Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jens W. Fischer

Expression und Translation des COX1b-Gens in humanen Zellen - kein Hinweis auf die Bildung eines COX1b-Proteins

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Christina Maria Reinauer
2013

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Karsten Schrör

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Peter Brenneisen

Ich brauche Wahrheit und Aspirin
(Álvaro de Campos)

Für meine Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Reinauer C, Censarek P, Kaber G, Weber AA, Steger G, Klamp T, Schrör K.

Expression and translation of the COX-1b gene in human cells - no evidence of generation of COX-1b protein. *Biological Chemistry*. 2013 Jun;394(6):753-60.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	Antikörper
AS	Aminosäuren
ASS	Acetylsalicylsäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	*Complementary DNA*
COS-7	*Cercopithecus aethiops* Fibroblastenzelllinie der Grünen Meerkatze
COX	Cyclooxygenase
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle* Zellkulturmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	*Enhanced Chemiluminescence*
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötales Kälberserum
FS	HEK 293-f Freestyle
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HEK	*Human embryonic kidney* Zelllinie
HRP	Meerrettichperoxidase
IBs	*Inclusion Bodies* Einschlusskörper
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitäts-Chromatografie
IPI	*International Protein Index* Proteindatenbank
IPTG	Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
LB	Luria Broth Medium
LEW	*Lysis Equlibration Wash* Puffer
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
M	mol/l
min	Minute

mRNA	*Messenger RNA*
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetoessigsäure
Ni-TED	Nickel-Triscarboxymethylethylendiamin
NMD	*Nonsense mediated decay*
NOG	N-Octyl-ß-Glucopyranosid
NSAR	Nicht steroidale Entzündungshemmer
OD	*Optical density*
ORF	*Open reading frame* Offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PGE2	Prostaglandin E2
PGI2	Prostaglandin I2
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pre-RNA	Präkursor-mRNA
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sf	*Spodoptera frugiperda* Insektenzelllinie
SNP	S*ingle nucleotide polymorphisms*
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TED	Tris-Carboxymethylethylendiamin
TEMED	Tetramethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... **v**

EINLEITUNG **1**

1.1 Cyclooxygenase und Schmerz 1

1.2 Die Cyclooxygenase 2

1.3 Varianten der Cyclooxygenase 5

1.4 Alternative Spleißformen der Cyclooxygenase 5

1.5 COX1b entsteht durch Intronretention 7

1.6 COX1b-mRNA in humanem Gewebe 9

1.7 Selektive Cyclooxygenase1b Inhibitoren? 9

1.8 Aufgabenstellung 10

MATERIAL UND METHODEN **11**

2.1 Substanzen 11

2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien 12

2.3 Antikörper 13

2.4 Puffer und Lösungen 14

2.5 Plasmide 15

2.6 Primer 16

2.7 *E. coli* Bakterienstämme 18

2.8 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* 18

2.9 *E. coli* Transformation 19

2.9.1 *E. coli* Transformation zur Plasmidamplifikation 19

2.9.2 *E. coli* Transformation zur Proteinexpression 19

2.10 Allgemeine Zellkultur-Methoden 20

2.10.1 HEK 293 20

2.10.2 COS-7 21

2.10.3 HEK 293-f 21

2.11 Transfektion 21

2.11.1 Transiente Transfektion der adhärenten Zellen mit Lipofectamine 2000 21

2.11.2 Transiente Transfektion der Suspensionszellen mit linearem PEI 22

2.12 Extraktion von Gesamt-RNA 22

2.13 RNA Strukturanalyse 23

2.14 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 23

2.15 Aufreinigung von mRNA 23

2.16 cDNA-Synthese 23
2.17 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 24
2.17.1 p53 PCR 24
2.17.2 FLAG-Tag übergreifende PCR 25
2.18 Klonierung und Markierung von COX1b und COX1bΔG 25
2.18.1 Anhängen eines 5' HIS-Tags mittels PCR 26
2.18.2 Anhängen eines 5' GFP-Tags mittels pmaxFP-GreenC 27
2.18.3 Einklonierung in das pQE-Trisystem His.Strep 2 27
2.19 Agarosegel-Elektrophorese 28
2.20 COX1b-mRNA Sequenzanalyse 29
2.20.1 PCR zur COX1b-mRNA Sequenzanalyse 29
2.20.2 Klonierung des PCR-Produktes in den TOPO Vektor 30
2.20.3 Mini DNA-Präparation 30
2.20.4 Restriktionsverdau zur Überprüfung der Klonierung 31
2.20.5 DNA-Sequenzierung 31
2.21 Plasmidaufreinigung mittels Midi-Präparation 31
2.22 Lyse der Zellen 32
2.22.1 Lyse der Zellen für die SDS-PAGE 32
2.22.2 Lyse der Gewebezellen aus Mainz 32
2.22.3 Test verschiedener Lysemittel 32
2.22.4 Lyse der Zellen für IMAC Aufreinigung mit Ni^{2+}-NTA/TED 33
2.22.5 Lyse der Zellen für die Immunpräzipitaion 33
2.22.6 Lyse von *E. coli* 33
2.23 Bestimmung der Proteinkonzentration 34
2.24 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 34
2.25 Färbung von Polyacrylamidgelen mit kolloidalem Coomassie 35
2.26 Western Blot 35
2.26.1 Proteintransfer auf PVDF Membran 35
2.26.2 Immundetektion von Proteinen auf PVDF Membran 35
2.26.3 Densitometrische Auswertung der Röntgenfilme 36
2.27 Aufreinigung von His-getaggtem Protein 36
2.27.1 Ni-TED Protino Säulchen (Macherey Nagel) 37
2.27.2 Ni-NTA Agarose (Qiagen) 37
2.28 Immunpräzipitation 37
2.29 Immunfluoreszenzmikroskopie von pmaxFP-COX-GFP 38
2.30 Differentielle Zentrifugation 38
2.31 Signalpeptidabspaltung: Berechnung mit SignalP 3.0 39

2.32 N-terminale Sequenzierung 39
2.33 Massenspektrometrie Nano-HPLC/ESI-MS/MS 39
2.33.1 Tryptischer Verdau 39
2.33.2 Nano HPLC 40
2.33.3 ESI-MS/MS 40
2.33.4 Auswertung der MS Daten 41

ERGEBNISSE 42
3 Charakterisierung von Intron1 auf mRNA-Ebene 42
3.1 Sequenzanalyse der Intron1-mRNA 42
3.2 Analyse der RNA-Struktur zur Überprüfung auf einen ribosomalen *Frameshift* 45
3.3 FLAG-Tag übergreifende PCR 47
4 Charakterisierung der COX1b auf Proteinebene 48
4.1 Analyse von COX1b-Varianten im Western Blot 49
4.1.1 Analyse von COX-Varianten im Western Blot mit α-COX1-Antikörper 49
4.1.2 Analyse von COX1b-Varianten im Western Blot mit α-His-Antikörper 50
4.1.3 Analyse von COX1b-Varianten im Western Blot mit α-FLAG-Antikörper 51
4.1.4 Analyse von GFP-markierten COX-Varianten im Western Blot 52
4.1.5 Hinweise auf ein verfrühtes Stoppkodon? 55
4.1.6 Analyse von COX-Varianten in Zellkultur und Geweben im Western Blot mit α-COX1b-Antikörper 56
a) HEK 293 Zellkultur
b) Gewebeproben
c) Gewebeblot
4.2 Lokalisationsbestimmung der COX1b-Varianten 59
4.3 Ni-NTA und Ni-TED Aufreinigung von COX1b-His und COX1bΔG-His 61
4.4 Immunpräzipitation 63
4.5 Untersuchung auf Signalpeptidabspaltung 64
4.6 Massenspektrometrische Untersuchung der COX1b(ΔG)-His 67
a) 70 kDa Doppelbande
b) 55 kDa Bande
4.7 Hypothetische COX1b Peptidsequenzen 70
4.8 N-terminale Sequenzierung 71
4.9 Zusammenfassung der Ergebnisse 72

DISKUSSION 76
5.1 Charakterisierung von Intron1 auf mRNA-Ebene 76
5.1.1 Sequenzanalyse der Intron1 der COX1b-mRNA 77

5.1.2 Analyse der RNA-Struktur 78
5.1.3 Analyse des Spleißens von Intron1 aus der COX1b-mRNA 79
5.2 Analyse der COX1b-Varianten im Western Blot 81
5.2.1 Western Blot mit α-COX1-Antikörper 81
5.2.2 Western Blot mit α-COX1b-Antikörper 81
a) HEK 293 Zellkultur
b) Gewebeblot
5.2.3 Suche nach COX1b-Fragmenten 84
5.2.4 Untersuchung von FLAG- und His-Tag-tragenden COX1b-Varianten 84
5.2.5 Analyse von GFP-getaggten COX-Varianten im Western Blot 85
5.3 Lokalisationsbestimmung 86
5.4 Signalpeptidabspaltung 87
5.5 Untersuchungen des N-Terminus des COX1b-Konstruktes 88
5.6 Der Nachweis einer COX1b ist zell- und gewebespezifisch 89
5.7 COX1b nur ein Zwischenprodukt? 91
5.8 Ausblick 92

ZUSAMMENFASSUNG 95

LITERATURVERZEICHNIS 96

EINLEITUNG

1.1 Cyclooxygenase und Schmerz

Die Cyclooxygenasen spielen bei der Schmerzwahrnehmung und Inflammation eine Schlüsselrolle. Sie produzieren Prostaglandine, lokale Gewebshormone, die sie ins entzündliche Exsudat abgeben. Zusammen mit weiteren proinflammatorischen Mediatoren nehmen Prostaglandine Einfluss auf die komplexen Signalkaskaden der peripheren Nozizeption: Über Rezeptoren und Ionenkanäle wird die Aktionspotentialfrequenz der afferenten Nervenzellen moduliert (vgl. Abb. 1-1; McCleskey & Gold, 1999). Auch die Vasodilatation im Rahmen einer Entzündung und die weitere zentrale Schmerzverarbeitung werden durch die Produkte der Cyclooxygenasen vermittelt (Mitchell & Warner, 1999; Vane, 2000; Leith et al., 2007).

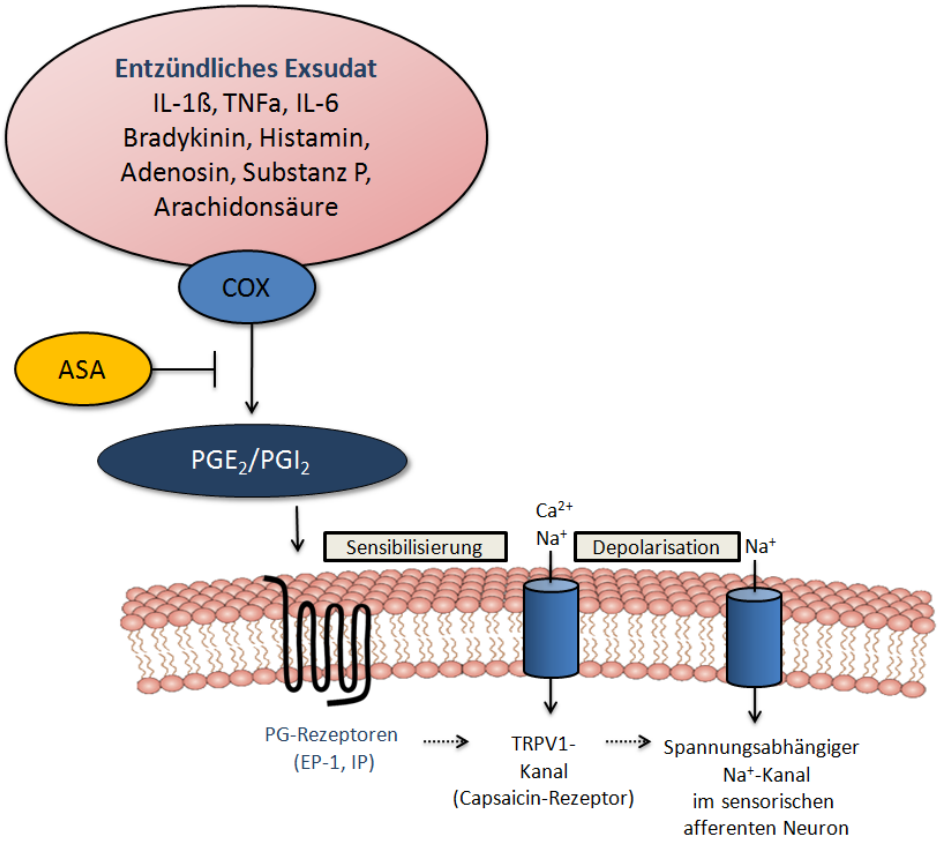


Abbildung 1-1. Bedeutung der Prostglandine und Cyclooxgenasen in der peripheren Nozizeption. Schmerzrezeptoren werden durch Protaglandine aus dem entzündlichen Exsudat sensibilisiert (PGE_2, PGI_2). Folge der Aktivierung von Schmerzrezeptoren (TRPV1-Kanal) ist die Öffnung spannungsabhängiger Na+-Kanäle im sensorischen afferenten Neuron. Acetylsalicylsäure (ASA) und andere nicht steroidale Entzündungshemmer hemmen diese Vorgänge durch Hemmung der Prostaglandinsynthese (*modifiziert aus: Schrör, 2011).*

Inhibitoren der Prostaglandinsynthese haben schmerzlindernde und entzündungshemmende Wirkung. Beide Isoformen der Cyclooxygenase (COX1 und COX2) werden durch nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAR) gehemmt (Vane, 1971). Um die gastrointestinalen Nebenwirkungen in Form von Ulcera, Blutungen und Perforationen zu reduzieren, wurden isoformspezifische Inhibitoren für die COX2, die Coxibe, entwickelt. Dieser Vorteil der selektiven Präparate wurde jedoch durch ein gehäuftes Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse aufgehoben (Jüni et al., 2004, Trelle et al., 2011), so dass weiter nach nebenwirkungsarmen Alternativen der Schmerzhemmung gesucht werden muss. Während der Wirkmechnismus der NSAR weitgehend bekannt ist, gehört der genaue Angriffspunkt des Analgetikums Paracetamol bis heute zu den offenen Fragen der Schmerzforschung (Hinz et al., 2008; Boutaud & Oates, 2010). Die analgetische und antipyretische Wirkung ähnelt der von NSAR. Paracetamol ist jedoch nicht antiphlogistisch wirksam und nur ein schwacher Inhibitor der peripheren Prostaglandinproduktion. Die Hauptwirkung scheint wesentlich im Zentralnervensystem stattzufinden. Flower und Vane zeigten bereits 1972, dass die Prostaglandinproduktion im Gehirn zehnfach sensitiver auf Paracetamol reagierte, als die der Leber. Neuere Ansätze diskutieren weiterhin eine zentrale Wirkweise von Paracetamol, die im Wesentlichen auf der *in vivo* Hemmung der Prostaglandinsynthese beruht (Anderson, 2008; Boutaud & Oates, 2010).

1.2 Die Cyclooxygenase

Die Cyclooxygenase (COX) wurde zu Beginn der 1970er Jahre aus Samenblasen von Schweinen und Rindern isoliert (Hemler et al., 1976; Miyamoto et al., 1976). Sie katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Synthese von Prostaglandinen und wird folglich auch als Prostaglandin H Synthase (PGHS) bezeichnet. Aus Membranphospholipiden freigesetzte Arachidonsäure wird in zwei Schritten durch die Cyclooxygenase- und Peroxidaseaktivität des Enzyms zum intermediären Zwischenprodukt Prostaglandin (PG) H_2 umgesetzt. Dieses PGH_2 ist Ausgangsprodukt für die gewebsspezifisch gebildeten Prostaglandine PGD_2, PGE_2, PGF_2, PGI_2 (Prostacyclin) und TXA_2 (Thromboxan; Abb. 1-2).

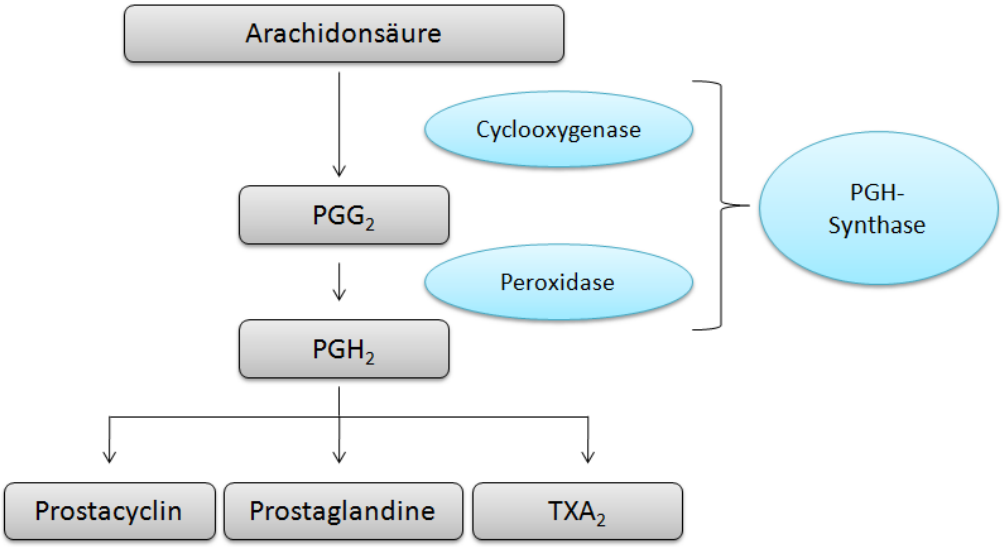


Abbildung 1-2. Schemadarstellung der Bildung von Prostaglandinen (PG), Prostacyclin und Thromboxan A2 (TXA_2) aus Arachidonsäure. Die Cyclooxygenaseaktivität wird durch ASS gehemmt (*modifiziert aus: Schrör, 2011:67).*

Cyclooxygenasen sind in der Kernhülle und im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und über monotope α-Helices in den Membranen verankert (Picot et al., 1994). Die Existenz verschiedener Isoformen des Enzyms wurde bereits 1972 vermutet (Flower & Vane, 1972). Zwei Isoenzyme als Produkte unterschiedlicher Gene sind seit den 1990er Jahren bekannt: Die COX1 und die COX2 (Xie et al., 1991). Die zwei COX-Gene (Abb. 1-3) entstanden durch Genduplikation nach der evolutionären Verzweigung zwischen Wirbeltieren und Wirbellosen (Järving et al., 2004).

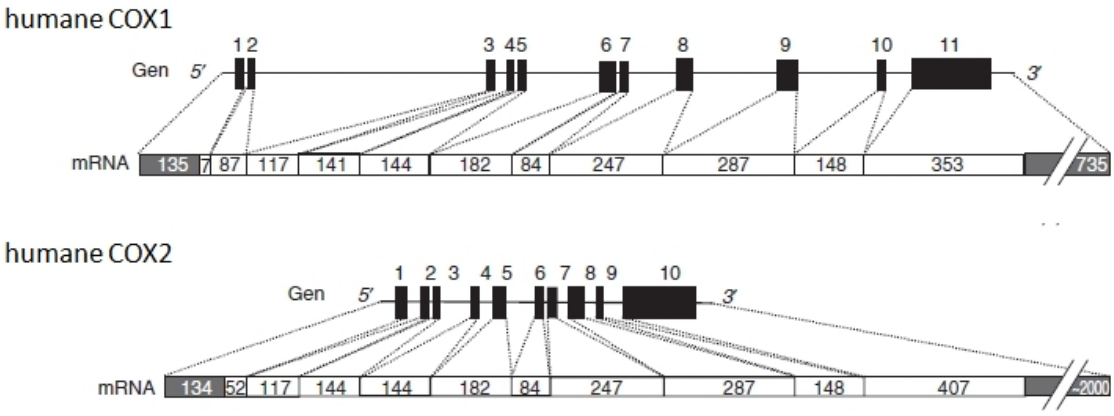


Abbildung 1-3. Schematische Darstellung des COX1- und COX2-Gens. Die schwarzen, nummerierten Boxen charakterisieren die Exons, die Linien die Introns. Die mRNA ist in Form von weißen Boxen dargestellt, welche die einzelnen Exons repräsentieren. Innerhalb der Boxen ist die Exonlänge in Nukleotiden angegeben. Graue Boxen kennzeichnen die 5'- und 3' untranslatierten Regionen *(aus: Chandrasekharan & Simmons, 2004*).

Das COX1-Gen wird konstitutiv und ubiquitär exprimiert. Eine entscheidende Rolle spielt die COX1 bei der Thrombozytenaggregation, der Kontrolle der renalen Durchblutung und der Magenschleimhautprotektion (Smith et al., 1996). Die COX2 ist vielfältig induzierbar und unter proinflammatorischen Bedingungen vermehrt zu finden. Induktoren sind Zytokine, Wachstumsfaktoren, Onkogene und Hormone. Sowohl in physiologischen Signalwegen, als auch bei pathophysiologischen Prozessen spielt sie eine zentrale Rolle. Neben ihrer Bedeutung bei Zellwachstum und Reproduktion ist sie wesentlich an Entzündungsreaktionen und Tumorgenese beteiligt (Vane & Botting, 1998; Cao et al., 1996). Da sich die COX2 in ihrer Konformation durch eine größerer Seitentasche von der COX1 unterscheidet, konnten selektive COX2-Inhibitoren synthetisiert werden.

Tabelle 1-1. Eigenschaften von COX1 und COX2 und ihrer Gene (*vgl. Chandrasekharan & Simmons, 2004*).

	COX1	**COX2**
Chromosom	9q32-q.33.3	1q25.2-25.3
Gengröße	ca. 22 kb	ca. 8 kb
Anzahl Exons	11	10
Anzahl Introns	10	9
Länge der primären mRNA	2.8 kb	4.5 kb
Länge alternativ polyadenylierter Varianten	4.5 kb, 5.2 kb	2.8 kb, 4,0 kb
Länge der kodierenden Region	1.797 bp	1.812 bp
Expression	konstitutiv	induzierbar
Proteingröße (mit Signalpeptid)	599 AS	604 AS
Proteingröße des maturen Proteins (ohne Signalpeptid)	576 AS	581 AS
Molekulargewicht (mit Signalpeptid, nativ)	68,686 kDa	68,996 kDa
Glykosylierungsstellen	3	3 bis 4
Kofaktor	Häm	Häm
Substrat	Arachidonsäure	Arachidonsäure
Quartärstruktur	Homodimer	Homodimer

Weitere Charakteristika der COX1 und der COX2 werden in Tabelle 1-1 gegenübergestellt. Die beiden COX-Isoformen sind zu 63 % sequenzhomolog (Morita et al., 1995) und bestehen aus vier funktionellen Abschnitten, die in Abbildung 1-4 gekennzeichnet sind: einem N-terminalen Signalpeptid, einer Dimerisierungs- und einer Membranbindungsdomäne sowie einem katalytischen Zentrum (Garavito & Malkowski, 2002; Simmons et al., 2004). Die COX1 mit ihren 11 Exons und 10 Introns enthält ein Intron mehr als die COX2 (10 Exons, 9 Introns). In einem weiteren Genprodukt, der sogenannten COX1b, ist dieses zusätzliche Intron1 im N-terminalen Signalpeptid retiniert (Simmons, 2003). Schon vor Entdeckung der COX1b wurde über die Beteiligung eines dritten COX-Enzyms an Schmerz, Fieber und späten Entzündungsstadien spekuliert (Botting, 2000B; Willoughby et al., 2000).

1.3 Varianten der Cyclooxygenase

Es gibt derzeit keine Hinweise auf ein distinktes drittes COX-Gen (Davies et al., 2004). Diverse Varianten der Gene bei verschiedenen Organismen sind bekannt. Neben je ca. 20 *single nucleotide polymorphisms* (SNP) auf Genomebene (vgl. Ulrich et al., 2002) wurde über alternativ polyadenylierte mRNA-Transkripte für die COX1 und COX2 berichtet (Fritsche et al., 2001; Halushka et al., 2003). Für die COX1 sind drei unterschiedlich lange mRNA-Transkripte mit Längen von 2.8, 4.5 und 5.2 kb beschrieben. Während die 2.8 kb mRNA bei der COX1 am häufigsten vorkommt (Hla, 1996), enthält das 5.2 kb Transkript besonders häufig auch die Intron1 retinierende COX1b (Chandrasekharan et al., 2002). Die verschieden polyadenylierten COX2-Transkripte präsentieren sich mit Größen von 2.2, 3.8 und 4.2 kb (Plant & Laneuville, 1999). Ferner existieren diverse alternativ gespleißte Unterformen, die im Folgenden beschrieben werden.

1.4 Alternative Spleißformen der Cyclooxygenase

Zwischen 40 und 60 % der humanen Gene werden alternativ gespleißt (Xu et al., 2002). Gehäuft kodieren diese Gene für Enzyme, Signaltransduktoren und Rezeptoren (Liu et al., 2003). Fast 15 % der alternativen Spleißformen retinieren zumindest ein Intron (Galante et al., 2004). Gene mit hohem Expressionsniveau und kurzen Introns von unter 100 bp Länge sind bevorzugt von Intronretention betroffen (Sakabe &

Souza, 2007). Alternative Spleißvarianten der COX kommen besonders häufig vor. Eine Auswahl ist in Tabelle 1-2 gelistet.

Tabelle 1-2. Alternative Spleißvarianten der Cyclooxygenasen in Säugetieren.

Variante	**Sequenzänderung**	**Organismus**	**Erstbeschreiber**
COX1			
COX1SV	111 bp Deletion in Exon9	Mensch	Diaz et al., 1992
COX1b (COX3)	94 bp Retention von Intron1	Hund, Ratte, Maus, Mensch	Chandrasekharan et al., 2002
partielle pCOX1a	94 bp Retention von Intron1, Deletion von Exon5-8	Hund	Chandrasekharan et al., 2002
partielle pCOX1b	Deletion von Exon5-8	Hund	Chandrasekharan et al., 2002
alternative spliced COX1 mRNA	Deletion in Exon1-2, partielle Retention von Intron2	Ratte	Kitzler et al., 1997
COX2			
mitogen inducible miPGHS$_{ch}$	550 bp Retention von Intron1	Huhn	Xie et al., 1991
COX2a	110 bp Deletion in Exon5	Mensch	Censarek et al., 2004
COX2b	282 bp Retention von Intron7	Mensch	Huang et al., 2005

Die meisten Spleißvarianten der COX wurden nur auf mRNA-Ebene gefunden. Beim alternativen Spleißen stellt sich auch bei der COX1b die Frage, inwieweit die Variante für ein funktionelles Produkt kodiert (Lareau et al., 2004).

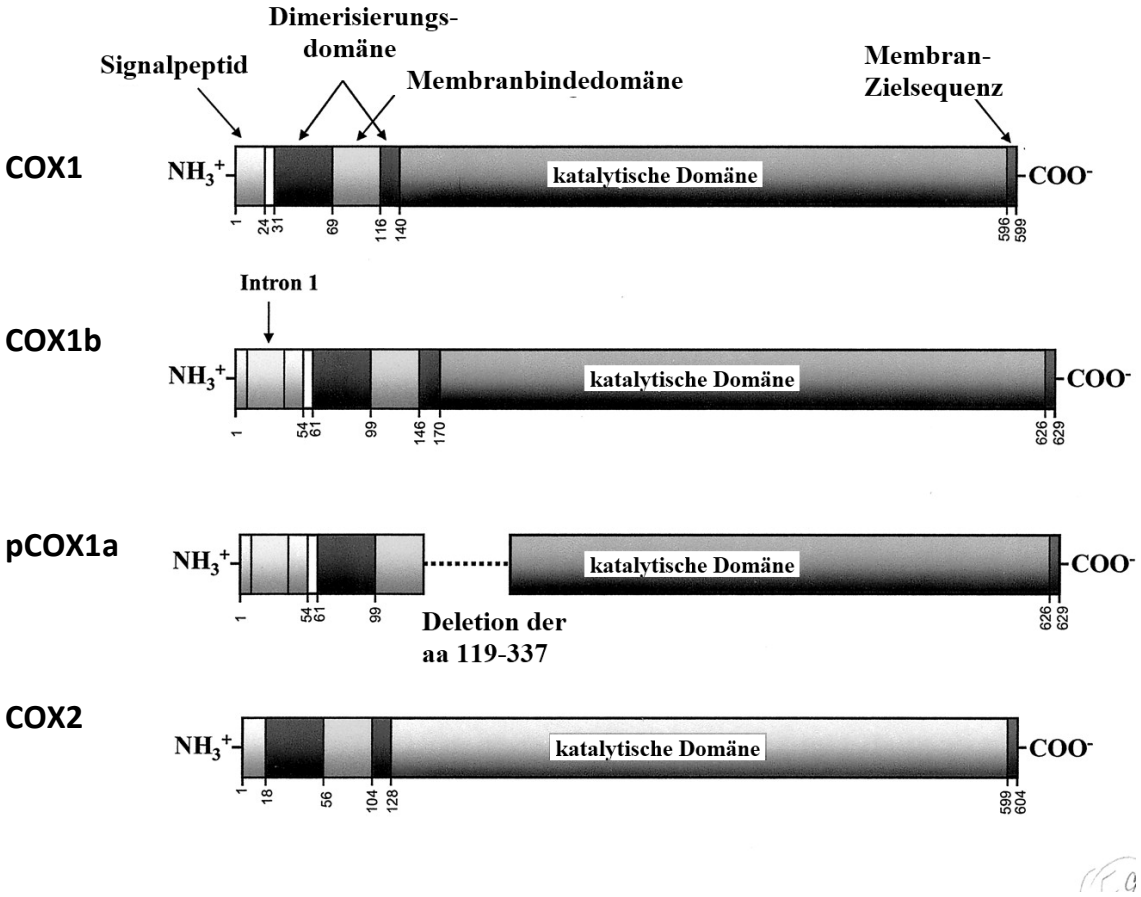


Abbildung 1-4. Darstellung ausgewählter COX-Varianten.
Darstellung der funktionellen Domänen der COX1 und COX2. COX1b entsteht durch Retention von Intron1, welches translatiert 31 Aminosäuren entspricht. Eine weitere Variante, die PCOX1a, retiniert Intron1 und überspringt zusätzlich die Exons 5-8 *(aus: Simmons et al., 2004).*

1.5 COX1b entsteht durch Intronretention

Die Erstbeschreibung der COX1b erfolgte 2002 von der Gruppe um Daniel Simmons bei Hunden (Chandrasekharan et al., 2002). Das zunächst als ‚COX3' bezeichnete Protein erhielt den Namen ‚COX1b', da es sich um ein Spleißprodukt der COX1 und nicht um das Produkt eines unabhängigen COX-Gens handelt (Davies et al., 2004). Die COX1b unterscheidet sich von der COX1 nur in der Retention des ersten Introns (vgl. Abb. 1-4). Die Frage, ob COX1b die pharmakologische Zielstruktur von Paracetamol sei, stammt aus Untersuchungen an der caninen COX1b (Chandrasekharan et al., 2002). Beim Hund resultiert aus der Retention des Intron1 die Insertion von 30 Aminosäuren in das hydrophobe Signalpeptid des Proteins.

Rätsel gibt die COX1b aus anderen Spezies auf, da das retinierte Intron1 in Maus (Shaftel et al., 2003), Ratte (Kis et al., 2003) und Mensch (Chandrasekharan et al.,

2002) den Leserahmen verschiebt. Die Insertion von 98 bzw. 94 bp verändert das offene Leseraster (*open reading frame,* ORF) am Übergang zu Exon2. Diese Verschiebung des Leserahmens bedingt beim Menschen ein verfrühtes Stoppkodon nach 249 bp, bei Ratte und Maus nach 382 bp. Konsekutiv sind verkürzte Proteine zu erwarten, die keine strukturelle Ähnlichkeit mit einer Cyclooxygenase haben (vgl. Tab. 1-3) und deren funktionelle Bedeutung zweifelhaft ist (Dinchuk et al., 2003).

Tabelle 1-3. Intron1-Längen und kalkulierte Proteingrößen der COX1b verschiedener Spezies.

Organismus	**Intron1 [bp]**	**Proteingröße [AS]**	**Molekulargewicht [kDa]**
Hund	90 bp	633	72,5
Ratte	98 bp	127	13
Maus	98 bp	127	13
Mensch	94 bp	82	8,7

Für Ratte und Maus konnte das verkürzte 13 kDa große COX1b-Proteinfragment u.a. in Niere, Herz und Gehirn (Kis et al., 2005; Kis et al., 2006) detektiert werden. Die Existenz eines funktionsfähigen humanen COX1b-Proteins wurde allerdings bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig bewiesen. Mehrere Forschergruppen äußerten Zweifel an der Entstehung eines funktionellen COX1b Proteins in humanen Zellen (Hersh et al, 2005; Kis et al., 2005).

Bei Überexpression humaner COX1b-cDNA in COS-7 Zellen (Fibroblastenzelllinie der Grünen Meerkatze) konnten Censarek et al. (2006) ein ca. 70 kDa großes Protein mit Cyclooxygenaseaktivität nachgewiesen. Dieses scheinbar voll abgelesene COX1b-Protein mit COX-Eigenschaften kann nur entstehen, wenn die Verschiebung des Leserahmens durch einen geeigneten, noch ungeklärten Mechanismus korrigiert wird (Ayoub et al., 2006). Im Speziesvergleich ergeben sich durch Intronretention Proteine unterschiedlicher Länge und Sequenz (Abb. 1-5).

```
Mensch     1 MSRECDPGARWGIFLASWWSLECQAQPLISLLCRESLALVLAVPAPAPAA  50
Hund       1 MSREFDPEAPRNPLRLPGEPRMPGPALTSRSAGGSRLHRWPLLLLLLLLL  50
Ratte      1 MSRESDPSGAPTRPGIRWPAGGALNVRLNSLFPLQEGVSRSSFPCCCSCC  50
Maus       1 MSRESDPSGAPTRPGIRWPAGGALNARLNSLFLLQEGVSRSGFPCCCSCC  50

Mensch    51 PRPARGPRGAHASESLLLLSMPAPGHLCPLRP   82
Hund      51 PPPPVLPAEARTPAPVNPCCYYPCQHQGICVRFGLDRYQCDCTRTGYSGP  100
Ratte     51 CSHHPRYCSQMLGYPHQSIPVVTIHARTRVSVSASASTTTNVTVLARATR  100
Maus      51 CRRHPRSCSQILGCPHQSIPVVTIRARTRVSVSALASTTTSVIVLARATQ  100

Mensch
Hund     101 NCTIPELWTWLRNSLRPSPSFLHFLLTHGRWFWEFINATFIRDMLMRLVL  150
Ratte    101 APTVLSLRSGPGFGVPCGPAPHSPISC  127
Maus     101 APTVPSLRSGPGFGILCGPAPRSPISC  127
```

Abbildung 1-5. Vergleich der putativen Aminosäuresequenzen für die COX1b in Mensch, Hund, Ratte und Maus. Nur die ersten 150 Aminosäuren der Sequenz des Hundes sind dargestellt. Die durch Intron1 kodierte Sequenz ist unterstrichen (*aus: Kis et al., 2005).*

1.6 COX1b-mRNA in humanem Gewebe

Die Existenz einer COX1b-mRNA in humanen Zellen gilt als gesichert. COX1b-mRNA ist vor allem in Gehirn und Herz des Menschen stark exprimiert (Cui et al., 2004), überdies auch in Magen, Skelettmuskel, Plazenta, Leber, Pankreas, Milz, Hoden, Nieren und Nebennieren (Qin et al., 2005). Semiquantitativ wurde im Rattengehirn der Anteil der COX1b-mRNA an der Gesamt-COX1-mRNA auf 5 bis 30 % geschätzt (Chandrasekharan et al., 2002; Kis et al., 2004).

1.7 Selektive COX1b Inhibitoren?

Die physiologische Bedeutung der COX1b-Enzymvariante ist nicht vollständig aufgeklärt. Als mögliche Bedeutungsfelder wurden das Entzündungsgeschehen, Morbus Alzheimer (Cui et al., 2004), Kolonkarzinome, Leukämie und gynäkologischen Krebsformen (Kam & See, 2000) genannt. Obwohl die COX1b zunächst für das lang gesuchte entscheidende Element in der Erklärung der antipyretischen Wirkung von Paracetamol gehalten wurde, stellte sich heraus, dass die beim Hund (Chandrasekharan et al., 2002) beschriebene Hemmung der COX1b unspezifisch, nur schwach und insgesamt nicht ausreichend war, um die Wirkung von Paracetamol hinreichend zu erklären (Schwab et al., 2003 a). Chandrasekharan et al. (2002) beschrieben eine insgesamt niedrige Enzymaktivität der COX1b des Hundes. Diese wurde durch Beeinflussung der Enzymfaltung und damit der Konformation des aktiven Zentrums bei Retention

der Intronsequenz erklärt (Kis et al., 2003). Aminopyrin und Antipyrin wurden im Vergleich mit COX1 als stärkere Inhibitoren der COX1b bewertet (Chandrasekharan et al., 2002; Botting, 2003). Seitdem wurde sie in der Literatur als selektive COX1b Inhibitoren bezeichnet (Botting & Ayoub, 2005). Das bei der Maus entstehende 13 kDa große COX1b-Protein hat keine katalytische Wirksamkeit (Li et al., 2008). Humane, sequenzkorrigierte COX1b in COS-7 Zellen ist zwar sensitiv gegenüber ASS, jedoch nicht durch Paracetamol hemmbar (Censarek et al., 2006).

