

Aus dem Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften
der Universität Würzburg
Lehrstuhl für Physiologische Chemie II
Vorstand: Professor Dr. rer.-nat. W. Sebald

**Untersuchungen zum enzymatischen und immunchemischen Nachweis
der Phytanoyl-CoA-Hydroxylase in CHO-Zellen**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Dirk Thorsten Weismann
aus Hamburg

Würzburg, Juni 2002

Referent: Professor Dr. rer.-nat. E. Conzelmann

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. D. Schindler

Dekan: Professor Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Januar 2004

Der Promovend ist Arzt

Inhalt

Inhalt.....	I
1. Einleitung	1
1.1 Ziel der Arbeit	9
2. Material und Methoden	10
2.1 Materialien.....	10
2.1.1 Geräte	10
2.1.2 Chemikalien.....	10
2.2 Synthese von Phytanoyl-CoA.....	11
2.3 Proteinchemische Methoden	12
2.3.1 Zellen und Gewebe.....	12
2.3.1.1 Rattenleber.....	12
2.3.1.2 Chinese Hamster Ovarian Cells.....	12
2.3.1.3 HepG2	12
2.3.2 Aufschlusstechnik für Gewebe und Zellen, Lagerung und Konzentrierung von Proteinen.....	12
2.3.2.1 Postnukleärer Überstand.....	12
2.3.2.2 Subzelluläre Fraktionierung [Mannaerts et al 1982].....	13
2.3.2.3 Aufbrechen der Zellen.....	13
2.3.2.4 Dialyse.....	13
2.3.3 Gelelektrophorese.....	13
2.3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)	13
2.3.3.2 Protein-Größenstandard.....	15
2.3.3.3 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran.....	15
2.3.4 Chromatographische Verfahren.....	16
2.3.4.1 Dünnschichtchromatographie.....	16
2.3.4.2 Reverse Phase Chromatographie (Rp-18)	17
2.3.4.3 DEAE-Cellulose-Gele	17
2.3.4.4 Affinitätssäulenchromatographie	17
2.3.4.5 Gaschromatographische Analyse	18
2.3.5 Quantitative Methoden.....	19
2.3.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford (1976).....	19

2.3.6	Enzymatische Messungen	19
2.3.6.1	Phytanoyl-CoA-Hydroxylase Assay	19
2.3.6.2	Phytanoyl-CoA-Hydroxylase Assay mit freier Fettsäure.....	20
2.3.6.3	Succinat-Dehydrogenase (mitochondriales Leitenzym) [Banerjee et al, 1984].....	20
2.3.6.4	Katalase (peroxisomales Leitenzym) [Hübl et al, 1964]	20
2.3.6.5	UDPase (Leitenzym des Golgi-Apparat).....	21
2.3.6.6	5'-Nucleotidase (Leitenzym für die Plasmamembran) [D.J. Morre` et al, 1971].....	22
2.3.6.7Glucose-6-Phosphatase (Leitenzym für das Endoplasmatische Retikulum) [C.de Duve et al, 1955]	22
2.3.6.8	Phosphatbestimmung [Eibl et al. 1970].....	23
2.3.6.9	β -Hexosaminidasen (lysosomales Leitenzym) [K.Sandhoff et al, 1977]..	23
2.4	Mikrobiologische Arbeitstechniken	24
2.4.1	Sterilisationstechniken.....	24
2.4.1.1	Trockensterilisation	24
2.4.1.2	Dampfsterilisation	24
2.4.1.3	Sterilfiltration	24
2.5	Kulturmedien.....	25
2.5.1	Flüssigmedien.....	25
2.5.1.1	LB-Medium:	25
2.5.1.2	SOC-Medium	25
2.5.2	Puffer	25
2.5.2.1	PBS	25
2.5.2.2	10x Phosphatpuffer.....	25
2.5.2.3	TBS.....	26
2.5.2.4	5xTBE	26
2.5.2.5	ELISA.....	26
2.5.3	Festmedien.....	26
2.5.3.1	LB-Platten	26
2.6	Molekularbiologische Methoden.....	27
2.6.1	cDNA-Bank.....	27
2.6.1.1	Uni-Zap TM XR Library (Stratagene).....	27

2.6.1.2	Amplifikation einer cDNA-Bank	27
2.6.1.3	Titerbestimmung	27
2.6.2	Oligonucleotide	28
2.6.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Innis, 1990).....	28
2.6.4	Reinigung, Fällung und Trocknung von DNA	29
2.6.5	Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren.....	30
2.6.6	Agarose-Gelelektrophorese	30
2.6.7	DNA-Größenstandards.....	31
2.6.8	Elution von DNA aus Agarose-Gelen	32
2.6.9	Klonierung mit TA Cloning® Kit (Invitrogen).....	32
2.6.9.1	Ligation	32
2.6.9.2	Transformation	33
2.6.10	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	33
2.6.11	Plasmidpräparation	34
2.6.11.1	Plasmid-Minipräparation.....	34
2.6.11.2	Plasmidpräparation mit Qiaprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN).....	34
2.6.12	Automatisierte DNA-Sequenzierung.....	35
2.7	Immunchemische Methoden	35
2.7.1	Antikörperherstellung (Kaninchen-anti-Hamster-Phytanoyl-CoA-Hydroxylase-Antikörper)	35
2.7.2	Elisa	36
2.7.3	Immunchemischer Antigennachweis nach Elektrotransfer	37
2.7.4	Trennung von Immunkomplexen	37
3	Ergebnisse	39
3.1	Versuche zur enzymatischen Messung der Phytanoyl-CoA-Hydroxylase.....	39
3.1.1	Substrate	39
3.1.1.1	Phytansäure	39
3.1.1.2	Phytanoyl-CoA.....	39
3.1.2	Messung der Phytanoyl-CoA Hydroxylase.....	40
3.1.2.1	Dünnschichtchromatographie und Analyse.....	41
3.1.2.2	Etablieren des Assays.....	42
3.1.2.3	Optimierung des Assays.....	42
3.1.2.4	Gaschromatographische Analyse des Produktes	44
3.1.2.5	Untersuchung zur Substrataffinität der Hydroxylase	45

3.1.2.6	Subzelluläre Fraktionierung	46
3.1.2.7	ATP-Abhängigkeit	49
3.1.3	Untersuchungen zur Enzymanreicherung.....	49
3.1.3.1	Aceton-Fällung.....	50
3.1.3.2	DEAE-Cellulose.....	50
3.1.3.3	Anreicherung.....	50
3.1.3.4	Versuche mit verschiedenen Nucleotiden	51
3.1.4	Messung in Homogenaten kultivierter Zellen	52
3.1.4.1	Humane Hepatomzellen (HepG 2).....	52
3.1.4.2	Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells und menschliche Fibroblasten ..53	
3.2	Versuche zur immunochemischen Detektion der Phytanoyl-CoA-Hydroxylase ..55	
3.2.1	Molekularbiologie	56
3.2.1.1	Allgemeine Strategie	56
3.2.1.2	Amplifikation der cDNA-Bank.....	57
3.2.1.3	Klonierung der cDNA für die Hamster-Phytanoyl-CoA-Hydroxylase ..57	
3.2.1.4	3'-Ende	57
3.2.1.5	5'-Ende	58
3.2.2	Immunchemie.....	58
3.2.2.1	Peptide.....	58
3.2.2.2	Konjugation.....	59
3.2.2.3	Immunisierung.....	59
3.2.2.4	Titerbestimmung durch ELISA	60
3.2.2.5	Westernblot	61
3.2.2.6	Affinitätschromatographie.....	62
3.2.2.7	Trennung der Immunkomplexe	66
4	Diskussion	71
5	Zusammenfassung.....	77
6	Anhang	79
6.1	Proteinsequenzvergleich der Phytanoyl-CoA-Hydroxylase aus Mensch, Maus und Hamster	79
6.2	Abkürzungen	82
7	Literaturverzeichnis.....	85

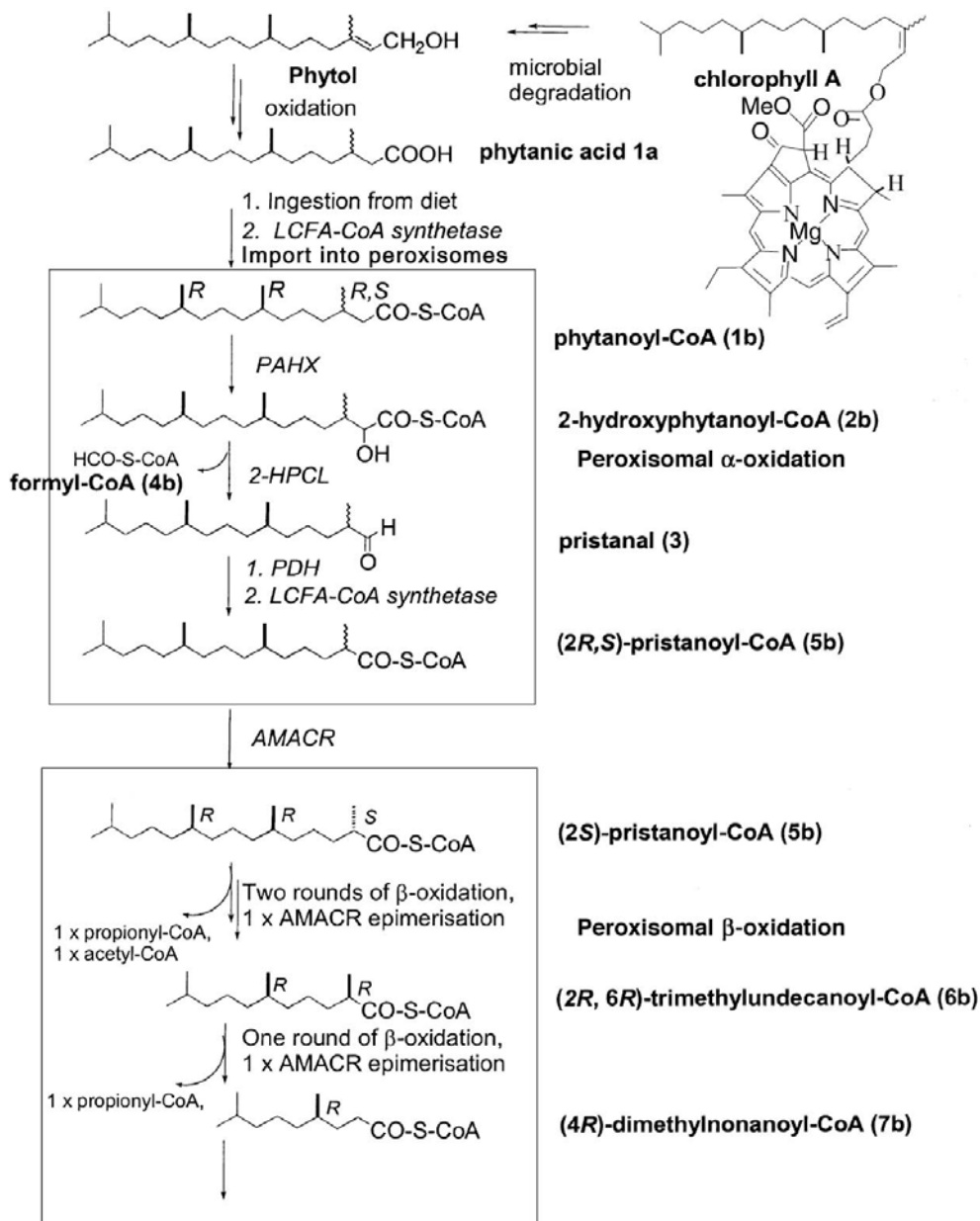
1. Einleitung

Die Entdeckung der Peroxisomen geht auf Rhodin (1954¹) zurück, der das Organell elektronenmikroskopisch in Präparaten aus Rattenleber nachwies und als *microbody* bezeichnete. Auf den Aufnahmen war ein Organell erkennbar, das von einer Phospholipiddoppelschicht umgeben ist und zentral einen Kristallkern aufweist, der als Urat-Oxidase-Kristall identifiziert wurde. DeDuve² wies in diesen Mikrokörperchen 1960 eine Wasserstoffperoxid-bildende Oxidase und die Katalase nach. Aus diesen Entdeckungen zog man den Schluss, daß die beschriebenen Enzyme Bestandteil eines primitiven Oxidationssystems seien und die Organellen folglich als evolutionärer Ballast anzusehen sind.

Die Bedeutung der Peroxisomen wurde erkannt, als das Cerebrohepatorenale-Syndrom durch Goldfischer et al., 1973³ mit dem völligen Fehlen intakter Peroxisomen assoziiert werden konnte. Erkrankte fallen bei Geburt durch charakteristische faciale Dysmorphien, Katarakt, schwere Hypotonie und Anfälle auf. Es findet sich weiter eine Retinopathia pigmentosa, ein Hörverlust, eine Hepatomegalie, Nierenzysten und eine Chondrodysplasia punctata, die an der Patella und am Acetabulum nachweisbar ist. Die Säuglinge zeigen keine psychomotorische Entwicklung und versterben im Laufe des ersten Lebensjahres. Dieses Syndrom wird auch nach seinem Erstbeschreiber als Zellweger-Syndrom^{4,5} bezeichnet.

Mittlerweile sind so viele peroxisomale Stoffwechselwege bekannt, daß eine vollständige Aufzählung zu umfangreich wäre, einige sind aber hervorzuheben. Am längsten bekannt dürfte die peroxisomale β -Oxidation sein. Hierbei werden die Fettsäuren analog zur mitochondrialen β -Oxidation katabolisiert, wobei jedoch die Reduktionsäquivalente in den Peroxisomen über H_2O_2 direkt auf Sauerstoff übertragen werden. Wasserstoffperoxid wird über die Katalase disproportioniert. Die Reduktionsäquivalente werden also nicht auf Zytochrome übertragen, passend zu der Beobachtung, daß Peroxisomen keine Kompartimentierung für eine oxidative Phosphorylierung besitzen. Bei den zu oxidierenden Substanzen handelt es sich um überlangkettige Fettsäuren (VLCFA), α -Methylfettsäuren, Prostaglandine u. a. Im Rahmen der Gallensäurenbildung erfolgt die für letztere essentielle Oxidation von THCA und DHCA zu Chenodeoxycholat und Cholat durch peroxisomale β -Oxidationsenzyme, insbesondere durch die THCA-CoA-Oxidase.^{6,7,8,9,10,11}

Die β -methylverzweigten Fettsäuren werden ebenfalls in den Peroxisomen katabolisiert. Quantitativ am wichtigsten ist die Phytansäure (3,7,11,15-Tetramethylhexadecanät), ein Metabolit des Chlorophyllbestandteils Phytol. Hierbei verhindert die β -Methylverzweigung eine β -Oxidation, da im Falle einer hypothetischen β -Oxidation im dritten Schritt am β -C-Atom von 3-Hydroxy-Phytanoyl-CoA anstelle eines Protons eine Methyl-Gruppe abgespalten werden müsste. Statt dessen wird die Fettsäure in Peroxisomen α -oxidiert, in dem die aktivierte Fettsäure in α -Stellung hydroxyliert wird und anschließend unter Abspaltung von Formyl-CoA der Aldehyd der Pristan säure entsteht. Der Aldehyd



wird zur Carbonsäure oxidiert und zum Thioester aktiviert und kann anschließend in der peroxisomalen β -Oxidation verstoffwechselt werden, wobei wegen der Methylverzweigung, die sich nunmehr in α -Stellung findet, Propionyl-CoA als Metabolit entsteht.

In Peroxisomen finden sich weitere oxidative Abbausysteme, zum Beispiel für exogen aufgenommene d-Aminosäuren oder endogene Metaboliten wie L-Pipecolinsäure und viele andere mehr. Die Aufgabe der Peroxisomen läßt sich, betrachtet man ihre katabole Funktion, als eine Art zelluläre „Müllverbrennungsanlage“ beschreiben. Diese Charakterisierung ist allerdings unvollständig, da auch anabole Vorgänge durch die Peroxisomen katalysiert werden. So finden sich in den Peroxisomen Schritte für die Plasmalogen- und, wie derzeit vermutet wird, auch für die Cholesterinsynthese. Die Plasmalogensynthese nimmt ihren Ursprung in der Acylierung von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und der anschließenden Substitution des Säurerestes durch einen langkettigen Alkohol unter Bildung von Alkyl-DHAP. Beide Enzyme, die DHAP-Acyltransferase und die Alkyl-DHAP-Synthase sind in den Peroxisomen angesiedelt. Obendrein wird die Reduktion von langkettigen Fettsäuren zu ihren Alkoholen durch die peroxisomale Acyl-CoA-Reduktase vorgenommen, womit auch das zweite Substrat für die Alkyl-DHAP-Synthetase auch in Peroxisomen entsteht.

Bezüglich der Cholesterinsynthese läßt sich feststellen, daß Peroxisomen HMG-CoA-Reduktase und größere Mengen von Sterol-Carrier-Protein-2 enthalten, wobei letzteres die Cholesterolsynthese induziert. Es konnte in gereinigten Peroxisomen die Synthese von Acetoacetyl-CoA aus Acetyl-CoA und die Synthese von Cholesterol aus Mevalonat nachgewiesen werden^{12,13}. Somit scheint es neben der Synthese im ER und Cytosol auch eine peroxisomale Cholesterinsynthese zu geben, deren Bedeutung aber noch nicht geklärt ist.

Peroxisomen finden sich in jeder Zelle, kommen aber besonders reichlich in Geweben vor, die am Lipid-Metabolismus beteiligt sind, also in der Leber, den Talgdrüsen und in braunem Fett. Es besteht meist eine enge räumliche Beziehung zwischen Peroxisomen und Endoplasmatischem Retikulum, so daß lange von einer Zusammengehörigkeit beider Organellen ausgegangen^{14,15,16} und eine räumliche Kontinuität vermutet wurde. Heute weiß man, daß Peroxisomen durch Knospung aus älteren Peroxisomen abgespalten werden¹⁷. Hierbei entstehen erst einmal katalase-negative Ausstülpungen, welche dann durch Import

mit Matrixproteinen aufgefüllt werden, nachdem die Membranen mit peroxisomalen Membranproteinen bestückt worden sind^{18,19,20,21}.

Der Import wird über zwei zurzeit bekannte Targeting Sequenzen gesteuert^{22,23,24}. Dabei handelt es sich um Aminosäure-Sequenzen der Primärstruktur des Proteins, an die, vermutlich cytosolische, Rezeptoren binden^{25,26,27,28}. Von den beiden derzeit bekannten Peroxisomalen Targeting Sequenzen (PTS) scheint über die PTS 1 der größte Teil der peroxisomalen Matrixproteine importiert zu werden²⁹. Es handelt sich bei dieser Sequenz um ein C-terminales Tripeptid, welches vornehmlich aus den Aminosäuren Serin-Lysin-Leucin besteht, jedoch auch Modifikationen zulässt (S/A/C-K/R/H-L)³⁰. Ein ausbleibender Import von modifizierten Proteinen, die C-terminal zwei zusätzliche Aminosäuren tragen, zeigt hingegen die Notwendigkeit der C-terminalen Lokalisation des SKL-Motifs^{30,31}. Da Anti-SKL-Antikörper ausschließlich Matrixproteine von Peroxisomen binden, demnach in immunhistochemischen Versuchen mit diesen Antikörpern nur die peroxisomale Matrix reagiert, muß es sich bei dieser Sequenz um ein spezifisch peroxisomales Signal handeln^{30,32}. Dafür spricht auch die Tatsache, daß dieses SKL-Motiv hochkonserviert ist und sich neben den Säugern auch in anderen Tieren, Pflanzen, Hefen und auch Parasiten (Trypanosomen) wiederfindet^{31,33}. Der Import erfolgt über die Bindung der Sequenz an den PTS 1 Rezeptor, ein Produkt des *PEX5*-Gens²⁵. Hierbei handelt es sich um ein Protein der tetratricopeptid Familie, über das jedoch noch sehr wenig bekannt ist. Die Lokalisation ist umstritten und wird einerseits als cytosolisch angegeben, andererseits aber auch an peroxisomale Membranen gebunden vermutet.

Bei der PTS 2 handelt es sich um eine in der Nähe des N-Terminus liegende Sequenz mit einer etwas variablen Aminosäureabfolge (-R/K-L/V/I-X₅-H/Q-L/A-)³⁴. Beschrieben wurde die Sequenz bei der β -Ketothiolase und findet sich ebenfalls in der Alkyl-Dihydroxyacetonphosphat-Synthase und der Phytanoyl-CoA-Hydroxylase^{35,36,37,38}. Tatsächlich ist noch relativ wenig über den Importmechanismus bekannt. Man weiß, daß ATP verbraucht wird^{39,40}, daß ein nicht näher charakterisierter cytosolischer Faktor⁴¹ benötigt wird und daß das heat shock protein 70 (Hsp 70)⁴² anwesend sein muß. Letzteres spielt möglicherweise eine Rolle bei Wiedererlangung der Tertiärstruktur, nachdem sich das zu importierende Proteine vor der Durchschleusung entfaltet hat^{43,44}. Es wird zur Zeit davon ausgegangen, daß sich die oder einige der die PTS 2 enthaltenden Proteine schon vor dem Import in ihrer Tertiärstruktur befinden. Nach dem Import wird die Targeting Sequenz im Rahmen einer posttranslationalen Modifikation abgeschnitten. Das *PEX-7*-Genprodukt

wurde für den Thiolaseimport als Rezeptor beschrieben und ist ein 42 kD Protein, das zur WD repeat Familie gehört.

Die große Rolle, die die Peroxisomen im zellulären Stoffwechsel spielen, wurde in den letzten 20 Jahren erkannt und wird nunmehr durch zunehmendes Wissen über die peroxisomalen Stoffwechselerkrankungen unterstrichen.

Die peroxisomalen Stoffwechselerkrankungen können pathogenetisch in Gruppen eingeteilt werden. Erstens finden sich Erkrankungen, denen ein Biogenesedefekt (PBD) zugrunde liegt. Hierzu wird das eingangs erwähnte Zellweger-Syndrom (ZS)^{4,5}, sowie die neonatale Adrenoleukodystrophie (NALD)⁴⁵ und das infantile Refsum-Syndrom (IRD)⁴⁶ gezählt⁴⁷. Zweitens lassen sich Erkrankungen beschreiben, denen ein einzelner Enzymdefekt zugrunde liegt. Hierzu zählt man die X-ALD⁴⁸, die Akatalasämie⁴⁹, die Hyperoxalurie Typ 1⁵⁰ und den M. Refsum^{51,52}, sowie noch einige andere mehr. Der dritten Gruppe liegt pathogenetisch ein Ausfall von wenigen nicht-verwandten Proteinen zugrunde, sie kann durch einen Import-Defekt erklärt werden, der nur einen Teil der peroxisomalen Matrixproteine betrifft. Für diese Gruppe existiert zurzeit nur ein Beispiel, es handelt sich um eine Variante der rhizomelischen Chondrodysplasia punctata (RCDP)^{26,27}, die mit einem PTS 2-Import-Defekt verbunden ist. Formal handelt es sich auch hier um einen Biogenesedefekt, mit dem Unterschied, daß sich bei Erkrankten, die der ersten Gruppe zu zuordnen sind, keine oder nur sehr wenige Peroxisomen normalen Aussehens finden, während die Peroxisomen bei RCDP-Patienten eine unauffällige Anzahl und Form besitzen.

Die Namensgebung der peroxisomalen Stoffwechselerkrankungen führt zu großer Verwirrung und ist auf klinische Beobachtungen der Erstbeschreiber zurückzuführen, die zu einem Zeitpunkt gemacht wurden, bevor eine Assoziation zu den Peroxisomen bekannt war⁵³. Tatsächlich ist es so, daß das Zellweger Syndrom, die neonatale Adrenoleukodystrophie (NALD) und das infantile Refsum Syndrom mehr miteinander gemeinsam haben als etwa NALD und X-ALD oder IRD und der klassische M. Refsum. In Tabelle 1-1 sind die Symptome der drei PBD und der RCDP einander gegenüber gestellt.

Tabelle 1-1: Symptome der PBD und der RCDP

Merkmal	ZS	NALD	IRD	RCDP
mittlere Überlebenszeit	0,76	2,2	6,4	1,0
facial Dysmorphie	++	+	+	++
Katarakt	80%	45%	7%	72%
Retinopathie	71%	82%	100%	0
Hörverlust	100%	100%	93%	71%
psychomot. Retardierung	4+	3-4+	3+	3+
musk. Hypotonie	99%	82%	52%	±
neugeborenen Anfälle	80%	82%	20%	±
Hepatomegalie	100%	79%	83%	0
Nierenzysten	93%	0	0	0
Rhizomelie	3%	0	0	93%
Chondrodysplasia punctata	69%	0	0	100%
neuronaler Migrationsdefekt	67%	20%	±	±
Demyelinisierung	22%	50%	0	0

Anmerkung: Die Prozentangaben beziehen sich auf die Prozentzahl der Patienten, die ein Symptom aufweisen. 0: Symptom nicht nachweisbar, ± bis 4+ Ausprägung eines Symptoms. [Moser, H.W., 1997]

In Komplementierungsversuchen zu den PBD fanden sich 12 Komplementierungsgruppen, weshalb von 12 unterschiedlichen genetischen Defekten ausgegangen wird^{54,55,56}. Alle betroffenen Gene wurden kloniert, wobei sich herausstellte, daß ein betroffenes Gen mit mehreren Phänotypen assoziiert sein kann. In Tabelle 1-2 sind einige Peroxine mit den durch ihre Defekte verursachten Erkrankungen wieder gegeben. Mit Peroxin werden die Produkte der *PEX*-Gene bezeichnet. Als *PEX*-Gene werden eben jene Gene bezeichnet, die im Rahmen der Komplementierungsstudien mit mutanten Hefen für die peroxisomale Biogenese als essentiell identifiziert wurden. Die Liste der Proteine, die bei der Peroxisomen-Biogenese eine Rolle spielen, ist nicht vollständig und wird ständig durch Neuentdeckungen ergänzt, ebenso, wie die Assoziation von Peroxin und Phänotyp laufend vervollständigt wird. Die Defekte der Peroxine 1 und 12, sowie des Genprodukts der Komplementierungsgruppe 8 des Kennedy-Krieger-Instituts, können sich phänotypisch in jeder der drei Formen der PBD – ZS, NALD und IRD – äußern. Die Schlussfolgerung hieraus ist, daß ZS, NALD und IRD unterschiedliche Ausprägungen von Erkrankungen darstellen, nämlich von peroxisomalen Biogenesestörungen, denen verschiedenen

genetischen Ursachen zugrunde liegen können und die sich, im Sinne eines Kontinuums, mit dem ZS als der schwersten und dem IRD als der am wenigsten schweren Verlaufsform präsentieren. Auf der Suche nach einer Erklärung für diesen Pleomorphismus konnten experimentell Bestätigungen für zwei Theorien gefunden werden. Zum Einen können verschiedene Mutationen in einem Gen zu Proteinen mit unterschiedlich eingeschränkter Funktion im Vergleich zum Wildtyp führen, wobei die Erkrankung umso milder verläuft, je höher die Restaktivität eines Proteins ist⁵⁴. Zum Anderen kann die Ursache einer milden Verlaufsform in einem Mosaizismus des Individuums gesehen werden, wobei sich nebeneinander Zellen mit und ohne funktionellen Defekt finden^{57,58,59,60,61}. Die Ursache dieser Mosaizismen ist noch nicht geklärt. Denkbar wäre zum Einen das Auftreten einer Neumutation während der Ontogenese. Je nachdem zu welchem Zeitpunkt dieses Ereignis eintritt, betrifft der Defekt komplette Gewebe oder nur Teile davon, während gleichzeitig andere Gewebe unbeeinträchtigt erscheinen. Es kann zu einem Mosaik innerhalb eines Gewebes kommen, indem sich zum Beispiel in der Leber im Falle einer PBD import-kompetente und inkompetente Zellen in einem krankheitsdeterminierenden Verhältnis mischen. Andererseits könnte beispielsweise eine Punktmutation, die zu einem AS-Austausch führt, die Faltung oder Stabilität des Genproduktes so beeinflussen, daß geringe Variationen der Umgebungsbedingungen (Sauerstoff- und Nährstoffangebot, pH-Wert u.ä.) quantitativ große Unterschiede in der Funktionsfähigkeit zur Folge haben können. Durch diese beiden Theorien wären Verlaufsformen erklärbar, die von klinisch gesund bis hin zur infausten Prognose eines klassischen Zellweger-Syndroms reichen können.

In der Tabelle 1-2 fällt jedoch eine Erkrankung auf, die nicht in dieses ZS-IRD-Kontinuum eingeordnet werden kann, die RCDP^{62,63}. Hierbei handelt es sich um eine autosomal-rezessive Erkrankung die sich klinisch durch stark verkürzte Extremitäten, gestörte enchondrale Ossifikation, Spaltbildung in den Wirbelkörpern, sowie Ichthyosis und Katarakt äußert. Die Chondrodysplasia punctata ist vor allem in der Wirbelsäule, aber auch in extraskeletalem Gewebe nachweisbar. Im Serum ist ein Mangel an Plasmalogenen und eine Akkumulation von Phytansäure typisch. Die Verteilung und Form der Peroxisomen ist zum Teil auffällig und äußert sich dann in dysmorphen und in der Anzahl reduzierten bis nicht mehr nachweisbaren Organellen. Differentialdiagnostische Bedeutung hat die Tatsache, daß die rhizomelische Chondrodysplasia punctata die einzige Variante der Chondrodysplasien mit einem gestörten peroxisomalen Metabolismus darstellt. Sie wird

von der autosomal-dominanten Conradi-Hünemann-Chondrodysplasia punctata, sowie jeweils einer X-chromosomal-rezessiven und dominanten Form abgegrenzt.

