichtig für die Linsentransparenz	(27)
Horwitz <i>et al.</i> , 1999	Das Verhältnis 3:1 von αA -: αB -Kristallin ist am thermodynamisch stabilsten	(28)
Braun <i>et al.</i> , 2009	Pseudoatomare Struktur des volllängen αB -Kristallin 24-mers	(23)
Makley <i>et al.</i> , 2015	Die konformationelle Stabilität von α -Kristallin wird durch Sterole beeinflusst	(29)

β/γ -Kristalline

Delaye <i>et al.</i> , 1983	Die kurzreichweitige Anordnung von Kristallinen bedingt die Transparenz der Linse	(30)
-----------------------------	---	------

Leveille <i>et al.</i> , 1984	Kalorienreduktion reduziert den altersbedingten Abbau von γ -Kristallinen	(31)
Rudolph <i>et al.</i> , 1990	Die Domänenfaltung ist der ratenlimitierende Schritt bei Faltung von γ II-Kristallin	(32)
Tardieu <i>et al.</i> , 1992	Interaktionen zwischen β -Kristallinen sind anziehend, abstoßend zwischen γ -Kristallinen	(33)
Trinkl <i>et al.</i> , 1994	Die Domänen-verbindende Region ist wichtig für die Dimerisierung von β B2-Kristallin	(34)
Norledge <i>et al.</i> , 1996	Das β/γ -Zweidomänenprotein ist vermutlich durch die Evolution einer hydrophoben Interaktionsfläche aus zwei Eindomänenproteinen entstanden.	(35)
Takemoto <i>et al.</i> , 2006	Die Interaktion zwischen γ - und α -Kristallinen nimmt im Alter ab	(36)
Das <i>et al.</i> , 2011	Katarakt-assoziierte γ -Kristalline aggregieren durch Domäntausch	(37)
Cai <i>et al.</i> , 2017	S-Kristallin bildet einen Brechungsindexgradienten durch unterschiedliche molekulare Anordnung je nach Position in der Linse	(38)

1.2.1 Die α -Kristalline

Die α -Kristalline gehören zur Proteinsuperfamilie der kleinen Hitzeschockproteine und können die Aggregation von Proteinen unterdrücken (39). Bei den α -Kristallinen geht der Ursprung vermutlich noch weiter als bei den β/γ -Kristallinen auf einen gemeinsamen Verwandten von Pro- und Eukaryoten zurück (40). Ihre Chaperoneigenschaften wurden erstmals 1992 von Joseph Horwitz beschrieben (26). So konnte aus Rinderlinsen gewonnenes α L-Kristallin die thermisch-induzierte Aggregation von Alkoholdehydrogenase und wichtiger, die der Kristalline in der β - und γ -Fraktion aus bovinen Linsenextrakten unterdrücken. Seitdem wird die Funktion der α -Kristalline als Schutz vor Proteinaggregation und auch anderen zytotoxischen Vorgängen diskutiert (41-43). In der Augenlinse von Vertebraten kommen hauptsächlich zwei α -Kristallinisformen vor: α A und α B-Kristallin. Die α -Kristalline besitzen eine molekulare Masse von etwa 20 kDa. Trotz der geringen molekularen Masse des Monomers, liegen die α -Kristalline in Lösung als höhergeordnete Oligomere von bis zu 970 kDa Größe vor. So bildet humanes Wildtyp- α A- und - α B-Kristallin 12- bis 48-mere aus. Für α B-wt ist das 24-mer das am stärksten populierte Homooligomer, für reduziertes α A-wt das 20-mer (23) (unveröffentlichte Daten, Dr. rer. nat. Carsten Peters, Professur für Elektronenmikroskopie, Technische Universität München, DEU). In der Linse hingegen kommen die beiden α -Kristalline als Heterooligomere vor. Die Komplexgröße von bovinem α L-Kristallin, einer Mischung aus α A- und α B-Kristallin, liegt hier jedoch bei einem circa 40-mer (44). Das natürlich vorkommende Verhältnis von α A-: α B-Kristallin beträgt dabei 3:1 (28). Dieses Verhältnis der α -Kristalline ist das thermodynamisch stabilste und wird als optimal angesehen um die Chaperonfunktion in der Linse zu

erfüllen (45). Während die Transkription des α A-Kristallin-Gens nur in der Augenlinse stattfindet, wird das Gen für α B-Kristallin auch in anderen Geweben, wie etwa dem Herz, der Lunge dem Gehirn transkribiert (46). Eine Besonderheit bei Mäusen ist das Vorliegen einer dritten Isoform (α A_{ins}-Kristallin). α A_{ins}-Kristallin wurde 1983 von King und Piatigrosky beschrieben und trägt eine 22 Aminosäuren lange Insertion zwischen Aminosäure 63 und 64 von α A-Kristallin (47). Trotz der um 2 kDa variierenden molekularen Masse zeigen alle drei Isoformen einen für sHsp typischen dreiteiligen Aufbau. Dieser besteht aus einer weitestgehend unstrukturierten N-terminalen Region (NTR), gefolgt von der charakteristischen α -Kristallindomäne (AKD) und C-terminalen Region mit einem I-X-I/V-Tripeptidmotiv (Abbildung 4) (48).

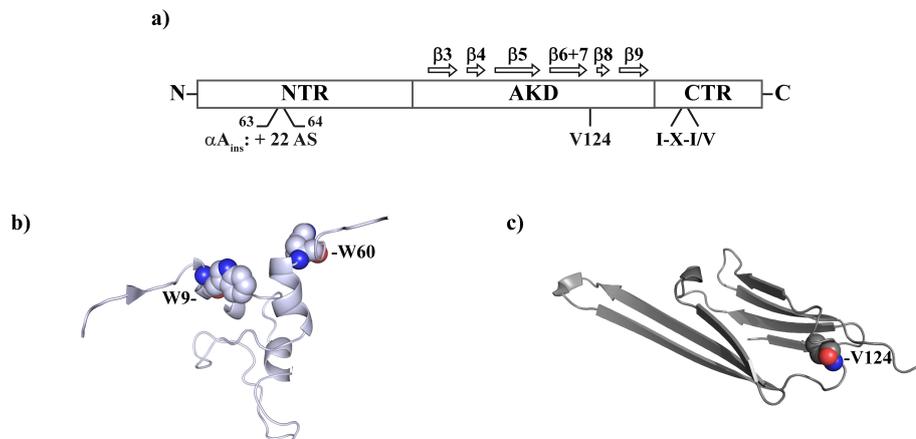


Abbildung 4: Schematischer Aufbau von α -Kristallinen. Der für sHsp typische dreigeteilte Aufbau setzt sich zusammen aus einer größtenteils unstrukturierten N-terminalen Region (NTR), einer β -Faltblattreichen α -Kristallindomäne (AKD) und ebenfalls sehr flexiblen C-Terminalen Region (CTR) (a). Während die NTR vor allem an der Ausbildung von höhermolekularen Strukturen beteiligt ist, liegt die isolierte AKD als Dimer vor. Die CTR dient als eine Art molekularer Anker für Kontakte zwischen zwei AKD Dimeren. Hier bindet das I-X-I/V-Tripeptidmotiv (α A: I-P-V, α B: I-P-I) in eine hydrophobe Furche, die vom β 4- und β 8-Falltblatt des benachbarten Dimers gebildet wird. Eine Besonderheit in Mäusen ist das Vorliegen einer dritten Isoform: α A_{ins}, die eine 22 Aminosäure lange Insertion zwischen den Positionen 63 und 64 trägt. Die Struktur der flexiblen NTR von α -Kristallinen konnte bisher nur durch molekulare Modellierung untersucht werden (b). Für das unter 3.2 vorgestellte FRET-System wurden die zwei natürlich in der sehr flexiblen NTR von humanem α B-Kristallin (hellgrau, UniProt-ID: P02511-1) vorkommenden Trp an Position 9 und 60 mutiert. Diese sind als Kalottenmodell gezeigt. In Teilabbildung b) ist die Kristallstruktur der AKD von α A-Kristallin aus Rind gezeigt (grau, PDB-ID: 3L1F) und das Valin 124 als Kalottenmodell dargestellt. Die Sequenz von bovinem (UniProt-ID: P02470-1) und murinem (UniProt-ID: P24622-2) α A-Kristallin ist zu 96 % identisch und zu 98 % ähnlich. Die Mutation V124E ist mit dominantem, erblichem Katarakt in Mäusen assoziiert. Die Identität und Ähnlichkeit wurde mit dem Programm EMBOSS Needle mit der Einstellung für Proteinsequenzen bestimmt.

Die etwa 70-90 Aminosäuren lange NTR ist dabei maßgeblich an der Ausbildung von oligomeren Strukturen beteiligt. Eine Besonderheit der NTR ist die relativ hohe Hydrophobizität und konformationelle Flexibilität (23). Wird die NTR getrennt in *E. coli* produziert, so findet sich das Polypeptid in der wasserunlöslichen Fraktion, bildet aber nach Rückfaltung hochmolekulare Multimere (49). Auch konnte die Struktur der NTR bislang noch nicht eindeutig bestimmt werden, sondern nur näherungsweise durch molekulare Modellierung dargestellt werden (23). Die AKD ist der am stärksten strukturierte Teil der sHsp. Sie besteht aus insgesamt 7 (β 3 bis β 9), teilweise in einander

übergehenden, β -Faltblattsträngen und nimmt eine Immunoglobulin-ähnliche β -sandwich-Faltung ein (50). Die zwei antiparallel angeordneten Schichten aus drei ($\beta 3$ - $\beta 9$ - $\beta 8$) und vier ($\beta 4$ - $\beta 5$ - $\beta 6$ - $\beta 7$) β -Faltblattsträngen bilden eine kompakte Struktur aus und sind durch kurze Schleifenstrukturen innerhalb der Domäne verbunden. Wird die AKD von αA - oder αB -Kristallin getrennt produziert, kommt diese als Dimer vor und kann nicht zu höhergeordneten Strukturen assemblieren (51-53). Die CTR enthält ein hochgradig zwischen den Spezies konserviertes I-X-I/V Tripeptidmotiv und vermittelt den Kontakt zwischen zwei Dimeren. Dazu bindet das Motiv in eine vom $\beta 4$ - und $\beta 8$ -Faltblatt des benachbarten Dimers gebildete, hydrophobe Furche und bildet eine Art molekularen Anker. Allerdings ist dieser nicht als starr, sondern hochgradig flexibel anzusehen, da dieser zwischen gebundenem und frei beweglichem Zustand fluktuiert und somit eine Rolle bei der allosterischen Regulation der α -Kristalline spielen könnte (54,55). Neben der Aufklärung der Struktur dieser sehr polydispersen, oligomeren Proteine war die Beschreibung der dynamischen Prozesse beim Austausch von Untereinheiten zwischen Homo- und Heteroligomeren und der mechanistischen Funktionsweise auf molekularer Ebene eine der größten Herausforderungen. Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass α -Kristallinmonomere zwischen den großen, wenig chaperonaktiven Oligomeren austauschen und diese auf einen Stimulus hin aktiviert werden. Dabei zerfallen die hochmolekularen Spezies zu kleineren chaperonaktiven Strukturen (56,57). Als Bindefläche für Substrate werden sowohl die NTR als auch AKD diskutiert. Während das amorph aggregierende Modellsubstrat Lysozym an die sehr flexible NTR von humanem αB -Kristallin bindet, interagiert das fibrillenformende $A\beta_{1-40}$ -Peptid vor allem mit dem $\beta 3$ -, $\beta 4$ - und $\beta 8$ -Faltblattstrang der zentralen AKD (58). Diese Modularisierung von Bindeflächen ermöglicht es den sHsp vermutlich ein breites Spektrum an strukturell unterschiedlichen Substraten abzudecken. Die dabei gebildeten sHsp-Substratkomplexe sind 12 nm bis 40 nm groß und sehr stabil, allerdings sind die mikroskopischen Ratenkonstanten der Substratbindung noch unbekannt (59-62).

Zwar können kleine Hitzeschockproteine die Aggregation von Proteinen verhindern, besitzen aber keine Rückfaltungsaktivität und werden daher auch als *Holdasen* bezeichnet (63). Für die Rückfaltung von Substraten sind sie daher auf eine Kooperation mit ATP-abhängigen Chaperonsystemen, den *Foldasen*, wie dem Hsp70/40-System angewiesen (64,65).

1.2.2 Die β - und γ -Kristalline

Die Mitglieder der Superfamilie der β/γ -Kristalline sind evolutionär nah verwandt und gelten als die wichtigsten Strukturproteine, die die lichtbrechenden Eigenschaften der Linse bedingen (14,66,67). Es gibt Hinweise auf einen Ursprung aus Chordaten. Für *Ciona intestinalis* ist ein Einzeldomänen- β/γ -Kristallin beschrieben. Der Unterstamm der Manteltiere (lat. *Tunicaten*) hat sich vor der Entwicklung des Auges in Vertebraten abgespalten. Dennoch trägt er ein Gen, das in seinem Aufbau dem von Vertebraten teilweise identisch ist und für ein Protein, mit dem charakteristischen, sogenannten

griechischen Schlüsselmotiv (engl. *Greek key motif*, (68)) kodiert. Die β/γ -Kristalline in Vertebraten besitzen vier griechische Schlüssel motive als eine gemeinsame Kernstruktur. Dieses Motiv besteht aus vier benachbarten antiparallelen β -Faltblättern. Dabei liegt das erste β -Faltblatt benachbart zum Vierten, das Zweite benachbart zum Dritten. Eine Verbindung zwischen den einzelnen β -Faltblättern wird durch β -Haarnadeln bzw. Schleifenstrukturen hergestellt (Abbildung 5). Allerdings unterscheiden sich die zwei Kristallinfamilien in ihrer genetischen Anordnung. Während bei den β -Kristallinen jedes der Motive durch ein eigenes Exon kodiert wird, fehlen bei den γ -Kristallinen die „intradomänen Introns“. Dadurch wird eine Domäne je Exon kodiert (16,69).

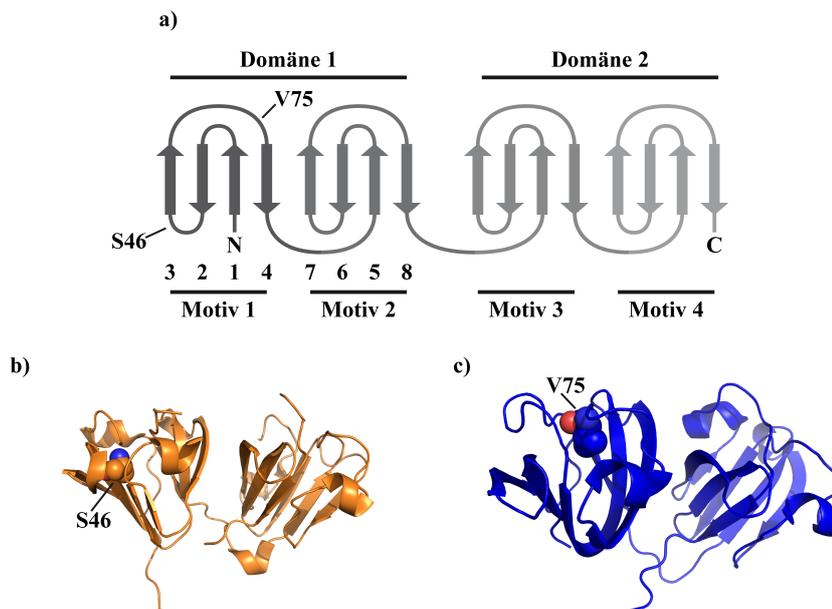


Abbildung 5: Topologiekarte der Sekundärstrukturelemente von β/γ -Kristallinen. Das griechische Schlüsselmotiv ist eine Gemeinsamkeit von Mitgliedern der Superfamilie der β/γ -Kristalline (a). Diese Proteine sind aus zwei Domänen mit jeweils zwei griechischen Schlüssel motiven aufgebaut. Jedes Schlüsselmotiv besteht aus vier benachbarten antiparallelen β -Faltblättern, die über β -Haarnadeln verbunden sind. Der erste β -Faltblattstrang ist benachbart zum Vierten, der über eine Schleifenstruktur mit dem dritten β -Faltblattstrang verbunden ist. Bei den β -Kristallinen wird jedes Motiv von einem Exon kodiert, bei den γ -Kristallinen hingegen kodiert jedes Exon eine Domäne bestehend aus zwei Motiven. In Teilabbildung b) und c) sind die Kristallstrukturen von humanem β A4-Kristallin (PDB-ID: 3LWK) und γ D-Kristallin (PDB-ID: 1HK0) gezeigt. Die Positionen S46 in β A4- und V75 in γ D-Kristallin sind als Kalottenmodell dargestellt. Humanes β A4- und murines β A2-Kristallin sind zu 54 % identisch und zu 71 % ähnlich. Bei humanem und murinem γ D-Kristallin liegt die Identität bei 85 % und die Ähnlichkeit bei 91 %. Die Punktmutationen S47P in β A2-Kristallin und V76D in γ D-Kristallin sind in Mäusen mit dominantem, erblichem Katarakt assoziiert. Die Identität und Ähnlichkeit wurde mit dem Programm EMBOSS Needle mit der Einstellung für Proteinsequenzen bestimmt.

Trotz der nahen genetischen Verwandtschaft unterscheiden sich die β/γ -Kristalline stark in einigen ihrer Eigenschaften auf Proteinebene. So besitzen die β -Kristalline eine größere molekulare Masse, zeigen eine höhere Varianz der N- und C-terminalen Verlängerungen, sowie größere strukturelle Flexibilität bei Domäneninteraktionen und der damit verbundenen Ausbildung an höhergeordneten Strukturen (70). Während die γ -Kristalline in Mäusen eine vergleichbare molekulare Masse zwischen 20 und 21 kDa besitzen, variiert das der β -Kristalline zwischen 22 und 28 kDa (18). Auch hinsichtlich

ihres isoelektrischen Punkts unterscheiden sich beide Familien. So werden die β -Kristalline zusätzlich in eine saure ($\beta A1$, $\beta A2$, $\beta A3$, und $\beta A4$) und basische ($\beta B1$, $\beta B2$, und $\beta B3$) Gruppe unterteilt (71,72). Diese Unterteilung gilt gleichermaßen für Menschen und Mäuse. Wie unter Punkt 1.2 erwähnt, bilden β -Kristalline Homo- und Heteropolymere. Allerdings ist noch nicht vollständig geklärt ob die höher geordneten Strukturen durch die terminalen Verlängerungen, oder auch die Domänen-verbindende Schleifenstruktur bedingt wird (34,73,74). Die N-terminalen Verlängerungen kommen sowohl bei den sauren, als auch bei den basischen β -Kristallinen vor. Die basischen β -Kristalline besitzen zusätzlich noch C-terminale Verlängerungen (14).

Die γ -Kristalline (in Mäusen: $\gamma A-F$, γN , γS) sind hinsichtlich ihrer Primär- und Quartärstruktur die kleinsten Mitglieder der β/γ -Superfamilie. Die verschiedenen Isoformen sind wie bei den β -Kristallinen aus Genduplikation entstanden (67). Die γ -Kristalline sind ebenfalls Zweidomänenproteine, liegen auf Proteinebene aber als kompakte, globuläre Monomere mit einem Durchmesser von etwa 5 nm vor. Dies spiegelt sich in einem hydrodynamischen Radius von 2,12 nm und geringen Reibungsverhältnis (f/f_0) von etwa 1,21 wieder (75). Durch die dichte Packung der Proteine, aufgrund der hohen Proteinkonzentration in der Linse, kommt es zu einer kurzreichenden räumlichen Ordnung der Kristalline, die die nötige Transparenz vermittelt (30). Die Ordnung der Kristalline in der Augenlinse kann dabei ähnlich der von hochdichten Flüssigkeiten oder Glas sein (30,76-78). Dementsprechend wurde die Augenlinse in der Literatur auch als proteinöses Glas bezeichnet (79). Studien mit Extrakten aus Kalbslinsen zeigen, dass die Wechselwirkungen zwischen den γ -Kristallinen schwach anziehend sind, während schwach abstoßende Kräfte zwischen den β -Kristallinen auftreten (33). Entsprechend wird vermutet, dass Störungen in dieser Anordnung, etwa durch Aggregation, die Lichtbrechung ändern und für eine Trübung der Linse sorgen (80).

1.3 Das derzeitige Modell zur Entstehung von Katarakt

Funktion der Augenlinse ist es, einfallendes Licht zu bündeln und auf die Makula zu projizieren. Die optischen Eigenschaften der Linsenfaserzellen sind insbesondere auf den ähnlichen Brechungsindex von Zellmembran, verbleibenden Zellorganellen und Zytoplasma zurückzuführen, der es ermöglicht einfallendes Licht zu fokussieren (81). Hauptaufgabe der Kristalline im Zytoplasma ist es, die Brechungseigenschaften so einzustellen, dass Licht ohne Farbverfälschung fokussiert werden kann. Dazu muss sichergestellt werden, dass die Proteine während der gesamten Lebensdauer des Organismus löslich und nativ gefaltet vorliegen. Kommt es während des Alterns oder durch Umwelteinflüsse zu einer (teilweisen) Entfaltung der Kristalline kann eine ungesteuerte Polymerisation der Proteine einsetzen, die letztendlich zu lichtstreuenden, hochmolekularen Aggregaten und damit zur Linsentrübung führt. Dieser Fall wird als seniler oder erworbener Katarakt bezeichnet und kann eine Vielzahl von Ursachen, wie physikalische, biochemische, metabolische oder strukturelle Veränderungen haben, tritt aber immer als Konsequenz der Alterns auf (1). Neben dem alterungsbedingten Katarakt sind auch Kataraktformen beschrieben, die mit vererbten Mutationen in

Einleitung

den Kristallinen einhergehen (erblicher Katarakt). Für erblichen Katarakt sind mehrere Duzend Mutationen in allen drei Kristallinfamilien für Mäuse und den Menschen beschrieben, die zu einer zeitlich verfrühten Trübung der Augenlinse führen (Tabelle 2) (7,12).

Tabelle 2: Übersicht über ausgewählte, bekannte Katarakt-assoziierte Mutationen in den murinen und humanen Kristallin-Genen.

α -Kristalline

Gen	NT-Mutation	AS-Mutation
<i>CRYAA</i> , murin	C → T	R54C
<i>CRYAA</i> , murin	T → A	V124E
<i>CRYAA</i> , human	G → T	R21K
<i>CRYAA</i> , human	C → T	R49C
<i>CRYAB</i> , human	A → G	R120G
<i>CRYAB</i> , human	G → A	D140N

β -Kristalline

Gen	NT-Mutation	AS-Mutation
<i>CRYBA2</i> , murin		S47P
<i>CRYBB2</i> , murin	T → A	V187E
<i>CRYBA4</i> , human	T → C	F94S
<i>CRYBB2</i> , human	A → T	D128V

γ -Kristalline

Gen	NT-Mutation	AS-Mutation
<i>CRYGA</i> , murin	T → C	W43R
<i>CRYGD</i> , murin	T → A	V76D
<i>CRYGC</i> , human	A → C	T5P
<i>CRYGD</i> , human	C → T	R14C

Angegeben sind neben dem Gen-Namen, die Mutation des Nukleotids und die daraus resultierende Änderung auf Proteinebene. Die Punktmutationen rufen dominanten erblichen Katarakt hervor. In Fettschrift hervorgehoben sind Mutationen, die für diese Arbeit von besonderer Bedeutung waren. Die Informationen über die jeweilige Mutation wurden von J. Graw übernommen (12).

Ähnlich wie beim senilen Katarakt werden aggregierte Kristalline als Ursache angesehen. Allerdings ist es noch nicht vollständig geklärt, ob es unspezifische Aggregate ohne definierte Form, sind oder spezifische Polymere aus teilgefalteten Intermediaten (82). So wird auch diskutiert, dass die Interaktionen spezifisch und wiederholend sein könnten. Erreicht würde dies durch Domänentausch

oder Insertionen von Schleifen- oder Faltblattstrukturen zwischen zwei Kristallinen aufgrund von partieller Entfaltung, die sich fortsetzen (37). Dennoch führte dies letztendlich auch zu lichtstreuenden Strukturen und würde somit eine Trübung der Augenlinse bedingen. Als Ursache für das Entstehen solcher aggregationsanfälligen Spezies werden Trunkierungen, Deamidierung, Oxidation, Racemisierung und andere Modifikationen, sowie die thermodynamische Destabilisierung und damit verbundene Aggregationsanfälligkeit von mutanten Kristallinen diskutiert (83-87). Solche Aggregationsprozesse werden nach aktuellem Forschungsstand durch die α -Kristalline verhindert, indem diese an (teil-) entfaltete β - und γ -Kristalline binden und somit die Aggregation durch Ausbildung von hochmolekularen Strukturen unterdrücken (Abbildung 6) (88). Die Proteine in der hochmolekularen Fraktion (HMW, engl. *high molecular weight fraction*), vor allem deren Zunahme im Alter und das höhere Vorkommen in trüben Linsen, stehen im Verdacht an der Kataraktgenese beteiligt zu sein (89-92). Der Name „hochmolekulare Fraktion“ leitet sich dabei von der sehr frühen Elution dieser Proteinkomplexe bei der Größenausschlusschromatographie mit dem wasserlöslichen Teil von Linsenextrakten ab.

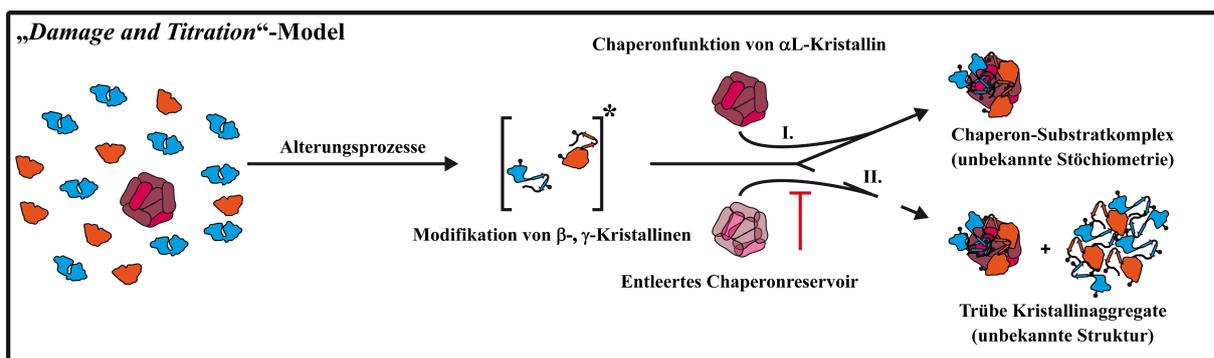


Abbildung 6: Derzeitige Modellvorstellung der Kataraktgenese. Das „Damage and Titration“-Modell geht von einer (partiellen) Entfaltung der β - (orange) bzw. γ -Kristalline (blau) in der Augenlinse aus. Die (Teil-) Entfaltung wird durch umwelt-, alterungs- oder genetisch bedingte Modifikationen verursacht (*). Die Modifikationen führen zu thermodynamisch destabilisierten und aggregationsanfälligen Spezies [*]. Die Aggregation dieser Spezies wird durch die Bindung an α L-Kristalline (einer Mischung aus α A-/ α A_{ins}- (violett) und α B-Kristalline (magenta) verhindert (I). Ist der vorhandene Vorrat an α L-Kristallinen in der Augenlinse erschöpft (II), kommt es zur Bildung von hochmolekularen, lichtstreuenden Aggregaten mit noch unbekannter Struktur.

Grundlage für das heutige Verständnis der Kataraktgenese waren hauptsächlich *in vitro* Messungen mit extrahierten oder rekombinant produzierten Proteinen und komplementär dazu *in vivo* Messungen mit genetisch veränderten Tieren. Neben *in vitro* Methoden sind die mutanten Mauslinien Aey7, Aca30 und Aey4 von besonderer Bedeutung für diese Arbeit. Diese Stämme tragen jeweils eine homozygote Mutation in einem Vertreter der drei Kristallinfamilien. Aey7 trägt die Mutation α A-V124E, Aca30 die Mutation β A2-S47P und Aey4 die Mutation γ D-V76D (93-95). Zwar unterscheiden sich die Stämme in der Art und Progression des Kataraktes (Aey7: nuklearer und zonulärer Katarakt; Aca30: perinukleare zonuläre Trübung zu totalem Katarakt; Aey4: nuklearer Katarakt), entwickeln aber alle dominanten, früh einsetzenden Katarakt, der bereits im Alter von 3 Monaten zu einer fast

vollständigen Trübung der Linse führt. Im Falle von Aey7 und Aey4 ist eine Linsentrübung schon beim Öffnen der Augen der Mäuse wenige Tage nach der Geburt sichtbar. Zusätzlich ist das Linsenfeuchtgewicht der Katarakt-Stämme verglichen mit den Wildtyp-Stämmen signifikant verringert. Die zugrundeliegenden Wildtyp-Stämme C57Bl/6J (bei Aca30) und C3HeB/FeJ (bei Aey4 und Aey7) entwickeln auch nach 12 Monaten keine signifikante Trübung der Augenlinse.

1.4 Problemstellung

Trotz intensiver Forschung zur Entstehung von Katarakt, sind die genauen molekularen Ursachen und Vorgänge noch nicht vollständig verstanden. Bislang wird davon ausgegangen, dass es zu einer Trübung der Linse durch die Aggregation der wichtigsten Strukturproteine des Auges, den β - und γ -Kristallinen kommt. Als Schutz gegen ungewollte Aggregation von Proteinen in der Augenlinse dient α -Kristallin, das aggregationsanfällige Spezies bindet und die Aggregation somit verhindert. Ist der vorhandene Vorrat an α -Kristallin erschöpft, kommt es zu unkontrollierter Aggregation und letztendlich zu einer Linsentrübung. Diese Modellvorstellung der Kataraktgenese begründet sich hauptsächlich aus *in vitro* Messungen mit Proteinextrakten oder rekombinantem Protein, hat aber noch einige Lücken was die Rolle der einzelnen Proteinkomponenten *in vivo* betrifft. Ein besonderer Schwerpunkt dieser Arbeit lag darauf, die derzeitige Modellvorstellung auszubauen und die Rolle der verschiedenen Proteinfamilien in der Linse mit Hilfe biochemischer und biophysikalischer Methoden genauer zu beschreiben. Dazu wurde eine umfangreiche *in vivo* und *in vitro* Charakterisierung der alternden Augenlinse von Wildtyp-Mäusen und Kataraktmutanten durchgeführt, um ein besseres Verständnis der verschiedenen Proteinfractionen, deren Anteil am Proteom, sowie deren Funktion in der Linse zu erlangen. Von besonderem Interesse waren dabei die Proteine in der HMW, da diese mit der Entstehung von Katarakt in Verbindung gebracht wurden. Komplementär dazu wurden Katarakt-assoziierte Proteinvarianten, sowie das jeweilige Wildtyp-Protein rekombinant produziert und gereinigt, um eine mögliche Verknüpfung zwischen *in vivo* und *in vitro* Beobachtungen aufzuzeigen. Dazu wurden neben der thermodynamischen Stabilität, die Aggregationsanfälligkeit und proteolytische Stabilität der Proteinvarianten, sowie deren apparente Quartärstruktur untersucht.

Als weiterer Punkt sollte die Funktionsweise von α B-Kristallin bei der Substratbindung auf molekularer Ebene genauer analysiert werden, da diese noch nicht vollständig verstanden ist. Ansatzpunkt hierfür war die Inkorporation einer fluoreszierenden unnatürlichen Aminosäure durch Erweiterung des genetischen Codes von *E. coli*, um eine spezifische Messsonde für die Interaktion von (teil-) entfaltenen Modellproteinen mit α B-Kristallin bei der Substratbindung zu erhalten. Die unnatürliche Aminosäure sollte dabei als minimalinvasive Sonde dienen, ohne die N-terminale Region von α B-Kristallin zu stören. Übergeordnete Zielsetzung war die Etablierung eines Förster-Resonanzenergietransfersystems zwischen α B-Kristallin und Modellproteinen, das es erlaubt die mikroskopischen Ratenkonstanten der Substratbindung und Interaktion mit dem ATP-abhängigen Hsp70/40-Chaperonsystem zu bestimmen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp
BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>dcm</i> ⁺ , Tet ^r , <i>gal</i> , λ(DE3), <i>endA</i> , Hte, [<i>argU</i> , <i>ileY</i> , <i>leuW</i> , Cam ^r]
DH10B	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ ⁻ <i>rpsL</i> (Str ^r) <i>nupG</i>
Mach1-T1 ^R	Fφ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74, hsdR</i> (r _k ⁻ m _k ⁺), Δ <i>recA1398, endA1, tonA</i>
XL1 Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺), <i>supE44, relA1, lac</i> , [F ['] , <i>proAB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q ΔM15, ::Tn10 (Tet ^r)]

Die *E. coli*-Stämme DH10B, Mach1-T1^R und XL1 Blue (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA; Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) wurden zur Produktion von Plasmid-DNA und für Klonierungen verwendet. Der *E. coli*-Stamm DH10B wurde weiterhin für die Produktion von rekombinantem αB-Kristallin mit einer unnatürlichen Aminosäure durch *Genetic Code Expansion* verwendet. Der *E. coli*-Stamm BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) wurde zur Produktion rekombinanter Kristalline und Hsc70* eingesetzt. Als Plasmidvektoren für Klonierungen, sowie die Produktion von rekombinanten Kristallinen dienten die Plasmide pET28 (Kan^r, Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, D) und pE-SUMOpro (Kan^r, LifeSensors, Malvern, PA, USA). Für die Produktion von rekombinantem Hsc70* wurde ein modifizierter pET28-Plasmidvektor verwendet (pET28-SUMO-Hsc70-wt, Dr. rer. nat. Oliver Lorenz, Lehrstuhl für Biotechnologie, Technische Universität München, DEU). In pET28 wurde eine für einen Hexahistidin-SUMO-*tag* (UniProt-ID: Q12306-1) codierende Nukleotidsequenz eingefügt (NcoI/ BamHI) und anschließend das humane Wildtyp-Gen von Hsc70 in den Plasmidvektor eingebracht (BamHI/ XhoI). Die Zielgene in pET28, pET28-SUMO und pE-SUMOpro standen jeweils unter Kontrolle des T7-Promotors. Für die Inkorporation der unnatürlichen Aminosäure para-Cyanophenylalanin in αB-Kristallin wurde der Plasmidvektor pDule-pCNF (Sp^c, mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Ryan Mehl (Department of Biochemistry & Biophysics, Oregon State University, Corvallis, OR, USA) verwendet. Als Expressionsvektor wurde pBAD/His A (Amp^r, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) eingesetzt. Beide Plasmidvektoren standen unter der Kontrolle des araB-Promotors.

2.1.2 Nährmedien

LB-Medium 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl

Nährboden LB- Medium mit 1,5 % (w/v) Agar-Agar

Alle Nährmedien und Nährböden wurden durch Autoklavieren (120 °C, 20 min, 2 bar) sterilisiert. Bei Bedarf wurden nach dem Autoklavieren Antibiotika als sterilfiltrierte Stammlösungen zugegeben. Die Endkonzentration an Antibiotikum lag bei 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml für Kanamycin und Spectinomycin, 25 µg/ml für Chloramphenicol, 30 µg/ml für Streptomycin, sowie 10 µg/ml für Tetracyclin. Die Stammlösungen waren 1000-fach in sterilfiltriertem ddH₂O konzentriert für Ampicillin, Kanamycin, Spectinomycin, Streptomycin und Tetracyclin bzw. in Ethanol p.a. für Chloramphenicol.

2.1.3 Enzyme, Protein- und DNA-Größenstandards

αB-Kristallin S19,45,59E (αB-3E)	Dr. rer. nat. Jirka Peschek, Lehrstuhl für Biotechnologie, Technische Universität München, DEU
α-Chymotrypsin # C4129	Sigma-Aldrich Co., Merck KGaA, Darmstadt, DEU
α-Lactalbumin #L6010	Sigma-Aldrich Co., Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Bovines Serumalbumin #23209 (2 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
BsaI-HF v2 #R3733S (20 U/µl)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
CutSmart-Puffer (10x) #B7204S	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
dNTPs (10 mM je dNTP) #M0447S	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
DpnI (20 U/µl) #R0176S	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Gelfiltrationsstandard #1511901	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Lysozym aus Hühnereiweiß # L6876-25G	Sigma-Aldrich Co., Merck KGaA, Darmstadt, DEU
MDH #10127914001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DEU
NcoI-HF #R3193S (20 U/µl)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
NEBuffer 2.1 (10x) #B7202S	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

Phusion DNA-Polymerase (2 U/μl) #M0530S	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Phusion HF-Reaktionspuffer (5x) #B0518	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Q5 DNA-Polymerase (2 U/μl) #M0491S	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Q5-Reaktionspuffer (5x) #B9027S	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
SERVA FastLoad 1 kb DNA-Leiter #39317.01	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU
T4 DNA-Ligase (400 U/μl) #M0202S	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
T4 DNA-Ligase-Reaktionspuffer (10x) #B0202S	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
T4 DNA-Polymerase (3 U/μl) #M0203S	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
T4 Polynukleotidkinase (10 U/μl) #M0201S	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Ulp1 (<i>S. cerevisiae ubiquitin-like-specific protease 1</i>)	Jasmin König, Lehrstuhl für Biotechnologie, Technische Universität München, DEU
Ungefärbter niedermolekularer SDS-PAGE- Standard #1610304	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Vorgefärbter SDS-PAGE-Standard peqGOLD Protein Marker IV, #27-2110P	VWR International GmbH, Darmstadt, DEU
XhoI #R0146S (20 U/μl)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

2.1.4 Synthese von Oligodesoxyribonukleotiden und Genen

Die zur Klonierung und Punktmutagenese von Zielgenen notwendigen Oligodesoxyribonukleotide wurden von Eurofins (Eurofins NDSC Food Testing Germany GmbH, Hamburg, DEU) bezogen. Im Rahmen dieser Arbeit erstmals verwendete Gene wurden von GeneArt (Geneart AG, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) synthetisiert und in pET28 (Kan^r) kloniert. Die synthetisierten Oligodesoxyribonukleotide und Gene inklusive der zur Vektorinsertion verwendeten Schnittstellen, sind in Tabelle S2 gelistet.

2.1.5 Chemikalien

2-Iodacetamid	Sigma-Aldrich Co., Merck KGaA, Darmstadt, DEU
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU
2-Propanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU
3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-	Sigma-Aldrich Co., Merck KGaA, Darmstadt,

Material und Methoden

propanesulfonat (CHAPS)	DEU
5-[2-(2-Iodacetamido)ethylamino]-naphthalin-1-sulfonsäure (IAEDANS)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Aceton	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU
Acrylamid/Bis-Lösung, 19:1 (40 % w/v), 5 % C	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU
Acrylamid/Bis-Lösung, 37.5:1 (30 % w/v), 2,6 % C	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU
Agar-Agar	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU
Agarose	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU
Ammoniumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Atto488-Maleimid	ATTO-TEC GmbH, Siegen, DEU
Atto488-NHS-Ester	ATTO-TEC GmbH, Siegen, DEU
Bradford-Reagenz, 5x Konzentrat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich Co., Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Coomassie Brilliantblau G-250	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU
Coomassie Brilliantblau R-250	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU
Ethanol, p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU
Guanidiniumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Harnstoff	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU

Iodacetat, Natriumsalz	Sigma-Aldrich Co., Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU
Kobalt(II)-chlorid	Sigma-Aldrich Co., Merck KGaA, Darmstadt, DEU
L-(+)-Arabinose	Sigma-Aldrich Co., Merck KGaA, Darmstadt, DEU
L-4-Cyanophenylalanin, #A-0070	Amatek Chemical Co., Ltd., Hong Kong, HKG
L-Arginin	Sigma-Aldrich Co., Merck KGaA, Darmstadt, DEU
LB-Medium (nach Lennox, (96))	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Mangan(II)-chlorid	Sigma-Aldrich Co., Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU
<i>N,N,N',N'</i> -Tetraethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Natriumdeoxycholat	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Phenylmethylsulfonylfluorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU
Phosphorsäure, ortho	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU
Proteaseinhibitor Mix HP, Mix G (100x)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU
Quick Coomassie Stain	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU
Serva DNA Stain G (ca. 25 000x)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU

Silikonöl <i>Drystrip Cover Fluid</i>	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE
Streptomycinsulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU
Thioharnstoff	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Trägerampholyt Pharmalyte pH 3-10	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE
Trägerampholyt Servalyt pH 3-10	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU
Tris-(2-carboxyethyl)phosphinhydrochlorid (TCEP)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich Co., Merck KGaA, Darmstadt, DEU

Verwendete L-Aminosäuren stammten von Sigma-Aldrich Co. (Merck KGaA, Darmstadt, DEU), Merck KGaA (Darmstadt, DEU) in einem Reinheitsgrad von mindestens ≥ 98 %. Alle anderen Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich Co. (Merck KGaA, Darmstadt, DEU), Merck KGaA (Darmstadt, DEU) oder Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DEU) im Reinheitsgrad p.a. bezogen. Das für Puffer und Lösungen verwendete Wasser wurde mit einer arium proUV Reinstwasseranlage deionisiert (ddH₂O, Leitfähigkeit < 0,1 μ S/cm; Sartorius AG, Göttingen, DEU).

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Amicon Ultra-0,5 Zentrifugen-Filtereinheit, NMGG 10 kDa	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheit, NMGG 10 kDa	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Amicon Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheit, NMGG 10 kDa	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Dialyseschläuche Spectra/Por 1, NMGG 6 - 8 kDa, 3,3 - 46 ml/cm	Spectrum, Inc., Middleton, WI, USA
Entsalzungssäule Illustra NAP-5	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE
Entsalzungssäule PD-10	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE
Gel Loading Dye, Blue (6X) #B7021S	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
Glaskapillare Prometheus NT.48 Series nanoDSF Grade High Sensitivity Capillaries	NanoTemper Technologies GmbH, München, DEU

Immobiline DryStrip pH 3-10, 24 cm	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE
Immobiline DryStrip pH 3-10, 7 cm	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE
Membranfilter aus Zelluloseacetat, 0,45 µM, 50 mm	Sartorius AG, Göttingen, DEU
ServaGel TG Prime 14 % Fertiggel, 2D-Tasche	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU
ServaGel TG Prime 4-20 % Fertiggel, 12 Taschen	
Spritzenvorsatzfilter Millex-GS, 0,22 µm, 25 mm, Zellulosemischester	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Spritzenvorsatzfilter Millex-SV 5,0 µm, 25 mm, PVDF	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Ultrafiltrations-Membranscheiben Ultracel PL- 10, PLGC aus regenerierter Zellulose, NMGG 10 kDa passend für UFSC05001, UFSC20001 und UFSC40001	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, DEU
<i>Wizard Plus Midipreps DNA Purification System</i>	Promega GmbH, Mannheim, DEU
<i>Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System</i>	Promega GmbH, Mannheim, DEU
<i>Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System</i>	Promega GmbH, Mannheim, DEU
Xpress Minidialysiereinheit MD100, MD300 und MD1000, NMGG 3,5 kDa	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU

Einwegplastikreaktionsgefäße (0,5 - 5 ml), Pipettenspitzen (10 µl - 5 ml) und Spritzen (1 - 50 ml) wurden von Sarstedt AG & Co. KG (Nürnbrecht, DEU) und Eppendorf AG (Hamburg, DEU) bezogen. PCR-Plastikreaktionsgefäße (0,2 ml) stammten von Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA). Sofern nötig wurde das Verbrauchsmaterial durch Autoklavieren (120 °C, 20 min, 2 bar) sterilisiert.

2.1.7 Geräte und Chromatographiesäulen

Analytische Ultrazentrifuge ProteomeLab XL-I, 12 mm Epon-Harz Standard-Doppelsektorzellen, mit Quartzfenstern	Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
Analytischer 8-Loch Rotor (An-50 Ti)	Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
Analytischer 4-Loch Rotor (An-60 Ti)	

Material und Methoden

Autoklav Varioklav EP-Z	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, DEU
Chromatographiesäule HiLoad 16/600 Superdex 200 pg	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE
Chromatographiesäule HiLoad 26/600 Superdex 200 pg	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE
Chromatographiesäule HisTrap FF, 5 ml	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE
Chromatographiesäule Superdex 200 10/300 GL Superdex 200 Increase 10/300 GL	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE
Chromatographiesäule XK 26/20 Q-Sepharose <i>Fast Flow</i> , selbstgepackt	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE
Dichtemessgerät DMA 5000 M	Anton Paar GmbH, Graz, AUT
Dispergiergerät SilentCrusher M	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, DEU
Fluoreszenzspektrophotometer FluoroMax-4	K.K. Horiba Seisakusho, Kyōto, Japan
Fluoreszenzspektrophotometer FP-8500	Jasco Corporation, Tokyo, JPN
FPLC-System ÄKTA Purifier, ÄKTA Pure	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE
Geldokumentationssystem ImageScanner III	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE
Gelelektrophoreseapparatur Ettan DALT II	Amersham BioSciences Ltd., GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE
Gelelektrophoreseapparatur Mighty Small II	Hoefer Inc., Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU
Gelelektrophoreseeinheit HU10 Mini-Plus	Scie Plas Ltd, Harvard Bioscience, Holliston, MA, USA
Gelgießstand DALT II 276mm #80-6467-22	Amersham BioSciences Ltd., GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE
HPLC-System Shimadzu SIL-20AC, LC-20AT, SPD-20A, FRC-10A	Shimadzu Corporation, Nakagyo-ku, Kyōto, JPN
IEF-System Ettan IPGphor	Amersham BioSciences Ltd., GE Healthcare Bio-

	Sciences AB, Uppsala, SWE
Massenspektrometer Ultraflex II MALDI-ToF/ToF	Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, USA
Mehrwinkellichtstreuungsdetektor Wyatt Dawn Heleos II	Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA
nanoDSF Prometheus NT.48	NanoTemper Technologies GmbH, München, DEU
Peristaltikpumpe P-1	Pharmacia, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE
pH-Meter WTW pH 538	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim, DEU
Quarzküvette 105.201-QS, 105-201-15-40	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, DEU
Quarzküvette 119F-QS, 119004F-10-40	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, DEU
Refraktometer Abbe Mark II	Leica Camera AG, Wetzlar, DEU
Rührzelle, Modell 8050, 50 ml, UFSC05001	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Rührzelle, Modell 8200, 200 ml, UFSC20001	
Rührzelle, Modell 8400, 400 ml, UFSC40001	
Spektropolarimeter Chirascan V100	Applied Photophysics Limited, Leatherhead, GBR
Spektropolarimeter Jasco J-710, J-715 mit PFD-350S, PTC-348WI Peltierelement	Jasco Corporation, Tokyo, JPN
Stopped-flow-Fluoreszenzspektrophotometer DX.17MV	Applied Photophysics Limited, Leatherhead, GBR
Stromquelle EPS600, EPS601	Amersham Pharmacia Biotech Ltd, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE
Stromquelle LKB GPS 200/400	Pharmacia, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE
Thermocycler MJ Mini PTC-1148	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Tischzentrifuge Eppendorf 5417C, 5418, 5418R	Eppendorf AG, Hamburg, DEU
Ultrafiltrationszelle UFSC05001, UFSC20001 und UFSC40001 mit passenden Ultrafiltrations-Membranscheiben	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, DEU

Ultracel PL-10, NMGG 10 kDa

UV/Vis-Spektrophotometer Cary 400 Bio Varian, Inc., Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA

UV/Vis-Spektrophotometer Jasco V-550 Jasco Corporation, Tokyo, JPN

UV/Vis-Spektrophotometer NanoDrop ND-1000, ND-2000 Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Viskosimeter AMVn Anton Paar GmbH, Graz, AUT

Zellaufschlussmaschine CF Range Basic-Z E1061 Constant Systems Limited, Score Group, GBR

Zentrifuge Avanti J-25, J-26 XP, JXN-26 Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA

Zentrifuge Rotina 420R, 46R Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, DEU

2.1.8 Computerprogramme

Adobe Creative Suite 6 64Bit Adobe Systems, San José, CA, USA

ASTRA 5.3.4.20 Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA

BioTools 2.2 Bruker, Billerica, MA, USA

ChemBioDraw Ultra 14.0.0.117 PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA

DCDT+ 2.4.3 John Philo, Alliance Protein Laboratories, Thousand Oaks, CA, USA

EMBOSS Needle ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/

ExpASy ProtParam web.expasy.org/protparam/

ImageJ 1.51j8 National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

LabScan 6.0 GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE

Mascot 2.3 Matrix Science, Boston, MA, USA

NEBuilder nebuilder.neb.com

OligoCalc biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html

OriginPro 2015G 64Bit OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA

Phylogeny.fr phylogeny.fr

PR.Stability Analysis v1.0.2.8422 NanoTemper Technologies GmbH, München,

	DEU
SedFit 15.01b	Peter Schuck, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Sednterp 20120828 BETA	Biomolecular Interaction Technologies Center, University of New Hampshire, NH, USA
The PyMOL Molecular Graphics System 1.3	Schrödinger, LLC, New York, NY, USA
Watershed 02.2008 plug-in for ImageJ	Biomedical Imaging Group, EPFL Lausanne, CHE

2.2 Methoden

2.2.1 Elektrophoretische Methoden

2.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Probenpuffer (6x)	NEB <i>Gel Loading Dye, Blue</i> 20 mM Tris/HCl, 15 % (w/v) Ficoll-400, 70 mM EDTA, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, pH ^{25 °C} 8,0
TAE-Puffer (1x)	40 mM Tris/HCl, 20 mM Eisessig, 1 mM EDTA, pH ^{RT} 8,0

Die analytische Trennung und präparative Reinigung von DNA-Fragmenten erfolgte durch horizontale Gelelektrophorese. Für DNA-Fragmente mit einer Größe von unter 1000 bp wurden Gele mit 1,6 % (w/v) Agarose verwendet, für größere Fragmente lag die Agarosekonzentration bei 1 % (w/v). Zur Visualisierung der DNA-Fragmente unter UV-Licht nach elektrophoretischer Trennung wurde dem Gel 0,04 % (v/v) Serva DNA Stain G (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU) zugegeben. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 30 min in TAE-Puffer bei einer Spannung von 6 V pro cm Elektrodenabstand mit anschließender Analyse unter UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$).

2.2.1.2 Kontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Laemmli-Probenpuffer (5x)	300 mM Tris/HCl, 50 % (w/v) Glycerin, 10 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, pH ^{RT} 6,8
Laemmli-Laufpuffer (10x)	250 mM Tris/HCl, 2 M Glycin, 1 % (w/v) SDS, pH ^{RT} 8,8
Trenngel	15 % (w/v) Acrylamid (Stammlösung mit 19:1 (40 % w/v), 5 % C Acrylamid/ N,N'-Methylenbisacrylamid), 375 mM Tris/HCl, 0,2 % (w/v) SDS, pH ^{RT} 8,8

Material und Methoden

Sammelgel	5 % (w/v) Acrylamid (Stammlösung mit 19:1 (40 % w/v), 5 % C Acrylamid/ N,N'-Methylenbisacrylamid), 125 mM Tris/HCl, 0,2 % (w/v) SDS, pH ^{RT} 6,8
Färbelösung (Fairbanks A)	25 % (v/v) 2-Propanol, 10 % (v/v) Eisessig, 0,05 % (w/v) Coomassie-Brilliantblau G-250
Entfärbelösung (Fairbanks D)	10 % (v/v) Eisessig

Die kontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese erlaubt die Trennung von Proteinen nach deren molekularer Masse durch ein Sammel- und anschließendes Trenngel. Die Separation der Proteine wurde nach einem modifizierten Protokoll nach Laemmli sowie Fairbanks *et al.* durchgeführt (97,98). Dazu wurden die Proben mit 1/4 Volumen Laemmli-Probenpuffer versetzt, 15 min im Heizblock bei 95 °C gekocht und vor dem Auftragen kurz abzentrifugiert (10 min, 20800 g, RT). Die Gelelektrophorese erfolgte in einer Mighty Small II Vertikalgelelektrophoreseapparatur (Hoefer Inc., Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU) bei Raumtemperatur und einer Stromstärke von 25 mA und 20 min Dauer für das Sammelgel, bzw. 35 mA und 30 min Dauer für das Trenngel. Nach der Elektrophorese wurde das Gel durch Aufkochen in Färbelösung ca. 20 min lang gefärbt und anschließend nach erneutem Aufkochen in Entfärbelösung mehrere Stunden entfärbt.

2.2.1.3 Limitierte Proteolyse

Messpuffer	100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl ₂ , pH ^{25 °C} 7,8
------------	---

Um Empfindlichkeit von Kristallinen gegenüber proteolytischem Abbau zu untersuchen, wurden 10 µM an Protein mit α-Chymotrypsin *ad* 4 % (w/w) in Messpuffer bei 25 °C inkubiert und zu definierten Zeitpunkten Proben entnommen. Der enzymatische Verdau wurde durch Zugabe von PMSF *ad* 2 mM gestoppt. Die gelelektrophoretische Trennung erfolgte wie unter 2.2.1.2 beschrieben mit ServaGel TG Prime 4-20 % (w/v) Fertiggelen (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU). Die Gele wurden über Nacht in Quick Coomassie Stain (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU) bei Raumtemperatur und 30 rpm gefärbt und in deionisiertem Wasser entfärbt. Die entfärbten Gele wurden mit einem kalibrierten ImageScanner III Geldokumentationssystem unter Verwendung von LabScan 6.0 bei 600 dpi dokumentiert (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE). Die Bandenintensität wurde mit ImageJ 1.51j8 densitometrisch bestimmt. Die Experimente und Datenanalysen wurden in Zusammenarbeit mit Nicole Lim, Ph.D. (Lehrstuhl für Biotechnologie, Technische Universität München, DEU) durchgeführt.

2.2.1.4 Zweidimensionale Gelelektrophorese und densitometrische Analyse

Probenpuffer	7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 65 mM DTT, 2 % (w/v) CHAPS,
--------------	---

	0,2 % (v/v) Trägerampholyt
Äquibrierungspuffer	50 mM Tris/HCl, 6 M Harnstoff, 30 % (w/v) Glycerin, 2,5 % (w/v) SDS, pH ^{20 °C} 8,8
Reduktionslösung	65 mM DTT in Äquibrierungspuffer
Alkylierungslösung	215 mM 2-Iodacetamid in Äquibrierungspuffer
Trenngel für 24 cm IPG-Streifen (24 cm x 18,5 cm)	15 % (w/v) Acrylamid (Stammlösung mit 37.5:1 (30 % w/v), 2,6 % C Acrylamid/ N,N'-Methylenbisacrylamid), 375 mM Tris/HCl, 0,2 % (w/v) SDS, pH ^{20 °C} 8,8
Trenngel für 7 cm IPG-Streifen (8 cm x 7 cm)	ServaGel TG Prime 14 % (w/v) Fertiggele mit einer 2-D Tasche
Laufpuffer	25 mM Tris/HCl, 190 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH ^{20 °C} 8,8
Agaroselösung	0,5 % (w/v) Agarose in Laufpuffer, Spuren von Bromphenolblau
Färbelösung für 24 cm x 18,5 cm Gele	20 % (v/v) Methanol, 10 % (w/v) Ammoniumsulfat, 2 % (v/v) Phosphorsäure, 0,1 % (w/v) kolloidales Coomassie Brilliantblau G-250
Färbelösung für 8 cm x 7 cm Gele	Quick Coomassie Stain
Entfärbelösung für 24 cm x 18,5 cm Gele	20 % (v/v) Eisessig
Entfärbelösung für 8 cm x 7 cm Gele	ddH ₂ O

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE) ermöglicht es Proteine zunächst nach deren Ladung durch isoelektrische Fokussierung (IEF; erste Dimension) und dann nach ihrer molekularen Masse (zweite Dimension) zu trennen. Für die erste Dimension wurden bis zu 150 µg Protein aus den Linsenextrakten auf 24 cm IPG-Streifen (Immobiline DryStrip, pH 3-10, 24 cm, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE) aufgetragen, mit *Drystrip Cover Fluid* Silikonöl (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE) überschichtet und fokussiert. Als Trägerampholyt für die IEF von Linsenextrakten wurde Pharmalyte pH 3-10 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE) für den Probenpuffer verwendet und die Probe mit Probenpuffer auf 450 µl aufgefüllt. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte an einem Ettan IPGphor IEF-System (Amersham Biosciences, Little Chalfont, GBR) programmiert auf 25,5 h Laufzeit bei 20 °C mit der Sequenz: 30 V/ 6 h, 60 V/ 6 h, 200 V/ 1 h, 500 V/ 1 h, 1000 V/ 1 h, 1000 ↗ 8000 V über 0,5 h und 8000 V/ 10 h. Für die zweite Dimension wurden die IPG-Streifen nach der IEF für je 15 min in Reduktionslösung bei Raumtemperatur

geschüttelt (30 rpm), zweimal mit ddH₂O gewaschen und erneut für 15 min in Alkylierungslösung bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Trennung nach molekularer Masse erfolgte mit selbstgegossenen 15%igen (w/v) SDS-Gelen (24 cm x 18,5 cm) (DALT II 276mm #80-6467-22 Gelgießstand, Amersham BioSciences Ltd., GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE) an einer Ettan DALT II Gelelektrophoreseapparatur (Amersham BioSciences Ltd., GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE). Dem Trennungslauf wurde ein Vorlauf der leeren Gele bei 8 mA pro Gel für 1 h vorangestellt und der Laufpuffer im Anschluss gewechselt. Die IPG-Streifen wurden vor der elektrophoretischen Trennung mit Agaroselösung fixiert und die Proteine mit 4 mA pro Gel für 1 h und weiter bei 15 mA pro Gel für etwa 16 h bei 20 °C getrennt. Die Färbung der Gele erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur unter Schütteln (30 rpm) in Färbelösung, die Entfärbung in Entfärbelösung bei gleichen Parametern.