1.8 Aufgabenstellung

Da COX1b-mRNA in humanen Zellen sicher nachgewiesen wurde, stellt sich die Frage, ob daraus beim Menschen ein funktionelles Protein entsteht. Der erforderliche Mechanismus, um den Leserahmen der mRNA wiederherzustellen, ist seit langem Gegenstand des wissenschaftlichen Disputes, konnte aber bisher nicht aufgeklärt werden. Literaturhinweise liefern widersprüchliche Angaben zur Korrektur des ORF. Der eindeutige Nachweis der humanen COX1b auf Proteinebene, z.B. durch Massenspektrometrie, wurde bis heute nicht durchgeführt (Roos & Simmons, 2005).

Aufgabe dieser Arbeit war, die Expression der COX1b auf mRNA- und Proteinebene in einem humanen Zellsystem, humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293), zu untersuchen. Der Schwerpunkt lag in der Analyse von Struktur und Beschaffenheit des N-Terminus des Proteins. Daraus sollten Rückschlüsse auf den verwirklichten Korrekturmechanismus möglich werden.

Folgende Ziele wurden formuliert:

1.) Untersuchung des Korrekturmechanismus auf mRNA-Ebene, der den ORF wiederherstellt, dazu Bestimmung von Länge und Sequenz von Intron1 in der humanen COX1b-mRNA sowie mRNA Strukturvorhersage;
2.) Expression N-terminal markierter COX1b-Varianten in humanen Zellen und Vergleich mit COX1 und der leserasterkorrigierten Mutante COX1bΔG;
3.) Aufreinigung von COX1b-Proteinen und Charakterisierung des N-Terminus mittels Massenspektrometrie.

MATERIAL UND METHODEN

2.1 Substanzen

Alle nicht gesondert in Tabelle 2-1 aufgeführten Chemikalien und Lösungsmittel wurden in p.a. Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Die Restriktionsenzyme stammten von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot).

Tabelle 2-1. Substanzen.

Substanz	**Hersteller**
293 Freestyle Expression Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
100 bp DNA Ladder	Invitrogen (Karlsruhe)
Accusure DNA Polymerase	Bioline (Luckenwalde)
Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung 40 %	BioRad (München)
Agarose	Life Technologies (Paisley, Schottland)
Ammoniumpersulfat	BioRad (München)
Bacto Tryptone	BD Biosciences (Heidelberg)
Bio-X-ACT Short DNA Polymerase	Bioline (Luckenwalde)
DMEM Low glucose, 31885-049	Gibco-Invitrogen (Karlsruhe)
dNTP Mix 10mM	Qiagen (Hilden)
ECL advance Western blotting detection kit	GE Healthcare Europe (München)
GenElute mRNA Miniprep	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Gewebeblot (W1234404, lot. B304008)	BioChain (Hayward, CA USA)
GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit	Amersham (Freiburg)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
Hoechst 33324 Kernfärbung	Sigma-Aldrich (München)
HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen (Hilden)
I-max II DNA Polymerase	iNtRON Biotechnology (Freiburg)
Kodak GBX Developer	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Lipofectamine 2000	Invitrogen (Karlsruhe)
Lumi.Light Western Blotting Substrat	Roche (Mannheim)
Ni-NTA Agarose	Qiagen (Hilden)
n-Octyl-ß-D-Glucopyranosid	Calbiochem-Merck (Darmstadt)
Nucleobond-AX Plasmid-Midi-Präp Kit	Macherey Nagel (Düren)
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)

PEI linear 25 kDa	Polysciences (Warrington, PA USA)
Protein G Plus Agarose	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Protein-A Agarose	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Protease Inhibitor Cocktail Set III, EDTA-Free	Calbiochem-Merck (Darmstadt)
Protino Ni-TED Packed Columns	Macherey Nagel (Düren)
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
TRIZOL Reagenz	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin/EDTA	Invitrogen (Karlsruhe)
Vectashield Mounting Medium	Vector Lab (Burlingame, CA USA)

2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Zellkulturmaterialien für den Einmalgebrauch wurden von der Firma Greiner Bio-One (Frickenhausen) bezogen. Alle weiteren Materialien werden in Tabelle 2-2 aufgeführt.

Tabelle 2-2. Geräte und Verbrauchsmaterialien.

Material	**Hersteller**
Blot-Kammer: Semi-Phor Blotter	Hoefer (Amstetten)
Brutschrank	Heraeus (Düsseldorf)
Colorview II Kamera mit SIS-Software	Soft Imaging Systems (Münster)
Coverslips Deckgläser 13mm	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Data Analysis 4.0 Software	Bruker Daltonics (Bremen)
Durchlichtmikroskop IX 50	Olympus (Hamburg)
Durchlichtmikroskop BX 50	Olympus (Hamburg)
ECL plus Detection Reagent	GE Healthcare (München)
Esquire Control Software	Bruker Daltonics (Bremen)
Feinwaage: AE 50	Mettler Toledo GmbH (Giessen)
Glaskapillaren Distal coated SilicaTips	New Objective (Woburn, MA USA)
Graph Pad Prism 5	GraphPad (La Jolla, CA USA)
GS-800 Calibrated Densitometer Scanner	Bio-Rad (München)
HCT Ultra PTM Ion Trap Massenspektrometer	Bruker Daltonics (Bremen)
HPLC System Dionex U3000	Dionex (Idstein)
Hyperfilm ECL Röntgenfilm	GE Healthcare (München)
Immobilon PVDF Membran	Millipore (Eschborn)
Mastercycler Gradient PCR-Gerät	Eppendorf (Hamburg)
Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik (Staufen)

Milli-Q-Anlage	Millipore (Eschborn)
Minifuge GL	Heraeus (Düsseldorf)
Nanodrop 1000 Spectrophotometer	Peqlab (Erlangen)
Neubauer-Zählkammer	Optik Labor (Friedrichshofen)
PepMap Vorsäule 0.3 mm ID × 5mm	Dionex (Idstein)
PepMap Säule 75 µm ID × 150mm, 3µm particle	Dionex (Idstein)
pH-Meter: Digital pH-Meter	Knick (Berlin)
Photometer: Model 550, Microplate Reader	Bio-Rad (München)
Pipetten (2,5 µl, 20 µl, 100 µl, 1 ml)	Eppendorf (Hamburg)
PowerPac 200 Power Supply	Bio-Rad (München)
ProteinScape 2.1 Software	Bruker Daltonics (Bremen)
Reaktionsgefäße (1.5 ml, 0.5 ml, 2.0 ml)	Eppendorf (Hamburg)
SDS-Gelkammer: Mini-Protean Cell II	Bio-Rad (München)
Sonifier B-12	Branson Sonic (Danbury)
Speedvac Zentrifuge	Savant Instruments (Holbrook, NY USA)
Sterilbank: Safety bench HLB 2448 GS	Heraeus (Düsseldorf)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge: Centrifuge 5415 R	Eppendorf (Hamburg)
Ultrazentrifuge L8-M60 mit Ti70 Rotor	Beckmann (München)
Waage	Sartorius AG (Göttingen)
Wärmeschrank	Gerhardt (Königswinter)
Quantity One Software	Bio-Rad (München)

2.3 Antikörper

Die verwendeten Antikörper sind mit den Reaktionsbedingungen in Tabelle 2-3 gelistet.

Tabelle 2-3. Im Immunoblot und in der Immunpräzipitation verwendete Primärantikörper.

Antikörper	**Hersteller - Spezies**	**Reaktionsbedingungen**
α-COX1-Antikörper	Cayman (#160110) - Maus	1:200 in 5 % TBSTM
6X α-His-Tag-Antikörper [HIS.H8]	abcam (#ab18184) - Maus	1:2.000 in5 % TBSTM
α-FLAG M2-Antikörper	Stratagene, (# 200470-21) - Maus	1:2.000 in 5 % TBSTM
α -Turbo-GFP(d)-Antikörper	everogen, (# AB513) - Kaninchen	1:20.000 in 5 % TBSTM
α-COX1b-Antikörper	pickcell custom hybridoma (custom made) - Kaninchen Ac-SRECDPGARWGC-amid	1:500 in 5 % TBSTM

Der Antikörper mit dem Epitop Ac-SRECDPGARWGC-amid wurde in Analogie zum bereits publizierten Antikörper von Qin et al. (2005) synthetisiert. Er richtet sich gegen die Aminosäuren 2 bis 12 der hypothetischen humanen COX1b, und damit gegen den Anfang von Intron1. Auf das N-terminale Methionin wurde verzichtet, um auch getaggte Varianten nachweisen zu können. Dieser Antikörper wird als α-COX1b-AK bezeichnet.

Tabelle 2-4. Im Immunoblot und in der Immunpräzipitation verwendete Sekundärantikörper.

Antikörper	**Hersteller/ Spezies**	**Reaktionsbedingungen**
α-rabbit IgG, HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology (# sc 2004)/ Ziege	1:3000/ 1:20.000 in 5 % TBSTM
α-mouse IgG, HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology (#sc 2005)/ Ziege	1:3000 /1:20.000 in 5 % TBSTM

2.4 Puffer und Lösungen

Zur Herstellung der Lösungen wurde Reinstwasser aus einer Milli-Q-Anlage (Millipore; Eschborn) verwendet. Tabelle 2-3 fasst die Zusammensetzungen der Puffer und Lösungen zusammen.

Tabelle 2-5.Zusammensetzung der Puffer und Lösungen.

TBS	150 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl; pH 7,4
TBST	150 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl; 0,1 %(v/v) Tween-20; pH 7,4
Blockierpuffer TBSTM	TBST; 5 % (m/v) Milchpulver
Amido-Schwarz Färbelösung	0,1 % (m/v) Amido-Schwarz; 25 % (v/v) Isopropanol; 10 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung (Amido-Schwarz Färbung)	25 % (v/v) Isopropanol; 10 % (v/v) Essigsäure
Kolloidale Coomassie Färbelösung	25 % (m/v) Coomassie Brillant Blue R 250; 34 % Methanol; 2 % Phosphorsäure; 17 % Ammoniumsulfat
Fixierlösung (Kolloidale Coomassie Färbung)	50 % (v/v) Methanol; 2 % (v/v) Phosphorsäure
Fixierlösung (Röntgenfilm)	1 % (m/v) $K_2S_2O_5$; 20 % (m/v) $Na_2S_2O_3$

TBE (10 ×)	0,89 M Tris/HCl; 0,89 M Borsäure; 20 mM EDTA; pH 8,3
Blaumarker (10x) für DNA-Gele	30 % (v/v) Glycerol; 0,04 % (m/v) Bromphenolblau
LB Luria Broth	10 g NaCl ;10 g Bacto Tryptone; 5 g Hefeextrakt ad 1 l H_2O .Bei Proteinexpression LB mit 0,4 % Glucose; mit jeweils 100µg/ml Ampicillin; Zur Herstellung von LB-Platten wurden dem Medium 15 g/l Agar zugesetzt.
Laemmli-Puffer (4×)	25 mM Na_2HPO_4/ NaH_2PO_4-Puffer (pH 7,0); 40 % Glycerin; 8 % SDS; 0,02 % Bromphenolblau; DTT wurde ad 100 mM frisch zugegeben (Endkonz. in 1× Laemmli).
Paraformaldehyd-Lösung	Paraformaldehyd 4 % (m/v) in PBS; pH 7,4
PBS	2,7 mM KCl; 1,5 mM KH_2PO_4; 137 mM NaCl; 8,3 mM Na_2HPO_4; pH 7,4
LEW Puffer	300mM NaCl; 50 mM NaH_2PO_4 H_20; pH 7,4
Tris Puffer	250mM NaCl; 50 mM Tris; pH 7,4
RIPA Puffer *(modifiziert)*	150 mM NaCl; 1 % (v/v) Triton X-100; 1 % (m/v) NOG; 50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 0,1 % (m/v) SDS; 1 % (m/v) Natriumdesoxycholat; pH 7,4, PMSF wurde ad 1 mM frisch zugegeben.

2.5 Plasmide

Als Expressionsvektoren dienten drei Vektorgrundgerüste: pcDNA3, pSG-5 und pmaxFP für die Transfektion von HEK- und COS-Zellkultur. Für die Expression in *E. coli* wurde das COX1b-His und COX1bΔG-His-Konstrukt in den Vektor pET-21b kloniert. Zur Testung der Transfektionseffizienz diente pEGFP-N1 mit GFP als Reportergen (Kontrolle unter UV-Licht). Der pCR4-TOPO-Vektor diente der Zwischenklonierung für die Sequenzierung von COX1b-cDNA.

Tabelle 2-6a. Plasmidrahmenkonstrukte.

Plasmid	**Resistenz**	**Hersteller**
pEGFP-N1	Neomycin	Clontec (Saint-Germain-en-Laye)
pcDNA 3.1	Ampicillin	Invitrogen (Karlsruhe)
pSG-5-FLAG	Ampicillin	Stratagene (Amsterdam)
pCR4 TOPO TA	Ampicillin/Kanamycin	Invitrogen (Karlsruhe)
pmaxFP-GreenC	Neomycin/Kanamycin	Lonza (Basel)
pET 21b	Ampicillin	Novagen-Merck (Darmstadt)
His-Strep pQE-TriSystem	Ampicillin	Qiagen (Hilden)

Tabelle 2-6a. Plasmidkonstrukte.

COX1-Konstrukte	pcCOX1
	psgCOX1
	pmaxFP-COX1-GFP
COX1b-Konstrukte	pcCOX1b-His
	pETCOX1b-His
	psgCOX1b-FLAG
	pmaxFP-COX1b-GFP
	PQE-COX1b-Strep/His
COX1bΔG-Konstrukte	pcCOX1bΔG-His
	pETCOX1bΔG-His
	psgCOX1bΔG-FLAG
	pmaxFP-COX1bΔG-GFP
	PQE-COX1bΔG-Strep/His

2.6 Primer

Die aufgelisteten Oligonukleotidprimer wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen und in Reinstwasser aus einer Milli-Q-Anlage aufgenommen.

Tabelle 2-7. Oligonukleotide.

Bezeichnung	**Sequenz**	**Tm (AT+GC)**
Genotypisierung		
hCOX1b gen 5‘	5’ –AGGAGCCTGCACTCTGCGTC- 3’	61 °C
hCOX1b gen 3‘	5’ –GCAGGAACAGCAAGAACCGGA- 3’	61 °C
p53 PCR		
p53 5‘	5‘-CGTGAGCGCTTCGAGATATTCCG-3‘	67 °C
p53 3’	5’-CCTAACCAGCTGCCCAACTGTAG-3’	67 °C
Tag übergreifende PCR		
5AFLAG-COX	5‘-GGATTACAAGGATGACGACGA-3‘	57 °C
3AFLAG-COX	5‘- GAGCAGGAACAGCAAGAACC-3‘	57 °C
TOPO Sequenzierung		
T7 Primer	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3‘	
5’ His-Tag Markierung		
COX1b-His-5’	5’-TATA*AAGCTT***ATG**CACCACCACCACCACCAC**AGCC *HindIII* **Start** 6x His GTGAGTGCGACCCC-3’	
COX1b-His-3’	5’-TATA*CTCGAGGGCGGCCGC***TCA**GAGCTCTGTG *XhoI* *NotI* **Stop** GATGGTC-3’	
5’ GFP-Tag Markierung (pmaxFP-GreenC)		
COX1b GFP 5’	5’-TATAT*CTCGAG***AT**AGCCGTGAGTGCGACCC-3’ *XhoI* **„Füllbasen“**	
COX1 GFP 5’	5’-TATAT*CTCGAG***AT**AGCCGGAGTCTCTTGCTC-3’ *XhoI* **„Füllbasen“**	
COX1(b) GFP 3`	5’-TATATA*GGATCC*GAGCTCTGTGGATGGTCG-3’ *BamHI*	
Klonierung in das pQE-Trisystem His.Strep-2		
1b Strep2 Fxa 5’	5’-TATATA*GGATCC***A**ATCGAGGGAAGGAGCCGT *BamHI* **„Füllbase“** FXa-Schnittstelle GAGTGCGACCCC-3’	
1 Strep2 Fxa 5’	5’- TATATA*GGATCC***A**ATCGAGGGAAGGAGCCG *BamHI* **„Füllbase“** FXa-Schnittstelle GAGTCTCTTGCT -3’	
1(b) 3ATag Hind 3‘	5’-TATATA*AAGCTT*GAGCTCTGTGGATGGTCG-3’ *HindIII*	

2.7 *E. coli* Bakterienstämme

Zur Anzucht von *E. coli* Stämmen wurde LB-Medium verwendet. Zum Resistenzgen des Vektors passende Antibiotika wurden in einer Konzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Tabelle 2-8 zeigt diesen Zusammenhang.

Tabelle 2-8. Für Transfektion und Transformation eingesetzte *E. coli* Bakterienstämme.

Bezeichnung	**Referenz**	**Genotyp**
BL21 (DE3)	Novagen-Merck (Darmstadt)	F^- *omp*T *gal* [*dcm*] [*lon*] *hsd*S_B (r_B-,m_B-) λ(DE3)
DH5αF‘	Invitrogen (Karlsruhe)	F- / *end* A1 *hsd* R17(rk -, mk +) *gln* V44 *thi* -1 *rec* A1 *gyr*A (Nalr) *rel* A1 Δ(l*ac* ZYA-*arg*F) U169 *deo*R (Φ80*dlac* Δ(*lac* Z)M15)
One Shot MAX Efficiency DH5α- T1R	Invitrogen (Karlsruhe)	F- Φ80*lac* ZΔM15 Δ(*lac* ZYA-*arg* F)U169 *rec* A1 *end* A1 *hsd* R17(rk -, mk+) *pho*A *sup* E44 *thi* -1 *gyr* A96 *rel* A1 *ton*A

2.8 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Die Rubidiumchlorid-Methode wurde genutzt, um Bakterien der Stämme BL21 (DE3) und DH5αF’ chemisch kompetent zu machen. Jeweils eine Kolonie wurde von einem Agar-Ausstrich gepickt und über Nacht in einer 5 ml LB Vorkultur kultiviert. Mit 500µl dieser Vorkultur wurden 50 ml LB angeimpft und bis auf eine OD_{600} von 0,4-0,6 vermehrt (70 rpm, 37 °C). Die Zellsuspension wurde in ein Falconröhrchen überführt, 15 min auf Eis gekühlt und bei 4 °C (15 min, 1.000 x g) pelletiert. Das leicht getrocknete Pellet wurde in der Folge in 20 ml Lösung RF1 resuspendiert und nach 1-2 h Inkubation auf Eis und erneuter Zentrifugation (15 min, 1000 x g, 4 °C) in 4 ml RF2 aufgenommen, homogenisiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert (á 150µl). Nach

Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff wurden die kompetenten Zellen bei -80 °C gelagert.

RF1	100mM RbCl; 50mM NaCl; 30mM KCl; 10mM CaCl2 $2H_2O$; 15 % (m/v) Glycerin; pH 5,8, steril filtriert durch 0,22µm Membran
RF2:	10mM MOPS; 10mM RbCl; 75mM CaCl2 $2H_2O$; 15 % (m/v) Glycerin; pH 6,8, steril filtriert durch 0,22µm Membran.

2.9 *E. coli* Transformation

2.9.1 *E. coli* Transformation zur Plasmidamplifikation

Die Plasmid-Reamplifikation erfolgte im *E. coli* Stamm DH5α-F' unter Ausnutzung des Resistenzgens des zu amplifizierenden Vektors. Aliquots chemisch kompetenter Zellen wurden mit 1- 2 µg DNA versetzt, aufgetaut und nach einem Hitzeschock (50 s, 42 °C) im Heizblock mit 900 µl LB Medium versetzt. Eine Stunde bei 37 °C und 65 rpm im Brutschrank diente der Regeneration der Zellen, bevor mit dieser Vorkultur eine 50-100 ml Kultur angeimpft wurde. Diese Kulturen waren zur Plasmidselektion mit 100 µg/ml Antibiotikum (vgl. Tab. 2-6) versetzt. Nach einer Anzucht über Nacht bei 75 rpm und 37 °C wurden die Zellen pelletiert (10 min, 4.000 x g) und für die Plasmidextraktion, die unter 2.21 beschrieben wird, lysiert.

2.9.2 *E. coli* Transformation zur Proteinexpression

Zur Proteinexpression eingesetzte *E. coli* BL21 (DE3) wurden in LB Medium mit 0,4 % Glukose kultiviert. Eine Übernachtkultur in 50 ml LB wurde bei 75 rpm und 28 °C herangezogen. Am nächsten Morgen wurde diese Vorkultur in einem Liter vorgewärmtem Medium auf eine OD_{600} von 0.1 verdünnt. Wenn die Dichte nach 2-3 Stunden eine OD_{600} von 0.6-0.8 erreicht hatte, wurde die Proteinproduktion durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid, synthetischer Induktor des Lac-Operons) in einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Die so zur Proteinexpression stimulierten BL21 Zellen wurden nach 3-4 h durch Zentrifugation (20 min, 5.000 x g, 20 °C) geerntet und die Zellpellets bei -20 °C gelagert.

2.10 Allgemeine Zellkultur-Methoden

Alle die Zellkultur betreffenden Verfahren wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank unter Laminar Air Flow durchgeführt. Details sind in Tabelle 2-9 dargestellt. Die Zellzahl und -viabilität wurden mittels Trypanblau-Färbung bestimmt. Trypanblau durchdringt die Zellwand toter Zellen und färbt diese blau an. Dazu wurden 20 µl Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau versetzt und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Nur wenn die Viabilität über 95 % lag, wurden die Zellen zur Transfektion verwendet.

Tabelle 2-9. Für die Transfektion eingesetzte Zellkulturlinien.

Zelllinie	**Nr.**	**Organismus**	**Zelltyp**	**Medium**
HEK 293	ATCC CRL 1573	*Homo sapiens*	embryonale Nierenzelle, adhärent	suppl. DMEM, 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin
HEK Freestyle 293-F Cells	Invitrogen Kat. # R790-07	*Homo sapiens*	embryonale Nierenzelle in Suspension	293 Freestyle Expression Medium, 50 U/ml Penicillin, 0,05 mg/ml Streptomycin
COS-7	ATCC CRL 1651	*Cercopithecus aethiops* (Grüne Meerkatze)	Nierenzell-Fibroblasten, adhärent	suppl. DMEM, 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin

2.10.1 HEK 293

Bei HEK 293 (*human embryonic kidney*) Zellen handelt es sich um adhärent wachsende, mit Adenovirus 5 transformierte embryonale Nierenzellen. Adhärente HEK 293 Zellen wurden in DMEM, supplementiert mit 4,5 g/l Glucose und 10 % FCS in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37 °C, 5 % CO2 und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert und einmal pro Woche bei einer Konfluenz von ca. 90 % im Verhältnis 1:50 gesplittet. 48 h vor Transfektion wurden die Zellen auf 12.500 Zellen pro cm² ohne Zusatz von Antibiotika ausgesät.

2.10.2 COS-7

Die Fibroblastenzelllinie COS-7 wurde 1981 aus Nierengewebe Grüner Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*) gewonnen. COS-7 Zellen wuchsen unter denselben Bedingungen wie HEK 293 Zellen in D100er Zellkulturschalen und wurden alle 10 Tage im Verhältnis 1:30 gesplittet. 48 h vor Transfektion wurden die Zellen auf 12.500 Zellen pro cm² ohne Zusatz von Antibiotika ausgesät.

2.10.3 HEK 293-f

Die Suspensionszellen HEK 293-f Freestyle (FS) wurden in Freestyle Medium der Firma Invitrogen angezogen. Sie wurden im Zellinkubator bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in einer 8 % CO_2-Atmospäre in konstanter Bewegung gehalten(vgl. Durocher et al., 2002; Muller et al. 2005). Als optimal erwies sich dafür eine zu 1/3 gefüllte Schott-Glasflasche mit Rührfisch (Deckel 1/4 Umdrehung zugedreht) bei 130 rpm auf dem Magnetrührer oder eine T75er Zellkulturflasche mit 20 ml Zellsuspension auf einer Wippe mit 60 Kippbewegungen/min.

2.11 Transfektion

Die Transfektion erfolgte in der Phase des exponentiellen Wachstums, d.h. jeweils 24h nach Aussaat. Für die transiente Transfektion wurden zwei Verfahren eingesetzt: Die Transfektion der adhärenten Zelllinien HEK 293 und COS-7 wurde mit Lipofectamine 2000 durchgeführt, während HEK 293-f Suspensionszellen mit dem linearen Polyethylenimin (PEI) transfiziert wurden. Als Transfektionskontrolle wurde stichprobenartig parallel GFP-Plasmid transfiziert, dessen Expression vor Zellernte unter UV-Licht überprüft werden konnte.

2.11.1 Transiente Transfektion der adhärenten Zellen mit Lipofectamine 2000

Vor der Transfektion der COS-7 und HEK 293 Zellen erfolgte ein Mediumwechsel auf 10 % DMEM ohne Antibiotika. Pro 24-Loch-Platte wurde 1 µg DNA in 50 µl serumfreiem DMEM gelöst und 5 min bei RT inkubiert. Lipofectamine wurde, 2µl ad 50 µl in

Hungermedium vorverdünnt, zur DNA gegeben. Nach 20 min Inkubation bei RT wurde die Transfketionsmischung auf die Zellen gegeben.

2.11.2 Transiente Transfektion der Suspensionszellen mit linearem PEI

Die Transfektion von Suspensionszellen HEK 293-f resultiert durch die höhere Zellmasse in einer höheren Ausbeute an Proteinen. Lineares Polyethylenimin (PEI) diente als kationisches Transfektionsreagenz. Lineares pulverförmiges Polyethylenimin (Polysciences) wurde nach dem Protokoll von Tom et al. (2008) unter Rühren bei niedrigem pH-Wert über 3 Stunden in Millipore-Wasser gelöst. Die PEI Stocklösung mit einer Konzentration von 1mg/ml wurde durch eine 0,22 µm Membran steril filtriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. 24 Stunden nach Aussaat auf 0,5 x 10^6 Zellen/ml wurden die HEK-Freestyle Zellen bei einer Dichte von 10^6 Zellen/ml transfiziert. Am Tag der Transfektion erfolgte kein erneuter Mediumwechsel. Antibiotika im serumfreien Medium beeinflussten die Transfektionseffizienz nicht. Pro ml Zellsuspension wurden 2 µg DNA eingesetzt. Diese wurde 1:250 in vorgewärmtem PBS verdünnt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. PEI wurde im Verhältnis von 1:3 bis 1:4 (DNA:PEI) direkt aus der Stammlösung zugegeben. Das Transfektionsgemisch wurde 3 x 3 s kräftig gevortext und 15 min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Transfektionsgemisch auf die Zellen gegeben, die Flasche geschwenkt und wieder in den Brutschrank zurückgegeben. Die Ernte erfolgte vier Tage später durch Zentrifugation.

2.12 Extraktion von Gesamt-RNA

Die Präparation von Gesamt-RNA aus HEK 293 Zellen erfolgte mittels Trizol (Invitrogen) entsprechend der Herstellerangaben. Dazu wurden die mit PBS gewaschenen Zellen in 1 ml Trizol pro 6-Lochplatte suspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Die wässrige phenolhaltige Phase wurde durch Zugabe von 200 µl Chloroform extrahiert und die DNA mit 450 µl Isopropanol präzipitiert. Die gewonnene RNA wurde nochmals nach Zugabe von 200 µl H_2O, 20 µl steriler 5M Kaliumacetat und 400 µl Ethanol bei 4 °C über Nacht ausgefällt. Das durch 30 min Zentrifugation (16.100 x g, 4 °C) gewonnene RNA-Pellet wurde in 20 µl sterilem H_2O aufgenommen. Konzentration und

Reinheit wurden durch Extinktionsmessung (siehe 2.14) bestimmt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei –20 °C.

2.13 RNA Strukturanalyse

Die RNA Strukturanalyse wurde analog der Veröffentlichung von Censarek et al. (2006) mit den Algorithmen RNAfold und pknots RG (Hofacker, 2003; Reeder & Giegerich, 2004) von Prof. Dr. G. Steger (Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt.

2.14 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von DNA und RNA in Lösungen erfolgte durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm im Nanodrop Spektralphotometer. Durch die Messung der Absorption bei 280 nm und Bestimmung des 260/280 nm-Quotienten konnte zudem der Grad der Reinheit bestimmt werden. Nur bei einem Quotienten 260/280 größer als 1,85 wurden die Plasmidpräparationen weiterverwendet. Plasmidpräparationen wurden durch Zugabe von sterilem H_2O auf Konzentrationen zwischen 0,6 und 1,2 µg/µl eingestellt.

2.15 Aufreinigung von mRNA

Die Isolierung von Poly-A+ mRNA erfolgte mit dem Genelute Kit (Sigma) nach Herstellerangaben. An Polystyrol gebundene Oligo $(dT)_{30}$ Reste dienen dabei mit ihren Thymidinresten als Hybridisierungspartner für die Poly-A+ mRNA. Für die Isolierung von mRNA wurden je 150 µg gesamt-RNA (vgl. 2.12) eingesetzt.

2.16 cDNA Synthese

Die cDNA Synthese aus RNA wurde mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben durchgeführt. Pro Ansatz wurden 200 bis 1000 ng RNA nach folgendem Schema in cDNA umgeschrieben:

2 µl	10x RT Puffer
1 µl	20x dNTP-Mix 100 mM
2µl	10x random hexamer Primer
1 µl	Multiscribe RT Enzym
x µl	RNA Probe
ad 20 µl	H_2O

Programm:

10 min	25 °C
2h	37 °C
5 min	85 °C
Abkühlen auf	4 °

2.17 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktionen wurde in einem Eppendorf Mastercycler durchgeführt. Es wurde jeweils eine Wasserkontrolle mit ultrareinem Wasser eingesetzt. Die Sequenzen der eingesetzten Oligonukleotide sind unter 2.6 zusammengefasst.

2.17.1 p53 PCR

Die p53 PCR diente dem Nachweis von Verunreinigungen in cDNA Proben durch genomische DNA. Sie wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

0,5 µl	dNTP (10 mM)
1 µl	5‘-Primer p53-5’ (10 µM)
1 µl	3‘-Primer p53-3’ (10 µM)
3 µl	PCR Puffer (10 x)
0,2 µl~1U	Qiagen HotStarTaq Polymerase
23,5 µl	H_2O
0,5 µl	cDNA Probe

Programm:

15 min	95 °C
30 s	94 °C
30s	67 °C
2 min	72 °C
30 Zyklen	
6 min	72 °C
Abkühlen auf	4 °C

Die Produkte wurden 1:5 mit Ladepuffer versetzt und zum analytischen Ausschluss von Verunreinigungen auf ein 1 %iges Agarose-TBE- Gel (siehe 2.19) aufgetragen.

2.17.2 FLAG-Tag übergreifende PCR

48h nach Transfektion von HEK 293 Zellen mit psgCOX1b-FLAG, psgCOX1bΔG-FLAG und als Negativkontrolle PQE-COX1b-Strep/His wurde die Gesamt-RNA isoliert und mRNA über ihren Poly-A-Anhang aufgereinigt (siehe 2.15). Die aufgereinigte mRNA wurde (wie in 2.16 beschrieben) in cDNA umgeschrieben. Auf der cDNA wurde eine PCR über 35 Zyklen durchgeführt. Die Primer flankierten Intron1 ohne es zu überschneiden, so dass bei Vorhandensein des Introns ein ca. 170 bp großes und bei Fehlen des Intron1 ein 76 bp großes Produkt zu erwarten war. Der 5‘ Primer richtete sich gegen eine für den FLAG-Tag kodierende Region. Damit war eine Amplifikation zelleigener COX1 ausgeschlossen. Die Primersequenzen sind Tabelle 2-7 zu entnehmen. Die PCR Produkte wurden in einem Agarosegel (siehe 2.19) aufgetrennt und unter UV-Licht visualisiert.

0,4 µl	MgCl2
2 µl	10x Puffer Accusure
1,5 µl	dNTP 10mM
1,5 µl	5’- Primer A 5AFLAG-COX
1,5 µl	3’- Primer B 3AFLAGCOX
1 µl	Accusure Polymerase
150ng	cDNA Probe
ad 20 µl	H_2O

Programm:

10 min	95 °C
1 min	94 °C
1 min	59 °C
1 min	72 °C
35 Zyklen	
15 min	75 °C
Abkühlen auf 4 °C	

2.18 Klonierung und Markierung von COX1b und COX1bΔG

Als Grundlage für die Klonierung in andere Expressionsvektoren und das Anhängen anderer Tags dienten die Konstrukte pcDNA3: COX1b-FLAG und pcDNA3:

COX1bΔG-FLAG (Censarek et al., 2006). Die Mutante COX1bΔG wurde durch gerichtete Mutagenese hergestellt (beschrieben in Censarek et al., 2006) und diente der Simulation einer Leserasterkorrektur. Zu diesem Zweck wurde das Guanin (G) an Position 94 des Intron 1 deletiert. Als Klonierungs-Schnittstelle für die meisten *multiple cloning sites* verschiedener Vektoren diente 5' vom ORF eine HindIII-Schnittstelle und 3' vom ORF eine XhoI- und eine NotI-Schnittstelle.

2.18.1 Anhängen eines 5' HIS-Tags mittels PCR

Um die COX1b und COX1bΔG über einen HIS-Tag aufreinigen zu können, wurde in einem Schritt der N-terminale FLAG-Tag entfernt und mittels PCR durch eine 6x HIS-Tag ersetzt. Die Primer sind Tabelle 2-7 zu entnehmen, die PCR erfolgte mit der Accusure Proofread Polymerase (Bioline) nach folgendem Schema:

50 ng	Plasmid-DNA pcDNA3 COX1b(ΔG)-FLAG
3 µl	10 µM Primer COX1b-His-5'
3 µl	10 µM Primer COX1b-His-3'
5 µl	10x Accusure Puffer
1 µl	50 mM $MgCl_2$
3,5 µl	10 mM dNTPs
2 µl	Accusure Polymerase
ad 50 µl	H_2O

Programm:

10 min	95 °C
45 sec	95 °C
45 sec	60 °C
2 min	72 °C
40 Zyklen	
15 min	72 °C
Abkühlen auf	4 °C

Die PCR-Produkte wurden in den Vektor TOPO blunt zwischenkloniert, sequenziert und korrekte Produkte anschließend über die angehangenen Schnittstellen in die entsprechenden Expressionsvektoren kloniert.

2.18.2 Anhängen eines 5' GFP-Tags mittels pmaxFP-GreenC

Um die COX1, COX1b und COX1bΔG mit einem N-terminalen GFP-Protein-Tag zu versehen, wurden die entsprechenden ORFs in den Vektor pmaxFP-GreenC (Amaxa) kloniert. Hierzu musste der N-terminale FLAG-Tag von COX1b und COX1bΔG entfernt werden, der ORF der COX an den ORF des GFP-Proteins angepasst werden, 5' vor der COX Sequenz eine XhoI-Schnittstelle eingefügt werden und am 3'-Ende das Stoppkodon durch eine BamHI-Schnittstelle ersetzt werden. Die pcCOX-Vektoren wurden zunächst im Verdau mit PvuI linearisiert. Die Primer sind Tabelle 2-7 zu entnehmen. Die PCR erfolgte mit der i-MaxII DNA Polymerase (iNtRON Biotechnology) nach folgendem Schema:

50 ng	Plasmid-DNA pcDNA3 COX1/COX1b(ΔG)-His
1,5 µl	10 µM Primer COX1 bzw. COX1bGFP 5'
1,5 µl	10 µM Primer COX1(b) GFP-Tag 3'
2 µl	10x PCR Puffer
2 µl	2,5 mM each dNTPs
0,5 µl = 2 U	i-MaxII DNA Polymerase
ad 20 µl	H_2O

Programm:

4 min	94 °C
1 min	94 °C
1 min	58 °C
2,5 min	72 °C
30 Zyklen	
10 min	72 °C
Abkühlen auf	4 °C

Die PCR-Produkte wurden mit BamHI und XhoI nachgeschnitten und in den ebenfalls mit BamHI und XhoI linearisierten pmaxFP-GreenC Vektor kloniert.

2.18.3 Einklonierung in das pQE-Trisystem His.Strep 2

Zur Aufreinigung der Konstrukte über das pQE-Trisystem His.Strep 2 von Qiagen wurden die ORFs der COX1, COX1b und COX1bΔG in den entsprechenden Vektor kloniert. Der Vektor trägt einen N-terminalen Streptavidin-Tag und einen C-terminalen His-Tag. Hierzu musste der N-terminale FLAG-Tag von COX1b und COX1bΔG ent-

fernt werden, der ORF der COX an den ORF des Vektors angepasst werden, zur 5'-Klonierung eine BamHI-Schnittstelle eingefügt werden und zur 3'-Klonierung das Stoppkodon durch eine HindIII-Schnittstelle ersetzt werden. Zusätzlich wurde hinter dem Streptavidin-Tag eine Faktor Xa-Schnittstellen eingefügt, um gegebenenfalls den Tag im Protein entfernen zu können. Zur Verbesserung der PCR-Ausbeute wurde die Vektor-DNA vor der PCR mit PvuI linearisiert. Die Plasmide pcDNA3 COX1, COX1b-FLAG bzw. COX1bΔG-FLAG wurden zuvor linearisiert. Die PCR auf pcDNA3 COX1, -COX1b und -COX1bΔG erfolgte mit der i-MaxII DNA Polymerase (iNtRON Biotechnology) nach folgendem Schema:

50 ng	Plasmid-DNA
1,5 µl	10µM Primer COX1b Strep2 Fxa 5'bzw. COX1 Strep2 Fxa 5'
1,5 µl	10 µM Primer COX1(b) 3ATagging Hind
2 µl	10x i-MaxII Puffer
2 µl	dNTPs (jeweils 2,5 mM)
0,5 µl	i-MaxII Polymerase
Ad 20 µl	H_2O

Programm:

4 min	94 °C
1 min	94 °C
1 min	63 °C
2,5 min	72 °C
30 Zyklen	
10 min	72 °C
Abkühlen auf	4 °C

Die PCR-Produkte wurden über ein Agarosegel aufgereinigt und mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII verdaut. Es erfolgte danach sofort die Klonierung in den Vektor pQE-Trisystem His.Strep-2 mit anschließender Sequenzierung des ORF.

2.19 Agarosegel-Elektrophorese

Die Nukleinsäurefragmente wurden in 0,75 bis 2 %-igen TBE Agarosegelen in TBE Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Agarose-Elektrophorese wurde die entsprechende Menge Agarose (0,75-2 %) in 50 ml TBE Puffer bis zur kompletten Lösung aufgekocht. Nach Abkühlung wurde das Gel vorsichtig und blasenfrei in die Plexiglaskammer gegossen und nach Verfestigung mit TBE Puffer überschichtet.

Alle Proben wurden vor dem Auftrag mit 1:9 Blaumarker-Ladepuffer versetzt. Gele liefen bei 50V bis der Blaumarker 2/3 des Gels passiert hatte. Zur Skalierung lief ein DNA-Molekulargewichtsstandard mit. Die Gele wurden in TBE Puffer mit 1 µg/ml Ethidiumbromid für 20 min nachgefärbt und die Bandenmuster wurden unter UV-Licht dargestellt.

2.20 COX1b-mRNA Sequenzanalyse

Die cDNA für die mRNA Sequenzanalyse wurde freundlicherweise von Dr. Thorsten Klamp (Universitätsklinik für Innere Medizin III, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz) zur Verfügung gestellt. Die mRNA war aus humanen Leber- und Magenbiopsien unterschiedlicher Personen isoliert worden.

2.20.1 PCR zur COX1b-mRNA Sequenzanalyse

Die PCR wurde mit der x-act-short bzw. I-Max II Polymerase nach Herstellerangaben durchgeführt.

x-act-short DNA Polymerase

1,5 µl	5‘-Primer hCOX1b 5’ 10 mM
1,5 µl	3’-Primer hCOX1b 3’ 10 mM
2,5 µl	10x Optipuffer
0,75 µl	MgCl2 50 mM
1,5 µl	Hi Spec Additive
1 µl	dNTPs 10 mM
4U~1 µl	x-act short Polymerase
9,25 µl	H_2O
2 µl	cDNA Probe

Programm:

5 min	95°C
30 s	94°C
30 s	65°C
1 min	72 °C
40 Zyklen	
4 min	72°C
Abkühlen auf	4°C

I-max II DNA Polymerase

1 µl	5‘-Primer hCOX1b 5’ 10 mM
1 µl	3’-Primer hCOX1b 3’ 10 mM
2 µl	I-max II Puffer
2 µl	dNTPs 2,5 mM
2,5 U~0,5 µl	I-max II Polymerase
12 µl	H2O
0,5 µl	cDNA Probe

Programm:

4 min	94°C
30 s	94°C
30 s	65 °C
1 min	72°C
40 Zyklen	
4 min	72°C
Abkühlen auf	4°C

2.20.2 Klonierung des PCR-Produktes in den TOPO Vektor

Zur Aufreinigung der PCR Produkte bei der COX1b-mRNA Analyse wurden diese in präparativen 2 % Agarosegelen (siehe 2.19) aufgetrennt. Die relevante Intron1 enthaltende 175bp Bande wurde mit einem sauberen Skalpell unter UV Kontrolle ausgeschnitten. Das 175bp große PCR-Produkt wurde aus dem Gel mit dem Gel Band Purification Kit (Amersham) nach Herstellerangeben extrahiert. Für die Sequenzierung wurde das COX1b-Fragment in den TOPO Vektor zwischenkloniert. Das TOPO TA Kit von Invitrogen wurde nach Herstellerangaben eingesetzt. 2 µl des 175 bp PCR-Produktes wurden mit 10 ng TOPO- Plasmid in der mitgelieferten Pufferlösung für 5 bis 10 min bei RT inkubiert. 1-2 µl dieser Lösung wurden unmittelbar im Anschluss zur Transformation chemisch kompetenter One Shot MAX Efficiency DH5α-T1R *E. coli* eingesetzt (vgl. 2.9.1).

2.20.3 Mini DNA-Präparation

Die transformierten Zellen wurden auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen über Nacht kultiviert. Pro Ansatz wurden 10 Kolonien nach dem Zufallsprinzip gepickt und in 5 ml LB (100 µg/ml Ampicillin) geimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 70 rpm und 37 °C kultiviert. Die Ernte erfolgte per Sedimentation über 20 min (5.000 rpm,

RT). Zur Extraktion der Plasmide wurde eine DNA-Mini-Präparation nach alkalischer Lyse durchgeführt (modifiziert nach Birnbaum & Doly, 1979). Das Zellpellet wurde dafür in 400µl Puffer 1 resuspendiert, mit 200µl Puffer 2 zur Lyse versetzt, invertiert und durch 300µl Puffer 3 neutralisiert. Der Zelldetritus wurde abzentrifugiert. Aus dem klaren Überstand wurde mit 0,7 Vol. Isopropanol über 20 min bei 4 °C die DNA gefällt. Das DNA-Pellet (30 min, 16.100 x g, RT) wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, 10 min bei 37 °C getrocknet und im letzten Schritt in 30 µl H_2O aufgenommen.

Puffer 1	50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A; pH 8.0
Puffer 2	200 mM NaOH; 1 % (m/v) SDS
Puffer 3	3 M Kaliumacetat; pH 5.5

2.20.4 Restriktionsverdau zur Überprüfung der Klonierung

Die erfolgreiche Klonierung in den TOPO-Vektor wurde durch einen Restriktionsverdau überprüft. Je 10 µl der Mini-Präparationen wurden in einem Ansatz von 20 µl mit je 2 U Restriktionsenzym für 2 h bei 37 °C verdaut. Die Restriktionsenzyme PstI und NotI (Fermentas) wurden im gemeinsamen Puffer ‚O' eingesetzt. In einem analytischen Agarosegel als richtig identifizierte Klone wurden in einer Midi-Präparation (siehe 2.21) amplifiziert und zur Sequenzierung (siehe 2.20.5) geschickt.

2.20.5 DNA Sequenzierung

Die Sequenzierung der klonierten Fragmente wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt. Als Sequenzierungsprimer diente der T7 Primer. Jede DNA wurde, um Fehler zu vermeiden, zweimal unabhängig sequenziert.

2.21 Plasmidaufreinigung mittels Midi-Präparation

Die Plasmidaufreingung erfolgte mit dem Nucleobond AX Midi-Kit (Macherey Nagel) nach Herstellerangaben. Nach protokollgerechter Aufreinigung der DNA aus 50-100 ml *E. coli* Kultur (siehe 2.9.1) wurde die gewonnene DNA ein zweites Mal mit Ethanol gefällt. Dafür wurde das gewonnene Pellet in 450 µl Ethanol und 30 µl 5 M NaCl auf-

genommen. Die DNA wurde für 2 h bei 4 °C präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in H_2O aufgenommen.

2.22 Lyse der Zellen

2.22.1 Lyse der Zellen für die SDS-PAGE

Bei der direkten Lyse transfizierter adhärenter Zellen wurde das Medium 48h nach Transfektion abgesaugt und der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen, bevor zur Lyse 1x Laemmli Puffer (50 µl in einer 24-Loch-Platte, 70 µl in einer 12-Loch-Platte, 100µl in einer 6-Loch-Platte) zugegeben wurde. Suspensionszellen wurden zuvor 5 min bei 1.000 x g pelletiert. Nach 5 min Inkubation bei 37 °C wurde das Lysat in Reaktionsgefäße überführt, 7 min im Heizblock einer Temperatur von 95 °C ausgesetzt und zur Scherung der DNA durch Sonifikation homogenisiert (Stufe 3, 10 s). Die Proben wurden, wenn sie nicht direkt auf ein Gel aufgetragen wurden, bei -20 °C gelagert. Wässrige Proteinlösungen, z.B. Aliquots der Fraktionen der Aufreinigungsschritte, wurden nach Zugabe von 4x Laemmli 1:3 analog 7 min im Heizblock denaturiert und auf Stufe 3 für 10 s durch Sonifikation homogenisiert.

2.22.2 Lyse der Gewebezellen aus Mainz

Gewebeproben aus Niere, Leber und Magen des Menschen wurden freundlicherweise von Dr. Thorsten Klamp (Universitätsklinik für Innere Medizin III, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz) zur Verfügung gestellt. Zu Verwendung kam histologisch begutachtetes Normalgewebe bei unterschiedlichen Grunderkrankungen. Die Proben wurden in kleinen Stücken in dreifachem Volumen RIPA Puffer aufgenommen. Mit Proteaseinhibitor III 1:100 versetzt wurde es durch drei Zyklen wiederholtes Auftauen und Einfrieren mit flüssigem Stickstoff lysiert, durch Sonifikation homogenisiert und 3 min bei 94 °C denaturiert. Der Protein-enthaltende Überstand (16.100 x g, 5 min) wurde mit Laemmli-Puffer versetzt, 5 min gekocht, sonifiziert und bei -20 °C gelagert.

2.22.3 Test verschiedener Lysemittel

Um festzustellen, mit welchem Detergenz die COX1b am besten in Lösung gebracht werden kann, wurde zunächst eine Testreihe durchgeführt, in der die transfizierten, in LEW Puffer homogenisierten Zellen mit verschiedenen Detergenzien versetzt wurden.

Es wurde schließlich N-Octyl-ß-Glucopyranosid (NOG) ausgewählt, weil sich eine maximale Ausbeute bei Kompatibilität mit den im Folgenden beschriebenen Aufreinigungssystemen abzeichnete.

2.22.4 Lyse der Zellen für IMAC Aufreinigung mit Ni^{2+}-NTA/TED

Je 20 ml HEK FS Suspensionszellen (ca. 3x 10^7 Zellen) oder eine D100er Schale adhärenter Zellen wurden am vierten Tag nach Transfektion pelletiert (5 min, 4 °C, 5.000 rpm), in PBS gewaschen und in 4 ml LEW Puffer mit 1 % NOG und 10 µl Proteaseinhibitor III (EDTA-frei) resuspendiert. Das Lysat wurde 3 mal 5 s sonifiziert und zur Lyse 60 min auf Eis geschwenkt. Kerne und Zelldebris wurden abzentrifugiert und der klare Überstand weiterverwendet (16.100 x g, 30 min, 4 °C).

2.22.5 Lyse der Zellen für die Immunpräzipitaion

Die Zellen wurden in RIPA Puffer lysiert. Diesem wurde vor Gebrauch 1:100 Proteaseinhibitor III zugesetzt. Vor der Lyse wurden die Zellen mechanisch vom Kulturschalenboden abgelöst, sedimentiert (5 min, 5.000 x g, 4 °C) und in PBS gewaschen. Den gewonnenen Pellets wurden in 500 µl eiskaltem RIPA Puffer suspendiert, 3 mal 5 s auf Stufe 3 sonifiziert und 30 min auf Eis geschwenkt. Das Lysat wurde 30 min bei 4 °C und 16.100 x g zentrifugiert um Zelltrümmer abzutrennen.

2.22.6 Lyse von *E. coli*

Die Lyse der *E. coli* BL21(DE3) Bakterien nach Proteinexpression wurde unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden durch 20 min Zentrifugation (5.000 x g, RT) sedimentiert. 1 g Zellpellet wurde in 5 ml LEW Puffer suspendiert und 1:200 Proteaseinhibitor III zugegeben. Lysozym wurde ad 1 mg/ml zugegeben und die Lösung 30 min auf Eis geschüttelt. Als weiterer Lyseschritt schlossen sich drei Zyklen wiederholtes Auftauen und Einfrieren mit flüssigem Stickstoff an. Um die DNA zu scheren wurde die Zellsuspension 5 x 10 s im Eisbad sonifiziert. Die Proteinenthaltenden *Inclusion Bodies* (IB) wurden in einem 30 min Zentrifugationsschritt (10.000 x g, 4 °C) pelletiert, mit 20 ml LEW Puffer gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das gewonnene IB-Sediment wurde mit 5 ml LEW Puffer mit 8 M Harnstoff versetzt, 2 x 10 s

im Wasserbad sonifiziert und eine Stunde auf Eis geschüttelt. Das überexprimierte Protein wurde so aus den IB in Lösung gebracht. Der Überstand wurde durch 20 min Zentrifugation (16.100 x g, RT) gewonnen und war für weitere Experimente einsatzbereit.

2.23 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen in Zelllysaten wurden mit dem BioRad Protein Assay Kit bestimmt. Proteinlösung in saurem Milieu wurde hierbei mit Coomassie G-250 gemischt und die Absorption der Protein-Farbstoff-Verbindung bei 595 nm am ELISA-Reader gemessen. Eichgeraden wurde mit BSA als Standardprotein erstellt. Die Auswertung erfolgte mit der Microplate Manager Software.

2.24 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe erfolgte mittels diskontinuierlicher Polyacrylamid-Gelelektrophorese, orientiert an den Prinzipien von Laemmli (1970). Die Proteine wurden entsprechend ihrer molekularen Masse unter denaturierenden Bedingungen in vertikalen Gelen in der Mini Protean Cell II aufgetrennt. Unter Standardbedingungen wurden 0,75 -1,5 mm dicke Gele eingesetzt. 10 %-ige Trenngele wurden mit 5 %-igen Sammelgelen überschichtet. Die Proteine wurden im elektrischen Feld bei 150V im Sammelgel konzentriert, bevor sie bei 180 V im Trenngel separiert wurden. Als Größenstandard diente der Fermentas Page Ruler Prestained (17/26/34/43/55/72/95/130/170 kDa). Die Angaben in Tabelle 2-7 beziehen sich auf zwei 0.75 mm Gele.

Tabelle 2-10. Zusammensetzung der Gele und Puffer für die SDS-PAGE.

	Sammelgel (5 ml)	**Trenngel (10 ml)**
Acrylamid (m/v)	5 %	10 %
Acrylamid Mix	830 µl	3,3 ml
Sammel-/ Trenngel-puffer	630 µl	2,5 ml
ddH_2O	3,4 ml	4,0 ml
SDS (m/v) 10 %	50 µl	100 µl
APS (m/v) 10 %	50 µl	100 µl
TEMED	5 µl	4 µl

SDS-PAGE Laufpuffer	250 mM Glycin; 25 mM Tris/HCl (pH 8,5); 0,1 % (m/v) SDS
Sammelgelpuffer	1 M Tris/HCl, pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

2.25 Färbung von Polyacrylamidgelen mit kolloidalem Coomassie

Die Färbung von Polyacrylamidgelen zur Detektion von Proteinen erfolgte in drei Schritten unter leichtem Schütteln. Die Gele wurden 1h bei RT in Fixierlösung fixiert, über Nacht bei 4 °C in kolloidalem Coomassie gefärbt, und in 5 Waschschritten über eine Stunde mit H_20 entfärbt, bis der Hintergrund klar war.

2.26 Western Blot
2.26.1 Proteintransfer auf PVDF Membran

Nach der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine im elektrischen Feld auf eine mit Methanol benetzte Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran übertragen. Die Durchführung erfolgte in einer Semi Dry Blotkammer zwischen dreilagigem, in Transferpuffer getränktem Whatmanpapier mit konstanter Stromstärke von 1,5mA/cm² über 50 min.

Western Blot Transferpuffer	25 mM Tris; 200 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol

2.26.2 Immundetektion von Proteinen auf PVDF Membran

Auf der Membran immobilisierte Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert. Nach Abschluss des Transfers wurde die Membran eine Stunde bei RT in 5 % TBSTM inkubiert, um überschüssige Bindungsstellen abzusättigen. Die Erstantikörperinkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die Konzentrationen der Primärantikörper sind der Tabelle 2-3 zu entnehmen. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min in TBST erfolgte die Hybridisierung mit Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern für 1 h bei Raumtemperatur.
Die sekundären Antikörper wurden

- 1:3.000 bei Detektion mit Lumi.Light, bzw.
- 1:20.000 bei Detektion mit ECL advance

in TBSTM verdünnt. Überschüssiger Sekundärantikörper wurde in einem zweiten Waschgang entfernt (3 x 10 min in TBST).
Visualisiert wurde die AK-Bindung durch Inkubation mit Chemilumineszenz-Reagenz. Dazu wurde die Membran mit 500 µl Lumi.Light oder ECL advance Reagenz benetzt, 5 min bei RT inkubiert und zwischen zwei klare Plastikfolien eingeschlagen. Die entstehende Chemilumineszenz wurde durch Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm visualisiert.

2.26.3 Densitometrische Auswertung der Röntgenfilme

Die Filme wurden mit dem GS-800 Calibrated Densitometer eingescannt und anschließend mit Hilfe der Software Quantity One ausgewertet.

2.27 Aufreinigung von His-getaggtem Protein

Zur Aufreinigung von Proteinen über den His-Tag nach dem Immobilisierten-Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) Prinzip wurden zwei Systeme eingesetzt:

- Ni-TED Protino Säulen von Macherey Nagel und
- Ni-NTA Agarose von Qiagen.

Bei Protino Ni-TED und Ni-NTA handelt es sich um mit Ni^{2+} Ionen vorbeladenes Silicagranulat bzw. Agarose. Die Bindung des Proteins erfolgt durch Interaktion zwischen dem Polyhistidin-Tag und immobilisierten Ni^{2+}-Ionen, die durch die Chelatoren TED oder NTA komplexiert werden. TED besetzt fünf der sechs Koordinationsstellen des Nickelions und lässt eine für die Histidinbindung frei, NTA lässt zwei Bindungsstellen frei. Während His-getaggte Proteine an die Matrix binden, können alle ungebundenen Proteine durch Waschen entfernt werden. Die Elution erfolgt durch Zugabe von hohen Konzentrationen des Histidinanalogons Imidazol, welches das gebundene Protein kompetitiv verdrängt. Die Zelllyse ist in Kapitel (siehe 2.22.4) beschreiben. Beide Systeme wurden sowohl mit, als auch ohne 8 M Harnstoff im Auftrags-, Wasch- und Elutionspuffer (LEW Puffer) verwendet. Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert.

2.27.1 Ni-TED Protino Säulchen (Macherey Nagel)

Die Protinosäulen wurden bei Normaldruck unter Ausnutzung der Schwerkraft eingesetzt. Die Säulen wurden mit 4 ml LEW Puffer mit 0,1 % NOG equilibriert. 4 ml Proteinprobe wurden auf die Säule aufgetragen. Nach Durchlauf wurde in zwei Waschschritten mit je 4 ml LEW Puffer gereinigt. Gebundene Proteine wurden durch Elution in drei Schritten mit je 3 ml Elutionspuffer (LEW Puffer mit 0,1 % NOG und 300 mM Imidazol) eluiert und in sauberen Reaktionsgefäßen aufgefangen.

2.27.2 Ni-NTA Agarose (Qiagen)

Um mit 500 µg Ni-NTA arbeiten zu können, wurde 1 ml Ni-NTA Agarose Suspension eingesetzt, der Lagerungspuffer wurde abgenommen und durch LEW Puffer ersetzt. Das Protokoll basierte auf den Herstellerangaben von Qiagen. Die 4 ml Proteinlösung wurden mit 500 µg Ni-NTA Agarose versetzt und zur Bindung 2 h auf Eis geschwenkt. Der ungebundene Überstand wurde als Durchfluss-Fraktion verworfen. Nach Waschen des Trennmaterials mit 2x 4 ml LEW Puffer mit 0,1 % NOG wurde gebundenes Protein in drei Schritten mit je 3 ml Elutionspuffer (LEW Puffer mit 0,1 % NOG und 300 mM Imidazol) eluiert und in sauberen Reaktionsgefäßen aufgefangen.

2.28 Immunpräzipitation

Für den beschriebenen Ablauf wurden je eine D60er-Schale adhärenter Zellen (ca. 1,5 x 10^6 Zellen) bzw. 4 ml HEK FS Zellsuspension (ca. 10^7 Zellen) eingesetzt. Die Zelllyse für die Immunpräzipitation ist unter 2.22.5 zu finden. Alle Arbeitsschritte der Immunpräzipitation fanden bei 4 °C statt. Dem RIPA Puffer wurde vor Gebrauch 1:100 Proteaseinhibitor III zugesetzt. Das Lysat wurde zur Vorreinigung 15 min mit 1 µg α-mouse- bzw. α-rabbit-AK (je nach Ursprung des präzipitierenden Antikörpers) im Überkopfschüttler inkubiert. Nach Zugabe von 20 µl Protein-A Agarose und erneuter Inkubation für 15 min wurde zentrifugiert und das Präzipitat verworfen (3 min 3.000 rpm). Der vorgereinigte Überstand wurde für die Immunpräzipitation verwendet. Das vorgereinigte Lysat wurde mit 1 µg des Primärantikörpers COX1 / His.H8 / FLAG-M2 / GFP turbo über Nacht inkubiert. Durch Zugabe von 20 µl Protein-A Agarose Suspension und 1 h Inkubation wurde das Präzipitat durch Zentrifugation gewonnen (30 s, 3.000 x g.). Das

Pellet wurde zweimal mit RIPA Puffer gewaschen und in 50 µl 2x Laemmli/DTT resuspendiert, 7 min bei 95 °C denaturiert, vor der Elektrophorese erneut für 1 min erhitzt und 30 s bei 16.100 x g zentrifugiert.

2.29 Immunfluoreszenzmikroskopie von pmaxFP-COX-GFP

HEK 293 Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und nach Protokoll (vgl. 2.11.1) mit pmaxFP-COX-Varianten transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die in PBS gewaschenen Zellen mit 4 % Paraformaldehydlösung auf den Deckgläsern fixiert (20 min, RT). Die Fixierungen wurden dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Zur Kernfärbung wurde mit Hoechst 33342 (1:1000 in PBS) unter Lichtausschluss inkubiert (2 min, RT) und erneut vorsichtig gewaschen. Die leicht angetrockneten Deckgläser wurden mit Vectashield Eindeckflüssigkeit auf Objektträgern fixiert und mit Nagellack rundum abgedichtet. Fluoreszenzmikroskopische Bilder stammen aus der Untersuchung mit dem BX 50 Auflichtmikroskop.

2.30 Differentielle Zentrifugation

Die Fraktionierung der Zellbestandteile und Gewinnung der mikrosomalen Fraktion erfolgte nach dem Protokoll von Song und Smith (Song & Smith, 1996). HEK 293 Zellen wurden aus 6-Loch-Platten durch Auf- und Abpipettieren mechanisch geerntet, pelletiert (5 min, 5.000 x, RT), mit PBS gewaschen und in je 100 µl Tris Puffer homogenisiert. Alternativ wurde 1 ml HEK FS Zellsuspension eingesetzt. Die Lyse erfolgte nach Zugabe von 1:100 Proteaseinhibitor III durch drei Zyklen wiederholtes Einfrieren und Auftauen mit flüssigem Stickstoff und dreimal 5 s Sonifikation. Zelldebris und Kerne wurden abzentrifugiert (16.100 x g, 30 min, 4 °C). Der Überstand, die postnukleäre Fraktion, wurde in der Ultrazentrifuge bei 100.000 x g und 4 °C für 60 min zentrifugiert, um Cytosol (Überstand = 100S) und Mikrosomenfraktion (100P) zu trennen. Zu den Fraktionen wurde ad 100 µl Tris Puffer und 1:3 4x Laemmli-Puffer mit DTT zugegeben. Nach 7 min Denaturierung bei 95 °C und Sonifikation wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

2.31 Signalpeptidabspaltung: Berechnung mit SignalP 3.0

Die Berechnung der Signalpeptid-Erkennungs- und Abspaltungswahrscheinlichkeit mit dem WWW-Programm SignalP 3.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) wurde mit Standardeinstellungen für Eukaryonten durchgeführt (Bendtsen et al., 2004). Es wurden automatisch nur die ersten 70 AS eingerechnet.

2.32 N-terminale Sequenzierung

Die N-terminale Sequenzierung wurde als Auftragssequenzierung bei der Firma Proteome Factory (Berlin) durchgeführt. Zur N-terminalen Sequenzanalyse der COX1b-FLAG aus HEK 293 Zellen wurde ein Aliquot des über eine α-COX1-Immunpräzipitation aufgereinigten Enzyms über SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend nach Firmenvorgaben auf eine PVDF-Membran geblottet.

2.33 Massenspektrometrie Nano-HPLC/ESI-MS/MS

Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Heike Piechura im Medizinischen Proteom Center (Prof. Dr. H.E. Meyer, Zentrum für Klinische Forschung II der Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt.

2.33.1 Tryptischer Verdau

Die zu untersuchenden Banden aus der SDS-PAGE wurden nach Anfärbung mit kolloidalem Coomassie sparsam ausgeschnitten und dreimal abwechselnd in für je 10 min bei RT in 40 µl Puffer A und B inkubiert. Im Anschluss wurde das Gelstück in der SpeedVac Zentrifuge für 10 min getrocknet. Zum getrockneten Gelstück wurden 2 µl Trypsinlösung zugegeben und 8 h bei 37 °C im Inkubator verdaut.

Puffer A	10 mM NH_4HCO_3
Puffer B	10 mM NH_4HCO_3: Acetonitril 1:1 (v/v)
Trypsinlösung	0,03 µg/µl Trypsin 10 mM NH_4HCO_3

2.33.2 Nano HPLC

Die Auftrennung mittels Umkehrphasen-HPLC wurde mit einem Dionex U3000 HPLC System mit zwei Vorsäulen, orientiert an der Arbeit von Schaefer durchgeführt (Schaefer et al., 2004). Die Peptide wurden *on-line* auf eine Vorsäule (PepMap Säule; 0,3 mm I.D. × 5 mm) aufgeladen und unter Nutzung der Ladepumpe mit 0.1 % TFA (30 µl/min; 5 min) vorkonzentriert. Für die Umkehrphasentrennung mit einer nano-HPLC Säule (PepMap Säule 75 µm I.D. × 150 mm, 3 µm) wurde die Vorsäule mit der Hauptsäule *in-line* geschaltet, und die Peptide und mit der Micropumpe (300 nl/min) aufgespült. Dazu wurde folgendes Lösungsmittelsystem verwendet:

Lösungsmittel A	0.1 % (v/v) Ameisensäure
Lösungsmittel B	0.1 % (v/v) Ameisensäure, 84 % (v/v) Acetonitril

Zur Auftrennung der Peptide wurde ein Gradient von 5 % bis 40 % Lösungsmittel B über 35 min eingesetzt. Lösungsmittel B wurde anschließend über 5 min auf 95 % erhöht und die Säule für 5 min gewaschen. Die Säulen wurden anschließend mit 5 % Lösungsmittel B reäquilibriert (20 min).

2.33.3 ESI-MS/MS

Die Elektrospray Ionisations Tandem Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) wurde mit einem Bruker HCT Ultra PTM Ionenfallen-Massenspektrometer durchgeführt. Dieses war mit einer Nanospray-Ionenquelle versehen, die Peptide wurden über eine beheizte Glaskapillare gesprüht. Das Instrument wurde mittels Standardkomponenten extern kalibriert. Die Standardeinstellungen für die massenspektrometrischen Messungen waren: CV 1400 V; PO 500 V; DG 8.0 l/min; DT 160 °C *aimed ICC* 200000; *maximal fill time* 500 ms. Für MS/MS Analysen wurde die datenabhängige Software Esquire Control verwendet. Die drei intensivsten, mehrfach geladenen Ionen in einem Spektrum wurden jeweils für MS/MS Analysen ausgewählt. Nach zwei MS/MS Spektren wurden die Massen für jeweils 1,2 min von weiteren Messungen automatisch ausgeschlossen. Um Fragmentionen mit *collision induced dissociation* (CID) zu generieren, wurden die isolierten Ionen mit einer Fragmentierungsamplitude von 0.6 V fragmentiert. Die MS-Spektren waren eine Summe aus sieben individuellen Scans von m/z 300-1500 mit einer

Scangeschwindigkeit von 8.100 (m/z)/s, während MS/MS Spektren eine Summe aus zwei Scans von m/z 100-2800 mit einer Scangeschwindigkeit von 26.000 (m/z)/s waren.

2.33.4 Auswertung der MS Daten

Aus den Rohdaten wurden Peaklisten mit der Software Data Analysis 4.0 unter Standardeinstellungen generiert. Diese wurden mit dem Programm ProteinScape 2.1 analysiert und dort mit Hilfe der Suchmaschine Mascot v.2.2 (Perkins et al. 1999; www.matrixscience.com) mit der humanen IPI *(International Protein Index)* Proteindatenbank abgeglichen. Sie enthielt in der Version 3.66 zum Zeitpunkt der Auswertung 86845 Proteine. Es wurde eine automatische Proteinidentifikation durchgeführt. Hypothetische Peptide aus möglichen Intron1 Sequenzen und COX-spezifische Peptide wurden in einer Datenbank zusammengefasst und mit den Peaklisten verglichen.

ERGEBNISSE

3 Charakterisierung von Intron1 auf mRNA-Ebene
3.1 Sequenzanalyse der Intron1-mRNA

Die COX1b-mRNA Sequenzanalyse diente der Bestimmung von Länge und Sequenz des Intron1 der COX1b in cDNA humaner Leber- und Magenproben. Eine mögliche Korrektur des Leserahmens durch Deletion einer Base des Intron1 im Rahmen von mRNA Editing sollte überprüft werden. mRNA Editing bezeichnet die Modifikation einzelner Aminosäuren der mRNA. Eine Deletion von Basen (ΔG 72, ΔC 50) wurde von Qin et al. (2005) beschrieben.

Aus humanen Leber- und Magenbiopsien wurde RNA gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde mithilfe der p53 PCR auf Kontaminationen durch genomische DNA getestet. Spezifische Oligonukleotide umrahmen eine Intron enthaltende Region des ubiquitär exprimierten p53-Gens. Liegt reine cDNA – aus gespleißter mRNA – vor, wird allein ein kurzes Fragment von 750 bp Länge amplifiziert. Bei Verunreinigungen durch genomische DNA entsteht zudem ein langes Produkt, welches auch die Intronsequenzen des p53-Gens enthält (1700 bp). Nur reine cDNA Proben (Abb. 3-1: S1, S2, S4-6, S8-10, L1-8), in denen keine Bande bei 1700 bp gefunden werden konnte, wurden für die mRNA Sequenzanalyse verwendet.

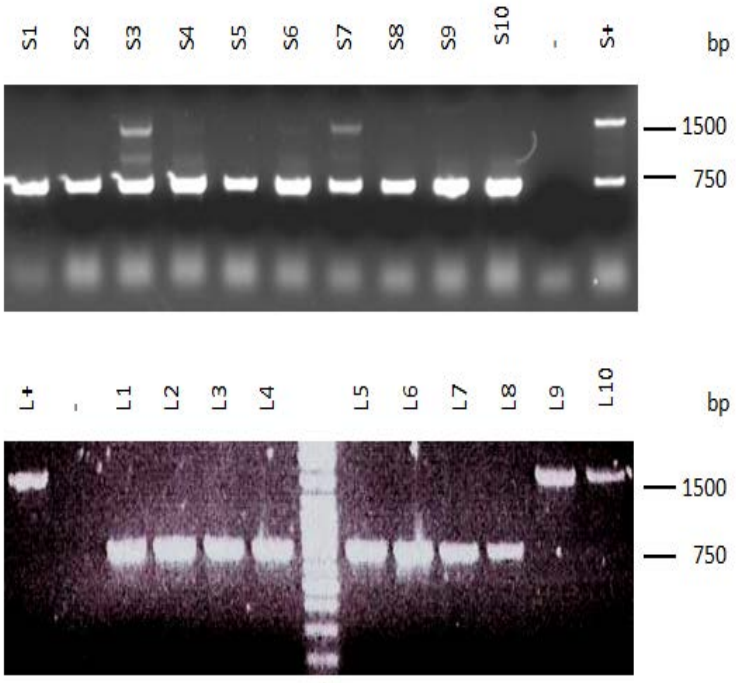


Abbildung 3-1. p53 PCR der cDNA Proben. cDNA aus humanen Magen- (S) und Leberbiopsien (L) wurde mit der p53 PCR auf Kontaminationen durch genomische DNA untersucht. Als Qualitätskontrolle (S+, L+) wurden kontaminierte Proben eingesetzt. Bei Vorliegen reiner cDNA entstand nur eine 750 bp große Bande, im Falle der Kontamination durch genomische DNA zudem eine 1700 bp große Bande. Nur reine cDNA Proben (S1, S2, S4-6, S8-10, L1-8) wurden für die mRNA Sequenzanalyse verwendet.

Für die anschließende COX1b-mRNA-Typisierung wurden Primer gewählt, die Intron1 der COX1 flankieren. Eine PCR über 40 Zyklen generierte zwei Produkte: Ein 81 bp großes Fragment durch Amplifikation von COX1-cDNA, und ein ca. 175 bp großes Fragment durch Amplifikation von COX1b-cDNA. Die Fragmente mit einer Größe von 175 bp enthielten Intron1 (Abb. 3-2). Eine unspezifische Bande bei 250 bp konnte nicht näher charakterisiert werden. Das 175 bp Fragment wurde über ein Agarosegel isoliert und in den TOPO Vektor kloniert. Pro Biopsieprobe wurden ca. 10 unabhängige Klone nach dem Zufallsprinzip selektiert. Diese Klone wurden amplifiziert und mit dem T7 Primer zweifach sequenziert, um Sequenzierfehler zu minimieren. Insgesamt wurden aus Leber oder Magen cDNA Proben von 10 Personen beiderlei Geschlechts analysiert. Von diesen fand eine Untersuchung von mehr als 100 unabhängigen Klonen statt. Bei sechs Proben konnten nicht genug unabhängige Klone generiert werden, so dass sie von der Auswertung ausgeschlossen wurden.

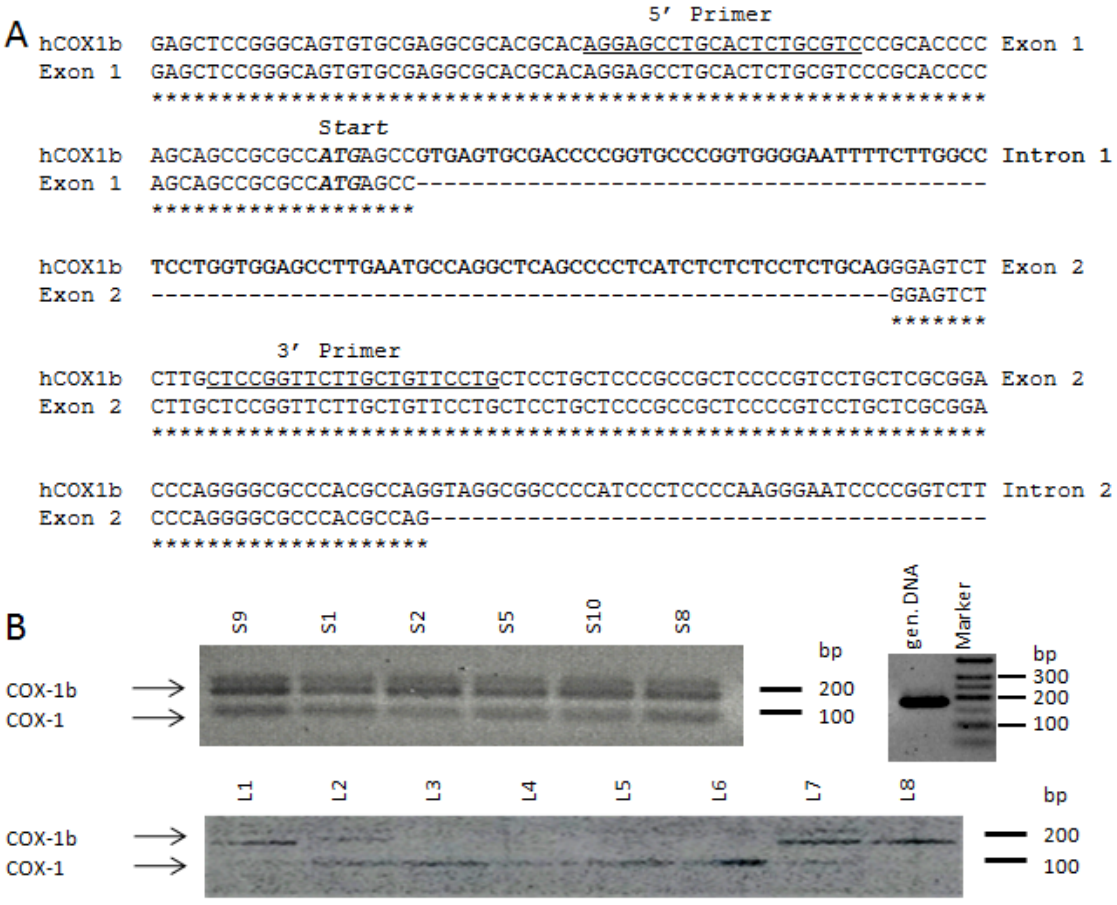


Abbildung 3-2. Sequenzanalyse des Intron1 auf mRNA-Ebene.
A Schematische Darstellung der RT-PCR im Rahmen der COX1b-mRNA Sequenzanalyse. Dargestellt sind die Sequenzen humaner COX1b und COX1. Die Primer sind durch Unterstriche gekennzeichnet, während Intron1 fettgedruckt ist.

B PCR-Produkte aus Magen- (S) und Leberproben (L), visualisiert unter UV-Licht im 2 % Agarosegel nach Ethidiumbromidfärbung. Es entstanden zwei spezifische COX Produkte: 175 bp COX1b mit Intron1, 81 bp COX1. Die dritte Bande um 250 bp ist kein Produkt des COX-Gens.

Abgesehen von wenigen Abweichungen einzelner Basenpaare stimmte die Sequenz mit der veröffentlichten COX1b-mRNA Sequenz (GenBank: AY884200.1) überein. Sequenzabweichungen von der veröffentlichten humanen Intron1 Sequenz sind in Tabelle 3-1 angeführt. Einzelne Abweichungen, die nur einmal gefunden wurden, sind nicht gelistet, da es sich wahrscheinlich um Fehler in der PCR oder Sequenzierung handelte.

Tabelle 3-1. Klone und Sequenzierungsergebnisse der COX1b-mRNA Sequenzanalyse.

Gewebe	Magen und Leber		
Klone	65 und 39		
Individuen	10 (beide Geschlechter)		
Länge des Intron 1	94 bp in allen Klonen		
Varianten der Sequenz von Intron1	Position im Intron1	Substitution	Vorkommen
	14	C → A C → T	3 x in Leber cDNA 1 x in Leber cDNA
	24	T → C	2 x in Magen cDNA
	25	G → A	7 x in drei Magen cDNAs
	93	A → G	3 x in Magen cDNA

Tabelle 3-2. Funktionelle Folgen der Sequenzabweichungen.

14: C → A	stumm
14: C → T	stumm
24: T → C	Arginin statt Tryptophan an Stelle 11 AS
25: G → A	verfrühtes Stoppkodon nach 11 AS: MSRECDPGAR-Stopp
93: A → G	stumm

Bei den Abweichungen handelt es sich im Vergleich mit der veröffentlichten humanen COX1b- Sequenz zum großen Teil um stumme Mutationen. Im Falle der Magenproben findet sich jedoch auch eine *nonsense* Mutation (25: G → A, Stopp bei 11 AS) und eine *missense* Mutation (24: T → C, Arginin statt Tryptophan bei 11 AS) (Tab. 3-2). Wäh-

rend es sich mehrheitlich um frühe Fehler in der PCR handeln könnte, weist das Vorkommen der Abweichung an Position 25 in drei cDNAs eventuell auf einen Polymorphismus hin, der bisher nicht beschrieben wurde. Alle sequenzierten Klone enthielten eine Intron1 Sequenz von 94 bp Länge. Es konnte kein Hinweis auf die Deletion einer Base auf mRNA-Ebene gefunden werden.

3.2 Analyse der RNA-Struktur zur Überprüfung auf einen ribosomalen *Frameshift*

Neben mRNA Editing ist der Leserastersprung durch einen ribosomalen *Frameshift* eine Möglichkeit, den ORF einer fertig prozessierten mRNA auf Translationsebene zu modifizieren. Das Überlesen einer Base im Ribosom, ein sogenannter ‚+1 ribosomaler *Frameshift*' könnte eine Korrektur des Leserahmens ermöglichen. Dadurch würde die Sequenz in den ORF einer COX1 zurück verschoben. Während die Konsensussequenzen für einen -1 ribosomalen *Frameshift* gut erforscht sind, ist über den +1 ribosomalen *Frameshift* in Eukaryonten wenig bekannt. Die +1 *Frameshift*-Signale sind nach aktueller Sicht zu divers, um eine konkrete Vorhersage zu erlauben (Moon et al., 2004; Ivanov & Atkins, 2007). Das Auftreten einer Uracil- und Cytosin-reichen ‚rutschigen Sequenz' (*slippery site*) in der mRNA und eines thermostabilen Pseudoknotens in der mRNA-Sekundärstruktur sind jedoch vielen *Frameshift*-Stellen gemein. Für die Annahme eines ribosomalen Leserastersprungs wurde die Erfüllung beider Bedingungen vorausgesetzt.

Die mRNA-Sekundärstruktur und damit das Vorkommen von Pseudoknoten in Intron1 wurde mit den Algorithmen RNAfold und pknotsRG (Hofacker, 2003; Reeder & Giegerich, 2004) untersucht. Es wurden zwei thermostabile Pseudoknoten-Strukturen gefunden, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu einer hypothetischen *slippery site* liegen. Sie sind in Abbildung 3-3B dargestellt. An diesen Stellen könnte unter den genannten Voraussetzungen eine Korrektur des Leserahmens stattfinden. Damit sind die notwendigen Voraussetzungen für einen potentiellen ribosomalen *Frameshift* bei der COX1b-mRNA formal erfüllt.

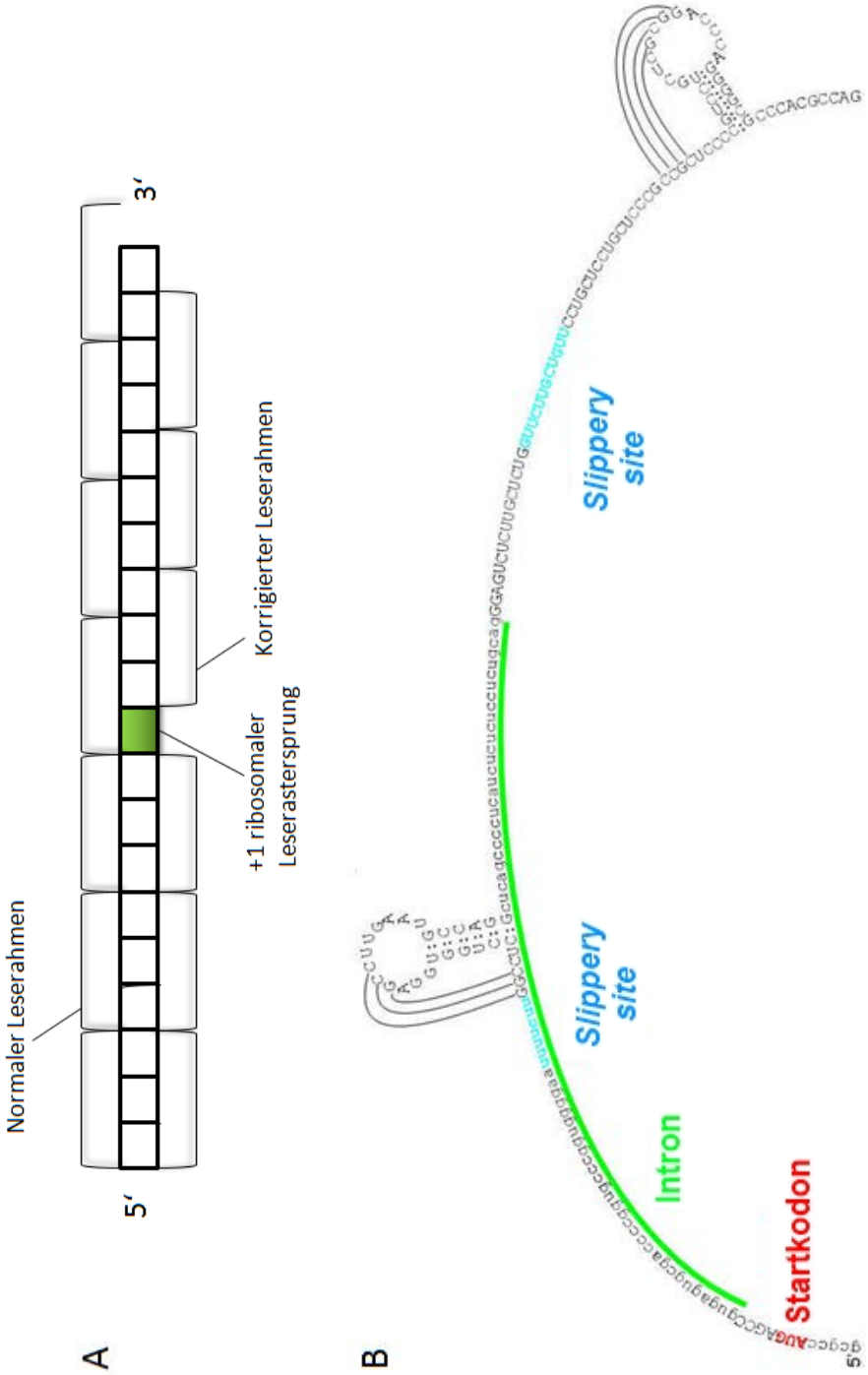


Abbildung 3-3. Ribosomaler Leserastersprung.

A Schematische Darstellung eines +1 ribosomalen *Frameshifts*.
B RNA-Strukturvorhersage für humane COX1b-mRNA, Markierung der für einen Leseraster-sprung potentiell notwendigen Elemente.

3.3 FLAG-Tag übergreifende PCR

Ein nachträgliches Spleißen des Intron1 aus der COX1b-mRNA bietet eine weitere Erklärungsmöglichkeit, wie aus einer COX1b-mRNA ein ca. 70 kDa großes, der COX1 ähnliches Protein entstehen kann. Mithilfe der FLAG-Tag übergreifenden PCR sollte untersucht werden, ob das Intron1 aus der COX1b-mRNA nachträglich herausgespleißt werden kann.

HEK 293 Zellen wurden mit den Konstrukten psgCOX1b-FLAG, psgCOX1bΔG-FLAG und als Negativkontrolle PQE-COX1b-Strep/His transfiziert und die RNA extrahiert. Um Kontaminationen durch Vektor-DNA auszuschließen, wurde die mRNA anschließend über ihren Poly-A+ Anhang aufgereinigt. Für die nachfolgende PCR wurden Primer eingesetzt, die Intron1 flankieren ohne es zu überschneiden, so dass bei Vorhandensein des Introns bei COX1b ein ca. 170 bp großes Produkt zu erwarten war. Bei Fehlen des Intron1 wurde hingegen ein 76 bp großes Produkt erwartet (Abb. 3-4A). Der 5‘-Primer der PCR wurde in den Bereich des synthetischen FLAG-Tags gelegt. Damit war nur die Amplifikation FLAG-getaggter cDNA möglich und eine Amplifikation nicht getaggter, zelleigener COX1 ausgeschlossen.

Bei Analyse der PCR-Produkte auf einem Agarosegel konnte kein Amplifikat in den mock-transfizierten oder Kontroll-Zellen detektiert werden. Für psgCOX1b-FLAG und psgCOX1bΔG-FLAG transfizierte Zellen zeigte sich ein identisches Bandenmuster. Es entstanden zwei Produkte: Die obere 170 bp große Bande entsprach COX1b- und COX1bΔG-FLAG-mRNA, sie enthielt Intron1 (Abb. 3-4 B). Die untere Bande bei 76 kDa entsprach COX1-FLAG-mRNA ohne Intron1. Der Nachweis der 76 kDa Bande belegte, dass das Intron1 aus COX1b-mRNA und auch aus der ΔG-Variante herausgespleißt wurde. So entstand den untersuchten COX1b-Varianten schon auf mRNA-Ebene eine COX1. Die entstehende COX1-mRNA kann voll translatiert werden. Die Ergebnisse aus dieser FLAG-Tag übergreifenden PCR lassen darauf schließen, dass das Intron1 aus COX1b-mRNA entfernt werden kann. Dies entspricht einem möglichen Korrekturmechanismus für die volle Ablesung einer COX1b-mRNA.

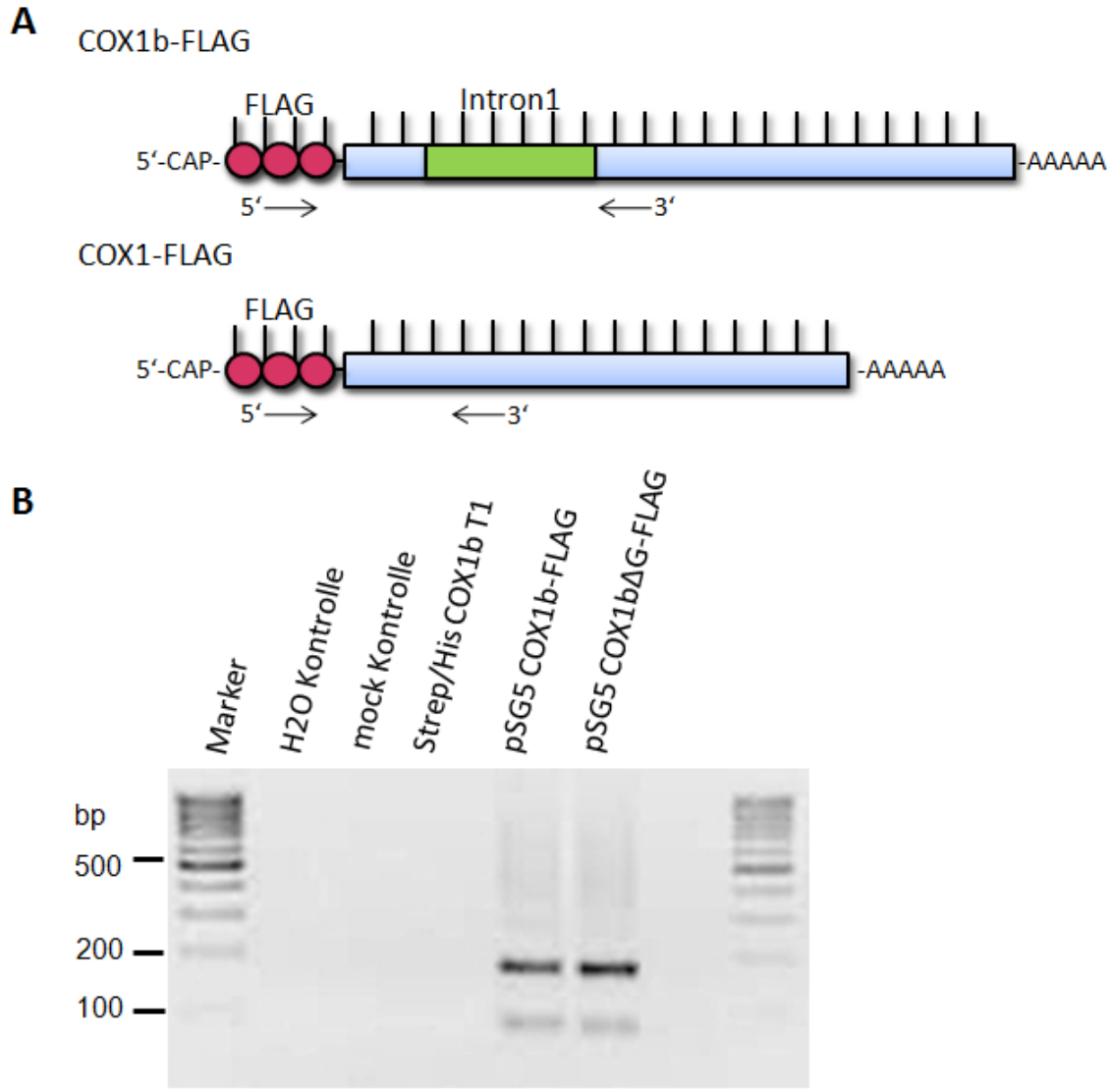


Abbildung 3-4. FLAG-Tag übergreifende PCR.
A Schematische Darstellung der PCR Primer und der Entstehung von COX1-mRNA. **B** Nach der PCR wurden zwei Banden für COX1b- und COX1bΔG-FLAG gefunden: eine 170 bp messende Intron1 enthaltende Bande, und eine 76 bp große Bande nach Spleißen zu COX1-mRNA. Die Negativkontrollen in den Spalten 1-3 zeigten keine Produkte.

4 Charakterisierung der COX1b auf Proteinebene

Im Folgenden werden die Proteinprodukte aus HEK Zellen, die mit COX1b- und COX1bΔG-kodierenden Vektoren transfiziert wurden – unabhängig von der tatsächlichen Proteinsequenz – als „***COX1b***“ und „***COX1bΔG***“ (ggf. mit Tag) bezeichnet. Bei dem Konstrukt COX1bΔG wurde der ORF durch Deletion der 94. Base von Intron1 wieder in den Leserahmen der COX1 verschoben. Die COX1bΔG simuliert so eine Korrektur des Leserahmens durch z.B. ribosomalen Leserastersprung.

Bei der COX1b2 (ΔG 72) und der COX1b3 (ΔC50) handelt es sich um von Qin et al. (2005) beschriebene Varianten, deren Leserahmen durch Deletion der Basen 72 bzw. 50 korrigiert würden.

4.1 Analyse von COX1b-Varianten im Western Blot

Zum spezifischen Nachweis der transfizierten COX1b-Varianten wurden sowohl die COX1b als auch die COX1bΔG mit verschiedenen N-terminalen Proteinmarkierungen versehen. Sie wurden in Vektoren kloniert, die die Proteine mit einem N-terminalen Tag versehen. Neben einem His-Tag (Hexahistidin-Tag) und einem FLAG-Tag wurde ein N-terminales Grün-fluoreszierendes Protein (GFP) angekoppelt (Tab. 4-1).

Tabelle 4-1. Aminoterminale Markierungen der transfizierten COX1b-Konstrukte.

Aminoterminaler Tag	**Sequenz bzw. Protein**	**Vektorbezeichnung**
His	HHHHHH	pcCOX1b-His pcCOX1bΔG-His
FLAG	MDYKDDDK	psgCOX1b-FLAG psgCOX1bΔG-FLAG
GFP	maxFP-GreenC	pmaxFP-COX1-GFP pmaxFP-COX1b-GFP pmaxFP-COX1bΔG-GFP

Des Weiteren wurden COX1b und COX1bΔG in den pQE-TriSystem His-Strep Vektor (Qiagen) kloniert, der einen N-terminalen Streptavidin- und einen C-terminalen His-Tag (Octahistidin-Tag) anhängt.

4.1.1 Analyse von COX-Varianten im Western Blot mit α-COX1-Antikörper

HEK 293 Zellen wurden mit pcCOX1, pcCOX1b-His, und pcCOX1bΔG-His transfiziert. Ferner wurden psgCOX1b-FLAG und psgCOX1bΔG-FLAG in der Transfektion eingesetzt. Die Zelllysate wurden im Western Blot mit dem α-COX1-Antikörper (AK) analysiert.

Der α-COX1-AK detektierte bei Transfektion von pcCOX1 eine singuläre Bande bei ca. 70 kDa. Das Molekulargewicht entsprach erwartungsgemäß dem der humanen COX1, die je nach Glykosylierungsgrad zwischen 66 und 72 kDa läuft. Die Transfektion mit

COX1b-Konstrukten ergab ebenfalls eine singuläre Bande bei ca. 70 kDa. Dieses 70 kDa große Protein entstand nicht nur bei Transfektion der leserasterkorrigierten Mutante COX1bΔG, sondern auch bei Transfektion von COX1b-Konstrukten (Abb. 4-1), obwohl aus COX1b-mRNA aufgrund des verfrühten Stoppkodons ein verkürztes Protein entstehen müsste, das sich von COX1 unterscheidet. Da das Protein mit dem α-COX1-AK reagiert, muss es einen Teil der Sequenz – das Epitop des Antikörpers – mit der COX1 gemeinsam haben. Der Leserahmen muss korrigiert worden sein, damit ein Protein dieser Größe entstehen und vom Antikörper erkannt werden kann. Das kalkulierte Molekulargewicht von COX1bΔG-His bzw. -FLAG ist mit 73 bzw. 74 kDa höher als das der COX1. Auf dieser Höhe konnte jedoch keine Bande detektiert werden. Im Western Blot mit α-COX1-AK waren die COX1b-Varianten nicht von COX1 zu unterscheiden.

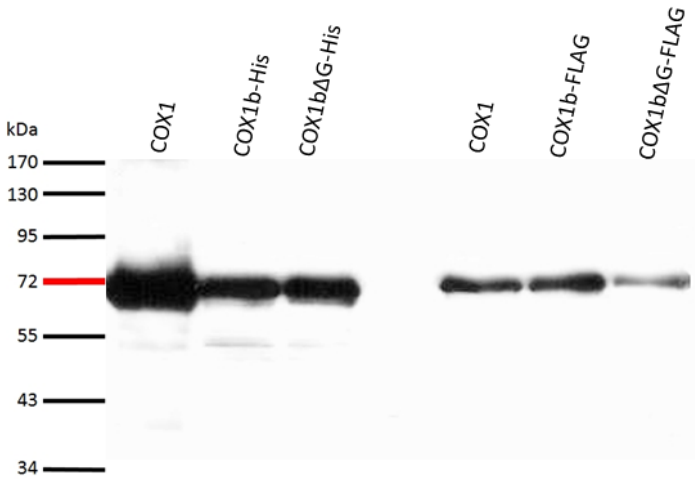


Abbildung 4-1. Vergleich der COX-Konstrukte im Western Blot mit α-COX1-AK. Transfektionsprodukte von COX1, COX1b und COX1bΔG mit His- bzw. FLAG-Tag aus HEK 293 Zellen sind im Western Blot mit α-COX1-AK (1:200) nicht unterscheidbar. Bei allen Konstrukten findet sich eine singuläre Bande bei ca. 70 kDa.

4.1.2 Analyse von COX1b-Varianten im Western Blot mit α-His-Antikörper

Die Vektoren pcCOX1b-His und pcCOX1bΔG-His wurden in HEK 293 und COS-7 Zellen transfiziert, die exprimierten Produkte mit α-His-AK im Western Blot analysiert und mit pcCOX1 und mock-transfizierten Zellen verglichen. Der α-His-AK detektierte bei allen verwendeten Konstrukten unspezifische Banden bei 60, 80, 110 und 150 kDa (Abb. 4-2). Bei 70 kDa, bzw. bei dem für COX1bΔG-His errechneten Molekulargewicht von 73 kDa, wurde keine spezifische Bande gefunden. Bandenmuster verschiedener Zelllinien (COS-7 und HEK 293) unterschieden sich bereits unabhängig vom der N-

terminalen Markierung. Im Vergleich von vermeintlich getaggten und ungetaggten Proteinen im Western Blot konnte kein Unterscheid im Bandenmuster detektiert werden. Daher konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob Proteine in den detektierten Banden tatsächlich einen N-terminalen His-Tag trugen oder nicht. Drei weitere α-His-AK eines anderen Herstellers wurden getestet. Auch sie lieferten Hintergrundbanden und konnten das Problem des His-Tag Nachweises nicht lösen (nicht dargestellt).

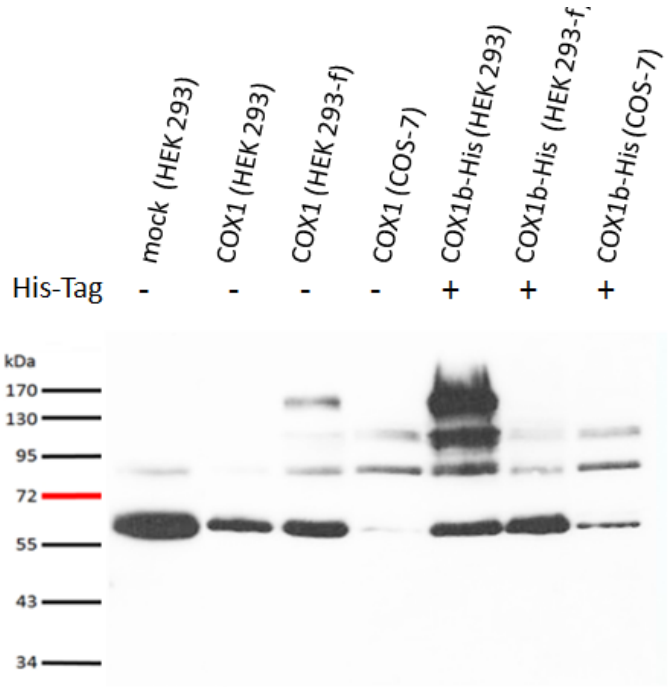


Abbildung 4-2. Vergleich der COX-Konstrukte im Western Blot mit α-His-AK. Im Western Blot mit α-His.H8-AK (1:2000) mit erwartbar getaggten und ungetaggten Proteinen aus drei Zellsystemen entsteht das typische Bandenmuster sowohl in Negativ- (Spalten 1-4) als auch in Positivkontrollen (Spalten 5-7).

4.1.3 Analyse von COX1b-Varianten im Western Blot mit α-FLAG-Antikörper

psgCOX1b-FLAG und psgCOX1bΔG-FLAG wurden in HEK 293 Zellen transfiziert und im Western Blot mit α-FLAG-AK analysiert. Als Positivkontrolle diente COX1b-FLAG aus COS-7 Zellen, in denen der Tag erhalten bleibt (Censarek et al., 2006). Der Antikörper erkannte eine distinkte, singuläre Bande bei ca. 70-72 kDa für das FLAG-markierte Konstrukt aus COS-7 Zellen (Abb. 4-3).

Bei den in HEK 293 Zellen überexprimierten COX1b-Varianten konnte jedoch keine FLAG-Markierung nachgewiesen werden. Eine unscharfe Bande bei ca. 60 kDa war auch in mock-transfizierten Zellen zu finden, und muss daher als unspezifisch gelten.

Beim für die COX1bΔG-FLAG berechneten Molekulargewicht von 74 kDa (vgl. Tab. 4-8) konnte keine Bande mit dem Antikörper gefunden werden. Auch zu früheren Zeit-

punkten nach der Transfektion gelang in HEK 293 Lysaten kein Nachweis des FLAG-Tags (nicht dargestellt).

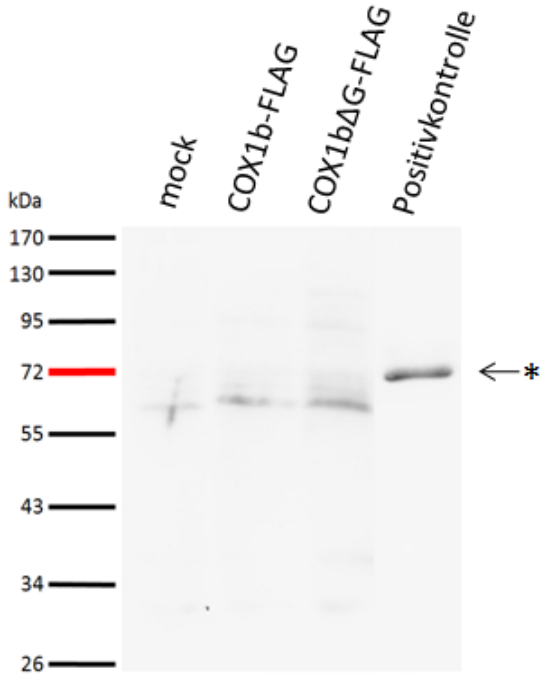


Abbildung 4-3.
Analyse von HEK 293 Lysaten im Western Blot mit α-FLAG-AK (1:2000).
Als Positivkontrolle (*) diente COX1b-FLAG aus COS-7 Zellen. Eine schwache Bande bei ca. 60 kDa ist auch in mock-transfizierten Zellen zu finden.

4.1.4 Analyse von GFP-markierten COX-Varianten im Western Blot

Zur besseren Größenunterscheidbarkeit der N-terminal markierten und unmarkierten Produkte wurde die COX mit einem größeren Tag, dem GFP-Tag (maxFP-Green, 26 kDa) versehen. Mit COX-GFP-Varianten transfizierte HEK 293 Zellen wurden im Western Blot mit α-COX1-AK und einem spezifischen Antikörper gegen den GFP-Tag analysiert. Als Positivkontrolle für den α-GFP-AK wurde das GFP-Protein im pmaxFP Leervektor allein transfiziert und wie erwartet bei 26 kDa detektiert, Banden geringerer Größe stellten Proteolyseprodukte dar (Abb. 4-4B).

Für die COX-GFP-Fusionsproteine ergab sich unabhängig vom der Zeitspanne zwischen Transfektion und Untersuchung folgendes Bild: Im Western Blot mit α-COX1-AK fanden sich bei allen drei untersuchten Konstrukten, COX1-GFP, COX1b-GFP und COX1bΔG-GFP zwei Banden. Die obere Bande lag in allen Fällen bei 95 kDa, eine zusätzliche Bande fand sich bei 70 kDa. Ein Unterschied in der elektrophoretischen Mobilität war bei den drei Konstrukten nicht ersichtlich (Abb.4-4A). Die bei 95 kDa detektierte Bande entspricht dem errechneten Molekulargewicht des Fusionsproteins COX1-GFP (Tab. 4-2). Auch für COX1bΔG-GFP und eine ähnlich *leserasterkorrigierte*

COX1b-GFP wäre eine Bande auf etwa dieser Höhe zu erwarten. Warum die Bande als Doppelbande auftrat, blieb ungeklärt. 70 kDa entsprechen dem Molekulargewicht einer COX1, evtl. nach Signalpeptidabspaltung.

Tabelle 4-2. Kalkulierte Molekulargewichte der GFP-Varianten.

Konstrukt	**AS**	**kDa**	**Größe des Signalpeptides bzw. Differenz zu COX1 [kDa]**
COX1-GFP	840	95,29	29,29
COX1b-GFP *unkorrigiert*	317	34,79	
COX1bΔG-GFP	871	98,82	32,83

Zusätzlich zum α-COX1-AK wurden die Lysate mit einem α-GFP-AK im Western Blot analysiert. Bei 95 kDa, der Größe des COX-GFP Fusionsproteins, fand sich bei allen COX-GFP-Varianten eine zum COX1-Western Blot korrespondierende Bande. Bei dem dort detektierten Protein handelte es sich also um eine Cyclooxygenase, die den GFP-Tag trug.

Allein bei der COX1bΔG-GFP konnte zudem eine spezifische Bande bei ca. 34 kDa detektiert werden. Die Bande liegt eindeutig höher als die des alleinigen GFP-Proteins (vgl. GFP-Leervektor: 26 kDa), muss also einen durch das COX-Protein codierten Anteil enthalten. Rechnerisch entspricht dieses 34 kDa große Protein dem Signalpeptid oder dem durch ein verfrühtes Stoppkodon verkürzten Fragment der COX1b. Letzteres ist unwahrscheinlich, da die COX1bΔG mit korrigiertem Leserahmen vorliegt und ein frühzeitiger Abbruch nicht stattfinden sollte. Dies stellt einen Hinweis auf eine Signalpeptidabspaltung dar. Warum diese Bande nur für die COX1bΔG detektiert wird, ist unklar.

Eine Bande bei 65 kDa trat in allen Proben, auch in mock-transfizierten und COX1-transfizierten Negativkontrollen, auf und muss daher als unspezifisch angesehen werden (Abb. 4-4B).

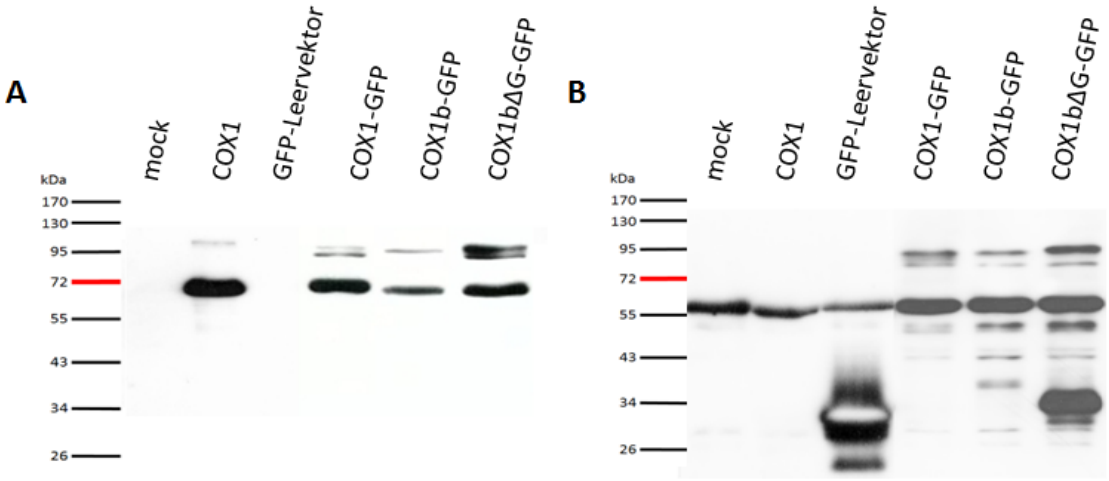


Abbildung 4-4. Analyse von COX-GFP im Western Blot.
Zelllysate aus transfizierten HEK 293 Zellen wurden im Western Blot mit **A** α-COX1-AK (1:200) und **B** α-GFP-AK (1:20.000) untersucht.

In COS-7 Zellen, einer nicht humanen Zelllinie, blieb der GFP-Tag in höherem Maße erhalten. Im α-COX1-Western Blot war die 95 kDa Bande deutlich kräftiger als die 70 kDa Bande. Offenbar sind GFP-Tag-tragende Proteine in dieser Zelllinie stabiler. Im Zeitverlauf mit Erntezeiten von 18 bis 96 h nach Transfektion zeigte sich in COS-7 Zellen überdies eine relative Zunahme der 70 kDa Bande. Die 95 kDa Bande wurde im Zeitverlauf im Verhältnis schwächer (Abb. 4-5). Dies legte nahe, dass es sich bei der 95 kDa Bande um eine Zwischenstufe handelte, die im Verlauf zur 70 kDa großen COX1 gespalten wurde.

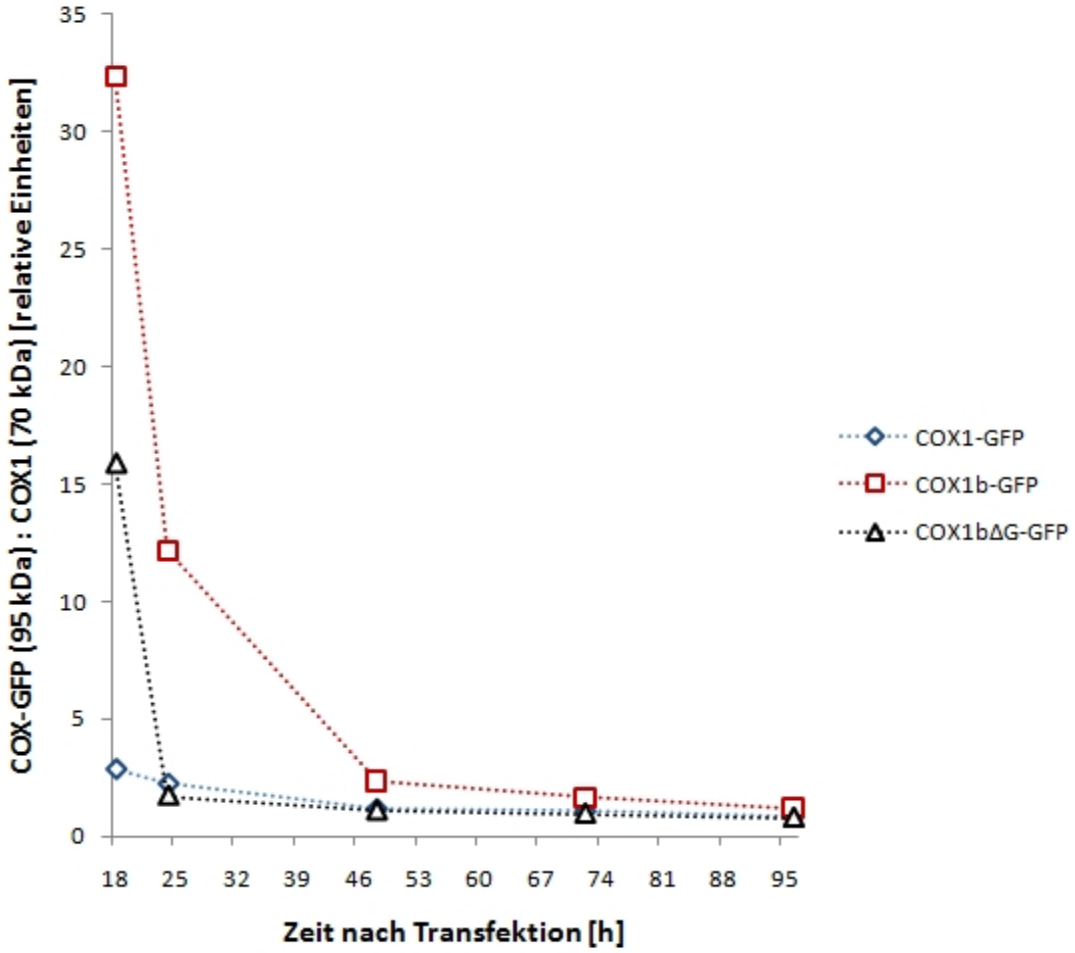


Abbildung 4-5. Zeitabhängige Abspaltung des GFP-Tags im Zeitverlauf in COS-7 Zellen. Mit pcCOX1, pcCOX1b-His und pcCOX1bΔG-His transfizierte COS-7 Zellen wurden im Western Blot mit α-COX1-AK (1:200) untersucht. Die densitometrische Dichte der 95 kDa großen Bande mit GFP-Tag und der 70 kDa großen Bande wurden im Verhältnis zueinander im Zeitverlauf dargestellt (Originaldarstellung).

4.1.5 Hinweise auf ein verfrühtes Stoppkodon?

Aufgrund der Verschiebung des Leserahmens durch das Intron1 und des dadurch entstehenden verfrühten Stoppkodons bei 249 bp sollten theoretisch nur kurze Proteinfragmente entstehen, sofern der Leserahmen nicht korrigiert wurde. Das erwartete Molekulargewicht liegt bei ca. 9 kDa für die COX1b-His und COX1b-FLAG, bzw. bei 34 kDa für die COX1b-GFP (Tab. 4-3).

Tabelle 4-3. Kalkulierte Molekulargewichte der Proteinfragmente infolge eines verkürzten Stoppkodons.

Konstrukt	**AS**	**kDa**
COX1b *unkorrigiert*	82	8.7

COX1b-His *unkorrigiert*	88	9.5
COX1b-FLAG *unkorrigiert*	94	10.2
COX1b-GFP *unkorrigiert*	317	34.8

Nach diesen verkürzten Proteinfragmenten wurde im Western Blot mit α-COX1b-AK und Antikörpern gegen die N-terminalen Tags gesucht (vgl. 4.1.6). Weder mit dem gegen die putative Aminosäuresequenz des Intron1 gerichteten α-COX1b-AK, noch mit den α-His- bzw. α-FLAG-AK konnte ein Protein entsprechender Größe gefunden werden. Ein 34 kDa großes Fragment findet sich nur bei COX1bΔG-GFP, bei der aber durch die Basendeletion kein verfrühtes Stoppkodon auftritt (vgl. Abb. 4-4B). Es handelt sich dabei höchstwahrscheinlich um das abgespaltene Signalpeptid mit dem GFP-Tag (vgl. 4.1.4). Hinweise auf ein verkürztes COX1b-Protein ergaben sich nicht.

4.1.6 Analyse von COX-Varianten in Zellkultur und Geweben im Western Blot mit α-COX1b-Antikörper

Der im Folgenden als α-COX1b-AK bezeichnete Antikörper wurde analog zum von Qin et al. (2005) veröffentlichten Antikörper synthetisiert (vgl. 2.3). Er richtet sich gegen die Aminosäuren 2-12 der putativen Intron1-Sequenz der humanen COX1b.

a) HEK 293 Zellkultur

In HEK 293 Zellen überexprimierte COX1, COX1b- und COX1bΔG-Varianten mit verschiedenen N-terminalen Tags wurden im Western Blot mit α-COX1b-AK analysiert. Dabei fanden sich in allen Proben vier Banden bei ca. 45, 50, 53 und 60 kDa, wobei die prominenteste bei ca. 60 kDa lag. Es handelte sich um unspezifisch auftretende Banden, da sie auch in der COX1-Negativkontrolle und in mock-transfizierten Zellen zu finden waren. Eine spezifische Bande auf Höhe eines COX1b-Konstruktes (vgl. Tab 4-8) konnte nicht nachgewiesen werden.

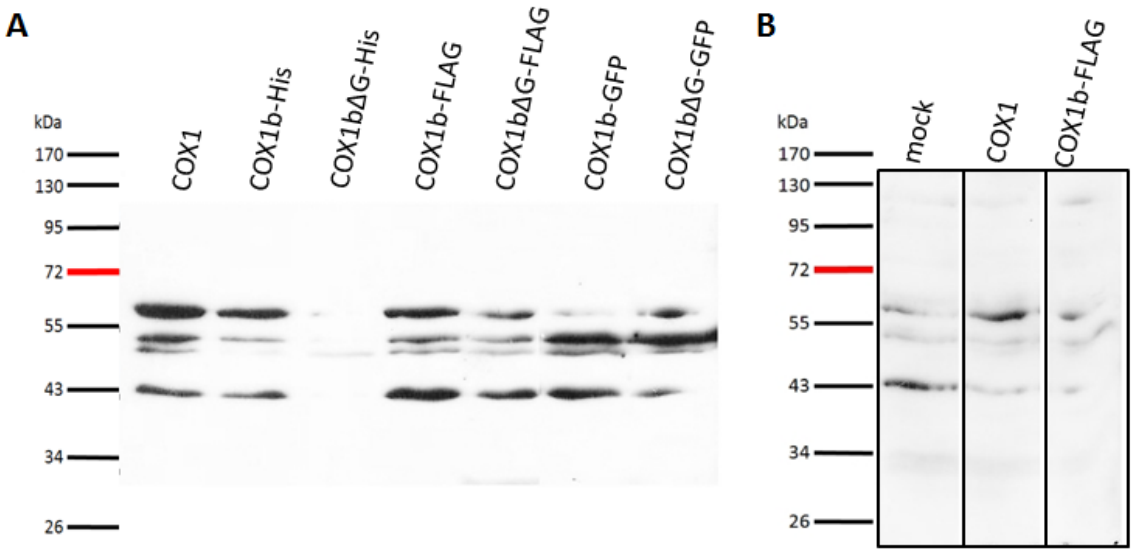


Abbildung 4-6. COX1 und COX1b-Varianten aus HEK 293 im Western Blot mit α-COX1b-AK (1:500). **A** Bei allen transfizierten Konstrukten sind vier Banden (45/50/53/60 kDa) detektierbar. **B** Negativkontrollen zeigen dasselbe Bandenmuster wie die vermeintlich Intron1 enthaltende COX1b.

b) Gewebeproben

Gewebeproben aus Niere, Leber und Magen wurden mit dem α-COX1b-AK im Western Blot analysiert. Eine Bande bei ca. 53 kDa konnte in allen Geweben detektiert werden. In Magenproben fand sich zusätzlich eine 55 kDa große Bande.

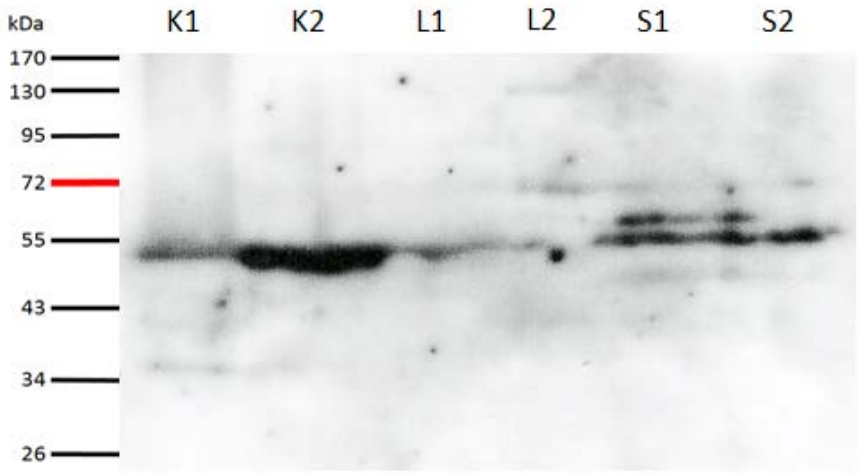


Abbildung 4-7. Gewebeproben aus Niere (K), Leber (L) und Magen (S) wurden im Western Blot mit α-COX1b-AK (1:500) analysiert. Eine Bande bei ca. 53 kDa wurde in allen Proben detektiert.

c) Gewebeblot

Um eine höhere Gewebevielfalt (neben Leber-, Magen- und Nierenproben) zu untersuchen und zu überprüfen, ob der Antikörper die bei Qin et al. (2005) beschriebenen Ban-

den reproduzierbar detektiert, wurde ein Gewebeblot mit humanem Normalgewebe eingesetzt. Der Gewebeblot der Firma BioChain (W1234404) wurde vergleichend mit α-COX1- und α-COX1b-AK untersucht.

Im Western Blot detektierte der α-COX1-AK die COX1 erwartungsgemäß bei 70 kDa. Die höchsten COX1 Konzentrationen fanden sich in Niere (3), Pankreas (6) und Reproduktionsorganen (13, 15). In einigen Proben (5-7, 9, 11-16) wurde eine weitere Bande bei ca. 55 kDa detektiert. Möglicherweise handelt es sich um ein Proteolyseprodukt, da in einigen Geweben kleinere Fragmente um 25 kDa gefunden wurden.

Der α-COX1b-AK detektierte in den meisten Organen ebenfalls eine Bande bei ca. 55 kDa. Besonders prominent nachweisbar war diese Bande in Pankreas, Kolon, Dünndarm, Uterus und Hoden (6, 10, 11, 13, 15), deutlich in Herz, Niere, Lunge, Milz, Magen, Rektum, Prostata und Plazenta (1, 3, 5, 7, 12, 14, 16), schwach in der Leber (4). Nur in Gehirn (2) und Skelettmuskulatur (8) war sie nicht zu finden. Zu weiteren Ausführungen zu einem Protein dieser Größe sei auf Abschnitt 4-6 verwiesen.

Das mit α-COX1b-AK detektierte Protein wies eine höhere elektrophoretische Mobilität auf als die mit α-COX1-AK detektierte COX1. Demzufolge ist es zu klein um aus COX1 plus Intron1 und Signalpeptid zu bestehen. Eine durch Korrekturmechanismen voll abgelesene COX1b sollte mindestens 72 kDa groß sein und ca. 55 AS mehr enthalten als die COX1. Sie sollte damit eine geringere elektrophoretische Mobilität besitzen.

Herz (1) und Gehirn (2) zeigten ein differentes Bandenmuster. Im Herzen fanden sich neben der 55 kDa Bande auch Banden bei 45 kDa und 95 kDa. Im Gehirn fanden sich Banden bei 220 kDa, 95 kDa, sowie bei 48 und 50 kDa. In Niere (3), Lunge (5), Pankreas (6) und Plazenta (16) detektierte der α-COX1b-AK eine zusätzliche Bande um 110 kDa. Möglicherweise handelte es sich um Dimerisierungsprodukte des 60 kDa Proteins.

In keinem der 16 untersuchten Gewebe wurde mit α-COX1b-AK eine Bande bei ca. 72 kDa detektiert, die der erwarteten Größe der COX1b entspricht. Auch ein 9 kDa großes COX1b-Fragment, das einem verkürzten Protein oder dem Signalpeptid entspräche, wurde im Gewebeblot nicht gefunden.

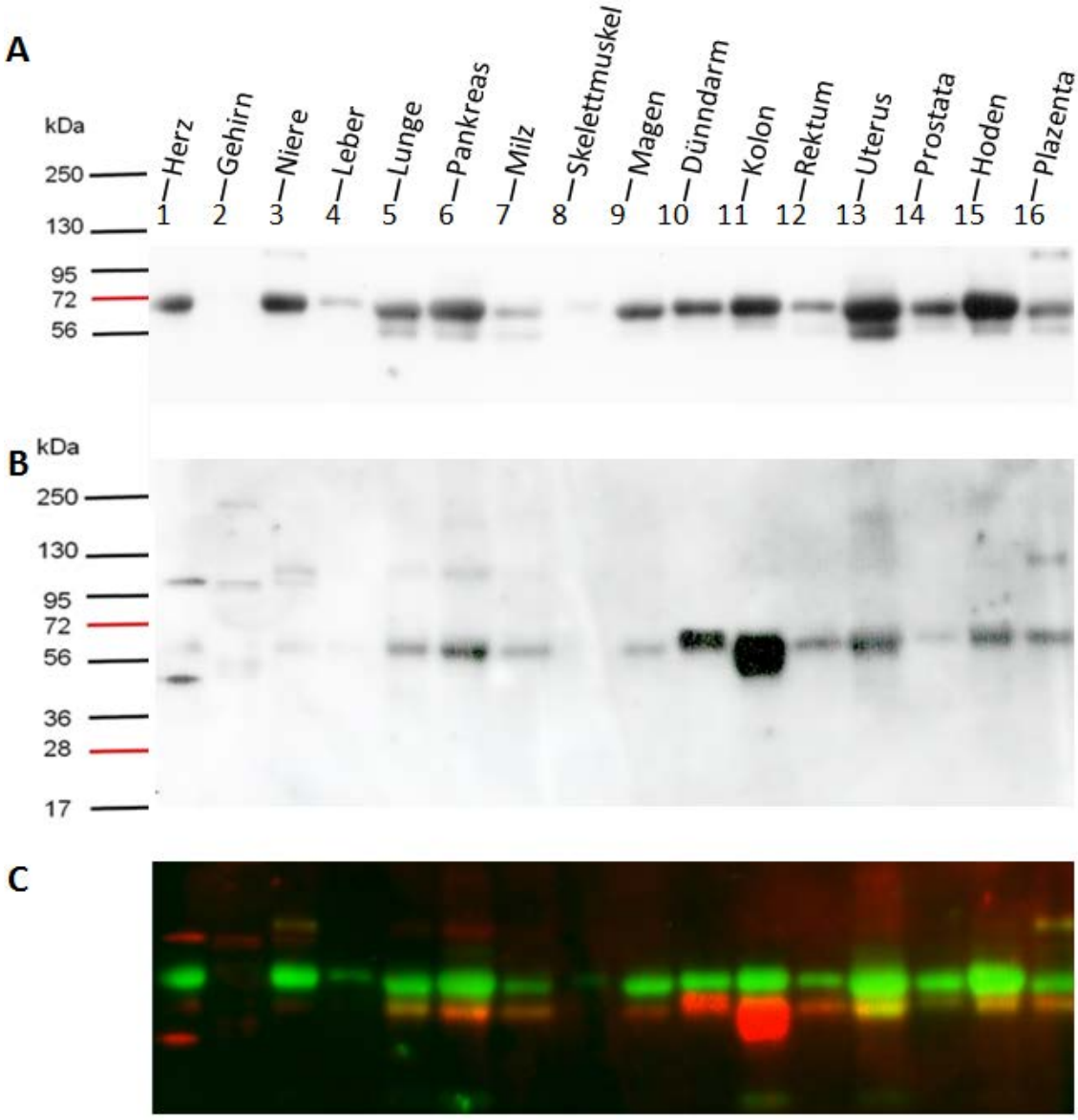


Abbildung 4-8. Gewebeblot mit humanem Normalgewebe.
Der Gewebeblot (BioChain W1234404, lot. # B304008) wurde im Western Blot mit **A** α-COX1-AK (1:200) und **B** mit α-COX1b-AK (1:250) analysiert. **C** Die Western Blots wurden im Subtraktionsverfahren überlagert (grün: α-COX1-Western Blot, rot: α-COX1b-Western Blot).

4.2 Lokalisationsbestimmung der COX1b-Varianten

Eine Veränderung des Signalpeptids durch Retention von Intron1 und Addition des N-terminalen Tags könnte Einfluss auf die Lokalisation des Proteins nehmen. Daher wurde die zelluläre Lokalisation der COX1b-Varianten in transfizierten HEK 293 Zellen untersucht. Fluoreszenzmikroskopisch war das Verteilungsmuster von COX1b- dem von COX1bΔG- und COX1-GFP ähnlich, mit perinukleärer Anhäufung und granulär-retikulärer Struktur im Plasma. Die COX1 ist der mikrosomalen Fraktion zuzuordnen

und bindet an Kernmembran und raues endoplasmatisches Retikulum (Song & Smith, 1996).

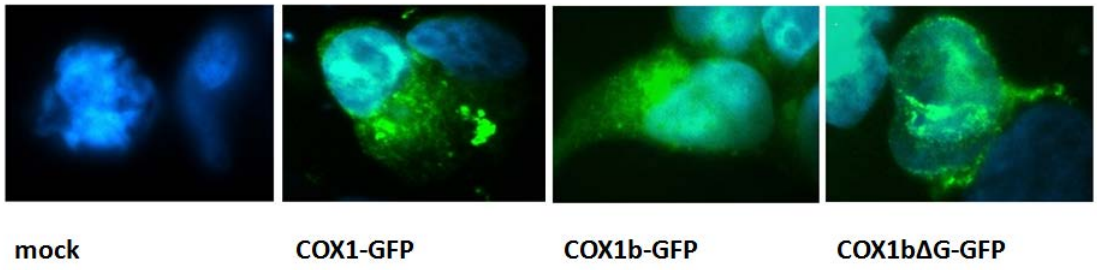


Abbildung 4-9. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der COX-GFP-Varianten. N-terminal mit GFP markierte pmaxFP-GreenC-COX-Varianten wurden in HEK 293 Zellen transfiziert und nach Kernfärbung mit Hoechst 3342 mit dem Durchlichtmikroskop unter UV-Licht visualisiert (Olympus BX 50, 1000 x).

Mittels differenzieller Zentrifugation wurden Zellbestandteile transfizierter, homogenisierter HEK Zellen aufgetrennt. Dabei wurde zytosolisch gelegenes, nicht membrangebundenes und mikrosomal lokalisiertes Protein unterschieden. Die Kernfraktion wurde nicht gesondert untersucht. In der Lokalisation von COX1 und COX1b- bzw. COX1bΔG-His konnte in HEK Zellen kein Unterschied festgestellt werden. Ähnlich der nativen COX1 fanden sich die COX1b-His-Varianten nahezu vollständig in den Membranpellets der mikrosomalen Fraktion (Abb. 4-10B). Da COX1b-Varianten zudem nur durch Detergenzien in Lösung gebracht werden konnten, kann davon ausgegangen werden, dass die Membranbindungseigenschaften durch die Veränderung des N-Terminus nicht gestört wurden (vgl. Marshall & Kulmacz, 1988). Die Veränderung des Signalpeptides und auch des N-terminalen Tags beeinflussten die Lokalisation der Cyclooxygenasen in der Zelle nicht. Die COX1b-Varianten verhielten sich in ihrer Verteilung ähnlich der nativen COX1.

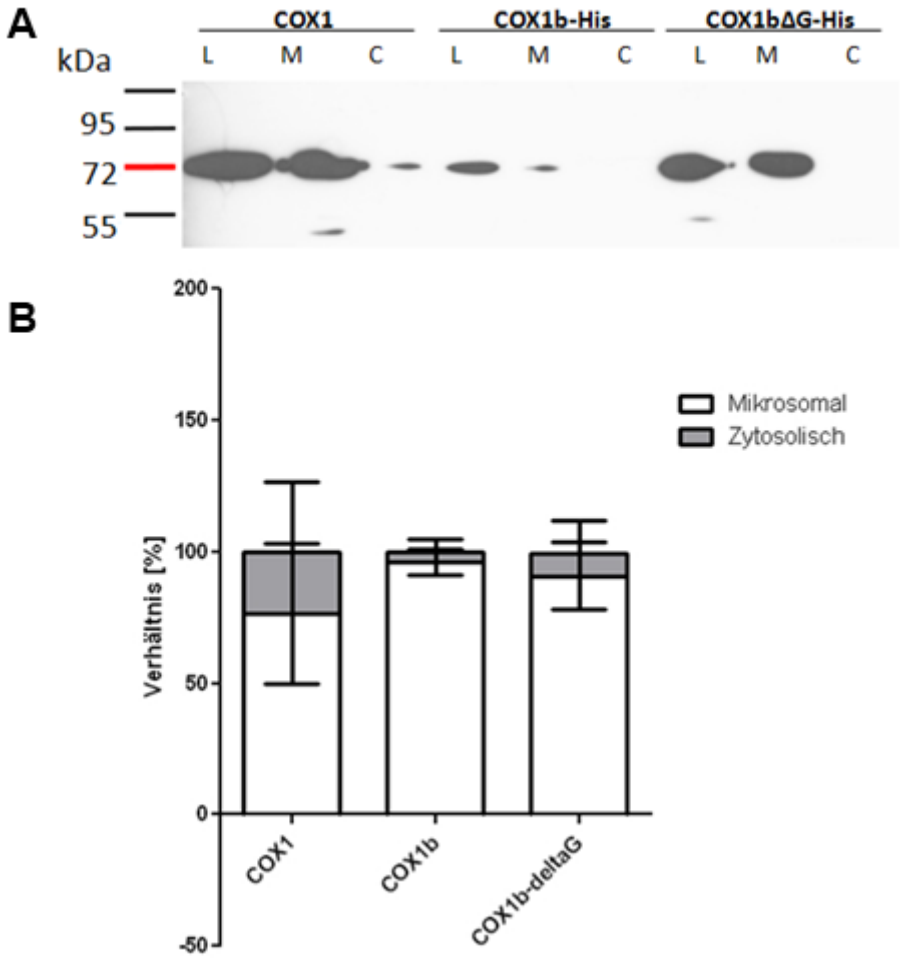


Abbildung 4-10. Subzelluläre Lokalisation von COX1b-His in HEK Zellen
A HEK 293 Zellen wurden mit pcCOX1, pcCOX1b-His und pcCOX1bΔG-His transfiziert und die Zellysate (L) durch differenzielle Zentrifugation in eine cytosolische (C) und eine mikrosomale (M) Fraktion getrennt. Die Fraktionen wurden im Western Blot mit α-COX1-AK (1:200) analysiert. (Exemplarische Darstellung für n=6.)
B Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung von n=6 Versuchen.

4.3 Ni-NTA und Ni-TED Aufreinigung von COX1b-His und COX1bΔG-His

His-getaggte COX-Varianten sollten über ihren N-terminalen Tag aufgereinigt werden. Dafür wurden COX1b-His und COX1bΔG-His der Immobilisierten-Metallionen-Affinitäts-Chromatografie (IMAC) zugeführt. Für die Aufreinigung mit Ni-TED Säulen wurde in *E. coli* und in HEK 293-f, einer HEK Suspensionszelllinie, überexprimiertes Protein eingesetzt. Aliquots der Aufreinigungsschritte wurden im Western Blot mit α-COX1-AK untersucht.

Das überexprimierte Protein aus dem Zelllysat (L) band nicht an die Ni-TED Matrix der Säule, sondern fand sich in der Durchlauf- (F) und Waschfraktion (W1) wieder. In den Elutionsfraktionen mit Imidazol (E1-3) konnte kein aufgereinigtes Protein mit α-COX1-

AK gefunden werden (Abb. 4-11). Mit α-HIS-AK wurde keine spezifische Bande detektiert. Es gelang weder die Aufreinigung von COX1b, noch von COX1bΔG.
Auch mit einem weiteren IMAC System, einer Ni-NTA Matrix, konnte keine Aufreinigung eines His-getaggten Proteins erzielt werden. Es wurde bei 4 °C und unter Einsatz von Proteaseinhibitoren gearbeitet. Durch die Veränderung von Aufreinigungsparametern konnte das Problem nicht gelöst werden: Ein Stufengradient mit Imidazol brachte keine Vorteile. Die Ergebnisse unter denaturierenden Bedingungen mit 8 M Harnstoff fielen identisch aus. Der Einsatz unterschiedlicher Detergenzien veränderte die Ergebnisse nicht. Der Versuch der Aufkonzentrierung der E1 Elutionsfraktion mittels Ultrazentrifugation führte nicht zum Nachweis eines getaggten COX-Proteins im Western Blot (nicht dargestellt). Die Methodik wurde in allen Parametern modifiziert, doch die Aufreinigung eines His-getaggten COX1b-Proteins war nicht möglich. In Zusammenschau mit den Ergebnissen des Western Blots (vgl. 4.1.2) mehrten sich damit die Hinweise, dass der N-terminale His-Tag fehlte.

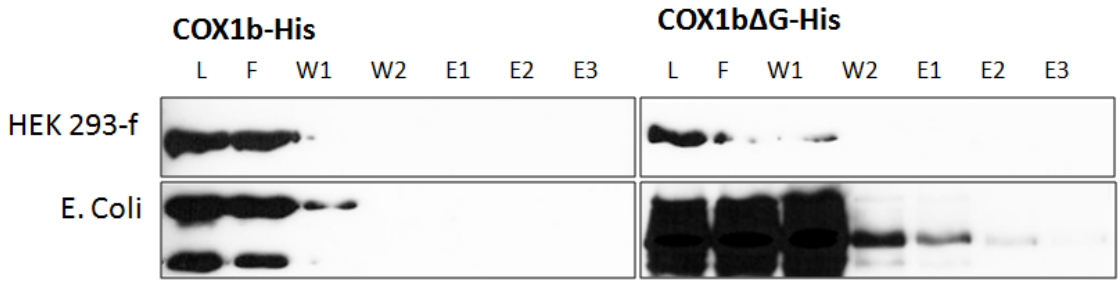


Abbildung 4-11. Ni-TED IMAC mit COX1b-His aus *E. coli* und HEK 293-f.
Die Fraktionen (L=Zelllysat, F=Durchlauf, W1-2=Waschschritte, E1-3=Elutionsfraktionen) wurden im Western Blot mit α-COX1-AK (1:200) analysiert. Es konnte kein spezifisches His-Protein von der Säule eluiert werden. (Repräsentative Darstellung für n=10.)

Um sicherzustellen, dass die Menge an aufgereinigter COX1b nicht unterhalb der Nachweisgrenze lag, wurde nach Ni-NTA Aufreinigung ein Gelstreifen aus einem SDS-Gel auf Höhe der erwarteten COX1b-Varianten ausgeschnitten (ca. 70-75 kDa). Dieser Streifen wurde in der Massenspektrometrie analysiert. Es fanden sich lediglich kontaminierende Proteine, u.a. Hitzeschockprotein HSP 70, das auch im Lysat in großer Menge vorhanden ist. Lediglich ein einzelnes Peptid, das auf das Vorhandensein von einer COX schließen ließ, konnte gefunden werden. Dies war ein weiteres Indiz dafür, dass diese Methode ungeeignet ist, um das aus COX1b-Transfektion entstehende Protein aufzureinigen.

4.4 Immunpräzipitation

In HEK 293 Zellen überexprimierte COX1b und COX1bΔG mit verschiedenen aminoterminalen Tags wurde mittels Immunpräzipitation angereichert. Neben α-COX1-AK wurden zur Präzipitation auch Antikörper gegen die jeweiligen N-terminalen Tags eingesetzt. Es gelang, das bei Transfektion von COX1b-Vektoren überexprimierte Protein durch COX1-Immunpräzipitation aufzureinigen, sichtbar an einer Verstärkung der 70 kDa Bande im α-COX1-Western Blot. Die Präzipitate waren im Coomassie gefärbter SDS-PAGE als distinkte Bande bzw. Doppelbande bei ca. 70 kDa erkennbar (vgl. Abb. 4-12 und 4-14). Daher wurde der Immunpräzipitation mit α-COX1-AK als Aufreinigungsmethode für COX1b-Varianten für die Massenspektrometrie der Vorzug gegeben. Mittels Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen die N-terminalen Tags konnte jedoch keine Aufreinigung erzielt werden. Es konnte keine Bande auf Höhe der COX1b im Western Blot nachgewiesen werden.

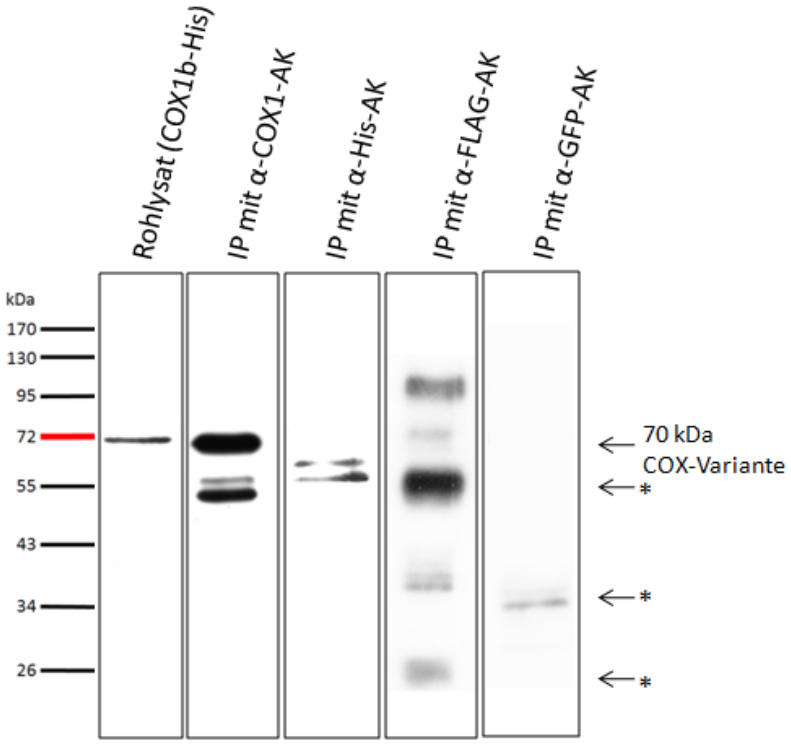


Abbildung 4-12. Immunpräzipitationen (IP) verschieden getaggter COX1b-Proteine. Präzipitate aus IPs mit α-COX1- und α-Tag-AK wurden im Western Blot mit α-COX1-AK (1:200) analysiert. Die 70 kDa Bande des Rohlysates (beispielhaft COX1b-His dargestellt) wurde nur durch α-COX1-IP angereichert (Spalte 2), sie verschwand bei IP mit Antikörpern gg. die N-terminalen Tags. Störbanden (*) kamen durch den präzipitierenden Antikörper selbst zustande. (Exemplarische Darstellung für n = 2 - 6.)

4.5 Untersuchung auf Signalpeptidabspaltung

Wichtige Hinweise auf die Abspaltung des Signalpeptides ergaben sich aus der Untersuchung der COX-GFP-Proteine (vgl. 4.1.4). Bereits der fehlende Größenunterschied zwischen COX1b und COX1 im Western Blot und das Fehlen der aminoterminalen Markierungen wiesen darauf hin, dass der N-Terminus der COX1b im maturen Protein nicht vorhanden ist. Es galt daher, auf die Abspaltung des Signalpeptids zu prüfen. Sowohl eine Retention des Intron1 als auch die Addition des N-terminalen Tags könnten bei der COX1b Einfluss auf die Signalpeptidabspaltung genommen haben.

Voraussetzungen für die Signalpeptiderkennung bestehen im Vorliegen einer positiv geladenen n-Region, gefolgt von einer hydrophoben h-Region. Die Seitenketten der Aminosäuren an den Stellen -3 und -1 vor der Spaltstelle müssen kurz und neutral sein, damit die Spaltung korrekt stattfinden kann (Nielsen et al., 1997). Diese Strukturbedingungen werden durch COX1b und leserasterkorrigierte COX1bΔG, COX1b2 und COX1b3 erfüllt. Die für die Erkennung nötige hydrophobe Sequenz bleibt auch bei Retention und Translation von Intron1 erhalten (Abb. 4-13C).

Um die Wahrscheinlichkeit der Signalpeptiderkennung für die COX1b-Varianten quantitativ zu erfassen, setzten wir die SignalP 3.0 Software ein, die eine Signalpeptidvorhersage erlaubt (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP). COX1b mit vorzeitigem Stoppkodon sowie die leserasterkorrigierten Proteine COX1bΔG, COX1b2 und COX1b3 wurden mit der COX1 verglichen. Die für die Signalpeptiderkennung geforderten Elemente sind in der grafischen Darstellung der HMM Berechnung (*Hidden Markov Model*) erkennbar. Beim *y-peak* der NN Berechung (*Neural Networks*) in Abbildung 4-13B handelt es sich um die präferierte Spaltstelle (Emanuelsson et al., 2007).

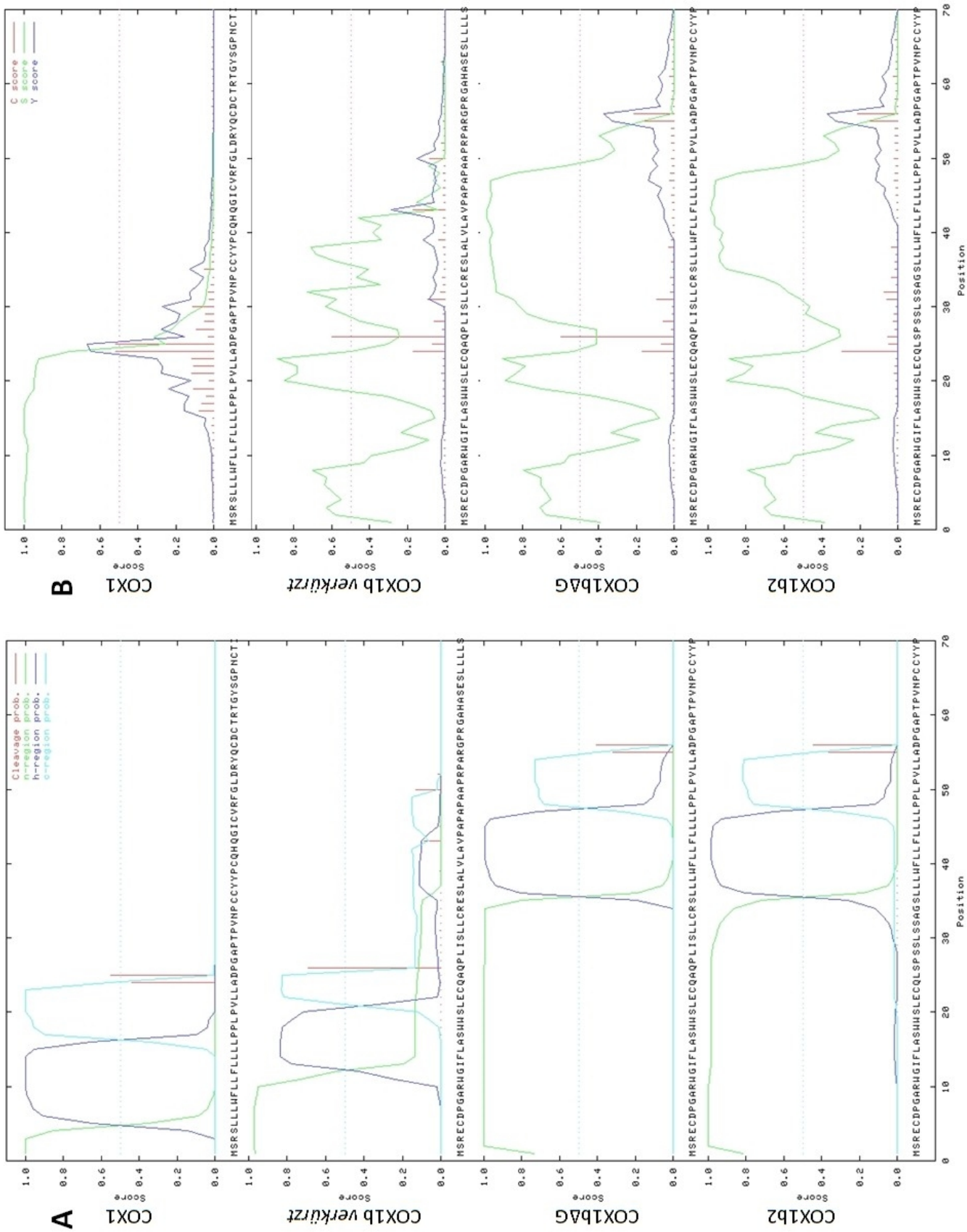
Für COX1 ergab sich, wie erwartet, eine 100 %ige Wahrscheinlichkeit der Signalpeptidabspaltung. Die Signalpeptidspaltstelle der COX1 liegt in der Berechnung wie in der Literatur beschrieben zwischen Leucin 23 und Alanin 24 (Smith et al., 2000 a). Die Signalpeptide der korrigierten Varianten werden mit bis zu 96 %iger Wahrscheinlichkeit (COX1b3) erkannt und abgespalten (Tab. 4-4). Selbst für das unkorrigierte COX1b-Fragment lag die Spaltwahrscheinlichkeit bei 96 %. Die geringste Wahrscheinlichkeit wurde mit 73 % für COX1bΔG berechnet. Die vorhergesagte Spaltstelle der Intron1-retinierenden Varianten blieb wie bei COX1 zwischen Leucin und Alanin und wurde lediglich durch die Insertion im Protein auf die Positionen 55 und 56 nach hinten verschoben.

Für die aminoterminal getaggten Varianten waren Signalpeptiderkennung und -abspaltung umso weniger wahrscheinlich, je länger der angefügte Tag war (Daten nicht gezeigt). Auch hier blieben die erwarteten Spaltstellen zwischen Leucin und Alanin, erkennbar an den y-Peaks der NN (*neural networks*) Berechnung. Sie wurden durch Intron1 und den Tag nach hinten verschoben.

Die Erkennung des Signalpeptides wurde durch die Insertion des Intron1 kaum beeinflusst. Bei Eintritt der Proteine in das endoplasmatische Retikulum fand bei COX1b und den leserahmenkorrigierten Varianten mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Abspaltung statt. Durch Signalpeptidabspaltung entstand aus COX1b und COX1bΔG eine normale COX1 mit 576 Aminosäuren.

Tabelle 4-4. SignalP 3.0 Berechnungen für COX1b-Varianten.

Konstrukt	**Wahrscheinlichkeit für die Signalpeptiderkennung**	**Spaltstelle an Position**
COX1	1.000	24
COX1b *verkürzt*	0.964	25
COX1bΔG	0.733	55
COX1b2	0.815	55
COX1b3	0.955	55


A
B
COX1
COX1b verkürzt
COX1bΔG
COX1b2
Score
Position
Cleavage prob.
n-region prob.
h-region prob.
c-region prob.
C score
S score
Y score
MSRSLLLWFLLFLLLLPPLPVLLADPGAPTPVNPCCYYPCQHQGICVRFGLDRYQCDCTRTGYSGPNCT
MSRECDPGARHGIFLASWHSLECQAQPLISLLCRESLALVLAVPAPAPAAPRPARGPRGAHASESLLLLS

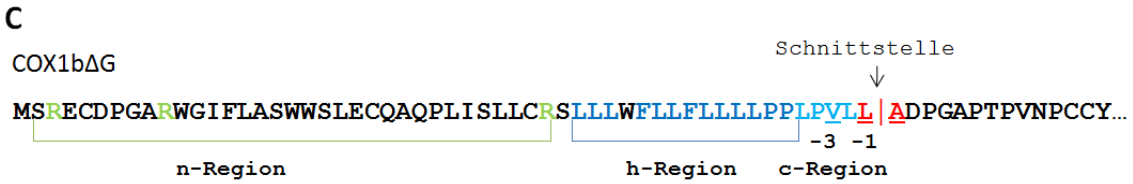


Abbildung 4-13. Ergebnisse der SignalP 3.0 Berechnung.
A und B Grafische Darstellung der Signalpeptidwahrscheinlichkeit mit SignalP 3.0 für die COX-Varianten , Berechnung mit **A:** HMM (*hidden markov models*) und **B:** NN (*neural networks),* bei Standardeinstellungen für Eukaryonten. Wichtige Regionen der Signalpeptiderkennung (n-, h-, c-Region) sind in den HMM Darstellungen farbig markiert; In der NN-Darstellung entspricht sind Signalpeptid (S-Kurve), matures Protein (C-Kurve) und der Ort der Spaltstelle (maximaler Y-Score) markiert.
C Wichtige Regionen der Signalpeptiderkennung, dargestellt anhand der Proteinsequenz von COX1bΔG.

4.6 Massenspektrometrische Untersuchung der COX1b(ΔG)-His

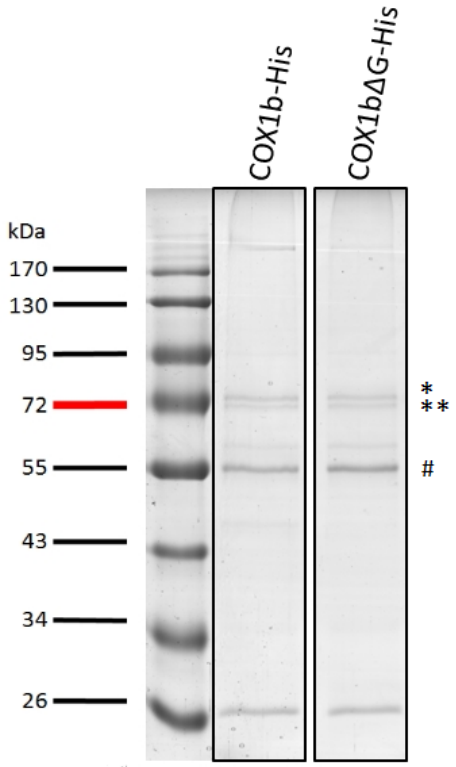


Abbildung 4-14. SDS-Page (10%) nach Immunpräzipitation mit α-COX1-AK. Das SDS-Gel wurde mit kolloidalem Coomassie angefärbt. Die Doppelbande (*/**) um 70 kDa und die Bande (#) um 55 kDa wurden für weitere Analyse in der Massenspektrometrie ausgeschnitten. (Repräsentative Darstellung für n=3.)

In HEK 293 Zellen überexprimierte COX-Varianten waren nach Immunpräzipitation mit α-COX1-AK sauber genug, um aus dem mit Coomassie gefärbten SDS-Gel ausgeschnitten und für die massenspektrometrische Untersuchung herangezogen zu werden. Für zwei Konstrukte, COX1b-His und COX1bΔG-His wurde nach Immunpräzipitation eine Doppelbande um 70 kDa und eine Bande um 55 kDa aus einem SDS-Gel ausgeschnitten (Abb. 4-14). Die Proteine wurden aus dem Gel eluiert, mit Trypsin verdaut

und in der HPLC-gekoppelten ESI MS/MS Massenspektrometrie analysiert. In den ESI MS/MS Massenspektren wurde mit der Mascot Suchmaschine (Mascot v.2.2, www.matrixscience.com, Perkins et al., 1999) eine Proteinidentifikation durch Abgleich mit der IPI Datenbank (v 3.66) durchgeführt und so nach bekannten COX-spezifischen Peptiden gesucht.

a) 70 kDa Doppelbande

Die massenspektrometrische Analyse ergab für die 70 kDa Doppelbanden sowohl von COX1b-His, als auch der COX1bΔG-His diverse Peptide, die typisch für COX1 sind.
Der erste erkannte Sequenzabschnitt begann mit der 86. Aminosäure der COX1bΔG-His, bzw. der 49. Aminosäure einer COX1. Die detektierten Peptide entsprechen Sequenzabschnitten aus drei ähnlichen Proteinen *(similar proteins*) der IPI Datenbank: COX1, COX1b3 (IPI00298267) und COX1 Isoform short (IPI00298268). Damit erkannte die automatische Proteinidentifikation unter anderem das *mögliche* Vorliegen einer, Cyclooxygenase1b3', weil diese seit der Veröffentlichung von Qin et al. (2005) im System verzeichnet ist. Bei der Isoform Short handelt es sich um eine andere, von Diaz et al. (1992) beschriebene COX-Variante, der 37 AS in Exon 9 fehlen, in der aber kein Intron retiniert ist. Diese Proteine wurden sowohl für COX1b-His- als auch für COX1bΔG-His-Proben – wenn auch anhand anderer Peptide – identifiziert. Die zur Identifikation herangezogenen Peptide (Tab. 4-5) passen zwar unter anderem auf COX1b3 und die kurze Isoform, es kann sich aber genauso um eine einfache COX1 handeln, da die Peptide allesamt im hinteren Proteinbereich liegen, der in COX1 und einer *leserasterkorrigierten* COX1b homolog ist (Abb. 4-15). Damit ist nachgewiesen, dass bei der COX1b eine Korrektur stattfindet, sodass der hintere Teil des Proteins wieder im Leserahmen der COX1 liegt. Es konnten jedoch keine für eine COX1b *spezifischen* Peptide aus Signalpeptid oder Intron1 detektiert werden.

COX1b3, (ΔC50, aus Qin et al., 2005)

```
1    MSRECDPGARWGIFLASGGALNARLSPSSLSSAGSLLLWFLLFLLLLPPLPVLLADPGAP   60
61   TPVNPCCYYPCQHQGICVRFGLDRYQCDCTRTGYSGPNCTIPGLWTWLRNSLRPSPSFTH   120
121  FLLTHGRWFWEFVNATFIREMLMRLVLTVRSNLIPSPPTYNSAHDYISWESFSNVSYYTR   180
181  ILPSVPKDCPTPMGTKGKKQLPDAQLLARRFLLRRKFIPDPQGTNLMFAFFAQHFTHQFF   240
241  KTSGKMGPGFTKALGHGVDLGHIYGDNLERQYQLRLFKDGKLKYQVLDGEMYPPSVEEAP   300
301  VLMHYPRGIPPQSQMAVGQEVFGLLPGLMLYATLWLREHNRVCDLLKAEHPTWGDEQLFQ   360
361  TTRLILIGETIKIVIEEYVQQLSGYFLQLKFDPELLFGVQFQYRNRIAMEFNHLYHWHPL   420
421  MPDSFKVGSQEYSYEQFLFNTSMLVDYGVEALVDAFSRQIAGRIGGGRNMDHHILHVAVD   480
481  VIRESREMRLQPFNEYRKRFGMKPYTSFQELVGEKEMAAELEELYGDIDALEFYPGLLLEK   540
541  CHPNSIFGESMIEIGAPFSLKGLLGNPICSPEYWKPSTFGGEVGFNIVKTATLKKLVCLN   600
601  TKTCPYVSFRVPDASQDDGPAVERPSTEL
```

Abbildung 4-15. Massenspektrometrisch identifizierte COX-spezifische Peptide, beispielhaft dargestellt für die COX1b3 Sequenz aus Qin et al. (2005). Der Bereich des Signalpeptids (blau) ist unterstrichen, Intron1 (grün) ist fettgedruckt, die grauen Hervorhebungen kennzeichnen die in der 70 kDa Bande detektierten Peptide. Die identifizierten Peptide liegen im hinteren Bereich, nach dem Signalpeptid.

Tabelle 4-5. COX-spezifische Peptide in der 70 kDa Bande der COX1b-His.

K.ALGHGVDLGHIYGDNLER.Q
K.FDPELLFGVQFQYR.N
K.IVIEEYVQQLSGYFLQLK.F
K.MGPGFTK.A
K.KQLPDAQLLAR.R
K.QLPDAQLLAR.R
R.FGLDR.Y
R.FGMKPYTSFQELVGEK.E
R.LILIGETIK.I
R.LQPFNEYR.K
R.LQPFNEYRK.R
R.NMDHHILHVAVDVIR.E
R.RFLLR.R
R.VPDASQDDGPAVERPSTEL.-
R.WFWEFVNATFIR.E
R.LVLTVR.S

b) 55 kDa Bande

Auch in der 55 kDa messenden Bande wurde in der Massenspektrometrie der COX1b-His das mögliche Vorliegen der ‚Cyclooxygenase1b3' erkannt (IPI00298267). Passende Peptide (Tab. 4-6) beschränkten sich jedoch auf den hinteren Bereich, der auch zur COX1 gehört. Es wurde kein Peptid aus dem Intron1 oder Signalpeptid detektiert.

Tabelle 4-6. COX-spezifische Peptide in der 70 kDa Bande der COX1b-His.

R.RFLLR.R
R.LQPFNEYR.K
K.QLPDAQLLAR.R
R.VPDASQDDGPAVERPSTEL.-
K.ALGHGVDLGHIYGDNLER.Q
R.NMDHHILHVAVDVIR.E
R.FGMKPYTSFQELVGEK.E
R.LILIGETIK.I

Bei der sowohl mit α-COX1-AK als auch mit α-COX1b-AK detektierten (vgl. 4.1.6, Abb. 4-8) 55 kDa Bande kann es sich nicht um die bei Chandrasekharan et al. (2002) beschriebene ‚partielle' pCOX1a handeln. Es wurden Peptide aus dem Bereich von Exon5 bis 8 massenspektrometrisch identifiziert, der bei der pCOX1a deletiert ist.

4.7 Hypothetische COX1b Peptidsequenzen

Für eine Korrektur des Leserahmens der COX1b-mRNA kommen nicht nur die betrachteten Positionen ΔC 50, ΔG 72, ΔG 94 in COX1b2, COX1b3 und COX1bΔG in Frage. Vielmehr kann eine Leserasterkorrektur durch Veränderung einer Base, sei es durch mRNA Editing oder durch ribosomalen Leserastersprung theoretisch an jeder Position vor dem verfrühten Stoppkodon bei 249 bp stattfinden. Je nach hypothetischem Ort der Korrektur ergeben sich unterschiedliche Proteinsequenzen für N-Terminus und Intron1 der COX1b.

Eine Leserahmenkorrektur durch Verlust bzw. Überlesen einer Base wurde an allen 94 Stellen des Intron1 und darüber hinaus bis zum verfrühten Stoppkodon simuliert. Jedes der Nukleotide wurde im Modell entfernt. Die ca. 250 hypothetischen N-terminalen Sequenzen wurden *in silico* mit Trypsin verdaut (mit der Option einer übersprungenen Spaltstelle, *1 missed cleavage site*, Tab. 4-7). Dabei wurden auch die unkorrigierte,

frühzeitig gestoppte COX1b und der aminoterminale His-Tag nach Transfektion mit pcCOX1b-His berücksichtigt. Die generierten hypothetischen Peptide wurden in eine Datenbank eingetragen und diese mit den gefundenen LC-ESI MS/MS Massenspektren korreliert (Abb. 4-16, Tab. 4-7).

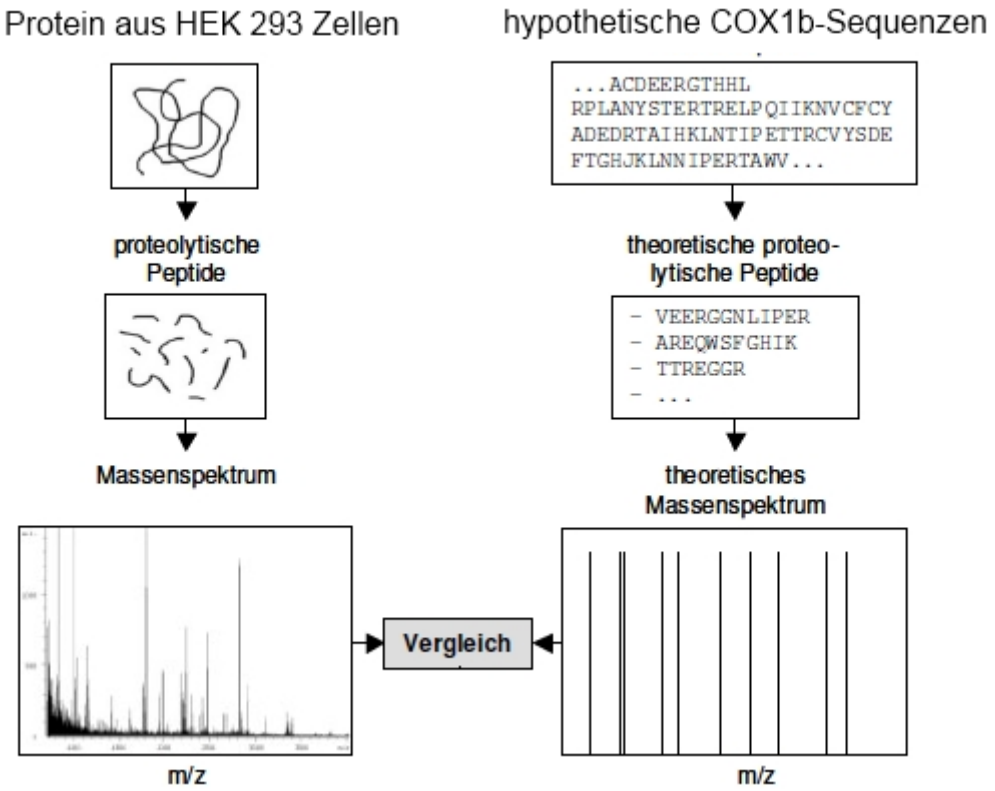


Abbildung 4-16. Schematische Darstellung der Suche nach hypothetischen Peptidsequenzen der COX1b in den Massenspektren (*Abb. modifiziert nach Chamrad, 2004*).

Es wurde keines der möglichen Peptide aus dem N-terminalen Bereich der 250 möglichen Korrekturversionen gefunden. Weder aus Intron1 noch aus dem Signalpeptid konnten Peptide detektiert werden, die das Vorliegen einer COX1b beweisen. Die MS/MS Massenspektren lassen nur auf Peptide schließen, die auch bei einer normalen COX1 nach Signalpeptidabspaltung gefunden würden. Zwar kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich z.B. um COX1b3 oder eine anders korrigierte COX1b handelt, ein sicherer Beweis liegt allerdings nicht vor.

4.8 N-terminale Sequenzierung

Um zu bestätigen, dass eine Signalpeptidabspaltung stattfindet, sollte das Produkt bei Transfektion von COX1b-cDNA in HEK Zellen N-terminal sequenziert werden.

COX1b-FLAG aus HEK 293 Zellen wurde zuvor über eine α-COX1-Immunpräzipitation aufgereinigt, über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Bei der N-terminalen Sequenzanalyse konnten keine Daten gewonnen werden. Das gesuchte Protein war zu gering konzentriert oder N-terminal blockiert, so dass keine freie N-terminale Aminogruppe vorlag. Damit konnte die N-terminale Sequenzierung nicht als Beweis für eine Signalpeptidabspaltung herangezogen werden.

4.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei der Sequenzierung von COX1b-mRNA humaner Gewebeproben aus Leber, Niere und Magen war Intron1 immer exakt 94 bp lang. Die Intronsequenz stimmte bis auf einzelne Ausnahmen mit der veröffentlichten Sequenz überein. Das von Qin et al. (2005) postulierte mRNA Editing konnte nicht nachgewiesen werden.
Bei Betrachtung weiterer potentieller Korrekturmechanismen des Leserahmens zeigte die RNA-Strukturanalyse im Bereich von Intron1/Exon 2 das Auftreten potentieller thermostabiler Pseudoknotenstrukturen in Kombination mit *slippery sites*.
Fernerhin gelang der Nachweis, dass Intron1 noch nachträglich aus COX1b-mRNA entfernt werden kann. Somit kann aus COX1b-mRNA COX1-mRNA entstehen.
Sofern keine Korrektur erfolgt, und Intron1 in der mRNA retiniert wird, sollte durch Leserasterverschiebung ein verkürztes Proteinfragment entstehen. Hinweise auf die Existenz dieses verkürzten COX1b-Proteins ergaben sich nicht.
Stattdessen zeigte sich bei der Untersuchung, dass sowohl bei Transfektion der COX1b, als auch der leserasterkorrigierten COX1bΔG wie bei COX1 in humaner Zellkultur ein 70 kDa großes Protein entstand, unabhängig davon, ob das Konstrukt N-terminal FLAG- und HIS-Tag markiert war. Die Markierungen konnten weder im Western Blot gefunden werden, noch zur Aufreinigung des Proteins über IMAC oder Immunpräzipitation genutzt werden. Allerdings blieb ein 26 kDa großer GFP-Tag am N-Terminus des Proteins in Anteilen erhalten, er wurde zeitabhängig abgespalten, das 34 kDa große Spaltprodukt war für COX1bΔG nachweisbar.
Weder in Lysaten überexprimierender Zellen, noch in Gewebeproben konnte mit einem gegen die Intron1 Sequenz gerichteten α-COX1b-AK eine Bande im Western Blot nachgewiesen werden, die der erwarteten Größe einer COX1b (ca. 72 kDa) entspricht.
Massenspektrometrisch konnten zwar COX1-typische, aber keine für eine COX1b *spezifischen* Peptide aus Signalpeptid oder Intron1 detektiert werden.

Die Wahrscheinlichkeit für die Signalpeptidabspaltung bei einem COX1b-Protein liegt Berechnungen mit SignalP zufolge immer über 73 %. Dementsprechend ist die Signalpeptidabspaltung wesentlicher Gegenstand der Diskussion.

Tabelle 4-7. Liste der gesuchten hypothetischen Peptide.

MHHHHHHSLSATPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ECDPGARWGIFLASVWVTLNAR.L	R.GAHASESLLLSMPAPGHLCPLGL	R.GPRGAHASESLLLYPCQHQGICVR.F
MHHHHHHSR.D	R.ECDPGARWGILFPPGGALNAR.L	R.GAHASESLLLSMPAPGHLCPLR.L	R.GPRGAHASESLLYYPCQHQGICVR.F
MHHHHHHSR.E	R.ECDPGARWGIFWPPGGALNAR.L	R.GAHASESLLLSMPAPGHLCPLRP	R.GPRGAHASESR.C
MHHHHHHSR.G	R.ECDPGARWGISWPPGGALNAR.L	R.GAHASESLLLSMPAPGHLCR.F	R.GPRGAHASNPCCYYPCQHQGICVR.F
MHHHHHHSR.S	R.ECDPGPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.GAHASESLLLSMPAPGHLFR.F	R.GPRGAHAVNPCCYYPCQHQGICVR.F
MHHHHHHSRDATPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ECDPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.GAHASESLLLSMPAPGHLFRFGL	R.GPRGAHPVNPCCYYPCQHQGICVR.F
MHHHHHHSREATPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ECTPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.GAHASESLLLLSMPAPGHLVR.F	R.GPRGAPPVNPCCYYPCQHQGICVR.F
MHHHHHHSRECAPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ESLALFLFLLLLPPLPVLLADPGAPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.GAHASESLLLLSMPAPGHLVRFGL	R.GPRGAQPVNPCCYYPCQHQGICVR.F
MHHHHHHSRECDPGAGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ESLALVLAFLLLLPPLPVLLADPGAPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.GAHASESLLLLSMPAPGHR.V	R.GPRGATPVNPCCYYPCQHQGICVR.F
MHHHHHHSRECDPGAR.G	R.ESLALVLAVLLLLPPLPVLLADPGAPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.GAHASESLLLLSMPAPGHRVR.F	R.GPRGPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F
MHHHHHHSRECDPGAR.W	R.ESLALVLAVPALLPPLPVLLADPGAPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.GAHASESLLLLSMPAPGICVR.F	R.GPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F
MHHHHHHSRECDPGPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ESLALVLAVPAPAPAAPLLLGTQGRPR.Q	R.GAHASESLLLLSMPAPGLCVR.F	R.LLAAQGRPR.Q
MHHHHHHSRECDPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ESLALVLAVPAPAPAAPRL.L	R.GAHASESLLLLSMPAQGICVR.F	R.LLATQGRPR.Q
MHHHHHHSRECTPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ESLALVLAVPAPAPAAPRLLAAQGRPR.Q	R.GAHASESLLLLSMPDQGICVR.F	R.NPCCYYPCQHQGICVR.F
MHHHHHHSRESTPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ESLALVLAVPAPAPAAPRLLATQGRPR.Q	R.GAHASESLLLLSMPHQGICVR.F	R.SATPVPGGEFSWPPGGALNAR.L
MHHHHHHSREWTPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ESLALVLAVPAPAPAAPRPAADPGAPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.GAHASESLLLLSMVCQHQGICVR.F	R.TQGRPR.Q
MHHHHHHSRGATPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ESLALVLAVPAPAPAAPRPADPGAPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.GAHASESLLLLSSQHQGICVR.F	R.VRFGL
MHHHHHHSRSATPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ESLALVLAVPAPAPAAPRPAR.D	R.GAHASESLLLYPCQHQGICVR.F	R.WEFSWPPGGALNAR.L
MSRDATPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ESLALVLAVPAPAPAAPRPAR.G	R.GAHASESLLYYPCQHQGICVR.F	R.WGFSWPPGGALNAR.L
MSREATPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ESLALVLAVPAPAPAAPRPAR.G	R.GAHASESR.C	R.WGIFLAPGGALNAR.L
MSRECAPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ESLALVLAVPAPAPAAPRPADPGAPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.GAHASESRCYYPCQHQGICVR.F	R.WGIFLASCGALNAR.L
MSRECDPGAGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ESLALVLAVPAPAPAAPRPARGPGAPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.GAHASNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.WGIFLASGGALNAR.L
MSRECDPGAR.G	R.ESLALVLAVPAPAPAAPRPARGPR.A	R.GAHAVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.WGIFLASW
MSRECDPGAR.W	R.ESLALVLAVPAPAPAAPRPARGPR.G	R.GAHPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.WGIFLASWALNAR.L
MSRECDPGAR.W	R.ESLALVLAVPAPAPAAPRPLADQGRPR.Q	R.GAPPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.WGIFLASWGALNAR.L
MSRECDPGPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ESLALVLAVPAPAPAAPRPVADQGRPR.Q	R.GAQPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.WGIFLASWVWALNAR.L
MSRECDPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ESLALVLAVPAPAPAAPVLLADPGAPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.GATPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.WGIFLASWWSLDAR.L
MSRECTPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ESLALVLAVPAPAPAAPVLLR.T	R.GATPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.WGIFLASWWSLEAR.L
MSRESTPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ESLALVLAVPAPAPAAPVLLRTQGRPR.Q	R.GEFSWPPGGALNAR.L	R.WGIFLASWWSLECQAQPLISLL
MSREWTPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ESLALVLAVPAPAPAAPVLPR.T	R.GLLLWFLFLLLLPPLPVLLADPGAPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.WGIFLASWWSLECQAQPLISLLCR.D
MSRGATPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ESLALVLAVPAPAPAAPVLPRTQGRPR.Q	R.GPGAPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.WGIFLASWWSLECQAQPLISLLCR.E
MSRSATPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ESLALVLAVPAPALPVLLADPGAPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.GPRAPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.WGIFLASWWSLECQAQPLISLLCR.G
R.APTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.ESLALVLAVPAPAPAVPVLLADPGAPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.GPRGAHAMNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.WGIFLASWWSLECQAQPLISLLCR.S
R.CYYPCQHQGICVR.F	R.ESLALVLAVPAPAPPLPVLLADPGAPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.GPRGAHAR.N	R.WGIFLASWWSLECQAQPLISLLCRESLALVLAVPAPAAPRPAR.G
R.DATPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ESLALVLAVPAPLPPLPVLLADPGAPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.GPRGAHASDPCCYYPCQHQGICVR.F	R.WGIFLASWWSLECQAQPLISLLCRESLAR.F
R.DPGAPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.ESLALVLAVPAPVPPLPVLLADPGAPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.GPRGAHASEPCCYYPCQHQGICVR.F	R.WGIFLASWWSLECR.L
R.EATPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ESLALVLAVPALLPPLPVLLADPGAPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.GPRGAHASESCCYYPCQHQGICVR.F	R.WGIFLASWWSLESR.L
R.ECAPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ESLALVLAVPLLPPLPVLLADPGAPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.GPRGAHASESLCYYPCQHQGICVR.F	R.WGIFLASWWSLNAR.L
R.ECDPGAGGEFSWPPGGALNAR.L	R.ESLALVLFLLLLPPLPVLLADPGAPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.GPRGAHASESLFYYPCQHQGICVR.F	R.WGIFLASWWTLNAR.L
R.ECDPGAR.G	R.ESLALVLVFLLLLPPLPVLLADPGAPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.GPRGAHASESLLFYPCQHQGICVR.F	R.WGIFLPPGGALNAR.L
R.ECDPGAR.W	R.ESLARLF	R.GPRGAHASESLLLHPCQHQGICVR.F	R.WGIFWPPGGALNAR.L
R.ECDPGARGEFSWPPGGALNAR.L	R.ESLARFLFLLLLPPLPVLLADPGAPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.GPRGAHASESLLLLPCQHQGICVR.F	R.WGISWPPGGALNAR.L
R.ECDPGARWEFSWPPGGALNAR.L	R.ESLAWFLFLLLLPPLPVLLADPGAPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.GPRGAHASESLLLLSCQHQGICVR.F	
R.ECDPGARWGFSWPPGGALNAR.L	R.ESTPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.GPRGAHASESLLLLSIQHQGICVR.F	
R.ECDPGARWGIFLAPGGALNAR.L	R.EWTPVPGGEFSWPPGGALNAR.L	R.GPRGAHASESLLLLSMPAPGHCVR.F	
R.ECDPGARWGIFLASVWVTLNAR.L	R.FLFLLLLPPLPVLLADPGAPTPVNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.GPRGAHASESLLLLSMPAPGHLCPFGL	
R.ECDPGARWGIFLASWGALNAR.L	R.GAHAMNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.GPRGAHASESLLLLSMPAPGHLCPLGL	
R.ECDPGARWGIFLASWWALNAR.L	R.GAHAR.N	R.GPRGAHASESLLLLSMPAPGHLCPLR.L	
R.ECDPGARWGIFLASWWSLDAR.L	R.GAHARNPCCYYPCQHQGICVR.F	R.GPRGAHASESLLLLSMPAPGHLCPLRP	
R.ECDPGARWGIFLASWWSLEAR.L	R.GAHASDPCCYYPCQHQGICVR.F	R.GPRGAHASESLLLLSMPAPGHLCPLRP	
R.ECDPGARWGIFLASWWSLECQAQPLISLL	R.GAHASEPCCYYPCQHQGICVR.F	R.GPRGAHASESLLLLSMPAPGHLCR.F	
R.ECDPGARWGIFLASWWSLECQAQPLISLLCR.D	R.GAHASESCCYYPCQHQGICVR.F	R.GPRGAHASESLLLLSMPAPGHLCR.L	
R.ECDPGARWGIFLASWWSLECQAQPLISLLCR.E	R.GAHASESLCYYPCQHQGICVR.F	R.GPRGAHASESLLLLSMPAPGHLF.R	
R.ECDPGARWGIFLASWWSLECQAQPLISLLCR.G	R.GAHASESLLLLSCQHQGICVR.F	R.GPRGAHASESLLLLSMPAPGHLV.R	
R.ECDPGARWGIFLASWWSLECR.L	R.GAHASESLLLLSIQHQGICVR.F	R.GPRGAHASESLLLLSMPAPGHR.V	
R.ECDPGARWGIFLASWWSLESR.L	R.GAHASESLLLLSMPAPGHCVR.F	R.GPRGAHASESLLLLSMQHQGICVR.F	
R.ECDPGARWGIFLASWWSLNAR.L	R.GAHASESLLLLSMPAPGHLCPFGL	R.GPRGAHASESLLLLSSQHQGICVR.F	

Tabelle 4-8. Molekulare Massen der humanen COX-Varianten, kalkuliert anhand ihrer putativen Aminosäuresequenz. Die Proteingrößen wurden mit Expasy ProtParam ohne posttranslationale Modifikationen (average) berechnet. Von Modifikationen durch z.B. Glykosylierung wurde in der Darstellung abgesehen.

	AS (mit Signalpeptid)	**kDa ***	**Differenz zu COX1**	**ohne Signalpeptid**
COX1	599	68.6563	2.7 kDa	576 AS; 66 kDa
Signalpeptid der COX1	23	2.6784		576 AS; 66 kDa
frühzeitig gestoppt				
COX1b *unkorrigiert*	82	8.7343		
COX1b-His *unkorrigiert*	88	9.5571		
COX1b-FLAG *unkorrigiert*	94	10.1847		
COX1b-GFP *unkorrigiert*	317	34.7931		
korrigierte Varianten:				
COX1bΔG-His	636	73.0413	7 kDa	576 AS; 66 kDa
COX1bΔG-FLAG	642	73.6689	7.7 kDa	576 AS; 66 kDa
COX1bΔG-GFP	871	98.8228	32.8 kDa	576 AS; 66 kDa
Hypothetisch:				
COX1bΔG (ΔG 94)	630	72.2184	6.2 kDa	576 AS; 66 kDa
COX1b2 (ΔG 72)	630	72.1091	6.1 kDa	576 AS; 66 kDa
COX1b3 (ΔC 50)	630	71.8158	5.8 kDa	576 AS; 66 kDa
GFP-Varianten:				
COX1-GFP	840	95.2907	29.3 kDa	576 AS; 66 kDa
COX1b-GFP *unkorrigiert*	317	34.7931		
COX1bΔG-GFP	871	98.8228	32.8 kDa	576 AS; 66 kDa

DISKUSSION

5.1 Charakterisierung von Intron1 auf mRNA-Ebene

Die Existenz einer Intron1-retinierenden COX1b-mRNA wurde in verschiedenen humanen Zellen und Geweben beschrieben. Deren prozentualer Anteil an der gesamten COX1-mRNA wurde semiquantitativ auf 5 bis 30 % geschätzt (Chandrasekharan et al., 2002; Qin et al., 2005). Die Retention des 94 bp langen Intron1 in der humanen COX1b-mRNA bedingt eine Leserasterverschiebung am Übergang zu Exon2 und ein verfrühtes Stoppkodon nach 249 bp. Aus humaner COX1b-mRNA sollte daher bei stringenter Translation ein verkürztes, 9 kDa (82 AS) großes Protein entstehen. Bei der von Chandrasekharan et al. (2002) erstbeschriebenen COX1b (‚COX3') des Hundes tritt dieses Phänomen nicht auf, da das canine Intron1 mit 90 bp den Leserahmen nicht verschiebt: Die Retention führt zu einer einfachen Insertion von 30 Aminosäuren in das hydrophobe Signalpeptid.

Auch bei Maus und Ratte wurde eine Retention von Intron1 in der COX1b-mRNA beobachtet. In diesen Organismen verschiebt das 98 bp lange Intron1 den ORF, was zu einem verfrühten Stoppkodon an Position 382 bp führt. Für beide Spezies wurde ein verkürztes COX1b-Protein der erwarteten Größe (13 kDa) gefunden (Snipes et al., 2005, Kis et al., 2006).

Für die humane COX1b konnte jedoch auch in der vorliegenden Arbeit kein entsprechendes verkürztes Fragment auf Proteinebene detektiert werden. Stattdessen entstand in Zellmodellen aus humaner COX1b-mRNA ein ca. 70 kDa großes Protein mit COX-Aktivität (Censarek et al., 2006). Dieses Protein wurde nach Transfektion von HEK 293 Zellen mit COX1b-Konstrukten mit einem spezifischen α-COX1-AK nachgewiesen. Damit aus COX1b-mRNA ein solches COX1-ähnliches und 70 kDa großes Produkt entstehen kann, muss eine Korrektur des Leserahmens erfolgen, so dass die mRNA in voller Länge – bis zum eigentlichen Stoppkodon der COX1 – translatiert werden kann.

Verschiedene Mechanismen, die den kompletten Leserahmen bei Retention des Intron1 wiederherstellen könnten, wurden erwogen. Korrekturmöglichkeiten des Leserahmens auf mRNA-Ebene umfassen:

- mRNA Editing,
- Ribosomalen *Frameshift*;
- Spleißen des Intron aus der mRNA.

Alle drei Möglichkeiten wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit geeigneten Methoden untersucht. Andere Autoren schlugen zudem alternative Polyadenylierung (Simmons, 2003), alternatives Spleißen distal von Exon2 und alternative Startkodons (Kis et al., 2003) vor. Alternative Polyadenylierung hat jedoch nur Einfluss auf die Größe des mRNA-Transkripts und beeinflusst nicht dessen Prozessierung, scheidet also als Reparaturmechanismus aus. Alternatives Spleißen nach Exon2 wurde bisher nicht beobachtet. Es müsste vor dem Stoppkodon bei 249 bp, also im Bereich von Exon2 und Exon3 stattfinden. Auch bei Translationsbeginn an alternativen Startkodons läge der Leserahmen nicht im ORF einer COX1 und das Problem des notwendigen Leserastersprungs würde nicht umgangen.

5.1.1 Sequenzanalyse der Intron1 der COX1b-mRNA

mRNA Editing durch Deletion einer Base in Intron1 stellt einen der vorgeschlagenen Mechanismen zur Leserahmenkorrektur dar. Qin et al. (2005) postulierten, dass der Leserahmen der COX1b durch die Deletion einer Base in der mRNA wiederhergestellt wird. Die Arbeitsgruppe um Qin untersuchte COX1b-mRNA anhand zweier kommerziell erhältlicher humaner cDNA Banken aus Gehirn und Magen. Dabei ist allerdings nicht klar, ob es sich um cDNA einzelner Spender oder um gepoolte cDNA handelt. Dies war auch über den Hersteller (BD Biosciences Clontech) nicht eruierbar. In den beiden cDNA Banken beschrieb Qin bei 7 von 93 Klonen eine Verkürzung des Intron1 um eine Base. Die Klone mit der nun 93 bp langen Intron1 Sequenz wurden anhand der Position der fehlenden Base in zwei Gruppen eingeteilt, die als COX1b2 und COX1b3 bezeichnet wurden. Qin kam zu dem Ergebnis, dass durch Deletion einer Base des Intron1 an den Positionen ΔG 72 (COX1b2) oder ΔC 50 (COX1b3) der Leserahmen der COX1b korrigiert werde. Angaben, in welcher der beiden cDNA Banken diese Varianten gefunden wurden, fehlen.

In der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen der COX1b-mRNA Sequenzanalyse mehr als 100 unabhängige Klone aus Magen- und Leberproben von zehn verschiedenen Spendern analysiert. In keinem der untersuchten Klone wurde die Deletion einer Base festgestellt. Die Intron1 Sequenz präsentierte sich bei doppelter Sequenzierung immer mit 94 bp Länge. Tabelle 5-1 stellt die Befunde beider Arbeiten gegenüber. Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen die Befunde von Dinchuk et al. (2003), die in cDNA aus humanem cerebralem Kortex immer die volle 94 bp lange Sequenz fanden.

Das von Qin et al. (2005) postulierte Deletions-Editing tritt in Trypanonsomen und Paramyxoviren auf (Simpson & Emeson, 1996). In Eukaryonten wurde diese spezielle Form des mRNA Editing bis heute nicht beschrieben. Nach aktuellem Stand der Forschung handelt es sich beim mRNA Editing in Eukaryonten ausschließlich um Substitutions-Editing (meist als C→U und A→I Editing). Einzelne Basen werden modifiziert, die Basenanzahl verändert sich nicht. Die Arbeit von Qin entspräche einer Erstbeschreibung des Deletionsmechanismus in Eukaryonten. Die vorliegende Arbeit kann diese Vermutung nicht bestätigen.

Tabelle 5-1. Gegenüberstellung der Ergebnisse dieser Studie und Qin et al. (2005).

	Qin et al. (2005)	**Diese Studie**
Klone	93 (20 bis 25 unabhängige)	65 + 39 (ca. 10 pro Organismus)
Anzahl Organismen	unbekannt: minimal 2 Individuen oder gepoolte cDNA Banken	10
Gewebe	Gehirn, Magen	Magen, Leber
COX1b1 *unkorrigert*	86	104
COX1b2	5 (Gewebe unbekannt, ebenfalls ob aus einem oder mehreren Organismen)	-
COX1b3	2 (ebenso)	-
Sonstige Abweichungen	keine Angaben	vgl. Tab. 3-1 und 3-2

5.1.2 Analyse der RNA-Struktur

Eine Kompensation der Leserasterverschiebung durch ribosomalen *Frameshift* stellt eine weitere potentielle aber umstrittene Erklärung für die Entstehung eines funktionellen COX1b-Proteins dar (Schwab et al., 2003 b). *Frameshifts* begünstigen durch Verrutschen des Ribosoms und nachfolgende Änderung des ORF die alternative Übersetzung einer mRNA Sequenz. Ein ‚+1 ribosomaler *Frameshift*', das Überlesen einer Base bei der Translation, würde den Leserahmen der COX1b-mRNA korrigieren und ihre vollständige Ablesung ermöglichen. Über +1 ribosomale *Frameshifts* und die Leserastersprung-Effizienz in Eukaryonten ist wenig bekannt. Obwohl die Translation in der Regel mit hoher Genauigkeit stattfindet (Wills & Atkins, 2006), können ribosomale *Fra-*

meshifts bei bestimmten Sequenzen *in vitro* in bis zu 2 % der Fälle beobachtet werden (Brierley et al., 1992). Sofern ein solcher *Frameshift* bei COX1b-mRNA – zumindest sporadisch – stattfindet, bietet er eine theoretische Erklärung für die vollständige Translation der COX1b-mRNA. Die unter 3.2 beschriebenen RNA-Struktur-Vorhersagen belegen, dass COX1b-mRNA die formalen Voraussetzungen für einen ribosomalen *Frameshift* erfüllt. Die relevanten Strukturelemente sind für die COX1b-mRNA gegeben.

5.1.3 Analyse des Spleißens von Intron1 aus der COX1b-mRNA

Dass ein großer Anteil der COX-Transkripte das Intron1 enthält, spricht für die Stabilität der COX1b-mRNA. Cui et al. (2004) berechneten eine ebenso lange Halbwertszeit für COX1b-mRNA wie für COX1-mRNA. Allerdings bedeutet eine hohe Stabilität nicht notwendigerweise, dass diese Intron1-enthaltende mRNA auch für die Proteinsynthese verantwortlich ist. Vorstellbar ist, dass nur derjenige Anteil der COX1b-RNA, aus dem Intron1 später herausgespleißt wird, in Protein translatiert wird. Konsensussequenzen der Spleißstellen 5' und 3' von Intron1 sind in der COX1b-mRNA wie bei COX1-pre-RNA vorhanden. Daher ist plausibel, dass das Intron1 noch im Verlauf der Prozessierung aus der COX1b-mRNA gespleißt wird. Schließlich besteht bei der Betrachtung von Spleißvarianten ein ungelöstes Problem darin, dass man nie sicher sein kann, die fertig gespleißte RNA zu untersuchen (Sakabe & Souza, 2007). Die Intronretention ist der am wenigsten untersuchte Mechanismus alternativen Spleißens, eben, weil viele vermeintliche Varianten lediglich noch nicht gespleißte oder partiell gepleißten pre-RNAs darstellen (Galante et al., 2004).
Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass mit der COX1b-mRNA nur ein teilprozessierter Übergangszustand von pre-RNA zu mRNA amplifiziert wird. Übrig bleibt bei Verlust des Introns eine – in unserem Fall mit einem N-terminalen FLAG-Tag versehene – COX1-mRNA, die in ein COX1-FLAG-Protein translatiert und auf Proteinebene weiter modifiziert wird (Abb. 5-1). Im Reifungsprozess des Proteins wird das Signalpeptid abgespalten, der FLAG-Tag geht verloren und eine reine COX1 entsteht. Die Ergebnisse der Proteinuntersuchung stützen diese Theorie. Transfektionen humaner Zellen mit COX1- und COX1b-cDNA ergaben in der Western Blot Analyse Banden gleicher Größe. Auch das Fehlen einer spezifischen Reaktion des α-COX1b-AK spricht gegen die Übersetzung von Intron1 in eine Aminosäuresequenz.

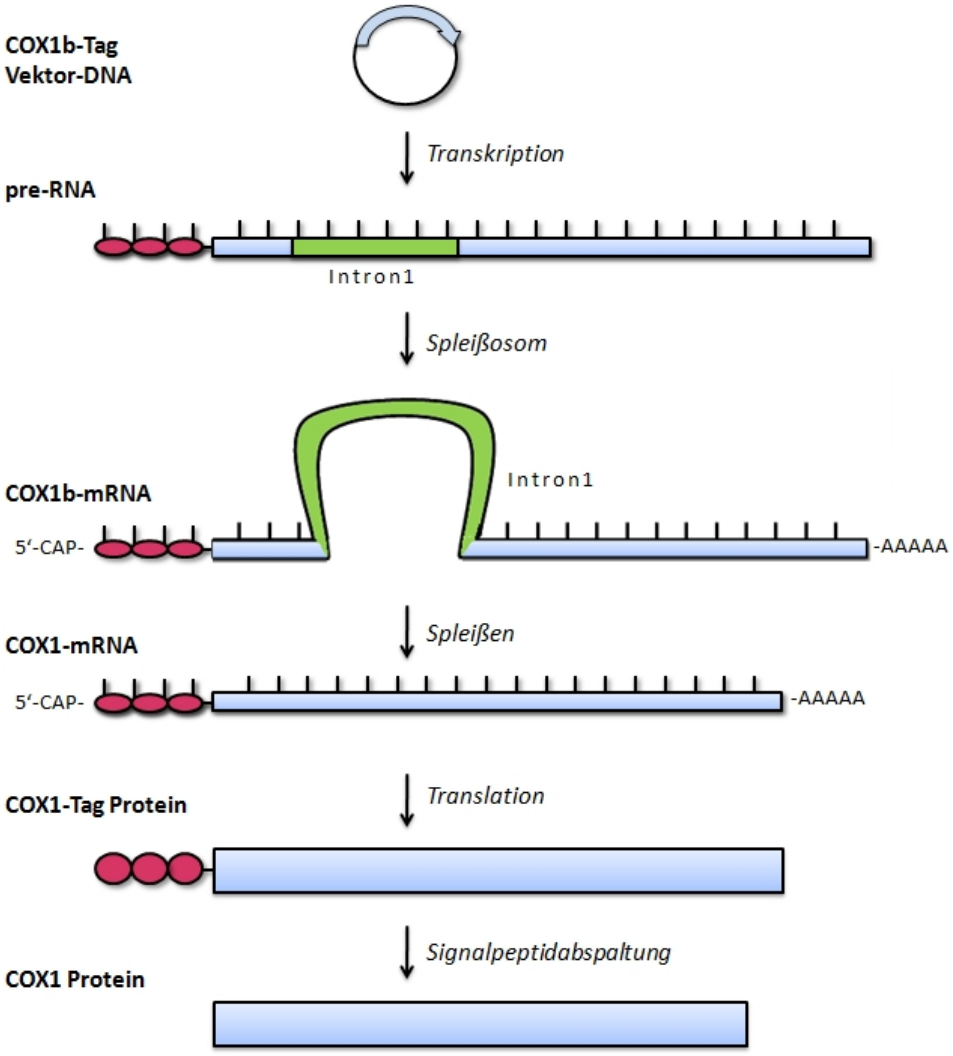


Abbildung 5-1. Schematische Darstellung der Entstehung von COX1-Protein aus COX1b-Tag-RNA.

Die FLAG-Tag übergreifende PCR wurde durchgeführt, um den Verlust des Intron1 aus der COX1b-mRNA darzustellen. PCR-analytisch konnte das Entstehen von COX1-mRNA bei Transfektion von HEK 293 Zellen mit COX1b-Konstrukten bewiesen werden. Der Nachweis einer 76 bp großen Bande in der PCR zeigte, dass das Intron1 aus der COX1b-mRNA anteilig verloren ging.

Eine semiquantitative Auswertung wurde nicht durchgeführt, da die Intron1 enthaltende Bande bei 170 bp nicht nur aus mRNA, sondern auch durch Amplifikation des transfizierten Vektors entstanden sein kann. Trotz Aufreinigung der mRNA ist es nicht vermeidbar, dass Reste des psgCOX1b-FLAG-Plasmids im Ansatz enthalten sein können. Die 76 bp große, für COX1-mRNA stehende Bande jedoch kann nur aus gespleißter mRNA entstanden sein.

5.2 Analyse der COX1b-Varianten im Western Blot
5.2.1 Western Blot mit α-COX1-Antikörper

Bei Transfektion von Zellen mit humaner COX1b-cDNA wurde ein ca. 70 kDa großes Protein mit COX-Aktivität überexprimiert, das mit α-COX1-AK reagierte (vgl. 4.1.1; Censarek et al., 2006). Die Mutante COX1bΔG simuliert eine Korrektur des Leserahmens. Bei voller Translation ist aufgrund der Aminosäuresequenz der COX1bΔG die Entstehung eines Proteins mit einem Molekulargewicht von 72 kDa zu erwarten, das sich aus der COX1, dem Signalpeptid und dem retinierten Intron1 zusammensetzt und damit größer ist als eine reine COX1. Ein ähnliches Protein würde für COX1b entstehen, wenn der Leserastersprung durch mRNA Editing oder ribosomalen *Frameshift* korrigiert wird. Durch den zusätzlichen aminoterminalen Tag vergrößert sich die erwartete Differenz zwischen COX1 und COX1b-His bzw. -FLAG auf mehr als 7 kDa. Damit sollte die COX1b eine geringere elektrophoretische Mobilität als die COX1 aufweisen.
Überraschenderweise liefen N-terminal getaggte COX1b-Varianten im Western Blot (mit α-COX1-AK detektiert) auf der gleichen Höhe wie die COX1. Der erwartete Größenunterschied war somit nicht nachweisbar. Auch ein Unterschied zum Modellkonstrukt COX1bΔG war nicht zu erkennen. Bemerkenswerterweise konnte auch die Arbeitsgruppe um Qin et al. (2005) keinen Größenunterschied zwischen überexprimierter COX1 und COX1b2 in Sf 9 (*Spodoptera frugiperda,* Insektenzelllinie) Zelllysaten zeigen. Auch in der Veröffentlichung von Kis et al. (2005) scheinen COX1 und COX1b gleich groß zu sein. Einzig durch Censarek et al. (2006) konnte in COS-7 Zellen eine Größendifferenz zwischen COX1 und FLAG-Tag markierter COX1bΔG gezeigt werden. Ein gewisser Grad aberranter Migration aufgrund unterschiedlicher Ladung von Proteinen ist in der Gelelektrophorese nicht unüblich. Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass eine Größendifferenz von 7 kDa dadurch kaschiert wird.

5.2.2 Western Blot mit α-COX1b-Antikörper

Der von uns eingesetzte α-COX1b-AK, der entsprechend dem bei Qin et al. (2005) beschriebenen Verfahren erzeugt wurde (siehe 2.3), müsste Proteine, die Intron1 enthalten, erkennen. Die diskutierten Korrekturmechanismen der COX1b-mRNA, bei denen Intron1 erhalten bleibt (mRNA Editing oder ribosomaler *Frameshift*) verändern das Epitop des Antikörpers nicht. Alle Sequenzabweichungen betreffen den Bereich hinter der AK-Bindungsstelle (Abb. 5-2).

```
COX1b*     1 MSRECDPGARWGIFLASWWSLECQAQPLISLLCRESLALVLAVPAPAPA… 49
COX1b2     1 MSRECDPGARWGIFLASWWSLECQLSPSSLSSAGSLLLWFLLFLLLLPP… 49
COX1b3     1 MSRECDPGARWGIFLASGGALNARLSPSSLSSAGSLLLWFLLFLLLLPP… 49
COX1bΔG    1 MSRECDPGARWGIFLASWWSLECQAQPLISLLCRSLLLWFLLFLLLLPP… 49
               2     -    12
```

Abbildung 5-2. Peptidsequenzvergleich der COX1b-Varianten.
Das Epitop des α-COX1b-AK ist in unkorrigierter COX1b (COX1b*), sowie den hypothetischen Korrekturmodellen COX1b2, COX1b3 aus Qin et al. (2005) und COX1bΔG erhalten. Umrahmt ist die Zielsequenz des eingesetzen α-COX1b-AK.

a) HEK 293 Zellkultur

In mit COX1b-Konstrukten transfizierten HEK 293 Zellen konnte im Western Blot mit α-COX1b-AK keine Bande auf der erwarteten Höhe einer COX1b (ca. 72 kDa mit Intron1) erkannt werden. Alle detektierten Banden (bei 45, 50, 53 und 60 kDa) traten auch in der mock-Kontrolle auf und müssen daher als unspezifisch gelten. Ein ähnliches Problem trat bei der Arbeitsgruppe von Nurmi et al. (2005) auf, die mit einem ähnlichen polyklonalen α-COX1b-AK (Epitop: MSRECDPGARWG) keine spezifischen Banden im Western Blot nachweisen konnten, während der Antikörper im Dot Blot eine Reaktion lieferte. Die fehlende spezifische Reaktion des α-COX1b-AK in HEK 293 Zellen spricht dafür, dass das Intron1 entweder nicht abgelesen wird, oder, dass es im maturen Protein fehlt.

Qin et al. (2005) wiesen mit dem gleichen AK in mit COX1b2 transfizierten Sf 9 Zellen eine Bande bei etwas über 70 kDa nach, die bei Transfektion mit einem COX1-Konstrukt nicht auftrat. Wahrscheinlich sind die sich widersprechenden Ergebnisse auf die unterschiedlichen Zellmodelle zurückzuführen.

Banden, die Chandrasekharan et al. (2002) im Western Blot mit einem polyklonalen α-COX3-AK als spezifisch für COX1b (65 kDa) bzw. pCOX1a (53 kDa) bezeichnete, traten in unserem Modell mit dem synthetisch hergestellten humanen α-COX1b-AK auch in der mock-Kontrolle auf und sind rein rechnerisch für eine COX1b zu klein. Die geringe Größe des detektieren COX1b-Produktes (65 statt 72 kDa) erklärten Chandrasekharan et al. durch Hypoglykosylierung ‚oder andere Unterschiede', die gegenüber einem COX1-Protein bestünden. Chandrasekharans α-COX3-AK wurde gegen ein Gemisch aus Intron1-Peptiden von Mensch und Maus produziert. Dies kann Unterschiede zu den Ergebnissen des in dieser Arbeit genutzten Antikörpers gegen Proteine humanen Ursprungs erklären. Die sequenzkorrigierte COX1bΔG-FLAG aus COS-7 Zellen prä-

sentierte sich als ein FLAG-Tag-tragendes Protein, das im α-COX1 Western Blot größer als COX1 imponierte. Aufgrund der Sequenzkorrektur sollte es Intron1 enthalten, also als Positivkontrolle für den α-COX1b-AK nutzbar sein. Auch hier konnte keine eindeutige Bande im Western Blot detektiert werden.

b) Gewebeblot

Um den α-COX1b-AK auf Funktionalität zu überprüfen, wurde ein kommerzieller Multi-Gewebeblot entsprechend dem Blot von Qin et al. (2005) eingesetzt. Im Gegensatz zur Arbeit von Qin konnte keine Bande bei 75 kDa gefunden werden. Diese Bande war von ihm als COX1b bezeichnet worden.

Stattdessen fand sich in fast allen Geweben eine Bande bei ca. 55 kDa. Diese ist zu klein, um aus COX1, Intron1 und Signalpeptid zu bestehen. Ein 53kDa großes COX1-Protein wurde von Chandrasekharan et al. (2002) als pCOX1a beschrieben, die sich aus einer um Exon5 bis 8 verkürzten COX1 mit retiniertem Intron1 zusammensetzt. Es kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei der 55kDa Bande um dieses ähnlich große Protein handelt, da in der Massenspektrometrie Peptide aus dem in pCOX1a deletierten Bereich identifiziert wurden.

Eine weitere Bande lag bei etwas über 110 kDa. Wie in 4.1.6. angedeutet, handelte es sich am ehesten um ein Dimerisationsprodukt. Nur im Skelettmuskel traten diese Banden nicht auf. Im Herzen und im Gehirn wurde ein anderes Bandenmuster sichtbar, im Herzen traten Banden bei 45 und 95 kDa, im Gehirn bei 48, 50, 95 und 220 kDa auf.

Erwähnenswert ist, dass im Blot von Qin et al. ein anderer Proteingrößenstandard aufgetragen wurde als in unserer Studie, obwohl die Blots vom selben Hersteller stammten. So ist eine Vergleichbarkeit der Western Blots nicht vollends gewährleistet. Trotz Rückfrage beim Hersteller konnten keine Informationen zu den unterschiedlichen Größenstandards eingeholt werden. Indes ist anzumerken, dass unser Bandenmuster im Western Blot mit α-COX1b-AK optisch dem von Qin et al. (2005) ähnelt, aber nach oben verschoben wirkt. Banden, die in dieser Arbeit bei ca. 55 kDa detektiert wurden, beschrieb Qin bei 45 kDa. Die Bande, die wir bei 110 kDa fanden, sah Qin als 75 kDa große COX1b an. Mit dem α-COX1-AK wurde in der Arbeit von Qin nur eine Bande auf der Höhe von ca. 70 kDa in dem beschriebenen Gewebeblot detektiert. Auch COX1b hätte bei 75 kDa mit dem α-COX1-AK reagieren müssen.

Trotz analoger Durchführung des Experimentes konnten die Ergebnisse von Qin et al. nicht bestätigt werden, damit war auch keine endgültige Aussage über die Funktionalität

des AK zu treffen. Die vorliegenden Ergebnisse legen jedoch nahe, dass ein vollständig translatiertes COX1b-Protein nicht vorhanden war.

5.2.3 Suche nach COX1b-Fragmenten

Bei Maus und Ratte wurde ein durch das verfrühte Stoppkodon verkürztes COX1b-Protein von 127 AS Länge (13 kDa) mit einem jeweils speziesspezifischen COX1b-AK detektiert (Snipes et al., 2005; Kis et al., 2006). In den Untersuchungen von Snipes und Kis war es allerdings durch die Art der Klonierung nicht möglich, durch Spleißen von Intron1 den ORF (vgl. 3.3) wiederherzustellen. In beiden Arbeiten wurde die COX1b nur bis zum verfrühten Stoppkodon nach 382 bp kloniert und zur Überexpression genutzt. Somit konnten potentielle Reparaturmechanismen nicht greifen. Es konnten nur maximal 13 kDa große Proteine entstehen.
Das entsprechende humane Protein von 9 kDa Molekulargewicht und 82 AS Länge wurde auch in der vorliegenden Arbeit in HEK 293 Zellen, *E. coli* und im Gewebeblot nicht detektiert. Weder mit α-COX1b-AK noch mit verschiedenen α-Tag-AK konnte ein verkürztes Fragment gefunden werden. Die Frage, ob das Protein in humanen Zellen in reduzierter Menge gebildet wird, ist offen. Falls es entsteht, wird es aber rasch degradiert. Somit hat es aller Wahrscheinlichkeit nach keine funktionelle Relevanz.
Mit den α-Tag-AK hätten auch die Signalpeptide nach Abspaltung gefunden werden müssen. Einzig bei COX1bΔG-GFP konnte ein dem Signalpeptid plus GFP entsprechendes Proteinfragment von 34 kDa detektiert werden. Andere, vor allem kürzere abgespaltene Signalpeptide wurden möglicherweise sofort durch Proteasen abgebaut.

5.2.4 Untersuchung von FLAG- und His-Tag-tragenden COX1b-Varianten

Eine Isolation der Proteine COX1b und COX1bΔG über einen N-terminalen His-Tag mittels Affinitätschromatografie gelang nicht. Trotz extensiver Modifikationen der Aufreinigungsmethodik und Fehlersuche konnte keine Anreicherung erzielt werden. Dies legte die Vermutung nahe, dass das exprimierte, mature Protein keinen His-Tag enthielt. Auch konnten die N-terminalen His- und FLAG-Tags am Protein nicht im Western Blot nachgewiesen werden. Der α-His-AK erwies sich als ungeeignet und ließ keine Schlüsse auf den Erhalt der Markierung zu. Bei dem daraufhin untersuchten COX1b-FLAG-Protein konnte in HEK 293 Zellen im Western Blot kein Tag gefunden

werden. Eine Immunpräzipitation mit α-Tag-AK war auch bei COX1b-FLAG nicht erfolgreich (Abb. 4-12). Selbst bei der leserasterkorrigierten Mutante COX1bΔG-FLAG konnte kein Tag nachgewiesen werden.
Dass in anderen Zelllinien exprimierte COX1b-FLAG-Protein sehr wohl den FLAG-Tag enthielt, konnte mit COS-7 Zellen (vgl. Censarek et al., 2006) reproduziert werden. In diesem nicht humanen Zellsystem ist auch eine N-terminale GFP-Markierung stabiler (vgl. 4.1.4). Ein Verlust des N-Terminus der COX1b in humanen Zellen ist damit sehr wahrscheinlich.

5.2.5 Analyse von GFP-getaggten COX-Varianten im Western Blot

GFP-getaggte COX-Varianten, exprimiert in HEK 293 Zellen, zeigten im Western Blot mit α-COX1-AK zwei Banden. Die Banden unterschieden sich in ihrem Molekulargewicht um ca. 30 kDa, was mit der Größe des Signalpeptides mit N-terminalem GFP-Tag übereinstimmt. Die obere 95 kDa Bande bei COX1-GFP trug das Signalpeptid, der N-terminale GFP-Tag war im Western Blot nachweisbar. Durch Spaltung entstand die 70 kDa große COX1 ohne GFP-Tag. Da sich bei COX1b-GFP und COX1bΔG-GFP das gleiche Bild zeigte, war im Analogieschluss anzunehmen, dass auch hier die Größendifferenz der Banden durch Signalpeptidabspaltung zustande kam. Die getaggten, Signalpeptid und eventuell Intron1-tragenden COX1b-Varianten wären dieser Hypothese zufolge nur Zwischenprodukte auf Proteinebene (Abb. 5-3). Ob Intron1 auf Proteinebene in dem Fusionsprotein enthalten ist, kann auch hier anhand der Bandenposition nicht entschieden werden.
Die ca. 70 kDa messenden unteren Banden waren im α-COX1-Western Blot bei COX1-GFP, COX1b- und COX1bΔG-GFP gleich groß und zeigten keine Reaktion mit dem α-GFP-AK. Das stützt die Annahme, dass der durch Intron1 kodierte Bereich und eine N-terminale Markierung im maturen Protein nicht mehr vorhanden sind. Schließlich würde so aus den COX1b-Varianten durch Signalpeptidabspaltung mature COX1 entstehen.

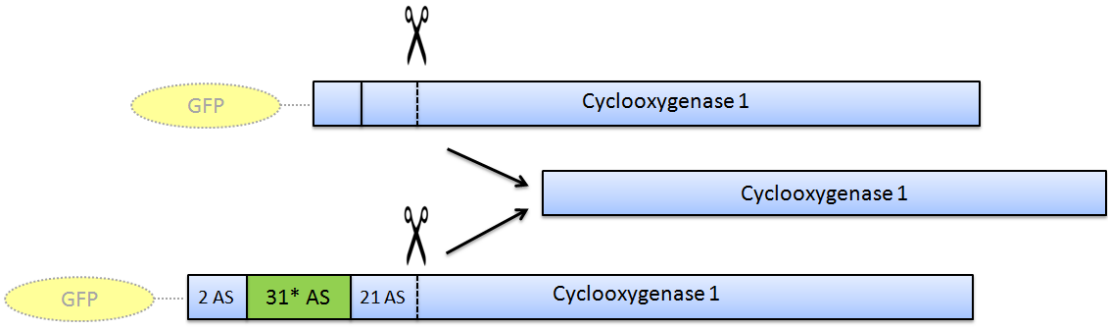


Abbildung 5-3. Schematische Darstellung der Entstehung maturer COX1 aus den Vorstufen COX1-GFP (oben) und COX1bΔG-GFP (unten).

Der große N-terminale GFP-Tag behindert die Erkennung und Spaltung des Signalpeptides (vgl. 4.5). Er verlangsamt den Prozess der Abspaltung und macht das Signalpeptid-tragende Intermediärprodukt nachweisbar.
Dass eine solche zweite Bande bei den Varianten mit kürzeren Tags (His- bzw. FLAG-Tag) nicht detektiert wurde, kann darin begründet sein, dass das Signalpeptid bei diesen schneller erkannt und bereits kotranslational abgespalten wird. In diesem Fall könnten die getaggten Varianten in HEK Zellen nicht nachgewiesen werden, weil sie nur eine geringe Halbwertszeit haben. Da die Signalpeptidabspaltung selbst bei COX1b-GFP, trotz der Hindernisse stattfindet, ist es umso wahrscheinlicher, dass auch bei kürzeren Tags und bei ungetaggter COX1b die Abspaltung erfolgt.

5.3 Lokalisationsbestimmung

Falls Intron1 im Signalpeptid-tragenden, instabilen Protein enthalten ist, können Konformation und Transport des Proteins aufgrund der Modifikation des Signalpeptids verändert sein, obwohl der C-Terminus und die Membranbindedomäne voraussichtlich nicht gestört sind (Ulrich et al., 2004; Kis et al., 2003). Das aminoterminale Signalpeptid sorgt für die Einschleusung der Cyclooxygenase in das raue endoplasmatische Retikulum (Li et al., 1998). Es spielt eine Schlüsselrolle bei der ordnungsgemäßen Insertion der COX in die Membran und deren Glykosylierung (Qin et al., 2005). Die –P/STEL Sequenz am C-Terminus ist Voraussetzung für den Verbleib der COX im endoplasmatischen Retikulum (Morita et al., 1995).
Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Lokalisation der COX1b in HEK 293 Zellen untersucht. In diesem humanen Zellsystem fand sich kein Unterschied in Lokalisation und Verteilung zwischen den COX1b-Varianten und der COX1. Es handelte sich auch bei den Varianten um mikrosomal lokalisierte Membranproteine. Sollte das Intron1 in HEK

293 Zellen auf Proteinebene zunächst noch vorhanden sein, stört dies den Transport des Proteins nicht.

5.4 Signalpeptidabspaltung

Eine Retention von Intron1 auf Proteinebene würde das Signalpeptid verändern (Roos & Simmons, 2005). Daher stellt sich die Frage, ob die Signalpeptidabspaltung, die bei der COX1 regelhaft stattfindet, durch die Insertion von Intron1 inhibiert wird, und weiterhin, ob die gewählten N-terminalen Tags die Spaltung beeinflussen. Bei Expression der COX1 in HEK 293 Zellen muss von einer Proteinprozessierung durch Signalpeptidabspaltung ausgegangen werden. Die zunächst 599 AS messende COX1 (68,6 kDa) wird durch Abspaltung des 23 AS langen Signalpeptides zu einem ca. 66 kDa großen Protein. Von anderen Arbeitsgruppen wurden Tags zur Aufreinigung der COX1 bewusst hinter das Signalpeptid kloniert (Smith et al., 2000 a).
In dieser Arbeit wurde der His-Tag zur Aufreinigung an den N-Terminus der COX1b kloniert, da für COX1b von Chandrasekharan et al. (2002) beschrieben worden war, dass das Signalpeptid nicht abgespalten wird. Im Gegensatz dazu implizieren unsere Ergebnisse, dass das Signalpeptid in humanen Zellen sehr wohl abgespalten werden kann. In HEK 293 Zellen konnte kein Hinweis auf einen Erhalt des Signalpeptides gefunden werden. Für eine Signalpeptidabspaltung sprechen:

- Die Strukturbedingungen für die Signalpeptidabspaltung werden von der COX1b und den korrigierten Varianten erfüllt. Die geforderten Sequenzelemente bleiben auch bei Retention und Translation von Intron1 erhalten;
- Die Transfektion von COX1- und COX1b-mRNA in HEK 293 Zellen führte zur Expression von Proteinen, die im Western Blot auf der gleichen Höhe laufen, also in ihrer elektrophoretischen Mobilität übereinstimmen;
- Der N-terminale His-Tag und FLAG-Tag konnten im Western Blot nicht detektiert werden;
- Eine Aufreinigung des Proteins über den N-terminalen His-Tag konnte nicht erreicht werden;
- Intron1 konnte immunologisch nicht nachgewiesen werden;
- Das GFP-Tag-tragende Protein wurde in ein 70 kDa großes Protein ohne Signalpeptid gespalten.

Wir bestimmten die Wahrscheinlichkeiten für die Erkennung und Abspaltung des Signalpeptides für die sequenzkorrigierte (ΔG) und unkorrigierte COX1b. Die Berechnungen mit SignalP 3.0 legen nahe, dass eine Signalpeptidabspaltung stattfindet. Für die leserahmenkorrigierten Modelle liegt die Wahrscheinlichkeit zwischen 73 und 96 %. Dies untermauert die oben genannten Beobachtungen.

Je größer der angefügte Tag, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit für die Erkennung der Spaltstelle und desto wahrscheinlicher ist der Erhalt des Signalpeptides. Dies ist eine mögliche Erklärung, warum bei Konstrukten mit großem GFP-Tag ein offenbar Signalpeptid -tragendes Protein gefunden wird, welches bei kürzeren Tags nicht auftritt. Bei kürzeren Tags wird das Signalpeptid eher erkannt, kotranslational abgespalten, und kann am prozessierten Protein nicht nachgewiesen werden.

Anhand der COX1b-GFP wurde der Spaltungsprozess in COS-7 Zellen indirekt beobachtbar. Abhängig vom Erntezeitpunkt nach Transfektion nimmt die Intensität der 95 kDa großen Bande ab, während die der gespaltenen COX1-Bande zunimmt. Aus COX1b und COX1bΔG würde im Zuge der Signalpeptidabspaltung ein identisches, ca. 70 kDa großes Protein entstehen, dessen 576 AS lange Sequenz mit der einer COX1 übereinstimmt. Das Endprodukt entsteht unabhängig davon, ob Ausgangsprodukt COX1- oder COX1b-Tag-mRNA war. Im maturen Protein ist der Bereich, der für Intron1 kodiert nicht vorhanden. Unabhängig davon, wie vorher der Leserahmen korrigiert wurde, wäre COX1b auf Proteinebene nicht stabil.

Spekulationen über eine veränderte Konformation und ein anderes pharmakologisches Profil wären für das Protein in humanen Zellen in diesem Falle hinfällig. Der von Chandrasekharan et al. (2002) propagierte Erhalt des Signalpeptides lässt sich offenbar nicht von den von ihm verwendeten Insektenzellen auf andere Zellsysteme und die Situation *in vivo* übertragen.

5.5 Untersuchungen des N-Terminus des COX1b-Konstruktes

Mithilfe der Massenspektrometrie und N-terminaler Sequenzierung nach Edman sollten weitere Hinweise auf die N-terminale Sequenz der in humanen Zellen exprimierten COX1b gesammelt werden.

Die massenspektrometrische Untersuchung detektierte nur Peptide, die auch in nativer COX1 enthalten sind. Auch bei Überprüfung aller vorstellbaren ca. 250 Korrekturmöglichkeiten des Leserahmens mit den entsprechenden Intron1-Peptidsequenzen (darunter

COX1b2, COX1b3 und COX1bΔG) wurde kein charakteristisches Peptid aus dem Intron1-Bereich, und auch kein Peptid aus dem Signalpeptid gefunden. Über den COX1b-spezifischen Bereich konnte somit keine Aussage getroffen werden.
Eine der beiden möglichen Erklärungen dafür liegt darin, dass nur Peptide aus dem hinteren Teil einer COX1b gefunden wurden, obwohl das Intron im Protein vorhanden ist. Ansonsten verteilen sich die gefundenen Peptide jedoch gleichmäßig auf die gesamte Länge des Proteins (vgl. Abb. 4-15). Naheliegender ist, dass das Intron1 fehlt und somit nicht nachweisbar war. Es wird entweder schon auf mRNA-Ebene herausgespleißt oder COX1b wird auf Proteinebene durch Signalpeptidabspaltung zu COX1 prozessiert. Die N-terminale Sequenzierung verlief nicht erfolgreich, so dass keine weiteren Informationen gewonnen werden konnten. Bei Identifikation eines oder mehrerer der hypothetischen Peptide wäre eine Teilrekonstruktion der Intron1 Sequenz möglich gewesen. Daraus hätten Rückschlüsse auf den Mechanismus und Ort der Leserahmenkorrektur gezogen werden können. Es gelang nicht, wie erhofft, die Intron1 Sequenz aufzuklären, um eine nähere Aussage darüber machen zu können, an welcher Stelle der mRNA die Korrektur stattfindet.

5.6 Der Nachweis einer COX1b ist zell- und gewebespezifisch

Die vorliegenden Ergebnisse erweitern die heutigen Vorstellungen zur Existenz einer humanen COX1b. Andere Arbeitsgruppen forschten an humaner COX1b in Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda)* und nicht-humanen Säugetierzellen. Die eingesetzten Zelllinien für die Expression von COX1b und anderen COX-Varianten sind in Tabelle 5-2 gelistet.

Tabelle 5-2. Expressionssysteme für Cyclooxygenase-Varianten.

COX-Variante	**Expressionssystem**	**Referenz**
COX1	Sf 9 (Baculovirus)	Shimokawa & Smith (1992)
COX1-His und COX2-His	Sf 21 (Baculovirus)	Smith et al. (2000 a)
COX1b	Sf 9 (Baculovirus)	Chandrasekharan et al. (2002)
COX1 und COX2	Sf 9 (Baculovirus)	Zhang et al. (2004)
COX1 und $COX1b_{human}$	Sf 9 (Baculovirus)	Qin et al. (2005)
COX1 und COX1-Varianten	COS-7 und Sf 9	Schneider et al. (2005)
$COX1b_{rat}$	COS-7	Snipes et al. (2005)

COX1b-FLAG	COS-7	Censarek et al. (2006)
COX1 und COX2-Varianten	Sf 21 (Baculovirus)	Liu et al. (2007)
COX1Δ7aa	COS-7, CHO, HEK 293 und A549	Xu et al. (2010)

Speziell bei Spleißvarianten ist eine Generalisierung der Ergebnisse nicht möglich. Alternativ gespleißte Gene haben zum großen Teil gewebsspezifische Spleißformen (Xu et al., 2002). Auch für die Intronretention scheinen zellspezifische Faktoren eine Rolle zu spielen (Sakabe & Souza, 2007). Wie oben unter 1.2 dargestellt existieren in verschiedenen Spezies und Organsystemen unterschiedliche COX-Varianten. Bereits bezüglich der Quantität der COX1b-mRNA gibt es in humanen Geweben große Differenzen (Davies et al., 2004). Die Wahl des Zellsystems hat demnach großen Einfluss auf die Versuchsergebnisse.

Allein der Vergleich von HEK mit COS Zellen offenbart gravierende Unterschiede in der Proteinprozessierung. Das Signalpeptid der COX1b bleibt in COS Zellen länger erhalten als in HEK 293 Zellen (Censarek et al., 2006; eigene Beobachtungen). In COS Zellen wurden bei Expression der COX verschiedene Produkte unfertiger Glykosylierung gefunden (Otto et al., 1993).

Insektenzellsysteme wie Sf 9 und Sf 21, infiziert mit Baculoviren, wurden schon früh für die Expression von COX1 und COX2 in großem Maßstab genutzt, doch bereits 1992 wurde das System durch die Arbeitsgruppe von Smith als problematisch bewertet (Shimokawa & Smith, 1992). Smith et al. (2000 a) kritisierten speziell die ineffiziente Prozessierung und unzureichende Glykosylierung der Cyclooxygenase in Insektenzellen. Es entstanden multiple Glykosylierungsstufen für COX1 und COX2 (Zhang et al., 2004), nur in 10 bis 20 % der Fälle fand die N-Glykosylierung vollständig statt (Shimokawa & Smith, 1992). Die Zuckerreste sind aber für die Aktivität der Cyclooxygenase von essentieller Bedeutung (Otto et al., 1993). Aufgrund der fehlerhaften Glykosylierung ist folglich in Frage zu stellen, inwieweit die gemessene Prostaglandinproduktion dieser Proteine mit COX-Aktivität zu verallgemeinern ist, und ob sich so ein valides pharmakologisches Profil erstellen lässt. Zwar sind Insektenzellen in der Lage, Signalpeptide von COX1 und COX2 abzuspalten (Barnett et al., 1994), ob dies auch bei Varianten wie der COX1b geschieht, ist ungeklärt. Dies mag indes zu Chandrasekharans Beobachtung geführt haben, das Signalpeptid der COX1b werde nicht abgespalten (Chandrasekharan et al., 2002). Chandrasekharan exprimierte Hunde-

COX1b in Insektenzellen, wies sie mit einem Gemisch aus Mensch- und Maus-AK nach und verglich sie in der Aktivitätsmessung mit Mäuse-COX1. Auch bei Untersuchung anderer COX-Varianten werden oft mehrere Systeme eingesetzt. Xu et al. (2010), die eine andere COX1-Variante (COX1Δ7aa) untersuchten, verwendeten verschiedene Expressionssysteme (COS-7, CHO, HEK293 und A549-Zellen), und übertrugen die Ergebnisse der einzelnen Zellsysteme anschließend auf die Gesamtheit. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellen in Frage, ob es sinnvoll ist, bei der Untersuchung von Proteinisoformen verschiedene Systeme zu vermischen, wenn Isoformen häufig zelltypspezifisch sind.

Für diese Studie wurden HEK 293 Zellen als humanes Zellsystem gewählt, da COX1b-mRNA in menschlichen Nierenzellen nachgewiesen wurde (Qin et al., 2005). Auch die Proteinsynthese wurde für Nierenzellen beschreiben, ist aber anhand der Ergebnisse dieser Arbeit kritisch zu hinterfragen. In HEK 293 Zellen bleibt das Signalpeptid inklusive Intron1 offensichtlich nicht erhalten.

In dieser Arbeit wurde unseres Wissens erstmals konsequent *humane* COX1b in einem *humanen* Zellsystem exprimiert. Es wurde versucht das Protein mit einem Antikörper gegen *humane* COX1 und COX1b nachzuweisen, und es wurde *humane* COX1 zum Vergleich eingesetzt. Einschränkend wird festgestellt, dass auch aus den hier gewonnen Ergebnissen keine generellen Schlüsse für andere humane Zellen abgeleitet werden können. Sie sind nur bedingt übertragbar. Weiterhin muss offen bleiben, inwieweit die gemachten Beobachtungen in Zellkultursystemen auf die Verhältnisse *in vivo* anwendbar sind.

5.7 COX1b nur ein Zwischenprodukt?

Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene ergaben sich Hinweise darauf, dass die COX1b nur ein transientes Produkt auf dem Weg zur COX1 darstellt und entsprechend schwer erfassbar ist. Sollte aus COX1b-mRNA doch ein verkürztes Proteinfragment entstehen, das schnell abgebaut wird, ist seine Aufgabe bislang unbekannt. Abbildung 5-4 zeigt: Wenn sich aus COX1b-mRNA kein solches kurzes Proteinfragment ableitet, sondern ein ca. 70 kDa großes Protein mit COX-Eigenschaften, ist davon auszugehen, dass Intron1 verloren geht, sei es auf mRNA- oder auf Proteinebene.

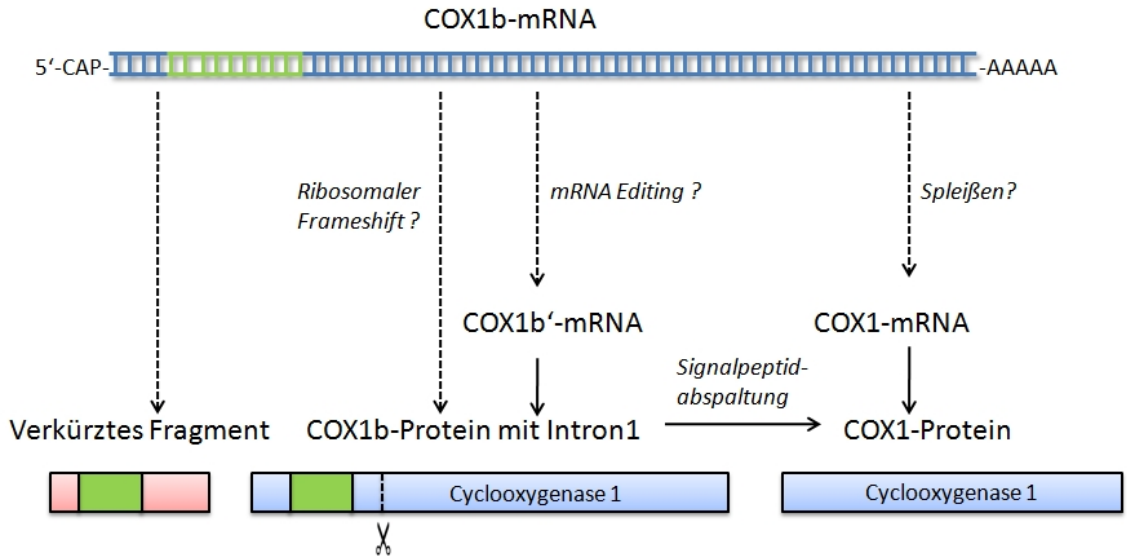


Abbildung 5-4. Schematische Darstellung einer Entstehung von COX1-Protein aus COX1b-mRNA.

Entweder, das COX1-Protein entsteht direkt, durch Spleißen von Intron1 aus der mRNA. Dann existiert COX1b nur auf mRNA-Ebene als Übergangszustand.
Oder ein COX1b-Protein entsteht als instabiles Zwischenprodukt. Dafür muss der Leserastersprung in der mRNA durch mRNA Editing oder ribosomalen *Frameshift* korrigiert worden sein. Der Nachweis des Proteins gelingt aber nicht, weil

- die Methodik bzw. der Antikörper ungeeignet ist oder
- weil das COX1b-Protein in so geringer Menge entsteht, dass es unter der Nachweisgrenze bleibt oder
- weil das Protein zu schnell in COX1 gespalten wird, und sich aufgrund seiner geringen Halbwertszeit dem Nachweis entzieht.

Selbst wenn COX1b-Protein entstand, es war zumindest in HEK Zellen nicht stabil.
Durch Signalpeptidabspaltung wurde der durch das Intron kodierte Bereich abgespalten. Das Signalpeptid umfassende Spaltprodukt wurde in den meisten Fällen abgebaut. Aus COX1b-mRNA in HEK 293 Zellen entsteht schließlich ein COX1-Protein.

5.8 Ausblick

Auf der Suche nach neuen antiinflammatorischen und antikarzinogenen Medikamenten lieferte die Entdeckung der COX1b im Hund einen vielversprechenden Ansatzpunkt. Die Veröffentlichung von Chandrasekharan et al. (2002) über die COX1b beim Hund galt als Beginn der Aufklärung des Wirkmechanismus von Paracetamol. Dass die hu-

mane leserasterkorrigierte COX1b kein spezifischer Angriffspunkt von Paracetamol ist, konnte schon früher gezeigt werden (Censarek et al., 2006). Als Erklärung wurde zunächst angeführt, es käme beim Menschen durch Leserasterverschiebung zu einem veränderten Protein *ohne* Sequenzübereinstimmung mit einer COX (Lucas et al., 2005). Mit der vorliegenden Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass, anders als beim Hund, *kein* verändertes funktionsfähiges Protein entsteht.

Die Isolation eines humanen COX1b-Proteins aus humaner HEK 293 Zellkultur gelang nicht, Intron1 scheint auf Proteinebene nicht vorhanden zu sein. Plausibel ist die Erklärung durch verspätetes Spleißen von Intron1 aus der relativ stabilen COX1b-mRNA. Inwieweit dieses Spleißen des Introns zelltypspezifisch, respektive organspezifisch geschieht, ist ungeklärt. Hierzu müssten Zellen anderer Gewebe untersucht werden.

Der Wirkmechanismus von Paracetamol ist bis heute umstritten. Konsens herrscht über einen Wirkort im Zentralnervensystem. Zu den Erklärungsmodellen gehört eine präferentielle COX2-Inhibition durch die Überführung des Enzyms in seinen reduzierten Ruhezustand, die durch Hydroperoxide antagonisiert werden kann (Botting, 2000A; Lucas et al., 2005; Aronoff & Oates, 2006; Hinz et al., 2008; Boutaud & Oates, 2010). Weiterhin werden die Wirkung über absteigende serotoninerge Bahnen (Pickering et al., 2008), Interaktionen mit dem Vanilloidrezeptor (Mallet et al., 2010; vgl. auch Abb. 1-1) und die Interaktion mit Cannabinoidrezeptoren (Anikwue et al, 2002; Anderson, 2008) diskutiert. Graham und Scott hatten bereits 2005 festgestellt, dass die humane COX1b nicht zur Klärung des Wirkungsmechanismus von Paracetamol führt. Zukünftige Untersuchungen speziell zur humanen COX1b als pharmakologischem Angriffspunkt sind wenig sinnvoll, wenn es sich um eine konventionelle COX1 handelt. Funktion und Bedeutung der COX-Isoformen sind aber auch in Zukunft Gegenstand grundlegender Forschungsansätze für wirkungsstärkere und besser verträgliche Entzündungshemmer v (Davies et al., 2004).

Andererseits stellt sich die Frage, warum so viel COX1b-mRNA entsteht. COX1b-mRNA sollte dem *Nonsense mediated decay* (NMD) zum Opfer fallen, der im Regelfall abnorme Transkripte mit vorzeitigen Stoppkodons eliminiert, damit aus ihnen keine potentiell schädlichen Proteine entstehen (Gonzalez et al., 2000; Lejeune et al., 2003). Routinefehler in der Genexpression, die durch alternatives Spleißen generiert werden, sollen so abgefangen werden (Maquat, 2004; Maquat & Gong, 2009). Schon Kis et al. (2005) stellten fest, dass demnach auch COX1b-mRNA durch NMD eliminiert werden müsste. Dabei gaben sie zu bedenken, dass generell 10 bis 30 % der mRNA dem NMD

entgehen (Perrin-Vidoz et al., 2002), und dass es so zu keiner kompletten Elimination der mRNA kommt. Auch bei Kallikreinen, ß-Globin, Von-Willebrand-Faktor, dem LDL-Rezeptor und Apolipoprotein B wurden Spleißvarianten in hohen Konzentrationen gefunden, die scheinbar resistent gegenüber NMD sind (Michael et al., 2005).

Auch wenn COX1b nicht funktionell translatiert wird, kann die COX1b-mRNA doch eine funktionelle Bedeutung haben. In $COX2^{-/-}$-knockout Mäusen wurde eine Hochregulierung der COX1b-mRNA beobachtet (Ayoub et al., 2004). In humanen Kolonadenokarzinomzellen konnte eine COX1b-mRNA Induktion durch osmotischen Stress ausgelöst werden (Nurmi et al., 2005). Wodurch die Expression humaner COX1b-mRNA weiterhin beeinflusst wird, ist nicht bekannt. Da COX1b-mRNA zelltypspezifisch auftritt und reguliert zu sein scheint, darf angenommen werden, dass es sich um ein ‚funktionelles' Transkript handelt. COX1b-mRNA erfüllt die von Sorek et al. (2004) geforderten Kriterien für funktionell relevante RNA-Varianten: COX1b-mRNA ist in physiologisch bedeutsamer Menge vorhanden, gewebsspezifisch reguliert, evolutionär konserviert und tritt in verschiedenen Spezies auf. Sie erfüllt allerdings nicht die finale Anforderung: Das Proteinprodukt sollte zweifelsfrei *in vivo* detektiert werden können.

Möglicherweise kommen der COX1b-mRNA noch unbekannte regulatorische Bedeutungen zu, wie die Arbeitsgruppe von Kis et al. (2003) vorschlug. Nurmi et al. (2005) nahmen an, COX1b-mRNA oder ihr Produkt könnte allein oder durch Hilfsfaktoren die Expression von COX1 und COX2 reprimieren. Auch diese Hypothesen erfordern noch experimentelle Bestätigung.

Eine andere Erklärung für die Existenz von COX1b-mRNA könnte in der Herabregulation des Gens durch Generierung inaktiver Isoformen liegen (Lareau et al., 2004). Auch wenn kein Protein entsteht, kann das unproduktive Spleißen einen interessanten posttranskriptionalen Mechanismus darstellen, um das COX1-Gen herabzuregulieren. Letzteres wurde bereits für COX2a diskutiert (Censarek et al., 2004), und für eine COX2-Isoform aus dem Huhn beschrieben (Xie et al., 1991; Simmons, 2003). Dort wird durch Retention eines Introns die Ablesung der mRNA in ruhenden Zellen blockiert, unter mitogenen Bedingungen wird die mRNA fertig gespleißt und abgelesen. Dies könnten Ansatzpunkte für zukünftige Studien sein, um die Bedeutung der humanen COX1b-mRNA aufzuklären.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Cyclooxygenase1b (COX1b), ein Spleißprodukt des COX1-Gens, zeichnet sich durch die Retention des ersten Introns aus. Die Entstehung eines funktionell aktiven COX1b-Proteins in verschiedenen Spezies hängt von der jeweiligen Länge des Intron1 ab. In humanen Zellen führt das retinierte 94 bp lange Intron1 zu einer Leserasterverschiebung. Aufgrund des entstehenden verfrühten Stoppcodons sollte ein verkürztes Proteinfragment (9 kDa) entstehen. Trotzdem wurde nur die Expression eines voll abgelesenen COX1b-Proteins (70 kDa) beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde COX1b-mRNA in einem humanen Überexpressionssystem analysiert und potentielle Korrekturmechanismen des Leserahmens untersucht, die die Entstehung des ca. 70 kDa messenden Proteins aus COX1b-mRNA ermöglichen.

Das von Qin et al. (2005) postulierte mRNA Editing konnte nicht nachgewiesen werden. Bei der Sequenzierung von 104 COX1b-cDNAs humaner Gewebeproben aus Leber, Niere und Magen war Intron1 immer exakt 94 bp lang und stimmte bis auf einzelne Ausnahmen mit der veröffentlichten Sequenz überein.

Die notwendigen RNA-Strukturvoraussetzungen für einen *ribosomalen frameshift* zur Leserahmenkorrektur werden von der humanen COX1b erfüllt.

Es konnte gezeigt werden, dass Intron1 noch nachträglich aus der COX1b-mRNA entfernt werden und so aus COX1b-mRNA COX1-mRNA entstehen kann.

Bei Expression der COX1b parallel zur COX1 und zur leserasterkorrigierten COX1bΔG in humaner Zellkultur entstand in allen drei Fällen ein 70 kDa großes Protein. N-terminale Markierungen der Proteine konnten weder im Western Blot gefunden werden noch zur Aufreinigung des Proteins herangezogen werden.

Weder in den Lysaten überexprimierender Zellen, noch in Gewebeproben kann im Western Blot mit einem gegen die Intron1 Sequenz gerichteten α-COX1b-AK eine korrespondierende Bande nachgewiesen werden, die der erwarteten Größe einer COX1b (ca. 72 kDa) entspricht. Auch massenspektrometrisch konnten zwar COX1-typische, aber keine für eine COX1b spezifischen Peptide aus dem N-terminalen Bereich des Proteins, z.B. Signalpeptid oder Intron1 detektiert werden. Die Daten sprechen für eine Abspaltung des N-terminalen Signalpeptids inklusive der Intron1-Sequenz. Dass ein COX1b-Protein als instabiles Zwischenprodukt entsteht, kann nicht ausgeschlossen werden, das Endprodukt in den untersuchten humanen Zellen und Geweben war immer ein matures COX1 Protein.

LITERATURVERZEICHNIS

Anderson BJ. Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action. Paediatr Anaesth. 2008; 18(10):915-21.

Anikwue R, Huffman JW, Martin ZL, Welch SP. Decrease in efficacy and potency of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by chronic delta(9)-tetrahydrocannabinol administration. J Pharmacol Exp Ther. 2002; 303(1):340-6.

Aronoff Dm, Oates JA. New insights into the mechanism of action of acetaminophen: Its clinical pharmacologic characteristics reflect its inhibition of the two prostaglandin H2 synthases. Clin Pharmacol Ther. 2006; 79(1):9-19.

Ayoub SS, Colville-Nash PR, Willoughby DA, Botting RM. The involvement of a cyclooxygenase 1 gene-derived protein in the antinociceptive action of paracetamol in mice. Eur J Pharmacol. 2006; 538(1-3):57-65.

Ayoub SS, Botting RM, Goorha S, Colville-Nash PR, Willoughby DA, Ballou LR. Acetaminophen-induced hypothermia in mice is mediated by a prostaglandin endoperoxide synthase 1 gene-derived protein Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101(30):11165-9.

Baldi L, Muller N, Picasso S, Jacquet R, Girard P, Thanh HP, Derow E, Wurm FM. Transient gene expression in suspension HEK-293 cells: application to large-scale protein product Biotechnol Prog. 2005; 21(1):148-53.

Barnett J, Chow J, Ives D, Chiou M, Mackenzie R, Osen E, Nguyen B, Tsing S, Bach C, Freire J, et al. Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system. Biochim Biophys Acta. 1994; 1209(1):130-9.

Bendtsen, JD, Nielsen, H, von Heijne, G., Brunak, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0 J Mol Biol. 2004; 340(4):783-95.

Berenbaum F. COX-3: fact or fancy? Joint Bone Spine. 2004; 71(6):451-3.

Botting R, Ayoub SS. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2005; 72(2):85-7.

Botting R. COX-1 and COX-3 inhibitors. Thromb Res. 2003; 110(5-6):269-72.

Botting R. Paracetamol-inhibitable COX-2. J Physiol Pharmacol. 2000 a; 51(4 Pt 1):609-18.

Botting, RM. Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3? Clin Infect Dis. 2000 b; 31 Suppl 5:S202-10.

Boutaud O, Aronoff DM, Richardson JH, Marnett LJ, Oates JA. Determinants of the cellular specificity of acetaminophen as an inhibitor of prostaglandin H(2) synthases. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(10):7130-5.

Boutaud O, Oates JA. Study of inhibitors of the PGH synthases for which potency is regulated by the redox state of the enzymes. Methods Mol Biol. 2010; 644:67-90.

Brierley I, Jenner AJ, Inglis SC.Mutational analysis of the "slippery-sequence" component of a coronavirus ribosomal frameshifting signal.J Mol Biol. 1992; 227(2):463-79.

Brierley I, Gilbert RJ, Pennell S. RNA pseudoknots and the regulation of protein synthesis Biochem Soc Trans. 2008; 36:684-9.

Cao C, Matsumura K, Yamagata K, Watanabe Y. Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 beta: a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever. Brain Res. 1996; 733(2):263-72.

Censarek P, Freidel K, Hohlfeld T, Schrör K, Weber AA. Human cyclooxygenase-1b is not the elusive target of acetaminophen Eur J Pharmacol. 2006; 551(1-3):50-3.

Censarek P, Freidel K, Udelhoven M, Ku SJ, Hohlfeld T, Meyer-Kirchrath J, Schrör K, Weber AA. Cyclooxygenase COX-2a, a novel COX-2 mRNA variant, in platelets from patients after coronary artery bypass grafting. Thromb Haemost. 2004; 92(5):925-8.

Chamrad D. Bioinformatische Verfahren zur Analyse von Primärstrukturinformation mittels massenspektrometrischer Daten in der Proteomanalyse [Dissertation]. Bochum, Ruhr-Universität Bochum; 2004. 118 p.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other

analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(21):13926-31.

Chandrasekharan NV, Simmons DL. The cyclooxygenases. Genome Biol. 2004; 5(9):241.

Cui JG, Kuroda H, Chandrasekharan NV, Pelaez RP, Simmons DL, Bazan NG, Lukiw WJ. Cyclooxygenase-3 gene expression in Alzheimer hippocampus and in stressed human neural cells. Neurochem Res. 2004; 29(9):1731-7.

Davies NM, Good RL, Roupe KA, Yáñez JA. Cyclooxygenase-3: axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error?- not as easy as 1,2,3. J Pharm Pharmaceut Sci. 2004; 7(2):217-26.

DeWitt DL, Smith WL. Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence Proc Natl Acad Sci U S A. 1988; 85(5):1412-6.

Diaz A, Reginato AM, Jimenez SA. Alternative splicing of human prostaglandin G/H synthase mRNA and evidence of differential regulation of the resulting transcripts by transforming growth factor beta 1, interleukin 1 beta, and tumor necrosis factor alpha. J Biol Chem. 1992; 267(15):10816-22.

Dinchuk JE, Liu RQ, Trzaskos JM. COX-3: in the wrong frame in mind. Immunol Lett. 2003; 86(1):121.

Durocher Y, Perret S, Kamen A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. Nucleic Acids Res. 2002; 30(2):E9.

Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. Nat Protoc. 2007; 2(4):953-71.

Flower RJ, Vane JR. Inhibition of prostaglandin biosynthesis. Biochemical Pharmacology. 1974; 23(10):1439-50.

Flower RJ, Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). Nature. 1972; 240(5381):410-1.

Flower, RJ. Aspirin, prostaglandins, endoperoxides and platelets. Nature. 1975; 253(10):88-90

Fritsche E, Baek SJ, King LM, Zeldin DC, Eling TE, Bell DA. Functional characterization of cyclooxygenase-2 polymorphisms. J Pharmacol Exp Ther. 2001; 299(2):468-76.

Galante PA, Sakabe NJ, Kirschbaum-Slager N, de Souza SJ. Detection and evaluation of intron retention events in the human transcriptome. RNA. 2004; 10(5):757-65

Garavito MR, Malkowski MG. The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2002; 68-69:129-52.

Geisse S, Henke M. Large-scale transient transfection of mammalian cells: a newly emerging attractive option for recombinant protein production. J Struct Funct Genomics. 2005; 6(2-3):165-70.

Giedroc DP, Theimer CA, Nixon PL. Structure, stability and function of RNA pseudoknots involved in stimulating ribosomal frameshifting. J Mol Biol. 2000; 298(2):167-85.

Graham GG, Scott KF. Mechanism of action of paracetamol. Am J Ther. 2005; 12(1):46-55.

Halushka MK, Walker LP, Halushka PV. Genetic variation in cyclooxygenase 1: effects on response to aspirin. Clin Pharmacol Ther. 2003 ; 73(1):122-30.

Hemler M, Lands WEM, Smith WL. Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins: demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. *J Biol Chem.* 1976; 251:5575-5579.

Hersh, EV, Lally ET. Update on cyclooxygenase inhibitors: has a third COX isoform entered the fray? Curr Med Res Opin. 2005; 21(8):1217-1226.

Hinz B, Cheremina O, Brune K. Acetaminophen (paracetamol) is a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in man. FASEB J. 2008; 22(2):383-90.

Hla T. Molecular characterization of the 5.2 KB isoform of the human cyclooxygenase-1 transcript. Prostaglandins. 1996; 51(1):81-5.

Hofacker IL. Vienna RNA secondary structure server. Nucleic Acids Res. 2003; 31(13):3429-31.

House AE, Lynch KW. Regulation of alternative splicing: more than just the ABCs. Curr Opin Struct Biol. 2007; 283(3):1217-21.

Huang Y, Ye D, Wu P, Huang Y, Zhang L, Zhou X, Huang Y, Yuan P, Zhang D, Wan J. Expression of cyclooxygenase-2 mRNA and identification of its splice variant in human myometrium obtained from women in labor. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2005; 25(1):5-7.

Ivanov IP, Atkins JF. Ribosomal frameshifting in decoding antizyme mRNAs from yeast and protists to humans: close to 300 cases reveal remarkable diversity despite underlying conservation. Nucleic Acids Res. 2007; 35(6):1842-58.

Ivanov IP, Gesteland RF, Matsufuji S, Atkins JF. Programmed frameshifting in the synthesis of mammalian antizyme is +1 in mammals, predominantly +1 in fission yeast, but -2 in budding yeast RNA. 1998; 4(10):1230-8.

Järving R, Järving I, Kurg R, Brash AR, Samel N. On the evolutionary origin of cyclooxygenase (COX) isozymes: characterization of marine invertebrate COX genes points to independent duplication events in vertebrate and invertebrate lineages J Biol Chem. 2004; 279(14):13624-33.

Julius D, Basbaum AL. Molecular mechanisms of nociception. Nature. 2001; 413(6852):203-10.

Jüni P, Nartey L, Reichenbach S, Sterchi R, Dieppe PA, Egger M. Risk of cardiovascular events and rofecoxib: cumulative meta-analysis. Lancet. 2004; 364(9450):2021-9.

Kam PC, See AU. Cyclo-oxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role. Anaesthesia. 2000; 55(5):442-9.

Kis B, Snipes JA, Gaspar T, Lenzser G, Tulbert CD, Busija DW. Cloning of cyclooxygenase-1b (putative COX-3) in mouse. Inflamm Res. 2006; 55(7):274-8.

Kis B, Snipes JA, Busija DW. Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. J Pharmacol Exp Ther. 2005; 315(1):1-7.

Kis B, Snipes A, Bari F, Busija DW. Regional distribution of cyclooxygenase-3 mRNA in the rat central nervous system. Brain Res Mol Brain Res. 2004 a; 126(1):78-80.

Kis B, Snipes JA, Simandle SA, Busija DW. Acetaminophen-sensitive prostaglandin production in rat cerebral endothelial cells. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004 b; 288(4):R897-902.

Kis B, Snipes JA, Isse T, Nagy K, Busija DW. Putative cyclooxygenase-3 expression in rat brain cells. J Cereb Blood Flow Metab. 2003; 23(11):1287-92.

Kitzler J, Hardman R, Hill E, Reddy N, Philpot R, Eling TE. Cloning and sequencing of prostaglandin H synthetase from rat tracheal epithelial cells: structural evidence that a TPA regulated mRNA codes for the rat ortholog of murine PHS-1. Adv Exp Med Biol. 1997; 400A:65-70.

Kowalski ML, Borowiec M, Kurowski M, Pawliczak R. Alternative splicing of cyclooxygenase-1 gene: altered expression in leucocytes from patients with bronchial asthma and association with aspirin-induced 15-HETE release. Allergy. 2007; 62(6):628-34.

Krapf, R. Acetaminophen- auch ein COX-Hemmer! Schweiz Med Forum. 2003; 3:355.

Lareau LF, Green RE, Bhatnagar RS, Brenner SE. The evolving roles of alternative splicing. Curr Opin Struct Biol. 2004; 14(3):273-82.

Leith JL, Wilson AW, Donaldson LF, Lumb BM. Cyclooxygenase-1-derived prostaglandins in the periaqueductal gray differentially control C- versus A-fiber-evoked spinal nociception.J Neurosci. 2007; 27(42):11296-305.

Lejeune F, Li X, Maquat LE. Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities. Molecular cell. 2003; 12(3):675-87.

Li S, Dou W, Tang Y, Goorha S, Ballou LR, Blatteis CM. Acetaminophen: antipyretic or hypothermic in mice? In either case, PGHS-1b (COX-3) is irrelevant. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2008; 85(3-4):89-99.

Li Y, Smith T, Grabski S, DeWitt DL. The membrane association sequences of the prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 isozymes J Biol Chem. 1998; 273(45):29830-7.

Liu J, Seibold SA, Rieke CJ, Song I, Cukier RI, Smith WL. Prostaglandin endoperoxide H synthases: peroxidase hydroperoxide specificity and cyclooxygenase activation. J Biol Chem. 2007; 282(25):18233-44.

Liu S, Altman RB: Large scale study of protein domain distribution in the context of alternative splicing. Nucleic Acids Res. 2003; 31:4828-4835.

Liao PY, Choi YS, Lee KH. FSscan: a mechanism-based program to identify +1 ribosomal frameshift hotspots. Nucleic Acids Res. 2009; 37(21):7302-11.

Lucas R, Warner TD, Vojnovic I, Mitchell JA. Cellular mechanisms of acetaminophen: role of cyclo-oxygenase. 2005; 19(6):635-7.

Mallet C, Barrière DA, Ermund A, Jönsson BA, Eschalier A, Zygmunt PM, Högestätt ED. TRPV1 in brain is involved in acetaminophen-induced antinociception. PLoS One. 2010; 5(9).

Maquat LE. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics Nat Rev Mol Cell Biol. 2004; 5(2):89-99.

Maquat LE, Gong C. Gene expression networks: competing mRNA decay pathways in mammalian cells. Biochem Soc Trans. 2009; 37(Pt 6):1287-92.

Marshall PJ, Kulmacz RJ. Prostaglandin H synthase: distinct binding sites for cyclooxygenase and peroxidase substrates. Arch Biochem Biophys. 1988; 266(1):162-70.

McCleskey EW, Gold MS. Ion channels of nociception. Annu Rev Physiol. 1999; 61:835-56.

Michael IP, Kurlender L, Memari N, Yousef GM, Du D, Grass L, Stephan C, Jung K, Diamandis EP. Intron Retention: A Common Splicing Event within the Human Kallikrein Gene Family. Clin Chem. 2005; 51(3):506-15.

Mitchell JA, Warner TD. Cyclooxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. Br J Pharmacol. 1999; 128(6):1121-32.

Miyamoto T, Ogino N, Yamamoto S, Hayaishi O. Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. J Biol Chem. 1976; 251:2629-2636.

Moon S, Byun Y, Kim HJ, Jeong S, Han K. Predicting genes expressed via -1 and +1 frameshifts Nucleic Acids Res. 2004; 32(16):4884-92.

Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, DeWitt DL, Smith WL. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. J Biol Chem. 1995; 270(18):10902-8.Muller N, Girard P, Hacker DL, Jordan M, Wurm FM. Orbital shaker technology for the cultivation of mammalian cells in suspension Biotechnol Bioeng. 2005 ; 89(4):400-6.

Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites Protein Eng. 1997; 10(1):1-6.

Nurmi JT, Puolakkainen PA, Rautonen NE. Intron 1retaining cyclooxygenase 1splice variant is induced by osmotic stress in human intestinal epithelial cells Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2005; 73(5):343-50.

Otto JC, DeWitt DL, Smith WL. N-glycosylation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 and their orientations in the endoplasmic reticulum. J Biol Chem. 1993; 268(24):18234-42.

Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. Electrophoresis. 1999; 20(18):3551-67.

Picot D, Loll PJ, Garavito RM. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. Nature. 1994; 367(6460):243-9.

Pickering G, Estève V, Loriot MA, Eschalier A, Dubray C. Acetaminophen reinforces descending inhibitory pain pathways. Clin Pharmacol Ther. 2008; 84(1):47-51.

Plant MH, Laneuville O. Characterization of a novel transcript of prostaglandin endoperoxide H synthase 1 with a tissue-specific profile of expression. Biochem J. 1999; 344 (3):677-85.

Qin N, Zhang SP, Reitz TL, Mei JM, Flores CM. Cloning, Expression, and functional Characterization of human Cyclooxygenase-1 splicing variants: Evidence for Intron 1 Retention J Pharmacol Exp Ther. 2005; 315(3):1298-305.

Reeder J, Giegerich R. Design, implementation and evaluation of a practical pseudoknot folding algorithm based on thermodynamics. BMC Bioinformatics. 2004; 5:104.

Roos KL, Simmons DL. Cyclooxygenase variants: the role of alternative splicing. Biochem Biophys Res Commun. 2005; 338(1):62-9.

Sakabe NJ, de Souza SJ. Sequence features responsible for intron retention in human. BMC Genomics. 2007; 8:59.

Santilli F, Rocca B, De Cristofaro R, Lattanzio S, Pietrangelo L, Habib A, Pettinella C, Recchiuti A, Ferrante E, Ciabattoni G, Davì G, Patrono C. Platelet cyclooxygenase inhibition by low-dose aspirin is not reflected consistently by platelet function assays: implications for aspirin "resistance". J Am Coll Cardiol. 2009; 53(8):667-77.

Schaefer H, Chervet JP, Bunse C, Joppich C, Meyer HE, Marcus K. A peptide preconcentration approach for nano-high-performance liquid chromatography to diminish memory effects Proteomics. 2004; 4(9):2541-4.

Schellenberg MJ, Ritchie DB, MacMillan AM. Pre-mRNA splicing: a complex picture in higher definition. Trends Biochem Sci. 2008; 33(6):243-6.

Schneider C, Boeglin WE, Brash AR. Human cyclooxygenase-1 and an alternative splice variant: contrasts in expression of mRNA, protein and catalytic activities. Biochem J. 2005; 385:57-64.

Schrör K: Acetylsalicylsäure. Frechen, Dr. Schrör Verlag, 2011.

Schrör K, Seidel H. (1988) Blood-vessel wall arachidonate metabolism and its pharmacological modification in a new in vitro assay system Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1988; 337(2):177-82.

Schwab JM, Schluesener HJ, Laufer S. Commentary: COX-3: just another COX or the solitary elusive target of paracetamol? Lancet. 2003 a; 361(9362):981-2.

Schwab JM, Schluesener HJ, Meyermann R, Serhan CN. COX-3 the enzyme and the concept: steps towards highly specialized pathways and precision therapeutics? Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2003 b; 69(5):339-43.

Shaftel SS, Olschowka JA, Hurley SD, Moore AH, O'Banion MK. COX-3: a splice variant of cyclooxygenase-1 in mouse neural tissue and cells. Brain Res Mol Brain Res. 2003; 119(2):213-5.

Sheng QH, Xie T, Ding DF. De Novo Interpretation of MS/MS Spectra and Protein Identification via Database Searching. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai). 2000; 32(6):595-600.

Shimokawa T, Smith WL. Expression of prostaglandin endoperoxide synthase-1 in a baculovirus system Biochem Biophys Res Commun. 1992; 183(3):975-82.

Simmons DL, Chandrasekharan NV. Comments on "Acetaminophen and the Cyclooxygenase-3 Puzzle: Sorting out Facts, Fictions ans Uncertainties" J Pharmacol Exp Ther. 2005; 315(3):1412-4.

Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. Pharmacol Rev. 2004; 56(3):387-437.

Simmons DL. Variants of cyclooxygenase-1 and their roles in medicine. Thromb Res. 2003; 110(5-6):265-8.

Simmons DL, Botting RM, Robertson PM, Madsen ML, Vane JR. Induction of an acetaminophen-sensitive cyclooxygenase with reduced sensitivity to nonsteroid antiinflammatory drugs. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96(6):3275-80.

Simpson L, Emeson RB. RNA editing. Annu Rev Neurosci. 1996; 19:27-52.

Smith T, Leipprandt J, DeWitt D. Purification and characterization of the human recombinant histidine-tagged prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. Arch Biochem Biophys. 2000 a; 375(1):195-200.

Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. Annu Rev Biochem. 2000 b; 69:145-82.

Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. J Biol Chem. 1996; 271(52):33157-60

Snipes JA, Kis B, Shelness GS, Hewett JA, Busija DW. Cloning and characterization of cyclooxygenase-1b (putative cyclooxygenase-3) in rat. J Pharmacol Exp Ther. 2005; 313(2):668-76.

Song I, Smith WL. C-terminal Ser/Pro-Thr-Glu-Leu tetrapeptides of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 target the enzymes to the endoplasmic reticulum Arch Biochem Biophys. 1996; 334(1):67-72.

Sorek R, Shamir R, Ast G. How prevalent is functional alternative splicing in the human genome? Trends Genet. 2004; 20(2):68-71.

Staple DW, Butcher SE. Pseudoknots: RNA structures with diverse functions. PLoS Biol. 2005; 3(6):e213.

Tom R, Bisson L, Durocher Y. Transfection of HEK293-EBNA1 Cells in Suspension with Linear PEI for Production of Recombinant Proteins. Cold Spring Harb Protoc. 2008; doi:10.1101/pdb.prot4977 2008

Trelle S, Reichenbach S, Wandel S, Hildebrand P, Tschannen B, Villiger PM, Egger M, Jüni P. Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: network meta-analysis. BMJ. 2011; 342:c7086.

Ulrich CM, Bigler J, Sparks R, Whitton J, Sibert JG, Goode EL, Yasui Y, Potter JD. Polymorphisms in PTGS1 (=COX-1) and risk of colorectal polyps. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2004; 13(5):889-93.

Ulrich CM, Bigler J, Sibert J, Greene EA, Sparks R, Carlson CS, Potter JD. Cyclooxygenase 1 (COX1) polymorphisms in African-American and Caucasian populations. Human Mutation. 2002; 20(5):409-10.

Vane JR. The fight against rheumatism: from willow bark to COX-1 sparing drugs. J Physiol Pharmacol. 2000; 51(4 Pt 1):573-86.

Vane JR, Botting RM. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. Inflamm Res. 1998; 47 Suppl 2:S78-87.

Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nat New Biol. 1971; 231(25):232-5.

Warner TD, Vojnovic I, Giuliano F, Jiménez R, Bishop-Bailey D, Mitchell JA. Cyclooxygenases 1, 2, and 3 and the production of prostaglandin I2: investigating the activities of acetaminophen and cyclooxygenase-2-selective inhibitors in rat tissues. J Pharmacol Exp Ther. 2004; 310(2):642-7.

Warner TD, Mitchell JA. Cyclooxygenase-3 (COX-3): filling in the gaps toward a COX continuum? Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(21):13371-3.

Weber AA, Zimmermann KC, Meyer-Kirchrath J, Schrör K. Cyclooxygenase-2 in human platelets as a possible factor in aspirin resistance. Lancet. 1999; 353(9156):900

Willoughby DA, Moore AR, Colville-Nash PR. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. Lancet. 2000; 355(9204):646-8.

Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991; 88(7):2692-6.

Xu Q, Modrek B, Lee C. Genome-wide detection of tissue-specific alternative splicing in the human transcriptome. Nucleic Acids Res. 2002; 30:3754–66.

Xu Y, Phipps S, Turner MJ, Simmons DL. The N-terminus of COX-1 and its effect on cyclooxygenase-1 catalytic activity. J Genet Genomics. 2010; 37(2):117-23.

Yokoyama C, Tanabe T. (1989) Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme. Biochem Biophys Res Commun. 1989; 165(2):888-94

Zhang WY, Yang XN, Jin DZ, Zhu XZ. Expression and enzyme activity determination of human cyclooxygenase-1 and -2 in a baculovirus-insect cell system. Acta Pharmacol Sin. 2004; 25(8):1000-6.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Karsten Schrör danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und die konstante und konsequente Unterstützung dieser Arbeit, Frau Dr. Petra Censarek für Ihre Betreuung in freundlicher Atmosphäre. Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Helmut E. Meyer und Frau Heike Piechura aus dem Medizinischen Proteom Center in Bochum, sowie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie in Düsseldorf, die diese Arbeit zu einer einzigartigen Erfahrung gemacht haben.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Christina Maria Reinauer