Tabelle 1-2: Peroxine mit assoziierten Phänotypen im Falle ihres Defektes

Peroxin		Komplementierungsgruppe			Phenotyp	Chromosom
Nr.:	Charakteristika	KKI	Jap	AMS		
1	143 kDa AAA ATPase	1	E	2	ZS, NALD, IRD	7q21-22
2	C3HC4 zinc binding integral peroxisomal membrane protein 35-52 kDa	10	F	5	ZS	
5	PTS1 receptor	2		4	ZS, NALD	12p13.3
6	12-127 kDa AAA ATPase	4	C	3	ZS, NALD	6p21.1
7	PTS2 receptor	11		1	RCDP	6q22-24
10	C3HC4 zinc-binding integral perox. membrane protein	7	B		ZS, NALD	8q21.1
12	48 kDa C3HC4 zinc binding integral perox. membrane protein	3			ZS, NALD, IRD	
13	SH-containing 40-43 kDa perox. integral membrane protein		H		ZS, NALD	
16	39 kDa peripheral perox. membr. prot	9	D		ZS	
19	Perox membr. prot.; prenylated		J		ZS	
	Unidentified	8	A		ZS, NALD, IRD	
	Unidentified		G		ZS	

Abkürzungen: KKI: Kennedy Krieger Institut; Jap: Japan; Ams: Amsterdam;
Für eine Übersicht über die PEX-Nomenklatur siehe Subramani, S., 1998.

Der in der Tabelle 1-2 angegebene Defekt der RCDP bezieht sich auf das Peroxin 7, welches als PTS2-Rezeptor identifiziert wurde. Von den zur Zeit sequenzierten peroxisomalen Matrixproteinen wird die Mehrzahl über die PTS 1 importiert, tatsächlich

sind nur 3 Proteine bekannt, die eine PTS 2 besitzen: die β -Keto-Thiolase, Alkyl-Dihydroxyacetonphosphat-Synthetase und die Phytanoyl-CoA-Hydroxylase.

Nun kann das klinische Bild einer RCDP aber auch durch einen isolierten Fehler in der Plasmalogensynthese hervorgerufen werden. Das heißt, auch hier ist die Genotyp-Phänotyp-Beziehung nicht eindeutig. Es ist aber noch zuwenig über den PTS 2-Import bekannt, um Aussagen über Pleomorphismen machen zu können. Es existieren jedoch mutante CHO-Zelllinien, die die Merkmale eines PTS-Import-Defektes aufweisen. Diese Zellen müssen bezüglich ihres PTS 2-Importverhaltens charakterisiert werden, damit sie anschließend für Komplementierungsversuche eingesetzt werden können. Daraus verspricht man sich die Identifizierung betroffener Gene, welche dann kloniert und analog dem Vorgehen zur Untersuchung der PBD für Transfektionsversuche eingesetzt werden können.

1.1 Ziel der Arbeit

Um den PTS 2-Import in verschiedenen mutanten CHO-Zelllinien untersuchen zu können, mußte ein geeigneter Test entwickelt werden. Eine Möglichkeit ergab sich aus Aktivitätsmessung einer der drei PTS 2-importierten Enzyme. Es sollte untersucht werden, ob ein Test mit ausreichender Sensibilität durch eine enzymatische Messung der Aktivität der Phytanoyl-CoA-Hydroxylase zu etablieren ist. Für den Fall, daß dieser Weg nicht den geforderten Ansprüchen genügt, sollte nach Alternativen gefahndet werden. Insbesondere war hier an einen immunochemischen Nachweis gedacht, dessen Etablierung für den Fall einer unbefriedigenden enzymchemischen Methode versucht werden sollte.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Dialyse-Schläuche: Serva (Heidelberg)

Fluorimeter: Locarte Company (London, England).

Flüssigkeitsszintillationszähler: Wallac System 1410, von Pharmacia LKB GmbH (Freiburg).

Gaschromatograph: Modell 5890 von Hewlett-Packard (Bad Homburg); GC-Säule FS-OV-1701, 10m * 0,23 mm ID von CS.Chromatographie Service GmbH (Langerwehe).

pH-Meter: Modell 3500; Kühlzentrifuge: Modell J2-21; Ultrazentrifuge: Modell L8-70M nebst Rotoren und Zubehör von Beckmann (München)

Potter-Elvehjem Homogenisator: von B. Braun (Melsungen)

Radiodünnschichtscanner: von Raytest (Straubenhardt)

Spannungsgeräte: Electrophoresis Power Supply, E532 und Microcomputer Electrophoresis Power Supply, E 455 von Consort (Turnhout, Belgien)

Spektralphotometer: PM 6 von Carl Zeiss (Oberkochen)

Ultraschallgeräte: Sonifier 250 mit regelbarer Schalleistung von Branson Sonic, Danbury (Connecticut, USA)

Electrophorese-Zelle: Mini-Protean II und Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell von Bio Rad (Richmond, USA)

2.1.2 Chemikalien

Aceton, Dichlormethan, Essigsäureethylester und Trimethylsilylchlorid von Riedel-de Haën (Seelze)

Acetonitril, Coomassie Brilliant Blue G-250 und t-Butanol von Janssen (Beerse, Belgien)

CCl₄, Pentan, Toluol, Triethylamin von Fluka AG (Buchs, Schweiz).

5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphat (BCIP), Buttersäure, Coenzym A (Li₃-Salz), 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB), Enzyme, N-Ethylmaleinimid, Farbstoffaffinitätsmedien, p-Nitrotetrazoliumblau (NBT) von Sigma Chemie (Deisenhofen)

Carbonyldiimidazol, H₂O₂ (30%-Lsg), HgCl₂, NaN₃, Salzsäure, Schwefelsäure, Saccharose, Tris von Aldrich (Steinheim)

Chlorameisensäureethylester, Chloroform, DC-Fertigplatten Kieselgel 60, Diethylether, Kieselgel 60, NH₄OH und Phytol von Merck (Darmstadt)

DEAE-52-Cellulose, Molekulargewichtsmarker für SDS-Gelelektrophorese und Reagenz für die Phosphatbestimmung nach Eibl und Lands von Serva (Heidelberg)

Hydroxylapatit (Bio Gel HT) von Bio Rad (Richmond, USA)

Radioaktive Chemikalien von Amersham (Braunschweig)

Silicagel RP-18 (32-63 mesh, 60 Å) von ICN (Eschwege)

Szintillationslösung Rotaszint 2211 von Roth (Karlsruhe)

Alle übrigen Chemikalien p.a. bzw. von höchsten erhältlichen Reinheitsgrad von Merck (Darmstadt), Aldrich (Steinheim) oder Sigma (Deisenhofen).

2.2 Synthese von Phytanoyl-CoA

Aktivierung zum Anhydrid: Die 1,3 fache Menge Chlorameisensäureethylester und Triethylamin (je 20 µl, 1 M in Dichlormethan) werden mit Phytansäure (ebenfalls in Dichlormethan) versetzt und 1 h stehengelassen. Das entstandene Acyl-Kohlensäureethylesteranhydrid wird im N₂-Strom zur Trockene eingengt.

Synthese des Thioesters: Das Anhydrid wird in 0,5 ml tertiärem Butanol aufgenommen und mit einer äquimolaren Menge Li₃CoA (in 0,5 ml 0,4 M Kaliumhydrogencarbonat-Puffer) versetzt. Die Reaktion soll 30 min bei RT unter zeitweiligem Schütteln und Ultraschall stattfinden.

Reinigung: Nach Zusatz von 100 µl 2 N HCl wird die Probe erneut im N₂-Strom zur Trockene eingengt, in 1 ml H₂O aufgenommen und anschließend an 0,5 ml Rp18 aufgetrennt. Nach Waschen mit 2×1ml H₂O erfolgte die Elution mit je 1 ml eines EtOH/H₂O-Stufengradienten mit den Mischungsverhältnissen 1/9, 2/8, ..., 9/1 und anschließendem Nachspülen mit 2×1ml EtOH.

Analyse und Dünnschichtchromatographie: Die radioaktiven Fraktionen werden durch Zählung im β-Counter bestimmt. Durch Dünnschichtchromatographie mit einem hydrophilen Laufmittel (Propanol/Wasser 7/3) und Analyse im Radioscanner, werden die Fraktionen bestimmt, die Phytanoyl-CoA enthalten. Diese werden vereinigt und erneut im N₂-Strom zur Trockene eingengt.

Stammlösung & Substratlösung: Die Thioester wurden in einem kleinen Volumen H₂O als Stammlösung aufgenommen. Die Aktivität der Substratlösung betrug 5×10^5 cpm/ml.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Zellen und Gewebe

2.3.1.1 Rattenleber

Rattenleber wurde frisch präpariert und anschließend homogenisiert. Das Homogenat wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.3.1.2 Chinese Hamster Ovarian Cells

CHO-Zellen waren in der Zellbank des Arbeitskreises vorhanden, und wurden freundlicherweise von Christine Albers kultiviert. Zur Verfügung standen Zellen vom Wildtyp, sowie Zellweiger-ähnliche und RCDP-ähnliche Mutanten.

2.3.1.3 HepG2

Mit HepG2-Zellen wird eine permanente Zelllinie humaner Hepatomzellen bezeichnet. Sie waren ebenfalls in der Zellbank des Arbeitskreises vorhanden. Es wurden Zellen vom Wildtyp verwendet.

2.3.2 Aufschlusstechnik für Gewebe und Zellen, Lagerung und Konzentrierung von Proteinen

2.3.2.1 Postnukleärer Überstand

Herstellung eines Homogenates: Zerkleinerte Rattenleber wird im Eisbad mit der 9-fachen Menge Saccharose-Lösung (8,6% Saccharose in 1 mM Tris/HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,0) im Potter mit Teflon-Pistill bei 700 Upm durch viermaliges Potten homogenisiert.

Herstellen eines Postnucleären Überstandes: Zur Abtrennung der Nukleinsäuren wird das Homogenat 3 min bei 400 g und 4° C zentrifugiert.

2.3.2.2 Subzelluläre Fraktionierung [Mannaerts et al 1982]⁶⁴

Auf einen linearen Saccharose-Gradienten werden 4 ml eines frisch zubereiteten Postnukleären Überstandes (PNÜ) geschichtet

Saccharose-Gradienten: Der Gradient wird aus je 17,5 ml 56% und 35% Saccharose-Lösung (in 1 mM Tris/HCl pH 7,0 mit 0,1 mM EDTA) hergestellt und mit PNÜ beschichtet. Der Gradient wird 3 Stunden mit 69000 g (4° C) im Sorvall AH.629-Rotor zentrifugiert und anschließend fraktioniert, zu Fraktionen à 1,5 ml.

2.3.2.3 Aufbrechen der Zellen

Durch Lagerung der Homogenate bei -20 °C wurden die Zellen aufgebrochen. Anderenfalls wurden die Homogenate 2 x 5 min mit bis zu 250 Watt sonifiziert.

2.3.2.4 Dialyse

Zur Entsalzung werden die Proteinlösungen gegen 10 mM Phosphatpuffer, pH 6,8 in Servapor Dialyseschläuchen (Serva) dialysiert.

2.3.3 Gelelektrophorese

2.3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)⁶⁵

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Makromolekülen in Reihenfolge ihrer molaren Masse. Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird das Gel in einer radikalischen Polymerisation aus Acrylamid und n,n'-Methylenbisacrylamid hergestellt, so daß der Auftrennungsbereich von der Konzentration des Acrylamids abhängig ist.

Lösung A: 30 % Acrylamid, 0,8 % N,N' -Methylenbisacrylamid

Lösung B: 0,75 M Tris/HCl pH 8,8

Lösung C: 0,5 M Tris/HCl pH 6,7

Elektrophoresepuffer: 30 g Tris, 0,75 g Glycin, 5 g SDS, 4,8 l ddH₂O

Proteinprobenpuffer: 4 ml Lösung C, 0,3 g SDS, 0,75 g Glycerin (87 %), 0,1 g Mercaptoethanol, 250 µl Bromphenolblau (1 mg/ml)

Hierten-Nomenklatur: Acrylamidgehalt $T = [100 (A+B)]/V$

Vernetzungsgrad $C = (100 B) / (A+B)$

Für unterschiedliche Acrylamid-Konzentrationen wurden die Lösungen entsprechend nachfolgendem Pipettierschema (Tabelle 2-1) eingesetzt. Die Angaben beziehen sich auf ein Gel mit 0,3 mm Schichtdicke.

Tabelle 2-1: Pipettierschema für Proteingele von 0,3 mm Dicke

Stammlösung	Sammelgel 4%	Trenngel		
		8 %	10 %	12 %
Lösung A	0,4 ml	2,0 ml	2,5 ml	3 ml
Lösung B	-	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
Lösung C	1,5 ml	-	-	-
10%SDS (w/v)	30 µl	75 µl	75 µl	75 µl
H ₂ O	1,06 ml	1,613 ml	1,113 ml	0,613 ml
APS 10% (w/v)	50 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	20 µl	20 µl	20 µl

Die entsprechenden Ansätze für Trenn- und Sammelgel wurden bis auf APS und TEMED vorgelegt. Letztere lösen die Polymerisation aus und wurden erst unmittelbar vor Gebrauch der Lösung zugefügt. Die seitlichen Abstandhalter („spacer“) wurden zwischen gereinigte Glasplatten gesetzt, mit Klemmen befestigt und die untere Kante mit Agarose abgedichtet. Im nächsten Schritt wurde das Trenngel (nach Zugabe von APS und TEMED) zwischen die Glasplatten pipettiert (bis ca. 2 cm unter dem Rand). Um eine ebene Trennlinie zwischen Trenn- und Sammelgel zu erhalten, wurde das Trenngel sofort nach dem Gießen mit Wasser überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Wasser entfernt, die Sammelgel-Lösung hinzupipettiert und ein geeigneter Kamm für die Geltaschen eingesetzt. Das ausgehärtete Gel wurde in eine mit Elektrophoresepuffer gefüllte Gelelektrophoresekammer (Mini-Protean II 2D-Zelle, BIORAD) eingebracht.

Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1:2 mit SDS-Probenpuffer gemischt und zur vollständigen Reduktion und Denaturierung bei 95°C für 5 min erhitzt. Das Probenvolumen pro Geltasche betrug 10-25 µl (ca. 0,5-5 µg Protein). Die Fokussierung der Proteine im Sammelgel erfolgte bei 80 V, die anschließende Auftrennung bei 200 V für 45 min.

2.3.3.2 Protein-Größenstandard

Die Bestimmung der Molekulargewichte der Proteine erfolgte durch einen Vergleich mit verschiedenen Proteinen bekannter Zusammensetzung und Größe. Voraussetzung für die Verwendung eines Proteins als Kalibrierungsmarker ist, daß es regulär, d.h. im SDS-Gel proportional zu seiner Molmasse wandert. Für einen anschließenden Westernblot verwendet man einen *prestained* Marker (BIORAD), bei dem die Eichproteine schon vorgefärbt sind.

Tabelle 2-2: Low range prestained Marker (BIORAD)

Protein	M _r [kD]
Phosphorylase B	104
BSA	80
Ovalbumin	46,6
Carboanhydrase	33,5
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	28,3
Lysozym	19,8

2.3.3.3 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran

(Towbin, H. et al., 1979)

Transfer-Puffer: 25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20 % Methanol

TBS: 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl

Blocklösung: 2 % Milchpulver, 1 % BSA in TBS, 0,3 % Tween

ALP-Puffer: 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM Tris/HCl, pH 9,5

Detektionslösung: 1/300 Vol. NBT (75 mg/ml in 70 % DMF) und 1/400 Vol. BCIP (50 mg/ml in 100 % DMF) werden vor Gebrauch zugesetzt.

Stopplösung: 20 mM EDTA/TBS-Lösung

Schema des Blot-Aufbaus:	Schaumstoffmatte	Plus-Pol
	Whatman-Papier	
	Nitrozellulosemembran	
	SDS-Polyacrylamidgel	
	Whatmanpapier	
	Schaumstoffmatte	Minus-Pol

Im Western Blot werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteingemische vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend auf der Membran durch Antikörper markiert.

Transfer: Das SDS-Gel wurde zusammen mit der vorher in Transfer-Puffer eingelegten Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schüll BA85) nach obigem Schema in die Blotting-Apparatur eingespannt und in die mit Transfer-Puffer gefüllten Blotting-Kammer eingesetzt (BIORAD). Der Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran erfolgte in 1h bei 100 V.

Waschen: 3 x 5 min mit TBS

Blockieren: 1 h Inkubation bei RT mit Blocklösung

Primärantikörper: unter Wiegen 2 h Inkubation bei RT mit Kaninchen Anti-Hydroxylase-Antikörper in 3 %-BSA/TBS, 0,3 % Tween

Waschen: 3 x 5 min mit TBS

Sekundärantikörper: unter Wiegen 1h Inkubation bei RT mit Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper, ALP-gekoppelt in 3 %-BSA/TBS, 0,3 % Tween

Waschen: 3 x 5 min mit TBS

Detektion: Die Membran wird mit Detektionslösung bis zum erscheinen der Banden bei RT inkubiert. Der gebundene Antikörper wird dabei über eine Farbreaktion mit NBT/BCIP als Substrat für die alkalische Phosphatase nachgewiesen.

Stoppen: Wenn die Banden gut sichtbar sind wird die Reaktion mit Stopplösung beendet und der Blot anschließend getrocknet.

2.3.4 Chromatographische Verfahren

2.3.4.1 Dünnschichtchromatographie

Verwendet wurden DC-Fertigplatten Kieselgel 60 von Merck. Die Proben, die zuvor im Stickstoffstrom zur Trockene eingengt worden sind, wurden in 20µl Diethylether aufgenommen, und aufgetragen. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Chromatographie in einem Laufmittel aus Hexan/Essigsäureethylester/Essigsäure im Verhältnis 50/10/1.

Die Analyse und Auswertung erfolgte mit einem Radiodünnschichtscanner von Raytest (Straubenhardt).

2.3.4.2 Reverse Phase Chromatographie (Rp-18)

Pasteur-Pipetten werden mit einem kleinen Wattepfropf abgedichtet, sodaß Elutionslösungen leicht passieren können, das Kieselgel jedoch zurück gehalten wird. Die Säulchen werden mit 1ml einer 1/2 (v/v) Kieselgel-Methanolschwemme beladen, und mit 2ml Wasser gewaschen. Ungeladene und lipophile Substanzen werden an Rp-18 mit hoher Affinität adsorbiert.

2.3.4.3 DEAE-Cellulose-Gele

Zur partiellen Reinigung des Enzyms wurde eine Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose durchgeführt.

Die Cellulose wurde in 10 mM Phosphat-Puffer aufgeschwemmt und äquilibriert, dann auf eine 24 mm durchmessende Säule 30 cm hoch geladen. Nach dem die Enzymquelle aufgetragen worden ist, wurde mit 3 Säulenvolumina 10 mM Phosphat-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem 0-1 M NaCl-Gradienten (in 10mM Phosphat-Puffer), in einem 60 ml Volumen. Abschließend wurde noch mit 20 ml 1 M NaCl in 10 mM P-Puffer nachgespült. Es wurde zu je 5 ml fraktioniert.

2.3.4.4 Affinitätssäulenchromatographie

Es wurden Quick 900 Cartridges aus dem His•Bind® Kit der Fa Novagen verwendet. Die Säulen basieren auf einer Cellulose-Matrix großen Durchmessers, die mit einem Ni²⁺-Harz beladen werden und besitzen ein Volumen von 2ml und eine Bindungskapazität von ca. 2mg. An die Ni-Ionen können Peptide mit His-Tag über Chelatkomplexe gebunden werden. Die Peptide wurden in Binding-Buffer (His•Bind® Kit) gelöst (Peptid 1 & 3: 1mg/ml; Peptid2 1,5mg/ml)

Äquilibrieren: 6 ml Binding-Buffer (5 mM Imidazol, 0,5 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,9) pro Säule Für die drei Peptide wurde jeweils eine Säule vorbereitet

Beladen: 2 ml Peptid-Lösung wurden auf die Säule gegeben.

Waschen: 20 ml Binding-Buffer s.o.

Waschen: 10 ml Wasching-Buffer (6 mM Imidazol, 0,5 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,9)

An dieser Stelle wurde von der Vorschrift abgewichen, und nach einer Methode von Gu et al, 1994⁶⁶ weitergearbeitet. Diese Arbeitsgruppe hat eine Methode zur Affinitätsreinigung von Antikörpern beschrieben.

Äquilibrieren: 7 SV Äquilibrierungspuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCL, pH 7,4)

Beladen: 2 ml unverdünntes Antiserum, 5 min Inkubation bei RT

Waschen: 5 SV Äquilibrierungspuffer

Waschen: 5 SV Wasch-Puffer (2 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,4)

Elution: 1 SV Elutionspuffer (4 M MgCl₂, ohne Puffer) 15min bei RT, dann weitere 1,5 ml Elutionspuffer. Fraktionen zu je 1ml wurden in Eppendorf-Caps gesammelt.

2.3.4.5 Gaschromatographische Analyse

Um ausreichende Mengen an Fettsäuren für die gaschromatographische Analyse zu gewinnen, wurde ein 10 facher Ansatz zur Reaktion gebracht. Die Fettsäuren wurden extrahiert (siehe Phytanoyl-CoA-Hydroxylase Assay) und an ihren funktionellen Gruppen derivatisiert.

Veresterung: Die zur Trockene eingeeengten Fettsäuren werden mit 0,5 ml methanolischer Salsäure versetzt und über Nacht bei RT zu Methylestern umgesetzt.

Silylierung: Die Proben werden wiederum zur Trockene eingeeengt, und dann mit 20µl TMS-Chlorid versetzt (→ Silylierung an der Hydroxy-Gruppe)

Gaschromatographie: Die Auftrennung erfolgte über eine 15m lange OV 1701 Säule mit einem Säulenkopfdruck von 30kPa.

Folgendes Protokoll wurde verwendet:

Tabelle 2-3: Temperaturprotokoll für die gaschromatographische Analyse

Temperatur		Anstiegsgeschwindigkeit °C/min
von	Bis	
100 °C	150 °C	50 °C
150 °C	240 °C	2,5 °C
240 °	241 °C	0,1 °C

Das Zählgas für die Radio-Gas-Analyse lief mit 20 ml/min und einem Totalflow von 40 ml/min.

2.3.5 Quantitative Methoden

2.3.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)⁶⁷

Coomassie-Lösung: 0,1 g Coomassie Brilliant Blue G250, 50 ml EtOH (abs.), 100 ml H₃PO₄ (85%), 850 ml ddH₂O

10 µl Proteinlösung werden mit 1000 µl Coomassie-Lösung gemischt und die Extinktion bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wird anhand einer Eichkurve mit BSA bestimmt.

2.3.6 Enzymatische Messungen

2.3.6.1 Phytanoyl-CoA-Hydroxylase Assay

Der Ansatz muß nach Mihalik et al. (1995)⁶⁸ Fe²⁺ [1 mM], α-Ketoglutarat [1 mM], Ascorbat [1mM], ATP [10 mM], Mg²⁺ [5 mM], CoA [0,2 mM] und Tris/HCl-Puffer [50 mM] pH7,5 enthalten. Die Komponenten wurden in Stammlösungen angesetzt.

Enzymquelle: 5 µg Protein eines in 20 µl eines Homogenates oder postnucleären Überstandes einer Rattenleber

Substrat: 20 µl [2,3]-³H-Phytanoyl-CoA in wässriger Lösung mit einer spezifischen Aktivität von 1,67x10³Ci/mol.

Reaktionsansatz: Die Kofaktoren, das Substrat und die Enzymquelle werden zu einem Gesamtvolumen von 100 µl vereinigt.

Inkubation: 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad, geschüttelt.

Alkalische Hydrolyse: Mit 100µl 1N Natronlauge wird die Reaktion gestoppt und anschließend bei 80°C hydrolysiert.

Extraktion: Der Ansatz wird mit 100µl konzentrierter Salzsäure angesäuert, und die Lipide mit 3*1ml Diethylether gründlich ausgeschüttelt. Die organische Oberphase wird gesammelt und unter einem N₂-Strom bis zur Trockene eingengt.

Dünnschichtchromatographie: Die Proben werden in 20µl Diethylether aufgenommen und auf eine Kieselgel-Platte aufgetragen. Die Chromatographie erfolgt in einem Laufmittel aus Hexan / Essigsäureethylester / Eisessig (50/10/1).

Analyse und Auswertung: Die Analyse erfolgt mittels Radioscanner, wobei eine Zählzeit von 10min/Bahn in der Regel genügt. Per Integration der Aktivitätskurven werden die Umsätze ermittelt.

2.3.6.2 Phytanoyl-CoA-Hydroxylase Assay mit freier Fettsäure

Phytansäure (in CH_2Cl_2) wird im N_2 -Strom zur Trockene eingeeengt, in $20\mu\text{l}$ β -cyclodextrin und mit den oben angegebenen Komponenten versetzt. Reaktion wie oben.

2.3.6.3 Succinat-Dehydrogenase (mitochondriales Leitenzym) [Banerjee et al, 1984]⁶⁹

Substrat-Lösung: Man benötigt für diesen Assay eine Substrat-Lösung aus 100mM Kaliumphosphat pH7,5, 50mM Saccharose, 2mM Kaliumcyanid, 0,02mg/ml Antimycin A, 100mM Natrium-Succinat und 2mg/ml Jodnitrotetrazoliumviolettchlorid (INT).

Reaktion: Es werden $50\mu\text{l}$ Substrat-Lösung und $50\mu\text{l}$ Fraktion zusammenpipettiert und 30min bei 37°C inkubiert. Wenn dann keine Rotfärbung erkennbar ist, wird die Inkubation über Nacht verlängert. Die Reaktion wird mit $50\mu\text{l}$ 10%iger TCA-Lösung abgestoppt und mit $600\mu\text{l}$ Essigsäureethylester ausgeschüttelt.

Messung: $500\mu\text{l}$ der Oberphase (EE) werden nach Zentrifugation bei 490nm im Photometer gemessen. Als Blank dient ein Ansatz mit Wasser anstelle von Fraktion. Vor der Messung sollten die Proben ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen werden.

Bemerkung: Wichtig für eine erfolgreiche Bestimmung ist, dass das Coenzym der Succinat-Dehydrogenase, FAD, nach Reduktion durch Succinat, seine Elektronen nicht an Enzyme der Atmungskette weitergibt, sondern statt dessen INT reduziert, was zu der charakteristischen Rotfärbung führt. Aus diesem Grunde werden dem Reaktionsansatz die Atmungsketteninhibitoren Antimycin A und KCN hinzugefügt.

2.3.6.4 Katalase (peroxisomales Leitenzym) [Hübl et al, 1964]⁷⁰

Substrat-Lösung: Die Substrat-Lösung dieser Reaktion setzt sich aus 1mM Wasserstoffperoxid in 50mM Phosphat-Puffer, pH 7,0 zusammen.

Reaktion: Man versetzt $50\mu\text{l}$ Fraktion mit 0,5ml Substrat-Lösung und lässt den Ansatz 2,5 Stunden bei 37°C inkubieren. Anschliessend gibt man 0,5ml Titanoxidsulfat-Lösung (4g $\text{TiO}(\text{SO}_4)$ in 1l 40%iger Schwefelsäure) dazu und zentrifugiert.

Messung: Die gelbe Färbung des entstandenen Titanperoxidsulfats ($\text{TiO}_2(\text{SO}_4)$) misst man bei 407nm im Photometer. Den 100%-Wert erhält man durch einen Ansatz mit Wasser anstelle von Fraktion, den Blank mit 50mM Phosphat-Puffer anstelle von Substrat-Lösung.

Zur Auswertung der Reaktion errechnet man die Zerfallskonstante k mit:

$$k = \ln(E_{100\%}/E_{\text{Probe}})/\text{Inkubationszeit.}$$

Bemerkung: In diesem Assay wird die Aktivität der Katalase durch den, von der Katalase bedingten Abbau des zugegebenen Wasserstoffperoxids bestimmt. Das zugesetzte Titanoxidsulfat reagiert mit dem übriggebliebenen H_2O_2 zu dem, gelben Titanperoxidsulfat. Da H_2O_2 in hohen Konzentrationen Enzyme schädigt, die Katalase jedoch auch noch eine sehr hohe spezifische Aktivität besitzt, kann unter diesen Bedingungen niemals innerhalb des Bereichs der Substratsättigung gemessen werden. Desweiteren nimmt während der Reaktion die H_2O_2 -Konzentration deutlich ab. Es handelt sich folglich um eine Reaktionskinetik erster Ordnung. Dies erklärt den logarithmischen Zusammenhang zwischen der Aktivität der Katalase und der Extinktion der Messprobe.

2.3.6.5 UDPase (Leitenzym des Golgi-Apparat)⁷¹

Substrat-Lösung: Die Substrat-Lösung für diese Messung muß mit H_2O -bidest angesetzt werden, da das, im normalen destillierten Wasser enthaltene, Phosphat das Messergebnis verfälscht. Die Lösung enthält 33mM Tris/HCl, pH 8,0, 15mM CaCl_2 , 0,1% Triton X-100, 2mM UDP und 0,01% NaN_3 .