Zur 2-DE von kleineren Proteinmengen wurden bis zu 25 µg Protein auf 7 cm IPG-Streifen (Immobiline DryStrip, pH 3-10, 24 cm, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE) aufgetragen und fokussiert (Sequenz: 30 V/ 6 h, 60 V/ 6 h, 300 V/ 0,5 h, 300 ↗ 1000 V über 0,5 h, 1000 ↗ 5000V über 1,5 h, 5000 V/ 2,5 h). Das Vorgehen für die erste Dimension erfolgte analog zu dem für 24 cm IPG-Streifen. Das Gesamtvolumen der Probe wurde auf 125 µl mit Probenpuffer eingestellt und Servalyt pH 3-10 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU) für die Herstellung des Probenpuffers eingesetzt. Die Trennung in der zweiten Dimension fand über 14%ige (w/v) ServaGel TG Prime Fertiggele mit einer 2-D Tasche (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU) bei 10 mA pro Gel für 15 min und anschließend 30 mA pro Gel für 70 min statt. Die Gele wurden über Nacht bei Raumtemperatur und 30 rpm mit Quick Coomassie Stain (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU) gefärbt und mit deionisiertem Wasser bei gleichen Parametern entfärbt. Alle 2-DE-Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Bettina Richter, Chem. Ing. (Lehrstuhl für Biotechnologie, Technische Universität München, DEU) durchgeführt. Die Gele wurden mit einem kalibrierten ImageScanner III Geldokumentationssystem unter Verwendung von LabScan 6.0 bei 600 dpi dokumentiert (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE). Die densitometrische Analyse der Gele erfolgte nach Natale *et al.* mit ImageJ 1.51j8 und dem Watershed 02.2008 *Plug-In* ohne den *warping*-Schritt (99,100). Die Proteinspots wurden durch MALDI-TOF-MS an einem Maldi-TOF/TOF Ultraflex II (Bruker, Billerica, MA, USA) eindeutig und mehrfach redundant zugeordnet. Die Messungen der Proteinspots erfolgte nach Courchesne und Patterson (101). Die resultierenden Massenspektren wurden mit dem Programm *BioTools* (Bruker, Billerica, MA, USA) analysiert und mit dem MASCOT Programm (Matrix Science, Boston, MA, USA) gegen die NCBI-Proteindatenbank abgeglichen (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) (102). Die Messungen wurden von Florian Rührnöbl (Lehrstuhl für Biotechnologie, Technische Universität München, DEU) durchgeführt.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Polymerasekettenreaktion

Phusion HF-Reaktionspuffer Zusammensetzung nicht vom Hersteller angegeben
(5x)

Q5-Reaktionspuffer (5x) Zusammensetzung nicht vom Hersteller angegeben

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Phusion- oder Q5-DNA-Polymerase verwendet. Die Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgte in 50 µl Ansätzen mit 32 µl ddH₂O, 10 µl Phusion HF-Reaktionspuffer oder Q5-Reaktionspuffer, 1 µl 10 mM dNTPs, je 2,5 µl 10 µM Primer, 1 µl Templat-DNA (75 ng, entspricht ca. ca. 25 pmol) und 1 µl Phusion- oder Q5-DNA-Polymerase (2 U). Die PCR erfolgte in einem MJ Mini PTC-1148 Thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) bei jeweils drei Hybridisierungstemperaturen. Die PCR-Sequenz wurde nach zweiminütigem Aufheizen auf 95 °C in 35 Zyklen durchgeführt. Jeder Zyklus bestand aus Strangtrennung (30 s, 95 °C), Primer-Hybridisierung bei drei Temperaturen (30 s, 53, 55 und 57 °C) und Polymerisation (1 min/ 1 kb, 72 °C). Nach Abschluss der Zyklen wurden weitere 10 min bei 72 °C inkubiert, um eine vollständige Polymerisierung zu gewährleisten. Das Ergebnis der PCR wurde wie unter 2.2.1.1 beschrieben durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.2.2.2 Sequenz- und Ligations-unabhängiges Klonieren

CutSmart-Puffer (10x) 200 mM Tris/Acetat, 500 mM Kaliumacetat, 100 mM
Magnesiumacetat, 1 mg/ml BSA, pH^{25 °C} 7,9

NEBuffer 2.1 (10x) 100 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 1 mg/ml BSA,
pH^{25 °C} 7,9

Das Sequenz- und Ligations-unabhängige Klonieren (SLIC) ermöglicht die Integration von mehreren DNA-Fragmenten in ein linearisiertes Vektorrückgrat durch homologe Rekombination ohne den Einsatz von Ligationsenzymen (103). Grundlage ist die bevorzugte 3'-5'-Exonukleaseaktivität der T4 DNA-Polymerase in der Abwesenheit von dNTPs, die es ermöglicht, dass Fragmente mit homologen Überhängen nach kurzer Inkubation in Gegenwart der T4 DNA-Polymerase rekombinieren können. Hierzu wurde das zu transferierende Zielgen wie unter 2.2.2.1 durch Einsatz der Q5 DNA-Polymerase amplifiziert und nach anschließender gelelektrophoretischer Trennung aus dem Agarosegel gereinigt (2.2.1.1). Die *Primer* (Tabelle S2), sowie die PCR-Parameter wurden mit Hilfe von *NEBuilder* entworfen und händisch verifiziert. Die Linearisierung des Zielvektors erfolgte durch enzymatischen Verdau. Dazu wurden 200 µl pE-SUMOpro bzw. pBAD (150 ng/µl) mit 23 µl CutSmart-Puffer, sowie 4 µl BsaI (80 U) bzw. NcoI, XhoI vermischt und bei 37 °C für 4 h inkubiert. Die Assemblierung des SLIC-Konstrukts erfolgte mit einem molaren Vektor zu Fragment Verhältnis von 1:2. Für den SLIC-

Zellen extrahiert. Hierzu wurden die Zellen durch alkalische Lyse aufgeschlossen, die DNA an Silica-Material gebunden, mehrmals gewaschen und anschließend in ddH₂O eluiert. Für größere Vektormengen wurden die transformierten *E. coli*-Zellen in 100 ml LB-Medium in einem Schüttelinkubator (37 °C, 120 rpm) über Nacht angezogen und das *Wizard Plus Midipreps DNA Purification System* (Promega GmbH, Mannheim, DEU) zur Extraktion verwendet. Die Elution erfolgte in 60 µl autoklaviertem ddH₂O für Mini-Plasmidpräparationen und 300 µl für Midi-Plasmidpräparationen. Die Nukleotidkonzentration nach der Elution wurde an einem Nanodrop ND-2000 oder ND-1000 UV/Vis-Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) bestimmt.

2.2.2.5 Herstellung und Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen

Tfb1-Puffer	30 mM Kaliumacetat, 100 mM RbCl ₂ , 50 mM MnCl ₂ , 2 mM CaCl ₂ , 15 % (w/v) Glycerin, pH 5,8, steril-filtriert
Tfb2-Puffer	10 mM MOPS/KOH, 75 mM CaCl ₂ , 10 mM RbCl ₂ , 15 % (w/v) Glycerin, pH ^{4 °C} 6,8, steril-filtriert

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 4 ml LB-Medium mit einem Einzelklon *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, DH10B, Mach1-T1^R, oder XL1 Blue inokuliert und über Nacht bei 37 °C in einem Rotationsinkubator bei 60 rpm angezogen. Sofern nötig wurde den LB-Medien Antibiotikum gemäß 2.1.1, 2.1.2 zugegeben. Am Folgetag wurden 100 ml vorgewärmtes LB-Medium mit 1 ml Übernachtskultur (100x, ca. OD₆₀₀ 0,03 - 0,05) angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,3 - 0,4 in einem Schüttelinkubator bei 37 °C und 120 rpm kultiviert (105). Sobald die Zelldichte erreicht war, wurden die Zellen für 15 min auf Eis abgekühlt und anschließend pelletiert (Rotina 420R, 10 min, 2 000 g, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 30 ml eiskaltem Tfb1-Puffer resuspendiert und auf Eis inkubiert (15 min für XL1 Blue, 45 min für BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, 60 min für DH10B und Mach1-T1^R). Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut pelletiert (Rotina 420R, 10 min, 2 000 g, 4 °C), der Überstand verworfen, mit 10 ml eiskaltem Tfb1-Puffer gewaschen und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand verworfen, vorsichtig in 2 ml eiskaltem Tfb2-Puffer resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 100 µl-Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen wurde 1 µl (ca. 100 ng, entspricht ca 0,03 pmol) Plasmidvektor zu 50 µl Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Zur Erhöhung der Transformationseffizienz wurde ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 s durchgeführt und die Zellen für 2 min auf Eis inkubiert (106). Anschließend wurden die Zellen in 500 µl LB-Medium aufgenommen und für 60 min in einem Heizblock bei 37 °C, 350 rpm geschüttelt. Bei Transformationen mit bereits vorhandenem Plasmidvektor wurden 100 µl Zellen auf Nährboden ausplattiert, bei Klonierungen

wurden die Zellen in einer Tischzentrifuge pelletiert (1 min, 2 000 g, RT, Eppendorf 5418, Eppendorf AG, Hamburg, DEU), in 50 μ l LB-Medium resuspendiert und das gesamte Zellmaterial ausplattiert. Die Nährböden enthielten die erforderlichen Selektionsantibiotika.

2.2.3 Produktion und Reinigung rekombinanter Proteine

2.2.3.1 Proteinproduktion und Zellaufschluss

Zur Produktion von Zielproteinen wurden *E.coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL-Zellen mit dem entsprechenden Plasmidvektor transformiert, ausplattiert und ein geeignetes Volumen an Übernachtskultur mit einem Einzelklon in LB-Medium hergestellt. Den Nährböden und Medien waren dabei die entsprechenden Antibiotika zugesetzt. Anschließend wurde die Übernachtskultur 100- bis 1000-fach (OD_{600} ca. 0,03 - 0,003) in vorgewärmte Schikanekolben (5 l), gefüllt mit 2 l LB-Medium und 50 μ g/ml Kanamycin, verdünnt und bei 37 °C, 120 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,3 - 0,8 geschüttelt. Die Proteinproduktion wurde durch Zugabe von 0,3 - 1 mM IPTG induziert (1M Stammlösung in ddH₂O). Die genauen Parameter für die Proteinproduktion sind in Tabelle 3 gelistet.

Tabelle 3: Übersicht über die Parameter bei der Proteinproduktion und die berechneten molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten bei 280 nm.

Protein	UniProt-ID	Plasmidvektor	Verdünnung (n-fach)	Induktion (OD_{600})	[IPTG] (mM)	ϵ_{280} ($M^{-1} cm^{-1}$)
α A-wt	P24622-2	pET28	100	0,6 - 0,8	1	14 440
α A-V124E	P24622-2	pET28	100	0,6 - 0,8	1	14 440
α B-wt	P02511-1	pET28	100	0,6 - 0,8	1	13 980
α B-pCNF	P02511-1	pBAD	100	Autoinduktion	-	3 830
β A2-wt	Q9JJV1-1	pE-SUMOpro	100	0,3 - 0,5	0,3	46 410
β A2-S47P	Q9JJV1-1	pET28	100	0,3 - 0,5	0,3	46 410
γ D-wt	P04342-1	pE-SUMOpro	1000	0,6 - 0,8	1	45 840
γ D-V76D	P04342-1	pE-SUMOpro	1000	0,6 - 0,8	0,3	45 840
Hsc70*	P11142-1	pET28-SUMO	100	Autoinduktion	-	22 350

Gelistet sind der Name des Zielproteins, sowie die dazugehörige UniProt-Identifikationsnummer, der zugrundeliegende Plasmidvektor und sofern zutreffend die Zelldichte bei Induktion sowie die Endkonzentration an IPTG nach manueller Induktion. Die Inkorporation von pCNF im Falle von α B-pCNF (α B-Kristallin mit den Mutationen W9TAG, W60F) erfolgte in Autoinduktionsmedium mit 0,05 % (w/v) L-(+)-Arabinose. Ebenfalls angegeben ist der zur Konzentrationsbestimmung verwendete molare dekadische Extinktionskoeffizient bei 280 nm (ϵ_{280}). Die Berechnung der ϵ_{280} -Werte erfolgte mit ExPASy ProtParam (107). Für pCNF wurde ein ϵ_{280} -

Wert von $850 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet (Siehe Tabelle S1 für eine vollständige Liste aller verwendeten Extinktionskoeffizienten).

Nach vierstündigem Schütteln wurden die Zellen abzentrifugiert (JA-10 Rotor, 15 min, 8670 g, 4 °C), der Überstand abdekantiert und das Zellmaterial in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Zellpellets erfolgte bei -80 °C.

Vor dem mechanischen Aufschluss wurde das Zellpellet aufgetaut, mit 20 ml des jeweiligen Puffer A, je 2 l Proteinproduktionsvolumen, sowie Proteaseinhibitor Mix HP für SUMO-Fusionsproteine oder Mix G (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU) für Proteine ohne SUMO-tag versetzt. Die Suspension wurde anschließend mit einem SilentCrusher M Dispergiergerät (Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, DEU) auf Eis homogenisiert (5 min, 10 000 rpm) und die Zellen an einer CF Range Basic-Z E1061 Zellaufschlussmaschine zweimal bei 2,1 kbar, 4 °C (Constant Systems Limited, Score Group plc, GBR) aufgeschlossen. Für die Proteinreinigung wurden Zellfragmente durch Zentrifugation entfernt (JA-25.50, 45 min, 50 800 g, 4 °C) und der Überstand durch einen 5,0 µm-Filter filtriert.

2.2.3.2 Proteinextraktion und -reinigung

Bei den Proteinreinigungen verwendete Puffer wurden vor der Verwendung filtriert (Zelluloseacetat-Membranfilter, 0,45 µm, 50 mm, Sartorius AG, Göttingen, DEU) und der pH-Wert überprüft. Alle Reinigungspuffer wurden mit ddH₂O hergestellt. Vor dem Auftrag der Proteinlösungen auf die jeweilige Säule, wurde diese mit mindestens einem Säulenvolumen des verwendeten Puffers äquilibriert. Sofern nicht anders angegeben fanden alle Proteinreinigungen und Dialyseschritte bei 4 °C oder auf Eis statt. Weiterhin wurden die Fraktionen mit Zielprotein ($\leq 50 \text{ ml}$) nach dem letzten Reinigungsschritt vereinigt, auf etwa 2 - 5 ml konzentriert (Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheit, NMGG 10 kDa, 6 700 g, 4 °C) und zu 100 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Konzentration der Aliquots wurde an einem Jasco V-550 UV/Vis-Spektrophotometer (Jasco Corporation, Tokyo, JPN) mit einer Quarzküvette (105.201-QS, 105-201-15-40, Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, DEU) der Schichtdicke 1 cm bestimmt. Dazu wurden Absorptionsspektren von 240 nm bis 350 nm mit einer Aufnahmegeschwindigkeit von 100 nm/min bei einer Bandbreite von 2 nm, sowie einer Auflösung von 1 nm aufgenommen. Der zur Berechnung der Konzentration verwendete molare dekadische Extinktionskoeffizient bei 280 nm ist in Tabelle 3 gegeben.

2.2.3.2.1 Murines wildtyp- α A-Kristallin

Puffer A 50 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, pH^{4 °C} 8,5

Puffer B 50 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, 1 M NaCl, pH^{4 °C} 8,5

Puffer C 50 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, 400 mM NaCl, pH^{4 °C} 8,5

Puffer D PBS, 2 mM DTT, 2 mM EDTA, pH 7,4

Für den ersten Reinigungsschritt wurde die Proteinlösung aus dem Zellaufschluss (2.2.3.1) auf ein Endvolumen von 120 ml mit Puffer A verdünnt und mit einer Flussrate von 3 ml/min auf eine selbstgepackte XK 26/20 Q-Sepharose *Fast Flow* Säule mit ca. 70 ml Bettvolumen aufgetragen. Nach dem Säulenauftrag wurde mit 140 ml Puffer A gewaschen und die Proteine anschließend mit einem Gradienten von 0 bis 50 % (v/v) Puffer B in Puffer A über 600 ml eluiert. Während der Elution wurden kontinuierlich Fraktionen von 7 ml Volumen gesammelt. Die Zielfraktionen, in denen das Protein enthalten war, wurden durch SDS-PAGE unter Zuhilfenahme eines Molekulargewichtsstandards (#1610304, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) bestimmt und vereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden auf etwa 2 - 5 ml konzentriert (Ultrafiltrationszelle Ultracel PL-10, NMGG 10 kDa, 4,5 bar, 4 °C und Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheit, NMGG 10 kDa, 6 700 g, 4 °C) und auf eine HiLoad 26/600 Superdex 200 pg Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Gelfiltration wurde mit einer Flussrate von 2 ml/min mit Puffer C durchgeführt und nach etwa 80 ml Elutionsvolumen mit dem Sammeln von 2 ml Fraktionen begonnen. Die Fraktionen mit Zielprotein (≤ 50 ml) wurden vereinigt und über Nacht gegen 5 l Puffer D dialysiert (Dialyseschlauch Spectra/Por 1, NMGG 6 - 8 kDa).

2.2.3.2.2 Murines α A-Kristallin V124E

Puffer A 100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH^{4 °C} 7,5

Puffer B 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 5 M Harnstoff, pH^{4 °C} 7,5

Puffer C 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 5 M Harnstoff, 1 M NaCl pH^{4 °C} 7,5

Puffer D 250 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 mM L-Arginin, pH^{4 °C} 8,0

Puffer E PBS, 2 mM DTT, 2 mM EDTA, pH 7,4

Anders als α A-wt ist die Katarakt-assoziierte V124E Variante nicht löslich in *E. coli*-Zellen produzierbar und wurde daher aus den unlöslichen *inclusion bodies* gereinigt. Das Zellpellet wurde, wie unter 2.2.3.1 beschrieben, aufgeschlossen und das Rohextrakt abzentrifugiert (JA-25.50, 45 min, 50 800 g, 4 °C). Allerdings wurde hier der Überstand verworfen und das Zielprotein aus dem unlöslichen Teil gereinigt. Hierzu wurden die pelletierten *inclusion bodies* in 100 ml Puffer A aufgenommen, mit einem SilentCrusher M Dispergiergerät (Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, DEU) auf Eis homogenisiert (5 min, 10 000 rpm) und auf ein Volumen von 200 ml mit Puffer A aufgefüllt. Die Suspension wurde danach erneut abzentrifugiert (JLA 16.250 Rotor, 40 min, 19 800 g, 4 °C) und der Überstand verworfen. Die *inclusion bodies* wurden insgesamt drei Mal gewaschen, in dem diese jeweils in 200 ml Puffer A homogenisiert (Dispergiergerät SilentCrusher M,

5 min, 10 000 rpm, auf Eis) und abzentrifugiert wurden (JLA 16.250 Rotor, 40 min, 19 800 g, 4 °C). Für den ersten Chromatographieschritt wurden die gewaschenen *inclusion bodies* in 120 ml Puffer B aufgenommen, für 60 min bei Raumtemperatur gerührt und abzentrifugiert (JA-25.50, 45 min, 50 800 g, 4 °C). Die Proteinlösung wurde filtriert (Millex-SV 5,0 µm Spritzenvorsatzfilter, 25 mm, PVDF) und mit einer Flussrate von 3 ml/min auf eine selbstgepackte XK 26/20 Q-Sepharose *Fast Flow* Säule aufgetragen. Die Elution der Proteine mit Puffer C und Bestimmung der Zielfraktionen erfolge wie unter 2.2.3.2.1 beschrieben. Die Rückfaltung der vereinigten Zielfraktionen wurde durch Dialyse gegen 5 l Puffer D bei einer Konzentration von 0,1-0,5 mg/ml induziert (Dialyseschlauch Spectra/Por 1, NMGG 6 - 8 kDa). Der Rückfaltungsansatz wurde im Anschluss auf etwa 2 - 5 ml konzentriert (Ultrafiltrationszelle Ultracel PL-10, NMGG 10 kDa, 4,5 bar, 4 °C und Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheit, NMGG 10 kDa, 6 700 g, 4 °C) und auf eine HiLoad 26/600 Superdex 75 pg Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Gelfiltrationschromatographie wurde mit einer Flussrate von 2 ml/ml mit Puffer E durchgeführt und nach etwa 80 ml Elutionsvolumen mit dem Sammeln von 2 ml Fraktionen begonnen. Die Proteinreinigung wurde von Katrin Back durchgeführt (108).

2.2.3.2.3 Murines wildtyp-βA2-Kristallin

Puffer A	50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH ^{4 °C} 8,0
Puffer B	50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 6 M GdmCl, pH ^{RT} 8,0
Puffer C	50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 6 M GdmCl, 500 mM Imidazol, pH ^{RT} 8,0
Puffer D	50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 200 mM L-Arginin, 5 % (w/v) Glycerin, pH ^{4 °C} 8,0
Puffer E	50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 500 mM Imidazol, pH ^{4 °C} 8,0

Die Reinigung von βA2-wt erfolgte ebenfalls aus *inclusion bodies*. Trotz der Fusion mit dem häufig löslichkeitserhöhenden SUMO-tag konnte das Zielprotein nicht wasserlöslich in *E. coli*-Zellen produziert werden. Die Präparation der *inclusion bodies* erfolgte wie unter 2.2.3.2.2 beschrieben mit Puffer A. Die gelösten *inclusion bodies* wurden mit einer Flussgeschwindigkeit von 3 ml/min an Puffer B bei Raumtemperatur auf zwei miteinander verbundene Ni-NTA-Säulen (je 5 ml Säulenvolumen) aufgetragen (erste Ni-NTA-Chromatographie). Unspezifisch an das Säulenmaterial bindende Proteine wurden durch Waschen mit 150 ml 4 % (v/v) Puffer C verdünnt mit Puffer B (20 mM Imidazol) entfernt. Die Elution des SUMO-Fusionsproteins erfolgte mit 50 % (v/v) Puffer C verdünnt mit Puffer B (250 mM Imidazol). Dazu wurden die ersten 8 ml, das etwaige Totvolumen der Säule, verworfen und 25 ml des Eluats mit dem darin enthaltenen SUMO-Fusionsprotein gesammelt. Die Säule wurde nach der Elution des Zielproteins mit 100 ml Puffer C und weiteren 100 ml ddH₂O

gespült. Der Lösung mit SUMO-Fusionsprotein wurde danach *ad* 10 mM DTT zugegeben und die Rückfaltung des Eluats (25 ml) durch tropfenweises Verdünnen mit einer Flussrate von 0,5 ml/min (P-1 Peristaltikpumpe; Pharmacia, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE) in 500 ml eiskalten Puffer D unter Rühren auf Eis induziert. Dem Rückfaltungsansatz (ca. 0,1 mg/ml) wurde eine geeignete Menge an SUMO-Protease Ulp1 (1 mg Protease pro 150 mg Substrat) zugegeben und über Nacht gegen 5 l Puffer D dialysiert (Dialyseschlauch Spectra/Por 1, NMGG 6 - 8 kDa). Während der Dialyse wird noch vorhandenes Imidazol entfernt und der SUMO-*tag* durch Ulp1-Protease vom Zielprotein abgeschnitten. Während des Verdaus entstehende Aggregate wurden durch Zentrifugation abgetrennt (JLA 16.250 Rotor, 40 min, 19 800 g, 4 °C). Die zweite Ni-NTA-Affinitätschromatographie erfolgte analog zur Ersten jedoch auf Eis mit Puffer D und E. Anders als bei der ersten Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurde hier der Durchfluss gesammelt. Der SUMO-*tag* und Ulp1 besitzen beide einen N-terminalen His₆-*tag* und binden somit an die Ni-NTA-Säule, während das Zielprotein nicht mit dem Säulenmaterial interagiert und bereits im Durchfluss eluiert. Die Säule wurde zur Regeneration mit 100 ml Puffer E und weiteren 100 ml ddH₂O gespült. Abschließend wurde das *tag*-freie Zielprotein auf 2 - 5 ml konzentriert (Amicon Ultra-15 Zentrifugeneinheit, NMGG 10 kDa, 6 700 g, 4 °C), auf eine HiLoad 26/600 Superdex 200 pg Gelfiltrationssäule aufgetragen und mit einer Flussrate von 2 ml/min mit Puffer D mit 1 mM DTT chromatographiert. Nach 80 ml Elutionsvolumen wurde mit dem Sammeln von 2 ml Fraktionen begonnen.

2.2.3.2.4 Murines β A2-Kristallin S47P

Puffer A	50 mM Tris/HCl, 1 mM DTT, pH ^{4 °C} 8,0
Puffer B	50 mM Tris/HCl, 1 mM DTT, 6 M GdmCl, pH ^{4 °C} 8,0
Puffer C	50 mM Tris/HCl, 1 mM DTT, 6 M GdmCl, 1 M NaCl, pH ^{4 °C} 8,0
Puffer D	50 mM Tris/HCl, 500 mM L-Arginin, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, pH ^{4 °C} 7,5

Die β A2-S47P enthaltenden *inclusion bodies* wurden wie unter 2.2.3.2.2 beschrieben mit Puffer A präpariert und über eine selbstgepackte XK 26/20 Q-Sepharose *Fast-Flow* Säule mit Puffer B, Puffer C gereinigt (2.2.3.2.1). Das konzentrierte Eluat (ca. 8 ml, 270 μ M) wurde 54-fach unter Rühren tropfenweise mit einer Flussrate von 0,5 ml/min (P-1 Peristaltikpumpe; Pharmacia, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE) zu einer Endkonzentration von 5 μ M in 500 ml eiskaltem Puffer D verdünnt und über Nacht gegen 5 l Puffer D dialysiert. Das Dialysat wurde danach auf 10 μ M (ca. 0,2 mg/ml) konzentriert. Die Aliquotgröße betrug 2 - 5 ml. Aufgrund der Aggregationsanfälligkeit der β A2-S47P Variante, konnte die Proteinlösung nicht stärker konzentriert werden.

2.2.3.2.5 Murines wildtyp- γ D-Kristallin

Puffer A	50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 0,5 mM DTT, pH ^{4 °C} 8,0
Puffer B	50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 500 mM Imidazol, pH ^{4 °C} 8,0
Puffer C	PBS, 1 mM DTT, pH 7,4

Das SUMO-Fusionsprotein wurde aus dem löslichen Überstand nach dem Zellaufschluss gereinigt (2.2.3.1). Die erste Ni-NTA-Chromatographie erfolgte analog zu der unter 2.2.3.2.3 Beschriebenen mit Puffer A und Puffer B. Das Eluat wurde auf 10 ml konzentriert (Amicon Ultra-15 Zentrifugeneinheit, NMGG 10 kDa, 6 700 g, 4 °C) und über Nacht, unter Zugabe einer geeigneten Menge Ulp1-Protease, gegen 5 l Puffer A mit 1 mM DTT dialysiert. Nach der zweiten Ni-NTA-Chromatographie wurde die Proteinlösung auf 2 ml konzentriert und über eine HiLoad 16/600 Superdex 200 pg Gelfiltrationssäule mit Puffer A mit 1 mM DTT bei einer Flussrate von 1 ml/min chromatographiert. Nach 30 ml Elutionsvolumen wurde mit dem Sammeln von 2 ml Fraktionen begonnen. Abschließend wurde das konzentrierte Eluat der Gelfiltrationschromatographie gegen 5 l Puffer C über Nacht dialysiert.

2.2.3.2.6 Murines γ D-Kristallin V76D

Puffer A	50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH ^{4 °C} 8,0
Puffer B	50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 6 M GdmCl, pH ^{4 °C} 8,0
Puffer C	50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 6 M GdmCl, 500 mM Imidazol, pH ^{4 °C} 8,0
Puffer D	50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 200 mM L-Arginin, 50 mM L-Glutamat, 5 % (w/v) Glycerin, pH ^{4 °C} 8,0
Puffer E	50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 500 mM Imidazol, pH ^{4 °C} 8,0

Die Reinigung erfolgte analog zu dem für β A2-wt beschriebenen Protokoll (2.2.3.2.3). Die abschließende Gelfiltrationschromatographie wurde mit einer HiLoad 16/600 Superdex 200 pg Gelfiltrationssäule mit einer Flussrate von 1 ml/ml mit Puffer D mit 1 mM DTT und einem Auftragsvolumen von 1 ml durchgeführt.

2.2.3.2.7 Humanes Hsc70*

Puffer A	40 mM HEPES/KOH, 150 mM KCl, 350 mM NaCl, 20 mM MgCl ₂ , 5 % (w/v) Glycerin, 10 mM Imidazol, 1 mM DTT, 0,5 mM ATP, pH ^{4 °C} 7,5
Puffer B	40 mM HEPES/KOH, 150 mM KCl, 350 mM NaCl, 20 mM MgCl ₂ , 5 % (w/v) Glycerin, 300 mM Imidazol, 1 mM DTT, 0,5 mM ATP, pH ^{4 °C} 7,5
Puffer C	40 mM HEPES/KOH, 150 mM KCl, 5 mM MgCl ₂ , pH ^{4 °C} 7,5

Die SUMO-Hsc*-Variante wurde in Autoinduktionsmedium nach Studier produziert und wie unter 2.2.3.1 beschrieben aufgeschlossen (109). Die Reinigung von Hsc* (W90,580F, 647G, 648C) erfolgte nach dem Reinigungsprotokoll von Dr. rer. nat. Oliver Lorenz (Lehrstuhl für Biotechnologie, Technische Universität München, DEU). Die Nickel-Affinitäts- und Gelfiltrationschromatographie wurde wie für murines γ D-Kristallin beschrieben durchgeführt (2.2.3.2.5). Die Elution des SUMO-Fusionsproteins geschah jedoch mit 100 % Puffer B.

2.2.4 Inkorporation von pCNF in humanes α B-Kristallin

18-Aminosäuremischung (25x)	56 mM Ala, 24 mM Arg, 33 mM Asn, 38 mM Asp, 30 mM Glu, 34 mM Gln, 67 mM Gly, 24 mM His, 38 mM Ile, 38 mM Leu, 27 mM Lys, 34 mM Met, 30 mM Phe, 43 mM Pro, 48 mM Ser, 42 mM Thr, 24 mM Trp, 43 mM Val
Spurenelemente (5000x)	20 mM CaCl ₂ , 10 mM MnCl ₂ , 10 mM ZnSO ₄ , 2 mM CoCl ₂ , 2 mM CuCl ₂ , 2 mM NiCl ₂ , 2 mM Na ₂ MoO ₄ , 2 mM Na ₂ SeO ₃ , 2 mM H ₃ BO ₃ , 50 mM FeCl ₃
Puffer M (50x)	1,25 M Na ₂ HPO ₄ , 1,25 M KH ₂ PO ₄ , 2,5 M NH ₄ Cl, 0,25 M Na ₂ SO ₄
Magnesiumsulfatlösung (500x)	1 M MgSO ₄
Nicht-induzierendes Medium	0,5 % (w/v) Glycerin, 0,05 % (w/v) D-(+)-Glukose, 2 % (v/v) Puffer M (x50), 0,2 % (v/v) Magnesiumsulfatlösung (500x), 5 % (v/v) 375 mM Aspartatlösung pH ^{RT} 7,5, 0,4 % (v/v) 31 mM Leucinlösung pH ^{RT} 7,5, 4 % (v/v) 18-Aminosäuremischung, 0,02 % (v/v) Spurenelemente (5000x)
Induzierendes Medium	Nicht-induzierendes Medium mit 0,05 % (w/v) L-(+)-Arabinose, 0,04 % (v/v) 100 mM pCNF, pH ^{RT} 7,5

Die Inkorporation der unnatürlichen Aminosäure para-Cyanophenylalanin (L-4-Cyanophenylalanin, pCNF) erfolgte nach dem Protokoll von Hammill *et al.* in *E. coli* DH10B (110). Dafür wurde das, für ein Typtophan an Position 9 in der Primärsequenz codierende, Basentriplett gegen das Amber-Stopcodon (TAG) ausgetauscht. Weiterhin wurde das an Position 60 vorkommende Tryptophan gegen Phenylalanin ausgetauscht. Für die Produktion des Zielproteins α B-pCNF wurde ein mit pDule-pCNF und pBAD- α B-pCNF transformierter *E. coli* DH10B-Einzelklon über Nacht in nicht-induzierendem Medium angezogen (mit 100 μ g/ml Amp, 50 μ g/ml Spc). Die Übernachtskultur wurde 100-fach in 500 ml vorgewärmtes induzierendes Medium (mit 50 μ g/ml Amp, 25 μ g/ml Spc in 2l-Schikanekolben) verdünnt und bei 37 °C, 120 rpm für 16 h kultiviert. Die Konzentration an pCNF betrug 4 mM. Die Zellernte und der -aufschluss erfolgte wie unter 2.2.3.1 beschrieben. Die Proteinreinigung wurde analog dem Protokoll für murines α A-wt durchgeführt (2.2.3.2.1).

2.2.5 Kovalente Modifikation von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Markierungspuffer A	PBS, pH 7,4
Markierungspuffer B	100 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH ^{RT} 7,8
Markierungspuffer C	40 mM HEPES/KOH, 150 mM KCl, 5 mM MgCl ₂ , 0,1 mM ATP, pH ^{RT} 7,2

Die unspezifische kovalente Modifikation von freien Aminogruppen in Lysozym und RCM- α -Lactalbumin erfolgte mit dem NHS-Ester-Derivat von Atto488. Dazu wurde das jeweilige Protein mit einem 1,1-fachen molaren Überschuss an Atto488-NHS-Ester (Stammlösung in DMSO) versetzt und für 2,5 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Für Lysozym erfolgte die Markierung in Markierungspuffer A, für RCM- α -Lactalbumin in Markierungspuffer B. Die Kopplung der Farbstoffe Atto488-Maleimid oder IAEDANS an Hsc70* erfolgte über freie Thiole, präferenziell an der Thiolgruppe des eingefügten C-terminalen Cystein 648, in Markierungspuffer C (111). Vor Zugabe des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffs wurde das Protein mit einem 10-fachen molaren Überschuss an TCEP für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde ein 10-facher molarer Überschuss an Atto488-Maleimid (gelöst in DMSO) oder 25-facher molarer Überschuss an IAEDANS (gelöst in DMF) zugegeben und der Markierungsansatz über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Freier Fluoreszenzfarbstoff wurde anschließend über eine Illustra NAP-5 und PD-10 Entsalzungssäule im jeweiligen Markierungspuffer abgetrennt. Die Proteinlösung wurde konzentriert (Amicon Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheit, NMGG 10 kDa, 6 700 g, 4 °C), aliquotiert und bis zu Verwendung bei -80 °C gelagert. Bei der Konzentration wurde die Absorption des Farbstoffs bei 280 nm berücksichtigt (Tabelle 3).

2.2.6 Herstellung von RCM- α -Lactalbumin

Reduktionspuffer 200 mM Tris/HCl, 7 M GdmCl, 2 mM EDTA, pH^{RT} 8,7

Elutionspuffer 100 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH^{RT} 7,8

Zur Herstellung von permanent entfaltetem aber löslichem, reduziert carboxymethyliertem α -Lactalbumin (UniProt-ID: B6V3I5-1), wurden 10 mg Protein in 315 μ l Reduktionspuffer gelöst und *ad* 50 mM TCEP zugegeben. Die Lösung wurde 90 min bei Raumtemperatur inkubiert und *ad* 23 mM Natriumiodacetat zugegeben. Nach 15 min Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur, wurde freies Iodacetat über eine Illustra NAP-5 und PD-10 Entsalzungssäule in Elutionspuffer abgetrennt. Die Proteinlösung wurde auf 450 μ M konzentriert (Amicon Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheit, NMGG 10 kDa, 6 700 g, 4 °C), aliquotiert und bis zu Verwendung bei -80 °C gelagert. Als Extinktionskoeffizient bei 280 nm (ϵ_{280}) wurde 27 960 M⁻¹ cm⁻¹ verwendet.

2.2.7 Spektroskopische Methoden

Vor allen Messungen wurden die Proteinstammlösungen abzentrifugiert (10 min, 20 800 g, 4 °C) und die Konzentration an einem NanoDrop ND-2000 oder ND-1000 UV/Vis-Spektrophotometer nachbestimmt (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Alle Messpuffer wurden durch 0,22 μ m Spritzenvorsatzfilter (Millex-GS, 0,22 μ m, 25 mm, Zellulosemischester; Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, DEU) filtriert und vor Verwendung mindestens 20 min entgast. Sofern nicht im Folgenden angegeben, sind die genauen bei Messungen verwendeten Proteinkonzentrationen, Puffer und Parameter in den jeweiligen Bildunterschriften angegeben.

2.2.7.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Massenkonzentration von Proteinmischungen wurde nach Bradford an einem Jasco V-550 UV/Vis-Spektrophotometer (Jasco Corporation, Tokyo, JPN) gemäß den Angaben der Serva Electrophoresis GmbH durchgeführt (112). Als Eichprotein wurde Serumalbumin aus Rind (BSA; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) verwendet und eine Eichgerade zwischen 0 und 15 μ g (0 - 13,6 μ g/ml) BSA erstellt. Dazu wurden 1000 μ l Bradford-Lösung (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU) in Einwegplastikküvetten vorgelegt, das benötigte Volumen an BSA (Stammlösung: 0,2 mg/ml in PBS) zugegeben, auf 1100 μ l mit ddH₂O aufgefüllt und die Extinktion bei 595 nm bestimmt. Zur Konzentrationsbestimmung von Proteingemischen wurde analog vorgegangen und ein geeignetes Volumen an Proteinlösung gewählt, deren resultierende Extinktion zwischen 0,05 und 0,8 lag. Durch lineare Regression der Daten konnte anhand der resultierenden Eichgerade die Massenkonzentration von Proteinmischungen bestimmt werden.

2.2.7.2 Circular dichroism spectroscopy

Messpuffer PBS, pH 7,4

Fern-UV-Circular dichroism spectra were recorded on an Applied Photophysics Chirascan V100 (Applied Photophysics Limited, Leatherhead, GBR), Jasco J-710 or J-715 (Jasco Corporation, Tokyo, JPN). The protein concentration was 10 μM in the buffer. Quartz cuvettes with a path length of 0.1 cm were used. The spectra were recorded from 185 to 260 nm with a resolution of 0.2 nm. The scan rate was 200 nm/min, the slit width was 2 nm and the integration time was 2 s. The temperature was 15 $^{\circ}\text{C}$ for native protein spectra and 90 $^{\circ}\text{C}$ for denatured protein spectra. For each sample, ten individual spectra were recorded, averaged, and the buffer spectrum was subtracted. The measured ellipticity was converted to the molar ellipticity $[\Theta]_{\text{MRW}}$ according to equation (1). For β - and γ -crystallins, 1 mM DTT was added to the buffer.

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\Theta}{c \cdot d \cdot N_{\text{AS}} \cdot 10} \quad (1)$$

$[\Theta]_{\text{MRW}}$: measured quantity, molar ellipticity per amino acid residue ($\text{Grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$); Θ : measured ellipticity (Grad); d : path length (cm); c : protein concentration of the sample (M); N_{AS} : number of amino acids in the protein

The measurements were performed in collaboration with Nicole Lim, Ph.D. (Chair of Biotechnology, Technical University of Munich, DEU).

2.2.7.2.1 Thermally induced unfolding transitions

Messpuffer PBS, pH 7,4

The thermal unfolding of proteins was monitored by measuring the change in CD signal at 222 nm on an Applied Photophysics Chirascan V100 (Applied Photophysics Limited, Leatherhead, GBR). The protein concentration was 10 μM in the buffer, the heating rate was 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, the integration time was 8 s and the slit width was 1 nm. The unfolding transition was monitored by the increase in CD signal at 222 nm. Under the assumption of a two-state model, the thermal unfolding transitions were evaluated according to equation (2) (113).

$$y(T) = \frac{y_{\text{N}}^0 + m_{\text{N}} \cdot [T] + (y_{\text{U}}^0 + m_{\text{U}} \cdot [T]) \cdot e^{\left\{ -\frac{\Delta H_{\text{vH}}}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{\text{M}}} \right) - \frac{\Delta C_{\text{P}}}{R} \cdot \left[1 - \frac{T_{\text{M}}}{T} + \ln \left(\frac{T_{\text{M}}}{T} \right) \right] \right\}}}{1 + e^{\left\{ -\frac{\Delta H_{\text{vH}}}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{\text{M}}} \right) - \frac{\Delta C_{\text{P}}}{R} \cdot \left[1 - \frac{T_{\text{M}}}{T} + \ln \left(\frac{T_{\text{M}}}{T} \right) \right] \right\}}} \quad (2)$$

$y(T)$: Messgröße, gemessene Elliptizität in Grad in Abhängigkeit der Temperatur; y_N^0, y_U^0 : theoretische Messgröße für natives bzw. denaturiertes Protein bei 0 K; m_N, m_U : Steigung der Basislinie des nativen bzw. denaturierten Proteins (K^{-1}); ΔH_{vH} : van't Hoff-Enthalpie der Entfaltungsreaktion ($J \cdot mol^{-1}$); ΔC_P : Änderung der molaren Wärmekapazität ($J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$); R : allgemeine Gaskonstante ($J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$); T : Temperatur (K); T_M : Temperatur am Übergangsmittelpunkt (K)

Mit den aus Gleichung (2) ermittelten Werten für den Übergangsmittelpunkt T_M und für die van't Hoff-Enthalpie ΔH_D wurde nach Gleichung (3) die konformationelle Stabilität des Proteins berechnet (114).

$$\Delta G_D(T) = \Delta H_{vH} \cdot \left(1 - \frac{T}{T_M}\right) - \Delta C_P \cdot \left[T_M - T + T \cdot \ln\left(\frac{T}{T_M}\right)\right] \quad (3)$$

$\Delta G_D(T)$: freie Enthalpie der Entfaltung in Abhängigkeit der Temperatur ($J \cdot mol^{-1}$); ΔH_{vH} : van't Hoff-Enthalpie der Entfaltungsreaktion in ($J \cdot mol^{-1}$); ΔC_P : Änderung der molaren Wärmekapazität ($J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$); T : Temperatur (K); T_M : Temperatur am Übergangsmittelpunkt (K)

Bei der thermischen Entfaltung von γD -V76D wurde ein biphasischer Übergang beobachtet. Dies bedeutet, dass während der Entfaltung ein beobachtbares Intermediat gebildet wird. Vermutlich ist die Entfaltung der einzelnen Domänen des Zweidomänenproteins γD -V76D auflösbar. Das Intermediat würde demnach eine entfaltete und eine noch gefaltete Domäne besitzen. Die Auswertung des thermischen Übergangs erfolgte daher nach dem Dreizustandsmodell unter Berücksichtigung der beiden Gleichgewichtskonstanten der Entfaltung K_1 und K_2 (Gleichung (4)) (115).



$$K_1 = \frac{[I]}{[N]} \quad ; \quad K_2 = \frac{[U]}{[I]} \quad (5)$$

K_1 : Gleichgewichtskonstante des Übergangs von N nach I; K_2 : Gleichgewichtskonstante des Übergangs von I nach U; N: natives Protein; I: Intermediat; U: entfaltetes Protein

Die Gesamtkonzentration an Protein [P] setzt sich aus der Summe der Konzentrationen an nativem Protein [N], Intermediat [I] und denaturiertem Protein [U] zusammen (Gleichung (6)). Durch Kombination von Gleichung (5) und (6) ergibt sich nach Umformung Gleichung (7). Hieraus kann die Konzentration an denaturiertem Protein in Abhängigkeit der Gesamtkonzentration berechnet werden.

$$[P] = [N] + [I] + [U] \quad (6)$$

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Untersuchungen zur Entstehung von Katarakt

Bisherige Arbeiten zur Erforschung der Kataraktgenese mit Augenlinsenproteinen aus Gewebsextrakten und rekombinant produzierten Proteinen geben ein zunehmend klareres Bild der molekularen Vorgänge bei der Linsentrübung. Allerdings fand bisher noch keine tiefere biologische und biochemische Vergleichsanalyse zwischen kataraktösen Linsen und rekombinanten Proteinen statt, in denen dieselbe Katarakt-assoziierte Mutation in einer Kristallinisoform vorliegt. Um diese Verständnislücke zu füllen und die Vergleichbarkeit zwischen den beiden Forschungsansätzen sicherzustellen, wurden sowohl Messungen mit Wildtyp-Mäusen und Kataraktmutanten als auch mit rekombinanten Katarakt-assoziierten Kristallinisoformen durchgeführt. In Abbildung 7 ist ein Überblick über den, für die Vergleichsanalyse zwischen der intakten Augenlinse bzw. Extrakten daraus und rekombinantem Protein, verwendeten Arbeitsfluss dargestellt.

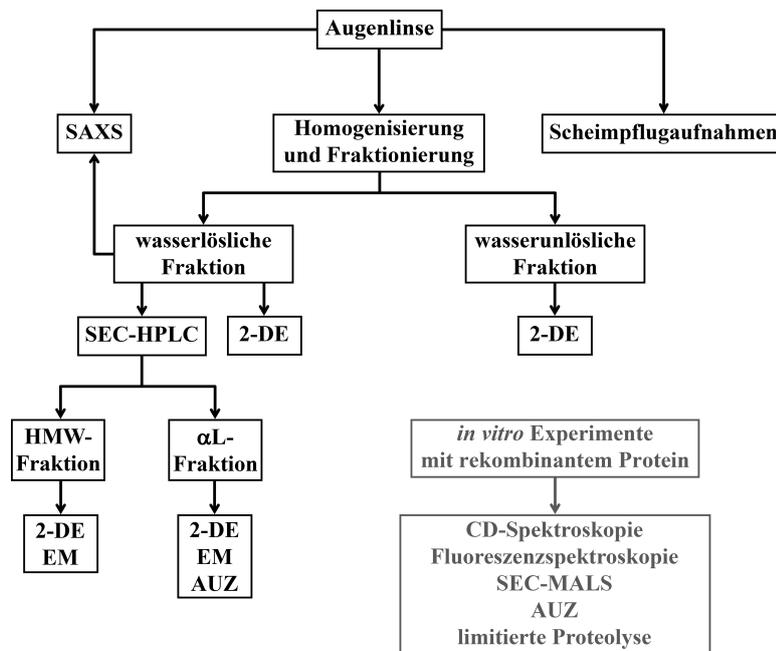


Abbildung 7: Übersicht über den Arbeitsfluss zur Charakterisierung der murinen Kristalline. Zur Bestimmung der optischen Durchlässigkeit der Linse wurden Scheimpflugaufnahmen von lebenden Tieren angefertigt. Ausgehend von der isolierten Augenlinse wurden SAXS-Profile gemessen. Nach der Homogenisierung und Fraktionierung in die wasserlösliche und -unlösliche Fraktion, wurden die Proteine in den beiden Fraktionen mittels 2-DE untersucht. Mit der wasserlöslichen Fraktion fand zusätzlich eine Charakterisierung durch SEC-HPLC statt. Die Proteine der HMW- und α L-Fraktion wurden nachgeordnet mit 2-DE, EM und im Falle der α L-Fraktion mit AUZ untersucht. Als komplementärer Ansatz wurden verschiedene spektroskopische, chromatographische und gelelektrophoretische Experimente mit rekombinantem Protein (in grau dargestellt) durchgeführt, um eine mögliche Korrelation mit den *in vitro* Eigenschaften von Katarakt-assoziierten Proteinvarianten und der *in vivo* Situation in Mäusen aufzuzeigen.

Um ein besseres Verständnis der Alterungsvorgänge in der Augenlinse zu erlangen, wurden zwei Wildtyp-Stämme (C3HeB/FeJ, C57Bl/6J) und drei Katarakt-Stämme (Aca30, Aey4 und Aey7) in der Proteinzusammensetzung ihrer Augenlinsen analysiert und ausgewählte Proteinfractionen nach

chromatographischer Trennung von Linsenextrakten näher untersucht. Aey4- und Aey7-Mäuse basieren auf dem C3HeB/FeJ Wildtyp-Stamm, Aca30-Mäuse auf dem C57Bl/6J Wildtyp-Stamm. Der untersuchte Zeitraum erstreckte sich von der Geburt der Tiere bis hin zu 12 Monaten. Von allen Tieren ab einem Alter von 3 Monaten wurden Scheimpflugaufnahmen der Augenlinse angefertigt, die eine Aussage über den Trübungsgrad ermöglichten. Für alle anderen Experimente wurden die isolierten Augenlinsen verwendet. Mit isolierten, intakten Linsen wurden SAXS-Experimente durchgeführt, um mögliche strukturelle Unterschiede in der Augenlinse von Wildtyp- und mutierten Mäusen zu erkennen. Für die weiteren Experimente wurden die Linsen homogenisiert und die Proteine im erhaltenen Rohextrakt in eine wasserlösliche und -unlösliche Fraktion unterteilt. Zunächst wurde die Proteinzusammensetzung der beiden Fraktion mittels 2-DE untersucht, um mögliche Unterschiede zwischen den beiden Anteilen darzustellen. Die wasserlösliche Fraktion der Linsenextrakte wurde durch SEC-HPLC weiter fraktioniert und ausgewählte Fraktionen (HMW- und α L-Fraktion) mittels 2-DE, EM und AUZ untersucht. Um den *in vivo* beobachteten Phänotypen mit *in vitro* Daten, durch Messungen mit rekombinanten Proteinen, korrelieren oder sogar voraussagen zu können, wurden drei Katarakt-assoziierte Proteinvarianten biochemisch charakterisiert. Diese Varianten entsprechen dabei den in den Katarakt-Stämmen vorkommenden Proteinen und decken Katarakt-assoziierte Mutationen in allen drei Kristallinfamilien (α -, β - und γ -Kristalline, Abbildung 3) ab. Diese Mutationen sind: α A-V124E (Aey7-Mäuse), β A2-S47P (Aca30-Mäuse) und γ D-V76D (Aey4-Mäuse).

3.1.1 Biochemische Charakterisierung des Proteoms von Wildtyp-Mäusen

Um pleiotrope Effekte, die durch den unterschiedlichen genetischen Hintergrund der Kataraktmutanten zustande kommen könnten auszuschließen, wurden zunächst die zugrundeliegenden Wildtyp-Stämme C3HeB/FeJ und C57Bl/6J vergleichend untersucht. Die Wildtyp-Stämme unterscheiden sich zwar in ihrem Körpergewicht (Tabelle S3), zeigen aber ein ähnliches Linsenfeuchtgewicht und eine ähnliche Menge an extrahierbarem Gesamtprotein. Die Zunahme des Linsenfeuchtgewichts korreliert mit der Zunahme des Körpergewichts bei heranwachsenden Mäusen und liegt zwischen etwa 5 mg für neugeborene Mäuse (0 mo.) und etwa 20 mg für gealterte Mäuse (12 mo.) (Abbildung 8a). Auch ist der Anteil an wasserlöslichem bzw. -unlöslichem Protein an der extrahierten Proteinmenge vergleichbar (Abbildung 8b). Aus den Linsen sind circa 0,3 mg bis 7 mg Protein extrahierbar, wobei die extrahierbare Proteinmenge in mg pro mg Linsenfeuchtgewicht in der wasserlöslichen und -unlöslichen Fraktion sehr gut zwischen den Wildtyp-Stämmen vergleichbar ist (Abbildung S1). Allerdings erhöht sich der relative Mengenanteil in der wasserunlöslichen Fraktion mit dem Alter deutlich. Liegt dieser bei bis zu 4 % (w/w) erhöht er sich um das etwa 6-fache auf 23 % (w/w) in gealterten Linsen. Bezogen auf das Linsenfeuchtgewicht, macht der Proteinanteil in der Augenlinse etwa 30-35 % (w/w) aus (Abbildung 8b). Der Proteinanteil in den Linsen der Wildtyp-Stämme liegt damit in dem für Säugetiere in der Literatur beschriebenen Bereich von 30-40 % des Linsenfeuchtgewichts. Der Anteil an wasserlöslichem und -unlöslichem Protein stimmt ebenfalls gut

mit der Literatur überein (121). Nachdem grundlegende Parameter wie das Linsenfeuchtgewicht, die extrahierbare Proteinmenge sowie der Anteil der wasserlöslichen und -unlöslichen Fraktion für die beiden Wildtyp-Stämme vergleichbar waren, wurde das Proteom der Linse genauer analysiert (Abbildung 9).

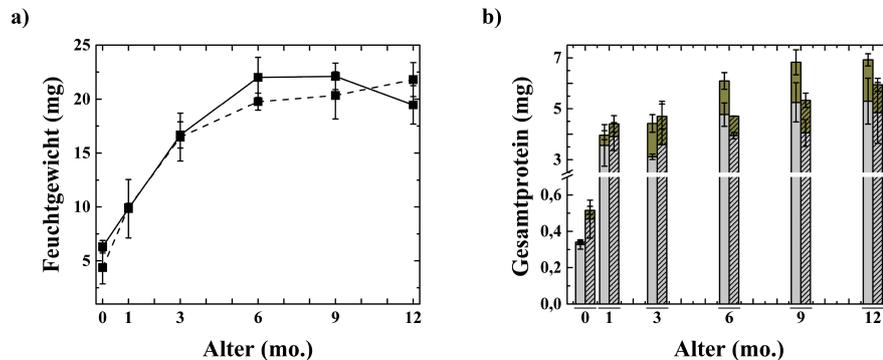


Abbildung 8: Linsenfeuchtgewicht und Menge an extrahierbarem Protein in C3HeB/FeJ und C57Bl/6J Wildtyp-Mäusen. Das paarweise Linsenfeuchtgewicht der Wildtyp-Stämme C3HeB/FeJ (—) und C57Bl/6J (---) wurde nach Isolation der Linsen an einer Feinwaage bestimmt. Die Bestimmung des Gesamtproteins in der wasserlöslichen und -unlöslichen Fraktion erfolgte nach Bradford. Die Gesamtmenge an Protein in der Linse von C3HeB/FeJ (glatte Balken) und C57Bl/6J (schraffierte Balken) Wildtyp-Mäusen setzt sich aus dem wasserlöslichen (grau) und -unlöslichen (grün) Anteil zusammen.

In Abbildung 9 sind die 2D-Karten der wasserlöslichen und Fraktion aus Linsenextrakten von 0 (neugeborenen) und 12 Monate alten Wildtyp-Linsen gezeigt. In der Linse von neugeborenen Wildtyp-Mäusen sind alle 18 Kristallinisoformen detektierbar (Isoformen: siehe Abbildung 3) und mittels MALDI-TOF-MS eindeutig zuordenbar. Die Zuordnung der Proteinspots erfolgte mehrfach redundant und stimmte sehr gut mit der in der Literatur für C57Bl/6J beschriebenen überein (18). Eine exemplarische Übersicht über die 2D-Karten der wasserlöslichen und -unlöslichen Fraktion aller verwendeten Mausstämmen ist in Abbildung S2 gezeigt.

Während α A-Kristallin einen isoelektrischen Punkt bei einem leicht sauren pH von etwa 6 zeigt, fokussiert α B-Kristallin bei einem basischeren pH von etwa 7, wie es auch für α B-Kristallin aus anderen Vertebraten beschrieben ist (122). Die γ -Kristalline laufen gruppiert um einem pH von etwa 7,5. Die Isoformen γ B- und γ C-, sowie γ E- und γ F-Kristallin können mittels 2-DE nicht getrennt werden und wurden daher zusammengefasst. Die β -Kristalline hingegen zeigen die typische Aufteilung in eine saure (β A1, β A2, β A3, und β A4) und basische (β B1, β B2, und β B3) Gruppe. Dieses Laufverhalten der Proteine ist für beide Wildtyp-Stämme beobachtbar (Abbildung 9a,b). Während des Alterns kommt es zu einer zunehmenden Modifikation der Kristalline in der Augenlinse (Abbildung 9c,d). In den 2D-Karten der wasserlöslichen Fraktion von Linsenextrakten ist eine deutliche Modifikation der α -Kristalline (α A- und α B-Kristallin) zu erkennen, die ein verändertes Laufverhalten der Proteine bei der 2-DE im Vergleich zum unmodifizierten Volllängenprotein verursacht. Dabei ist ein gehäuftes Vorkommen der modifizierten α -Kristalline in der wasserunlöslichen Fraktion mit zunehmendem Alter zu beobachten (Abbildung S4). Als auftretende

Modifikationen sind Deamidierung, Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Carbamylierung, Racemisierung, Oxidation, Glykosylierung, Glykierung und Trunkierungen beschrieben (15,123). Neben den α -Kristallinen, werden auch die β -Kristalline stark während des Alterns modifiziert. Davon sind insbesondere β A1-, β A4- und β B3-Kristallin betroffen. Solche Modifikationen der β -Kristalline wurde bereits für andere Wildtyp-Mäuse und den Menschen beschrieben (124,125). Während des Alterns finden zudem noch andere Änderungen im murinen Proteom statt. So nimmt der relative Anteil von β B2-Kristallin nach der Geburt sehr stark zu, während es durch den Alterungsprozess zu einem fast vollständigen Abbau von γ A- und einer Reduktion des relativen Anteils von γ E/F- kommt. Der Anteil an γ B/C-Kristallin hingegen nimmt deutlich weniger stark ab. Insgesamt sinkt der relative Anteil an γ -Kristallinen während des Alterns am meisten (siehe auch Abbildung S3). Solche proteolytischen Prozesse, wie der (un-) vollständige Abbau von Proteinen in der Augenlinse und die Akkumulation von Fragmenten könnten auch an der Kataraktgenese beteiligt sein (126,127).

