

I

meine!

**Charakterisierung der ubiquitären mitochondrialen
Sulphydryloxidase (SOx) Erv1p / Alrp aus Hefe und Säugern**

Inaugural-Dissertation

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

Beate R. Rosenberg

Mönchengladbach

2004

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vom 25.11.2004.

1. Gutachter: apl. Prof. Dr. Thomas Lisowsky

2. Gutachter: Prof. Dr. William Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.2004

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
I. Einleitung.....	2 - 12
II. Material.....	13 - 18
A. Biologisches Material	13
1. Bakterien	13
2. Hefen	13
3. Zellkulturen	14
4. Säugetiermaterial: Ratte, Maus und Human	14
a) Ratte	14
b) Maus	14
c) Organe und Fraktionen	14
B. Verwendete Vektoren	15
C. Verwendete Primer	15
D. Verwendete Antikörper	16
E. Nährsubstrate und Lösungen	16
1. Bakterien	16
2. Hefen	17
3. Zellkulturen	17
4. DNA	18
5. Immunzytochemie	18
III. Methoden.....	19 - 45
Allgemeine Methoden	19 - 24
A. Bakterienanzucht	19
B. Präparation kompetenter Bakterienzellen	19
C. Transformation von Bakterienzellen	20
D. Plasmid-Isolation aus <i>E. coli</i>	20
E. Plasmid-Isolation nach der Boiling-Methode	20
F. Photometrische Messung der Nukleinsäurekonzentration	20
G. Transformation von Hefen	20
1. Ausplattieren von Hefen	21
2. Lösungen für die Transformation	21
H. Kryokonservierung	21
1. Hefestämme	21
2. Bakterien	22
I. Sporulation und Tetradenanalyse	22
J. Mitochondrienisolation	22
1. Isolation aus Gewebe (20%iger Percoll-Gradient)	22
2. Isolation aus Hefe (Methode mit Glasperlen)	23
K. Fällungsmethoden	23
1. Ethanol-Chloroform-Methode für DNA	23
2. Trichloressigsäure (TCA)-Fällung für Proteine	23

Molekularbiologische Methoden.....	25 - 30
A. Zellfreie DNA-Vermehrung (<i>in vitro</i> Amplifikation von DNA)	25
B. Modifikation von PCR-Produkten	25
1. Einführung von Restriktionsschnittstellen	25
2. Herstellung markierter Fusionskonstrukte	25
3. Herstellung der Importsequenz von <i>ALR</i>	25
4. Herstellung der nativen <i>ALR-DNA</i> mit STOP-Sequenz für Expressionsuntersuchungen	25
C. <i>In vitro</i> -Mutagenese	25
1. <i>ERV1-C133S</i> -Mutante	25
2. <i>ERV1-C33S</i> -Mutante	26
3. <i>ERV1-C30/33S</i> -Doppelmutante	26
D. Standard-Labortechniken für DNA	27
1. Nachweis von amplifizierter DNA	27
2. Restriktionsenzyme und Methoden	27
3. Ligierung von DNA in Vektoren	27
a) Ligation der Cystein-Mutanten	28
b) Ligation der Cystein-Doppelmutanten	28
c) Primer-Phosphorylierung	28
4. Test der DNA-Konstrukte	28
5. Agarose-Gelelektrophorese	29
6. Elution von DNA aus Agarosegelen	29
E. Sequenzierung von Plasmid-DNA	29
1. Modifizierte DNA-Isolation für die Sequenzierung	29
2. Sequenzierung von DNA	29
F. Klonierung der <i>ERV1</i> -Mutanten für die Arbeiten mit Hefe	29
1. Klonierung der Punktmutanten	29
2. Herstellung von Doppelmutanten	30
3. Herstellung der C30/33S-Doppelmutante in <i>ERV1</i>	30
Proteinbiochemische Methoden.....	31 - 36
A. Einengung von Proteinlösungen	31
B. Herstellung von Proteinextrakten	31
1. Gesamtproteinextrakte aus Geweben	31
2. Gesamtproteinextrakte aus Zellen	31
C. Proteinexpression	31
1. Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	31
2. Isolation löslicher Proteine aus <i>E. coli</i>	32
3. Aufreinigung von His-Tag-markierten Proteinen aus Hefe	32
D. Konzentrationsbestimmung von Proteinen	33
1. Gesamtproteinbestimmung nach Bradford	33
2. Gesamtproteinbestimmung nach Biuret	33
3. Proteinbestimmung des aktiven FAD-gebundenen Proteins	33
E. <i>in vitro</i> -Analysen: Sulfhydryloxidasetest	33
F. <i>in vitro</i> -Analysen: Dimerisierungstests	34
1. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese von Proteinen	34
2. Transfer von Proteinen auf Membranen (Western-Analyse).....	34
3. Färbung der transferierten Proteine (Ponceau S Färbung)	35

4. Immunologischer Nachweis von Proteinen (indirekter Nachweis)	35
5. Chemolumineszenz-Reaktion und indirekte Visualisierung der Proteine	35
6. Lösen der Antikörper von NC-Membranen	36
Zellkulturtechniken	37 - 41
A. Kultivierung von Zelllinien	37
1. Allgemeine Zellkulturbedingungen	37
2. Nährmedien und Kulturbedingungen	37
B. Zellzahlbestimmung	38
C. Transfektion	38
1. Transfektion mit DOSPER	38
2. Transfektion nach Qiagen	38
3. Transfektion mit DEAE-Dextran	39
D. Einfrieren und Auftauen von humanen Zellkulturen	40
E. Einengung der Zellkulturüberstände	40
F. Fluoreszenzmikroskopie von GFP-Fusionsproteinen	40
Mikroskopische Methoden	41 - 43
A. Inverse Mikroskopie	41
B. Mikromanipulator	41
C. Fluoreszenzmikroskopie	41
D. Mikroskopische Daten	41
1. Filtersysteme	41
2. Objektive und Okulare	42
3. Filme und Kameras	42
4. Farbstoffe	42
E. Konfokale Mikroskopie	43
Immunzytochemie	44 - 45
A. Fixierung der Gewebeschnitte	44
1. Paraffin-Fixiertes Gewebe	44
2. Kryofixiertes-Gewebe	44
B. Färbemethoden	44
1. Paraffin-Fixiertes Gewebe	44
2. Kryofixiertes Gewebe	44
a) Permeabilisierung von Gewebe	45
b) Verwendete Antikörper für die Immunzytochemie	45
c) Blocken unerwünschter Enzymaktivität	45
IV. Ergebnisse	47 - 92
Kapitel I : Erv1p der Hefe	47 - 66
A. Die <i>in vitro</i> -Mutagenese	47
1. Schema zur <i>in vitro</i> -Mutagenese	47
2. Schema zur <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> -Analyse	49

B. Das genetische System in Hefe	50
1. Phänotypuntersuchungen	50
2. Tetradenanalysen	52
C. Die Analysen mit rekombinanten Proteinen aus <i>E. coli</i>	54
1. Die Enzymaktivität der Mutantenproteine C33S und C133S	54
2. Die Enzymaktivität für alle Erv1p-Mutanten im Vergleich	56
3. Dimerisierungstests	57
4. Die Dimerisierungseigenschaften der Erv1-Proteine aus Hefe	58
5. Spektroskopie der C30/33S Doppelmutante	59
D. Die Analysen der Erv1-Mutantenproteine aus Hefe	60
1. Das FAD/Gesamtprotein-Verhältnis aller Erv1p-Mutanten aus Hefe in vier unabhängigen Messungen und drei Methoden	60
E. Die Farben der rekombinanten Erv1-Proteine	61
F. Substratsuche über Substratfang (substrate trapping)	62
1. Das Substratfang-Modell	62
2. Substratfang des Mutantenproteines C33S	64
G. Die Substratsuche mit Hefeantikörpern gegen bekannte IMS Proteine	65
Kapitel II: Das Homologe Erv1p der Säuger (Alrp)	67 - 92
A. Genkonstrukte	67
1. Herstellung der Fusionskonstrukte	67
2. Expression der <i>ALR-GFP</i> -Fusionskonstrukte in Zellkulturen	69
3. Expression der nativen Alrp-Form in Zellkulturen	70
B. Fraktionierungen	71
1. Mitochondrienisolation aus Maus-Leber	71
2. Blut von regenerierenden Lebern aus Ratte	72
3. Zusammenstellung: Serum, Zytoplasma und Kontrollen	73
C. Exkretion von Alrp	75
1. Exkretion der Volllängenform von Alrp in Zellkulturen unter Langzeitkulturbedingungen	75
2. Exkretion des nativen Alrp in Zellkulturen unter Langzeitkulturbedingungen	76
3. Zusammenstellung: Exkretion des nativen Alrp unter serumfreien Bedingungen	77
D. Zellkulturen	78
1. Verschiedene Zelltypen im Vergleich	78
2. Leberzelllinien: HSC	80
E. GFP-Fluoreszenz transfektierter Zellkulturtypen	81
1. Verschiedene Alrp-Fusionsproteine im selben Zelltyp	81
2. Die Volllängenform des Alrp in unterschiedlichen Zelltypen	82
F. Alrp-Lebermodell	83
G. Stabilität von Alrp	84
H. Alrp in regenerierender Leber	85
1. Gewebeextrakte	85
2. Das natürliche System der Leber – Zusammenfassung	86
3. Das Modell der Leberschädigung durch Fibrose	87

VIII

I. Immunzytochemische Untersuchungen	88
1. Video-Mikroskopie mit Nachweis über Alkalische Phosphatase	88
2. Fluoreszenz-Mikroskopie	89
V. Diskussion	93 - 112
A. Erv1p aus Hefe	93
B. Das homologe humane Erv1p der Säuger (Alrp)	105
VI. Literaturverzeichnis	113 - 118
Danksagung	119 - 121

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit geht es um die ubiquitäre FAD-abhängige Sulphydryloxidase Erv1p von Hefe und höheren Eukaryoten. Das Enzym ist bevorzugt im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert und katalysiert unabhängig vom Endoplasmatischen Retikulum, das Einfügen von Disulfidbrücken in Substrate.

Voraussetzungen für die Untersuchungen an Hefe Erv1p waren sechs Cystein-Mutanten und ein etabliertes biochemisches Testsystem. Damit gelang es, ein dynamisches 3D-Modell für den Enzymmechanismus zu entwickeln. Das 3D-Modell entstand aus den Kenntnissen über den charakteristischen Domänenaufbau von Erv1p und den gefundenen Interaktionen seiner funktionellen Cysteine. Als Grundlage für das Modell diente eine Röntgenkristallstrukturanalyse des nahe verwandten Hefeenzym Erv2p. Die Funktionen der sechs Cysteine des Erv1p wurden näher untersucht. Die C-terminalen Cysteinpaare sind strukturell wichtig für die FAD-Bindungstasche. Die N-terminalen Cysteine sind verantwortlich für die Dimerbildung und den Transfer der Disulfidbrücken vom aktiven Zentrum auf Substrate. Dabei ist der flexible N-terminale Arm des Enzyms in der Lage eine Bewegung auszuführen. Erv1p bildet Homodimere in einer antiparallelen Anordnung aus. Eine Cystein-Mutante von Erv1p wurde für die Substratsuche genutzt. Das Substratfangmodell gab dabei erste Hinweise auf ein mögliches Substrat von 2 kDa Größe. Bei der *in vivo* Substratsuche konnte mit bekannten Intermembranraum-Antikörpern ein mögliches Substrat identifiziert werden.

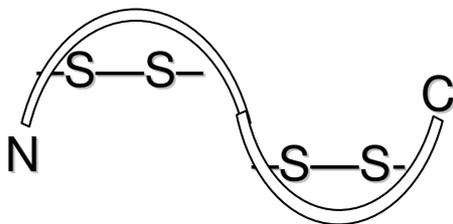
Die Arbeiten an dem homologen humanen Erv1p, dem Alrp der Säuger, konnten das scErv1-Modell erfolgreich für höhere Eukaryoten erweitern. Neue Ergebnisse liegen vor. Alle Daten aus den *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen ergaben ein einheitliches Bild. Die Expressions- und Regulationsmechanismen sind für Alrp komplexer. Es gibt drei Alrp-Varianten in Säugetierzellen. Ihre subzellularen Lokalisationen wurden identifiziert. Alrp konnte als ein essentielles und ubiquitäres Protein in allen Geweben von Säugern beschrieben werden. Alrp ist nicht leberspezifisch. In Zellkulturen wurden unter den speziellen Versuchsbedingungen alle Alrp-Varianten identifiziert. Es wird aktiv exkretiert. Eine eindeutige Lokalisation der Varianten in Zellkulturen war nicht möglich. Für die Expression der Varianten deuten die Untersuchungen auf differentielle Translation oder Protein-Prozessing hin. Die *in vivo*-Formen des Alrp wurden bei Maus, Ratte und Mensch untersucht. Alrp ist in den Mitochondrien mit der 23 kDa und 21 kDa Variante lokalisiert. Die 21 kDa Variante wurde extrazellulär im Serum von regenerierenden Rattenlebern nachgewiesen. Die 15 kDa Variante von Alrp wurde bei meinen Gewebeuntersuchungen nie gefunden. Erst bei unspezifischem Gewebeabbau wurde ein Nachweis geführt.

I. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit werden die Untersuchungen an einem neuen Enzymtyp der Familie der Oxidasen vorgestellt. Sulfhydroxidasen können über die Oxidation der Sulfhydrylgruppen von Cysteinen Disulfidbrücken herstellen. Das vorliegende Problem wird verständlicher, wenn die bekannten Grundlagen der biologischen Disulfidbrückenbildungen betrachtet werden.

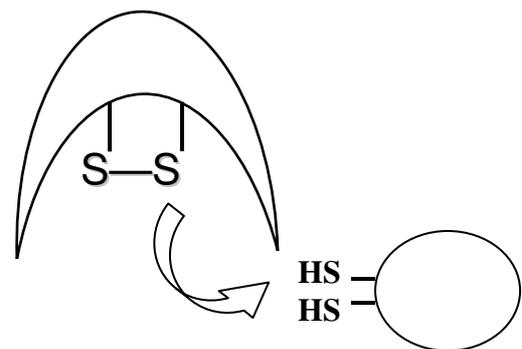
Die Aminosäure Cystein besitzt eine Seitenkette, die ihr spezielle Eigenschaften verleiht. Sie trägt eine reaktive Sulfhydrylgruppe (-SH), die mit einem zweiten Cysteinrest unter Bildung einer Disulfidbrücke (-S-S-) reagieren kann und eine kovalente Bindung eingeht. Die Disulfidbrücken spielen eine wichtige Rolle für Proteine in und außerhalb der Zelle. Die Betrachtung von Proteinen und Aminosäuresequenzen mit Cysteinen belegen unterschiedliche Funktionen der vorhandenen Disulfidbrücken. Sie sind in der **Abb. 1** exemplarisch dargestellt.

A. Struktur



Beispiel ist die Ribonuklease (Anfinsen 1973).

B. Redoxaktives Zentrum mit Transfer



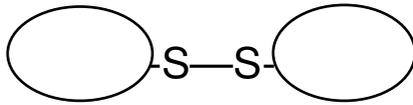
Beispiel ist das Thioredoxin (Nakamura et al. 1997).

Abb. 1a: Verschiedene Funktionen von Disulfidbrücken in Proteinen.

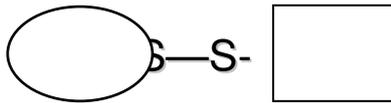
- A. Strukturbildende Disulfide,
- B. Ausbildung eines redoxaktiven Zentrums mit Transfer der Bindung auf ein Substrat.

C. Komplex-Bildung

1. Homodimere

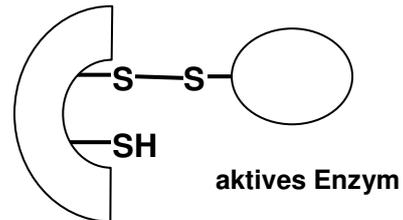
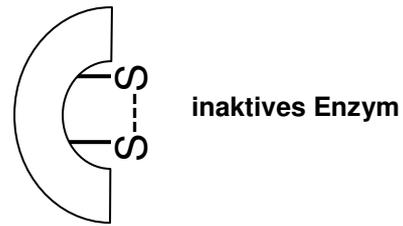


2. Heterodimere



Beispiele sind Immunoglobuline.

D. Regulation



Beispiel ist die Endoplasmatische Retikulum Oxidase (Fränd et al. 2000).

Abb. 1b: Verschiedene Funktionen von Disulfidbrücken in Proteinen.

- C. Die Komplex-Bildung von Hetero- und Homodimeren,
- D. Die Regulation von Prozessen mittels Disulfidbrücken.

Im Allgemeinen entsteht die kovalente Bindung an den Thiolgruppen zweier Cysteine, die sich in der gleichen oder jeweils in unterschiedlichen Polypeptidketten befinden. In eukaryontischen Zellen werden Disulfidbindungen hauptsächlich im Lumen des ER gebildet, nicht im Zytosol. In Gegenwart von Sauerstoff läuft die Reaktion spontan ab. Im Endoplasmatischen Retikulum ist für die *de novo* Synthese von Disulfidbrücken das Protein Ero1, Endoplasmatische Retikulum Oxidase 1, verantwortlich (Fränd et al. 2000). Disulfidbrückenbildner ist das Enzym Pdi1p, die Protein-Disulfid-Isomerase 1 (Freedmann et al. 1984). Seine essentielle Funktion ist die Umfaltung von vorhandenen Disulfidbrücken (Laboissiere et al. 1995). Intrazelluläre Proteine weisen relativ wenige Disulfidbrücken auf. Extrazelluläre Proteine enthalten mehr Disulfidbrücken, die die korrekte Struktur stabilisieren. Disulfidbrücken kommen daher bei Sekretproteinen und exoplasmatischen Domänen von Membranproteinen vor. Zytosolische Proteine werden an freien Ribosomen synthetisiert. Die nativen Proteine werden unter den Bedingungen nicht durch Disulfidbrücken stabilisiert. Die zytosolischen Proteine liegen in der denaturierten Transportform in der Zelle vor, bis sie ihren Bestimmungsort erreicht haben.

Subzelluläre Räume der Zelle wie die Mitochondrien waren bis vor kurzem als Orte bekannt, in denen die Reaktionen für die Neubildung (*de novo*) von Disulfidbrücken an Proteinen oder

Substraten nicht vorkamen oder eine wesentliche Rolle spielten. Die Matrix der Mitochondrien mit ihrer speziellen reduzierenden Umgebung ist die Ursache dafür, dass Thiolgruppen nicht stabil vorliegen können. Neue Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass außerhalb des ER eine signifikante Aktivität von Disulfidbrücken-Bildungen in der Zelle gefunden werden (Coppock et al. 1998, Hooper et al. 1999a,b). Das Auffinden von spezialisierten Sulphydryloxidasen in Mitochondrien gab den Anstoß, die Disulfidbildungs-Hypothesen in der Zelle neu zu überdenken. Eine große Anzahl von Proteinen sind mittlerweile als Sulphydryloxidasen identifiziert worden. Sie gehören alle ein und derselben Proteinfamilie an (Coppock et al. 1998). Sulphydryloxidasen (SOx) sind Enzyme, die als neue Familie der Oxidasen beschrieben wurden. Unabhängig vom ER können sie Disulfidbrücken in Substrate einfügen und verwenden dazu Sauerstoff als Oxidationsmittel (Hooper et al. 1999). Andere Ergebnisse zeigten, dass SOx unter Sauerstoffabschluss alternative Substrate verwenden (Sevier et al. 2001). Sie katalysieren folgende Reaktion:



Die Oxidation der Sulphydrylgruppen wird hier gekoppelt mit der Reduktion von Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid.

Im Allgemeinen sind Sulphydryloxidasen relativ kleine Proteine. Sie binden Kofaktor wie Eisen-, Kupfer- und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und besitzen ein CxxC-Motiv, das funktionell an der Redox-Reaktion beteiligt ist. Sie unterscheiden sich in ihren Molekulargewichten, den Dimerisierungseigenschaften und der Substratspezifität (Hooper und Thorpe 1999).

Bei der Suche nach Hefegenen, die für Interaktionen zwischen Mitochondrien und Zellkern eine Rolle spielen, wurde eine temperatursensitive Mutante identifiziert, die bei Ausfall der oxidativen Phosphorylierung eine ungewöhnliche Zellzyklusarretierung zeigte. Bei Ausfall des Gens destabilisiert die Mitochondrienmembran und die Zellkernhülle defragmentiert, dann stirbt die Zelle (Lisowsky 1992). Das gefundene mutierte Gen wurde mittels Komplementationsanalysen untersucht und eine duale Funktionalität wurde identifiziert. Das Gen war notwendig für die oxidative Phosphorylierung und die Lebensfähigkeit der Zelle und erhielt daraufhin den Namen *ERV1* (**E**ssential for **R**espiration and **V**iability). Durch weitere Expressionsstudien wurde eine detailliertere Spezifikation für die Rolle des *ERV1* in den Mitochondrien und der Regulation der zellularen Funktion aufgedeckt (Lisowsky 1994 und 1996). Die subzelluläre Lokalisation des *Erv1p* in der Hefe konnte für das Zytosol und die

Mitochondrien von Hefezellen bestimmt werden (Lisowsky 1996), wo es eine essentielle Rolle spielt bei der normalen Ausbildung der mitochondrialen Membranmorphologie und der Stabilität der Organellen in der Zelle. Das Hefeprotein Erv1 stand für weitere Funktionsaufklärungen zur Verfügung. Am Beginn der Untersuchungen über das *ERV1*-Gen wurden im Gen Punktmutationen eingefügt. Die resultierenden Aminosäuresequenzen des Erv1p enthielten an den jeweiligen Stellen für die Cysteine ein Serin. So wurde das veränderte Verhalten der mutagenisierten Proteine einzeln getestet. Aus Untersuchungen war bekannt, dass in der Hefe früher mehr Cysteine in den Aminosäuresequenzen ihrer Proteine vorhanden waren. Die Anzahl der Cysteingruppen in den Proteinen der Hefe erfuhr im Laufe der Zeit eine Reduzierung, auf die wesentlichen Cysteine mit wichtiger Funktion. Die Ursache dafür ist der heutige Lebensraum der Hefen auf Pflanzenoberflächen, wie Blätter, Blüten und Früchte. Der Lebensraum liefert keine ausreichenden Schwefelquellen, sondern nur Proteine und schwefelarme C-Quellen. Die Reduktion der Cysteinreste in Hefeproteinen hält daher weiterhin an (Jones und Fink 1982).

Weitere biochemische und enzymologische Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe lieferten für Erv1p weitere Auskünfte über den Domänenaufbau und die funktionellen Mechanismen im Erv1-Protein. Das Hefe *ERV1* Gen kodiert ein einziges Protein von 189 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 22 kDa, zu sehen in **Abb. 2**. Das Gen ist essentiell für die Hefezelle. Über die Proteinsequenz des Erv1p sind sechs Cysteine verteilt, von denen vier Cysteine -CxxC-Motive darstellen (Der erste Sequenzblock mit -PCRSC- und der zweite mit einer -PCNWC- Sequenz). Untersuchungen konnten belegen, dass der N-terminale Proteinbereich eine größere Sequenzvariabilität im Vergleich mit anderen Proteinen verschiedener Spezies zeigt und die Lokalisationssequenz und eine Dimerisierungsdomäne besitzt. Im Gegensatz dazu ist die C-terminale Domäne im Vergleich mit verschiedenen Spezies stark konserviert, was verständlich wird, da hier das CxxC-Motiv des redox-aktiven Zentrums und die FAD-Bindungsregion liegen.

Domänen des Erv1-Proteins

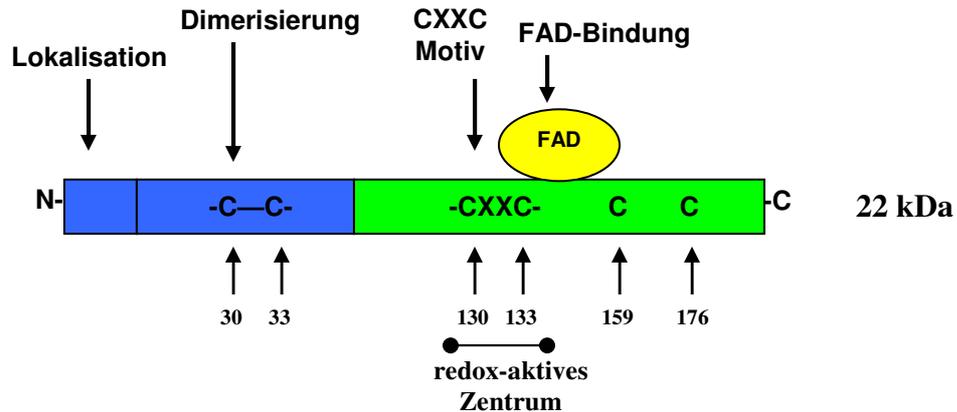


Abb. 2: Die Grafik zeigt die funktionellen Domänen des Erv1p. Der N-Terminus trägt die Zielsequenz und die Dimerisierungsdomäne für das Protein. Der grün gekennzeichnete C-terminale Proteinbereich trägt das CxxC-Motiv des redoxaktiven Zentrums und die FAD-Bindungsregion. Die Zahlen mit den Pfeilen zeigen die Positionen der Cysteine in der Proteinsequenz an.

Die Hefe besitzt ein zweites Gen, das *ERV2*, das entfernte Homologien zu *ERV1* aufweist. Bei Komplementationsuntersuchungen am Gen konnte *ERV2* die *ERV1*-Funktionen nicht übernehmen (Stein und Lisowsky 1998) und steht, im Gegensatz zu *ERV1*, daher nicht im Zusammenhang mit irgendeiner Wachstumsfunktion für die Zelle. Das Protein Erv2p besitzt 196 Aminosäuren. Erv1p und Erv2p katalysieren Disulfidbrückenbildungen in Substrate. Erv2p ist die erste Sulfhydryloxidase, die in den Mikrosomen des Endoplasmatischen Retikulums gefunden wurde und zur Erv1p/Alrp-Familie der FAD-bindenden Sulfhydryl-Oxidasen gehört (Gerber et al. 2001). Erv2p kommt parallel mit Ero1p und Pdip im Endoplasmatischen Retikulum vor (Sevier et al. 2001). Damit unterscheiden sich die subzellularen Lokalisationen der beiden Hefeproteine. Erv2p ist im ER und Erv1p im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert (Lisowsky 1996, Hofhaus et al. 1999a). Stellvertretend für die speziellen Sulfhydryloxidasen, die in der Hefe gefunden wurden, stehen somit Erv1p und Erv2p. Ihre Gensequenz und die resultierende Proteinsequenz konnten aufgeklärt werden (Stein und Lisowsky 1998, Lee et al. 2000) und der daraus gefundene Domänenaufbau gab Hinweise auf den Mechanismus im Protein. Die generelle Bedeutung des *ERV1*-Gens und seines Proteins für die eukaryontische Zelle als ein Modellsystem wurde deutlich durch die Identifikation des strukturellen und funktionellen humanen homologen Gens (Lisowsky et al. 1995). Die Hefe ist ein eukaryontischer Einzeller, weshalb es wichtig war, ein homologes Gen in Säugern ausfindig zu machen und zu untersuchen.

Das homologe humane Gen trägt den Namen *ALR*, als Abkürzung für **Augmenter of Liver Regeneration**. *Alrp* wurde bei der Leberregeneration entdeckt und für einen potentiellen hepatischen Wachstumsfaktor gehalten (Francavilla et al. 1994). Die Besonderheit der Leber ist ihre Regenerationsfähigkeit in kürzester Zeit (Michalopoulos et al. 1997). In regenerierenden Lebergeweben wurde eine hohe Expressionsrate des Proteins gefunden, das später als *Alrp* Bezeichnung fand. Bei Untersuchungen wurde nach Injektion einer *Alrp*-Proteinlösung das Wachstum von Hepatocyten in der Leber angeregt (Hagiya et al. 1994). Das diente als Beleg, dass *Alrp* die proliferative Aktivität sich teilender Hepatocyten verstärkt und selber als ein sekundärer hepatischer Wachstumsfaktor wirkt.

In unserer Arbeitsgruppe wurde ein humanes Gen auf Chromosom 16 als ein homologes Hefe *ERV1*-Gen identifiziert und als humanes (h) *ERV1* bezeichnet. Durch Komplementationstudien konnte gezeigt werden, dass das *scERV1* essentiell für die Zellfunktion ist und dass das humane *hERV1*-Gen ein strukturell und funktionell homologes Gen des *scERV1*-Gens ist (Lisowsky et al. 1995). Der Entdeckung folgte eine genaue vergleichende Untersuchung des Gens und seiner Struktur. Gleichzeitig wurde das homologe *ALR*-Gen aus Ratte und Maus identifiziert und durch Untersuchungen seiner spezifischen Struktur und Lokalisationen der Leberregeneration und der Spermatogenese zugeordnet (Hagiya et al. 1995; Giorda et al. 1996). Das humane Gen wurde nun wegen seiner schon früh beschriebenen möglichen Rolle bei der Leberregeneration als ein verstärkender hepatischer Wachstumsverstärker betrachtet (Lisowsky 1996; Giorda et al. 1996).

Die Expression des *ALR*-Gens in höheren Eukaryonten verläuft komplexer als die Expression des *ERV1* in der Hefe. Für *ALR* liegt in den Genomen der untersuchten Säuger Maus, Ratte und Mensch nur jeweils ein Gen vor (Maus Chromosom 17, Mensch 16) (Polimeno et al. 1999). Es wurden aber verschiedene Formen des *Alr*-Proteins mit unterschiedlichen Molekulargewichten gefunden (Giorda et al. 1996). Daraufhin wurde vermutet, dass das Auftreten verschiedener Formen von *Alrp* regulatorische Ursachen hat und möglicherweise durch Initiation der Translation an verschiedenen ATGs der mRNA entsteht. Die entstehenden Proteine weisen somit eine verkürzte N-terminale Domäne auf. Es wurden 23 kDa und 15 kDa Proteine bei der Ratte detektiert (Giorda et al. 1996, Rose et al. 1997). Für das humane *Alrp* wurden die lange und die kurze Proteinform in humanen Zellen gefunden. Es wurden Genkonstrukte hergestellt und für die Expression des humanen *ALR* in Hefe getestet. Bei den Untersuchungen der homologen Genkomplementation konnte das humane

ALR das Hefegen ersetzt (Lisowsky et al. 1995). Aus den vergleichenden Untersuchungen an der *ERV1/ALR*-Genfamilie in unserer Arbeitsgruppe war bekannt, dass die N-terminale Domäne des Erv1-Proteins von Hefe notwendig ist für den Import der Proteine in die Mitochondrien. Durch Antikörperuntersuchungen wurde die Assoziation des Proteins mit den Mitochondrien bestätigt (Lisowsky 1996). Durch Herstellung von Fusionsproteinen für Alrp und Erv1p mit GFP konnte die subzelluläre Lokalisation der homologen Proteine in Hefe und humanen Zellen in ersten Experimenten untersucht werden. In Hefezellen akkumuliert humanes Alrp im Zytoplasma, während scErv1p mit den Hefemitochondrien assoziiert. Erste vergleichende Studien in humanen Zellen lokalisierten Alrp im Zytoplasma der Zellen (Hofhaus et al. 1999a). Im Allgemeinen konnte für die beiden bekannten Formen des Alr-Proteins ein zytosolischer Nachweis geführt werden (Hagiya et al. 1995; Giorda et al. 1996). Aus der Literatur ist von einer anderen Arbeitsgruppe für die kurze 15 kDa Form von Alrp ein Nachweis im Zellkern (Hagiya et al. 1994) bekannt. Die Ergebnisse zeigen, dass für die genaue subzelluläre Lokalisation des Alrp noch weitere Untersuchungen notwendig sind.

Eine Genom-Datenbank-Analyse zeigte, dass *ALR* ubiquitär bei allen eukaryontischen Organismen vorkommt. Die abgeleiteten Proteinsequenzen ergaben für die C-terminale Domäne einen 40%igen identischen Aminosäureanteil. Das ist ein stark konservierter Bereich. Die N-terminale Domäne zeigt hingegen Variabilität in der Sequenz, selbst zwischen eng verwandten Spezies wie Maus, Ratte und Mensch (Lisowsky 1995 und 1996). Das CxxC Motiv kommt in allen verglichenen Sulphydryloxidasen vor und ist zusammen mit seinen benachbarten Aminosäuren stark konserviert (-PCEEC-; Hofhaus et al. 1999a; Polimeno et al. 1999). Den Domänenaufbau des Alrp vom Menschen soll im folgenden die **Abb. 3** verdeutlichen.

Domänen des humanen Alr-Proteins

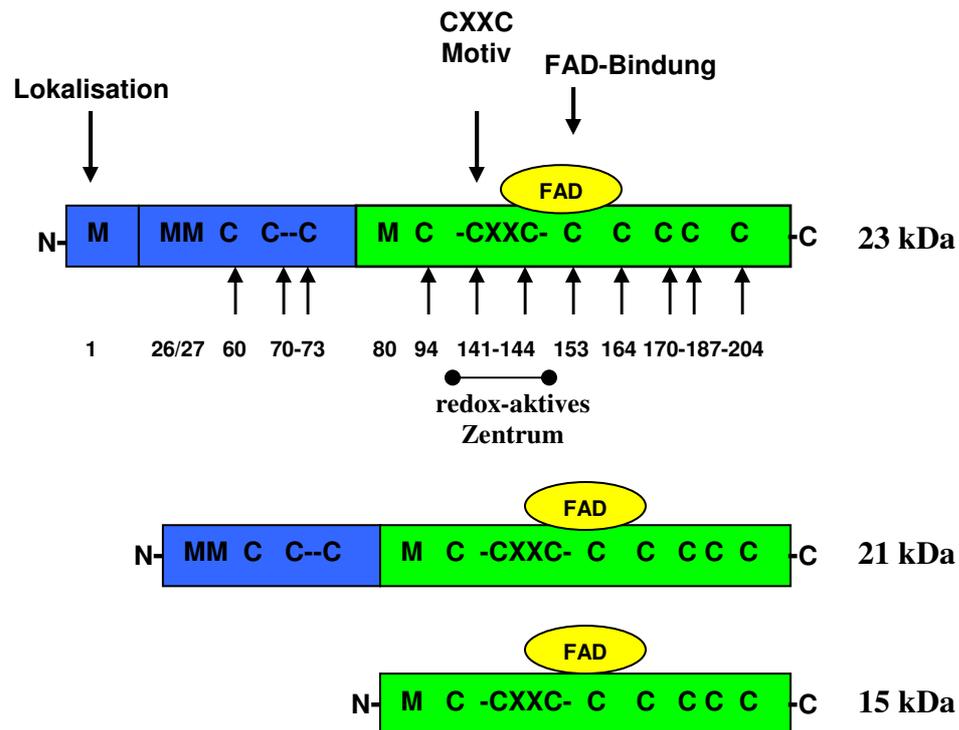


Abb. 3: Die Grafik zeigt die funktionellen Domänen des Alrp. Die N-terminale Domäne ist für die Lokalisation in der Zelle verantwortlich. Die C-terminale Domäne beinhaltet das CxxC-Motiv des redoxaktiven Zentrums und die FAD-Bindungsregion. Die Zahlen mit den Pfeilen zeigen die Positionen der Cysteine in der Sequenz an. Mit M werden die Methionine bezeichnet, die mögliche Translationsstartstellen sind. Die 21 kDa und 15 kDa Formen des Alrp sind weitere mögliche Proteinvarianten.

Durch die Identifizierung der Sequenzen verschiedener Sulphydryloxidasen wurde belegt, dass die starke Konserviertheit des Proteinbereiches, der das CxxC-Motiv beinhaltet, einen Hinweis auf einen gemeinsamen Ursprung gibt. Die katalytische Erv1p-Domäne hat in der Entwicklung von der einzelligen Hefe zum vielzelligen Eukaryoten bis hin zum Säuger vergleichbare enzymatische Funktionen behalten. Daraus kann geschlossen werden, dass die Erv1/Alr-Proteinfamilie eine fundamentale Funktion in eukaryontischen Zellen erfüllt. Erv1p und ein bekanntes Q6-Protein sind evolutionär miteinander verwandt. Das Q6p hat seine katalytische Domäne von einem Vorläufer-Erv1-Protein (Hooper et al. 1999a,b und **Abb.4**). Auch das Q6-Protein zeigt *in vitro* Sulphydryloxidaseaktivität.

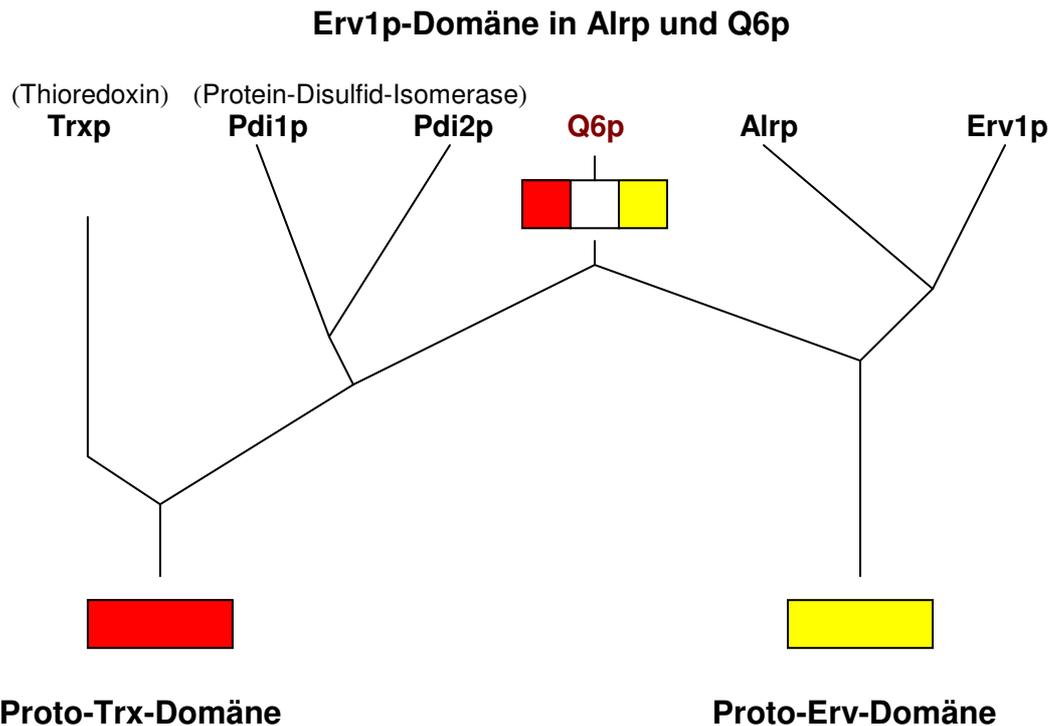


Abb 4: Die Entstehung des Fusionsproteins Q6p und der gemeinsame Ursprung von Alrp und Erv1p (Coppock et al. 1998; verändert).

Das humane Quiescin *Q6* Gen ist bei Untersuchungen von Zellkulturen als humaner Wachstumsfaktor des Menschen entdeckt und beschrieben worden. Das Q6p wurde in der Phase der nicht-proliferierenden Zellen gefunden und wurde solange nachgewiesen, bis die Zellen aus dem Stadium wieder austreten. Das *Q6*-Gen ist ein essentielles Gen und kommt ubiquitär in allen Zellen vor. Bei Untersuchungen an Ratten konnte das *Q6* bei der Hochregulation von Prozessen im Verlauf der Spermatogenese gefunden werden. Das huQ6-Protein wurde in der extrazellulären Matrix nachgewiesen. Es wird sekretiert. Darum gilt humanes Q6p heute als ein weiteres Beispiel für ein Enzym, das Disulfidbrückenbildungen außerhalb des Endoplasmatischen Retikulums katalysiert.

Offene Fragestellungen

Erv1p in Hefe ist gut charakterisiert worden. Die Frage nach der eigentlichen Enzymfunktion konnte mit der Zuordnung geklärt werden, dass Erv1p eine Sulphydryloxidase ist. Damit stand die Funktion des Enzyms und die Einfügung von Disulfidbrücken in Substrate im Mittelpunkt weiterer Untersuchungen. Die daraus resultierenden Fragenkomplexe gliederten sich in drei große Themenbereiche:

1. Der Mechanismus des Enzyms,
2. Die *in vivo*-Substrate des Enzyms und
3. die Funktionen der speziellen SOx in der Zelle.

Die Voraussetzungen für die vorliegende Doktorarbeit waren die Erv1p-Mutanten und das etablierte Hefesystem. Die noch fehlenden Vektorkonstrukte mussten hergestellt, die Hefemutanten erzeugt und das Expressionsverhalten der Mutantenproteine im genetischen System der Hefe untersucht werden. Aus den nun vorliegenden Mutantenproteinen und den anstehenden genetischen Untersuchungen in der Hefezelle, sollten folgende Antworten für die *in vivo*-Analyse gefunden werden:

- Wie ist das Verhalten der mutierten Erv1-Proteine *in vivo* und *in vitro*?
- Kann ein Unterschied erkannt werden, der einen funktionellen Bezug hat?
- Was zeigen die Funktionstests für die Dimerisierung, die Enzymaktivität und die FAD-Bindungsfähigkeit im *in vitro*-System?
- Welche Substrate bevorzugt Erv1p *in vivo*? Unterscheiden sie sich von den *in vitro*-Substraten?

ALR wurde als ein essentielles und ubiquitäres Gen der Säuger beschrieben. Es wurde die Aussage gemacht, dass Alrp in der Leber eine wichtige Rolle spielt und ein Wachstumsverstärker bei Prozessen wie der Leberregeneration ist. Aufgrund des Befundes, dass verschiedene Formen des Alrp mit unterschiedlichen Molekulargewichten in der Zelle gefunden wurden, stellen sich die folgenden Fragen:

- Wo sind die Alrp Varianten lokalisiert?
- Welche Alrp Varianten treten in Zellen und Geweben auf? Hat Alrp eine spezifische Funktion in der Leber?
- Können Aussagen über die Regulation von ALR in der Zelle gemacht werden?
- Gibt es eine generelle Funktion des Alrp in der Leber und ist es daher auch bei anderen Leberphänomenen von Bedeutung?

Daraus ergeben sich folgende konkrete Problemstellungen für die vorliegende Arbeit:

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten mitochondrialen Sulphydryloxidasen Erv1p und Alrp sind auffällig in ihren Cysteinanordnungen und den daraus resultierenden Cysteinmotiven. Um die Struktur und den Mechanismus des Erv1p aufzuklären, sollten Mutagenesen an den Cysteinen in der Sequenz von Erv1p vorgenommen werden. In Vorarbeit (Lee 2002) wurde das Mutagenese-Projekt begonnen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Mutagenisierung aller sechs Erv1p-Cysteine angestrebt. Hierbei ist das genetische System der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* essentiell für die Beantwortung von Fragestellungen der Phänotypuntersuchungen an den Mutanten. Die Untersuchungen an Alrp, dem Homolog des Erv1p, ermöglichen den Einstieg in die Arbeiten für Säugetiere. Vorliegende Widersprüche in der Literatur über Alrp ergaben neue Fragen zum Thema. Die Fragen sollten in neuen Experimenten Beantwortung finden. Es wurden neue ALR-Konstrukte hergestellt. Sie ermöglichten die Untersuchung der Expression des Genproduktes in Zellkulturen ohne GFP-Tag (Hofhaus et al. 1999a). Gewebeuntersuchungen und Zellfraktionierungen von Mensch, Maus und Ratte sollten dem folgen. Die *in vivo*-Untersuchungen sollten helfen, die vorliegenden Widersprüche über Lokalisation und Funktion des Alrp aufzuklären.