Reaktion: Es werden 60 μl Substrat-Lösung, 20 μl Wasser und 20 μl Fraktion zusammenpipetiert und 30min bei 37°C inkubiert. Dann wird mit 100 μl 10%iger TCA abgestoppt und zentrifugiert.

Messung: 20 μl werden zur Phosphatbestimmung (siehe unten) abgenommen. Um vergleichbare Werte zu erhalten, muß von jeder Fraktion ein Blank erstellt werden, indem vor der Zugabe von Substrat-Lösung mit 100 μl 10%iger TCA abgestoppt wird.

Kommentar: NaN_3 dient in der Substrat-Lösung um Bakterienwachstum zu verhindern, währen Triton X-100, ein Detergens, die Golgi-Membranen zerstören soll.

Bedeutung: Im Golgi-Apparat wird aus UDP-Monosacchariden, "aktivierten" Zuckern, Glykogen synthetisiert. Dazu werden die UDP-Zucker in den Golgi-Apparat hinein geschleust, und dort gespalten. Nun gibt es aber für Nucleosid-Diphosphate kein

Carriersystem, wohl aber für Nucleosid-Monophosphate. Deswegen wird UDP zu UMP hydrolysiert.

2.3.6.6 5'-Nucleotidase (Leitenzym für die Plasmamembran) [D.J. Morre` et al, 1971]⁷²

Substrat-Lösung: 55mM Tris/HCl, pH 8,5, 5,5mg Magnesiumchlorid und 11mM Adenosinmonophosphat.

Reaktion: 20µl Fraktion werden mit 80µl Substrat-Lösung versetzt und 30min bei 37°C inkubiert. Mit 100µl 10%iger TCA wird abgestoppt.

Messung: 20µl werden zur Phosphatbestimmung (siehe unten) abgenommen. Die Blanks zu jeder Probe erhält man, in dem jeweils vor Zugabe von Substrat-Lösung mit TCA abgestoppt wird.

Bemerkung: Die biologische Bedeutung dieses Enzyms, das die Spaltung des Nucleotids zum Nucleosid katalysiert, ist nicht ganz klar. Eine Hypothese wäre, daß es sich um die Initialreaktion zum Abbau der Nucleotide handelt, wobei die Purine zu Harnsäure verstoffwechselt würden. Allerdings werden beim Salvage-Pathway die entstandenen Purine wieder zu Nucleotiden verwertet.

2.3.6.7 Glucose-6-Phosphatase (Leitenzym für das Endoplasmatische Retikulum) [C.de Duve et al, 1955]⁷³

Substrat-Lösung: 11mM Glucose-6-Phosphat, 11mM Mercaptoethanol und 55mM Tris/HCl, pH 6,6.

Reaktion: Es werden 20µl Fraktion mit 90µl Substrat-Lösung versetzt und 15min bei 37°C inkubiert. Es wird abgestoppt mit 100µl 10%iger TCA, anschließend gemixen und zentrifugiert.

Messung: 20µl des Überstandes werden zur Phosphatbestimmung abgenommen.

Bemerkungen und biologische Bedeutung: Das Mercaptoethanol im Ansatz schützt Enzyme vor Oxidation.

Glucose-6-Phosphat kommt im Organismus nur intrazellulär vor und kann die Zellmembranen nicht passieren, Glucose ist also in den Zellen gefangen. Da die Leber aber unter anderem für die Aufrechterhaltung eines konstanten Blutzuckerspiegels verantwortlich ist, muß Glucose, freigesetzt aus den Glykogenspeichern der Leber, die Leberzellen verlassen, und ins Blut gelangen können. Beim Glykogenabbau entsteht aber keine "freie" Glucose, sondern Glucos-1-Phosphat, welches durch die Phosphoglucomutase

in Glucose-6-Phosphat umgewandelt wird. Um nun "freie" Glucose zu erhalten, für die es in den Zellmembranen Carrierenzyme (GLUT 1&3) gibt, wird die Glucose-6-Phosphatase benötigt, die die Dephosphorylierung von Glucose-6-Phosphat katalysiert. Die Glucose-6-Phosphatase kommt nur in Geweben vor, die Glucose ins Blut abgeben, also Leber, Niere und Darm. Ein Defekt dieses Enzyms führt zu der Glykogenspeicherkrankheit Typ I, Morbus von Gierke.

2.3.6.8 Phosphatbestimmung [Eibl et al. 1970]⁷⁴

Mess-Lösungen: Zur Phosphatbestimmung werden zwei Lösungen der Firma Serva benötigt, Lösung 1 und Lösung 2 zur Phosphatbestimmung.

Messung: Man versetzt 20µl Probe mit 480µl 1/10 verdünnter Lösung 1 und, für jede Probe nach exakt der gleichen Zeit, frühesten aber nach 10min bei Raumtemperatur, mit 50µl Lösung 2. Wiederum nach exakt gleicher Zeit für jede Probe, frühestens aber nach 20min bei Raumtemperatur, wird die Extinktion der Lösungen im Photometer bei 660nm gemessen.

Bemerkungen: Es handelt sich bei diesem Assay um eine allgemein angewendete, kommerziell erhältliche Methode, um geringste Mengen anorganischen Phosphates zu bestimmen. Der genaue Verlauf der Reaktion ist noch nicht eindeutig aufgeklärt. Im Prinzip handelt es sich aber um eine Komplexierung von Phosphat als Molybdatokomplex – Lösung 1 enthält Ammoniummolybdat –, welcher anschließend durch ein in Lösung 2 enthaltenes Reduktionsmittel reduziert wird. Da der reduzierte Komplex jedoch nicht wasserlöslich ist, kommt es zu einer Trübung, die bei 660nm Licht absorbiert. Beide Reaktionen laufen langsam und unvollständig ab. Folglich ist es für die Bestimmung wichtig, dass alle Proben, insbesondere aber die Probe und der zugehörige Blank, die gleiche Reaktionszeit erhalten.

2.3.6.9 β-Hexosaminidasen (lysosomales Leitenzym) [K.Sandhoff et al, 1977]⁷⁵

Substrat-Lösung: Die Substrat-Lösung enthält 50mM Natrium-Citrat-Puffer, pH 4,5, 0,25% Triton X-100 und 1mM 4-Methylumbelliferyl-2-acetamido-2-deoxy-B-D-glucosamid (4-Muf-Glc-NAc).

Stopp-Lösung: 0,2M Natriumcarbonat und 0,2M Glycin.

Reaktion: Es werden 10µl Fraktion, 90µl Wasser und 100µl Substrat-Lösung zusammenpipettiert, 15min bei 37°C inkubiert, anschließend mit 1ml Stopp-Lösung abgestoppt und mit Wasser 1:5 verdünnt.

Messung: Nach Zentrifugation wird die Fluoreszenz im Fluorimeter bei 440nm bestimmt.

Bemerkung und biologische Bedeutung: 4-Muf-Glc-NAc ist ein künstliches Substrat. 4-Methylumbilliferon, das freigesetzt wird, besitzt ein System leicht anregbarer, konjugierter Doppelbindungen, die es dem Molekül ermöglichen, zu fluoreszieren. Die Stärke der Fluoreszenz im Assay hängt von der Anzahl der abgespaltenen 4-Methylumbilliferon Moleküle ab.

Die β -Hexosaminidasen dienen dem Abbau von Gangliosiden, ein Defekt führt zu den Gangliosidosen. Dies sind Gangliosid-Speicherkrankheiten, die zu einer Anreicherung von Gangliosiden vornehmlich in der grauen Substanz des Gehirns führen, und mit Erblinden und Schwachsinn einhergehen (amaurotische Idiotie).

2.4 Mikrobiologische Arbeitstechniken

Soweit nicht anders beschrieben, sind die mikrobiologischen Methoden *Molecular Cloning* (Sambrook et al, 1989)⁷⁶ entnommen.

2.4.1 Sterilisationstechniken

2.4.1.1 Trockensterilisation

Glasgefäße, Pipetten und weitere Glasartikel werden für 4 h bei 160 °C im Heißluftschrank sterilisiert (Heraeus Trockenschrank Typ ST 5060).

2.4.1.2 Dampfsterilisation

Kunststoffgefäße, sowie Medien und Pufferlösungen werden für 20 min bei 121 °C und 1,1 bar autoklaviert (Sterico Vapoklav Dampfsterilisator).

2.4.1.3 Sterilfiltration

Kleine Volumina thermolabiler Substanzen werden mit Spritzenfiltern (Schleicher & Schuell, 0,22 μ m Porendurchmesser) filtriert.

2.5 Kulturmedien

2.5.1 Flüssigmedien

2.5.1.1 LB-Medium:

10 g/l Bacto-Trypton
5 g/l Yeast-Extract
10 g/l NaCl
pH 7,5, mit 1 M NaOH einstellen

2.5.1.2 SOC-Medium

(Hanahan, 1983⁷⁷)
20 g/l Bacto-Trypton
26,6 g/l Bacto-Yeast Extrakt
0,59 g/l NaCl
0,85 g/l KCl
1 Vol.% 2 M Glucose

Vor Verwendung des Mediums wird 1 Vol.% 1 M MgCl₂/1 M MgSO₄ zugesetzt.

Nach pH-Kontrolle werden die Medien autoklaviert.

2.5.2 Puffer

2.5.2.1 PBS

(Weast, 1986)
8,0 g/l NaCl
0,34 g/l KH₂PO₄
1,21 g/l K₂HPO₄
pH 7,3

2.5.2.2 10x Phosphatpuffer

(Sambrook, 1989)
0,17 M KH₂PO₄
0,72 M K₂HPO₄

2.5.2.3 TBS

(Weast, 1986)
 12,11 g/l Tris
 2,05 g/l NaCl
 0,75 g/l Glycin
 pH 7,5

2.5.2.4 5xTBE

(Weast, 1986)
 54 g/l Tris
 27 g/l Borat
 9,3 g/l EDTA

2.5.2.5 ELISA

Blockpuffer 3% BSA in PBS-T

Substrat-Puffer	0,1M	Glycin	0,75g	
	1mM	MgCl ₂	0,02g	
	1mM	ZnCl ₂	0,014g	ad 100 ml
	pH 10,4			

Coating-Puffer	100mM	NaHCO ₃	
	100mM	Na ₂ CO ₃	
	pH 9,5		

2.5.3 Festmedien

2.5.3.1 LB-Platten

15 g/l Agarose in LB-Medium werden autoklaviert. Nachdem die Agarose auf etwa 45 °C abgekühlt ist, werden ggf. Antibiotika mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt, gemischt und in Petrischalen verteilt. Nach Erstarren der Agarose werden die Platten bei RT getrocknet und anschließend bei 4 °C gelagert.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 cDNA-Bank

2.6.1.1 Uni-ZapTM XR Library (Stratagene)

Chinese Hamster Ovary Cells entstammen den Ovarien chinesischer Zwerghamster (*Cricetulus griseus*).

CHO-cDNA-Library in the Uni-ZAPTM XR Vector aus CHO-K1 Zellen, proliferierend und G₀-Phase. Unidirektional geklont.

Bakterienstämme: XL-1 Blue recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17(r_k⁻, m_k⁺), supE44, relA1, λ⁻, Δ(lac), {F', proAB, lacIqZΔM15, Tn10(tet[®])}

2.6.1.2 Amplifikation einer cDNA-Bank

Mit den Phagen, in welche die cDNA kloniert ist, wurden *Escherichia coli* infiziert, und diese bis zum Eintritt der Lyse inkubiert. Die Phagen wurden isoliert.

Transfektion: Zur Infektion von Bakterien nimmt man 1 ml Übernachtskultur *E. coli*-Bakterien vom XL-1B Stamm, versetzt diese mit 500 µl λ Phagen des Titors 4x10⁶ pfu, und inkubiert 15 min bei 37 °C.

Amplifikation: Die infizierten Bakterien gibt man in 40 ml LB-Medium und läßt die Kultur bei 37 °C wachsen, bis zum Eintritt der Lyse.

Präparation: Die Reinigung der Phagen und die Präparation ihrer DNA erfolgt mit dem NucleoBond[®] λDNA Purification Kit der Firma Clontech.

2.6.1.3 Titerbestimmung

Transfektion: Es wurden jeweils 200 µl Übernachtskultur XL-1B Bakterien mit Verdünnungen der amplifizierten Bank von 1:500, 1:250000 und 1:25x10⁶ infiziert und 15 min bei 37 °C inkubiert.

Ausplattieren: Man gibt die Kultur zu 4 ml Si-Agar, plattiert die Melange auf Agar-Platten aus und läßt den Agar abkühlen und sich festigen. Der Si-Agar sollte dabei ungefähr eine Temperatur von 40 °C haben, damit er noch flüssig ist, und andererseits nicht die Bakterien mit zu hohen Temperaturen abtötet.

Inkubation: Man läßt die Platten bei 37 °C inkubieren.

In dem Si-Agar bildet sich ein konfluenter Bakterienrasen aus, der einzelne phageninfizierte Bakterien enthält. Tritt ein infiziertes Bakterium dann in den lytischen Zyklus ein, infizieren die freigesetzten Phagen die Nachbarbakterien usw. In dem Agar erkennt man die Orte der Lyse an einer kreisförmigen Aufhellung.

Titerbestimmung: Es werden die plaque forming units (pfu) gezählt, und mit der eingesetzten Verdünnung verrechnet.

2.6.2 Oligonucleotide

Tabelle 2-4: Für die Klonierung verwendete Oligonucleotide

M13 for	5'>gTA-AAA-CgA-Cgg-CCA-gT<3'
M13 rev	5'>ggA-AAC-AgC-TAT-gAC-CAT-g<3'
T 7	5'>TAA-TAC-gAC-TCA-CTA-TAg-gg<3'
D4 R	5'>gCA-gTA-TCT-gAA-gAg-CTC-CT<3'
D3 F	5'>Agg-AgC-TCT-TCA-gAT-ACT-gC<3'
D7 F	5'>ACC-CTg-gAA-CAg-AgA-AAA<3'
D10 R	5'>CCT-ggg-AgC-ACA-ACC-AgA<3'
D11 F	5'>ACC-gCC-ATg-gAg-CAC-gTT<3'

Alle Oligonucleotide wurden per Internet bei der Firma Carl Roth bestellt und als 100 pmol/µl Stammlösung in sterilem Wasser gelöst. Für Polymerase Ketten Reaktionen wurde eine 1:10 Verdünnung eingesetzt.

2.6.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Innis, 1990)

Thermozykler: Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400

10x PCR-Puffer: 100 mM Tris/HCl pH 9,0, 500 mM KCl, 15 mM Mg Cl₂, 1 % Triton X-100, 2 mg/ml BSA

PCR-Ansatz:

Tabelle 2-5: Pipettierschema für PCR

Template	2µl
5'-und 3'-Primer, 10µM	je 2µl
dNTP, 2mM	4µl
PCR-Puffer, 10fach	3µl
Wasser	auf 30µl
Taq-Polymerase	0,5 U

Der PCR-Ansatz wird in einem 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammengegeben und nach unten aufgeführtem Programm inkubiert. Variationen werden an entsprechenden Stellen gesondert angegeben.

PCR-Programm:

Tabelle 2-6: Protokoll für PCR

	32 Zyklen			
Denaturierung	Schmelzen	Annealing	Elongation	4°C
94°C	94°C	53°C	72°C	
5min	30sec	45sec	45sec	7min

2.6.4 Reinigung, Fällung und Trocknung von DNA

Die DNA-Lösung wird mit 1/10 Vol. 2 M NaOAc pH 5,5 (Salzkonzentration von ca. 0,2 M) und mit 2,5 Vol EtOH gemischt und bis zur vollständigen Fällung der DNA für 30 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugieren (15 min, 20000 g) wird das Pellet mit einer geeigneten Menge 70 %-igem Ethanol gewaschen und kurz bei 37 °C getrocknet. Die DNA sollte hierbei nicht vollständig eintrocknen. Anschließend wird die DNA in einem geeigneten Puffer (TE-Puffer oder in ddH₂O) gelöst.

Zur Entfernung von Nukleotiden oder kurzer ssDNA wird die Salzkonzentration mit 4 M NH₄OAc auf 2 M eingestellt und die DNA, wie oben beschrieben gefällt.

2.6.5 Konzentrationsbestimmungen von Nucleinsäuren

(Warburg, 1994)

Die Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren erfolgte photometrisch durch Aufnahme eines Absorptionsspektrums im Bereich von 240-320 (Kontron Uvikon 930 Spektrophotometer). Nach dem Lambert-Beer'schen-Gesetz ist die Extinktion zur Konzentration der absorbierenden Verbindung direkt proportional, so daß sich bei einer Schichtdicke von 1 cm und einer Extinktion von 1,0 am Absorptionsmaximum von 258 nm folgende Nucleinsäurekonzentrationen ergeben:

Tabelle 2-7: Photometrisch bestimmte Nucleinsäurekonzentrationen bei E_{358}

Nucleinsäure	Konzentration
dsDNA:	50 $\mu\text{g/ml}$
ssDNA:	33 $\mu\text{g/ml}$
Oligonucleotide:	20 $\mu\text{g/ml}$

2.6.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese (Herrmann, R.G. et al., 1980) dient der analytischen oder präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten.

Laufpuffer: 0,5x TBE-Puffer

EtBr: 5 mg/ml Ethidiumbromid

Agarose-Gel: 0,7-2 % Agarose in 0,5xTBE mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$

Die Agarose-Konzentration wurde entsprechend der Länge der aufzutrennenden DNA Fragmente gewählt.

Tabelle 2-8: Für die Gelelektrophorese verwendete Agarose-Konzentrationen

Länge der DNA-Fragmente	Agarose-Konzentration
-------------------------	-----------------------

0,4 - 7 kbp	1,0 %
0,2 - 4 kbp	1,5 %
0,1 - 3 kbp	2,0 %

Die Agarose wurde in 1x TBE-Laufpuffer aufgekocht und bei 55°C aufbewahrt. Vor Verwendung wird die Agaroselösung mit 1/1000 Vol. EtBr versetzt und in einen horizontalen Gelschlitten gegossen. Die Probentaschen wurden durch Einsetzen eines Kammes in die noch flüssige Agarose geformt. Nach Aushärtung der Agarose wird der Gelschlitten in eine mit 1x TBE-Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 1/6 Vol. 6x Ladepuffer (Sigma) versetzt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt bei 100 V. Im UV-Licht wird das in die DNA interkalierte EtBr sichtbar und kann zur Dokumentation fotografiert werden. Im Falle eines präparativen Gels, wurde die interessierende Bande mit dem Skalpell ausgeschnitten und die DNA anschließend aus dem Gelstück eluiert wie unter 2.6.8 beschrieben.

2.6.7 DNA-Größenstandards

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wurden zur Abschätzung von Größe und Menge der zu analysierenden DNA folgende DNA-Standards der Firma MBI Fermentas eingesetzt.

Folgende DNA-Molekulargewichtsmarker von MBI Fermentas wurden verwendet:

HMS: λ -Phagen-DNA/*Eco*RI mit *Hind*III geschnitten (0,5 mg DNA/ml)

LMS: pBr322-Plasmid-DNA *A*1uI geschnitten (0,5 mg DNA/ml)

DNA-Leiter: Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (0,5 mg DNA/ml)

Tabelle 2-9: Molekulargewichtsmarker

HMS [bp]	LMS [bp]	DNA-Leiter [bp]
21226	910	1000

5148/4973	656/643	900
4268	521	800
3530	403	700
2027/1904	281/257/226	600
1584	100/90/63	500
1375	57/49/46	400
947		300
831		200
564		100
125		80

2.6.8 Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Für die Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde das System *Qiaquick Gel Extraction Kit* (QIAgen) eingesetzt. Das Verfahren beruht auf der Bindung von DNA an Silicagel-Partikel und Reinigung dieser Komplexe mit ethanolischer Lösung, die Elution erfolgt durch einen geeigneten Puffer (z.B. TE-Puffer). Um das gewünschte DNA-Fragment zu isolieren, wird das aus einem präparativen Agarose-Gel ausgeschnittene Gelstück mit 3 Vol. QG-Puffer bei 50 °C aufgelöst (ca. 10 min). Die DNA wird mit 1 Vol. Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation von 1 min bei 14000 rpm an *QIAquick spin columns* gebunden. Zur Entfernung von Agarose und Salzen wird mit 500 µl QG-Puffer und 750 µl PE-Puffer gewaschen. Die Elution der DNA erfolgt mit 30 –50 µl ddH₂O und kann dann ohne weitere Reinigungsschritte direkt für weitere Klonierungen verwendet werden.

2.6.9 Klonierung mit TA Cloning® Kit (Invitrogen)

(Clark, 1988)

2.6.9.1 Ligation

Ansatz:

- 1 µl PCR-Produkt, gereinigt
- 1 µl 10x Ligationspuffer
- 2 µl Vektor C, PCR 2.1 (25 µg/µl)

1 μl T₄-DNA-Ligase (4 U/ μl)
5 μl H₂O

Das PCR-Produkt wird 4-18 h bei 14 °C ligiert und danach kurzfristig auf Eis gestellt. Das nicht benötigte Ligationsprodukt kann bei -20 °C gelagert werden.

2.6.9.2 Transformation

Ansatz: 1 Vial kompetenter Zellen, 2 μl 0,5 M β -Mercaptoethanol, 2 μl Ligationsprodukt werden vereinigt und 30 min bei 0 °C inkubiert.

Hitzeschock: Der Ansatz wird für 30 sec auf 42 °C erhitzt und anschließend sofort wieder 2 min auf Eis abgekühlt.

SOC-Medium: Es werden 450 μl SOC zu den Bakterien gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert.

Ausplattieren: 50-200 μl Bakteriensuspension werden auf LB/Amp-Platten (mit 40 μl x-Gal (40 mg/ml) zur Farbselektion) ausgestrichen und ca. 18 h bei 37 °C inkubiert, bis die Bildung von Bakterienkolonien zu erkennen ist.

Farbentwicklung: Die Platten werden 1-2 h bei 4 °C gelagert.

Selektion: je 10 positive (weiße) Klone werden gepickt und in LB/Amp-Medium bei 37 °C wachsen gelassen.

2.6.10 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

(Sambrock et al., 1989).

Für analytische Kontrollschnitte von Plasmid-DNA wurden Restriktionsverdau durchgeführt. Hierfür wurden die von den Herstellern empfohlenen Reaktionsbedingungen und die mitgelieferten 10x Reaktionspuffer verwendet.

Ansatz: Für einen Restriktionsverdau wurden 9 μl Plasmid-Lösung mit 1 μl 10x Restriktionspuffer und 0,2 μl EcoR I (MBI Fermentas) versetzt.

Inkubation: 1-3 Stunden bei 37°C.

Analyse: Zu dem Ansatz wurde Ladebuffer (Sigma) gegeben und anschließend 10 μl zur elektrophoretischen Trennung auf ein 1%-iges Agarose Gel aufgetragen (s.o.).

2.6.11 Plasmidpräparation

2.6.11.1 Plasmid-Minipräparation

(Sambrook, 1989⁷⁸)

Bakteriolyse: 1,5ml Kultur werden pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 350µl STET und 25µl Lysozym resuspendieren und die Bakterien 40sec bei 100°C lysiert. Anschließend wird 10min mit einer Tischzentrifuge bei maximaler Drehzahl zentrifugiert.

Plasmidfällung: 270µl des klaren Überstandes werden mit 30µl 2,5M NaOAc pH 5,0 und 300µl Isopropanol versetzt und 5min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die ausgefällte Plasmid-DNA muss durch 5minütiges Zentrifugieren pelletiert werden, der Überstand wird verworfen.

Waschen: Um die DNA von überschüssigen Salzen zu reinigen, wird mit 0,5ml tiefkühlfach kaltem 70%igem Ethanol gewaschen, ohne die DNA von der Eppendorf-Cap Wand zu lösen. Das Ethanol wird ebenfalls verworfen, und die DNA 20min bei Raumtemperatur getrocknet.

Resuspendieren: Die Plasmide werden in 50µl sterilem Wasser gelöst und eingefroren.

Wenn die Plasmide zur Sequenzierung herangezogen werden sollten, wurden sie wegen der höheren Reinheit und Ausbeute mit einem Miniprep Kit der Firma Qiagen (QIAprep Spin) präpariert.

2.6.11.2 Plasmidpräparation mit Qiaprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)

Resuspension: Das Pellet von 1-5 ml ÜNK von E.coli in LB-Medium wird in 250 µl Resuspensionspuffer P1 mit RNase A aufgenommen und in 2,0 ml Eppendorffgefäße überführt.

Lyse: Der Lyse der Zellen mit 250 µl Lysepuffer P2 (5x invertieren) folgt die Neutralisation mit 250 µl Neutralisationspuffer N3 (5x invertieren), danach wird 10 min mit 14000 rpm zentrifugiert.

DNA-Bindung: Der Überstand wird auf QIAGEN spin columns aufgetragen und die DNA an die Silica-Gelmatrix gebunden (14000 rpm, 60 sec)

Waschen: Das Eluat wird verworfen und die Säulchen werden zuerst mit 500 µl Puffer PB und danach mit 750 µl Puffer PE gewaschen.

Delution: Die Säulchen werden in neue Eppendorffgefäße überführt, 1 min mit 30-50 µl ddH₂O stehengelassen und im Anschluss daran 2 min mit 14000 rpm zentrifugiert..

2.6.12 Automatisierte DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von Herrn Wolfgang Hädelt an einem DNA-Sequenzer der Firma Applied Biosystems (Modell 373A) nach Angaben des Herstellers und von SEQLAB (Sequence Laboratories, Göttingen), durchgeführt.

Die Didesoxy-Sequenzierung nach Sanger beruht auf dem basenspezifischen Abbruch der DNA-Kettenverlängerung durch den statistischen Einbau von Farbstoff beladenen ddNTPs in die von den Primern her anwachsende Kette.

Es werden hierzu vier voneinander unabhängige Reaktionen durchgeführt, die neben gleichem Template, Primer und dNTPs jeweils verschiedene kettenabbrechende ddNTPs enthalten. Durch den statistischen Einbau der ddNTPs in die sich verlängernden Fragmente kommt es zu einem Kettenabbruch. Nach Abschluß der Polymerase-Reaktion werden die Produkte vereinigt, nach Fällung mit Ethanol im Formamid/50 mM EDTA, pH 8,0 (5:1) aufgenommen und anschließend auf einem 7%-igem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die einzelnen DNA-Fragmente können aufgrund ihrer unterschiedlichen Fluoreszenz im Argon-Laserstrahl detektiert werden. Unter Berücksichtigung der Molekulargewichte der einzelnen Fragmente kann schließlich ihre Basensequenz bestimmt werden.

2.7 Immunchemische Methoden

2.7.1 Antikörperherstellung (Kaninchen-anti-Hamster-Phytanoyl-CoA-Hydroxylase-Antikörper)

Peptid-Spezifische Antikörper werden durch Immunisierung mit Cys-haltigen Peptiden, gekoppelt an Keyhole limpet hemocyanin (KLH) oder Rinder-Serum-Albumin (BSA), gewonnen. Man addiert für die Dauer einer Stunde an 10mg Trägerprotein (in 1ml 10mM Phosphat-Puffer, pH 7.4), 2mg m-Maleimidobenzoyl N-Succimidester (MBS; in 0,1ml Dimethylformamid). Der so aktivierte Carrier wird über eine 1*5cm Sephadex G-25 Säule, in 50mM Phosphat-Puffer pH 7, getrennt und zu 10mg reduziertem Peptid gegeben. Nach 3 Stunden werden 10mg 1-ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (EDCI) zugegeben, erneut auf pH 7 eingestellt und eine weitere Stunde reagieren gelassen. Dieser

Schritt soll Thioether-Bindungen der Peptide untereinander verhindern. Anschließend wird die Mischung gegen Phosphat gepufferte Saline (PBS) pH 7.2, dialysiert.

New Zealand White rabbits werden durch mehrfache intradermale oder subcutane Injektionen mit einer Gesamtmenge von 300-500µg Peptid-Trägerprotein immunisiert. Booster werden nach 3 und 5 Wochen mit inkompletem Freund's adjuvans injiziert. Zu Kontroll- und Dokumentationszwecken werden vor der Impfung und 10 Tage nach den Booster-Injektionen Blutproben entnommen. Serum wird bei -20°C gelagert.

2.7.2 Elisa

Coating mit Antigen: Auf einer Mikrotiterplatte werden die Wells über Nacht bei 37°C mit je 100µl einer Antigen Coating -Puffer Lösung inkubiert. Die Antigenmenge richtet sich nach dem eingesetzten Antigen. Für das Beschichten der Platte wird ein Coating-Puffer pH 9.6 gewählt.

Peptide als Antigen werden in einer Konzentration von 250ng/100µl eingesetzt.

Waschen: Nach ausschleudern der Lösung werden die Wells je vier mal mit PBS-T gewaschen. Die gewaschene Platte wird gründlich auf Küchenkrepp ausgeklopft.

Blockieren der freien Bindungsstellen: Die Wells werden 60min bei Raumtemperatur auf der Wippe mit je 200µl einer 3%igen Blockpuffer-Lösung (30mg BSA/ml PBS-T) abgesättigt.

Waschen (s.o.)

Primärantikörper: Die IgY-Lösung wird in Zweifach-Verdünnungen bis 1/64 der Ausgangskonzentration pipettiert (100µl/Well). Alle Lösungen und Verdünnungen werden in Blockpuffer angesetzt.

Die Ausgangskonzentration für Peptidantikörper beträgt 10µg/100µl (1,1µM).

