

**Hefe Erv1 Protein und das homologe Säugerprotein
sind essentielle mitochondriale Sulphydryloxidasen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Jeung-Eun Lee
aus Seoul

Düsseldorf 2002

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

1. Referent: Prof. Dr. Thomas Lisowsky
2. Referent: Prof. Dr. Hanns Weiss

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Januar 2002

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Das <i>ERV1</i> Gen der Hefe: Duale Funktion für Mitochondrien und Zellwachstum	3
2.2. Sequenz und Datenbankanalyse des <i>ERV1</i> Gens	4
2.3. Die konservierte C-terminale Domäne von Erv1p/Alrp wurde während der Evolution mit anderen Redoxproteinen fusioniert	7
2.4. Problemstellung	8
3. Material und Methoden	10
3.1. Antikörper	10
3.2. Mikroorganismen, Zelllinien, Vektoren und Oligonukleotide	10
3.3. Anzucht der Bakterien	11
3.4. Transformation von Bakterien	11
3.5. Allgemeine molekularbiologische Methoden	12
3.6. Zellkulturmethoden	13
3.7. Proteinchemische Methoden	14
3.7.1. Expression	14
3.7.2. Proteinanalysen	17
3.7.3. UV/VIS-Spektroskopie	22
3.8. Stellengerichtete PCR-Mutagenese	22

3.9.	Sequenzierung von Plasmid-DNA	23
3.10.	Der Enzymtest	23
3.10.1.	Präparation von reduziertem Lysozym als Substrat für Erv1p	23
3.10.2.	Messung der Sulfhydryloxidaseaktivität	23
3.10.3.	Auswertung	24
4.	Ergebnisse	25
4.1.	Konstruktion der Expressionsplasmide pET-ALR und pET-Erv1	25
4.2.	Überexpression und Aufreinigung der Proteine	26
4.3.	Erv1p/Alrp enthalten FAD als Cofaktor	28
4.4.	Enzymatische Aktivität der Proteine	29
4.5.	Erv1p bildet Dimere unter nicht-reduzierenden Bedingungen und der Aminoterminus ist essentiell dafür	31
4.6.	<i>In vitro</i> Mutagenesestudien	34
4.6.1.	Ein spezifischer Cystein-Rest von humanem Alrp ist essentiell für die enzymatische Aktivität	35
4.6.2.	Cysteine in Hefeproteinen	35
4.6.3.	Gezielte <i>in vitro</i> Mutagenese von Cysteinen in Erv1p	36
4.6.4.	Analyse der Spektren der mutierten Erv1 Proteine	36
4.6.5.	Sulfhydryloxidaseaktivität der mutierten Proteine	39
5.	Diskussion	42
5.1.	Funktionen von Erv1p/Alrp	42
5.1.1.	Erv1p/Alrp als FAD-abhängige Sulfhydryloxidase	42
5.1.2.	Ist die Sulfhydryloxidaseaktivität die einzige Funktion von Erv1p/Alrp?	45

5.2.	Zusammenfassung der Daten zur Cystein-Mutagenese	46
5.3.	Interpretation der Ergebnisse anhand der aktuellen Kristallstruktur des verwandten Ery2 Proteins der Hefe	51
6.	Literaturverzeichnis	54

1. Zusammenfassung

Das Erv1 Protein der Hefe ist ein kleines Polypeptid von ca. 22 kDa, das essentiell ist für die mitochondriale Biogenese und für das Wachstum bzw. Überleben der Zellen. Die konservierte carboxy-terminale Domäne dieses Proteins enthält zwei benachbarte Cysteine. In homologen Proteinen wurde dieses CXXC-Motiv kürzlich als redoxaktives Zentrum einer Sulfhydryloxidase beschrieben. Diese Enzyme verknüpfen unter Bildung von H₂O₂ zwei Cysteine zu einem Disulfid. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass es sich auch beim Erv1p und dem homologen Protein der Säugetiere um FAD-abhängige Sulfhydryloxidasen handelt. Für die Aktivität reicht die C-terminale Domäne des Proteins aus und in Säugetieren werden unter bestimmten physiologischen Bedingungen auch verkürzte Formen des Proteins gefunden. *In vitro* werden reduzierte Proteine gegenüber kleinen chemischen Molekülen wie Glutathion als Substrate bevorzugt. Die Zielmoleküle dieses Enzyms *in vivo* sind bis jetzt unbekannt, aber die charakteristischen Veränderungen der Mitochondrien bei der Inaktivierung des *ERV1*-Gens und die Lokalisation des Proteins im Intermembranraum der Mitochondrien deuten an, dass integrale Membranproteine der Mitochondrien potentielle Zielproteine sein könnten.

Neben dem redoxaktiven CXXC Motiv enthält das Hefeprotein noch vier weitere Cysteine. Mit molekulargenetischen Methoden wurden 4 von allen 6 vorhandenen Cysteine gegen Serinreste ausgetauscht. Biochemische Untersuchungen und Komplementationsstudien zeigen, dass diese Cysteinreste *in vitro* und *in vivo* eine Bedeutung für die Funktion des Proteins haben. Kürzlich wurde die atomare Struktur des homologen Erv2 Proteins veröffentlicht, das Disulfidbrücken im endoplasmatischen Retikulum der Hefe bilden kann. Der Vergleich der Proteine, die beide als Homodimere vorkommen, erlaubt eine genauere Interpretation der untersuchten Mutanten. Danach sind zwei der Cysteine primär für die Struktur der FAD-Bindungstasche notwendig und nehmen wahrscheinlich nicht an der Redoxreaktion teil. Das verbleibende

Cysteinpaar liegt im N-terminalen, flexiblen Arm des Proteins. Dadurch kann es sowohl mit dem Substrat reagieren als auch mit dem aktiven Zentrum des zweiten Monomers. Dieser Befund unterstreicht die funktionelle Bedeutung der Dimerisierung des Proteins.

2. Einleitung

2.1. Das *ERV1* Gen der Hefe: Duale Funktion für Mitochondrien und Zellwachstum

Auf der Suche nach Genen, die für Interaktionen von Mitochondrien und Zellkern notwendig sind, wurden eine Reihe von Hefemutanten untersucht, die bei einer erhöhten Temperatur nicht mehr auf Glycerolmedium wachsen können, da ihre oxidative Phosphorylierung defekt ist. Normalerweise überleben diese Mutanten mit Hilfe der Glykolyse. Eine dieser Mutante, *pet-ts492*, zeigt aber bei der restriktiven Temperatur nach dem Ausfall der oxidativen Phosphorylierung eine ungewöhnliche Zellzyklusarretierung, die zum Absterben der Zellen führte (Lisowsky 1992). Durch Komplementationsexperimente wurde das mutierte Gen identifiziert und aufgrund seiner dualen Funktion für oxidative Phosphorylierung und Lebensfähigkeit der Zelle wurde das Gen *ERV1* (Essential for Respiration and Viability) genannt.

Bereits bei der permissiven Temperatur zeigt die Mutante *pet-492* gegenüber dem Wildtyp eine drastische Änderung der Morphologie und Verteilung der Mitochondrien (Becher *et al.* 1999). Diese akkumulieren als kleine Vesikel an gegenüberliegenden Polen der Zelle. Die oxidative Phosphorylierung wird jedoch erst bei der restriktiven Temperatur vollständig blockiert. Die innere Membran der Mitochondrien verliert ihre typischen *Cristae* und geht anschliessend vollständig verloren. Nach längerer Inkubation bei der restriktiven Temperatur ist der Verlust des mitochondrialen Genoms mit anschliessendem völligen Verschwinden der mitochondrialen Organellen zu beobachten. Da in den Mitochondrien neben der ATP-Synthese auch andere wichtige Biosynthesewege lokalisiert sind, führt der vollständige Verlust dieser Organellen zum Absterben der Zellen (Church und Poyton 1998, Jarosch *et al.* 1997).

2.2. Sequenz und Datenbankanalyse des *Erv1* Gens

Das *ERV1* Gen kodiert ein Protein von 189 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 22 kDa. Auffällig sind drei über die Sequenz verteilte Cysteinpaare (siehe Abb.1.1). Das Cysteinpaar in der Mitte von *Erv1p* besitzt Ähnlichkeit mit den redoxaktiven Zentren anderer bekannter Redoxfaktoren wie Thioredoxin (Chivers *et al.* 1997). Datenbankvergleiche identifizierten ein homologes Protein von Säugetieren, das mit *ALR* für Augmenter of Liver Regeneration bezeichnet wird (Lisowsky *et al.* 1995, Lisowsky 1996, Giorda *et al.* 1996). Wie der Name schon andeutet, wurde das entsprechende Genprodukt von *ALR* als ein potentieller hepatischer Wachstumsfaktor beschrieben (Francavilla *et al.* 1987, 1991, 1993, 1994). Eine Besonderheit der Leber ist ihre Regenerationsfähigkeit, die ein vollständiges Zurückwachsen auf die Ursprungsgröße z.B. nach einer operativen Entfernung eines Teils der Leber ermöglicht (Michalopoulos und DeFrances 1997). Nach Verletzung oder Schädigung der Leber findet man in den regenerierenden Bereichen dieses Organs eine hohe Expression von *Alrp*. Es konnte gezeigt werden, dass durch Injektion von isoliertem *Alrp* das Wachstum der Hepatozyten während der Leberregeneration gesteigert wird (Hagiya *et al.* 1994). Dabei induziert *Alrp* selbst keine Mitosen, sondern verstärkt die proliferative Aktivität sich teilender Hepatozyten. Somit stellt *Alrp* einen sekundären, hepatischen Wachstumsfaktor dar.

```

      ↓
1  MKAIDKMTDN PPQEGLSGRK I IYDEDGKPC RSCNTLLDFQ YVTGKISNGL
      ↓
51  KNLSSNGKLA GTGALTGEAS ELMPGSRTYR KVDPPDVEQL GRSSWTL LHS
101 VAASYPAQPT DQQKGEMKQF LNIFSHIYPC NWCAKDFEKY IRENAPQVES
151 REELGRWMC E AHNKVNKKLR KPKFD CNFWE KRWKDGWDE

```

Abb. 1.1: Die Primärstruktur von *Erv1p*. Das Protein besteht aus 189 Aminosäuren und enthält 6 Cysteine. Die vorhandenen Cysteine sind unterstrichen und fett geschrieben. Es kommen 2 Startcodons an der Position 1 und 73 (Pfeil) vor. *In vivo* wird aber nur das erste ATG genutzt.

Während vom *ERV1* Gen der Hefe nur 1 Protein gebildet wird, verläuft die Expression des *ALR* Gens in höheren Organismus komplexer. Ausgehend von einer einzigen Kopie im Genom der Maus auf Chromosom 17 und beim Menschen auf Chromosom 16 wurden verschiedene Formen des Proteins mit unterschiedlichen Molekulargewichten gefunden (Giorda *et al.* 1996). Es ist möglich, dass die verschiedenen Formen von Alrp regulatorische Bedeutung haben und durch Initiation der Translation an verschiedenen ATGs der mRNA entstehen. Dadurch werden Proteine mit verkürzten N-terminalen Bereichen translatiert, so dass Formen mit 23 kDa bzw. 15 kDa beobachtet werden (Giorda *et al.* 1996, Rose *et al.* 1997). Die N-terminalen Domäne von Erv1p ist notwendig für den Import des Proteins in die Mitochondrien (Lisowsky 1996). Daher ist die lange Form von Alrp mit den Mitochondrien assoziiert, wohingegen die kurze Form im Cytosol akkumuliert (Hagiya *et al.* 1994, 1995, Giorda *et al.* 1996, Hofhaus *et al.* 1999).

Die Ähnlichkeiten zwischen dem *ERV1* Gen und dem *ALR* Gen sind im C-terminalen Bereich besonders gross. Mit entsprechenden Komplementationsstudien an der Hefe konnte gezeigt werden, dass dieser Teil des humanen *ALR* Gens den Teil des Hefe *ERV1* Gens auch funktionell ersetzen kann (Lisowsky *et al.* 1995, Hofhaus *et al.* 1999). Analysen der genomischen Datenbanken zeigen, dass der C-terminale Teil von Erv1p/Alrp ubiquitär bei allen eukaryontischen Organismen vorkommt. Die Vergleiche der abgeleiteten Proteinsequenzen ergeben für die C-terminale Domäne eine Konservierung mit ca. 40% identischer Aminosäuren an vergleichbaren Positionen (Abb. 1.2). Vor allem das schon erwähnte CXXC-Motiv kommt in allen Proteinen vor, wobei auch benachbarte Aminosäurereste stark konserviert sind. Im Unterschied dazu ist die N-terminale Domäne selbst zwischen eng verwandten Organismen wie Maus, Ratte und Mensch nicht so stark konserviert (Lisowsky *et al.* 1995, 1996) und zeigt bei weiter entfernten Spezies sogar fast keine Sequenzähnlichkeiten mehr. Die besonderen strukturellen und funktionellen Konservierungen von Erv1p und Alrp lassen aber trotzdem vermuten, dass Erv1p während der Evolution von der Hefe bis zum Menschen vergleichbare zelluläre Funktionen

behalten hat und damit diese Proteinfamilie eine fundamentale Funktion in der eukaryontischen Zelle erfüllt.

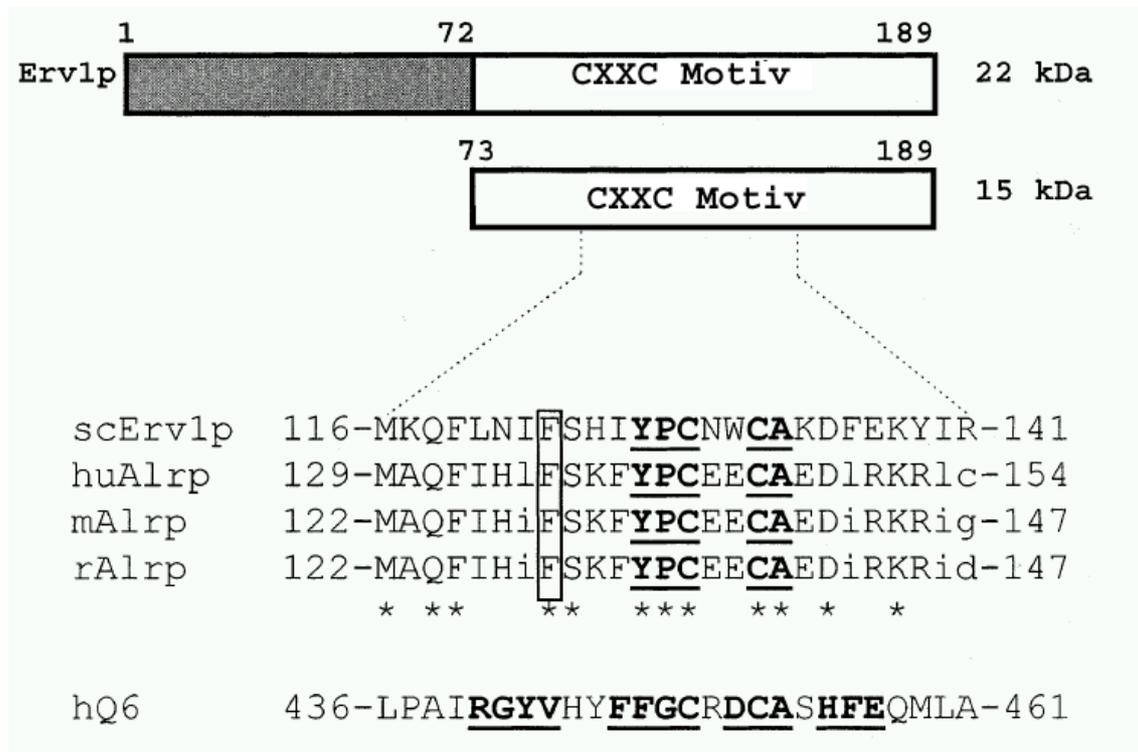


Abb. 1.2: Domänen von Hefe Erv1p. Das Protein enthält 189 Aminosäuren. Das N-terminale Fragment (grauer Teil) mit den ersten 72 Aminosäuren zeigt keine Homologien mit anderen Proteinen. Die C-terminale Domäne (weißer Teil) mit den Aminosäuren von der Position 73 bis 189 hat ca. 40% Homologie mit Alrp und enthält das konservierte CXXC-Motiv. Sequenzvergleiche von diesem Bereich wurden für Hefe (sc) Erv1p, humanes (hu), Maus (m) und Ratten (r) Alrp gemacht. Identische Aminosäuren bei den gleichen Positionen in allen 4 Proteinen wurden mit Sternchen(*) markiert. Nummern am Ende der Sequenzen zeigen die Position der Aminosäuren in den Proteinen. Die konservierten, am CXXC-Motiv liegenden Aminosäuren wurden unterstrichen und fett geschrieben. Die Domäne vom humanen Q6 Protein, die das Cysteinpaar im redoxaktiven Zentrum enthält, ist in diese Abbildung eingefügt. Wichtige Aminosäuren für das Konsensus-Motiv des Q6 Proteins sind auch unterstrichen und fett geschrieben.

Die Hefe besitzt ein zweites Gen, das *ERV2*, welches Homologien zu *ERV1* aufweist. Das Protein Erv2p besteht aus 196 Aminosäuren und enthält auch das konservierte CXXC Motiv im C-Terminus. Es konnte aber gezeigt

werden, dass *ERV2* die Funktion von *ERV1* nicht übernehmen kann (Stein und Lisowsky 1998). Erv2p ist im ER lokalisiert (Gerber *et al.* 2001), während Erv1p überwiegend im Intermembranraum der Mitochondrien vorkommt.