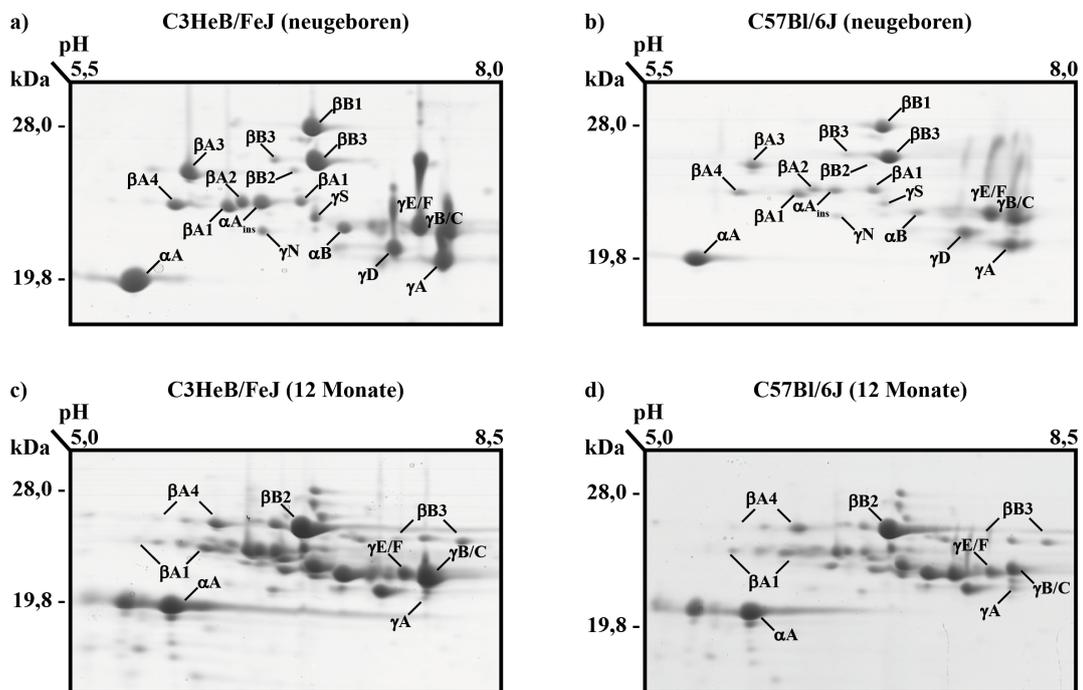


Abbildung 9: 2D-Karten der wasserlöslichen Fraktion von Linsenextrakten aus neugeborenen und 12 Monate alten Wildtyp-Mäusen. Gezeigt ist die niedermolekulare Kristallinregion der wasserlöslichen Fraktion von Linsenextrakten aus neugeborenen und 12 Monate alten C3HeB/FeJ (a, c) bzw. C57Bl/6J (b, d) Mäusen. Während des Alterns kommt es insbesondere zu einer Modifikation der α - und β -Kristalline. Die Modifikation von α A- und α B-Kristallin, aber auch β A1-, β A4- und β B3-Kristallin, zeigt sich durch ein geändertes Laufverhalten des Proteins bei der 2-DE verglichen mit dem unmodifizierten Volllängenprotein (siehe c) und d)). Zu den beschriebenen Modifikationen zählen Deamidierung, Phosphorylierung, Methylierung, Acetylierung, Carbamylierung, Racemisierung, Oxidation und Trunkierungen. Dabei kommt es einer Häufung von modifizierten α -Kristallinen in der wasserunlöslichen Fraktion im Alter. Bei γ A-Kristallin hingegen findet ein fast vollständiger proteolytischer Abbau während des Alterns statt. Für die 2-DE wurden bis zu 150 μ g Protein aufgetragen.

3.1.1.1 Die Plastizität des Proteoms in der Augenlinse von Wildtyp-Mäusen

Um einen besseren, zeitlich aufgelösten Überblick über die Plastizität des Augenlinsenproteoms von Wildtyp-Mäusen zu erlangen, wurden die 2D-Karten densitometrisch analysiert. Dazu wurde die wasserlösliche und -unlösliche Fraktion von Linsenextrakten der beiden Wildtyp-Stämme vom neugeborenen (0 mo.) bis 12 Monate alten Zustand herangezogen. Ein Alter von 12 Monaten bei Mäusen entspricht dabei einem menschlichen Alter von etwa 38-47 Jahren (128). Zur Auftragung des zeitlichen Verlaufs von Veränderungen im Proteom der murinen Augenlinse, wurde die Färbungsintensität aller Proteinspots im niedermolekularen Kristallinbereich nach der 2-DE bestimmt. Das Signal der Kristalline machte dabei mehr als 90% der Gesamtsignals in den Extrakten aus (Abbildung S2). Die Signale der einzelnen Isoformen wurden den drei Kristallinfamilien α -, β -, und γ -Kristalline zugeordnet. Für die densitometrische Analyse der 2D-Karten von Linsenextrakte, wurde daher nur das Färbungssignal der Kristalline nach der 2-DE berücksichtigt und auf 1 respektive 100 % normiert. Bei neugeborenen Mäusen liegen etwa 15-20 % α -Kristallin, 25-30 % β -Kristallin und 50-60 % γ -Kristallin vor (Abbildung 10).

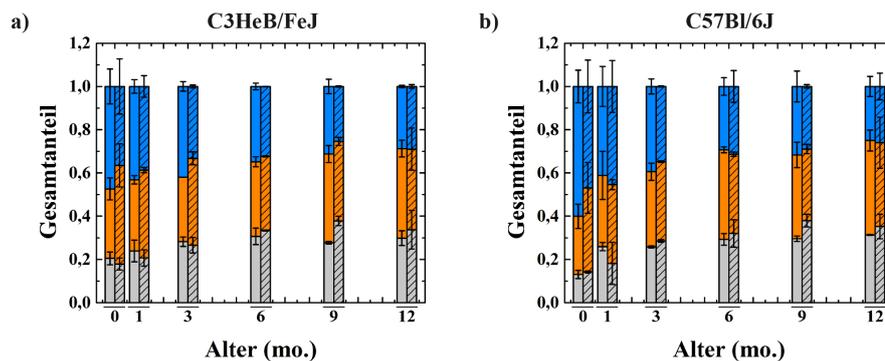


Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der relativen Kristallinanteile in der alternden Augenlinse von Wildtyp-Mäusen. Aufgetragen sind die relativen Anteile der drei Kristallinfamilien (α - (grau), β - (orange), und γ -Kristalline (blau)). Die einzelnen Isoformen wurden im entsprechenden, gefärbten 2D-Gel nach densitometrischer Analyse der jeweiligen Kristallinfamilie zugeordnet und auf das Gesamtsignal normiert. Ermittelt wurden die Anteile in der wasserlöslichen (glatte Balken) und -unlöslichen Fraktion (schraffierte Balken) von Linsenextrakten aus C3HeB/FeJ (a) und C57Bl/6J (b) Wildtyp-Mäusen. Die densitometrische Analyse der 2D-Karten wurde mit dem Programm ImageJ durchgeführt. Die Identifizierung der Proteinspots erfolgte durch MALDI-TOF-MS und Abgleich der Spektren mit der NCBI-Proteindatenbank. Die 2-DE-Analysen wurden als unabhängiges biologisches Duplikat durchgeführt.

Allerdings ändern sich die Anteile mit dem Alter der Mäuse. So fällt insbesondere die Abnahme der γ -Kristalline bei beiden Wildtyp-Stämmen ins Auge. Liegt der relative Anteil der γ -Kristalline bei der Geburt bei 50-60 %, nimmt dieser bis auf 25-30 % in den Linsen von 12 Monate alten Mäusen ab. Ersichtlich wird dies auch in Abbildung S3. Hier sind die relativen Anteile aller 18 Isoformen an der Gesamtheit der Kristalline zeitlich aufgelöst dargestellt und die Summe der Einzelanteile auf 1 normiert. Verursacht wird die Abnahme der γ -Kristalline während der Alterns hauptsächlich durch den nahezu vollständigen Abbau von γ A-Kristallin, sowie dem teilweisen Abbau von γ E/F- und γ B/C-Kristallin. Bei β B2-Kristallin hingegen ist eine deutliche Zunahme des relativen Anteils in den ersten

Monaten nach der Geburt der Mäuse zu erkennen. Die zeitlichen Veränderungen des Anteils der drei Kristallinfamilien, sowie der einzelnen Isoformen, sind in sehr guter Übereinstimmung mit den von Ueda *et al.* für C57Bl/6J Wildtyp-Mäuse beschriebenen Beobachtungen (18). Diese alterungsbedingten Veränderungen im Proteom der murinen Augenlinse finden in beiden Wildtyp-Stämmen gleichermaßen statt. Die Übereinstimmung der Kristallinanteile mit Literaturdaten und vergleichbaren anteiligen Verläufe während des Alterns von C3HeB/FeJ und C57Bl/6J Wildtyp-Mäusen, bestätigten die Validität der densitometrischen Analyse und Vergleichbarkeit der beiden Stämme.

Als komplementärer Ansatz zur Darstellung der Plastizität des Augenlinsenproteoms wurden SEC-HPLC Läufe mit der wasserlöslichen Fraktion von Linsenextrakte aus beiden Wildtyp-Stämmen durchgeführt (Abbildung 11).

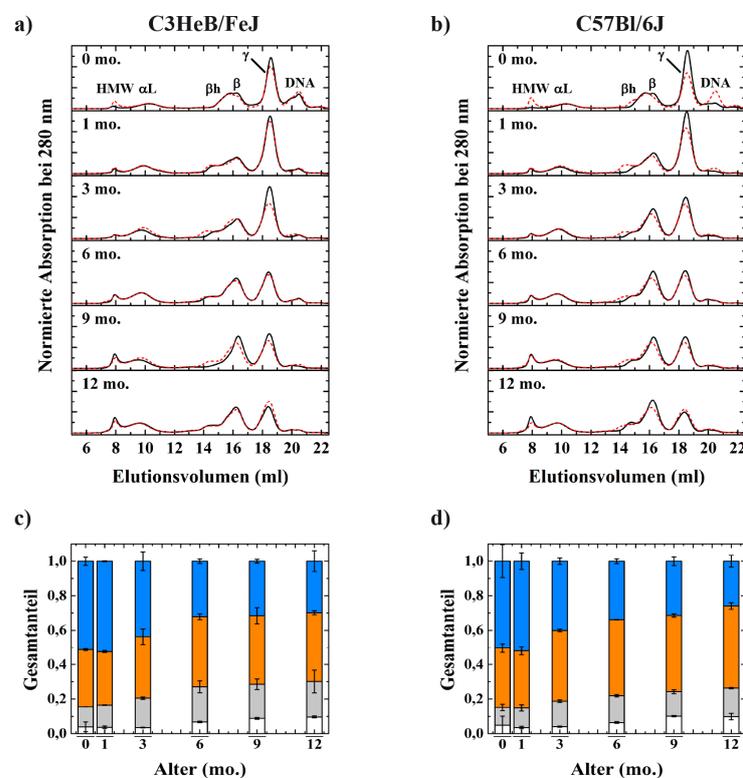


Abbildung 11: SEC-HPLC-Profil der wasserlöslichen Fraktion von Linsenextrakten aus Wildtyp-Mäusen. Gezeigt sind die normierten Elutionsprofile der wasserlöslichen Fraktion zu verschiedenen Zeitpunkten von Linsenextrakten aus den Wildtyp-Stämmen C3HeB/FeJ (a) und C57Bl/6J (b). Die chromatographische Trennung der Proteine erfolgte bei einer Flussrate von 0,5 ml/min in PBS und 20 °C über eine Superdex 200 10/300 GL Säule mit bis zu 2 mg an aufgetragenem Gesamtprotein in je 100 μ l Auftragsvolumen. Das Absorptionssignal wurde kontinuierlich bei 280 nm aufgezeichnet. Alle Läufe wurden als biologische Duplikate durchgeführt (Lauf 1: —, Lauf 2: ---). Zur leichteren Vergleichbarkeit des Anteils der einzelnen Fraktionen (HMW- (weiß), α L-Fraktion (grau), β - (orange) und γ -Kristalline (blau)), wurde das normierte Flächenintegral für die SEC-HPLC-Profile aufgetragen (c, d). Die β h- und β -Kristallin Fraktion wurde zusammengefasst. Das Absorptionssignal der DNA wurde nicht in die Auftragung einbezogen.

Die Zeitpunkte wurden dabei analog denen der 2-DE-Analyse gewählt. Zu sehen ist ein für Linsenextrakte aus Vertebraten typisches Elutionsprofil mit mehreren Fraktionen (129-132). Dieses unterteilt sich in eine hochmolekulare HMW- (engl. *high molecular weight fraction*) und eine α L-

Fraktion (einer Mischung aus αA , αA_{ins} und αB), sowie die βh -, β - und γ -Kristallinfraktion. Bei den SEC-HPLC-Profilen von Linsenextrakten aus jungen Mäusen (0 und 1 mo.) ist zudem noch etwas residuale DNA zu erkennen. Diese bedingt das Absorptionssignal bei etwa 20 ml Elutionsvolumen und wird vermutlich durch den noch andauernden Abbau der Zellkerne in den Linsenfaserzellen verursacht. Die Fragmentgröße der DNA liegt dabei deutlich über 25 kbp (Abbildung S5).

Die Änderungen in den Kristallinanteilen sind sehr gut mit den Ergebnissen der 2-DE-Analyse der wasserlöslichen Fraktion vergleichbar, bieten allerdings eine noch detailliertere Auflösung (Abbildung 11c,d). So sind neben der β - und γ -Kristallinfraktion noch zwei weitere Fraktionen, die HMW- und αL -Fraktion, zu erkennen (Abbildung 11a,b). Die beiden Fraktionen bestehen größtenteils aus α -Kristallinen (Abbildung 13). Von der αL -Fraktion (einer Mischung aus αA , αA_{ins} und αB -Kristallin) wird angenommen, dass sie als Chaperonreservoir dient und während des Alterns allmählich zu Neige geht. Allerdings bleibt der Anteil der αL -Fraktion im wasserlöslichen Teil der Linsenextrakte aus den Wildtyp-Stämmen über die Zeit in etwa gleich zwischen 15-20 %. In den SEC-HPLC-Profilen ist auch eine leichte Verschiebung der αL -Fraktion zu kleineren Elutionsvolumen mit zunehmendem Alter zu erkennen, was auf eine Zunahme der Oligomergröße hindeutet. Verursacht werden könnte dies durch Modifikationen in den Kristallinen während des Alterungsprozesses. Die genaue Ursache konnte aber nicht im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden. Ein möglicher Ansatzpunkt wäre die massenspektrometrische Analyse der modifizierten Proteine nach Extraktion aus dem 2D-Gel.

Nach derzeitigem Wissensstand binden (teil-) gefaltete, aggregationsanfällige β - und γ -Kristalline an αL -Kristallin und bilden dadurch die HMW-Fraktion aus (133). Von der HMW-Fraktion (ca. 8 ml Elutionsvolumen) wird angenommen, dass der Anteil während des Alterns zunimmt und diese Zunahme an der Kataraktbildung beteiligt sein könnte (89-92). In den Wildtyp-Stämmen ist die anteilige Zunahme der HMW-Fraktion auch gut erkennbar, allerdings tritt während des Beobachtungszeitraums von 12 Monaten kein Katarakt auf. Dies könnte darauf hindeuten, dass das intrinsische Chaperonreservoir an αL -Kristallinen (ca. 10 ml Elutionsvolumen) während des Beobachtungszeitraumes nicht erschöpft wird. Die β -Kristallinfraktion unterteilt sich in die βh - und β -Kristalline. Während die β -Kristallinfraktion aus Homo- und Heterodimeren besteht (ca. 16,5 ml Elutionsvolumen), sind in der βh -Fraktion Tetramere und möglicherweise auch noch höhere Oligomere (bis zu Oktameren) vorhanden (ca. 13-15,5 ml Elutionsvolumen) (121,134). Wie auch bei der 2-DE-Auswertung der Linsenextrakte, ist vor allem die Abnahme der γ -Kristalline während des Alterns für beide Wildtyp-Stämme kennzeichnend. Die relativen Veränderungen in den Kristallinanteilen sind dabei für beide Wildtyp-Stämme sehr gut vergleichbar.

Um die in den SEC-HPLC-Experimenten beobachtete Zunahme der Oligomergröße in der α L-Fraktion zu bestätigen, wurden Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe an einer analytischen Ultrazentrifuge durchgeführt (Abbildung 12).

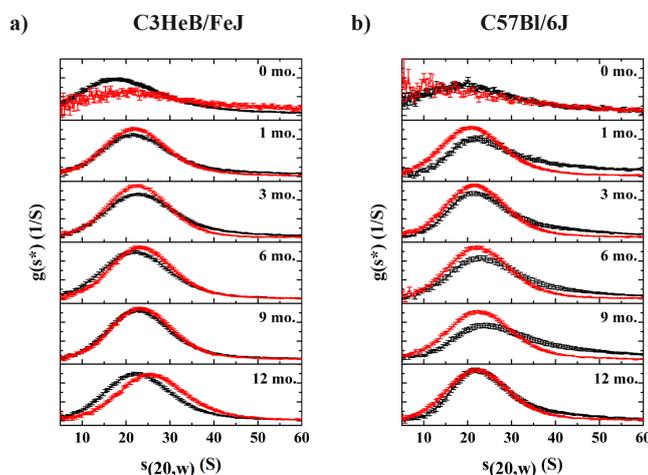


Abbildung 12: Sedimentationskoeffizientenverteilung der α L-Fraktion aus Linsenextrakten von C3HeB/FeJ und C57Bl/6J Mäusen. Nach der Fraktionierung des wasserlöslichen Teils von Linsenextrakten mittels SEC-HPLC, wurde die α L-Fraktion von C3HeB/FeJ (a) und C57Bl/6J (b) Wildtyp-Mäusen durch Ultrazentrifugation analysiert. Die Proben wurden auf eine Absorption bei 230 nm von $\leq 1,5$ in PBS eingestellt und bei 13 000 rpm, 20 °C bis zur vollständigen Sedimentation zentrifugiert. Die Absorption in Abhängigkeit der Radialposition wurde kontinuierlich bei 230 nm gemessen. Die Messungen erfolgten als unabhängiges biologisches Duplikat (Lauf 1: —, Lauf 2: —) und wurden nach dem $g(s^*)$ -Modell mit dem Programm DCDT+ ausgewertet.

Mit AUZ konnte die apparente Größenzunahme der α L-Fraktion mit zunehmendem Alter ebenfalls bestätigt werden. Liegt der auf Wasser und 20 °C normierte Sedimentationskoeffizient ($s_{20,w}$) für die α L-Fraktion in Linsenextrakten aus neugeborenen Mäusen (0 mo.) bei etwa 17,5 S, nimmt er auf etwa 22,5 S in gealterten Mäusen (12 mo.) zu. Diese Größenzunahme könnte durch Oxidationsprozesse der α -Kristalline verursacht werden. So kommt es beispielsweise bei der unspezifischen Oxidation von α A- und α B-Kristallin aus Ratten mit Wasserstoffperoxid zu einer Zunahme der Oligomergröße, Veränderungen in der sekundär Struktur und Abnahme der Chaperonaktivität (135). Ähnliche Effekte konnten auch für humanes α A-Kristallin beobachtet werden. Humanes α A-Kristallin besitzt zwei Cysteine. Werden diese gezielt mit Glutathion oxidiert, kann eine intramolekulare Disulfidbrücke entstehen. Das resultierende oxidierte α A-Kristallin bildet signifikant größere Oligomere und zeigt einen deutlich höheren Sedimentationskoeffizienten als reduziertes α A-Kristallin (unveröffentlichte Daten Philipp Schmid und Dr. rer. nat Christoph Kaiser, Professur für Elektronenmikroskopie, Technische Universität München, DEU).

Zusammengenommen zeigen die Experimente eine hohe Plastizität der murinen Augenlinse. Während des Alterungsprozess kommt es in beiden Wildtyp-Stämmen zu sehr gut vergleichbaren Änderungen im Proteom der Linse. Während der relative Anteil an γ -Kristallinen stark abnimmt, nimmt der der β -Kristalline, insbesondere von β B2-Kristallin zu. Kennzeichnend für alterungsbedingte Vorgänge bei

den α -Kristallinen ist deren anteilige Zunahme in der HMW-Fraktion, sowie eine apparente Steigerung der Partikelgröße und Trunkierungen, insbesondere bei α A-Kristallin.

3.1.1.2 Gelelektrophoretische Analyse der HMW- und α L-Fraktion von Wildtyp-Mäusen

Als letzter Punkt der Charakterisierung von Linsenextrakten aus Wildtyp-Mäusen erfolgte die 2-DE- und EM-Analyse der HMW- und α L-Fraktion (Abbildung 13).

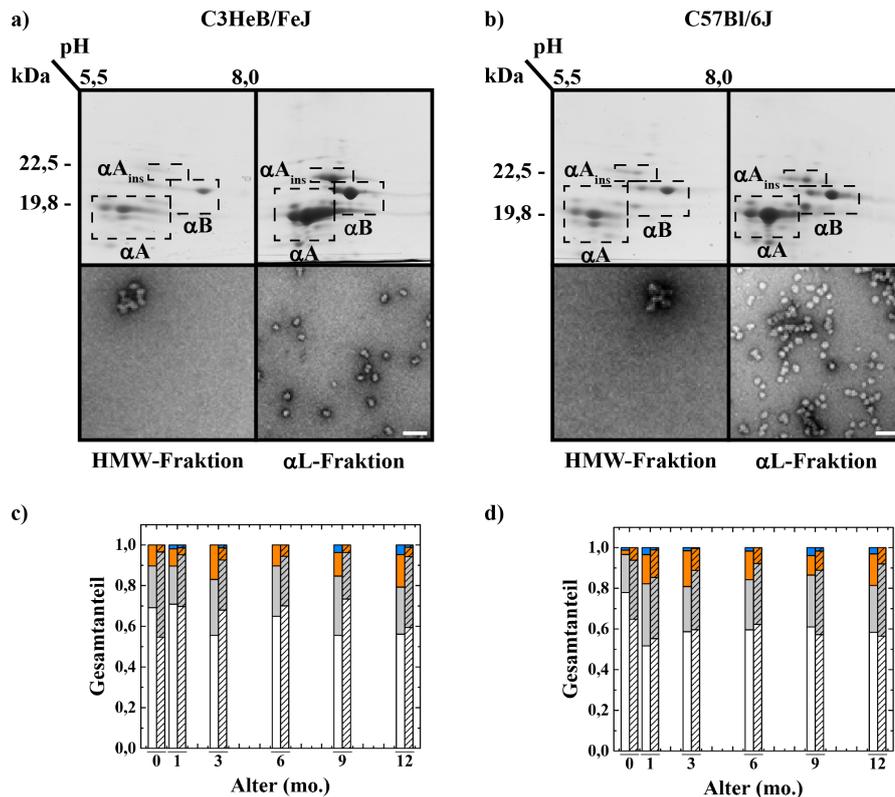


Abbildung 13: 2-DE- und EM-Analyse der HMW- und α L-Fraktion von Wildtyp-Mäusen. Nach der chromatographischen Trennung des wasserlöslichen Teils von Linsenextrakten aus C3HeB/FeJ (a) und C57Bl/6J (b) Wildtyp-Mäusen mittels SEC-HPLC, wurde die HMW- (glatte Balken) und α L-Fraktion (schraffierte Balken) mit 2-DE und EM (Maßstabsskala: 50 nm) untersucht. Zur leichteren Vergleichbarkeit wurde eine densitometrische Analyse der 2D-Karten mit dem Programm ImageJ durchgeführt und das Kristallinsignal auf 1 normiert (α A-Kristallin (weiß), α B-Kristallin (grau), β -Kristalline (orange) und γ -Kristalline (blau)). Die Identifizierung der Proteinspots erfolgte durch MALDI-TOF-MS und Abgleich der Spektren mit der NCBI-Proteindatenbank. Die beiden Kristallinisoformentypen α A- und α A_{ins}-Kristallin wurden zusammengefasst. Für die gezeigten 2D-Gele, der HMW- und α L-Fractionen aus Extrakten von 6 Monate alten Mäusen, wurden bis zu 25 μ g an Gesamtprotein aufgetragen.

Die HMW-Fraktion war von besonderem Interesse, da die anteilige Zunahme dieser Fraktion in der Augenlinse an der Entstehung von Katarakt beteiligt sein könnte. Während des Alterns kommt es zu einer Abnahme des, in Form der α L-Fraktion, verfügbaren Chaperonreservoirs und damit verbunden zu einer Zunahme von Partikeln in der HMW-Fraktion. Nach dem Literaturverständnis bestehen die Partikel in der HMW-Fraktion aus α -Kristallinen und daran gebundenen, aggregationsanfälligen β - und γ -Kristallinen. Ist das Chaperonreservoir der α L-Fraktion alterungsbedingt oder durch Umwelteinflüsse erschöpft und das der HMW-Fraktion gesättigt, kommt es zu einer unkontrollierten Aggregation

und letztendlich Linsentrübung. Überraschenderweise stellen die α -Kristalline sowohl in der HMW- als auch α L-Fraktion mit etwa 90 % den Großteil der darin vorhandenen Proteine. Das Verhältnis von α A- zu α B-Kristallin stimmte sehr gut mit dem in der Literatur für Vertebraten beschriebenen Verhältnis von 3 zu 1 überein und unterstreicht die Validität der densitometrischen Auswertung (28,45,136). Zwar konnten in den 2D-Gelen β - und γ -Kristalline, insbesondere β B2- und γ D-Kristallin, detektiert werden, dennoch machen diese sowohl für C57Bl/6J als auch C3HeB/FeJ Mäuse in beiden Fraktionen nur 5 bis 20 % aus (Abbildung 13a,b). Auch was die Zusammensetzung der HMW- und α L-Fraktion über die Zeit betrifft, findet kaum eine Veränderung statt. Ursache für den geringen relativen Anteil an β - und γ -Kristallinen und die invariante Zusammensetzung könnte die Abwesenheit von Katarakt in beiden Wildtyp-Stämmen während des Beobachtungszeitraumes von 12 Monaten sein. Interessanterweise sind die HMW- und α L-Fraktion der beiden Mausstämmen fast identisch in ihrer Proteinzusammensetzung, unterscheiden sich aber stark was die Partikelgröße betrifft. Während die Proteinkomplexe in der HMW-Fraktion eine Größe von mehr als 50 nm zeigen, liegt die Größe bei den Partikeln in der α L-Fraktion bei 15 nm. Die Partikelform und -größe passt gut zu Beobachtungen mit Linsenextrakten aus Rind (44). Die α L-Fraktion ist dabei jedoch größer als die Homooligomere von humanem α A- und α B-Kristallin (α A-Kristallin, reduziert: 13,5 nm, α A-Kristallin, oxidiert 17,7 nm (unveröffentlichte Daten, Dr. rer. nat. Carsten Peters, Professur für Elektronenmikroskopie, Technische Universität München, DEU) und α B-Kristallin 13,5 nm (23). Der Grund für den apparenten Größenunterschied bleibt unklar. Eventuell könnten Modifikationen eine Rolle spielen, die sich nicht unmittelbar durch 2-DE detektieren lassen, wie etwa Racemisierung, Glykosylierung oder Glykierung (137-140). Nicht-enzymatische Glykierung über die ϵ -Aminogruppe von Lysin, die mit steigendem Alter zunimmt, wurde bereits 1981 von Chiou *et al.* in bovinen Linsenextrakten gezeigt (141). Besonders die α -Kristalline in der HMW-Fraktion waren von Glykierung betroffen. Die in Abbildung 13 gezeigten 2D-Karten der HMW- und α L-Fraktion zeigen zwar zu allen Zeitpunkten ähnliche Zusammensetzung, mit leicht erhöhtem Vorkommen von Modifikationen der α -Kristalline in der HMW-Fraktion, allerdings wären die oben genannten Modifikationen nicht unmittelbar durch 2-DE detektierbar (Abbildung S7). Zur Klärung welche Faktoren den Unterschied in der Partikelgröße der beiden Fraktionen bedingen, könnten LC-MS/MS-Messungen mit den Fraktionen nach chromatographischer Trennung oder Extraktion der Proteine aus den 2D-Gelen in Frage kommen. Als Kontrolle wurde auch die Zusammensetzung der β h, β - und γ -Kristallinfraktion von beiden Wildtyp-Stämme zu ausgewählten Zeitpunkten mittels 2-DE untersucht (Abbildung S7). Die 2D-Karten zeigten das zu erwarten Vorkommen an β - und γ -Kristallinen in der jeweiligen Fraktion. Der fast vollständige Abbau von γ A-Kristallin konnte auch hier bestätigt werden. Liegt der relative Anteil an γ A-Kristallin bei etwa 15 % in Linsenextrakten aus neugeborenen Mäusen, fällt er innerhalb von 12 Monaten auf unter 1 %. Ebenfalls gut zu erkennen ist die starke Zunahme des relativen Anteils von β B2-Kristallin von unter 1 % auf circa 10 %. Wie auch die HMW- und α L-

Fraktion, sind sich die β _h- und β -Kristallinfraktion sehr ähnlich in den 2D-Karten. Ein Grund für das unterschiedliche Trennverhalten bei SEC-HPLC-Experimenten könnten ebenfalls nicht mit 2-DE detektierbare Modifikationen sein.

3.1.2 Die *in vitro* Eigenschaften von Katarakt-assoziierten Kristallinvarianten

Einer der vermuteten Gründe für die Entstehung von Proteinaggregaten in der Linse bei erblichem Katarakt ist die thermodynamische Destabilisierung und dadurch erhöhte Aggregationsanfälligkeit des betreffenden Proteins. Dadurch kommt es zu einer schnelleren Entleerung des verfügbaren Chaperonreservoirs in der Linse und zu früh einsetzendem Katarakt. Um dieser Vermutung nachzugehen und um möglicherweise den beobachteten Katarakt-Phänotyp durch die *in vitro* Eigenschaften von rekombinanten Kristallinen voraussagen zu können, wurden drei Katarakt-assoziierte Kristallinvarianten untersucht: α A-V124E, β A2-S47P und γ D-V76D. Die V124E-Mutation von α A-Kristallin liegt in der zentralen AKD, die S47P-Mutation von β A2- bzw. V76D-Mutation von γ D-Kristallin liegt in der N-terminalen Domäne des jeweiligen Proteins. Die Kristallinvarianten tragen die gleichen Punktmutationen, wie sie in den mutanten Mauslinien Aey7 (α A-V124E), Aca30 (β A2-S47P) und Aey4 (γ D-V76D) vorkommen. Allen drei Mausmutanten entwickeln dominanten, erblichen Katarakt und es liegt eine sehr detaillierte genetische sowie phänotypische Beschreibung dieser Mäuse vor. Diese Mausstämme eigneten sich daher gut als Referenz für einen *in vivo-in vitro*-Vergleich (93-95).

3.1.2.1 Thermodynamische Stabilität von Wildtyp-Kristallinen und Varianten

Zwar konnten alle drei Kristallinvarianten und die zugehörigen Wildtyp-Proteine mit akzeptabler Ausbeute (1-10 mg Protein pro Liter Kulturmedium) in *E. coli* produziert werden, lagen aber nach dem Zellaufschluss, bis auf α A-wt und γ D-wt, in der unlöslichen Fraktion vor. Alle anderen Kristalline (α A-V124E, β A2-wt, β A2-S47P, γ D-V76D) wurden durch Rückfaltung gereinigt. Dafür wurde jeweils ein eigenes Reinigungsprotokoll für die 6 untersuchten Kristalline etabliert (siehe 2.2.3.2). Um das Vorhandensein von Sekundärstrukturelementen, die einen Hinweis auf den Faltungszustand geben können, zu untersuchen, wurden zunächst CD-Spektren aller Proteine außer β A2-S47P aufgenommen (Abbildung 14). Die β A2-S47P-Variante war nur in L-Arginin-haltigem Puffer löslich, sodass eine Aufnahme von CD-Spektren nicht möglich war. Diese Variante war in Phosphatpuffer nahezu unlöslich und konnte nur in Tris-Puffer unter Zusatz von 500 mM L-Arginin in Lösung gehalten werden (siehe 2.2.3.2.4 für genaue Pufferzusammensetzung). Im Folgenden wurden Messungen mit den beiden β -Kristallinen (β A2-wt und β A2-S47P) immer in L-Arginin-haltigem Puffer durchgeführt. Als Kontrolle wurden die Messungen zusätzlich mit β A2-wt in PBS Puffer durchgeführt. Die geringe Löslichkeit von α A-V124E, β A2-S47P und γ D-V76D, bei rekombinanter

Produktion in *E. coli*, gab einen ersten Hinweis auf die thermodynamische Destabilisierung der Proteine durch die jeweilige Punktmutation.

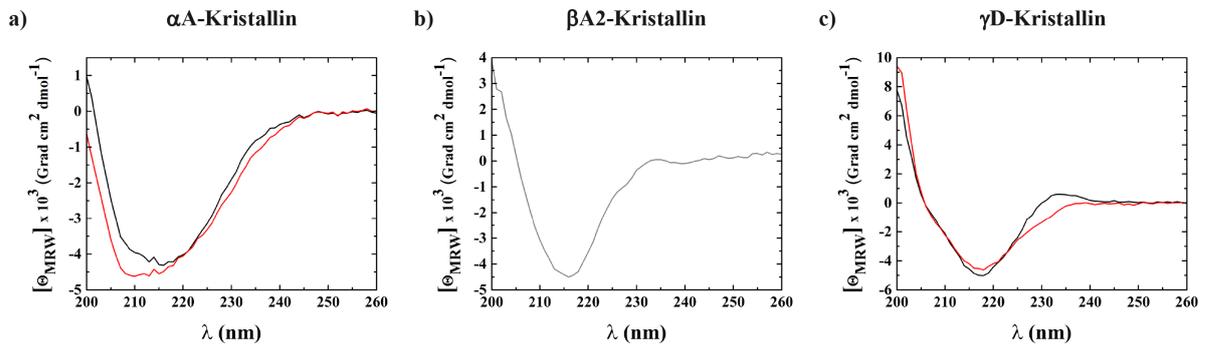


Abbildung 14: Sekundärstruktur von Wildtyp-Kristallinen und Katarakt-assoziierten Varianten. Die Spektren (α A-wt (—), α A-V124E (—)) (a); β A2-wt (—) (b), sowie γ D-wt (—), γ D-V76D (—) (c) wurden bei 20 °C mit einer Aufnahmegeschwindigkeit von 20 nm/min, Bandbreite von 1 nm und Dämpfung von 1 s in einer Quarzküvette mit 0,1 cm Schichtdicke gemessen. Die Proteinkonzentration lag bei je 10 μ M in PBS. Bei β - und γ -Kristallinen wurde 1 mM DTT zugesetzt. Die Messungen und Datenauswertungen wurden in Zusammenarbeit mit Nicole Lim, Ph.D. (Lehrstuhl für Biotechnologie, Technische Universität München, DEU) durchgeführt.

Die CD-Spektren von α A-wt und α A-V124E zeigen ein für β -Faltblattstrukturen typisches Minimum im Bereich von 210-215 nm und sind vergleichbar zu CD-Spektren von humanem α A-wt (142). Das CD-Signal wird dabei hauptsächlich von den β -Faltblattstrukturen der zentralen AKD verursacht. Der Nulldurchgang des CD-Spektrums von α A-V124E kann nicht vollständig aufgelöst werden, scheint aber zu kleineren Wellenlängen verschoben zu sein. Dies könnte auf einen höheren Anteil von unstrukturierten Elementen hindeuten. Bei β A2-wt wird das CD-Signal hauptsächlich von den β -Faltblattstrukturen der griechischen Schlüssel motive bedingt und zeigt ein Minimum um 215 nm. Die qualitative Form des Spektrums stimmt dabei gut mit dem von murinem und bovinem β B2-Kristallin überein (143,144). Von β A2-S47P konnte kein CD-Spektrum aufgenommen werden. Diese Variante war nur in L-Arginin-haltigem Puffer löslich, der für CD-Messungen nicht geeignet ist. Das CD-Spektrum von γ D-wt und γ D-V76D zeigt ein Minimum im Bereich zwischen 215-220 nm und stimmt sehr gut mit dem CD-Spektrum der humanen Varianten überein (145).

Zur Bestimmung der thermodynamischen Stabilität wurde die thermisch-induzierte Entfaltung der Kristalline mittels CD-Spektroskopie und nanoDSF bestimmt (Abbildung 15). Dazu wurde bei der CD-Spektroskopie jeweils die Temperatur bei der halbmaximalen Signaländerung des ersten und gegebenenfalls zweiten Übergangs bestimmt (Tabelle 4). Da die Denaturierung der Kristalline nicht vollständig reversibel verläuft, kann nur die Temperatur am apparenten Übergangsmittelpunkt (T_M) angegeben werden. Ersichtlich wird die unvollständige Reversibilität auch durch die gemessene Lichtstreuung während der nanoDSF-Messungen, die ein Maß für die Proteinaggregation ist (Abbildung 16). Sowohl bei α A-Kristallin als auch bei γ D-Kristallin ist eine deutliche Verschiebung des apparenten Übergangsmittelpunkts zu niedrigeren Temperaturen bei den Katarakt-assoziierten

Varianten im Vergleich zum Wildtyp-Protein zu beobachten. Diese Verschiebung des T_M belegt die stark destabilisierende Wirkung der jeweiligen Punktmutation.

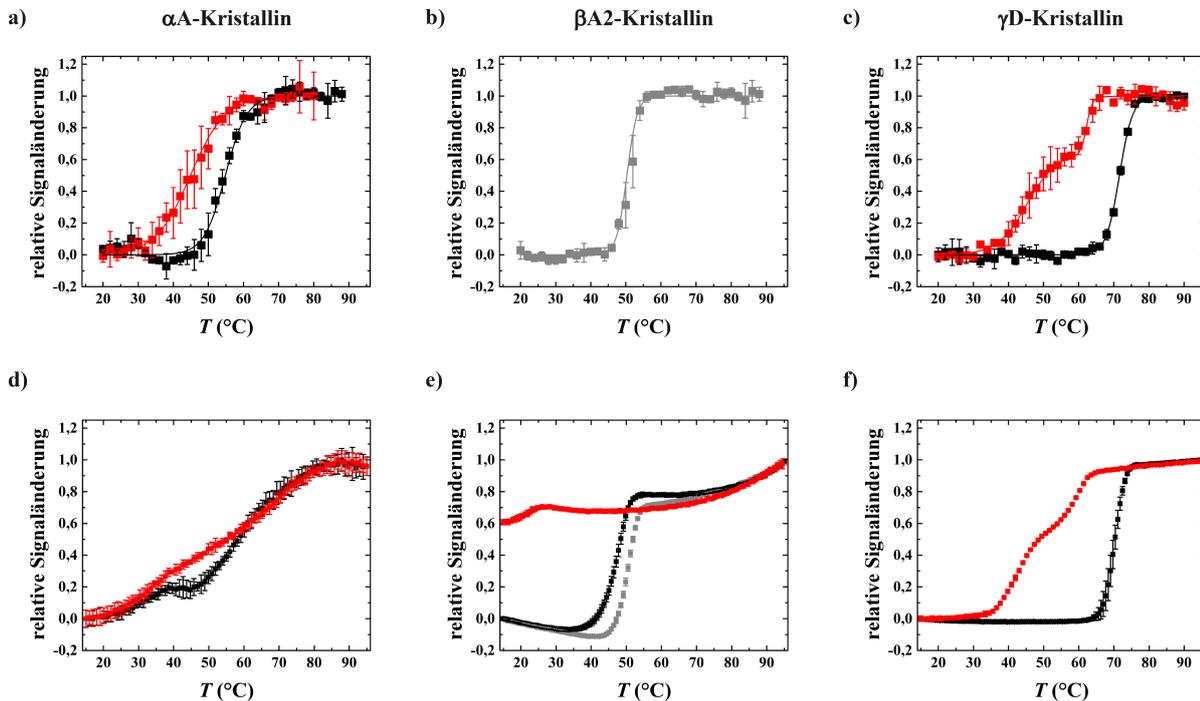


Abbildung 15: Thermisch-induzierte Entfaltungsübergänge von Wildtyp-Kristallinen und Katarakt-assoziierten Varianten. Die thermisch-induzierte, konformationelle Entfaltung der Kristalline wurde mittels CD-Spektroskopie (a-c) und nanoDSF (d-f) verfolgt. Aufgetragen ist die Änderung des CD-Signals für αA -wt (■), αA -V124E (■) bei 205 nm (a); $\beta A2$ -wt (■) bei 217 nm (b) sowie γD -wt (■), γD -V76D (■) bei 217 nm (c). Aufgrund der geringen Löslichkeit in Phosphatpuffer, war für $\beta A2$ -S47P keine Messung möglich. Die Übergänge wurden bei einer Proteinkonzentration von 10 μM , Heizrate von 1 $^{\circ}C/min$ und Dämpfung von 8 s in Quarzküvetten mit 0,1 cm Schichtdicke gemessen und normiert. Die nanoDSF-Messungen wurden für alle Kristalline bei einer Konzentration von 10 μM und Heizrate von 1 $^{\circ}C/min$ in hochlichtdurchlässigen Glaskapillaren durchgeführt. Aufgetragen ist das normierte Verhältnis der intrinsischen Fluoreszenz bei 350 nm und 330 nm. Alle CD- und nanoDSF-Messungen mit αA - und γD -Kristallin, sowie $\beta A2$ -wt wurden in PBS durchgeführt. Bei β - und γ -Kristallinen wurde 1 mM DTT zugesetzt. Für $\beta A2$ -wt und $\beta A2$ -S47P erfolgten die nanoDSF-Messungen in L-Arginin-haltigem Puffer (αA -wt (■), αA -V124E (■) (d); $\beta A2$ -wt in PBS (■), $\beta A2$ -wt in L-Arginin-haltigem Puffer (■), $\beta A2$ -S47P in L-Arginin-haltigem Puffer (■) (e), sowie γD -wt (■), γD -V76D (■) (f)). Alle Experimente wurden mindestens als Triplikate gemessen. Die CD-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Nicole Lim, Ph.D. (Lehrstuhl für Biotechnologie, Technische Universität München, DEU) durchgeführt.

Für αA -V12E liegen nach aktuellem Wissensstand keine Vergleichsdaten über die thermodynamische Stabilität von Wildtyp-Protein und Katarakt-assoziierte Variante vor. Eine Verschiebung des T_M um etwa 10 $^{\circ}C$ zeigt die starke destabilisierende Wirkung dieser Punktmutation. Möglicherweise stört die V124E-Mutation die Integrität der β -sandwich-Faltung der zentralen AKD (Abbildung 4). In der Primärstruktur von αA aus Rind befindet sich an Position 124 ebenfalls ein Valin. Die Primärstrukturen von αA aus Maus (UniProt-ID: P24622-2) und Rind (UniProt-ID: P02470-1) sind zu 96 % identisch. In der Kristallstruktur einer trunkierten, bovinen αA -Variante (PDB-ID: 3L1F) befindet sich das Valin an Position 124 in einer Schleifenstruktur, die die zwei antiparallel angeordneten Schichten aus β -Faltblättern in der AKD verbindet (146). Durch das Einbringen einer

negativen Ladung könnte möglicherweise die Packung der AKD und damit die Faltung des zentralen, strukturgebenden Elements gestört werden. Dies würde auch den höheren Anteil an unstrukturierten Bereichen erklären, wie er aus den CD-Spektren ersichtlich ist.

Tabelle 4: Thermische Stabilität von Wildtyp-Kristallinen und Katarakt-assoziierten Varianten

	CD-Spektroskopie		nanoDSF	
	$T_{M,1}$ (°C)	$T_{M,2}$ (°C)	$T_{M,1}$ (°C)	$T_{M,2}$ (°C)
α A-wt	$54,6 \pm 0,6$	-	$31,9 \pm 1,4$	$57,5 \pm 2,1$
α A-V124E	$45,0 \pm 3,2$	-	$33,6 \pm 0,3$	$68,9 \pm 1,8$
β A2-wt	$51,2 \pm 1,0$	-	$50,6 \pm 0,1$	-
β A2-wt [†]	n.b.	n.b.	$47,7 \pm 0,3$	-
β A2-S47P [†]	n.b.	n.b.	$21,5 \pm 0,4$	-
γ D-wt	$71,7 \pm 0,2$	-	$70,2 \pm 0,3$	-
γ D-V76D	$46,3 \pm 3,5$	$62,1 \pm 0,7$	$42,9 \pm 0,4$	$59,2 \pm 0,1$

Aufgetragen ist Temperatur bei halbmaximaler Signaländerung der thermisch-induzierten Entfaltungsübergänge beim ersten und gegebenenfalls zweiten Übergang. Die Werte wurden durch nicht-lineare Angleichung an die Messdaten der CD-Spektroskopie bestimmt. Im Falle der nanoDSF-Messungen wurden die Werte mit dem Programm PR.Stability Analysis ermittelt. (n.b.: nicht bestimmbar; -: nicht beobachtbar; †: Messung in L-Arginin-haltigem Puffer)

Der T_M von murinem β A2-wt liegt mit circa 51 °C in dem Bereich wie er für bovines und humanes β B2-wt (ca. 60-65 °C) beschrieben wurde (144). Allerdings besteht nur eine geringe Sequenzidentität zwischen β A2- und β B2-Kristallin. Im Falle von murinem β A2- und β B2-Kristallin (UniProt-ID: Q9JJV1-1 und P62696-1) liegt die Identität bei 35 % und die Ähnlichkeit bei 54 %.

Für die humane Variante von γ D-V76D wurde eine Destabilisierung durch diese Punktmutation bereits beschrieben (145,147). Die V76D Punktmutation liegt ebenfalls in einer Schleifenstruktur in der N-terminalen Domäne von γ D-Kristallin. Anderes als bei murinem γ D-wt ist bei der V76D-Variante ein biphasischer Übergang zu beobachten. Im Falle der CD-Messungen mit einem ersten Übergang bei circa 46,3 °C und zweiten Übergang bei etwa 62,1 °C. Die Wandlung von einem monophasischem zu einem biphasischem Übergang wurde auch für humanes γ D-V76D beobachtet (145). Verursacht wird dies vermutlich durch die destabilisierende Wirkung der V76D-Punktmutation auf die N-terminale Domäne (Abbildung 5). Von dieser thermodynamischen Destabilisierung wird auch vermutet, dass sie die Aggregation der Katarakt-assoziierten V76D-Variante begünstigen könnte. Eine entfaltete N-terminale Domäne könnte als Nukleationskeim für unspezifische und unkontrollierte Aggregation dienen (147). Aufgrund der geringen Löslichkeit von β A2-S47P in Phosphatpuffer waren keine CD-Messungen möglich. Da die β A2-S47P-Variante nur in L-Arginin-haltigem Puffer löslich war, wurden zur Abschätzung des T_M von β A2-S47P und der anderen Kristalline nanoDSF-Messungen durchgeführt. Bei den nanoDSF-Messungen erfolgte die Bestimmung des T_M durch die

Ermittlung der Maxima der ersten Ableitung der gemessenen Fluoreszenzverläufe mit dem Programm PR.Stability Analysis. Das Fluoreszenzsignal wurde bei den Messungen anhand des Verhältnisses der intrinsischen Fluoreszenz bei 350 nm und 330 nm ($F_{350\text{nm}}/F_{330\text{nm}}$) verfolgt. Zwar ist generell die intrinsische Fluoreszenz, wie auch in diesem speziellen Fall der pH-Wert des L-Arginin-haltigen Puffers temperaturabhängig, dennoch konnten die vergleichenden nanoDSF-Messungen als näherungsweise Abschätzung des T_M herangezogen werden. Bei den α -Kristallinen ist ein wenig kooperativer Übergang zu beobachten. Grund dafür könnte die komplexe Oligomerstruktur des Proteins und Veränderungen darin während der thermisch-induzierten Entfaltung sein. Daher wurden die Fluoreszenzverläufe und ermittelten Wendepunkte (T_M) nur aus Gründen der Vollständigkeit angegeben, aber nicht in die weitere Interpretation der Daten einbezogen. Für die β - und γ -Kristalline stimmt die Temperatur am Übergangsmittelpunkt gut mit den Werten der CD-Spektroskopie überein. Auch hier ist eine deutliche Destabilisierung der Katarakt-assoziierten Kristallinvarianten zu beobachten. Am drastischen fällt die Verschiebung für β A2-S47P (UniProt-ID: Q9JJV1-1) aus. Zwar kann die Basislinie des nativen Proteins, durch eine Limitierung der Starttemperatur auf 15 °C, nicht vollständig aufgelöst, der T_M aber dennoch auf 21,5 °C abgeschätzt werden. Dies bedeutet Erniedrigung des T_M um etwa 26 °C im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Grund hierfür könnte ebenfalls eine Störung der Faltung sein. In der zu 54 % identischen und 71 % ähnlichen Sequenz von humanem β A4-Kristallin (UniProt-ID: P53673-1) befindet sich an Position 46 ebenfalls ein Serin (Abbildung 5). Dieses Serin befindet sich kurz vor dem dritten β -Faltblatte im ersten griechischen Schlüsselmotiv der N-terminalen Domäne. Zwar kommen Proline durchaus in der flankierenden Region von β -Faltblättern vor, sind aber bei Vorkommen im Inneren des Faltblattes sehr stark destabilisierend (148). Trotz der hohen Ähnlichkeit der Sequenz von murinem und humanem β A4, könnte der Grund für die sehr stark destabilisierende Wirkung dieser Punktmutation ein Vorkommen des Prolins im Inneren des β -Faltblattes sein.

Ersichtlich wird die destabilisierende Wirkung der Punktmutationen auch durch die Lichtstreuung während der thermisch-induzierten Entfaltung mittels nanoDSF (Abbildung 16). Bei den α -Kristallinen tritt während des Aufheizvorgangs nahezu keine Aggregation ein und die Lichtstreuung bleibt bis etwa 70 °C nahe zu konstant. Im Bereich zwischen 70 °C und 95 °C ist ein geringer Anstieg des Signals zu sehen. Diese Beobachtung stimmt mit denen bei humanem α A-Kristallin überein (persönliche Kommunikation, Dr. rer. nat Christoph Kaiser, Professur für Elektronenmikroskopie, Technische Universität München, DEU). Begründet sein könnte dies durch die Funktion der α -Kristalline als molekulare Chaperone unter Stressbedingungen, die auch Hitzestress mit einschließen. Im Falle der β -Kristalline ist bei β A2-S47P ein starker Anstieg der Lichtstreuung bei Temperaturen über 30 °C erkennbar, während β A-wt in beiden getesteten Puffern erst ab etwa 45-50 °C aggregiert. Das Abfallen des Lichtstreuungssignals bei Temperaturen über 60 °C wird vermutlich durch die Sedimentation der lichtstreuenden Aggregate in der Glaskapillare verursacht. Interessanterweise folgt das Lichtstreuungssignal von γ D-V76D dem Fluoreszenzsignal bei der thermischen Denaturierung und

zeigt ebenfalls die drastische Verschiebung des T_M im Vergleich zum Wildtyp-Protein und biphasischen Signalverlauf.

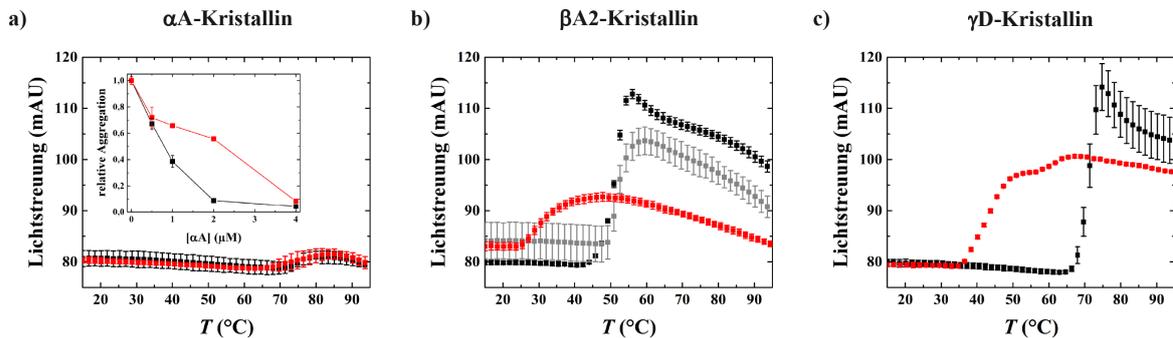


Abbildung 16: Lichtstreuung der Kristallinproben während thermisch-induzierter Entfaltung und Chaperonaktivität von α A-Kristallin. Bei der thermisch-induzierten Entfaltung während der nanoDSF-Messungen wurde neben der intrinsischen Fluoreszenz auch die Lichtstreuung der Proben gemessen (a-c). Die Bestimmung der Chaperonaktivität von α A-Kristallin (a, Einsatz, α A-wt ■, α A-V124E ■) erfolgte bei 42 °C mit dem Modells substrat MDH (4 μ M) mit der angegebenen Konzentration an kleinem Hitzeschockprotein. Alle Messungen mit α A- und γ D-Kristallin, sowie β A2-wt wurden in PBS durchgeführt. Bei β - und γ -Kristallinen wurde 1 mM DTT zugesetzt. Für β A2-wt und β A2-S47P erfolgten die nanoDSF-Messungen in L-Arginin-haltigem Puffer (α A-wt (■), α A-V124E (■) (a); β A2-wt in PBS (■), β A2-wt in L-Arginin-haltigem Puffer (■), β A2-S47P in L-Arginin-haltigem Puffer (■) (b), sowie γ D-wt (■), γ D-V76D (■) (c)). Die Messungen wurden mindestens als Triplikate durchgeführt.

Insgesamt stimmen die Ergebnisse der Untersuchungen zur thermodynamischen Stabilität von Wildtyp-Kristallinen und Katarakt-assoziierten Varianten sehr gut mit dem derzeitigen Modellverständnis überein. Dieses Modell geht von einer erhöhten Aggregationsanfälligkeit der Proteine aufgrund niedrigerer Stabilität aus. Die aggregationsanfälligen β - und γ -Kristalline werden von den α -Kristallinen sequestriert und die Aggregation somit verhindert. Da mit der Mutation V124E in α A-Kristallin aber auch ein molekulares Chaperon betroffen ist, wurde die Chaperonaktivität des Wildtyp-Proteins und der V124E-Variante untersucht (Abbildung 16a, Einsatz). Dazu wurde das Modells substrat MDH verwendet. Dieses Protein aggregiert bei einer Temperatur von 42 °C und bildet große, lichtstreuende Aggregate, die eine Änderung des relativen Absorptionssignals der Lösung bei 350 nm durch Lichtstreuung hervorrufen. Während durch α A-wt bereits bei einem substöchiometrischen Verhältnis von 1:2 (α A-wt:MDH, jeweils bezogen auf die Konzentration des Monomers) eine nahezu komplette Unterdrückung der Aggregation von MDH stattfindet, ist α A-V124E deutlich weniger chaperonaktiv. Hier ist ein äquimolares Verhältnis notwendig um einen ähnlichen Effekt zu erzielen. In der Kataraktmutante Aey7 (α A-V124E) könnte es durch die geringere Chaperonaktivität der V124E-Variante zu einem vorzeitigen Verbrauch des Chaperonreservoir und so zu einer frühzeitigen Trübung der Linse kommen.

3.1.2.2 Quartärstrukturanalyse von Wildtyp-Kristallinen und Varianten

Neben der thermodynamischen Stabilität, wurde auch die apparente Quartärstruktur der Kristalline untersucht. Dazu wurden analytische Ultrazentrifugation und SEC-MALS- bzw. SEC-HPLC-Messungen durchgeführt (Abbildung 17).

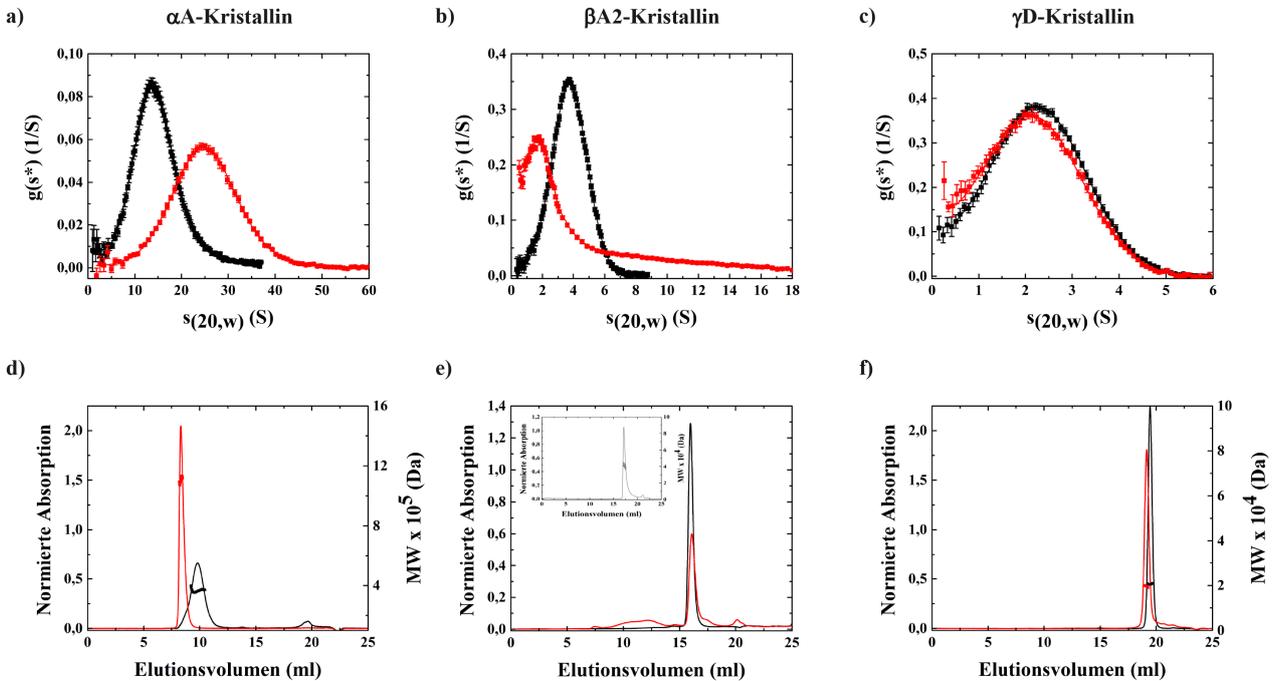


Abbildung 17: Quartärstrukturanalyse von Wildtyp-Kristallinen und Katarakt-assoziierten Varianten. In Teilabbildung a-c) ist die $g(s^*)$ -Auftragung von Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe mit murinen Kristallinen (α A-wt (■), α A-V124E (■) (a); β A2-wt (■), β A2-S47P (■) (b), sowie γ D-wt (■), γ D-V76D (■) (c)) gezeigt. Die Kristalline wurden bei einer Konzentration von 10 μ M bei 22 000 rpm für α -Kristalline und 42 000 rpm für β - und γ -Kristalline bei 20 °C zentrifugiert. Die Absorption der Proben bei 230 nm wurde kontinuierlich in Abhängigkeit der Radialposition gemessen. Die Datenauswertung erfolgte mit dem Programm DCDDT+. In Teilabbildung d-f) ist die chromatographische Analyse der Kristallinvarianten gezeigt. Für SEC-MALS-Läufe wurden 100 μ l an 10 μ M Kristallinlösung auf eine äquilibrierte Superdex 200 Increase 10/300 GL geladen und mit 0,4 ml/min chromatographiert. Wegen der geringen Löslichkeit von β A2-S47P konnten SEC-MALS-Messungen nur für β A2-wt durchgeführt werden (e, Einsatz). Daher wurden mit β -Kristallinen SEC-HPLC-Läufe in L-Arginin-haltigem Puffer durchgeführt (e). Hierzu wurde eine Superdex 200 10/300 GL Säule bei 0,5 ml/min und gleichem Ladebedingungen verwendet. (α A-wt (—), α A-V124E (—) (d); β A2-wt (—) in PBS, β A2-wt (—), β A2-S47P (—) (e), sowie γ D-wt (—), γ D-V76D (—) (f)). Die Messungen erfolgten in PBS für α A-Kristalline, PBS 1 mM DTT für β A2-wt, γ D-Kristalline und L-Arginin-haltigem Puffer für β A2-Kristalline. Alle Messungen wurden als Triplikate durchgeführt. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Datensatz.