Die Mikrotiterplatten werden zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

Waschen (s.o.)

Sekundärantikörper-Enzym-Konjugat: In jedes Well werden 100µl der Sekundärantikörper-Lösung in Blockpuffer pipettiert und 1h bei 37°C inkubiert. Für Anti-Rabbit-IgG alkalische Phosphatase-Konjugat wurde eine Verdünnung von 1:500 gewählt.

Waschen (s.o.)

Farbreaktion: Eine 20mg p-Nitrophenylphosphat-Tablette wird in 20ml Glycin-Puffer gelöst. Davon werden je 100µl pro Well pipettiert und 60min bei 37°C inkubiert.

Messung der optischen Dichte: Die Extinktionsmessung im ELISA-Reader erfolgt bei 405nm.

In einigen, besonders gekennzeichneten Fällen, wurden Proben auf ihren Antikörpergehalt hin untersucht. Hierzu wurden Aliquots mit Coating-Buffer über Nacht bei 37°C auf einer Mikrotiterplatte inkubiert. Nach Waschen und Blockieren der freien Bindungsstellen (wie oben beschrieben), konnten die Antikörper mit dem Sekundäntikörper detektiert werden (s.o.).

2.7.3 Immunchemischer Antigennachweis nach Elektrotransfer

Das transferierte Antigen wird in zwei Stufen nachgewiesen, wobei der mit dem Indikatorenzym gekoppelte zweite Antikörper über einen antigen-spezifischen ersten Antikörper mit dem Antigen reagiert. Als Indikatorenzym wird die alkalische Phosphatase verwendet.

Primäntikörper: Kaninchen, Anti-Hamster-Phytanoyl-CoA-Hydroxylase-Antikörper
1:10000 in 3 % BSA/TBS, 0,3 % Tween

Sekundäntikörper: Ziege, Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper, ALP gekoppelt in 3 %
BSA/TBS, 0,3 % Tween.

Durchführung siehe 2.3.3.3.

2.7.4 Trennung von Immunkomplexen

Die Peptid-Antikörper-Komplexe werden über einen Ultrafilter (His•Bind® Kit, Fa Novagen, Darmstadt) eingengt. Durch Zentrifugation werden Lösungsmittel und Peptide von den Antikörpern abgetrennt. Die Trennung wurde mit chaotropen Reagenzien, sowie im sauren und alkalischen Milieu versucht.

Eingesetzt werden 500µl einer Immunkomplex-Lösung. Der Antikörper-Gehalt wird zuvor in einem ELISA geschätzt.

Imidazol: Zu den eingengten Antikörpern auf dem Ultrafilter werden 100µl 1M Imidazol (Elution-Buffer His•Bind® Kit) gegeben. 15min bei RT inkubation, dann zentrifugieren, 1200g 10min. Das Zentrifugat wird zur Untersuchung des Peptid-Gehalts gesichert.

Waschen: 500µl 50mM Phosphat-Puffer pH 7,5, zentrifugieren.

Aufnehmen: Die Antikörper werden in 200µl Phosphat-Puffer aufgenommen, davon werden 40µl zur weiteren Analyse entnommen. Der Rest wird erneut eingengt, das Zentrifugat gesichert.

Citrat: Die Antikörper werden in 100µl 0,1 M Citrat-Puffer pH 1,8 aufgenommen, und 15 min bei RT inkubiert, anschließend zentrifugiert. Das Zentrifugat wird gesichert.

Waschen: 500µl Phosphat-Puffer

Aufnehmen: 200µl Phosphat-Puffer, 50µl werden zur Analyse der Antikörper entnommen, der Rest wird eingengt.

Diethylamin: Die eingengten Antikörper werden in 100µl 0,1M Diethylamin pH 11,7 aufgenommen, 15 min bei RT inkubiert, dann zentrifugiert. Das Zentrifugat wird gesichert.

Waschen: 500µl Phosphat-Puffer

Aufnehmen: Die Antikörper werden in 200µl Phosphat-Puffer aufgenommen, 100µl werden zur weiteren Analyse entnommen, der Rest eingengt.

Rodanid: Die verbleibenden Antikörper werden in 100µl 3M NaSCN aufgenommen, 15 min bei RT inkubiert, dann zentrifugiert.

Waschen: 500µl Phosphat-Puffer, zentrifugieren.

Aufnehmen: Die Antikörper werden in 100µl Phosphat-Puffer aufgenommen, und zur Analyse verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Versuche zur enzymatischen Messung der Phytanoyl-CoA-Hydroxylase

3.1.1 Substrate

Als Substrate für die Versuche wurden sowohl die freie Phytansäure als auch der aktivierte Thioester, Phytanoyl-CoA, eingesetzt. Der Thioester wurde durch eine Synthese mit tritiummarkierter Phytansäure gewonnen, während letztere in der Arbeitsgruppe zur Verfügung stand.

Die radioaktive Markierung beider Substrate mit Tritium in 2- und 3-Stellung ermöglichte eine einfache und spezifische Detektion der Substrate, wie auch der Produkte, da das ^3H -Atom in 3-Stellung von Phytansäure bzw. Phytanoyl-CoA auch nach der Hydroxylierung in α -Stellung erhalten bleibt. Das α - ^3H -Atom hingegen wird auf Wasser übertragen.

3.1.1.1 Phytansäure

In der Arbeitsgruppe stand $[2,3]\text{-}^3\text{H}$ -Phytansäure zur Verfügung, die durch Hydrierung der α,β -ungesättigten Vorstufe Phytensäure mit $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ hergestellt worden war. Bei der Synthese entstand ein Gemisch aus 2(R/S) und 3(R/S) Derivaten, das eine spezifische Aktivität von 1.67×10^3 Ci/mol aufwies.

In Anlehnung an Tanford, 1980⁷⁹ wurden verschiedene Methoden zur Solubilisierung von Phytansäure getestet. Bei der Bindung an Albumin wurden 22% der eingesetzten markierten Fettsäuren gelöst, durch die Mizellenbildung mit Ölsäure wurden nur 21,4% solubilisiert. Allein nach Ummantelung mit β -Cyclodextrin fanden sich 44% der eingesetzten markierten Fettsäuren in Lösung wieder.

3.1.1.2 Phytanoyl-CoA

$[2,3]\text{-}^3\text{H}$ -Phytansäure wurde nach einer Methode von Rasmussen et al.⁸⁰ über das Zwischenprodukt Acyl-Kohlensäureethylesteranhydrid mit Li_3CoA zum Thioester umgesetzt. Nach Trennung über Silicatgel Rp-18 und Elution mit einem MeOH/H₂O-

Stufengradienten, wurden die Thioester mit einem Laufmittel aus Propanol/Wasser (7:3) dünnschichtchromatographisch auf Reinheit geprüft.

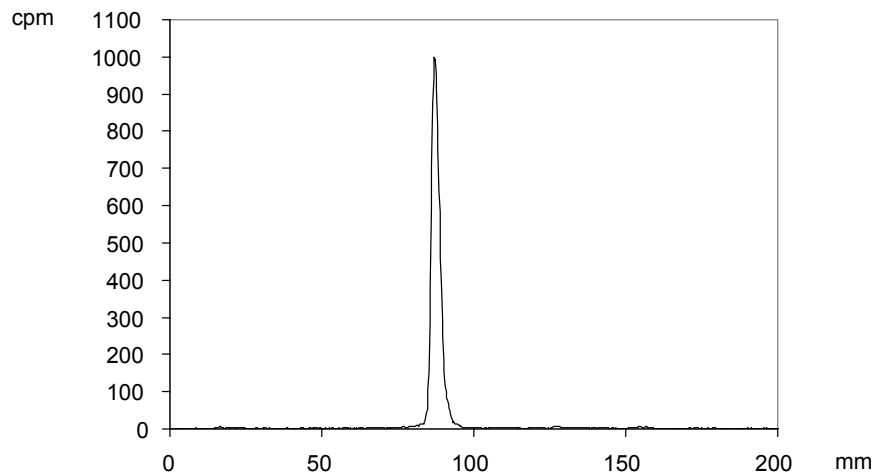


Abbildung 3-1: Dünnschichtchromatographische Darstellung der Reinheit des synthetisierten Phytanoyl-CoA

Die Synthese ergab folgende Ausbeute:

eingesetzt: 1.120×10^6 cpm Phytansäure

vereinigte Fraktionen: 130×10^6 cpm.

Die CoA-Ester wurden in Wasser zu einer Stammlösung aufgenommen, die eine Aktivität von 50×10^6 cpm/ml besaß.

3.1.2 Messung der Phytanoyl-CoA Hydroxylase

Während in der Literatur⁶⁸ eine Messung der Reaktion durch den Nachweis von Edukt und Produkt nach einer Trennung durch HPLC beschrieben wurde, sollte in der vorliegenden Arbeit eine Methode etabliert werden, die zeitlich und technisch weniger aufwendig und somit für Reihenuntersuchungen geeigneter ist. Hier bietet sich eine dünnschichtchromatographische Trennung mit anschließendem Nachweis im Radio-Dünnschicht-Scanner an.

3.1.2.1 Dünnschichtchromatographie und Analyse

Eine dünnschichtchromatographische Trennung der Thioester stellt sich aufgrund ihrer ähnlichen Hydrophilie als schwierig dar, eine Trennung von freier Phytansäure und ihrem α -Hydroxy-Derivat hingegen ist einfach durchführbar. Da durch Hydrolasen in der Enzymquelle ein Teil der Ester ohnehin schon hydrolysiert ist, bietet sich an, das Substrat/Produkt-Gemisch unter schonenden Bedingungen mit 1N NaOH 30 min (80°C) vollständig zu hydrolysieren, und, nach Ansäuern mit konzentrierter HCL, die Fettsäuren mit Ethylester zu extrahieren. Als feste Phase zur dünnschichtchromatographischen Trennung wurde Kieselgel 60 auf Glasplatten verwendet, auf welche der Fettsäure-Extrakt des Reaktionsansatzes aufgetragen wurde.

Eine gute Trennung der langkettigen, methylverzweigten Fettsäure und ihres in α -Stellung hydroxylierten Reaktionsproduktes wurde mit einem Laufmittelgemisch aus Hexan/ Essigsäureethylester/ Essigsäure (50/10/1) erreicht.

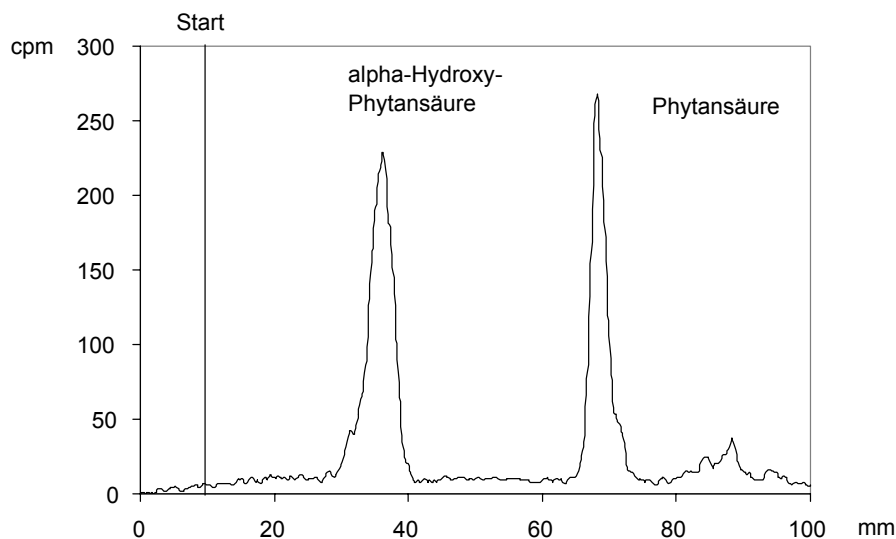


Abbildung 3-2: Dünnschichtchromatographische Trennung von Phytansäure und alpha-Hydroxyphytansäure

Wegen der nur etwa 40%igen Solubilisierung der Phytansäure mussten etwa 10.000 cpm pro Ansatz eingesetzt werden, um auch bei geringen Umsatzraten in der anschließenden Analyse der Reaktion im Riodünnschicht-Scanner einen Produktpeak über der Nachweisgrenze zu erhalten.

3.1.2.2 Etablieren des Assays

In Anlehnung an Mihalik et al.⁶⁸ wurde die Enzymquelle in einem Reaktionsgemisch aus 5 mM MgCl₂, 0,2 mM CoA, 10 mM ATP, sowie je 1 mM Fe²⁺, α-Ketoglutarat und Ascorbinsäure und 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, gelöst, und mit in β-Cyclodextrin solubilisierter [³H]-Phytansäure versetzt. Im Gegensatz zu den von Mihalik et al. eingesetzten Peroxisomen wurde hier als Enzymquelle Postnukleärer Überstand eines Rattenleberhomogenates verwendet. Bevor die Gewebefraktion zu dem Ansatz gegeben wurden, musste letzterer mit KOH auf pH 7,5 eingestellt werden. Das Reaktionsvolumen betrug 100 µl. Die Inkubation erfolgte 60 min bei 37°C im Wasserbad unter ständiger Bewegung. Die Reaktion wurde mit 200 µl 1 M NaOH gestoppt und 30 min (80°C) hydrolysiert. Um die freien Säuren mit Ethylester extrahieren zu können, mussten die alkalischen Ansätze mit konzentrierter HCl auf pH 1-3 eingestellt werden. Der Nachweis der Reaktionsprodukte erfolgte wie oben beschrieben.

Es zeigt sich in der Analyse, daß unter diesen Bedingungen eine Reaktion ablaufen konnte. Ausgehend hiervon wurden die Reaktionsbedingungen für eine Messung im Homogenat optimiert.

3.1.2.3 Optimierung des Assays

Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden Enzym- und Zeitabhängigkeiten gemessen.

Es kann beobachtet werden, daß in Ansätzen mit größeren Homogenatmengen die Umsätze wieder niedriger werden. Das ist wahrscheinlich darauf zurück zu führen, daß dort die ebenfalls höheren Mengen an Membranen das Substrat aufnehmen und letzteres nicht mehr von der Hydroxylase erfasst werden kann. Da bei Inkubation von mehr als 30 min nur wenig mehr Umsatz gemessen werden konnte (siehe Abbildung 3-4), wurden bei allen weiteren Versuchen 30 min als Inkubationszeit gewählt. Desweiteren zeigte sich, daß bei PNÜ als Enzymquelle mit 45 µg Protein die besten Ergebnisse erzielt wurden.

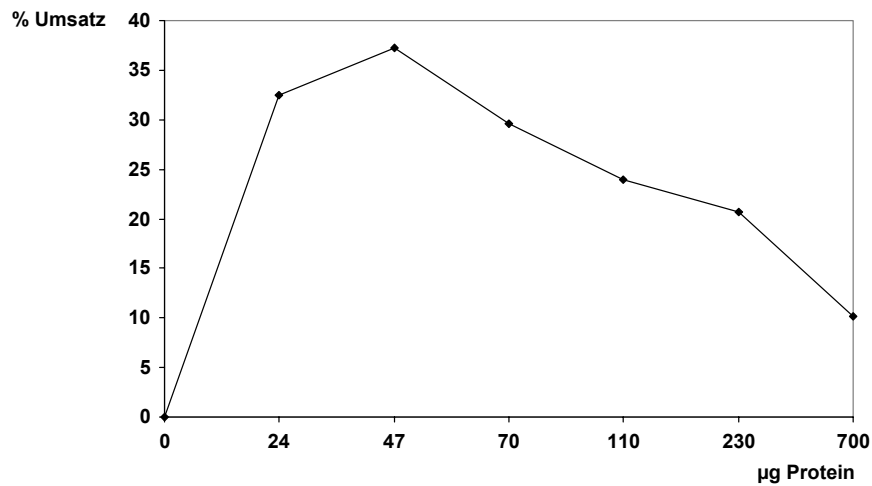


Abbildung 3-3: Proteinabhängigkeit der Hydroxylierung von Phytanoyl-CoA. 20

nmol $[2,3]\text{-}^3\text{H}$ -Phytanoyl-CoA wurden mit den angegebenen Proteinmengen an postnukleärem Überstand aus Rattenleberhomogenat 30 min unter den im Text angegebenen Standardbedingungen inkubiert. Die Quantifizierung des Umsatzes erfolgte durch DC der extrahierten Fettsäuren wie unter Material und Methoden angegeben.

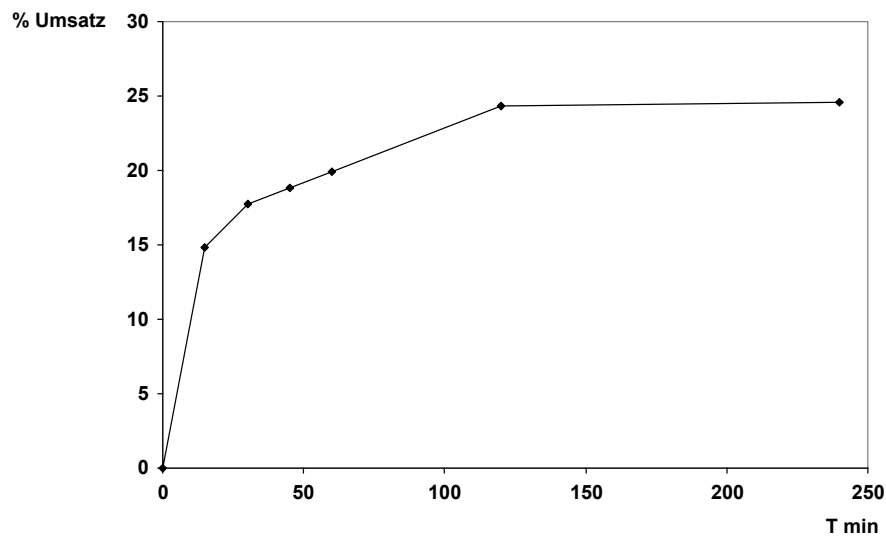


Abbildung 3-4: Zeitabhängigkeit der Hydroxylierung von Phytanoyl-CoA. 20 nmol

$[2,3]\text{-}^3\text{H}$ -Phytanoyl-CoA wurden mit 45 µg Protein in Form eines postnukleären Überstandes aus Rattenleberhomogenat entsprechend den angegebenen Zeiten unter den im Text beschriebenen Standardbedingungen inkubiert. Die Quantifizierung des Umsatzes erfolgte durch DC der extrahierten Fettsäuren wie unter Material und Methoden angegeben.

3.1.2.4 Gaschromatographische Analyse des Produktes

Zum unabhängigen Nachweis, daß bei der Reaktion Hydroxyphytansäure gebildet wird, wurde eine gaschromatographische Analyse der Reaktionsprodukte durchgeführt. Hierzu wurden die Analyten mit methanolischer HCl zu Methylestern umgesetzt, und anschließend die OH-Gruppen mit TMS-Chlorid silyliert. Die Trennung erfolgte über eine 15m OV 1701 Säule bei 150-240°C (Temperaturanstieg von 2,5°C/min) und einem Trägergas Durchfluss von 40 ml/min. Detektiert wurde mittels Flammenionisationsdetektor (FID) und Riodurchflußdetektor (Raga).

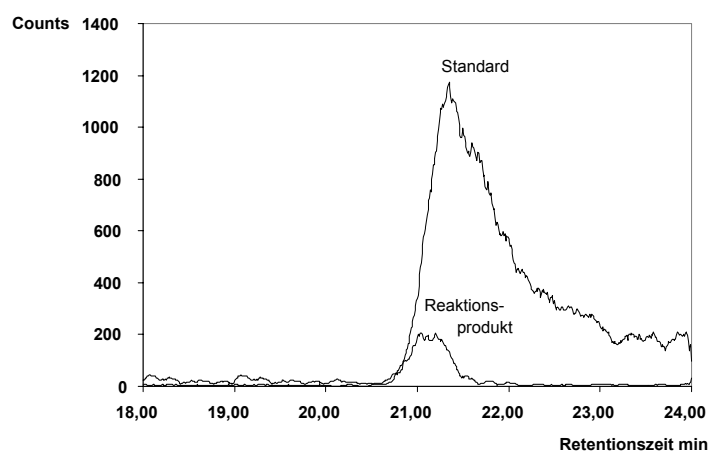


Abbildung 3-5: Gaschromatographische Überprüfung des Reaktionsproduktes.

Nach Silylierung der zu Methylestern umgesetzten Analyten eines unter Standardbedingungen inkubierten 10x Ansatzes erfolgte eine Trennung über eine 15 m OV 1701 Säule bei 150-250 °C (s. Text). Durch den Vergleich mit einem Standard konnte unabhängig gezeigt werden, daß es sich bei dem Reaktionsprodukt um α -Hydroxy-Phytansäure handelt.

Wie die Abbildung 3-5 zeigt, stimmen die Retentionszeiten von Standard und Probe überein. Hiermit konnte gezeigt werden, daß der radioaktive Produkt-Peak, der bei der dünn-schichtchromatographischen Trennung beobachtet wurde, tatsächlich von markierter Hydroxyphytansäure hervorgerufen wurde.

3.1.2.5 Untersuchung zur Substrataffinität der Hydroxylase

Zu dem Zeitpunkt, als diese Arbeiten begonnen wurden, war noch nicht klar, ob freie Phytansäure oder Phytanoyl-CoA das Substrat der Hydroxylase ist. Um dies zu unterscheiden, wurden beide Substrate parallel je 15, 30, 45, 60, 120 und 240 min mit Enzymquelle und Cofaktoren inkubiert.

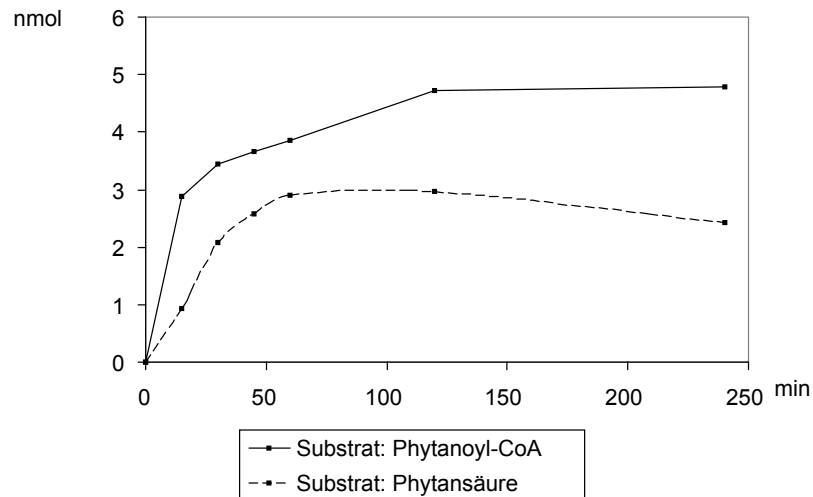


Abbildung 3-6: Umsetzung von Phytansäure und ihrem Thioester im Vergleich.

Parallel wurden 20 nmol [2,3]-³H-Phytanoyl-CoA bzw freie [2,3]-³H-Phytansäure wurden mit 45 µg Protein in Form eines postnukleärem Überstandes aus Rattenleberhomogenat je 15, 30, 45, 60, 120 und 240 min unter den im Text beschriebenen Standardbedingungen inkubiert. Die Quantifizierung des Umsatzes erfolgte durch DC der extrahierten Fettsäuren wie unter Material und Methoden angegeben.

Mit dem CoA-Ester wurden deutlich höhere Umsätze erzielt (Abbildung 3-6), offensichtlich muss also die freie Säure erst aktiviert werden (die nötigen Cofaktoren waren im Ansatz zugegeben), das eigentliche Substrat ist also Phytanoyl-CoA. Die Arbeitsgruppen von Mihalik et al. (1997)⁸¹ und Jansen et al. (1997)⁸² haben zeitgleich das Enzym gereinigt und ebenfalls als Phytanoyl-CoA-Hydroxylase charakterisiert.

3.1.2.6 Subzelluläre Fraktionierung

Um die subzelluläre Lokalisation der Phytanoyl-CoA-Hydroxylase genauer zu untersuchen, musste Rattenlebergewebe unter schonenden Bedingungen aufgebrochen, und die Zellkompartimente von einander getrennt werden. Insbesondere war auf eine saubere Unterscheidbarkeit zwischen mitochondrialen und peroxisomalen Fraktionen zu achten. Nach einem von W. Schmitz (1994)⁸³ verfeinerten Verfahren wurde Rattenleber nach Homogenisation im Potter-Elvehjem-Homogenisator 3 min mit 400×g zentrifugiert, um Bindegewebe, Kerne und größere Gewebstücke abzutrennen. Der Überstand wurde auf einen 35%-56% Succrose-Dichtegradienten aufgetragen, und mit 69000×g 3 h (4° C) zentrifugiert. Das Zentrifugenröhrchen wurde von unten angestochen, und der Inhalt in Fraktionen à 1,5 ml gesammelt. Die Zuordnung der Fraktionen zu bestimmten Organellen erfolgte durch die Bestimmung von Leitenzymen (Tabelle 3-1).

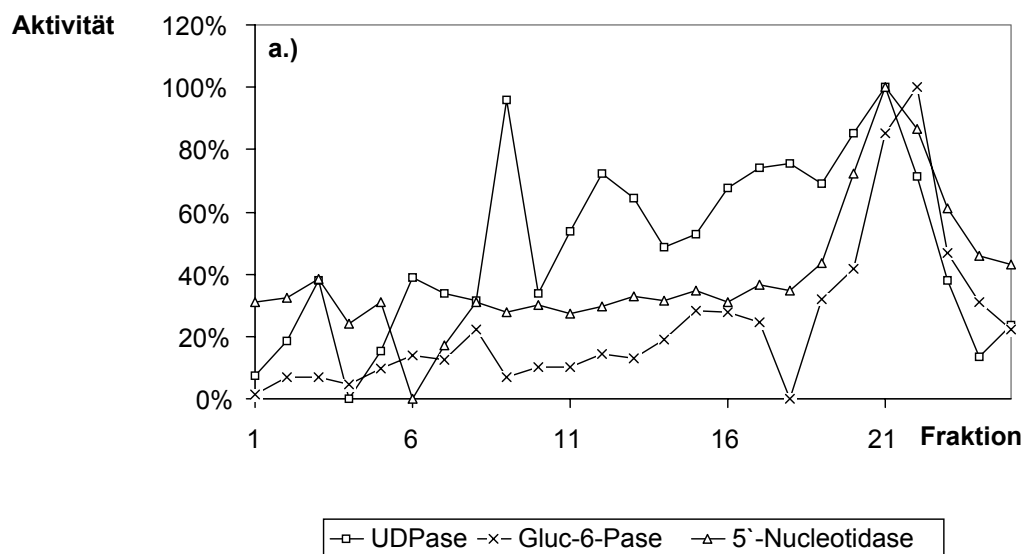
Die peroxisomalen Fraktionen wurden durch die Messung der Katalase erkannt. Diese kommt zwar auch im Cytosol vor, da aber unter den gewählten Bedingungen eine gute Trennung von Cytosol und Peroxisomen stattfindet, ist eine Verwechslung ausgeschlossen [W. Schmitz (1994)⁸³].

Die Mitochondrien wurden aufgrund der Aktivität der Succinat-Dehydrogenase erkannt. Aus Abbildung 3-7 ist ersichtlich, daß eine gute Trennung von Mitochondrien und Peroxisomen stattgefunden hat.

Da es sich im vorliegenden Fall um Lebergewebe handelt, konnte zur Lokalisation des endoplasmatischen Retikulums die Glukose-6-Phosphatase, ein Enzym, welches nur in der Leber vorkommt, gemessen werden. ER und Membranbestandteile, anhand der 5'-Nucleotidase identifiziert, fanden sich an der oberen Grenze des Gradienten. Die Lysosomen (β -Hexosaminidase) fanden sich zwischen Peroxisomen und Mitochondrien. Die Aktivität der UDPase, die zur Bestimmung des Golgi-Apparates herangezogen wurde, verteilt sich auf mehrere Bereiche des Gradienten. Die höchste Aktivität findet sich im oberen Bereich, in der Gegend wo sich auch Membran und ER finden. Eine fast ebenso hohe Aktivität findet sich jedoch auch in Fraktion 9, wo die Peroxisomen liegen.