II. Material

A. Biologisches Material

1. Bakterien

Tab. 1: Bakterien Stämme : *Escherichia coli*

Name	Verwendung	Marker	Quelle
RR1ΔM15	Labor-Transformationsstamm	F ^h sd329 (r _B ⁻ , m _B ⁻) rec A ⁺ ara-14 pro A2 lacI ^q Z, ΔM15 gal K2 rspL20 str ^R xyl-5 mtl-1 supE 44 Lambda ⁻	Bolivar et al. 1977
DH 5α	Transformationsstamm	F ⁻ recA1; endA1; gyrA96; thi1; hsdR17(r _k ⁻ , m _k ⁻); supE44; lacI ^q Z, ΔM15 galK2	Hanahan 1983
BL-21(+)	Expressionsstamm	s. Hersteller	Novagen
XL-1 superkompetent	Transformationsstamm Mutagenesen	s. Hersteller	Stratagen

2. Hefen

Tab. 2: Hefestämme: *Saccharomyces cerevisiae*

Stamname	Marker	Verwendung	Quelle
S3, Sporulationsstamm Nr.3 (2n). Δscerv1//scERV1	MATα/a, his4-519/ his4-519 Δleu2/Δleu2 ura3-52/ura3-52 erv1 LEU2/ERV1	Tetradenanalyse	Lisowsky 1992, 1994
pet 492-6A (1n) Kerngenmutante	MATα, Δleu2 ura3-52 pet 492 ^{ts}	Komplementation	Lisowsky, 1992
JRY 1n α	a bzw. α, Δleu2 ura3-52 his4-519 (Jasper Rine, unveröffentlicht).	Wildtyp	Labor

3. Zellkulturen

Tab. 3: Zellkulturstämme und Zellkulturlinien

Abkürzung	Bezeichnung	Herkunft
143B	Humane Osteosarkomazelllinie (Fibroblasten-Zelllinie)	Hofhaus (Uni-Düsseldorf)
HepG2	Permanente Leberzelllinie	Uni-Göttingen
<i>Cos.7</i>	Embryonale Nierenepithelzellen der grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus</i>)	Hepatologie, Uni-Düsseldorf
H42E	Permanente Lebertumorzelllinie	Hepatologie, Uni-Düsseldorf
Primäre Hepatocyten	Primärkultur frisch präparierter Hepatocyten aus Rattenleber	Hepatologie, Uni-Düsseldorf
KC	Kupffersche Zellen	Hepatologie, Uni-Düsseldorf
HSC	Hepatische Stellate Zellen	Hepatologie, Uni-Düsseldorf
SEC	Stellate Sinoidale Zellen	Hepatologie, Uni-Düsseldorf

4. Säugetiermaterial: Ratte, Maus und Human

a) Ratte

Die Organentnahme erfolgte an Wistar-Ratten in der Tierversuchsanstalt der HHU-Düsseldorf. Die Organproben von Herz und Leber wurden zur Mitochondrienisolation und als Null-Kontrollen für Western-Analysen bei den Fragestellungen über *ALR* verwendet. Lebermaterial von Ratten im Rahmen der Untersuchungen des SFB575 stammten aus den Labors der Experimentellen Hepatologie der HHU-Düsseldorf und wurden dort von Fachpersonal den narkotisierten Ratten entnommen.

b) Maus

Die Organentnahme bei Mäusen (*Mus musculus*) erfolgte im Institut für Genetik am Stamm C57 BL/6 (Wildtyp). Die Mäuse wurden mit Ether im Überschuss betäubt und durch Genickbruch getötet. Anschließend fand die Sezierung statt, bei der die Organentnahme von Herz, Leber, Testis und Gehirn erfolgte. Die Organe der Mäuse wurden fixiert und für spätere Gewebeschnitte und Immunzytochemischen Untersuchungen in Paraffin eingebettet.

c) Organe und Fraktionen

Schnittpräparate von Leber, Herz und Darm wurden der Arbeitsgruppe als Paraffin-Schnitte von der Italienischen Kooperationsgruppe aus Bari zur Verfügung gestellt. Schnittpräparate von der Rattenleber für die Untersuchung des Fibrosemodells wurden von Richard Fischer, SFB 575, zur Verfügung gestellt. Schnittpräparate von Rattenlebern für Immunzytochemische-Untersuchungen wurden in der Experimentellen Hepatologie selber hergestellt. Die Leber wurde am Gefriermikrotom mit einer Schnittdicke von 7 µm hergestellt. Fraktionen von Blut der Ratten und von Human und Biopsiematerial von Human

wurden von Herrn Wettstein, SFB 575 oder der Italienischen Kooperationsgruppe aus Bari zur Verfügung gestellt.

B. Verwendete Vektoren

Tab. 4: Die verwendeten Klonierungsvektoren.

Name des Vektors		Verwendung des Vektors	
pET24a(+)	Fa. Novagen	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	5310bp
pRS 416	Labor	Hefeklonierung: niedrige Kopienzahl	4898bp
pYEp 352	Labor	Hefeklonierung.	5188bp
pYEp 352-pADH	Labor	Hefeklonierung: hohe Kopienzahl	5181bp
pUC19	Fa. Fermentas	Mutagenisierung des Gens <i>ERV1</i>	2686bp
pEGFP-N1	Fa. Clontech	Fusionsprotein	4,7 kb

C. Verwendete Primer

Tab. 5: Die verwendeten Primer.

Nr	Bezeichnung	Sequenz	Name
	ALR:		
1a	hmALR-1.ALR-GFP	5`-CCCGAATCCGTCGCCACCATGGCGGCGCCCCGGCGAGCGG-3`	Volllängenform von Alrp
1b	Rhm1.ALR-GFP	5`-CCCGGATCCTCGGAGCGCGCGCCCCCCCCGG-3`	Volllängenform von Alrp
2a	p2MmhuA*	5`-CCCGAATTCGTCGCCACCATGATGGACGACCTGGCGACC-3`	ΔN-Alrp-Form (21kDa)
2b	s. 1b		Rückprimer
4a	25ASALR*	5`-GGGGGCGCGCGCTCCGAGGATCC-3`	Prä-Sequenz von Alrp
4b	ALRR25*	5`-GGTGGATCCTCGGAGCGCGCGCCCCCCCCGG-3`	Prä-Sequenz von Alrp Rückprimer
8a	ALR+STOP-6his-tag	5`-CCCGAATTCTAGTCACAGGAGCCATC-3`	Natives Alrp Rückprimer EcoRI/Stop
8b	nde1-alr-his	5`-CGACTTCAAGTGCCATATGCGGACGCAGCAGAAG-3`	Natives Alrp Vorwärtsprimer Nde1
	ERV1:		
5a	MC33SF	5`-CTACTTGACTTTCAGTACGTGACC-3`	C33S
5b	MC33SR*	5`-GGTGTTAGATGATCGGCAAGGTTTGC-3`	C33S
6a	MC133SF2	5`-CTTTGAAAAATATATCAGAGAAAATG-3`	C133S
6b	MC133SR*	5`-TCTTTAGCAGACCAGTTGTAAGG-3`	C133S
7b	MC3033SR*	5`-GGTGTTAGACGATCGGGAAGGTTTGCC-3`	C30/33S
7a	5b (MC33SR)		
9a	ERV1-Nde-F	5`-AATACAAAGCCATATGAAAGCAATAGATAAAAATG-3`	6 His-tag
9b	ERV1-Xho-R	5`-GATTGCTCGAGTTCGTCCCAGCCGTCCTTCCA-3`	6 His-tag

*Primer mit der Mutation.

D. Verwendete Antikörper

Tab. 6: Die verwendeten Antikörper.

Antikörper	Bezug	Arbeitskonzentration
Primäre Antikörper		
α - Ery1p, Hefe	R. Lill, Marburg	1:1000
α -His-Tag, Maus	Lisowsky	1:1000
α -GFP, Maus	Boehringer Mannheim	0,4 μ g/ml
α -huAlrp, Kaninchen	Universität Düsseldorf	1 μ l/ml ; 1: 1000 // 1:250
α -Hsp70 (w27), Maus	Santa Cruz Biotechnology	0,2 μ g/ml // 1:250
α -Actin (Ab-1), Maus	Oncogene Res. Prod.	0,05 μ g/ml; 1:2000 // 1:200
α -Cyt c (Ab-2), Kaninchen	Oncogene Res. Prod.	100 μ g/ml;
α -CoxVb, Maus	Molecular Probes	3 μ g/ml; // 1:250
α -Trxp, Ratte	Imcocorp, Stockholm, Schweden	1:1000
α -Porin (Ab-5) (Kaninchen)	Calbiochem	1 μ g/ μ l // 1:250
α -Porin 31HL, Human (Maus)	Calbiochem	1 μ g/ μ l // 1:250
α -Som1, Kaninchen	Arbeitsgruppe	1:1000
α -Imp1, Kaninchen	Arbeitsgruppe	1:1000
α -Sodp, Kaninchen	R. Lill, Marburg	1:1000
α -Grxp, Kaninchen	R. Lill, Marburg	1:1000
α -Trxp1, Kaninchen	R. Lill, Marburg	1:1000
α -Apo cytc, Kaninchen	R. Lill, Marburg	1:1000
Sekundäre Antikörper		
Alkalische Phosphatase gekoppelte IgG (Ziege α -Maus)	Boehringer	1:1000
Alkalische Phosphatase gekoppelte IgG (Ziege α -Kaninchen)	Boehringer	1:1000
Fluoreszenzantikörper		
FITC- α -Kaninchen	Dianova	1 : 500 (bis 250)
FITC- α -Maus	Dianova	1 : 500 (bis 250)
CY3- α -Kaninchen	Dianova	1 : 1000 (bis 2500)
CY3- α -Maus	Dianova	1 : 2500 (bis 2500)

E. Nährsubstrate und Lösungen

1. Bakterien

Tab. 7: Bakterien

Name	Bestandteile
LB-Medium (Luria-Broth)	1 % (w/v) Bacto-Trypton; 1 % (w/v) NaCl; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 15 g/l Agar für Platten
Antibiotika	Kanamycin: 50 mg/l oder 25 mg/l Ampicillin : 100 mg/l

2. Hefen

Tab. 8: Hefen

Name	Bestandteile
Sporulationsmedium	0,05 % Glucose, 0,1 % Yeast Extract, 1 % Kaliumacetat pH 6,5
N3-Medium (Glycerin-Medium)	1 % Hefeextrakt, 1 % Bacto Pepton, 2 % Glycerin, 10 % Sörensen-Puffer pH 6,2 (2,5 % Agar für die Platten)
Minimalmedium (WA-Medium)	2 % Glucose, 0,67 % Yeast Nitrogen Base, 5 % Sörensenpuffer pH 6,2 (bei Platten werden 2,3 % Agar hinzugegeben). 100 mg Ade, je 20 mg (Ura), Arg, His, Ile, (Leu), Lys, Met, Trp, Thr, Val, Tyr, Phe. Bei <u>Aminosäure-Auxotrophie</u> wird z.B. Ura oder Leu weggelassen. Das WA ^{-URA} Medium fand als Präsporulationsmedium für die Tetradenanalyse Anwendung.
Sörensen-Puffer	100 mM Na ₂ HPO ₄ , 400 mM KH ₂ PO ₄ , pH 6,2
YPGc-Medium	2 % Glucose, 1 % Bacto Pepton, 1 % Yeast Extract, 0,01 % Adenin, je 0,002 % Thr, Trp und Uracil; (2,3 % Agar für die Platten)

3. Zellkulturen

Tab. 9: Zellkultur

Name	Bestandteile
Trypsin/EDTA Lösung	0,1 % Trypsin in 25 mM Tris; 137 mM NaCl; 7 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1 mM EDTA; 5 mM KCl; pH 7,5
HBS	20 mM HEPES; 150 mM NaCl; pH 7,4 sterilfiltriert
DOSPER	25 - 500 nM
DEAE-Dextran	50 mg/ml in PBS, autoklaviert (Pharmacia) M _w ~ 500.000
DMSO	10 %ig in PBS
Chloroquine	100 mM in PBS (Sigma), 4°C lagern
Transfektionsmedium	DMEM mit Antibiotika (PSK) ohne Serum (FCS)
Kulturmedium	DMEM + 1 % Antibiotika + 5 % FCS
PBS	140 mM NaCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2,7 mM KCl, 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH7,4 steril gefiltert / autolaviert
MitoTraker	25 – 50 nM-Lösung für Gewebeschnitte, 10-30 min Einwirkzeit

4. DNA

Tab. 10: DNA

Name	Bestandteile
Agarosegel	1 % Agarose in 0,5 x TBE / EtBr (5 mg / l) ; 85 V, 30 – 60 min Laufzeit
TBE	45 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA; 8 % Saccharose; 5 % Triton X-100
Probenpuffer	445 mM Tris-Borat, pH 8,3; 10 mM EDTA; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanol; 50 % (v/v) Glycerin
Boiling-Puffer	8 % Sucrose, 0,5 % Triton X100, 50 mM EDTA pH8,0, 10 mM Tris/HCl pH 8,0
Lysozymlösung	10 mg Lsozym, 1 ml TE-Puffer.
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA
10x Ligations- Puffer	0,66 M Tris / HCl pH7,5 50 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT, 10 mM ATP 50 % PEG-Puffer (Polyethylenglykol)
Transformation	
Lithium Azetat- Stammlösung.	1 M
50% PEG- Stammlösung	2,5 ml PEG 600, 2,5g PEG 4000 mit H ₂ O auf 10 ml auffüllen.
0,1M LiAc	2 ml LiAc-Stammlösung; 18 ml H ₂ O.
PEG-Lsg.	1 ml LiAc-Stammlsg, 8 ml 50 % PEG-Stammlsg., (0,1 mM LiAc, 40 % PEG) 1 ml H ₂ O

5. Immunzytochemie

Tab. 11: Immunzytochemie

Lösungsname	Bestandteile
Medien für die Immunhistochemie	
Mayer`s Hämatoxylin	0,1 % Hematoxylin, 5 % Kaliumaluminiumsulfat, (0,02 % Natriumjodate, nur für die natürliche Alterung), in dH ₂ O
Eosin-Lsg.	0,4 % Eosin G (w/v) in dH ₂ O mit Zugabe von 1 % Eisessig
Medien und Reagenzien für die Immunzytochemie	
Reaktionspuffer	50 mM Tris-HCL, pH 9,5; 140 mM PBS
NGS	Jung-Ziegen Serum, 2 % zum Blocken
Waschpuffer	1 x PBS
Substrat	NBT + BCIP pro ml ; gelöst in 70 % Dimethylformamid (DMFA)
BCIP (5-Brom 4-chlor-3 indoyl-phosphat)	18,8 mg / ml ; Einsatz von 3,5 µl BCIP / ml Puffer
NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid)	37,5 mg / ml ; Einsatz von 4,5 µl NBT / ml Puffer
Block-Serum	PBS : NGS (1:50) für den Primär-Antikörper; PBS : NGS (1:500) oder PBS pur verwendet.
Permeabilisierung	Tween-20 : 0,05 % in PBS für das Waschen
Levamisol	0,1 mM Endkonzentration von Levamisol zum Blocken endogener Alkalischer Phosphatase Aktivität.
Rotiplast	Paraffin-Pastillen für die Gewebeeinbettung Roth Nr.: 6642
Eindeckelmedium	DePeX // Serva Nr.:18243

III. Methoden

Allgemeine Methoden

A. Bakterienanzucht

Die Bakterienanzucht der verwendeten *E. coli*-Stämme erfolgte im LB (Luria-Broth)-Nährsubstrat bei 37°C mit Zugabe von Antibiotika zur Selektion. Die transformierten Stämme wurden in kleinen Mengen im Reagenzglas angezogen, indem eine Impfösemenge der Bakterien 5 ml LB-Medium zugesetzt wurden. Die Inkubation erfolgte für 4 - 6 Std. oder ü. N. Für den Expressionsstamm wurde eine 10ml Vorkultur angesetzt, die zum Beimpfen einer 1l Hauptkultur verwendet wurde. Die Bakterien wurden bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert und geerntet.

LB-Nährsubstrat: 1 % (w/v) Bacto-Trypton; 1 % (w/v) NaCl; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt;
15 g / l Agar für Platten.

Antibiotika: Kanamycin : 50 mg / l oder 25 mg / l
Ampicillin : 100 mg / l.

B. Präparation kompetenter Bakterienzellen

Das Grundprotokoll zur Herstellung von kompetenten Bakterienzellen stammt aus Sambrook et al. 1989. Die folgende Arbeitsanweisung wurde im Labor verwendet: Es wird eine *E. coli* Vorkultur hergestellt, indem in einem kleinen Kulturkolben 10 ml LB-Nährsubstrat mit dem Laborstamm angeimpft werden und ü.N. bei 37°C inkubieren. Am nächsten Morgen wird die Vorkultur in einen 2 l-Erlenmeyerkolben mit Handikap steril überführt und 3 – 4 h bei 37°C auf dem Schüttler kultiviert. Danach wird in regelmäßigem Abstand der OD₆₀₀-Wert der Bakteriensuspension überprüft. Bei Erreichen eines Wertes zwischen 0,5 und 0,6 werden die Bakterien weiterverarbeitet. Die Kultur wird 10 min auf Eis gestellt und anschließend für 10 min und 4°C bei 6000 rpm schonend in einem GSA-Rotor zentrifugiert. Das Pellet wird über Eis mit 200 ml kalter 75 mM Calciumchloridlösung (CaCl₂) resuspendiert. Die Suspension wird 20 min auf Eis inkubiert, erneut zentrifugiert und das Pellet mit 20 ml CaCl₂-Lösung resuspendiert und 15min inkubiert. Zugabe von Glycerin in einer Endkonzentration von 15 %. Die kompetenten Zellen werden in sterile 1,5 ml Eppendorfgefäßen zu je 500 µl portioniert und bei –70°C kryokonserviert. Der Test erfolgt mit einem Aliquot der Bakteriensuspension auf eine LB-Platte mit Antibiotika, die über Nacht (ü.N.) inkubiert wird.

C. Transformation von Bakterienzellen

Die Transformation der BL-21 *E. coli* erfolgte nach Hersteller-Protokoll (Stratagen) über einen Hitzeschock. Für die Laborstämme RR1ΔM15 und DH5α und für den BL-21 Stamm wurden 70 µl tiefgefrorene, kompetente Zellen aufgetaut und mit 10 – 100 ng Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für die Transformation der DNA für 2 min auf 42°C erwärmt, abgekühlt und danach auf LB-Nährplatten mit Antibiotika ausplattiert. Vom Plasmid wurden 0,5 - 1,0 µg DNA verwendet.

D. Plasmid-Isolation aus *E. coli*

Das ursprüngliche Methodenprotokoll zur Plasmidisolation aus Bakterien ist die Alkalische-Lyse-Methode, beschrieben von Birnboim und Doly (1979). Die Plasmidisolation erfolgte mit Qiagen-Plasmidisolation-Kits. Die Standard-Elution erfolgte mit Tris-HCl Puffer. Für Sequenzanalysen wurde mit dH₂O eluiert.

E. Plasmidisolation nach der Boiling-Methode

Die Grundlage der Boiling-Methode ist die alkalische Lyse. 1,5 ml einer stationären *E. coli*-Kultur wurden 1min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 350 µl Boilingpuffer resuspendiert, mit 25 µl Lysozymlösung versetzt und resuspendiert. Die Proben wurden 30 - 40 sec. bei 95°C im Wasserbad gekocht und dann 10 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet enthält hochmolekulare DNA und Zellwandbestandteile als Verunreinigungen. Der Überstand enthält die Plasmid-DNA. Unter der Sterilbank wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Ein Test erfolgt mit 3 µl Plasmid-DNA auf einem Agarose-Gel.

Boiling-Puffer:	8 % Sucrose, 0,5 % Triton X100, 50 mM EDTA pH8,0, 10 mM Tris / HCl pH 8,0.
Lysozymlösung:	10 mg Lysozym, 1 ml TE-Puffer.
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA

F. Photometrische Messung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte spektroskopisch mit einem UV / Vis-Spektrophotometer der Fa. Zeiss bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dabei entspricht eine OD₂₆₀-Einheit (=A₂₆₀) einer Menge von 50 µg / ml ss DNA und einer Menge von 40µg/ml ds DNA oder RNA.

G. Transformation von Hefen

Im Allgemeinen werden auf einer Stammkultur-Platte einzelne Hefekolonien mit einer sterilen Impföse Zellen abgenommen und in 10ml eines Nährsubstrates übertragen. Die Zellen

werden über Nacht auf einem Schüttler bei 28°C inkubiert. Alle Arbeiten fanden in der Sterilbank statt. Die Transformation von Hefezellen wird nach der Methode von Ito et al. 1983 in der veränderten Form nach Lauer mann 1991 durchgeführt. Es wird eine Hefe-Vorkultur in 20 ml YPGc-Nährsubstrat angeimpft und über Nacht bei 28°C in einer Klimakammer schüttelnd inkubiert. Als Hefekultur wurden für die Untersuchungen der haploide pet492-Stamm und der diploide S3-Stamm verwendet. Am nächsten Tag werden die Vorkulturen auf Dichte untersucht. Bei einer notwendigen Verdünnung der Kultur wurden aus der Vorkultur 2 ml in 18ml frisches YPGc-Nährsubstrat gegeben und bei 28°C weiter inkubiert, bis die Zellzahl bei ca. $1,7 \times 10^7$ Zellen / ml liegt. Die Zellzahl wird mit einem Spektrophotometer gemessen, wobei die OD_{600} von 0,6 - 0,8 erreicht sein muss. Die Hefezellen wurden für Transformationen verwendet.

1. Ausplattieren von Hefekulturen

Die Transformationsansätze werden in Reaktionsgefäße resuspendiert. Die Suspensionskulturen wurden mit einer Pipette aufgenommen, auf das Zentrum einer Kulturplatte getropft und mit einem sterilen Drigalski-Spatel ausplattiert. Die Transformationsansätze werden als Nullkontrolle ohne DNA auf WA^{-ura} Platten ausplattiert.

2. Lösungen für die Transformation

1 M LiAc-Stammlösung.

50 % PEG-Stammlösung: 2,5 ml PEG 600, 2,5g PEG 4000, mit H₂O auf 10 ml auffüllen.

0,1 M LiAc: 2 ml LiAc-Stammlösung; 18 ml H₂O.

PEG-Lsg: 1 ml LiAc-Stammlsg, 8 ml 50 % PEG-Stammlsg.,
1 ml H₂O oder (0,1 mM LiAc, 40 % PEG).

H. Kryokonservierung

1. Hefestämme

Wenn nach erfolgreicher Transformation nicht permanent im Labor mit den Hefezellen gearbeitet wird, empfiehlt es sich, eine Bevorratungshaltung für die wertvollen Transformanten anzulegen. Die Kryolagerung bewahrt die Zellen vor Kontamination und vor Variabilität bei ständiger Kultivierung in Dauerkulturen. Als Schutzsubstanz dient Glycerin. Es verhindert die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zellen, sowie die partielle Dehydratation des Zytoplasmas. Von frischen Plattenkulturen werden mit einer sterilen Impföse Hefezellen abgenommen. Die Hefezellen werden in Flüssigmedium überführt und so lange kultiviert, bis eine dichte Zellsuspension (1×10^8) vorliegt. Die Hefen werden zentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml YPGc-Glycerin-Nährsubstrat (Verhältnis 1:1) resuspendiert. Die Kulturen werden in beschrifteten Schraubreaktionsgefäßen bei -70°C eingefroren und gelagert.

2. Bakterien

1 ml *E. coli* Zellen werden in LB-Nährlösung angezogen und zentrifugiert. Die Zellen werden danach in 0,85 ml LB Medium suspendiert. Für die Portionierung wurden 0,15 ml steriles 100 %iges Glycerin hinzugegeben. Die Endkonzentration der Glycerin-Lsg. sollte bei 15 % liegen. Die Bakteriensuspension wird in Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel bei -70°C eingefroren.

I. Sporulation und Tetradenanalyse

Frisch transformierte Kulturen von diploiden Hefestämmen werden auf $\text{WA}^{-\text{URA}}$ Platten kultiviert, mit einer sterilen Impföse auf eine Platte mit Sporulationsnährboden ausgestrichen und bei 28°C kultiviert. Der verwendete Hefestamm S3 benötigte mindestens 5 Tage für die Sporulation. Für die Tetradenanalyse wurde ein Teil der sporulierten Zellen mit einer sterilen Impföse in 100 μl sterilem H_2O suspendiert, 5 μl Zymolyase 20T (2,5 mg / ml) hinzugegeben und 8 - 10 min bei RT inkubiert. Die Zymolyase-Lösung wird durch Zugabe von 1ml sterilem H_2O verdünnt. Die Hefezellen werden für den Zeitraum der Auswertung in Eis aufbewahrt. Für die manuelle Tetradenanalyse am Mikromanipulator wurde eine Menge von 17 μl aus der Suspension entnommen, auf eine ebene $\text{WA}^{-\text{URA}}$ – Platte getropft und als einzelne Spur über die Platte verteilt. Danach erfolgte die Vereinzelung der Sporen mit dem Mikromanipulator und die Kultivierung bei 28°C . Nach der Auskeimung wurden die genetischen Marker auf verschiedenen Selektionsmedien getestet.

J. Mitochondrienisolation

1. Isolation aus Gewebe (20%iger Percoll-Gradient)

Das reine Gewebe wurde gewogen. Das Homogenisieren erfolgte im Mörser oder im Potter. Für die Gewinnung der Mitochondrien aus Gewebe wurde eine differentielle Zentrifugation des Zellhomogenisats mit anschließender Gradientenzentrifugation in einem linearen Percoll-Gradienten durchgeführt (Madden und Storrie 1987, Mickelson et al. 1980). Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C oder im Kühlraum vorgenommen. Die isolierte Mitochondrienfraktionen wurden aufgeteilt, um sie unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen zu testen. Für die Lagerung wurden die Proben bei $50 - 60^{\circ}\text{C}$ inkubiert und bei -70°C eingefroren.

Isopuffer: 250 mM Sucrose, 50 mM Tris, pH 7,2; 0,1 % BSA; 100 mM EGTA für 1 Liter.

Zellaufschluß: Zugabe von 100 mM PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid).

2. Isolation aus Hefe (Methode mit Glasperlen)

Die ursprüngliche Methode stammt von Pratje und Michaelis (1977). Die Mitochondrienisolation wurde bei 4°C durchgeführt. Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation geerntet. Das Pellet wurde in 0,5ml MTE suspendiert, in Schraub-Reaktionsgefäß gegeben und mit 0,4 ml Glasperlen Ø0,45 mm versehen. Der Aufschluß erfolgte im Braun-Homogenisator. Die Suspension wurde mit 1 ml MTE aus den Glasperlen gewaschen, gesammelt niedrigtourig und dann 15 min hochtourig bei 18.000 rpm zentrifugiert. Die pelletierten Rohmitochondrien wurden mit 100 µl MTE portionsweise resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt. Für Western-Blot Analysen wurde von der Mitochondrienfraktion 5 µl mit Probenpuffer gemischt, 5 min bei 95°C inkubiert und verwendet oder bei -20°C gelagert.

MTE (pH7,2): 0,6 M Mannit, 25 mM Tris, 1 mM EDTA und 1 mM PMSF.

Stammlösung: 100 mM PMSF in Ethanol wird frisch hergestellt oder alternativ eine ½ Tablette Protease-Inhibitor-Mix CompleteTM (Boehringer) in 15 ml MTE verwendet.

K. Fällungsmethoden

1. Ethanol-Chloroform-Methode für DNA

Für DNA-Fällungen mit Fragmentgrößen unter 100 bp wurde in den Untersuchungen die Ethanol-Chloroform-Methode verwendet. Das Verfahren eliminiert Verunreinigungen der DNA. Dabei wurde wie folgt vorgegangen: Das Volumen im Reaktionsgefäß wird bestimmt und 10 % einer 3M-Natriumacetat-Lösung mit einer Endkonzentration von 300 mM hinzugegeben. Es folgt die Zugabe von 100 – 200 µl Chloroform, die mit der Pipette gut gemischt werden. Zentrifugation bis zur Ausbildung einer Phasengrenze, der Überstand enthält die DNA. Die DNA wird mit der Pipette abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß pipetiert. Das Volumen wird bestimmt. Jetzt wird die 2,5fache Menge -20°C kaltes und reines Ethanol hinzugegeben und 5min zentrifugiert bei maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge. Das Pellet wird mit 100 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wird getrocknet, bis die DNA als glasiges Pellet erkennbar ist. Für anschließende Restriktionsansätze wird 90µl bidestilliertes Wasser hinzugegeben und die DNA bei 60°C gelöst. Die DNA wird weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

2. Trichloressigsäure (TCA)-Fällung für Proteine

Zu 1 ml Zellkulturüberstand wird 150 µl NaOH / β-ME hinzugegeben. Die Mischung wird 2 – 3 x invertiert und 10 min auf Eis gestellt. Es werden 150 µl einer 50 %igen TCA-Lösung hinzugegeben und gemischt (Endkonzentration der TCA-Lösung von 5 – 6 %). Zentrifugation für 2 min bei 14.000 rpm. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Das Pellet wird

2-3 x mit je 1 - 1,5 ml kaltem Aceton gewaschen und erneut für 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird im Exsikkator unter Vakuum getrocknet. Die Größe des Pellets wird beurteilt und mit 50 µl 0,1 M NaOH resuspendiert. Die Proteine werden in 10 µl 5 x Probenpuffer gelöst. Für die Lagerung wird für 5 min bei 60°C inkubiert und zentrifugiert. Die Proben werden für die Western-Analyse bei -20°C aufbewahrt.

Molekularbiologische Methoden

A. Zellfreie DNA-Vermehrung (*in vitro*-Amplifikation von DNA)

Mittels der PCR-Technik wurden im Thermozykler verschiedene Genkonstrukte hergestellt. Als Matrize wurde die WT-*ERV1* und –*ALR* verwendet. Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese aufgereinigt, die ermittelten Banden aus dem Gel eluiert und mit entsprechenden Restriktionsenzymen angedaut. Die DNA wurde in die entsprechenden restringierten Vektoren ligiert und für Standardanwendungen in den Laborstamm RR1ΔM15 transformiert. Nach Plasmidisolierung und Transformation dienten sie in Hefe für die Tetraden- und bei den Zellkulturen für die Transfektionsanalysen.

B. Modifikation von PCR-Produkten

1. Einführung von Restriktionsschnittstellen (*NdeI* – *HindIII*).

2. Herstellung der Fusionskonstrukte: *ALR-GFP*

Herstellung des Vollängenkonstruktes und der N-terminal-deletierten *ALR-GFP* Konstrukte im pEGFP-N1-Plasmid für die Transfektion in Zellkulturen. Mit zusätzlicher Restriktionsschnittstelle *EcoRI* und Ribosomenbindungsstelle.

3. Herstellung der Importsequenz von *ALR*.

Herstellung des N-*ALR-GFP* Konstruktes im pEGFP-N1-Plasmid.

4. Herstellung der nativen *ALR*-DNA mit STOP-Sequenz für Expressionsuntersuchungen.

Mit STOP und *EcoRI* Schnittstelle im pEGFP-N1.

Alle Primer sind im Materialteil in der **Tabelle 5** aufgeführt.

C. *in vitro* Mutagenese

Um die Beziehung zwischen Struktur und molekularem Mechanismus im *ERV1*-Protein zu untersuchen wurden gezielt Punktmutationen in das WT-*ERV1* eingeführt. Durch die Mutation im Gen wurde ein Cystein gegen ein Serin im Protein ausgetauscht. Die PCR-Mutagenese des Inserts erfolgte mit den Komponenten der Fa. TaKaRa.

Herstellung von Punktmutationen

Anwendung für C133S im pUC19-Vektor und für C33S im pET24a(+)-Vektor.

1. *ERV1*-C133S-Mutante

Für die C133S-Mutante wurden die Primer: **6a** und **6b** verwendet. Die entstandenen Klone wurden durch Sequenzanalysen kontrolliert. Es folgte eine PCR, die zwei zusätzliche terminale Schnittstellen in die Sequenz einführte: *NdeI* und *XhoI*. Die Expression erfolgte im optimierten pET24a(+) / BL21-System. Der Vektor und das Insert wurden *HindIII*-*XhoI* restringiert und mit T4-DNA-Ligase ligiert. Die Transformanten des Laborstamms RR1ΔM15 wurden durch Restriktion (*NdeI*-*XhoI*) überprüft.

Tab. 12: Daten für die PCR.

Ansatz	Thermozykler-Programm		
67,5 µl dH ₂ O	10min	95°C	1x
10 µl 10 x Reaktions-Puffer	30sec.	95°C	
8 µl dNTP-Mix (10 mM)	60sec.	40°C	3x
12 µl MgCl ₂ (25 mM)	4min	70°C	
0,5 µl BSA (Rinderserum Albumin, 20 mg /ml)	30sec.	95°C	
1 µl Template (0,1µg)	30sec.	46°C	27x
2 µl Primer für NdeI/XhoI (5pmol/µl)	4min	70°C	
1 µl Taq-DNA-Polymerase (Fermentas, 10 U / µl)	5min	70°C	1x

2. ERV1-C33S-Mutante

Für die C33S-Mutante wurde die Primer **5a und 5b** verwendet.

Tab. 13: Daten für die PCR

Ansatz	Thermozykler-Programm		
78 µl dH ₂ O	5 min	94°C	1x
10 µl 10 x Reaktions-Puffer	4 min	94°C	
8 µl dNTP-Mix (10 mM)	2 min	50°C	3x
	2 min	72°C	
	1 min	94°C	
1 µl Template (0,1 µg)	2 min	56°C	27x
2 µl je Primer für NdeI / XhoI (5 pmol / µl)	1 min	72°C	
0,5 µl TaKaRa-Polymerase (5 U / µl)	5 min	72°C	1x

Das PCR-Produkt wurde mit dem QIAquick PCR Purifikation Kit von Qiagen gereinigt und in 50µl EB-Puffer eluiert.

3. ERV1-C30/33S-Doppelmutante

Tab. 14: Daten für die Primer Phosphorylierung und für die PCR.

Primer Phosphorylieren	Ansatz	Thermozykler-Programm		
10 µl Primer (100 pmol / µl)	Primer: 7a, Tm 68°C 5b, Tm 61°C	4 min	95°C	1x
5 µl dH ₂ O	78 µl dH ₂ O	30 sec	94°C	
2 µl 10 x Reaktionspuffer	10 µl 10 x PCR-Puffer	60 sec	51°C	3x
2 µl 100 mM ATP	8 µl dNTP (2,5 mM)	4 min	70°C	
1 µl Polynukleotid-Kinase (3 U / µl)	1 µl Plasmid (0,1 µg) pET24a(+):C33S-9	30 sec	94°C	
		30 sec	56°C	27x
Für 1 h bei 37°C inkubieren. Der Ansatz wird 1 : 10 verdünnt für die Anwendung mit Zugabe von 180 µl H ₂ O.		4 min	70°C	
		5 min	70°C	1x

D. Standard-Labortechniken für DNA

1. Nachweis von amplifizierter DNA

Der Nachweis der amplifizierten DNA wurde in Agarosegelen vorgenommen. Die DNA wurde auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und in Beisein von EtBr unter UV-Licht (366 nm) lokalisiert. Mit einem Skalpell wurde die ermittelte Bande herausgeschnitten und mit QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellervorschrift isoliert. NA-Konzentration: zwischen 0,5 – 1,0 µg / µl.

Agarosegel: 1 % Agarose in 0,5 x TBE

EtBr (5mg/l)

85 V, 30 – 60 min Laufzeit.

TBE 45 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA; 8 % Saccharose; 5 % Triton X-100.

Probenpuffer: 445 mM Tris-Borat, pH 8,3; 10 mM EDTA; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanol; 50 % (v/v) Glycerin.

Als **Standard** wurde für alle Gelläufe ein Längenstandard verwendet: Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* Marker 3 der Fa. MBI Fermentas mit einer Konzentration von 0,5 mg DNA / ml. Von der Arbeitslösung wurden 5 µl DNA-Marker verwendet.

2. Restriktionsenzyme und Methoden

Die Restriktionsenzyme, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, sind in den Katalogen der Hersteller Firmen: MBI Fermentas, BioLabs und Boehringer Mannheim aufgeführt. Nähere Angaben zu den einzelnen Enzymen sind dort nachzulesen. Standardrestriktionen wurden unter Herstellerangaben durchgeführt.

3. Ligierung von DNA in Vektoren

Das molare Verhältnis Vektor-DNA zu klonierter DNA (Insert) lag für Standardansätze zwischen 1 : 1 bis 1 : 3. Die Vektoren wurden 5'-dephosphoryliert. Bei einer Ligierung von DNA mit nicht-komparablen Enden war keine 5'-Dephosphorylierung nötig. Im Allgemeinen sind für die Ligationen die Protokolle der Hersteller verwendet worden. Der Ligations-Ansatz wurde 1 : 10 verdünnt und anschließend wurde mit T4-DNA-Ligase (Roche) für 4 h bei RT oder ü.N. bei 14°C ligiert. Am nächsten Morgen wurde mit dem Laborstamm RR1ΔM15 transformiert und auf LB_{kan50}-Platten ausplattiert. Die erhaltenen Klone wurden in LB_{kan}-Nährsubstrat angeimpft, die Plasmide isoliert und einer Testrestriktion unterzogen (*NdeI*-*XhoI*). Bei erfolgreichem Test wurde erneut eine ausreichende Menge des Plasmides aus den Suspensionskulturen gewonnen. Für die Expression des Enzyms wurde das Plasmid in den BL21-Stamm transformiert. Für die genetischen Untersuchungen in der Hefe wurde in den YEp352-pADH-Vektor umklont und in die Hefestämme pet492 und S3 transformiert.

a) Ligation der Cystein-Mutanten

- Ligation gemischter Enden für Vektor / klonierter DNA:

- 9µl Vektor
- 3µl Insert
- 2µl 10 x Lig.-puffer
- 4µl 50 % PEG 4000
- 1-2µl dH₂O

1µl T4-Ligase (Fermentas); 4 h bei RT.

Für den Vektor wurde die Eigenligationsrate getestet. Bei nicht kompatiblen DNA-Enden darf keine Religation des Vektors mit sich selber erfolgen. Die Ligation wurden entweder für 5 h bei RT durchgeführt oder alternativ wurde zuerst 4 – 5 h bei RT und dann ü.N. bei 14 - 16°C inkubiert. Vor einer Transformation des Plasmides in kompetente Bakterien wurde der Ansatz fünffach verdünnt.

b) Ligation der Cystein-Doppelmutanten

- Für die C30/33S-Doppelmutante wurde der pET24a(+)-Vektor mit C33S-Insert mutagenisiert. Es wurden Standard-Ligationen verwendet.
- Für die Cystein-Doppelmutanten: C30S-C130S, C30S-C176S, C30S-C159S wurde die Ligation, wie unter **3a** beschrieben, verwendet.

c) Primer-Phosphorylierung

Die Primer wurden auf eine Arbeitskonzentration von 10 pmol Primer pro µl eingestellt. Für einen 20 µl Ansatz wurde wie folgt pipettiert: 5 µl dH₂O, 200 pmol Primer, 2 µl 10 x Phosphorylierungspuffer, 10 mM ATP und 1 µl Polynukleotid-Kinase (10 U). Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert und mit H₂O verdünnt.

4. Test der DNA-Konstrukte

Mit verschiedenen Restriktionsschnitten wurden die Inserts für *ERV1* und *ALR* in den Plasmiden getestet:

- Restriktionsschnitte für *EcoRI* und *BamHI*.: ALR-GFP-Fusionsgen
- Restriktionsschnitte für *EcoRI* : *ERV1*-Test
YEPC33S und -C133S
- Restriktionsschnitt für *BamHI* – *BglIII* : *ERV1*-Orientierung
- Restriktionsschnitt für *Xba-SmaI* : Fragment Test, Umklonierung
- Restriktionsschnitt für *EcoRI* – *HindIII* : pUC-Vektor für *ERV1*-Insert Test
- Test der richtigen Mutation in *ERV1*:
 - MunI* – *XhoI* (227bp) für C130S
 - NruI* – *MunI* (386bp) für C30S-C130S
 - NruI* – *Cfr13* (470bp) für C30S-C159S
 - NruI* – *PflMI* (524bp) für C30S-C176S

5. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Detektion von gelelektrophoretisch getrennten DNA-Proben wurde die Ethidiumbromid-Färbung verwendet. Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen der Nukleinsäuren. Der DNA-EtBr-Komplex wird nach Anregung mit UV-Licht (254 nm, 302 nm oder 366 nm) im sichtbaren Bereich (zw. 500 – 590 nm) als rot-orange leuchtende Bande erkennbar.

EtBr: 5 mg / ml Stammlsg..

In die Gellaufkammer werden vor jedem Lauf 5 µl EtBr zum TBE-Puffer gegeben.

6. Elution von DNA aus Agarosegelen

Für die Gewinnung von DNA-Fragmenten nach erfolgter Gelelektrophorese aus Agarosegelen wurde im Labor ein Kit der Fa. Qiagen verwendet (QIAquick PCR Purification Kit). Die Methode basiert auf Adsorption von DNA an Glasmilch (Vogelstein und Gillespie, 1979). Das ist ein Anionen-Austauschermaterial auf Silikagel-Basis.

E. Sequenzierung von Plasmid-DNA

1. Modifizierte DNA-Isolation für die Sequenzierung

Für Standardanwendungen erfolgte die Plasmidisolation nach dem Protokoll des Plasmidisolutions-Kit von Qiagen. Für die Sequenzanalysen wurden die Plasmide mit dH₂O eluiert und gelagert. Die DNA-Konzentration lag für die Sequenzierung bei 0,5 µg / µl.

2. Sequenzierung von DNA

Die transformierten Mutagenese-PCR-Produkte wurden nach erfolgter Plasmidisolation einer Testrestriktion unterzogen. Klone mit identischem Schnittmuster wurden ausfindig gemacht, für die Sequenzierung 1:10 verdünnt und zu der Firma MWG-Biotech geschickt. Die Sequenzierung erfolgte für die *ERV1-DNA* im pUC19-Vektor mit T7-Promotor und für den pET24a(+)-Vektor mit *ERV1-DNA* mit dem M13-Promotor. Die Sequenzergebnisse wurden ausgewertet und überprüft. Die korrekten Klone für die weiteren Untersuchungen wurden vorbereitet und verwendet.

F. Klonierung der *ERV1*-Mutanten für die Arbeiten mit Hefe

1. Klonierung der Punktmutanten C30S, C33S, C130S, C133S, C159S und C176S in Vektoren mit niedriger und hoher Kopienzahl.

Die Punktmutanten von *ERV1* im pET24a(+) wurden für

- den YEp352-pADH-Vektor (hohe Kopienzahl) zur Umklonierung *Xba-SmaI* restringiert.
- die Klonierung in den pRS416-Vektor (niedrige Kopienzahl) folgendermaßen geschnitten:
 - für C30S: *BfrI(BspT1)-BglIII*
 - für C130S: *BglIII - XhoI*
 - für C159S und C176S: *BglIII - XhoI*.

2. Herstellen von Doppelmutanten im pRS419-Vektor für C30S, C130S, C159S und C176S.

Es wurden mögliche Schnittstellen in der *ERV1*-Sequenz gesucht, die eine Klonierung möglich machten. Die Genbereiche wurden geschnitten und neu kombiniert.

- Für die C30S-C130S-Mutante wurden aus den Plasmiden pRS416:*ERVIC30S* und pET24a(+):*ERVIC130S* die Fragmente entnommen.
- Für die Herstellung der C30S-C159S-Mutante wurde aus den Plasmiden pRS416:*ERVIC30S* und pET24a(+):*ERVIC159S* die Fragmente entnommen.
- Für die C30S-C176S-Mutante wurden aus den Plasmiden pRS416:*ERVIC30S* und pET24a(+):*ERVIC176S* die Fragmente entnommen.

3. Herstellung der C30/33S-Doppelmutante in *ERV1*

Die Herstellung der Doppelmutante erfolgte durch PCR mit speziellen Primern. Als Vorlage wurde das Plasmid pET24a(+) mit C33S-Insert verwendet. Die Primer sind in der Tabelle 5 aufgelistet.

Proteinbiochemische Methoden

A. Einengen von Proteinlösungen

Mit VIVASPIN-Röhrchen der Fa. Vivascience wurde das Protein-Probenvolumen eingengt. Die Methode stellt eine Ultrafiltration über eine Membran dar. Hierfür wurden Vivaspin 2 Röhrchen verwendet (5,000 MWCO PES). Das eingesetzte Probenvolumen musste zwischen 500 – 2000 µl liegen und konnte max. auf 100µl eingengt werden. Verwendet wurde eine Sorval-Zentrifuge bei 5000 rpm.