Die α -Kristalline zeigen eine sehr breite, heterogene Verteilung und sedimentieren bei etwa 13,9 S für α A-wt und 25,0 S für α A-V124E. Dies entspricht etwa einem 28-mer für α A-wt und circa 60-mer für α A-V124E. Der Sedimentationskoeffizient von α A-wt ist ähnlich dem von humanem α A- und α B-wt. Für humanes α A-wt liegt der $s_{(20,w)}$ -Wert bei 14,3 S (unveröffentlichte Daten Philipp Schmid und Dr. rer. nat Christoph Kaiser, Professur für Elektronenmikroskopie, Technische Universität München, DEU). Der apparente Sedimentationskoeffizient für humanes α B-wt wurde zu 16,2 S bestimmt (65). Die gemessenen Sedimentationskoeffizienten liegen dennoch deutlich unter den für murines α L-Kristallin gemessenen S-Werten von etwa 20-25 S (Abbildung 12). Mögliche Ursache könnte die

Abwesenheit von Modifikationen sein. Dem hohen Sedimentationskoeffizienten entsprechend, eluieren die α -Kristalline auch bei geringem Elutionsvolumen (Abbildung 17d). Im Falle von α A-V124E liegt das Elutionsvolumen im Ausschlussvolumen der Superdex 200 10/300 GL Säule von 8,5 ml (149,150). Die durch Mehrwinkellichtstreuung berechnete molekulare Masse entspricht einem 18-21-mer für α A-wt, sowie circa 56-mer für α A-V124E und liegt damit in der gleichen Größenordnung der mittels AUZ bestimmten Werte (Tabelle 5). Für β A2-Kristallin konnte nur die molekulare Masse bzw. die Quartärstruktur des Wildtyp-Proteins bestimmt werden. Aufgrund der starken Destabilisierung durch die S47P-Mutation, entfaltet das Protein vermutlich während des Laufs. Wie im SEC-HPLC-Profil sind bei β A2-S47P mutmaßlich unspezifische höhermolekulare Aggregate zu erkennen. In guter Übereinstimmung zwischen den zwei Messmethoden, liegt das Wildtyp-Protein von β A2 in Lösung als Dimer vor. Für γ D-wt und γ D-V76D wurde die molekulare Masse zu 22 kDa bestimmt und das Protein liegt entsprechend als Monomer in Lösung vor.

Tabelle 5: Quartärstrukturanalyse von Wildtyp-Kristallinen und Katarakt-assoziierten Varianten.

	SEC-MALS		$s_{(20,w)}$ (S)	AUZ	
	berechnete MM (kDa)	apparente Quartärstruktur		berechnete MM (kDa)	apparente Quartärstruktur
α A-wt	399 ± 28	18-21-mer	$13,9 \pm 0,1$ $14,8 \pm 0,1^\dagger$	- $555 \pm 14^\dagger$	- 28-mer [†]
α A-V124E	1110 ± 13	56-mer	$25,0 \pm 0,1$ $27,5 \pm 1,5^\dagger$	- $1207 \pm 138^\dagger$	- 60-mer [†]
β A2-wt	42 ± 1	Dimer	$3,9 \pm 0,1$	37 ± 2	Dimer
β A2-S47	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
γ D-wt	22 ± 1	Monomer	$2,4 \pm 0,1$	22 ± 1	Monomer
γ D-V76D	22 ± 1	Monomer	$2,3 \pm 0,1$	21 ± 1	Monomer

Gelistet ist die aus SEC-MALS- bzw. analytischen Ultrazentrifugationsläufen berechnete molekulare Masse (MM in kDa) und die daraus abgeleitete Quartärstruktur (n-mer). Die Sedimentationskoeffizienten ($s_{(20,w)}$) und molekularen Massen wurden mit dem Programm DCDT+ bestimmt. Aufgrund der geringen thermodynamischen Stabilität von β A2-S47P konnten keine Werte bestimmt werden. Im Falle der α -Kristalline erfolgte die Berechnung des $s_{(20,w)}$ -Werts, dem MW und der Quartärstruktur wegen der starken Heterogenität der Proteinlösung mit dem Programm SedFit. (n.b.: nicht bestimmbar; [†]: mit SedFit berechnet; -: nicht berechnet).

3.1.2.3 Proteolytische Stabilität von Wildtyp-Kristallinen und Varianten

Ein weiterer diskutierter Grund für die Entstehung von Katarakt ist die Akkumulation von Kristallinfragmenten, die durch unspezifischen proteolytischen Abbau der Proteine entstehen. Um zu bestimmen, ob und welche Unterschiede zwischen Wildtyp-Kristallinen und den katarakt-assoziierten Varianten bestehen, wurde limitierte Proteolyse durchgeführt. Dazu wurden die Kristalline mit α -Chymotrypsin verdaut und die enzymatische Reaktion zu bestimmten Zeitpunkten gestoppt. Nach der

gelelektrophoretischen Trennung der Ansätze, wurde die verbleibende Menge an unverdaulichem Volllängenprotein densitometrisch ermittelt und gegen die Zeit aufgetragen. Aus dieser Auftragung konnte die Stabilität der Kristalline gegenüber dem enzymatischen Abbau durch die Protease abgeschätzt werden (Abbildung 18).

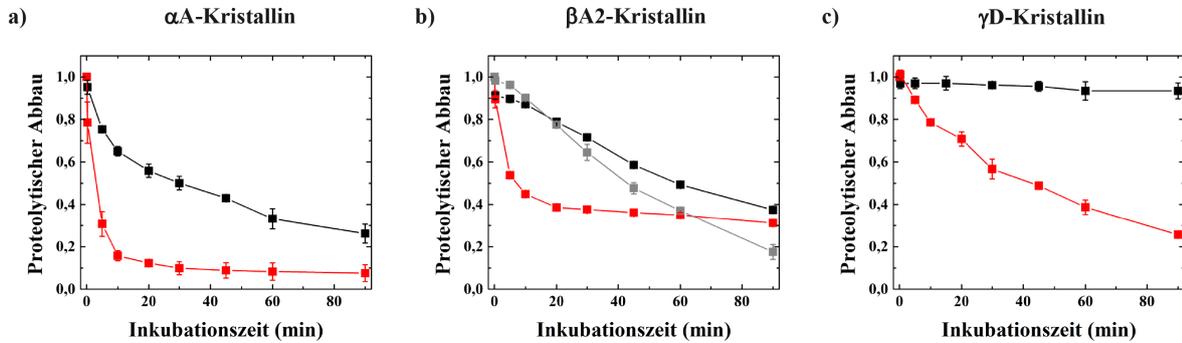


Abbildung 18: Limitierte Proteolyse von Wildtyp-Kristallinen und Katarakt-assoziierten Varianten. Zur Bestimmung der Empfindlichkeit gegenüber proteolytischem Abbau wurden zu 10 μ M Kristallinlösung *ad* 0,4 % (w/w) α -Chymotrypsin gegeben und die Reaktion bei 25 °C zu definierten Zeitpunkten mit *ad* 2 mM PMSF gestoppt (α A-wt (■), α A-V124E (■) (a); β A2-wt (■) in L-Arginin-freiem Puffer, β A2-wt (■) und β A2-S47P (■) in L-Arginin-haltigem Puffer (b), sowie γ D-wt (■), γ D-V76D (■) (c). Der Grad an proteolytischem Verdau des Volllängenproteins wurde durch densitometrische Auswertung der Gele mit dem Programm ImageJ bestimmt. Die Intensität der Bande des Volllängenproteins wurde gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Nicole Lim, Ph.D. (Lehrstuhl für Biotechnologie, Technische Universität München, DEU) durchgeführt.

Dabei zeigte sich, dass alle drei Katarakt-assoziierten Kristallinvarianten deutlich empfindlicher gegenüber proteolytischem Abbau waren als die Wildtyp-Proteine. Während bei α A-wt das Signal nach etwa 30 min auf die Hälfte abnimmt, ist dies dieser Signalabfall bei α A-V124E bereits nach weniger als 5 min beobachtbar. Für Experimente mit β A2-S47P wurde dem Messpuffer 500 mM L-Arginin zugegeben und für β A2-wt eine Kontrolle mit und ohne Zusatz von L-Arginin durchgeführt. Auch hier ist ein deutlich schnellerer Abbau der Kristallinvariante im Vergleich zum Wildtyp-Protein zu erkennen. Während bei β A2-wt das Signal nach etwa 60 min um die Hälfte abnimmt, ist dies bei β A2-S47P bereits zwischen 5-10 min der Fall. Allerdings bleibt der Grund für das konstante Signal bei β A2-S47P nach 20 min Inkubationszeit unklar. Ein möglicher Grund könnte die hohe L-Arginin-Konzentration von 500 mM sein, da bei der Kontrolle mit β A2-wt in Puffer ohne zugesetztes L-Arginin ein fast vollständiger Abbau des Gesamtproteins innerhalb von 90 min stattfindet. Im Gegensatz zu den α A- und β A2-Kristallinen wird γ D-wt kaum während der Inkubationsdauer durch α -Chymotrypsin abgebaut. So nimmt das Signal auch nach 90 min Inkubationszeit kaum ab, während es im Falle von γ D-V76D nach 45 min um etwa die Hälfte abfällt.

Die durchgeführten Experimente mit den murinen Kristallinen zur Bestimmung der thermodynamischen Stabilität, Aggregationsanfälligkeit und Empfindlichkeit gegenüber proteolytischem Verdau, fügen sich sehr gut in die derzeitige Modellvorstellung der Kataraktentstehung ein. Diese geht von einer erhöhten Aggregationsanfälligkeit der thermodynamisch

destabilisierten, Katarakt-assoziierten Varianten aus, die das Chaperonreservoir frühzeitig aufbrauchen und letztendlich das System überlasten. Durch die unkontrollierte Aggregation dieser destabilisierten Spezies kommt es zur Bildung von lichtstreuenden Aggregaten in der Linse.

Alle drei Katarakt-assoziierten Varianten (α A-V124E, β A2-S47P und γ D-V76D) zeigen einen deutlich zu niedrigeren Temperaturen verschobenen Übergangsmittelpunkt (T_M) bei der thermisch-induzierten Entfaltung. Während die Verschiebung des T_M von α A-Kristallin nur etwa 10 °C zwischen Wildtyp-Protein und Variante beträgt, fällt diese für γ D-Kristallin deutlich stärker aus (Tabelle 4). Neben der Herabsetzung des T_M ist zudem noch eine Veränderung im Entfaltungsverlauf zu erkennen. Während γ D-wt einen monophasischen Verlauf bei CD- und nanoDSF-Messungen zeigt, ist bei γ D-V76D ein biphasischer Übergang erkennbar. Diese Änderung des Entfaltungsverlaufs wurde auch für humanes γ D-V76D beschrieben und lässt sich auf ein stabiles Entfaltungsintermediat zurückführen (145,151). Das Faltungsintermediat von humanem γ D-V76D kann bei einer Harnstoffkonzentration von 4,2 M detektiert werden. Während die C-terminale Domäne noch gefaltet ist, liegt die N-terminale Domäne mit der darin enthaltenen V76D-Mutation komplett entfaltet vor (147). Dieser lange, vollständig entfaltete und frei lösungsmittelzugängliche Abschnitt könnte den Ausgangspunkt für amorphe Aggregation bilden. Interessanterweise reduziert die künstliche Erhöhung der Ubiquitinierung von γ D-V76D, durch Kotransfektion einer Ubiquitinligase (CHIP) und eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (Ubc5), die Proteinaggregation in humanen Linsenepithelzellen (152). Sowohl die Linsenepithel- als auch Linsenfaserzellen besitzen einen funktionalen Ubiquitin-Proteasom-Weg (153,154). So könnte neben der Aggregation *per se*, ein zu langsamer Abbau von aggregationsanfälligen Spezies an der Kataraktentstehung beteiligt sein.

Am auffallendsten sind die Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp-Protein für β A2-S47P. Das Protein ist ohne den Zusatz von stabilisierenden bzw. aggregationsunterdrückenden Agenzien wie L-Arginin nicht in Puffer löslich. Um eine Löslichkeit von maximal 10 μ M Protein zu erreichen, ist die Zugabe mindestens 500 mM L-Arginin nötig. Unter diesen Bedingungen zeigt β A2-S47P ein SEC-HPLC-Profil ähnlich dem des Wildtyp-Proteins. Dies lässt auf eine wildtyp-ähnliche Quartärstruktur schließen, nach der die S47P-Variante ebenfalls Dimere in Lösung ausbildet (Abbildung 17e). Bei Ultrazentrifugationsexperimenten zeigt das β A2-S47P Protein jedoch einen deutlich niedrigeren Sedimentationskoeffizienten als das Wildtyp-Protein (Abbildung 17b). Dies könnte an der metastabilen Struktur des Proteins und daraus resultierende Entfaltung während des mehrstündigen Sedimentationsgeschwindigkeitslaufes liegen. Bestärkt wird die Annahme der Metastabilität auch durch die drastische Herabsetzung des T_M um mehr als 26 °C. Der Entfaltungsvorgang der S47P-Variante konnte trotz der geringen Starttemperatur von 15 °C bei den nanoDSF-Messungen nicht vollständig aufgelöst werden. Basierend auf den Verläufen der nanoDSF-Messungen liegt β A2-S47P oberhalb von 30 °C vollständig entfaltet vor.

Neben der thermodynamischen Stabilität wird bei α A-Kristallin zusätzlich auch die Quartärstruktur und Chaperonaktivität durch die Mutation beeinflusst. Zwar scheint die V124E-Variante kaum bei der

thermisch-induzierten Entfaltung zu aggregieren (Abbildung 16a), unterscheidet sich jedoch deutlich in der durchschnittlichen Partikelgröße und den Chaperoneigenschaften vom Wildtyp-Protein. Die Katarakt-assoziierte Variante α A-V124E bildet in Lösung deutlich größere Oligomere (Abbildung 17a,d) und ist weniger chaperonaktiv (Abbildung 16a, Einsatz). Nach derzeitigem Verständnis der kleinen Hitzeschockproteine, wird davon ausgegangen, dass hochmolekulare Oligomerspezies eine wenig chaperonaktive Speicherform der α -Kristalline darstellen. Auf einen aktivierenden Stimulus hin, zerfallen die großen Oligomere in kleinere Spezies mit hoher Chaperonaktivität und unterdrücken so die Aggregation von Substratproteinen (56,65). In Einklang mit dieser Annahme stehen auch die Beobachtungen für α A-V124E. Im Vergleich zum Wildtyp-Protein ist eine deutlich geringere Chaperonaktivität gegenüber dem Modellsubstrat MDH bei der Katarakt-assoziierten Variante beobachtbar. In der *in vivo* Situation könnte diese geringere Chaperonaktivität eine schnellere Erschöpfung des Chaperonreservoirs bedingen und zum frühzeitigen Auftreten von lichtstreuenden Aggregaten führen.

Eine weitere Gemeinsamkeit aller Varianten ist die höhere Empfindlichkeit gegenüber proteolytischem Abbau (Abbildung 18). So zeigen alle untersuchten Katarakt-assoziierten Varianten einen schnelleren Abbau durch α -Chymotrypsin als das jeweilige Wildtyp-Protein. Ähnliche Effekte wurden bereits für die humanen Katarakt-assoziierten Varianten β B1-S129R und γ D-W42R beschrieben (155,156). In beiden Fällen ist die Katarakt-assoziierte Variante sehr empfindlich gegenüber Proteasen. Bei β B1-Kristallin war die Trypsin-verdaute S129R-Variante zudem deutlich aggregationsanfälliger bei Hitzestress als das gleich behandelte Wildtyp-Protein. So könnte neben dem Chaperonnetzwerk auch das Proteasenzentrum in der Linse durch die Akkumulation von Proteolysefragmenten überlastet werden. Resultat dieser Überlastung wäre eine sehr früh einsetzende Linsentrübung durch die Aggregation der Katarakt-assoziierten Kristalline oder von trunkierten Varianten.

3.1.3 Biochemische Charakterisierung des Proteoms von Kataraktmutanten

Zur Analyse des Einflusses der mutierten Kristalline auf die Augenlinse, wurden die entsprechenden Mausmutanten untersucht. Dazu wurden die Stämme Aey7 (α A-V124E), Aca30 (β A2-S47P) und Aey4 (γ D-V76D) verwendet. Diese tragen die Katarakt-assoziierte Mutation jeweils homozygot und entwickeln alle in jungem Alter Katarakt (93-95). Die Katarakt-assoziierte Mutation V124E in α A-Kristallin befindet sich in der zentralen AKD des Proteins. Die Mutationen S47P in β A2-S47P, sowie V76D in γ D-Kristallin liegen jeweils in der N-Terminalen Domäne des Proteins. Die Wildtyp-Stämme (C3HeB/FeJ und C57Bl/6J) bilden dabei den genetischen Hintergrund der verwendeten Kataraktmutanten (C3HeB/FeJ bei Aey4, Aey7 und C57Bl/6J bei Aca30). Die beiden Wildtyp-Stämme sind in den biologischen, biochemischen Eigenschaften der Linse, sowie der Plastizität des Proteoms sehr gut untereinander vergleichbar (siehe Punkt 3.1.1). In Abbildung 19 sind exemplarisch Scheimpflugaufnahmen der Kataraktmutanten und den dazugehörigen Wildtyp-Stämmen gezeigt.

Durch Scheimpflugaufnahmen lässt sich die mittlere Linsendichte bestimmen, die als Maß für die Lichtdurchlässigkeit der Linse bei 475 nm dient. Eine mittlere Linsendichte von 0 % bedeutet eine komplett klare, lichtdurchlässige Linse, während eine mittlere Linsendichte von 100 % eine vollständig trübe, lichtundurchlässige Linse beschreibt (157).

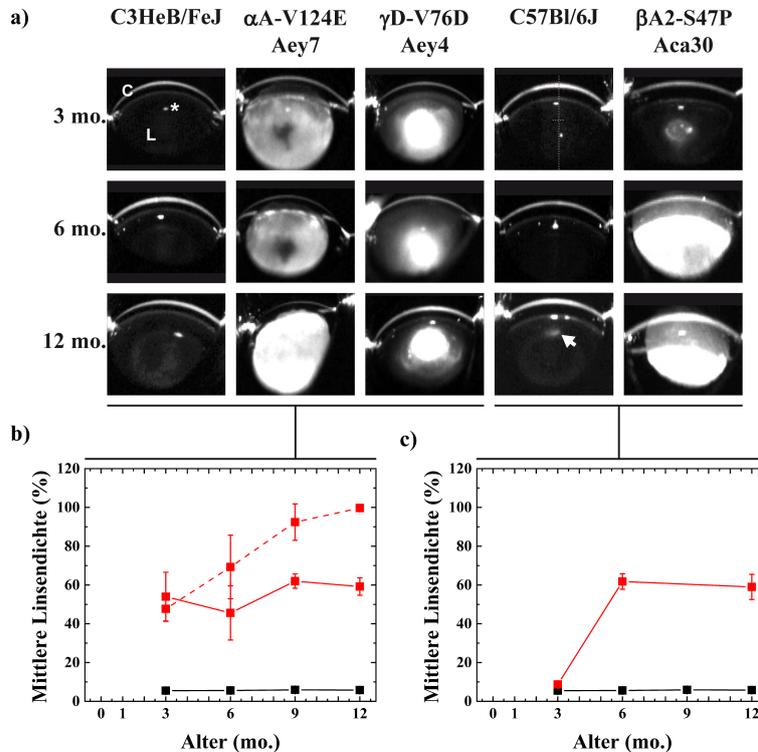


Abbildung 19: Scheimpflugaufnahmen von Kataraktmutanten und den dazugehörigen Wildtyp-Mäusen. Die nicht-invasiven Scheimpflugaufnahmen wurden von allen Stämmen zu verschiedenen Zeitpunkten aufgenommen und so die mittlere Linsendichte bestimmt. Diese dient als Maß für die Lichtdurchlässigkeit (a). Der zeitliche Verlauf der optischen Dichte der Augenlinse in Abhängigkeit des Alters ist für C3HeB/FeJ (—), Aey7 (α A-V124E, —), Aey4 (γ D-V76D, - -) in b) und in c) für C57Bl/6J (—), Aca30 (β A2-S47P, —) dargestellt. Der Pupillenreflex wurde mit 5% (w/v) wässriger Atropinlösung unterdrückt. (C: Cornea, L: Linse, \nearrow : schwache anteriore Linsentrübung) Die Daten wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jochen Graw (Institut für Entwicklungsgenetik, Helmholtz Zentrum, München, DEU) zur Verfügung gestellt.

Während bei allen drei Mutantenlinien eine nahezu vollständige Trübung der Linse im Alter von 6 Monaten zu beobachten war, bleiben die Linsen der beiden Wildtyp-Stämme während des gesamten Beobachtungszeitraums klar. Eine mittlere Linsendichte von 100 % entspricht dabei einer komplett lichtundurchlässigen Linse. Der zeitliche Verlauf bis zu einer vollständigen Trübung der Augenlinse unterscheidet sich stark zwischen den Kataraktmutanten. Während die Linsen der Aca30-Mutante in einem Alter von 3 Monaten noch weitestgehend klar sind, liegt in den Linsen von Aey7-Mäusen schon eine nahezu vollständige Trübung vor. Schon beim Öffnen der Augen, etwa zwei Wochen nach der Geburt, ist bei den Linsen von Aey7- und Aey4-Mäusen eine Trübung zu erkennen, während die Aca30-Linsen noch klar sind (persönliche Kommunikation, Prof. Dr. Jochen Graw, Institut für Entwicklungsgenetik, Helmholtz Zentrum, München, DEU).

Das Gewicht der Kataraktmutanten und die aus den Linsen extrahierbare Proteinmenge waren für die Kataraktmutanten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant geringer (Tabelle S3, Abbildung 20).

Lag das Linsenfeuchtgewicht von Aey4-Mäusen noch nahe bei dem der Wildtyp-Mäuse, war es in Aca30-Mäusen um etwa ein Drittel reduziert.

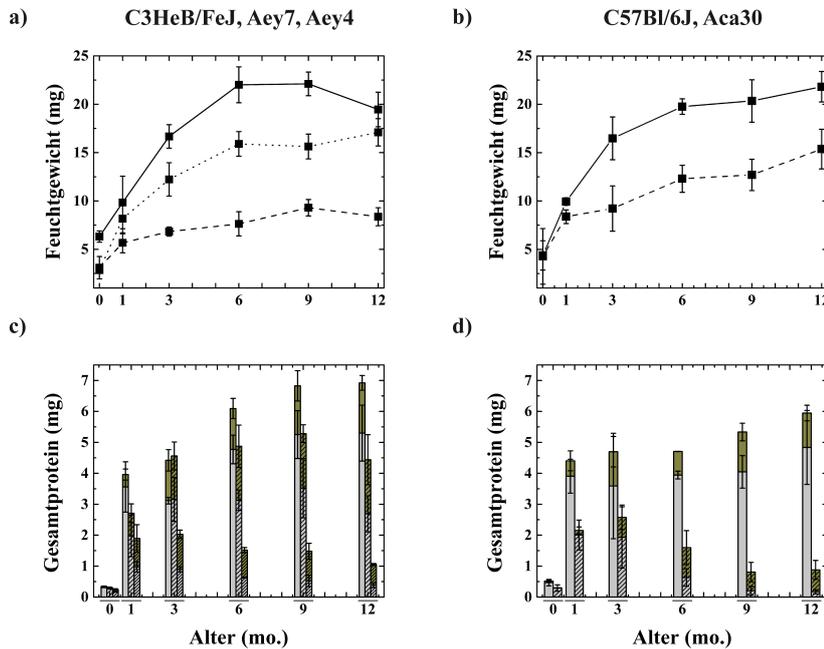


Abbildung 20: Linsenfeuchtgewicht und Menge an extrahierbarem Proteinmenge aus den Linsen von alternden Wildtyp-Mäusen und Kataraktmutanten. Das paarweise Linsenfeuchtgewicht der Wildtyp-Stämme C3HeB/FeJ (—, a) und C57Bl/6J (—, b) sowie der Kataraktmutanten (Aey7 (—•—, Aey4 (—•••—) a) und Aca30 (—•—) b), wurde nach Isolation der Linsen an einer Feinwaage bestimmt. Die Bestimmung des Gesamtproteins in der wasserlöslichen und -unlöslichen Fraktion erfolgte nach Bradford. Die Gesamtmenge an Protein in der Linse von C3HeB/FeJ (glatte Balken), Aey7 (schraffierte Balken) und Aey4 (dicht schraffierte Balken) (c), sowie C57Bl/6J (glatte Balken) und Aca30 (schraffierte Balken) (d) setzt sich aus dem wasserlöslichen (grau) und -unlöslichen (grün) Anteil zusammen.

Bei neugeborenen Mäusen ist die extrahierbare Menge an Protein in der Linse zwischen dem Wildtyp und der jeweiligen Mutante vergleichbar, nimmt aber insbesondere für Aey7- und Aca30-Mäusen in älteren Linsen drastisch ab. Während in den Wildtyp-Stämmen aus 12 Monate alten Linsen noch bis zu 7 mg aus C3HeB/FeJ- bzw. 6 mg aus C57Bl/6J-Mäusen extrahierbar sind, liegt die Menge bei Aey7- und Aca30-Mäusen mit je etwa 1 mg deutlich darunter. Bei Aca30-Mäusen korreliert die Abnahme an extrahierbarem Protein zudem mit der Zunahme der mittleren Linsendichte nach 3 Monaten Lebenszeit. Die Aey4-Mutante liegt mit etwa 4,5 mg aus 12 Monate alten Linsen extrahierbarem Protein zwischen dem Wildtyp und der Aca30-Mutante. Während die extrahierbare Menge an wasserlöslichem bzw. -unlöslichem Protein pro mg Linsenfeuchtgewicht bei Aey4-Mäusen über das Alter in etwa gleich bleibt, ändert sich diese bei Aey7- und Aca30-Mäusen (Abbildung S1). Insbesondere nimmt die Menge an extrahierbarem Protein in der wasserlöslichen Fraktion ab, während sie in der wasserunlöslichen Fraktion konstant bleibt. Dies lässt auf eine Zunahme des Wasseranteils in der Augenlinse von gealterten Mäusen schließen.

Neben der Abnahme an extrahierbarem Protein fällt auch die unterschiedlich starke Verschiebung der Anteile von wasserlöslicher und -unlöslicher Fraktion auf (Abbildung 21).

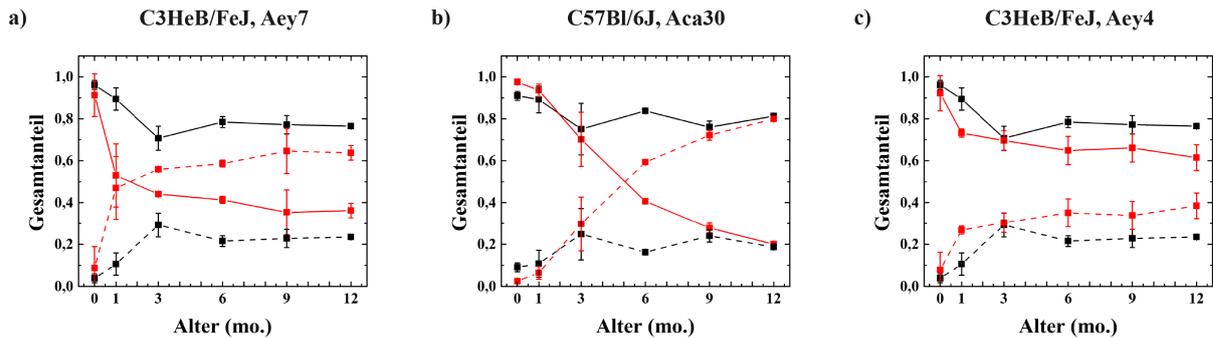


Abbildung 21: Relative Anteile der wasserlöslichen und -unlöslichen Fraktion in Linsenextrakten aus alternden Wildtyp-Mäusen und Kataraktmutanten. Aufgetragen ist der relative Anteil der wasserlöslichen (—) und -unlöslichen Fraktion (---) am Gesamtprotein in Linsenextrakten zu verschiedenen Zeitpunkten (a): C3HeB/FeJ (■), Aey7 (α A-V124E, ■) sowie b): C57Bl/6J (■), Aca30 (β A2-S47P, ■) und c): C3HeB/FeJ (■), Aey7 (γ D-V76D, ■). Die Berechnung der Anteile erfolgte ausgehend von den in Abbildung 20 gezeigten Werten.

Sowohl bei neugeborenen Wildtyp-Mäusen als auch bei Kataraktmutanten machen die Proteine in der wasserlöslichen Fraktion nahezu die Gesamtmenge an extrahierbarem Protein aus. Während des Alterns treten jedoch deutliche Unterschiede im anteiligen Verlauf der zwei Fraktionen auf. Bei beiden Wildtyp-Stämmen (C3HeB/FeJ und C57Bl/6J) bleibt der Anteil an wasserlöslichem Protein ab einem Alter von 3 Monaten nahezu konstant bei etwa 80 %. Der wasserunlösliche Anteil steigt von unter 5 % auf etwa 20 % in gealterten Wildtyp-Mäusen. Bei Aey7-Mäusen jedoch, liegt schon nach nur einem Monat etwa die Hälfte an extrahierbarem Protein in der wasserunlöslichen Fraktion vor und steigt auf über 60 % in gealterten Mäusen an (Abbildung 21a). Noch stärker ist die Zunahme des wasserunlöslichen Anteiles im Alter bei Aca30-Mäusen ausgeprägt (Abbildung 21b). Hier ist das Verhältnis nach 12 Monaten Lebensdauer im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen invertiert und es liegen etwa 80 % der extrahierbaren Proteine im wasserunlöslichen Teil des Rohextrakts nach Homogenisierung der Linse vor. Interessanterweise liegen die Anteile der wasserlöslichen und -unlöslichen Fraktion bei Aey4-Mäusen zu allen untersuchten Zeitpunkten etwa in dem Bereich der C3HeB/FeJ Wildtyp-Mäuse. Eine direkte Korrelation zwischen dem Auftreten von Katarakt ab einem bestimmten Verhältnis von wasserlöslicher zu -unlöslicher Fraktion war aus den Messdaten nicht ersichtlich.

3.1.3.1 Die Plastizität des Proteoms in der Augenlinse von Kataraktmutanten

Nach der heutigen Vorstellung der Kataraktgenese, kommt es durch die thermodynamische Destabilisierung von Katarakt-Varianten (hier: α A-V124E (Aey7), β A2-S47P (Aca30) und γ D-V76D (Aey4)) zur Aggregation der Proteine in der Linse und damit zu einer Überwältigung des Chaperonnetzwerks (88,144,158). Solche beschleunigten Aggregationsprozesse könnten die frühzeitige Linsentrübung und Verschiebung im Verhältnis der wasserlöslichen und -unlöslichen Fraktion bedingen. Um der Vermutung nachzugehen, dass die Katarakt-assoziierten Varianten in der Linse aggregieren, wurden Linsenextrakte aus den drei Kataraktmutanten mittels 2-DE untersucht (Abbildung 22). Die Proteinspots wurden auch hier mehrfach redundant und eindeutig mittels

MALDI-TOF-MS identifiziert und der jeweiligen Isoform zugeordnet. Wie auch in den Wildtyp-Stämmen konnten alle 18 Isoformen in den 2D-Gelen der Kataraktmutanten nachgewiesen werden, mit der Ausnahme von β A2-S47P in Aca30-Mäusen.

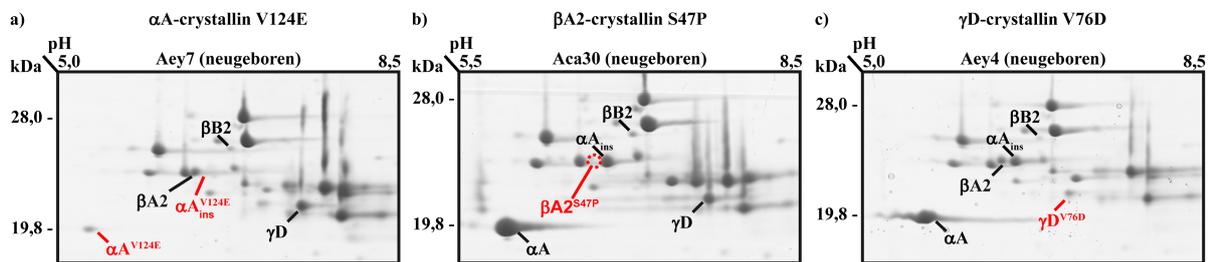


Abbildung 22: 2D-Karten der wasserlöslichen Fraktion von Linsenextrakten aus neugeborenen Kataraktmutanten. Gezeigt ist die niedermolekulare Kristallinregion der wasserlöslichen Fraktion von Linsenextrakten aus neugeborenen Aey7- (a), Aca30- (b) und Aey4-Mäusen (c). Im Falle von Aey7- und Aey4-Mäusen war der Anteil des mutierten Kristallins deutlich gegenüber der Wildtyp-Situation reduziert. Die β A2-S47P-Variante in Aca30-Mäusen konnte nicht mittels MALDI-TOF-MS detektiert werden. Für die 2-DE wurden bis zu 150 μ g Protein aufgetragen.

Der Anteil der Katarakt-assoziierte Variante war in den Linsenextrakten von allen drei Kataraktmauslinien deutlich gegenüber den Wildtyp-Stämmen reduziert (Abbildung S3). Liegt der Anteil von α A-Kristallin in den Linsenextrakten aus neugeborenen Wildtyp-Mäusen bei etwa 18 %, ist er in den Linsenextrakten aus Aey7-Mäusen auf circa 2 % reduziert. Ähnliches ist für γ D-V76D zu beobachten. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ist der Anteil auf γ D-Kristallin von 12 % auf 5 % in den Linsenextrakten aus neugeborenen Mäusen reduziert. Auch fokussiert die mutante Isoform aufgrund der Aminosäuresubstitution bei niedrigerem pI (etwa -0,5 pH-Einheiten verglichen mit dem wildtyp Protein). Die starke Reduktion der γ -Kristalline, insbesondere durch den stark verminderten Anteil an γ D-Kristallin V76D stimmt sehr gut mit früheren Beobachtungen überein (159). Im Falle von neugeborenen Aca30-Mäusen konnte die β A2-Kristallinvariante S47P zu keinem Zeitpunkt mittels MALDI-TOF-MS in der wasserlöslichen Fraktion detektiert werden. In C57Bl/6J Wildtyp-Mäusen hingegen beträgt der Anteil an β A2-Kristallin 2,5 % (Abbildung S3). Nach dem derzeitigen Modell der Kataraktentstehung könnte die Katarakt-assoziierte Variante aufgrund ihrer Aggregationsanfälligkeit entweder in der HMW-Fraktion im wasserlöslichen Teil, aber auch der wasserunlöslichen Fraktion vorkommen. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde neben der wasserlöslichen Fraktion auch immer der wasserunlösliche Teil der Linsenextrakte mittels 2-DE untersucht. Die Zeitpunkte entsprachen dabei denen, wie sie für die Wildtyp-Stämme gewählt wurden. Aufgrund des niedrigen Anteils an Protein in der wasserunlöslichen Fraktion von neugeborenen Mäusen sind in Abbildung 23 zur besseren Veranschaulichung die Gele der wasserlöslichen und -unlöslichen Fraktion von Linsenextrakten aus 1 Monat alten Linsen aller Kataraktmutanten gezeigt. Auch hier war der Anteil an Katarakt-assoziierte Variante im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp-Stamm deutlich reduziert und im Falle von β A2-S47P, war das Protein weder in 1 Monat alten noch zu einem anderen Alter mittels Massenspektrometrie in der wasserlöslichen oder -unlöslichen Fraktion

detektierbar. Ein Grund dafür könnte möglicherweise der sehr geringe Anteil von β A2-Kristallin von 2,5 % am Linsenproteom sein (Abbildung S3) und die hohe Empfindlichkeit gegenüber Proteasen sein. Entsprechend wäre das Protein durch den sofortigen proteolytischen Abbau nicht detektierbar. Allerdings zeigen die α A-V124E und γ D-V76D-Variante eine ähnlich hohe Empfindlichkeit gegenüber proteolytischem Abbau wie β A2-S47P (Abbildung 18). Auffallend ist jedoch, dass auch in der wasserunlöslichen Fraktion keine Akkumulation der Katarakt-assoziierten Varianten α A-V12E (Aey7) oder γ D-V76D (Aey4) zu beobachten ist.

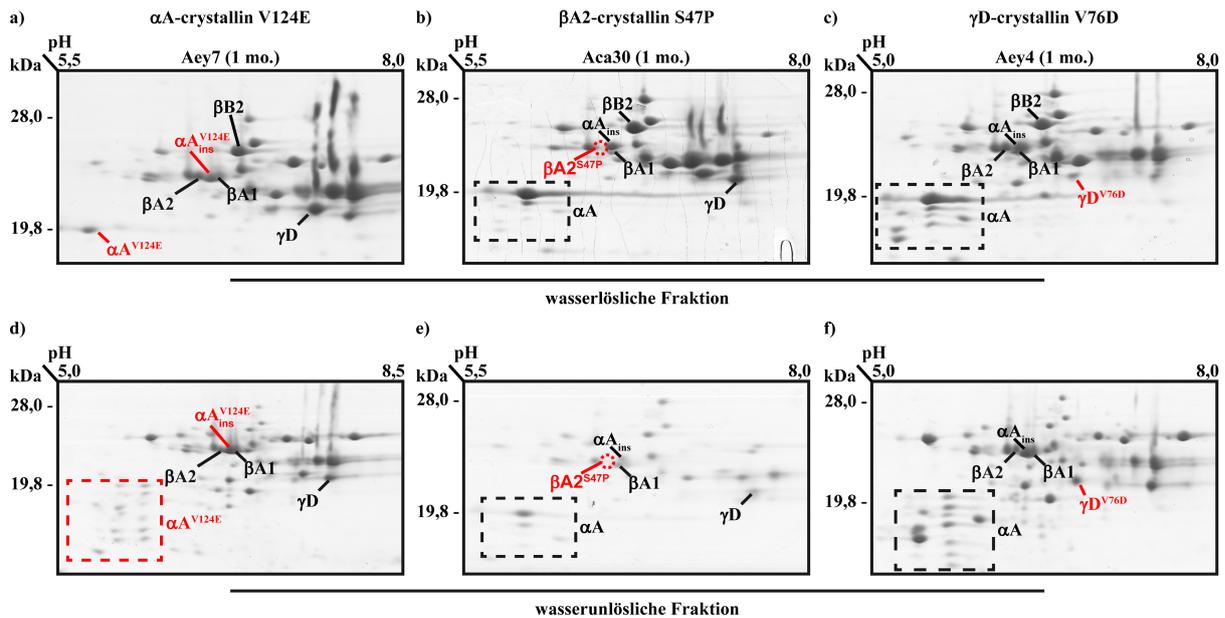


Abbildung 23: 2D-Karten der wasserlöslichen und -unlöslichen Fraktion von Linsenextrakten aus 1 Monat alten Kataraktmutanten. Gezeigt ist die niedermolekulare Kristallinregion der wasserlöslichen und -unlöslichen Fraktion von Linsenextrakten aus 1 Monat alten Aey7- (a,d), Aca30- (b,e) und Aey4-Mäusen (c,f). Im Falle von Aey7- und Aey4-Mäusen war der Anteil an Katarakt-assoziiertem Kristallin deutlich gegenüber dem in Wildtyp-Mäusen reduziert. Die β A2-S47P-Variante in Aca30-Mäusen konnte nicht mittels MALDI-TOF-MS detektiert werden, während der relative Anteil von β B2-Kristallin in Aey7- und Aey4-Mäusen stark nach der Geburt zunimmt. Bei den Kataraktmutanten findet eine starke Modifizierung der Kristalline, insbesondere der α -Kristalline, bereits im jungen Alter statt. Durch die Modifikationen ändert sich das Laufverhalten bei der 2-DE im Vergleich zum unmodifizierten Vollängenprotein. Zu den beschriebenen Modifikationen zählen Deamidierung, Phosphorylierung, Methylierung, Acetylierung, Carbamylierung, Racemisierung, Oxidation und Trunkierungen. Dabei kommt es einer Häufung von modifizierten α -Kristallinen und β B2-Kristallin in der wasserunlöslichen Fraktion im Alter. Für die 2-DE wurden bis zu 150 μ g Protein aufgetragen.

Ebenfalls gut zu erkennen ist die starke Zunahme von β B2-Kristallin in der wasserlöslichen Fraktion von Linsenextrakten aus allen drei Mausstämmen nach der Geburt. Bei allen drei Kataraktmutanten tritt zudem bei α A- und α B-Kristallin bereits in jungem Alter eine starke Zunahme von Modifikationen in der wasserlöslichen und -unlöslichen Fraktion auf. Die beobachteten Proteinmodifikationen wurden in der Literatur mit der Entstehung von Katarakt in Verbindung gebracht, da diese die thermodynamische Stabilität und Löslichkeit der Proteine beeinflussen können (160,161). Wie unter 3.1.1 beschrieben, sind als auftretende Modifikationen Deamidierung, Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Carbamylierung, Racemisierung, Oxidation,

Glykosylierung, Glykierung und Trunkierungen in der Literatur zu finden (15,123). Wie auch in den Linsenextrakten aus Wildtyp-Mäusen, kommt es zu einer Akkumulation der modifizierten α -Kristalline in der wasserunlöslichen Fraktion (Abbildung S4). Davon ist insbesondere α B-Kristallin betroffen und der Anteil von modifiziertem α B-Kristallin ist, verglichen mit der Wildtyp-Situation, bei den Kataraktmutanten erhöht. Bei Aey7 findet zudem eine starke Modifikation von β B2-Kristallin statt, das vermehrt in der wasserunlöslichen Fraktion zu finden ist.

Um die globalen Veränderungen im Anteil der Kristalline besser darstellen zu können, wurden die 2D-Gele, wie für die Wildtyp-Stämme erfolgt, densitometrisch analysiert. Der zeitliche Verlauf der Kristallinanteile ist in Abbildung 24 dargestellt.

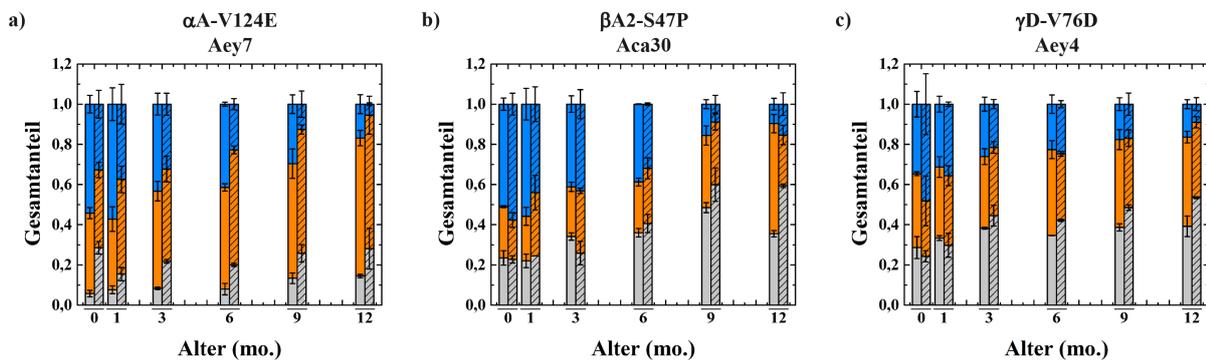


Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf der relativen Kristallinanteile in der alternden Augenlinse von Mausmutanten. Aufgetragen sind die relativen Anteile der drei Kristallinfamilien (α - (grau), β - (orange), und γ -Kristalline (blau)). Die einzelnen Isoformen wurden im entsprechenden, gefärbten 2D-Gel nach densitometrischer Analyse der jeweiligen Kristallinfamilie zugeordnet und auf das Gesamtsignal normiert. Ermittelt wurden die Anteile in der wasserlöslichen (glatte Balken) und -unlöslichen Fraktion (schraffierte Balken) von Linsenextrakten aus Aey7- (a), Aca30- (b) und Aey4-Mäusen (c). Die densitometrische Analyse der 2D-Karten wurde mit dem Programm ImageJ durchgeführt. Die Identifizierung der Proteinspots erfolgte durch MALDI-TOF-MS und Abgleich der Spektren mit der NCBI-Proteindatenbank. Die 2-DE-Analysen wurden als unabhängiges biologisches Duplikat durchgeführt.

Anders als die Wildtyp-Stämme zeigen die Kataraktmutanten deutliche Unterschiede, was die Zusammensetzung der Linsenextrakte bei der Geburt und den anteiligen Verlauf der Kristalline während des Alterns betrifft. Wie auch aus den 2D-Gele ersichtlich (Abbildung 23, Abbildung 24), zeigt die Aey7-Mutante einen deutlich niedrigeren Gehalt an α -Kristallin als die C3HeB/FeJ Wildtyp-Mäuse (Abbildung 10). Dies ist insbesondere auf die starke Reduktion des Anteils von α A-Kristallin zurückzuführen, dass in Form von α A-V124E signifikant im Vergleich zur Situation in den Wildtyp-Mäusen reduziert ist. Ebenso fällt eine sehr starke Abnahme der γ -Kristalline während des Alterns auf. Bei Aey7 liegt der Anteil an γ -Kristallinen, wie auch bei Wildtyp-Mäusen bei etwa 50-60 %. Nimmt der Anteil an γ -Kristallinen bei Wildtyp-Mäusen nach 12 Monaten auf etwa 25-30 % ab, sinkt dieser bei Aey7-Mäusen auf etwa 15 %. Durch das geringere Vorkommen der α A-V124E-Variante ist zudem der relative Anteil an β -Kristallinen erhöht. Dies gilt insbesondere bei gealterten Mäusen, bei denen der Abbau der γ -Kristalline weit vorangeschritten ist. Bei Aca30-Mäusen zeigen die Linsen von neugeborenen Mäusen ebenfalls eine mit dem Wildtyp vergleichbare Zusammensetzung. Allerdings

nimmt der Anteil der γ -Kristalline in 12 Monate alten Linsen auf etwa 10 % ab, mit einer apparenten Zunahme der α -Kristalline. Besonders drastisch fällt der Abbau der γ -Kristalline nach 6 Monaten Lebenszeit aus. Bei der Aey4-Mutante ist bereits bei der Geburt der Anteil an γ -Kristallinen reduziert. Dies wird primär durch den niedrigeren Anteil an γ D-Kristallin, hier die γ D-V76D-Variante, bedingt (siehe auch Abbildung S3). Interessanterweise ist wie auch bei den beiden Wildtyp-Stämmen (Abbildung 10) die Zusammensetzung des wasserlöslichen und -unlöslichen Teils der Linsenextrakte sehr ähnlich bis identisch. Die erwartete Akkumulation der Katarakt-assoziierten Varianten in der wasserunlöslichen Fraktion konnte nicht beobachtet werden.

Als nächster Schritt wurde die Plastizität des Proteoms der Kataraktmutanten mittels SEC-HPLC der wasserlöslichen Fraktion von Linsenextrakten untersucht (Abbildung 25). Auch hier ist die Plastizität des Proteoms in der murinen Augenlinse gut zu erkennen und stimmt qualitativ sehr gut mit den Ergebnissen der 2-DE-Analyse überein. Bei Aey7-Mäusen ist die α L-Fraktion in den SEC-HPLC-Profilen der wasserlöslichen Fraktion nicht zu erkennen. Grund dafür könnte die veränderte Quartärstruktur der α A-V124E-Variante sein. Diese bildet in Lösung deutlich größere Oligomere als das Wildtyp-Protein (Abbildung 17, Tabelle 5). Auffällig ist auch der im Alter abnehmende Anteil der β h-Kristallinfraktion. Wie auch in den SEC-HPLC-Profilen von Linsenextrakten aus Wildtyp-Mäusen, ist diese Fraktion noch gut im SEC-HPLC-Profil von Linsenextrakten aus neugeborenen Aey7-Mäusen zu erkennen. Anders als in Wildtyp-Mäusen nimmt der Anteil der β h-Kristallinfraktion jedoch in alternden Aey7-Mäusen tendenziell ab. Gut zu erkennen ist ebenfalls der starke Abbau der γ -Kristalline während des Alterns, der in seinem Verlauf sehr gut mit den Ergebnissen der 2-DE-Analyse übereinstimmt. Anders als bei den SEC-HPLC-Profilen von Linsenextrakten aus Wildtyp-Mäusen, ist in den Extrakten aus Aey7-Mäusen immer ein Absorptionssignal von residualer DNA erkennbar (Abbildung S5). Das Vorhandensein von DNA ist auch, etwas weniger ausgeprägt, in den Linsenextrakten von Aca30- und Aey4-Mäusen zu erkennen. Selbst bei einem Alter 12 Monaten ist noch residuale DNA in den Linsenextrakten enthalten. Möglicherweise könnte das Vorkommen von DNA durch fehlerhaften Abbau des Zellkerns wie bei OP/OP- oder Aey2-Mäusen bedingt werden (162,163). Allerdings sind solche Beobachtungen nicht für die drei untersuchten Katarakt-Stämme beschrieben. Im Gegensatz zu den Linsenextrakten aus Aey7-Mäusen, ist bei denen aus Aca30- und Aey4-Mäusen die chromatographische Trennung der HMW- und α L-Fraktion mittels SEC-HPLC möglich. Wie auch in den Linsenextrakten aus Wildtyp-Mäusen verschiebt sich die Elution der α L-Fraktion mit dem Alter zu kleineren Volumen, was auf eine Zunahme der Oligomergröße hindeutet. Überraschenderweise nimmt die HMW-Fraktion der beiden Kataraktmutanten im gleichen Maße wie bei den Wildtyp-Stämmen über die Zeit zu. Der Anteil der HMW-Fraktion in den Kataraktmutanten Aca30 und Aey4 ist auch noch bei fast vollständiger Lichtundurchlässigkeit der Linse ab einem Alter von 6 Monaten mit dem Anteil in Wildtyp-Mäusen vergleichbar (siehe Abbildung 11, Abbildung 25). Weiterhin ist auch bei diesen beiden Mausmutanten, wie bei Aey7-Mäusen, eine anteilige Abnahme der β h-Kristallinfraktion während des Alterungsprozesses beobachtbar.

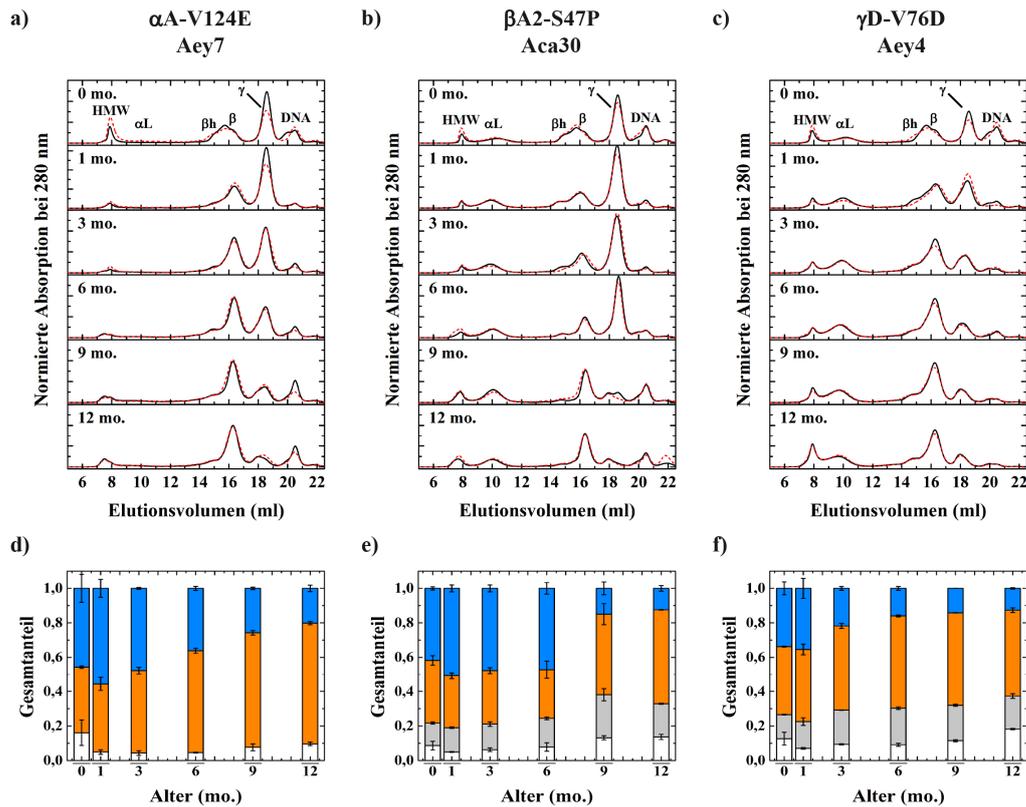


Abbildung 25: SEC-HPLC-Profil der wasserlöslichen Fraktion von Linsenextrakten aus Kataraktmutanten. Gezeigt sind die normierten Elutionsprofile der wasserlöslichen Fraktion zu verschiedenen Zeitpunkten von Linsenextrakten aus den Katarakt-Stämmen Aey7 (α A-V124E, a), Aca30 (β A2-S47P, b) und Aey4 (γ D-V76D, c). Die chromatographische Trennung der Proteine erfolgte bei einer Flussrate von 0,5 ml/min in PBS und 20 °C über eine Superdex 200 10/300 GL Säule mit bis zu 2 mg an aufgetragenem Gesamtprotein in je 100 μ l Auftragsvolumen. Das Absorptionssignal wurde kontinuierlich bei 280 nm aufgezeichnet. Alle Läufe wurden als biologische Duplikate durchgeführt (Lauf 1: —, Lauf 2: ---). Zur leichteren Vergleichbarkeit des Anteils der einzelnen Fraktionen (HMW- (weiß), α L-Fraktion (grau), β - (orange) und γ -Kristalline (blau)), wurde das normierte Flächenintegral für die SEC-HPLC-Profile aufgetragen (d,e,f). Die β h- und β -Kristalline Fraktion wurde zusammengefasst. Die HMW- und α L-Fraktion in Extrakten aus Aey7-Mäusen waren chromatographisch nicht trennbar und wurden ebenfalls zusammengefasst. Das Absorptionssignal der DNA wurde nicht mit in die Auftragung einbezogen.

Verglichen mit den Wildtyp-Mäusen ist auch hier die starke Abnahme der γ -Kristalline während des Alterns prägend. Die Abnahme stimmt sehr gut mit der überein, wie sie durch die 2-DE-Experimente bestimmt wurde. Der Abbau von γ -Kristallinen ist insbesondere bei der Aca30-Mutante sichtbar (Abbildung 24). Liegt der Anteil der γ -Kristalline bei Aca30-Mäusen in einem Alter von 6 Monaten noch bei etwa 50 %, so fällt er innerhalb von 3 Monaten auf 15 %. Die Abnahme der γ -Kristalline ist, wie auch bei den Wildtyp-Mäusen, auf den nahezu vollständigen Abbau von γ A-Kristallin, sowie dem teilweisen Abbau von γ E/F- und γ B/C-Kristallin zurückzuführen (Abbildung S3). Im Falle von Linsenextrakten aus Aey4-Mäusen ist bereits bei der Geburt weniger γ -Kristallin vorhanden. Verursacht wird die Diskrepanz im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen durch das niedrige Vorkommen der Katarakt-assoziierten γ D-V76D-Variante.

Um die in den SEC-HPLC-Experimenten beobachtete apparente Größenzunahme der α L-Fraktion in den Linsenextrakten der Kataraktmutanten zu bestätigen, wurden Sedimentationsgeschwindigkeits-

läufe in einer analytischen Ultrazentrifuge durchgeführt. Die Läufe erfolgten dabei nur für die α L-Fraktion von Aca30- und Aey4-Mäusen, da keine chromatographische Trennung der HMW- und α L-Fraktion in den Linsenextrakten aus Aey7-Mäusen möglich war (Abbildung 26).