2.3. Die konservierte C-terminale Domäne von Erv1p/Alrp wurde während der Evolution mit anderen Redoxproteinen fusioniert

Es sind noch weitere Proteine bei höheren Eukaryonten bekannt, die signifikante Homologien zur C-terminalen Domäne von Erv1p/Alrp aufweisen. So besitzt das aus 582 AS bestehende Q6 Protein (Quiescin 6) in der C-terminalen Domäne einen Bereich, der homolog zur konservierten Domäne von Erv1p/Alrp ist. Das Q6 Protein wurde als ein Wachstumsfaktor beschrieben, der von der Zelle exkretiert wird. In humanen Fibroblastenkulturen konnte gezeigt werden, dass die Expression induziert wird, wenn die Zellen ihren proliferativen Zellzyklus verlassen und in der G1-Phase arretieren (Coppock *et al.* 1993). Die N-terminale Domäne zeigt Verwandtschaft zu der bereits bekannten Thioredoxin-Proteinfamilie. Offenbar ist das Q6 Gen aus der Fusion von Domänen der beiden ursprünglichen *TRX*- und *ERV1* Genfamilien hervorgegangen (Coppock *et al.* 1998) (Abb. 1.3).

Überraschend ist, dass die *ERV1/ALR* Gene nicht nur in niederen und höheren Eukaryonten vorkommen, sondern auch auf dem Genom doppelsträngiger DNA-Viren gefunden wurde (Yanez *et al.* 1995). Das entsprechende *E10R* Gen kodiert für ein 12 kDa Protein, das eine Redoxfunktion bei der Assemblierung der Virushülle im Cytosol der Zelle hat (Lewis *et al.* 2000, Senkevich *et al.* 2000).

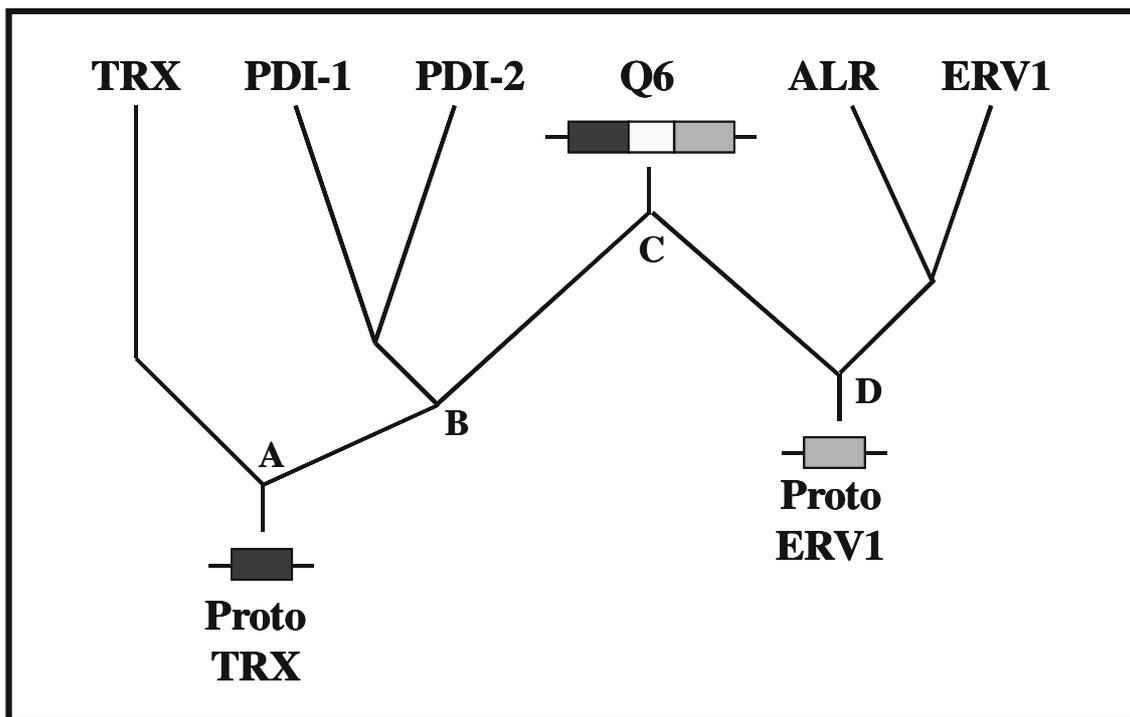


Abb. 1.3: Schema für die evolutionäre Entstehung des Q6-Gens durch Genfusion aus 2 alten Genfamilien Thioredoxin und ERV1.

2.4. Problemstellung

Trotz der ubiquitären Verbreitung des Gens ist die Funktion des Proteins nicht bekannt. Die oben beschriebenen Aufgaben für die Zelle sind sehr divers und lassen keinen eindeutigen Rückschluss auf die enzymatische oder zelluläre Funktion zu. Entscheidend für die vorliegende Arbeit ist, dass für rekombinantes Q6 Protein kürzlich zum erstenmal eine definierte Sulfhydroxidasefunktion nachgewiesen werden konnte (Hooper *et al.* 1999). Aus *E. coli* sind die sogenannten DsbB -Proteine bekannt, die ebenfalls ein CXXC Motiv besitzen, das durch die Proteine der prokaryontischen Atmungskette reduziert wird (Kobayashi *et al.* 1997). Die Untersuchung der möglichen Redoxfunktion von Erv1p/Alrp in Verbindung mit der mitochondrialen Atmungskette ist daher ein erster Ansatz, um die Funktion des Protein zu verstehen.

In dieser Arbeit wurde daher versucht an rekombinantem Protein eine Redoxaktivität des Alr/Erv1 Proteins nachzuweisen. Die Struktur dieses Proteins mit seinen 6 Cysteinen ist in Hefe ungewöhnlich, da in diesem Organismus aufgrund der Anpassung an eine schwefelarme Umgebung nur funktionell wichtige Cysteine konserviert werden. Durch systematische Mutagenese dieser Cysteine, sollte deren Funktion untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1. Antikörper

primäre Antikörper α -GFP (Boehringer Mannheim)
 α -Erv1p (Lisowsky)
 α -Alrp (Universität Düsseldorf)

sekundäre Antikörper

α -Maus IgG, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase (Boehringer)
 α -Kaninchen IgG, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase (Boehringer)

3.2. Mikroorganismen, Zelllinien, Vektoren und Oligonukleotide

Mikroorganismen

E. coli BL 21(+) (Novagen)
 DH5 α (Hanahan, 1983)

Zelllinien

143B humane Osteosarkomazelllinie
ALR-GFP mit pALR-GFP transfizierte 143B (Hofhaus, 1998)

Vektoren

pALR-GFP (Hofhaus, 1998)
pET24a(+) (Novagen)

Oligonukleotide

nde1-alr-his 5'-CGACTTCAAGTGCCATATGGCGGCGCCCGGCGAGCGG-3'
huALR-His-2 5'-CCCCTCGAGGTCACAGGAGCCATCCTTCCA-3'

Mut-Alr-f	5'-TGCTGAAGACCTAAGAAAAAGGCTG-3'
Mut-Alr-r	5'-GACTCCTCACAGGGGTAAAACCTTAG-3'
1Erv1-Nde-F	5'-AATACAAAGCCATATGAAAGCAATAGATAAAATG-3'
2Erv1-Nde-F	5'-CTTCAGAGCATATGCCTGGCTCAAGAACATAC-3'
Erv1-Xho-R	5'-GATTGCTCGAGTTCGTCCCAGCCGTCCTTCCA-3'
Erv1-1C-F	5'-CGATCATGTAACACCCTAC-3'
Erv1-1C-R(N)	5'-CGAAGGTTTGCCATCTTCG-3'
Erv1-3c-F(M)	5'-CCAATTGGTGTGCTAAAGACTTTG-3'
Erv1-5C-F	5'-GCCACAATAAAGTCAATAAGAAAT-3'
Erv1-5C-R	5'-CTCAGACATCCACCTCCCAAGTTCTT-3'
Erv1-6C-F(P)	5'-CTCCAATTTCTGGGAAAAAAGATGGAAG-3'
Erv1-6C-R	5'-TCAAATTTGGGCTTCCTCAATTC-3'

3.3. Anzucht der Bakterien

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte im LB-Medium auf einem Schüttler bei 37°C. Zunächst wurden 100 ml Vorkulturen mit dem Stamm angeimpft und diese über Nacht wachsen gelassen. Da die Bakterien durch die Aufnahme des Plasmids ein Resistenzgen erworben haben, wurden die Bakterien durch Zugabe des Antibiotikums mit dem Plasmid selektiert. Anschliessend wurden die Vorkulturen auf 1l Hauptkulturen überimpft und diese bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen (Verdopplungszeit ca. 40 min). Für Stammkulturen wurden 0,5 ml Bakteriensuspension mit 0,5 ml Glycerin vermischt und bei -70°C aufbewahrt.

LB-Medium: 1% (w/v) Bacto-Trypton; 1% (w/v) NaCl; 0,5% (w/v) Hefeextrakt

3.4. Transformation von Bakterien

Die Transformation von *E. coli* erfolgte nach Inoue *et al.* (1990). 200 µl tiefgefrorene, kompetente Zellen wurden aufgetaut und mit 10-100 ng DNA in maximal 10 µl Volumen für 15 min auf Eis inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen für 90 s auf 42°C erwärmt, dann auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 1 ml LB-Medium 1 h bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden kurz abzentrifugiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Platten mit Antibiotikum ausplattiert.

3.5. Allgemeine molekularbiologische Methoden

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde die "Boiling-Lysis"-Methode (Sambrook *et al.*, 1989) verwendet. 1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden 5 min bei 5 000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, das Bakteriensediment in 500 µl kaltem STET (50 mM Tris-Cl, pH 8,0; 50 mM EDTA; 8% Saccharose; 5% Triton X-100) aufgenommen, mit 10 µl Lysozymlösung (40 mg/ml) versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension 3 min im kochenden Wasserbad erhitzt, auf Eis gekühlt und 15 min bei 14 000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen des Sedimentes wurde der Überstand mit 0,5 ml kaltem Isopropanol versetzt, die DNA 5 min auf Eis gefällt und 10 min bei 14 000 rpm abzentrifugiert. Die gefällte DNA wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in Wasser gelöst. Für die präparative Plasmidisolierung wurden die Zellen aus einer 100 ml Übernachtskultur geerntet. Die DNA wurde mit dem QIAGEN Midi Kit (Qiagen) nach den Herstellervorschriften isoliert und in H₂O aufgenommen.

Restriktionsverdau von 0,2-2 µg Plasmid-DNA wurden in 20 µl Gesamtvolumen mit 0,5-2 U Enzym (Pharmacia, Boehringer) für 1-2 h nach Herstellerangaben (Boehringer Puffersystem) durchgeführt. Genomische DNA in grossen Mengen wurde in 100 µl Gesamtvolumen mit bis zu 20 U Enzym

über Nacht verdaut. Die Ligation von DNA erfolgte mit T4-Ligase (Boehringer) nach Herstellerangaben

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die DNA mit dem jeweiligen Restriktionsenzym geschnitten und in einem Agarosegel aufgetrennt. Die gewünschte Bande wurde unter UV-Licht (366 nm) lokalisiert, mit einem scharfen Skalpell herausgeschnitten und mit dem QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellervorschrift isoliert.

Die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde im GenAmp® PCR System (Fa. Perkin Elmer) durchgeführt (Mullis & Faloona, 1987). Alle Reaktionen wurden als Heissstart-PCR (D'Aquila *et al.*, 1991) in einem Gesamtvolumen von 100 µl in dünnwandigen 200 µl Reaktionsgefäßen (Biozym Diagnostik GmbH) durchgeführt. Die Reaktionsansätze bestanden aus 0,5-1 ng Plasmid-DNA bzw. 10-100 ng genomischer DNA als Matrize, PCR-Puffer (Qiagen, Boehringer), 1,5 mM NaCl₂, 0,2 mM dNTPs und 100 pmol beider Primer. Anschließend wurden 2 U Taq-Polymerase (Qiagen, Boehringer) kurz vor dem Reaktionsbeginn zugegeben. Die Reaktionen begannen mit der Denaturierung bei 94°C für 90 s. Es wurden 20-35 Zyklen der Primerhybridisierung, DNA-Synthese und Denaturierung unter variierenden Bedingungen durchgeführt. Nach Beendigung der Zyklen wurde zur vollständigen DNA-Synthese 7 min bei 72°C inkubiert.

3.6. Zellkulturmethoden

Zur Kultivierung der Zelllinie wurde das Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) unter Zusatz von 5% fötalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin/Kanamycin-Lösung (GISCO) angesetzt. Die Anzucht erfolgte in 10 cm Kulturplatten mit 10 ml Medium im Brutschrank. Da die Zellen

die im Medium enthaltenen Nährstoffe verbrauchen und Stoffwechselprodukte ausscheiden, muss das Medium alle 2-3 Tage gewechselt werden. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen und alle Medien, die zu den Zellen gegeben wurden, waren vorher auf 37°C erwärmt worden.

Wenn der Boden der Kulturschale von den adhärennten Zellen vollständig bedeckt ist, stellen die Zellen ihr Wachstum ein und sterben anschließend ab. Daher mussten die Zellen durch Umplattierung regelmäßig verdünnt werden. Hierzu wurde das Kulturmedium der Platten entfernt und die Zellen mit 5 ml einer Trypsin/EDTA Lösung bedeckt. Die nach ca. 4 min. Inkubation von der Platte abgelösten Zellen wurden mit 500 µl New Born Calf Serum (NBCS) zum Abstoppen der Wirkung des Trypsins versetzt und anschließend bei 1100 rpm geerntet. Das Zellpellet wurde dann im Kulturmedium resuspendiert und je 10⁴ Zellen auf neue Platten zur Weiterkultur gegeben.

Trypsin/EDTA Lösung: 0,1% Trypsin in 25 mM Tris; 137 mM NaCl;
7 mM Na₂HPO₄; 1 mM EDTA; 5 mM KCl; pH 7,5

3.7. Proteinchemische Methoden

3.7.1. Expression

3.7.1.1. Plasmidtransfektion

Für die Expression von verschiedenen GFP Fusionsproteinen in Zellen wurde fremde Plasmid DNA über kationische Liposomen-vermittelte Transfektion in die Zelle geschleust. Am Vortag der Transfektion wurden ca. 6 x 10⁴ Zellen je Gefäß einer 24-Proben Kulturplatte (SARSTEDT) in 500 µl Kulturmedium angesetzt und über Nacht inkubiert. Am Tag der Transfektion wurde das Medium der Proben durch je 1 ml frisches ersetzt und verschiedene Verhältnisse von DNA/DOSPER-Mischungen hergestellt (Plasmid DNA: 0,5-

2,0 µg; DOSPER: 1-4 µg, Boehringer); jeweils verdünnt in HBS, um optimale Transfektionsbedingungen zu ermitteln. Zur Bildung des Liposomen-Polynucleotid-Komplexes wurden die DOSPER/DNA Mischungen 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise zu den Kulturen gegeben, um eine einheitliche Verteilung dieser Lösungen zu erzielen. Nach 6 h Inkubation wurde die Transfektionslösung durch einen Medienwechsel entfernt und die Kulturen weitere 24 h inkubiert.

HBS: 20 mM Hepes; 150 mM NaCl; pH 7,4: sterilfiltriert

3.7.1.2. Fluoreszenzmikroskopie von GFP Fusionsproteinen

Die Expression der GFP Fusionsproteine in den Zellen konnte über Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Das GFP absorbiert blaues Licht und emittiert grünes Licht. Zellkulturen, in denen viele Zellen das grün fluoreszierende Protein unter dem Fluoreszenzmikroskop aufwiesen, wurden für weitere proteinbiochemische Analysen eingesetzt.

3.7.1.3. heterologe Überexpression von FAD-bindenden Proteinen in *E. coli*

Nach Anzucht des *E. coli* BL 21 Stammes wurde die Expression des 6×His-markierten Proteins durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration von 1 mM) induziert. Um eine Limitierung an FAD während der Überexpression des FAD-bindenden Proteins auszuschliessen, wurde der Kultur eine FAD Endkonzentration von 1 µg/ml hinzugegeben. Die Überexpression erfolgte im Schüttler bei 28°C für 24 h. Danach konnten die Zellen bei 8000 rpm und bei 4°C geerntet werden.

3.7.1.4. Isolation löslicher Proteine aus *E. coli*

Der Zellaufschluss der *E. coli* Zellen erfolgte unter hohem Druck. Zunächst wurden die unter 3.5.1.3 geernteten Zellen in Lysis Puffer (ca. 10 ml je 1L-

Zellkultur) resuspendiert und diese Zellsuspension in der Kammer einer French Press mehrmals einem hohen Druck von bis zu 1000 bar ausgesetzt. Anschliessend konnten die lysierten Zellen bei 18000 rpm für 10 min abzentrifugiert werden. Der Überstand, in dem sich die gelösten Proteine befanden, wurde für die Aufreinigung des 6×His-markierten Proteins eingesetzt.

Lysis Puffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0

3.7.1.5. Aufreinigung von 6×His-markierten Proteinen (QIAGEN)

Die carboxyterminalen 6 Histidine des überexprimierten Proteins ermöglichten eine schnelle und effiziente Aufreinigung über die spezifische Immobilisierung an Ni-NTA Agarose (Methode nach QIAGEN). Die Nitrilotriacetsäure (NTA), die an der Agarose geknüpft ist, bildet mit den Imidazolringen des 6×His-Endes einen Chelatkomplex, in dem Nickel als Zentralion über 6 koordinative Bindungen gebunden vorliegt.

Imidazol alleine kann diese Bindungen ebenfalls einnehmen. Durch Zugabe einer geringen Konzentration von Imidazolringen nach der Immobilisierung an der Ni-NTA Agarose werden unspezifische Bindungen anderer Proteine gelöst, ohne jedoch die spezifischen Bindungen der 6×His-markierten Proteine zu unterbinden. Erst durch weitere Erhöhung der Imidazolkonzentration verdrängen die Imidazolringe die spezifischen Bindestellen, so dass die 6×His-markierten Proteine von der Ni-NTA Agarose eluiert werden können.