Tabelle 3-1: Leitenzyme der subzellulären Fraktionierung

Organell	Leitenzym
Mitochondrien	Succinat-Dehydrogenase
Peroxisomen	Katalase
Golgi-Apparat	UDPase
Plasmamembran	5'-Nucleotidase
ER	Glucose-6-Phosphatase
Lysosomen	β -Hexosaminidasen



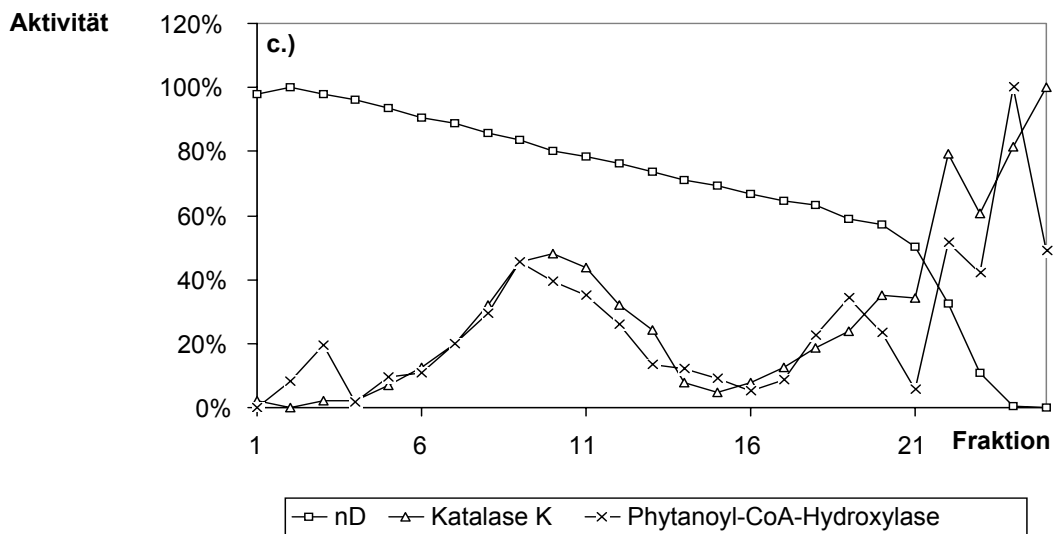
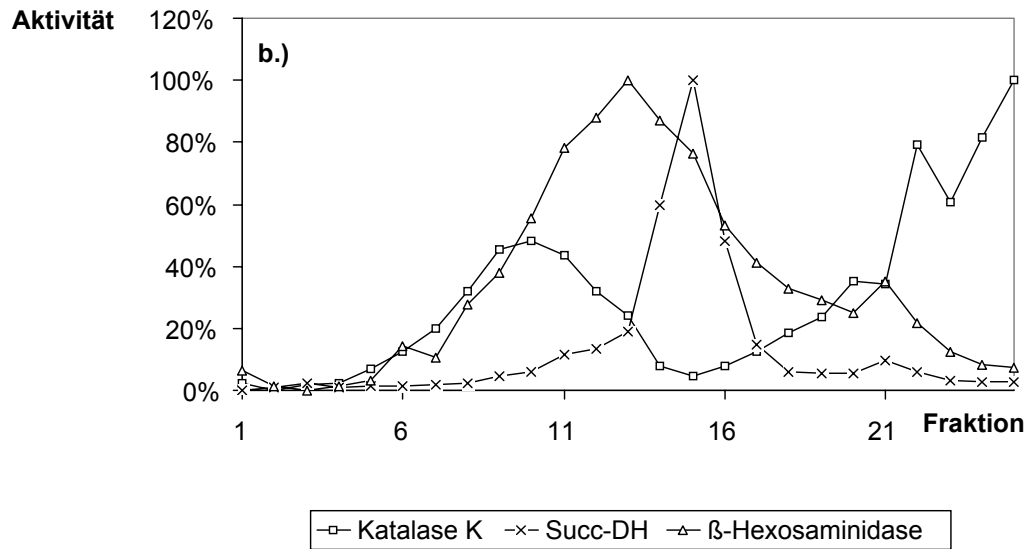


Abbildung 3-7: Subzelluläre Fraktionierung von PNÜ aus Rattenleberhomogenat. Nach Zentrifugation eines Homogenats aus Rattenleber mit $400\times g$ 3 min wurde der Überstand auf einen 35%-56% Succrose-Dichtegradienten aufgetragen und mit $69000\times g$ 3h ($4^{\circ}C$) zentrifugiert. Fraktionen à 1,5 ml wurden gewonnen und bezüglich der Aktivität der Leitenzyme [a.) und b.)] charakterisiert. c.) Zur Veranschaulichung wurde die Aktivität der Phytanoyl-CoA-Hydroxylase gemeinsam mit der der Katalase, sowie mit dem Verlauf des Dichtegradienten n_D dargestellt.

Die Aktivität der Phytanoyl-CoA-Hydroxylase läuft mit der Aktivität der Katalase annähernd parallel, so daß davon auszugehen ist, daß die Hydroxylase ein peroxisomales Enzym ist, zumal in den Bereichen hoher Aktivität der Succinat-DH (Mitochondrium) die Hydroxylase sehr geringe Aktivität aufweist.

3.1.2.7 ATP-Abhängigkeit

Alle bisherigen Beobachtungen deuten darauf hin, daß die Hydroxylase als Substrat Phytanoyl-CoA benötigt. Wird in einem Versuch Phytansäure eingesetzt, ist es folglich notwendig, diese vorher zu aktivieren. Dies kann einerseits dadurch geschehen, daß man Phytansäure mit Mikrosomen und den Cofaktoren für die Acyl-CoA-Synthetase, ATP, CoA und $MgCl_2$, inkubiert und erst nach der Aktivierung die Cofaktoren für die Hydroxylase, sowie die Hydroxylase selbst, ergänzt. Es ist naheliegend, daß die Cofaktoren für die Acyl-CoA-Synthetase in einer Reaktion, in der bereits die aktivierte Fettsäure eingesetzt wird, nicht gebraucht werden sollten. Unerwarteterweise zeigte sich aber, daß in einem Ansatz kein Umsatz nachweisbar war, wenn dieser mit Phytanoyl-CoA, aber ohne die Acyl-CoA-Synthetase-Cofaktoren, inkubiert wurde. Dieses Phänomen konnte auch in Reaktionen beobachtet werden, in denen Peroxisomen der subzellulären Fraktionierung als Enzymquelle eingesetzt wurden.

Die Cofaktoren CoA und $MgCl_2$ waren für die Reaktion nicht so entscheidend, wie es ATP war. Wurde Coenzym A alleine im Ansatz weggelassen, wurde lediglich ein etwas reduzierter Umsatz gemessen. In Abwesenheit von ATP war dagegen sowohl in Homogenaten wie auch in gereinigten Peroxisomen kein Umsatz messbar.

Um diesem Phänomen weiter nachzugehen, wurde eine partielle Reinigung des Enzyms angestrebt. Es sollte geklärt werden, ob der Zusammenhang von Umsatz und ATP auch nach einer Anreicherung bestehen bleibt oder ob es sich eventuell um einen Artefakt einer Homogenatmessung handelt.

3.1.3 Untersuchungen zur Enzymanreicherung

Es war das Ziel, die ATP-Abhängigkeit der Hydroxylierung in einer Enzymquelle zu testen, die weniger anfällig für Nebenreaktionen und Interaktionen ist als ein Homogenat. Wichtig erschien dabei vor allem die Entfernung der zellulären Membranen (die bei Enzymreaktionen mit Lipid-Substraten erfahrungsgemäß extrem stören). Nach einem zweistufigen Reinigungsgang wurde ein membranfreies, lösliches Enzympräparat erhalten, mit dem dann die Messung erneut durchgeführt wurden.

3.1.3.1 Aceton-Fällung

Rattenleber wurde nach Homogenisation im Potter-Elvehjem-Homogenisator mit 400×g 3 min zentrifugiert, um Bindegewebe, Kerne und größere Gewebstücke abzutrennen. Der postnukleäre Überstand enthielt 4165 mg Protein mit einer spez. Aktivität von 0,189 U/mg. Der postnukleäre Überstand wurde mit 10 Vol-% Aceton versetzt und 30 min bei 0°C inkubiert. Der Niederschlag wurde 30 min bei 4°C und 1000rpm abzentrifugiert und verworfen. Im Überstand fanden sich 2400 mg Protein mit einer spez. Aktivität von 0,29 U/mg.

3.1.3.2 DEAE-Cellulose

Auf eine mit Startpuffer (10 mM Phosphatpuffer, pH 7,3) äquilibrierte DE-Säule wurde postnukleärer Überstand nach Aceton-Fällung aufgetragen. Ungebundenes Protein wurde mit 3 SV Start-Puffer ausgewaschen. Anschließend wurde mit 3 SV eines linearen NaCl-Gradienten von 0 – 1 M in 10 mM Phosphat-Puffer, pH 6,8 eluiert. Die Hydroxylase desorbierte in einem Bereich von 80 – 150 mM NaCl. Die Aktivität betrug 30,42 U, bei einer Gesamtproteinmenge von 36,39 mg und einer spez. Aktivität von 0,84 U/mg.

3.1.3.3 Anreicherung

Tabelle 3-2: Anreicherung der Phytanoyl-CoA-Hydroxylase

Stufe	Volumen ml	Protein		Aktivität		spez. Aktivität U/mg	Aus- beute %	Anrei- cherung
		mg/ml	mg	U/ml	U			
PNÜ	70	59,5	4165	11,3	791	0,189	100	1
Aceton	60	40	2400	11,6	696	0,29	87,9	1,53
DEAE	9	4,04	36,39	16,75	150,75	4,143	19,06	21,9

Auch in dieser angereicherten Enzymquelle blieb die Abhängigkeit der Reaktion von ATP bestehen (Abbildung 3-8). Damit war es unwahrscheinlich, daß das beobachtete Phänomen ein Artefakt in einer Homogenatsmessung ist. Ganz offensichtlich spielt ATP eine bisher unbekannte Rolle in der Hydroxylierungsreaktion von Phytanoyl-CoA.

3.1.3.4 Versuche mit verschiedenen Nucleotiden

Um die Funktion des ATPs in dieser Reaktion weiter zu untersuchen, wurden Versuche mit verschiedenen Nucleotiden unternommen. Dabei sollte untersucht werden, ob sich Hinweise auf einen allosterischen Effekt des ATPs finden lassen. Dieser, und ein unspezifischer Effekt der negativen Ladung von ATP, sollten mit der Substitution des ATPs durch GTP untersucht werden. Ob die Energie aus der Hydrolyse von Pyrophosphat für die Reaktion benötigt wird, wurde mit AMP-PNP, einem nichtspaltbaren ATP-Analogen getestet.

Wird ein Ansatz ohne ATP, aber mit allen anderen Cofaktoren zur Reaktion gebracht, kommt es zur Oxidation des zugegebenen Eisens. In diesem Fall ist kein Umsatz nachweisbar, weil der Cofaktor Fe^{2+} nicht zur Verfügung steht. Es zeigte sich aber, daß in einem Homogenat noch ausreichend Fe^{2+} vorhanden ist, daß eine Reaktion ohne zusätzliches Fe^{2+} , aber nach Zugabe aller anderen Cofaktoren (inkl. ATP), ablaufen kann. Die gemessenen Umsatzraten sind dann aber geringer. In einem Ansatz, dem weder Fe^{2+} noch ATP zugegeben werden, ist wiederum kein Umsatz nachweisbar. Eine Möglichkeit, um zugegebenes Eisen reduziert zu halten, besteht darin, ATP durch GTP zu substituieren. Während in diesem Fall Fe^{2+} in einem Reaktionsansatz wieder im Überschuß zur Verfügung steht, ist wegen des Fehlens von ATP wiederum kein Umsatz nachweisbar. Daraus wurde gefolgert, daß ATP eine spezifische Rolle in der Hydroxylierungsreaktion spielt.

Die Substitution von ATP durch AMP-PNP, einem nichtspaltbaren ATP-Analogen, ermöglicht zwar eine Umsetzung von Phytanoyl-CoA, es kommt jedoch zu deutlich geringeren Umsatzraten.

Wird AMP anstelle von ATP der Reaktion zugegeben, ist wiederum kein Umsatz nachweisbar.

Die naheliegende Vermutung, daß die in Peroxisomen ebenfalls sehr aktiven Thioesterasen das Substrat sehr rasch hydrolysieren, dieses also permanent wieder aktiviert werden muss, wird durch die Wirkung des nicht spaltbaren ATP-Analogons widerlegt. Anscheinend wird die Hydroxylase durch ATP allosterisch aktiviert.

Um die Rolle des ATPs letztlich zu klären, müsste das Enzym gereinigt werden und Tests unter eindeutigen Bedingungen durchgeführt werden. Dies würde aber den Rahmen dieser Arbeit sprengen, deren Ziel die Etablierung und Anwendung einer sensitiven Messmethode zum Nachweis der Hamster-Phytanoyl-CoA-Hydroxylase ist.

Umsatz [%]

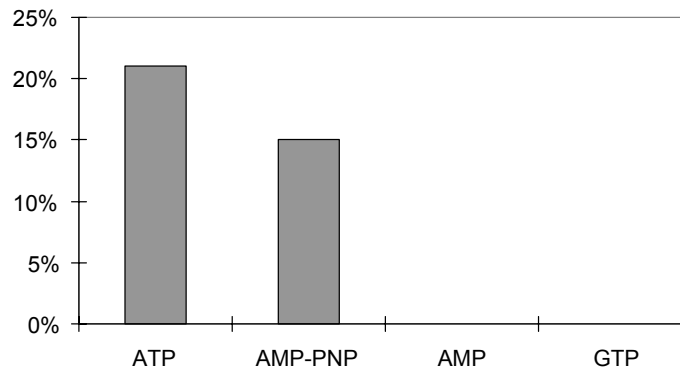


Abbildung 3-8: Untersuchung des Einflusses verschiedener Nucleotide auf den Umsatz von Phytanoyl-CoA durch angereicherte Phytanoyl-CoA-Hydroxylase. Je 20 nmol [2,3]-³H-Phytanoyl-CoA wurden mit 120 µg Protein in Form von angereicherter Phytanoyl-CoA-Hydroxylase aus postnukleärem Überstand von Rattenleberhomogenat 30 min unter den im Text beschriebenen Standardbedingungen, jedoch ausschließlich mit den angegebenen Nucleotiden inkubiert. Die Quantifizierung des Umsatzes erfolgte durch DC der extrahierten Fettsäuren wie unter Material und Methoden angegeben.

3.1.4 Messung in Homogenaten kultivierter Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, daß der Assay eine ausreichende Empfindlichkeit für Messungen in subzellulären Fraktionen von Rattenleber besitzt, wurde mit Enzymquellen geringerer spezifischer Aktivität experimentiert. Verschiedene kultivierte Zelllinien standen zur Verfügung:

3.1.4.1 Humane Hepatomzellen (HepG 2)

Es handelt sich um eine permanente Zelllinie, die Charakteristika von humanen Leberzellen besitzt. Kultivierte Zellen wurden mit PBS versetzt und durch Ultraschall homogenisiert. Das 1:5 Homogenat besaß einen Proteingehalt von 25 mg/ml. Als Enzymquelle wurden 500, 250, 125, 50, 25 und 12,5 µg Protein eingesetzt und unter Standardbedingungen inkubiert. Mit 12,5 µg Protein im Ansatz konnte ein deutlicher Umsatz gemessen. Daß mit höheren Proteinmengen kein Umsatz nachweisbar ist, kann

wahrscheinlich darauf zurück geführt werden, daß das Substrat in die, in einem Homogenat enthaltenen, Membranen integriert wird. Dieser Homogenat-Effekt war auch bei Messungen in Rattenleberhomogenat zu beobachten (Abbildung 3-3).

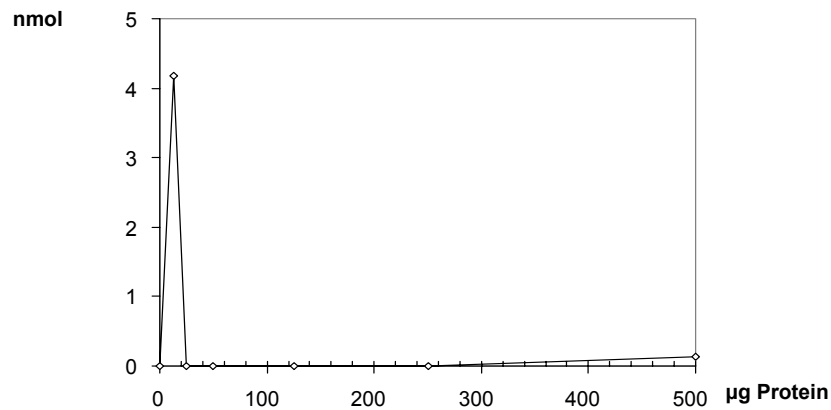


Abbildung 3-9: Proteinabhängigkeit der Hydroxylierung von Phytanoyl-CoA unter Verwendung homogenisierter HepG2-Zellen. 20 nmol [2,3]-³H-Phytanoyl-CoA wurden mit 12,5, 25, 50, 125, 250 und 500 µg Protein in Form homogenisierter HepG2-Zellen 30 min unter den im Text angegebenen Standardbedingungen inkubiert. Die Quantifizierung des Umsatzes zu α -Hydroxy-Phytansäure erfolgte durch DC der extrahierten Fettsäuren wie unter Material und Methoden angegeben.

3.1.4.2 Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells und menschliche Fibroblasten

Durch Sonifizieren wurde ein 25% iges Homogenat aus kultivierten CHO-Zellen in PBS hergestellt. Aufgrund der Ergebnisse aus den Hepatomzell-Versuchen wurde eine Zeitabhängigkeit mit etwa 13µg Protein pro Ansatz durchgeführt, die Inkubationszeiten betragen 1, 2 und 4 Stunden. Die Analyse im Radio-Dünnschicht-Scanner lieferte kein eindeutiges Ergebnis. Es zeigte sich für die einstündige Inkubation nach 30 Minuten Messung ein schwache, kaum den Hintergrund überstrahlende Aktivitätsanreicherung in Laufweite der α -Hydroxyphytansäure. Alle anderen Ansätze waren in der Scanner-Analyse negativ. Wegen der eingangs erwähnten schwachen Zählausbeute des Radio-Dünnschicht-Scanners, wurde eine Messung im Radio-Szintillations-Zähler durchgeführt. Hierzu wurden die Kieselgelplatten vermessen und die Bereiche in denen α -Hydroxyphytansäure

zu erwarten war, isoliert und die Aktivität des Kieselgels im Radioszintillationszähler gemessen. Zusätzlich wurden die wässrigen Phasen der Ansätze im Szintillationszähler analysiert, um gebildetes Tritiumwasser nachweisen zu können. Auch diese Messungen brachte keine eindeutigen Ergebnisse.

Tabelle 3-3: Radioszintillationszählung in DPM nach Isolation von dünn-schichtchromatographisch getrenntem Edukt und Produkt

	CHO-Zellen				Ratte
Inkubation	negativ	1h	2h	4h	4h
α -Hydroxyphytansäure	184,3	157,8	185,7	175,9	8220,3
Zwischenraum	638,8	130,7	387,2	248,6	845,2
Phytansäure	12713,5	9388,4	14236,9	12192,3	30916,7
H ₂ O-Phase	687,5	715,0	1622,5	827,5	3345,0

Ein deutliches Ergebnis lieferte nur die Positivkontrolle, die in Form eines Ansatzes mit PNÜ von Rattenleberhomogenat gewonnen wurde. Hiermit konnte gezeigt werden, daß ein Nachweis durch das beschriebene Vorgehen zwar prinzipiell möglich ist, die Umsatzraten in CHO-Zellen aber zu gering sind, um mit diesem Assay nachgewiesen werden zu können. Denn auch im Falle eines sofortigen Abbaus von α -Hydroxyphytanoyl-CoA, so daß dieses vielleicht in keinem Fall nachweisbar gewesen wäre, hätte ja Tritiumwasser nachgewiesen werden müssen.

Auch die Messungen in Fibroblasten waren negativ.

Nachdem alle untersuchten Methoden zur Messung der Enzymaktivität der Phytanoyl-CoA-Hydroxylase sich damit bereits für Messungen in Homogenaten der zu untersuchenden Zellen als zu unempfindlich erwiesen hatten, schien es aussichtslos, die Messmethoden soweit verbessern zu wollen, daß die Aktivität selbst in subzellulären Fraktionen noch quantitativ zu messen ist. Deswegen wurde als Alternative versucht, das Enzymprotein als solches immunchemisch nachzuweisen.

3.2 Versuche zur immunochemischen Detektion der Phytanoyl-CoA-Hydroxylase

Von Stephanie Mihalik und ihrer Arbeitsgruppe wurde ein Antikörper gegen das Rattenenzym aus Kaninchen gewonnen, den wir für unsere Zwecke testen konnten. Hierzu wurde ein Western Blot durchgeführt und eine Nitrozellulose-Membran präpariert, auf die die aufgetrennten Proben eines Rattenleberhomogenates und eines Homogenates kultivierter CHO-Zellen transferiert wurden. Der Erstantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt, und die Membran eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Inkubation mit dem Zweitantikörper, einem anti-Kaninchen-IgG alkalische Phosphatase-Konjugat, und Färbung mit NBT/BCIP zeigte sich, daß das Antiserum für unsere Zwecke zu unspezifisch ist. Während von den aufgetrennten Rattenproteinen viele angefärbt wurden, aber nicht mit besonderer Intensität im Bereich der Hydroxylase, war in den aufgetrennten Hamsterproteinen eine Detektion nicht nachweisbar.

Dieses Antiserum war für unsere Zwecke nicht geeignet, denn auch nach einer Affinitätsreinigung wäre keine deutlichere Detektion der Hamster-Hydroxylase zu erwarten gewesen. Aus diesem Grunde wurde an dieser Stelle die Herstellung eines spezifischen Anti-Phytanoyl-CoA-Hydroxylase-Serum angestrebt, das gegen das Hamsterprotein gerichtet ist. Drei alternative Strategien waren gegeneinander abzuwägen: 1.) Nach Reinigung des Enzyms könnte das Antiserum durch Immunisierung von Kaninchen generiert werden. 2.) Nach Klonierung der Hydroxylase aus einer Hamster-cDNA-Bank könnte das Enzym in einem geeigneten Vektor exprimiert werden. Nach Isolierung des Enzyms wäre eine Immunisierung möglich. 3.) Selbst wenn die vollständige codierende Sequenz nicht zu klonieren wäre, könnte die Sequenz zur Synthese von Peptiden herangezogen werden, welche, zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt, zur Generierung spezifischer Anti-Peptid-Antikörper führen sollte.

Die erste Strategie ist mit dem Nachteil eines großen Aufwandes bei gleichzeitig geringer Enzym-Ausbeute behaftet, da die Hydroxylase den Lebern chinesischer Zwerghamster isoliert werden müsste, welche folglich in größeren Mengen benötigt worden wären. Erschwerend kommt hinzu, daß die Hamster im Labortierhandel nicht ohne weiteres erhältlich waren. Prinzipiell wäre es auch möglich gewesen, das Enzym aus Geweben größerer Tiere, etwa aus Rinder- oder Schweineleber zu isolieren. Der Reinigungsaufwand wäre aber nach wie vor erheblich gewesen, zudem besteht in solchen Fällen immer die

Gefahr einer mangelhaften Kreuzreaktivität mit dem Nager-Enzym, was ggf. den ohnehin schwierigen Nachweis des Enzyms weiter erschwert hätte.

Während die erste Alternative aufgrund der geschilderten Schwierigkeiten nahezu ausgeschlossen war, konnten Alternative zwei und drei aufgrund ihres gemeinsamen Beginns, parallel verfolgt werden.

Die 3. Strategie erschien aber insofern am vielversprechendsten, da einerseits die aufwendige Expression und Reinigung des Enzyms umgangen werden konnte, andererseits die für die Immunisierung verwendeten Peptide nötigenfalls auch für eine Affinitätschromatographie eingesetzt werden konnten. Dafür war es allerdings wichtig, die cDNA- und Aminosäure-Sequenz des Hamster-Enzyms zu kennen, um nicht Gefahr zu laufen, aus der bekannten Ratten-Sequenz gerade diejenigen Bereiche zu erwischen, in denen sich Hamster und Ratte unterscheiden.

Daher musste zunächst die Aminosäure-Sequenz des Hamster-Enzyms mit molekularbiologischen Methoden analysiert werden

3.2.1 Molekularbiologie

3.2.1.1 Allgemeine Strategie

Die Ähnlichkeit der bekannten humanen und murinen α -Phytanoyl-CoA-Hydroxylase-Sequenzen stützt die Annahme einer phylogentisch konservierten Struktur der kodierenden Sequenzen des Hydroxylase-Gens. Unter Annahme dieser Hypothese lässt sich schlussfolgern, daß ebenfalls eine große Ähnlichkeit zwischen Maus- und Hamstersequenz besteht, so daß es möglich sein sollte, aus den bekannten Sequenzen Primer für die Klonierung der Hamster-Hydroxylase abzuleiten. Insbesondere sind zu diesem Zweck Abschnitte hoher Konservierung geeignet, da diese Abschnitte mit großer Wahrscheinlichkeit funktionell wichtige Aminosäure-Sequenzen kodieren und sich folglich in nahezu gleicher Form beim Hamster wiederfinden sollten. Es wurden Primer in sense- und anti-sense-Orientierung ausgewählt, die einen relativ kurzen Abschnitt der bekannten Sequenzen flankieren und die Klonierung eines Teilstückes der Hamster-Hydroxylase ermöglichen sollten.

Die Klonierung erfolgte aus einer cDNA-Bank, die aus Hamsterzellen gewonnen wurde (Uni-ZAP® XR Library, Fa. Stratagene).

3.2.1.2 Amplifikation der cDNA-Bank

Die Vervielfältigung der cDNA-Bank, die in λ -Phagen kloniert ist, erfolgte in E.coli Bakterien des Stammes XL-1blue, die mit den Phagen infiziert wurden. Nach Inkubation der Bakterien bis zur Lyse konnten die Phagen mit einem Reinigungskit der Firma Qiagen isoliert und deren DNA präpariert werden (Qiagen). Zuvor wurde mit einem Aliquot kompletter Phagen der Titer der amplifizierten Bank bestimmt.

Tabelle 3-4: Titerbestimmung der amplifizierten Phagenbank

Verdünnung	pfu/Platte
1:500	ca. 2700
1:250 000	420
1:25*10 ⁶	4

Daraus folgt: $1\mu\text{l} \cong 20 \times 10^6$ pfu.

Extinktion einer 1:100 Verdünnung der isolierten DNA::

$$E_{260} = 0,01$$

Es gilt: $E_{260} = 1 \Leftrightarrow 50\mu\text{g DNA/ml}$

Daraus folgt: $50\mu\text{g/ml} \times 0,01 \times 100 = 50\mu\text{g/ml}$

Der DNA-Gehalt der amplifizierten Bank beträgt demnach 50 $\mu\text{g/ml}$.

3.2.1.3 Klonierung der cDNA für die Hamster-Phytanoyl-CoA-Hydroxylase

Mit dem Primerpaar D7F und D10R (siehe Tabelle 2-4) konnte mittels Polymerase-Ketten-Reaktion ein cDNA-Fragment kloniert und amplifiziert werden, welches im 1%igen-Agarose-Gel auf eine Größe von 450 bp geschätzt wurde und mit der Größe der entsprechenden Maussequenz (455 bp) vereinbar war. Die Sequenzierung ergab eine Länge von 402 bp mit offenem Leseraster und konnte im Vergleich mit der humanen und murinen Sequenz als Fragment der α -Phytanoyl-CoA-Hydroxylase des Hamsters identifiziert werden.

3.2.1.4 3'-Ende

Das 3'-Ende der Sequenz wurde mit dem Primer D11F, der aus dem sequenzierten Mittelstück abgeleitet worden war, und dem Plasmid-Primer M13F gefunden. Das cDNA-

Fragment wurde ebenfalls kloniert, und in beide Richtungen sequenziert. Auf diese Weise konnte die Sequenz bis zum Poly-A-Schwanz entschlüsselt werden.

3.2.1.5 5'-Ende

Für die Entschlüsselung des 5'-Endes konnte ausschließlich mit dem Primerpaar D4R/T7 ein cDNA-Fragment aus der Phagenbank amplifiziert werden. Nach Klonierung wurde dieses Fragment sequenziert. Die Sequenz konnte so um weitere 82 bp Richtung Start-Codon entschlüsselt werden, diese unterscheiden sich aber erheblich von den entsprechenden Sequenzen von Mensch und Maus, so daß eine Rekombination innerhalb der cDNA-Bank nicht auszuschließen ist. Eine vollständige Sequenzierung der cDNA-Sequenz der Hydroxylase war nicht möglich. Es ist davon auszugehen, daß in dieser Phagenbank die komplette Sequenz nicht enthalten ist.

Für die Generierung der Antikörper gegen die Hydroxylase war eine Immunisierung mit Peptiden geplant. Diese waren auch aus einer unvollständigen Sequenz ableitbar. Insofern konnte an dieser Stelle die Sequenzierung abgebrochen werden und das eigentliche Ziel, die Erstellung eines Antiserums, verfolgt werden.

3.2.2 Immunchemie

Wegen des geringeren Aufwandes der Synthese von Peptiden im Vergleich mit der Expression eines Proteins in einem Vektor, die zudem ohne 5'-Ende nicht möglich ist, wurde eine Immunisation mit Peptid-BSA-Konjugaten durchgeführt. Die Auswahl von immunogenen Sequenzen und die Synthese der Peptide wurde dankenswerter Weise von Prof. Palm durchgeführt.

3.2.2.1 Peptide

Alle drei verwendeten Peptide sind aus Bereichen hoher Homologie der Hamster-Sequenz mit der von Mensch und Maus, können also als bona fide Hydroxylase-Sequenzen angesehen werden.

Tabelle 3-5: Sequenzen der für die Immunisierung synthetisierten Peptide

Peptid 1	DDDIQRFREEERIC	75 ff.
Peptid 2	TKIQDFQEDEELFRYC	119 ff.
Peptid 3	KKTSRHPLHQDLHY+C	167 ff.

Die Peptide 1 und 2 besitzen natürlicherweise am Ende ein Cystein, das zur Koppelung an das Trägerprotein benötigt wurde. Das Cystein des 3. Peptides wurde für die Koppelung angefügt, findet sich aber nicht in der Sequenzvorlage.