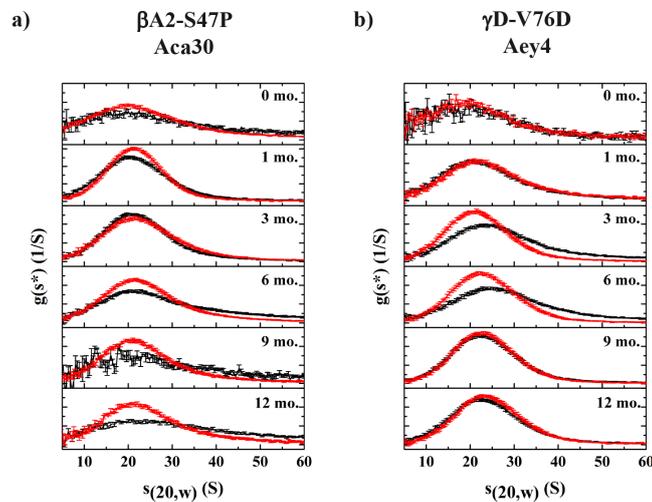


Abbildung 26: Sedimentationskoeffizientenverteilung der α L-Fraktion aus Linsenextrakten von Aca30- und Aey4-Mäusen. Nach der Fraktionierung des wasserlöslichen Teils von Linsenextrakten mittels SEC-HPLC, wurde die α L-Fraktion von Aca30- (a) und Aey4-Mäusen (b) durch Ultrazentrifugation analysiert. Die Proben wurden auf eine Absorption bei 230 nm von $\leq 1,5$ in PBS eingestellt und bei 13 000 rpm, 20 °C bis zur vollständigen Sedimentation zentrifugiert. Die Absorption in Abhängigkeit der Radialposition wurde kontinuierlich bei 230 nm gemessen. Die Messungen erfolgten als unabhängiges biologisches Duplikat (Lauf 1: —, Lauf 2: —) und wurden nach dem $g(s^*)$ -Modell mit dem Programm DCDT+ ausgewertet.

Wie auch in der α L-Fraktion aus den Linsenextrakten von Wildtyp-Mäusen, verschiebt sich der apparente Sedimentationskoeffizient nach der Geburt zu etwas größeren Werten. Die beobachtete Größenzunahme konnte neben SEC-HPLC und AUZ auch mittels EM-Aufnahmen gezeigt werden (Abbildung S6). Der Grund für die apparente Größenzunahme könnte, wie auch für die α L-Fraktion der Wildtyp-Stämme vermutete, Modifikation der α -Kristalline sein.

Zusammenfassend ergibt sich aus der Charakterisierung der Linsenextrakte eine erhöhte Plastizität des Proteoms in der Augenlinse von Kataraktmutanten und Verschiebung in der Kristallinzusammensetzung. So war der Abbau an γ -Kristallinen in allen drei Mutantenlinien gegenüber dem jeweiligen Wildtyp-Stamm ab einem Alter von etwa 6 Monaten beschleunigt. Der Anteil an γ -Kristallinen lag dabei in gealterten, 12 Monate alten Linsen um etwa die Hälfte niedriger als in gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen. Ebenso war ein erhöhtes Vorkommen von modifizierten α -Kristallinen, insbesondere bei α A-Kristallin, zu beobachten. Am auffälligsten war jedoch die starke Reduktion im Anteil des mutierten Proteins bei allen drei Kataraktmutanten. Im Falle von β A2-S47P war das Protein zu keinem Zeitpunkt mittels Massenspektrometrie in den 2D-Gelen detektierbar. Weiterhin war in allen Mutantenlinien der Anteil der HMW- und α L-Fraktion im wasserlöslichen Anteil mit dem in Linsenextrakten aus Wildtyp-Mäusen vergleichbar. Dies könnte nach dem „Damage and Titration“-Modell auf ein immer noch intaktes und ungesättigtes Chaperonnetzwerk hindeuten.

3.1.3.2 Gelelektrophoretische Analyse der HMW- und α L-Fraktion von Kataraktmutanten

Nach der derzeitigen Modellvorstellung befinden sich in der HMW-Fraktion aggregationsanfällige Proteine, die durch Bindung an α L-Kristallin in Lösung gehalten werden. Dementsprechend sollte in der HMW-Fraktion der Kataraktmutanten eine Häufung der Katarakt-assoziierten Varianten zu beobachten sein. Diese Häufung sorgt für eine schnellere Entleerung des Chaperonreservoirs an α L-Kristallin. Dadurch kommt es während des Alterns schneller zu einer Übersättigung der Augenlinse mit aggregationsanfälligen Spezies, was letztendlich durch die unkontrollierte Aggregation zu einer Trübung der Linse führt. Aus der Untersuchung der Linsenextrakte von Kataraktmutanten mittels 2-DE und SEC-HPLC ergaben sich aber Hinweise, dass das Chaperonnetzwerk in der Linse nicht durch die Aggregation der Katarakt-assoziierten Varianten überlastet war. Aber dennoch ist Katarakt bei allen Mausmutanten beobachtbar, insbesondere bei Aca30-Mäusen. In dieser Kataraktmutante war die Katarakt-assoziierte β A2-S47P-Variante in allen mittels 2-DE untersuchten Linsenextrakten massenspektrometrisch nicht detektierbar. Um ein besseres Verständnis über den möglichen Verbleib der Katarakt-assoziierten Kristallinvarianten zu entwickeln, wurde die HMW- und α L-Fraktion aller Kataraktmutanten mittels 2-DE untersucht (Abbildung 27). Unerwarteterweise war in keiner der untersuchten HMW-Fraktionen aller Kataraktmutanten zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Anreicherung an Katarakt-assoziierte Variante zu beobachten. Auch konnte kein gehäuftes Vorkommen an anderen β - oder γ -Kristallinen detektiert werden. Zwar konnten β - (β A1, β B1, β B2, β B3) und γ -Kristalline (γ B/C, γ D, γ E/F, γ S) sowie andere Proteine, wie G-Aktin oder Hsp-27, detektiert werden, diese zeigten aber keine starke Häufung in der HMW-Fraktion. Vielmehr waren die HMW- und α L-Fraktion relativ ähnlich in ihrer Zusammensetzung. In der HMW-Fraktion war ein etwas höherer Anteil an β -Kristallinen beobachtbar. Allerdings stellten in beiden Fraktionen die α -Kristalline (α A_{ins}, α A, α B) mit 80-100 % den Großteil der detektierbaren Proteine zu jedem der untersuchten Zeitpunkte. Erstaunlicherweise auch nachdem die Mäuse bereits eine fast vollständige Trübung der Linse ab einem Alter von 6 Monaten entwickelt hatten (Abbildung 19). Trotz der ähnlichen Proteinzusammensetzung der HMW- und α L-Fraktion zeigen sich aber deutliche Unterschiede zwischen den Kataraktmutanten hinsichtlich der Partikelgröße in den EM-Aufnahmen (Abbildung 27). In den Linsenextrakten aus Aey4-Mäusen war die α L-Fraktion nicht mittels SEC-HPLC von der HMW-Fraktion trennbar. Die EM-Aufnahmen dieser Fraktion zeigen eine Mischung aus kleineren α L-Kristallin-Partikeln von etwa 15 nm Größe und großen Aggregat-ähnlichen Partikeln mit bis zu 50 nm Größe. Ähnlich große Partikel sind auch in der HMW-Fraktion von Linsenextrakten aus Aca30-Mäusen sichtbar. In der α L-Fraktion sind hauptsächlich kleinere α L-Kristallin-Partikel sichtbar. In der HMW-Fraktion von Linsenextrakten aus Aey4-Mäusen hingegen, sind trotz der Trennbarkeit von HMW- und α L-Fraktion auch kleinere Partikel in der HMW-Fraktion sichtbar. Die α L-Fraktion in den Extrakten aus Aey4-Mäusen besteht ebenfalls aus Partikeln von circa 15 nm Größe und passt in der Partikelform und -größe zu Beobachtungen mit Extrakten aus gesunden Rindern (44).

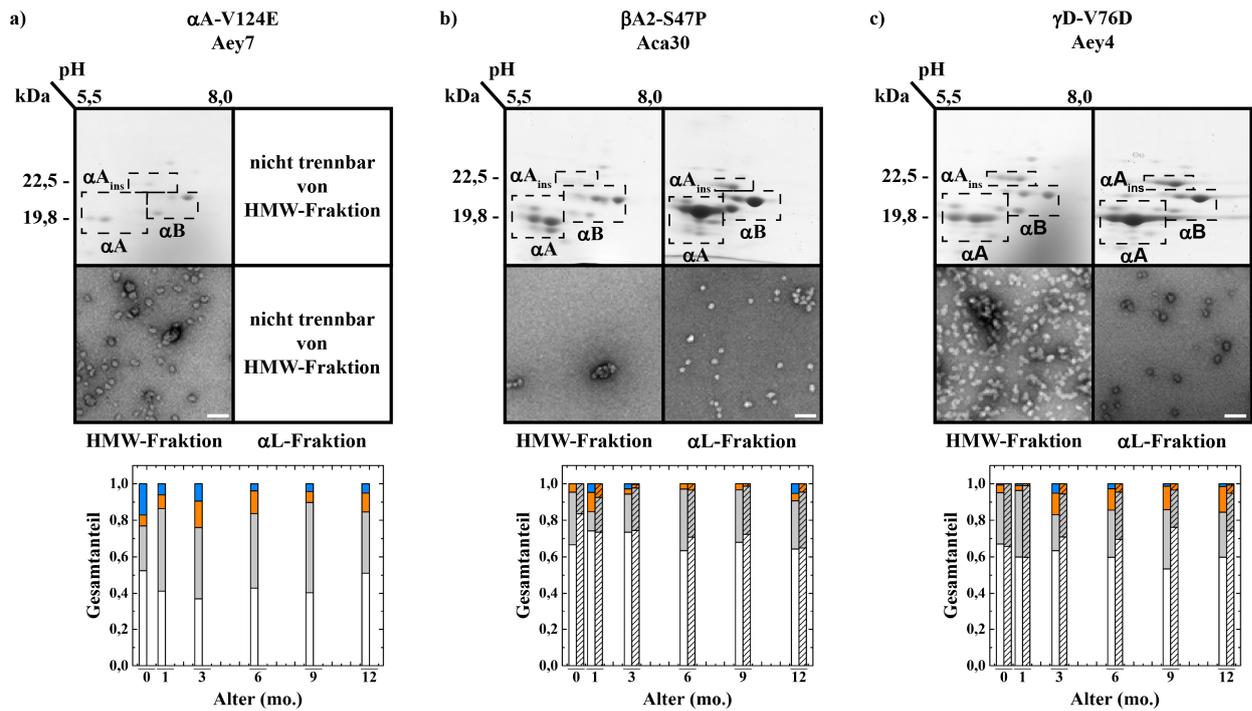


Abbildung 27: 2-DE- und EM-Analyse der HMW- und α L-Fraktion von Kataraktmutanten. Nach der chromatographischen Trennung der wasserlöslichen Teils von Linsenextrakten aus Aey7- (a), Aca30- (b) und Aey4-Mäusen (c) mittels SEC-HPLC, wurde die HMW- (glatte Balken) und α L-Fraktion (schraffierte Balken) mit 2-DE und EM (Maßstabsskala: 50 nm) untersucht. Zur leichteren Vergleichbarkeit wurde eine densitometrische Analyse der 2D-Karten mit dem Programm ImageJ durchgeführt und das Kristallinsignal auf 1 normiert (α A-Kristallin (weiß), α B-Kristallin (grau), β -Kristalline (orange) und γ -Kristalline (blau)). Die Identifizierung der Proteinspots erfolgte durch MALDI-TOF-MS und Abgleich der Spektren mit der NCBI-Proteindatenbank. Die beiden Kristallinisformen α A- und α A_{insl}-Kristallin wurden zusammengefasst. Im Falle von Linsenextrakten aus Aey7-Mäusen war die α L-Fraktion nicht von der HMW-Fraktion trennbar. Für die gezeigten 2D-Gele, der HMW- und α L-Fractionen aus Extrakten von 6 Monate alten Mäusen wurden bis zu 25 μ g an Gesamtprotein aufgetragen.

3.1.4 Kleinwinkel-Röntgenstreuung von murinen Linsen und Linsenextrakten

Um die räumliche Packung der murinen Kristalline in Linsenextrakten und der intakten Augenlinse zu untersuchen, wurden Kleinwinkel-Röntgenstreuungsexperimente (SAXS-Experimente) durchgeführt. Die Experimente erfolgten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tobias Madl (Gottfried Schatz Forschungszentrum, Institut für Molekularbiologie und Biochemie, Medizinische Universität Graz, AUT). Zum Zeitpunkt der schriftlichen Abfassung dieser Arbeit, lag noch keine endgültige Auswertung der Daten vor, sodass im Folgenden die bislang vorliegenden Ergebnisse zusammengefasst sind (persönliche Kommunikation, Tobias Madl).

Eine Charakterisierung der Linsenextrakte aus Mäusen mittels SAXS war möglich. In den Linsenextrakten nimmt die Größe der Kristallinoligomere mit dem Lebensalter in den Wildtyp-Stämmen zu. Liegt der Gyrationradius bzw. die Partikelgröße bei etwa 6,9 nm und 480 kDa in den Linsenextrakten aus 1 Monate alten Mäusen, steigen beide Größen auf etwa 7,8 nm und 790 kDa in den Extrakten aus 9 Monate alten Tieren. Weiterhin dissoziieren die großen Oligomere in den Linsenextrakten nicht bei Verdünnung. Die Zunahme der Partikelgröße dabei stimmt gut mit den

Beobachtungen aus den SEC-HPLC-, AUZ- und EM-Messungen überein. In den Experimenten konnte eine apparente Größenzunahme der α L-Kristalline im Alter sowohl für Wildtyp-Mäuse als auch für die Kataraktmutanten gezeigt werden (3.1.1.1, 3.1.3.1). Diese bedingt vermutlich auch die in den SAXS-Experimenten beobachtete Zunahme der Oligomergröße.

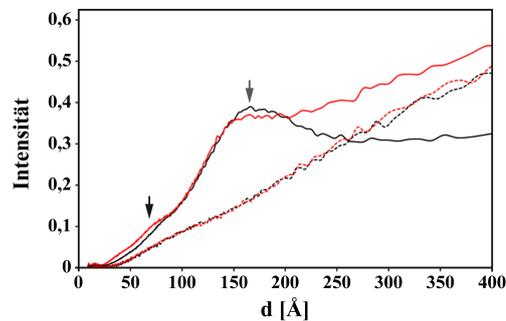


Abbildung 28: SAXS-Streukurve von Linsenextrakten und intakten Linsen aus C57Bl/6J Wildtyp-Mäusen und Aca30 Kataraktmutanten. Die Streukurven wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tobias Madl (Gottfried Schatz Forschungszentrum, Institut für Molekularbiologie und Biochemie, Medizinische Universität Graz, AUT) aufgenommen. Es wurden sowohl Linsenextrakte (---) als auch intakte Linsen (—) aus C57Bl/6J Wildtyp-Mäusen (schwarz) als auch einer Kataraktmutante (Aca30, β A2-S47P, rot) untersucht. Das charakteristische Kristallinsignal bei 70 \AA und der Bragg-Abstand bei 160 \AA sind mit einem Pfeil (\rightarrow) markiert.

Mit isolierten, intakten Augenlinsen konnten erstmals SAXS-Messungen mit einer intakten Augenlinse durchgeführt werden. Die intakte Augenlinse aus C57Bl/6J Wildtyp-Mäusen zeigt zwei relevante Signale bei 70 \AA und 160 \AA (Abbildung 28). Das Signal bei 70 \AA ist kennzeichnend für Kristalline. Die Auflösung der Streukurven mit intakten Linsen war dabei deutlich besser als mit den, bisher in der Literatur verwendeten, Linsenextrakten. Die weitreichende Anordnung der Kristalline in den Wildtyp-Linsen entspricht einem Bragg-Abstand von etwa 160 \AA und spiegelt die räumliche Packung der Kristalline durch langreichweitige Wechselwirkungen in der Linse wieder. Im Vergleich zwischen den Wildtyp-Mäusen zeigen die Kristalline in der 9 Monate alten Linse von C3HeB/FeJ-Mäusen eine etwas weniger starke Ordnung der Packung als die Kristalline in der Linse von C57Bl/6J-Mäusen. In den Linsen von Aca30-Mäusen ist ebenfalls ein für Kristalline charakteristisches Signal bei 60 \AA zu sehen (Abbildung 28). Allerdings scheint die Struktur der Kristalline in der intakten Linse mit 150 \AA etwas kompakter zu sein. Die apparente Kompaktierung der Proteine in der Linse ist insofern interessant, da bei Aca30-Mäusen mit β A2-Kristallin ein β -Kristallin mit nur geringem Anteil in der Augenlinse betroffen ist. Während der Anteil von β A2 bei 2,5 % in den Wildtyp-Mäusen liegt, ist die Katarakt-assoziierte Mutation β A2-S47P in Aca30-Mäusen nicht detektierbar. Offensichtlich reichen bereits geringen Störungen in der Zusammensetzung der Kristalline in der Augenlinse aus, um zusammen mit natürlichen, alterungsbedingten Vorgängen früh einsetzenden Katarakt zu verursachen. Die Empfindlichkeit gegenüber Änderungen in der Kristallinzusammensetzung der Augenlinse, könnte einen Ansatz bieten, die mitunter sehr unterschiedlichen Beobachtungen in den Kataraktmutanten zu erklären. Um diese Annahme zu bestätigen werden noch SAXS-Messungen mit den Augenlinsen von Aey7- (α A-V124E) und Aey4-Mäusen (γ D-V76D) durchgeführt.

3.2 Inkorporation von pCNF in humanes α B-Kristallin als FRET-Sonde

Humanes α B-Kristallin gehört zur Superfamilie der kleinen Hitzeschockproteine (sHsp) und dient als Schutz gegen Proteinaggregation unter Stressbedingungen. Diese Aufgabe erfüllt es, in dem es an aggregationsanfällige (teil-) entfaltete Proteine bindet und so die Aggregation verhindert. In Lösung bildet das 20 kDa große Protein hochmolekulare Oligomere von bis zu 48 Untereinheiten mit einer molekularen Masse von etwa 960 kDa. Die am stärksten populierte Spezies ist das 24-mer mit einer entsprechenden molekularen Masse von etwa 480 kDa. Diese hochmolekulare Spezies werden als Speicherform mit geringer Chaperonaktivität gesehen (56). Auf einen aktivierenden Stimulus hin, wie etwa Hitzestress, zerfallen die hochmolekulare Spezies in kleinere, chaperonaktive Oligomere (65). Die kleineren Oligomere, hauptsächlich 12- und 6-mer, halten die aggregationsanfälligen Substratproteine in Lösung und bilden dabei wiederum hochmolekulare Komplexe. Anders als ATP-abhängige Chaperone, wie Hsp70 und Hsp90, besitzen die kleinen Hitzeschockproteine keine Rückfaltungsaktivität. Für die Rückfaltung von Proteinen sind sie daher auf die ATP-abhängigen Chaperonsysteme angewiesen (164). Eine Zusammenarbeit zwischen den sHsps und den ATP-abhängigen Chaperonsystemen bei der Rückfaltung von Proteinen konnte bereits gezeigt werden (64,65). Allerdings sind die mikroskopischen Ratenkonstanten des Zerfalls in kleinere Oligomere auf einen Stimulus hin, der Bindung von Substraten und der Substratweitergabe an das Hsc70/40-System von humanem α B-Kristallin bisher noch unbekannt.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein FRET-System erarbeitet, das es ermöglichen könnte, die Bindung von Substraten an humanes α B-Kristallin und die Weitergabe des Substrats an das ATP-abhängige Hsc70/40-System zu verfolgen. Durch den gewählten Ansatz kann auch die Dissoziationsrate von α B-Kristallin bei Zugabe von Substrat bestimmt werden. Grundlage des Systems war der Einbau der unnatürlichen Aminosäure pCNF in humanes α B-Kristallin.

3.2.1 Die unnatürliche Aminosäure pCNF als Grundlage eines Tripel-FRET-Systems

Für die Etablierung eines Tripel-FRET-Systems zur Untersuchung der Substratbindung, der Substratweitergabe und auch der Oligomerdissoziation von α B-Kristallin wurden die FRET-Paare: pCNF-Trp und Trp-AEDANS genutzt. Bei pCNF handelt es sich um ein Phenylalanin-Analog mit einer Nitrilgruppe in para-Position, das durch die Erweiterung des genetischen Codes (*Genetic Code Expansion*) von *E. coli* in α B-Kristallin eingebaut wurde (Abbildung 29). Für die Erweiterung des genetischen Codes von *E. coli* wird ein orthogonales tRNA/Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Paar aus *Methanococcus jannaschii* genutzt. Dabei wird das tRNA^{Tyr}/Tyrosyl-tRNA-Synthetase-Paar (TyrRS) durch gerichtete Evolution zum spezifischen Einbau einer unnatürlichen Aminosäure evolviert (165-167). Als Erkennungssequenz für den Einbau der unnatürlichen Aminosäure in die Polypeptidkette durch das bakterielle Ribosom dient das selten verwendete Amber-Stopcodon (TAG). Durch den Einbau von pCNF in das Protein fluoresziert α B-Kristallin nach Anregung bei 240 nm im

Wellenlängenbereich um 297 nm. Die strahlenlose Energieübertragung zwischen pCNF und Trp bei räumlicher Nähe der beiden FRET-Partner kann in der Folge genutzt werden um Bindungsereignisse zu detektieren ($R_0(2/3)$ 16 Å, (168)). Die Oligomerdissoziation von α B-Kristallin bei Zugabe eines Trp-freien Substrat kann durch Mischung von α B-wt und α B-pCNF mit nachfolgender Substratzugabe über die Fluoreszenzänderung verfolgt werden. So können neben der Ratenkonstanten der Substratbindung, auch die mikroskopischen Ratenkonstanten der Oligomerdissoziation von α B-Kristallin in Gegenwart von Substrat mit dem FRET-Paar pCNF-Trp bestimmt werden. Die Weitergabe von Trp-haltigen Substraten von α B-pCNF an Hsc70 kann durch den FRET-Übertrag von Trp zu AEDANS verfolgt werden ($R_0(2/3)$ 22 Å, (169)). Die kovalente Modifikation mit IAEDANS erfolgt dabei über die Thiolgruppe des in Hsc70* hinzugefügten C-terminalen Cysteins durch nukleophile Substitution (S_N1 -Mechanismus) mit I als Abgangsgruppe. Das Cystein wurde durch Verlängerung des C-Terminus einer Trp-freien Hsc70-Variante (W90,580F) um zwei Aminosäuren (Gly-Cys) (Hsc70 W90,580F, 647G, 648C, abgekürzt als Hsc70*) eingebracht.

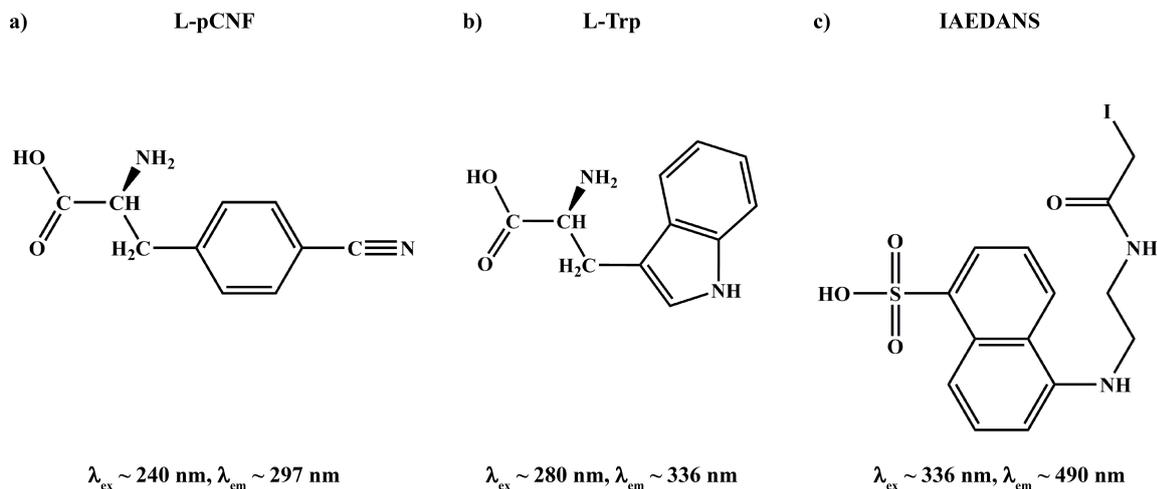


Abbildung 29: Strukturformeln der eingesetzten Fluorophore. Die fluoreszierende Aminosäure L-pCNF (a) trägt eine Nitrilgruppe in der para-Position des aromatischen Rings. Das Anregungsmaximum liegt bei etwa 240 nm, das Emissionsmaximum bei 297 nm. L-Trp (b) kommt natürlicherweise in Proteinen vor und zeigt ein Anregungsmaximum bei 280 nm bzw. Emissionsmaximum bei circa 336 nm. IAEDANS (c) kann über die Thiolgruppe von Cysteinen in Proteinen kovalent gekoppelt werden und absorbiert maximal bei etwa 336 nm. Das Emissionsmaximum liegt bei 490 nm. Die drei Verbindungen bilden ein dreifaches FRET-Paar und können eingesetzt werden um die Bindung von Substraten an α B-Kristallin, sowie die Weitergabe des Substrats an Hsc70 zu verfolgen. Der Försterradius für das FRET-Paar pCNF-Trp beträgt 16 Å und 22 Å für das FRET-Paar Trp-AEDANS. Die Strukturformeln wurde mit dem Programm ChemBioDraw Ultra 14.0.0.117 erstellt.

Für den Einbau von pCNF mittels *Genetic Code Expansion* musste zunächst eine geeignete Position in einer Trp-freien α B-Kristallin Variante gefunden werden. α B-Kristallin besitzt zwei natürlich vorkommende Tryptophane an Position 9 und 60 in der Primärstruktur. Die beiden Tryptophane mussten als zwingende Grundvoraussetzung für das Funktionieren des geplanten FRET-Systems entfernt werden und eigneten sich daher als mögliche Positionen für den Einbau von pCNF. Der Vorteil von pCNF liegt auch darin, dass es als Substituent sowohl in einer hydrophilen als auch hydrophoben Umgebung genutzt werden kann (170-172). Als Substituent für das zweite Trp wurde

Phe gewählt. Nach den Skala von Rose et al. und Eisenberg et al. unterscheiden sich Trp und Phe kaum in ihrer Hydrophobizität (173,174). Daher führt die Verwendung von pCNF als Substituent für Trp bzw. von Phe für Trp zu einer geringen Auswirkung auf die Eigenschaften der flexiblen N-terminalen Region (NTR) von α B-Kristallin. Die NTR (Abbildung 4) ist von besonderer Wichtigkeit für die Ausbildung von höhergeordneten Oligomeren und für die Bindung von amorph aggregierenden Aggregaten, wie Lysozym. Wird die NTR entfernt, kann α B-Kristallin die amorphe Aggregation von Lysozym nicht mehr unterdrücken (58).

3.2.2 Einbau von pCNF in humanes α B-Kristallin durch *Genetic Code Expansion*

Um eine pCNF-haltige Variante von α B-Kristallin zu erhalten, wurde die Einbaueffizienz der unnatürlichen Aminosäure durch *Genetic Code Expansion* in *E. coli* an den Positionen 9 und 60 in der Primärsequenz untersucht. Bislang ist die Inkorporationseffizienz von unnatürlichen Aminosäuren bei *Genetic Code Expansion* nicht vorhersagbar (175,176). Für α B-Kristallin erwies sich der Einbau an Position 9 durch Tausch des für Trp codierenden Triplets gegen das Amber-Stopcodon (TAG) am effizientesten. Bei einem Tausch des Triplets an Position 60 in der Primärsequenz von α B-Kristallin war kaum Einbau von pCNF beobachtbar (Abbildung 30).

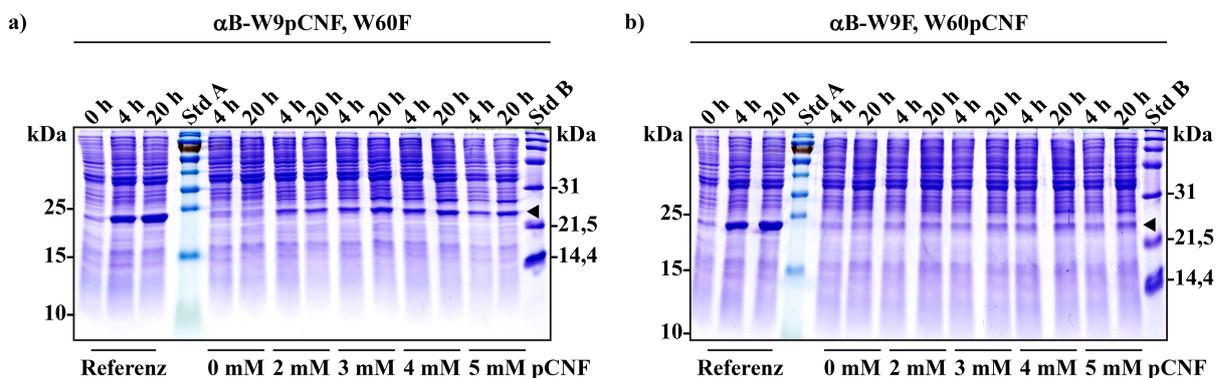


Abbildung 30: Inkorporation von pCNF in α B-Kristallin an Position 9 und 60 durch *Genetic Code Expansion* von *E. coli*. Gezeigt ist der Einbau der unnatürlichen Aminosäure pCNF in humanes α B-Kristallin an verschiedenen Positionen (Position 9 und 60) durch *Genetic Code Expansion* von *E. coli*. Während der Produktion des rekombinanten Proteins wurde in zeitlichen Abständen Zellsuspension aus dem Kulturmedium entnommen und das Rohextrakt mittels 15%iger (w/v) SDS-PAGE analysiert. Die Produktion der α B-Kristallinvarianten erfolgte nach dem Protokoll von Hammill *et al.* mit variabler Konzentration an pCNF im Medium (0-5 mM Endkonzentration) bei 37 °C (siehe 2.2.4) (110). Bereits 4 h nach Animpfen des Kulturmediums ist eine deutliche Zunahme an rekombinantem α B-pCNF zu erkennen (\blacktriangleleft). Die Autoinduktion erfolgte durch Zusatz von 0,05 % (w/v) L-(+)-Arabinose. Als Referenz wurde α B-wt unter gleichen Bedingungen ohne Zusatz von pCNF produziert. Die Proteinproduktion fand im 25-ml-Maßstab statt.

Hinsichtlich der Inkorporationseffizienz von pCNF an Position 60 war keine Steigerung bei höherer pCNF-Konzentration im Kulturmedium beobachtbar (Abbildung 30b). An Position 9 hingegen, war bereits bei einer Endkonzentration von 2 mM pCNF der Einbau in α B-Kristallin gut sichtbar. Durch weitere Steigerung der pCNF-Konzentration im Kulturmedium konnte die Inkorporationseffizienz weiter erhöht werden (Abbildung 30a). Für die Produktion in größerem Maßstab wurde die

Endkonzentration von pCNF auf 4 mM festgelegt und das Konstrukt α B-Kristallin W9TAG, W60F verwendet (α B-pCNF). Die Proteinproduktion in größeren Volumina (500 ml Medium) erfolgte in Autoinduktionsmedium mit 0,05 % (w/v) L-(+)-Arabinose nach Hammill *et al.* (110). Die Expression des Zielgens wird durch Aufnahme von L-(+)-Arabinose, nach Verbrauch der D-(+)-Glukose, in die *E. coli*-Zellen durch den L-(+)-Arabinose-induzierbaren Promoter (*araB*) induziert. In Abbildung 31 ist die Produktionskinetik des rekombinanten Proteins gezeigt. Das Vorkommen von α B-pCNF im Rohextrakt ist nach 5 h erstmals beobachtbar und erreicht nach etwa 14-18 h einen konstanten Wert. Die Ausbeute an α B-pCNF nach Reinigung lag dabei bei etwa 2 mg Protein pro Liter Kulturmedium.

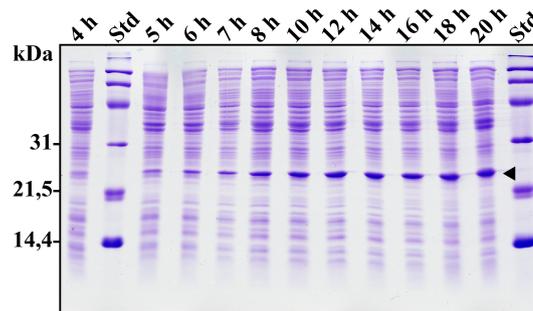


Abbildung 31: Inkorporation von pCNF in α B-Kristallin durch *Genetic Code Expansion* von *E. coli*. Gezeigt ist der Einbau der unnatürlichen Aminosäure pCNF in humanes α B-Kristallin W9TAG, W60F durch *Genetic Code Expansion* von *E. coli*. Während der Produktion des rekombinanten Proteins wurde in zeitlichen Abständen Zellsuspension aus dem Kulturmedium entnommen und das Rohextrakt mittels 15%iger (w/v) SDS-PAGE analysiert. Die Produktion von α B-pCNF erfolgte nach dem Protokoll von Hammill *et al.* bei 37 °C (siehe 2.2.4) (110). Etwa 5 h nach Animpfen des Kulturmediums ist eine deutliche Zunahme an rekombinatem α B-pCNF zu erkennen (\blacktriangleleft). Die Autoinduktion erfolgte durch Zusatz von 0,05 % (w/v) L-(+)-Arabinose. Die Proteinproduktion fand im 500 ml-Maßstab statt.

Nach der erfolgreichen Produktion des rekombinanten Proteins in *E. coli* wurde α B-pCNF wie unter 2.2.4 beschrieben gereinigt. In Abbildung 32a ist die gelelektrophoretische Analyse des gereinigten α B-pCNF gezeigt. Die berechnete molekulare Masse von α B-pCNF beträgt ca. 20 kDa, jedoch zeigt diese Variante, wie auch das Wildtyp-Protein, ein apparentes Laufverhalten von ca. 23 kDa. Die Identität des Proteins konnte jedoch mittels MALDI-TOF-MS und Abgleich gegen die NCBI-Proteindatenbank mehrfach redundant bestätigt werden (Trefferwert: 185, signifikant ab > 65 , $p < 0,05$). Als Kontrolle wurde zusätzlich das Fluoreszenzspektrum von Wildtyp- α B-Kristallin bei gleicher Anregungswellenlänge aufgezeichnet (Abbildung 32b). Wird das Protein bei 240 nm angeregt, fluoresziert es mit einem Maximum bei etwa 297 nm. Das Emissionsmaximum von α B-pCNF entspricht dabei dem, wie es auch für andere Proteine mit inkorporierten pCNF beobachtet wurde (170). Für α B-wt ist nach Anregung bei 240 nm nur ein geringes Fluoreszenzsignal im Bereich von 340 nm detektierbar, das vermutlich durch Anregung der zwei natürlich vorkommenden Tryptophane (W9 und W60) verursacht wird.

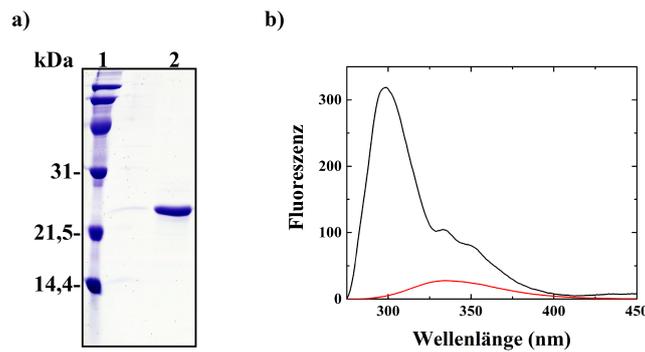


Abbildung 32: SDS-PAGE und Fluoreszenzspektrum von α B-pCNF. Gezeigt ist die gelelektrophoretische Analyse von gereinigtem α B-pCNF nach der abschließenden Größenausschlusschromatographie. Die Trennung erfolgte durch 15%ige (w/v) SDS-PAGE nach Laemmli (a, Bahn 1: Molekulargewichtsstandard, Bahn 2: α B-pCNF). Um den Einbau der Aminosäure zu verifizieren, wurde ein Fluoreszenzspektrum von α B-pCNF (—) aufgezeichnet (b). Als Kontrolle diente α B-wt (—). Die Spektren wurden bei einer Proteinkonzentration von je $1 \mu\text{M}$ in Quarzküvetten der Schichtdicke 1 cm aufgenommen. Alle Messungen wurden in PBS bei 37°C durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei 240 nm. Die Spaltbreiten von Anregung und Emission betragen 2,5 nm und 5 nm, bei einer Messgeschwindigkeit von 200 nm/min und Dämpfung von 2 s.

3.2.3 Biochemische Charakterisierung von α B-pCNF

Nachdem der Einbau von pCNF in humanes α B-Kristallin durch *Genetic Code Expansion* erfolgreich war, wurde die Integrität der α B-Kristallinvariante vergleichend zum Wildtyp-Protein untersucht. Dazu wurden neben der Chaperonaktivität, die Oligomergröße mittels analytischer Ultrazentrifugation und die Geschwindigkeit des Untereinheitenaustauschs bestimmt.

Kleine Hitzeschockproteine können die Aggregation von Proteinen unterdrücken, indem sie an (teil-)entfaltete Proteine binden und diese so in Lösung halten. Ist dies nicht möglich, kann es durch die Aggregation des Substratproteins zur Bildung von großen, lichtstreuenden Aggregaten kommen. Diese Aggregate sind durch die Änderung der relativen Absorption bei 350 nm durch Lichtstreuung detektierbar und bilden das Messprinzip zum Test der Chaperonaktivität. Als Substrat diente die mitochondriale L-Malaldehydhydrogenase aus Schweineherz (MDH), die bei einer Temperatur von 42°C denaturiert und amorphe Aggregate bildet. Um eventuelle Auswirkungen der Inkorporation von pCNF in α B-Kristallin zu überprüfen, wurde die Chaperonaktivität von α B-pCNF und α B-wt gegenüber dem Modellsubstrat MDH bestimmt (Abbildung 33). Ohne Chaperon kommt es zur Aggregation von thermisch denaturierter MDH und der Bildung von amorphen Aggregaten. Diese bedingen den Signalanstieg auf 0,7 innerhalb von etwa 40 min. Wird Chaperon zugegeben, so verschiebt sich zum einen die Zeit bis erste Aggregate detektierbar sind und der Endwert des gemessenen Signals. Die relative Aggregation korreliert dabei mit der Konzentration an α B-Kristallin. Bei einem äquimolaren Verhältnis von Chaperon zu Substrat, verhindert α B-Kristallin die Aggregation von MDH nahezu vollständig (Abbildung 33a). Verglichen mit dem Wildtyp-Protein ist die pCNF-Variante von α B-Kristallin hinsichtlich der Chaperonaktivität gegenüber MDH nahezu identisch (Abbildung 33b). Beide Proteinvarianten unterdrücken die relative Aggregation von MDH um etwa die Hälfte bereits

bei einem substöchiometrischen Verhältnis von circa 1:8 und nahezu vollständig bei äquimolarer Konzentration von α A-Kristallin:MDH (jeweils bezogen auf die Konzentration des Monomers).

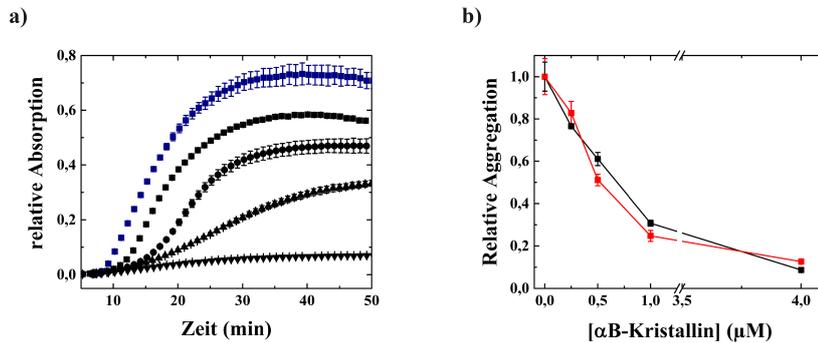


Abbildung 33: Chaperonaktivität von α B-pCNF und α B-wt gegenüber dem Modellsubstrat MDH. a) Zur Bestimmung der Chaperonaktivität von α B-pCNF wurde die Entfaltung von 4 μ M MDH in PBS bei 42 °C thermisch induziert und die Aggregation durch die Änderung der relativen Absorption bei 340 nm mit steigender Konzentration an α B-pCNF in Triplikaten verfolgt. In Teilabbildung a) sind die Aggregationskinetiken von α B-pCNF gezeigt (0 (■), 0,25 (■), 0,5 (●), 1 (▲) und 4 μ M (▼) α B-pCNF). b) Als Vergleich wurden die Experimente auch mit α B-wt durchgeführt und die relative Chaperonaktivität gegen die Konzentration an α B-Kristallin aufgetragen (α B-pCNF (■), α B-wt (■)). Die relative Aggregation wurde dabei auf Kontrollmessungen mit MDH (4 μ M) ohne zusätzliches Chaperon normiert.

Neben der Funktion bei der Bindung von amorph-aggregierenden Substraten, ist die N-terminale Region in α B-Kristallin von großer Bedeutung für die apparente Oligomergröße (65). Um zu untersuchen, ob die für den Einbau der unnatürlichen Aminosäure notwendigen Mutationen (W9TAG, W60F) die Oligomerstruktur von α B-Kristallin stören, wurde analytische Ultrazentrifugation durchgeführt (Abbildung 34).

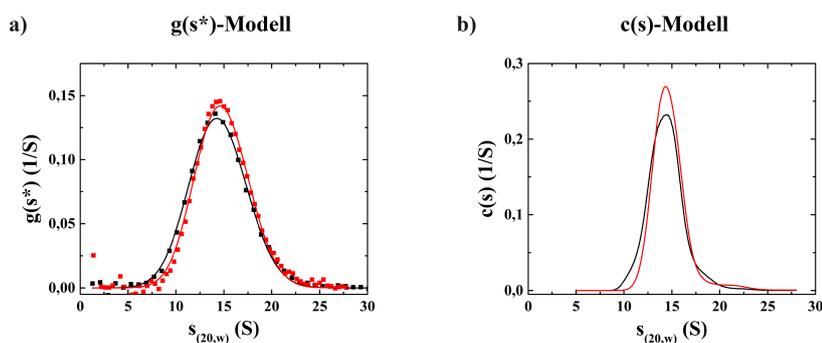


Abbildung 34: Sedimentationskoeffizientenverteilung von α B-Kristallin-Varianten. Aufgetragen ist die Sedimentationskoeffizientenverteilung von α B-pCNF (—) und α B-wt (—). Zur Bestimmung der Verteilung wurden 10 μ M Protein in PBS bei 34 000 rpm und 20 °C in Triplikaten bis zur vollständigen Sedimentation in der analytischen Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die Absorption der Proben bei 230 nm wurde kontinuierlich in Abhängigkeit der Radialposition gemessen. Die Datenauswertung erfolgte nach dem g(s*)-Modell mit dem Programm DCDT+ (a) und dem c(s)-Modell mit dem Programm SedFit (b). Der resultierende mittlere Sedimentationskoeffizient ($s_{(20,w)}$) von α B-pCNF stimmte zwischen den Modellen und mit dem Wildtyp-Protein sehr gut überein. Gezeigt ist jeweils eine repräsentative Sedimentationskoeffizientenverteilung.

Die Sedimentationskoeffizientenverteilung für α B-pCNF und α B-wt sind sehr gut vergleichbar mit einem mittleren Sedimentationskoeffizienten ($s_{(20,w)}$; normiert auf Wasser und 20 °C) von 14,3 S für α B-pCNF und 14,6 S für α B-wt bei der Datenanalyse mit dem Programm DCDT+. Bei Auswertung

der Sedimentationsprofile mit dem Programm SedFit liegt der $s_{(20,w)}$ -Wert für beide α B-Kristallinvarianten bei 14,4 S und stimmt sehr gut mit dem berechneten Literaturwert für das 24-mer von 14,5 S überein (23). Beide Programme nutzen die gemessenen Sedimentationsprofile für die Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten, verwenden aber unterschiedliche mathematische Modelle zur numerischen Lösung der Lamm-Gleichung (116,117,177). Bei dem $c(s)$ -Modell wird die Rückdiffusion der Proteinmoleküle durch einen Zusatzterm bei Verwendung der Lamm-Gleichung korrigiert. Daher erscheint die $c(s)$ -Verteilung schmaler, als die nicht-diffusionskorrigierte $g(s^*)$ -Verteilung. Jedoch sind beide Auswertemodelle gleichermaßen valide (178).

Als letzter Punkt zum Vergleich der Eigenschaften zwischen Wildtyp-Protein und α B-pCNF wurde der Untereinheitenaustausch zwischen den α B-Kristallinvarianten untersucht. Das kleine Hitzeschockprotein α B-Kristallin bildet zwar große, oligomere Komplexe, allerdings sind diese Komplexe nicht statisch sondern unterliegen einem ständigen Austausch von Protomeren (24,65,179). Neutronenstreuungs- und massenspektrometrische Experimente deuten darauf hin, dass der Austausch über monomeres α B-Kristallin erfolgt (180).

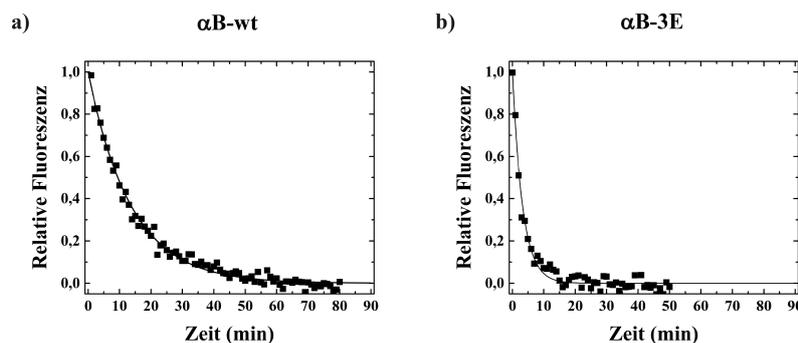


Abbildung 35: Untereinheitenaustausch von α B-pCNF mit α B-Kristallinvarianten. Der Untereinheitenaustausch von α B-pCNF (1 μ M) mit einem 25-fachen molaren Überschuss an α B-wt (a) und einer phosphomimetischen α B-3E-Variante (b) wurde über die Abnahme des Fluoreszenzsignals bei 297 nm (■) nach Anregung bei 240 nm verfolgt. Die Messungen erfolgten in einer Fluoreszenzrührküvette mit 1 cm Schichtdicke bei 37 °C in PBS mit einer Anregungs- und Emissionsspaltbreite von 2,5 nm und 5 nm mit einer Dämpfung von 2 s. Die Ratenkonstante des Untereinheitenaustauschs wurde durch nicht-linearen Angleich an die Messdaten mit einer Exponentialfunktion erster Ordnung ermittelt und der Fluoreszenzverlauf normiert.

In Abbildung 35 ist der Verlauf des Fluoreszenzsignals von α B-pCNF nach Zugabe eines 25-fachen molaren Überschusses an α B-wt und einer phosphomimetischen Variante α B-3E (S19,45,59E) gezeigt. Die phosphomimetische α B-3E-Variante ist dabei deutlich kleiner, sowie chaperonaktiver als das Wildtyp-Protein und zeigt einen schnelleren Untereinheitenaustausch (65). Die Fluoreszenzverläufe zeigen einen deutlichen Unterschied in der Austauschrate von α B-pCNF mit dem Wildtyp-Protein und der aktivierten, phosphomimetischen α B-3E-Variante. Die Austauschrate von α B-pCNF mit α B-wt bzw. α B-3E wurde zu $0,064 \text{ min}^{-1}$ und $0,306 \text{ min}^{-1}$ bestimmt. Die Werte stimmen sehr gut mit den Literaturwerten für α B-wt ($0,053 \text{ min}^{-1}$) und α B-3E ($0,369 \text{ min}^{-1}$) überein (65). Hinsichtlich der Chaperonaktivität, Quartärstruktur und Dynamik des Oligomeraustausches ist α B-pCNF sehr gut mit dem Wildtyp-Protein vergleichbar. Es zeigte eine gleiche Chaperonaktivität

gegenüber MDH und konnte die Aggregation des Modellsubstrates bereits bei substöchiometrischen Konzentrationen deutlich verringern. Die Sedimentationskoeffizientenverteilung von α B-pCNF und dem Wildtyp-Protein stand ebenfalls in guter Übereinstimmung und zeigte die typische breite Verteilung an verschiedenen großen Oligomeren. Weiterhin störte der Einbau der unnatürlichen Aminosäure an Position 9, sowie die gleichzeitige Mutation W60F die Dynamik des Untereinheitenaustausches nicht. Die Variante α B-pCNF (W9TAG, W60F) war in allen untersuchten Eigenschaften mit dem Wildtyp-Protein vergleichbar. Demnach war α B-pCNF als Basis des Tripel-FRET-Systems zur Untersuchung der Substratbindung und Weitergabe an Hsc70, sowie der Dynamik des Untereinheitenaustausches in Gegenwart von Trp-freien Substraten geeignet.

3.2.4 Bindung von Proteinsubstraten an α B-pCNF

Bislang konnte die Bindung von α B-Kristallin an Substrate noch nicht kinetisch verfolgt werden. Eine detaillierte Beschreibung der Ratenkonstanten bei der Substratbindung und bei der Oligomerdissoziation, könnte helfen, die molekularen Vorgänge bei der Substraterkennung und -bindung besser zu verstehen, insbesondere welche Rolle die N-terminale Region von α B-Kristallin dabei spielt. Um diese Wissenslücke zu schließen, wurde die Bindung von Proteinsubstraten an α B-pCNF photometrisch untersucht. Als *Proof of Concept* für die Anwendbarkeit des pCNF-Trp-FRET-Systems zur Untersuchung der Substratbindung des kleinen Hitzeschockproteins, wurden zunächst α B-pCNF und Lysozym inkubiert. Um die Bindung von α B-pCNF an Lysozym zu induzieren, wurde der Proteinlösung *ad* 1 mM Reduktionsmittel (TCEP) zugegeben. Lysozym aus Hühnereiweiß (UniProt-ID: P00698-1) besitzt insgesamt 6 Trp-Reste und 4 strukturelle Disulfidbrücken, die bei Reduktion eine Entfaltung und Aggregation des Proteins verursachen. Die Bindung von Lysozym an α B-pCNF wurde durch den FRET-Übertrag auf die Trp-Reste in Lysozym verfolgt.

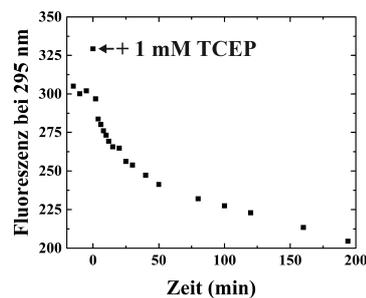


Abbildung 36: Bindung von entfaltetem Lysozym an α B-pCNF. Um die Bindung von (teil-) entfaltenen Proteinen an α B-pCNF zu untersuchen, wurde die Entfaltung des Modellsubstrats Lysozym durch Zugabe von Reduktionsmittel (1 mM TCEP) induziert und die Änderung des Fluoreszenzsignals (■) bei 295 nm verfolgt. Die Grundlage ist der FRET-Übertrag zwischen pCNF in α B-Kristallin und den Trp-Resten in Lysozym. Die Messung erfolgte mit 4 μ M α B-pCNF und 1 μ M Lysozym in PBS in einer Fluoreszenzrührküvette der Schichtdicke 1 cm bei 37 °C. Die Anregungswellenlänge lag bei 240 nm, die Emissionswellenlänge bei 295 nm. Die Spaltbreite der Anregung betrug 2,5 nm, die der Emission 5 nm. Die Dämpfung lag bei 2 s.

In Abbildung 36 ist die Änderung der Donorfluoreszenz bei 297 nm bei Zugabe von Reduktionsmittel, nach vorheriger Inkubation der Proteinlösung, gezeigt. Bereits wenige Minuten nach Zugabe von TCEP ist ein deutlicher Abfall der Donorfluoreszenz zu beobachten, was auf eine Bindung von Lysozym an α B-pCNF und FRET-Übertrag zwischen pCNF und den Tryptophanen in Lysozym schließen lässt. Allerdings ist eine quantitative Auswertung der Daten nicht möglich, da sich mindestens zwei Prozesse überlagern: Die Bindung von denaturiertem Lysozym an α B-pCNF und die gleichzeitig stattfindende, durch Reduktion induzierte, konformationelle Entfaltung von Lysozym.

Um gezielt die Bindung von Substrat an α B-pCNF zu verfolgen, wurden Handmischexperimente mit vollständig reduziertem und in 8 M Harnstoff denaturiertem Lysozym durchgeführt. Dazu wurde α B-pCNF vorgelegt und die Abnahme der Donorfluoreszenz bei 295 nm nach Zugabe von denaturiertem Lysozym verfolgt (Abbildung 37).

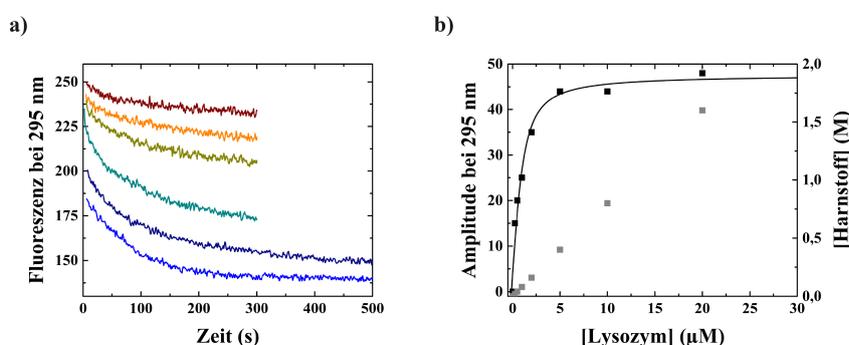


Abbildung 37: Bindung von denaturiertem Lysozym an α B-pCNF. Um die Bindung von vollständig entfaltenen Proteinen an α B-Kristallin spektroskopisch zu verfolgen, wurde α B-pCNF vorgelegt und verschiedene Konzentrationen an reduziertem, in 8 M Harnstoff gelöstem, Lysozym zugegeben. Die Bindung wurde über die Abnahme der Donorfluoreszenz von α B-pCNF bei 297 nm verfolgt. Die Endkonzentration von α B-pCNF lag jeweils bei 1 μ M mit steigender Konzentration an Lysozym (a, 0,25 (—), 0,5 (—), 1 (—), 2 (—), 10 (—) und 20 μ M (—) Lysozym). Aus der Auftragung der Amplituden (■) nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an Lysozym konnte eine Dissoziationskonstante von 0,4 μ M abgeschätzt werden (b). Aufgrund der geringen Löslichkeit von denaturiertem Lysozym musste die Harnstoffkonzentration (■) kontinuierlich bis auf 1,6 M erhöht werden. Die Messungen erfolgten in PBS bei 37 °C in einer Fluoreszenzrührküvette der Schichtdicke 1 cm. Die Fluoreszenzänderung wurde bei 297 nm nach Anregung bei 240 nm gemessen. Die Spaltbreiten der Anregung und Emission betragen 3 nm und 5 nm. Die Dämpfung lag bei 2 s.

In Abbildung 37a sind die Fluoreszenzverläufe nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an denaturiertem Lysozym gezeigt. Die Bindung von Lysozym an α B-pCNF kann über die Abnahme der Donorfluoreszenz bei 297 nm verfolgt werden. Aus der konzentrationsabhängigen Zunahme der Fluoreszenzamplitude bei Zugabe von denaturiertem Lysozym zu α B-pCNF, lässt sich die Dissoziationskonstante bestimmen. Aufgrund der geringen Löslichkeit von denaturiertem Lysozym musste jedoch die Harnstoffkonzentration auf bis zu 1,6 M erhöht werden, um die Aggregation des Proteins zu verhindern. Daher konnte die Dissoziationskonstante nur näherungsweise auf 0,4 μ M abgeschätzt werden. Dennoch geben die Experimente mit dem Modellsubstrat Lysozym einen Hinweis auf die Funktionalität des FRET-Systems zwischen pCNF in α B-Kristallin und Tryptophanen in

Bindepartnern und die Anwendbarkeit zur Untersuchung der Dynamik bei der Substratbindung durch kleine Hitzeschockproteine.

Um die Größe und Stabilität der gebildeten sHsp-Substratkomplexe zwischen α B-pCNF und denaturiertem, Lysozym zu charakterisieren, wurde analytische Ultrazentrifugation durchgeführt (Abbildung 38). Dazu wurde Lysozym kovalent mit dem Fluoreszenzfarbstoff Atto488 markiert und durch Reduktion denaturiert. Die Kopplung des Farbstoffes erfolgte mittels eines Amin-reaktiven Atto488 Derivates (Atto488-NHS-Ester) an freie Aminogruppen des Proteins. Anders als bei den bisherigen fluoreszenzspektroskopischen Experimenten wird zwar ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet, jedoch dient dieser nicht als FRET-Partner. Bei der analytischen Ultrazentrifugation ist neben der Absorptions- auch eine Fluoreszenzdetektion möglich. Als Signalgeber dient in diesem Fall kovalent an Lysozym gekoppeltes Atto488, das selektiv detektiert werden kann.