Die Aufreinigung des löslichen Erv1p-6×His wurde unter nativen Bedingungen folgendermaßen durchgeführt (alle Schritte auf Eis):

1. Proteinlysate in 10 ml Rörchen aliquotieren und je 1 ml Ni-NTA Agarose (QIAGEN) zugeben.

2. Röhrcchen verschließen und diese waagrecht 1 h auf einen Kipp-Schüttler legen.
3. Ni-NTA Agarose bei 5000 rpm abzentrifugieren, Überstand verwerfen.
4. 10 ml Waschpuffer auf die Ni-NTA Agarose geben und durch Schwenken des Röhrcchen Agarose resuspendieren.
5. Schritte 3 und 4 zwei mal wiederholen, nach letzter Waschung Überstand abnehmen.
6. Ni-NTA Agarose in 2 ml Elutionspuffer resuspendieren und inkubieren lassen.
7. Ni-NTA Agarose bei 5000 rpm abzentrifugieren, Elutionslösung abnehmen und bei 4°C für die Proteinaufkonzentrierung aufbewahren.

Waschpuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0

Elutionspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0

3.7.1.6. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die allgemeine Proteinbestimmung erfolgte mit der Biuret-Methode (Beisenherz *et al.* 1953) mit Rinderserumalbumin als Standard.

Die Bestimmung der Konzentration des Erv1p-6×His Proteinkonzentrats erfolgte über die photometrische Konzentrationsbestimmung des gebundenen FAD bei einer Wellenlänge von 460 nm. Folgende Formel wurde zur Konzentrationsbestimmung herangezogen:

$$\text{OD}_{600}(\text{FAD}) = 0,1 \quad \text{entspricht } 10 \mu\text{M FAD} \quad (\epsilon_{\text{FAD}} = 10 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ bei } 460 \text{ nm})$$
$$\text{entspricht } 10 \mu\text{M Erv1p}$$

3.7.2. Proteinanalysen

3.7.2.1. Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli, 1970

Aus Glasplatten und Spacern wurden Gelkammern zusammengesetzt und zur Herstellung des Trenngels diese mit folgendem Gemisch bis ca. zwei cm unter der max. Füllhöhe aufgefüllt und anschließend mit Isopropanol überschichtet.

Trenngel: 3,0 ml Acrylamid-Stock
2,5 ml Lower Tris
4,5 ml H₂O
25 µl 10% Ammoniumpersulfat
5 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

Nach Auspolymerisierung des Trenngels wurde das Gemisch für die Herstellung des Sammelgels in die Kammer bis zur max. Füllhöhe gegeben und ein Slotformer eingesteckt.

Sammelgel: 850 µl Acrylamid-Stock
1250 µl Upper Tris
2900 µl H₂O
50 µl 10% Ammoniumpersulfat
5 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

Acrylamid-Stock:

30 g Acrylamid; 0,8 g N,N'-Methylen-Bis-Acrylamid; add 100 ml H₂O, filtrieren

Lower Tris: 1,5 M Tris HCl; 0,4% SDS; pH 8,8

Upper Tris: 0,5 M Tris HCl; 0,4% SDS; pH 6,8

Für den Gelelektrophoretischen Lauf wurde folgender Laufpuffer eingesetzt:

Laufpuffer: 3% Tris Base; 14,4% Glycin; 1% SDS

3.7.2.2. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese von Proteinen

Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte mit Hilfe des „NuPAGE Elektrophoresis System“ (INVITROGEN) in 4-12%igen Bis/Tris Gradientengelen bzw. in 10%igen Tris/Glycin Gelen, welche als Fertiggele von der Firma geliefert wurden. Als Laufpuffer wurde bei Verwendung der Bis/Tris Gele, 1 x Mes/SDS Laufpuffer bzw. bei Verwendung der Tris/Glycin Gele, 1 x Tris/Glycin/SDS Laufpuffer eingesetzt. Die Proteinproben wurden mit 5 x SDS/PAGE Puffer für reduzierende Bedingungen bzw. mit 4 x NuPAGE LDS Puffer für nicht reduzierende Bedingungen versetzt und zur Denaturierung für 5 min. auf 80°C erhitzt. Nach Abzentrifugation der Proben wurden von diesen max. 15 µl in die Probentaschen pipettiert und die Elektrophorese nach Vorschrift des Herstellers bei 200 V und 110 mA für ca. 35 min. durchgeführt.

20 x MES/SDS Laufpuffer:

97,6 g MES; 60,6 g Tris; 10 g SDS; 3 g EDTA; pH 7,3; add 500 ml H₂O

10 x Tris/Gly SDS Laufpuffer:

30 g Tris Base; 144 g Glycin; 10 g SDS; add 1000 ml H₂O

4x NuPAGE LDS Probenpuffer:

4g Glycerol; 0,682 g Tris Base; 0,666 g Tris-HCl; 0,8 g LDS;
0,006 g EDTA; 0,075% Serva Blau G250; 0,025% Phenol Rot;
add 10 ml H₂O

5 x SDS/PAGE Puffer:

250 mM Tris HCl, 10% SDS, 0,5% Bromphenolblau, 50% Glycerol,
500 mM DTT bzw. β-Mercaptoethanol (optional)

3.7.2.3. Westernblot

Die Proteine wurden mit Hilfe des „NuPAGE-System“ im Blot Module

(INVITROGEN) bei 25 V und 150 mA auf eine NC Membran geblottet. Der Blotaufbau erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers. Für den immunologischen Nachweis grösserer Proteine wurde die Blotzeit von zwei auf vier Stunden verlängert, um den Proteintransfer auf die NC Membran möglichst vollständig zu haben.

Transferpuffer:

4,08 g Bicine; 5,23 g Bis/Tris; 0,29 g EDTA; 10 mM DTT;
200 ml Methanol; pH 8,3; add 1000 ml

3.7.2.4. Ponceau S Färbung von Proteinen

Die auf die NC Membran mittels Elektrolot transferierten Proteine wurden durch eine Ponceau S Färbung sichtbar gemacht, um die auf das Gel aufgetragene Proteinmenge quantifizieren zu können. Hierfür wurde die NC Membran kurz auf eine Ponceau S Färbelösung bei leichtem Schütteln inkubiert und anschließend die Membran in Leitungswasser gewaschen, so dass nur noch die Proteinbanden die rote Färbung behielten. Durch mehrmaliges Waschen in PBST konnten die Banden wieder entfärbt werden.

Ponceau S Färbelösung:

2 g Ponceau S; 30 g TCA; 30 g Sulfosalicylsäure, add 200 ml H₂O

PBST: 1 x PBS; 0,1% Tween 20

3.7.2.5. Immunologischer Nachweis von Proteinen

Für den Nachweis von Proteinen wurden die NC Membranen mit den gebundenen Proteinen nacheinander in zwei verschiedene Antikörperlösungen inkubiert. Der primäre Antikörper bindet spezifisch an das Zielprotein, der sekundäre Antikörper, der mit einer enzymatischen Aktivität gekoppelt ist, bindet spezifisch an den primären. Die enzymatische Aktivität des sekundären

Antikörpers, die der alkalischen Phosphatase, kann durch Zugabe spezieller Chemikalien für Nachweisreaktionen genutzt werden, einmal über Auslösung von Chemilumineszenz oder über einer Farbumsetzung.

Für die Antikörperbindungen wurde zunächst die NC Membran kurz in PBST gewaschen und dann in Blocking Puffer für ca. 60 min. vorinkubiert, um die unspezifischen Bindestellen abzusättigen. Anschließend wurde der primäre Antikörper verdünnt in Blocking Puffer zugegeben und nach Inkubation über Nacht die Membran 3 x für je 5 min. in PBST gewaschen. Nach Inkubation im sekundären Antikörper für ca. 60 min, der ebenfalls in Blocking Puffer verdünnt wurde, erfolgte eine weitere 3 malige Waschung für je 5 min. in PBST.

Die mit den Antikörpern behandelte Membran wurde kurz für 2 x 2 min. in Assay Puffer geschwenkt und anschließend eine Lösung bestehend aus 1 ml CSPD ready-to-use Lösung (TROPIX) und 50 µl Nitro-Block II Lösung (TROPIX) auf den Filter gegeben und 5 min. im Dunkeln inkubiert. Danach wurde überschüssiges CSPD entfernt und die NC Membran luftblasenfrei in eine Klarsichtfolie gelegt. Die alkalische Phosphatase des sekundären Antikörpers katalysiert die Dephosphorylierung von CSPD zu CSD*. CSD* sendet bei seinem weiteren Zerfall Licht aus, welches auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden konnte.

Die mit den Antikörpern behandelte Membran wurde kurz in NBT/BCIP Puffer äquilibriert und anschliessend im gleichen Puffer, jedoch unter Zusatz von 340 µg/ml NBT und 170 µg/ml BCIP inkubiert. Nach erfolgter Farbumsetzung konnte die Aktivität der alkalischen Phosphatase durch Zugabe von Stopp Lösung abgebrochen werden.

Blocking Puffer: 1 x PBS; 0,2% Tween 20; 4% Magermilchpulver

10 x Assay Puffer: 200 mM Tris; 10 mM MgCl₂; pH 9,6

NBT/BCIP Puffer: 100 mM Tris; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; pH 9,6

Stopp Lösung: 100 mM Tris; 100 mM NaCl; 2 mM MgCl₂; pH 7,0

3.7.3 UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektren wurden an einem Diodenarray-Spektrometer (Spectrocord S10 UV/VIS, Zeiss) bei Raumtemperatur mit einer Quarzglasküvette der Schichtdicke 1cm aufgenommen. Zur Bestimmung der FAD-Konzentration wurde als Messbereich 350-650 nm gewählt. Dabei diente 50 mM Na_xH_xPO₄, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol pH 8,0 als Referenz. Die Spektren wurden mit dem Programm WINASPECT (Fa. Zeiss) ausgewertet.

3.8. Stellengerichtete PCR-Mutagenese

Die zielgerichtete Mutagenese wurde nach dem Vorschrift von „ExSite[™] PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) durchgeführt.

Die PCR-Mutagenese mit Primern mit Mismatch erfolgte mit der Boehringer DNA-Polymerase (long expand system). Hierbei wurden zur PCR je 100 pmol phosphorylierte Primer und 100 ng Template-DNA in 100 µl Volumen eingesetzt. Alle PCR-Reaktionen erfolgten in einem Thermocycler GenAmp PCR-System 2400 (Fa. Perkin-Elmer) in dünnwandigen Reaktionsgefäßen (Biozyme). Als Template-DNA diente der Plasmid pET-ALR bzw. PET-1ERV1. Die Fehlpaarung der Primer mit dem Template sollte eine Punktmutation erzeugt werden, wobei das gezielte Cysteincodon gegen Serincodon ausgetauscht wurde. Nach der PCR wurden die überhängenden Enden des PCR-Produktes mit 1 U *Pfu* DNA-Polymerase durch Inkubation für 1 h bei 37 °C aufgefüllt. Nach Abtrennen des PCR-Puffers mit dem Qiaquick PCR-Purification Kit (Qiagen) wurde die DNA für 2 h bei 37 °C mit 10 U *Dpn* I verdaut, welches

nur die methylierte Template-DNA spaltet, nicht aber das PCR-Produkt. Der Ansatz wurde 1:10 verdünnt zur Ligation eingesetzt, um das PCR-Produkt zum Plasmid zu schliessen. 10 µl des Ligationsansatzes wurden zur Transformation vom kompetenten *E. coli* Stamm BL21 eingesetzt. Aus den nach 15 h bei 37 °C auf LB/Kan-Platten herangewachsenen Kolonien wurden in flüssiges LB/Kan-Medium überführt und angezüchtet. Von der Bakteriensuspension wurden die Plasmide isoliert und per Restriktionsverdau analysiert. Um unerwünschte Mutationen im Plasmid auszuschliessen, wurde die DNA durchsequenziert.

3.9. Sequenzierung von Plasmid-DNA

Nach der Mutagenese wurde die erzeugte Plasmid-DNA durch eine Auftragssequenzierung bei der Firma MWG-Biotech überprüft. Die Sequenzierung erfolgte über Primer für den T7-Promotor.

3.10. Der Enzymtest

3.10.1. Präparation von reduziertem Lysozym als Substrat für Erv1p

Die Herstellung von reduziertem Lysozym erfolgte nach Hooper (Hooper *et al.* 1999). 40 mg Lysozym (Fluka) wurde in 2 ml entgastem Puffer (Guanidiniumhydrochlorid, 0,3 mM EDTA, 6 mM DTT) gelöst und bei pH 8,0 über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurde der pH-Wert mit Eisessig auf 3,5 eingestellt. Das überschüssige DTT wurde durch Gelfiltration mit einer Sephadex G-25 Säule, die mit entgastem Puffer (8 M Harnstoff, 0,1% Essigsäure (v/v), 3 mM EDTA) äquilibriert wurde, entfernt.

3.10.2. Messung der Sulphydryloxidaseaktivität

In einem 1,5 ml Eppendorffgefäß wurden $x \cdot 50$ pmol FAD-gebundenen Enzyme mit dem reduzierten Substrat in $x \cdot 100$ µl Messpuffer inkubiert. Der gleiche Ansatz ohne Enzym diente als Nullprobe. Bei x -maligen verschiedenen Zeitpunkten wurden je 100 µl Aliquot von dem Ansatz entnommen und mit 900 µl Nachweisreagenz (800 µl Messpuffer und 100 µl DTNB-Lösung, Ellman-Reagenz) hinzugegeben. Anschliessend wurde die Extinktion bei 412 nm gemessen (Pharmacia Biotech).

Messpuffer: 50 mM $\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$, 1 mM EDTA, 2 M Harnstoff, pH 7,5

DTNB-Lösung: 4 mg 5,5'-Dithio-bis-2-Nitrobenzoic acid in 10 ml Messpuffer

3.10.3. Auswertung

- Unterschied in reduziertem Thiol zwischen Nullwert und Enzymprobe (nach Ellman) ($\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 412 nm)

nmol Δ Thiol

$$= \{E_{412 \text{ nm}}(\text{Nullprobe}) - E_{412 \text{ nm}}(\text{Enzymprobe})\} \cdot \text{Volumen der Messküvette} / 13,6$$

- Umsatzzahl

$$\text{UZ min}^{-1} = \text{nmol Thiol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ pro nmol eingesetztes FAD}$$

4. Ergebnisse

4.1. Konstruktion der Expressionsplasmide pET-ALR und pET-ERV1

Die Reinigung von nativem Erv1p/Alrp aus Hefe bzw. Leberorganen ist sehr aufwendig. Daher werden die Proteine heterolog in *E. coli* überexprimiert.

Als Ausgangsvektor für die Herstellung der Expressionsplasmide wurde der Vektor pET24a(+) (Novagen) verwendet. Nach der Klonierung des Gens in der richtigen Orientierung und im passenden Leseraster werden dem Genprodukt an seinem C-Terminus 6-Histidine angehängt (Abb. 4.1). Die konstruierten Plasmide für die lange (22 kDa) und kurze (15 kDa) Form von Erv1p und die kurze Form (15 kDa) von Alrp wurden durch Restriktionsanalysen verifiziert und zur heterologen Überexpression in den *E. coli* Stamm BL21 transformiert. Die lange Form des *ALR* Gens konnte trotz mehrfachen Versuche nicht zur Überexpression gebracht werden. Möglicherweise ist das Genprodukt für *E. coli* toxisch.

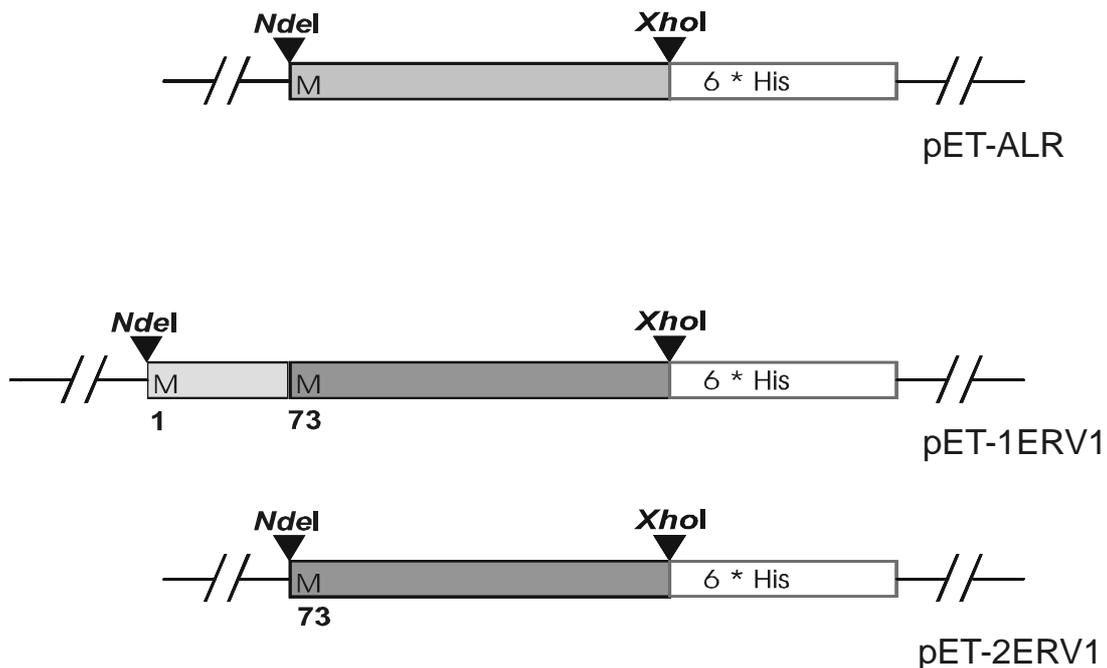


Abb. 4.1: Konstruktion der Expressionsplasmide für Erv1p/Alrp. Der Vektor pET24a(+) wurde mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XhoI* gespalten, und die Gene für die C-terminale Domäne von Alrp (pET-ALR), und die Vollängenform von Erv1p (pET-1ERV1) als auch die C-terminale Domäne von Erv1p (pET-2ERV1) wurden einkloniert. Die passgenaue Einfügung der Restriktionsstellen *NdeI* und *XhoI* an den Fragmentenden erfolgte über geeignete Primer und PCR.

4.2. Überexpression und Aufreinigung der Proteinen

Nach Überexpression wurden die *E. coli* Zellen mittels French-Press aufgeschlossenen. Dank der zusätzlichen Histidine am C-Terminus binden die Proteine an Nickel Agarose, was eine schnelle und schonende Aufreinigung ermöglicht (Abb. 4.2). Die Elution erfolgt mit 50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0; 300 mM NaCl; 300 mM Imidazol Puffer. Die homogen gereinigten Proteine in Elutionspuffer zeigten in allen 3 Fällen eine intensive gelbe Farbe.