3.2.2.2 Konjugation

Um ihre haptene Funktion erfüllen zu können, mussten die Peptide an Trägerproteine gebunden werden. Die Peptide wurden zum einen an BSA und zum anderen an Keyhole Limpet Hemocyanin gekoppelt, und zwar in der Form, das jedes Trägermolekül mit allen drei Peptiden konjugiert war. Es wird erwartet, daß diese Konjugate am ehesten ein Antiserum mit spezifischer Aktivität erzeugen können. Die Trägerproteine wurden mit m-Maleimidobenzoyl-N-succinimid (MBS) aktiviert. Die Reinigung der Trägerproteine an Sephadex G-25 ergab eine Ausbeute von ca. 4 mg BSA in 1 ml und 5 mg KLH in 2 ml. Das BSA wurde mit 1,8 mg, das KLH mit 3,5 mg Peptid versetzt. Letztlich betrug die Ausbeute für BSA 2 ml mit 2 mg/ml und für KLH 4ml mit 1 mg/ml

3.2.2.3 Immunisierung

Es wurden zwei weiße neuseeländische Kaninchen immunisiert, das eine mit dem BSA-Konjugat, das andere mit dem KLH-Konjugat. Initial wurden je 0,5 mg Konjugat in komplettem Freund'schen Adjuvans als beständige Emulsion zwischen Schulterblatt und Rumpfwand als Depot gespritzt. Nach je 4 Wochen wurde eine 1. und 2. boost-Injektion mit je 0,5 mg Konjugat in inkomplettem Freund'schen Adjuvans als Emulsion erneut unter die Schulterblätter gegeben. 10 Tage nach der zweiten boost-Injektion wurde mittels ELISA (s.u.) der Titer der Seren der beiden Tiere bestimmt, die sich als schwach herausstellten. Daraufhin wurde eine dreimalige intravenöse Injektion von 70 µg Konjugat in 0,5 ml PBS, jeweils im Abstand von 3 Tagen vorgenommen. 4 Tage nach der 3. i.V. Injektion wurden erneut die Titer bestimmt. Aufgrund der deutlich geringeren Aktivität des Antiserums gegen das KLH-Konjugat wurde im Folgenden hauptsächlich das Anti-BSA-Konjugat-Antiserum verwendet, worauf sich auch im Weiteren die Darstellung bezieht.

3.2.2.4 Titerbestimmung durch ELISA

Die Aktivität des Anti-BSA-Konjugat-Antiserums gegen das Konjugat (alle drei Peptide) und gegen die Peptide im Einzelnen sollte bestimmt werden. Hierzu wurden je 8 Wells einer Mikrotiterplatte einerseits mit den Peptid-BSA-Konjugaten und zum anderen mit den Peptiden 1, 2 und 3 beschichtet und die freien Bindungsstellen mit 3%-BSA in TBS / Tween blockiert. Anschließend wurde das Antiserum mit 3%-BSA in TBS im Verhältnis 1:100 verdünnt und mit Verdünnungsschritten im Verhältnis 1:2 pro Reihe aufgegeben und 2 h (37°C) inkubiert. Als Zweitantikörper wurde ein anti-Kaninchen-IgG alkalische Phosphatase-Konjugat eingesetzt und 1 h (37°C) inkubiert. Als Färbereagenz wurde pNPP verwendet, die Extinktion wurde bei 405 nm gemessen.

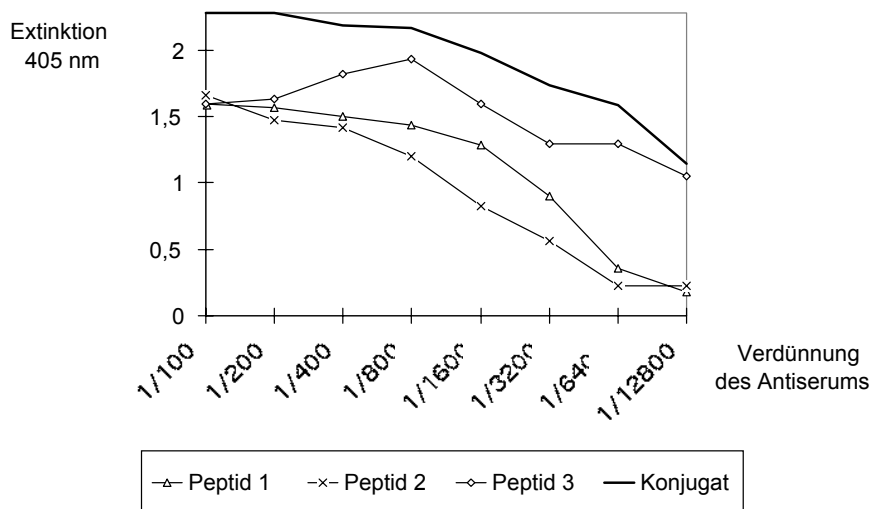


Abbildung 3-10: Titerbestimmung und differenzierte Darstellung der Aktivität des Antiserums gegen die drei Peptide im ELISA Je eine Reihe à 8 Wells einer Mikrotiterplatte wurde mit BSA-Konjugat bzw. Peptid 1, 2 oder 3 beschichtet, anschließend mit 3%-BSA-TBS/Tween geblockt. Das Antiserum wurde in der angegebenen Weise mit 3%-BSA-TBS verdünnt, Inkubation und Detektion wie im Text beschrieben.

Aus Abbildung 3-10 ist ersichtlich, daß die Extinktionskurve, die zur Bestimmung der Aktivität des Antiserums gegen das BSA-Konjugat gemessen wurde, die größten Werte annimmt. Etwas niedriger verlaufen die Extinktionskurven, die die Aktivität des Antiserums gegen die einzelnen Peptide charakterisieren, wobei die Kurven die größte Immunogenität von Peptid 3 und die geringste von Peptid 2 vermuten lassen. Aus Abbildung 3-10 läßt sich

schließen, daß eine Vereinigung der Aktivitäten gegen die Peptide 1, 2 und 3 für die hohe Aktivität gegen das Konjugat verantwortlich ist.

Da bei einer Verdünnung von 1/12800 die halbmaximale Extinktion der Konjugatkurve noch nicht überschritten worden ist, kann der Titer des Antiserums auf etwa 1:10.000 angesetzt werden.

3.2.2.5 Westernblot

Die Qualität des Antiserums sollte in einem Westernblot überprüft werden. Auf die Nitrozellulose-Membran wurden die aufgetrennten Proteine eines Rattenleberhomogenates, sowie eines Homogenates kultivierter CHO-Zellen transferiert. Der Erstantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in 3% BSA in TBS / Tween aufgenommen, und die Membran 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Als Zweitantikörper diente ein Anti-Kaninchen-IgG alkalische-Phosphatase-Konjugat, die Färbung wurde mit NBT / BCIP durchgeführt.

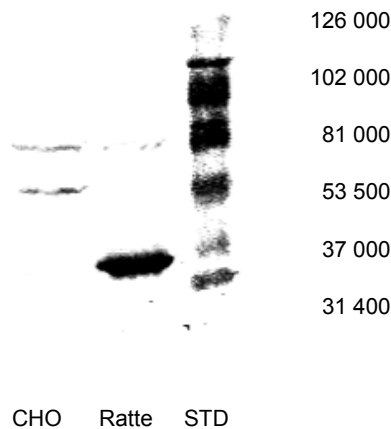


Abbildung 3-11: Detektion der Hydroxylase im Westernblot. Nach Transfer aufgetrennter Proteine eines PNÜ von Rattenleberhomogenat, sowie homogenisierter, kultivierter CHO-Zellen auf eine Nitrozellulose-Membran, erfolgte die Inkubation mit dem 1:1000 verdünnten Anti-Hydroxylase-Erstantikörper. Detektion und Färbung nach standardisiertem Vorgehen wie im Text beschrieben.

Aus der Abbildung 3-11 ist ersichtlich, daß der Antikörper ein Protein detektiert, welches die Größe der Ratten-Hydroxylase, sowie die vermutete Größe der Hamster-Hydroxylase aufweist. Allerdings werden noch Proteine in anderen Größen erkannt. Hier ist nicht klar, ob das eine Nebenreaktion des Antiserums ist oder ob es sich um prozessierte Formen der

Hydroxylase handelt. Um dem näher nachzugehen, wurde eine Affinitätsreinigung des Antikörpers angestrebt.

3.2.2.6 Affinitätschromatographie

Über einen Nickel-Histidin-Komplex wurden die neu synthetisierten Peptide 1, 2 und 3 mit N-terminalen Oligohistidin-Sequenzen (His-Tag) an ein Ni-Harz in einer großporigen Cellulose-Matrix gebunden. Die dazu nötigen Peptide wurden wiederum von Herrn Prof. Palm synthetisiert. Aus dem His•Bind® Kit (Fa Novagen, Darmstadt) wurden Säulen mit einem Volumen von 2 ml und einer Bindungskapazität von 2 mg Protein verwendet. Es wurden drei Säulen vorbereitet, die jeweils mit etwa 2 mg eines der Peptide 1-3 beladen wurden. Die Bindung und Elution der Antikörper erfolgte nach einer Vorschrift von Gu et al, 1994⁸⁴. Eingesetzt wurden jeweils 0,5ml unbehandeltes Antiserum. Die Säulen wurden nach Inkubation mit dem Serum mit 150 mM und 2 M NaCl-Puffer gewaschen und anschließend die Antikörper mit 4 M MgCl₂ eluiert. Dazu wurde die Säule mit einem Säulenvolumen MgCl₂-Puffer beladen und 15 min inkubiert, und anschließend mit einem Säulenvolumen MgCl₂-Puffer nachgewaschen. Die Messung der Optischen Dichte bei 280 nm gab folgende Werte:

Tabelle 3-6: Optische Dichte der Eluate nach Affinitätschromatographie

Fraktion	OD ₂₈₀		
	Säule 1	Säule 2	Säule 3
1	0,212	0,265	0,203
2	0,102	0,062	0,110
3	0,380	0,412	0,505
4	0,016	0,030	0,027

Auffällig ist, daß pro Säule je zwei Fraktionen mit hohem Protein-Gehalt eluiert wurden. Es wurde davon ausgegangen, daß der hohe Protein-Gehalt der ersten Fraktionen durch das Lösen unspezifischer Bindungen zustande kommt und keine spezifischen Antikörper enthält. Dies wurde durch einen Test mittels ELISA bestätigt (s.u.). Die darauf folgenden Fraktionen mit hoher optischer Dichte wurden auf ihren Gehalt an Anti-Peptid-Antikörper

getestet. Dazu wurden die Fraktionen über Nacht gegen 2 l PBS (4°C) dialysiert. Damit die Antikörper nicht an der Dialyse-Membran unspezifisch binden, wurden die Fraktionen mit 10 µl BSA (40 mg / ml) in TBS / Tween versetzt. Nach der Dialyse wurden 100 µl je Retentat als Erstantikörper zur Detektion von Peptiden auf einer Mikrotiterplatte eingesetzt. Nach Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen-IgG und Färbung mit pNPP, zeigte sich, daß keine spezifischen Antikörper detektiert werden konnten.

Um zu klären, ob die Proben überhaupt Antikörper enthalten, wurden wieder 100 µl je Retentat und je 100 µl der ersten Fraktionen der drei Säulen auf eine unbeschichtete Mikrotiterplatte gegeben und über Nacht (37°C) inkubiert. Die eventuell enthaltenden Antikörper sollten unspezifisch an die Platte binden, und anschließend mit dem Zweitantikörper nachgewiesen werden. Auf die gleiche Weise wurden die ersten Fraktionen der drei Säulen getestet, wobei eine Dialyse dieser Proben ausgelassen werden konnte, da die MgCl₂-Kristalle nach Einengung bis zur Trockene mit Waschpuffer ausgewaschen werden konnten. Bei diesem Test konnten keine Antikörper detektiert werden. Weil nun davon auszugehen ist, daß keine Antikörper eluiert worden sind, wurden die Säulen daraufhin mit je 6 ml 4 M MgCl₂ nacheluiert.

Die Messung der optischen Dichte bei 280nm der Elutionsfraktionen mit einem Spektralphotometer (PM 6, Fa Zeiss) ergab folgende Werte:

Tabelle 3-7: Optische Dichte nach erneuter Elution mit 4 M MgCl

Fraktionen	OD ₂₈₀		
	Säule 1 (Peptid1)	Säule 2 (Peptid2)	Säule 3 (Peptid3)
1	0,018	0,124	0,125
2	0,128	0,031	0,013
3	0,149	0,028	0,002
4	0,048	0,003	0,028
5	0,058	0,045	0,031

Die Fraktionen 2 und 3 von Säule 1 wurden vereinigt (~2ml), und ebenso wie die jeweils erste Fraktion der Säulen 2 und 3 gegen 2 l PBS (4°C) über Nacht dialysiert. Die dialysierten Proben wurden mittels Elisa auf Antikörper gegen die jeweiligen Peptide getestet, als Vergleichsproben wurden das Serum vor Auftrag auf die Säule und die Durchlauf-Fractionen getestet.

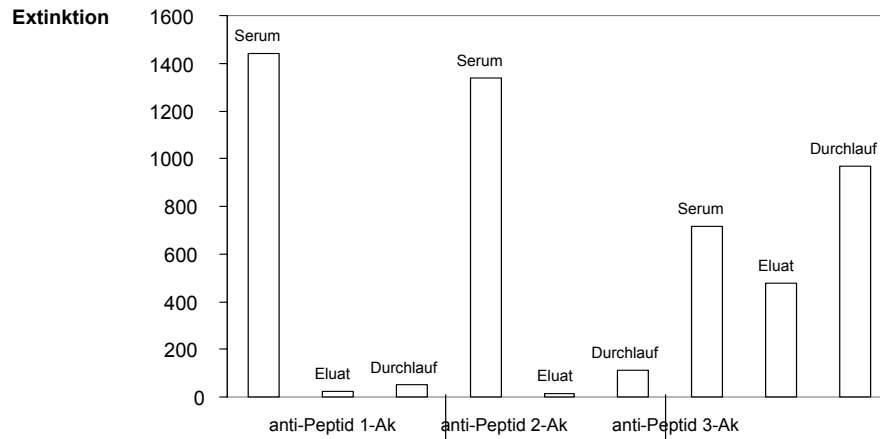


Abbildung 3-12: Affinitätschromatographie des anti-BSA-Konjugat-Antiserums.

Affinitätssäulen, die jeweils ausschließlich mit Peptid 1, 2 oder 3 beladen waren, wurden zur Reinigung der spezifischen Antikörper unter den im Text angegebenen Standardbedingungen eingesetzt. Dargestellt ist der Gehalt an Antikörpern gemessen als Extinktion₄₀₅ im Elisa (Bedingungen im Text). Serum bezeichnet das Antiserum vor Chromatographie, Eluat bezeichnet chromatographisch gereinigtes Antiserum und Durchlauf sind die Durchlauf-Fractionen.

Aus Abbildung 3-12 ist ersichtlich, daß nur Antikörper gegen Peptid 3 eluiert werden konnten. Zur Detektion von IgG in den Eluaten wurden je 100 ml aller Fraktionen zur unspezifischen Bindung auf eine Mikrotiterplatte gegeben, und anschließend mit dem Zweitantikörper detektiert. Nur in den Eluaten von Säule 3 konnten Antikörper nachgewiesen werden.

Das dialysierte Antiserum gegen Peptid 3 wurde nun in einem Westernblot getestet. Die Phytanoyl-CoA Hydroxylase sollte in Rattenleberhomogenat und aus homogenisierten CHO-Zellen nachgewiesen werden. Die Proben wurden in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Erstantikörper wurde in einer Verdünnung von 1 : 25 in 3% BSA in TBS / Tween 2 h bei RT mit der Membran inkubiert und anschließend mit dem Zweitantikörper 1 h bei RT detektiert. Als Substrat für

die alkalische Phosphatase diente NBT/BCIP. Wie die Abbildung zeigt, kann die Hydroxylase nicht nachgewiesen werden:

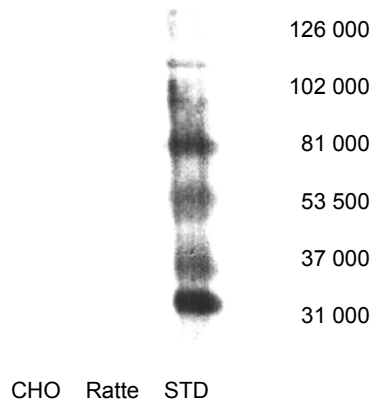


Abbildung 3-13: Fehlende Detektion der Hydroxylase nach affinitätschromatographischer Reinigung des Antiserums

Während das Antiserum gegen Peptid 3 noch in der Lage ist, in einem ELISA Peptide zu detektieren, ist die Detektion von Proteinen in einem Western Blot nicht möglich. Die Vermutung, daß dieser Antikörper sein Antigen schwächer bindet, kann durch die Beobachtung untermauert werden, daß dieser Antikörper noch in größeren Mengen im Serum nach der Affinitätschromatographie nachzuweisen ist, also auch nicht vollständig an die Säule gebunden hat.

Daraufhin wurde die Isolierung der Antikörper gegen die Peptide 1 und 2 weiterverfolgt. Weil in beiden Elutionen keine Antikörper nachgewiesen werden konnten und weil im Serum nach Chromatographie über die Affinitätssäule ebenfalls keine Antikörper gegen die Peptide 1 und 2 nachgewiesen werden konnten, war davon auszugehen, daß unter den angewendeten Elutionsbedingungen die Antigenbindung nicht zu lösen ist und folglich die Antikörper weiterhin auf die Säule gebunden haben. Dies konnte nachgewiesen werden, in dem nun die Ni-Histidin-Komplexe mit 1 M Imidazol (His•Bind® Kit, Fa Novagen, Darmstadt) gelöst wurden und die Antigen-Antikörper-Komplexe eluiert wurden. Es wurden 4 Fraktionen à 1 ml gewonnen, und ihre optische Dichte gemessen:

Tabelle 3-8: Optische Dichte der isolierten Ag-Ak-Komplexe nach Elution mit Imidazol

Fraktionen	OD ₂₈₀		
	Säule 1	Säule 2	Säule 3
1	0,305	0,305	0,304
2	0,289	0,298	0,295
3	0,192	0,094	0,210
4	0,264	0,005	0,109

Je 100 µl jeder Fraktion wurde zur unspezifischen Bindung der Immunkomplexe auf eine Mikrotiterplatte gegeben. Nach Inkubation über Nacht (37°C) und gleichzeitiger Einengung zur Trockene, konnten die Imidazol-Kristalle mit Waschpuffer entfernt werden und die Immunkomplexe durch Bindung des Zweitantikörpers an die Fc-Stücke der Anti-Peptid-Ak detektiert werden. In Tabelle 3-8 ist zu erkennen, daß von den Säulen 1 und 2 große Mengen von Immunkomplexen eluiert wurden. Von Säule 3 hingegen wurden nur noch geringe Mengen erhalten, passend zu der Tatsache, daß ein Teil der Antikörper während der Chromatographie die Peptide auf der Säule gar nicht gebunden hat und ein weiterer Teil der gebundenen Antikörper von Säule 3 in der Nachelution entfernt werden konnten.

Aus Abbildung 3-14 wird ersichtlich, daß insbesondere die Antikörper gegen die Peptide 1 und 2 noch in größerer Menge ihre Antigene gebunden haben, und offensichtlich wegen ihrer hohen Avidität schwer von ihren Antigenen zu lösen sind. Dies macht zwar die Affinitätsreinigung schwierig, läßt aber hoffen, daß gerade diese Antikörper für eine Detektion in einem Western Blot einsetzbar sind.

3.2.2.7 Trennung der Immunkomplexe

Wie aus den vorhergehenden Versuchen ableitbar ist, scheint die Ag-Ak-Bindung stärker als die Ni-Histidin-Komplexbindung der Peptide an das Ni-Harz der Cellulose-Matrix zu sein. Folglich würden Bedingungen, die eine Lösung des Antikörpers vom Antigen gestatten, immer auch zu einer Lösung der Ni-Histidin-Komplexbindung führen, so daß sich nach Elution im Eluat sowohl Antigen wie auch Antikörper wieder finden. An die Elution

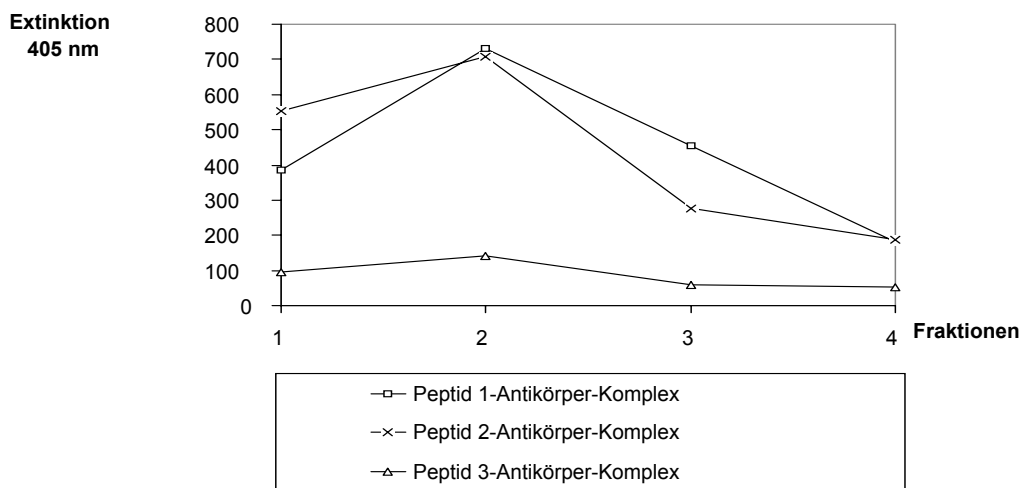


Abbildung 3-14: Elution der Ag-Ak-Komplexe von den Affinitätsäulen. Nach erfolgreicher Elution funktionsfähiger Antikörper von den drei Affinitätsäulen, wurden nun die Peptid-Antikörper-Komplexe eluiert. Proben der Fraktionen 1-4 wurden zur unspezifischen Bindung auf Mikrotiterplatten gegeben, die Antikörper mit einem anti-Kaninchen-Antikörper detektiert. Färbung und Messung unter Elisa-Standardbedingungen. jede Kurve stellt den Elutionsverlauf einer Affinitätsäule dar.

muss sich also noch eine Trennung (z.B. Chromatographie, Filtration) anschließen. Da diese Versuchsanordnung einen verhältnismässig langen Kontakt der Antikörper mit dem Lösungspuffer, der mit hoher Wahrscheinlichkeit auch denaturierend wirkt, impliziert, erschien es sinnvoller, die Komplexe unter schonenderen Bedingungen zu eluieren, unter der Vorstellung, nun zwar gebundene, aber noch funktionsfähige Antikörper im Antigen-Antikörper-Komplex zu erhalten. Aliquote dieser Komplexe wurden zur Untersuchung verschiedener Lösungspuffer (sauer, alkalisch, chaotrop) und Trennverfahren (Biogel, Ultrafilter) eingesetzt. Die Analyse erfolgte stets nach folgendem Schema: Zur Bestimmung des Gehalts an ungebundenen, funktionsfähigen Antikörpern wurde die Probe im Elisa zur Bindung von Peptid 1 als Erst-Antikörper eingesetzt. Zur Bestimmung des Gehalts an gelöstem Peptid 1 im Elisa wurde die Probe zur unspezifischen Bindung auf eine Mikrotiterplatte gegeben, als Erst-Antikörper wurde unbehandeltes Anti-Hydroxylase-Serum eingesetzt.

Die folgenden Versuche wurden mit Peptid 1 und den dagegen gerichteten Antikörpern durchgeführt, da letztere in den vorhergehenden Elisa-Untersuchungen den höchsten Titer gezeigt hatten.

Zur Gewinnung der Immunkomplexe wurde 1 ml Serum auf eine Affinitätssäule gegeben, die etwa 1 mg Peptid 1 gebunden hatte. Über 99% der im Serum enthaltenen Anti-Peptid-1 Antikörper wurden an die Säule gebunden.

Die Immunkomplexe wurden mit 6 ml Elutionspuffer (His•Bind® Kit, Fa Novagen) gelöst und in 6 Fraktionen à 1 ml aufgefangen. Nach Dialyse wurde von diesen Fraktionen eine Proteinbestimmung bei 595 nm mit Bradford Reagenz durchgeführt, sowie je 100 µl für eine Immunkomplex Detektion unspezifisch auf eine Elisa-Platte gebunden und analysiert:

Tabelle 3-9: Gewinnung von Immunkomplexen; Messung der Proteinkonzentration der Fraktionen, sowie Detektion der Immunkomplexe im ELISA

Fraktion	Bradford -Reagenz E ₅₉₅	Elisa E ₄₀₅
1	0,776	>3
2	0,831	2,098
3	0,552	>3
4	0,542	0,954
5	0,527	0,440
6	0,486	0,196

Die Fraktionen 1-3 scheinen ausreichend Immunkomplexe zu enthalten, Aliquote dieser Fraktionen wurden für die Versuche eingesetzt.

Als einziges chromatographisches Verfahren zur Trennung von Peptid und Antikörper wurde die Absorption der Peptide an Biogel P 2 versucht. Hierzu wurden die Immunkomplexe in 100 mM Citrat-Puffer pH 2 aufgenommen und auf eine Biogel P 2-Säule (SV 2 ml) gegeben, die Elution erfolgte mit 50 mM Phosphat-Puffer pH 7,3, die Eluate wurden sofort auf pH 7,5 titriert. Der Gehalt an Antikörper wurde im Elisa analysiert, jedoch war es nicht möglich funktionsfähige Antikörper nachzuweisen.

Auch bei dieser Versuchsanordnung besteht ein relativ langer Kontakt zwischen Antikörper und Lösungspuffer, so daß ein weit fortgeschrittener Denaturierungsprozess für den fehlenden Nachweis funktioneller Antikörper verantwortlich sein könnte. Ebenfalls denkbar ist, daß wegen der Änderung des Milieus während der Elution die gelösten, noch nicht denaturierten Antikörper erneut an Peptide gebunden haben. Weniger wahrscheinlich scheint die Möglichkeit, daß die Bedingungen für eine Trennung nicht aggressiv genug waren. Um die Inkubationszeit mit dem Lösungspuffer, und damit den Denaturierungsprozess, besser kontrollieren zu können und um eine simultane Trennung der Moleküle unter Lösungsbedingungen zu gestatten, wurde nun ein Ultrafilter (Porengröße 30 kD) eingesetzt. Über diesen Ultrafilter können mit einer Tischzentrifuge innerhalb weniger Minuten Antigen und Lösungspuffer entfernt werden, während im Anschluß an die Zentrifugation eine sofortige Aufnahme des Retentates in Neutralisierungspuffer (100 mM Phosphat-Puffer pH 7,5) möglich ist. Bei dieser Versuchsanordnung finden sich die Antikörper im Retentat, die gelösten Peptide im Eluat.

Zur Trennung wurde erneut ein saures Milieu (100 mM Citrat-Puffer pH 2), ein alkalisches Milieu (100 mM Diethylamin pH 11,7), ein chaotropes Reagenz (3 M NaSCN), sowie der Elutionspuffer (1 M Imidazol) aus dem His•Bind® Kit (Fa Novagen, Darmstadt) eingesetzt.

Dazu wurden die Komplexe über den Ultrafilter auf ein Volumen von etwa 10 µl eingeeengt und dann 5 min mit jeweils 100 µl der oben genannten Puffer inkubiert. Nach Zentrifugation und Waschen (500 µl 100 mM Phosphat-Puffer pH 7,5) wurden die Antikörper in Phosphat-Puffer aufgenommen, Aliquote von Retentat und Eluat wurden auf ihren Gehalt an Antikörper respective Peptid 1 untersucht.

Aus der Abbildung 3-15 ist ersichtlich, daß mit Imidazol, wie auch mit Diethylamin einerseits eine gute Lösung des Peptids aus dem Immunkomplex möglich ist, sowie andererseits eine Abtrennung der Peptide mit der vorgestellten Methode gewährleistet ist. Allerdings können keine funktionellen Antikörper nachgewiesen werden. Nach einer Komplexlösung mit Citrat-Puffer und in noch geringerem Maße auch mit Rhodanid, wurde bei der Analyse des Gehalts an funktionellen Antikörpern eine sehr schwache Extinktion gemessen. Hier scheinen also funktionelle, nicht denaturierte Antikörper im Retentat

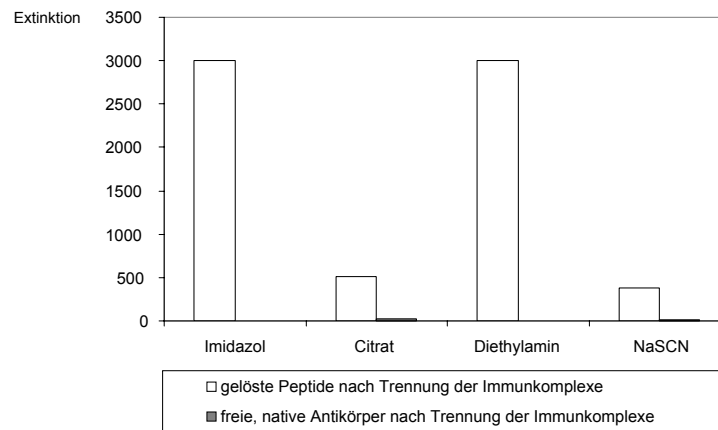


Abbildung 3-15: Nachweis gelösten Peptids 1 und nativer Antikörper nach Trennung der Immunkomplexe. Die Immunkomplexe wurden mit den angegebenen Substanzen inkubiert, eine Trennung erfolgte über Ultrafiltration. Zum Nachweis von Peptid 1 wurden Proben der Eluate unspezifisch auf Mikrotiterplatten gebunden und durch Elisa nachgewiesen. Zum Nachweis funktionsfähiger Antikörper wurden Proben der Retentate unter Elisa-Standardbedingungen als Erst-Antikörper gegen Peptid 1 eingesetzt.

vorhanden gewesen zu sein. Allerdings konnten die Komplexe unter diesen Bedingungen ebenfalls nur in geringem Maße gelöst werden (siehe gelöstes Peptid).. Die Avidität des Antikörpers scheint also so hoch zu sein, daß eine Lösung der Bindung nur unter denaturierenden Bedingungen stattfindet, möglicherweise löst sich das Antigen vom Epitop erst zu einem Zeitpunkt, wo der Denaturierungsprozess bis zur Unbrauchbarkeit des Antikörpers fortgeschritten ist. Folglich scheint eine affinitätschromatographische Reinigung mit diesen Peptiden nicht möglich zu sein.