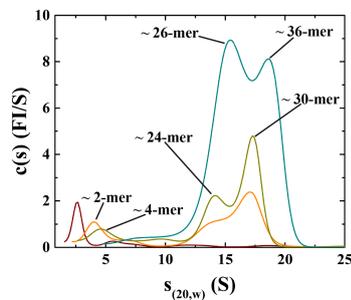


Abbildung 38: Bindung von Lysozym-Atto488 an α B-Kristallin. Um die Größe der sHsp-Substratkomplexe aus Lysozym und α B-pCNF zu untersuchen, wurde analytische Ultrazentrifugation durchgeführt. Dazu wurde Lysozym mit dem Fluoreszenzfarbstoff Atto488 Amin-markiert, reduziert und in 8 M Harnstoff denaturiert. Zu 1 μ M Atto488-markiertem Lysozym wurden verschiedene Konzentrationen an α B-pCNF zugegeben (0 (—), 5 (—), 10 (—) und 40 μ M (—) α B-pCNF) und Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe durchgeführt. Die Proteine wurden in PBS bei 20 °C und 35 000 rpm bis zu vollständigen Sedimentation zentrifugiert. Während des Laufs wurde die integrale Fluoreszenz bei 505-565 nm nach Anregung bei 488 nm in Abhängigkeit der radialen Position kontinuierlich detektiert. Die Auswertung erfolgte nach dem $c(s)$ -Modell mit dem Programm SedFit. Die Abschätzung der Oligomergroße von α B-Kristallin anhand des Sedimentationskoeffizienten erfolgte nach den von Braun *et al.* und Peschek *et al.* berechneten Werten (23,65).

In den Sedimentationskoeffizientenverteilungen bei konstanter Konzentration an Lysozym-Atto488 und variabler Konzentration an α B-pCNF lassen sich mehrere Spezies identifizieren. Wird kein α B-pCNF zugegeben, sedimentiert Atto488-markiertes Lysozym als entfaltetes Protein mit etwa 2,5 S. Aufgrund der Aggregationsanfälligkeit, selbst bei einer geringen Konzentration von 1 μ M, kann nur ein geringes Signal detektiert werden. Mit steigender Konzentration an α B-pCNF sind verschiedene größere Spezies zu beobachten, diese entsprechen in etwa einem α B-pCNF Dimer (2,8 S), einem Tetramer (6,0 S), einem 24-mer (14,4 S), 26-mer (15,2 S) und etwa 30- bis 36-mer (17,2 S bis 19,5 S) (23,65). Allerdings kann die genaue Größe der Komplexe nicht bestimmt werden, da die Anzahl an Bindeplätzen für Substrate von α B-Kristallin noch unbekannt ist. Des Weiteren verwendet das Programm SedFit einen für alle Spezies gemitteltes Reibungsverhältnis (f/f_0) zur Berechnung der molekularen Masse. Dies limitiert insbesondere bei sehr heterogenen Verteilungen, wie sie in

Abbildung 38 gezeigt ist, die Interpretation der Größenverteilung und berechneten molekularen Massen. Die Ergebnisse der analytischen Ultrazentrifugation zeigen dennoch deutlich die Polydispersität von α B-Kristallin, die insbesondere für die Chaperonfunktion wichtig ist (146). Durch die Verwendung des Modellsubstrats Lysozym konnte die grundlegende Funktionalität von pCNF als FRET-Donor in α B-Kristallin bei der Bindung von Trp-haltigen Substraten gezeigt werden. Allerdings waren bei den Messungen, aufgrund der geringen Löslichkeit von denaturiertem Lysozym, keine quantitativen Bestimmungen möglich. Um möglicherweise die Substratbindung von α B-Kristallin quantitativ beschreiben zu können, wurden Messungen mit α -Lactalbumin durchgeführt. α -Lactalbumin aus Rind (UniProt-ID: P00711-1, MW: 14 kDa) besitzt wie auch Lysozym 4 strukturelle Disulfidbrücken, kann aber nach Reduktion und Carboxymethylierung der Thiolgruppen der 8 Cysteine in Lösung gehalten werden. Die Carboxymethylierung erfolgt mit Iodacetat in reduziertem, denaturiertem Zustand des Proteins in Guanidiniumchlorid-haltigem Puffer. Das so erhaltene reduzierte, carboxymethylierte α -Lactalbumin (RCM- α -Lactalbumin) bildet ein permanent entfaltetes, aber dennoch lösliches Substrat (181). Um die Bindung von RCM- α -Lactalbumin an α B-pCNF aber auch an Hsc70* zu untersuchen, wurden *stopped-flow*-Messungen und eine Gleichgewichtstitration durchgeführt (Abbildung 39).

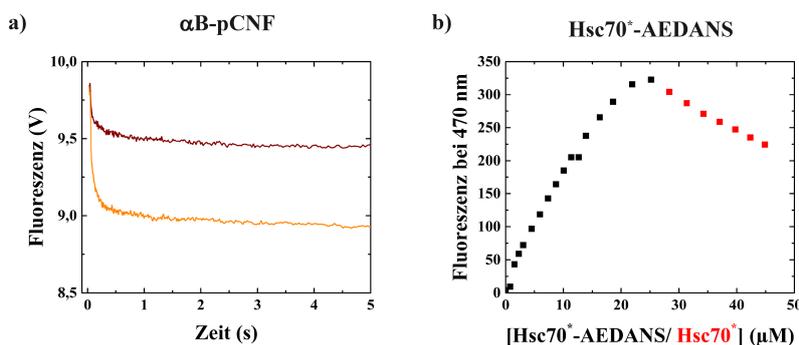


Abbildung 39: Bindung von RCM- α -Lactalbumin an α B-pCNF und Hsc70*. Die Bindung des permanent entfaltenen Substrats RCM- α -Lactalbumin an α B-pCNF und Hsc70* wurde durch *stopped-flow*-Messungen (a) und Gleichgewichtstitration (b) untersucht. Die *stopped-flow*-Messungen wurden mit einer Endkonzentration von 3 μ M α B-pCNF bei 25 °C in PBS durchgeführt. In Teilabbildung a) sind beispielhafte Fluoreszenzkinetiken bei Zugabe von 11 μ M (—) und 33 μ M (—) RCM- α -Lactalbumin gezeigt. Die Anregung erfolgte bei 240 nm, die Detektion der Emission oberhalb von 285 nm. Die Spaltbreite der Anregung lag bei 3 nm. Teilabbildung b) zeigt die Bindung von RCM- α -Lactalbumin an Hsc70*-AEDANS (■). Zu 1 μ M RCM- α -Lactalbumin wurden AEDANS-markiertes Hsc70* titriert und die Fluoreszenz bei 470 nm nach Anregung bei 280 nm gegen die Konzentration an Hsc70*-AEDANS aufgetragen. Das AEDANS-markierte Hsc70* konnte aus dem Chaperon-Substratkomplex mit unmarkiertem Hsc70* (■) verdrängt werden. Die Messungen erfolgten bei 37 °C in 20 mM HEPES/KOH, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH^{37 °C} 7,2. Die Spaltbreite der Anregung und Emission lag bei 3 und 5 nm. Die Dämpfung betrug 2 s.

Die Bindung von RCM- α -Lactalbumin an α B-pCNF konnte, anders als die von denaturiertem Lysozym, zeitlich nicht mit Handmischexperimenten aufgelöst werden, da die Signaländerung innerhalb der Totzeit des Experiments erfolgte. Die geringe Totzeit von wenigen Millisekunden des *stopped-flow*-Fluoreszenzspektrophotometers, erlaubte es jedoch die Abnahme der Donorfluoreszenz nach Anregung von α B-pCNF und Zugabe von Substrat zu verfolgen. In Abbildung 39a sind die

Fluoreszenzkinetiken bei Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an RCM- α -Lactalbumin zu α B-pCNF gezeigt. Bei beiden gewählten Endkonzentrationen von 11 μ M und 33 μ M RCM- α -Lactalbumin ist eine deutliche und konzentrationsabhängige Abnahme der Donorfluoreszenz zu beobachten. Die größte Signaländerung erfolgt dabei innerhalb der ersten 500 ms, was auf eine sehr schnelle Erkennung und Bindung von RCM- α -Lactalbumin als Substrat für α B-pCNF hindeutet. Neben der Bindung von RCM- α -Lactalbumin an α B-pCNF wurde auch die Erkennung des Substrats durch Hsc70* konzeptionell untersucht. RCM- α -Lactalbumin als Substrat für ATP-abhängige Chaperone wurde bereits 1995 von Freeman *et al.* für Studien zur Regulation der Hsp70 Funktion durch das EEVD-Motiv verwendet (182). Bei Zugabe von RCM- α -Lactalbumin zu Hsp70 bilden sich stabile Komplexe aus, die chromatographisch und gelelektrophoretisch trennbar sind. Um die Bindung der Isoform Hsc70* an RCM- α -Lactalbumin zu beschreiben, wurde das Substrat vorgelegt und die Konzentration an Hsc70*-AEDANS schrittweise erhöht. Durch Anregung der Tryptophane in RCM- α -Lactalbumin konnte die Bindung an das Chaperon durch den FRET-Übertrag auf AEDANS-markiertes Hsc70* spektroskopisch verfolgt werden. In Abbildung 39b ist die Zunahme der Akzeptorfluoreszenz von AEDANS gegen die Konzentration an Chaperon aufgetragen. Bei Zugabe von Hsc70*-AEDANS zu RCM- α -Lactalbumin ist ein deutlicher Anstieg des Fluoreszenzsignals bei 470 nm zu beobachten. Dieser konzentrationsabhängige Anstieg deutet auf eine Bindung und den FRET-Übertrag zwischen den Tryptophanen in RCM- α -Lactalbumin und AEDANS in Hsc70* hin. Auch kann die Hsc70*-AEDANS-Variante durch Zugabe von unmarkiertem Hsc70* aus dem Chaperon-Substratkomplex verdrängt werden. Dementsprechend nimmt die AEDANS-Fluoreszenz bei Zugabe von unmarkiertem Hsc70* ab.

Neben der Dynamik und Affinität der Substratbindung von α B-pCNF und Hsc70* wurde auch die Größe der Substratkomplexe bei Zugabe von RCM- α -Lactalbumin mittels analytischer Ultrazentrifugation untersucht (Abbildung 40). Ohne Zugabe von α B-Kristallin bzw. Hsc70* sedimentiert Atto488-markiertes RCM- α -Lactalbumin mit 1,5 S. Nach Zugabe von α B-Kristallin sind selbst bei einem 50-fachen Überschuss an kleinem Hitzeschockprotein keine sedimentierenden Spezies mit einem Sedimentationskoeffizienten unter 25 S erkennbar (Abbildung 40a,b). Möglicherweise sedimentieren sHsp-Substratkomplexe aus RCM- α -Lactalbumin und α B-Kristallin schon vollständig vor Erreichen der finalen Umdrehungszahl von 35 000 rpm. Einen Hinweis darauf gibt die Abnahme des Fluoreszenzintegrals zwischen 0,75 S und 2,5 S. Das Fluoreszenzintegral ist dabei ein Maß für das Signal aller sedimentierenden Spezies in der analysierten Proteinlösung bei gegebener Konzentration (183). Bei Zugabe von α B-Kristallin nimmt das Fluoreszenzintegral konzentrationsabhängig ab, was darauf hindeuten könnte, dass der gebildete sHsp-Substratkomplex aus α B-Kristallin und RCM- α -Lactalbumin-Atto488 bereits vor dem Erreichen der eingestellten Umdrehungszahl den Zellenboden erreicht hat und so nicht mehr detektiert werden kann. Hinweise darauf ergeben sich auch aus der Partikelgröße der α -Kristalline in der HMW-Fraktion von Linsenextrakten aus Mäusen (Abbildung 13

und Abbildung 27). Hier sind Partikel von über 25 nm Größe erkennbar, die in etwa der Größe des 80 S Ribosom aus Eukaryoten entsprechen (184). Partikel dieser Größe würden bereits vor dem Start der Messung bei 35 000 rpm sedimentieren.

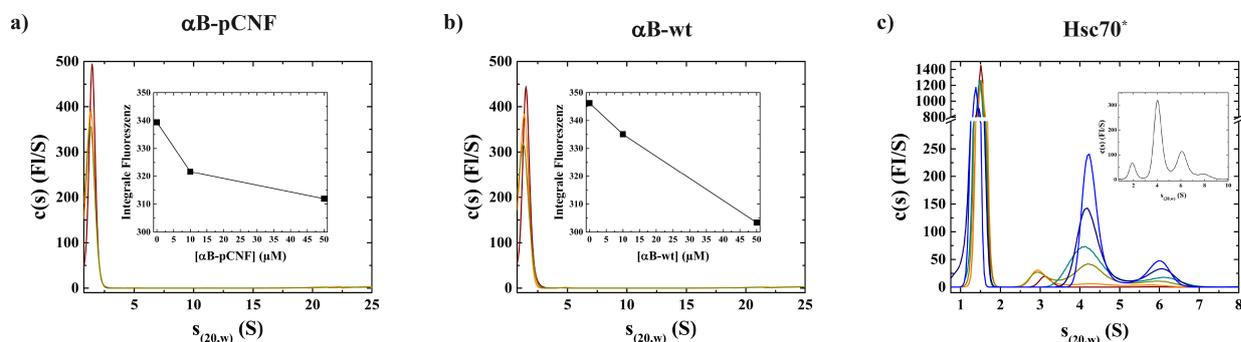


Abbildung 40: Charakterisierung der Substratkomplexe von RCM- α -Lactalbumin mit α B-Kristallin und Hsc70*. Nach Inkubation des permanent entfaltenen Modells substrats RCM- α -Lactalbumin-Atto488 mit α B-Kristallin (a,b) und Hsc70* (c), wurde die Proteinlösung mittels analytischer Ultrazentrifugation untersucht. Die Konzentration an RCM- α -Lactalbumin-Atto488 lag jeweils bei 1 μ M, die von α B-pCNF (a) bzw. α B-wt (b) bei 0 (—), 10 (—), 50 μ M (—) in PBS. Für Hsc70* wurden 0 (—), 1 (—), 5 (—), 10 (—), 20 (—), und 30 μ M (—) Protein in 20 mM HEPES/KOH, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, pH^{20 °C} 7,2 eingesetzt. In a) und b) ist als Einsatz die Änderung des Fluoreszenzintegrals (■) zwischen 0,75 S und 2,5 S gezeigt. Als Einsatz in c) ist die Sedimentationskoeffizientenverteilung von 1 μ M Hsc70*-Atto488 (—) abgebildet. Die Proteinlösungen wurden bei 35 000 rpm für α B-Kristallin und 42 000 rpm für Hsc70* bei 20 °C bis zur vollständigen Sedimentation zentrifugiert. Während des Laufs wurde die integrale Fluoreszenz bei 505-565 nm nach Anregung bei 488 nm in Abhängigkeit der radialen Position kontinuierlich detektiert. Die kovalente Modifikation von freien Aminen in RCM- α -Lactalbumin mit Atto488 erfolgte mit dem NHS-Ester Derivat. Die Auswertung wurde nach dem c(s)-Modell mit dem Programm SedFit durchgeführt.

Bei Zugabe von Hsc70* zu RCM- α -Lactalbumin-Atto488 hingegen, treten bei steigender Konzentration an Chaperon verschiedene große ternäre Komplexe bei etwa 4,2 S und 6,2 S auf (Abbildung 40c). Diese entsprechen einem Hsc70*-Mono- und Dimer mit gebundenem RCM- α -Lactalbumin-Atto488. Ungebundenes RCM- α -Lactalbumin-Atto488 sedimentiert wie auch in den Experimenten mit α B-Kristallin beschrieben mit 1,5 S. Wird Hsc70*-Atto488 als Kontrolle alleine zentrifugiert, zeigt es einen Sedimentationskoeffizienten von 4,0 S für das Monomer, 6,0 S für das Dimer, sowie 8,0 S für das Trimer. Der Sedimentationskoeffizienten von Hsc70*-Atto488 und die Verteilung der Oligomerspezies stehen in sehr guter Übereinstimmung mit den für Hsp70 aus Hefe und für die humane, endoplasmatische Isoform BiP beschriebenen Beobachtungen (185,186). Die verwendeten α B-Kristallin- und Hsc70-Varianten können daher als Grundlage für ein Tripel-FRET-System dienen.

Durch den Einbau von pCNF an Aminosäureposition 9 in eine Tryptophan-freie α B-Kristallinvariante durch die Erweiterung des genetischen Codes von *E. coli* konnte eine spezifische Fluoreszenzsonde in der N-terminalen Region geschaffen werden. Die verwendete α B-pCNF-Variante war dabei in ihren physikochemischen Eigenschaften sehr gut mit dem Wildtyp-Protein vergleichbar. Weder die Chaperonaktivität, die Oligomergröße, noch der Untereinheiten austausch zwischen den Oligomeren waren von den Mutationen messbar beeinflusst. Der Einsatz von pCNF als positionsspezifische

Fluoreszenzsonde ermöglichte die Untersuchung der mikroskopischen Ratenkonstanten der Bindung von (teil-) entfalteten, Tryptophan-haltigen Substraten, wie Lysozym oder RCM- α -Lactalbumin an humanes α B-Kristallin. Durch Reduktion und Carboxymethylierung liegt RCM- α -Lactalbumin als permanent entfaltetes aber dennoch lösliches Protein vor (181). Diese Eigenschaft ermöglichten es das Protein als Modellsubstrat zur Untersuchung der Bindung an α B-Kristallin zu verwenden. Die Bindung von Substraten an α B-Kristallin konnte durch Handmisch- und *stopped-flow*-Experimente spektroskopisch verfolgt werden. Durch Verwendung eines Trp-freien Substrates, kann mit diesem System prinzipiell auch die Dynamik des Untereinheiten austausches von α B-Kristallin bei Zugabe von Bindepartnern untersucht werden. Wird zu einer Mischung aus α B-pCNF und α B-wt ein Tryptophan-freies Substrat gegeben, können potentiell dynamische Vorgänge im Oligomergleichgewicht spektroskopisch verfolgt werden. Grundlage bildet dabei das FRET-Paar pCNF in α B-pCNF und Trp in α B-wt. Um die Brücke zwischen den kleinen Hitzeschockproteinen und dem ATP-abhängigen Hsp70/40-Chaperonsystem zu schlagen, wurde Hsc70* als dritte Komponente des Tripel-FRET-System etabliert. Hsc70* trägt die Mutationen W90,580F, 647G, 648C und bildet stabile Chaperon-Substratkomplexe mit dem permanent entfalteten Modellsubstrat RCM- α -Lactalbumin aus. Die Bindung von Hsc70* an RCM- α -Lactalbumin konnte durch Gleichgewichtstitration, sowie analytische Ultrazentrifugation bestätigt werden und stimmt sehr gut mit der Literatur überein. Nach Sicherstellung, dass die in Hsc70* eingeführten Mutationen nicht die ATPase-Aktivität und andere Proteinparameter beeinflussen, kann das vorgestellte Tripel-FRET-System die Grundlage zur Untersuchung der Kooperation von kleinen Hitzeschockproteinen mit dem Hsp70/40-System bei der Rückfaltung von Substraten bilden.

4 Zusammenfassende Diskussion

4.1 Molekulare Determinanten der Kataraktentstehung

Eine Besonderheit der Augenlinse von Vertebraten ist, neben der sehr hohen Proteinkonzentration in den Linsenfaserzellen von bis zu 450 mg/ml (13), die Abwesenheit einer *de-novo*-Proteinsynthese. Die Kristalline in der Augenlinse von Vertebraten sind so alt wie der Organismus selbst und werden nicht während des Alterns erneuert (187). Das bisherige Modell der Kataraktentstehung geht davon aus, dass die Kristalline in der Augenlinse mit dem Alter zunehmend modifiziert werden. Diese Modifikationen schließen Deamidierung, Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Carbamylierung, Racemisierung, Oxidation, Glykosylierung, Glykierung und Trunkierungen ein (15,123). Unabhängig vom genauen Typ wird davon ausgegangen, dass diese Modifikationen zu aggregationsanfälligen, destabilisierten Spezies führen. Als Schutz gegen die Proteinaggregation in der Linse dienen nach aktuellem Wissenstand die α -Kristalline (α L-Fraktion), die an modifizierte β - und γ -Kristalline binden. Dabei sollen große sHsp-Substratkomplexe (HMW-Fraktion) entstehen und die Aggregation von modifizierten β - und γ -Kristallinen wird verhindert. Allerdings kommt es während des Alterns dadurch zu einer Verringerung des Chaperonreservoirs in Form der α -Kristalline und infolgedessen zum Auftreten von senilem Katarakt. Bei erblichem Katarakt hingegen wird davon ausgegangen, dass Mutationen im Erbgut eine thermodynamische Destabilisierung der Kristalline verursachen. Das mutierte Kristallin ist aggregationsanfälliger als das Wildtyp-Protein und belastet das Chaperonsystem zusätzlich. In beiden Fällen kommt es jedoch nach einer Überlastung des Chaperonreservoirs zur Bildung von lichtstreuenden Proteinaggregaten.

4.1.1 Das Proteom in der Augenlinse von Wildtyp-Mäusen ändert sich mit dem Alter

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das derzeitige Modell der Kataraktentstehung überprüft werden. Dazu wurden Experimente mit genetisch veränderten Tieren und den dabei mutierten Kristallinen durchgeführt. Um zunächst normale Alterungsvorgänge in den Linsen zu untersuchen, wurden zwei Wildtyp-Stämme (C3HeB/FeJ und C57Bl/6J) verwendet. Bei beiden Wildtyp-Stämmen waren Veränderungen im Proteom während des Alterns zu beobachten. So kam es zu der in der Literatur beschriebenen Zunahme von Modifikationen der Kristalline und Veränderungen der relativen Anteile in der Linse. Am ausgeprägtesten war die Abnahme des relativen Anteils der γ -Kristalline, wie er auch von Ueda *et al.* für C57Bl/6J Wildtyp-Mäuse beschrieben wurde (18). Linsenepithelzellen und die sich daraus entwickelnden Linsenfaserzellen besitzen zwar ein funktionierendes Ubiquitin-Proteasom-System, allerdings ist dieses primär während der Zelldifferenzierung und dem dabei stattfindenden Abbau der Zellorganellen aktiv (153,154). Derzeit ist es aber noch unklar, welche Proteasen in den ausdifferenzierten Zellen aktiv sind und den Abbau von γ -Kristallinen, insbesondere von γ A-Kristallin, bedingen könnten. Neben den γ -Kristallinen waren auch die α -Kristalline von enzymatischem Verdau

betroffen. Speziell bei α A-Kristallin fanden Trunkierungen statt, wie sie bereits beschrieben sind (188). Die trunkierten α A-Varianten zeigten ein erhöhtes Vorkommen in der wasserunlöslichen Fraktion, was auf eine geringere Stabilität bzw. Löslichkeit des Proteins hindeutet. Bei α B-Kristallin hingegen waren neben Trunkierungen vermehrt Modifikationen zu beobachten, die eine Änderung des isoelektrischen Punkts hin zu niedrigerem pK_a verursachten. Mögliche Ursachen hierfür könnten die mittels MALDI-TOF-MS detektierbaren Phosphorylierungen oder Acetylierungen sein. Wie auch bei trunkiertem α A-Kristallin, war ein gehäuftes Vorkommen von trunkiertem, modifiziertem α B-Kristallin in der wasserunlöslichen Fraktion zu beobachten. Von den mit zunehmendem Alter stärker modifizierten Kristallinen wird angenommen, dass diese thermodynamisch destabilisiert und dementsprechend aggregationsanfälliger sind.

Derzeit wird in der Literatur davon ausgegangen, dass die Funktion der α -Kristalline darin besteht, die Aggregation von Proteinen durch die Bildung von hochmolekularen Komplexen (HMW-Fraktion) aus den α -Kristallinen und aggregationsanfälligen β - und γ -Kristallinen zu verhindern. Die Zunahme der HMW-Fraktion verursacht aber gleichzeitig auch eine relative Abnahme der α L-Fraktion, dem Chaperonreservoir der Linse. Allerdings konnte in der HMW-Fraktion der Wildtyp-Mäuse zu keinem Zeitpunkt eine relative Häufung von β - oder γ -Kristallinen beobachtet werden. Vielmehr war die Zusammensetzung der HMW-Fraktion und der α L-Fraktion, nach Trennung der Proteine in den Fraktionen durch 2-DE, nahezu identisch. Jedoch unterschieden sich die beiden Fraktionen stark in ihrer Partikelgröße. Während in der HMW-Fraktion Proteinkomplexe von bis zu 50 nm vorkamen, waren die Proteine in der α L-Fraktion mit 15 nm Größe deutlich kleiner. Der deutliche Größenunterschied der Proteinkomplexe in den beiden Fraktionen war auch bei SEC-HPLC-Experimenten zu beobachten. Während die die HMW-Fraktion im Ausschlussvolumen der Säule von 8,5 ml eluiert, erstreckt sich das Elutionsvolumen der α L-Fraktion über einen breiten Bereich von etwa 9-11 ml. Ein möglicher Grund könnten Modifikationen sein, die sich mittels 2-DE nicht detektieren lassen, wie etwa Racemisierung oder Glykierung. Insgesamt zeigte sich eine hohe Plastizität des murinen Linsenproteoms während des Alterns. Neben Änderungen im relativen Anteil der Kristalline in der Linse fanden auch zunehmend Modifikationen aller Kristalline statt.

4.1.2 Katarakt-assoziierte Kristallinvarianten sind thermodynamisch destabilisiert

Die geringere thermodynamische Stabilität von Katarakt-assoziierten Kristallinvarianten ist eine der zentralen Annahmen des „*Damage and Titration*“-Modells (86). In sehr guter Übereinstimmung mit dem Modell waren alle untersuchten Katarakt-assoziierten Kristallinvarianten thermodynamisch destabilisiert. Die analysierten Kristallinvarianten: α A-V124E, β A2-S47P und γ D-V76D umfassten dabei Vertreter aus allen drei Kristallinfamilien. Ein erster Hinweis auf die geringere Stabilität der Proteinvarianten ergab sich bereits bei der Produktion der Kristalline in *E. coli*. So befanden sich die Kristallinvarianten stets in der wasserunlöslichen Fraktion des bakteriellen Rohextrakts. Selbst der

löslichkeitserhöhende SUMO-tag hatte keinen Einfluss auf die Löslichkeit der rekombinanten Kristallinvarianten bei der Produktion in *E. coli*. Auch aus der CD-Spektroskopie, nach Rückfaltung der Kristallinvarianten, ergaben sich Hinweise auf strukturelle Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp-Protein. So war der Nulldurchgang des CD-Spektrums von α A-V124E im Fern-UV zu kleineren Wellenlängen verschoben, was auf einen höheren Anteil an unstrukturierten Bereichen hindeutet. Bei γ D-V76D ist zwar das Signal bei kleinen Wellenlängen um 200-220 nm sehr gut mit dem Wildtyp-Protein vergleichbar, unterscheidet sich aber bei größeren Wellenlängen. Bei β A2-S47P war die destabilisierende Wirkung der Punktmutation so stark, dass die Proteinvariante nur unter Zusatz von 500 mM L-Arginin bei einer Konzentration von maximal 10 μ M löslich war. Die Aminosäure L-Arginin wirkt löslichkeitserhöhend in dem es die Aggregation von Proteinen, vermutlich durch die Verlangsamung von Protein-Protein-Interaktionen, verhindert (189). Allerdings absorbiert L-Arginin stark im Fern-UV, sodass eine Analyse von β A2-S47P mittels CD-Spektroskopie nicht möglich war. Deutlich sichtbarer, als bei der Sekundärstrukturanalyse, war der Einfluss der jeweiligen Punktmutation auf die thermische Stabilität der Kristallinvarianten. Verglichen mit dem Wildtyp-Protein war bei allen untersuchten Varianten eine signifikante Verschiebung der Temperatur des apparenten Übergangsmittelpunktes (T_M) zu kleineren Werten zu erkennen. Während die Verschiebung des T_M bei α A-V124E etwa 10 °C beträgt, steigt die Differenz von γ D-V76D zu β A2-S47P weiter an. Die thermodynamische Destabilisierung der mutierten Kristalline fügt sich gut in die Literatur ein. Die humanen Katarakt-assoziierten α A-Kristallin-Punktmutanten G98R und R49C sind beide ebenfalls deutlich empfindlicher gegenüber thermisch-induzierter Entfaltung (190,191). Die Variante α A-G98R zeigt zudem eine drastisch geringere Chaperonaktivität und koaggregiert mit dem Substrat. Bei der Mutante α A-R116C war, wie auch bei α A-V124E, die molekulare Masse des Oligomers, verglichen mit dem Wildtyp-Protein, um mindestens den Faktor 3 erhöht und die Chaperonaktivität stark reduziert (192). Möglicherweise kann α A-Kristallin aufgrund der, durch die Punktmutationen R116C bzw. V124E bedingten, veränderten Oligomergröße und Chaperonaktivität nicht mehr die Funktion in der Linse erfüllen aggregationsanfällige Proteine zu sequestrieren.

Bei der Katarakt-assoziierten γ D-V76D-Variante ändert sich neben dem T_M zudem die Form des Signalverlaufs bei der thermisch-induzierten Entfaltung unabhängig von der verwendeten Methode. Sowohl bei der Untersuchung durch CD-Spektroskopie als auch mittels nanoDSF ist bei γ D-V76D ein biphasischer Verlauf zu beobachten, während beim Wildtyp-Protein ein monophasischer Entfaltungsübergang auftritt. Die Übergangsmittelpunkte der γ D-V76D-Variante sind dabei um 25 °C bzw. 10 °C gegenüber dem T_M des Wildtyp-Proteins verschoben. Ein möglicher Grund dafür ist die destabilisierende Wirkung der Punktmutation in der N-terminalen Domäne des Zweidomänenproteins, die sich offenbar auch auf die Stabilität der C-terminalen Domäne auswirkt. Dadurch können die Entfaltungsübergänge der zwei Domänen von γ D-Kristallin V76D getrennt voneinander aufgelöst werden und sind zudem deutlich im T_M zu niedrigeren Werten verschoben. Eine Verschiebung des T_M zu niedrigeren Temperaturen und Änderung des Entfaltungsverlaufs von einem monophasischem zu

einem biphasischem Verlauf tritt auch bei humanem γ D-V76D auf (145). Interessanterweise zeigen die α -Kristalline *in vitro* eine sehr geringe Affinität gegenüber der Katarakt-assoziierten γ -Kristallinvariante V76D (145), was darauf hindeutet, dass die *in vitro* Eigenschaften nicht zwangsläufig direkt auf die Augenlinse anwendbar sind. Am drastischsten fällt der Einfluss der Katarakt-assoziierten Mutation bei β A2-Kristalline aus. Diese Variante β A2-S47P ist bereits bei einer Temperatur oberhalb von 30 °C vollständig entfaltet. Unterhalb dieser Temperatur nimmt das Protein vermutlich einen metastabilen Zustand mit einer Wildtyp-ähnlichen Quartärstruktur ein. Bei SEC-HPLC-Experimenten eluieren sowohl β A2-S47P als auch β A2-wt mit einer Retentionszeit von etwa 32 min als Dimer, während β A2-S47P im Laufe von mehrstündigen AUZ-Experimenten vollständig entfaltet. Metastabile Zustände von Proteinen wurden in der Literatur bereits mit pathogenen Vorgängen in Verbindung gebracht (193). Bei humanem β B2-Kristallin kann ein teilgefaltetes Intermediat populiert werden, das in Abwesenheit von α -Kristallin aggregiert. Wird jedoch Chaperon zugegeben, findet keine Aggregation statt und es werden stabile sHsp-Substratkomplexe gebildet (144). Eine ähnliche Situation könnte auch bei der β A2-S47P Variante vorliegen. Durch die Bindung der Katarakt-assoziierten Variante an α -Kristallin kommt es zu einer Belastung des Chaperonreservoirs die, durch die Akkumulation von weiteren aggregationsanfälligen Kristallinen, letztendlich zu einer Überlastung des Chaperonsystems und Katarakt führt.

Eine weitere Gemeinsamkeit aller untersuchten Katarakt-assoziierten Kristallinvarianten ist die erhöhte Empfindlichkeit für proteolytischen Abbau. Sowohl bei α A-V124E als auch β A2-S47P ist die Zeit bis zum proteolytischen Abbau der Hälfte des Volllängenproteins um etwa den Faktor 6 bzw. 20 im Vergleich zum Wildtyp-Protein verkürzt. Bei γ D-Kristallin ist das Wildtyp-Protein sehr resistent gegen den proteolytischen Abbau durch α -Chymotrypsin und es findet auch nach 90 min kaum Proteolyse statt, während bei γ D-V76D die Hälfte des Volllängenproteins nach 30 min verdaut wird. Eine Akkumulation von proteolytischen Fragmenten wird bereits seit einiger Zeit als einer der möglichen Gründe für die Entstehung von Katarakt diskutiert. Auch hier wird angenommen, dass die Akkumulation und folgende Aggregation der Proteinfragmente zu lichtstreuenden Aggregaten führt (126,127). In gealterten humanen Linsen konnte das Auftreten von trunkierten Kristallinen, insbesondere α B- und β A1/3-Kristallinfragmenten, bestätigt werden (194). Interessanterweise induzieren die Peptidfragmente von β A1/3-Kristallin eine 5,6-fache Größenzunahme des α B-Kristallinoligomers und teilweise Präzipitation, was auf die Bildung von hochmolekularen sHsp-Substratkomplexen hindeutet, wie sie nach dem „*Damage and Titration*“-Modell in der HMW-Fraktion vorkommen sollen. Eine Akkumulation von trunkierten Kristallinen war dementsprechend in den 2D-Gelen der wasserunlöslichen Fraktion von Linsenextrakten zu beobachten.

4.1.3 Das Proteom in der Augenlinse von Kataraktmäusen zeigt eine signifikant höhere Plastizität im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen

Um die Auswirkung von Katarakt-assoziierten Mutationen in den Kristallinen auch *in vivo* beschreiben zu können, wurde das Linsenproteom von drei Kataraktmutanten. Neben Aey7-Mäusen (α A-V124E), wurden Aca30- (β A2-S47P) und Aey4-Mäuse (γ D-V76D) für die Experimente verwendet. Bei den verschiedenen Kataraktstämmen war zwar eine unterschiedliche Progression und Art des Kataraktes zu beobachten, dennoch stellte sich in der Augenlinse der Tiere eine nahezu vollständige Trübung nach der Hälfte des Beobachtungszeitraumes ein. Eine der auffälligsten Beobachtungen war die starke Verringerung des relativen Anteils des mutierten Kristallins im Linsenproteom der jeweiligen Kataraktmutante. Verglichen mit dem Vorkommen der jeweiligen nicht-mutierten, analogen Isoform in neugeborenen Wildtyp-Mäusen, war der relative Anteil von γ D-V76D von 12 % auf 5 % etwa halbiert, während der relative Anteil von α A-V124E bei nur einem Neuntel lag (18 % zu 2 %). Die mutierte Isoform β A2-S47P konnte zu keinem Zeitpunkt in den Linsen detektiert werden, wohingegen β A2-Kristallin 2,5 % am Linsenproteom von Wildtyp-Mäusen ausmacht. Der anteilige Wert der mutierten Isoform war dabei zu allen Zeitpunkten in der wasserlöslichen, -unlöslichen Fraktion deutlich reduziert und es fand keine Akkumulation der mutierten Kristalline in der wasserunlöslichen Fraktion statt. Eine beobachtbare Tendenz in der Progression des Katarakts war die, dass je größer die Differenz des relativen Anteils des Kristallins in Wildtyp-Mäusen und dem relativen Anteil der mutierten Kristallins war, desto früher kam es zu einer signifikanten Trübung der Linse über 50 % der mittleren Linsendichte in der jeweiligen Kataraktmutante. Dementsprechend sind die Linsen von Aey7 schon bei der Geburt sichtbar trüb, während die Aca30-Linsen auch mit 3 Monaten noch klar und erst ab 6 Monaten lichtundurchlässig sind. Bei Aey4 stellt sich die Trübung über 50 % der mittleren Linsendichte zeitlich zwischen den zwei anderen Kataraktmutanten ein. Ein möglicher Grund für die drastische Reduzierung des Anteils an mutiertem Kristallin in den Kataraktstämmen könnte der rasche proteolytische Abbau durch zelluläre Proteasen während der Ausdifferenzierung der Linsenfasern aus den Linsenepithelzellen sein. Hinsichtlich der Plastizität des Linsenproteoms ergaben sich in den Kataraktmutanten starke Unterschiede zu Wildtyp-Mäusen, aber auch Differenzen zwischen den Kataraktmutanten. Verglichen mit der Wildtyp-Situation waren die untersuchten Isoformen (α A-, α B- und β B2-Kristallin) alle stärker modifiziert und traten gehäuft in der wasserunlöslichen Fraktion auf. Im Vergleich zwischen den Kataraktmutanten war bei Aey7-Mäusen β B2-Kristallin am stärksten modifiziert, während in Aey4-Mäusen insbesondere α A- und α B-Kristallin modifiziert war. Bei Aca30-Mäusen lag der Modifikationsgrad der α -Kristalline nochmals über dem von Aey4-Mäusen. Eine Gemeinsamkeit hingegen war die sehr starke Abnahme der γ -Kristalline während des Alterns, wie sie durch 2-DE und SEC-HPLC gezeigt werden konnte. Zwar nimmt der relative Anteil der γ -Kristalline auch in Wildtyp-Mäusen ab, die anteilige Abnahme in den Kataraktmutanten überstieg diese aber deutlich um den

Faktor 2. Liegt der Anteil an γ -Kristallin in den Linsen drei Kataraktmutanten im neugeborenen Alter bei 50-60 %, nimmt er in 12 Monate alten Mäusen auf etwa 15 % ab.

Die überraschendste Beobachtung war allerdings die, dass weder eine Akkumulation der mutierten Kristalline in der wasserunlöslichen Fraktion, noch in der HMW-Fraktion im wasserlöslichen Teil stattfand. Vielmehr war die HMW-Fraktion in den Kataraktmutanten, wie auch bei Wildtyp-Mäusen, in der Proteinzusammensetzung sehr ähnlich zur α L-Fraktion und es trat weder eine Häufung der Katarakt-assoziierten Variante noch anderer β - oder γ -Kristalline auf. Die HMW-Fraktion von Aey4- und Aca30-Mäusen bestand zu jedem Alter zu mindestens 80 % aus α -Kristallinen. Einzig in der Partikelgröße bestanden Unterschiede. So waren in EM-Aufnahmen die Proteinkomplexe in der HMW- um mindestens den Faktor 3 größer als in der α L-Fraktion. Die Partikelgröße in der jeweiligen Fraktion war jedoch sehr gut mit der Wildtyp-Situation vergleichbar. Eine Ausnahme bildeten Linsenextrakte aus Aey7-Mäusen. Hier waren die HMW- und α L-Fraktion, durch die höhere Oligomergröße von α A-V124E, chromatographisch nicht trennbar und eluierten als eine Fraktion im Ausschlussvolumen der Säule. Dennoch bestand auch diese Fraktion zu über 80 % aus α -Kristallinen und enthielt, ausgehend von EM-Aufnahmen, eine Mischung von HMW- und α L-Partikeln. Die Größenverhältnisse waren dabei mit der Wildtyp-Situation bzw. der Situation in den beiden anderen Kataraktmutanten vergleichbar.

4.2 Die thermodynamische Destabilisierung und Aggregation von mutierten Kristallinen ist nicht der Grund für erblichen Katarakt

Nach dem derzeitigen „*Damage and Titration*“-Modell müsste es in den Kataraktmutanten zu einer Akkumulation des mutierten Kristallins in der HMW-Fraktion oder dem wasserunlöslichen Teil kommen. Allerdings erbrachte die Untersuchung des Linsenproteoms der Mausmutanten Ergebnisse, die nicht mit dem Modell vereinbar sind. Erstens war der relative Anteil des mutierten Kristallins am Gesamtprotein sowohl in der wasserlöslichen als auch -unlöslichen Fraktion von Linsenextrakten aus der jeweiligen Mutantenlinie drastisch reduziert bzw. nicht detektierbar. Zweitens war keine Akkumulation des mutierten Proteins in der HMW-Fraktion beobachtbar. Vielmehr entsprach die Proteinzusammensetzung der, wie sie auch in der HMW-Fraktion von Wildtyp-Mäusen vorkommt. Um diese Widersprüche zum „*Damage and Titration*“-Modell zu erklären, werden im Folgenden kurz zwei weitere, bereits existierende, Erklärungsansätze für die Kataraktentstehung vorgestellt und ein neues, globales Modell zur Kataraktgenese vorgeschlagen. Das vorgeschlagene Modell erlaubt es alle erhaltenen experimentellen Befunde einzubeziehen, was mit den bisherigen Modellen nicht möglich ist, und kann zudem auf alle Kataraktarten angewandt werden.

Eine grundlegende Voraussetzung für die Transparenz der Linse ist die glasartige kurzreichweitige Ordnung der Proteine in den Linsenfaserzellen (6). Neben der Ordnung der Kristalline *per se* ist auch die Partikelgröße und gleichmäßige Verteilung der Proteindichte entscheidend um eine möglichst hohe

Lichtdurchlässigkeit zu erreichen (195). Werden diese Parameter gestört, kann es zu einer Trübung der Augenlinse durch die Akkumulation von Kristallinen in der wasserunlöslichen Fraktion kommen. Es ist bislang aber noch unklar welche Struktur die entstehenden wasserunlöslichen Kristalline besitzen. Derzeit werden Aggregations- oder Phasentrennungsprozesse als Ursache für den Übergang der Proteine in die wasserunlösliche Fraktion diskutiert (88,196). Während das „*Damage and Titration*“-Modell von einer unspezifischen Aggregation ausgeht, nehmen die aufeinander aufbauenden Modelle von Slingsby *et al.* und Tardieu *et al.* eine Phasentrennung als Ursache der Kataraktgenese an.

In dem von Slingsby *et al.* vorgeschlagenen Modell dienen die α -Kristalline ebenfalls als Chaperone und verhindern die Proteinaggregation (197). Durch die Bindung von destabilisierten β - und γ -Kristallinen bleibt die Linse klar, aber nur solange die Größe der sHsp-Substratkomplexe unter einer bestimmten Grenze liegt. Die Grenzgröße von Proteinkomplexen über der Lichtstreuung auftritt, liegt bei etwa 50 MDa (80). Sind die Partikel größer, wird das einfallende Licht gestreut und die Linse erscheint trüb. Gleichzeitig dienen die polydispersen α -Kristalline aber auch dazu, eine Balance in den intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Kristalline einzustellen um eine lokale Phasentrennung zu verhindern (197). Die Modellvorstellung von Slingsby *et al.* begründet sich in diesem Punkt aus den Vorschlägen von Tardieu *et al.* (198). Hier wird von einer anziehenden Wechselwirkung zwischen den γ -Kristallinen und einer abstoßenden Interaktion zwischen β -Kristallinen ausgegangen (33). Nach der Vorstellung von Tardieu *et al.* sind die polydispersen α -Kristalline dafür wichtig, die Protein-Protein-Interaktionen zwischen den Kristallinen zu modulieren und so eine gleichmäßige Verteilung der Proteindichte und Partikelgröße für eine optimale Transparenz zu gewährleisten (27). Insbesondere die γ -Kristalline zeigen stark anziehende Wechselwirkungen zwischen einander und könnten durch lokale Phasentrennung eine Trübung der Linse hervorrufen (33,198). Eine schwache anziehende Wechselwirkung zwischen α - und γ -Kristallinen wurde, in Übereinstimmung mit der vorgeschlagenen modulierenden Funktion der α -Kristalline, bereits gezeigt und nimmt im Alter ab (36). Nach dem Modell von Tardieu *et al.* sind nicht große, lichtstreuende Aggregate, sondern räumliche nicht-uniforme Änderungen in der Proteindichte und -packung für die Entstehung von Katarakt verantwortlich. Diese Veränderungen bedingen wiederum einen nicht-uniformen Brechungsindex und damit eine Linsentrübung (195). Allerdings wird die Rolle der β -Kristalline von beiden Modellen nur unzureichend adressiert. Für Mischungen aus β B1- und γ D-Kristallin wurden zwar bereits theoretische und experimentelle Arbeiten zur Phasentrennung durchgeführt (199,200). So nimmt die Phasentrennungstemperatur für γ D-Kristallin signifikant bei Zugabe von β B1-Kristallin ab und eine starke Entmischung der Proteine tritt auf. Jedoch fehlen bisher noch Analysen zur Phasentrennung einer Mischung von α -, β - und γ -Kristallinen, obwohl diese bereits 2010 von Drosaz *et al.* in ihrer Wichtigkeit hervorgehoben wurde (201). Die experimentellen Beobachtungen aus 3.1.3 und 3.1.4 deuten aber darauf hin, dass die Mischung aller Kristalline entscheidend für die Linsentransparenz bzw. die Entstehung von Katarakt ist.

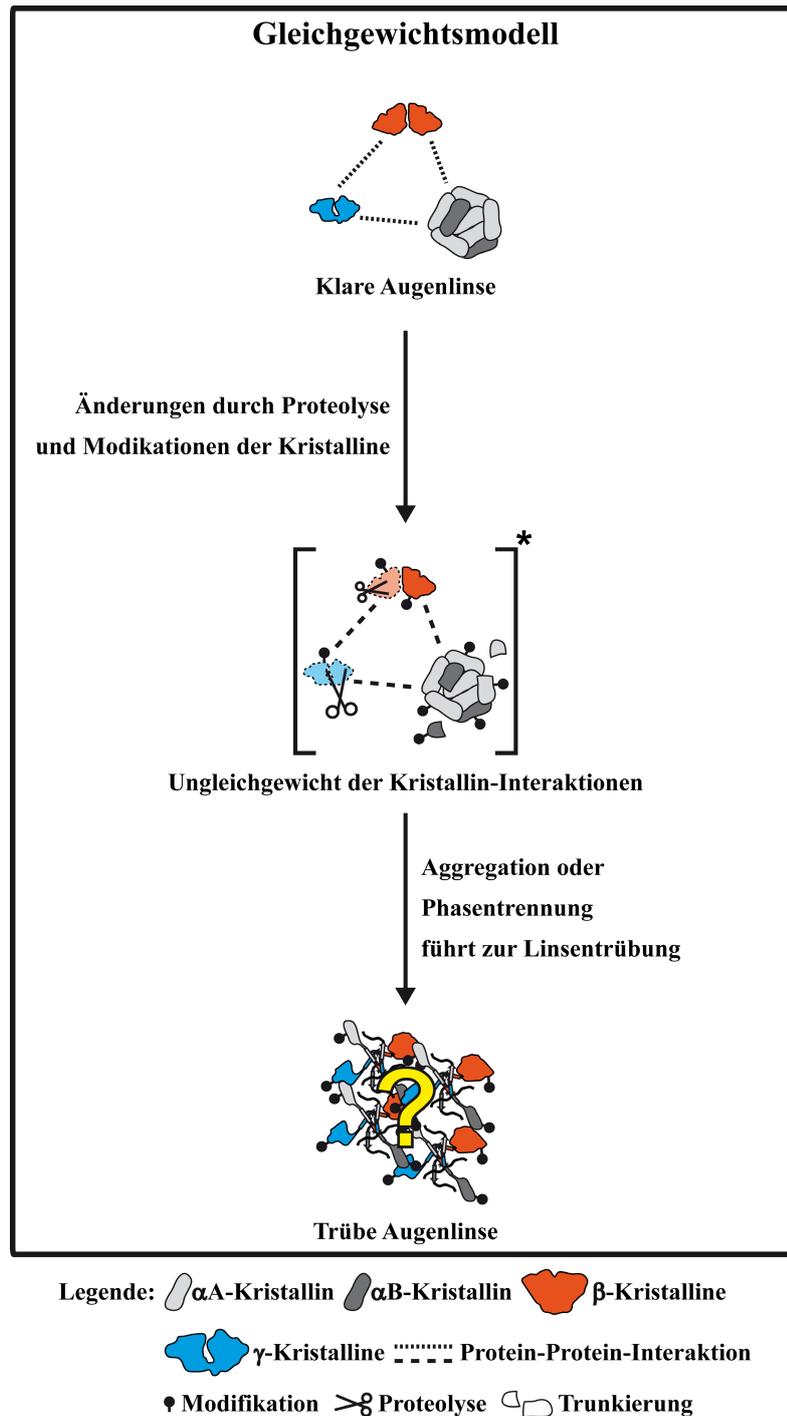


Abbildung 41: Alternatives Modell zur Entstehung von Katarakt. Das vorgeschlagene „Gleichgewichtsmodell“ geht davon aus, dass in der Augenlinse die intermolekularen Wechselwirkungen in einem Gleichgewicht stehen. Aufgrund von alterungsbedingten Änderungen im Proteom durch Proteolyse und Modifikationen der Kristalline, wie etwa durch Deamidierung, Phosphorylierung, Methylierung, Acetylierung, Carbamylierung, Racemisierung, Oxidation oder Trunkierungen, kommt es zu einer thermodynamischen Destabilisierung der Proteine (*) und Störungen in den ausgeglichenen Wechselwirkungen zwischen den Kristallinen. Am stärksten von Proteolyse sind die γ -Kristalline betroffen, während es nur zu geringem proteolytischen Abbau der β -Kristalline kommt. Bei den α -Kristallinen treten vor allem Trunkierungen auf. Wegen der extrem hohen Proteinkonzentration in der Augenlinse führt das Ungleichgewicht in den Kristallin-Interaktionen zur Phasentrennung oder Proteinaggregation. Die genauen Mechanismen der Bildung und die Struktur der lichtstreuenden Proteinkomplexe sind allerdings noch unbekannt. Bei senilem Katarakt entwickelt sich das Ungleichgewicht über einen längeren Zeitraum als bei erblichem Katarakt. Bei erblichem Katarakt ist das Proteom bereits bei der Geburt gestört und Veränderungen im Proteom sowie Modifikationen finden vermehrt statt.

Das Gleichgewichtsmodell versucht diese Lücken zu schließen, indem es die Linse gesamtheitlich betrachtet (Abbildung 41). Grundannahme ist, dass die Kristalline in einem Gleichgewicht von Protein-Protein-Interaktionen bei sehr hoher Konzentration in der Augenlinse vorliegen. Durch die natürlich vorkommende Mischung der Kristalline entsteht eine ausgewogene Wechselwirkung zwischen allen Isoformen. Alterungsbedingt kommt es, in Abwesenheit einer *de-novo*-Proteinsynthese in den Linsenfaserzellen, zu Modifikationen der Kristalline, die eine Destabilisierung der Proteine und eine Änderung in den Wechselwirkungen innerhalb des geschlossenen Systems verursachen können. Neben der Modifikation der Kristalline tritt während des Alterns auch der proteolytische Abbau von γ -Kristallinen und weniger stark von β -Kristallinen auf. Zusammen mit der destabilisierenden Wirkung der alterungsbedingten Modifikationen und dem Abbau der β/γ -Kristalline stellt sich ein Ungleichgewicht in den Kristallin-Interaktionen ein. Ist das Gleichgewicht über ein gewisses Maß hinaus gestört, kommt es zur Akkumulation der Kristalline in der wasserunlöslichen Fraktion und Entstehung von Katarakt. Bei senilem Katarakt findet die Einstellung des Ungleichgewichts über einen längeren Zeitraum als bei erblichem Katarakt statt. Bei erblichem Katarakt ist das Gleichgewicht bereits bei der Geburt verändert und die, experimentell beobachtete, stärkere Modifikation der Kristalline beschleunigt die Einstellung des Ungleichgewichts. Gestützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass, wie unter 4.1.3 erwähnt, die Zeit bis zur Trübung der Linse auch davon abhängt um welchen Anteil das mutierte Kristallin im Vergleich zur Wildtyp-Situation verringert ist. Je größer die Differenz, desto eher tritt Katarakt auf.

Anders als beim „*Damage and Titration*“-Modell ist die Rolle von α -Kristallin als molekulares Chaperon im „Gleichgewichtsmodell“ weniger wichtig. Nach dem „*Damage and Titration*“-Modell agieren die α -Kristalline als Chaperone und binden modifizierte, aggregationsanfällige β - und γ -Kristalline unter Ausbildung hochmolekularer Komplexe (HMW-Fraktion). Jedoch konnte das vermehrte Auftreten von β - und γ -Kristallinen in der HMW-Fraktion weder in Wildtyp-Mäusen noch den Kataraktmutanten bestätigt werden (4.1.1 und 4.1.3). Experimentelle Hinweise auf die Anwendbarkeit der Annahme, dass die Chaperonfunktion der α -Kristalline weniger wichtig ist als gedacht, finden sich bereits in der Literatur. So sind die α -Kristalline, die als Chaperone dienen sollen, die am wenigsten thermodynamisch stabilen Kristalline. Humanes α B-Kristallin besitzt eine freie Enthalpie (ΔG , Gibbs-Energie) von 21 kJ/mol, β B2-Kristallin hingegen ein ΔG von 49 kJ/mol und γ S-Kristallin ein ΔG von sogar 84 kJ/mol (14). Wird das Steroid Lanosterol zu α B-Kristallin R120G gegeben, wird die mutante Isoform zwar thermodynamisch destabilisiert, jedoch zeigt das Protein eine geringere Neigung amyloide Fibrillen zu bilden. Lanosterol kann die Proteinaggregation *in vitro* sogar umkehren und verbesserte die Linsentransparenz von Kataraktmäusen *in vivo* (202). In Zellkultur-experimenten konnte Lanosterol die Aggregation von Katarakt-assoziierten Kristallinvarianten reduzieren und verringerte die Schwere des Katarakts in Hunden (203). All diese Beobachtungen stehen in starkem Widerspruch zum „*Damage and Titration*“-Modell fügen sich aber sehr gut in das vorgestellte „Gleichgewichtsmodell“ ein, in dem Änderungen der Kristallin-Kristallin-Interaktionen

durch Modifikationen im Mittelpunkt der Kataraktentwicklung stehen. Zwar kann aus den vorliegenden Daten und auch aufgrund der Komplexität des Systems, mit 18 Kristallinisformen und einer Vielzahl von beobachteten Modifikationen, keine Aussage darüber gemacht werden, ab welchem Punkt ein Ungleichgewicht in den intermolekularen Kräften zwischen Kristallinen zu Katarakt führt. Dennoch ist das „Gleichgewichtsmodell“ auf alle Kataraktarten anwendbar. Neben dem senilen und erblichen Katarakt ist auch der diabetische Katarakt erklärbar. Bei diabetischem Katarakt werden die Kristalline stark durch Glykierung modifiziert (204). Vermutlich wird dadurch ebenfalls das Interaktionsgleichgewicht der Kristalline gestört und führt zu einer Linsentrübung. Das „Gleichgewichtsmodell“ bietet hier einen Ansatz zur Behandlung von diabetischem aber auch senilem oder erblichem Katarakt. Werden die Wechselwirkungen der Proteine in der Linse besser verstanden, könnten diese durch Therapeutika gezielt moduliert und so das Auftreten von Katarakt verhindert werden.

4.3 Die Dynamik der Substratbindung von α B-Kristallin

Zwar können α -Kristalline, wie auch andere kleine Hitzeschockproteine (sHsps), die Aggregation von Proteinen verhindern, diese aber nicht zurückfalten und werden daher als *Holdasen* bezeichnet (63). Die vorgeschlagene Funktion von sHsps ist es Substratproteine durch ihre *Holdase*-Aktivität in einem löslichen rückfaltungskompetenten Zustand zu halten. Für die eigentliche Rückfaltung von Substraten sind die sHsps auf die Zusammenarbeit mit den ATP-abhängigen *Foldasen*, wie dem Hsp70/40-System, angewiesen. Für humanes α B-Kristallin und Hsc70/40, sowie die homologen *E. coli* Proteine IbpAB und DnaK/DnaJ, konnte eine Zusammenarbeit zwischen den *Holdasen* und *Foldasen* bereits qualitativ gezeigt werden (64,65). In beiden Fällen können die sHsps die Aggregation eines Proteinsubstrates verhindern und bilden hochmolekulare aber lösliche sHsp-Substratkomplexe aus. Wird im Anschluss eine *Foldase* zugegeben, findet eine Herauslösung des Substrates aus dem sHsp-Substratkomplex und nachfolgende Rückfaltung durch die *Foldase* statt. Allerdings ist es noch unklar mit welchen Ratenkonstanten die Bindung von Substraten an α B-Kristallin und die Substratweitergabe an das Hsc70/40-System erfolgt.

4.3.1 Die unnatürliche Aminosäure pCNF dient als positionsspezifische FRET-Sonde in α B-Kristallin

Um die Zusammenarbeit zwischen den *Holdasen* und *Foldasen* auch quantitativ kinetisch beschreiben zu können, wurde die unnatürliche L-Aminosäure para-Cyanophenylalanin als positionsspezifische FRET-Sonde in α B-Kristallin durch Erweiterung des genetischen Codes (*Genetic Code Expansion*) von *E. coli* eingebaut. Der Einbau erfolgte an Position 9 in der N-terminalen Region (NTR) des Proteins. Die NTR war von besonderem Interesse, da diese als wichtiges Element von α B-Kristallin sowohl für die Regulation der Oligomergröße als auch für die Bindung von amorph-aggregierenden

Substraten beschrieben wurde (58,65). Der Einbau von pCNF in α B-Kristallin beeinflusste dabei weder die die Chaperonaktivität, noch die Oligomerverteilung oder die Geschwindigkeit des Untereinheitenaustausch zwischen den Oligomeren im Vergleich zum Wildtyp-Protein.

Die Inkorporation der unnatürlichen Aminosäure in α B-pCNF (aB-W9TAG, W60F) ermöglichte es erstmals die Bindung von Substraten kinetisch zu Verfolgen. Der Aufbau des Systems erlaubt zudem eine flexible Wahl des Substrats. Grundlage für die Verfolgung der Substratbindung an α B-Kristallin ist der strahlungslose Energieübertrag zwischen pCNF in α B-pCNF und Trp in Modellsubstraten. So konnte im Rahmen dieser Arbeit die Bindung der Modellsubstrate Lysozym und RCM- α -Lactalbumin an α B-pCNF fluoreszenzspektroskopisch verfolgt werden. Während die Bindung von reduziertem, denaturiertem Lysozym an α B-pCNF mit Handmischexperimenten aufgelöst werden kann, findet die Signaländerung bei Einsatz von RCM- α -Lactalbumin in der experimentellen Totzeit statt. Die Bindung von RCM- α -Lactalbumin an α B-pCNF war jedoch durch *stopped-flow*-Fluoreszenzspektroskopie verfolgbar. Die sich stark unterscheidenden Geschwindigkeit der Substratbindung könnte auf eine selektive Erkennung von Substraten oder unterschiedliche Affinität der Proteine zu α B-Kristallin hindeuten. Die resultierenden sHsp-Substratkomplexe aus α B-pCNF und Lysozym konnten durch analytische Ultrazentrifugation dargestellt werden und zeigten die Polydispersität des kleinen Hitzeschockproteins bei Anwesenheit von Substrat. So lag eine breite Verteilung von α B-Kristallin vom 2- bis zum 36-mer in Gegenwart von reduziertem, denaturiertem Lysozym vor. Mit RCM- α -Lactalbumin waren allerdings keine sHsp-Substratkomplexe mit α B-pCNF detektierbar. Vermutlich sedimentierten die Proteinkomplexe bereits vor dem Erreichen der Zentrifugationsgeschwindigkeit. Jedoch erwies sich RCM- α -Lactalbumin als geeignetes Substrat für die humane *Foldase* Hsc70*. So bildet, die in dieser Arbeit erarbeitete Variante, Hsc70* (Hsc70 W90,580F, 647G, 648C) Komplexe mit RCM- α -Lactalbumin aus. In Abwesenheit von ATP bildet Hsc70* stabile Chaperon-Substratkomplexe mit einer Mono-, Di- und Trimer-Verteilung der *Foldase*, mit je einem daran gebundenen Substratprotein. Liegt kein ATP vor, kann Hsc70* zwar Substrate binden, aber nicht seinen Funktionszyklus durchlaufen und bleibt im substratgebundenen Zustand gefangen (205). Durch Markierung eines eingefügten C-terminalen Cystein mit dem Fluoreszenzfarbstoff AEDANS wurde ein System entwickelt, das es erlaubt die Bindung von Trp-haltigen Substraten an Hsc70*-AEDANS zu verfolgen. Zusammen mit dem FRET-Paar pCNF-Trp, dient das FRET-Paar Trp-AEDANS als Grundlage eines Tripel-FRET-Systems um die Bindung von Substraten an α B-Kristallin und die Weitergabe des Substrats an Hsc70 zu untersuchen. Dadurch ist ein flexibler Einsatz von Modellsubstraten möglich, solange diese mindestens ein (natürlich vorkommendes) Tryptophan besitzen. Durch die Wahl der FRET-Paare des Systems, besteht prinzipiell auch Möglichkeit mit Atto488 eine vierte Fluoreszenzsonde einzuführen. Das Emissionsmaximum von AEDANS liegt bei etwa 490 nm und stimmt exakt mit dem Absorptionsmaximum von Atto488 überein. Das vorgestellte FRET-System kann somit auch als

Gundlage dienen das Hsp90-Chaperonsystem mit einzubeziehen. Eine Kooperation des Hsp70- mit dem Hsp90-System ist für bestimmte Substrate bereits bekannt (205). Dahingehend eignet sich das erarbeitete FRET-System als Basis für eine umfangreiche und detaillierte Beschreibung der Substratbindung der *Holdasen*, *Foldasen* sowie deren Kooperation untereinander.

4.3.2 Anwendbarkeit des Systems zur Untersuchung der Substratbindung von α B-Kristallin mit verschiedenen permanent entfalteteten Substraten

Mit den Modellsubstraten Lysozym und RCM- α -Lactalbumin konnte die prinzipielle Anwendbarkeit des (Tripel-) FRET-Systems gezeigt werden. Allerdings ergaben sich aus der Verwendung der zwei Modellsubstrate auch Nachteile, die die Interpretation der Messdaten limitieren. Im Falle von Lysozym musste dem Messpuffer bis zu 1,6 M Harnstoff zugesetzt werden um die Aggregation des Proteins bei einem stöchiometrischen Unterschuss von α B-pCNF zu verhindern. Zwar verhindert Harnstoff als chaotrope Verbindung die Aggregation von entfaltetem, reduziertem Lysozym, hat aber auch Einfluss auf die Oligomergröße von α -Kristallinen und damit auf die Affinität zu Substraten. Humanes α A-Kristallin zeigt im reduzierten Zustand einen Sedimentationskoeffizienten ($s_{(20,w)}$) von 14,3 S. Wird die Harnstoffkonzentration auf 1,5 M erhöht, sedimentiert das Protein mit 10,7 S und liegt ab einer Konzentration von 5 M Harnstoff vollständig entfaltet vor (unveröffentlichte Daten Philipp Schmid und Dr. rer. nat Christoph Kaiser, Professur für Elektronenmikroskopie, Technische Universität München, DEU). Ein Einfluss von Harnstoff auf die Oligomergröße und Substratbindeigenschaften von α B-pCNF kann daher nicht ausgeschlossen werden. Bei RCM- α -Lactalbumin konnte die Substratbindung zwar fluoreszenzspektroskopisch verfolgt werden, allerdings waren keine sHsp-Substratkomplexe mittels AUZ darstellbar. Ein möglicher Grund dafür könnte, wie unter 4.3.1 diskutiert, die Größe der entstehenden Komplexe sein. Um die sHsp-Substratkomplexe aus α B-pCNF und RCM- α -Lactalbumin darstellen zu können, kommen neben der Verringerung der Umdrehungsgeschwindigkeit bei der AUZ auch SEC-MALS-Messungen in Frage. Mit dieser Messtechnik können Proteinkomplexe von mehreren hundert kDa molekularer Masse chromatographisch mittels Absorptions- und Fluoreszenzdetektion bzw. Lichtstreuung untersucht werden.

Auch bieten sich, neben anderen Messmethoden, andere Substrate für α B-pCNF bzw. Hsc70* an. Die Carboxymethylierung der Thiolgruppen von Cysteinen ist nicht nur für Lactalbumin sondern auch für eine Reihe anderer Proteine möglich, um ein (teil-) entfaltetes aber lösliches Substrat zu erhalten. So wurde RCM-Lysozym erstmals 1963 von Canfield und Anfinsen beschrieben (206). Lysozym ist eines der im Allgemeinen, aber auch als Substrat für kleine Hitzeschockproteine, am besten charakterisiertesten Proteine (207). Als alternative Substrate eigneten sich auch RCM-BSA oder RCM- β -Lactoglobulin. Die beiden Proteine wurden bereits von Mifflin und Cohen in Experimenten zur Induktion der sHsp-Expression bei der Stressantwort in *Xenopus laevis* Oocyten eingesetzt (208). Um Ladungseffekte durch die Carboxymethylierung auszuschließen, ließen sich

carboxyamino-methylierte Proteine einsetzen. Ein geeignetes Substrat für die Untersuchung der Oligomerdissoziation von α B-pCNF in Anwesenheit von Substrat wäre RCM-RNase A. Pankreatische RNase A aus Rind besitzt kein Tryptophan und kann wie auch RNase T1 nach Carboxymethylierung der freien Thiole bei moderater Salzkonzentration in Lösung gehalten werden (209,210). RNase T1 nimmt dabei eine dem nativen Zustand ähnliche Faltung ein und könnte so als destabilisiertes Substrat für α B-Kristallin verwendet werden. Alternativ dazu kann auch Histon H1 eingesetzt werden. Humanes Histon H1 (UniProt-ID: P07305-1) besitzt ebenfalls keine Tryptophane und ist intrinsisch unstrukturiert (211). Wird eines der vorgeschlagenen Trp-freien Substrate zu einer Mischung aus α B-wt (W9,60) und α B-pCNF (W9TAG,W60F) zugegeben, kann die Oligomerdissoziation durch die Änderung des FRET-Signals spektroskopisch verfolgt werden. Durch Einfügen eines Tryptophans in das Proteinsubstrat mittels Mutation, kann das System zur Untersuchung der Substratbindung von α B-pCNF verwendet werden. Die hohe Zahl an möglichen Substraten unterstreicht die Flexibilität und Vielfältigkeit des vorgestellten FRET-Systems aus pCNF in α B-Kristallin und Trp in Substraten für die Untersuchung des Substratbindemechanismus des kleinen Hitzeschockproteins.

5 Zusammenfassung

Grauer Star (Katarakt) ist die weltweit häufigste Ursache für Erblindung. Während die Behandlung von Katarakt, durch Austausch der natürlichen Linse mit einer Künstlichen, ein Routineeingriff ist, sind die molekularen Ursachen der Kataraktentstehung nur lückenhaft verstanden. Um die zur Trübung der Augenlinse führenden Vorgänge besser zu beschreiben, wurden im Rahmen dieser Arbeit biochemische Analysen des Linsenproteoms von Wildtyp-Mäusen und Mausmutanten, sowie Experimente mit rekombinanten Katarakt-assoziierten Proteinen durchgeführt.

Das Proteom von Linsenfaserzellen in Mäusen besteht zu über 90 % aus Kristallinen, die sich in die drei Proteinfamilien α -, β - und γ -Kristalline mit insgesamt 18 Isoformen unterteilen und maßgeblich die optischen Eigenschaften der Linse bedingen. Die α -Kristalline gehören zu den kleinen Hitzeschockproteinen (sHsps), die β - und γ -Kristalline zur β/γ -Kristallinsuperfamilie. Da in der Augenlinse keine *de-novo*-Proteinsynthese stattfindet, unterliegen die Kristalline altersbedingten Modifikationen, die die thermodynamische Stabilität und Löslichkeit beeinflussen. Diese Modifikationen schließen die enzymatische und nicht-enzymatische kovalente Verknüpfung von Molekülen, Trunkierungen aber auch Proteolyse mit ein. Nach dem derzeitigen „*Damage and Titration*“-Modell zur Kataraktentstehung dienen die polydispersen α -Kristalline als Chaperone und verhindern die Aggregation von modifizierten, destabilisierten β - und γ -Kristallinen. Bei der Bindung entstehen hochmolekulare sHsp-Substratkomplexe (HMW-Fraktion) durch die, die Proteine in Lösung gehalten werden. Aufgrund dieser Vorgänge kommt es aber gleichzeitig zu einer Beanspruchung des Chaperonreservoirs an α -Kristallinen. Ist das Reservoir im Alter erschöpft, kann die Aggregation von Proteinen nicht mehr verhindert werden und es bilden sich große, lichtstreuende Aggregate, die eine Trübung der Linse (seniler Katarakt) hervorrufen. Dementsprechend nimmt in der Augenlinse der Proteinanteil in der wasserlöslichen Fraktion ab und im gleichen Maße in der wasserunlöslichen Fraktion zu.

Die α -Kristalline aus Linsenextrakten werden häufig auch als α L-Fraktion bezeichnet und bestehen aus einer heterooligomeren Mischung der Isoformen α A- und α B-Kristallin. Um die Bindung von Substraten an α B-Kristallin zu untersuchen, wurde in einem Teil dieser Arbeit ein FRET-System erarbeitet, das auf der Inkorporation der fluoreszierenden unnatürlichen Aminosäure para-Cyanophenylalanin (pCNF) durch *Genetic Code Expansion* von *E. coli* basiert. Anders als α A-Kristallin, kommt α B-Kristallin auch außerhalb der Augenlinse vor und bindet auch hier aggregationsanfällige Proteine. Durch die Inkorporation von pCNF war es möglich die Bindung von Substraten an α B-Kristallin erstmals spektroskopisch zu verfolgen. Die Bindung von Modellsubstraten erfolgt im Milli- bis Sekundenbereich und kann durch den FRET-Übertrag zwischen pCNF in α B-Kristallin und Trp-Resten im Binderpartner detektiert werden. Die Bindung induziert dabei die Bildung stabiler, hochmolekularer sHsp-Substratkomplexe. Neben den großen sHsp-Substratkomplexen sind bei einem stöchiometrischen Überschuss an α B-Kristallin auch kleinere Spezies des

Proteins mittels analytischer Ultrazentrifugation darstellbar. Die niedermolekularen Spezies von α B-Kristallin, im Bereich eines Dimers bis 6-mers, gelten als chaperonaktive Form, die nach Bindung von Substrat zu den hochmolekularen sHsp-Substratkomplexen assemblieren. Durch den Aufbau des FRET-Systems konnte auch die *Foldase* Hsc70 miteinbezogen werden. Die sHsps (*Holdasen*) könnten aggregationsanfällige Proteine in Lösung halten, besitzen aber keine Rückfaltungsaktivität und sind daher für die Renaturierung von Substraten auf die ATP-abhängigen *Foldasen* angewiesen. Die eingesetzte Hsc70*-Variante ist Trp-frei und besitzt ein eingefügtes C-terminales Cystein, an das der Fluoreszenzfarbstoff AEDANS kovalent gekoppelt werden kann. Hsc70* bildet in der Abwesenheit von ATP ebenfalls stabile Komplexe mit Modellsubstraten. Die etablierten FRET-Paare pCNF-Trp und Trp-AEDANS können somit die Basis für eine detaillierte Beschreibung der Substratbindung der *Holdasen* und *Foldasen*, sowie deren Kooperation bilden. Neben der Substratbindung von α B-Kristallin, wurden zum besseren Verständnis der Kataraktgenese natürlich auftretende Alterungsvorgänge im Proteom von Wildtyp-Mäusen sowie Kataraktmutanten mittels gelelektrophoretischer und chromatographischer Methoden untersucht. Im Alter kommt es zu einer Modifikation von allen Kristallinisoformen. Insbesondere die α -Kristalline werden modifiziert und treten vermehrt in der wasserunlöslichen Fraktion auf. Allerdings sind die wasserlösliche und -unlösliche Fraktion sehr ähnlich in ihrer Proteinzusammensetzung wenn nur die Identität der Proteine, ohne eventuelle Modifikationen, betrachtet wird. Neben Modifikationen der Kristalline kommt es insbesondere zu einem vollständigen proteolytischen Abbau der γ -Kristalline, vor allem der Isoform γ A-Kristallin. Anders als vom „*Damage and Titration*“-Modell vorhergesagt, konnte keine Akkumulation von β - und γ -Kristallinen in der HMW-Fraktion beobachtet werden. Zwar bestand ein Unterschied in der apparenten Partikelgröße von Proteinen in der HMW- und α L-Fraktion, jedoch setzten sich beide Fraktionen fast nur aus α -Kristallinen zusammen. Da Wildtyp-Mäuse aber keine klinisch signifikante Linsentrübung entwickeln, wurden Kataraktmutanten untersucht bei denen eine vollständige Trübung der Linse innerhalb weniger Lebensmonate auftritt. Die untersuchten Mutationen betrafen dabei die Gene von Isoformen aus allen drei Kristallinfamilien. Anders als bei senilem Katarakt, geht das „*Damage and Titration*“-Modell bei erblichem Katarakt von einer Überlastung des Chaperonsystems durch die Aggregation des mutierten Kristallins in jungem Alter aus. Um den beobachteten Phänotyp möglicherweise durch die *in vitro* Eigenschaften der Katarakt-assoziierten Kristallinvarianten voraussagen zu können, wurden zunächst Experimente mit rekombinanten Proteinen durchgeführt. Bei der Charakterisierung der Katarakt-assoziierten Varianten α A-V124E, β A2-S47P und γ D-V76D zeigte sich in Übereinstimmung mit dem „*Damage and Titration*“-Modell, dass alle Proteine drastisch in ihrer Stabilität durch die Punktmutation beeinflusst waren. Neben einem deutlich geringeren Schmelzpunkt, waren die Katarakt-assoziierten Varianten auch empfindlicher gegenüber dem enzymatischen Abbau durch Proteasen. Bei α A-V124E war zudem die apparente molekulare Masse des Oligomers deutlich erhöht und das sHsp zeigte eine signifikant niedrigere Chaperonaktivität als das Wildtyp-Protein. Bei der Untersuchung des Proteoms der

Kataraktmutanten waren ebenfalls Modifikationen aller Kristalline zu beobachten. Anders als in Wildtyp-Mäusen traten diese jedoch häufiger auf und es fand ein stärkerer proteolytischer Abbau der γ -Kristalline während des Alterns statt. Anders als erwartet ergaben sich bei den Untersuchungen des Proteoms von Kataraktmutanten Ergebnisse, die nicht mit der derzeitigen Modellvorstellung vereinbar sind. So war der Anteil an mutiertem Kristallin in allen drei charakterisierten Kataraktmauslinien: Aey7 (α A-V124E), Aca30 (β A2-S47P) und Aey4 (γ D-V76D) signifikant gegenüber den nicht-mutierten, analogen Proteinen in Wildtyp-Mäusen reduziert und lag im Falle von β A2-S47P unterhalb der Detektionsgrenze von 2-DE. Der Anteil des mutierten Kristallins war sowohl in der wasserlöslichen, als auch in der wasserunlöslichen Fraktion in jedem Alter reduziert bzw. nicht detektierbar. Auch konnte keine Häufung des mutierten Kristallins in der HMW-Fraktion beobachtet werden. Unerwarteterweise, waren die HMW- und α L-Fraktion, wie auch in Wildtyp-Mäusen, in ihrer Proteinzusammensetzung vergleichbar. Bei den Kataraktmutanten wäre nach dem „*Damage and Titration*“-Modell jedoch eine Akkumulation des mutierten Kristallins zu erwarten gewesen. Vielmehr führten die Mutationen zu einer stärkeren Modifikation der Kristalline und zu einem apparenten Ungleichgewicht im Linsenproteom der Kataraktmutanten. Auf Grundlage der experimentellen Daten wurde ein neues Modell zur Entstehung von Katarakt erarbeitet, das sich klar gegen das „*Damage and Titration*“-Modell und andere existierende Alternativen abgrenzt. In dem in dieser Arbeit vorgeschlagenen „Gleichgewichtsmodell“ bilden die Kristalline in der Augenlinse ein Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk. Neben langweitreichenden Wechselwirkungen spielen in der Augenlinse, aufgrund der sehr hohen Proteinkonzentration, auch kurzweitreichende Kräfte eine Rolle für den korrekten Brechungsindex. Durch alterungsbedingte Modifikationen und den proteolytischen Abbau von Kristallinen kommt es zu veränderten Wechselwirkungen, die bis zu einem bestimmten Punkt jedoch noch toleriert werden können. Ist dies im weiteren Verlauf des Alterungsprozesses nicht mehr der Fall, gehen die Kristalline in die wasserunlösliche Fraktion über und seniler Katarakt tritt auf. Bei genetischem Katarakt ist das Gleichgewicht bereits bei der Geburt gestört und es verkürzt sich die Zeit bis zur Einstellung des Ungleichgewichts. Offenbar reichen schon geringe Störungen im Proteom aus, um einen Einfluss auf die Wechselwirkungen zwischen den Kristallinen zu nehmen. Fehlen wie im Falle von Aca30 nur etwa 2 % eines Kristallins wirkt sich dies bereits auf das Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk aus und induziert eine Kompaktierung in der räumlichen Packung der Kristalline in der intakten Linse. Sofern es möglich ist die Wechselwirkungen zwischen den Kristallinen besser zu beschreiben, könnten diese gezielt durch Therapeutika moduliert werden um das Gleichgewicht beizubehalten und so die Bildung von Katarakt zu verhindern. Zwar konnte im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der Komplexität des Systems nicht endgültig geklärt werden, welche zwischenmolekularen Kräfte ab welchem Ungleichgewichtsgrad die Kataraktgenese begünstigen, dennoch ist es mit dem „Gleichgewichtsmodell“ möglich alle bekannten Kataraktarten zu beschreiben und die Vielzahl an Katarakt-assoziierten Mutationen und Modifikationen auf den kleinsten gemeinsamen Nenner zu reduzieren: die Destabilisierung des Protein-Protein-Interaktionsnetzwerks in der Augenlinse.

6 Summary

Cataract is the clouding of the eye lens and the leading cause of blindness worldwide. While the treatment of cataract, by replacing the natural lens with an artificial one, is surgical routine, the molecular determinants of cataract are still not fully understood. To improve our understanding, the processes involved in cataract formation on a molecular level and the lens proteome of wild-type and cataract mice was studied. Together with data from biochemical experiments with recombinant protein, new insights could be gained on the driving factor behind cataractogenesis.

Crystallins, which constitute about 90 % of proteome in murine lens fiber cells and are mainly responsible for the refractive index of the eye lens. These proteins are divided into three protein families: α -, β - and γ -crystallins and subdivided into a total of 18 isoforms. While the α -crystallins belong to the small heat shock proteins (sHsps), the β - and γ -crystallins are members of the β/γ -crystallin superfamily. Due to the lack of any *de novo* protein synthesis, the crystallins are as old as the organism and subject to modifications during aging. These modifications include a variety of processes, such as non-specific and specific covalent addition of molecules and truncations but are all known to thermodynamically destabilize and reduce the solubility of the proteins. According to the current 'damage and titration' model on cataract formation, the polydisperse α -crystallins serve as chaperones and prevent the aggregation of modified, destabilized β - and γ -crystallins. The substrate binding by the α -crystallins leads to the formation of large high molecular sHsp-substrate complexes (HMW fraction), which keep the proteins in solution. As a consequence of these processes, there is a concurrent depletion of the available α -crystallin chaperone reservoir. The α -crystallins from lens extracts are also referred to as α L fraction and consist of a heterooligomeric mixture of α A- and α B-crystallin. Once the chaperone reservoir is exhausted at old age, large light-scattering aggregates form and cause the clouding of the eye lens, commonly known as senile cataract. Accordingly, the water-soluble protein fraction in the eye lens decreases as the water-insoluble part increases inversely during aging.

To study the substrate binding of α B-crystallin, a FRET system, which is based on the incorporation of the fluorescent amino acid para-cyanophenylalanine (pCNF) by genetic code expansion of *E. coli*, was developed. Other than α A-crystallin, α B-crystallin can be found ubiquitously outside the eye lens and as there well binds aggregation-prone proteins. Through the incorporation of pCNF, it was possible for the first time to spectroscopically follow the binding of substrates to α B-crystallin. Substrate binding occurs on a milliseconds to seconds scale and can be visualized by the FRET between pCNF in α B-crystallin and Trp residues in binding partners. Upon binding stable high molecular sHsp-substrate complexes are formed. At a stoichiometric excess of α B-crystallin, smaller species are detectable besides the large sHsp-substrate complexes by analytical ultracentrifugation. The lower molecular species of α B-crystallin, in the range of a dimer to 6-mer, are considered to be chaperone active form and in a substrate-bound state assemble to the larger sHsp-substrate complexes.

Summary

Based on the design of the FRET system, the foldase Hsc70 could be included. Unlike the foldases, the sHsps (holdases) do not possess refolding activity and thus rely on ATP-dependent chaperones for the renaturation of substrates. The used Hsc70* variant is Trp free and contains a C-terminally introduced Cysteine, which allows the covalent coupling of the fluorescent dye AEDANS. Like α B-crystallin, Hsc70* forms stable substrate complexes with model substrates in the absence of ATP. The established FRET pairs pCNF-Trp and Trp-AEDANS may serve as the basis for an in-depth description of the substrate binding of holdases and foldases, as well as their cooperation.

Besides the substrate binding of α B-crystallin, naturally occurring aging processes in the proteome of wild-type and cataract mice were studied by electrophoretic and chromatographic means to improve our understanding of cataract formation. During aging all crystallin isoforms, but especially the α -crystallins, become modified and show an increased abundance in the water-insoluble fraction. However, the protein composition of the water-soluble and -insoluble fraction is very similar, if only the identity of the proteins, but not possible modifications are considered. Besides modifications, a full proteolytic degradation of γ -crystallins, particularly γ A-crystallin was observed. Unlike predicted by the 'damage and titration' model there was no observable accumulation of β - or γ -crystallins in the HMW fraction. Despite differences in the apparent particle size of proteins in the two fractions, they consisted almost exclusively of α -crystallins. Since wild-type mice do not develop a clinically significant opacity of the eye lens, cataract mice were used. These mice show an almost complete lens opacification after a few months. Mutations in these mice include the genes of isoforms from all three crystallin families. For hereditary cataract the 'damage and titration' model assumes an overload of the chaperone system due to the aggregation of the mutated protein already at young age. To potentially predict the phenotype by the *in vitro* properties of cataract-associated protein variants, experiments with recombinant crystallins were carried out. In good agreement with the current model, all cataract-associated variants α A-V124E, β A2-S47P and γ D-V76D were strongly destabilized by the point mutation. The stability against thermal denaturation was decreased and the protein variants were more susceptible to protease degradation. For α A-V124E the apparent molecular mass of the oligomer was increased and the chaperone activity decreased, as compared to the wild-type protein.

Comparable to lens extracts from wild-type mice, an increase in modified crystallins at older age could be observed. However, the modifications showed a higher abundance and were accompanied by a more quantitative degradation of γ -crystallins in mutant mice. Unexpectedly, not all data was compatible with the current model of cataractogenesis. The proportion of mutant protein was significantly reduced in all three used cataract mouse strains Aey7 (α A-V124E), Aca30 (β A2-S47P) and Aey4 (γ D-V76D), when compared to the wild-type situation. In the case of Aca30 mice, no β A2-S47P was detectable by 2-DE. These observations were true for the water-soluble and -insoluble fraction at all ages. Moreover, there was no accumulation of the mutant crystallin in the HMW fraction. Surprisingly, as observed with wild-type mice, the HMW and α L fraction were in fact very similar in their protein composition. According to the current 'damage and titration' model an

accumulation of the mutant crystallin would have been expected. Rather, the mutations led to an increase in crystallin modifications and caused an apparent imbalance in the eye lens proteome of the cataract mice.

To account for these observations, a new model for cataract is proposed. The ‘balance model’ is distinct from the ‘damage and titration’ model and other alternative models of cataractogenesis. In this model the crystallins in the eye lens constitute a protein-protein interaction network, which is key to lens transparency. Besides long-range interactions, short-range forces are also important at the high protein concentration found in the eye lens and responsible for the refractive index. Due to age-related modifications and the proteolytic degradation interactions between the crystallins are altered to a certain extent. If these alterations cannot be tolerated any more at old age, senile cataract occurs and the proteins accumulate in the insoluble fraction. In the case of hereditary cataract, the balance is already perturbed at birth and the timespan until an imbalance is reached decreases. Obviously, a marginal lack of 2 % of a crystallin is already enough to impact the protein-protein interaction network. In Aca30 this was sufficient to change the long-range order of the crystallins to a tighter packing even in the still clear mutant eye lens. However, caused on the complexity of the interaction network, it remains unclear which intermolecular forces at which degree of imbalance promote cataractogenesis. If the interactions between the crystallins in the eye lens can be better described, it will open up new therapeutical avenues to modulate protein-protein interactions in order to keep the balance in the eye lens and thus prevent cataract formation. Nonetheless, the herein proposed ‘balance model’ offers a unifying framework to describe all known types of cataract and reduce the plethora of cataract-associated mutations as well as observed modifications to the least common denominator: the destabilization of the protein-protein interaction network in the eye lens.

7 Abkürzungsverzeichnis

2-DE	zweidimensionale Gelelektrophorese
α A-V124E	murines α A-Kristallin mit der Substitution V124E
α A-wt	murines Wildtyp- α A-Kristallin mit natürlich vorkommender Aminosäuresequenz
α B-3E	humanes α B-Kristallin mit der Substitution S19,45,59E
α B-pCNF	humanes α B-Kristallin mit der Substitution W9TAG, W60F
α B-wt	murines Wildtyp- α B-Kristallin mit natürlich vorkommender Aminosäuresequenz
AS	Aminosäure
AUZ	analytische Ultrazentrifugation
β A2-S47P	murines β A2-Kristallin mit der Substitution S47P
β A2-wt	murines Wildtyp- β A2-Kristallin mit natürlich vorkommender Aminosäuresequenz
BSA	bovines Serumalbumin
Cam	Chloramphenicol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes H ₂ O (Leitfähigkeit < 0,1 μ S/cm)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSF	<i>Differential-Scanning-Fluorimetrie</i>
EM	Elektronenmikroskopie
ϵ_{nm}	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient bei gegebener Wellenlänge (nm)
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
GdmCl	Guanidiniumchlorid
γ D-V76D	murines γ D-Kristallin mit der Substitution V76D
γ D-wt	murines Wildtyp- γ D-Kristallin mit natürlich vorkommender Aminosäuresequenz
HMW	hochmolekulare Fraktion von Linsenextrakten

	<i>(high molecular weight fraction)</i>
Hsc70*	humanes Hsc70 mit der Substitution W90,580F, 647G, 648C
Hsc70-wt	humanes Wildtyp-Hsc70 mit natürlich vorkommender Aminosäuresequenz
IEF	isoelektrische Fokussierung
IPG	immobilisierter pH-Gradient
Kan	Kanamycin
K_D	Dissoziationskonstante
MDH	Mitochondriale L-Malatdehydrogenase aus Schweineherz
mo.	Monat
NT	Nukleotid
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PBS	Dulbecco's <i>Phosphate Buffered Saline</i> (212)
pCNF	para-Cyanophenylalanin
PCR	Polymerasekettenreaktion <i>(polymerase chain reaction)</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RCM- α -Lactalbumin	reduziert, carboxymethyliertes α -Lactalbumin
SAXS	Kleinwinkel-Röntgenstreuung <i>(small-angle X-ray scattering)</i>
SDS-PAGE	kontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese <i>(sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)</i>
SEC-HPLC	Größenausschluss-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie <i>(size-exclusion high-performance liquid chromatography)</i>
SEC-MALS	Größenausschlusschromatographie gekoppelt mit Mehrwinkellichtstreuung <i>(size-exclusion chromatography with multi-angle light scattering)</i>
sHsp(s)	kleine Hitzeschockprotein(e) <i>(small heat shock protein(s))</i>
SLIC	Sequenz- und Ligations-unabhängiges Klonieren <i>(Sequence- and ligation-independent cloning)</i>
S _N 1	bimolekulare nukleophile Substitutionsreaktion nach dem S _N 1-Mechanismus

Abkürzungsverzeichnis

Spc	Spectinomycin
Str	Streptomycin
SUMO	<i>small ubiquitin like modifier</i>
Tet	Tetracyclin
T_M	Mittelpunkt des thermischen Entfaltungsübergangs
U	<i>Unit</i> (Enzymmenge, die unter Standardbedingungen einen Umsatz von 1 μmol Substrat pro min erzeugt)
Ulp1	<i>Ubiquitin-like-specific protease 1</i> aus <i>S. cerevisiae</i>
v/v	Volumen / Volumen
w/v	Gewicht / Volumen
WT	Wildtyp (Protein mit unveränderter Aminosäuresequenz oder Mausstamm ohne Mutation in einem Kristallinen)
ΔC_p	Wärmekapazitätsänderung während der Entfaltung eines Proteins bei konstantem Druck
ΔG	Gibbs-Energie, freie Enthalpie der Faltung

Aminosäuren wurden mit dem gebräuchlichen Ein- oder Drei-Buchstabencode abgekürzt.

8 Literaturverzeichnis

1. Lam, D., Rao, S. K., *et al.* (2015) Cataract. *Nat. Rev. Dis. Primers* **1**, 15014
2. Keil, G. (2014) „blutken - bloedekijn“. Anmerkungen zur Ätiologie der Hyposphagma-Genese im "Pommersfelder schlesischen Augenbüchlein" (1. Drittel des 15. Jahrhunderts), mit einer Übersicht über die augenheilkundlichen Texte des deutschen Mittelalters, erschienen in: Fachprosaforchung - Grenzüberschreitungen, Band 8/9, 2012/2013. *Deutscher Wissenschafts-Verlag, Kappelrodeck, ISBN-10: 3868880771, ISBN-13: 9783868880779*, 14, Anm. 70.
3. Davis, G. (2016) The Evolution of Cataract Surgery. *Mo. Med.* **113**, 58-62
4. Mörner, C. T. (1894) Untersuchungen der Proteinsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges. *Z. Physiol. Chem.* **18**, 61-106
5. Cvekl, A., McGreal, R., *et al.* (2015) Lens Development and Crystallin Gene Expression. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **134**, 129-167
6. Bassnett, S., Shi, Y., *et al.* (2011) Biological glass: structural determinants of eye lens transparency. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **366**, 1250-1264
7. Graw, J. (2004) Congenital hereditary cataracts. *Int. J. Dev. Biol.* **48**, 1031-1044
8. Wride, M. A. (2011) Lens fibre cell differentiation and organelle loss: many paths lead to clarity. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **366**, 1219-1233
9. Cvekl, A., und Ashery-Padan, R. (2014) The cellular and molecular mechanisms of vertebrate lens development. *Development* **141**, 4432-4447
10. Graw, J. (2008) Modelle zur Entwicklungsgenetik des Auges: Mausmutanten mit angeborenen Augenerkrankungen, erschienen in: Faszination Lebenswissenschaften. *Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, ISBN-10: 3527305831, ISBN-13: 9783527305834*, 95-109
11. Jaffe, N., und Horwitz, J. (1992) Textbook of Ophthalmology v3 - Lens and cataract. *Gower Medical Publishing, ISBN-10: 1563750694, ISBN-13: 9781563750694*, 1.2-8.14
12. Graw, J. (2009) Genetics of crystallins: cataract and beyond. *Exp. Eye Res.* **88**, 173-189
13. Duncan, M. K., Cvekl, A., *et al.* (2004) Lens Crystallins, erschienen in: Development of the Ocular Lens. *Cambridge University Press, Cambridge, ISBN-10: 0521838193, ISBN-13: 9780521838191*, 119-150
14. Bloemendal, H., de Jong, W., *et al.* (2004) Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **86**, 407-485
15. Sharma, K. K., und Santhoshkumar, P. (2009) Lens aging: effects of crystallins. *Biochim. Biophys. Acta* **1790**, 1095-1108
16. Wistow, G. (2012) The human crystallin gene families. *Hum. Genomics* **6**
17. Lampi, K. J., Shih, M., *et al.* (2002) Lens proteomics: analysis of rat crystallin sequences and two-dimensional electrophoresis map. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 216-224
18. Ueda, Y., Duncan, M. K., *et al.* (2002) Lens proteomics: the accumulation of crystallin modifications in the mouse lens with age. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 205-215
19. Dereeper, A., Guignon, V., *et al.* (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* **36**, W465-469

20. Norledge, B. V., Trinkl, S., *et al.* (1997) The X-ray structure of a mutant eye lens β B2-crystallin with truncated sequence extensions. *Protein Sci.* **6**, 1612-1620
21. Vendra, V. P., Khan, I., *et al.* (2016) Gamma crystallins of the human eye lens. *Biochim. Biophys. Acta* **1860**, 333-343
22. Slingsby, C., und Bateman, O. A. (1990) Quaternary interactions in eye lens β -crystallins: basic and acidic subunits of β -crystallins favor heterologous association. *Biochemistry* **29**, 6592-6599
23. Braun, N., Zacharias, M., *et al.* (2011) Multiple molecular architectures of the eye lens chaperone α B-crystallin elucidated by a triple hybrid approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 20491-20496
24. Bova, M. P., Mchaourab, H. S., *et al.* (2000) Subunit exchange of small heat shock proteins. Analysis of oligomer formation of α A-crystallin and Hsp27 by fluorescence resonance energy transfer and site-directed truncations. *J. Biol. Chem.* **275**, 1035-1042
25. Spector, A., Freund, T., *et al.* (1971) Age-dependent changes in the structure of alpha crystallin. *Invest. Ophthalmol.* **10**, 677-686
26. Horwitz, J. (1992) α -crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 10449-10453
27. Tardieu, A. (1998) α -Crystallin quaternary structure and interactive properties control eye lens transparency. *Int. J. Biol. Macromol.* **22**, 211-217
28. Horwitz, J., Bova, M. P., *et al.* (1999) Lens α -crystallin: function and structure. *Eye (Lond)* **13** (Pt 3b), 403-408
29. Makley, L. N., McMenimen, K. A., *et al.* (2015) Pharmacological chaperone for alpha-crystallin partially restores transparency in cataract models. *Science* **350**, 674-677
30. Delaye, M., und Tardieu, A. (1983) Short-range order of crystallin proteins accounts for eye lens transparency. *Nature* **302**, 415-417
31. Leveille, P. J., Weindruch, R., *et al.* (1984) Dietary restriction retards age-related loss of gamma crystallins in the mouse lens. *Science* **224**, 1247-1249
32. Rudolph, R., Siebendritt, R., *et al.* (1990) Folding of an all-beta protein: independent domain folding in γ II-crystallin from calf eye lens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 4625-4629
33. Tardieu, A., Veretout, F., *et al.* (1992) Protein interactions in the calf eye lens: interactions between β -crystallins are repulsive whereas in γ -crystallins they are attractive. *Eur. Biophys. J.* **21**, 1-12
34. Trinkl, S., Glockshuber, R., *et al.* (1994) Dimerization of β B2-crystallin: the role of the linker peptide and the N- and C-terminal extensions. *Protein Sci.* **3**, 1392-1400
35. Norledge, B. V., Mayr, E. M., *et al.* (1996) The X-ray structures of two mutant crystallin domains shed light on the evolution of multi-domain proteins. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 267-274
36. Takemoto, L. J., und Ponce, A. A. (2006) Decreased association of aged alpha crystallins with gamma crystallins. *Exp. Eye Res.* **83**, 793-797
37. Das, P., King, J. A., *et al.* (2011) Aggregation of γ -crystallins associated with human cataracts via domain swapping at the C-terminal beta-strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 10514-10519

38. Cai, J., Townsend, J. P., *et al.* (2017) Eye patches: Protein assembly of index-gradient squid lenses. *Science* **357**, 564-569
39. Horwitz, J. (2003) Alpha-crystallin. *Exp. Eye Res.* **76**, 145-153
40. de Jong, W. W., Caspers, G. J., *et al.* (1998) Genealogy of the alpha-crystallin--small heat-shock protein superfamily. *Int. J. Biol. Macromol.* **22**, 151-162
41. McGreal, R. S., Kantorow, W. L., *et al.* (2012) α B-crystallin/sHSP protects cytochrome c and mitochondrial function against oxidative stress in lens and retinal cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1820**, 921-930
42. Kamradt, M. C., Chen, F., *et al.* (2001) The small heat shock protein α B-crystallin negatively regulates cytochrome c- and caspase-8-dependent activation of caspase-3 by inhibiting its autoproteolytic maturation. *J. Biol. Chem.* **276**, 16059-16063
43. Kamradt, M. C., Chen, F., *et al.* (2002) The small heat shock protein α B-crystallin negatively regulates apoptosis during myogenic differentiation by inhibiting caspase-3 activation. *J. Biol. Chem.* **277**, 38731-38736
44. Ryazantsev, S. N., Poliansky, N. B., *et al.* (2018) 3D structure of the native α -crystallin from bovine eye lens. *Int. J. Biol. Macromol.* **117**, 1289-1298
45. Srinivas, P., Narahari, A., *et al.* (2010) Importance of eye lens α -crystallin heteropolymer with 3:1 α A to α B ratio: stability, aggregation, and modifications. *IUBMB Life* **62**, 693-702
46. Chepelinsky, A. B., Piatigorsky, J., *et al.* (1991) Lens protein gene expression: alpha-crystallins and MIP. *Lens Eye Toxic Res* **8**, 319-344
47. King, C. R., und Piatigorsky, J. (1983) Alternative RNA splicing of the murine alpha A-crystallin gene: protein-coding information within an intron. *Cell* **32**, 707-712
48. Haslbeck, M., Franzmann, T., *et al.* (2005) Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 842-846
49. Merck, K. B., De Haard-Hoekman, W. A., *et al.* (1992) Expression and aggregation of recombinant α A-crystallin and its two domains. *Biochim. Biophys. Acta* **1130**, 267-276
50. Haslbeck, M., Peschek, J., *et al.* (2016) Structure and function of α -crystallins: Traversing from *in vitro* to *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* **1860**, 149-166
51. Berengian, A. R., Parfenova, M., *et al.* (1999) Site-directed spin labeling study of subunit interactions in the α -crystallin domain of small heat-shock proteins. Comparison of the oligomer symmetry in α A-crystallin, HSP 27, and HSP 16.3. *J. Biol. Chem.* **274**, 6305-6314
52. Feil, I. K., Malfois, M., *et al.* (2001) A novel quaternary structure of the dimeric alpha-crystallin domain with chaperone-like activity. *J. Biol. Chem.* **276**, 12024-12029
53. Delbecq, S. P., Rosenbaum, J. C., *et al.* (2015) A Mechanism of Subunit Recruitment in Human Small Heat Shock Protein Oligomers. *Biochemistry* **54**, 4276-4284
54. Hilton, G. R., Hochberg, G. K., *et al.* (2013) C-terminal interactions mediate the quaternary dynamics of α B-crystallin. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **368**, 20110405
55. Baldwin, A. J., Hilton, G. R., *et al.* (2011) Quaternary dynamics of α B-crystallin as a direct consequence of localised tertiary fluctuations in the C-terminus. *J. Mol. Biol.* **413**, 310-320
56. Haslbeck, M., Weinkauff, S., *et al.* (2019) Small heat shock proteins: Simplicity meets complexity. *J. Biol. Chem.* **294**, 2121-2132

57. Haslbeck, M., und Vierling, E. (2015) A first line of stress defense: small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. *J. Mol. Biol.* **427**, 1537-1548
58. Mainz, A., Peschek, J., *et al.* (2015) The chaperone α B-crystallin uses different interfaces to capture an amorphous and an amyloid client. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 898-905
59. Cheng, G., Basha, E., *et al.* (2008) Insights into small heat shock protein and substrate structure during chaperone action derived from hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* **283**, 26634-26642
60. Friedrich, K. L., Giese, K. C., *et al.* (2004) Interactions between small heat shock protein subunits and substrate in small heat shock protein-substrate complexes. *J. Biol. Chem.* **279**, 1080-1089
61. Mymrikov, E. V., Daake, M., *et al.* (2017) The Chaperone Activity and Substrate Spectrum of Human Small Heat Shock Proteins. *J. Biol. Chem.* **292**, 672-684
62. Lee, G. J., Roseman, A. M., *et al.* (1997) A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *EMBO J.* **16**, 659-671
63. Richter, K., Haslbeck, M., *et al.* (2010) The heat shock response: life on the verge of death. *Mol. Cell* **40**, 253-266
64. Źwirowski, S., Kłosowska, A., *et al.* (2017) Hsp70 displaces small heat shock proteins from aggregates to initiate protein refolding. *EMBO J*
65. Peschek, J., Braun, N., *et al.* (2013) Regulated structural transitions unleash the chaperone activity of α B-crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, E3780-3789
66. Slingsby, C., und Wistow, G. J. (2014) Functions of crystallins in and out of lens: roles in elongated and post-mitotic cells. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **115**, 52-67
67. Slingsby, C., Wistow, G. J., *et al.* (2013) Evolution of crystallins for a role in the vertebrate eye lens. *Protein Sci.* **22**, 367-380
68. Shimeld, S. M., Purkiss, A. G., *et al.* (2005) Urochordate $\beta\gamma$ -crystallin and the evolutionary origin of the vertebrate eye lens. *Curr. Biol.* **15**, 1684-1689
69. Graw, J. (1997) The crystallins: genes, proteins and diseases. *Biol. Chem.* **378**, 1331-1348
70. Wistow, G., und Slingsby, C. (2010) Structure and evolution of crystallins, erschienen in: The Encyclopedia of the Eye. *Academic Press, Oxford, ISBN-10: 012374198X, ISBN-13: 9780123741981*, 229-238
71. Slingsby, C., Driessen, H. P., *et al.* (1988) Evolutionary and functional relationships between the basic and acidic β -crystallins. *Exp. Eye Res.* **46**, 375-403
72. Liu, B. F., und Liang, J. J. (2007) Protein-protein interactions among human lens acidic and basic β -crystallins. *FEBS Lett.* **581**, 3936-3942
73. Dolinska, M. B., Sergeev, Y. V., *et al.* (2009) N-terminal extension of β B1-crystallin: identification of a critical region that modulates protein interaction with β A3-crystallin. *Biochemistry* **48**, 9684-9695
74. Werten, P. J., Lindner, R. A., *et al.* (1999) Formation of β A3/ β B2-crystallin mixed complexes: involvement of N- and C-terminal extensions. *Biochim. Biophys. Acta* **1432**, 286-292

75. Zhao, H., Chen, Y., *et al.* (2014) Solution properties of gamma-crystallins: hydration of fish and mammal gamma-crystallins. *Protein Sci.* **23**, 88-99
76. Zhao, H., Magone, M. T., *et al.* (2011) The role of macromolecular crowding in the evolution of lens crystallins with high molecular refractive index. *Phys Biol* **8**, 046004
77. Foffi, G., Savin, G., *et al.* (2014) Hard sphere-like glass transition in eye lens α -crystallin solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 16748-16753
78. Xia, J. Z., Wang, Q., *et al.* (1996) Structural basis of eye lens transparency: light scattering by concentrated solutions of bovine α -crystallin proteins. *Biophys. J.* **71**, 2815-2822
79. Sweeney, A. M., Des Marais, D. L., *et al.* (2007) Evolution of graded refractive index in squid lenses. *J. R. Soc. Interface* **4**, 685-698
80. Benedek, G. B. (1971) Theory of transparency of the eye. *Appl. Opt.* **10**, 459-473
81. Bassnett, S. (2009) On the mechanism of organelle degradation in the vertebrate lens. *Exp. Eye Res.* **88**, 133-139
82. Serebryany, E., und King, J. A. (2014) The $\beta\gamma$ -crystallins: native state stability and pathways to aggregation. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **115**, 32-41
83. Garner, W. H., und Spector, A. (1978) Racemization in human lens: evidence of rapid insolubilization of specific polypeptides in cataract formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 3618-3620
84. Yanshole, L. V., Cherepanov, I. V., *et al.* (2013) Cataract-specific posttranslational modifications and changes in the composition of urea-soluble protein fraction from the rat lens. *Mol. Vis.* **19**, 2196-2208
85. Graw, J. (1987) Die Beteiligung oxidativer Prozesse bei der Kataraktentstehung, erschienen in: *Reaktive Sauerstoffspezies in der Medizin. Springer-Verlag, Berlin, ISBN-10: 3540170677, ISBN-13: 9783540170679*, 125-138
86. Michael, R., und Bron, A. J. (2011) The ageing lens and cataract: a model of normal and pathological ageing. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **366**, 1278-1292
87. Vendra, V. P., Agarwal, G., *et al.* (2013) Structural integrity of the Greek key motif in $\beta\gamma$ -crystallins is vital for central eye lens transparency. *PLoS ONE* **8**, e70336
88. Moreau, K. L., und King, J. A. (2012) Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention. *Trends Mol. Med.* **18**, 273-282
89. Harding, J. J. (1979) Aggregation of Proteins in Human Cataract. *Ophthalmic Res.* **11**, 429-432
90. Spector, A., und Roy, D. (1978) Disulfide-linked high molecular weight protein associated with human cataract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 3244-3248
91. Dilley, K. J. (1975) The proportion of protein from the normal and cataractous human lens which exists as high molecular weight aggregates in vitro. *Exp. Eye Res.* **20**, 73-78
92. Srivastava, K., Chaves, J. M., *et al.* (2008) Multi-crystallin complexes exist in the water-soluble high molecular weight protein fractions of aging normal and cataractous human lenses. *Exp. Eye Res.* **87**, 356-366

93. Puk, O., Ahmad, N., *et al.* (2011) First mutation in the β A2-crystallin encoding gene is associated with small lenses and age-related cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**, 2571-2576
94. Graw, J., Löster, J., *et al.* (2002) V76D mutation in a conserved γ D-crystallin region leads to dominant cataracts in mice. *Mamm. Genome* **13**, 452-455
95. Graw, J., Löster, J., *et al.* (2001) Characterization of a new, dominant V124E mutation in the mouse α A-crystallin-encoding gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 2909-2915
96. Lennox, E. S. (1955) Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* **1**, 190-206
97. Fairbanks, G., Steck, T. L., *et al.* (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**, 2606-2617
98. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
99. Natale, M., Maresca, B., *et al.* (2011) Image analysis workflow for 2-D electrophoresis gels based on ImageJ. *Proteomics Insights* **4**, 37
100. Schneider, C. A., Rasband, W. S., *et al.* (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671-675
101. Courchesne, P. L., und Patterson, S. D. (1999) Identification of proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using peptide and fragment ion masses. *Methods Mol. Biol.* **112**, 487-511
102. Perkins, D. N., Pappin, D. J., *et al.* (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**, 3551-3567
103. Jeong, J. Y., Yim, H. S., *et al.* (2012) One-step sequence- and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 5440-5443
104. Kibbe, W. A. (2007) OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* **35**, W43-46
105. Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., *et al.* (2007) *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J. Bacteriol.* **189**, 8746-8749
106. Rahimzadeh, M., Sadeghizadeh, M., *et al.* (2016) Impact of heat shock step on bacterial transformation efficiency. *Mol Biol Res Commun* **5**, 257-261
107. Gasteiger, E., Gattiker, A., *et al.* (2003) ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3784-3788
108. Back, K. C. (2016) Substrate recognition determinants of the small heat shock protein α B-crystallin and its role in cataractogenesis. *Dissertation - Technische Universität München*
109. Studier, F. W. (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* **41**, 207-234
110. Hammill, J. T., Miyake-Stoner, S., *et al.* (2007) Preparation of site-specifically labeled fluorinated proteins for ^{19}F -NMR structural characterization. *Nat. Protoc.* **2**, 2601-2607
111. Böcking, T., Aguet, F., *et al.* (2011) Single-molecule analysis of a molecular disassemblase reveals the mechanism of Hsc70-driven clathrin uncoating. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 295-301

112. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
113. Tanford, C. (1968) Protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* **23**, 121-282
114. Privalov, P. L. (1992) Physical basis of the stability of the folded conformations of proteins. in *Protein folding* (Creighton, T. E. ed.), W. H. Freeman and Co., 37th Floor, 41 Madison Ave., New York, NY, USA. pp 83-126
115. Beasty, A. M., Hurlle, M. R., *et al.* (1986) Effects of the phenylalanine-22 → leucine, glutamic acid-49 → methionine, glycine-234 → aspartic acid, and glycine-234 → lysine mutations on the folding and stability of the α subunit of tryptophan synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **25**, 2965-2974
116. Philo, J. S. (2006) Improved methods for fitting sedimentation coefficient distributions derived by time-derivative techniques. *Anal. Biochem.* **354**, 238-246
117. Stafford, W. F., III. (1992) Boundary analysis in sedimentation transport experiments: a procedure for obtaining sedimentation coefficient distributions using the time derivative of the concentration profile. *Anal. Biochem.* **203**, 295-301
118. Schuck, P. (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys. J.* **78**, 1606-1619
119. Laue, T. M., Shah, B. D., *et al.* (1992) Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science. Edited by S. E. Harding, A. J. Rowe and J. C. Horton. Cambridge, Royal Society of Chemistry*, 90-125
120. Koontz, L. (2014) TCA precipitation. *Methods Enzymol.* **541**, 3-10
121. Urich, K. (1994) Lens Proteins (Crystallins), erschienen in: Comparative Animal Biochemistry. *Springer-Verlag, Berlin, ISBN-10: 3540574204, ISBN-13: 9783540574200*, 363-367
122. Doss, E. W., Ward, K. A., *et al.* (1997) Preliminary studies on the aggregation process of alpha-crystallin. *Exp. Eye Res.* **65**, 255-266
123. Hoehenwarter, W., Klose, J., *et al.* (2006) Eye lens proteomics. *Amino Acids* **30**, 369-389
124. Jungblut, P. R., Otto, A., *et al.* (1998) Identification of mouse crystallins in 2D protein patterns by sequencing and mass spectrometry. Application to cataract mutants. *FEBS Lett.* **435**, 131-137
125. Ma, Z., Hanson, S. R., *et al.* (1998) Age-related changes in human lens crystallins identified by HPLC and mass spectrometry. *Exp. Eye Res.* **67**, 21-30
126. David, L. L., und Shearer, T. R. (1989) Role of proteolysis in lenses: a review. *Lens Eye Toxic Res* **6**, 725-747
127. Santhoshkumar, P., Kannan, R., *et al.* (2015) Proteases in Lens and Cataract, erschienen in: Studies on the Cornea and Lens. *Springer, New York, ISBN-10: 1493919342, ISBN-13: 9781493919345*, 221-238
128. Flurkey, K., Currer, J. M., *et al.* (2007) The Mouse in Aging Research, erschienen in: The Mouse in Biomedical Research 2nd Edition. *Elsevier Inc., London, ISBN-10: 0123694582, ISBN-13: 9780123694584*, 637-672

129. Roy, B., und Ghosh, S. K. (1991) Purification and properties of the low-molecular-weight α -crystallin from normal goat lens: comparison with bovine lens. *Exp. Eye Res.* **53**, 693-701
130. Takata, T., und Fujii, N. (2016) Isomerization of Asp residues plays an important role in alphaA-crystallin dissociation. *FEBS J.* **283**, 850-859
131. Yang, Z., Chamorro, M., *et al.* (1994) Identification of the major components of the high molecular weight crystallins from old human lenses. *Curr. Eye Res.* **13**, 415-421
132. Kleiman, N. J., Chiesa, R., *et al.* (1988) Phosphorylation of β -crystallin B2 (β Bp) in the bovine lens. *J. Biol. Chem.* **263**, 14978-14983
133. Fujii, N., Awakura, M., *et al.* (2003) Characterization of α A-crystallin from high molecular weight aggregates in the normal human lens. *Mol. Vis.* **9**, 315-322
134. Bateman, O. A., Sarra, R., *et al.* (2003) The stability of human acidic β -crystallin oligomers and hetero-oligomers. *Exp. Eye Res.* **77**, 409-422
135. Rajan, S., Horn, C., *et al.* (2006) Effect of oxidation of α A- and α B-crystallins on their structure, oligomerization and chaperone function. *Mol. Cell. Biochem.* **288**, 125-134
136. Boyle, D. L., Takemoto, L., *et al.* (2002) Morphological characterization of the alphaA-/alphaB-crystallin double knockout mouse lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, U1001-U1001
137. Hooi, M. Y., Raftery, M. J., *et al.* (2012) Racemization of two proteins over our lifespan: deamidation of asparagine 76 in γ S crystallin is greater in cataract than in normal lenses across the age range. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**, 3554-3561
138. Perry, R. E., Swamy, M. S., *et al.* (1987) Progressive changes in lens crystallin glycation and high-molecular-weight aggregate formation leading to cataract development in streptozotocin-diabetic rats. *Exp. Eye Res.* **44**, 269-282
139. Stevens, V. J., Rouzer, C. A., *et al.* (1978) Diabetic cataract formation: potential role of glycosylation of lens crystallins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 2918-2922
140. Lyons, T. J., Silvestri, G., *et al.* (1991) Role of glycation in modification of lens crystallins in diabetic and nondiabetic senile cataracts. *Diabetes* **40**, 1010-1015
141. Chiou, S. H., Chylack, L. T., Jr., *et al.* (1981) Nonenzymatic glycosylation of bovine lens crystallins. Effect of aging. *J. Biol. Chem.* **256**, 5176-5180
142. Andley, U. P., Mathur, S., *et al.* (1996) Cloning, expression, and chaperone-like activity of human α A-crystallin. *J. Biol. Chem.* **271**, 31973-31980
143. Sathish, H. A., Koteiche, H. A., *et al.* (2004) Binding of Destabilized β B2-Crystallin Mutants to α -Crystallin. *J. Biol. Chem.* **279**, 16425-16432
144. Evans, P., Slingsby, C., *et al.* (2008) Association of partially folded lens β B2-crystallins with the α -crystallin molecular chaperone. *Biochem. J.* **409**, 691-699
145. Mishra, S., Stein, R. A., *et al.* (2012) Cataract-linked γ D-crystallin mutants have weak affinity to lens chaperones α -crystallins. *FEBS Lett.* **586**, 330-336
146. Laganowsky, A., Benesch, J. L., *et al.* (2010) Crystal structures of truncated alphaA and alphaB crystallins reveal structural mechanisms of polydispersity important for eye lens function. *Protein Sci.* **19**, 1031-1043
147. Whitley, M. J., Xi, Z., *et al.* (2017) A Combined NMR and SAXS Analysis of the Partially Folded Cataract-Associated V75D γ D-Crystallin. *Biophys. J.* **112**, 1135-1146

148. Li, S. C., Goto, N. K., *et al.* (1996) α -helical, but not β -sheet, propensity of proline is determined by peptide environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 6676-6681
149. Kalyuzhnyi, O., Di Paolo, N. C., *et al.* (2008) Adenovirus serotype 5 hexon is critical for virus infection of hepatocytes in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 5483-5488
150. Kobayashi, N., Yanase, K., *et al.* (2015) Self-Assembling Nano-Architectures Created from a Protein Nano-Building Block Using an Intermolecularly Folded Dimeric de Novo Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 11285-11293
151. Moreau, K. L., und King, J. (2009) Hydrophobic core mutations associated with cataract development in mice destabilize human γ D-crystallin. *J. Biol. Chem.* **284**, 33285-33295
152. Liu, Z., Taylor, A., *et al.* (2012) Enhancement of ubiquitin conjugation activity reduces intracellular aggregation of V76D mutant γ D-crystallin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**, 6655-6665
153. Pereira, P., Shang, F., *et al.* (2003) Lens fibers have a fully functional ubiquitin-proteasome pathway. *Exp. Eye Res.* **76**, 623-631
154. Liu, Q., Shang, F., *et al.* (2004) Regulation of the ubiquitin proteasome pathway in human lens epithelial cells during the cell cycle. *Exp. Eye Res.* **78**, 197-205
155. Ji, F., Jung, J., *et al.* (2013) The human W42R γ D-crystallin mutant structure provides a link between congenital and age-related cataracts. *J. Biol. Chem.* **288**, 99-109
156. Wang, S., Zhao, W. J., *et al.* (2013) Increasing β B1-crystallin sensitivity to proteolysis caused by the congenital cataract-microcornea syndrome mutation S129R. *Biochim. Biophys. Acta* **1832**, 302-311
157. Puk, O., Hrabé de Angelis, M., *et al.* (2013) Lens density tracking in mice by Scheimpflug imaging. *Mamm. Genome* **24**, 295-302
158. Kumar, P. A., und Reddy, G. B. (2009) Modulation of alpha-crystallin chaperone activity: a target to prevent or delay cataract? *IUBMB Life* **61**, 485-495
159. Wang, K., Cheng, C., *et al.* (2007) γ D-Crystallin-Associated Protein Aggregation and Lens Fiber Cell Denucleation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**, 3719-3728
160. Hayes, V. H., Devlin, G., *et al.* (2008) Truncation of α B-crystallin by the myopathy-causing Q151X mutation significantly destabilizes the protein leading to aggregate formation in transfected cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 10500-10512
161. Lin, H. J., Lai, C. C., *et al.* (2013) An increase in phosphorylation and truncation of crystallin with the progression of cataracts. *Curr. Ther. Res.* **74**, 9-15
162. Graw, J., Loster, J., *et al.* (2001) Aey2, a new mutation in the β B2-crystallin-encoding gene of the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 1574-1580
163. Graw, J., Jung, M., *et al.* (1999) Mutation in the β A3/A1-crystallin encoding gene *Cryba1* causes a dominant cataract in the mouse. *Genomics* **62**, 67-73
164. Mogk, A., Schlieker, C., *et al.* (2003) Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. *J. Biol. Chem.* **278**, 31033-31042
165. Wang, L., Brock, A., *et al.* (2001) Expanding the genetic code of *Escherichia coli*. *Science* **292**, 498-500

166. Lang, K., und Chin, J. W. (2014) Cellular incorporation of unnatural amino acids and bioorthogonal labeling of proteins. *Chem. Rev.* **114**, 4764-4806
167. Nguyen, T. A., Cigler, M., *et al.* (2018) Expanding the Genetic Code to Study Protein-Protein Interactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 14350-14361
168. Glasscock, J. M., Zhu, Y., *et al.* (2008) Using an amino acid fluorescence resonance energy transfer pair to probe protein unfolding: application to the villin headpiece subdomain and the LysM domain. *Biochemistry* **47**, 11070-11076
169. Fairclough, R. H., und Cantor, C. R. (1978) The use of singlet-singlet energy transfer to study macromolecular assemblies. *Methods Enzymol.* **48**, 347-379
170. Taskent-Sezgin, H., Chung, J., *et al.* (2009) Interpretation of p-cyanophenylalanine fluorescence in proteins in terms of solvent exposure and contribution of side-chain quenchers: a combined fluorescence, IR and molecular dynamics study. *Biochemistry* **48**, 9040-9046
171. Tucker, M. J., Oyola, R., *et al.* (2006) A novel fluorescent probe for protein binding and folding studies: p-cyano-phenylalanine. *Biopolymers* **83**, 571-576
172. Miyake-Stoner, S. J., Miller, A. M., *et al.* (2009) Probing protein folding using site-specifically encoded unnatural amino acids as FRET donors with tryptophan. *Biochemistry* **48**, 5953-5962
173. Rose, G. D., Geselowitz, A. R., *et al.* (1985) Hydrophobicity of amino acid residues in globular proteins. *Science* **229**, 834-838
174. Eisenberg, D., Schwarz, E., *et al.* (1984) Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J. Mol. Biol.* **179**, 125-142
175. Pott, M., Schmidt, M. J., *et al.* (2014) Evolved sequence contexts for highly efficient amber suppression with noncanonical amino acids. *ACS Chem. Biol.* **9**, 2815-2822
176. Xu, H., Wang, Y., *et al.* (2016) Re-exploration of the Codon Context Effect on Amber Codon-Guided Incorporation of Noncanonical Amino Acids in Escherichia coli by the Blue-White Screening Assay. *Chembiochem.* **17**, 1250-1256
177. Schuck, P. (1998) Sedimentation analysis of noninteracting and self-associating solutes using numerical solutions to the Lamm equation. *Biophys. J.* **75**, 1503-1512
178. Scott, D. J., Harding, S. E., *et al.* (2005) Analytical Ultracentrifugation - Techniques and Methods. *The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, ISBN-10: 0854045473, ISBN-13: 9780854045471*, 235
179. Bova, M. P., Ding, L. L., *et al.* (1997) Subunit exchange of α A-crystallin. *J. Biol. Chem.* **272**, 29511-29517
180. Inoue, R., Takata, T., *et al.* (2016) New insight into the dynamical system of α B-crystallin oligomers. *Sci. Rep.* **6**, 29208
181. Quistgaard, E. M., Weininger, U., *et al.* (2016) Molecular insights into substrate recognition and catalytic mechanism of the chaperone and FKBP peptidyl-prolyl isomerase SlyD. *BMC Biol.* **14**, 82
182. Freeman, B. C., Myers, M. P., *et al.* (1995) Identification of a regulatory motif in Hsp70 that affects ATPase activity, substrate binding and interaction with HDJ-1. *EMBO J.* **14**, 2281-2292

183. Chaturvedi, S. K., Zhao, H., *et al.* (2017) Sedimentation of Reversibly Interacting Macromolecules with Changes in Fluorescence Quantum Yield. *Biophys. J.* **112**, 1374-1382
184. Wilson, D. N., und Doudna Cate, J. H. (2012) The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**
185. Röhl, A., Wengler, D., *et al.* (2015) Hsp90 regulates the dynamics of its cochaperone Sti1 and the transfer of Hsp70 between modules. *Nat. Commun.* **6**, 6655
186. Rosam, M., Krader, D., *et al.* (2018) Bap (Sii1) regulates the molecular chaperone BiP by coupling release of nucleotide and substrate. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **25**, 90-100
187. Ray, N. J. (2015) Biophysical chemistry of the ageing eye lens. *Biophys. Rev.* **7**, 353-368
188. Hariharapura, R., Santhoshkumar, P., *et al.* (2013) Profiling of lens protease involved in generation of α A-66-80 crystallin peptide using an internally quenched protease substrate. *Exp. Eye Res.* **109**, 51-59
189. Baynes, B. M., Wang, D. I., *et al.* (2005) Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation. *Biochemistry* **44**, 4919-4925
190. Singh, D., Raman, B., *et al.* (2007) Mixed oligomer formation between human α A-crystallin and its cataract-causing G98R mutant: structural, stability and functional differences. *J. Mol. Biol.* **373**, 1293-1304
191. Andley, U. P., Hamilton, P. D., *et al.* (2008) Mechanism of insolubilization by a single-point mutation in α A-crystallin linked with hereditary human cataracts. *Biochemistry* **47**, 9697-9706
192. Shroff, N. P., Cherian-Shaw, M., *et al.* (2000) Mutation of R116C results in highly oligomerized α A-crystallin with modified structure and defective chaperone-like function. *Biochemistry* **39**, 1420-1426
193. Dinner, A. R., und Karplus, M. (1998) A metastable state in folding simulations of a protein model. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 236-241
194. Santhoshkumar, P., Udupa, P., *et al.* (2008) Significance of interactions of low molecular weight crystallin fragments in lens aging and cataract formation. *J. Biol. Chem.* **283**, 8477-8485
195. Takemoto, L., und Sorensen, C. M. (2008) Protein-protein interactions and lens transparency. *Exp. Eye Res.* **87**, 496-501
196. Delaye, M., Clark, J. I., *et al.* (1981) Coexistence curves for the phase separation in the calf lens cytoplasm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **100**, 908-914
197. Clark, A. R., Lubsen, N. H., *et al.* (2012) sHSP in the eye lens: crystallin mutations, cataract and proteostasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 1687-1697
198. Tardieu, A. (1988) Eye lens proteins and transparency: from light transmission theory to solution X-ray structural analysis. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **17**, 47-70
199. Kastelic, M., Kalyuzhnyi, Y. V., *et al.* (2016) Modeling phase transitions in mixtures of β - γ lens crystallins. *Soft Matter* **12**, 7289-7298
200. Wang, Y., Lomakin, A., *et al.* (2010) Phase behavior of mixtures of human lens proteins Gamma D and Beta B1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 13282-13287
201. Dorsaz, N., Thurston, G. M., *et al.* (2011) Phase separation in binary eye lens protein mixtures. *Soft Matter* **7**, 1763-1776

202. Makley, L. N., McMenimen, K. A., *et al.* (2015 - 2015/11/24) Pharmacological chaperone for alpha-crystallin partially restores transparency in cataract models. *Science* **350**, 674-677
203. Zhao, L., Chen, X. J., *et al.* (2015) Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts. *Nature* **523**, 607-611
204. Ahmed, N. (2005) Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **67**, 3-21
205. Wegele, H., Müller, L., *et al.* (2004) Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **151**, 1-44
206. Canfield, R. E., und Anfinsen, C. B. (1963) Chromatography of Pepsin and Chymotrypsin Digests of Egg White Lysozyme on Phosphocellulose. *J. Biol. Chem.* **238**, 2684-2690
207. Osserman, E. E., Canfield, R. E., *et al.* (1974) Lysozyme. *Academic Press, New York, ISBN-13: 9780323143677*
208. Mifflin, L. C., und Cohen, R. E. (1994) Characterization of denatured protein inducers of the heat shock (stress) response in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* **269**, 15710-15717
209. Mücke, M., und Schmid, F. X. (1992) Enzymatic catalysis of prolyl isomerization in an unfolding protein. *Biochemistry* **31**, 7848-7854
210. Mücke, M., und Schmid, F. X. (1994) Folding mechanism of ribonuclease T1 in the absence of the disulfide bonds. *Biochemistry* **33**, 14608-14619
211. Borgia, A., Borgia, M. B., *et al.* (2018) Extreme disorder in an ultrahigh-affinity protein complex. *Nature* **555**, 61-66
212. Dulbecco, R., und Vogt, M. (1954) Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.* **99**, 167-182
213. Koch, J. R. (2014) Mia40 ist optimiert für die duale Funktion als Proteinimport- und Faltungshelfer in Mitochondrien. *Dissertation - Universität Bayreuth*

9 Publikationsliste

Teile der vorliegenden Arbeit sind in Vorbereitung zur Publikation:

Schmid, P.W.N., Lim, N., Peters, C., Benjamin Bourgeois, Franz Pirolt, Richter, B., Back, K.C., Peschek, J., Puk, O., Amarie, O.V., Dalke, C., Haslbeck, M., Weinkauff, S., Madl, T., Graw, J. und Buchner, J. *Imbalances in the eye lens proteome are linked to hereditary cataract in mice*. Manuskript in Vorbereitung.

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden außerdem folgende Publikationen, die nicht Teil dieser Dissertation sind:

Girstmair, H., Toppel, F., Lopez, A., Tych, K., Stein, F., Haberkant, P., Schmid, P.W.N., Helm, D., Rief, M., Sattler, M. und Buchner, J. *The isoforms of the molecular chaperone Hsp90 from S. cerevisiae differ in structure, function and client range*. Nature Communications, angenommen.

Meier, S., Bohnacker, S., Klose, C., Lopez, A., Choe, C. A., Schmid, P. W. N., Rührnöbl, F., Haslbeck, M., Huang P. S., Sattler, M., und Feige, M. J. *The structural basis of chaperone-mediated interleukin 23 assembly control*. Nature Communications, in Revision.

Kaiser, C.J.O., Peters, C., Schmid, P.W.N., Stavropoulou, M., Zou, J., Mymrikow, E., Rockel, B., Asami, S., Haslbeck, M., Rappsilber, J., Reif, B., Zacharias, M., Buchner, J. und Weinkauff, S. *The structure and oxidation of the eye lens chaperone αA -crystallin*. Nature Structural & Molecular Biology, in Revision.

10 Anhang

10.1 Anhang - Tabellen

Tabelle S1: Vollständige Liste aller Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine und Verbindungen

Protein	UniProt-ID	ϵ_{nm} ($M^{-1} cm^{-1}$)
aA-V124E	P24622-2	ϵ_{280} 14 440
α A-wt	P24622-2	ϵ_{280} 14 440
α B-3E	P02511-1	ϵ_{280} 13 980
α B-pCNF	P02511-1	ϵ_{280} 3 830
α B-wt	P02511-1	ϵ_{280} 13 980
α -Lactalbumin	B6V3I5-1	ϵ_{280} 27 960
β A2-S47P	Q9JJV1-1	ϵ_{280} 46 410
β A2-wt	Q9JJV1-1	ϵ_{280} 46 410
γ D-V76D	P04342-1	ϵ_{280} 45 840
γ D-wt	P04342-1	ϵ_{280} 45 840
Hsc70*	P11142-1	ϵ_{280} 22 350
Lysozym	P00698-1	ϵ_{280} 37 470
MDH	P00346-1	ϵ_{280} 7 450
Verbindung		ϵ_{nm} ($M^{-1} cm^{-1}$)
pCNF		ϵ_{280} 850 (171)
Atto488-Maleimid/ -NHS-Ester		ϵ_{280} 90 000 ϵ_{500} 8 100 (atto-tec.com)
IAEDANS		ϵ_{280} 880 ϵ_{336} 5 700 (213)

Angegeben ist die Bezeichnung des jeweiligen Proteins bzw. der jeweiligen Verbindung sowie der molare dekadische Extinktionskoeffizient bei der jeweiligen Wellenlänge in nm. Für Proteine ist zudem die UniProt Identifikationsnummer gelistet. Die Berechnung der ϵ_{280} -Werte erfolgte mit ExpASy ProtParam anhand der UniProt-ID (107).

Tabelle S2: Liste der verwendeten Oligo- und Polydesoxyribonukleotide.**Oligodesoxyribonukleotide zur Mutagenese von murinen Kristallinen**

Konstrukt	Sequenz	Verwendung
araBp (+)	ATG CCA TAG CAT TTT TAT CC	Sequenzierung
Hsc70-Seq	GGT CGG GGC TGA AAG G	Sequenzierung
T7 (+)	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Sequenzierung
T7 (-)	CTA GTT ATT GCT CAG CGG T	Sequenzierung
α B-TAA (+)	GCC CCC AAG AAA TAA CTC GAG ATC	Änderung Stopcodon
α B-TAA (-)	TGC GGT GAC AGC AGG CTT CTC	
α B-W9TAG (+)	CAC CAC CCC TAG ATC CGC C	Punktmutagenese W9TAG
α B-W9TAG (-)	GAT GGC GAT GTC CAT ACC TCC	
α B-W60F (+)	CAT GAA GCA CTT TCC CTT CAT GGT G	Punktmutagenese W60F
α B-W60F (-)	TCA GAC TGA ACA ACA GCA TCA TCG	
pBAD- α B-pCNF (+)	GCT AAC AGG AGG AAT TAA CCA TGG GTC ATC ACC ATC ATC	Subklonierung in pBAD
pBAD- α B-pCNF (-)	TAC CAG CTG CAG ATC TCG AGC TAT TTC TTG GGG GCT GC	
β A2-wt-His6 (+)	CAT ATG AGC AGC GCA CCG G	Entfernen von N-terminalem His-Tag
β A2-wt-His6 (-)	ATA TCT CCT TCT TAA AGT TAA ACA AAA TTA TTT	
β A2-S47P (+)	GTC GTG TTC GTC CGG TTA AAG TTG	Punktmutagenese S47P
β A2-S47P (-)	GCA GTG CAC CAC GTT CAC AAA CAT	
SUMO- β A2-wt (+)	CGA ACA GAT TGG AGG TA TGA GCA GCG CAC CGG CA	Subklonierung in pE-SUMOpro
SUMO- β A2-wt (-)	GAA TTC GGA TCC TCT AG TTA ATG CTG CAC ACG ACG	
γ D-V76D (+)	AGC GAT AGC GAT CGT AGC TG	Punktmutagenese V76D

Anhang

γ D-V76D (-)	CTG CAT GCG GAA TCA GAC GA	
SUMO- γ D-wt (+)	CGA ACA GAT TGG AGG TA TGG GGA AAA TCA CCT TTT ATG	Subklonierung in pE-SUMOpro
SUMO- γ D-wt (-)	GAA TTC GGA TCC TCT AGT TAA TAG AAA TCC ATA ACG CG	
Hsc70-Ser (+)	ATG TCC AAG GGA CCT GCA GTT G	Entfernen von artifiziellem Serin in Position -1 Hsc70
Hsc70-Ser (-)	TCC ACC AAT CTG TTC TCT GTG AGC	
Hsc70-W90F (+)	CAT GAA GCA CTT TCC CTT CAT GGT G	Punktmutagenese W90F
Hsc70-W90F (-)	TCA GAC TGA ACA ACA GCA TCA TCG	
Hsc70-W580F (+)	GAA ATC ATC AAT TTT CTG GAT AAG AAC CAG	Punktmutagenese W580F
Hsc70-W580F (-)	GTT GCA CTT GTC AAG AAT CTT CTG TTT G	
Hsc70-647G,648C (+)	GAG GTT GAT GGC TGC TAA CTC GAG	Hinzufügen von 647G, 648C
Hsc70-647G,648C (-)	TTC AAT GGT GGG CCC TGA AGA AGC	

Polydesoxyribonukleotide zur Klonierung von murinen Kristallinen

Konstrukt	Sequenz
β A2-wt	ATG AGC AGC GCA CCG GCA CCG GGT AGT GCA CCG GTT TGT CTG ACC CTG TGG GAT GAA GAA GAT TTT CAG GGT CGT CGT TGT CGT CTG CTG AGC GAT TGT GCA AAT GTT TGT GAA CGT GGT GCA CTG CGT CGT GTT CGT AGC GTT AAA GTT GAA AAT GGT GCA TGG GTT GCA TTT GAG TAT CCG GAT TTC CAG GGT CAG CAG TTT ATT CTG GAA AAA GGT GAT TAT CCG TGT TGG AGC GCA TGG TCA GGT AGC AGC GGT CAT CAT AGC AAT CAG CTG CTG AGC TTT CGT CCG GTT CTG TGT GCA AAT CAT AGC GAT AGC CGT GTT ACC CTG TTT GAA GGT GAA AAC TTT CAG GGC TGT AAA TTT GAA CTG AGC GAC GAT TAT CCG AGC CTG CCG AGT ATG GGT TGG ACC AGC AAA GAT GTT GGT AGC CTG AAA GTG AGC AGC GGT GCC TGG GTA GCC TAT CAG TAT CCG GGT TAT CGT GGT TAT CAG TAT GTT CTG GAA CGT GAT CGT CAT AGC GGT GAA TTT CGT ACC TAT AGC GAT TTT GGT ACA CAG GCA CAT ACC GGT CAG CTG CAG AGT ATT CGT CGT GTG CAG CAT TAA

γ D-wt

ATG GGG AAA ATC ACC TTT TAT GAA GAT CGT GGT TTT CAG GGT CGT
 CAT TAT GAA TGT AGC ACC GAT CAT AGC AAT CTG CAG CCG TAT TTT
 AGC CGT TGT AAT AGC GTT CGT GTT GAT AGC GGT TGT TGG ATG CTG
 TAT GAA CAG CCG AAT TTT ACC GGT TGC CAG TAT TTT CTG CGT CGT
 GGT GAT TAT CCT GAT TAT CAG CAG TGG ATG GGT TTT AGC GAT AGC
 GTG CGT AGC TGT CGT CTG ATT CCG CAT GCA GGT AGC CAT CGT ATT
 CGT CTG TAT GAG CGT GAA GAA TAT CGT GGT CAG ATG ATC GAA TTT
 ACC GAA GAT TGT CCG AGC CTG CAG GAT CGT TTT CAT TTT AAT GAA
 ATC TAC AGC CTG AAT GTG CTG GAA GGT TGC TGG GTT CTG TAT GAT
 ATG ACC AAT TAT CGC GGT CGT CAG TAT CTG CTG CGT CCG GGT GAA
 TAT CGT CGT TAT CAT GAT TGG GGT GCA ATG AAT GCA CGT GTT GGT
 AGC CTG CGT CGC GTT ATG GAT TTC TAT TAA

Hsc70*

ATG GGC AGC CAT CAC CAT CAC CAT CAC TCT TCT GGC ATG TCG GAC
 TCA GAA GTC AAT CAA GAA GCT AAG CCA GAG GTC AAG CCA GAA GTC
 AAG CCT GAG ACT CAC ATC AAT TTA AAG GTG TCC GAT GGA TCT TCA
 GAG ATC TTC TTC AAG ATC AAA AAG ACC ACT CCT TTA AGA AGG CTG
 ATG GAA GCG TTC GCT AAA AGA CAG GGT AAG GAA ATG GAC TCC TTA
 AGA TTC TTG TAC GAC GGT ATT AGA ATT CAA GCT GAT CAG ACC CCT
 GAA GAT TTG GAC ATG GAG GAT AAC GAT ATT ATT GAG GCT CAC AGA
 GAA CAG ATT GGT GGA ATG TCC AAG GGA CCT GCA GTT GGT ATT GAT
 CTT GGC ACC ACC TAC TCC TGT GTG GGT GTC TTC CAG CAT GGA AAG
 GTG GAA ATA ATT GCC AAT GAC CAG GGT AAC CGC ACC ACG CCG AGC
 TAT GTT GCT TTC ACC GAC ACA GAA CGA TTA ATT GGG GAT GCG GCC
 AAG AAT CAG GTT GCA ATG AAC CCC ACC AAC ACA GTT TTT GAT GCC
 AAA CGT CTG ATC GGA CGT AGG TTC GAT GAT GCT GTT GTT CAG TCT
 GAC ATG AAG CAC TTT CCC TTC ATG GTG GTG AAC GAT GCA GGC AGG
 CCC AAG GTC CAA GTC GAA TAC AAA GGG GAG ACA AAA AGT TTC TAT
 CCT GAG GAA GTG TCT TCA ATG GTT CTG ACA AAA ATG AAG GAA ATT
 GCA GAA GCT TAC CTT GGA AAG ACT GTT ACC AAT GCC GTG GTC ACC
 GTG CCA GCT TAC TTC AAT GAC TCT CAG CGA CAG GCA ACA AAA GAT
 GCT GGA ACT ATT GCT GGC CTC AAC GTA CTT CGA ATT ATC AAT GAG
 CCA ACT GCT GCT GCT ATT GCC TAT GGC TTA GAT AAG AAG GTC GGG
 GCT GAA AGG AAT GTG CTC ATT TTT GAC TTG GGA GGT GGC ACT TTT
 GAT GTG TCA ATC CTC ACT ATC GAG GAT GGA ATT TTT GAA GTC AAA
 TCA ACA GCT GGA GAC ACC CAC TTG GGC GGA GAA GAC TTT GAC AAC
 CGA ATG GTC AAC CAT TTC ATT GCT GAG TTT AAG CGA AAG CAC AAG
 AAG GAC ATC AGT GAG AAC AAG AGA GCT GTC AGG CGT CTC CGC ACT
 GCC TGT GAG CGG GCC AAG CGC ACC CTC TCC TCC AGC ACC CAG GCC
 AGT ATT GAG ATT GAT TCT CTC TAT GAG GGA ATT GAC TTC TAC ACC
 TCC ATT ACC CGT GCT CGA TTT GAG GAG TTG AAT GCT GAC CTG TTC
 CGT GGC ACA CTG GAC CCT GTA GAG AAG GCC CTT CGA GAT GCC AAA

```
CTA GAC AAG TCA CAG ATC CAT GAT ATT GTC CTG GTG GGT GGT TCT
ACC AGA ATC CCC AAG ATC CAG AAA CTT CTG CAA GAC TTC TTC AAT
GGA AAA GAG CTG AAT AAG AGC ATT AAC CCC GAT GAA GCT GTT GCC
TAT GGT GCA GCT GTC CAG GCA GCC ATT CTA TCT GGA GAC AAG TCT
GAG AAT GTT CAG GAT TTG CTG CTC TTG GAT GTC ACT CCT CTT TCC
CTT GGG ATT GAA ACT GCT GGT GGA GTC ATG ACT GTC CTC ATC AAG
CGC AAT ACC ACC ATT CCC ACC AAG CAG ACC CAG ACT TTC ACC ACC
TAC TCT GAC AAC CAG CCA GGT GTA CTC ATC CAG GTG TAT GAA GGT
GAA AGG GCC ATG ACC AAG GAC AAC AAC CTG CTT GGG AAG TTT GAG
CTC ACA GGC ATA CCT CCA GCA CCC CGT GGG GTT CCT CAG ATT GAG
GTT ACT TTT GAC ATT GAT GCC AAT GGC ATC CTC AAT GTT TCT GCT
GTA GAT AAG AGC ACA GGA AAG GAG AAC AAG ATC ACC ATC ACC AAT
GAC AAG GGC CGC TTG AGT AAG GAG GAT ATT GAG CGC ATG GTC CAA
GAA GCT GAG AAG TAC AAA GCT GAG GAT GAG AAG CAG AGA GAT AAG
GTT TCC TCT AAG AAC TCG CTG GAG TCT TAT GCT TTC AAC ATG AAA
GCA ACT GTT GAA GAT GAG AAA CTT CAA GGC AAG ATC AAT GAT GAA
GAC AAA CAG AAG ATT CTT GAC AAG TGC AAC GAA ATC ATC AAT TTT
CTG GAT AAG AAC CAG ACT GCG GAG AAG GAA GAA TTT GAG CAT CAG
CAG AAA GAA CTG GAG AAG GTC TGC AAC CCT ATC ATC ACC AAG CTG
TAC CAG AGT GCT GGT GGC ATG CCT GGA GGA ATG CCT GGT GGC TTC
CCT GGT GGA GGA GCT CCT CCA TCT GGT GGT GCT TCT TCA GGG CCC
ACC ATT GAA GAG GTT GAT GGC TGC TAA
```

Die Nukleotidsequenz ist in 5' → 3' Richtung angegeben. Die Richtung der *Primer* ist mit (+) für die strangabwärts und mit (-) für die strangaufwärts abgekürzt. Die Basensequenz der Polydesoxyribonukleotide wurden von GeneArt (Geneart AG, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) für *E. coli* Codon optimiert, synthetisiert und in pET28 (Kan^r) kloniert. Als Ausgangssequenz diente die bei UniProt annotierte Aminosäuresequenz. (βA2-wt: Q9JJV1-1, γD-wt: P04342-1). Als Restriktionsschnittstellen wurden NdeI und NotI für Wildtyp-βA2, sowie NcoI und NotI für Wildtyp-γD verwendet. Der klonierungsbedingte artifizielle His₆-Tag bei βA2-wt wurde mittels *Blunt-End*-Mutagenese entfernt. Zur Subklonierung von βA2 und γD wurde BsaI verdauter pE-SUMOpro Plasmidvektor verwendet. Die Subklonierung von humanem αB-pCNF erfolgte in mit NcoI, XhoI verdautem pBAD Plasmidvektor. Für Hsc70* wurde ausgehend von dem vorhandenen Plasmidvektor pET28-SUMO-Hsc70-wt (Dr. rer. nat. Oliver Lorenz, Lehrstuhl für Biotechnologie, Technische Universität München, DEU) die natürlich vorkommenden Tryptophane und das klonierungsbedingte Serin an Position -1 von Hsc70 entfernt. Anschließend wurden die Aminosäuren 647G, 648C hinzugefügt.

Tabelle S3: Übersicht über das Körper- und Linsenfeuchtgewicht der verwendeten Mausstämme.

Alter (mo.)	C3HeB/FeJ (+/+)		Aey7 (α A-V124E)	
	Körpergewicht (g)	Paarweises Linsenfeuchtgewicht (mg)	Körpergewicht (g)	Paarweises Linsenfeuchtgewicht (mg)
0	n.b.	6,3 ± 0,6 (2)	n.b.	3,1 ± 1,2 (4)
1	n.b.	9,8 ± 2,7 (3)	n.b.	5,7 ± 1,0 (4)
3	32,5 ± 1,4 (6)	16,7 ± 1,2 (3)	30,5 ± 1,9 (6)	6,8 ± 0,5 (4)
6	40,0 ± 3,6 (6)	22,0 ± 1,9 (2)	34,7 ± 3,8 (6)	7,6 ± 1,3 (4)
9	40,7 ± 4,0 (6)	22,1 ± 1,2 (3)	41,0 ± 2,2 (6)	9,3 ± 0,9 (4)
12	39,8 ± 4,1 (4)	19,5 ± 1,8 (2)	41,3 ± 2,2 (6)	8,4 ± 0,9 (4)

Alter (mo.)	Aey4 (γ D-V76D)	
	Körpergewicht (g)	Paarweises Linsenfeuchtgewicht (mg)
0	n.b.	2,8 ± 0,2 (2)
1	n.b.	8,2 ± 1,6 (3)
3	30,0 ± 1,3 (6)	12,2 ± 1,7 (3)
6	36,8 ± 2,6 (5)	15,9 ± 1,3 (3)
9	36,0 ± 1,9 (6)	15,6 ± 1,3 (3)
12	32,7 ± 1,2 (3)	17,1 ± 1,4 (2)

Alter (mo.)	C57Bl/6J (+/+)		Aca30 (β A2-S47P)	
	Körpergewicht (g)	Paarweises Linsenfeuchtgewicht (mg)	Körpergewicht (g)	Paarweises Linsenfeuchtgewicht (mg)
0	n.b.	4,4 ± 1,5 (2)	n.b.	4,3 ± 2,9 (4)
1	n.b.	9,9 ± 0,4 (3)	n.b.	8,4 ± 0,7 (4)
3	28,0 ± 1,6 (6)	16,5 ± 2,2 (3)	28,3 ± 0,4 (4)	9,2 ± 2,3 (4)
6	31,2 ± 1,8 (6)	19,8 ± 0,8 (2)	38,3 ± 0,9 (3)	12,3 ± 1,4 (3)
9	40,7 ± 4,0 (6)	22,1 ± 1,2 (3)	38,7 ± 1,2 (3)	12,7 ± 1,6 (4)
12	39,8 ± 4,1 (4)	19,5 ± 1,8 (2)	33,8 ± 0,8 (4)	15,4 ± 2,1 (3)

Angegeben ist das Alter (mo.) und Körpergewicht (g) der Mäuse, sowie das paarweise Linsenfeuchtgewicht (mg). Das Feuchtgewicht wurde nach Präparation der Linsen an einer Feinwaage bestimmt. In Klammern ist die Anzahl an biologischen Replikaten gegeben (n.b.: nicht bestimmt). Die Daten wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jochen Graw (Institut für Entwicklungsgenetik, Helmholtz Zentrum, München, DEU) zur Verfügung gestellt.

10.2 Anhang - Abbildungen

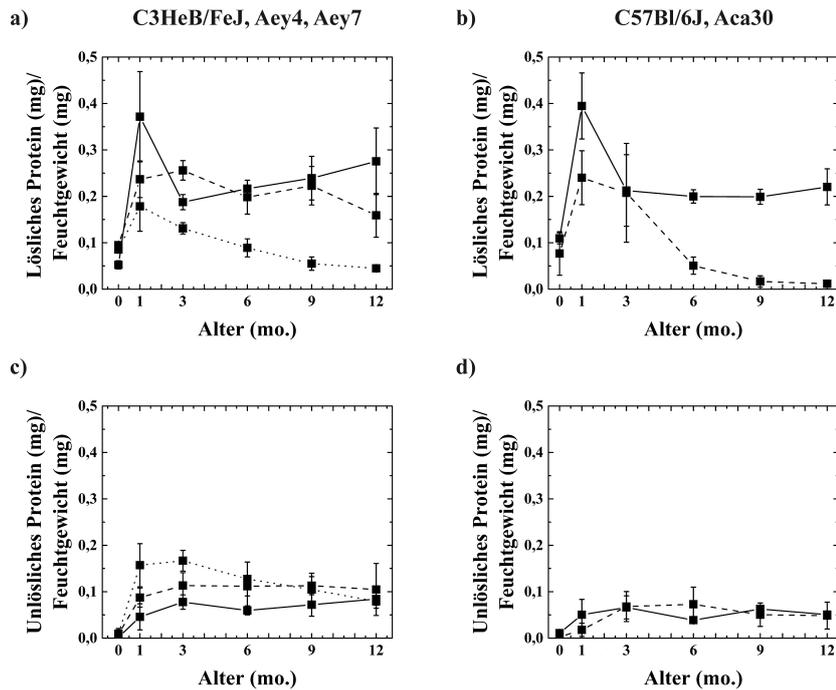


Abbildung S1: Mengenanteil an wasserlöslichem und -unlöslichem Protein in der Augenlinse der untersuchten Mausstämmen. Aufgetragen ist die Menge an extrahierbarem Protein (mg) aus der wasserlöslichen (a,b) bzw. -unlöslichen Fraktion (c,d) pro mg Linsenfeuchtgewicht für die Wildtyp-Stämme C3HeB/FeJ (—) und C57Bl/6J (—) sowie der Kataraktmutanten (Aey4 (—), Aey7 (---) und Aca30 (—)). Die Proteinkonzentration in den Fraktionen wurde nach Bradford bestimmt. Die Abnahme der extrahierbaren Proteinmenge in der wasserlöslichen Fraktion pro mg Linsenfeuchtgewicht, bei gleichbleibendem Wert in der wasserunlöslichen Fraktion, deutet auf eine Zunahme des Wassergehalts in den Linsen von Aey7- und Aca30-Mäusen hin.

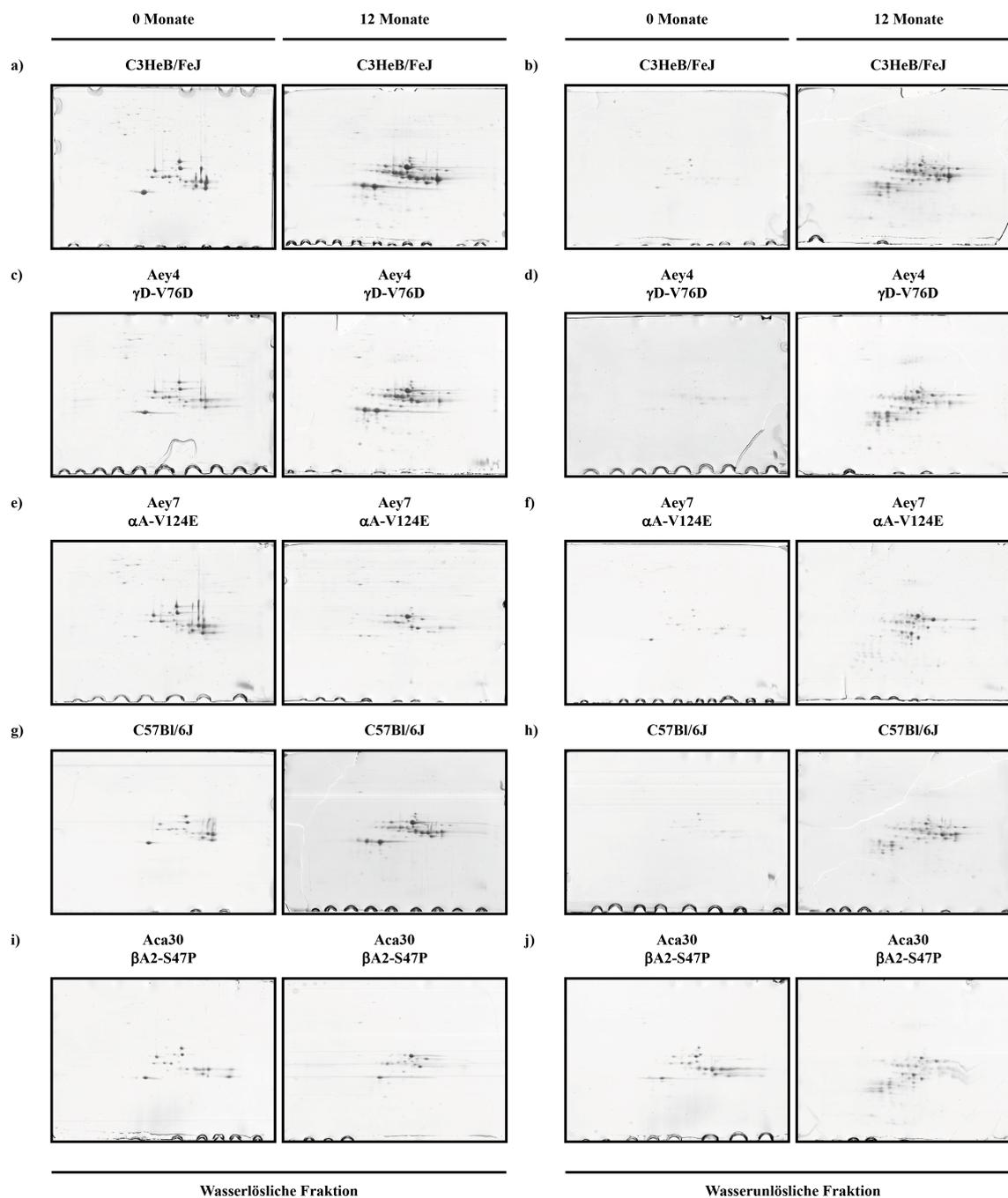


Abbildung S2: Exemplarische 2D-Karten der wasserlöslichen und -unlöslichen Fraktion von Linsenextrakten der untersuchten Mausstämmen. Gezeigt ist die wasserlösliche (a,c,e,g,i) und -unlösliche (b,d,f,h,j) Fraktion der Linsenextrakte von neugeborenen und 12 Monate alten Mäusen von pH 3-10. Die densitometrische Auswertung der niedermolekularen Kristallinregion erfolgte mit dem Programm ImageJ nach Natale *et al.* (99). Bei der wasserunlöslichen Fraktion aus Linsen von neugeborenen C3HeB/FeJ, Aey4, Aey7 und C57Bl/6J (b,d,f,h) Mäusen lag die Auftragsmenge aufgrund des sehr geringen wasserunlöslichen Anteils unter 150 μ g. Für alle anderen Gele wurden mindestens 150 μ g aufgetragen.

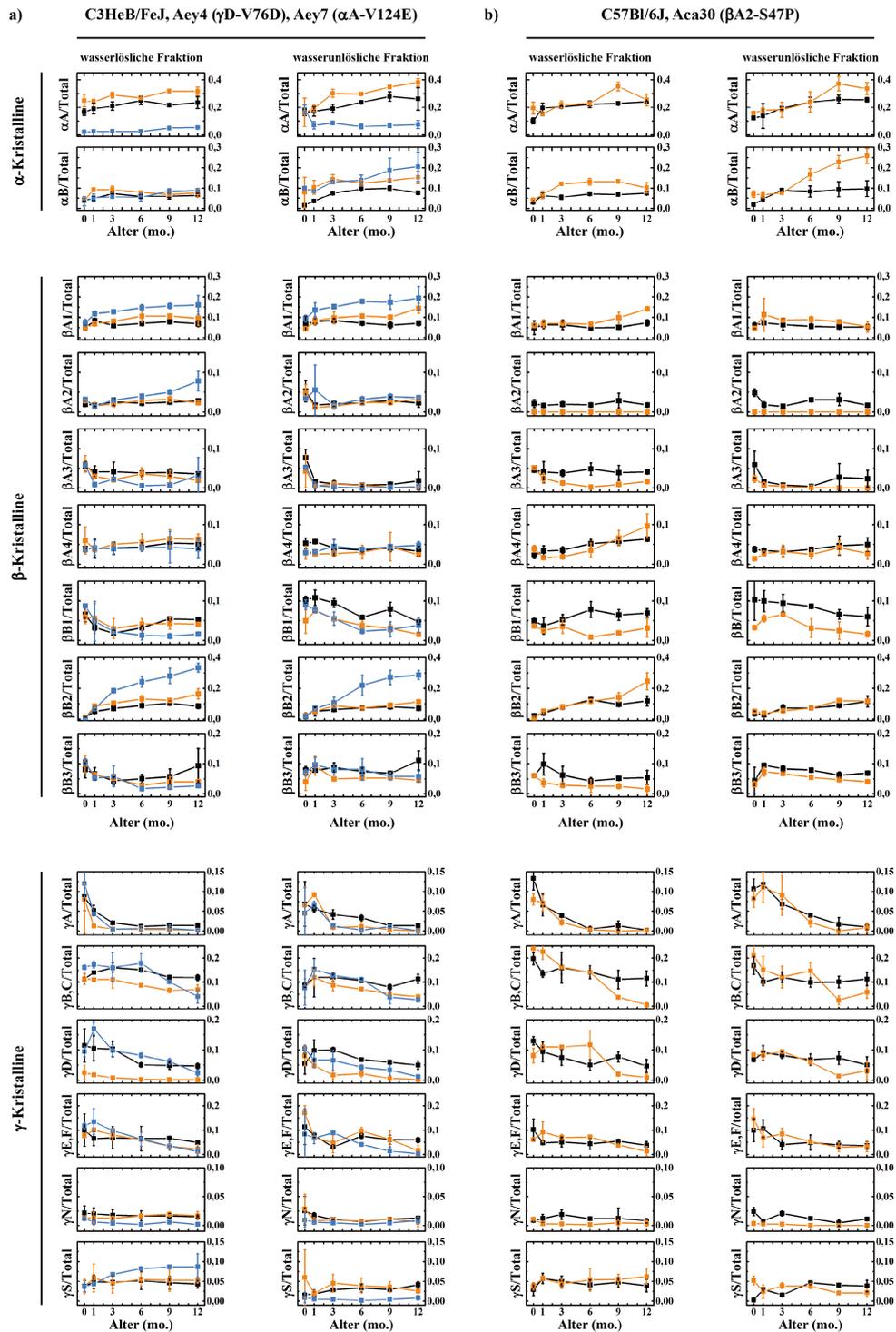


Abbildung S3: Zeitlicher Verlauf des Anteils aller Isoformen an der Gesamtheit der Kristalline in der alternden Augenlinse von Mäusen. Gezeigt ist der relative Anteil der Kristallinoisformen am Gesamtsignal in der wasserlöslichen und -unlöslichen Fraktion von Linsenextrakten im zeitlichen Verlauf. Aufgetragen sind jeweils der Wildtyp- bzw. Katarakt-Stamm C3HeB/FeJ (■), Aey4 (γ D-V76D, ■) und Aey7 (α A-V124E, ■) (a) sowie C57Bl/6J (■), Aca30 (β A2-S47P, ■) (b). Die Isoformen γ B/C und γ E/F wurden zusammengefasst, da diese nicht elektrophoretisch getrennt werden konnten. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageJ. Die Anteile aller Isoformen wurden auf das Gesamtsignal der Kristalline im jeweiligen Gel normiert und ergeben in Summe 1.

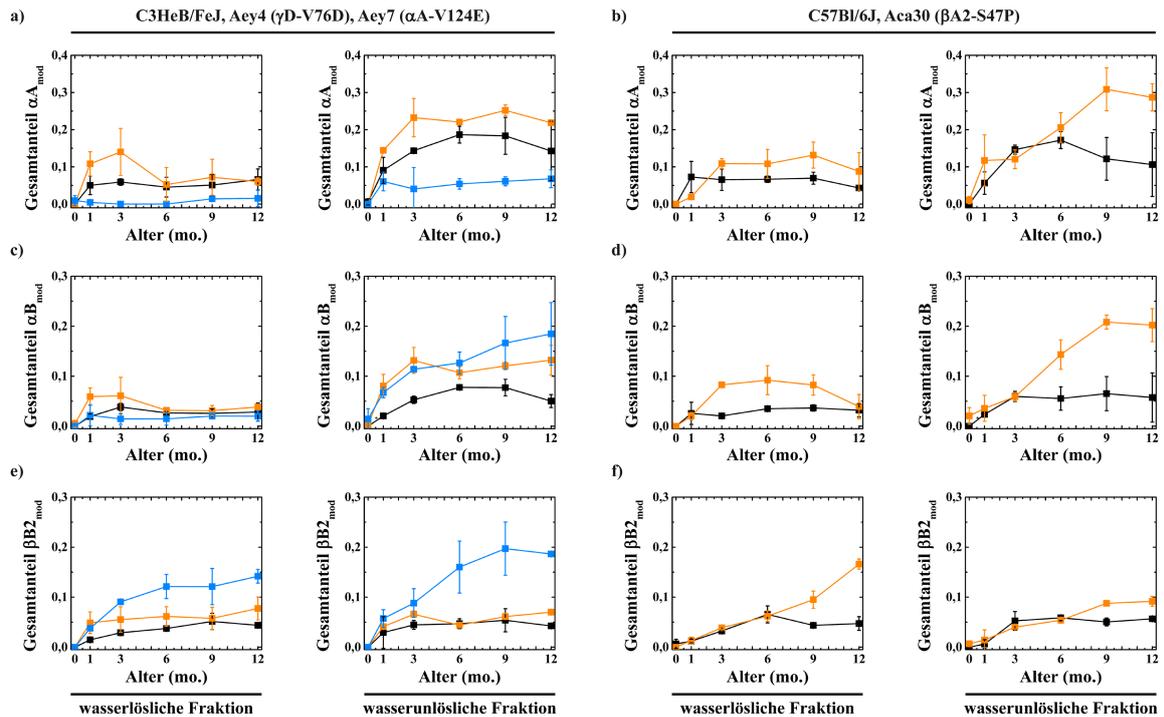


Abbildung S4: Zeitlicher Verlauf des Anteils von drei modifizierten Isoformen an der Gesamtheit der Kristalline in der alternden Augenlinse von Mäusen. Gezeigt ist der relative Anteil der modifizierten Kristallinisformen αA_{mod} - (a,b)-, αB_{mod} - (c,d) und $\beta B2_{\text{mod}}$ -Kristalline (e,f) am Gesamtsignal aller Kristalline (α -, β - und γ -Kristalline) in der wasserlöslichen und -unlöslichen Fraktion von Linsenextrakten im zeitlichen Verlauf. Aufgetragen sind jeweils der Wildtyp- bzw. Katarakt-Stamm C3HeB/FeJ (■), Aey4 (γD -V76D, ■) und Aey7 (αA -V124E, ■) sowie C57Bl/6J (■), Aca30 ($\beta A2$ -S47P, ■) Als „modifiziert“ wurden alle Kristalline klassifiziert, die bei der 2-DE ein geändertes Laufverhalten im Vergleich zum unmodifizierten Vollängenkristallin (αA -, αB - und $\beta B2$ -Kristalline) zeigten. Die Isoformen αA - und αA_{ins} -Kristalline wurden zusammengefasst. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageJ.

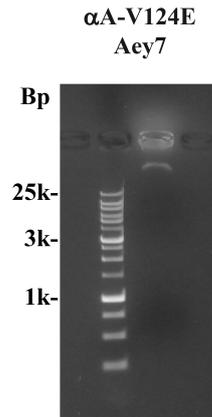


Abbildung S5: Gelelektrophorese der DNA-haltigen Fraktion von Linsenextrakten. In den Linsenextrakten aus Kataraktmutanten war zu allen untersuchten Zeitpunkten DNA detektierbar. Beispielhaft ist das Agarosegel der DNA-Fraktion aus dem Linsenextrakt von neugeborenen Aey7-Mäusen gezeigt. Die Fraktion wurde durch Größenausschlusschromatographie des Linsenextrakts erhalten. Die elektrophoretische Trennung der DNA erfolgte durch ein 0,5 % (w/v) Agarosegel versetzt mit 0,04 ‰ (v/v) Serva DNA Stain G. Die DNA-Fragmente waren deutlich größer als 25 000 Bp und konnten nicht mittels horizontaler Gelelektrophorese getrennt werden.

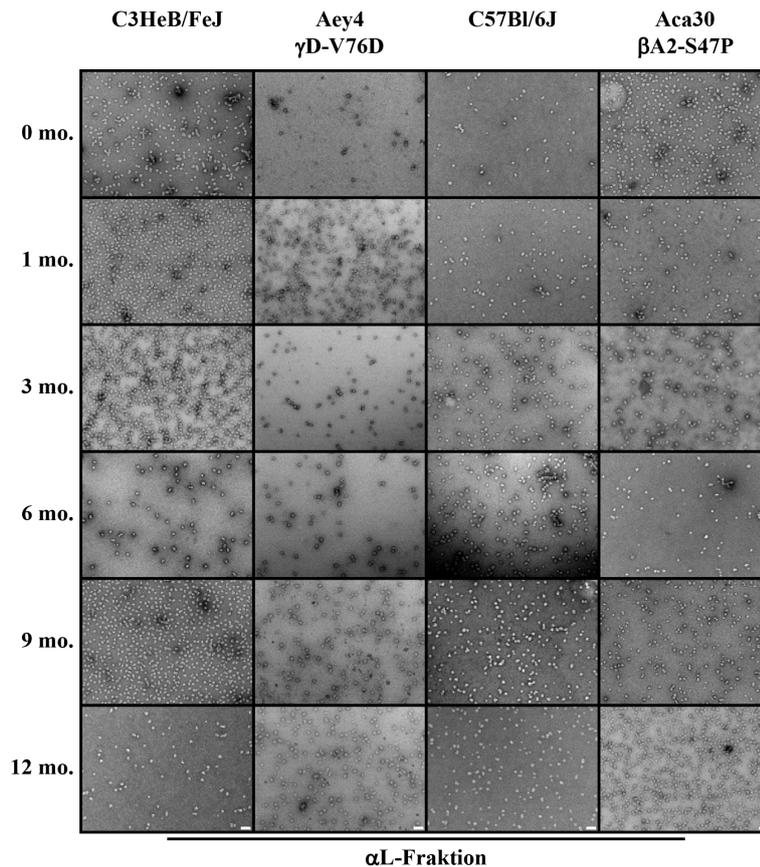


Abbildung S6: EM-Aufnahmen der α L-Fraktion aus Linsenextrakten der untersuchten Mausstämmе. Nach Fraktionierung der Linsenextrakte mittels SEC-HPLC wurden die Proteine der α L-Fraktion durch EM-Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht (Maßstabsskala: 50 nm).

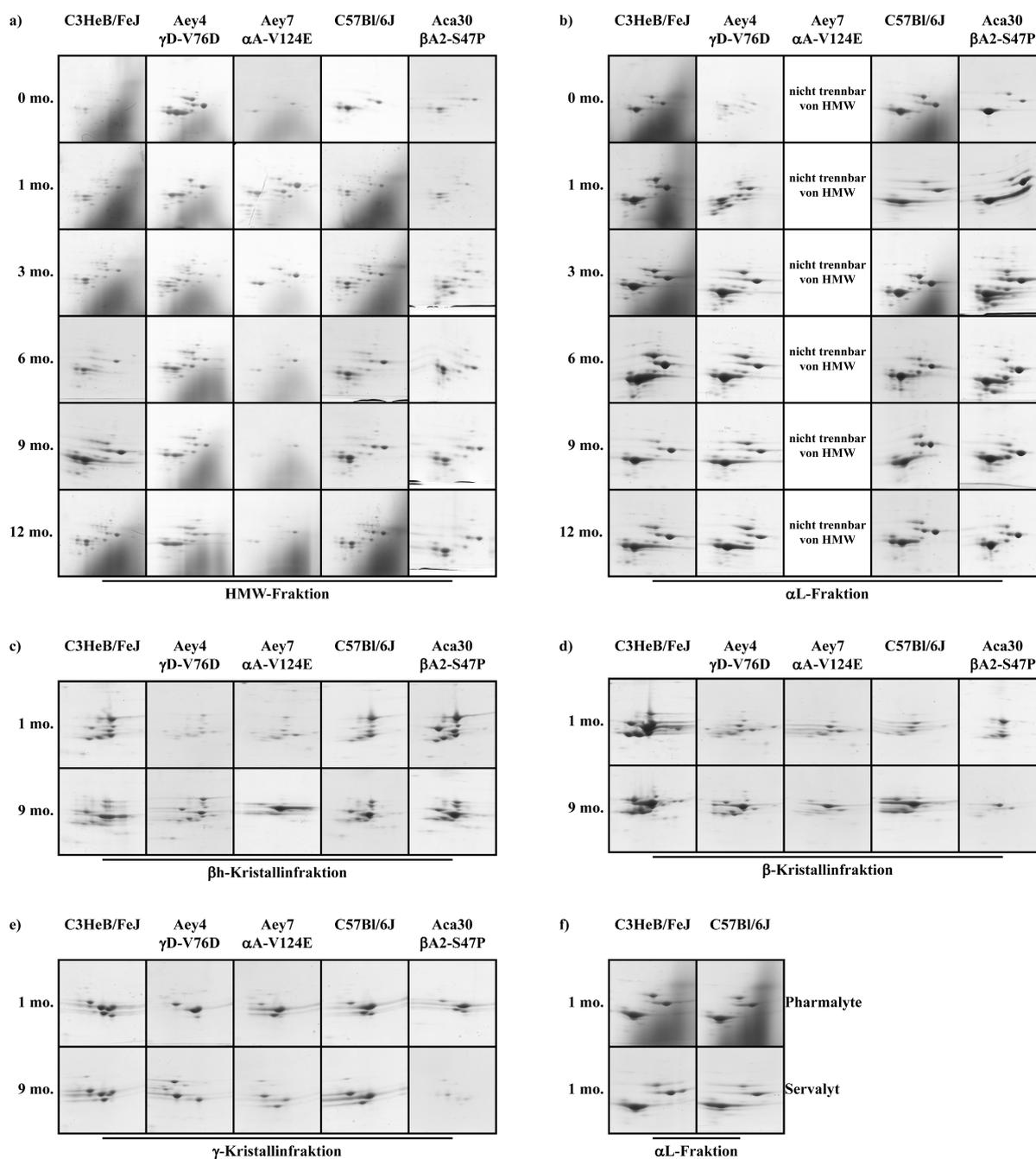


Abbildung S7: Übersicht über die 2D-Karten der Kristallinfraktionen im wasserlöslichen Teil von Linsenextrakten. Gezeigt sind die 2D-Karten nach der Fraktionierung des wasserlöslichen Teils von Linsenextrakten mittels SEC-HPLC. Für alle Mausstämme (C3HeB/FeJ, Aey4 und Aey7, sowie C57Bl/6J und Aca30) wurde die HMW- (a) und αL-Fraktion (b) von 0 bis 12 Monaten analysiert. Für die βh- (c), β- (d) und γ-Kristalline (e) erfolgte die 2-DE mit den Fraktionen aus 1 und 9 Monate alten Linsen. Das zunächst verwendete Trägerampholyt (Pharmalyte) zeigte Färbungsartefakte nach Abschluss der 2-DE, beeinflusste aber nicht das Laufverhalten der Proteine (f). Durch den Austausch gegen Servalyt konnten diese Effekte vermieden werden. Für die densitometrische Auswertung der 2D-Gele der HMW- und αL-Fraktion wurde das Hintergrundsignal mit der *rolling ball*-Funktion des Programms ImageJ bei einem Radius von 50,0 Pixeln ermittelt und abgezogen. Für die HMW- und αL-Fraktion wurden bis zu 25 µg Protein aufgetragen. Im Falle der βh-, β- und γ-Kristallinfraktion wurden bis zu 13 µg Protein eingesetzt.

11 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 2015 bis März 2019 am Lehrstuhl für Biotechnologie der Technischen Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. Johannes Buchner angefertigt.

Ihm gilt mein besonderer Dank für die exzellente wissenschaftliche Betreuung und für den Freiraum meine wissenschaftlichen Ideen und Vorschläge umsetzen zu können. Genauso möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, dass ich mir durch die sehr gute instrumentelle Ausstattung des Lehrstuhls ein breites Methodenspektrum aneignen und erste Industrieerfahrung sammeln konnte.

Ebenso möchte ich mich herzlich bei Martin Haslbeck für die immer freundliche wissenschaftliche, aber auch praktische Unterstützung bedanken. Dieser Dank gilt auch für Margot Rubinstein für ihre stete Hilfsbereitschaft und den herzlichen Umgang.

Bei Bettina Richter möchte ich mich herzlich für ihre immerwährende und verlässliche Unterstützung bedanken. Ohne ihre große Hilfe wäre es nie in so kurzer Zeit zu so großen Fortschritten bei meinen Projekten gekommen. Ungleich weniger haben jedoch auch Anja Osterauer und Florian Rührnöbl durch ihre experimentelle Hilfe zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso wenig wäre die vorliegende Arbeit ohne die intensive Unterstützung von Prof. Dr. Jochen Graw und seiner Arbeitsgruppe, insbesondere durch Erika Bürkle und Monika Stadler, am Helmholtz Zentrum München zustande gekommen - auch dafür herzlichen Dank.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Sevil Weinkauff für ihre Funktion als meine persönliche Mentorin und die sehr angenehme Zusammenarbeit nicht nur mit ihr, sondern mit allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Elektronenmikroskopie. Besonders hervorheben möchte ich die Zusammenarbeit mit Christoph Kaiser und Carsten Peters, die mir auch über die Wissenschaft hinaus viel Freude bereitet hat.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei Prof. Dr. Kathrin Lang und ihrer Arbeitsgruppe, insbesondere Susanne Mayer und Marie-Kristin von Wrisberg, die mir beim Thema „*Genetic Code Expansion*“ immer freundlich weiter geholfen haben.

Auch bei Nicole Lim, Christina Nickels, Jasmin König und Benedikt Weber möchte ich mich für die immer heitere und angenehme Atmosphäre in Büro Nummer 6 bedanken.

All jenen sei auch gedankt, die ich leider nicht mehr namentlich erwähnten konnte, die mir aber bei der wissenschaftlichen Arbeit und darüber hinaus geholfen haben.

Mein größter Dank jedoch gilt Johanna und meiner Familie ohne die, die vorangegangenen Zeilen vielleicht nie zustande gekommen wären.

12 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit wurde bisher keiner Prüfungskommission vorgelegt. Teile dieser Arbeit werden in wissenschaftlichen Journalen veröffentlicht.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

München, 14. März 2019

Philipp Schmid