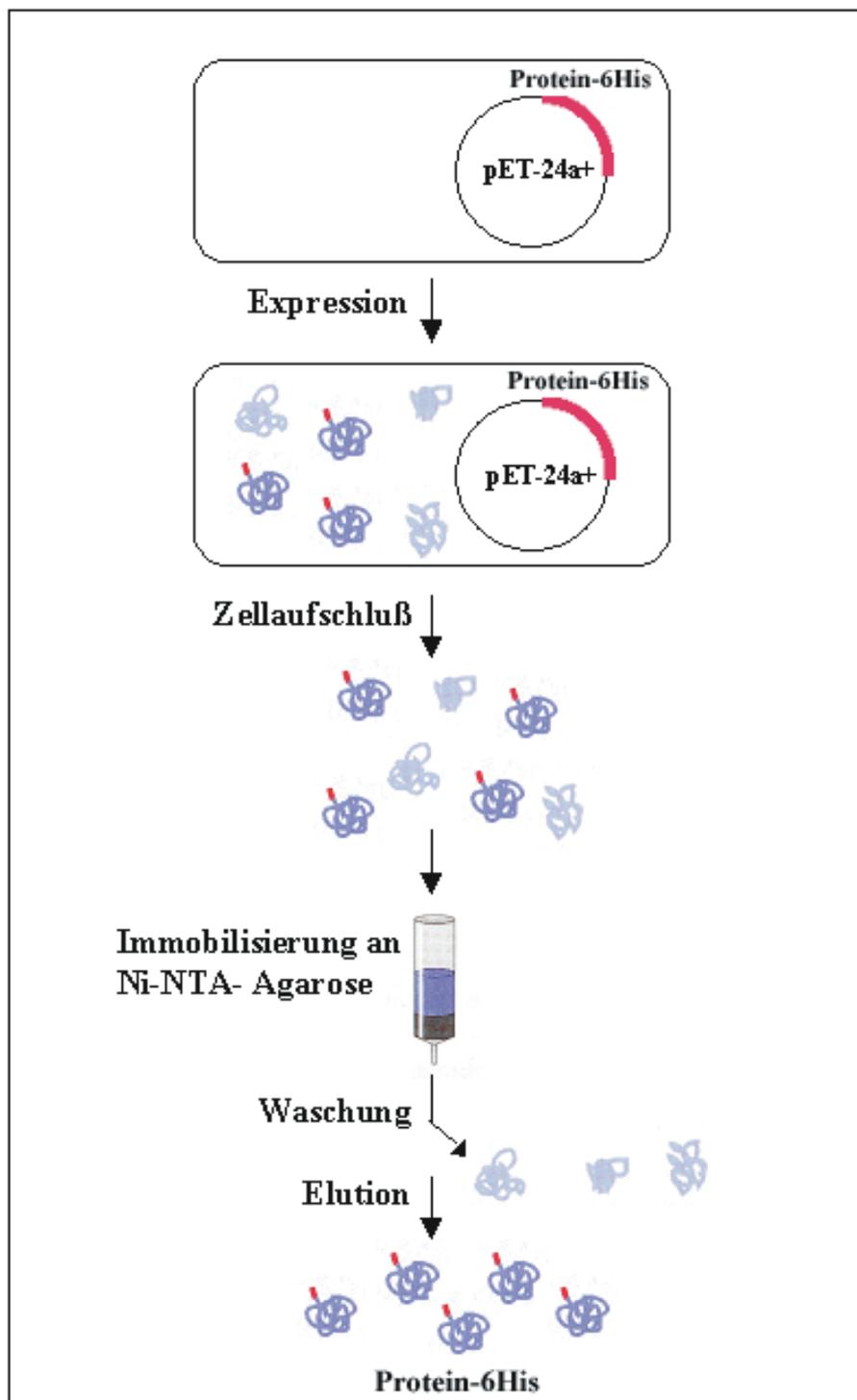


Abb. 4.2: Schema zur Expression und Aufreinigung von 6-His-markierten Proteinen. Das Protein wurde im *E. coli* Stamm BL21 vom Vektor pET24a(+) überexprimiert. Nach Zellaufschluß wurde es über eine Ni-NTA Affinitätschromatographie spezifisch aufgereinigt.

4.3. Erv1p/Alrp enthalten FAD als Cofaktor

Die intensive gelbe Farbe von gereinigten Erv1p/Alrp war erster Hinweis auf die Anwesenheit von FAD. Die gereinigten Proteine der Volllängenform von Erv1p (22 kDa), sowie die C-terminale Fragmente (15 kDa) von Hefe und humanem Alrp wurden nach der Aufreinigung über den 6 His-Tag spektroskopisch im Bereich 330 nm bis 550 nm untersucht. Als Referenzprobe diente freies FAD (Sigma). Die Absorptionsspektren beider Proteine zeigen die typischen Charakteristika für eine FAD-Absorption mit den Maxima bei 360 nm und 460 nm (Abb. 4.3). Die Verschiebung der Absorptionsmaxima gegenüber dem freien FAD erklärt sich durch die Wechselwirkung mit dem Protein. Unter Annahme eines Extinktionskoeffizienten des FAD von $10 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und durch die bekannten Molekulargewichte der Proteine konnte das Verhältnis von FAD/Protein bestimmt werden. Als Artefakt der heterologen Überexpression enthalten nur etwa 20 – 40 % der Monomere der Proteine ein FAD.

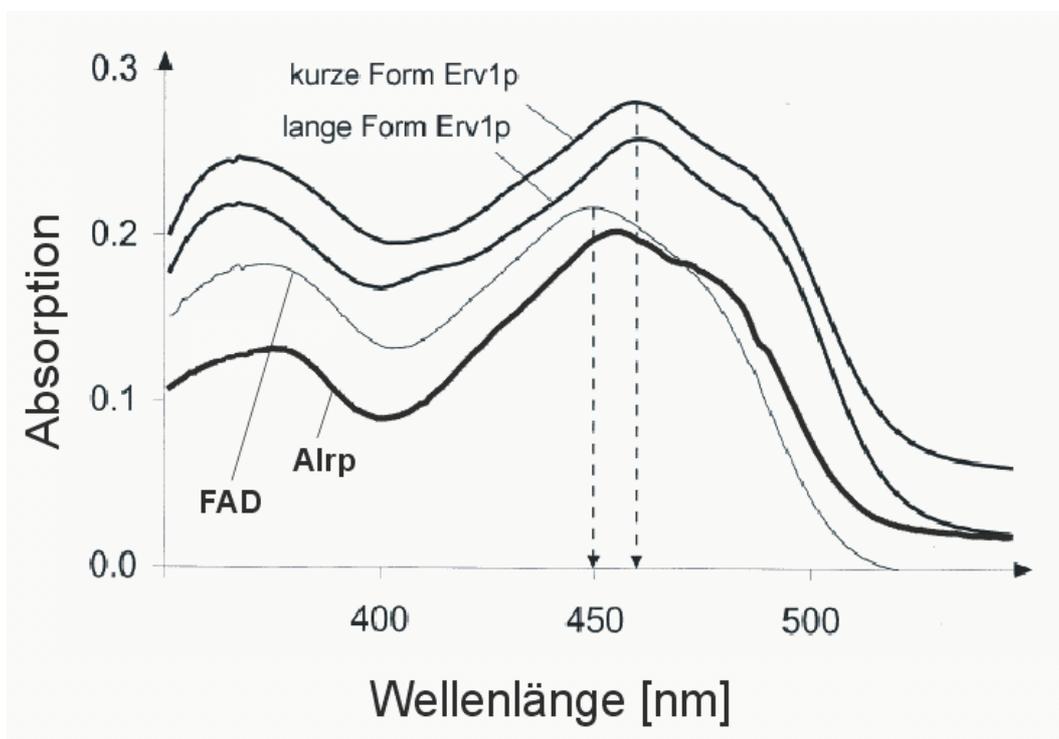


Abb.4.3: Spektroskopie von gereinigtem Hefe Erv1p und humanem Alrp. Vergleich der Spektren des langen (22 kDa), und kurzen (15 kDa) Fragments von Hefe Erv1p und des Alrps mit $15 \mu\text{M}$ reinem FAD als Referenzprobe.

Mit dem gebundenen FAD und dem konservierten CXXC-Motiv enthalten die untersuchten Proteine, genau wie die schon molekular untersuchten Q6 Proteine aus Mensch und Huhn (Coppock *et al.* 1998, Hooper *et al.* 1999), alle Cofaktoren, um als eine Sulfhydryloxidase funktionieren zu können.

4.4. Enzymatische Aktivität der Proteine

Sulfhydryloxidase katalysieren folgende Reaktion.



Für den Enzymtest wurde reduziertes Lyozym als Substrat verwendet. Dazu wurde das Lyozym (Fluka) mit einem Überschuss an DTT über Nacht inkubiert und alle Disulfidbrücken des Lyozym vollständig reduziert. Das reduzierte Protein wurde durch Chromatographie an einer Sepadex G25 Säule von überschüssigen DTT befreit und unter Stickstoff bei -70°C aufbewahrt. Der Gehalt an Thiolgruppen des reduzierten Lyozyms kann durch die Reaktion mit DTNB spektroskopisch bestimmt werden (Ellman 1959). Nach Zugabe der Sulfhydryloxidasen nimmt der Thiolgehalt des reduzierten Lyozyms durch die Bildung von Disulfidbrücken kontinuierlich ab. Zur Bestimmung der Aktivität wird zu verschiedenen Zeitpunkten ein Aliquot des Ansatzes entnommen und mit DTNB versetzt. Die Thiolgruppe reagiert mit DTNB zu einem farbigen p-Nitrophenol-Anion, dessen Intensität bei 412 nm spektrometrisch gemessen wird. Bestimmungen des FAD-Gehaltes und der Proteinkonzentration zeigten, dass nur etwa 60% der Moleküle ein FAD enthielten. Dies ist wahrscheinlich eine Folge der heterologen Überexpression. Die Aktivität der Proteine wurde daher auf den FAD-Gehalt bezogen. Die Umsatzzahlen für die Enzymaktivität sind $8,6 \text{ min}^{-1}$ bei dem langen 22 kDa Fragment und $7,8 \text{ min}^{-1}$ bei dem kurzen carboxy-terminalen Fragment von Erv1p und $9,1 \text{ min}^{-1}$ bei dem 15 kDa Alrp (Abb. 4.4).

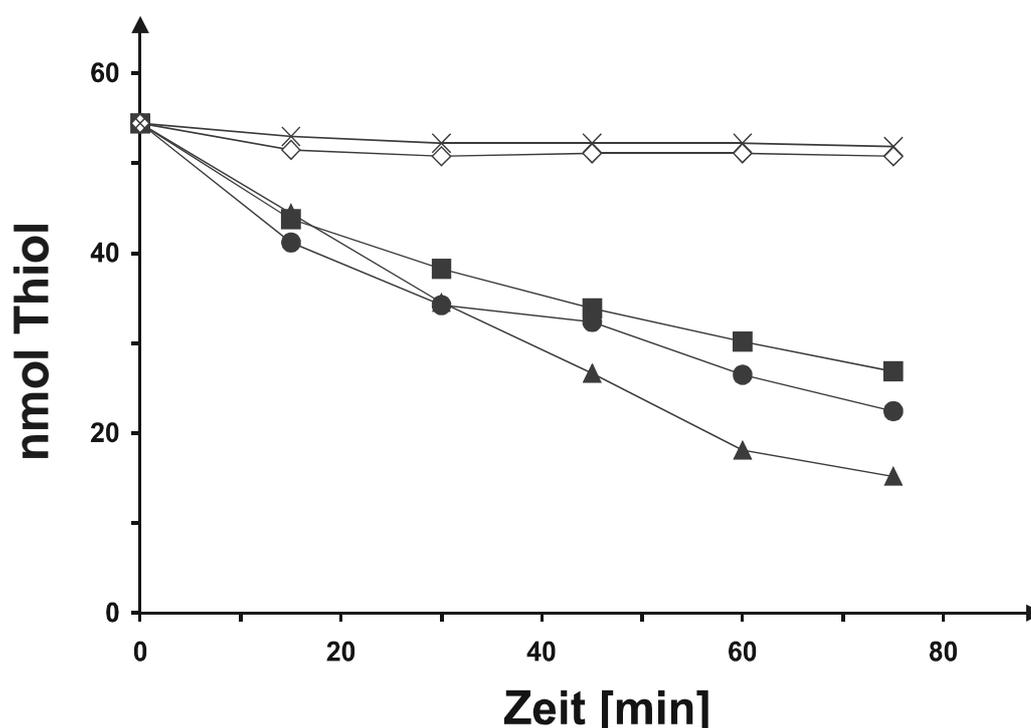


Abb. 4.4: Sulfhydryloxidasetest für Erv1p und Alrp. 6-His-markierte Proteine wurden in *E. coli* überexprimiert und durch Ni-Agarose aufgereinigt. Die Konzentrationen von den Proteinen wurden für jede Messung auf 50 pmol gebundenes FAD eingestellt. Die Oxidation der Thiogruppen wurde spektroskopisch bei 412 nm nach der Zugabe von 10 μ M DTNB gemessen, wobei die Extinktionsabnahme zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt wurde. Die Werte für das 22 kDa Erv1p wurden mit ■, für das 15 kDa Fragment mit ● und für das Alrp mit ▲ markiert. Vergleichbare Proben ohne Enzym (x) und mit gleicher Menge an reinem FAD (◇) wurden unter identischen Bedingungen gemessen.

Das natürliche Substrat der Proteine ist nicht bekannt, und die gemessene geringe Wechselzahl kann eine Folge des unspezifischen Substrates sein. Daher wurden ausgewählte Substrate für die Bestimmung der Sulfhydryloxidase-Aktivität von Erv1p herangezogen (Tab. 4.1). Um zu testen, ob das Erv1p auch autokatalytisch aktiv sein kann, wurde auch Erv1p selber als Substrat verwendet. Dabei wurde das heterolog überexprimierte Erv1p unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt und wie das Lysozym mit DTT reduziert. Reduziertes Erv1p ohne FAD zeigte sich dabei sogar als das beste Substrat gefolgt von Lysozym. Kleinere Peptide und kleine Moleküle mit Thiogruppen sind durch Erv1p kaum oxidierbar.

Tab. 4.1: Umsatzzahl (UZ) für die Aktivität von Erv1p mit verschiedenen Substraten.

Substrat	Erv1p	Lysozym	Cystein	Insulin	GSH
UZ (min ⁻¹)	11,7	8,7	5,0	0	0

Da Hefe und Mensch ganz unterschiedliche Wachstumstemperaturen haben, wurden die gereinigten Proteine von Erv1p und Alrp bei verschiedenen Temperaturen getestet. Die Temperaturoptima von 37°C für das humanen Alrp und Raumtemperatur für Erv1p entsprachen den Erwartungen.

4.5. Erv1p bildet Dimere unter nicht-reduzierenden Bedingungen und der Aminoterminus ist essentiell dafür

Nach dem bisherigen Untersuchung sind die kurze und die lange Form von Erv1p in ihrer Enzymfunktion identisch. Komplementationsexperimente (Lisowsky 1994) zeigen aber, dass die kurze Form des Proteins nicht die Funktion des vollständigen Proteins übernehmen kann. Der bei der kurzen Form von Erv1p fehlende N-Terminus muss daher *in vivo* eine wichtige Rolle spielen. Dieser amino-terminale Teil enthält ausserdem auch ein weiteres Cysteinpaar an der Position 30 und 33. Das lange und kurze Erv1p wurde aus *E. coli* unter nativen Bedingungen aufgereinigt und unter reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Das lange Fragment von Erv1p (1Erv1p) zeigt unter nicht-reduzierender Bedingung eine Homo-Dimerbildung von 44 kDa. Bei Zugabe von Reduktionsmitteln zerfällt es in die Monomere von 22 kDa (Abb. 4.5-a). Im Gegensatz dazu kann das 15 kDa carboxy-terminale Fragment (2Erv1p) keine Dimerkomplexe bilden (Abb. 4.5-b). Dies bedeutet, dass die amino-terminale Domäne von Erv1p mit ihren beiden Cysteine essentiell für die Dimerisierung ist.

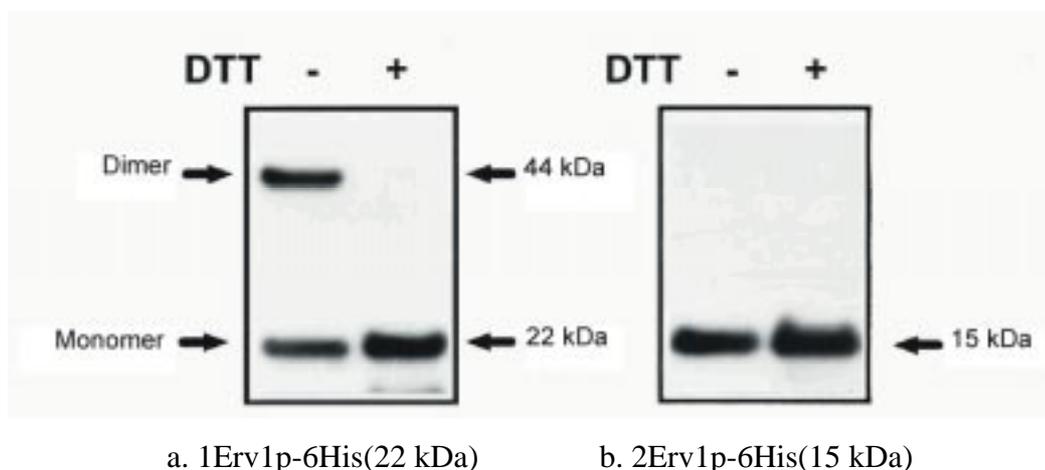


Abb. 4.5: Untersuchung der Dimerbildung von Erv1p. Nur die lange Form von Erv1p(1Erv1p) kann unter nicht-reduzierenden Bedingungen Dimere bilden. Die Proteinbanden wurden durch einen spezifischen Antikörper gegen den 6-His-Tag identifiziert

Eine Dimerisierung *in vivo* konnte durch das Fusionsprotein Erv1p-GFP gezeigt werden (Becher *et al.* 1999, Hofhaus *et al.* 1999). Der Proteinextrakt der Hefezellen mit exprimiertem Fusionsprotein wurde ohne Reduktionsmittel unter nativen Bedingungen präpariert. Der Proteinextrakt wurde mit und ohne Reduktionsmittel im Auftragspuffer im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach der Western-Blot-Analyse mit dem für GFP spezifischen Antikörper stellte sich das Fusionsprotein unter nicht-reduzierenden Bedingungen als 100 kDa Homodimer dar. Unter reduzierenden Bedingungen wurde das Protein als 50 kDa grosses Monomer detektiert.