4 Diskussion

Die Erkrankungen, die man zu den peroxisomalen Stoffwechselstörungen zählt, wurden zu einem Zeitpunkt beschrieben, als ihre Assoziation zu den Peroxisomen noch unbekannt war. Die damalige Namensgebung, die eine Klassifikation anhand von klinischen Merkmalen versuchte, läßt keine Rückschlüsse auf die biochemischen und genetischen Defekte zu, die nun bei der Klassifikation immer mehr in den Vordergrund rücken. Im Allgemeinen lassen sich die peroxisomalen Stoffwechselstörungen in drei Gruppen einteilen. Erstens ist die Gruppe der Erkrankungen abzugrenzen, denen eine Biogenesestörung mit der Folge einer Globalinsuffizienz der Peroxisomen zugrunde liegt. Vertreter sind das ZS, die NALD und die IRD. Zweitens finden sich eine ganze Reihe von Erkrankungen, bei denen einzelne Stoffwechselwege unterbrochen sind und es zur Akkumulation oder zu einem Mangel an bestimmten Substanzen kommt. Dieser Gruppe, zu der zum Beispiel die X-ALD, der M. Refsum, die Akatalasämie und die Hyperoxalurie Typ 1 gehören, liegt ein Defekt jeweils eines Enzyms zugrunde. Und schließlich läßt sich drittens ein Syndrom abgrenzen, bei dem mehrere Stoffwechselwege betroffen sind. Dieses Syndrom, die RCDP, wird durch einen defekten Import der Matrixproteine verursacht, die ein peroxisomales targeting signal Typ 2 besitzen. Zu beachten ist, daß das klinische Bild der rhizomelischen Chondrodysplasia punctata auch durch einen isolierten Defekt in der Plasmalogensynthese verursacht werden kann und in diesem Fall dann eine Erkrankung der zweiten Gruppe darstellen würde.

Der Import der peroxisomalen Matrixproteine wird, soweit zur Zeit bekannt, über Targeting-Signale gesteuert, die sich N- oder C-Terminal in der Aminosäuresequenz der Proteine befinden. Hierbei scheint das C-terminale Tripeptid –SKL (und/oder sehr ähnliche Aminosäuren), die PTS 1, für die weitaus größere Anzahl der Matrixproteine zu kodieren, was mit der Beobachtung konform geht, daß ein Ausfall dieses Import-Weges mit einer annähernd kompletten Blockierung des peroxisomalen Stoffwechsels einher geht (siehe auch Einleitung). Für den Import über die N-terminale PTS 2, die durch die –R/K-L/VI-X₅-H/Q-L/A-Konsensussequenz charakterisiert ist, sind derzeit nur drei Beispiele bekannt, die β -Ketothiolase, die Alkyl-DHAP-Synthase und die Phytanoyl-CoA-Hydroxylase.

Ein wertvolles Hilfsmittel für die Untersuchung sowohl der normalen peroxisomalen Biogenese als auch ihrer Störung durch erbliche Defekte beim Menschen war die Analyse induzierter Mutanten von Zellen anderer Spezies. Zahlreiche wichtige Grundlagen wurden anhand von mutanten Hefestämmen (*S.cerevisiae*, *H.polymorpha* u.a.) erarbeitet^{85,86,87}.

Obwohl sie noch als recht einfache Eukaryonten gelten, besitzen Hefepilze einen Peroxisomen-Biogenesemechanismus, der dem höherer Eukaryonten, selbst dem der Säuger, biochemisch wie genetisch sehr ähnlich ist. Allerdings bestehen auch charakteristische Unterschiede. So bilden Hefen ihre Peroxisomen nur aus, wenn sie benötigt werden, beispielsweise wenn als einzige Kohlenstoffquelle langkettige Fettsäuren angeboten werden. Für nähere Untersuchungen, die bessere Rückschlüsse auf die Vorgänge beim Menschen zulassen, werden daher experimentelle Modelle benötigt, die die Situation im menschlichen Organismus genauer wiedergeben.

Ein solches Modell stellen die von Tsukamoto et al. (1991)⁸⁸ etablierten Ovarialzellen chinesischer Zwerghamster (chinese hamster ovary cells. CHO-Zellen) mit Defekten der Peroxisomen-Biogenese dar.

Solche Modelle wurden für Komplementierungsstudien mit Fibroblasten aus Biopsien von Patienten mit PBDs herangezogen, wobei 12 verschiedene Komplementierungsgruppen beschrieben wurden. Die Klonierung der betroffenen Gene wurde durch Transfektionsversuche mit Kandidaten-cDNAs ermöglicht, was zur Identifizierung der bei der Biogenese beteiligten Proteine, ebenso wie die Identifizierung der am PTS 1-Import beteiligten Strukturen führte (siehe Einleitung).

Auch für den PTS 2-Import sind ähnlich komplexe physiologische Vorgänge zu vermuten. Um mutante CHO-Zellen mit möglichem PTS 2-Import-Defekt charakterisieren zu können, damit diese dann ebenfalls für Komplementierungsstudien und Transfektionsversuche mit cDNA einsetzbar sind, mußte ein Test entwickelt werden, der den Import über die PTS 2 erfaßt.

Der Vorteil eines enzymatischen Tests gegenüber anderen Verfahren, etwa immunchemischen Nachweisen, ist der, daß sich nicht nur qualitative, sondern auch sehr gute quantitative Aussagen machen lassen.

Als Indikator-Enzym wurde die Phytanoyl-CoA-Hydroxylase gewählt, da ihre Substrat-Vorstufe in Form radioaktiv markierter Phytansäure aus anderen Untersuchungen (Fingerhut, 1994)⁸⁹ zur Verfügung stand und das Enzym als solches mittlerweile gut charakterisiert war (Mihalik et al, 1997)⁸¹. Es handelt sich dabei um eine Dioxygenase, die als Cofaktoren Fe^{2+} und α -Ketoglutarat benötigt und durch das *PAHX*-Gen kodiert wird. Ein Ausfall dieses Enzyms beim M. Refsum ist mit einer Akkumulation von Phytansäure assoziiert. Da es keine andere effiziente Möglichkeit zum Abbau oder zur Ausscheidung von Phytansäure bei Refsum-Patienten gibt, kommt es bei ihnen bis zum zweiten Lebensjahrzehnt zur exzessiven Phytansäureanhäufung, die bis zu 1/3 des

Körpergesamtfettes betragen kann. Für diagnostische Zwecke kann die Phytansäure im Serum von Patienten bei einer Analyse aller Fettsäuren nachgewiesen und quantifiziert werden.

Experimentell ermöglicht die radioaktive Markierung der Fettsäure nun eine einfache und sensitive Detektion von Edukt und Produkt, ohne daß eine Isolierung der Phytansäure und α -Hydroxyphytansäure von Lipiden und anderen Fettsäuren notwendig gewesen wäre. Hierdurch war es möglich, auch geringe Umsätze einfach und schnell zu erfassen und zu quantifizieren. Die Markierung befand sich in 2,3-Stellung in Form von Tritium, die durch katalytische Hydrierung von Phytansäuremethylester mit Palladium/[³H]Wasserstoff nach einer Methode von Schwarzmann (1978)⁹⁰ von Ralf Fingerhut durchgeführt wurde und im Labor zur Verfügung stand.

Die Aktivierung der Fettsäure zum Thioester, als Voraussetzung zur Umsetzung durch die Hydroxylase, wird durch Inkubation mit Mikrosomen erreicht (Mihalik et al., 1995)³⁸ oder muß durch eine vorhergehende Synthese erfolgen. Letzteres ist insofern sehr praktikabel, als daß der wasserlösliche Thioester einfacher zu handhaben ist und demnach die Solubilisierung der Fettsäure entfällt. Die Synthese folgte einem Verfahren nach Rasmussen et al. (1990)⁸⁰, wobei Phytansäure über die Zwischenstufe eines Acyl-Kohlensäureethylesteranhydrids zu Phytanoyl-CoA umgesetzt wurde. Aktivität und Ausbeute wurden über eine Messung im Flüssigkeitsszintillationszähler ermittelt.

Zunächst wurde nun versucht, einen ausreichend empfindlichen Test zur Messung der Enzymaktivität auch in wenig aktiven Präparaten wie subzellulären Fraktionen kultivierter Zellen zu etablieren.

Für die Messung selbst wurde ein bereits beschriebenes Verfahren mit radioaktivem Substrat übernommen³⁸ und zunächst mit Homogenaten aus Rattenleber optimiert. Dabei zeigte sich, daß mit Inkubationszeiten von mehr als 30 min bei 37 °C keine wesentlich höheren Umsätze erzielt wurden. Der Nachweis von Produkt und Edukt konnte dünnschichtchromatographisch über Kieselgel 60 mit einem Laufmittel aus Hexan/Ethylester/Essigsäure (50/10/1) erfolgen.

Dabei stimmten die Laufstrecken von Produkt und Edukt mit vorhandenen Standards für α -Hydroxyphytansäure und Phytansäure überein. Zum unabhängigen Nachweis, daß bei der Reaktion tatsächlich die Hydroxylierung von Phytansäure gemessen wird, wurde das zum Methylester umgesetzte Reaktionsprodukt gaschromatographisch analysiert.

Bei der Optimierung der Versuchsbedingungen wurde auch getestet, ob die Reaktion ohne die Kofaktoren ATP und CoA ablaufen kann, da diese für die Aktivierung der Fettsäure

benötigt werden, jedoch dieser Schritt bei Verwendung von Phytanoyl-CoA entfallen sollte. Unter diesen Bedingungen findet in einem Homogenat kein messbarer Umsatz statt. Zunächst wurde eine unspezifische Aktivität von Hydrolasen im Homogenat vermutet, die die eingesetzten Thioester spalten könnten, so daß ohne eine erneute Aktivierung mit zugegebenem ATP, keine Umsetzung von Phytansäure stattfinden kann. Dagegen sprach die Beobachtung, daß diese Abhängigkeit ebenfalls in subzellulären Fraktionen von Rattenleberhomogenat, wie auch in angereicherten Enzymquellen auftritt, in welchen die Aktivität der Hydrolasen wesentlich geringer sein sollte. In weiteren Versuchen wurde nun die Wirkung des ATPs durch Untersuchung des Einflusses weiterer Nukleotide auf die Reaktion getestet. Zum Einsatz kamen GTP, AMP und ein unspaltbares ATP-Analogon, AMP-PNP. Hierbei zeigte sich, daß AMP-PNP als einziges in der Lage ist, eine, wenn auch reduzierte, Aktivität der Hydroxylase in der Reaktion zu erhalten. Dies könnte damit erklärt werden, daß eine Spaltung von AMP-PNP in AMP und PNP ohne anschließende Hydrolyse von PNP dennoch für bestimmte Reaktionen ausreicht, oder, daß AMP-PNP sterisch die Rolle von ATP übernehmen kann. Da jedoch nur Tests mit gereinigtem Enzym Aufschluss über die Ursache dieser ATP-Abhängigkeit bringen würden und dieses den Rahmen der Arbeit gesprengt hätte, konnte die Klärung nicht weiter verfolgt werden.

Allerdings zeigte es sich nun, daß die spezifische Aktivität von CHO-Zellen und menschlichen Fibroblasten wesentlich geringer ist als die von Lebergewebe sowie subzellulären Fraktionen von Lebergewebe und daß deswegen eine Messung unter Homogenatbedingungen mit den vorgestellten Methoden nicht möglich war. Aufgrund des Vorteils einer Quantifizierung des Umsatzes bei enzymatischen Messungen und der Möglichkeit, daraufhin Rückschlüsse auf Unterschiede in der Aktivität verschiedener Allele der Hydroxylase zuzulassen, wurde dieser Weg nicht gleich verlassen, sondern statt dessen nach sensitiveren Nachweismethoden gesucht. Dies schien insbesondere deswegen erfolgversprechend, da bekannt ist, daß die Messausbeute im Radiodünnschichtscanner besonders gering ist (etwa 10%) und deswegen aufgrund des schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses geringe Aktivitäten kaum noch messbar sind. Insofern ist eine Messung im Flüssigkeitsszintillationszähler günstiger, da die wesentlich größere Messausbeute geringe Verluste durch aufwendigere Trennungsvorgänge sicher überkompensiert. Zusätzlich wurde versucht, durch Messung der Radioaktivität der wässrigen Phase im Szintillationszähler das abgespaltene Tritium-Wasser zu messen. Jedoch konnten auch mit diesem Vorgehen keine eindeutigen Aussagen über Umsatzraten in CHO-Zellen und humanen Fibroblasten getroffen werden.

Die Messung der Enzymaktivität anhand der Bestimmung des freigesetzten Tritium-Wassers hätte sich zwar eventuell noch etwas empfindlicher gestalten lassen, etwa durch eine Abtrennung der Lipide durch Umkehrphasenchromatographie (Schmitz, 1994)⁸³, sie erwies sich aber als unzuverlässig, weil auch andere Enzyme $^3\text{H}_2\text{O}$ aus dem verwendeten Substrat freisetzen. Insbesondere die α -Methylacyl-CoA-Racemase, die α -Methylfettsäuren durch Austausch der α -Protonen racemisiert (Schmitz et al., 1994)⁹¹, reagiert, wenn auch wesentlich langsamer, ebenfalls mit β -methylverzweigten Substraten, wie der Phytansäure. In der Tat konnte W. Schmitz (1994) zeigen, daß eine Hemmung dieses Enzyms die Ausbeute an Tritium-Wasser stark verringert, folglich würden die Messungen durch die Aktivität der Racemase erheblich verfälscht werden.

Alternativ zum enzymatischen Nachweis wurde nun eine immunochemische Detektion angestrebt. Dabei war es zunächst erforderlich, eine Entscheidung bezüglich der Speziespezifität zu treffen. Zwar war zu erwarten, daß ein anti-Hydroxylase-Antikörper speziesübergreifend kreuzreagiert, da aber insbesondere die geplanten Komplementierungsversuche mit CHO-Zellen durchgeführt werden sollten, wurde die Generierung eines anti-Hamster-Hydroxylase-Antikörpers angestrebt. Prinzipiell stehen hierzu mehrere Möglichkeiten offen. Die nächstliegende Möglichkeit, die Reinigung der Hydroxylase aus Hamstergewebe wurde auch deswegen nicht weiterverfolgt, weil im Labortierbedarf keine chinesischen Zwerghamster (*Cricetulus griseus*) erhältlich waren.

Als nächstes kam die Klonierung der cDNA aus einer Hamster-cDNA-Bank in Betracht. Das Enzym hätte dann in *Escherichia coli* exprimiert, anschließend gereinigt und zur Immunisierung herangezogen werden können. Dies scheiterte aber daran, daß in keiner der verfügbaren cDNA-Banken die volle Länge der Hydroxylase-cDNA zu finden war. Ein offenes Leseraster mit hoher Homologie der Sequenzen von Hamster und Maus findet sich ab dem 178sten Basenpaar nach dem vermuteten Startcodon bis zum Stoppcodon (TGA). Ab bp 178 in Richtung Startcodon konnte noch ein Abschnitt von 82 weiteren Basen sequenziert werden, der jedoch keine Ähnlichkeit mit der humanen und murinen Sequenz aufweist, am 5'-Ende aber mit dem Vektor homolog ist. Es scheint also so zu sein, daß in der verfügbaren cDNA-Bank das 5'-Ende nicht enthalten ist.

Zur Verfügung stand damit lediglich eine partielle Sequenz, die aber für den angestrebten Zweck nutzbar war. Es wurden die Abschnitte mit statistisch hoher Immunogenität identifiziert als Peptide synthetisiert. Die Auswahl und Synthese der Peptide wurde von Herrn Prof. Dr. Palm durchgeführt. Nach einer Koppelung der Peptide an Träger wurde mit diesen Konjugaten neuseeländische weiße Kaninchen geimpft.

Nachdem die Antiseren in Elisa-Untersuchungen hohe Titer aufwiesen, wurde eine Detektion der Hydroxylasen vom Hamster und von der Ratte im Western Blot durchgeführt. Hierbei zeigten sich aber neben einer starken Bande in Laufweite der Hydroxylase zu viele weitere unspezifische Banden, so daß eine Affinitätschromatographie zur Isolierung der anti-Peptid-Antikörper durchgeführt wurde.

Für die Affinitätschromatographie wurden in einer erneuten Synthese die Peptid-Antigene mit einem N-terminalen Oligohistidin-Ende versehen, über das die Peptide an ein Nickelharz gebunden werden konnten. Nach Inkubation mit dem Antiserum banden die Antikörper die durch den Nickel-Histidin-Komplex immobilisierten Antigene auf der Säule. Hier tauchte nun das Problem auf, daß die Antikörper extrem fest an die Peptide binden und deswegen praktisch nicht mehr isoliert werden können. Nachweislich ist eine Elution der Antigen-Antikörper-Komplexe möglich. Diese Antikörper reagieren jedoch nicht im Westernblot, da sie durch ihre gebundenen Peptide blockiert werden. Alle Versuche, diese Komplexe zu trennen, blieben erfolglos, denn unter Bedingungen, unter denen die Bindung sich löst, denaturieren die Antikörper irreversibel.

Es ist nun geplant, durch Epitop-mapping Peptide zu identifizieren, die die Antikörper zwar noch spezifisch binden, aber mit wesentlich geringerer Avidität, so daß sie sich für eine Affinitätschromatographie eignen und eine Reinigung des Antikörpers ermöglichen. Aus zeitlichen Gründen war es aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr möglich, diesen Ansatz weiter zu verfolgen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde nach Wegen gesucht, den Import peroxisomaler Matrixproteine, der über ein peroxisomales Targeting Signal Typ 2 gesteuert wird, zu messen. Es war vorgesehen, in erster Linie einen enzymchemischen Nachweis zu etablieren, da diese Methode den Vorteil einer Quantifizierbarkeit der Aktivität der gemessenen Enzyme bietet und somit Rückschlüsse auf den Grad einer Beeinträchtigung des Importes zulassen würden.

Von dem Test wurde eine Sensitivität gefordert, die eine Messung auch in Homogenaten kultivierter Zellen, insbesondere von CHO-Zellen, erlaubt. Dieses war deswegen gefordert, weil der Test zur Charakterisierung induzierter CHO-Zell-Mutanten eingesetzt werden sollte, die die Merkmale eines PTS 2-Import-Defektes aufweisen. Dieser Nachweis sollte durch eine Messung der Phytanoyl-CoA-Hydroxylase erfolgen. Dieses Enzym ist eines von drei derzeit bekannten Proteinen, die eine PTS 2 besitzen und über diesen Weg importiert werden.

Das Substrat für die Hydroxylase war als Phytansäure mit einer 2,3-³H-Markierung in der Arbeitsgruppe vorrätig und wurde für den Test zum CoA-Thioester chemisch umgesetzt.

Nach erfolgter enzymatischer Umsetzung von Phytanoyl-CoA zu α -Hydroxyphytanoyl-CoA durch die Hydroxylase waren dann sowohl Edukt wie auch das Produkt durch eine radioaktive Markierung gekennzeichnet und konnten nach einer dünn-schicht-chromatographischen Trennung über Kieselgel durch einem Radiodünn-schicht-scanner nachgewiesen werden.

Zunächst wurde mit Hilfe von Homogenaten aus Rattenlebergewebe ein bereits beschriebenes Verfahren zur Messung der Phytanoyl-CoA-Hydroxylase optimiert. Es stellte sich jedoch heraus, daß die Sensitivität dieses Testes nicht hoch genug ist, um die Hydroxylase-Aktivität in Homogenaten kultivierter CHO-Zellen zu messen.

An dieser Stelle wurde die Etablierung eines immunchemischen Nachweises begonnen. Hierzu sollten Antikörper gegen die Hydroxylase des chinesischen Zwerghamsters, des Ursprungsorganismus der CHO-Zellen, generiert werden.

Eine Reinigung des Enzyms kam nicht in Betracht, weil die Hamster nicht im Labortierhandel erhältlich waren. Folglich musste die cDNA der Hydroxylase aus einer Hamster-cDNA-Bank kloniert werden, nachdem sie durch ihre bekannten Homologe aus Mensch und Maus identifizierbar war.

In den verfügbaren cDNA-Banken fand sich keine vollständige Sequenz, so daß mit einer partiellen Sequenz ohne 5'-Ende weitergearbeitet werden musste. Es bot sich im Institut die Möglichkeit, aus dieser Sequenz Peptide zu bestimmen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit stark immunogen wirken. Solche Peptide wurden synthetisiert und nach Koppelung an Trägerproteine neuseeländischen weißen Kaninchen geimpft.

Im Elisa wies das Antiserum zum Zeitpunkt seiner Gewinnung einen Titer von etwa 1:10000 auf, zeigte aber im Westernblot neben einer starken Detektion in Laufweite der Hydroxylase auch eine unspezifische Anfärbung der Proben.

In der nun durchgeführten Affinitätsreinigung des Antiserums über einer mit den antigenen Peptiden beladenen Säule tauchte das Problem auf, daß die Antikörper so fest binden, daß sie von ihren Antigenen nicht mehr ohne denaturierende Bedingungen zu lösen waren.

Für die weitere Arbeit sollte sich nun eine affinitätschromatographische Reinigung über Peptide, die den Antikörper mit geringerer Avidität binden, anschließen, so daß nach Trennung der Immunkomplexe native Antikörper isoliert werden könnten. Hierzu wäre ein Epitop-mapping wünschenswert, damit auf dieser Grundlage Peptide mit den geforderten Eigenschaften synthetisiert werden können.

6 Anhang

6.1 Proteinsequenzvergleich der Phytanoyl-CoA-Hydroxylase aus Mensch, Maus und Hamster

Mensch	1	ATG	GAG	CAG	CTT	CGC	GCC	GCC	GCC	CGT	CTG	CAG	ATT	GTT	CTG	GGC	CAC	48
Maus		ATG	AAA	CTT	ACG	CGC	GCC	GCC	GCC	CGG	CTG	CAG	GTC	CTT	CTG	GGA	CAC	
	1	M	E	Q	L	R	A	A	A	R	L	Q	I	V	L	G	H	16
		M	K	L	T	R	A	G	A	R	L	Q	V	L	L	G	H	
Mensch	49	CTC	GGC	CGC	CCC	TCG	GCC	GGG	GCT	GTC	GTA	GCT	CAT	CCC	ACT	TCA	GGG	96
Maus		CTC	GGC	CGA	CCC	TCG	GCT	CCA	ACG	ATT	GTA	GCC	CAG	CCT	GTA	TCA	GGG	
Hamster																GCN	ACN	
	17	L	G	R	P	S	A	G	A	V	V	A	H	P	T	S	G	32
		L	G	R	P	S	A	P	T	I	V	A	Q	P	V	A	T	
Mensch	97	ACT	ATT	TCC	TCT	GCC	AGT	TTC	CAT	CCT	CAA	CAA	TTC	CAG	TAT	ACT	CTG	144
Maus		TTG	GCT	TCC	CCT	GCC	AGT	TTC	CAG	CCT	GAA	CAA	TTC	CAG	TAT	ACT	CTG	
Hamster		TTT	TTG	GCC	CTC	TAN	AGC	TGC	TCG	AAC	GGC	CGC	CAT	GTG	ATG	GAT	ATC	
	33	T	I	S	S	A	S	F	H	P	Q	Q	F	Q	Y	T	L	48
		L	A	S	P	A	S	F	Q	P	E	Q	F	Q	Y	T	L	
		F	L	A	L	X	S	C	S	N	G	R	H	V	M	D	I	
Mensch	145	GAT	AAT	AAT	GTT	CTA	ACC	CTG	GAA	CAG	AGA	AAA	TTT	TAT	GAA	GAA	AAT	192
Maus		GAT	AAT	AAT	GTC	CTC	ACC	CTG	GAG	CAG	AGA	AAA	TTT	TAT	GAA	GAA	AAT	
Hamster		TGC	AGA	ATT	CGG	CTT	AAC	CTG	GAC	AGT	GTA	AAA	CTC	TAT	GAA	GAA	AAT	
	49	D	N	N	V	L	T	L	E	Q	R	K	F	Y	E	E	N	64
		D	N	N	V	L	T	L	E	Q	R	K	F	Y	E	E	N	
		C	R	I	R	L	N	L	D	S	V	K	L	Y	E	E	N	
Mensch	193	GGG	TTT	CTA	GTA	ATC	AAA	AAT	CTT	GTA	CCT	GAT	GCC	GAT	ATT	CAA	CGC	240
Maus		GGG	TTT	CTC	GTC	ATT	AAG	AAT	CTG	GTA	TCT	GAT	GAT	GAC	ATT	CAA	CGT	
Hamster		GGA	TTT	CTT	GTC	ATA	AAA	AAT	CTG	GTA	TCT	GAT	GAT	GAC	ATT	CAA	CGT	
	65	G	F	L	V	I	K	N	L	V	P	D	A	D	I	Q	R	80
		G	F	L	V	I	K	N	L	V	S	D	D	D	I	Q	R	
		G	F	L	V	I	K	N	L	V	S	D	D	D	I	Q	R	
Mensch	241	TTT	CGG	AAT	GAG	TTT	GAA	AAA	ATC	TGC	AGA	AAG	GAG	GTG	AAA	CCA	TTA	288
Maus		TTT	CGA	GCA	GAG	TTT	GAA	AGA	ATC	TGC	AGA	GAG	GAG	GTG	AAA	CCA	CCA	
Hamster		TTT	CGA	GAG	GAG	TTT	GAA	AGA	ATC	TGC	AGA	AAG	GAG	GTA	AAG	CCA	CCA	
	81	F	R	N	E	F	E	K	I	C	R	K	E	V	K	P	L	96
		F	R	A	E	F	E	R	I	C	R	E	E	V	K	P	P	
		F	R	E	E	F	E	R	I	C	R	K	E	V	K	P	P	

Mensch Maus Hamster	289	GGA TTA ACA GTA ATG AGA GAT GTG ACC ATT TCG AAA TCC GAA TAT GCT	336
		GGG ATC GTT ATA ATG AGA GAT GTG GCC CTT GCA AAA CAG GAT TAT ATG	
		GGG ATA TTT CTA ATG AAA GAT GTG GCC ATT GCA AAA CAG GAT TGT ACA	
	97	G L T V M R D V T I S K S E Y A	112
		G I V I M R D V A L A K Q D Y M	
		G I F L M K D V A I A K Q D C T	
Mensch Maus Hamster	337	CCA AGT GAG AAG ATG ATC ACG AAG GTC CAG GAT TTC CAG GAA GAT AAG	384
		CCA AGT GAT AGG ATG GTT TCA AAG ATC CAG GAT TTC CAA GAA GAT GAG	
		CTA AAT GAG AAA GTG ATT ACG AAG ATC CAG GAT TTC CAA GAA GAC GAG	
	113	P S E K M I T K V Q D F Q E D K	128
		P S D R M V S K I Q D F Q E D E	
		L N E K V I T K I Q D F Q E D E	
Mensch Maus Hamster	385	GAG CTC TTC AGA TAC TGC ACT CTC CCC GAG ATT CTG AAA TAT GTG GAG	432
		GAG CTC TTC AGA TAC TGC CTT CTC CCC GAG ATT CTG AAG TAT GTG GAG	
		GAG CTC TTT AGA TAC TGC ACC CTC CCC CAG ATT CTG AAA TAT GTG GAG	
	129	E L F R Y C T L P E I L K Y V E	144
		E L F R Y C L L P E I L K Y V E	
		E L F R Y C T L P Q I L K Y V E	
Mensch Maus Hamster	433	TGC TTC ACT GGA CCT AAT ATT ATG GCC ATG CAC ACA ATG TTG ATA AAC	480
		TGT TTC ACT GGA CCC AAT ATT ATG GCT CTG CAT GGG ATG CTG ATC AAC	
		TGT TTC ACT GGA CCC AAT ATC ATG GCT ATG CAC ACA ATG CTG ATA AAC	
	145	C F T G P N I M A M H T M L I N	160
		C F T G P N I M A L H G M L I N	
		C F T G P N I M A M H T M L I N	
Mensch Maus Hamster	481	AAA CCT CCA GAT TCT GGC AAG AAG ACG TCC CGT CAC CCC CTG CAC CAG	528
		AAG CCT CCA GAT GTT GGC AAG AAG ACA TCC CGG CAT CCC TTG CAT CAG	
		AAA CCT TCA GAT TCT GGC AAG AAG ACA TCT CGG CAC CCC TTG CAT CAG	
	161	K P P D S G K K T S R H P L H Q	176
		K P P D V G K K T S R H P L H Q	
		K P S D S G K K T S R H P L H Q	
Mensch Maus Hamster	529	GAC CTG CAC TAT TTC CCC TTC AGG CCC AGC GAT CTC ATC GTT TGC GCC	576
		GAT CTG CAC TAT TTC CCC TTC CGA CCT AGC AAC CTA ATT GTT TGT GCT	
		GAT CTG CAC TAC TTC CCC TTC CGT CCC AGC GAT CGC ATT GTT TGT GCT	
	177	D L H Y F P F R P S D L I V C A	192
		D L H Y F P F R P S N L I V C A	
		D L H Y F P F R P S D R I V C A	
Mensch Maus Hamster	577	TGG ACG GCG ATG GAG CAC ATC AGC CGG AAC AAC GGC TGT CTG GTT GTG	624
		TGG ACA GCC ATG GAG CAC ATT GAC AGA AAC AAC GGT TGT CTG GTT GTG	
		TGG ACC GCC ATG GAG CAC GTT GAC ACA AAC AAC GGT TGT CTG GTT GTG	
	193	W T A M E H I S R N N G C L V V	208
		W T A M E H I D R N N G C L V V	
		W T A M E H V D T N N G C L V V	
Mensch Maus Hamster	625	CTC CCA GGC ACA CAC AAG GGC TCC CTG AAG CCC CAC GAT TAC CCC AAG	672
		CTC CCA GGT ACC CAC AAA GGC ACT CTG AAG CCA CAT GAT TAC CCC AAG	
		CTC CCA GGC ACC CAC AAA GGC ACT CTG AAG CCA CAT GAT TAC CCC AGC	
	209	L P G T H K G S L K P H D Y P K	224
		L P G T H K G T L K P H D Y P K	
		L P G T H K G T L K P H D Y P S	