B. Herstellung von Proteinextrakten

1. Gesamtproteinextrakte aus Geweben

200 mg Gewebe wurden in ein Reaktionsgefäß gegeben, das eine Prise Seesand enthielt. Es folgte die Zugabe von 200 µl 0,1 M NaOH. Mit einem Minipotter wurde das Gewebe aufgeschlossen und anschließend homogenisiert. Es folgte eine Zentrifugation für 2 min bei 14.000 rpm, um die schweren Bestandteile zu entfernen. Der Überstand enthält die löslichen Bestandteile. Vom Überstand werden ca. 200 µl abgenommen und mit der entsprechenden Menge 5 x Protein-Probepuffer versehen. Die Lösung wird für 5 min bei 60°C inkubiert und für die Western-Analyse bei –20°C aufbewahrt.

2. Gesamtproteinextrakte aus Zellen

Die Zellen werden von den Kulturplatten durch Zugabe von 500 µl Trypsinlösung und für 4 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen lösen sich vom Untergrund ab und werden in vorbereitete Reaktionsgefäße überführt. Durch Zugabe von 50 µl NBCS wird der enzymatische Verdau gestoppt. Die Reaktionsgefäße werden für 2 min bei 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Zum Zellpellet werden 50 – 100 µl nichtreduzierender Protein-Probepuffer hinzugegeben. Die Zellen werden für 5min bei 60°C erhitzt, resuspendiert und für spätere Versuche bei –70°C eingefroren.

C. Proteinexpression

1. Expression von Proteinen in *E. coli*

Nach der Anzucht des BL21-Expressionsstamms wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration von 0,4 mM) die Proteinexpression des His-Tag Proteins induziert. Um eine Limitierung von FAD während der starken Expression des FAD-bindenden Proteins auszuschließen, wurde der Kultur eine FAD Endkonzentration von 1µg/ml hinzugegeben. Die Expression erfolgte im Schüttler bei 37°C für 3 h. Danach konnten die Zellen mit 8000 rpm bei 4°C geerntet werden.

2. Isolation löslicher Proteine aus *E. coli*

Das Ernten der Zellen erfolgt identisch wie bei den Hefen. Der Zellaufschluß der *E. coli* Zellen erfolgte in der French Press. Die geernteten Zellen wurden in Lysis-Puffer resuspendiert und die Zellsuspension in der Kammer einer French Press mehrmals (3 x) einem Druckunterschied ausgesetzt. Anschließend konnten die lysierten Zellen bei 18000 rpm für 10 min zentrifugiert werden. Der Überstand wurde für die Aufreinigung des 6 x His-Tag Proteins mit Nickel-Aggarose versetzt. Der Überstand wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt. Es wurde 2 ml NiNTA hinzugegeben und 2h auf einem Kippschüttler bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde über einer Glasfritte 2x mit Waschpuffer gewaschen und in eine Säule überführt, gewaschen und eluiert. Das Eluat wird in Reaktionsgefäße aufgefangen, mit Stickstoff überdeckt und bei 4°C gelagert.

Lysis-Puffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0. Einsatz von 10 ml Lysis-Puffer je 1 L-Bakterienkultur.

3. Aufreinigung von His-Tag-markierten Proteinen aus Hefe

Hefemutante werden ü.N. in 100 ml Vollmedium bei 28°C vermehrt. Die Vorkultur wird am nächsten Tag in einen 2 l Kolben Vollmedium überführt und ü.N. bei 36°C kultiviert. Isolation der Hefeproteine (alle Arbeitsschritte bei 4°C): Das Ernten der Zellen erfolgt in der Zentrifuge bei 5000 – 7000 U / min für 10 min. Die Zellen werden in 30 ml Lysispuffer resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgt durch French Press: 3 x bei ca. 1000 bar. Das Lysat wird mit 2 % Triton-X-100 versetzt und für 20min bei 20.000 U / min zentrifugiert. Der klare Überstand wird abgenommen und auf Eis gestellt. Die Reinigung des markierten Proteins erfolgt über eine Säule. Es wird ca. 1 ml NiNTA Agarose (Qiagen) vorgelegt und mit Waschpuffer durchgespült. Die eingesetzte Menge richtet sich nach Herstellerangaben. Der Hefeextrakt wird luftblasenfrei in die Säule gegeben. Nach Durchlauf des Hefeextraktes wird mit Waschpuffer gespült. Das Lösen des Proteins von der Nickel-Agarose erfolgt mit 1ml Elutionspuffer. Das Eluat wird in Reaktionsgefäßen aufgefangen und bei 4°C gelagert.

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

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

D. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung für die untersuchten Proteine Alrp und Ervp-6 x His erfolgte mit Hilfe des UV / VIS-Spektrophotometers anhand der Konzentrationsbestimmung des gebundenen FAD bei einer Wellenlänge von 460 nm. OD_{460} (FAD) = 0,1_(EXT.) entspricht 10 μ M FAD (Molarer Extinktionskoeffizient ϵ_{FAD} = 10 mM · cm⁻¹ bei 460 nm) und entspricht 10 mM Erv1p. Aus den gewonnenen Proteinextrakten wurde der Gesamtproteingehalt (μ g / μ l) und die Menge des aktiv gebundenen Proteins mit FAD ermittelt.

1. Gesamtproteinbestimmung nach Bradford

Das Protokoll für die Gesamtproteinbestimmung nach Bradford wurde nach Herstellerangaben (bio-rad) befolgt. Für die Eichkurve wurde ein BSE-Standard verwendet (Die Stammlsg. 20 mg / ml wurde 1 : 100 verdünnt). Die Proteinextrakte wurden 1 : 1000 verdünnt und doppelt bis dreifach Bestimmt. Als Vergleich dienten die beiden Wildtyp-Proteine 1.Erv1p und 2.Erv1p. Die Messungen erfolgten bei einer OD von 595 nm.

2. Gesamtproteinbestimmung nach Biuret

Das Protokoll für die Gesamtproteinbestimmung nach Biuret wurde nach Herstellerangaben befolgt. Die Eichkurve wurde mit BSA erstellt (Stammlsg. 10 mg / ml). Die Proteinextrakte wurden zur Messung auf 50 μ g Proteingehalt eingestellt. Die Proteinkonzentration wurde im Photospektrometer bei einer OD von 546 nm bestimmt.

3. Proteinbestimmung des aktiven FAD-gebundenen Proteins

Für den Anteil des aktiv gebundenen FAD der Proteine wurden alle Proteinextrakte auf gleiche Konzentration eingestellt. Die Proteinlösungen wurden photospektrometrisch gemessen bei einer OD von 460 nm.

E. *in vitro*-Analysen: Sulfhydryloxidasetest

Das Protokoll für den Sulfhydryloxidase-Test erfolgt nach Anweisungen unserer Arbeitsgruppe (Hofhaus und Lisowsky 2002) und in der Auswertung nach der Literatur (Riddles et al. 1983). Das Enzym und das Substrat wurden in 100 μ l Messpuffer inkubiert. Das Nachweisreagenz besteht aus 800 μ l Messpuffer und 100 μ l DNTB Lösung. Zum Nachweis wurden je 100 μ l Ansatz zu der Nachweislösung gegeben, 30 sec. inkubiert und gemessen. Die **Farbreagenz** DNTB (Carboxynitrophenyldisulfid, Ellmans-Reagent) wird frisch angesetzt und in einer Lösung von 4 mg / 10 ml (10 mM) verwendet. Die spektrophotometrischen Messungen erfolgten bei 28°C mit einer OD von 412 nm über einen Zeitraum von 5 – 25 min. Die Mutantenproteine wurden 1 : 50 verdünnt. Bei den gemessenen

Proteinproben wurde die Hemmung in der Aktivität der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Protein in Prozent angegeben. Es wurden verschiedene mögliche Substrate gemessen. Nach der Anzahl der vorhandenen und zugänglichen Cysteine des Substrates muss die Menge an Protein so gewählt werden, dass eine Extinktion von 100 mE nach Zugabe des Farbreagens entsteht. Die getesteten Substrate sind im Ergebnisteil aufgeführt. Sie wurden mit einer Endkonzentration von 5mmol verwendet.

Messpuffer: 100 mM Natriumhydrogenphosphat, 1 mM EDTA, 2 M Harnstoff, pH 7,5.

F. *in vitro*-Analysen: Dimerisierungstests

1. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden aus Gesamtproteinextrakten mittels Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Das erfolgte mit Fertiggelelektrophorese-Systemen von INVITROGEN. Es wurden 4 – 12 % Bis-Tris Gradientengele verwendet. Die Gelelektrophorese wurde mit MES-Laufpuffer bei 200 V für 45 – 50 min durchgeführt. Der Auftrag der Proteinproben erfolgte in SDS-Probenpuffer, bei reduzierten Proben mit Zusatz von β -ME oder DTT mit einer Endkonzentration für DTT von 1 mM und für β -ME von 5 – 20 mM. Für Gesamtextrakte musste eine Menge zw. 10 – 50 μ g Protein je Probenspur aufgetragen werden. Für die Gesamtproteinextrakte aus regenerierendem Lebermaterial wurden 30 μ g Protein aufgetragen.

Probenpuffer(4x): 0,8g SDS; 2,0 ml Glycerin; 4,0 ml 1M Tris-Acetat, pH6,8; 1,0 ml 0,1M EDTA. Auffüllen auf 10 ml und Zugabe von wenig Bromphenolblau.

2. Transfer von Proteinen auf Membranen (Western-Analysen)

Unmittelbar nach der Gelelektrophorese der Proteinproben erfolgt der Transfer der getrennten Proteine auf eine proteinbindende Membran. Das erfolgt mit Hilfe des NuPAGE-System im Transfer Modul der Fa. INVITROGEN bei 25 V für 2 h. Die eingesetzte Transfermembran war Nitrocellulose (NC, mit 0,2 μ m Porengröße der Fa Schleicher und Schull, #10401396) oder PVDF (mit 0,45 μ m Porengröße der Fa. Millipore, #IPVH00010).

Transferpuffer: 25 mM Bicine; 25 mM Bis-Tris; 20,5 mM EDTA; pH 7.2
Zugabe von 10 % Methanol für ein-Gel Transfers; für zwei-Gel Transfers 20 %ig.. 4,08 g Bicine, 5,23 g Bis/Tris; 0,29 g EDTA; 10 mM DTT; 200 ml Methanol; pH 8,3 add. auf 1000 ml H₂O.

3. Färbung der transferierten Proteine (Ponceau S Färbung)

Die Effizienz des Transfervorgangs kann mit Hilfe von Färbereagenzien, die generell Proteine anfärben, jedoch nicht mit den nachfolgenden Nachweisverfahren interferieren, überprüft werden: Die Membran wird beschriftet und auf notwendige Größe zurecht geschnitten. Die transferierten Proteine auf der NC oder PVDF-Membran werden mit einer Ponceau S Färbung sichtbar gemacht. Die Membran wird dazu kurz in der Färbelösung inkubiert und anschließend die überschüssige Färbelösung mit Leitungswasser abgewaschen. Die Proteinbanden sind rot gefärbt und können zur Dokumentation mittels eines Computerscans digitalisiert dargestellt werden. Die Färbelösung wird durch mehrmaliges Waschen mit PBS-Tween wieder entfernt. Evt. Reste verschwinden beim Absättigen der Membran.

Ponceau S Färbelösung: 0,2 % Ponceau S; 3,0 % TCA (Trichloressigsäure); 3,0 % Sulfosalicylsäure in dH₂O

PBSTw: 1 x PBS mit 0,05 % (v/v) Tween-20.

PBS (10x) 82,3 g Na₂HPO₄; 23,5 g NaH₂PO₄ x H₂O; 40,0 g NaCl
ad. 1000 ml H₂O; pH 7,4.

4. Immunologischer Nachweis von Proteinen (indirekter Nachweis)

Für die Antikörperbindung wurde die Membran 2 x 5 min in PBSTw gewaschen und dann für 1 h in Blocking Puffer vorinkubiert, um überschüssige Proteinbindungsstellen der Membran abzusättigen und eine unspezifische Bindung der Nachweisreagenzien zu verhindern. Für die Bindung des Primär-Antikörpers an die transferierten Proteine wird in frischem Blocking-Puffer der Primärantikörper in der Arbeitsverdünnung gelöst und die Membran über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wird 3 x 5min in PBSTw gewaschen und anschließend für die Sekundär-Antikörperbindung mit frischem Blocking-Puffer und Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert.

Blocking Puffer: 1 x PBS mit 0,2 % I-Block; 0,1 % Tween-20; 4 % Magermilchpulver.

5. Chemilumineszenz-Reaktion und indirekte Visualisierung der Proteine

Der Nachweis der Proteine auf der Membran erfolgt mit dem Serva Western-Light Chemiluminescent Detection System: Die mit den Antikörpern behandelte Membran wurde für 2 x 2 min in Assay Puffer geschwenkt, um die Alkalische Phosphatase zu aktivieren, die einen pH von 9 - 10 benötigt. Anschließend wird die Membran mit einer Lösung versehen, bestehend aus 1 ml CSPD ready-to-use Lösung (TROPIX) und 50 µl Nitro-Block II Lösung (TROPIX) und 5 min im Dunkeln inkubiert. Überschüssiges CSPD wird entfernt und die NC-Membran luftblasenfrei in eine Röntgenfilmentwicklungsfolie gelegt. Die alkalische Phosphatase des sekundären Antikörpers katalysiert die Dephosphorylierung von CSPD zu CSD^{*}. CSD^{*} ist ein Licht emittierendes Produkt, das am Ort seiner Entstehung Licht ausstrahlt

und so die Position der Nachweisreagenzien sichtbar macht. Dokumentiert werden die Signale bei der Chemilumineszenz durch Exposition auf einen Röntgenfilm.

Assay Puffer: 20 mM Tris; 1mM MgCl₂; pH 9.6
Röntgenfilme Kodak X-OMAT, XAR-5, Fa. Sigma F-5253
AGFA, CRONEX 5 100NIF , B4364
Development Folder Fa. TROPIX Cat.Nr.: XF 030.

6. Lösen der Antikörper von NC-Membranen

Die Membran wird mit PBS gespült. 30 min mit einer Glycerin-Lsg behandeln, gewaschen und wieder 30 min mit der Glycerin-Lsg. behandelt. Danach wird mit PBS gewaschen, bis ein neutraler pH-Wert vorliegt. 0,2 M Glycerin, 1 mM EGTA, pH 2,5.

Zellkulturtechniken

A. Kultivierung der Zelllinien

1. Allgemeine Zellkulturbedingungen

Primärkulturen wurden nach der Präparation für max. eine Woche kultiviert. In dieser Zeit wurden die Untersuchungen an ihnen vorgenommen. Für die Transfektionsanalysen wurden unbeschichtete Platten verwendet, um die Proteine ohne Kollagenrückstände isolieren zu können. Die Zellen für die Untersuchungen befanden sich im Zustand der logarithmischen Phase.

2. Nährmedien und Kulturbedingungen

Für die Kultivierung der verschiedenen Zelllinien wurde das Zellkulturmedium für adhaerierende Monolayer verwendet. Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium (DMEM) mit Zusatz von 5 % fötalem Kälberserum (FCS) und 1% einer Penicillin / Streptomycin / Kanamycin-Lsg. (GISCO). Die Kultivierung erfolgte in 10 cm Kulturplatten mit 10 ml DMEM-Medium im Brutschrank bei 37°C und einer Atmosphäre von 5 % CO₂. Verbrauches Medium wurde nach ca. 2-3 Tagen gewechselt, um den Zellen gleichbleibende Nährstoffversorgung zu bieten und die anfallenden Stoffwechselschlacken zu entfernen. Unter den speziellen Bedingungen der Kultivierung ist es nötig, die zu einem dichten Monolayer gewachsenen Zellen in regelmäßigen Abständen zu teilen und das Konfluent werden der Zellen zu verhindern. Um die Zellen in der logarithmischen Wachstumphase zu halten, werden die adhärenen Zellen auf eine Zellzahl von 10⁴ Zellen verdünnt und auf eine neue Kulturplatte ausplattiert. Hierzu wird das Kulturmedium entfernt und 5 ml einer 0,5 x Trypsin/EDTA-Lsg. hinzugegeben. Während einer vierminütigen Inkubation bei 37°C lösen sich die Zellen vom Untergrund ab. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von 500 µl New Born Calf Serum (NBCS) gestoppt, die Zellen geerntet und bei 1100 rpm für 4 min zentrifugiert. Das Zellpellet wird in Kulturmedium resuspendiert, auf eine Zellzahl von 10⁴ Zellen eingestellt und für die Hauptkultur weiter verwendet. Variationen der Zellzahl finden bei Untersuchungen für Transfektionen auf 24 – 6 Well-Platten statt. Hier variiert die benötigte Zellmenge zwischen 10⁴ – 10⁶ Zellen pro Well. Für die anschließende Gesamtproteinextraktion ist eine genügend große Anzahl von Zellen notwendig.

B. Zellzahlbestimmung

Um die Zellzahl von permanenten Zellen in Kultur zu ermitteln, wird deren Konzentration durch direktes Auszählen unter dem Mikroskop in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

C. Transfektion

Die Transfektion ist eine spezielle Transformation und diente bei meinen Untersuchungen für die Übertragung von DNA in Zellkultur-Zellen. Eine transiente (vorübergehende) Transfektion ist die Übertragung von DNA in Zellkultur-Zellen. Eine stabile Transfektion ist die Übertragung von DNA, so dass die DNA an die nachfolgenden Generationen weitergegeben wird. Für die Expression von verschiedenen GFP-Fusionsproteinen in Säugerzellen wurde fremde Plasmid-DNA mit verschiedenen chemischen Transfektionsmethoden in die Zellen eingeschleust.

1. Transfektion mit DOSPER

(kationische Liposomen-vermittelte Transfektion, Boehringer)

Hierbei wird die DNA in eine Lipiddoppelschicht von Phosphatidylserin eingekapselt. Die Phospholipiddoppelschicht ist Zellmembran ähnlich. Die Subkultivierung findet 24 h vor der Transfektion statt. Dazu wurden 3×10^4 Zellen je Well einer 24-Proben Kulturplatte (Sarstedt) in 500 μ l Kulturmedium angesetzt und über Nacht inkubiert. Am Tag der Transfektion wurde das Medium durch 1 ml frisches ersetzt und die DNA/DOSPER-Mischung hergestellt (Plasmid DNA: 1,0 μ g; DOSPER/Boehringer: 4 μ g); jeweils verdünnt in HBS, um optimale Transfektionsbedingungen zu ermitteln. Zur Bildung des Liposomen-Polynucleotid-Komplexes wurden die DOSPER/DNA Mischungen 15 min bei RT inkubiert und anschließend tropfenweise zu den Kulturen gegeben, um eine einheitliche Verteilung dieser Lösung zu erzielen. Nach 6 h Inkubation wurden die Transfektionslösungen durch Medium ausgetauscht und die Kulturen weitere 24 h bei 37°C inkubiert.

2. Transfektion nach Qiagen (Qiagen Selektor Kit; Qiagen Hilden)

Die Subkultivierung findet 24 h vor der Transfektion statt. Für 24-Well-Platten werden 3×10^4 Zellen in 1ml Medium ausplattiert, für 6-Well-Platten werden 4×10^5 Zellen in 2ml Medium ausplattiert. Vor der Transfektion werden die adhärennten Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann mit neuem Medium versehen. Es werden 60 μ l Transfektionsmix nach Herstellerangabe zu jedem Well gegeben und für *Effekten* (nicht-liposomales Reagenz) 18 h inkubiert, für *SuperFect* 3 h inkubiert. Es erfolgt ein erneuter Mediumwechsel. Die Transfektionseffizienz liegt bei mind. 50 % bis max. 80 %.

3. Transfektion mit DEAE-Dextran (Polykationisch-vermittelte Transfektion)

Der ursprüngliche Einsatz von DEAE-Dextran für Transfektionen erfolgte 1965 durch Valeri und Pagano. Bei dieser Transfektion wird das Polykation DEAE-Dextran mit einem Molekulargewicht von 500.000 verwendet, um die polyanionische DNA zu komplexieren und sie an die Zelle zu assoziieren. Die Komplexe werden zum Kulturmedium gegeben, adsorbieren an die Zelloberfläche und werden von der Zelle durch Schock aufgenommen. Ein vorzeitiger DNA-Abbau durch saure Hydrolasen wird durch Zugabe von Chloroquin und DMSO verhindert, das den rapiden Abfall des pH-Wertes unterbindet und gleichzeitig die Aufnahme der DNA-Polykation-Komplexe steigert. Mit dieser Methode lässt sich eine 20 % Expression der zugegebenen DNA erreichen. Bei bestimmten Zellen (*Cos.7*) lässt sich sogar eine Transfektionseffizienz (Prozentsatz transfizierter Zellen) von 70 % erreichen. Die Methode ist nicht geeignet für die Transfektion empfindlicher Zellen oder für Zellkulturen, bei denen DMSO und Chloroquine toxisch sind (hier: Primäre Hepatozyten). Die Methode eignet sich zur stabilen Transienten-Etablierung. Die Zellen werden 24 h vor der Transfektion auf 6-Well Platten kultiviert mit einer Zellzahl zwischen 10^4 – 10^6 , je nach notwendige Weiterbearbeitung und in Kulturmedium bei 37°C inkubiert. Für Proteinextraktionen sind 10^5 Zellen je 6-Well die Mindestmenge. Im Vorfeld der Transfektion wird der DEAE-Dextran-Mix in sterilen Eppendorf-Cups hergestellt. In 1ml Transfektionsmedium werden für jedes 6-Well folgende Mengen hinzugegeben: 1µg Plasmid-DNA, 0,08 % Chloroquine (0,2 µl), 4 % DEAE-Dextran (10 µl). Der Monolayer wird zweimal mit PBS gewaschen, der Mix hinzugegeben und für 80 min unter Gasausschluß bei 37°C inkubiert. Danach werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 10% DMSO in PBS für 1 min "geschockt". Nachfolgendes gründliches waschen der Zellen mit PBS und Inkubation der Zellen in DMEM mit FCS und Antibiotika für 48 h bei 37°C. Alle verwendeten Medien wurden für den Gebrauch auf 37°C erwärmt.

D. Einfrieren und Auftauen von humanen Zellkulturen

Die Zelllinien werden bis zu einer Zellmenge von 1×10^6 expandiert und nach Entnahme von 1×10^5 Zellen in Einfriermedium unter flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Einfriermedium: 70 % DMEM, 20 % FCS (Fötale Kälberserum) und 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid, Fluka).

Aufgetaut werden die Zellen, indem sie aus dem Stickstoff entnommen und schnell in ein 37°C Wasserbad überführt werden. Der Inhalt wird dann auf eine vorgewärmte Kulturschale verteilt und im Brutschrank kultiviert. Das verwendete DMEM wird zu Beginn des Zellwachstums ohne Antibiotika verwendet. Nach den ersten Teilungen kann Normalmedium (DMEM mit FCS und Antibiotika) verwendet werden.

E. Einengung der Zellkulturüberstände

Mit VIVASPIN-Röhrchen der Fa. Vivascience wurden biologische Proben aus der Zellkulturarbeit aufkonzentriert. Das eingesetzte Probenvolumen musste zwischen 500-2000 µl liegen und konnte max. auf 100 µl eingengt werden.

F. Fluoreszenzmikroskopie von GFP-Fusionsproteinen

Mit GFP kann eine starke, sichtbare Fluoreszenz in lebenden Zellen erzeugt werden. In dem Fall der HepG2, *Cos.7* und anderen in dieser Arbeit untersuchten Zellkulturen wurden *GFP*-Vektoren zur Proteinlokalisierung in lebenden Zellen eingesetzt. Das GFP (Grün Fluoreszierendes Protein) stammt aus der Qualle *Aequorea victoria*. Bei Anregung mit ultraviolettem oder blauem Licht, emittiert das Protein grünes Licht. Die GFP-Fluoreszenz in den Zellkulturzellen wurde mit Fluoreszenzmikroskopen (Fa. Zeiss) nachgewiesen. Zellkulturen, bei denen die Transfektionsrate ausreichend war (20 %; Zellzahl mind. 10^6), wurden für weitere proteinbiochemische Analysen geerntet. Für die Transfektionseffizienz (Prozentsatz transfizierter Zellen) wurden die fluoreszierenden Zellen ausgezählt und der Prozentsatz ermittelt. Hierbei wurden die verschiedenen expremierten Alrp-GFP-Formen miteinander verglichen.

Mikroskopische Methoden

A. Inverse Mikroskopie

Die Zellkulturen machten die Arbeiten an einem inversen Mikroskop nötig. Das Gerät war ein Zeiss Telaval 31 und wurde vom Institut der Biochemie zur Verfügung gestellt.

B. Mikromanipulator

Die Tetradenanalysen wurden an einem Leica Mikroskop mit Mikromanipulator vorgenommen.

C. Fluoreszenzmikroskopie

Zellkulturlinien und Gewebedünnschnitte wurden mit einem Zeiss Axioplan 2 und einem Leica DM LB Mikroskop analysiert.

D. Mikroskopische Daten

Die verwendeten Filtersätze gehörten bei den Zeiss Geräten zu den Filtergruppen Interferenzbreitbandfilter (Filtersatz 09) oder zu den Interferenzlinienfiltern (Filtersatz 01 und 15). Die Filtersysteme des Leica-Mikroskops waren die Filtersätze I3 für die Blauanregung und A3 für die UV-Anregung.

1. Filtersysteme

Tab. 15 : Die verwendeten Filtersysteme mit Angabe der Wellenlänge (nm)

Filtersysteme von Zeiss						
Filtergruppe	Anregungsbereich	Filtersatz	Erregerfilter	Farbteiler	Sperrfilter	
Interferenz-Breitbandfilter	Blau 450 – 490	09	BP 450 - 490	FT 510	LP 520	generelle FITC
	Blauviolett 400 – 440	05	BP 400 - 440	FT 460	LP 470	
Interferenzlinienfilter für Hg-Lampen	Grün H 546	15	BP 546 / 12	FT 580	LP 590	
	Ultraviolett H 365	01	BP 365 / 11	FT 395	LP 397	
Filtersysteme von Leica : Leica DM LB						
Filtergruppe	Anregungsbereich	Filtersatz	Erregerfilter	Farbteiler	Sperrfilter	
	Blau	I 3	BP 450 - 490	RKP 510	LP 515	
	UV 340 – 380	A	BP 340 - 380	RKP 400	LP 425	
	Grün	Y 3	BP 535 / 50	RKP 565	BP 610 / 75	

Abkürzungen:

BP Bandpaß

FT Farbteiler

LP Langpaß

RKP Reflexionskurzpassfilter

FT Farbteiler 510: d.h., Strahlung über 510 nm geht hindurch und wird nicht im System weitergeleitet.

Filtereigenschaften:

- 09 Blau-Anregung: Standard FITC-Filter: generelle FITC-Färbung.
- 15 Selektive Grün-Anregung (TRITC geeignet).
- 01 UV-Anregung; DAPI (Nukleinsäure).
- 05 Violett-Anregungsfilter zw. 400nm – 440nm.

2. Objektive und Okulare**Tab. 16: Die verwendeten Objektive und Okulare**

Zeiss	Axiophot 2	Bemerkung
Objektive		
Plan-NEOFLUAR	2,5x / 0,075 // 44 03 10	
	10x / 0,30 // ∞ / 0,17	30 : 1 Vergrößerung der
	20x / 0,50 // 44 03 41 01	Abbildung.
	40x / 0,75 // ∞ / 0,17	160 : 1 ``
	100x / 1,30 oil // ∞ / 0,17	250 : 1 ``
	64x / 1,25 oil // ∞ / 0,17	
Okular		
NEOFLUAR	PL 10x / 25	
Leica	Leica DM LB	Bemerkung
Leica Germany	10x / 0,25 N Plan ∞/- /A	
Planachromate	40x / 0,65 N Plan ∞/- /D	
	100x/1,25 oil N Plan ∞/- /D	
Okular	L Plan 10x / 20  M	

3. Filme und Kameras**a) Filme**

Die Fotos wurden hergestellt mit einem integrierten Kamerateil am Zeiss-Mikroskop unter Verwendung von Kodak Ectochrom Diafilmen. Für die digitalisierten Bilder fand jeweils eine Digitalkamera Olympus DP50 Verwendung.

b) Digitalkameras

Videosystem : Olympus DP50
 Videosystem AVT Horn (Adapter): Sony 3CCD Color Video Camera, 12V
 Bildschirm: Sony PVM-1453MD mit HR Triniton.
 Hardware: Power Macintosh 9500 / 200
 Software: Adobe Photoshop 4.0

4. Farbstoffe

Es wurde mit verschiedenen fluoreszenzfähigen Farbstoffen und Mikroskopfiltersystemen gearbeitet. Dabei wurden im Vorfeld die Filtersysteme mit ihren physikalischen Parametern bestimmt:

Farbstoffe: Mito-Tracker RedCMX Ros. (Molecular Probes, M7512)
 DAPI (Molecular Probes)
 Antikörper: Sekundär-AK: Goat anti-mouse/rabbit markiert mit FITC oder CY3.

Tab. 17: Die verwendeten Farbstoffe (Fluorochrome)

Methode Fluorochrom	spezifisch	Anregung nm	Emission nm	Anwendungs- gebiet	Filter	Bemerkung
FITC Fluorescein- Isothiocyanat	Nachweis von AG-AK- Reaktionen	BLAU 450 – 500 max: 492	Gelb/Grün 500 – 550 max: 520	Immunologie	generell 09 13	Bot III Bot I Genetik I
DAPI	Nukleinsäure	UV 359	461	Zytologie	01, 02	Bot III
TRITC	Nachweis von AG-AK- Reaktionen	GRÜN		Immunologie	selektiv 15	Bot III
CY2 Carbocyanin		489	506		09	
CY3 Indocarbo- cyanin		GRÜN 553 max.:550	ROT 575 em max: 570		20 auch TRITC- Filter	photo-stabiler
MitoTracker		GRÜN 578	599		15	
GFP		498	516		09	
GFPwt		395	509			
RedSTAR (DsRed)	in vivo- Doppelfärbung			Hefe- und Säugerzellen		24-48h
JC1		514	529			
Rodamin		550	573			
Rodamin 123		507	529			konvent- ionell

E. Konfokale Mikroskopie

Die untersuchten Präparate aus der Zellkultur und die kryokonservierten immuncytochemischen Leberschnitte wurden mit einem Inversmikroskop mit konfokalem Laserscanning Zubehör der Fa. Leica analysiert. Die Bilder wurden auf zwei Kanälen betrachtet. Die Excitationswellenlängen waren dabei 568 nm (grün) und 488 nm (rot). Die Emission wurde bei 520 nm (grün) und 590 nm (rot) aufgenommen, wobei eine gleichmäßige Überlappung beider Signale ein gelbes Signal ergab. Die Arbeiten wurden an einem Gerät im Labor der Hepatologie, Uni-Düsseldorf vorgenommen.

Immuncytochemie

A. Fixierung von Gewebeschnitten

1. Paraffin-Fixiertes Gewebe

Das von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellte Gewebematerial, war Paraffin-Fixiertes Gewebe. Für Voruntersuchungen wurden an Mausorganen Gewebeschnitte durchgeführt.

2. Kryo-Fixiertes-Gewebe

Das Gewebe der Rattenlebern wurde als kryofixiertes Gewebe verwendet. Mit einem Gefriermikrotom wurden 7 µm dicke Schnitte angefertigt bei einer Arbeitstemperatur von -25°C. Die Ausgangsmaterialien wurden bei -70°C gelagert und nur für die Dauer der Schnittprozedur auf -25°C aufgetaut. Die angefertigten Schnitte lagerten für die Dauer der Untersuchungen bei -20 bis -25°C. Die geschnittenen Präparate sind ½ Jahr lagerfähig.

B. Färbemethoden

1. Paraffin-Fixiertes Gewebe

Die Gewebeschnitte mit Paraffin wurden bei 55-60°C max. 5min geschmolzen und dann über eine umgekehrte Alkoholreihe rehydriert: Xylol: 5 min und 15 min. Ethanol: 100 %, 96 %, 96 %, 90 %, 70 %, 50 % und 30 % je 3 min. Zum Schluß wurden die Schnitte für 10 min in PBSTw gewaschen. Das Blocken erfolgt in einer Feuchtekkammer für 10 min indem 100-150 ml einer 2%igen Blocklsg. (PBSTw + NGS) auf die Schnitte geträufelt wurden. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgt für 45 min bei RT. Waschen des Schnittes mit PBSTw für 2 x 10 min und Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 45 min in der Feuchtekkammer bei RT. Erneutes Waschen für 5min. Die Aktivierung der Schnitte erfolgt durch eintauchen in Reaktionspuffer. Es erfolgt Inkubation der Schnitte mit 60 µl Substratlösung. Bei deutlicher Farbreaktion wird die Reaktion mit PBS gestoppt. Nachfolgend werden die Paraffin-Schnitte entwässert in der aufsteigenden Alkoholreihe und getrocknet. Eindeckeln in DePeX. Paraffiniertes Gewebe wurde nicht für Fluoreszenzuntersuchungen verwendet.

2. Kryo-Fixiertes-Gewebe

Bei den Gefrierschnitten wurde ein abgewandeltes Färbeprotokoll verwendet. Die Schnitte wurden aus der -20°C Lagerung entnommen und bei RT getrocknet. Die Schnitte wurden mit einem PAP-PEN (Dako) umrandet und in PBSTw für 2 x 5 min gewässert. Das Blocken erfolgt für 10min mit einer Serumlösung. Dann erfolgt der Auftrag des Primärantikörper für

45 min in einer Verdünnung von 1 : 250. Inkubation bei RT in einer Feuchtekammer. Anschließendes Waschen der Schnitte für 2 x 5 min in PBSTw und Inkubation mit dem Sekundärantikörper (CY3 oder FITC) für 45 min bei RT in der Feuchtekammer. Die Schnitte werden vor Licht geschützt. Danach können die Schnitte direkt mit einem Einbettungsmedium für Fluoreszenzanwendung eingedeckelt werden (DAKO Fluor.-Mounting Medium, S3023). Die Antikörper sind in **Tabelle 6** des Material-Teils aufgeführt.

a) Permeabilisierung von Gewebe

Da Gewebe im Ganzen eine sensitive Reaktion durch Antikörperbehandlung erschwert, wurden die Leberschnitte vor der Behandlung durch Permeabilisieren zugänglich gemacht. Für die Paraffinschnitte wurde dem Waschpuffer Tween-20 hinzugegeben mit einer Endkonzentration von 0,05 %. Für die Kryoschnitte wurde eine 2 %ige Tween-20 Lösung in Waschpuffer hergestellt.

b) Verwendete Antikörper für die Immunzytochemie

Tab. 18: Verwendete Antikörper

Name	Verwendete Verdünnung
Primärantikörper*	
α -Kaninchen-Alrp	1:250
α -Kaninchen-Porin	1:250
α -Maus-Porin	1:250
α -Maus-Actin	1:200
α -Maus-CoxVb	1:250
Sekundärantikörper	
aus human gegen Kaninchen, markiert mit Alkalischer Phosphatase	1:500
aus Ziege gegen Kaninchen, markiert mit FITC / CY3	1:1000
aus Ziege gegen Maus, markiert mit FITC / CY3	1:1000

*Bedeutung der Abkürzungen in den Namen der Antikörper: rb = rabbit (Kaninchen), ms = mouse(Maus), go = goat(Ziege), hu = human; CoxVb = Cytochromoxidase Untereinheit Vb.

c) Blocken unerwünschter Enzymaktivität

Zum Blocken der Aktivität von endogener Alkalischer Phosphatase wurde Levamisol (Sigma L-9756) eingesetzt. Es wurde eine Stammlösung von 0,01 M / ml Levamisol hergestellt und bei -20°C gelagert. Eingesetzt wurden 10 μl der 0,01 M Lösung auf 1000 μl Reaktionspuffer. Die Endkonzentration des Levamisols beträgt 0,1 mM.

IV. Ergebnisse

Kapitel I: Erv1p der Hefe

A. Die *in vitro* - Mutagenese

Um die Beziehung zwischen Struktur und molekularem Mechanismus am Erv1-Protein zu untersuchen wurden gezielt Punktmutationen in die DNA-Sequenz der cDNA eingeführt, die im resultierenden Protein einen Aminosäureaustausch von Cystein zu Serin bewirkte. Es sollten von den sechs möglichen Erv1p-Cysteinmutanten die beiden noch fehlenden Mutanten hergestellt werden. Als Matrize für die Mutagenese diente die cDNA von *ERV1* im pET24a(+)-Vektor.

1. Schema zur *in vitro* - Mutagenese

Zur Verdeutlichung des angewendeten Mutageneseprinzipes wird das Schema des Erv1p-WT Proteins mit den sechs Cysteinen in der Sequenz gezeigt. Die beiden Cysteine, die verändert werden sollen, sind blau unterlegt:

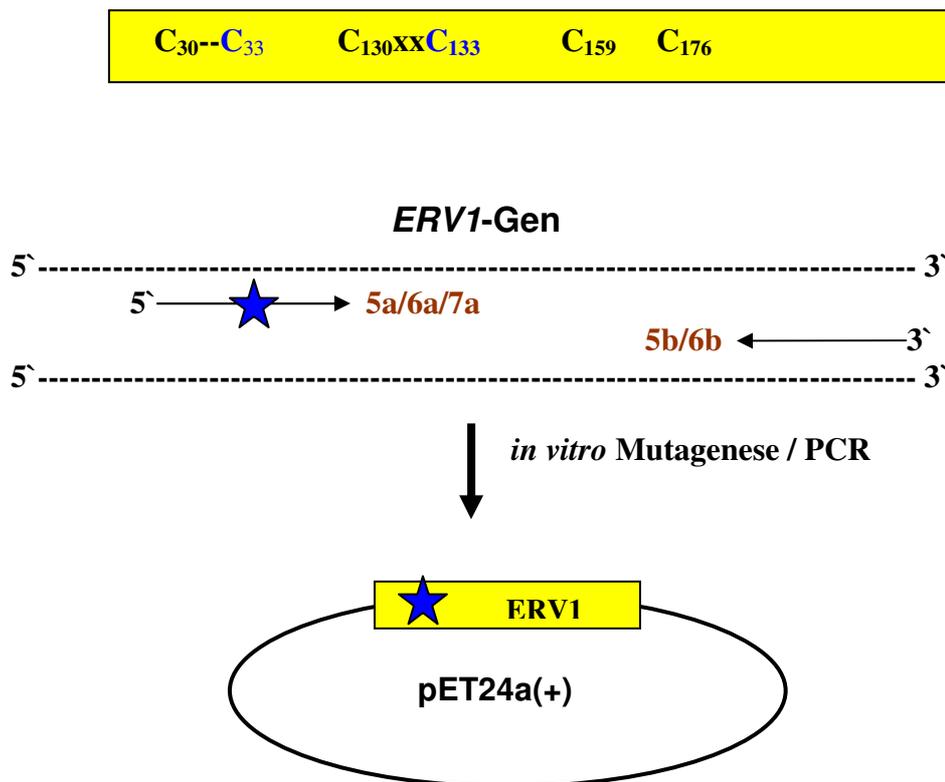


Abb. 5: Das Schema zur Herstellung der *ERV1*-Punktmutanten.

Die cDNA von *ERV1* und die *in vitro*-Primer mit den Punktmutationen und die Gegenprimer. Die Nummern der Primer (5a, 6a, 7a; 5b, 6b) sind in der **Tabelle 5** erläutert.

Die *Erv1p*-Mutanten C33S, C133S und C30/33S wurden hergestellt und für die nachfolgenden *in vitro*-Analysen direkt genutzt. Für die *in vivo*-Analysen in Hefe wurde die *ERV1*-Punktmutations-Sequenzen in die beiden Hefevektoren pRS416 und YEp352-pADH kloniert. Zusätzlich wurde die *Erv1p*-Doppelmutante C30/33S in pET24a(+) erzeugt. Die *Erv1p*-Doppelmutanten C30S-C130S, C30S-C159S und C30S-C176S wurden hergestellt, indem definierte Restriktionsschnittstellen in der Sequenz verwendet wurden. Die geschnittenen DNA Bereiche wurden im entsprechenden pRS416-Vektor neu kombiniert.

Für die Herstellung der Cystein-Einfach-Mutanten lagen unserer Arbeitsgruppe vier Punktmutanten vor:

Tabelle 19: Die Cystein-Mutationssequenzen für *Erv1p*.

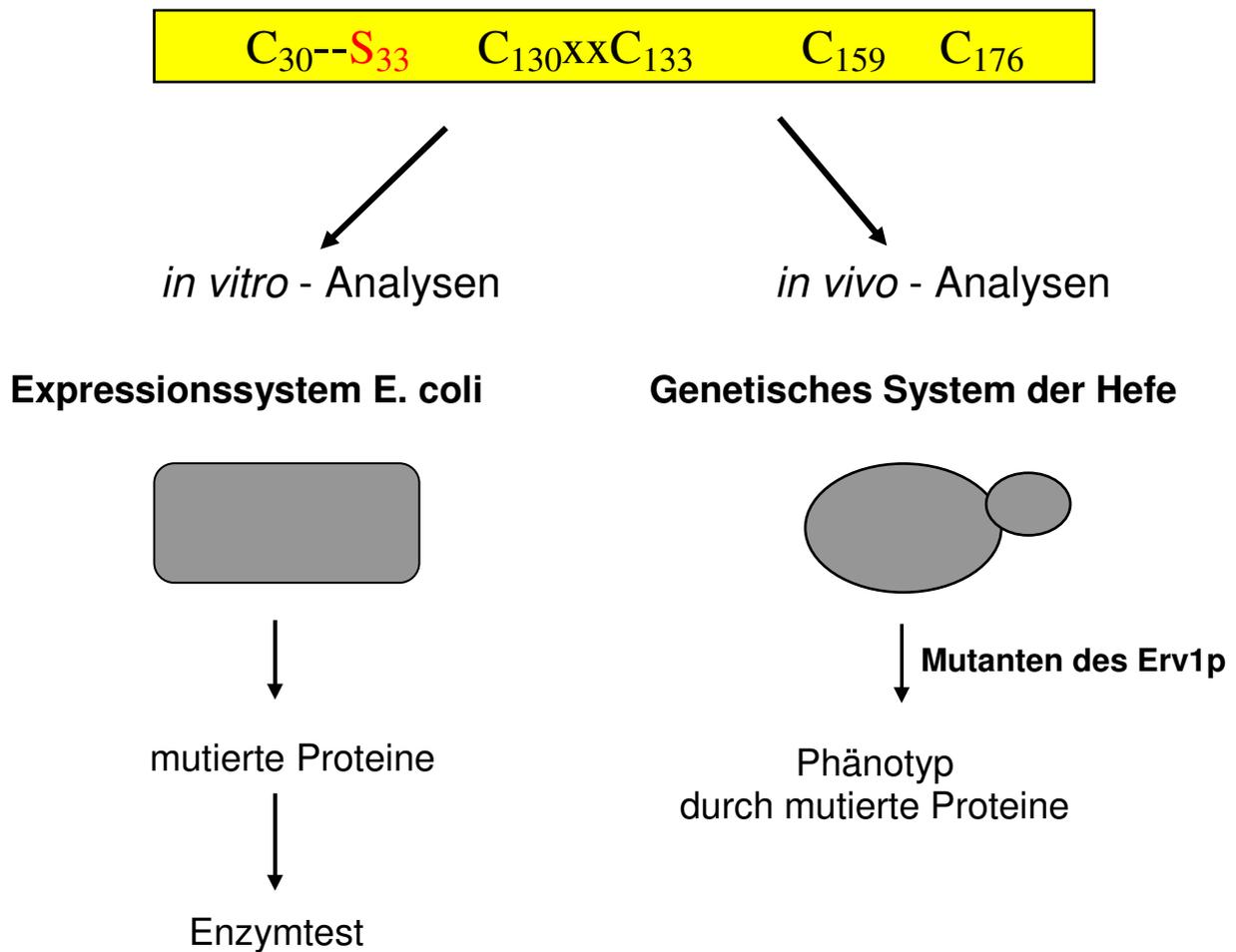
Position des Cysteins in der Sequenz	Name	Vektor	zusätzliche Schnittstellen
Vorhandene Sequenzen (Lee 2002)			
30	C30S	pET24a+	<i>NruI</i>
130	C130S	pET24a+	<i>MunI</i>
159	C159S	pET24a+	<i>Cfr13</i>
176	C176S	pET24a+	<i>Van9II</i>
Neu mutagenisierte Sequenzen			
33	C33S	pET24a+	keine
133	C133S	pET24a+	keine
30 + 33	C30/33S	pET24a+	<i>PvuI</i>

Die zusätzlichen Schnittstellen in den Gensequenzen dienen der Identifikation der korrekten Klone nach der Mutagenisierung. Bei der Herstellung der C33S- und C133S-Mutante wurde auf Schnittstellen verzichtet, da die möglichen einzufügenden Schnittstellen für die weiteren Klonierungen in die Hefevektoren ungünstig gewesen wären.

2. Schema zur *in vitro* und *in vivo*-Analyse

Nach der Herstellung der Vektorkonstrukte teilen sich die folgenden Untersuchungen in zwei Bereiche. Für enzymatische Tests wurden die *in vitro*-Analysen im Expressionssystem von *E. coli* vorgenommen. Für die *in vivo*-Funktionstests wurden die Untersuchungen im genetischen System der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* vorgenommen.

Die Erv1p-Cystein-Mutanten im Funktionstest



B. Das genetische System in Hefe

Für Untersuchungen in der Hefe musste das Vektorsystem gewechselt werden. Es wurden zwei verschiedene Vektoren verwendet. Ein Vektor mit hohen Kopienzahl: YEp352-pADH und ein Vektor mit niedriger Kopienzahl: pRS419. Die Arbeiten mit der Hefe und den *Erv1p*-Mutanten beinhaltete zwei Untersuchungsbereiche. Entstehende Veränderungen im Phänotyp durch die *Erv1p*-Cysteinmutanten sollten nachweisbare Proteindefekte aufdecken. Die Untersuchungen wurden im haploiden *pet-ts*-Stamm vorgenommen. Ergab sich ein Effekt durch die Mutation, wurde anschließend im diploiden System der Disruptionsmutante getestet. Die Ergebnisse sollten Auskunft über die Stärke des Effektes der Punktmutante geben.

1. Phänotypuntersuchung

Tabelle 20: Komplementationsverhalten der mutierten Proteine in Hefe.

Tab. 20a: Komplementation mit $\Delta erv1$ (S3) ; pRS416

Hefestamm	Temperaturen (°C)		
	28	36	38
Wild-Typ	+	+	+
$\Delta erv1$	-	-	-
$\Delta erv1$ + <i>Erv1p</i> C30S	+	-	-
$\Delta erv1$ + <i>Erv1p</i> C33S	-	-	-
$\Delta erv1$ + <i>Erv1p</i> C130S	-	-	-
$\Delta erv1$ + <i>Erv1p</i> C133S	-	-	-
$\Delta erv1$ + <i>Erv1p</i> C159S	+	-	-
$\Delta erv1$ + <i>Erv1p</i> C176S	+	-	-

Tab. 20b: Komplementation mit *erv1ts* (*pet492*); pRS416

Hefestamm	Temperaturen (°C)		
	28	36	38
Wild-Typ	+	+	+
$\Delta erv1$	+	-	-
$\Delta erv1$ + <i>Erv1p</i> C30S	+	+	-
$\Delta erv1$ + <i>Erv1p</i> C33S	+	-	-
$\Delta erv1$ + <i>Erv1p</i> C130S	+	-	-
$\Delta erv1$ + <i>Erv1p</i> C133S	+	-	-
$\Delta erv1$ + <i>Erv1p</i> C159S	+	-	-
$\Delta erv1$ + <i>Erv1p</i> C176S	+	-	-

In den beiden Tabellen 20a und b sind die Ergebnisse für das Komplementationsverhalten der *Erv1p*-Mutanten in Hefe aufgelistet.

20a zeigt die Ergebnisse des Disruptionssystems $\Delta erv1$ (1n) im niedrig Kopien-Vektor.

20b zeigt die Ergebnisse der temperatursensitiven Mutanten *erv1-ts* (1n) im niedrig Kopien-Vektor. (+ bedeutet Wachstum, - bedeutet kein Wachstum.).

Der Hauptunterschied zwischen den Mutanten und dem Wild-Typ ist, dass die Mutanten bei höheren Temperaturen nicht wachsen können.

zu 20a: Alle Mutanten zeigen Temperatursensitivität. Bei der C33S, C130S und C133S Mutante wirkt die Disruption des Gens letal.

zu 20b: Alle Mutanten zeigen Temperatursensitivität, die bei der C30S-Mutante vermindert ist. Alle anderen Mutanten wachsen zwischen 36-38°C nicht.

Tab. 20c: Zusammenfassung der Phänotypuntersuchungen im pet-ts-Stamm.

Name Vektor+Punkt- mutante	WA-ura	WA- leu	N3 28°	N3 36°	N3 38- 39°	YPGc 28°	YPGc 36°	YPGc 38°	YPGc 39°
pRSC30S	12	0	12	5(7)	0	12	12	0	0
pRSC33S	848	2	848	472	0	848	848	0	0
pRSC130S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pRSC133S	134	0	134	82	0	134	82	0	0
pRSC159S	20	0	20	14(6)	0	20	20	3	0
pRSC176S	24	0	24	24	3	24	23	1	-
YepC30S	nicht untersucht								
YepC33S	210	0	198	24	0	210	146	0	0
YepC130S	11	0	11	(3)	0	11	10	3	0
YepC133S	6	4	6	1(1)	0	6	2	0	0
YepC156S	18	0	18	18	0	18	7	0	0
YepC176S	letal								

Tab. 21a: Zusammenfassung der Ergebnisse der Phänotypanalysen (1n).

Mutante	Ergebnisse im niedrig-Kopien-Vektor
pRSC30S	Der Defekt <i>erv1-ts</i> wird nicht durch das Plasmid komplementiert. Ein Funktionsdefekt der Punktmutante liegt vor. Beim 1n-Stamm ist der Test auf Temperatursensitivität positiv. Deutlicheres <i>ts</i> -Verhalten beim Wachstum der Klone als bei den hohen Kopienzahl-Vektor. Der <i>ts</i> -Phänotyp ist ausgeprägter. Hier liegt ein Gendosis Effekt vor.
pRSC33S	Vermindertes Wachstum bei 36°C.
pRSC130S	---
pRSC133S	Im niedrig Kopien-Vektor sind alle Kolonien leu-. Die Klone wachsen auf 36°C vermindert, sie sind Temperatursensitiv.
pRSC159S	Deutlicheres <u><i>ts</i>-Verhalten</u> beim Wachstum der Mutanten als bei den Mutanten mit hohem Kopienzahl-Vektor. Der <i>ts</i> -Phänotyp ist ausgeprägter. Keine Komplementation. Der Defekt der Punktmutante ist da. Große und kleine Kolonien tauchen hier <u>nicht</u> auf. Hier liegt ein Gendosis Effekt vor.
pRSC176S	Deutlicheres <i>ts</i> -Verhalten der Klone als bei den Mutanten mit hohem Kopienzahl-Vektor. Der <i>ts</i> -Phänotyp ist ausgeprägter. Beim 1n-Stamm ist der Test auf Temperatursensitivität positiv. Hier liegt ein Gendosis Effekt vor. Keine Komplementation. Der Defekt der Punktmutante ist vorhanden.

Tab. 21b: Zusammenfassung der Ergebnisse der Phänotypenanalysen (1n).

Mutante	Ergebnisse im hohen Kopien-Vektor
YepC30S	Die Mutante zeigt Komplementation. Das Heterodimer scheint zur Aufrechterhaltung der Funktion zu genügen.
YepC33S	Mutante zeigt <u>keine</u> Komplementation. Einzelzellen der Kolonieabdrücke zeigen Restwachstum, was sehr typisch ist. Es könnte sich um genetische Rekombination handeln, der Genotyp würde dann zum WT werden oder andere genetische Anpassungen erzeugen. Vergleich mit mind. 20 Tetraden des 2n-Stammes Frage: Wieviel Restaktivität hat das Protein?
YepC130S	Die Mutante C130S im Yep-352-pADH Plasmid ist eine temperatursensitive Mutante. Die C130S-Mutante kann nicht komplementiert werden. Ein Defekt ist vorhanden.
YepC133S	Alle Kolonien leu+ sind ts. Alle Kolonien leu- wachsen noch bei 36°-38°C.
YepC159S	Vermindertes Wachstum bei 39°C
YepC176S	<u>nicht getestet</u> , direkt in pRS419 getestet.

2. Tetradenanalysen

Hier werden die Zusammenfassungen der Tetradenauswertungen vorgestellt.

Tab. 22a: Zusammenfassung der Tetradenanalyse im S3-Sporulationsstamm und dem hohen Kopienzahl-Vektor: YEp352-pADH.

Erv1p-Mutante	1:0	2:0	3:0	4:0	nicht gekeimt	Σ	Ergebnis
C30S	3	19	10	8	17	57	K* ; 2:0
C33S	19	8	-	-	40	72	2:0
C130S	19	6	-	-	47	72	2:0
C133S	6	2	-	1	25	34	letal
C159S	10	3	2	1	0	16	2:2
C176S	-	1	3	2	4	10	2:2

*Bemerkung zu der Tabelle: Die Abkürzung K bedeutet Komplementation.

Tab. 22b: Zusammenfassung der Tetradenanalyse im S3-Sporulationsstamm und dem niedrig Kopienzahl-Vektor: pRS416.

Erv1p-Mutante	1:0	2:0	3:0	4:0	nicht gekeimt	Σ	Ergebnis
C30S	8	11	5	10	8	42	2:0
C33S	6	10	1	6	12	23	2:0
C130S	8	3	3	1	0	15	2:0
C133S	0	7	3	4	17	31	artifizuell
C159S	4	3	3	3	0	13	2:0
C176S	5	6	5	3	0	19	2:0

Tab. 22c: Zusammenfassung der Ergebnisse der Tetradenanalysen.

Tetradenanalysen (1n)	
pRSC30S	2:0; Die 4er Tetraden zeigen ein heterogenes Keimbild: leu negativ. Viele wachsende Tetraden verhalten sich wie der WT. Der Gendefekt ist letal; Meiotische Rekombination ist für das Auftreten der 4er Tetraden und als Erklärung für die heterogen wachsenden Tetraden verantwortlich. Bei den Tetraden mit Wachstum auf LEU findet Rekombination des Genoms statt. pRS419-Plasmid verhalten sich bei der Verteilung in der Zelle wie ein Chromosom. Jede Tetradenzelle erhält ein Plasmid, dass über den Spindelapparat verteilt wird.
pRSC33S	2:0 Segregation .
pRSC130S	Ein heterogenes Bild: 2:0 ; letal; Rekombination in der Meiose, Der pRS419-Vektor verhält sich wie ein Chromosom. Keine Komplementation des Gendefektes.
pRSC133S	Hier liegt eine höhere Anzahl von Abundanten vor als bei YEp. Die 4er Tetraden sind artifiziell und brauchen nicht auf Temperaturstufen getestet werden. Hier entsteht der WT: durch CrossLink.
pRSC159S	4er Tetrade: 2:0; keine Komplementation, kein ts bei 36°. Komplementation; Der Defekt der Punktmutante ist <u>nicht</u> letal.
pRSC176S	Komplementation, Temperatursensitiv: ein sehr leichter Effekt, der bei längerer Inkubation deutlicher wird. Der Suppressoreffekt ist eliminiert.
YEp-C30S	Die C30S-Mutante zeigt Komplementation. Sie bildet Heterodimere aus. Bei dem AS-Austausch an Position 30 reicht evt. ein Cystein aus, um die entscheidende Funktion aufrecht zu erhalten.
YEp-C33S	2:0 Typ, letal.
YEp-C130S	Keine Komplementation. Der Defekt für die Zelle ist letal. Die Punktmutante C130S ist nicht in der Lage ein Protein zu bilden, dass die normale Enzymfunktion ausführt. Das Aktive Zentrum ist hier betroffen: 2:0. Es zeigt sich ein uneinheitliches Bild: viele 3er Tetraden. Dort ist der WT durch Rekombination in der Meiose entstanden.
YEp-C133S	Keine Komplementation des Defektes. Das aktive Zentrum ist irreparabel geschädigt. Für die Zelle ist der Defekt des Enzyms letal.
YEp-C159S	Nur 4er Tetraden wurden auf eine Platte vereinigt. Leichter konditioneller Effekt, wie bei den ts-Mutanten. Komplementierte Zellen wachsen 2:2, Wildtyp wächst auf leu nicht. Bei den verschiedenen Temperaturen ein sehr leichter Effekt. Die Zellen müssen länger inkubieren, um ihn deutlicher erkennbar werden zu lassen.
YEp-C176S	Ein sehr leichter konditioneller Effekt, wie bei den ts-Mutanten. Komplementierte Zellen wachsen 2:2. Der Wildtyp wächst auf leu nicht. Die Daten sind schwer auszuwerten, da das Tetradenwachstum nicht so deutlich ist wie bei C159S. Die Tetraden müssen länger Inkubieren, um den Effekt deutlich werden zu lassen. ts bei 38,5°C. Die Komplementation des Gens durch die Punktmutante (=nicht letal).

Fazit: Die wichtigsten Punkte der Zusammenfassung aus den Tetradenuntersuchungen sind:

- Bei den Phänotypuntersuchungen zeigen die Hefezellen mit dem pRS419-Vektor (niedrig Kopienzahl- oder CEN-Vektor) Temperatursensitivität.
- Bei den Tetradenuntersuchungen zeigen die Hefezellen mit dem YEp352-pADH-Vektor (hohe Kopienzahl-Vektor) Temperatursensitivität.

C. Die Analysen mit rekombinanten Proteinen aus *E. coli*

1. Die Enzymaktivität der Mutantenproteine C33S und C133S

Hier werden die Messungen der Enzymaktivität der von mir hergestellten Mutantenproteine des Erv1p: C33S, C133S im Vergleich mit dem Wildtyp von Erv1p gezeigt.

C33S und C133S im Vergleich zum Wildtyp-Erv1p.

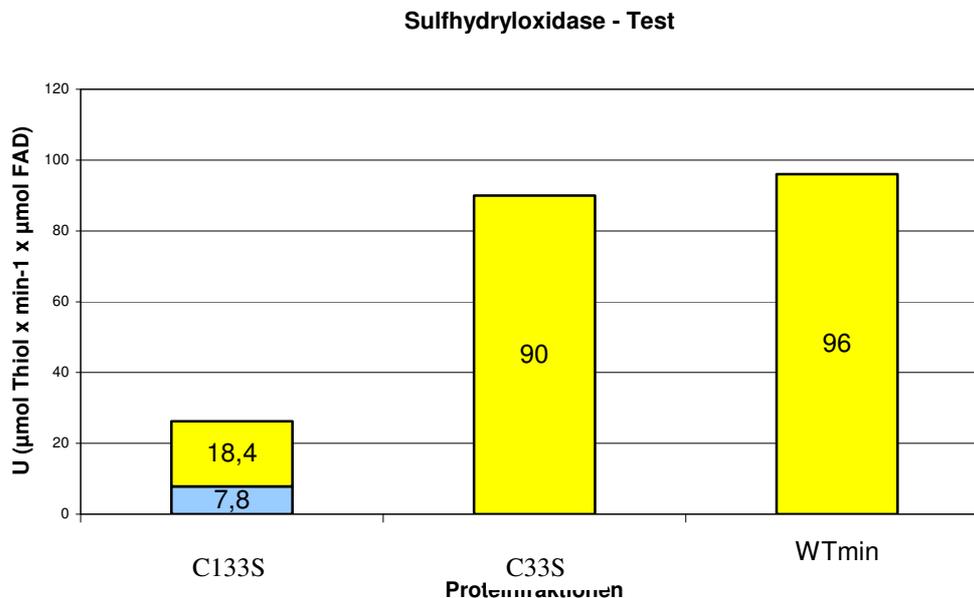


Abb. 6: Das Säulendiagramm zeigt die ersten Messwerte der gereinigten Mutantenproteine C33S und C133S im Vergleich mit dem Wildtyp 1.Erv1p. Die Enzymaktivitäten (Unit, U = $\mu\text{mol Thiol} \times \text{min}^{-1}$ pro $\mu\text{mol FAD}$) sind gemittelte Werte aus vier unabhängigen Messungen. Bei der C133S-Mutante ist die Diagrammsäule unterteilt für die Gesamtproteinmenge ■ und die FAD gebundenen Proteinmenge ■. Das verwendete Substrat war DTT. WTmin bezeichnet den Erv1p-WT kultiviert in Minimalmedium.

Bei der Messung der Enzymaktivität wird normalerweise der Anteil von gebundenem FAD und der Gesamtproteingehalt von Enzymen bestimmt. Bei den beiden von mir hergestellten Mutantenproteinen ist die FAD-Bindung nicht von Bedeutung. Die C133S-Mutation liegt im redoxaktiven Zentrum des Erv1-Proteins. Das Protein sollte keine Funktion mehr haben und keine FAD-Bindung zeigen. Für die C33S-Mutante ist das Bindungsverhalten für FAD unbekannt. Aus diesem Grund wurde der FAD-Gehalt der Mutantenproteine nicht über UV-VIS-Spektroskopie gemessen. Für die C133S-Mutante wurde nachträglich die Differenzierung in FAD-gebundenem Protein vorgenommen, da hier nicht mit einer Enzymaktivität gerechnet worden ist. Für die Messung der Enzymaktivität wurde DTT (Dithiothreitol) als Substrat verwendet. In Vortests wurde auch Cystein verwendet. Cystein enthält eine Thiolgruppe, DTT enthält zwei Thiolgruppen. Der Gehalt an freien Thiolgruppen kann durch die Reaktion mit DTNB (Ellman 1959) spektroskopisch bei 412 nm bestimmt

werden. Aus Messungen in unserer Arbeitsgruppe sind folgende Werte für die Enzymaktivität des Wildtyps 1.Erv1p bekannt (Lee 2002) **Tabelle 23:**

Tabelle 23: Die verwendeten Substrate.

Substrat	Erv1p	Lysozym Z	Cystein	GSH
$\mu\text{mol Thiol} \times \text{min}^{-1} \text{ pro } \mu\text{mol FAD}$	11,7	8,7	5,0	0

Fazit: Das hier verwendete DTT dient bei Erv1p als ein gutes *in vitro*-Substrat mit einer Enzymaktivität von 96 $\mu\text{mol Thiol} \times \text{min}^{-1}$ pro FAD für den Wildtyp. Es werden messbare Werte für die Cysteinmutanten ermittelt. Für Cystein als Substrat konnte bei meinen Mutanten keine Aktivitäten gemessen werden.

2. Die Enzymaktivität für alle Erv1p-Mutanten im Vergleich

Hier wird die eigentliche Enzymfunktion von Erv1p über seine Aktivität bestimmt und vergleichend untersucht.

Sulfhydryloxidase - Test der rekombinanten Erv1-Mutantenproteine.

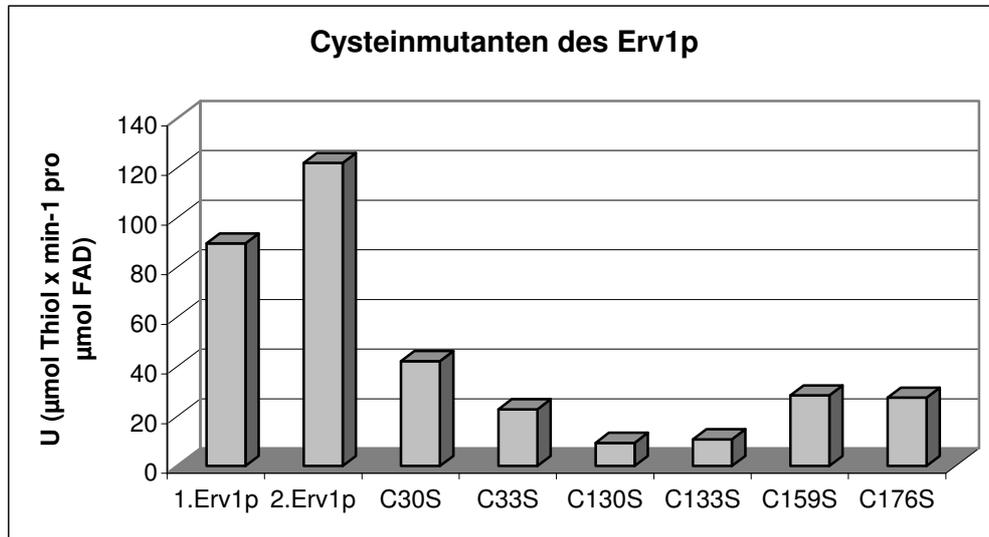


Abb. 7: Das Säulendiagramm zeigt die Messwerte aller rekombinanten Mutantenproteine des Erv1p im Vergleich mit den Wildtypen. Hier werden die ermittelten Enzymaktivitäten für die Proteine angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. Das verwendete Substrat war DTT.

Die gemessenen Werte zeigen, dass jede Cysteinmutation in der Sequenz von Erv1p zu einem charakteristischen Verlust in der enzymatischen Aktivität führt. Die Enzymaktivität wird bis zu 50% erniedrigt. Der ermittelte Wert für die Enzymaktivität aus den neuen Präparationen und den neuen Messungen entspricht jetzt den Erwartungen für die Cystein-Mutanten. Bei den Untersuchungen wurde das Substrat DTT verwendet. Die C30S-Mutante zeigt mit 42,2 µmol Thiol x min⁻¹ pro µmol FAD die höchste Enzymaktivität der untersuchten Mutantenproteine. Das steht im Einklang mit den genetischen Untersuchungen. Dort zeigt die C30S-Mutante noch Aktivität in der Hefe, da sie Heterodimere bilden kann.

3. Dimerisierungstests

Die Dimerisierungseigenschaften sind charakteristisch für die untersuchten Erv1-Proteine. Durch den Vergleich des Wildtyps mit den Mutanten von Erv1p können Veränderungen im Dimerisierungsverhalten entdeckt werden. Die Untersuchungen dienen auch der Aufklärung zur Substratbindung am Enzym. Hier wurde das Verhalten der Wildtyp-Proteine und der Mutantenproteine aus *E. coli* und Hefe untersucht.

Die Dimerisierungseigenschaften der Erv1-Proteine aus *E. coli*.

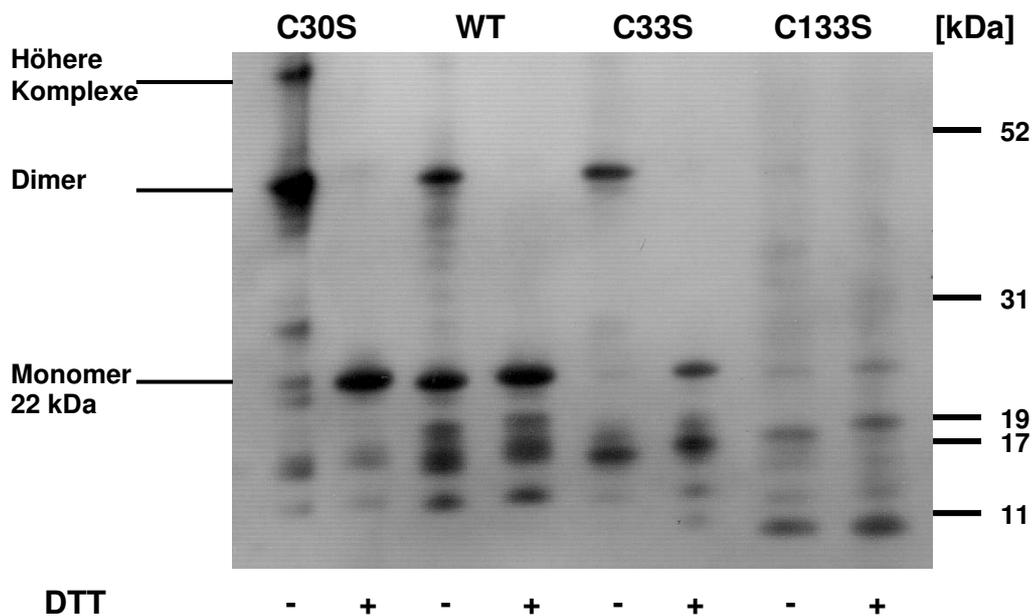


Abb. 8: Die Dimerisierungseigenschaften der rekombinanten Erv1-Mutantenproteine im Vergleich mit dem Wildtyp von Erv1p in der Western-Blot Analyse. Aufgetragen wurden der WT mit 2 µg, C30S mit 1 µg, C33S mit 2 µg und C133S mit 2 µg. Der verwendete Antikörper war Anti-His-Tag.

Unter reduzierenden Bedingungen treten Monomerformen auf. Die Mutante C30S bildet auf der nicht-reduzierten Spur mehr stabile Dimere als der Wildtyp und akkumuliert auch in höheren Komplexen. Der Mechanismus der C30S-Mutante zur Dimerisation ist beeinträchtigt. Der Wildtyp (WT) von Erv1p ist auf der nicht-reduzierten Spur als Monomer und als Dimer vorhanden. Das Auftreten beider Formen steht in einem Zusammenhang. Die C133S-Mutante des redox-aktiven Zentrums bildet keine Dimere.

4. Die Dimerisierungseigenschaften der Erv1p-Proteine aus Hefe

Für die Untersuchungen in Hefe wurden zwei Versuchsgruppen hergestellt. Bei der 4 h Gruppe wurden die Hefen ü.N. bei 28°C und für 4 h auf 36°C kultiviert. Bei der ü.N.-Gruppe wird die Kultur ü.N. auf 36°C kultiviert. Für die Western-Blot Analysen wurden Gesamtproteine aufgetragen.

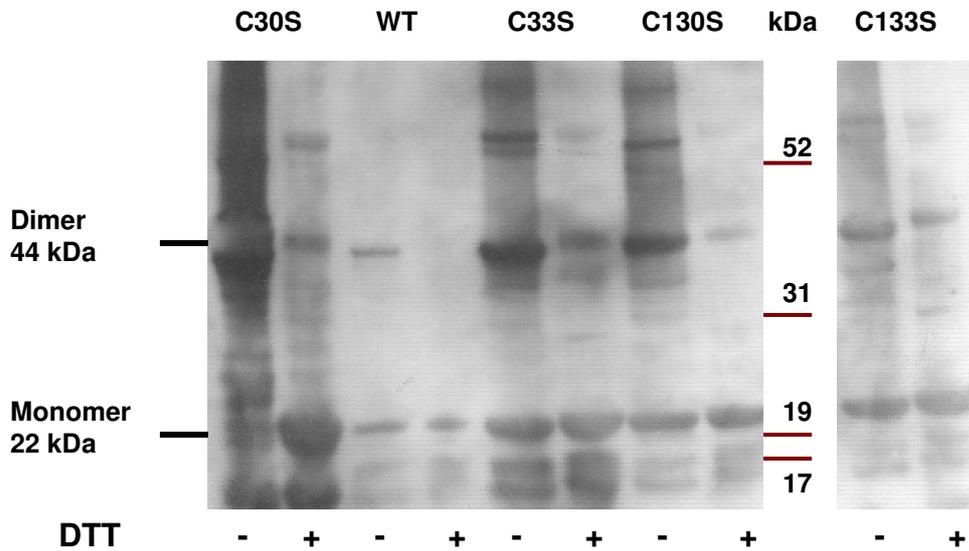


Abb. 9a: Die Dimerisierungseigenschaften der Erv1-Proteine aus Hefe in der Western-Blot Analyse. Hier werden die Mutanten mit dem Wildtyp von Erv1p verglichen. Aufgetragen wurden die Mutanten C30S, C33S, C130S und C133S im Vergleich mit dem Wildtyp mit 1µg Protein. Der verwendete Antikörper war Anti-scErv1p* (Lill). *Bemerkung: sc = *Saccharomyces cerevisiae*.

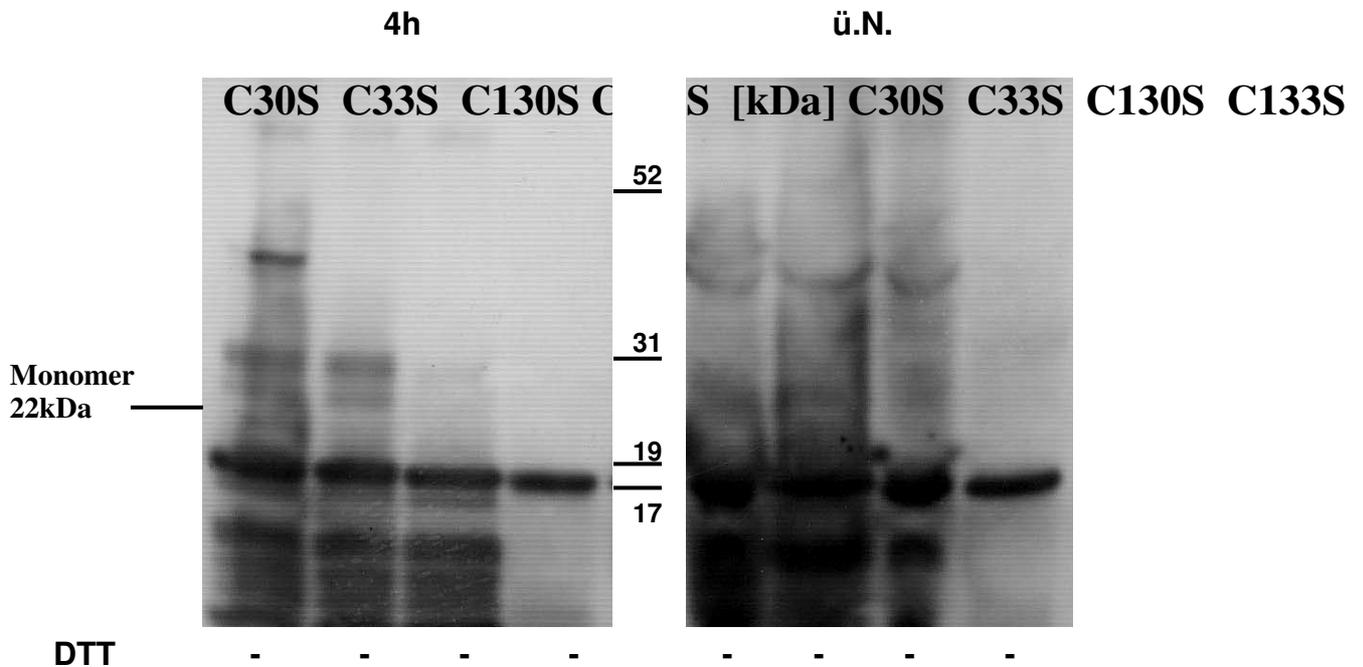


Abb. 9b: Die Dimerisierungseigenschaften der Hefe Erv1-Mutantenproteine aus den 4h und den ü.N. Ansätzen als Western-Blot Analyse. Hier wurden die Überstände der Proben der Proteinmutanten C30S, C33S, C130S und C133S aufgetragen. Der verwendete Antikörper war Anti-scErv1p (Lill). Es wurde 30 sec. belichtet. Der Abbildung dient hier als Ergänzung für die Dimerisierungseigenschaften des C133S.

Das Erv1-Protein C133S bildet keine Dimere. Das ergänzt den Western-Blot **Abb. 9a** und steht mit den Befunden im Einklang.

5. Spektroskopie der C30/33S Doppelmutante

Für die C30/33S Doppelmutante wurde das rekombinante Protein spektrophotometrisch gemessen. **Abb. 10** zeigt die Doppelmutante im Vergleich mit dem Wildtyp (WT) Erv1p.

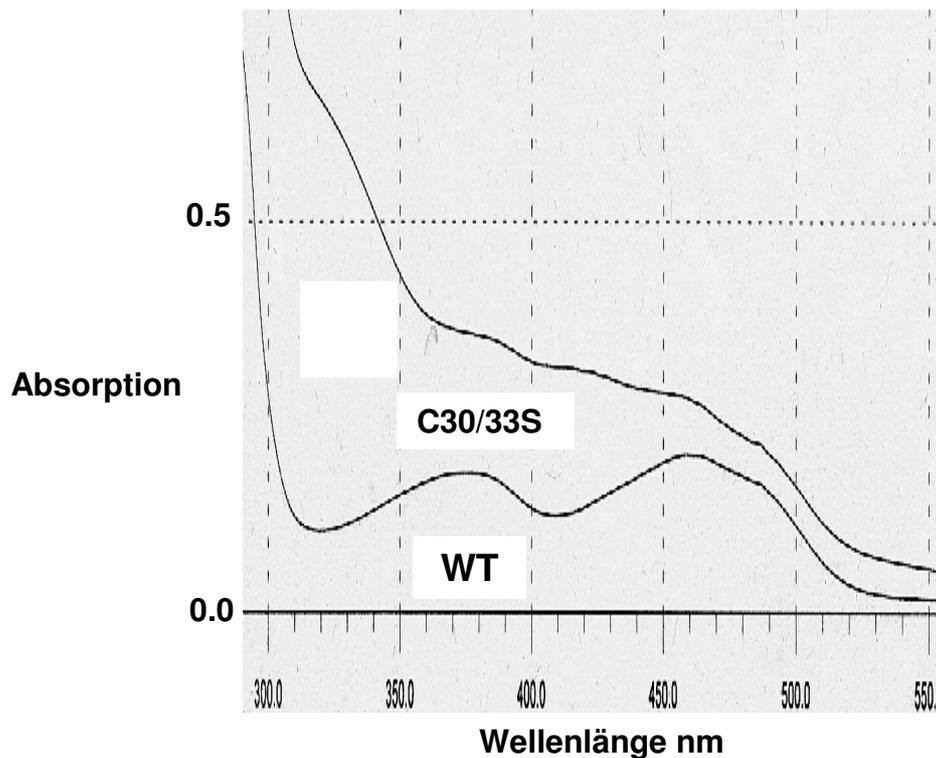


Abb. 10: Das Spektrum der Doppelmutante C30/33S im Vergleich mit dem Spektrum des Wildtyp-Erv1p.

Die Doppelmutante zeigt eine hohe Proteinausbeute in *E. coli*. Der Effekt entspricht dem Verhalten der C30S-Mutante. Der spektrale Bereich zwischen 320 nm bis 350 nm zeigt ein Absorptionsverhalten bei der C30/33S Mutante, die beim WT nicht auftritt. Hier könnte es sich um den N-terminalen Bereich handeln, der beim Mutantenprotein störend wirkt. Die hohen Peaks zu Beginn der Spektralkurve stammen vom Imidazol. Die Mutante hat die doppelte Proteinmenge des Wildtyps und zeigt eine blassgelbe Farbe. Sie ähnelt dadurch in der Farbe der C159S-Mutante, die wenig FAD bindet.

D. Die Analysen der Erv1p-Mutantenproteine aus Hefe

1. Das FAD / Gesamtprotein Verhältnis aller Erv1p-Mutanten aus Hefe in vier unabhängigen Messungen und drei Methoden

Aus unterschiedlichen Präparationsansätzen wurden für alle Erv1p-Cysteinmutanten aus Hefe und den beiden Wildtyp-Formen von Erv1p der FAD- und der Gesamtproteingehalt ermittelt. Das Diagramm zeigt die Verhältniswerte von FAD zu Gesamtprotein, dargestellt als Mittelwert aus vier unabhängigen Messungen.

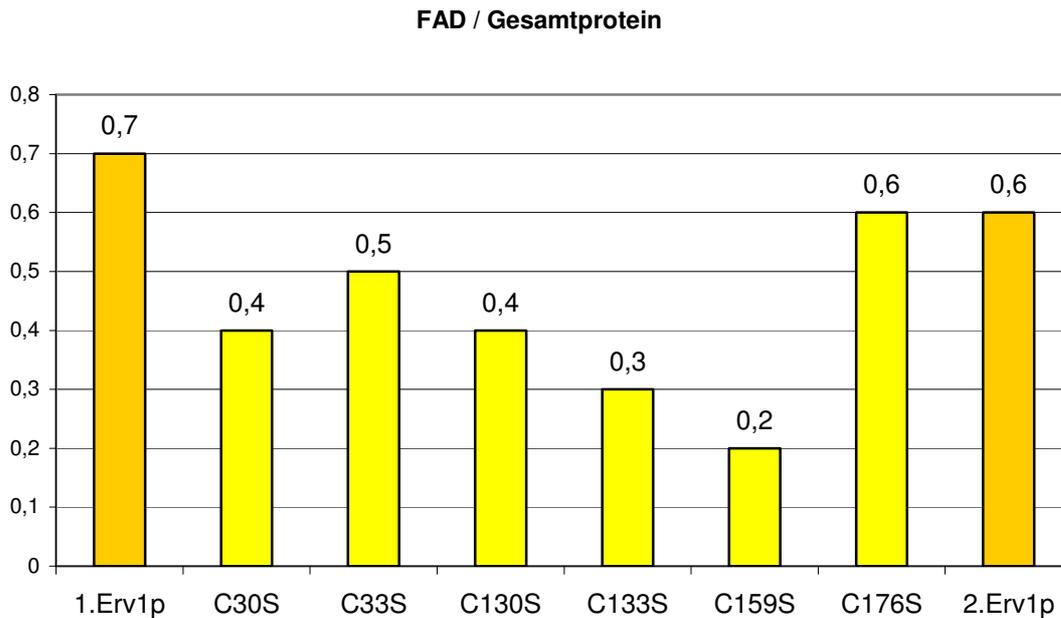


Abb. 11: Das Säulendiagramm zeigt die Verhältniswerte für die Cysteinmutanten und die beiden Wildtypen von Erv1p. Hier wurde aus vier unabhängigen Messungen mit drei verschiedenen Methoden die Gesamtkonzentration der Proteine und der FAD-Gehalt der Proteine aus Hefe bestimmt.

Bei der Betrachtung der Standardabweichung wurde für die Wildtypen von Erv1p keine Signifikanz festgestellt. In Bezug auf die Bindung von FAD liegt kein Unterschied zwischen dem 1.Erv1p und 2.Erv1p vor. Bei den Mutanten stellt C159S eine Ausnahme dar. Sie ist signifikant verschieden zum Wildtyp und den Mutanten C30S bis C133S und C176S.

E. Die Farben der rekombinanten Erv1- Proteine

Nach der NiNTA-Reinigung der Erv1-Proteine aus *E. coli* lagen die Proteinlösungen für die Mutantenproteine und der Wildtypen vor und lieferten folgendes Bild:

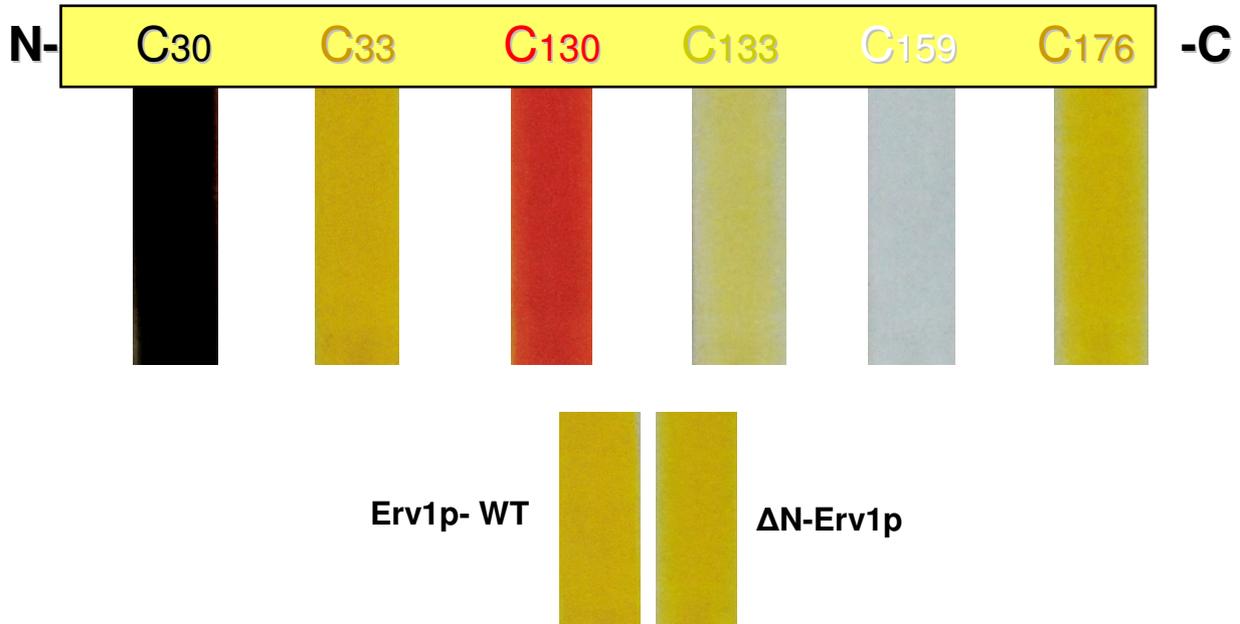


Abb. 12: Die Farben der rekombinanten Proteinlösungen der Cystein-Mutanten von Erv1p und der Wildtyp. Als Balken ist die Erv1p-Sequenz mit den Positionen der Cysteine schematisch abgebildet. Darunter befinden sich die Farben der entsprechenden Proteinlösungen. Hier kann die Zuordnung zwischen mutiertem Cystein und den farbigen Mutanten-Proteinen gemacht werden.

Die resultierenden Farben sind charakteristisch für jede Mutante. Die Mutanten sind in ihren Farben verschieden zu den Farben des Wildtyps. Die Hauptfarbe der Proteine ist Gelb, hervorgerufen durch gebundenes FAD. Davon abweichend finden sich unterschiedliche Nuancen an Gelbtönen bis hin zu farblos bei C159S, Orange bei C130S und Schwarz bei C30S. Die größte Veränderung in den Farben zeigen die Mutantenproteine C30S und C130S. Mit ihrer Hilfe sollte daher die Suche nach den *in vivo*-Substraten erfolgen. Die Farben zeigen FAD-Bindung an und deuten auf Elektronenverschiebungen hin. Sie sagen nichts über die Enzymaktivität aus. Es wird aufgrund der unterschiedlichen Farben deutlich, dass die Cysteinpaare der CxxC-Motive nicht gleichwertig sind.

F. Substratsuche über Substratfang (Substrate trapping)

Es ist nichts über die *in vivo*-Substrate von Erv1p bekannt. Deshalb wurden erste Experimente initiiert. Die Substratsuche für Erv1p erfolgte über die Idee einer Substratfang-Methode durch mutierte Erv1-Proteine. Das Prinzip des Substratfangs durch die Mutantenproteine wird durch das folgende Modell erklärt:

1. Das Substratfang-Modell

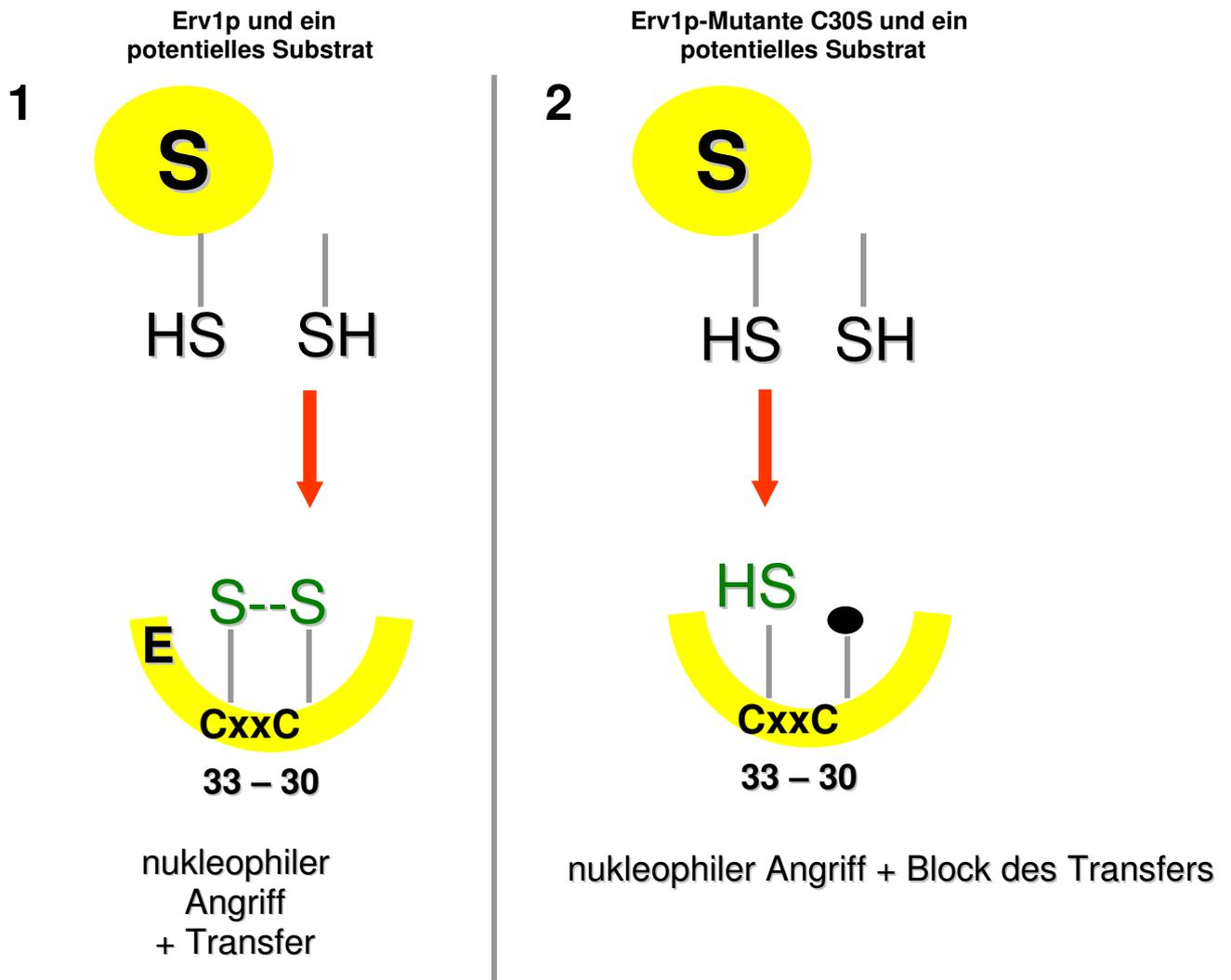


Abb. 13a: Das Prinzip des Substratfangs durch die Mutantenproteine des Erv1p.

- 1: Das Cysteinpaar C₃₀--C₃₃ wird von einem Substrat (S) über die Sulphydrylgruppe angegriffen. Dabei sind die beiden möglichen Cysteine für den Angriff nicht gleichwertig.
- 2: Das Mutantenzym C30S. Hier kann das Substrat nur noch eines der möglichen Cysteine nukleophil angreifen. Der weitere Transfer wird blockiert.

Erv1p-Mutante C33S und ein Substrat

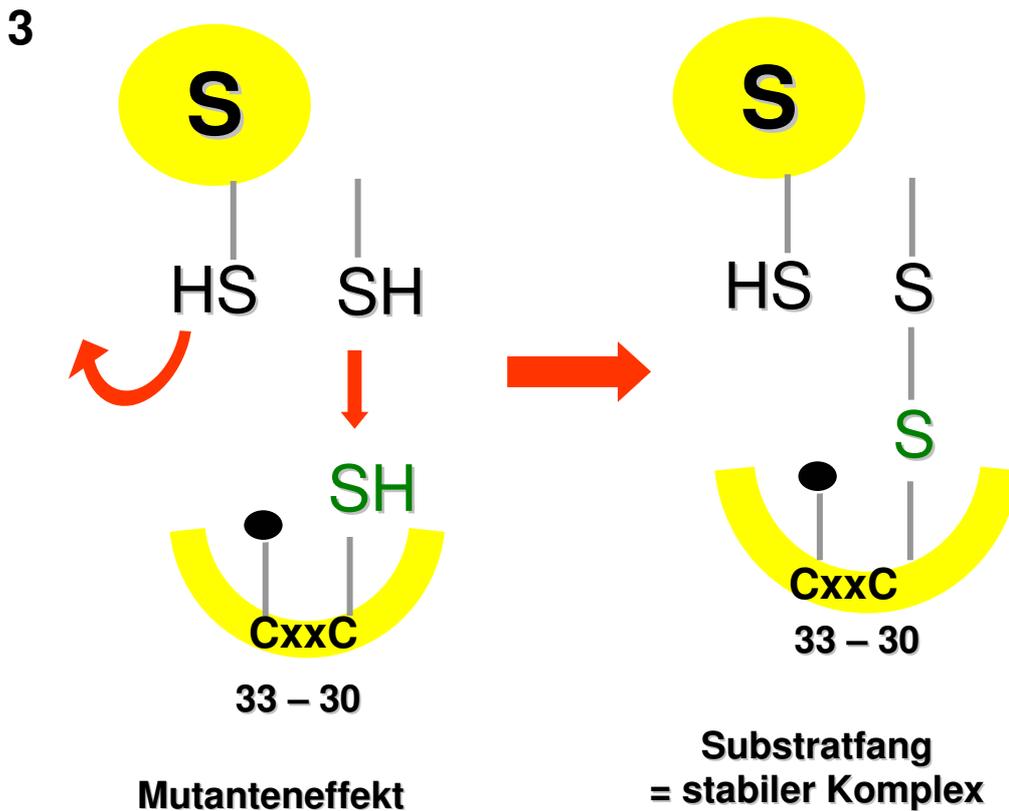
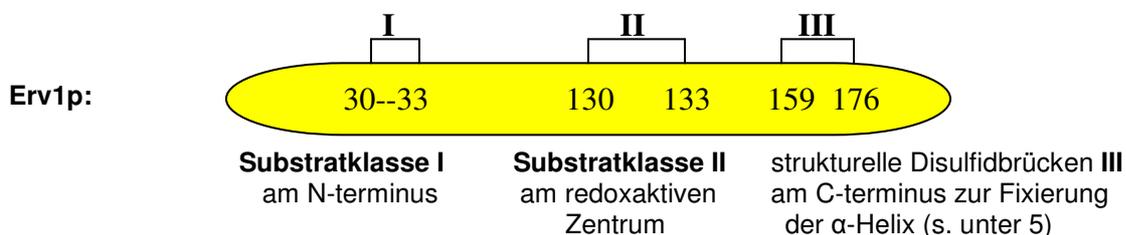


Abb. 13b: Das Prinzip des Substratfangs durch die Mutantenproteine des Erv1p.

3: Das Mutantenzym C33S. Hier kann das Substrat nur mit einem der Cysteine in Reaktion gehen und die Disulfidbrücke bilden. Es entsteht ein stabiler Enzym-Substrat-Komplex. Die Reaktion ist arretiert. Das Substrat ist gefangen.

Mit dem Modell erklärt sich das Prinzip des Substratfangs. Die Sequenz des Erv1-Proteins weist zwei CxxC-Motive auf.



Die farbigen Proteine demonstrieren den besonderen Charakter des N-terminalen Bereiches für das Protein. Die Cysteinpaare sind nicht gleichwertig. Die folgende Western-Blot Auswertung verdeutlicht das Substratfang-Prinzip und zeigt ein mögliches Substrat.

2. Substratfang des Mutantenprotein C33S

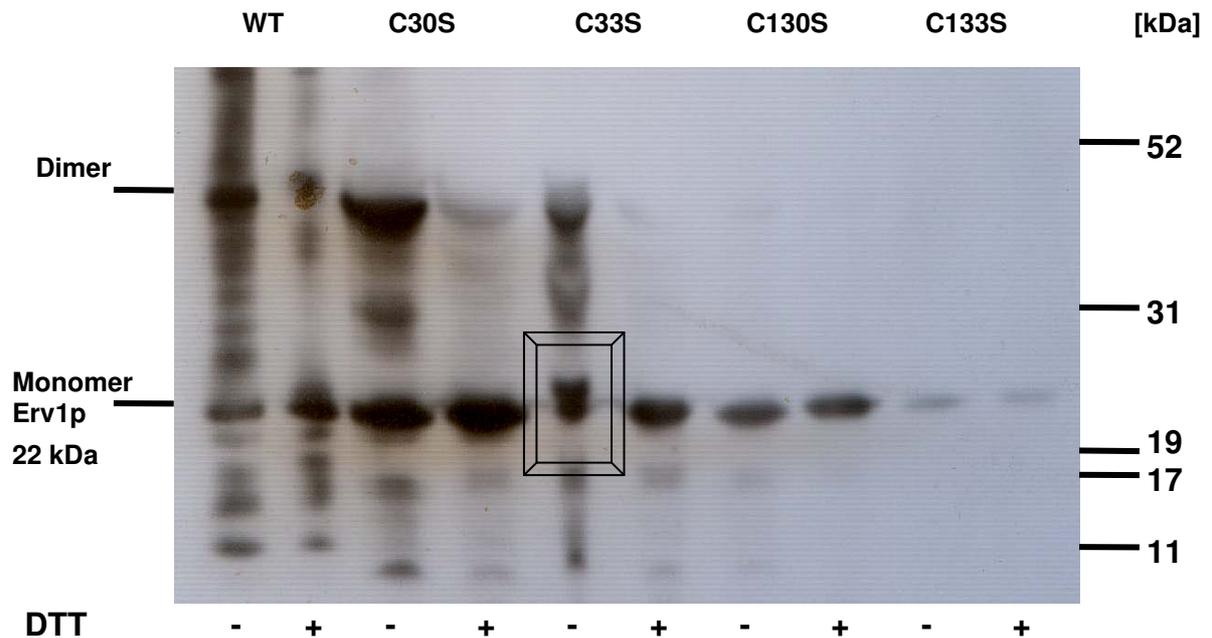


Abb. 14: Die Substratsuche in Hefe. Die Western-Blot Analyse der Erv1p-Cysteinmutanten aus Hefe im Vergleich mit dem 1.Erv1p aus *E. coli*. Der verwendete Antikörper war Anti-scErv1p. Der Rahmen markiert die Doppelbande von C33S und dem potentiellen *in vivo*-Substrat.

In Hefe wird unter den Bedingungen der kleinen Ansätze und der Inkubation ü.N. eine ausreichende Menge des Erv1-Proteins in Hefe expremiert. Nach dem Auftrag der Proteinlösungen können das Monomer (22 kDa) und das Dimer (44 kDa) von Erv1p identifiziert werden. Erv1p zeigt in den Analysen Homodimere. Beim Monomer der C33S-Mutante des Erv1p findet sich eine etwa um 2 kDa größere Proteinbande. Hier zeigt sich ein mögliches *in vivo*-Substrat. Das an das Monomer C33S gebundene Substrat ist zur Verdeutlichung mit einem Kasten umrandet.

G. Die Substratsuche mit Hefe-Antikörpern gegen bekannte IMS Proteine

Bei den Erv1p-Mutanten C30S und C33S der **Abb. 14** treten Zwischenprodukte auf, die noch genauer getestet werden können. Es wurden Western-Blot Filter mit den entsprechenden Erv1p-Mutanten hergestellt. Die Filter wurden mit bekannten Antikörpern aus Hefe hybridisiert und ausgewertet. Es wurde mit folgenden Antikörpern getestet: α -Trxp, α -Grxp, α -Sod1p und α -Apo cytc. Die Erv1p-Mutanten C30S und C33S wurden als Mitochondrienfraktionen und aufgereinigte Proteinextrakte aus Hefe getestet und miteinander verglichen.

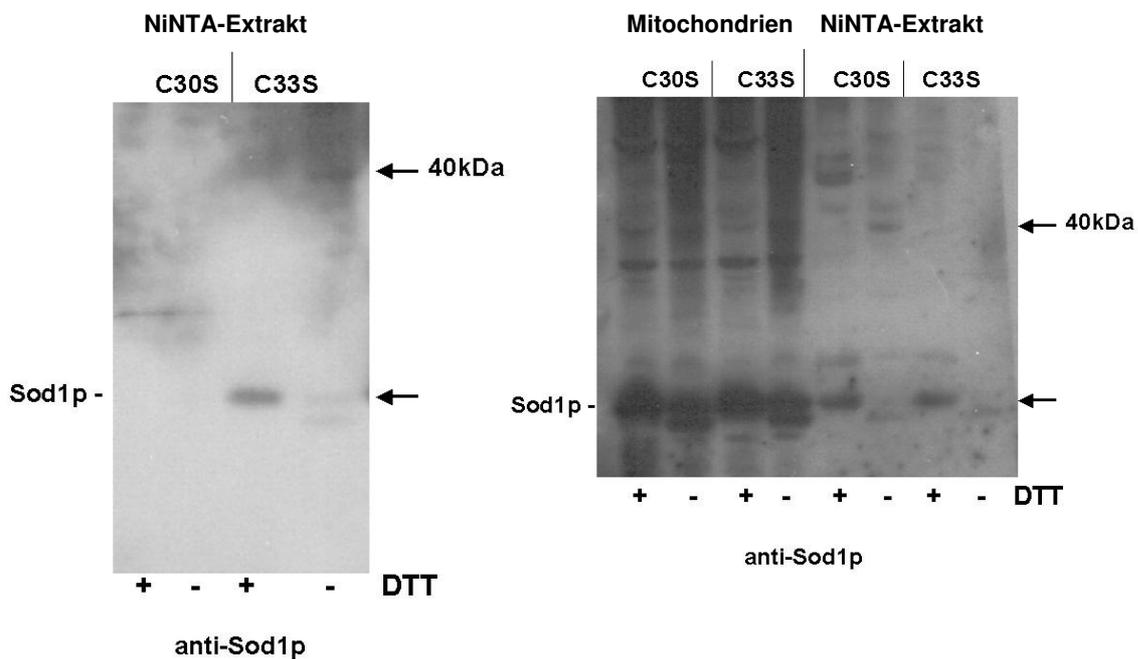


Abb. 15a: Die Substratsuche mit Anti-Sod1p. Es liegt ein Substrat-Enzym-Komplex unter nicht-reduzierten Bedingungen vor.

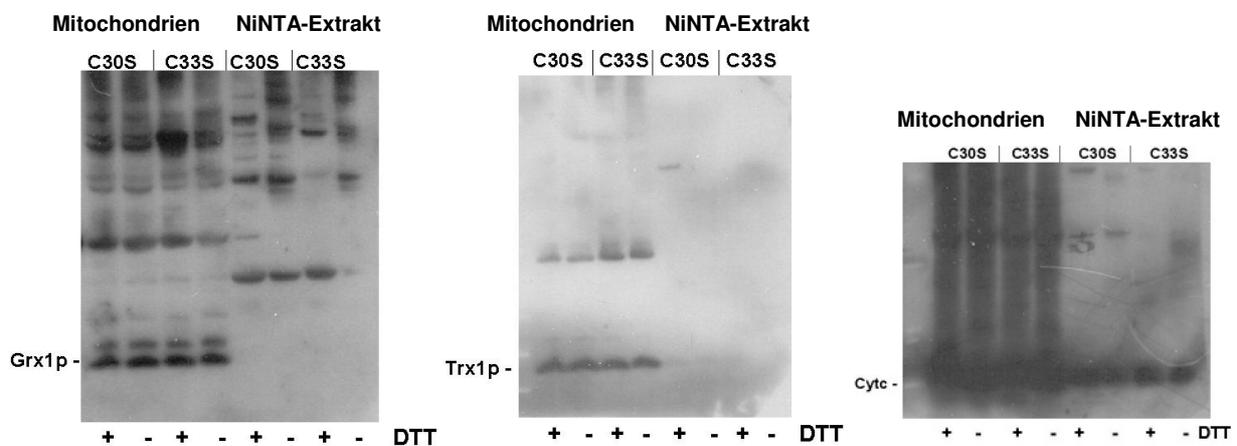


Abb. 15b: Die Substratsuche mit Anti-Grx1p, -Trx1p und -Cytic. Es liegen keine Substrat-Enzym-Komplexe vor.

Bei der Erv1p-Mutante C33S findet sich ein spezifisches Signal unter reduzierenden Bedingungen. Sod1p ist mit der Proteinlösung der Erv1p-Mutante aufgereinigt worden. Bei nicht-reduzierenden Bedingungen findet sich eine 40 kDa Proteinbanden. Sie besteht aus dem Sod1p (Substrat) und der Erv1p-Mutante (Enzym). Bei allen anderen untersuchten Antikörpern fehlen die charakteristischen Signalmuster des Substrat – Enzym-Komplexes.

Kapitel II: Das Homologe Erv1p der Säuger (Alrp)

A. Genkonstrukte

1. Herstellung der Fusionskonstrukte

Für die Lokalisation des Alrp in Säugerzellen wurden verschiedene Konstrukte von *ALR* in einem *GFP*-Vektor hergestellt und in verschiedene Zellkulturlinien transfektiert. In der Gensequenz des Homologen Erv1p der Säuger (Alrp) finden sich drei ATG, die mögliche Translations-Startstellen darstellen. Es soll untersucht werden, ob daraus Proteine resultieren. Die möglichen Alrp-Varianten sollen in der Zelle lokalisiert und ihnen mögliche Funktionen zugeordnet werden.

Die möglichen Konstrukte des *ALR* und die Proteine:

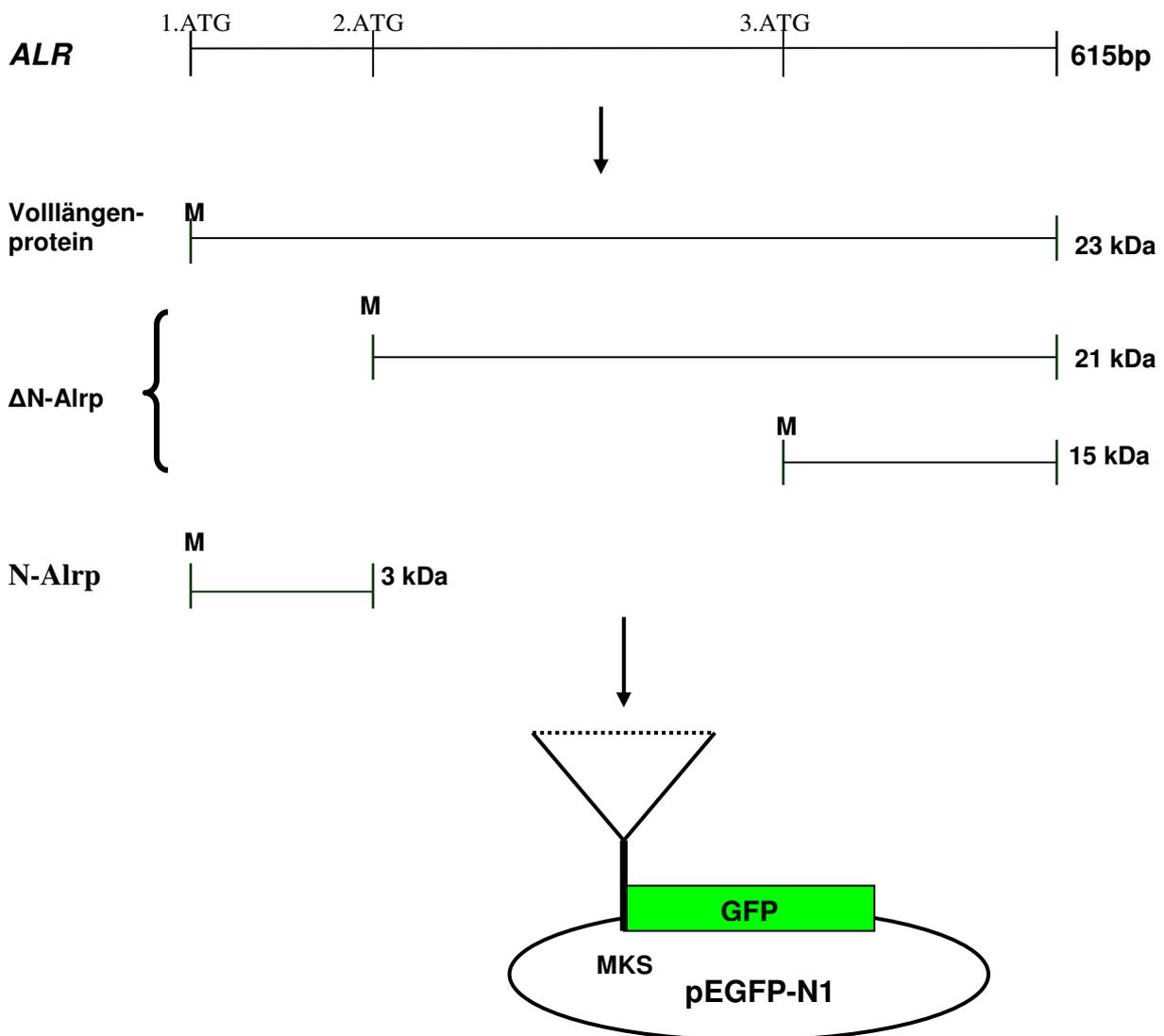


Abb. 16: Schema zur Herstellung der *ALR*-GFP Konstrukte.

Alle Konstrukte von *ALR* für das Volllängen-Alrp, die zwei N-terminal-deletierten Varianten und das 25 Aminosäure lange N-Alrp wurden in unabhängigen Experimenten in die Mehrfachklonierungsstelle (MKS) des verwendeten Vektors pEGFP-N1 kloniert.

Mit speziellen Primern wurden mittels PCR von der cDNA Sequenz des Alrp im pEGFP-N1-Vektor neue Fusionskonstrukte hergestellt.

Die Vektoren beinhalten die entsprechenden Genkombinationen für die Fusionsproteine:

Die Volllängenform von Alrp:	ergibt das 23kDa Alrp + 30kDa GFP Fusionsprotein.
Δ N-Alrp:	ergibt das 21kDa Alrp + 30kDa GFP Fusionsprotein.
Δ N-Alrp:	ergibt das 15kDa Alrp + 30kDa GFP Fusionsprotein.
Das N-Alrp:	ergibt das 3kDa Alrp + 30kDa GFP Fusionsprotein.
Die ALR+STOP Form:	ergibt das 23kDa native Alrp.

Die neuen Vektoren mit den humanen *ALR*-Konstrukten wurden in Zellkulturen transfektiert. Sie wurden für Lokalisationsexperimente von Alrp in der Zelle verwendet und lieferten die nachfolgenden Ergebnisse.

2. Expression der *ALR-GFP*-Fusionskonstrukte in Zellkulturen

Hier werden die Western Analysen zur Expression der *ALR-GFP*-Konstrukte vorgestellt, die aus den Arbeiten mit HepG2 Zellkulturzellen resultierten.

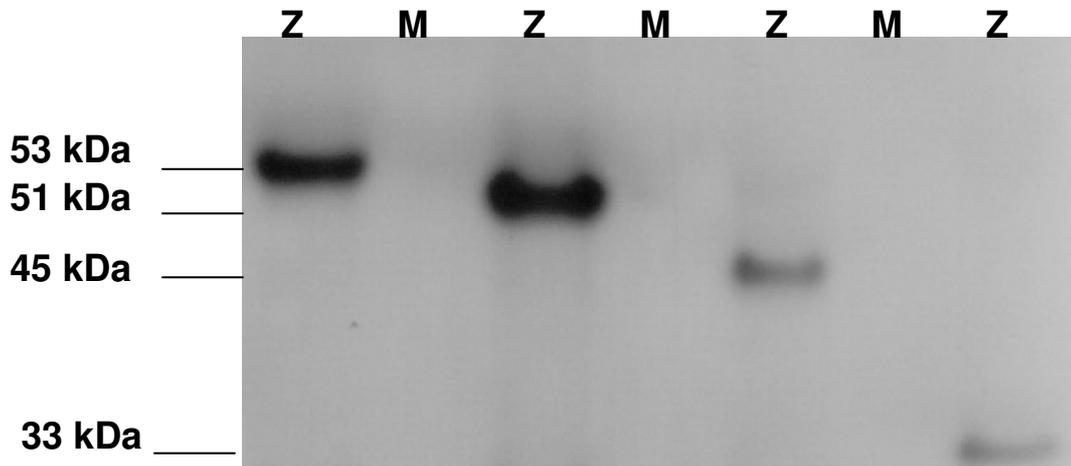


Abb. 17: Expression der verschiedenen *ALR-GFP*-Konstrukte in HepG2 Zellen.

Für die Western-Analyse wurde der Gesamtproteinextrakt aus den Zellkulturen aufgetragen. Z steht für die Zellysate und M für das Medium, indem die Zellen kultiviert wurden. Links sind die Molekularmassen der Alrp-Varianten aufgeführt. Sie resultieren aus der Addition von GFP-Anteil und Alrp-Variante. Nachweis wird mit Anti-GFP gemacht.

Man erkennt die vier verschiedenen Formen von Alrp-GFP in der Western Analyse. Je transfektiertes Konstrukt wird in HepG2-Zellen ein entsprechendes Protein synthetisiert. Es treten keine weiteren Translationsprodukte auf. Die Expression der *ALR-GFP*-Plasmide ist unter den Bedingungen der verschiedenen Transfektionsraten konstruktabhängig. So erkennt man, dass die 53 kDa und die 51 kDa-Form am meisten, die 45 kDa und die 33 kDa Form am wenigsten gebildet werden.

Die Transfektionsuntersuchungen der vier Konstrukte lieferten keine eindeutige Aussage. Die transfektierten Zellen sind durch eine starke Expression der Fusions-Produkte gekennzeichnet und zeigen fehlerhafte Lokalisationen. Deshalb sollten weitere Untersuchungen Auskunft über die Fusionsprodukte liefern.

3. Expression der nativen Alrp-Form in Zellkulturen

Hier werden die Western-Analysen des nativen Alrp vorgestellt, die aus den Zellkulturarbeiten mit HepG2 resultierten. Die transfektierten Zellkulturen wurden über mehrere Tage inkubiert.

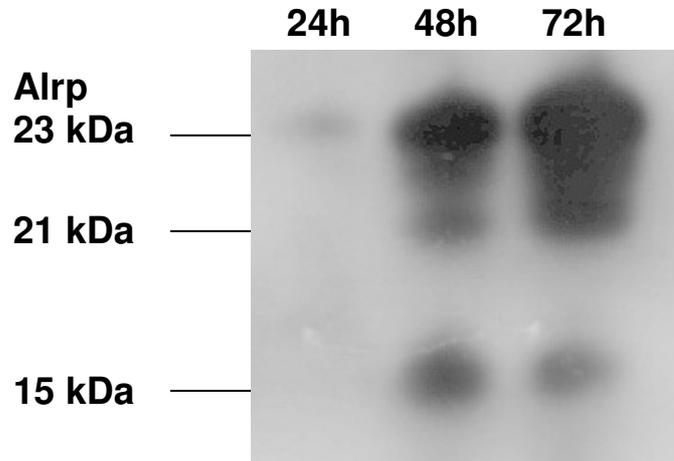


Abb. 18: Die Western-Analyse des nativen Alrp unter veränderten Kulturbedingungen.

Die Gesamtproteinextrakte von HepG2 Zellkulturen wurden nach der Transfektion der Vollängenform von ALR im 24stündigen Rhythmus geerntet und untersucht. Getestet wurde mit Anti-huAlrp als Primärantikörper.

Durch das *ALR+STOP*-Konstrukt werden drei verschieden lange Formen des Alrp expemiert und in den HepG2-Zellen identifiziert. Der Regulationsvorgang für Alrp in den Zellen kann eingegrenzt werden. Die Befunde deuten auf differentielle Translation hin.

Es ist nicht möglich, über das *in vitro*-System der Zellkulturen auf den biologischen Sinn des Alrp in der Zelle zu schlussfolgern. Es bestehen komplizierte Wechselwirkungen zwischen den Zelltypen der Kulturen, den Konstrukten und den Bedingungen der Anzuchten (Zeitdauer, Serumentzug).

B. Fraktionierungen

Zur Lokalisation des Alrp in der Zelle wurden Mitochondrienisolationen aus der Leber von Maus und Ratte angefertigt. Die Fraktionierungsschritte sollten Auskünfte über die subzelluläre Lokalisation des Alrp in den Zellen von Geweben geben.

1. Mitochondrienisolation aus Maus-Leber

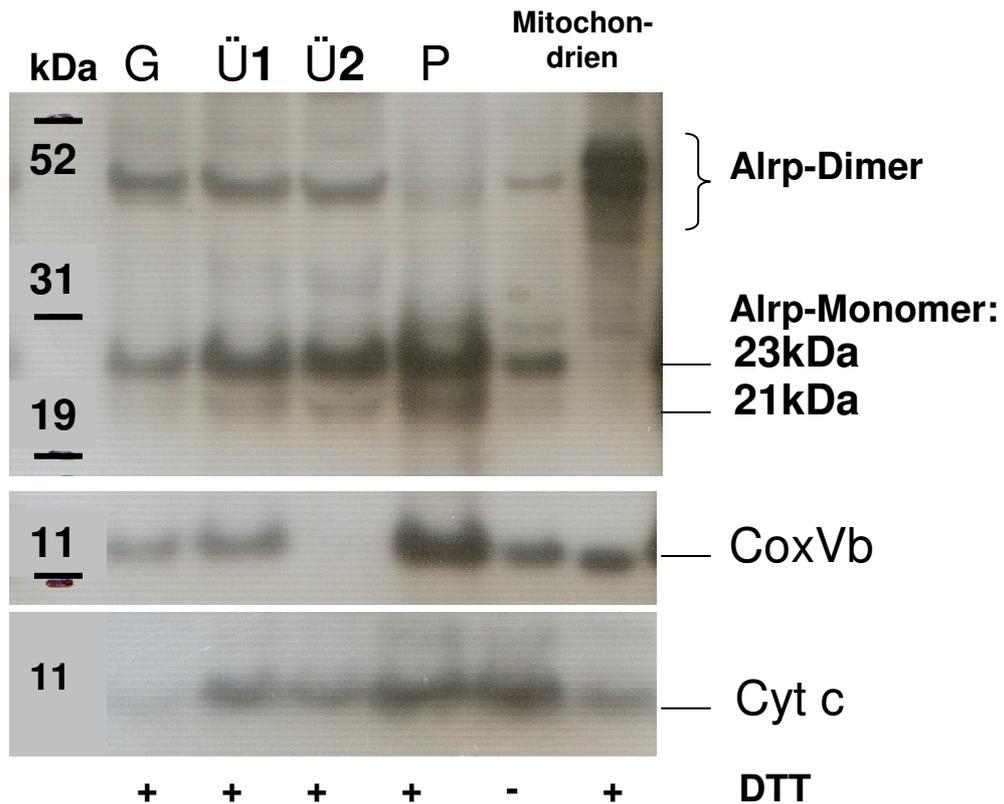


Abb. 19: Die Western Analyse verschiedener Fraktionen einer Mitochondrienisolation aus Leber von Maus. Die Proteinlysate wurden verdünnt aufgetragen und mit dem Antikörper gegen Alrp, CoxVb und Cytochrom c getestet. Die Abkürzungen bedeuten: Gesamtlysat (G), Überstand (Ü1 und Ü2) nach den Zentrifugationen und das Pellet (P), dass die Mitochondrienfraktion enthält.

Alrp konnte in den Mitochondrienfraktionen des Lebergewebes von Maus lokalisiert werden. Es kommt dort mit der 23 kDa und 21 kDa Variante von Alrp vor. Die Mitochondrienfraktionen zeigen das Monomer und das Dimer der Alrp-Varianten. Das Shiften des Alrp durch die Verwendung des DTT dient als ein Beweis für den Nachweis von Alrp.

CoxVb und Cytochrom c wurden als Kontrollen für die Aufreinigung über die Fraktionen benutzt. CoxVb ist ein Bestandteil der inneren Mitochondrienmembran und dient hier für die Identifikation der Assoziation von Proteinen mit den Mitochondrien. Cytochrom c ist ein

3. Zusammenstellung: Serum, Zytoplasma und Kontrollen

Hier wird die Expression von Alrp während der Leberregeneration im Zytoplasma von aufgeschlossenen Zellen und in der Serumfraktion des Blutes zu unterschiedlichen Zeiten dargestellt. Zur Kontrolle wird mit bekannten Antikörpern getestet.

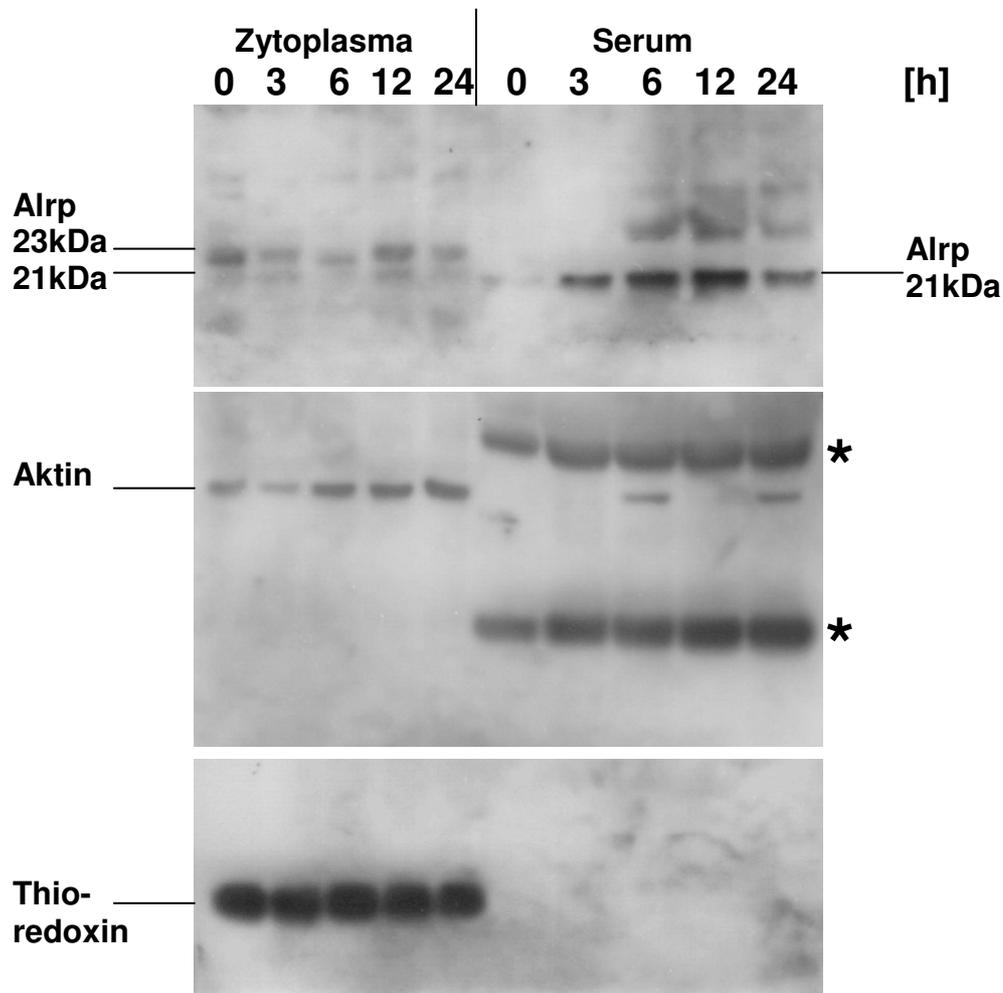


Abb. 21: Die Serumfraktion aus Blut und die cytoplasmatische Fraktion aus aufgeschlossenen Zellen von unterschiedlich lange regenerierenden Rattenlebern.

Der Nachweis wurde mit Anti-Alrp gemacht. Zur Kontrolle sind die Filter mit Anti-Aktin und Anti-Thioredoxin getestet worden. Das Sternchen* markiert die unspezifischen Reaktionen des Sekundärantikörpers mit IgG des Serums.

Nachweis der 23 kDa und 21 kDa Varianten des Alrp im Zytoplasma. Über den Zeitraum der Regeneration wird im Zytoplasma kein gleichmäßiger Nachweis beider Alrp Varianten gefunden. Nachweis von Alrp im Serum. Im Serum wird die 21 kDa Variante von Alrp erkennbar. Der Thioredoxin Antikörper markiert die zytoplasmatischen Fraktionen und findet sich nicht im Serum. Aktin findet sich im Zytoplasma, nicht im Serum. Thioredoxin ist ein lösliches zytoplasmatisches Protein und ein Nachweis für Zellstress oder Zellschädigung. Mit dem Antikörper kann getestet werden, ob ein Alrp Nachweis im Serum durch Zellinhalt

verursacht wird. Ein Indiz für eine gute Präparation ist der Test mit Aktin. Es ist ein Zellbestandteil und darf nicht im Serum auftreten.

C. Exkretion von Alrp

1. Exkretion der Volllängenform von Alrp in Zellkulturen unter Langzeitkulturbedingungen

Die HepG2 Zellen wurden über einen Zeitraum von 72 Stunden nach der Transfektion mit dem ALR+STOP-Vektor kultiviert. Es wurden Zellysate und Medien im Western-Blot analysiert und mit verschiedenen Antikörpern getestet. Das 72h Medium wurde eingeeengt. Die Untersuchung des Mediums sollte Auskunft geben, ob Alrp aus der Zelle exkretiert wird.

Zur Kontrolle dient Hsp70. Es ist ein lösliches Protein im Zytoplasma der Zellen. Es ist in großen Mengen in der Zelle nachweisbar und sollte Auskunft darüber geben, ob dass gefundene Alrp exkretiert wird oder ob es durch Zellyse ins Medium gelangte.

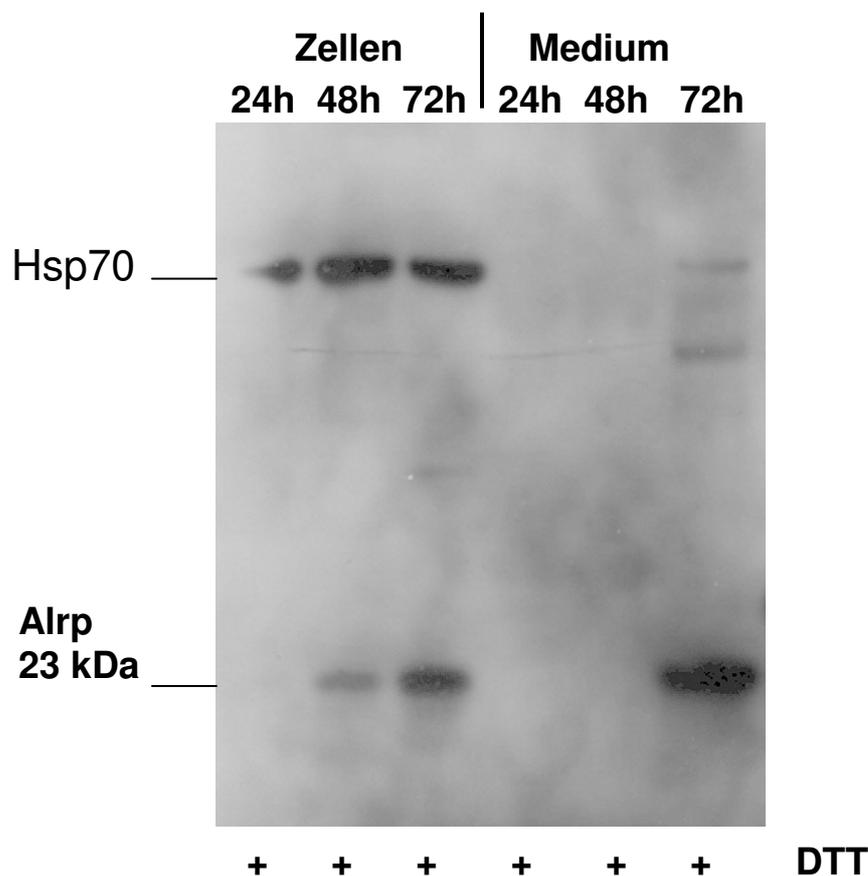


Abb. 22: Exkretion der Volllängenform von Alrp (23 kDa) in HepG2 Zellkulturen unter längeren Kulturzeiträumen zwischen 24h bis 72h.

Es wurden Zellysate und die Kulturmedien untersucht. Aliquots der Zellen wurden alle 24h geerntet. Die Antikörper für einen Nachweis waren Anti-Alrp und Anti-Hsp70.

Unter diesen Versuchsbedingungen wird die 23 kDa Form von Alrp im Zellysat nachgewiesen. Das Auftreten der Alrp Banden im Nährmedium basiert hier nicht auf

unspezifischem Zellsterben. Es ist ein aktiver Vorgang der Zellen, andernfalls müsste im Medium Hsp70 in höheren Konzentrationen auftreten.

2. Exkretion des nativen Alrp in Zellkulturen unter Langzeitkulturbedingungen

Die Exkretion wurden hier unter Langzeitkulturbedingungen untersucht. Es sollte untersucht werden, ob das GFP-Konstrukt eine Auswirkung auf die Translation in der Zelle hat. Die Zellkulturen wurden über einen längeren Zeitraum untersucht und alle 24 Stunden geerntet. Analysiert wurden die Zellysate und die Medienüberstände.

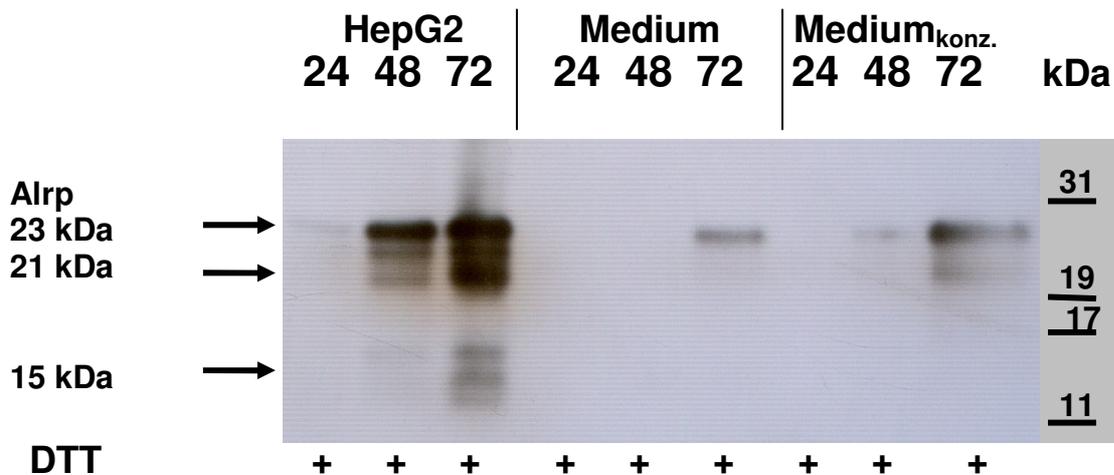


Abb. 23: Exkretion der nativen Alrp Varianten.

Die Western Blot Analyse zeigt Alrp-Varianten in Zellkulturen, die von 24h bis 72h kultiviert wurden. Das Zellysat, das Nährmedium und das konzentrierte Medium wurden untersucht. Der Nachweis wird mit Anti-GFP gemacht. Das Nährmedium aus den Zellysaten ist 20fach konzentriert.

Unter diesen Versuchsbedingungen können alle drei Varianten von Alrp nachgewiesen werden. Die Konzentration der Proteine steigt über den Kultivierungszeitraum an und ist im aufkonzentrierten Nährmedium nachweisbar.

3. Zusammenstellung: Exkretion des nativen Alrp unter serumfreien Bedingungen

Die Zellkulturen wurden mit serumfreiem Nährmedium kultiviert. Die HepG2-Zellen wurden mit dem Volllängenkonstrukt von *ALR* transfektiert, kultiviert und analysiert. Serumfreies Medium wurde verwendet, um auszuschließen, dass die Zellen Alrp aus Gründen der zu guten Nährstoffversorgung produzieren. Die Zellen sollten durch den Serumentzug in eine Form von Stress versetzt werden.

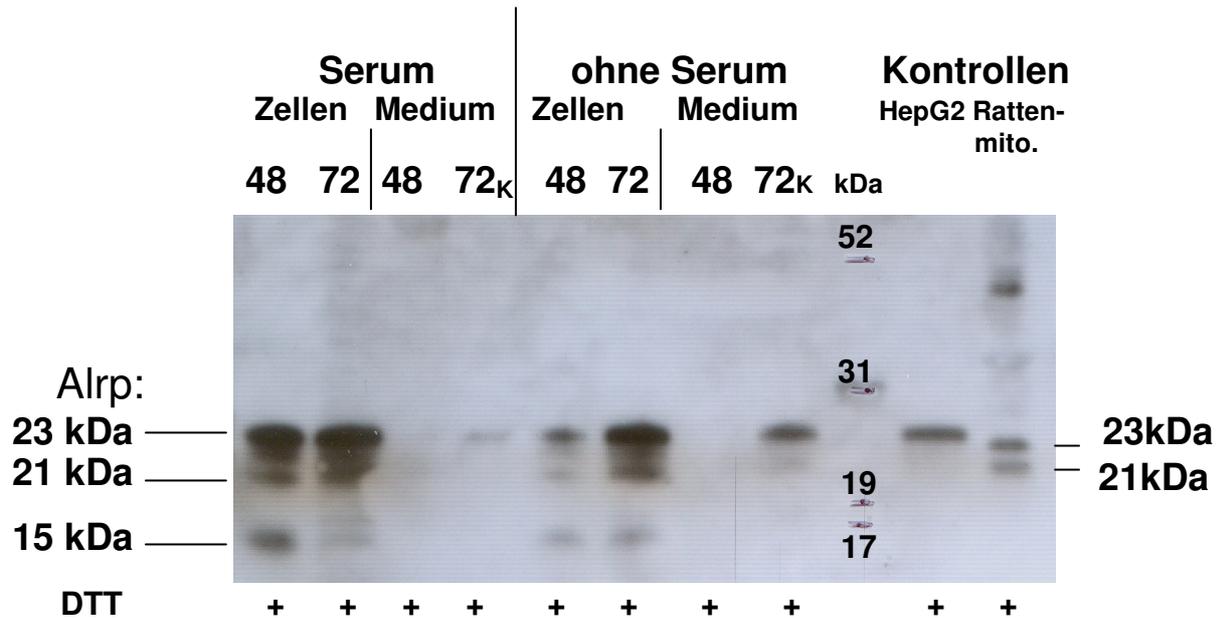


Abb. 24: Die Zusammenstellung zeigt das expremierte Alrp in Zellkultur unter serumfreien Bedingungen und die Kontrollen.

Die Zellen wurden mit dem *ALR+STOP*-Konstrukt transfektiert und bis zu 72 h kultiviert. Die 72 h Medium-Probe wurde 20fach konzentriert (K). Es wurde mit serumfreiem und serumhaltigen Medium kultiviert. Als Kontrollen wurden Mitochondrien aus Rattenleber und das native Alrp aus humanen HepG2-Zellen verwendet (Anti-Alrp).

Es besteht kein Unterschied bei der Verwendung von serumfreiem oder serumhaltigen Medium für die Expression des Alrp in HepG2-Zellen. Nachweis von Alrp in HepG2 Zellen und von Alrp in den konzentrierten Mediumproben. Zur Identifikation des Alrp dienen hier Mitochondrienfraktionen und die 23 kDa Alrp-Variante aus HepG2 Zellen. Die Tests wurden in neun unabhängigen Versuchen wiederholt und reproduziert.

D. Zellkulturen

1. Verschiedene Zelltypen im Vergleich

Hier wurden verschiedene Zellkulturlinien wie *Cos.7*, HepG2, H42-E, Primäre Hepatocyten oder 143-B Zellen miteinander verglichen. Es sollte untersucht werden, welche Alrp-Varianten expremiert werden. Dazu wurden die Zellkulturen mit dem *ALR+STOP*-Konstrukt unter Verwendung verschiedener Transfektionsmethoden transfektiert.

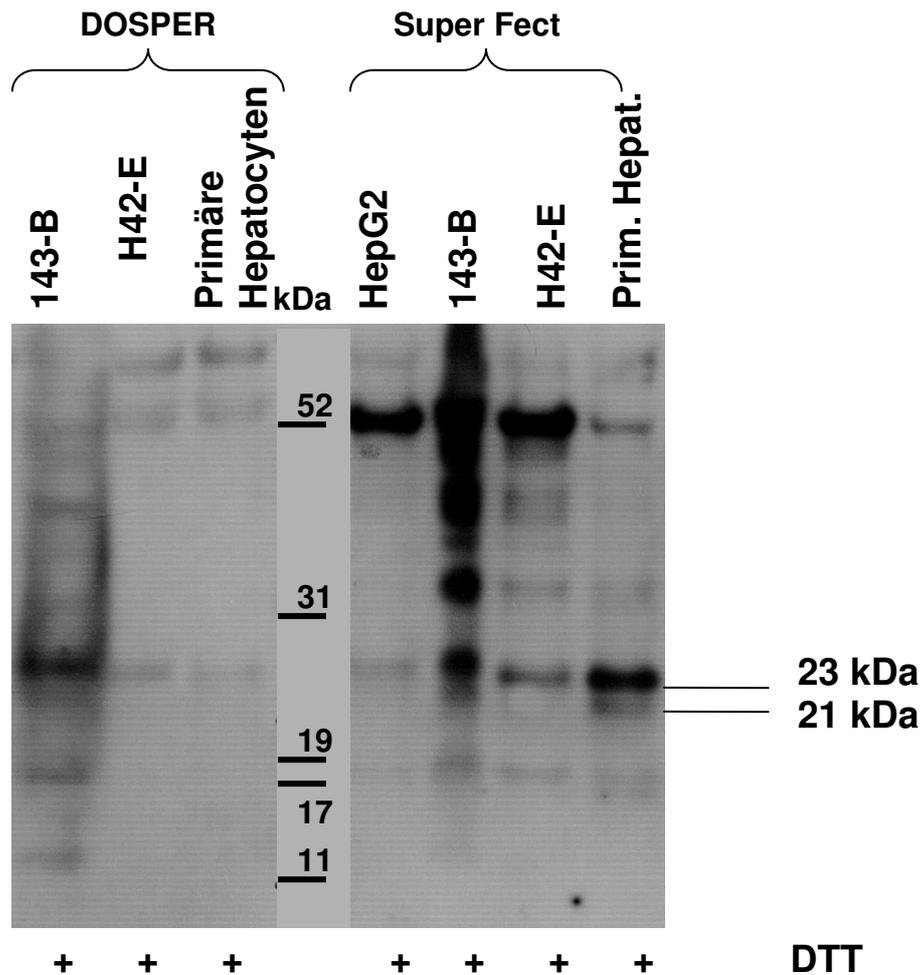


Abb. 25: Zusammenstellung verschiedener Zelltypen und Transfektionsmethoden.

Es wurde sechsmal mit der DOSPER-Methode und je dreimal mit der Effekten- und Super Fect-Methode transfektiert. Der Nachweis wird mit Anti-Alrp gemacht.

Der Test mit verschiedenen Transfektionsmethoden und derselben Menge Alrp ergibt, dass alle Zellkulturen transfektierbar und alle Methoden verwendbar sind.

In der nachfolgenden Tabelle 21 wird zusammengestellt, welche Alrp-Varianten nach der Transfektion in verschiedenen Zelltypen nach ca. 24h gefunden werden.

Tabelle 21: Die Zelltypen mit den exprimierten Alrp-Varianten. Die Zellkulturen wurden nach 24 Stunden geerntet und untersucht.

Zellkulturen	ALR Konstrukte	Protein Variante	mittlere Transfektionsrate in %
Primäre Hepatocyten	2	23 kDa	13,4 %
		21 kDa	
143 B	2	23 kDa	44,0 %
		(21 kDa)	
HepG2	1	23 kDa	13,4 %
H42-E	1	23 kDa	11,4 %
Cos.7	1	23 kDa	70,0 %
		21 kDa	
		15 kDa	

Es werden in verschiedenen Zelltypen verschiedene Varianten des Alrp gebildet. Es entstehen immer kürzere Produkte. Zur Diskussion stehen deshalb eine Regulation über differentielle Translation oder Protein-Prozessing. Hier können alle Speiß-Prozesse ausgeschlossen werden, da für die Transfektionen die cDNA benutzt wurde.

2. Leberzelllinien: HSC

Die Leber wird aus unterschiedlichen Zellen aufgebaut. Durchzogen von Gefäßen und Gallengängen hat sie eine komplexe Ausstattung von Zelltypen. Verschiedene Zelltypen des Lebersystems sind der Regeneration fähig. Darum wurde untersucht, ob eine differentielle Darstellung verschiedener Zelltypen einen Aufschluss geben kann über das Auftreten von Alrp in der Leber. In ersten Untersuchungen wurden SEC (Sinus Endothelzellen), HSC (Hepatische Lebersternzellen) und KC (Kupffersche-Zellen) untersucht. Nur in HSC-Zellen wurde Alrp nachgewiesen. Der spezielle HSC Leberzelltyp wurde als Zeitreihe weiter untersucht. Die Zellen wurden über einen Zeitraum zwischen 1 bis 28 Tage kultiviert. Das Zelllysate wurde mit Anti-Thioredoxin und Anti-Alrp analysiert.

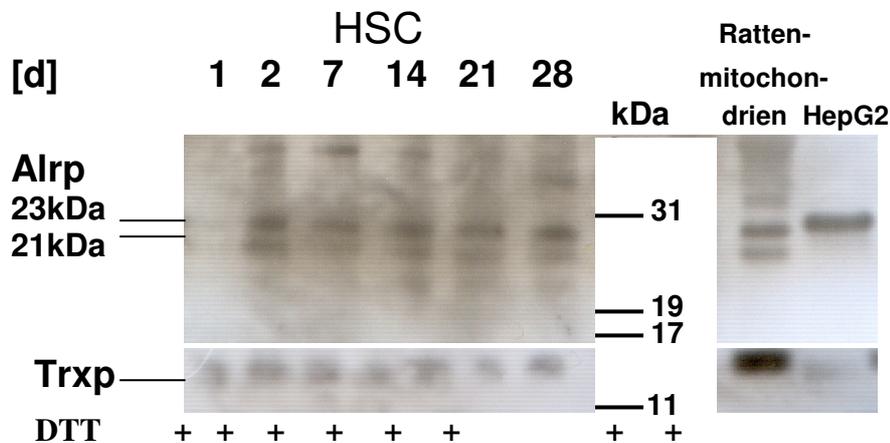


Abb. 26: Spezielle Leberzelllinien in der Western-Analyse bei unterschiedlich langen Kulturbedingungen.

Zur Kontrolle sind die Mitochondrienfraktion aus Rattenleber und die 23 kDa Alrp-Variante aus humanen Zellkulturen aufgetragen. Nachweis wurde mit Anti-Alrp und Anti-Thioredoxin gemacht. Vom Gesamtproteinlysate wurden 30µg aufgetragen.

Die speziellen HSC Leberzellen aus Ratte zeigen die 23 kDa und 21 kDa Formen von Alrp. Über den Zeitraum der Kultivierung ist keine signifikante Konzentrationsänderung nachweisbar. Trxp kann in den HSC-Zellen mit gleichbleibender Konzentration über die Zeitreihe hinweg nachgewiesen werden.

E. GFP-Fluoreszenz transfektierter Zellkulturtypen

1. Verschiedene Alrp-Fusionsproteine im selben Zelltyp

Die *ALR-GFP*-Plasmide wurden in 143-B Zellen transfektiert, um die Lokalisation in der Zelle zu untersuchen.

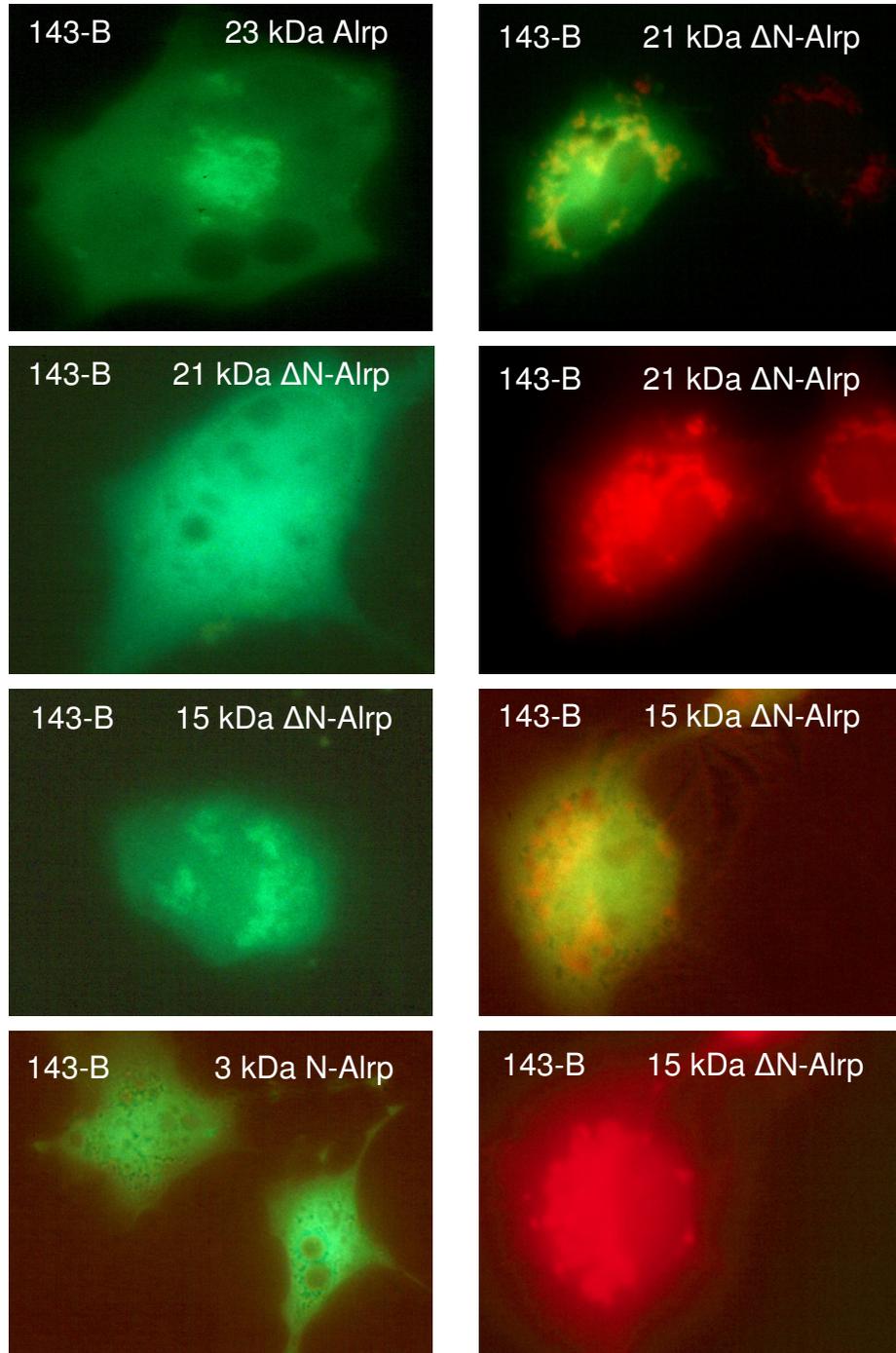


Abb. 27a: Die Fotos zeigen die fluoreszierenden Zellen des 143-B Zelltyps. Die linke Spalte zeigt die vier verschiedenen Fusionskonstrukte von Alrp-GFP in den Zellen. Die rechte Spalte zeigt Fotos der beiden N-terminal verkürzten 21 und 15 kDa Varianten von Alrp. Es wird abwechselnd die grüne GFP-Fluoreszenz und die rote MitoTracer-Fluoreszenz gezeigt.

Die 23 kDa und 15 kDa Alrp-Varianten markieren hauptsächlich mitochondrial und kernnah. Die 21 kDa Δ N- und N-Alrp Varianten markieren zytoplasmatisch und überstrahlt den ganzen Zellinnenraum.

2. Die Volllängenform von Alrp in unterschiedlichen Zelltypen

Die Volllängenform des Alrp wurde in verschiedene Zelltypen transfektiert, um mit Hilfe des GFP-Fusionsproteins die Lokalisation des Alrp in der Zelle festzustellen.

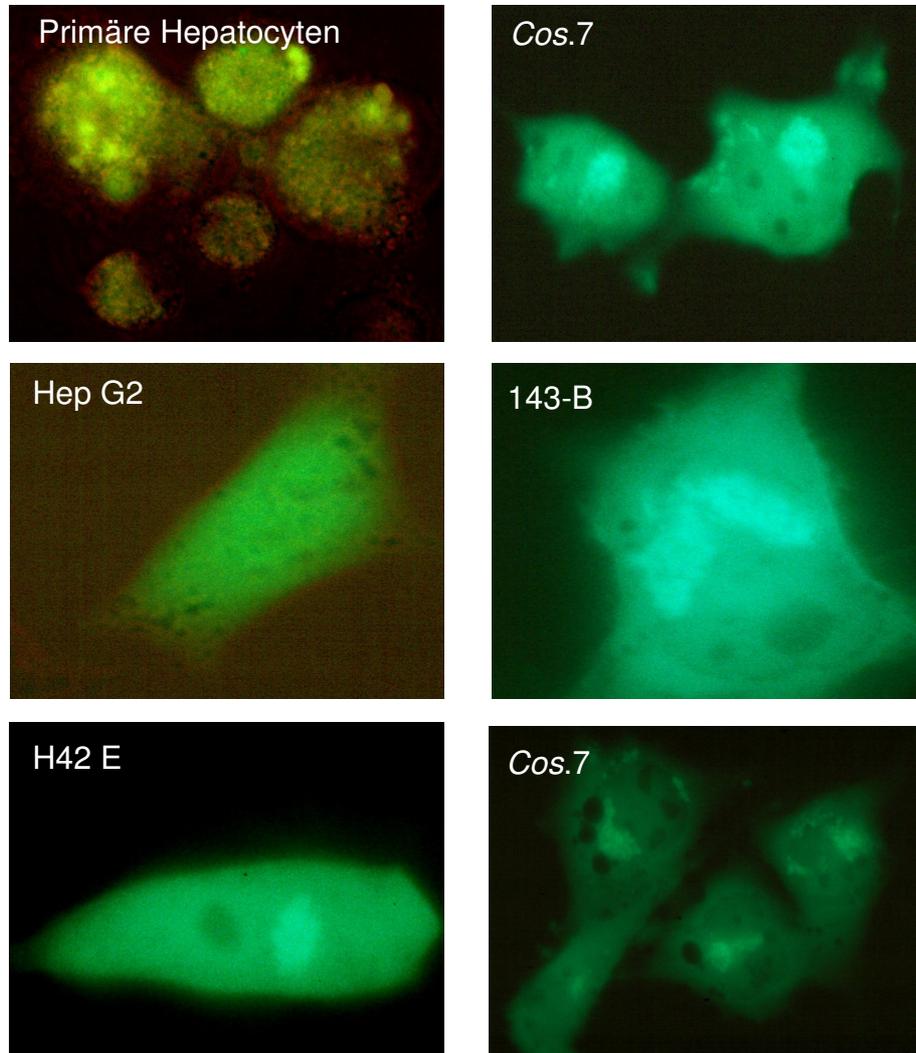


Abb. 27b: GFP-Fluoreszenz von verschiedenen Zelltypen und der Volllängenform von Alrp.

Die abgebildeten Zelltypen wurden in Western-Analysen untersucht, um Aussagen über die exprimierten Alrp-Varianten zu machen. Aufgrund des Charakters der Fluoreszenzsignale, scheinen verschiedene Lokalisationen für Alrp in der Zelle zu bestehen.

F. Alrp-Modell

Hier wird eine Zusammenfassung der Daten über Alrp in Form eines Modells vorgestellt. Es werden die beschriebenen und identifizierten subzellulären Lokalisationen der Alrp-Varianten in verschiedenen Zellen und Geweben gezeigt.

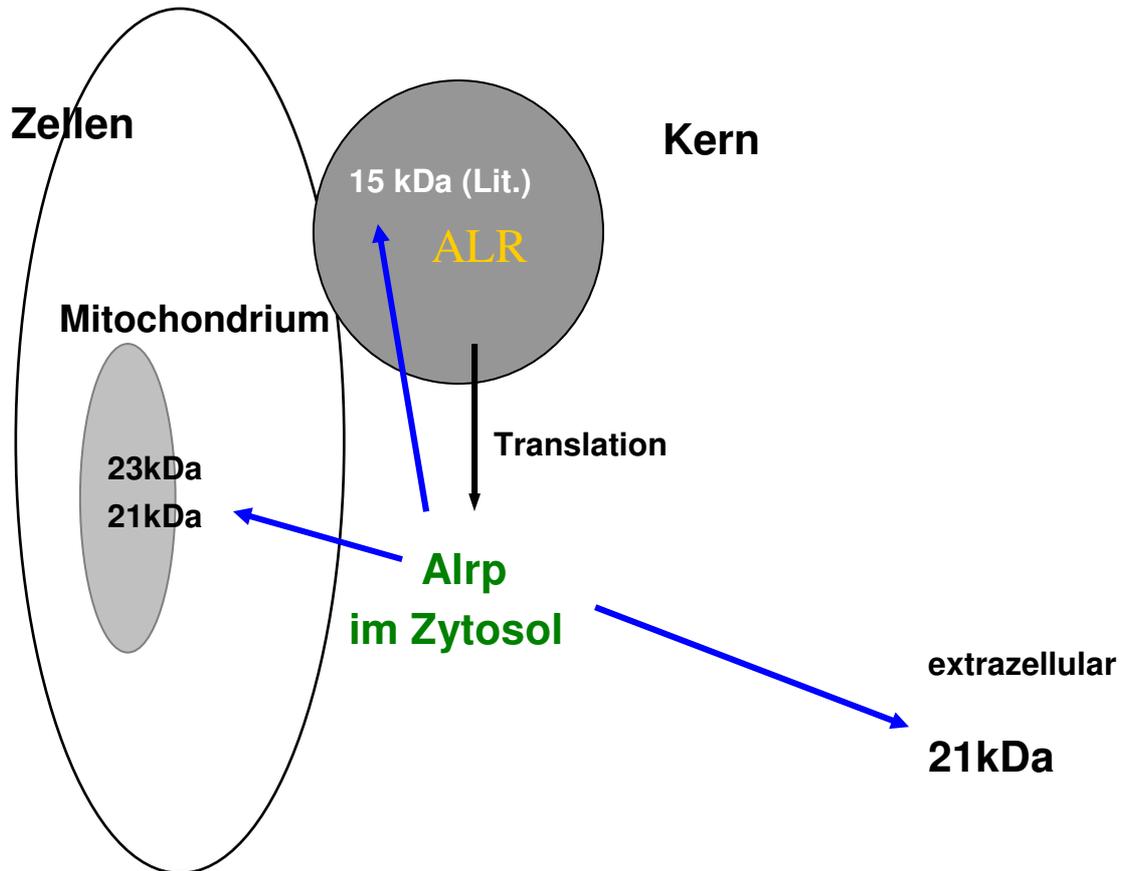


Abb. 28: Schema zur Verteilung der Alrp-Varianten in der Zelle.

G. Stabilität von Alrp

Das Auftreten verschiedener Varianten von Alrp in Herz- und Lebergewebe ermöglicht die Untersuchung zum Abbauverhalten der Alr-Proteine. Es folgen Untersuchungen zur Stabilität des Alr-Proteins.

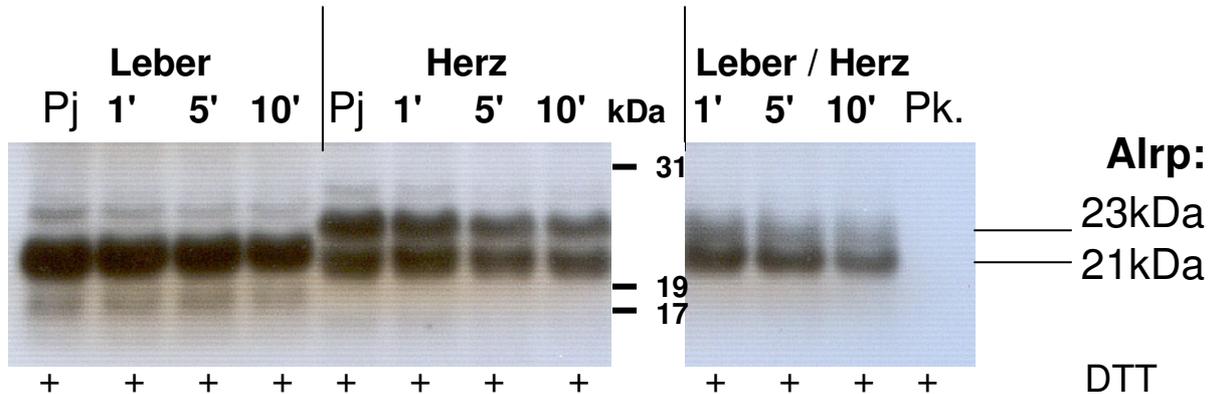


Abb. 29: Abbau der Alrp-Varianten in Gewebe von Ratte.

Herz und Lebergewebe wurden aufgeschlossen. Es wurden Leber-, Herz- und Leber/Herz-Mischproben aufgetragen. Gestoppt wurden die Abbauvorgänge mit einer 5minütigen Inkubation bei 60°C. Die Gesamtproteinanteile wurden im Western-Blot analysiert. Die Abkürzungen bedeuten: Pj ist eine Probe mit Proteaseinhibitor in Tris-Puffer; 1'-10' sind Proben, die zwischen 1min, 5min und 10min bei 37°C in PBS inkubiert wurden; Pk ist eine Probe mit Zugabe von Proteinase K. Der Nachweis wird mit Anti-Alrp gemacht.

Alrp ist durch Proteinase K vollständig abbaubar, die Proteine werden nicht spezifisch geschützt. In Leber und Herz kommen die 23 kDa und 21 kDa Varianten von Alrp vor. Die Herzformen von Alrp zeigen eine andere Molekularmasse als die Leberformen. Hier liegt ein gewebespezifischer Unterschied vor in der Expression des Alrp. In der Leber überwiegt die 23 kDa Variante. Im Herzen kann kein Unterschied in der Verteilung der beiden Alrp-Varianten gefunden werden. Durch Inkubation in PBS wird ein spezifischer oder unspezifischer Abbau nach Zellaufschluß untersucht. Dabei wurde belegt, dass es einen leichten unspezifischen Abbau zwischen 1-10 Minuten gibt. Die 15 kDa Variante wird hierbei nicht erzeugt.

H. Alrp in regenerierender Leber

1. Gewebeextrakte

Leberzellen haben während ihrer Differenzierungsphase ihre Teilungsfähigkeit nicht eingebüßt. Sie können bei Bedarf für ihre eigene Vermehrung sorgen. Nach Schädigung oder nach partieller Hepatektomie werden die Leberzellen zur Teilung stimuliert. Die Leber regeneriert. Für Untersuchungen über Alrp wurde mit den Analysen regenerierender Leberzellen die natürliche Situation *in vivo* nachvollzogen. Es wurden dabei Gesamtextrakte untersucht.

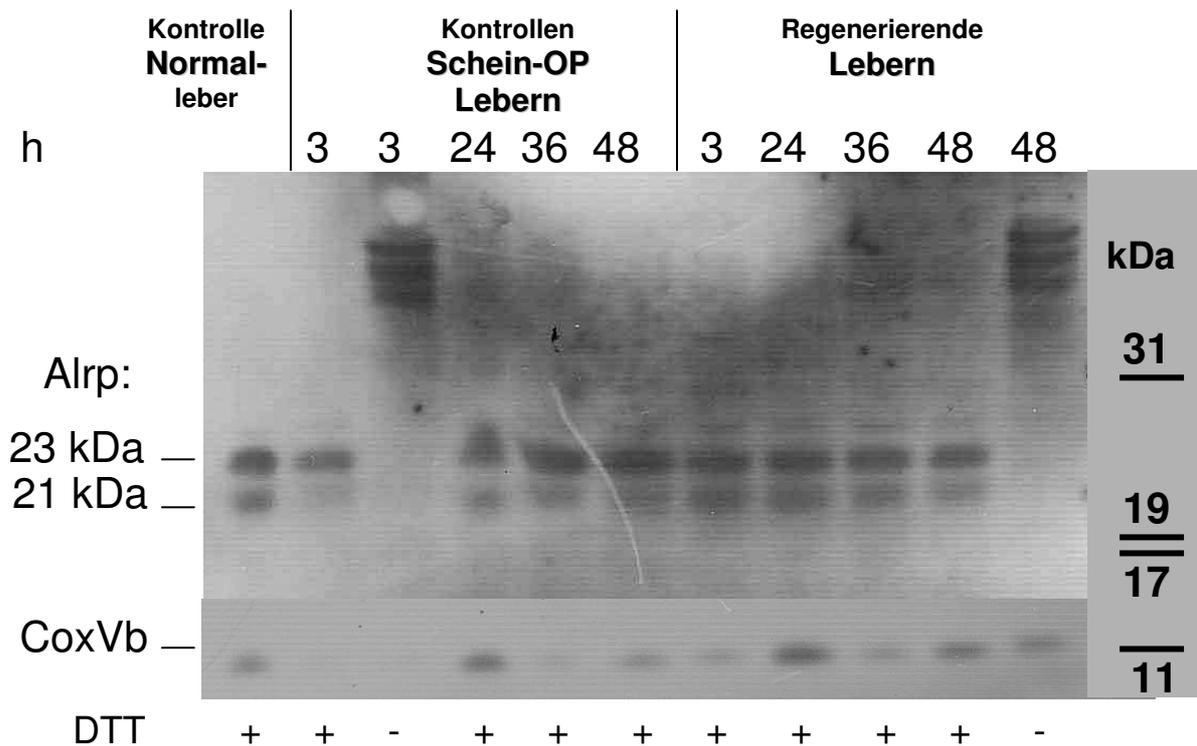


Abb. 30: Gewebeextrakte regenerierender Lebern und Kontrollratten.

Den Schein-OP Tieren wurde ein Operationsschock versetzt und identisch behandelt. Die Lebergewebsextrakte von regenerierenden Ratten stellen Tiere nach durchgeführter Hemihepatektomie dar. Die Lebern konnten noch 3 bis 48 Stunden regenerieren. Jeder untersuchte Zeitpunkt entspricht einer Ratte. Getestet wurde mit Anti-Alrp und Anti-CoxVb.

Alrp wird mit der 23 kDa und 21 kDa Variante in den Gewebeextrakten nachgewiesen. Es ist kein Unterschied zwischen den regenerierenden Tieren und den Kontrollen zu erkennen. Es ist keine signifikante Zu- oder Abnahme der Konzentration von Alrp zu erkennen. Der Test mit CoxVb zeigt, dass im Gesamtextrakt mitochondriales CoxVb nachzuweisen ist.

2. Das natürliche System der Leber - Zusammenfassung

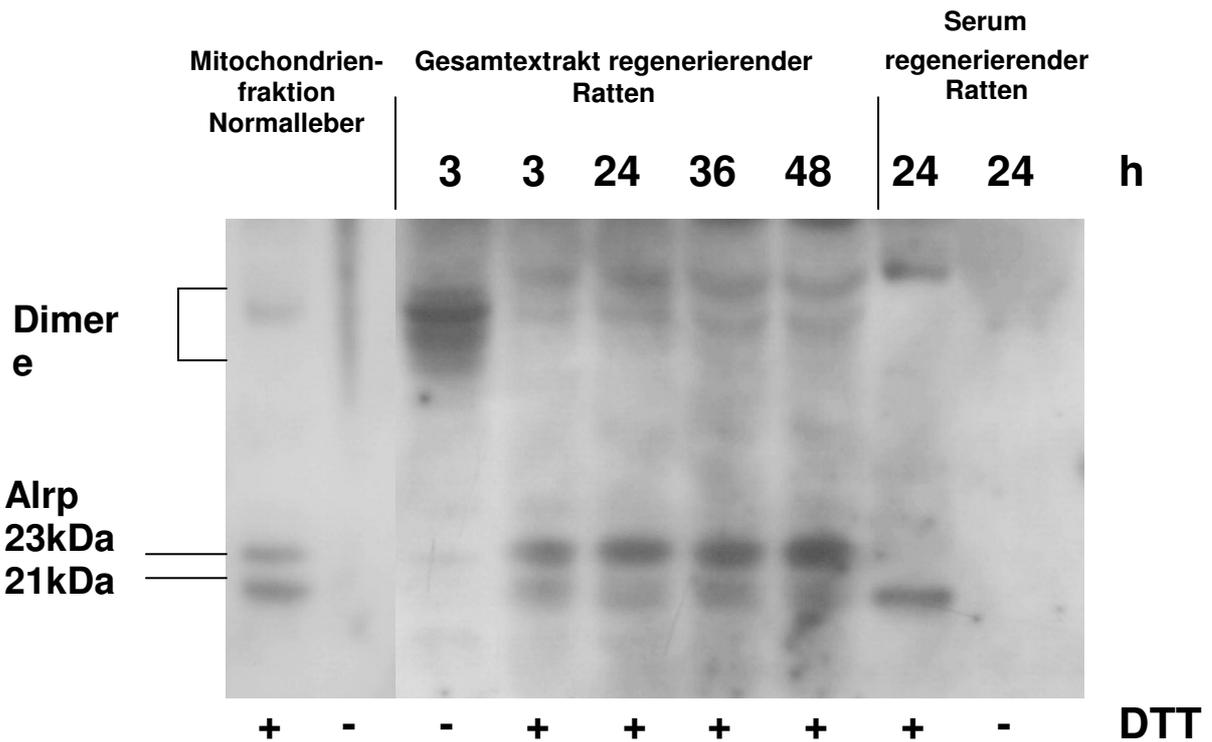


Abb. 31: Zusammenfassung der Daten über die regenerierende Leber von Ratte.

Von links nach rechts: Mitochondrienfraktionen von Normalratten, regenerierende Rattenleberextrakte und Serum aus Blut von regenerierenden Ratten. Für jede Probe war die Proteingesamtkonzentration bekannt und es wurden je untersuchte Probe 30 µg Protein aufgetragen. Untersucht wurde mit Anti-Alrp.

In der Zusammenstellung über die Rattenleber im regenerierenden Zustand kann die 23 kDa und die 21 kDa-Variante von Alrp analysiert werden. Die 21 kDa Variante von Alrp wird als einzige Variante im Serum der Ratten gefunden.

3. Das Modell der Leberschädigung durch Fibrose

Alrp ist als ein Leberfaktor beschrieben worden, der bei Regeneration vermehrt auftritt. Die Regeneration stellt eine natürliche Situation in der Leber dar, daher ist der Vergleich mit einem bekannten Krankheitsbild der Leber, der Fibrose sinnvoll, um das Expressionsverhalten von Alrp in einem kranken System zu untersuchen.

Ratten wurden mit CCl_4 (Tetrachlorkohlenstoff) über die Nahrung vergiftet. Die Vergiftung löst in der Leber in kurzer Zeit Fibrose aus.

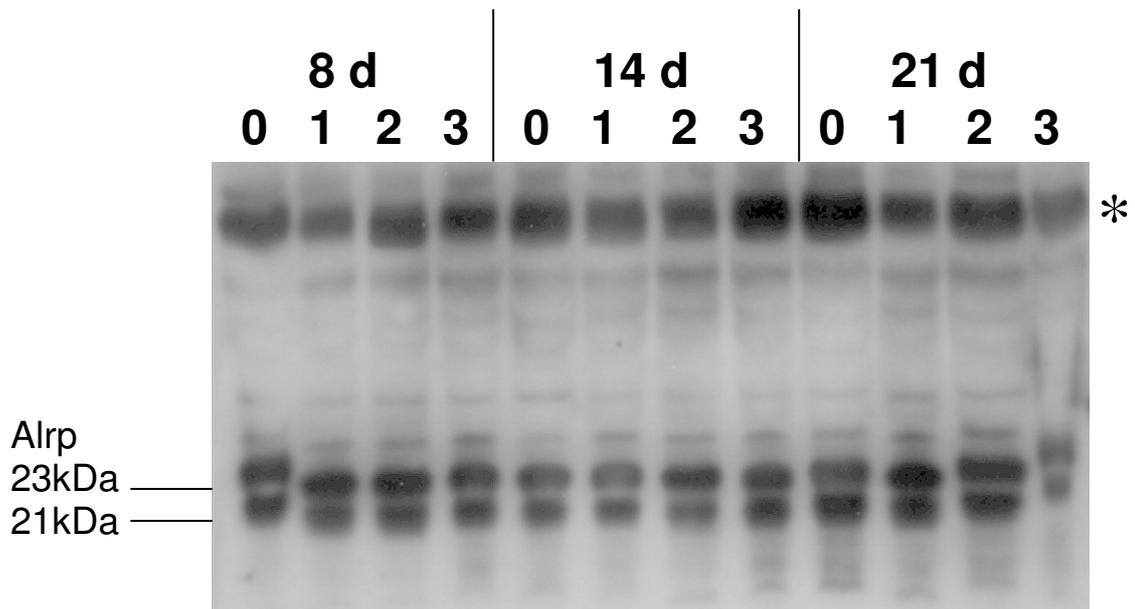


Abb. 32 : Das Fibrose-Modell mit CCl_4 .

Es wurden Gewebeextrakte von fibrösen Tieren analysiert. Die Ratten wurden nach 8, 14 und 21 Tagen der Vergiftung mit Tetrachlorkohlenstoff getötet und untersucht. Die Ziffern 0-3 geben verschiedene Tiere an. Null sind Tiere ohne Fixierungsmittel (native Lebern), 1-3 sind vergiftete Tiere. Die äußeren beiden Spuren ziehen präparationsbedingt die Banden nach. Ein * markiert eine unspezifische Bande durch den Sekundärantikörper.

Unter diesen speziellen Bedingungen der Vergiftung im Testsystem, gibt es keine signifikante Veränderungen der Expression des untersuchten Proteins Alrp. Alrp zeigt bei diesem Krankheitsbild keine Konzentrationsveränderung.

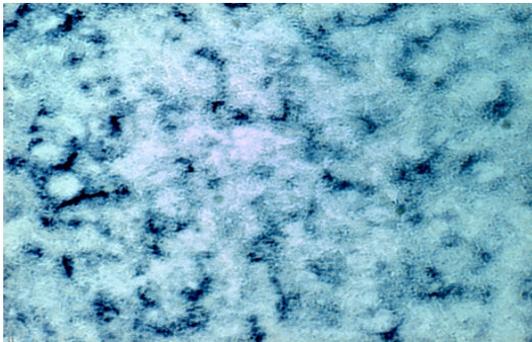
I. Immunzytochemische Untersuchungen

Die vorhergehenden Ergebnisse geben für Alrp Hinweise auf die Varianten des Alrp, aber geben keine Hinweise auf die Lokalisation von Alrp in der Leber. Die Gewebeschnitte werden im Folgenden in spezifischer Weise angesehen, indem die Zielproteine mit Antikörpern lokalisiert werden. Die Antikörper waren vorhanden und lieferten die folgenden Ergebnisse:

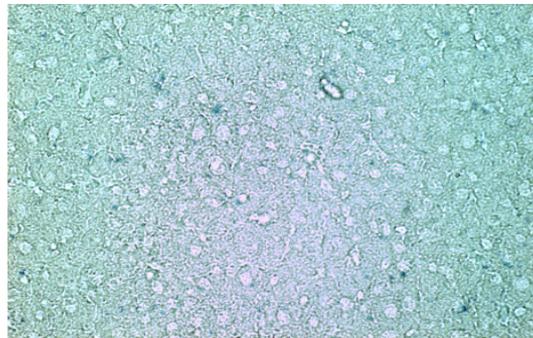
1. Video-Mikroskopie mit Nachweis über Alkalischer Phosphatase

Hier ist der Sekundärantikörper mit Alkalischer Phosphatase konjugiert.

**24h regenerierende Rattenleber,
unfixiert**



**Normalleber,
unfixiert**



**Normalleber,
fixiert**

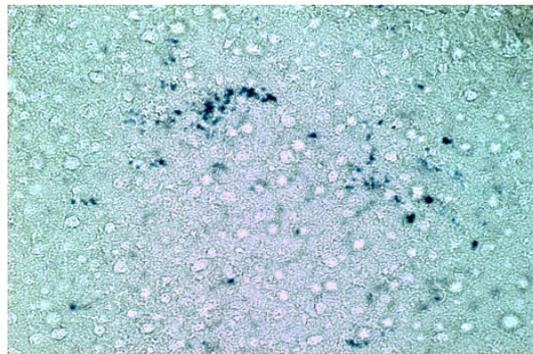


Abb. 33: Immunzytochemische Untersuchungen. An 24 h regenerierenden Rattenlebern und den Kontrollen von Normalleber wurden mit Anti-Alrp als Primärantikörper und mit Alkalischer Phosphatase als Sekundärantikörper Untersuchungen durchgeführt. Die Vergrößerung der Fotos ist 1000fach.

Das regenerierende Lebergewebe von Ratten zeigt im Vergleich mit Normallebern ein starkes Signal für Alrp. Das Signal kann nicht eindeutig lokalisiert werden.

2. Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Zielproteine in den regenerierenden Lebern der Ratten werden mit dem spezifischen Fluorochrom (CY3) des Sekundärantikörpers nachgewiesen. Alle folgenden Aufnahmen zeigen für jeden Zeitpunkt Ausschnitte aus den Lebern.

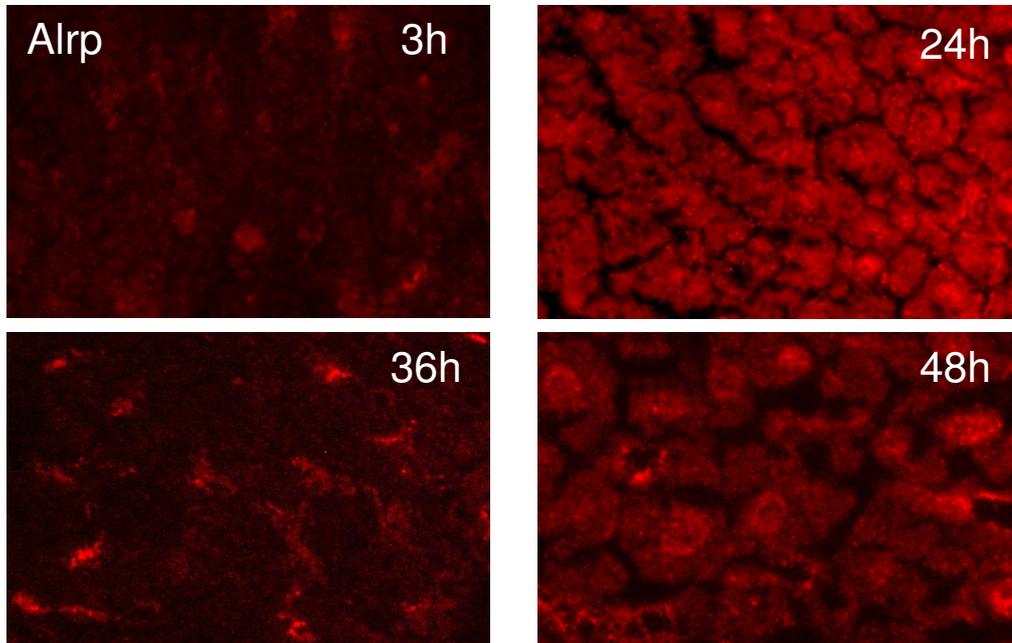


Abb. 34a: CY3-Fluoreszenz-Fotos des Alrp in regenerierender Leber von Ratten.
Der Primärantikörper war Anti-Alrp, Sekundärantikörper war Kaninchen-CY3. Die Lebern waren zwischen 3 h bis 48 h regeneriert. Die Vergrößerung der Fotos ist 1000fach.

Um Alrp eindeutig in der Leber zu lokalisieren musste mit Antikörpern gegen bekannte Zellstrukturen oder -proteine untersucht werden. Im folgenden sind die Hybridisierungen mit Anti-Porin gezeigt. Porin ist ein Außenmembranprotein der Mitochondrien.

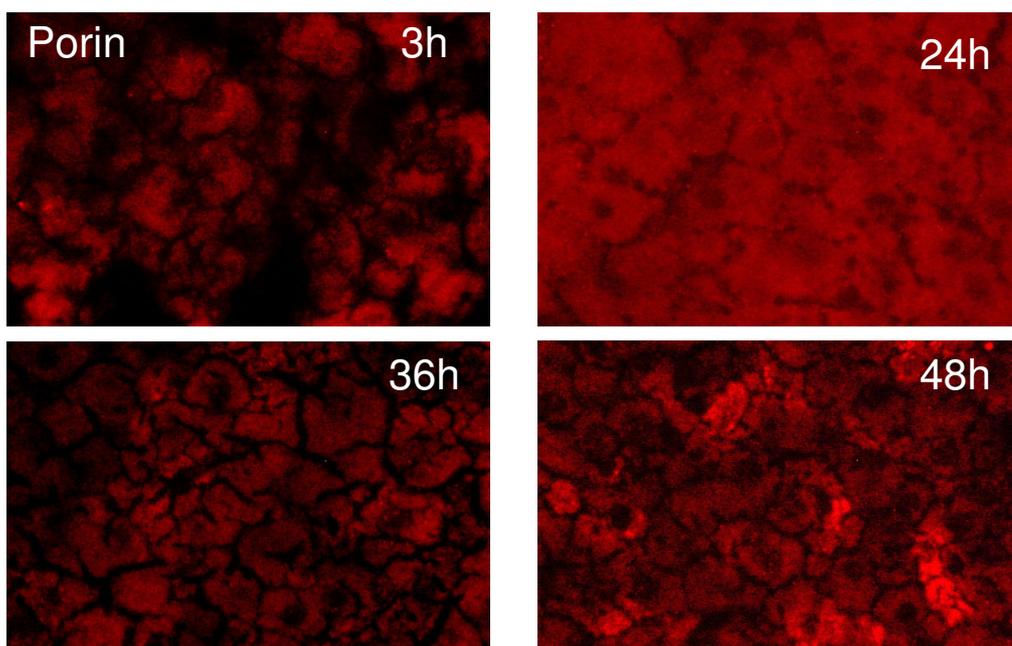


Abb. 34b: CY3-Fluoreszenz-Fotos des Porin in regenerierenden Lebern von Ratte.

Im folgenden sind die Hybridisierungen mit Anti-CoxVb gezeigt. CoxVb ist ein fester Bestandteil der inneren Mitochondrienmembran und dient hier als ein Nachweis für ein Protein der Atmungskette.

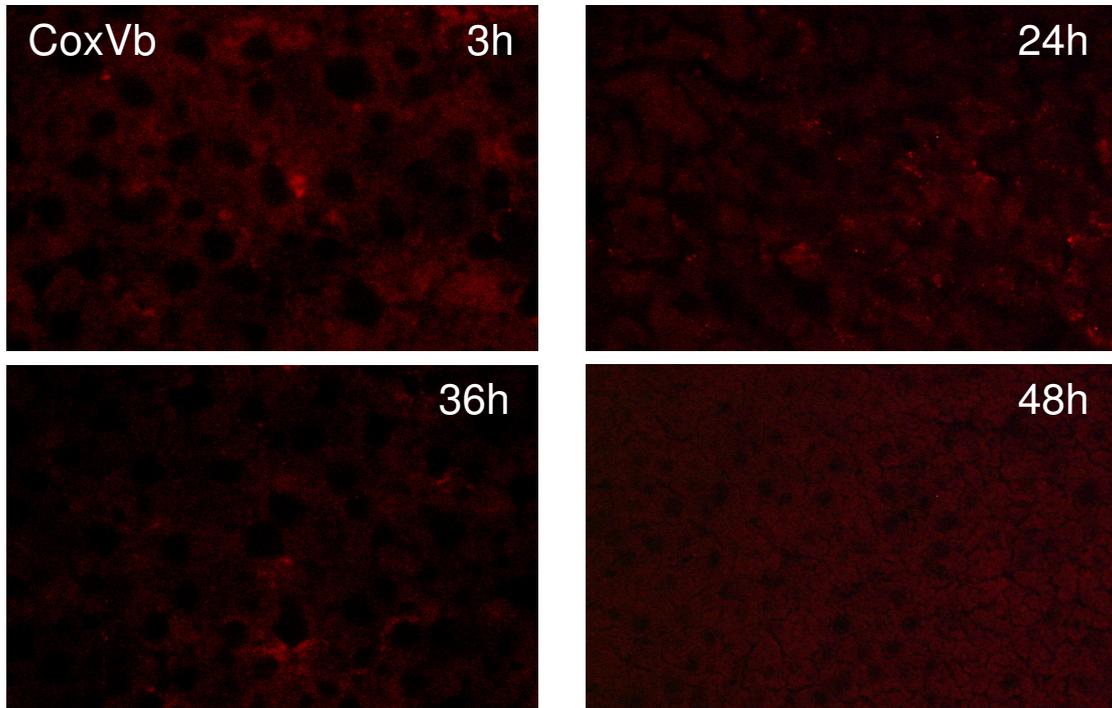


Abb. 34c: CY3-Fluoreszenz-Fotos des CoxVb in regenerierenden Lebern von Ratten.

Als **Kontrollen** für die Untersuchung dienten 24stündig regenerierende Lebern, hybridisiert mit Alrp und CY3 im Vergleich zu Schein-OP-Ratten und normalen Ratten.

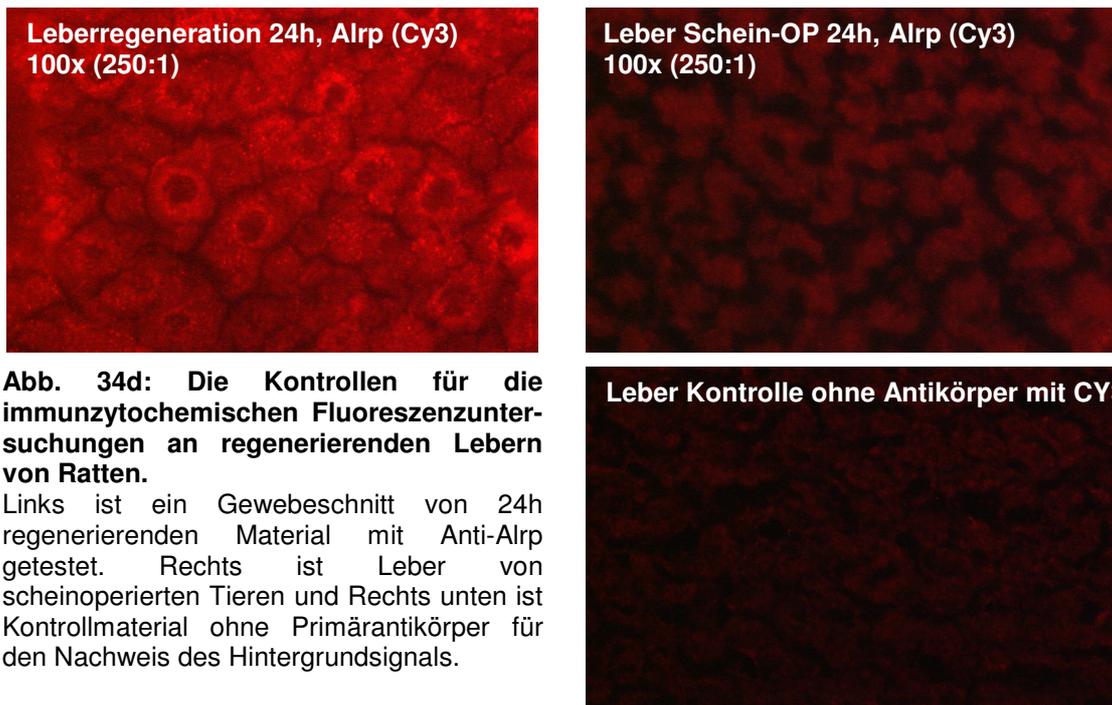


Abb. 34d: Die Kontrollen für die immunzytochemischen Fluoreszenzuntersuchungen an regenerierenden Lebern von Ratten.

Links ist ein Gewebeschnitt von 24h regenerierendem Material mit Anti-Alrp getestet. Rechts ist Leber von scheinoperierten Tieren und Rechts unten ist Kontrollmaterial ohne Primärantikörper für den Nachweis des Hintergrundsignals.

Die regenerierenden Lebern zeigen für Alrp charakteristische Signale, die die Schein-OP Tiere nie zeigen. Das Signal für Alrp in Lebergewebe zeigt eine Art Trübe für die gesamte Zellen und eine Akkumulation in den Mitochondrien. Die Signale sparen die Zellkerne aus. Das erscheint bei den 24h Lebern als eine "Loch"-Struktur. Über die verschiedenen Zeiträume der Regeneration zwischen 3h bis 48h werden immer dieselben charakteristischen Signale und Muster in den Schnitten gefunden, die Alrp hinterlässt, zu sehen in **Abb. 34a**. Typisch sind dabei die Akkumulationen und eine Delokalisation des Alrp-Signals.

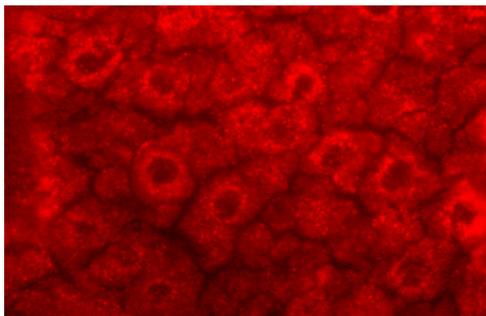


Abb. 35a: Alrp in Lebergewebe.

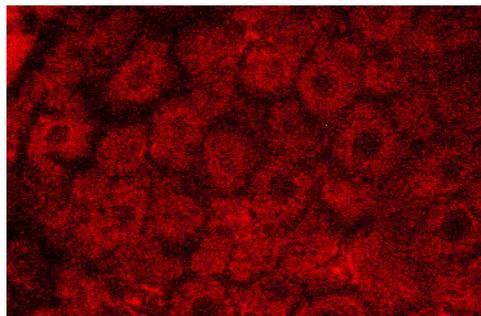


Abb. 35b: Porin in Lebergewebe: Mitochondrien.

Mit Porin werden die Mitochondrien der Leberzellen identifiziert, was in **Abb. 34b und 35b** zu sehen ist. Die Signalstärke des Porins ist über alle Zeitpunkte der Regeneration gleich und zeigt dieselbe Charakteristik. Das Signal ist nur an den Mitochondrien gebunden und lässt die Zellen klar erscheinen. Die intensiven Signalbereiche bei 48h-Porin erfasst die neugebildeten Zellen. Sie enthalten schon dieselbe Mitochondriendichte wie ausgewachsene Zellen, aufgrund des geringeren Zellvolumens erscheint das Porin-Signal intensiver.

Mit CoxVb werden die Mitochondrien der Leberzellen identifiziert. Es ist ein viel schwächeres Signal als das von Porin oder Alrp. Die "Loch"-Strukturen sind hier auch erkennbar. Das Signal des CoxVb über die verschiedenen Zeitpunkte der Regeneration ist gleich. Die Regeneration der Leber ist nicht an dem Signal des CoxVb nachvollziehbar.

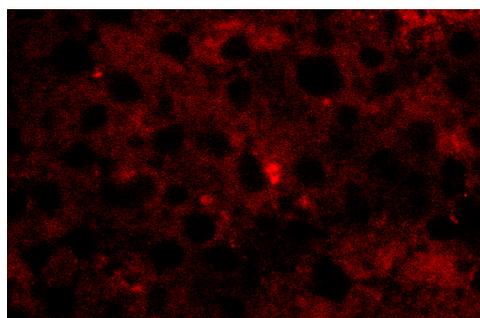


Abb. 35c: CoxVb in Lebergewebe

Die Fluoreszenz-Untersuchungen geben eine spezifischere Auskunft über die untersuchten Proteine als die Untersuchungen mit Alkalischer Phosphatase, siehe **Abb. 33**. Bei Alkalischer Phosphatase lassen sich Ja – Nein Aussagen für das Vorkommen des Alrp in Lebergewebe treffen. Eine Lokalisation ist dabei nicht möglich.

V. Diskussion

A. Erv1p aus Hefe

Die Hefe besitzt neben Erv1p eine zweite spezielle Sulphydryloxidase, die mit Erv2p bezeichnet wurde. Ihre Gen- und Proteinsequenzen konnten aufgeklärt werden (Stein und Lisowsky 1998, Lee et al. 2000). Der dabei gefundene Domänenaufbau gab Hinweise auf den funktionellen Mechanismus der Proteine. Das *ERV2*-Gen weist entfernte Homologien zum *ERV1*-Gen auf. Bei Komplementationsuntersuchungen mit den Genen konnte *ERV2* die *ERV1*-Funktionen nicht übernehmen (Stein und Lisowsky 1998). *ERV2* steht daher nicht im essentiellen Zusammenhang mit Wachstumsfunktion der Zelle. Das Protein Erv2p besitzt 196 Aminosäuren. Erv2p ist die erste Sulphydryloxidase, die in den Mikrosomen des Endoplasmatischen Retikulums gefunden wurde (Gerber et al. 2001). Trotz der verschiedenen subzellularen Lokalisation zeigen die beiden Hefeproteine funktionelle Ähnlichkeiten. Sie bilden Dimere, enthalten ein konserviertes YPCxxCA-Motiv in ihrer C-terminalen Domäne, binden FAD als Cofaktor und katalysieren die Bildung von Disulfidbrücken in Proteinsubstrate.

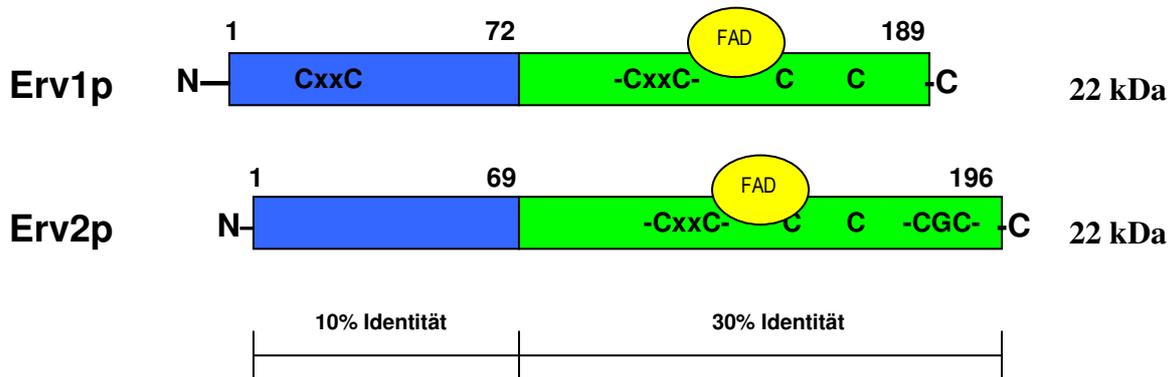


Abb. 36: Der bekannte Domänenaufbau von Erv1p und Erv2p im Vergleich. Die aminoterminalen Domänen mit ca. 70 Aminosäuren zeigen im Vergleich zwischen den Proteinen eine geringe Sequenzähnlichkeit. Die konservierten carboxyterminalen Domänen weisen eine 30%ige Identität zwischen den homologen Proteinen auf (Gerber et al. 2001).

Beim Vergleich von Hefe Erv1p mit Erv2p zeigen die aminoterminalen Domänen keine signifikanten Sequenzähnlichkeiten miteinander oder mit anderen Proteinen. Die carboxyterminale Domäne hat eine 30%ige Aminosäureidentität. Die Region um das CxxC-Motiv weist in beiden Proteinen identische Aminosäuren auf. Erv1p beinhaltet ein Paar von Cysteinen in der aminoterminalen Domäne, das nicht im Erv2p vorkommt. Dafür hat Erv2p zwei Cysteinreste in der carboxyterminalen Domäne, die nicht im Erv1p gefunden werden. Das letzte carboxyterminale Cysteinpaar des Erv2p befindet sich in einem flexiblen Arm des

durch die strukturellen Cysteine C159 und C176 stabilisiert und fixiert das FAD in der Tasche. Die gereinigte Proteinlösung der Cysteinmutante C159S ist farblos. Es liegt der völlige Verlust des FAD vor (Lee 2002). Ist die Position C159 mutiert, verliert das Erv1p sein FAD. Ein Verlust an FAD erfolgt in diesem Maße nicht, wenn die Position C176 mutiert ist. Bei der C176S-Mutante ist die gereinigte Proteinlösung gelb. Das Erv1p behält seine FAD-Bindungseigenschaft. Die Mutation an der Stelle C176S stört mit der Serin OH-Seitengruppe nicht die FAD-Bindung. Anders ist es, wenn die Mutation an Position C159S vorliegt. Hier wirkt die polare Seitengruppe des Serins auf die Stabilität des FAD in der Bindungstasche. Die polare Gruppe blockiert oder destabilisiert das FAD. Das Redox-Zentrum steht in Wechselwirkung mit dem Isoalloxazinring des FAD. Ist die Delokalisation der Elektronen durch Mutationen an den Cysteinen C130 oder C133 gestört, zeigt sich eine andere Farbe in den Proteinlösungen der beiden Cysteinmutanten von Erv1p. C130S ist orange und C133S ist schwach gelb. Da die beiden Cysteine des CxxC - Motives nicht gleichwertig sind, zeigen die sehr unterschiedlichen Farben. Die Farben zeigen einen veränderten Elektronentransfer oder eine Elektronentranslokation an. Das Gelb zeigt FAD-Bindung an.

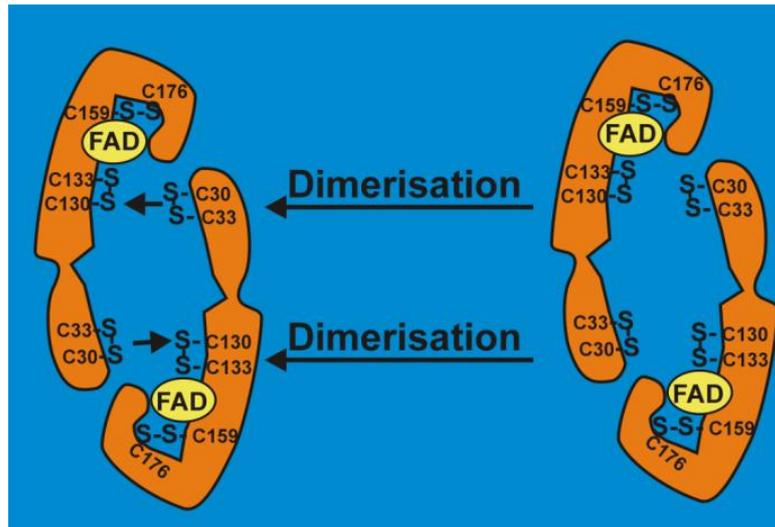


Abb. 38: Dimerisation des Erv1p. Zwei Monomere des Erv1p treten über ihre CxxC-Motive miteinander in Wechselwirkung. Das Dimer wird über Disulfidbrücken kovalent verbunden.

Die Untersuchungen machen sichtbar, dass Erv1p neben der Monomer- und der typischen Dimerform auch in höheren Komplexen akkumuliert. Das Dimerisationsmodell in **Abb. 38** zeigt den Zusammenschluss zweier homologer Monomere in antiparalleler Weise. So treten immer das N-terminale CxxC-Motiv eines Monomers mit dem jeweiligen gegenüberliegenden CxxC-Motiv des redoxaktiven Zentrums des zweiten Monomers in Wechselwirkung und fixieren über neue Disulfidbrücken das Dimer. Die Arbeiten mit Erv1p zeigen, dass bei *in vivo* und *in vitro*-Analysen unter reduzierenden Bedingungen durch Mercaptoethanol Monomerformen auftreten. Es gibt also Dimerisierungs-Cysteine. Erv1p liegt *in vivo* als Monomer und als Dimer vor. Bei den Untersuchungen wurde deutlich, dass die Mutante C30S mehr stabile Dimere bildet als der Wildtyp. Der o.g. Mechanismus zur Dimerisation ist bei der Mutante in einer Weise beeinträchtigt, dass eine Arretierung in der Dimerform erfolgt. Die Interaktion zwischen dem N-terminalen Cysteinpaar und dem redoxaktiven Zentrum muss für die Dimerisierungseigenschaften des Erv1p verantwortlich sein. Aus Untersuchungen ist bekannt, dass das N-terminal verkürzte Erv1p, die 15 kDa-Form des Erv1p, keine Dimere bilden kann (Hofhaus et al. 2003). Die C133S Mutation des redoxaktiven Zentrums bewirkt einen FAD-Bindungsverlust, der im Erv1p durch die schwach gefärbte Proteinlösung sichtbar wird. In den Western-Blot-Analysen wurde nachgewiesen, dass die C133S-Mutante keine Dimere bildet. Ihr redoxaktives Zentrum ist durch die Mutation irreparabel geschädigt. Die Cysteine des redoxaktiven Zentrums müssen im Zusammenhang mit der Dimerisationsfähigkeit stehen. Für die C133S-Mutante wurden in den Untersuchungen Aggregationsprodukte nachgewiesen. Ihre Entstehung findet eine Erklärung.

Die übriggebliebene Sulfhydrylgruppe des CxxC-Motives der Mutante wird durch das defekte Redoxzentrum falsch vernetzt, so dass die gerichtete Bildung zum Dimer nicht mehr erfolgt. Die Interpretationen über den Mechanismus des Erv1p zur Dimerisation in *E. coli* stehen im Einklang mit den Ergebnissen aus Hefe.

Die genetischen Arbeiten in Hefe wurden mit einem überexprimierenden Vektor durchgeführt. Die Ausprägung des Mutantenphänotyps sollten dadurch ohne Einflussnahme des Wildtyp-Phänotyps sein. Überexpression kann zu zusätzlichen Effekten führen. Unter den Versuchsbedingungen zeigte die C30S-Mutante eine Komplementation des Mutantendefektes zum Wildtyp. Das Verhalten der C30S-Mutante ist durch die Bildung von Heterodimeren erklärbar. Die Hefe enthält Erv1p genomischer und vektorieller Herkunft, die Punktmutationen an verschiedenen Stellen besitzen. Bei Heterodimeren werden Erv1p-Monomere genomischer und vektorieller Herkunft kombiniert. Zur Aufrechterhaltung der Erv1p Funktion reicht das Heterodimer aus. Die Hefezellen wachsen, kompensieren jedoch nicht den Defekt der Vektor-Erv1p-Mutation, sondern gleichen beide Punktmutationen aus. Die Cystein-Mutationen des Erv1p sind für die Hefe letal. Weitere Untersuchungen wurden mit dem pRS-416 Vektor gemacht. Die Vektoren verhalten sich wie Chromosomen bei der Verteilung auf die Sporen. Es liegt keine Überexpression vor. Im YEp-Vektor zeigten die C159S- und C176S-Mutanten noch Aktivität. Unter den Versuchsbedingungen ohne Überexpression ist keine Aktivität mehr vorhanden. Die Cystein-Mutationen sind für die Hefe letal. Die sichtbaren Effekte sind nur auf die Überexpression zurückzuführen (Hofhaus et al. 2003).

Die beiden Cysteinpaare der CxxC-Motive sind funktionell nicht äquivalent. Der Unterschied ist auffällig. Bei der Betrachtung der Mutanten CxxC-Motive des Erv1p wird die Farbänderung der Motiv-Cysteine C30S und C33S sichtbar. Die C30S-Mutante ist schwarz, die C33S ist gelb. Eines der beiden Cysteine zeigt durch die Mutation eine Veränderung der Farbe und belegt damit einen gestörten Elektronentransfer zum FAD. Die Cysteine C30 und C130 wurden als essentielle Sulfhydrylgruppen der CxxC-Motive des Enzyms identifiziert. Sie sind an der Primärreaktion des redoxaktiven Zentrums mit dem Substrat über einen nukleophilen Angriff beteiligt. Eine Mutation an diesen Positionen arretiert den Elektronentransport und die Weiterleitung der Elektronen auf das Substrat oder über das FAD. Die Farben der C30S und C130S-Mutanten weichen am stärksten ab und sind nur durch Veränderungen im π -Elektronensystem zu verstehen (**Abb. 39** nach Hooper und Thorpe 1999; verändert). π -Elektronen-Komplexe, die miteinander in Wechselwirkung stehen und ihren Elektronenmangel über FAD kompensieren, werden als Charge-Transfer-Komplexe bezeichnet.

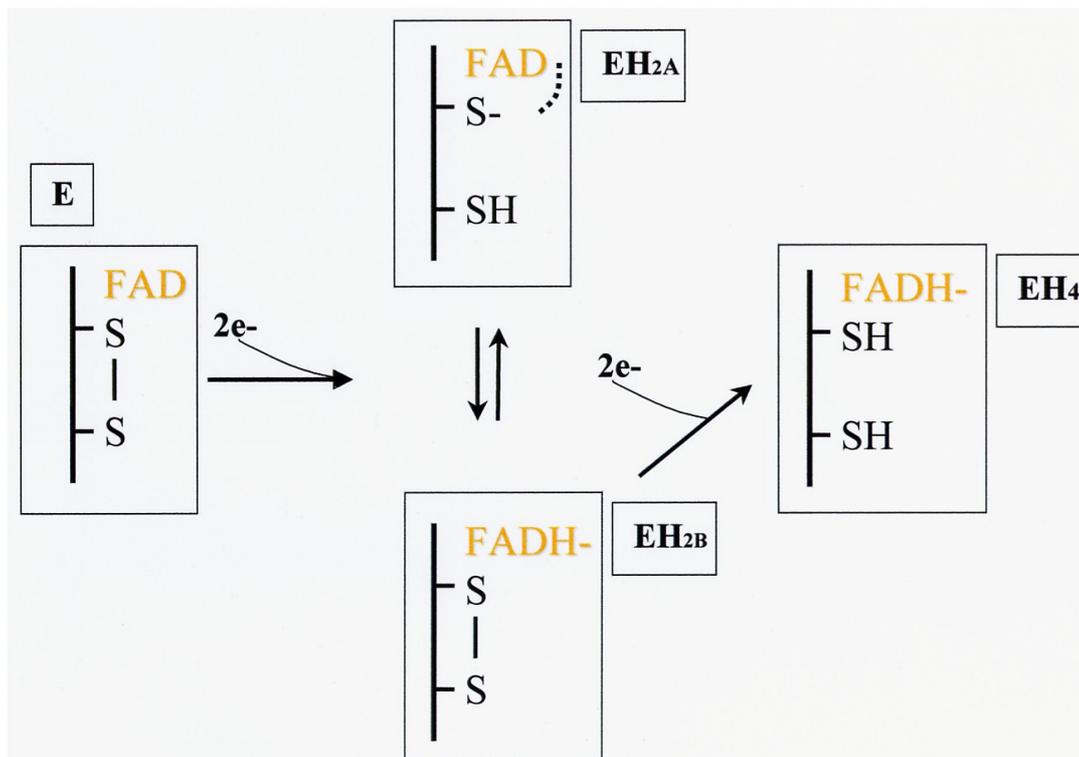


Abb. 39: Das Modell des Reaktionsmechanismus der Sulfhydryloxidase von Hooper und Thorpe (1999). Die oxidierte Sulfhydryloxidase (E) nimmt zwei Elektronen auf. Es bildet sich ein Flavin-Charge-Transfer-Komplex (EH_{2A}). Der Komplex steht mit einer zweiten Form im Gleichgewicht (EH_{2B}). Die EH_{2B}-Form des Enzym führt durch Aufnahme von zwei Elektronen zum vollständig reduzierten Enzym (EH₄). Der Prozess ist abgeschlossen, wenn zwei Protonen auf molekularem Sauerstoff übertragen werden und sich Wasserstoffperoxid (H₂O₂) bildet. Das Enzym kehrt in seinen oxidierten Zustand zurück.

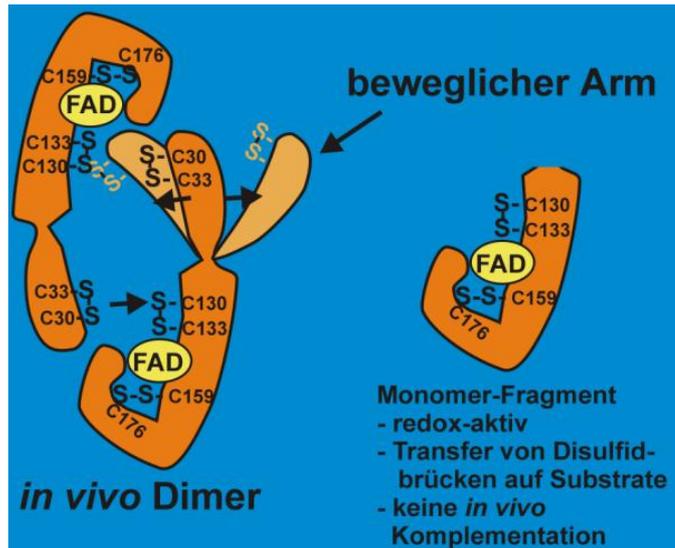


Abb. 40: Die Interaktionsdynamik des erweiterten Erv1p-Modells. Die N-terminale Deletionsvariante des Monomer-Fragmentes enthält die katalytische Domäne des Erv1p. Der flexible N-terminale Arm des Enzyms ist in der Lage eine Bewegung auszuführen. Hier erfolgt die Übertragung von Disulfidbrücken auf Substrate.

Aufgrund der Ergebnisse aus unseren Arbeiten und der vorliegenden Doktorarbeit ergibt sich ein neues Verständnis über die Interaktionen im Hefe-Enzym. Die daraus resultierende Dynamik für die Sulphydryloxidase Erv1p ist neu und in der **Abb. 40** gezeigt. Die antiparallele Anordnung zweier Monomere zu einem Dimer ist gekennzeichnet durch eine Dynamik des N-terminalen Arms des Monomers. Das N-terminale Cysteinpaar tritt über die Bewegung des flexiblen Arms in Wechselwirkung mit dem redoxaktiven Zentrum. Die bewegliche Struktur bedingt die Interaktions-Dynamik des Erv1p-Enzyms und damit die Funktionalität. Das Monomer-Fragment ist redox-aktiv und kann den Transfer von Disulfidbrücken auf Substrate bewirken. Eine Störung durch Mutationen an den wichtigen Cysteinen verändert die Fähigkeit Dimere zu bilden. Der beschriebene Zusammenhang zwischen den CxxC-Motiven des Erv1p und seiner Mutanten macht sichtbar, dass die N-terminale Erv1p-Domäne selber als eine Art erstes Substrat dient. Der Vergleich des funktionellen Mechanismus des Erv1p mit bekannten Sulphydryloxidasen bestätigt das vorliegende Modell und die Eigenschaft, selber als Substrat zu wirken. Gut untersuchte Sulphydryloxidasen sind Säuger-Q6p und Vogel-QSOx (Raje und Thorpe 2003). Das generelle Merkmal der Säuger-Sulphydryloxidasen Alrp und Q6p ist, dass sie als Wachstumsfaktoren identifiziert wurden. Q6p ist ein spezieller Wachstumsfaktor in Fibroblasten (Coppock et al. 1998). Das huQ6p wurde während des Zellzyklus in der Phase der nicht-proliferierenden Zellen gefunden. Das Q6-Gen ist ein essentielles Gen und kommt ubiquitär in allen Zellen vor. Bei Untersuchungen an Ratten konnte das Q6-Gen bei der Hochregulation von Prozessen im Verlauf der Spermatogenese gefunden werden. Das huQ6-Protein wurde in der extrazellulären Matrix nachgewiesen. Es wird sekretiert. Aus diesem Grund gilt humanes Q6p heute als ein weiteres Beispiel für ein Enzym, das Disulfidbrückenbildungen außerhalb des Endoplasmatischen Retikulums katalysiert. Beide

Proteine huAlrp und huQ6p sind beteiligt an regulatorischen Funktionen in der Zelle. Das ist ein Indiz für die funktionelle Evolution dieser Proteine in höheren Eukaryonten. Im allgemeinen sind Redoxproteine interessant für die Regulation und Modulierung des Zellwachstums, sowie die Aktivität von Enzymen und Hormonen. Hinzu kommt, dass viele Säuger-Zytokine und -Wachstumsfaktoren als Redoxfaktoren identifiziert wurden, einschließlich des Thioredoxin-Proteins (Nakamura et al. 1997). Die *in vitro* Substrate des Q6-Enzyms für seine Sulfhydryloxidase-Aktivität sind DTT und Glutathion. Die höchsten Umsatzzahlen für Q6p jedoch wurden gefunden für reduzierte RNase und Lysozym (Hooper et al. 1999a,b). Ihre eigentlichen *in vivo* Substrate sind weitestgehend unbekannt. Neuere Untersuchungen belegen, dass QSOx-Enzyme eine wichtige Rolle bei der oxidativen Faltung einer großen Anzahl von Proteinen spielen (Thorpe et al. 2002).

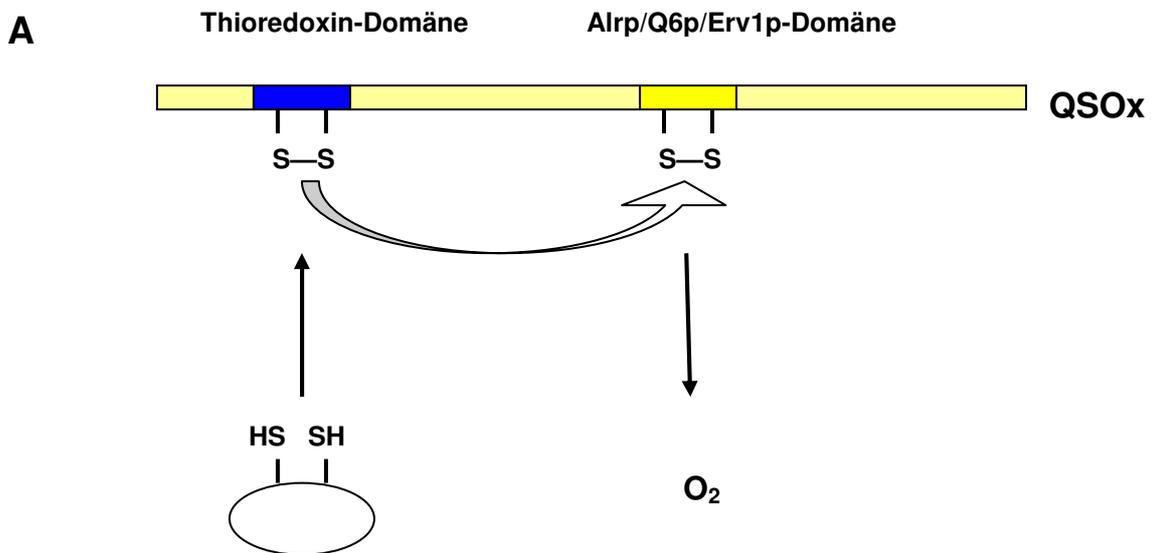


Abb. 41A: Das Schema zeigt den evolutionären Ursprung von QSOx-Enzymen (Thorpe et al. 2002). Sauerstoff ist der Endakzeptor der Elektronen. Die Abbildung zeigt die Reduktion der CxxC-Disulfide in der Thioredoxindomäne durch ein Substrat. Der Vorgang ist gekoppelt mit einer Interdomänen-Wechselwirkung.

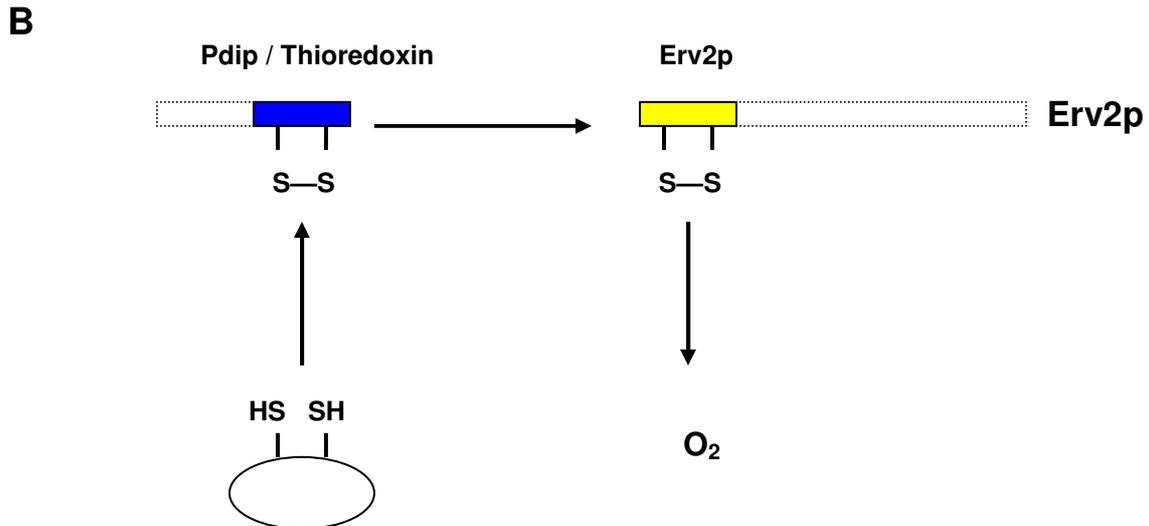


Abb. 41B: Das Schema zeigt den evolutionären Ursprung von QSOx-Enzymen (Thorpe et al. 2002). Sauerstoff ist der Endakzeptor der Elektronen. QSOx-Enzyme sind natürliche Fusionsproteine der dargestellten individuellen Aktivitäten.

Der Aufbau des Q6p und verwandter Proteine lässt Rückschlüsse auf die Entstehungsgeschichte der Fusionsproteine zu. Vogel-QSOx gehört zur Familie der Quiescin/Sulfhydryl-Oxidasen und ist gut untersucht (Raje und Thorpe 2003). Es ist ein Fusionsprotein aus Thioredoxin-domänen im N-terminalen Bereich und einer katalytischen Erv-Domäne im C-terminalen Bereich. Die Suche nach dem Substrat des Q6p zeigte, dass Thioredoxin selber ein Substrat für die Erv-Domäne sein kann. Liegt nur die Erv-Domäne von Vogel-QSOx vor, hat sie alleine Enzymfunktion und thioredoxinähnliche Proteine sind Substrate. Die Thioredoxin-Domäne ist frei über die Membran beweglich. Gebunden an die Erv-Domäne ist sie dem System entzogen. Für ein so fusioniertes Protein, wie die Vogel-QSOx, müssen andere Substrate in der Zelle vorliegen und gesucht werden.

Für die Substratsuche mit der Substratfang-Methode des Ery1p zeigen die **Abbildungen 13a/b und 43**, wie der Mechanismus durch die Mutation arretiert wird. So wurden erste Hinweise auf Substrate geliefert, die sich über diesen Mechanismus fangen lassen. Die Cysteine C30 und C33 liegen im N-terminalen Bereich des Proteins und haben eine Funktion bei der Dimerisierung des Ery1p und der Interaktion des Monomers mit Substraten. Da das redoxaktive Zentrum in einer Interaktion mit dem N-terminalen Disulfidpaar und dem dortigen Substrat steht, dient es im Gesamtmechanismus für die Elektronenweiterleitung auf FAD und für die Regeneration des Disulfid-Übertragungs-Mechanismus.

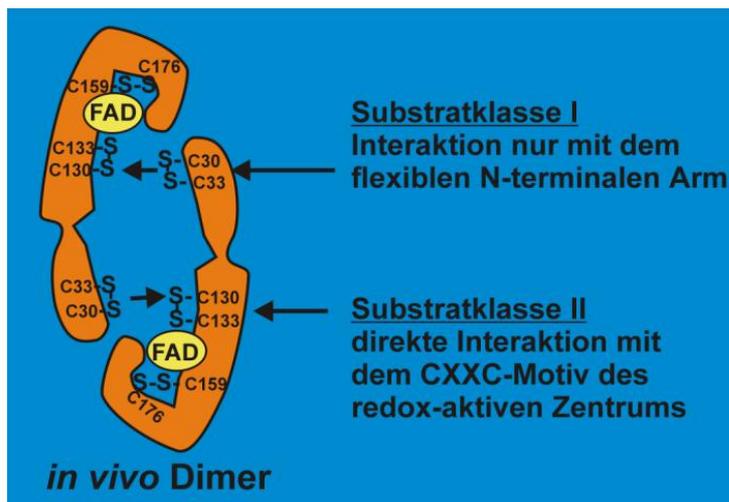


Abb. 42: Substratsuche mit dem *in vivo* Dimer. Es gibt zwei Substratklassen für Ery1p.

Die Substratklasse I für die N-terminale Domäne tritt mit dem flexiblen Arm in Interaktion.

Die Substratklasse II steht direkt mit dem redoxaktiven Zentrum in Interaktion.

In den Untersuchungen konnte DTT als ein künstliches Substrat für Ery1p gefunden werden. Entscheidend ist die Sulfhydrylgruppenanordnung des DTT im Vergleich zu allen anderen getesteten Substraten. Es kann darüber Auskunft geben, wie die Beschaffenheit des *in vivo* Substrates sein muss. Mercaptoethanol ist ein kleines Molekül mit einer Sulfhydrylgruppe. DTT besitzt terminale SH-Gruppen. DTT kann einen Ringschluß bilden, so dass die beiden SH-Gruppen in direkte Nachbarschaft kommen. Die Konformation ist entscheidend für die guten Substrateigenschaften des DTT bei Ery1p. Das gesuchte Substrat muss benachbarte SH-Gruppen besitzen. Die untersuchten Substrate zeigten deutlich, je näher die SH-Gruppen (DTT, β -ME, di- β -ME) zueinander liegen, desto schneller ist die Reaktion. Das Substratfangmodell in **Abb. 43** verdeutlicht die eingeschränkte Wahlmöglichkeit der Sulfhydrylgruppen des Substrates für den nukleophilen Angriff und den Verlauf der Reaktion. Es gibt nur eine SH-Gruppe am Enzym, die das Substrat kovalent bindet. Die Ergebnisse aus verschiedenen Präparationen konnten belegen, dass der Erfolg für die Substratsuche des Ery1p von der Proteinkonzentration abhängt. Das Ergebnis der Substratsuche ist nur ein erster Ansatz. Es liegt eine Doppel-Bande für den Proteinextrakt aus der C33S-Mutante vor. Das deutet auf ein mögliches Substrat von ca. 2 kDa Größe hin. Beim Test mit Reduktionsmittel

zerfällt die Bande. Das beweist die Disulfidbindung. Bei der Suche nach Substraten mit Hefe-Antikörpern konnte über den Fangmechanismus Sod1p im Enzym-Substrat-Komplex identifiziert werden.

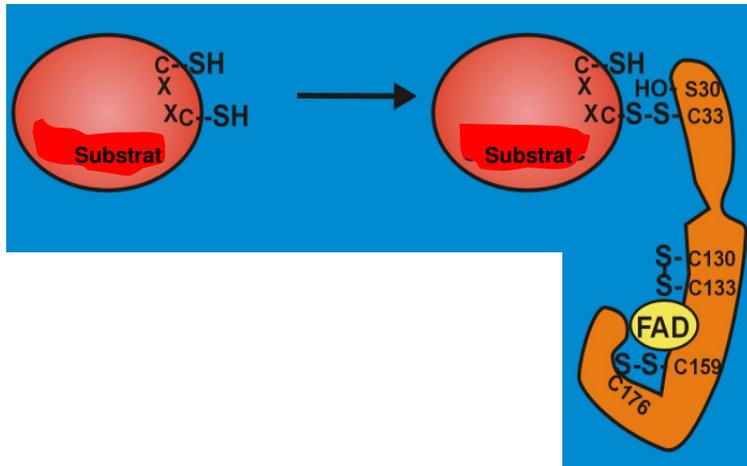


Abb. 43: Die amino-terminale Domäne.

Hier wird die funktionelle Bedeutung der N-terminalen Domäne für den Substratfang deutlich. Die Suche nach der Substratklasse I erfolgt mit Hilfe der C30S-Mutante des Erv1p. Das Substrat wird als Enzym-Substrat-Komplex ge-

bunden. Der Mutanteneffekt arretiert den eigentlichen Mechanismus der Reaktion. Das Substrat ist gefangen.

Bei den Arbeiten über Erv1p, die die N-terminale Domäne betreffen, wurde mit zwei Formen des Erv1p gearbeitet. Sie unterscheiden sich in ihrer N-terminalen Domäne zu sehen in **Abb. 40**. Es wurde festgestellt, dass *E. coli* anscheinend mehr Protein synthetisieren kann, wenn im N-terminalen Bereich von Erv1p ein Defekt vorliegt. Aus dieser Betrachtung heraus wurde die Doppelmutante C30/33S hergestellt. Mit ihrer Hilfe wurde der Effekt getestet, den der N-terminale Bereich hervorruft. Die Reaktion am redoxaktiven Zentrum erfolgt über Interaktion mit dem ersten Cysteinpaar der N-terminalen Domäne. Das FAD bewirkt einen Elektronensog und damit eine Destabilisierung der Elektronen über die Bindungen im Protein. Die Wechselwirkung zwischen dem redoxaktiven Zentrum und des N-terminalen Cystein-Paares ist in der C30/33S-Mutante gestört. Es könnte sein, dass der funktionslose N-terminale Bereich des Enzyms die Reaktion behindert. Somit entspricht das beschriebene Verhalten der C30/33S-Doppelmutante den Beobachtungen und fügt sich in die Theorie über das Erv1p-Gesamtverhalten ein.

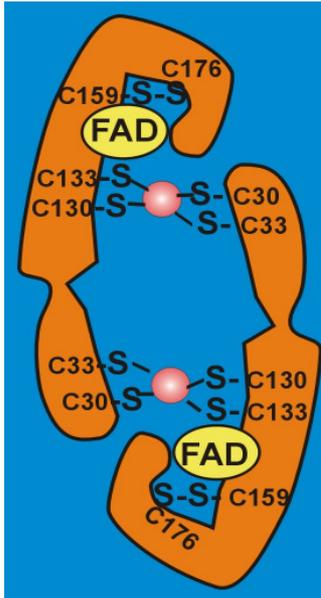


Abb. 44: Zwei Erv1p-Monomere binden kovalent Metall-Ionen über eine 4-Liganden-Bindung.

Die Sulfhydryloxidaseaktivität der mitochondrialen Enzyme Erv1p und Alrp ist nicht ihr einziges gemeinsames Merkmal. Die schon beschriebene Dimerisationsfähigkeit der Proteine tritt bei Erv1p genauso auf, wie bei allen Varianten des Alrp. Das zeigt, dass die Eigenschaft der Dimerisation eine essentielle Funktion für die Enzyme ist. Dimerisation von mitochondrialen Proteinen ist bekannt und findet sich bei Transportern und bei der Biogenese von Komponenten der Eisen / Schwefel-Cluster (Lill et al. 1999). Die Dimerisierungseigenschaften des Erv1p sind beschrieben worden. Es fehlt die dazugehörige Funktion. Für eine mögliche Dimerfunktion des Erv1p kann ein Modell gebildet werden (Abb. 44). Das Erv1p-Dimer könnte Metallionen binden, über die freien Bindungen der Schwefelatome. Die Bindung von Metallionen stellt eine mögliche Funktionserweiterung für Erv1p dar.

Bei Untersuchungen mit inaktiviertem Erv1p wurde die Biosynthese extramitochondrialer Eisen / Schwefel-Proteine beeinträchtigt. Die Ergebnisse belegten, dass Erv1p für die Assemblierung von zytosolischen Eisen / Schwefel-Proteinen aus den Mitochondrien eine essentielle Rolle spielt (Lange et al. 2001). Der Transport der mitochondrialen Substrate über die Membran könnte dann direkt von den Dimerisierungseigenschaften des Erv1p abhängen (Lisowsky 2001).

B. Das homologe Erv1p der Säuger (Alrp)

Erv1p und das homologe Alrp der Säuger sind FAD-abhängige mitochondriale Sulphydryloxidasen (Lee et al. 2000, Lisowsky et al. 2001). Die Enzyme katalysieren das Einfügen von Disulfidbrücken in Substrate mit Hilfe von FAD, O₂ und eines internen redox-aktiven Cysteinpaares (Hoover und Thorpe 1999). Alrp hat eine 40%ige Sequenzidentität zu Erv1p. Ihr Proteinaufbau hat identische funktionelle Strukturen. Gemeinsam sind sie gekennzeichnet durch eine konservierte carboxyterminale katalytische Domäne mit typischen CxxC-Motiv für das redox-aktive Zentrum mit FAD-Bindungsereich. Sie bilden Homodimere und haben eine Importsequenz für die Mitochondrien. Die beiden Sulphydryloxidasen unterscheiden sich. Während Erv1p ein unverändertes Protein in der Hefe ist, ist Alrp in Säugern mit drei Varianten vertreten (Klissenbauer et al. 2002). Die Varianten haben verkürzte aminoternale Domänen (**Abb. 45**).

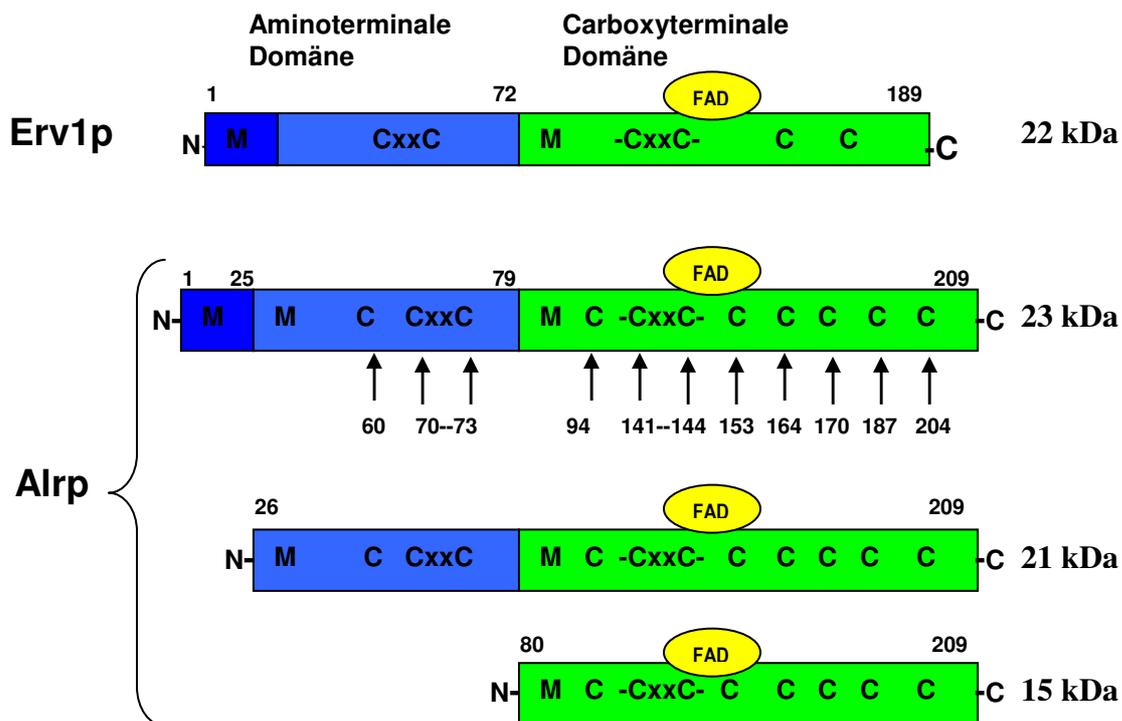


Abb. 45: Der bekannte Domänenaufbau von Hefe-Erv1p und Säuger-Alrp. Die stark konservierte carboxyterminale Domäne zeigt im Vergleich zwischen den beiden Proteinen eine 30%ige Sequenzidentität. Der Hauptunterschied zwischen Erv1p und Alrp liegt in der aminoternalen Domäne. Für Alrp gibt es in der Säugerzelle drei Varianten.

Erv1p und Alrp haben in den Mitochondrien aller Organismen eine elementare, ähnliche Funktion. Ihre Unterschiede betreffen Funktionen, die außerhalb der Mitochondrien liegen. Die Diskussion der Ergebnisse für die Sulphydryloxidase Erv1p der Hefe ist begrenzt auf das Modell des Einzelllers. Ihre Regulationsvorgänge sind typisch für ihre Situation. Mit den

Arbeiten an Alrp wurde das Hefe-Modell der Sulphydryloxidasen auf die Säuger angewendet. Säuger besitzen aufgrund der differenzierten Zellverbände eine komplexere Regulation. Aus den eigenen Ergebnissen über Alrp und der bekannten Literatur wurde das Alrp-Modell abgeleitet. Nachfolgend werden die Aussagen diskutiert.

Das Modell in **Abb. 46** ist eine Zusammenfassung über Alrp und zeigt die beschriebenen und identifizierten subzellularen Lokalisationen von Alrp. Die Literaturangaben zum Thema Alrp sind uneinheitlich. Vor Beginn meiner Doktorarbeit lagen keine systematischen Untersuchungen zur Lokalisation und Funktion von Alrp vor. Es gibt Hinweise für Funktionen der mitochondrialen Sulphydryloxidasen Erv1p/Alrp für die Beteiligung an der Reifung zytosolischer Fe/S-Proteine (Lang et al. 2001). Es gibt Studien, die Alrp eine spezifische Rolle als extrazellulären Faktor bei Leberregeneration zuweisen (Francavilla et al. 1994, Gandhi et al. 1999, Wang et al. 1999). Es wurden bis jetzt keine klaren Aussagen über die Expression und Lokalisation von Alrp in der Zelle gemacht. Bis jetzt ist unbekannt, welche Alrp-Varianten eine Rolle bei der Regeneration der Leber spielen.

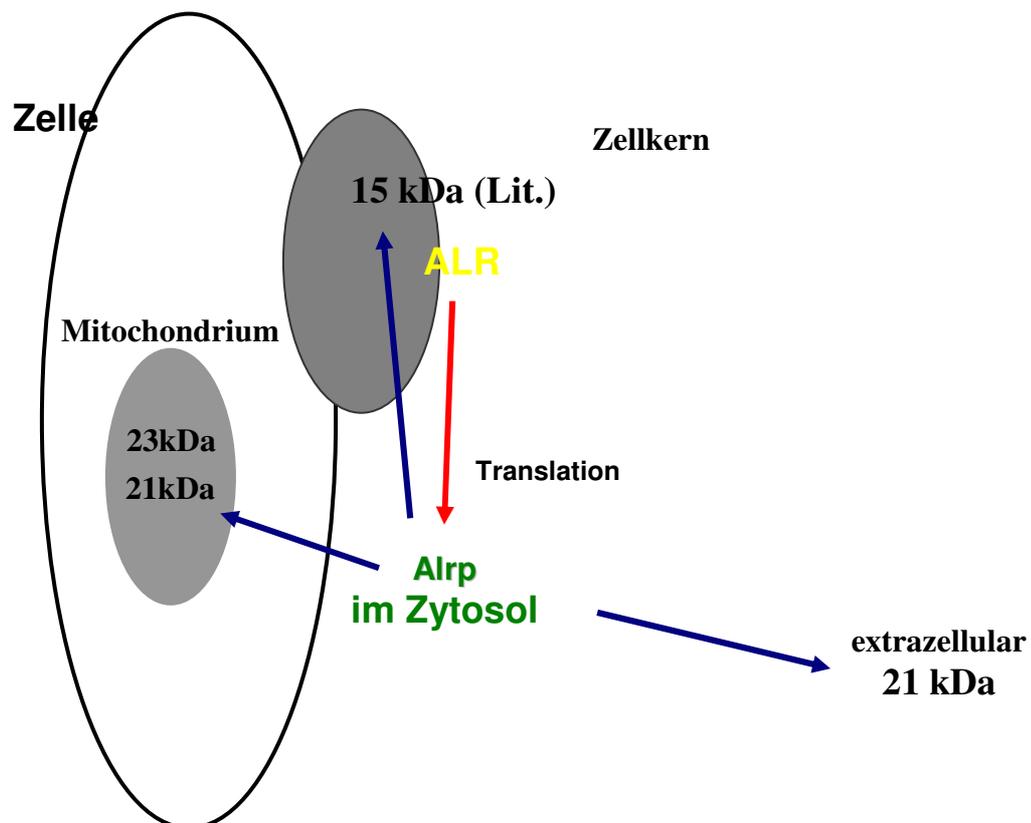


Abb. 46: Das Alrp-Modell. Dargestellt ist die Zusammenfassung der Daten über die subzellulären Verteilungen der Alrp-Varianten in verschiedenen Zellen und Geweben.

Erste Untersuchungen zeigten, dass Alrp ein kernkodierte mitochondriales Protein des Intermembranraums ist (Hofhaus et al. 1999a). Nach der Translation im Zytosol erfolgt der Transport in die Mitochondrien. Verschiedene Zellkulturlinien exprimieren unterschiedliche Alrp-Varianten. Säugetiere weisen mehrere Varianten des Alrp in ihren Zellen auf. Verschiedene Organe desselben Säugers exprimieren verschiedene Alrp-Varianten (Klissenbauer et al. 2001). Die verschiedenen Alrp-Varianten könnten unterschiedliche zelluläre Funktionen haben. Das 23 kDa Vollängen-Alrp lokalisiert in den Mitochondrien (Hofhaus et al. 1999a). Nach partieller Hepatektomie von Lebern wurde die 15 kDa-Variante des Alrp im Zytosol und im Serum von regenerierender Leber gefunden (Franciavilla et al. 1994, Hagiya et al. 1994, Giorda et al. 1996, Wang et al. 1999). Sein Auftreten korreliert mit einer Verringerung der Interferon- γ Konzentration, der Reduktion der Killerzellenaktivität und einer Zunahme des mitochondrialen Transkriptionsfaktors A (TFAM) (Polimeno et al. 2000a,b). Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die 23 kDa und die 21 kDa Varianten von Alrp in den Mitochondrien gefunden werden und die 21 kDa Variante im Serum aus Blut regenerierender Ratten. Die 15 kDa Variante konnte bei meinen Untersuchungen nur in Zellkulturen und bei Abbauvorgängen in Geweben gefunden werden.

Das GFP markierte Konstrukt des Alrp identifizierte die 23 kDa Variante im mitochondrialen Intermembranraum von Zellkulturzellen (Hofhaus et al. 1999a). Neue GFP markierte Konstrukte des Alrp wurden in den vorliegenden Untersuchungen eingesetzt und identifizierten Alrp-Varianten in verschiedenen Zellkulturen. Das native Alrp-Konstrukt sollte die Nachteile der GFP-Tags ausschließen (**Abb. 16**). Die Frage war, welches Konstrukt mit welchen nachweisbaren Formen des Alrp korreliert und welche Form des Alrp wie, wann und wo in Zellkulturen exprimiert wird. In den Zellkulturen konnte der Nachweis geführt werden, dass jedes transfektierte GFP-Konstrukt ein entsprechendes Fusionsprotein exprimiert. Über die Lokalisation der Proteine konnten keine eindeutigen Aussagen gemacht werden. Es konnten Signale im Bereich des Zellkerns, im Zytosol und in den Mitochondrien erkannt werden (**Abb. 17 und 27a**). Wichtig ist der Befund, dass alle drei Formen des Alrp in Zellkulturen produziert werden. Selbst das 3kDa N-terminale-GFP-Fusionsprotein von Alrp wird gebildet und findet seinen Zielort hauptsächlich in den Mitochondrien. Die Zellkulturen lassen nur stark vereinfachte Betrachtungen zu. Es kann keine Aussage über Zellen im Gewebe getroffen werden. Solche Rückschlüsse können aus den Arbeiten mit den Zellkulturen nicht gemacht werden. Durch die Arbeiten mit Zellkulturen kann nicht auf Funktionen von Alrp in der Zelle geschlossen werden.

Für das Volllängen-Konstrukt des Alrp wurden alle drei Proteinformen in Zellen nachgewiesen (**Abb. 18**). Das besagt, dass von einer cDNA die drei Translationsstartstellen auch als solche erkannt werden und definierte Produkte liefern, die unter den Versuchsbedingungen in den Zellen akkumulieren. Im Fall der Fusionsproteine ist das GFP am C-terminalen Ende angefügt worden. Es liefert jeweils ein Produkt. Liegt das native Alrp vor, so werden alle drei möglichen Alrp-Varianten von der Zellkultur exprimiert und sind nachweisbar. GFP kann artifiziell wirken und Translationsvorgänge stören. Die GFP-Fusionsproteine liefern immer nur die entsprechende Alrp-Form. Hier bestehen komplizierte Wechselwirkungen zwischen Zellkultur, Konstrukt und Versuchsbedingungen. Ein wichtiger grundsätzlicher Befund ist, dass die gefundenen Varianten von Alrp in Zellkulturen nicht das Ergebnis von alternativen Spleißvorgängen sind. Für die Herstellung der Konstrukte wurde die cDNA von *ALR* genutzt. Die Ergebnisse deuten auf differentielle Translation oder Prozessierung hin. Damit kann die Frage der Exprimierung eingegrenzt werden.

Die Fraktionierungen der Herz- und Lebergewebe von Maus und Ratte belegten den subzellularen Nachweis der 23 und 21 kDa Alrp-Varianten für die Mitochondrien (**Abb. 19**). In den Western-Blot-Analysen wurde CoxVb und Aktin als Antikörper-Standards verwendet. CoxVb ist ein integrales Protein der inneren Mitochondrienmembran und wird bei der Western-Analyse zur Identifikation der Mitochondrienfraktion benutzt. Das CoxVb-Signal ist in der Fraktion Überstand 2 nicht nachweisbar. Der Zentrifugationsschritt pelletiert die Mitochondrienfraktion. Der Überstand 2 besteht aus löslichen Proteinen. Der Aktin-Antikörper weist einen Zellbestandteil des Zytoskeletts nach und wird zum Nachweis der Güte der Präparation verwendet. In den Gewebefraktionierungen konnte der subzellulare Nachweis für die Alrp-Varianten in den Mitochondrien geführt werden. Alrp tritt mit seiner 23 kDa Volllängen- und der N-terminal deletierten 21 kDa Variante in Geweben der Leber und des Herzens von Ratte und Maus auf. Der Nachweis der Alrp-Varianten im Lebergewebe wird damit zu einem vorläufigen Abschluss gebracht.

In Zellkulturen wurde eine Exkretion von Alrp aus Zellen beobachtet. Bei Veränderungen der Kulturbedingungen konnte eine aktive Exkretion von Alrp eindeutig gezeigt werden (**Abb. 22 und 23**). In den Western-Blot-Analysen wurden für die Zellkulturen unter veränderten Versuchsbedingungen der Antikörper Hsp70 verwendet. Hsp70 ist ein lösliches Protein im Zytosol der Zellen. Es ist leicht in großen Mengen nachweisbar und gibt hier Auskunft darüber, ob dass gefundene Alrp exkretiert oder ob es durch Zelllyse freigesetzt wurde. Ein Lyse-Nachweis würde gegen Exkretion sprechen. Die aktive Exkretion des Alrp aus

Zellkulturzellen wurde belegt. Im weiteren wurde untersucht, ob Fraktionen von Rattenblut aus regenerierenden Lebern ein ähnliches Ergebnis für Gewebeuntersuchungen liefern **Abb. 20, 21 und 24**. Dabei wurde die N-terminal deletierte 21 kDa Variante von Alrp im Serum gefunden. Für die Untersuchungen des Serums wurde im Western-Blot zur Kontrolle Thioredoxin verwendet. Thioredoxin ist ähnlich lokalisiert wie Alrp und wurde mit ähnlichen Funktionen beschrieben (Nakamura et al. 1997). Es ist ein Wachstumsfaktor, löslich und auch zum Teil in den Mitochondrien lokalisiert. Dabei kann es die Membran passieren. Als löslicher zytosolischer Faktor zeigt es, ob ein Alrp-Nachweis im Serum durch Lyse der Zellen verursacht wird. Zum Befund der Lokalisation von Alrp-Varianten in den Mitochondrien konnte die aktive Exkretion von Alrp aus der Zelle belegt werden. Die Ergebnisse sind so noch nicht beschrieben worden. Alle bekannten Veröffentlichungen haben das 23 kDa Vollängen- Protein des Alrp für die Mitochondrien beschrieben und einen Nachweis der 15 kDa Variante im Zytosol und im Serum erbracht. Die Rezeptorsuche für das Alrp beschränkt sich auf die 15 kDa Variante (Wang et al. 1999). Unsere Befunde sind neu und liefern eindeutig die 23 kDa und 21 kDa Varianten für die Mitochondrien und die 21 kDa Variante für die Exkretion. Dass das 21 kDa-Alrp im Serum gefunden wurde, ist neu. Was Alrp dort bewirkt und welche Funktion es hat, kann im Moment noch nicht beantwortet werden. Hier beginnt der Einstieg für Untersuchungen über eine Zytokinwirkung des Alrp oder seine Wirkung als Wachstumsfaktor. Die Rezeptorsuche für das 21 kDa Alrp-Fragment folgt dem.

Beim Vergleich verschiedener Zellkulturlinien konnte die exprimierte Vollängenform des Alrp nachgewiesen werden (**Abb. 25**). Unter den Versuchsbedingungen wurde die signifikante 15 kDa Variante nur bei *Cos.7* Zellen gefunden. Die Untersuchung von speziellen Leberzelllinien (HSC) erbrachte den Nachweis der 23 kDa und 21 kDa Varianten von Alrp in **Abb. 26**. Eine Veränderung der Versuchsbedingungen durch Verlängerung der Inkubation zeigte, dass das Auftreten der Alrp Varianten in den Zellen keine signifikante Bevorzugung hat. Zwischen Zellkulturen und Lebergewebe ergibt sich eine geringe Differenz im Molekulargewicht des Ratten-Alrp im Vergleich zu humanem Alrp. Sie entsteht durch eine 7 Aminosäure Insertion beim humanen Protein (Lisowsky et al. 1995). Bei den Fluoreszenzuntersuchungen konnte mit den verschiedenen GFP-Fusionsproteinen eine unterschiedliche Verteilung des Alrp in den Zellen nachgewiesen werden (**Abb. 27a/b**). Hier findet sich das Alrp nicht nur in den Mitochondrien. Die Verteilung des Alrp in der Zelle ist komplexer. Die Zellkulturen zeigen nicht die natürliche Situation für das Alrp und sind durch Überexpression der Konstrukte gekennzeichnet. Die Zellkulturergebnisse zeigen, dass ein

komplizierter Sachverhalt vorliegt, der durch artifizielle Faktoren beeinflusst wird. Die Arbeiten an Zellkulturen sind hier beendet. Alrp muss in der natürlichen Situation der Gewebe betrachtet werden. Dort kann die Verteilung von Alrp beobachtet werden, wenn keine Überexpression durch das Vektorsystem vorliegt. Für die Stabilität des Alrp konnte festgestellt werden, dass erst nach Zellaufschluss ein leichter unspezifischer Abbau des Alrp erfolgen kann. Die 15 kDa Variante des Alrp wird dabei nicht erzeugt (**Abb. 29**).

Das vorgestellte Modell basiert auf Untersuchungen über einen Zustand der Leber nach Verletzung, der Regeneration. Die isolierten Mitochondrien, die Gesamtzellextrakte und das Serum zeigen das Auftreten des Alrp im Gewebe und die Verteilung der *in vivo* Alrp-Variante während der Leberregeneration. In den Mitochondrienfraktionen der Leber finden sich die 23 kDa und die 21 kDa Varianten, im Serum regenerierender Lebern die 21 kDa Variante und in allen regenerierenden Geweben die 23 kDa und 21 kDa Varianten, unabhängig von der Zeit (**Abb. 31**). Während der gesamten Untersuchung wurde die 15 kDa Variante nur in nicht signifikanten Mengen gefunden. In Gewebematerial, das über längere Zeiträume bei -20°C bis -70°C gelagert wurde, konnten hohe Konzentrationen nachgewiesen werden. Die 15 kDa Variante entstehen hier nur durch proteolytischen Abbau. Ihre nachträgliche Entstehung ist von Puffer und Lagerdauer abhängig. Eine durch partielle Hepatektomie ausgelöste Verletzung löst Regeneration aus. Die Regeneration ist eine besondere Eigenschaft der Leber. Ein anderes Krankheitsbild der Leber ist die Fibrose. Die Fibrose ist dadurch gekennzeichnet, dass keine Regeneration in der Leber entsteht und das Gewebe abstirbt. Bei den Untersuchungen zum Fibrose-Modell wurde kein Zusammenhang zwischen der Stärke des Alrp-Signals und dem Alter der untersuchten fibrösen Rattenlebern erkennbar. Alrp ist mit der 23 kDa und 21 kDa Variante nachweisbar, aber es gibt keinen Beleg für einen Zusammenhang zwischen fortschreitender Fibrose und Alrp (**Abb. 33**).

Alrp wurde bei den immunzytochemischen Untersuchungen mit Akkumulation in den Mitochondrien des regenerierenden Lebergewebes gefunden (**Abb. 33 und 34a/b/c/d**). Es wurden starke Signale bei 24stündiger Regeneration gezeigt. Bei 36 h wird das Alrp-Signal schwächer und verändert seine Ausprägung. Bei den 48 h Proben entspricht das Signal wieder der 24h Proben, ist aber schwächer. Die Schein-OP Tiere zeigen keine Signale. Die Kontrollen sind ohne spezifisches Signal für Alrp-Nachweis. CoxVb zeigt bei allen untersuchten Tieren ein gleichbleibendes Signal von derselben schwachen Intensität. Für CoxVb ändert sich nichts. Hier findet sich kein Zusammenhang mit der Regeneration der

Leber. Porin ist ein Protein der äußeren Mitochondrienmembran und kann eindeutig die Mitochondrien identifizieren. Es zeigt bei den untersuchten Lebergeweben der Ratten eine gleichbleibende Signalstärke an. Die starken Signale der Mitochondrien sind in den Leberzellen erkennbar. Sie haben Alrp-Signal-Charakteristik. Alrp kann in der regenerierenden Leber lokalisiert werden, es akkumuliert in den Mitochondrien und tritt bei Regeneration als deutliches Signal auf.

Das Hefe Erv1p und das homologe Erv1p der Säuger, das Alrp, haben in den Mitochondrien aller Organismen eine elementare ähnliche Funktion. Auf dem Weg von der Hefe bis zum Säugetier traten Veränderungen für das Protein auf, die sich in ihren heutigen funktionellen Unterschieden zeigen. Sie betreffen eine Funktionserweiterung der Enzyme, die außerhalb der Mitochondrien liegt. Hefe Erv1p lokalisiert im mitochondrialen Intermembranraum der Hefe (Lange et al. 2001). Alrp konnte mit der 23 kDa und 21 kDa Variante den Mitochondrien der Säugerzellen zugeordnet werden. Gemeinsam ist ihr Domänenaufbau und die charakteristischen Funktionen der Sulphydryloxidasen (Gerber et al. 2001, Lisowsky et al. 2001). Sie sind beide FAD-abhängige Sulphydryloxidasen mit typischen CxxC-Motiv des redox-aktiven Zentrums (Hoover and Thorpe 1999). Ihre carboxyterminale Domäne ist wegen der wichtigen Enzymfunktion stark konserviert. Im 3D-Modell ist der Core-Bereich für die carboxyterminale-Domäne für Erv1p und Alrp sehr ähnlich (Hofhaus et al. 2003, Gross et al. 2002). Die Arbeiten an Alrp ermöglichten die Erweiterung des Modells der Sulphydryloxidasen von der Hefe auf den Säuger. Alrp ist essentiell und kommt ubiquitär in allen Zellen vor (Lange et al. 2001). Hinweise auf die zellularen Funktionen des Alrp liefert die Lokalisation der Enzymvarianten. Neu ist, dass sich Alrp in drei verschiedenen Varianten nachweisen lässt (Klissenbauer et al 2001). Dabei finden sich alle drei Varianten des Enzyms nur in Niere und Muskelgewebe. Sie unterscheiden sich in der aminoterminalen weniger konservierten Domänen der Enzyme. Alrp ist mit der 23 kDa und 15 kDa Variante in der Zelle beschrieben worden (Lisowsky et al. 2001). In meinen Untersuchungen konnte die aminoterminal verkürzte 21 kDa Variante des Alrp in den Mitochondrien nachgewiesen und im Serum regenerierender Lebern gefunden werden. Ein Beleg, dass Alrp aktiv aus der Zelle exkretiert und nachweisbar ist. Das ist noch nicht beschrieben worden. Die Funktion der Alrp-Varianten außerhalb der Zelle ist noch unbekannt. Erv1p und die 23 kDa Alrp-Variante

wurden im Intramembranraum der Mitochondrien lokalisiert und könnten eine Rolle bei der Entstehung von zytosolischen Fe/S-Proteinen spielen (Lange et al. 2001).

Das neue 3D-Modell des Erv1p liegt vor. Es hilft bei einem Vergleich zwischen Hefe- und humanem Erv1p. Die daraus gewonnenen neuen Erkenntnisse konnten gezielt für Experimente genutzt werden, die in neue Richtungen weisen. Das Substratfangmodell gab Hinweise auf mögliche *in vivo* Substrate für Erv1p. Aus Zeitgründen konnten nur erste Versuche gemacht werden. Für das homologe Erv1p der Säuger, das Alrp, wäre für die Zukunft wichtig, seine Regulierung zu präzisieren, um ein abgerundeteres Bild über Alrp zu erhalten. Die Rezeptorsuche müsste weitere Beachtung finden.

Die Definition für ALR (augmenter of liver regeneration) (Hagiya et al. 1994) ist zu eng gefasst. Alrp ist nicht leberspezifisch. Es gibt Varianten des Enzyms in Säugierzellen. Der Befund unterstreicht die Notwendigkeit, die Rolle von Alrp in anderen Geweben und bei Entwicklungsprozessen zukünftig zu untersuchen.

VI. Literaturverzeichnis

- Anfinsen, CB. (1973) Principles that govern the folding of protein chain. *Science* 181: 232-230.
- Benayoun, B., Esnard-Feve, A., Castelle, S., Courty, Y. and Esnard F. (2001) Rat seminal vesicle FAD-dependent sulfhydryl oxidase: biochemical characterisation and molecular cloning of a member of the new sulfhydryl oxidase / quiescin Q6 gene family. *J. Biol. Chem.* 276: 13830 - 37.
- Birnboim, HC., Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Aci. Res.* 7: 1513-23.
- Bolivar, F., Rodriguez, RL., Greene, PJ., Betlach, MC., Heynejer, HL., Boyer, HW., Crosa, JH. and Falkow, S. (1977) Construction and characterisation of new cloning vehicles II. multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95 – 113.
- Chengrong, L. et al., and Fuchu, He (2002) Intracrine hepatopoietin potentiates AP-1 activity through JAB1 independent of MAPK pathway. *FASEB J.* 16.
- Chia-Kuei W., Tamara, A., Harry, A., Dailey, Bi-Cheng Wang and Rose, JP. (2003) The crystal structure of augmenter of liver regeneration: a mammalian FAD-dependent sulfhydryl oxidase. *Protein Science* 12: 1109-18.
- Collet, JF., Bardwell, JCA. (2002) Disulphides out of thin air. *Nature Struct. Biol.* 9(1): 2-3.
- Coppock, DL., Cina-Poppe, D., Gilleran, S. (1998) The quiescin *Q6* gene (QSCN6) is a fusion of two ancient gene families: thioredoxin and ERV1. *Genomics* 54: 460-468.
- Esser, K., Lisowsky, T., Michaelis, G. and Pratje, E. (2001) Extranuclear Inheritance: Genetics and Biogenesis of Mitochondria. *Progress in Botany* 62.
- Francavilla, A., Hagiya, M., Porter KA., Polimeno L., Ihara I., Starzl, TE. (1994) Augmenter of liver regeneration: its place in the universe of hepatic growth factors. *Hepatology* 20(3): 747-757.
- Frand, A.R, Cuozzo, JW. and Kaiser, CA. (2000) Pathways for protein disulphide bond formation. *Trends Cell Biol.* 10: 203-210.
- Freedmann, RB., Brockway, BE. and Lambert, N. (1984) Protein-disulphide-isomerase and the formation of native disulphide bonds. *Biochem. Soc. Trans.* 12: 929-932.
- Gandhi, CR., Kuddus, R., Subbotin, VM., Prelich, J., Murase, N., Rao, AS., Nalesnik, MA., Watkins, SC., DeLeo, A., Trucco, M. and Strzl, TE. (1999) A fresh look at augmenter of liver regeneration in rats. *Hepatology* 29: 1435-45.
- 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): 23486-91.

Giorda, R., Hagiya, M., Sek, T., Shimonishi, M., Saki, H., Michaelson, J., Francavilla, A., Starzl, TE., Trucco, M. (1996) Analysis of the structure and expression of the ALR gene. *Mol. Med.* 2: 97 – 108.

Gross, E., Servier, CS., Vala, A., Kaiser, CA., Fass, D. (2002) A new FAD-binding fold and intersubunit disulphide shuttle in the thiol oxidase Erv2p. *Nat. Struct. Biol.* 9(1): 61-67.

Hagiya, M., Francavilla, A., Polimeno, L., Ihara, I., Sakai, H., Seki, T., Shimonishi, M., Porter, KH., Starzl, TE. (1994) Cloning and sequence 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: 8142-46.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.

Hofhaus, G., Lee, JE, Tews, I., Rosenberg, B. and Lisowsky, T. (2003) The N-terminal cysteine pair of yeast sulfhydryl oxidase Erv1p is essential for *in vivo* activity and interacts with the primary redox centre. *Eur. J. Biochem.* 270: 1528-35.

Hofhaus, G. and Lisowsky, T. (2002) Sulfhydryl oxidase as factors for mitochondrial biogenesis. *Methods Enzymol.* 348: 314-324.

Hofhaus, G., Stein, G., Polimeno, L., Francavilla, A., Lisowsky, T. (1999a) Highly divergent amino termini of the homologous human ALR and yeast scERV1 gene products define species specific differences in cellular localisation. *Eur. J. Cell Biol.* 78: 349-356.

Hofhaus, G und Lisowsky, T. (1999b) Thiol enzymes and proteins. *Methods Enzymol.* 348: 314-324.

Hooper, KL., Thorpe, C. (1999) Egg white sulfhydryl oxidase: kinetic mechanism of the catalysis of disulphide bond formation. *Biochemistry* 38: 3211-17.

Hooper, KL., Glynn, NM., Burnside, J., Coppock, DL., Thorpe, C. (1999a) 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, KL., Sheasley, SL., Gilbert, HF. and Thorpe, C. (1999b) Sulfhydryl oxidase from egg white. A facile catalyst for disulphide bond formation in proteins and peptides. *J. Biol. Chem.* 274(32): 22147-50.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153: 163-168.

Jianming, W., Silva, G., Rustin, and Nils-Göran Larsson (2001) Increased *in vivo* apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(7): 4038 – 43.

Jones and Fink (1982) Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast. In: *The molecular biology of the yeast S.c.- mechanism and gene expression.* Cold Spring Harbor Laboratory Press NY :281-299.

Karlberg, O., Canbäck, C., Kurland, CG. and Andersson, Siv G.E. (2000) The dual origin of the yeast mitochondrial proteome. *Yeast* 17: 170-187.

Katinka, M.; Duprat, S.; Cotnillot, E. (2001) Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 414.

Keun Il Kim; Sung Hee Baek, Chin Ha Chung (2002) Versatile protein tag, SUMO: its enzymology and biological function. *Journal of Cell Phys.* 191: 257-268.

Klissenbauer, M., Winters, S., Heinlein, UAO and Lisowsky, T. (2002) Accumulation of the mitochondrial form of the sulphhydryl oxidase Erv1p/Alrp during the early stages of spermatogenesis. *J. Exp. Biol.* 205(14): 1979-86.

Laboissiere, MC., Sturley, SL. and Rainers, RT. (1995) The essential function of protein-disulphide isomerase is to unscramble non-native disulphide bonds. *J. Biol. Chem.* 270: 28006-09.

Lange, H., Lisowsky, T., Gerber, J., Mühlenhoff, U., Kispal, G. and Lill, R. (2001) An essential function of the mitochondrial sulphhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO rep.* 2(8): 715-720.

Lee, JE (2002) Hefe Erv1 Protein und das homologe Säugerprotein sind essentielle mitochondriale Sulphydryloxidasen. Doktorarbeit, Uni.-Düsseldorf.

Lee, JE., Hofhaus, G., Lisowsky, T. (2000) Erv1p from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulphhydryl oxidase. *FEBS Lett.* 477: 62-66.

Lill and Kispal (2000) Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *TIBS* 25.

Lisowsky, T., Esser, K., Ingenhoven, M., Pratje, E. (2003) Extranuclear inheritance: in genetics and biogenesis of mitochondria. *Progress in Botany* 64.

Lisowsky, T. (2001) Sulphydryl oxidases and the genetics of mitochondrial biogenesis. *Rec. Res. Dev. Curr. Genet.* 1: 1-10.

Lisowsky, T., Lee, JE., Polimeno, L., Francavilla, A. and Hofhaus, G. (2001) Mammalian augments of liver regeneration is a sulphhydryl oxidase. *Dig. Liver Dis.* 33: 173-181.

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: 1501 - 10.

Lisowsky, T., Weinstat-Laslow, D., Barton, N., Reeders, S.T., Schneider, M (1995) A new human gene located in the PKD1 region of chromosome 16 is a functional homologue to *ERV1* of yeast. *Genomics* 29: 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: 15-20.

Lisowsky, T. (1992) Dual function of a new nuclear gene for oxidative phosphorylation and vegetative growth in yeast. *Mol. Gen. Genet.* 232: 58-64.

Lisowsky, T. (1987) Die in vitro Analyse der mitochondrialen Transkription von Mutanten der Hefe, *Saccharomyces cerevisiae*: Isolation und Charakterisierung eines nuklearen Genes. Doktorarbeit, Uni.- Düsseldorf 1987.

Lodish, H. et al. (2001) Molekulare Zellbiologie. 4.Auflage Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.

Madden, EA., Storrie, B. (1987) The preparative isolation of mitochondria from chinese hamster ovary cells. *Analy. Biochem.* 163: 350-357.

Michalopoulos, GK., DeFrances, MC. (1997) Liver regeneration. *Science* 276: 60 – 66.

Mickelson, JR., Greaser, ML., Marsh, B. (1980) Purification of skeletal-muscle mitochondria by density-gradient centrifugation with Percoll. *Analy. Biochem.* 109: 255-260.

Mühlenhoff, Gerber, J., Hofhaus, G., Lill, R. and Lisowsky T. (2001) Yeast ERV2p is the first microsomal FAD-linked sulphhydryl oxidase of the Erv1p/Alrp protein family. *J. Biol. Chem.* 29(276): 23486-91.

Mühlenhoff and Lill (2000) Biogenesis of iron-sulphur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1459: 370-382.

Nakamura, H., Nakamura, K., and Yodoi, J. (1999) Redox regulation of cellular activation. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 351-369.

Polimeno, L., Margiotta, M., Marangi, L., Lisowsky, T., Azzarone, A., Ierardi, E., Frassanito, MA., Francavilla, R. and Francavilla, A. (2000a) Molecular mechanisms of augmenter of liver regeneration as immunoregulator: its effect on interferon- γ expression in rat liver. *Dig. Liver Dis.* 32: 217-225.

Polimeno, L., Capuano, F., Marangi, L., Margiotta, M., Lisowsky, T., Ierardi, E., Francavilla, R., Francavilla, A. (2000b) The augmenter of liver regeneration induces mitochondrial gene expression in rat liver and enhances oxidative phosphorylation capacity of liver mitochondria. *Dig. Liver Dis.* 32: 510-517.

Polimeno, L., Lisowsky, T., Francavilla, A. (1999) From yeast to man – from mitochondria to liver regeneration: a new essential gene family. *Ital. J. Gastroenterol Hepatol.* 31: 494-500.

Pratje, E. and Michaelis, G. (1977) Allelism studies of mitochondrial mutants resistant to antimycin A or funiculosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 152: 167-174.

Raje, S. and Thorpe, C. (2003) Inter-domain redox communication in flavoenzymes of the quiescin / sulphhydryl oxidase family: role of a thioredoxin domain in disulphide bond formation. *Biochemistry* 42(15): 4560 – 68.

Riddles, PW., Blakeley, RL. and Zerner, B. (1983) Reassessment of Ellman's reagent. *Methods Enzymol.* 91: 49-60.

Rose, JP., Wu, CK., Francavilla, A., Prelich, JG., Iacobellis, A., Hagiya, M., Rao, AS., Stazl, TE., Wang, BC. (1997) Crystallization and preliminary crystallographic data for the augments of liver regeneration. *Acta Crystallographica* 53: 331-333.

Sambrook, J., Fritsch, EF., Maniatis, T. (eds.) (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Seeler, JS., Dejean, A. (2001) SUMO: of branched proteins and nuclear bodies. *Oncogene* 20: 7243 – 49.

Senkevich, T., White, CL., Koonin, E., Moss, B. (2000) A viral member of the ERV1 / ALR protein family participates in a cytoplasmic pathway of disulphide bond formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(22): 12068 -73.

Sevier, CS., Cuozzo, JW., Vala, A., Aslund, F. and Kaiser, CA. (2001) A Flavoprotein oxidase defines a new endoplasmic reticulum pathway for biosynthetic disulphide bond formation. *Nature Cell Biology* 3.

Shaodong Dai, Schwendtmayer, C., Schürmann, P., Ramaswamy, S., Eklund, H. (2000) Redox signaling in chloroplasts: cleavage of disulphides by an iron-sulphur cluster. *Science* 287.

Stein, G., Lisowsky, T. (1998) Functional comparison of the yeast *scERV1* and *scERV2* genes. *Yeast* 14: 171-180.

Thorpe, C., Hooper, KL., Raje, S., Glynn, NM., Burnside, J., Turi, GK., Coppock, DL. (2002) Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulphide bond formation in eukaryotes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 405: 1-12.

Wang, G., Yang, X., Zhang, Y., Wang, Q., Chen, H., Wie, H., Xing, G., Xie, L., Hu, Z., Zhang, C., Fang, D., Wu, C. and He, F. (1999) Identification and characterisation of receptor for mammalian hepatopoietin that is homologous to yeast ERV1. *J. Biol. Chem.* 274: 11469-72.

Teile der vorliegenden Promotionsarbeit wurden bereits an folgender Stelle publiziert:

Hofhaus, G., Lee, JE, Tews, I., Rosenberg, B. and Lisowsky, T. (2003) The N-terminal cysteine pair of yeast sulfhydryl oxidase Erv1p is essential for *in vivo* activity and interacts with the primary redox centre. Eur. J. Biochem. 270: 1528-35.

Danksagung

Diese Arbeit entstand unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. Thomas Lisowsky. Ihm danke ich für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Bereitschaft der fachlichen Erfahrungsweitergabe an mich. Eine große Hilfe war seine Bereitschaft zwischen den verschiedenen Instituten der Biochemie, Genetik, und Hepatologie zu vermitteln und viele Hürden des alltäglichen Lebens im Institut zu glätten und zu beseitigen. Seine wissenschaftliche Beurteilungsfähigkeit ist einzigartig und hat mich immer überzeugt der Wahrheit etwas näher gekommen zu sein.

Die Abbildungen und Fotografien in meiner Dissertationsschrift wurden von mir angefertigt und digital bearbeitet. Mit Ausnahmen der von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Lisowsky zur Verfügung gestellten Abbildungen: 15a und b, 38, 40, 42, 43 und 44. Zudem danke ich Herrn Lisowsky für die Bereitstellung des Molecular Modelling des Erv1p in Abbildung 37.

Herrn Prof. Dr. Georg Michaelis, Botanisches Institut möchte ich danken für die Mitnutzung der Arbeitsplätze in seiner Abteilung, seinen netten Unterhaltungen, seines demokratischen Wesens und der Kritik seiner Erfahrung. Besonderen Dank möchte ich aussprechen für die Möglichkeit der Teilnahme an seinem Literaturseminar. Danken möchte ich auch Frau Prof. Dr. E. Pratje.

Besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. Karlheinz Esser aussprechen für die sachlichen Hinweise in Bezug auf die praktischen Arbeiten. Seine Anregungen ließen immer genügend Platz eigene Ideen und Methoden zu verwirklichen. Sein Wissen über Internetanwendungen war sprichwörtlich. Er war für die Jahre unseres Miteinanders im Laboralltag die Gute Seele im Institut.

Herrn Dr. Götz Hofhaus möchte ich danken für die Nutzung des Zellkulturlabors im Institut für Biochemie und der Möglichkeit, die Zellaufschlüsse für meine Arbeiten dort zu tätigen. Die Hinweise auf Methoden und Materialien von seiner Seite aus, waren immer mit Erfolg verbunden und lieferten die Grundlage zur gründlichen Durchführung eigener Protokolle. Für die Vorarbeiten und Hinweise zur Methodik ihrer Mutagenisierung danke ich Frau Dr. Jeung-Eun Lee.

Meinem Dank gilt auch den Mitarbeitern des SFB 575 und der Medizinischen Institute, Herrn Dr. Fischer, Dr. Wettstein und Dr. Ransfeld. Herrn Dr. Kubitz danke ich für die Nutzung des Konfokalen Mikroskops und der Einweisung für den Kryostaten.

Dem Personal danke ich für die Bereitwilligkeit das Lebermaterial zur Verfügung zu stellen.

Serumproben und andere Materialien erhielten wir von der Medical School Bari, Italien von Dr. L. Polimeno und Prof. Dr. A. Francavilla.

Den Mitarbeitern der Tierversuchanstalt danke ich für die Bereitstellung des Gewebes für Normalratten.

Meinem Dank gilt der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U.A.O. Heinlein für die Nutzung der Räume und Materialien. Seine Einweisungen in die Arbeiten für die Immunhistochemie und Immunzytochemie waren grundlegend. Die Antworten auf meine Fragen waren immer hilfreich.

Danken möchte ich dem Institut für Genetik und dem Institut von Prof. Dr. W. Martin für die Nutzung der Fluoreszenzmikroskope. Herrn Prof. Dr. W. Martin danke ich für die Übernahme des Gutachtens.

in Liebe
für meinen Ehemann
Uwe