Für eine entsprechende Analyse des humanen Alrps wurde das komplette humane Alrp als Fusionsprotein mit GFP in humanen Zellkulturen überexprimiert (Hofhaus *et al.* 1999). Es wurden sowohl das kurze carboxy-terminale Fragment als auch das lange Alrp in Form von Fusionsproteinen (45 kDa bzw. 50 kDa) *in vivo* synthetisiert. Cytosolischer Extrakt wurde von den Zellkulturen präpariert und im SDS-Polyacrylamidgel mit oder ohne Reduktionsmittel im Auftragspuffer aufgetrennt. Abbildung 4.6 zeigt die

Proteinbanden nach dem Western-Blot und Immunodetektion mit einem spezifischen Antikörper für GFP. Die beiden Formen von Alrp enthalten die GFP-Domäne und haben Molekulargewichte von ca. 45 kDa bzw. 50 kDa. Beide Fusionsproteine konnten unter reduzierenden Bedingungen auf dem Gel detektiert werden. Ohne Reduktionsmittel sind grössere Proteine mit den doppelten Molekulargewichten zu sehen. Dabei handelt es sich um kovalent gebundene Homodimere, die durch Disulfidbrücken zusammengehalten werden. Das in *E. coli* überexprimierte und dann aufgereinigte C-terminale Fragment von Alrp kann auch Dimer bilden. Im Gegensatz zum Erv1p können sowohl kurze als auch lange Form von Alrp Dimere bilden und *in vivo* synthetisiert werden.

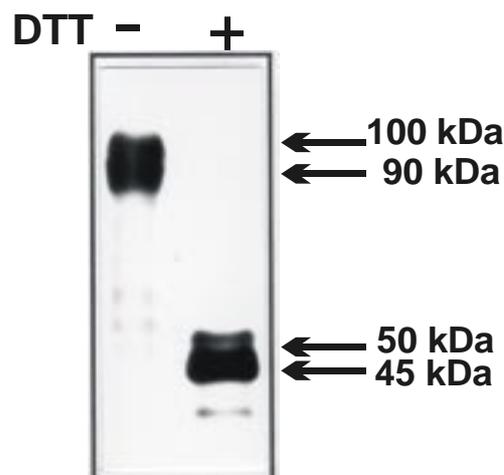


Abb. 4.6: Identifikation der Dimere für humanes Alrp-GFP aus Zellkulturen. Der cytosolische Extrakt wurde aus humanen 143B Zellen präpariert, die huAlr-GFP exprimieren. Aliquots von 20 µg cytosolischem Proteinextrakt wurden mit (+) oder ohne (-) 10 mM DTT im Auftragspuffer im 12% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Fusionsproteine wurden mit einem GFP-spezifischen Antikörper detektiert.

Dieser Befund wurde auch durch Grössenausschlusschromatographie (AcA 44) des cytosolischen Extrakts verifiziert. Die Elutions des Fusionsproteins Alrp-GFP kann anhand der GFP-Fluoreszenz und der Enzymaktivität verfolgt

werden (Abb. 4.7). Der Grossteil der Fluoreszenz und der Enzymaktivität eluierten an einem gemeinsamen Gipfel. Die Säule wurde mit den Proteinen, Conalbumin (45 kDa) und Gammaglobulin (160 kDa) geeicht. Das Elutionsvolumen des Fluoreszenzgipfels entspricht einem Molekulargewicht von ca. 100 kDa und zeigt, dass das native humane Alrp in der Zelle als Dimer vorliegt.

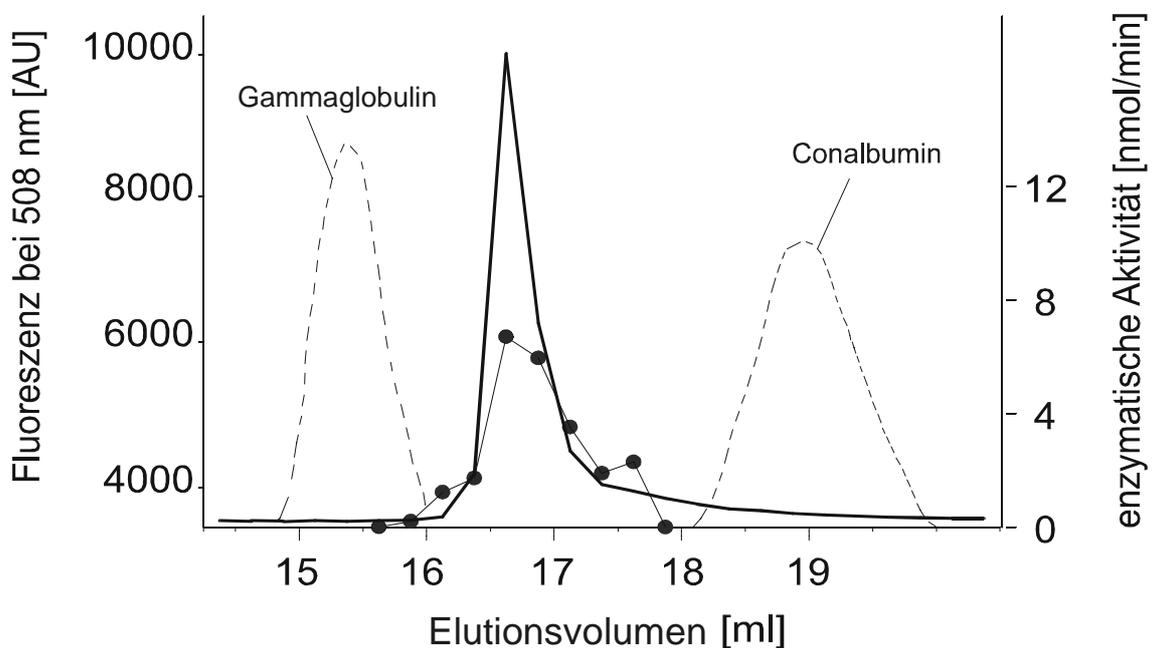


Abb. 4.7: Enzymtest von Proteinfractionen nach der Säulenaufreinigung von humanen Alrp-GFP aus Zellkulturen. Cytosolischer Extrakt von 143B Zellen, die Alrp-GFP exprimieren, wurde auf eine Anionenaustauscher-Chromatographiesäule aufgetragen und mit einem Gradienten von 50 mM bis 500 mM NaCl eluiert. Die Fluoreszenz wurde in einer Durchflussküvette gemessen (durchgezogene Linie). Die Fraktionen wurden in 0,5 ml Aliquots gesammelt und enzymatisch getestet (gefüllte Kreise). Die beiden punktierten Linien stellen die Eichkurve mit Gammaglobulin und Conalbumin dar.

4.6. *In vitro* Mutagenesestudien

4.6.1. Ein spezifischer Cystein-Rest von humanem Alrp ist essentiell für die enzymatische Aktivität

Nach Thorpe ist das konservierte CXXC-Motiv direkt an der Redoxreaktion beteiligt (Hooper *et al.* 1999). Um die Bedeutung dieses speziellen Cysteinpaars für die Enzymfunktion zu überprüfen, wurde das Cystein in der Position 145 von Alrp (Abb. 1.2) durch *in vitro* Mutagenese gegen Serin ausgetauscht. Das intakte und mutierte 15 kDa Proteinfragment von menschlichem Alrp wurde mit einem 6-His-Tag in *E. coli* überexprimiert und dann aufgereinigt. Im Gegensatz zur nicht mutierten Kontrolle zeigt das mutierte Protein weder eine Enzymaktivität noch die typische gelbe Farbe von FAD.

4.6.2. Cysteine in Hefeproteinen

Das obige Ergebnis liess es als sinnvoll erscheinen auch weitere Cysteinreste in die funktionellen Untersuchungen mit einzubeziehen. Dies ist aufgrund der vorhandenen genetischen und molekularbiologischen Techniken in Hefe sehr viel einfacher und die vorhandene *erv1-ts* Mutante erlauben detaillierte *in vivo* Untersuchungen. Desweiteren verzichtet die Hefe aufgrund der Anpassung an eine extrem schwefelarme Wachstums Umgebung wo möglich auf die Aminosäure Cystein als Baustein. Die in Hefeproteinen vorhandenen Cysteine sind daher fast immer von struktureller und/oder funktioneller Wichtigkeit (Jones und Fink 1982). Während das homologe humane Alrp bei 205 Aminosäuren insgesamt 9 Cysteine enthält, enthält das aus 189 Aminosäuren bestehende *Erv1p* nur 6 Cysteine (siehe Abb. 1.1). Diese Cysteine findet man an den Positionen 30, 33, 130, 133, 159 und 176 des Hefeproteins. Diese Cysteine sind in Paaren im Protein angeordnet. Die ersten beiden (C30/C33) liegen am Aminoterminal vor dem zweiten Startcodon (Abb. 1.1), sind also in der kurzen Form des Proteins nicht enthalten. Die beiden mittleren Cysteine bilden das redoxaktive Zentrum (C130/C133) und die letzten beiden finden sich im carboxy-terminalen Bereich.

4.6.3. Gezielte *in vitro* Mutagenese von Cysteinen in Erv1p

Die 6 Cysteine von Erv1p wurden systematisch gegen Serinreste ausgetauscht. Für die positionsspezifische PCR-Mutagenese wurden Oligonukleotide synthetisiert, die in ihrer Basensequenz gegenüber dem Wildtyp-Template (pET-1Erv1p) an der Mutationsstelle eine Fehlpaarung haben. Das PCR-Produkt weist ein Serincodon an der Stelle des entsprechenden Cysteincodons auf. Gleichzeitig entsteht eine neue Restriktionsschnittstelle, die einen einfachen Nachweis der gelungenen Mutagenese erlaubt. Es gelang die Cysteine an der Position 30(Erv1p-30), 130(Erv1p-130), 159(Erv1p-159) und 176(Erv1p-176) gegen Serin auszutauschen. Die mutagenisierten Plasmide wurden durch die erwartete Restriktionsschnittstelle identifiziert und durch Sequenzierung überprüft. Die entsprechenden Proteine wurden überexprimiert und über den 6His-Tag gereinigt.

4.6.4. Analyse der Spektren der mutierten Erv1 Proteine

Der Austausch der spezifischen Cysteine resultiert in einer signifikanten Veränderung der Proteinfarben (siehe Abb. 4.8). Das Wildtyp Erv1p hat eine intensive dunkel gelbe bis leicht orange Farbe, verursacht durch das gebundene FAD. Die Farbe von Erv1p-30 ist dunkelgrau-blau, die von Erv1p-130 intensiv dunkel orange und von Erv1p-159 hellgelb bis farblos, während Erv1p-176 keine Veränderung aufweist.

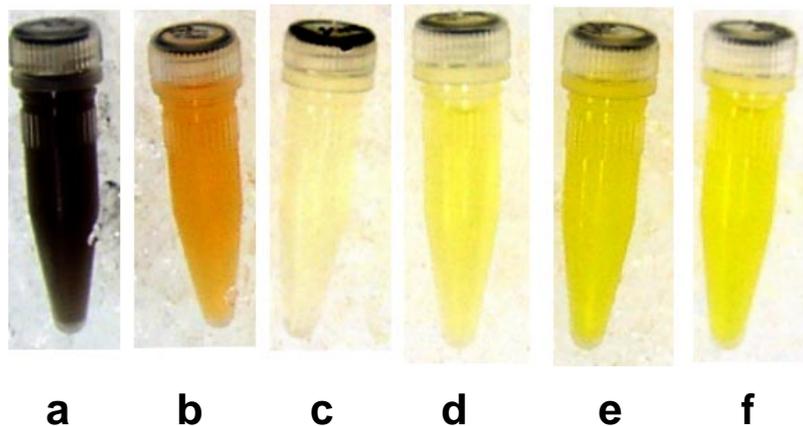


Abb. 4.8: Die Farbe der Proteinen nach der Aufreinigung. Die mutierten Proteine sind dunkelgrau-blau(Erv1p-30, a), dunkelorange(Erv1p-130, b), farblos(Erv1p-159, c) und gelb bei Erv1p-176(d). Die kurze Form vom Erv1p(2Erv1p)(f) weist die gleiche gelbe Farbe wie der Wildtyp(e) auf.

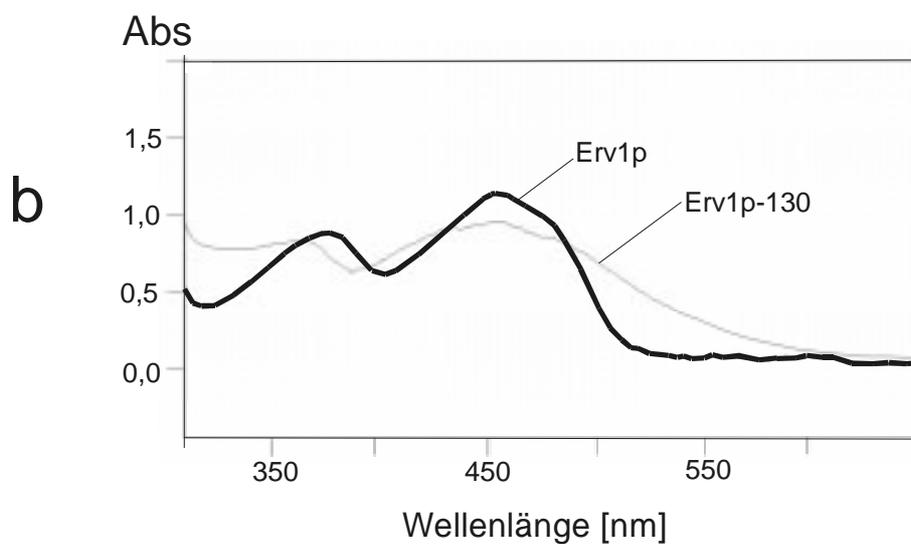
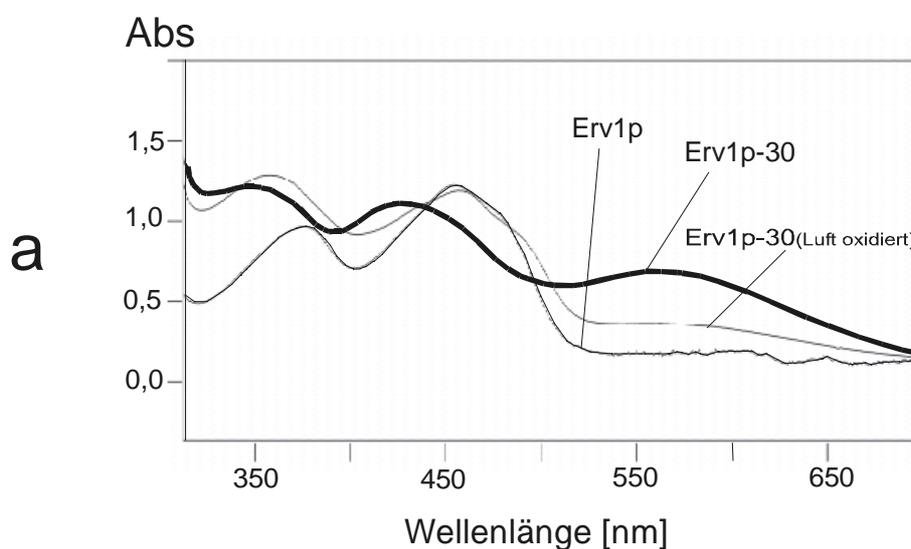
Die Farbänderungen der Proteine wurden durch UV/VIS Spektroskopie näher untersucht. Wie schon erwähnt hat Wildtyp Erv1p durch das gebundene FAD ein charakteristisches Spektrums mit Maxima bei bei 360 nm und 460 nm. Bemerkenswert ist, dass die kurze und lange Form von Erv1p praktisch identische Spektren haben (Abb. 4.3).

Das Spektrum des frisch aufgereinigten Erv1p-30 zeigt eine Verschiebung der beiden FAD-Gipfel zum kurzwelligen Bereich und einen neuen zusätzlichen kleinen dritten Gipfel bei 560 nm (Abb. 4.9-a). Nach Oxidation mit Luftsauerstoff bei der Lagerung des Enzyms entspricht das Spektrum dem des normalen Erv1p. Die Reduktion mit Dithionit führt zu einer völligen Entfärbung des Proteins. Die graue Farbe kann auf diese Weise nicht reproduziert werden.

Das Spektrum des frisch aufgereinigten dunkel-oranger farbigen Erv1p-130 ist nicht so drastisch verändert. Auffällig ist aber, dass der zweite Gipfel bei 460 nm stark verbreitert vorliegt (Abb. 4.9-b). Die Absorption im Bereich von 500 nm bis 600 nm ist wesentlich stärker als bei intaktem Erv1p. Wie im Falle des

Erv1p-30, wird auch bei Erv1p-130 nach Oxidation an Luftsauerstoff das Spektrum wieder dem von Wildtyp Erv1p ähnlicher.

Das Spektrum des farblosen Erv1p-159 zeigt nur eine flache Kurve ohne jeden Gipfel (Abb. 4.9-c) und das Spektrum vom Erv1p-176 ist dem von normalen Erv1p sehr ähnlich (Abb. 4.9-d). Das Verhältnis von FAD/Protein deutet darauf hin, dass die Mutante Erv1p-159 nur sehr wenig FAD bindet. Wahrscheinlich ist durch die Mutation die Faltung des Proteins stark veränert.



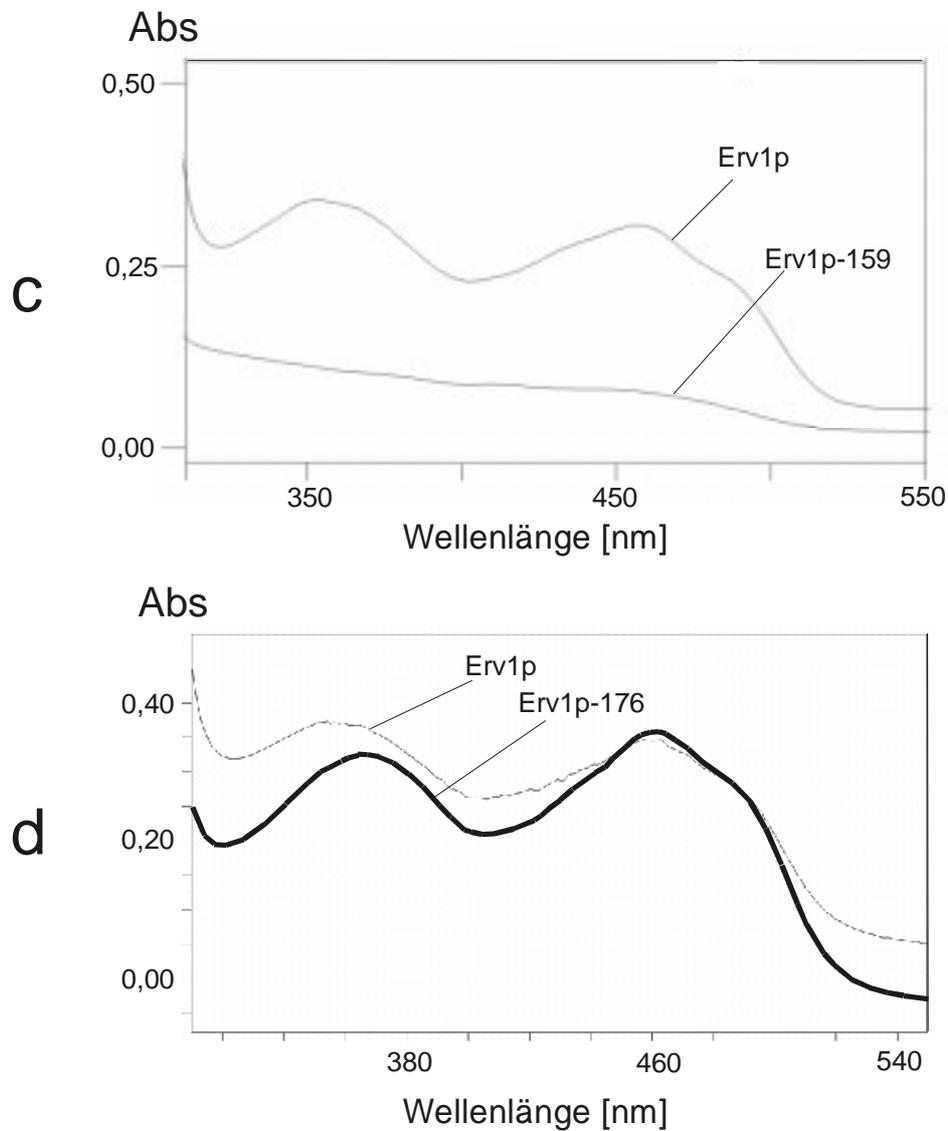


Abb. 4.9: Die Spektren der einzelnen Cysteinmutanten im Vergleich mit dem Spektrum von Wildtypprotein Erv1p. Das frisch aufgereinigte Erv1p-30 hat 3 Maxima bei 360 nm, 430 nm und 560 nm, während das Protein nach längerer Lagerung ähnliche Profil wie bei Erv1p zeigt (a). Das Erv1p-130 weist im Bereich des 2. Gipfels bei 460 nm stark verbreiterte Spektrum auf (b). Das Erv1p-159 zeigt eine flache Kurve ohne jeden Gipfel (c) während das Spektrum vom Erv1p-176 dem von normalen Erv1p sehr ähnlich ist (d).

4.6.5. Sulfhydryloxidaseaktivität der mutierten Proteine

Die gereinigten mutierten Proteine von Erv1p wurden systematisch auf ihre Enzymaktivität mit reduziertem Lysozym als künstliches Substrat für die Thiolreaktion getestet. Der Austausch der Cysteine an der Position 130, 159 oder 176 führte zum vollständigen Verlust der Sulfhydryloxidaseaktivität. Der Cysteinaustausch gegen Serin an der Position 30 bewirkt eine Reduktion der Enzymaktivität um etwa 40 % (Abb. 4.10).

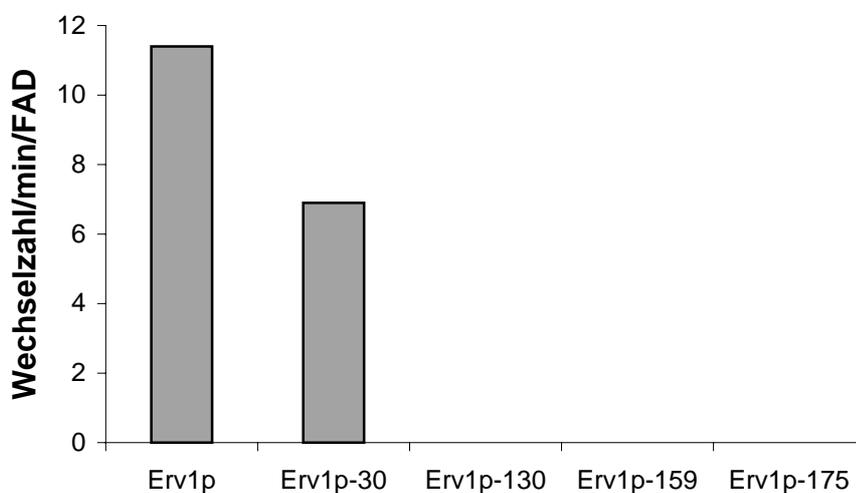


Abb. 4.10: Vergleich der Wechselzahl zwischen Erv1p und den Mutanten Erv1p-30, Erv1p-130, Erv1p-159 und Erv1p-176. Bei der Messung wurde das reduzierte Lysozym als Substrat verwendet. Gegenüber dem Wildtyp Protein zeigt Erv1p-30 ca. um 40% reduzierte Aktivität, während die anderen Mutanten nicht mehr in der Lage sind, die Reoxidation der Substrate zu katalysieren.

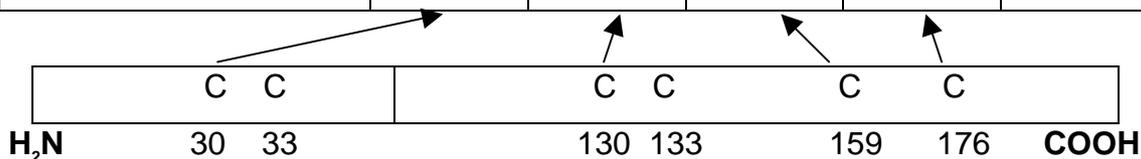
Der Verlust der einzelnen Cysteine führt zu einigen Veränderungen der Charakteristika von Erv1p. In allen Fällen bis auf die C30-Mutation verliert das Protein seine Sulfhydryloxidase-Aktivität. Diese bestätigen auch *in vivo* Versuche, in denen nur das Erv1p-30 in der Lage war, den Gendefekt in Hefe zu komplementieren. Nach der Aufreinigung der mutierten Proteine wurde das Verhältnis von FAD zu Protein bestimmt. Dies zeigt, dass nicht jedes Monomer

des Proteins ein FAD gebunden hat. Da FAD am Protein nicht kovalent gebunden ist, kann dies während der Aufreinigungsschritte verloren gehen. Die mutierten Proteine haben kleinere Werte für das FAD/Protein-Verhältnis als das Wildtypprotein. Die Analyse der mutierten Proteine auf einem SDS Gel unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen zeigt, dass alle Mutanten noch in der Lage sind, Dimere zu bilden.

Der Vergleich der Eigenschaften von einzelnen Mutanten werden in der Tabelle 4.2 zusammen dargestellt.

Tab. 4.2 Charakterisierung der Mutanten Tab. 4.2 Charakterisierung der Mutanten

	Erv1p-30	Erv1p-130	Erv1p-159	Erv1p-176	Wildtyp
Sulfhydryloxidase-Aktivität	+	-	-	-	++
erv1-ts Komplementierung <i>in vivo</i>	+	-	-	-	+
FAD-Bindung (FAD/Protein)	+ (0,2)	+ (0,2)	- (< 0,1)	+ (0,4)	+ (0,6)
Dimerisierung	++	+	+	+	+



5. Diskussion

5.1. Funktionen von Erv1p/Alrp

5.1.1. Erv1p/Alrp als FAD-abhängige Sulfhydryloxidase

Disulfidbrücken sind in vielen Proteine verantwortlich für die Stabilisierung von Tertiär- und Quartärstrukturen. Die Bildung der entsprechenden Disulfidbrücken ist enzymatisch katalysiert, wobei die Mehrzahl der involvierten Enzyme allerdings nur Disulfidbrücken zwischen verschiedenen Proteinen auszutauschen können (Kadokura und Beckwith 2001). Disulfide werden dabei weder gebildet noch zerstört. Erst in letzter Zeit sind sogenannte Sulfhydryloxidasen beschrieben worden, die in der Lage sind *de novo* Disulfidbrücken zu bilden (Collet und Bardwell 2002). Diese Enzyme enthalten ein FAD als prostetische Gruppe mit dessen Hilfe die Reduktionsäquivalente auf Sauerstoff übertragen werden unter Bildung von H₂O₂.

In Übereinstimmung mit dieser Funktion bevorzugen die in dieser Arbeit beschriebenen Sulfhydryloxidasen freie Thiolgruppen von Proteinen als Substrate. Mit wesentlich geringerer Effizienz werden auch Thiolreste aus niedermolekularen Verbindungen umgesetzt. So kann das Q6-Protein *in vitro* auch DTT und Glutathion als Substrat verwenden. Die höchsten Umsatzzahlen ergeben sich aber, wenn reduzierte Proteine als Substrat eingesetzt werden (Hooper und Thorpe 1999). Dieser Befund spricht dafür, dass Sulfhydryloxidasen auch *in vivo* Proteine als Zielmoleküle haben. Im Gegensatz zu Q6 kann Erv1p *in vitro* DTT und Glutathion nicht als Substrat verwenden, und auch die Umsatzzahl beim Einsatz eines reduzierten Proteins ist wesentlich kleiner. Das in diesen Tests verwendete reduzierte Lysozym kann kein natürliches Substrat für Erv1p von Hefe sein. Zusammen mit dem Befund, dass die spezifische Funktion von Erv1p in den Mitochondrien lokalisiert ist (Lisowsky 1992, 1994, 1996) ergibt sich daraus die Vermutung, dass dieses Enzym *in vivo*

keine generelle, für viele zelluläre Proteine zuständige Sulfhydryloxidase ist, sondern an sehr spezifische Zielsubstrat adaptiert wurde.

Solche potentiellen mitochondrialen Zielproteine könnten integrale Membranproteine sein. Der charakteristische Phänotyp der Membranveränderungen bei *ERV1*-Geninaktivierung und die Hauptlokalisierung des Proteins im Intermembranraum von Mitochondrien deuten dies an (Becher *et al.* 1999). Eine eindeutige Bestimmung solcher Zielproteine ist aber schwierig, da die starken Änderungen der Morphologie der Mitochondrien und deren Membranen in der konditionellen Mutante die Struktur und die Lokalisation vieler mitochondrialer Proteine betrifft. So können mögliche Änderungen in den Disulfidbrückenverknüpfungen auch durch sekundäre Effekte verursacht werden (Klissenbauer 2001). Die temporäre Ausbildung von kovalenten Disulfidbrücken zwischen mitochondrialen Membranproteinen und anderen Komponenten des Cytoskeletts könnte auch die beobachteten dynamischen Veränderungen des mitochondrialen Netzwerks erklären (Lisowsky 2001). Damit könnte man erklären, warum die Inaktivierung des *ERV1* Gens zur Degeneration des mitochondrialen Netzwerks, zur Zerstörung der typischen *Cristae* und schliesslich zum Verlust aller Mitochondrien führt. Aber bis heute sind die genauen *in vivo* Zielmoleküle von Sulfhydryloxidasen weder für *Erv1p/Alrp* noch für das Q6-Protein bekannt.

Im Gegensatz zu *Erv1p* kommt *Alrp* in mehreren Formen und an mehreren subzellulären Orten vor. *Alrp* konnte *in vivo* bis jetzt in mindestens drei verschieden langen Formen nachgewiesen werden (Hagiya *et al.* 1994, 1995, Giorda *et al.* 1996, Hofhaus *et al.* 1999, Klissenbauer 2001). Durch systematische Expressionsanalysen in Mensch, Maus und Ratte wurde dies für die Säuger abgesichert (Klissenbauer 2001). Das Vorkommen und die Verteilung der Formen ist signifikant unterschiedlich in den einzelnen Organen. Die Zelle hat offenbar Regulationsmechanismen zur Expression der einzelnen Formen, um je nach ihrem physiologischen Zustand die Synthese und Lokalisation der *Alrp*-Formen zu modulieren. Dies deutet darauf hin, dass *Alrp*

neben der zu Erv1p homologen, fundamentalen mitochondrialen Funktion zusätzliche komplexe Funktion(en) bei den höheren Eukaryonten ausführt.

Nicht nur die Sulfhydryloxidasen Alrp und das Q6-Protein wurden als Regulatoren des Zellwachstums beschrieben (Hoover *et al.* 1999) sondern auch andere Redoxproteine wie z.B. Thioredoxine haben vielfältige Funktionen als Enzyme und Cytokine beim Zellwachstum und der Modulation der Aktivität von Enzymen und Hormonen (Kleemann *et al.* 1998, Nakamura *et al.* 1997, Tanaka *et al.* 1997). Da möglicherweise einige Zielorte von Alrp für die Regulation der Proliferation regenerierender Leberzellen im Cytosol lokalisiert sind, könnte eine verkürzte Proteinform, die eine Zielsequenz für den Import in die Mitochondrien fehlt, an dieser Funktion beteiligt sein. Um die funktionellen Unterschiede von Q6 und Alrp zu verstehen, ist es wichtig, ihre natürlichen Zielproteine oder Zielmoleküle in lebenden Zellen zu identifizieren. Daher wäre es interessant zu überprüfen, ob Alrp die spezifische Disulfidbrückenbindung von bekannten primären Regulatoren der Leberregeneration wie zum Beispiel Insulin, Gamma-Interferon oder anderen Wachstumsfaktoren beeinflussen kann. Ein erster Hinweis auf eine solche Funktion ergibt sich durch die Identifizierung eines spezifischen Rezeptors für Alrp auf der Oberfläche von Hepatozyten (Wang *et al.* 1999).

Eine weitere Funktion für die Aktivität von Sulfhydryloxidasen ergibt sich aus ihrer spezifischen Assoziation mit der Entwicklung und Differenzierung von Spermatozoen (Kumari *et al.* 1990, Aumuller *et al.* 1991, Bergmann *et al.* 1992, Meinhardt *et al.* 1999). In der Ratte und im Hamster konnte eine Sulfhydryloxidase beschrieben werden, die spezifisch mit den Mitochondrien von pachytänen Spermatozyten assoziiert ist (Kumari *et al.* 1990). Dabei scheinen Defekte in den Sulfhydryloxidasen mit verminderter Fertilität und beeinträchtigter Spermatogenese assoziiert zu sein (Bergmann *et al.* 1992). Die neuesten Untersuchungen zeigen, dass auch eine Variante des Q6-Proteins an der Spermatogenese der Säugetiere beteiligt ist (Benayoun *et al.* 2001). Deshalb passt es gut zu diesem Bild, dass auch Alrp spezifisch in den

Mitochondrien von Spermatogonien akkumuliert (Klissenbauer 2001). Da bei der Spermatogenese ausschliesslich die Vollängenform von Alrp vorliegt, muss die mitochondriale Funktion von Alrp während dieses Entwicklungsprozesses von besonderer Bedeutung für die Zellen sein.

5.1.2. Ist die Sulphydryloxidaseaktivität die einzige Funktion von Erv1p/Alrp?

Die Dimerisierung ist nicht alleine auf Erv1p beschränkt, sondern auch alle Formen von Alrp liegen in der Zelle überwiegend als Dimere vor. Dieser Befund legt nahe, dass die Dimerisierung essentiell für die Funktion von Erv1p/Alrp ist. Eine Dimerisierung von mitochondrialen Proteinen findet man vor allem bei Transportern (Kramer 1994, Schroers *et al.* 1998) und bei Komponenten der Fe/S-Clustertbiogenese (Zheng *et al.* 1998, Lill *et al.* 1999). Dazu passt gut, dass die neuesten Experimente Erv1p eine essentielle Funktion für die Assemblierung von cytosolischen Eisen/Schwefel-Proteinen zuweisen (Lange *et al.* 2001). Die in der Matrix der Mitochondrien synthetisierten Fe/S-Cluster werden für die Assemblierung der mitochondrialen und cytosolischen Fe/S-Proteine benötigt. (Lange *et al.* 2000; Kaut *et al.* 2000). Da bei Inaktivierung von Erv1p nur die Biosynthese von extramitochondrialen Fe/S Proteinen beeinträchtigt ist, wird postuliert, dass Erv1p am Export der Fe/S-Cluster aus den Mitochondrien essentiell beteiligt ist. Für den Transport dieser mitochondrialen Substrate könnte daher die Dimerisierung essentiell sein (Lisowsky 2001).

Die Vollängenversion von Alrp kann die Funktion von Erv1p in der Biogenese der cytosolischen Fe/S-Proteine komplementieren (Lange *et al.* 2001). Dieses bestätigt die Vermutung, dass Alrp neben der Funktion bei der Leberregeneration zusätzlich in den Mitochondrien an einem für die Zelle essentiellen Syntheseweg beteiligt ist, jedoch keinen funktionellen Bestandteil der oxidativen Phosphorylierung darstellt. Das ubiquitäre Vorkommen der mit den Mitochondrien assoziierten Formen von Alrp steht im Einklang mit der

essentiellen Bedeutung von Alrp bei der Reifung und Synthese cytosolischer Fe/S-Proteine. Es wurde weiterhin gezeigt, dass auch der nur wenig konservierte N-Terminus von Erv1p für die Funktion im Fe/S Cluster-Export notwendig ist. Dies lässt vermuten, dass die Interaktion zwischen den Erv1p-Untereinheiten des Dimers und den Fe/S-Clustern wichtig ist für deren Transport und/oder den Schutz gegen Oxidation im Intermembranraum.

5.2. Zusammenfassung der Daten zur Cystein-Mutagenese

Aufgrund der Anpassung an einen schwefelarmen Lebensraum werden in Hefeproteinen normalerweise nur funktionell wichtige Cysteine konserviert. In Übereinstimmung mit diesem Befund sind die Ergebnisse der *in vitro* Mutagenese, die zeigen, dass alle untersuchten Cysteinaustausche zu einer Beeinträchtigung der Sulfhydryloxidaseaktivität von Erv1p führten. Dies bedeutet aber noch nicht, dass alle Cysteine auch direkt am Elektronentransport oder der Redoxreaktion beteiligt sein müssen. Die Mutation eines Cysteins kann auch zu einer Fehlfaltung des Enzyms führen. Die tertiäre Struktur könnte dadurch so verändert sein, dass das Protein keine enzymatische Aktivität mehr hat, wie z. B. bei Verlust der Bindung für FAD.

Das Cysteinpaar 30/33 muss nicht direkt am Elektronentransport im Protein beteiligt sein, aber die beiden Cysteine spielen wahrscheinlich eine sehr wichtige Rolle bei der korrekten Dimerisierung. Man kann spekulieren, dass sowohl der Cysteinrest 30 als auch 33 für inter- oder sogar intra-molekulare Disulfidbrücken wichtig sind. Das Vorhandensein als Dimer ist *in vivo* für die Funktion essentiell. Die verwaiste Sulfhydrylgruppe in der Mutante kann eine neue artifizielle Affinität zu anderen Aminosäureresten des Proteins zeigen. Die funktionelle Bedeutung des Cysteinpaares 30/33 wird dadurch demonstriert, dass die kurze Form von Erv1p(2Erv1p) den *in vivo* Defekt nicht komplementiert und keine Dimere bildet. Dieses Cysteinpaar hat ausserdem keine direkte Beteiligung an der FAD-Bindung, da die kleine Form von Erv1p, bei der das N-

terminale Fragment fehlt, immer noch sehr effizient FAD bindet. Der Cysteinaustausch an der Position 33 und die Doppelmutante für 30 und 33 könnten weitere Hinweise für diese Modelle liefern und die Schlussfolgerungen über die Funktionen dieses Cysteinpaars in Bezug auf Dimerisierung und Wechselwirkung mit dem redoxaktiven Zentrum absichern.

Im Wildtyp könnte die intermolekulare Disulfidbrückenbindung zur Dimerisierung durch Interaktionen von Cystein 30 oder 33 in den beiden Monomeren dienen. Das durch die Mutation verwaiste Cystein 33 im N-terminalen Bereich hat nun möglicherweise eine hohe Affinität zur Disulfidbrückenbildung auch mit anderen Cysteinen oder anderen unspezifischen Molekülen. Die daraus folgende strukturelle Änderung könnte dazu führen, dass das Protein eine reduzierte Enzymaktivität hat, indem der normale Elektronentransport im Enzym gestört wird. Eine andere Erklärung wäre, dass die räumliche Anordnung und Interaktionen mit aromatischen Aminosäuren, wie den Tyrosinen an der Position 23 und 41, so verändert sind, dass andere Elektronenverteilungen oder aromatische Strukturen entstehen. Es ist auch nicht ausgeschlossen, dass die Mutation die Interaktion zwischen den Elektronen und dem am Protein gebundenen FAD direkt beeinflusst und so die Enzymaktivität vermindert und das Spektrum verändert. Die genauen Ursachen dafür sind aber noch nicht geklärt. Es ist auch nicht auszuschließen, dass ein andere ganz neue Komponente dabei eine Rolle spielt.

Die zentrale Bedeutung des Cysteinpaars 130/133 wird durch die Konservierung in allen homologen Proteinen betont. Im Gegensatz dazu sind die anderen Cysteinpaare 30/33 und 159/176 nur in Erv1p/Alrp zu finden. Nach dem Modell von Hooper und Thorpe (1999) bildet das Cystein an der Position 130 zusammen mit dem Cystein an 133 und FAD das aktive Zentrum. Dies wird durch den völligen Verlust der Enzymaktivität nach Austausch des Cysteins 130 bestätigt. Der Cysteinaustausch in Alrp an der zur Position 133 von Erv1p entsprechenden Stelle ergab weder Enzymaktivität noch FAD-Bindung. Das Cysteinpaar 130/133 bildet wahrscheinlich eine intramolekulare Disulfidbrücke,

die wiederum mit dem vorhandenen FAD interagiert. Das Fehlen des Cysteins an der Position 130 führte weiterhin zu einem veränderten Spektrum. Nach dem von Thorpe vorgeschlagenen Mechanismus (Abb. 5.1) erfolgt die Reduktion des Enzyms über die Bildung eines Charge-Transfer Komplexes von FAD mit einem Cystein im CXXC Motiv. Dieser Komplex steht mit einem zweiten Übergangszustand im Gleichgewicht, in dem die beiden Cysteine im aktiven Zentrum eine intramolekulare Disulfidbrücke bilden. Das durch die Mutation verwaiste Cystein wird dazu gedrängt, mit FAD einen Charge-Transfer Komplex zu bilden, welcher die Farbänderung des Enzyms erklären kann. Es könnte das Cystein 133 von Erv1p in dieser Arbeit nicht gegen Serin ausgetauscht werden, aber der Befund für Alrp deutet an, dass dieses Cystein für die FAD-Bindung wichtig ist. Das Fehlen des FAD führt zum Verlust der enzymatischen Aktivität. Das FAD alleine ist aber auch nicht ausreichend für die Enzymfunktion, sondern das aktive Zentrum muss intakt erhalten bleiben, um den Redoxzustand des Enzyms aufrechtzuerhalten. Allein das Vorhandensein von FAD reicht nicht aus, sondern der korrekte Elektronenaustausch mit dem Cysteinpaar 130/133 ist auch eine Voraussetzung für die enzymatische Aktivität. Sie müssen zusammen eine korrekt angeordnete Struktur bilden, die die Ausbildung eines instabilen Übergangszustandes während des katalytischen Vorgangs ermöglicht. Der neue Cysteinaustausch an der Position 133 wäre wichtig, um die Schlussfolgerung für die entsprechende Punktmutante von Alrp im aktiven Zentrum auf Erv1p zu übertragen.

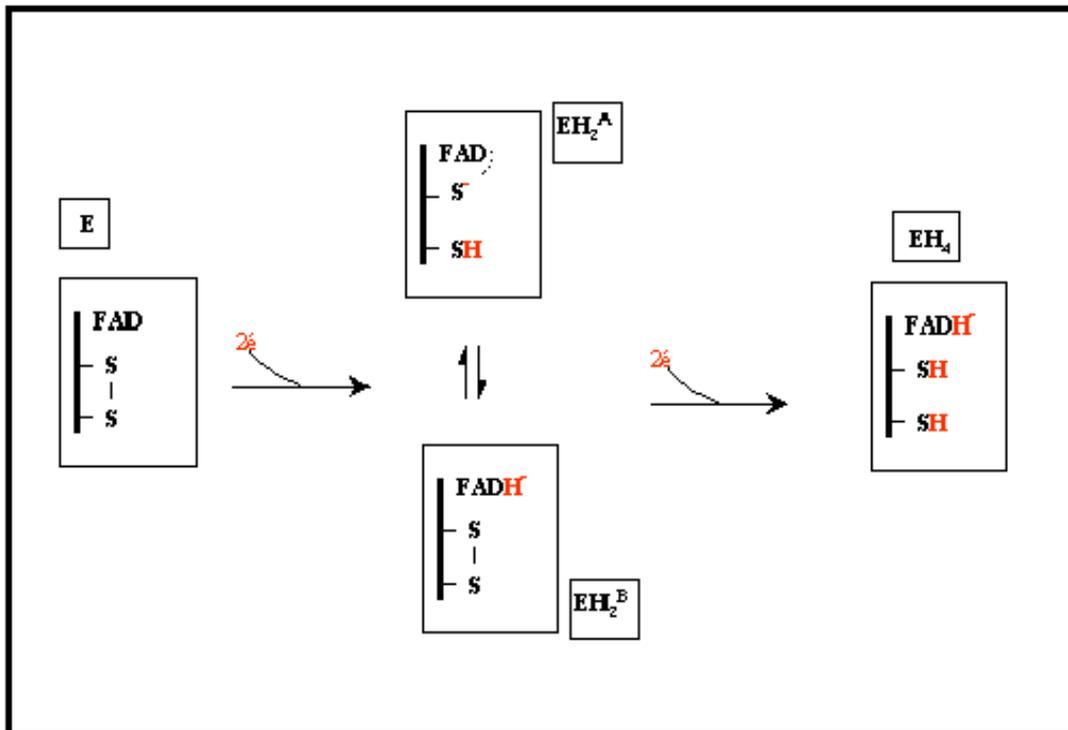


Abb. 5.1: Reaktionsmechanismus der Sulphydryloxidasen nach Hooper und Thorpe. Durch die erste Elektronenaufnahme wird ein Flavin Charge-Transfer Komplex (EH₂^A) gebildet, der mit einer zweiten Form (EH₂^B) im Gleichgewicht steht. Eine weitere Elektronenaufnahme führt zur Erzeugung eines vollständig reduzierten Enzyms (EH₄). Durch die Übertragung von zwei Protonen auf molekularen Sauerstoff entsteht Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und das Enzym kehrt in seinen oxidierten Zustand zurück (nicht gezeichnet).

Die vorliegenden Daten ergeben deuten an, dass die Bindestelle für FAD in Erv1p im Bereich zwischen den beiden Cysteinen an Position 133 und 159 lokalisiert ist. Beide Cysteine können eventuell mit dem FAD Molekül in Wechselwirkung treten und schaffen die strukturellen Voraussetzungen für die beobachtete feste aber nicht-kovalente Bindung. Fehlt eins dieser beiden Cysteine, so kann FAD nicht, oder zumindest nicht sehr fest an das Protein binden, so dass dieses Protein nicht die Aufreinigungsschritte mit gebundenem FAD überstehen kann. Die Tertiärstruktur wird dadurch so verändert, dass keine ausreichende FAD-Bindung mehr möglich ist. Dies führt logischerweise zum Verlust der enzymatischen Aktivität, da alle bekannten drei Gruppen von

Sulfhydryloxidasen für ihre Disulfidbrückenbildungsaktivität von Cofaktoren wie Eisen, Kupfer oder FAD abhängig sind (Benayoun *et al.* 2001).

Obwohl das Cysteinpaar 159/176 im Vergleich mit den anderen Paaren (30/33, 130/133) einen grösseren Abstand in Bezug auf die primäre Aminosäuresequenz hat, könnten die beiden Cysteine in der räumlichen Anordnung im Protein nahe beieinander liegen und so auch stark in einer engen funktionellen Wechselwirkung stehen. Die gestörte Wechselwirkung der Cysteine durch den Austausch an der Position 176 beeinflusst nicht direkt die FAD-Bindung, sondern hat wahrscheinlich einen schädlichen Einfluss auf den Elektronentransport im Protein. Wie das Beispiel von Erv1p-130 schon gezeigt hat, ist die FAD-Bindung nicht die alleinige Voraussetzung für die Enzymaktivität der FAD-abhängigen Sulfhydryloxidasen.

Die möglichen Funktionen der einzelnen Cysteine wurden in Abbildung 5.2 schematisch dargestellt.

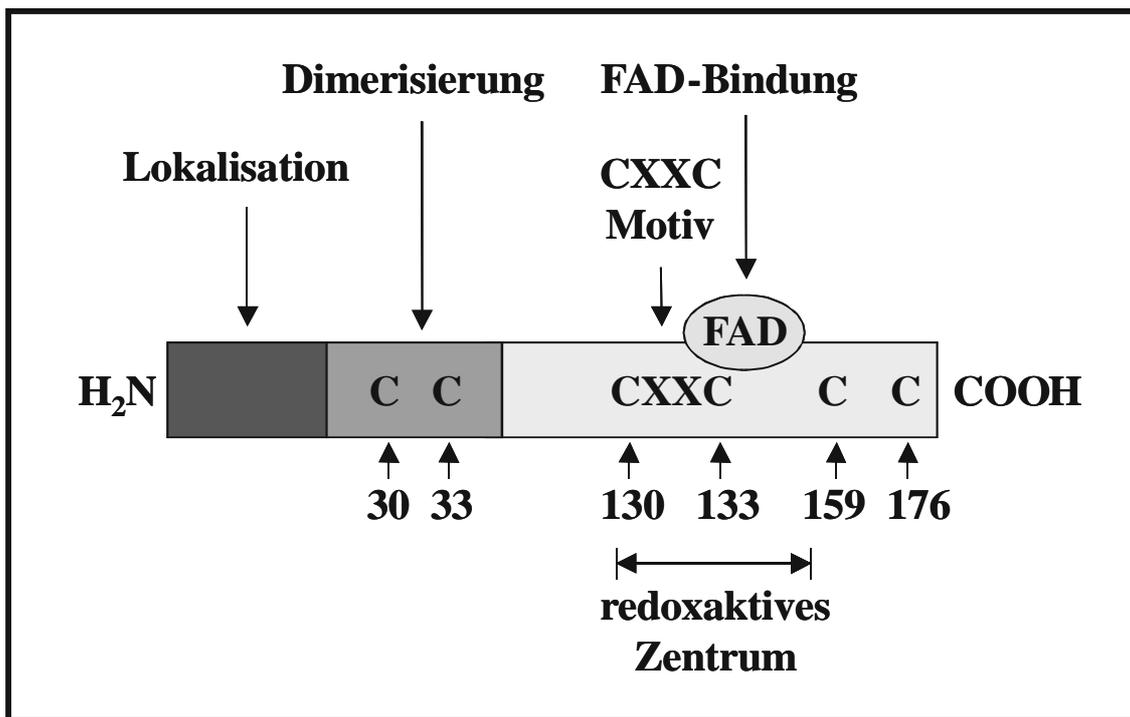


Abb. 5.2: Schematische Darstellung der Primärstruktur von Erv1p mit Bezug auf die Funktion. Die nicht konservierte N-terminale Domäne könnte zum Import des Proteins und damit zur Lokalisation, das Cysteinpaar 30/33 zur Dimerisierung des Proteins nötig sein, während das Cysteinpaar 130/133 zusammen mit dem gebundenen FAD das redoxaktive Zentrum bildet. FAD liegt wahrscheinlich im Bereich zwischen den Positionen 133 und 159 gebunden vor.

5.3. Interpretation der Ergebnisse anhand der aktuellen Kristallstruktur des verwandten Erv2-Proteins der Hefe

Nach Abschluss der experimentellen Arbeiten wurde die atomar aufgelöste Struktur des Erv2 Proteins der Hefe veröffentlicht (Gross *et al.* 2002). Dieses homologe Protein ist im endoplasmatischen Retikulum der Hefe lokalisiert und wird ebenfalls als Homodimer isoliert. Die Struktur der FAD Bindungsdomäne wird von einem Bündel aus 4 α -Helices gebildet. Eine fünfte kurze Helix steht rechtwinklig zu diesem Bündel. Die Anordnung dieser fünften Helix wird durch eine Disulfidbrücke fixiert. Bei dieser Disulfidbrücke steht die strukturelle Funktion im Vordergrund und es gibt keinen Hinweis auf eine Beteiligung an der

Redoxreaktion. Den daran beteiligten Cysteinen entsprechen im Erv1 Protein die Cysteine 159 und 176. Demzufolge destabilisiert die Mutation des Cysteins 159 die FAD Bindungsdomäne und erklärt den sehr geringen FAD Gehalt des mutierten Proteins. Unverstanden ist allerdings warum der Austausch des Cysteinpartners an Position 176 nicht den gleichen Effekt zeigt. Allerdings ist auch in dieser Mutante die Domäne nicht funktionstüchtig, denn trotz FAD Bindung ist das Protein enzymatisch nicht aktiv.

Erv1p und Erv2p weisen beide ein CXXC Motiv in der FAD-Bindungsdomäne auf, das für die Übertragung der Elektronen auf das FAD entscheidend ist. Von Thorpe wurde ein Charge-Transfer-Übergangszustand eines Thiolanions mit dem FAD postuliert (Hooper und Thorpe 1999), der durch die enge Nachbarschaft des C133 mit dem Flavin ermöglicht wird. Durch die Mutation des C130 wird dieser Übergangszustand wahrscheinlich stabilisiert, da die alternative Disulfidbrücke mit einem Serin an Position 130 nicht mehr möglich ist. Der stabilisierte Charge-Transfer-Komplex führt zu den beobachteten spektroskopischen Veränderungen. Die atomare Struktur dieser Mutante könnte unter Umständen die genaue Struktur des Übergangszustandes aufdecken.

Das Erv2 Protein weist ein ungewöhnliches Cystein-Glycin-Cystein Motiv im C-terminalen Teil des Proteins auf. Dieses Motiv sitzt auf einem Arm des Enzyms, der in den Proteinkristallen in einer von zwei Konfigurationen vorkommt. In einigen Molekülen liegt das Cystein-Glycin-Cystein Motiv in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums des zweiten Monomers, während es sich in den anderen Fällen an die kurze Helix des Proteins anlagert. Die Autoren postulieren, dass das Motiv am aktiven Zentrum oxidiert werden kann und die Flexibilität für die Interaktion mit den Substratproteinen notwendig ist. Dem Erv1p fehlt das entsprechende Cystein-Glycin-Cystein Motiv und der C-terminale Arm. Statt dessen besitzt es einen N-terminalen Arm mit dem Cysteinpaar 30/33, das eine analoge Funktion übernehmen könnte. Dieses

Cysteinpaar ist nicht direkt an der Struktur der FAD-Domäne beteiligt, da die kurze Form des Proteins ohne diese Cysteine sich in Bezug auf FAD Bindung und *in vitro* Aktivität nicht von der langen Form unterscheidet. Eine flexible Interaktion mit dem aktiven Zentrum des benachbarten Monomers würde zum einen die Dimerisierung des Proteins erklären, die bei der kurzen Form des Proteins nicht vorkommt. Zum anderen würden die spektralen Veränderungen nach Austausch des Cystein 30 gegen ein Serin dadurch verständlich. Trotz ähnlicher *in vitro* Eigenschaften kann die kurze Form das Protein *in vivo* nicht ersetzen. Es wäre daher interessant nach Substratproteinen zu suchen, die von der kurzen Form nicht reduziert werden können, sondern auf den flexiblen Arm des Proteins angewiesen sind.

6. Literaturverzeichnis

- Adham I.M., Kim Y., Shamsadin R., Heinlein U.A.O., von Beust G., Mattei M.-G., Engel W. (1998). Molecular cloning, chromosomal localization, and expression analysis of *CYRN1* and *CYRN2*, two human genes coding for cyritestin, a sperm protein involved in gamete interaction. **DNA Cell Biol.**17: 161-168
- Akiyama Y., Kamitani S., Kusukawa N., Ito K. (1992). *In vitro* catalysis of oxidative folding of disulfide-bonded proteins by the *Escherichia coli dsbA(ppfA)* gene product. **J. Biol. Chem.** 267, 22440-22445
- D'Aquila R.T., Bechtel L.J., Videler J.A., Eron J.J., Gorczyca P., Kaplan J.C. (1991). Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating. **Nucl Acid Res** 19, 3749
- Aumuller G., Bergmann M., Seitz J. (1991). Immunohistochemical distribution of sulfhydryl oxidase in the human testis. **Cell. Tissue. Res.** 266(1): 23-28
- Bader M., Muse W., Ballou D.P., Gassner C., Bardwell J.C. (1999) Oxidative folding is driven by the electron transport system. **Cell** 98: 60-66
- Becher D., Kricke J., Stein G. and Lisowsky T. (1999). A mutant for the yeast *scERV1* gene displays a new defect in mitochondrial morphology and distribution. **Yeast** 15(12): 1171-1181
- Benayoun B., Esnard-Fève A., Castella S., Courty Y., Esnard F. (2001). Rat seminal vesicle FAD-dependent sulfhydryl oxidase: biochemical characterization and molecular cloning of a member of the new sulfhydryl oxidase/ quiescin Q6 gene family. **J. Biol. Chem.** 276(17): 13830-3837
- Bergmann M., Aumuller G., Seitz J., Nieschlag E. (1992). Sulfhydryl oxidase immunoreactivity in seminiferous tubules of infertile men. **Cell. Tissue. Res.** 267(2): 209-214
- Beisenherz G., Boltze H.J., Bücher T., Czok R., Garbade K.H., Meyer-Arendt E., Pfeleiderer G. (1953). Phosphofructo-Aldolase, Phospho-glyceraldehyd-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchen-muskulatur in einem Arbeitsgang. *Z Naturforsch* **8b**, 555-577.
- Botstein D., Chervitz S.A., Cherry J.M. (1997). Yeast as a model organism. **Science** 277(5330): 1259-1260
- Chivers P.T., Prehoda K.E., Raines R.T. (1997). The CXXC-motif: a rheostat in the active site. **Biochemistry** 36: 4061-4066

- Church C. and Poyton R.O. (1998). Neither respiration nor cytochrome c oxidase affects mitochondrial morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Exp. Biol.** 201: 1729-1737
- Claverie J.M. (2001). Gene number - What if there are only 30,000 human genes? **Science** 291(5507): 1255-1257
- Collet J.F. and Bardwell J.C.A. (2002). Disulfides out of thin air. **Nat Struct Biol.** 9(1):2-3.
- Coppock D.L., Cina-Poppe D. and Gilleran S. (1998). The quiescin Q6 gene (*QSCN6*) is a fusion of two ancient gene families: thioredoxin and *ERV1*. **Genomics** 54(3): 460-468
- Coppock D.L., Kopman C., Scandalis S., Gilleran S. (1993). Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts. **Cell. Growth. Differ.** 4(6): 483-493
- Dujon B. (1996). The yeast genome project: what did we learn? **Trends. Genet.** 12(7): 263-270
- Ellman G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys** 82: 71-77
- Francavilla A., Polimeno L., Coetzee M., Makowka L., Rose J. *et al.* (1987). Extraction and partial purification of a hepatic stimulatory substance in rats, mice and dogs. **Cancer Res.** 47: 5600-5605
- Francavilla A. and Starzel T.E. (1991). Further steps of hepatic stimulatory substance purification. **Dig. Dis. Sci.** 36: 674-680
- Francavilla A., Hagiya M., Porter K.A., Polimeno L., Ihara I., Starzel T.E. (1994). Augmenter of liver regeneration: its place in the universe of hepatic growth factors. **Hepatology** 20(3): 747-757
- Francavilla A., Polimeno L., Barone M., Azzarone A., Starzl T.E. (1993). Hepatic regeneration and growth factors. **J. Surg. Oncol. Suppl.** 3: 1-7
- Frand A. R. and Kaiser C.A. (2000). Two pairs of conserved cysteines are required for the oxidative activity of Ero1p in protein disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. **Mol. Biol. Cell** 11(9): 2833-2843
- Freedman R.B., Brockway B.E., Lambert N. (1984). Protein disulphide-isomerase and the formation of native disulphide bonds. **Biochem. Soc. Trans.** 12(6): 929-932

- Freedman R.B. (1995). The formation of protein disulphide bonds. **Curr. Opin. Struct. Biol.** 5(1): 85-91
- Gandhi C.R., Kuddus R., Subbotin V.M., Prelich J., Murase N., Rao A.S., Nalesnik M.A., Watkins S.C., DeLeo A., Trucco M., Starzl T.E. (1999). A fresh look at augments of liver regeneration in rats. **Hepatology** 29(5): 1453-45
- Gerber J., Mühlenhoff U., Hofhaus G., Lill R., Lisowsky T. (2001). Yeast Erv2p is the first microsomal FAD-linked sulfhydryl oxidase of the Erv1p/Alrp protein family. **J. Biol. Chem.** 276 (26): 23486-23491
- Gething M.J. and Sambrook J. (1992). Protein folding in the cell. **Nature** 355(6355): 33-45
- Giorda R., Hagiya M., Seki T., Shimonishi M., Sakai H., Michaelson J., Francavilla A., Starzl T.E. and Trucco M. (1996). Analysis of the structure and expression of the augments of liver regeneration (*ALR*) gene. **Mol. Med.** 2(1): 97-108
- Gross E., Sevier C.S., Vala A., Kaiser C.A., Fass D. (2002). A new FAD-binding fold and intersubunit disulfide shuttle in the thiol oxidase Erv2p. **Nat Struct Biol.** 9(1):61-7.
- Hagiya M., Francavilla A., Polimeno L., Ihara I., Sakai H., Seki T., Shimonishi M., Porter K.A. Starzl T.E. (1994). Cloning and sequence analysis of the rat augments of liver regeneration (*ALR*) gene: expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 91(17): 8142-8146
- Hagiya M., Francavilla A., Polimeno L., Ihara I., Sakai H., Seki T., Shimonishi M., Porter K.A. Starzl T.E. (1995). Cloning and sequence analysis of the rat augments of liver regeneration (*ALR*) gene: expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 92(7): 3076
- Hatefi Y. (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. **Annu. Rev. Biochem.** 54:1015-541069
- Hawiger J. (1992). Repertoire of platelet receptors. **Methods in Enzymology** 215: 131-136
- Hodgkin J., Plasterk R.U.H., Waterston R.H. (1994). The nematode *Caenorhabditis elegans* and its genome. **Science** 270: 410-414
- Hofhaus G., Stein G., Polimeno L., Francavilla A. and Lisowsky T. (1999). Highly divergent amino termini of the homologous human *ALR* and yeast

- scERV1* gene products define species specific differences in cellular localization. **Europ. J. Cell Biol.** 78(5): 349-356
- Hooper K.L. and Thorpe C. (1999). Egg sulfhydryl oxidase: Kinetic mechanism of the catalysis of disulfide bond formation. **Biochemistry** 38: 3211-3217
- Hooper K.L., Glynn N.M., Burnside J., Coppock D.L., Thorpe C. (1999). Homology between egg white sulfhydryl oxidase and quiescin Q6 defines a new class of flavin-linked sulfhydryl oxidases. **J. Biol. Chem.** 274(45):31759-62
- Hooper K.L., Sheasley S.L., Gilbert H.F., Thorpe C. (1999). Sulfhydryl oxidase from egg white. A facile catalyst for disulfide bond formation in proteins and peptides. **J. Biol. Chem.** 274(32):22147-50
- Hwang C., Sinskey A.J., Lodish H.F. (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. **Science** 257(5076): 1496-1502
- Inoue H, Nojima H & Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene** 96, 23-28
- Jarosch E., Rödel G. Schweyen R.J. (1997). A soluble 12 kDa protein of the mitochondrial intermembrane space, *Mrs11*, is essential for mitochondrial biogenesis and viability of yeast cells. **Mol. gen. Genet.** 255: 157-165
- Jones E.W. and Fink G.R. (1982). Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast. In: the molecular biology of the yeast *Saccharomyces*-Metabolism and gene expression (Strathern J.N., Jones E.W., Broach J.R., eds) **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, pp181- 299
- Kadokura H. and Beckwith J. (2001) The expanding world of oxidative protein folding. **Nat Cell Biol.** 3(11):E247-9.
- Kamitani S., Akiyama Y., Ito K. (1992). Identification and characterization of an *Escherichia coli* gene required for the formation of correctly folded alkaline phosphatase, a periplasmic enzyme. **EMBO J.** 11, 57-62
- Kaut A., Lange H., Diekert K., Kispal G., Lill R. (2000) Isa1p is a component of the mitochondrial machinery for maturation of cellular iron-sulfur proteins and requires conserved cysteine residues for function. **J. Biol. Chem.** 275(21): 15955-15961
- Kissenbauer M. (2001) Eine neue, ubiquitäre eukaryontische Sulfhydryl Oxidase: Expression und Lokalisation in Säugern und Hefe. **Diplomarbeit** Heinrich-Heine Universität

- Kleemann R., Kapurniotu A., Frank R.W., Gessner A., Mischke R., Flieger O., Juttner S., Brunner H., Bernhagen J. (1998). Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase. **J. Mol. Biol.** 280(1): 85-102
- Kobayashi T., Kishigami S., Sone M., Inokuchi H., Mogi T., Ito K. (1997). Respiratory chain is required to maintain oxidized states of the DsbA-SsbB disulfide bond formation system in aerobically growing *Escherichia coli* cells **Proc. Natl. Acad. Sci.** 94, 11857-11862
- Kobayashi T. and Ito K. (1999). Respiratory chain strongly oxidizes the CXXC motif of DsbB in the *Escherichia coli* disulfide bond formation pathway. **EMBO J.** Vol. 18 No.5 pp. 1192-1198
- Kramer R. (1994). Functional principles of solute transport systems: concepts and perspectives. **Biochim Biophys Acta** 1185(1):1-34
- Kumari M., Aumuller G., Bergmann M., Meinhardt A., Seitz J. (1990). Stage-dependent appearance of sulfhydryl oxidase during spermatogenesis in the testis of rat and hamster. An immunohistochemical study. **Histochemistry** 94(4): 365-371
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-684
- Lange H., Kaut A., Kispal G., Lill R. (2000). A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 97(3): 1050-1055
- Lange H., Lisowsky T., Gerber J., Mühlenhoff U., Kispal G. Lill R. (2001). An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. **EMBO reports** 21(81)
- Lee J., Hofhaus. G. and Lisowsky T. (2000). *Erv1p* from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulfhydryl oxidase. **FEBS Lett.** 477(1-2): 62-66
- Lewis T., Zsak L., Burrage T.G., Lu Z., Kutish G.F., Neilan J.G. and Rock D.L. (2000). An African swine fever virus *ERV1-ALR* homologue, *9GL*, affects virion maturation and viral growth in macrophages and viral virulence in swine. **J. Virol.** 74(3): 1275-1285
- Lill R., Diekert K., Kaut A., Lange H., Pelzer W., Prohl C., Kispal G. (1999). The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. **J. Biol. Chem.** 380: 1157-1166

- Lisowsky T. (1996). Removal of an intron with unique 3' branch site creates an amino-terminal protein sequence directing the *scERV1* gene product to mitochondria. **Yeast** 12(15): 1501-1510
- Lisowsky T., Weinstat Saslow D.L., Barton N., Reeders S.T. and Schneider M.C. (1995). A new human gene located in the *PKD1* region of chromosome 16 is a functional homologue to *ERV1* of yeast. **Genomics** 29(3): 690-697
- Lisowsky T. (1994). *ERV1* is involved in the cell-division cycle and the maintenance of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.** 26(1): 15-20
- Lisowsky T. (1992). Dual function of a new nuclear gene for oxidative phosphorylation and vegetative growth in yeast. **Mol. Gen. Genet.** 232(1): 58-64
- Lisowsky T. (2001). Sulfhydryl oxidases and the genetics of mitochondrial biogenesis. **Recent Res. Devel. Genet.** 1: 1-10
- Lisowsky T., Lee J., Polimeno L., Francavilla A., Hofhaus. G. (2001). Mammalian augments of liver regeneration protein is a sulfhydryl oxidase. **Dig. Liver Dis.** 33(2): 173-180
- Meinhardt A., Wilhelm B., Seitz J. (1999). New aspects of spermatogenesis: Expression of mitochondrial marker proteins during spermatogenesis. **Europ. Society of human Reproduction and Embryology** 5(2): 108-119
- Mewes H.W., Albermann K., Bahr M., Frishman D., Gleissner A., Hani J., Heumann K., Kleine K., Maierl A., Oliver S.G., Pfeiffer F., Zollner A. (1997). Overview of the yeast genome. **Nature** 387(6632): 7-65
- Michalopoulos G.K. and DeFrances M.C. (1997). Liver regeneration. **Science** 276(5309): 60-6
- Mullis K.B., Faloona F.A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Meth Enzymol** 155, 335-350
- Nakamura H., Nakamura K., Yodoi J. (1997). Redox regulation of cellular activation. **Annu. Rev. Immunol.** 15: 351-369
- Pennisi E. (2000). Human genome project - and the gene number is...? **Science** 288(5469): 1146-1147
- Polimeno L., Margiotta M., Marangi L., Lisowsky T., Azzarone A., Lerardi E., Frassanito M.A., Francavilla R., Francavilla A. (2000). Molecular mechanisms of augments of liver regeneration as immunoregulator: its effect on interferon-gamma expression in rat liver. **Dig. Liver Dis.** 32(3): 217-225

- Polimeno L., Capuano F., Marangi L., Margiotta M., Lisowsky T., Lerardi E., Francavilla R., Francavilla A. (2000). The augments of liver regeneration induces mitochondrial gene expression in rat liver and enhances oxidative phosphorylation capacity of liver mitochondria. **Dig. Liver Dis.** 32(6): 510-517
- Polimeno L., Lisowsky T. and Francavilla A. (1999). From yeast to man - from mitochondria to liver regeneration: a new essential gene family. **Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.** 31(6): 494-500
- Pollard M.G., Travers K.J., Weissman J.S. (1998). Ero1p: A novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. **Mol. Cell** 1(2): 171-182
- Rose J.P., Wu C.K., Francavilla A., Prelich J.G., Iacobellis M., Hagiya M., Rao A.S., Starzel T.E. Wang B.C. (1997). Crystallization and preliminary crystallographic data for the augments of liver regeneration. **Acta Crystallographica** (Section D, Biological Crystallography) 53: 331-334
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1986) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York
- Schroers A., Burkovski A., Wohlrab H., Kramer R. (1998). The phosphate carrier from yeast mitochondria. Dimerization is a prerequisite for function. **J. Biol. Chem.** 273(23):14269-76.
- Senkevich T.G., White C.L., Koonin E.V., Moss B. (2000). A viral member of *ERV1/ALR* protein family participates in a cytoplasmic pathway of disulfide bond formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 97(22): 12068-12073
- Sherman F. (1997). Yeast genetics. The Encyclopedia of molecular biology and molecular medicine. **Edited by Meyers R.A., VCH Pub., Weinheim, Germany** 6: 302-325
- Stein G. and Lisowsky T. (1998). Functional comparison of the yeast *scERV1* and *scERV2* genes. **Yeast** 14(2): 171-180
- Tanaka T., Nishiyama Y., Okada K., Hirota K., Matsui M., Yodoi J., Hiai H., Toyokuni S. (1997) Induction and nuclear translocation of thioredoxin by oxidative damage in the mouse kidney: Independence of tubular necrosis and sulfhydryl depletion. **Lab. Invest.** 77(2): 145-155
- Wang G., Ming X., Zhang Y., Wang Q., Chen H., Wei H, *et al.*(1999). Identification and characterization of receptor for mammalian hepatopoietin that is homologous to Yeast *ERV1* **J. Biol. Chem.** 274: 11469-72

Yanez R.J., Rodriguez J.M., Nogal M.L., Enriquez C., Rodriguez J.F., Vinuela E. (1995). Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus. **Virology** 208:249-78

Zheng, L., Cash, V.L., Flint, D.H. and Dean, D.R. (1998) Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. **J. Biol. Chem.** 273: 13264–13272.

Teile dieser Arbeit wurden bereits an folgender Stelle publiziert.

Lee J., Hofhaus. G. and Lisowsky T. (2000). *Erv1p* from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulfhydryl oxidase. **FEBS Lett.** 477(1-2): 62-66

Lisowsky T., Lee J., Polimeno L., Francavilla A., Hofhaus. G. (2001). Mammalian augmenter of liver regeneration protein is a sulfhydryl oxidase. **Dig. Liver Dis.** 33(2): 173-180