6.2 Abkürzungen

Verwendete Abkürzungen (außer SI-Einheiten):

AAA	ATPase associated with diverse cellular activities
abs	absolut
Ac	Acetyl-
AS	Aminosäure
Ak	Antikörper
ALD	Adrenoleukodystrophie
ALP	alkalische Phosphatase
APS	Amoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloroindoxyolphosphat
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	bovines Serumalbumin
c	Konzentration
cDNA	mRNA komplementäre DNA
CHO	chinese hamster ovary
CoA	Coenzym A
cpm	counts per minute
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diethylaminoethyl-
DH	Dehydrogenase
DHCA	3 α ,7 α -Dihydroxy-5 β -cholestan-26-Säure
DHAP-AT	Dihydroxyacetonphosphat-Acyl-Transferase
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ddNTP	2',3'-Didesoxy-Nucleosid-5'-Triphosphat
dNTP	Desoxynucleosid-5'-Triphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA

<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Essigsäureethylester
Elisa	enzyme linked immunosorbend assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCA	komplettes Freud'sches Adjuvans
FIA	inkomplettes Freud'sches Adjuvans
F	Fraktion
FS	Fettsäure
GC	Gaschromatographie
grav,g	Gravitationskraft
HA	Hydroxyapatit
HMS	high molecular standard (DNA-Größenstandard)
HPLC	Hockdruck-Flüssigkeitschromatographie
hum, h	human
i.m.	intramuskulär
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalactopyranosid
IRD	infantile Refsum-Disease
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth
LCFA	longchain fatty acid
LM	Lösungsmittel
LMS	<i>low molecular Standard</i> (DNA-Größenstandard)
Lsg	Lösung
MeOH	Methanol
MRNA	messenger RNA
NALD	neonatale Adrenoleukodystrophie
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OD _x	polyacrylamide-gelelectrophoresis
Phytansäure	3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäure
Phytol	3,7,11,15-Tetramethylhexadec-2-en-1-ol
PNPP	para-Nitrophenolphosphat
Pristansäure	2,6,10,14-Tetramethylpentadecansäure
PTS	peroxisomal targeting signal

RCDP	rhizomelische Chondrodysplasia punctata
R _F	relative Front
Rkt.	Reaktion
RP	reversed phase
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
Sacc.	Saccharose
s.c.	subcutan
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SV	Säulenvolumen
TB	Tris-buffered-saline
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin
THCA	3 α ,7 α ,12 α -Trihydroxy-5 β -Cholestan-26-Säure
Tris	Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan
rpm	Umdrehung pro Minute
U	Unit [μ mol/min]
ÜNK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolett
VLCFA	very long chain fatty acid (überlangkettige Fettsäure)
ZS	Zellweger-Syndrom (Cerebrohepatorenales Syndrom)

Die Ein- und Dreibuchstabenabkürzungen für die jeweiligen Aminosäuren entsprechen den Richtlinien der UIPAC-IUB-Kommission für Biochemische Nomenklatur [*Eur.J.Biochem.* (1984) **138**,9.

7 Literaturverzeichnis

- ¹ Rhodin, J. (1954) Dissertation, Karolinska Institut, Stockholm, Akitbolaget Godvil.
- ² De Duve, C., Beaufay, H., Jacques, P., Rahman-Li, Y., Sellinger, O.Z., Wattiaux, R. und de Coninck, S. (1960) Intracellular localization of catalase and of oxidases in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **40**, 186-187
- ³ Goldfischer, S., Moore, C.L., Johnson, A.B., Spiro, A.J., Valsamis, M.P., Ritch, R.H., Wisniewski, H.K., Norton, W.T., Rapin, I. und Gartner, L.M. (1973) Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebro-hepato-renal syndrome. *Science* **182**, 62-64
- ⁴ Bowen, P., Lee, C.S.N., Zellweger, H. und Lindenberg, R. (1964) A familial syndrome of multiple congenital defects. *Bull. Johns. Hoppkins Hosp.* **114**, 402-414
- ⁵ Zellweger, H. (1987) The cerebro-hepato-renal (Zellweger) syndrome and other peroxisomal disorders. *Dev Med Child Neurol.* **29**, 821-829
- ⁶ Pederson, J.L. (1993) Peroxisomal oxidation of steroid side chain in bile acid formation. *Biochemie* **75**, 167-174
- ⁷ Kase, B.F., Prydz, K., Bjorkhem, I., Pederson, J.L. (1986) *In vitro* formation of bile acids from di- and trihydroxy-5 beta-cholestanoic acid in human liver peroxisomes. *Biochem. Biophys. Acta* **877**, 37-42
- ⁸ Krisans, S.K., Thompson, S.L., Pena, L.A., Kok, E., Javitt, N.B. (1985) Bile acid synthesis in rat liver peroxisomes: metabolism of 26-hydroxycholesterol to 3 beta-hydroxy-5-cholenoic acid. *Lipid Res.* **26**, 1324-1332
- ⁹ Casteels, M., Schepers, L., van Eldere, J.R., Eyssen, H.J., Mannaerts, G.P. (1988) Inhibition of 3 alpha, 7 alpha, 12 alpha-trihydroxy-5 beta-cholestanoic acid oxidation and of bile acid secretion in rat liver by fatty acids. *J. Biol. Chem.* **263**, 4645-4661
- ¹⁰ Ostlund Farrants, A.K., Bjorkhem, I., Pederson, J.L. (1992) Identification of 3 alpha, 7 alpha, 12 alpha-trihydroxy-5 beta-cholest-24 enoic acid as an intermediate in the peroxisomal conversion of 3 alpha, 7 alpha, 12 alpha-trihydroxy-5-beta-cholestanoic acid to cholic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **1002 (2)**, 198-202
- ¹¹ Russell, D.W., Setchell, K.D.R. (1992) Bile acid synthesis. *Biochem* **31**, 4737-4748
- ¹² Thompson, S.L., Burrows, R., Laub, R.J., Krisans, S.K. (1987) Cholesterol synthesis in rat liver peroxisomes. Conversion of mevalonic acid to cholesterol. *J. Biol. Chem.* **262**, 17420-17425
- ¹³ Thompson, S.L., Krisans, S.K. (1990) Rat liver peroxisomes catalyze the initial step in cholesterol synthesis. The condensation of acetyl-CoA units into acetoacetyl-CoA. *J. Biol. Chem.* **265**, 5731-5735
- ¹⁴ De Duve, C., Baudhuin, P. (1966) Peroxisomes (microbodies and related particles) *Physiol Rev* **46**, 323-357

- ¹⁵ Novikoff, A.B., Shin, W.Y. (1989) The endoplasmic reticulum in the golgi zone and its relations to microbodies, Golgi apparatus and autophagic vacuoles in rat liver cells. *J. Microsc* **3**, 187-206
- ¹⁶ Hruban, Z., Vigil, E.L., Slesers, A., Hopkins, E., (1972) Microbodies: Constituent organelles of animal cells. *Lab invest* **27**, 184-191
- ¹⁷ Lazarow, P.B., Fujiki, Y. (1985) Biogenesis of Peroxisomes *Annu. Rev. Cell Biol.* **1**, 485-530
- ¹⁸ Luers, G., Beier, K., Hashimoto, T., Fahimi, H.D., Volkl, A. (1990) Biogenesis of peroxisomes: Sequential biosynthesis of the membrane and matrix proteins in the course of hepatic regeneration *Eur. J. Cell. Biol.* **53**, 175-184
- ¹⁹ Baumgart, E., Volkl, A., Hashimoto, T., Fahimi, H.D. (1989) Biogenesis of peroxisomes: Immunocytochemical investigation of peroxisomal membrane proteins in proliferating rat liver peroxisomes and in catalase-negative membrane loops. *J. Cell. Biol.* **108**, 2221-2231
- ²⁰ Fahimi, H.D., Baumgart, E., Volkl, A. (1993) Ultrastructural aspects of the biogenesis of peroxisomes in rat liver. *Biochimie* **75**, 201-208
- ²¹ Heinemann, P., Just, W.W. (1992) Peroxisomal protein import. In vivo evidence for a novel translocation component compartment. *FEBS Letts* **330**, 179-182
- ²² Lazarow, P., B., Fujiki, Y. (1985) Biogenesis of Peroxisomes *Annu. Rev. Cell Biol.* **1**, 489-530
- ²³ Elgersma, Y., Tabak, H.F. (1996) Proteins involved in peroxisome biogenesis and functioning. *Biochim Biophys. Acta* **1286**, 269-283
- ²⁴ Subramani, S. (1998) Components involved in peroxisome biogenesis, proliferation, turnover and movement. *Physiol. Rev.* **78**, 171-188
- ²⁵ Dodt, G., Braverman, N., Wong, C., Moser, A., Moser, H.W., Watkins, P.A., Valle, D., Gould, S. (1995) Mutation in the PTS1 receptor gene, PXR1, define complementation group 2 of the peroxisome biogenesis disorders. *Nature Genet* **9**, 115-125
- ²⁶ Braverman, N., Steel, G., Obie, C., Moser, A., Moser, H., Gould, S.J., Valle, D. (1997) Human PEX7 encodes the peroxisomal PTS2 receptor and is responsible for rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Nature Genet* **15**, 369-376
- ²⁷ Purdue, P.E., Zhang, J.W., Skoneczny, M., Lazarow, P.B. (1997) Rhizomelic chondrodysplasia punctata is caused by deficiency of human PEX7, a homologue of the yeast PTS2 receptor. *Nature Genet* **15**, 381-384
- ²⁸ Motley, A.M., Hettema, E.H., Hogenhout, E.M., Brites, P., ten Asbroek, A., Wijburg, F.A., Baas, F., Heijmans, H.S., Tabak, H.F., Wanders, R., Distel, B. (1997) Rhizomelic chondrodysplasia punctata is a peroxisomal protein targeting disease caused by a non-functional PTS2 receptor. *Nature Genet* **15**, 377-380

- ²⁹ Singh, I. (1996) Biochemistry of peroxisomes in health and disease. *Mol Cell Biochem* **167**, 1-29
- ³⁰ Gould, S., Keller, G., Hosken, N., Wilkinson, J., Subramani, S. (1989) A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol* **108**, 1657-1664
- ³¹ Miura, S., Kasuya-Arai, I., Mori, H., Miyazawa, S., Osumi, T., Hashimoto, T., Fujiki, Y. (1992) Carboxyl-terminal consensus Ser-Lys-Leu-related tripeptide of peroxisomal proteins functions *in vitro* as a minimal peroxisome-targeting signal. *J Biol Chem* **267**, 14405-14411
- ³² Contreras, M., Singh, I., Yasutake, A., Yoshida, Y. (1991) Peroxisomal transport tripeptide signal and biogenesis of peroxisomes. *Trans Am Soc Neurochem* **22**, 56
- ³³ Osumi, T., Fujiki, Y. (1990) Topogenesis of peroxisomal proteins. *Bioessays* **12**(5), 217-222
- ³⁴ Swinkels, B.W., Gould, S.J., Bodnar, A.G., Rachubinski, R.A., Subramani, S. (1991) A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *EMBO J* **10**, 3255-3262
- ³⁵ Authier, F., Bergeron, J.M., Ou, W.J., Rabushinski, R., Posner, B.I., Walton, P.A. (1995) Degradation of the cleaved leader peptide of thiolase by a peroxisomal proteinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 3859-3863
- ³⁶ de Vet, E.C.J.M., Lodewijk, I.J., Oostheim, W., Wanders, R.J., van den Bosch, H. (1998) Alkyl-dihydroxyacetonphosphate synthase: Fate in peroxisome biogenesis disorders and identification of the point mutation underlying a single enzyme deficiency. *J Biol Chem* **273**(17), 10296-10301
- ³⁷ Jansen, G.A., Ofman, R., Ferdinandusse, S., Ijlst, L., Muijsers, A.O., Skjeldal, O.H., Stokke, O., Jakobs, C., Besley, G.T.N., Wraith, J.E., Wanders, R.J.A. (1997) Refsum disease is caused by mutations in the phytanoyl, CoA hydroxylase gene. *Nature Genet* **17**, 190-193
- ³⁸ Mihalik, S.J., Morell, S.J., Kim, D., Watkins, P.A., Gould, S.J. (1997) Identification of PAHX, a Refsum disease gene. *Nature Genet* **17**, 185-189
- ³⁹ Soto, U., Pepperkok, R., Ansorge, W., Just, W. (1993) Import of firefly luciferase into mammalian peroxisomes *in vivo* requires nucleotide triphosphate. *Expt Cell Res* **205**, 66-75
- ⁴⁰ Imanaka, T., Small, G., Lazarow, P (1987) Translocation of acyl-CoA oxidase into peroxisomes requires ATP hydrolysis but not a membrane potential. *J Cell Biol* **105**, 2915-1922
- ⁴¹ Wendland, M., Subramani, S. (1993) Cytosol-dependent peroxisomal protein import in permeabilized cell system. *J Cell Biol* **120**, 675-685
- ⁴² Walton, P, Wendland, M., Subramani, S., Rachubinski, S., Welch, W. (1994) Involvement of 70 kDa heat shock proteins in peroxisomal import. *J Cell Biol* **125**, 1037-1046
- ⁴³ Skerjanc, I.S., Sheffield, W.P., Randall, S.K., Sivijs, J.R., Shore, G.C. (1990) Import of precursor proteins into mitochondria: site of polypeptide unfolding. *J Biol Chem* **265**, 9444-9451

- ⁴⁴ Walton, P.A., Hill, P., Subramani, S. (1995) Import of stably folded proteins into peroxisomes. *Mol Biol Cell.* **6**, 675-683
- ⁴⁵ Ulrich, J., Hershkowitz, N., Heits, P., Sigrist, T., Baerlocher, P. (1978) Adrenoleukodystrophy: Preliminary report of a connatal case, light- and electron microscopical, immunohistochemical and biochemical findings. *Acta Neuropathol (Berl)* **43**, 77-83
- ⁴⁶ Scotto, J.M., Hadchouel, M., Odievre, M., Laudat, M.H., Saudubray, J.M., Dulac, O., Beucler, I., Beaune, P. (1982) Infantile phytanic acid storage disease: A possible variant of Refsum's disease: Three cases, including ultrastructural studies of the liver. *J Inher Metab Dis* **5**, 83-90
- ⁴⁷ Moser, H.W. (1997) Genotype-phenotype correlations in peroxisomal disorders. *Dev Brain Dysfunct* **10**, 282-292
- ⁴⁸ Moser, H.W. *Advances in Human Genetics*, Vol 21, H. Harris and K. Hirschhorn (eds). Plenum Press, New York, 1993
- ⁴⁹ Eaton, J.W. Acatalasemia. In: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle. (eds). *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, McGraw Hill Information Service Co., New York, 2: 1989, 1551-1561
- ⁵⁰ Williams, H.E., Smith, L.H. Primary Hyperoxaluria. In: J.B. Stanbury, J.B. Wyngaarden, D. Frederickson, J.L. Goldstein, M.S. Brown (eds). *Molecular Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, 1983, 204-208
- ⁵¹ Refsum, S. (1946) Heredopathia atactica polyneuritiformis. *Acta Psychiatr Scand (Suppl)* **38**, 9-303
- ⁵² Steinberg, D.: Refsum disease. in *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 7th ed. (eds Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D.) 2351-2369 (McGraw.-Hill, New York, 1995)
- ⁵³ H.W. Moser (1999) Genotype-Phenotype Correlations in Disorders of Peroxisome Biogenesis. *Minirev. Mol Gen Metab* **68**, 316-327
- ⁵⁴ Moser, A.B., Rasmussen, M., Naidu, S., Watkins, P.A., McGuinness, M., Hajra, A.K., Chen, G., Raymond, G., Liu, A., Gordon, D., Garnaas, K., Walton, D.S., Skjeldal, O.H., Guggenheim, M.A., Jackson, L.G., Elias, E.R., Moser, H.W. (1995) Phenotype of patients with peroxisomal disorders subdivided into 16 complementation groups. *J Pediatr* **127**, 13-22
- ⁵⁵ Wanders, R.J.A., Mooijer, P.A.W., Dekker, C., Suzuki, T., Shimozawa, N. (1999) Disorders of peroxisome biogenesis: Complementation analysis shows genetic heterogeneity with strong overrepresentation of one group (PEX 1 deficiency). *J Inher Metab Dis* **22**, 314-318
- ⁵⁶ Shimozawa, N., Suzuki, Y., Zhang, Z., Kinoshita, N., Fujiki, Y., Tsukamoto, T., Osumi, T., Imanaka, T., Orii, T., Beemer, F., Mooijer, P., Dekker, C., Wanders, R.J.A. (1963) Genetic basis of peroxisome-assembly mutants of humans, Chinese hamster ovary cells, and yeast: Identification of a new complementation group of peroxisome-biogenesis disorders apparently lacking peroxisomal-membrane ghosts. *Am J Hum Genet* 1898-1903

- ⁵⁷ Baumgartner, M.R., Poll-The, B.T., Verhoeven, N.M., Jakobs, C., Espeel, M, Roels, F., Rabier, D., Levade, T., Rolland, M.O., Martinez, M., Wanders, R.j.A., Saudubray, J.M. (1998) Clinical approach to inherited peroxisomal disorders: A series of 27 patients. *Ann Neurol* **44(5)**, 720-730
- ⁵⁸ Espeel, M., Mandel, H., Poggi, F., Smeitink, J.A.M., Wanders, R. Kerckaert, I., Schutgens, R., Saudubray, J., Poll-The, B., Roels, F. (1995) Peroxisome mosaicism in the livers of peroxisomal deficiency patients. *Hepatology* **22**, 497-504
- ⁵⁹ Roels, F., Tytgat, T., Bekebe, S., Giros, M., Espeels, M., dePrest, B., Kerckaert, I., Pampols, T., Rogiers, V. (1996) Peroxisome mosaicism in the liver of patients and the regulation of peroxisome expression in rat hepatocyte cultures. *Ann NY Acad Sci* **804**, 502-515
- ⁶⁰ Mandel, H., Espeels, M., Roels, F., Sofer, N., Luder, A., Iancu, T., Aizin, A., Berant, M., Wanders, R., Schutgens, R. (1994) A new type of peroxisomal disorder with variable expression in liver and fibroblast. *J Pediatr* **125**, 549-555
- ⁶¹ Pineda, M., Giros, M., Roels, F., Espeels, M., Ruiz, M., Moser, A., Moser, H.W., Wanders, R., Pavia, C., Conill, J. (1999) Diagnosis and follow-up of a case of peroxisomal disorder with peroxisomal mosaicism. *J Chil Neurol* **16**, 434-440
- ⁶² Singh, I., Lazo, O., Contreras, M., Stanley, W., Hashimoto, T. (1991): Rhizomelic chondrodysplasia punctata: biochemical studies of peroxisomes isolated from cultured skin fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* **286**, 277-283
- ⁶³ Heikoop, J.C., Van Roermund, C.W., Just, W.W., Ofman, R., Schutgens, R.B., Heymans, H.S., Wanders, R.J., Tager, J.M. (1990): Rhizomelic chondrodysplasia punctata. Deficiency of 3-oxoacyl-coenzyme A thiolase in peroxisomes and impaired processing of the enzyme. *J. Clin Invest* **86**, 126-130
- ⁶⁴ Mannaerts, G.P., van Veldhoven, P., van Broekhoven, A., Vandebroek, G. und Debeer, L.J. (1982) Evidence that peroxisomal acyl-CoA synthetase is located at the cytoplasmatic side of the peroxisomal membrane. *Biochem. J.* **204**, 17-23
- ⁶⁵ Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (259),680-685
- ⁶⁶ Gu, J., Stephenson, C. G., and Iadarola, M. J. (1994) Recombinant Proteins Attached to a Nickel-NTA Column: Use in Affinity Purification of Antibodies. *BioTechniques* **Vol. 17** No. 2, 257-262.
- ⁶⁷ Bradford, M.M.(1976) A rapid and sensitiv method for the quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254
- ⁶⁸ Mihalik, St., Rainville, A.M., Watkins, P.A. (1995) Phytanic acid α -oxidation in rat liver peroxisomes; Production af α -hydroxyphytanoyl-CoA and formate is enhanced by dioxygenase cofactors. *Eur.J.Biochem* **232** 545-551.

- ⁶⁹ Bannerjee, A., Burg, J., Conzelmann, E., Carroll, M. und Sandhoff, K. (1984) Enzyme-linked immunosorbent assay for the ganglioside GM2-activator protein. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **365**, 347-356
- ⁷⁰ Hübl, P und Bretschneider, R. (1964) Titanyl sulfate method for the detection of catalase in blood, serum and urine. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **335**, 146-155
- ⁷¹ Plaut, G.W.E. (1963) Inosine diphosphatase (nucleoside diphosphatase) from mammalian liver. *Meth. Enzymol.* **6**, 143-147
- ⁷² Morre, D.J. (1971) Isolation of Golgi apparatus. *Methods Enzymol.* **22**, 130-148
- ⁷³ De Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. und Appelmans, F. (1955) Tissue fractionation studies. *Biochem. J.* **60**, 604-617
- ⁷⁴ Eibl, H., Parmentier, G., Campenolle, F., Boon, J. und Eggermont, E. (1972) A new, sensitive determination of phosphate. *Anal. Biochem.* **30**, 51-57
- ⁷⁵ Sandhoff, K., Conzelmann, E. und Nehr Korn, H. (1977) Specificity of human liver hexosaminidases A und B against glycosphingolipids GM2 and GA2. Purification of the enzymes by affinity chromatography employing specific elution. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **358**, 779-787
- ⁷⁶ Sambrook j., Fritsch, E.F., Maniatis, T., Ed (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2. edit. 3 vols: Cold Spring Harbor Press
- ⁷⁷ Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**(4), 557-80
- ⁷⁸ Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., Ed. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2 edit. 3 vols: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- ⁷⁹ Tanford, C. (1980) *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes*. 2. Ed., Wiley, New York.
- ⁸⁰ Rassmussen, J.T., Børchers, T. und Knudsen, J. (1990) Comparison of the binding affinities of acyl-CoA-binding protein and fatty-acid-binding protein for long-chain acyl-CoA esters. *Biochem. J.* **265**, 849-855
- ⁸¹ Mihalik, St., Morrel, J.C., Kim, D., Sacksteder, K.A., Watkins, P.A., Gould, St.J. (1997) Identification of *PAHX*, a Refsum disease gene. *Nature genetics* **Vol.17** 185-189
- ⁸² Jansen, G.A., Ofman, R., Wraith, J.E., Wanders, R.J.A. (1997) Refsum disease is caused by mutations in the phytanoyl-CoA hydroxylase gene. *Nature genetics* **Vol 17** 190-193
- ⁸³ Schmitz, W. (1994) Untersuchung des Katabolismus α -methylverzweigter Carbonsäuren. *Dissertation* Julius-Maximilians-Universität, Würzburg.
- ⁸⁴ Gu, J., Stephenson, C. G., and Iadarola, M. J. (1994) Recombinant Proteins Attached to a Nickel-NTA Column: Use in Affinity Purification of Antibodies. *BioTechniques* **Vol. 17** No. 2, 257-262.

- ⁸⁵ Elgersma, Y., Kwast, L., Klein, A., Voorn Brouwer, T., van den Berg, M., Metzger, B., America, T., Tabak, H.F. & Distel, B. (1996) The SH3 domain of the *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal membrane protein Pex13p functions as a docking site for Pex5p, a mobile receptor for the import PTS 1-containing proteins. *J Cell Biol* **135**(1), 97-109.
- ⁸⁶ McNew, J.A. & Goodman, J.M. (1996) The targeting and assembly of peroxisomal proteins: some old rules do not apply. *Trends Biochem Sci* **21**(2), 54-8
- ⁸⁷ Spong, A.P. & Subramani, S. (1993) Cloning and characterization of PAS5: a gene required for peroxisome biogenesis in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Cell Biophys* **241**(1), 252-64
- ⁸⁸ Tsukamoto, T., Shimozawa, N. und Fujiki, Y. (1994) Peroxisome assembly factor 1: nonsense mutation in a peroxisome-deficient Chinese hamster ovary cell mutant and deletion analysis. *Mol. Cell. Biol* **14**(8), 5458-65
- ⁸⁹ Fingerhut, R. (1994). Untersuchungen zum Abbau β -methylverzweigter Fettsäuren (Phytansäure). Dissertation. *Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg*.
- ⁹⁰ Schwarzmann, G. (1978) A simple and novel method for tritium labeling of gangliosides and other sphingolipids. *Biochim. Biophys Acta* **529**, 106-114
- ⁹¹ Schmitz, W., Fingerhut, R. und Conzelmann, E. (1994) Purification and properties of an α -methylacyl-CoA racemase from rat liver. *Eur. J. Biochem.* **222**, 313-323

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Physiologische Chemie II des Theodor-Boveri-Instituts der Universität Würzburg angefertigt. Mein Dank gilt allen, mit denen ich zusammen gearbeitet und diskutiert habe.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. E. Conzelmann. Die Faszination an der Erkundung des Unbekannten sprang als Funke auf mich über. Ich habe praktische und theoretische Fertigkeiten erlernen können, von denen ich noch sehr profitieren werde. Zudem genoß ich die Freiheit und Ungezwungenheit in seiner Arbeitsgruppe.

Herr Prof. Palm hat einen entscheidenden Beitrag für diese Arbeit geleistet. Die Unkompliziertheit der Kooperation ist ein Beispiel für eine gelungene Zusammenarbeit, ich bedanke mich herzlich.

Mein Dank gilt Dr. W.Schmitz, der letztlich den größten Teil an meiner praktischen Betreuung übernommen hatte. Es war mein Ehrgeiz mich an seinen Fähigkeiten zu messen, was letztlich vergebens war. Die Übung und die jahrelange Erfahrung eines exzellenten Chemikers machen aus allem Gold.

Frau Dr.C.Albers und Frau Dr.B.Spielbauer danke ich für die gemeinsam geteilte Freude, ebenso wie für die geteilten Leiden der täglichen Laborarbeit.

Und dann bedanke ich mich bei dem glücklichen Zufall, daß Stephanie Brändlein zu eben jener Zeit ihre Diplomarbeit am gleichen Lehrstuhl begann. Die Sonne schien heller, der Himmel wurde blauer und die Farben wurden bunter. Und blieben es auch.

Wolfgang Hädelt hat mich in die Welt des Apple Macintosh geführt. Aber nicht nur für diese Gute Tat möchte ich ihm danken, auch für seine fränkische Herzlichkeit, die mich immer wieder auf den Boden der Tatsachen setzte. Gut so.

Und schließlich gilt mein Dank all jenen Forschern, Doktoranden und Diplomanden an deren Wissen, Erfahrung und Hilfsbereitschaft ich teilhaben konnte; sie sind der kaum überschätzbare Grundbau jeder wissenschaftlichen Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten	Geboren am 1.3.1974 in Hamburg als erstes Kind meiner Eltern, Konstanze Weismann-Gerloff und Konrad Weismann. Meine 3 Jahre jüngere Schwester Anne-Kathrin wurde am 19.3.1977 in Hamburg geboren.
Ausbildung	1980-1990 Grund- und Mittelschule in Hamburg.
	1981-1983 Zweijähriger Chinaaufenthalt; dort Besuch einer 1. und 2. Klasse einer chinesischen Regelschule.
	1990-1993 Oberstufe an der Gesamtschule Jahnschule, Hamburg.
	1993 Abitur
	1993-1994 Zivildienst im Bereich der individuellen schwerstbehinderten Pflege (ISB-Pflege).
	1995 Beginn mit dem Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg.
	1997 Ärztliche Vorprüfung
	1997 Promotionsbeginn am Lehrstuhl für Physiologische Chemie II des Theodor-Boveri-Institutes der Universität Würzburg bei Prof.Dr.E.Conzelmann
	1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung