

3 Ergebnisse

Beim Abbau verzweigt-kettiger Fettsäuren kommt der Enzymklasse der Racemasen eine wichtige Funktion zu. Von den natürlich vorkommenden Diastereomeren α -methylverzweigter Fettsäuren können lediglich die (*S*)-Stereoisomere aufgrund der Stereospezifität der beteiligten Enzyme weiter oxidativ abgebaut werden. Um auch die (*R*)-Isomere zu metabolisieren, ist deshalb eine Racemisierung der (*R*)- zu den entsprechenden (*S*)-Stereomeren erforderlich. In der Ratte konnte 1994 eine α -Methylacyl-CoA-Racemase nachgewiesen werden (Schmitz *et al.*, 1994), die die methylverzweigten Fettsäuren als CoA-Ester racemisiert. Mit der vorliegenden Arbeit sollte die α -Methylacyl-CoA-Racemase aus humanem Gewebe isoliert und charakterisiert werden. Zu diesem Zweck mußte zuerst ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Racemase entwickelt werden.

3.1 Enzymatische Bestimmung der α -Methylacyl-CoA-Racemase

Analog der Methylmalonyl-CoA-Racemase katalysiert die α -Methylacyl-CoA-Racemase vermutlich die Umkehr der Konfiguration am Stereozentrum durch den Austausch des α -ständigen Protons gegen ein Proton aus Wasser (Stabler *et al.*, 1985). Bei der Aktivitätsbestimmung der α -Methylacyl-CoA-Racemase macht man sich diesen Reaktionsmechanismus zunutze, wobei die $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ -Freisetzung aus entsprechend markierten Substraten gemessen wird (Schmitz *et al.*, 1994). Diese radiometrische Methode wurde analog zu der von Rhead und Mitarbeitern beschriebenen Bestimmung des freigesetzten $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ aus $[2,3\text{-}^3\text{H}]\text{Butyryl-CoA}$ entwickelt (Rhead *et al.*, 1981). Der Vorteil dieser indirekten Messung gegenüber der direkten Bestimmung der Racemaseaktivität anhand einer gaschromatographischen Produktanalyse (3.3.10.2) liegt in ihrer hohen Empfindlichkeit und schnellen Durchführbarkeit. Hierbei wird durch den Einsatz von $[2\text{-}^3\text{H}]$ markiertem Pristanoyl-CoA nach Inkubation mit Enzympräparaten das freigesetzte $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ durch *reversed phase* Chromatographie vom Substrat abgetrennt und durch Flüssigkeitszintillationsmessung quantifiziert.

Die Ausbeute an $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ liegt bei dieser Methode bei 95 %, wobei das Substrat zu 99,8 % an das Säulenmaterial Lichoprep RP-18 gebunden bleibt (2.2.5.1). Um eine Mizellen-Bildung und

unspezifische Substratbindungen möglichst gering zu halten und noch intakte Organellen aufzubrechen, wurde in Rohextrakten bzw. nur schwach angereicherten Enzympräparationen, wie subzellulären Fraktionen, 0,2 % Nonidet P-40 als Detergenz zugegeben.

Für die Ratte konnte gezeigt werden, daß die Aktivität der α -Methylacyl-CoA-Dehydrogenase und α -Methylacyl-CoA-Oxidase in keinem quantitativen Zusammenhang zur Bildung von [^3H]H₂O aus [2- ^3H]Pristanoyl-CoA steht (Schmitz *et al.*, 1994). Bei der [^3H]H₂O-Freisetzung aus [2,3- ^3H]Butyryl-CoA konnte Rhead dagegen einen signifikanten Einfluß der beteiligten Dehydrogenasen und Oxidasen nachweisen (Rhead *et al.*, 1981). Für die humane Racemase mußte deswegen zunächst sichergestellt werden, daß die [^3H]H₂O-Bildung aus [2- ^3H]Pristanoyl-CoA nicht durch die Aktivität konkurrierender Enzyme, sondern in erster Linie auf die Racemase selbst zurückgeht.

Wie sich im weiteren Verlauf der Arbeiten schließlich zeigte, basiert auch in menschlichen Geweben die [^3H]H₂O-Freisetzung aus [2- ^3H]Pristanoyl-CoA fast ausschließlich auf der Aktivität der α -Methylacyl-CoA-Racemase. Dies trifft nicht nur auf das gereinigte Enzym, sondern auch bereits auf Rohextrakte zu (3.3.10.2).

Die radiometrische [^3H]H₂O-Meßmethode wurde aus diesen Gründen als Standardverfahren zur Verfolgung der Proteinreinigung und zur Untersuchung der enzymatischen Eigenschaften der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase eingesetzt.

3.2 Präparation und Reinigung von humaner α -Methylacyl-CoA-Racemase

Als Ausgangsmaterial für die Reinigung der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase diente menschliche Leber, die innerhalb von 24 h p.m. eingefroren und bei -20°C gelagert wurde. Der Rohextrakt wurde aus 235 g Humanleber durch Homogenisierung mittels Ultraturrax und Ultraschall, wie in 2.2.2.5 beschrieben, hergestellt. Anschließend erfolgte eine 60 %ige Ammoniumsulfatfällung des Humanleberextrakts, wie unter Punkt 2.2.2.4 dargestellt. Alle Reinigungsschritte erfolgten bei einer Temperatur von 4°C , zur Stabilisierung des Enzyms wurde, soweit nicht anders erwähnt, 10 mM Na/K/P_i-Puffer, pH 6.8 eingesetzt.

3.2.1 Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose

Das dialysierte Retentat aus der Ammoniumsulfatfällung wurde auf eine DEAE-Cellulose-Säule (500 ml SV, äquilibriert mit Phosphatpuffer, Flußrate: 1 ml/min) aufgetragen und der ungebundene Proteinanteil mit 2 SV Phosphatpuffer ausgewaschen. Die Elution erfolgte mit 4,5 l eines hyperbolischen Gradienten von 0-0,3 M NaCl in Phosphatpuffer (2.2.4.1.2). Fraktionen à 25 ml wurden auf ihre enzymatische Aktivität und den Proteingehalt überprüft und die aktiven Fraktionen im Bereich von 50 – 150 mM des NaCl-Gradienten vereinigt.

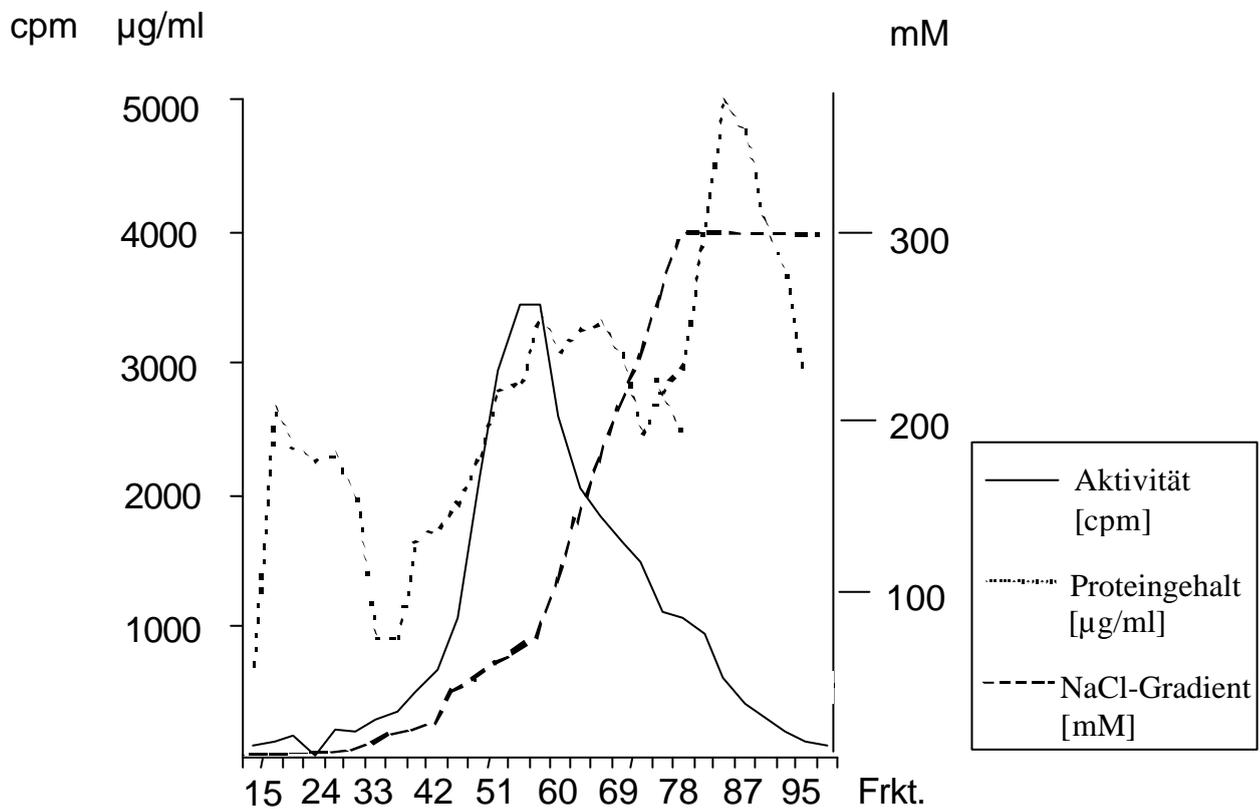


Abb. 3-1: DEAE-Chromatographie zur Reinigung der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase.

3.2.2 Hydroxylapatitchromatographie

Zur weiteren Auftrennung wurde eine Hydroxylapatitsäule mit einem Säulenvolumen von 250 ml mit Phosphatpuffer äquilibriert und die vereinigten DEAE-Fractionen aufgetragen (Flußrate: 1,2 ml/min). Die Säule wurde mit einem Säulenvolumen Phosphatpuffer ausgewaschen und mit 10 SV eines linearen Phosphatgradienten von 10 - 500 mM Na/K/P_i, pH 6.8 eluiert (2.2.4.1.3). Die aktiven Fraktionen à 26 ml im Bereich von 120 - 180 mM [PO₄]³⁻ wurden mittels Ultrafiltration (cut off: 30 kD) entsalzt und auf 10 ml konzentriert.

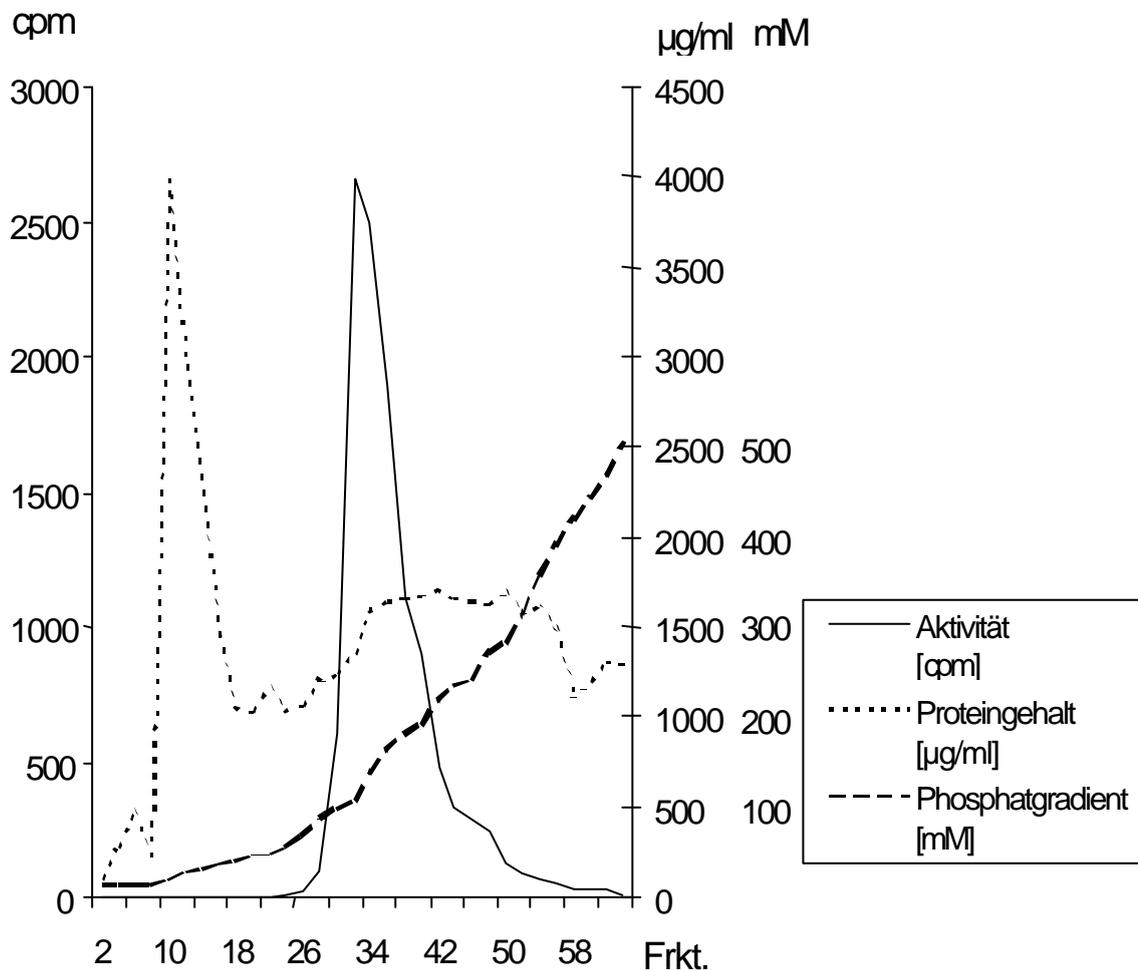


Abb. 3-2: Hydroxylapatitchromatographie zur Reinigung der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase.

3.2.3 Gelfiltration

Die chromatographische Auftrennung nach Molekulargewicht wurde mit einer 500 ml Sephadex G-100 *superfine*-Säule erreicht, die mit 250 mM NaCl in Phosphatpuffer, pH 6.8 äquilibriert wurde (2.2.4.1.5). Nach Auftrag der konzentrierten HA-Fraktionen wurde mit einer Flußrate von 0,35 ml/min mit dem Auftragspuffer eluiert. Nach Bestimmung der Aktivität wurden die enzymatisch aktiven Fraktionen anschließend in einer Ultrafiltrationszelle (YM-30 Diaflo-Membran, *cut of* = 30 kDa; Amicon) auf 9 ml konzentriert.

3.2.4 Affinitätschromatographie an immobilisierten Farbstoffsäulen

Zur weiteren Reinigung wurde eine Affinitätschromatographie an immobilisierten Farbstoffen durchgeführt. Neun verschiedene immobilisierte Farbstoffsäulen *Affinity Chromatography Media* (Sigma) wurden unter verschiedenen Elutionsbedingungen auf ihre Einsatzmöglichkeit zur Aufreinigung untersucht (2.2.4.1.6). Nach Äquilibrierung der Säulen mit 10 mM Phosphatpuffer, pH 6.8 wurde Protein in einer Konzentration von 30 mg/ml SV aufgetragen und mit 3 SV Auftragspuffer ausgewaschen. Die Proteinelution wurde mit je 6 SV der Elutionspuffer 1-7 durchgeführt, die für jede Säule nacheinander eingesetzt wurden.

Außer von den Reactive Yellow-Säulen wurde das Enzym von allen Säulenmaterialien vollständig gebunden, konnte aber nur von RB 72, RY 3 und RY 86 wieder eluiert werden, wobei die letzteren durch die unvollständige Bindung für die weitere Reinigung nicht in Frage kamen. Ohne größeren Aktivitätsverlust gelang die Elution nur bei dem Säulenmaterial RB 72 (zur Übersicht siehe Tab. 3-1).

Affinitäts- chromatographiemedien	Aktivität [%]							
	Durchlauf	Elution						
	10 mM PP, pH 6.8	50 µM FAD, pH 6.8	50 µM NADH, pH 6.8	50 µM NADP, pH 5.5	10 mM PP, pH 5.5	1 M PP, pH 6.8	10 µM AMP, pH 6.8	10 mM Tris, pH 8.5
Cibacron Blue 36A	–	–	–	–	–	–	–	–
Agarose (CB 36A)	–	–	–	–	–	–	–	–
Reactive Blue 4 (RB 4)	–	–	–	–	–	–	–	–
Reactive Blue 72 (RB 72)	0,5 %	3,7 %	0,2 %	–	1,4 %	3,9 %	0,3 %	90,0 %
Reactive Brown 10 (RB 10)	–	–	–	–	–	–	–	–
Reactive Green 5 (RG 5)	–	–	–	–	–	–	–	–
Reactive Green 19 (RG 19)	–	–	–	–	–	–	–	–
Reactive Red 120 (RR 120)	–	–	–	–	–	–	–	–
Reactive Yellow 3 (RY 3)	40,0 %	5,0 %	2,0 %	1,8 %	2,2 %	5,9 %	–	43,1 %
Reactive Yellow 86 (RY 86)	77,0 %	3,5 %	–	3,0 %	0,5 %	3,7 %	–	15,0 %

Tab. 3-1: Affinitätschromatographie zur Reinigung der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase an immobilisierten Farbstoffsäulen.

Zur weiteren Reinigung wurde schließlich die *Reactive Blue 72*-Säule eingesetzt, wobei das Protein durch eine pH-Erhöhung (10 mM Tris, pH 8.5) eluiert werden konnte.

Das Proteinkonzentrat aus der Gelfiltration wurde auf die immobilisierte Farbstoffsäule *Reactive Blue RB 72* (44 ml SV, äquilibriert mit Phosphatpuffer, pH 6.8) gegeben und die ungebundenen Proteine durch Nachwaschen mit 4 SV des gleichen Puffers entfernt. Die Elution erfolgte durch eine pH-Erhöhung mit 4 SV 10 mM Tris/HCl, pH 8.5, bei einer Durchflußrate von 60 ml/h. Das Eluat wurde mit einem Centriprep PM 30 Konzentrator auf 10 ml konzentriert und der Puffer wieder gegen 10 mM Phosphatpuffer, pH 6.8 ausgetauscht.

3.2.5 HPLC-Chromatographie

3.2.5.1 HPLC-Chromatographie an DEAE-Cellulose

Bei der anschließenden HPLC-Chromatographie (2.2.4.2) wurde zuerst eine Fractogel EMD DEAE-650-Säule (150 x 10 mm) eingesetzt, auf der das RB 72-Eluat aufgetrennt wurde (Flußrate 0,5 ml/min, Fraktionen à 1,25 ml). Nach der Äquilibrierung mit Phosphatpuffer und dem Auftrag der Proteinlösung wurden mit 15 ml Startpuffer die ungebundenen Proteine ausgewaschen. Anschließend wurde mit drei linearen NaCl-Gradienten von 0– 100 mM in 15 ml, 100 - 300 mM in 70 ml und 300 - 1000 mM NaCl in 30 ml Phosphatpuffer eluiert. Die enzymatisch aktiven Fraktionen wurden mit Centriprep PM 30 Konzentratoren entsalzt und auf ein Endvolumen von 6 ml konzentriert. Nach Äquilibrierung der DEAE-Säule mit Phosphatpuffer wurde das Proteinkonzentrat erneut appliziert und die ungebundenen Proteine mit dem gleichen Puffer ausgewaschen. Zur Elution wurde ein NaCl-Gradient angelegt, von 0 - 100 mM in 7,5 ml, 100 - 130 mM in 200 ml und 130 - 300 mM NaCl in 30 ml Phosphatpuffer (Flußrate 0,5 ml/min, Fraktionen à 2,5 ml). Nach Austausch des Puffers gegen 1 mM Phosphatpuffer, pH 6,8, wurden die enzymatisch aktiven Fraktionen mit Centripreps PM 10 auf 8 ml konzentriert.

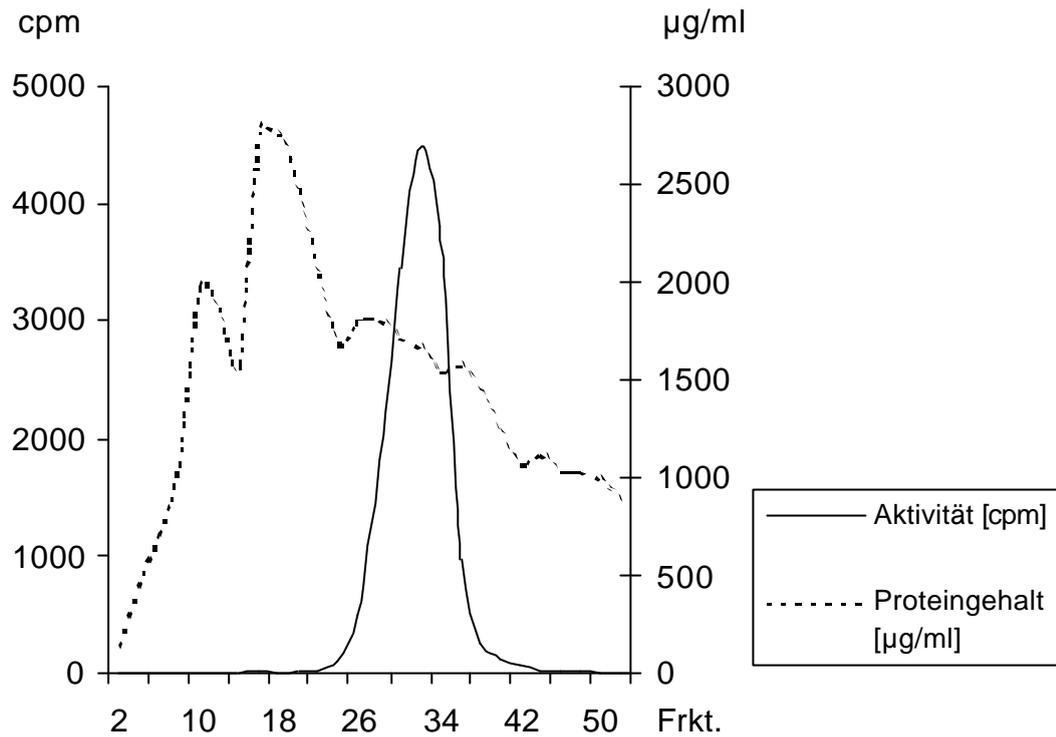


Abb. 3-3: HPLC-EM-DEAE-Chromatographie I zur Reinigung der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase.

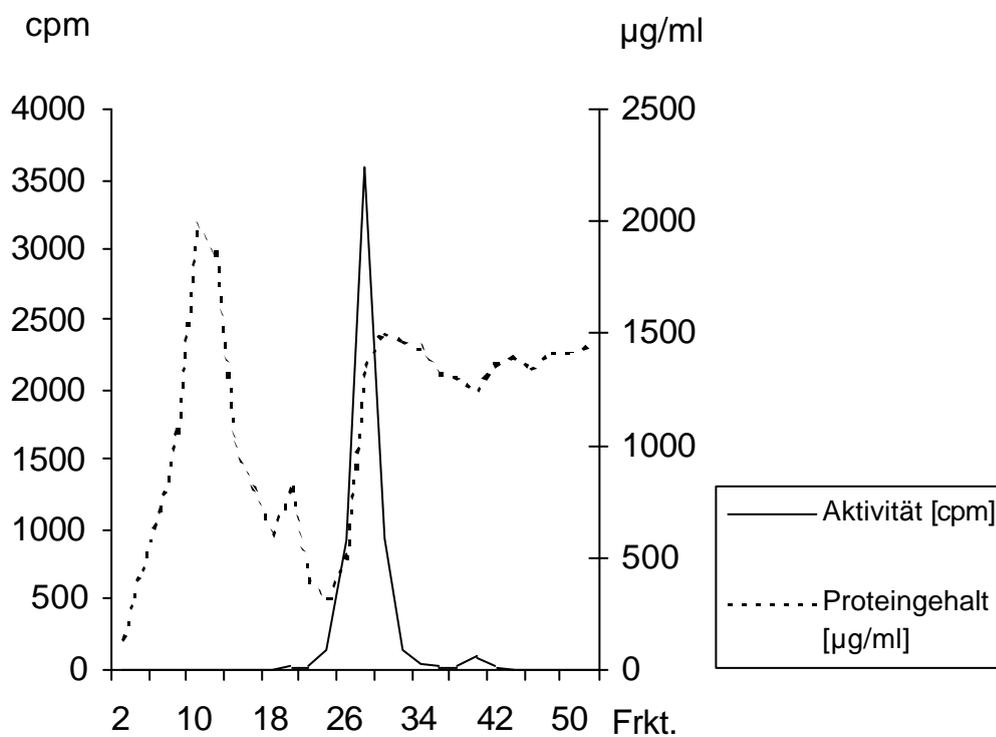


Abb. 3-4: HPLC-EM-DEAE-Chromatographie II zur Reinigung der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase.

3.2.5.2 HPLC-Chromatographie an Hydroxylapatit

Im letzten Reinigungsschritt zur Aufreinigung der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase wurde der HPLC-DEAE-Pool auf einer Hydroxylapatit-HPLC-Säule Pentax HA, B54-Y390 (1 ml SV) aufgetrennt. Die HA-Säule wurde hierzu mit 1 mM Phosphatpuffer, pH 6.8 äquilibriert, das Konzentrat aufgetragen und mit vier aufeinander folgenden linearen Na/K/P_i-Gradienten eluiert: 1 – 10 mM in 7,5 ml, 10 – 100 mM in 22.5 ml, 100 – 200 mM in 7,5 ml und 200 – 1000 mM in 7,5 ml (Flußrate 0,25 ml/min, Fraktionen à 1,25 ml) (2.2.4.2). Die Fraktionen, die Enzymaktivität zeigten, wurden vereinigt und im Centricon-10 entsalzt und konzentriert.

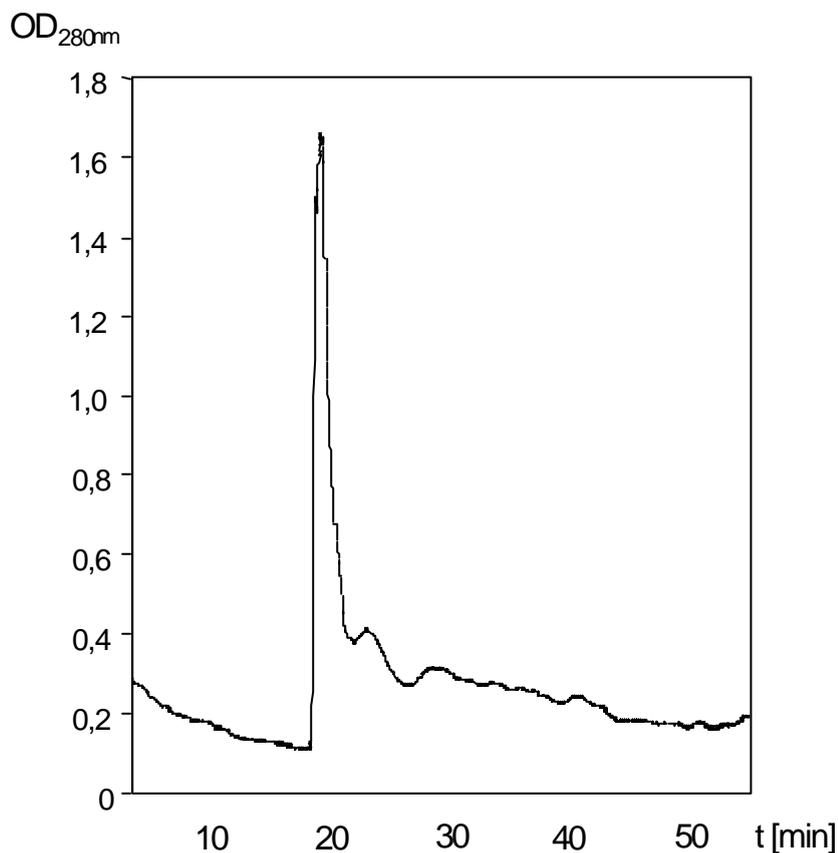


Abb. 3-5: HPLC-Chromatographie an Hydroxylapatit zur Reinigung der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase.

3.2.6 Übersicht der Aufreinigung der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase

Die zur Reinigung der α -Methylacyl-CoA-Racemase eingesetzten Verfahren mit ihren jeweiligen Reinigungsfaktoren und Ausbeuten sind in der unten stehenden Tabelle schematisch zusammengestellt. Letztlich konnten aus 25 g Gesamtprotein einer Humanleber 162 μ g hochreines Enzym mit einer Aktivität von 79 mU gewonnen werden, also einer spezifischen Aktivität von 486 mU/mg. Das entspricht einer Ausbeute von 2,3 % und einem Reinigungsfaktor von 3583.

	Protein [mg]	Aktivität [mU]	spezifische Aktivität [mU/mg]	Ausbeute [%]	Reinigungs- faktor
Humanleber- homogenat	25000	3390	0,136	100,00	1,0
Rohextrakt	17040	3880	0,227	114,45	1,7
(NH₄)₂SO₄-Fällung	12670	3830	0,302	112,98	2,2
DEAE- Chromatographie	383,7	3570	9,31	105,31	68,4
Hydroxylapatit- Chromatographie	86,50	1610	18,6	47,50	137,3
Gelfiltration	50,14	1300	26,0	38,50	192,0
Affinitätschromato- graphie an RB-72	12,53	580	46,3	17,40	342,0
HPLC-DEAE- Chromatographie (I)	3,060	200	65,5	5,92	483,0
HPLC-DEAE- Chromatographie (II)	1,360	192	141,0	5,57	1041,0
HPLC-HA- Chromatographie	0,162	78,7	485,8	2,32	3583,0

Tab. 3-2: Reinigung der α -Methylacyl-CoA-Racemase aus menschlicher Leber.

3.2.7 Analyse der Reinheit der präparierten α -Methylacyl-CoA-Racemase aus humaner Leber

3.2.7.1 HPLC-Chromatographie an WAEX-DEAE

Zur Überprüfung der Reinheit wurde ein Aliquot der konzentrierten HPLC-HA-Fractionen auf eine Euramid WAEX-DEAE 1000/7-Säule (1 ml SV) appliziert. Auf die mit 0,1 mM Phosphatpuffer äquilibrierte DEAE-WAEX-Säule wurde das Konzentrat in 0,1 mM $[\text{PO}_4]^{3-}$ aufgetragen, mit 15 ml 0,1 mM $[\text{PO}_4]^{3-}$ ausgewaschen und mit einem linearen Na/K/ P_i -Gradienten von 0,1 – 20 mM in 30 ml eluiert (Flußrate: 0,5 ml/min) (2.2.4.2). Das Elutionsprofil zeigt nur ein einziges Elutionsmaximum, das mit der Enzymaktivität korreliert.

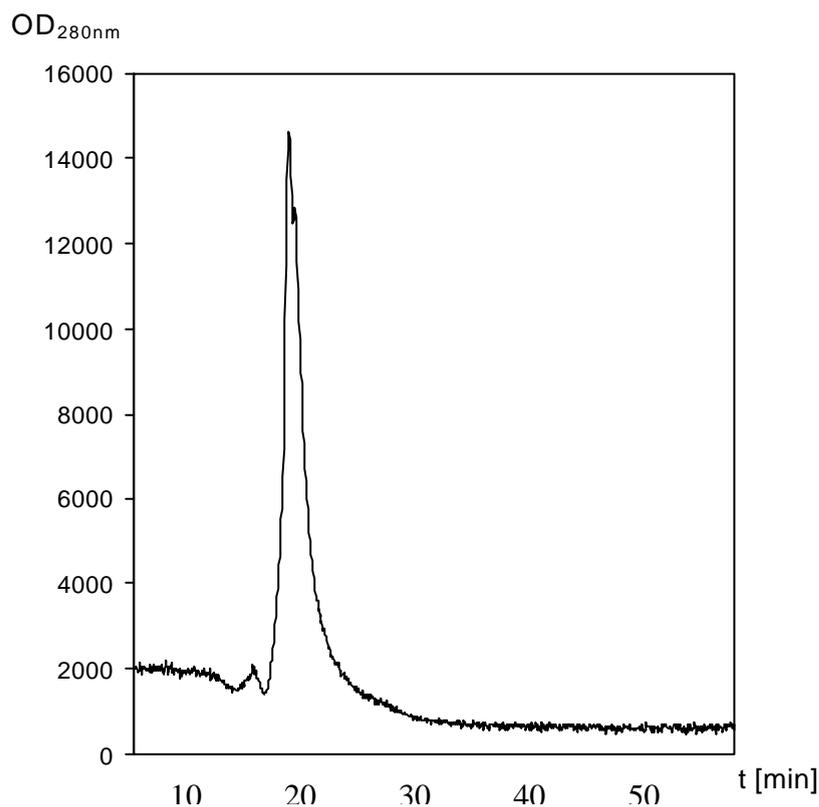


Abb. 3-6: HPLC-Chromatographie an DEAE-WAEX zur Reinigung der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase.

3.2.7.2 SDS-PAGE-Analyse

Zur zusätzlichen Analyse der Reinheit wurden die Hauptfraktionen der HPLC-Hydroxylapatitchromatographie und der DEAE-Pool vor Auftrag auf einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt (Abb. 3-7) und mit Coomassie Blue angefärbt (2.2.3.1). Parallel dazu wurden dieselben Proben auf einem nativen Polyacrylamidgel unter nicht denaturierenden Bedingungen aufgetrennt, das Gel in 0,5 cm breite Stücke geschnitten und nach Elution unter Schütteln (60 min, 4°C) in 10 mM Phosphatpuffer, pH 6.8 die enzymatische Aktivität mit dem Standardassay bestimmt. Von den Gelstücken wurde ein Teil parallel angefärbt, die einzelne sichtbare Bande korrelierte dabei mit der gemessenen Aktivität. Mit Hilfe des entsprechenden SDS-Gels konnte so überprüft werden, daß die einzige bei 45 kDa sichtbare Bande tatsächlich der aktiven Racemase entsprach.

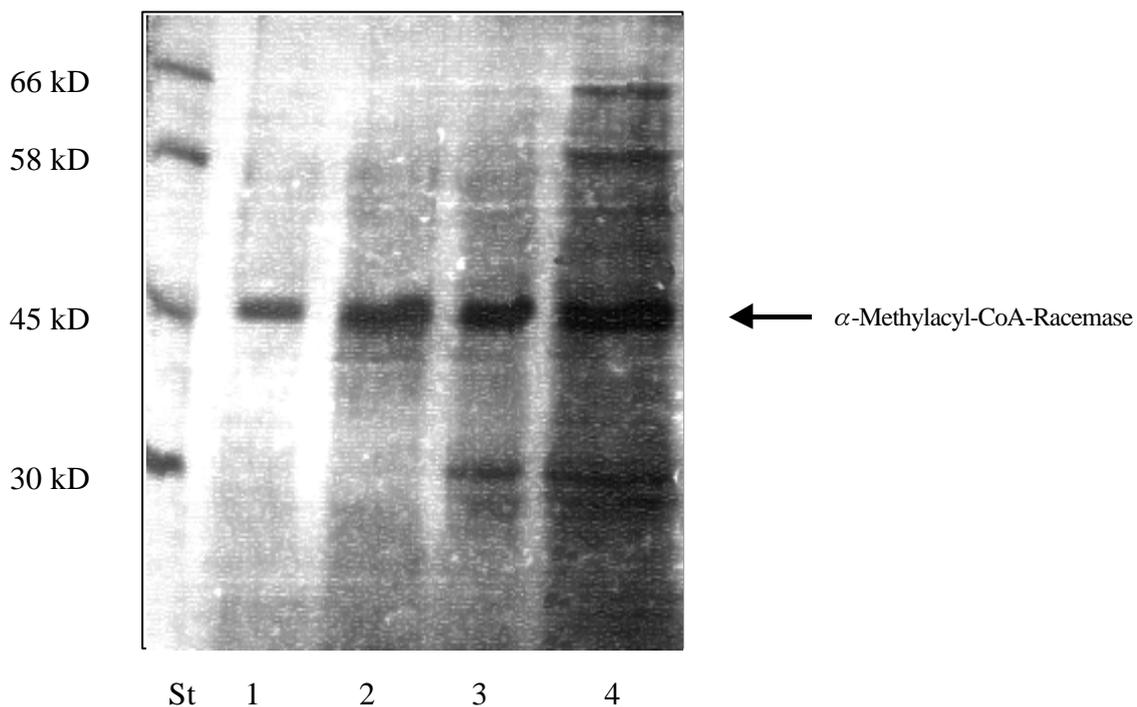


Abb. 3-7: 10%ige SDS-PAGE der gereinigten α -Methylacyl-CoA-Racemase aus menschlicher Leber: Proteinmarker (ST), HPLC-HA-Fraktionen mit dem höchsten Reinheitsfaktor (1, 2, 3) und HPLC-DEAE-Pool vor HPLC-Hydroxylapatitchromatographie (4).

3.3 Biochemische Charakterisierung der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase

3.3.1 Molekulargewichtsbestimmung

3.3.1.1 Gelfiltration

Eichproteine: Triosephosphat-Isomerase (30 kDa), LDH (36 kDa), Ovalbumin (48 kDa), BSA (66 kDa), Cytochromoxidase (240 kDa)

Eine Ultrogel AcA 34-Säule (250 ml SV, 20 - 350 kD, 4°C) wurde nach Äquilibrierung mit 10 mM Phosphatpuffer, pH 6.8 zuerst mit verschiedenen Eichproteinen (0,5 ml, 1 mg/ml) bei einer Flußrate von 0,3 ml/min kalibriert. Die eingesetzten Eichproteine sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt. Anschließend wurde die Proteinprobe (HA-Pool) mit der gleichen Durchflußrate chromatographiert (0,5 ml Auftragsvolumen). Zur Bestimmung von V_0 (Ausschlußvolumen) und V_s (Salzvolumen) wurden je 0,5 ml p-Nitrophenol (5 mg/ml) und Dextranblau (2 mg/ml) mit aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 0,5 M NaCl in 10 mM Phosphatpuffer, pH 6.8. Aus der photometrischen Bestimmung der Eichproteine und der Messung der Enzymaktivität in den erhaltenen Fraktionen (2,5 ml) konnten die R_f -Werte¹ der Eichproteine anhand der charakteristischen Elutionsvolumina (V_e) errechnet werden (Abb. 3-8). Mittels der relativen Mobilität der Racemase ($R_f = 0,62$) wurde anschließend das Molekulargewicht der α -Methylacyl-CoA-Racemase von 47,7 kDa bestimmt (2.2.4.1.5).

¹ R_f (relative Mobilität) = $(V_e - V_0) / (V_s - V_0)$

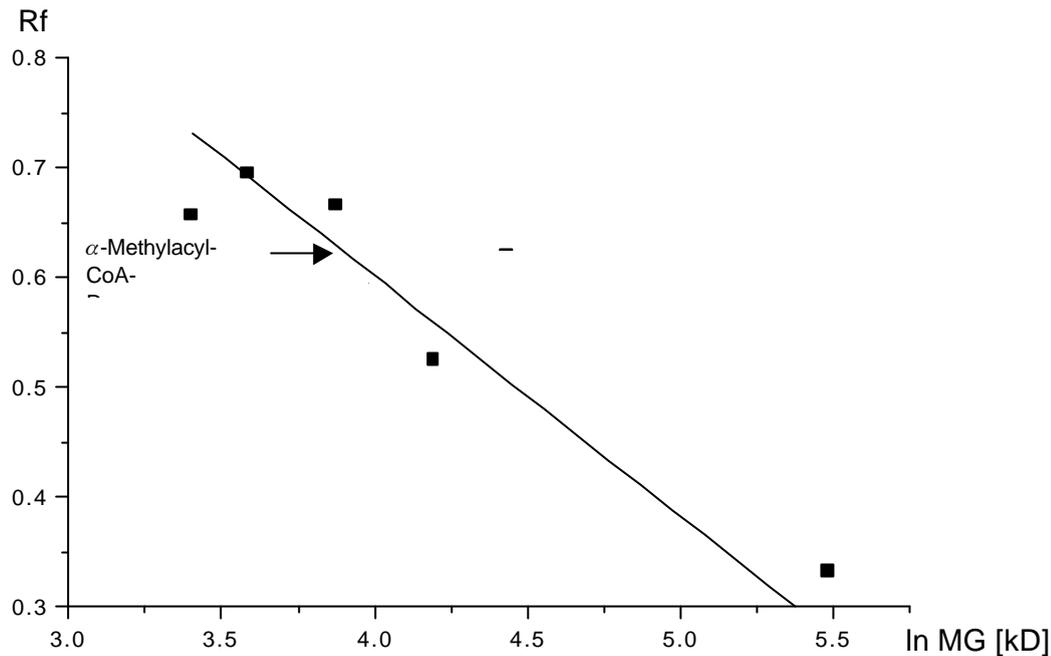


Abb. 3-8: Molekulargewichtsbestimmung einer aufgereinigten Proteinprobe mittels Gelfiltration auf einer Ultrogel AcA 34-Säule.

3.3.1.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur genaueren Molekulargewichtsbestimmung wurden nach Abschluß der Reinigung die aktiven HPLC-HA-Fractionen auf einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und das Molekulargewicht der α -Methylacyl-CoA-Racemase mittels des Proteinstandards (2.2.3.4) mitbestimmt (Abb. 3-7). Das durch die Gelfiltration erhaltene Molekulargewicht von 47,7 kDa korreliert sehr gut mit dem durch die SDS-Gelelektrophorese ermittelten Wert von 47,1 kDa.

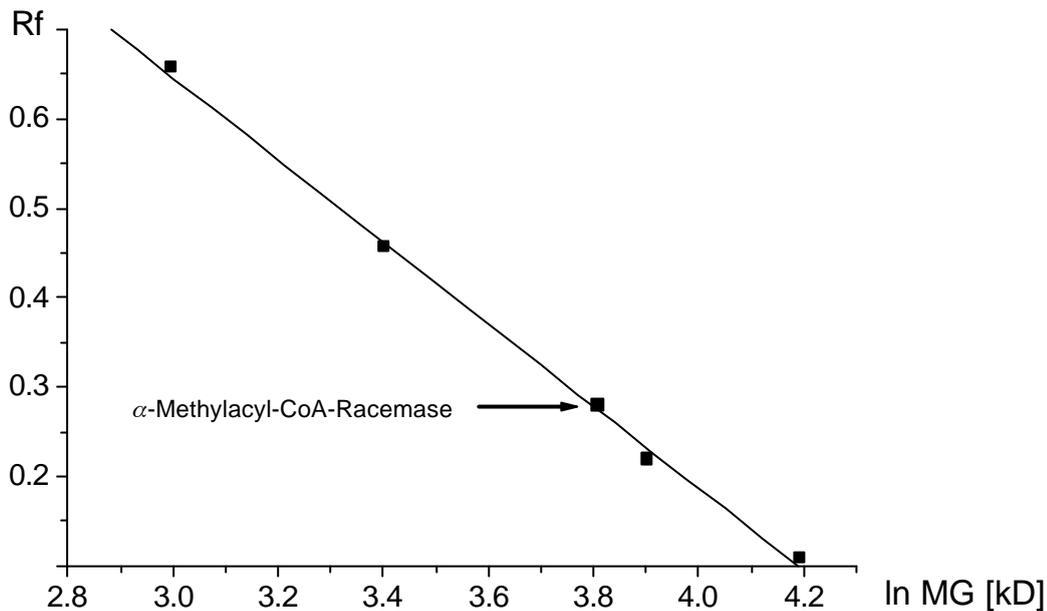


Abb. 3-9: Molekulargewichtsbestimmung der gereinigten α -Methylacyl-CoA-Racemase mittels SDS-Gelelektrophorese.

3.3.2 Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes wurde an der präparativen IEF-Zelle Rotofor eine isoelektrische Fokussierung eines nach DEAE- und HA-Chromatographie angereicherten Enzympräparates durchgeführt. Nach der Präfokussierung mit 1,5 ml Biolyte (Ampholyte, pH-Bereich 2-10, BIORAD) in 50 ml ddH₂O, erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteinprobe, an die sich eine Refokussierung der aktiven Fraktionen der IEF I anschloß. Alle Fokussierungen wurden bei 12 W, 20 mA und 570 V für 2,5 h durchgeführt (2.2.3.6). Der isoelektrische Punkt lag für die α -Methylacyl-CoA-Racemase bei pH 5,78 (+/-0,08).

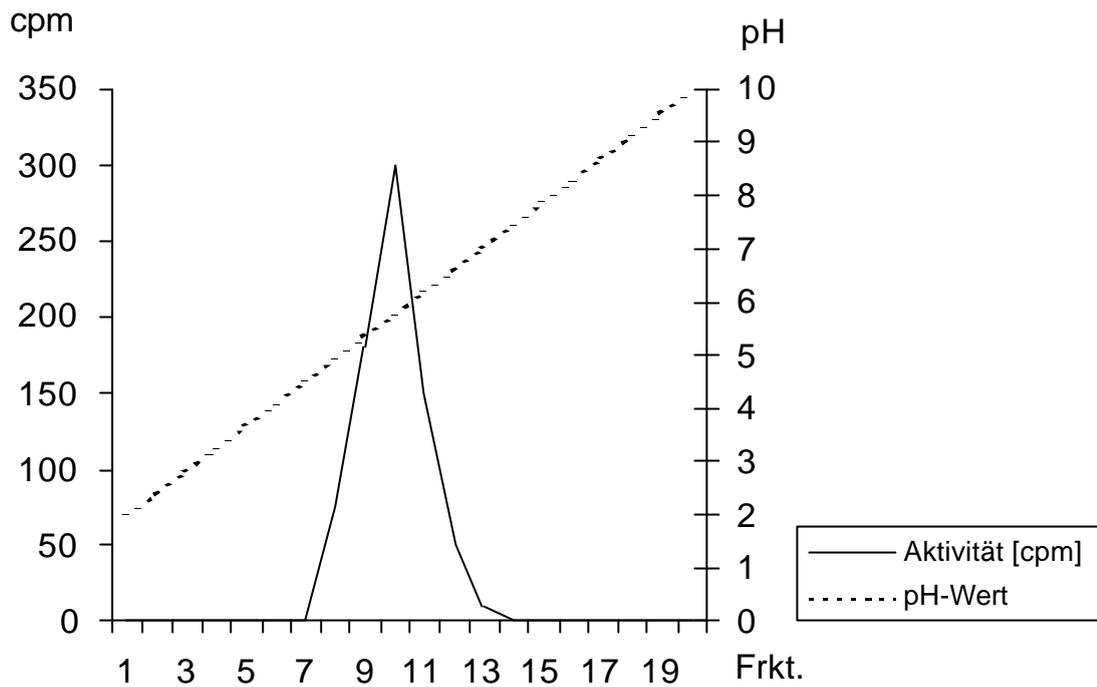


Abb. 3-10: Isoelektrische Fokussierung I der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase.

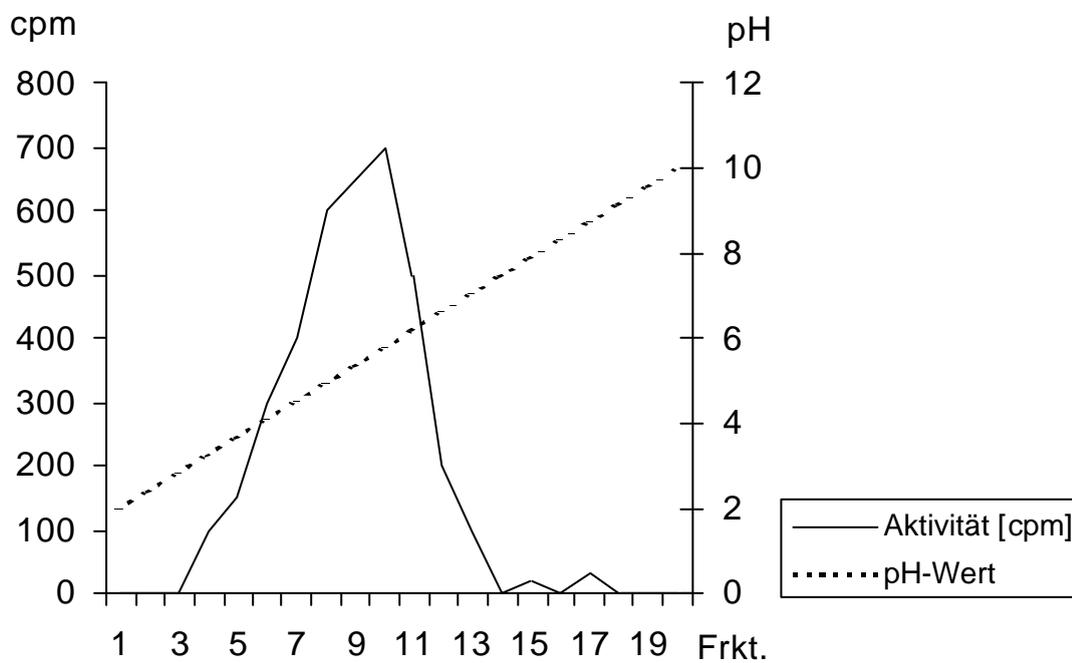


Abb. 3-11: Isoelektrische Fokussierung II der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase.

3.3.3 Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität

Um die Abhängigkeit der α -Methylacyl-CoA-Racemase-Reaktion von der Enzymkonzentration zu bestimmen, wurde die Freisetzung von $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ aus 0,4 nmol $[2\text{-}^3\text{H}]$ Pristanoyl-CoA bzw. 0,5 nmol $[24,25\text{-}^3\text{H}]$ THCA(Trihydroxycoprostanoyl)-CoA unter Standardbedingungen (2.2.5.1) (30 min, 37°C) durch gereinigte Racemase gemessen. Die Reaktionsrate steigt linear mit der Proteinkonzentration bis zu 45 ng pro Ansatz. 1 ng Racemase setzt pro Minute 0,008 pmol Pristanoyl-CoA bzw. 0,003 pmol THCA-CoA um (Abb. 3-12).

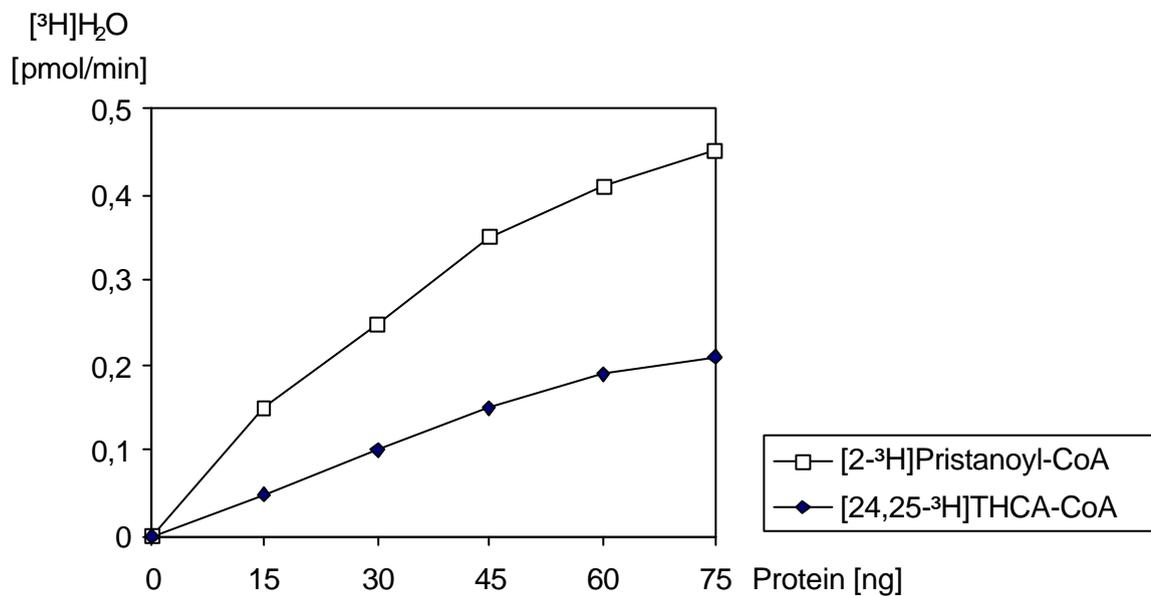


Abb. 3-12: Freisetzung von $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ aus $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Pristanoyl-CoA}$ und $[24,25\text{-}^3\text{H}]\text{THCA-CoA}$ durch die humane α -Methylacyl-CoA-Racemase in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration.

3.3.4 Thermostabilität

Der Rohextrakt von Humanleber (in Aliquots à 100 μ l, 1,3 mg Protein, 1:100 verd.) wurde zeitabhängig bei verschiedenen Temperaturen vorinkubiert, die Proben anschließend auf Eis gekühlt und nach Abzentrifugieren des ausgefallenen Proteins die Aktivität im Standard-verfahren (2.2.5.1) bestimmt. Als Ergebnis ließ sich eine deutliche Temperatur-empfindlichkeit der Racemase feststellen. Das Enzym verliert schon merklich an Aktivität bei einer Erhöhung von 35°C auf 40°C. Bei einer Vorinkubation mit einer Temperatur von 50°C liegt die Halbwertszeit der α -Methylacyl-CoA-Racemase bei 15 min (Abb. 3-13).

rel. Aktivität [%]

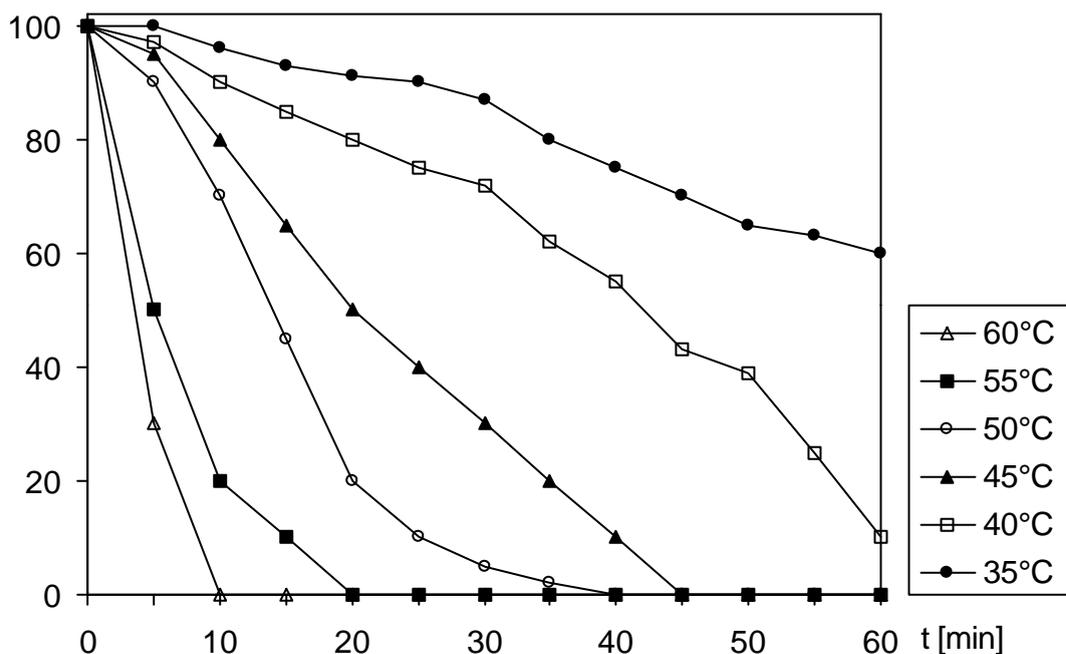


Abb. 3-13: Thermostabilität der α -Methylacyl-CoA-Racemase im Temperaturbereich von 35°C bis 60°C.

3.3.5 pH-Abhängigkeit

Die Freisetzung von $[2\text{-}^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ aus $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Pristanoyl-CoA}$ und $[24,25\text{-}^3\text{H}]\text{Trihydroxycoprostanoyl-CoA}$ durch die humane α -Methylacyl-CoA-Racemase ist bei einem pH-Wert von pH 8.0 am höchsten, wobei mehr als 80 % der maximalen Aktivität im pH-Bereich von pH 6.5 – 9.0 erreicht werden (Abb. 3-14). Bei pH-Werten unter 5.0 zeigt das Enzym keine Aktivität, bei einem pH-Wert über 9.5 konnte eine Aktivität aufgrund der schnellen Hydrolyse der Thioestersubstrate unter alkalischen Bedingungen nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 3-14).

rel. Aktivität [%]

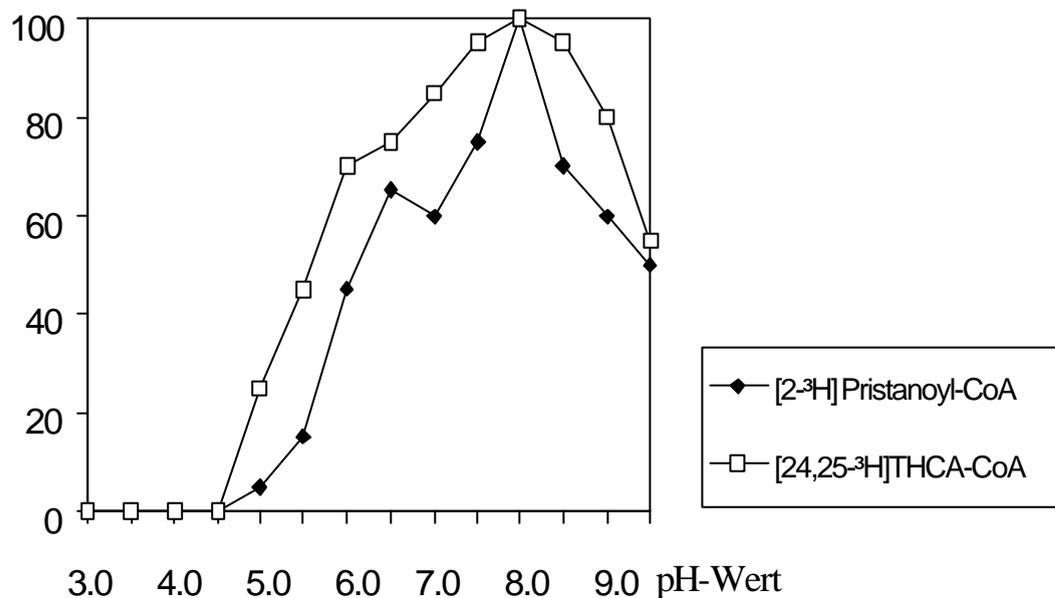


Abb. 3-14: pH-Abhängigkeit der $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ -Bildung aus $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Pristanoyl-CoA}$ und $[24,25\text{-}^3\text{H}]\text{THCA-CoA}$ durch die α -Methylacyl-CoA-Racemase aus Humanleber.

3.3.6 Enzymkinetik der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase

Gereinigte Racemase (28 ng Protein) aus Humanleber wurde mit 0,4 nmol $[2\text{-}^3\text{H}]$ Pristanoyl-CoA bzw. mit 0,5 nmol $[24,25\text{-}^3\text{H}]$ THCA-CoA unter Standardbedingungen (Abb.3-14) inkubiert und die Bildung von $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ in bestimmten Zeitabständen von 0 - 180 min gemessen. Die enzymatische Reaktion zeigt innerhalb der ersten 30 min eine lineare Zeitabhängigkeit, anschließend beginnt sich die Freisetzung von $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ zu verlangsamen (Abb. 3-15).

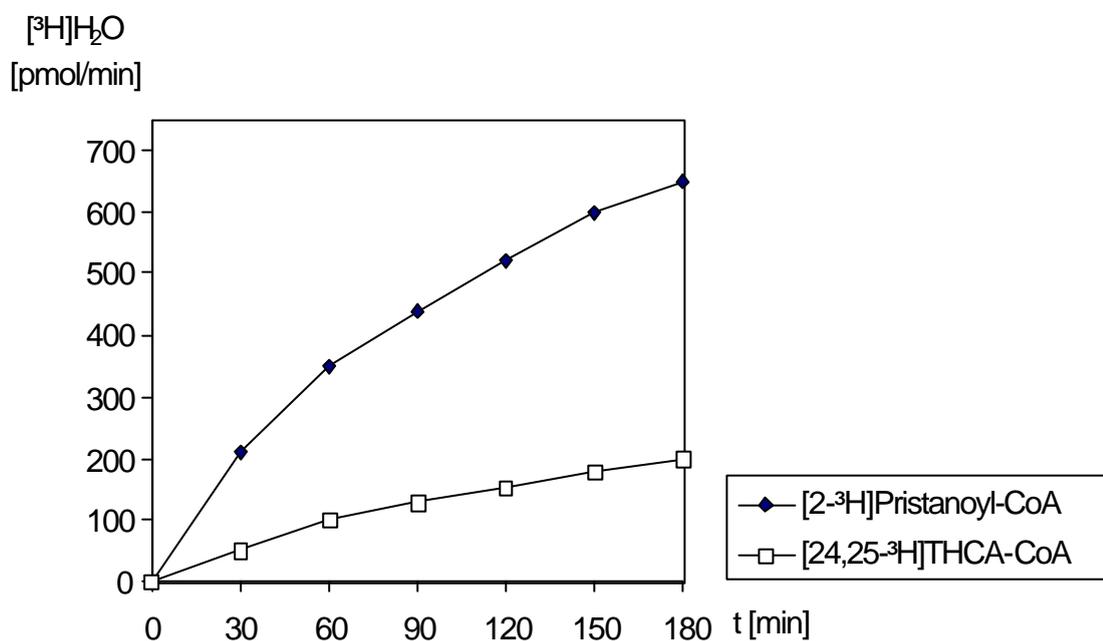


Abb. 3-15: Zeitabhängigkeit der $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ -Bildung aus $[2\text{-}^3\text{H}]$ Pristanoyl-CoA und $[24,25\text{-}^3\text{H}]$ THCA-CoA durch die α -Methylacyl-CoA-Racemase aus Humanleber.

Die enzymatische Reaktion mit $[2\text{-}^3\text{H}]$ Pristanoyl-CoA und $[24,25\text{-}^3\text{H}]$ Trihydroxyco-prostanoyl-CoA als Substrate für die humane α -Methylacyl-CoA-Racemase folgt einer einfachen Michaelis-Menten Kinetik, vergleichbar der Enzymkinetik des Rattenleberenzym (Schmitz *et al.*, 1994). Für $[2\text{-}^3\text{H}]$ Pristanoyl-CoA liegt die k_M bei 172 μM und die V_{\max} bei 0,1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (Abb. 3-16), die k_M für $[24,25\text{-}^3\text{H}]$ THCA-CoA beträgt 31,6 μM und die V_{\max} 0,3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (Abb. 3-17).

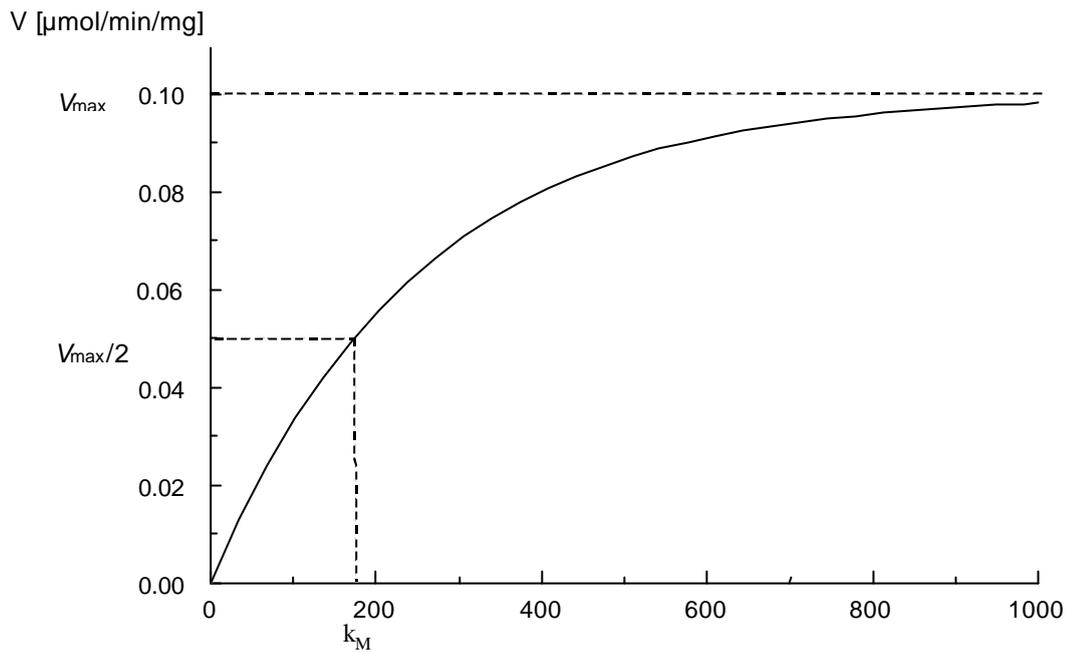


Abb. 3-16: Michaelis-Menten-Kinetik der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase für $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Pristanoyl-CoA}$.

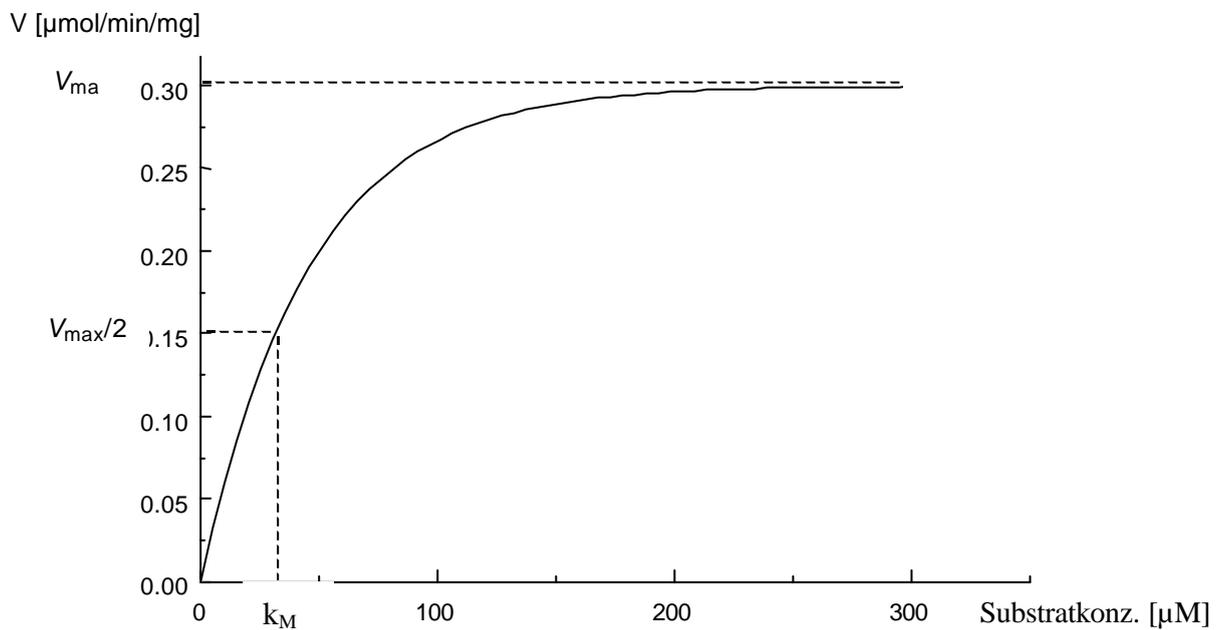


Abb. 3-17: Michaelis-Menten-Kinetik der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase für $[24,25\text{-}^3\text{H}]\text{Trihydroxycoprostanoyl-CoA}$.

3.3.7 Inhibition der α -Methylacyl-CoA-Racemisierung

Zur Analyse der Substratspezifität der α -Methylacyl-CoA-Racemase, wurden verschiedene Acyl-CoAs eingesetzt und auf ihre Fähigkeit überprüft, die [^3H]H₂O-Bildung aus [2- ^3H] Pristanoyl-CoA durch das gereinigte Enzym zu hemmen (Abb. 3-18). Eine signifikante kompetitive Inhibition konnte, wie schon für das Rattenenzym beschrieben (Schmitz *et al.*, 1994), nur mit 2-Methylacyl-CoAs mit Kettenlängen von mindestens acht Kohlenstoffatomen gezeigt werden. Die verzweigt-kettigen Substrate 2-Methylmyristoyl-CoA und 2-(4-Isobutylphenyl)-Propionyl-CoA (Ibuprofenoyl-CoA) zeigten eine eindeutige kompetitive Inhibition mit K_i -Werten von 19 μM bzw. 25 μM . Wie auch für das Rattenenzym gezeigt werden konnte (Schmitz *et al.*, 1994), inhibiert Palmitoyl-CoA dagegen die Reaktion vermutlich nicht durch direkte Bindung an das Enzym, sondern nur indirekt durch die Bildung stabiler Mizellen, die eine Substratbindung an das Enzym verhindern.

Acyl-CoA	Konzentration	Reaktionsrate
	[μM]	[% der Kontrollreaktion]
Acetyl-CoA	400	106
Butyryl-CoA	400	104
Valeryl-CoA	400	100
Octanoyl-CoA	400	102
Palmitoyl-CoA	400	39
2-Methylpropionyl-CoA	400	96
2-Methylbutyryl-CoA	400	109
2-Methylpentanoyl-CoA	200	91
2-Methyloctanoyl-CoA	200	76
2-Methylmyristoyl-CoA	200	9
2-Methylmyrist-2-enoyl-CoA	400	105
2-Methylbutyryl-CoA	400	116
2-Ethylhexanoyl-CoA	200	100
Ibuprofenoyl-CoA	200	13

Abb. 3-18: Inhibition der Pristanoyl-CoA-Racemisierung durch verschiedene Acyl-CoAs (10 μM [2- ^3H]Pristanoyl-CoA wurden mit 1 ng gereinigter α -Methylacyl-CoA-Racemase aus Humanleber und verschiedenen Acyl-CoAs für 30 min unter Standardbedingungen inkubiert).

3.3.8 Subzelluläre Verteilung der α -Methylacyl-CoA-Racemase

Die subzelluläre Lokalisation der α -Methylacyl-CoA-Racemase sollte in verschiedenen humanen Geweben und zum Vergleich auch in Rattenleberhomogenat untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Rattenleber, humane Hautfibroblasten (von Normalkontrollen und Patienten mit Zellweger-Syndrom) und Hep-G2-Zellen subzellulär fraktioniert. Die Fraktionierung erfolgte mit einem gegenläufigen Nycodenz-Saccharose-Gradienten (je 5,5 ml 34 % und 15 % Nycodenz in 8,5 % Saccharoselösung, 1 mM Tris/HCl, pH 7.0) (2.2.2.6).

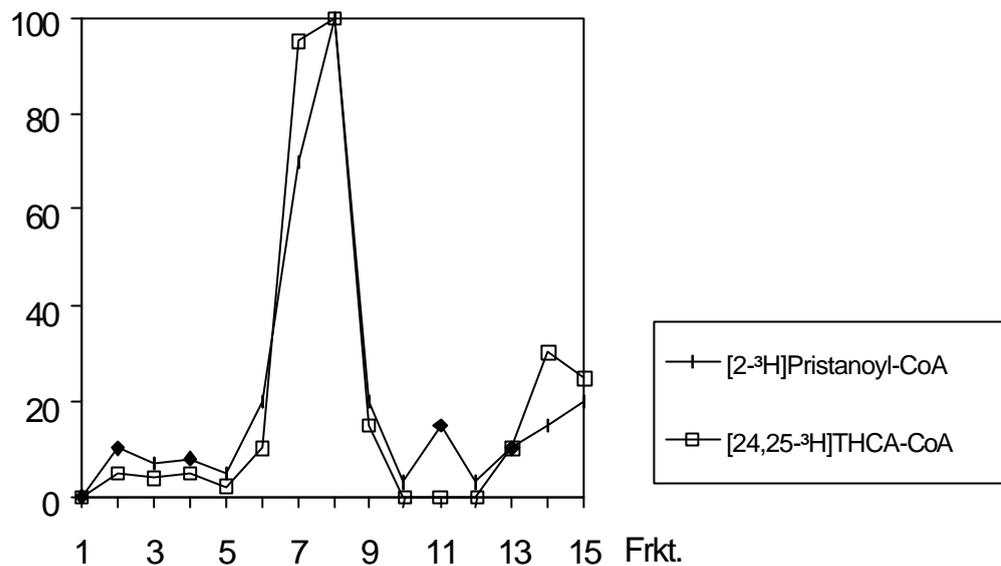
Neben der Racemaseaktivität in den einzelnen Fraktionen wurden noch die Leitenzyme der verschiedenen Organellen gemessen (2.2.5). Zur Identifikation der peroxisomalen Fraktionen wurde die Aktivität der Katalase gemessen, für die Mitochondrien die Succinatdehydrogenase und Palmitoyl-CoA-Dehydrogenase bestimmt. Die folgenden Abbildungen (Abb. 3-19 - Abb. 3-23) zeigen anhand der unterschiedlich verteilten Enzymaktivitäten eine deutliche Trennung von mitochondrialen und peroxisomalen Fraktionen.

Es konnte gezeigt werden, daß in Rattenleber die α -Methylacyl-CoA-Racemase fast ausschließlich mitochondrial lokalisiert ist (Abb. 3-19). Eine geringe Restaktivität in den cytosolischen Fraktionen ist vermutlich auf zerstörte Organellen zurückzuführen.

Im Gegensatz dazu konnte in menschlichen Zellen, wie Hautfibroblasten (Abb. 3-20) und Hep G2 Zellen (Abb. 3-21) die Enzymaktivität zu mehr als 80 % in den Peroxisomen und nur zu knapp 20 % in den Mitochondrien lokalisiert werden. Die beobachtete Verteilung der Racemaseaktivität war in allen menschlichen Zelllinien gesunder Probanden reproduzierbar.

(a)

rel. Aktivität [%]



(b)

rel. Aktivität [%]

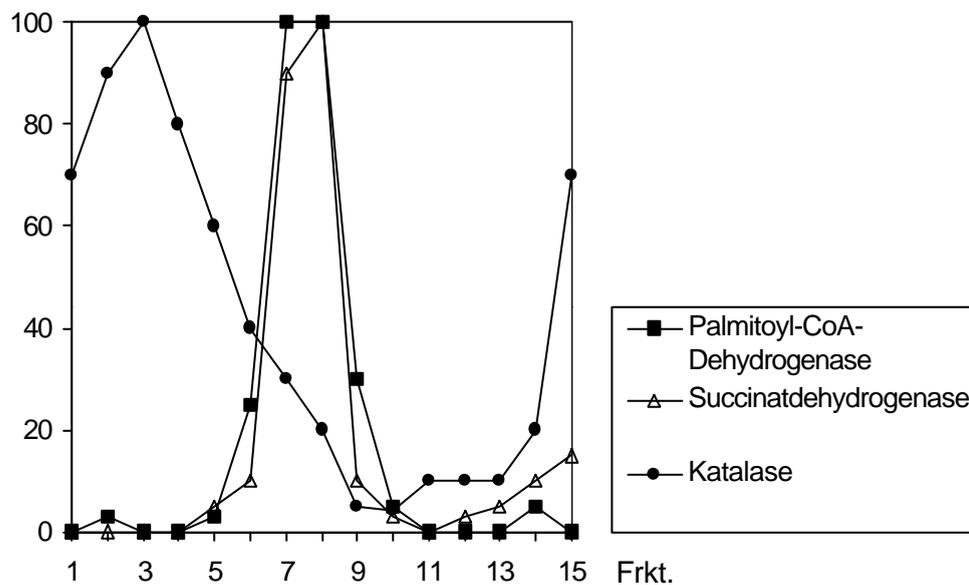
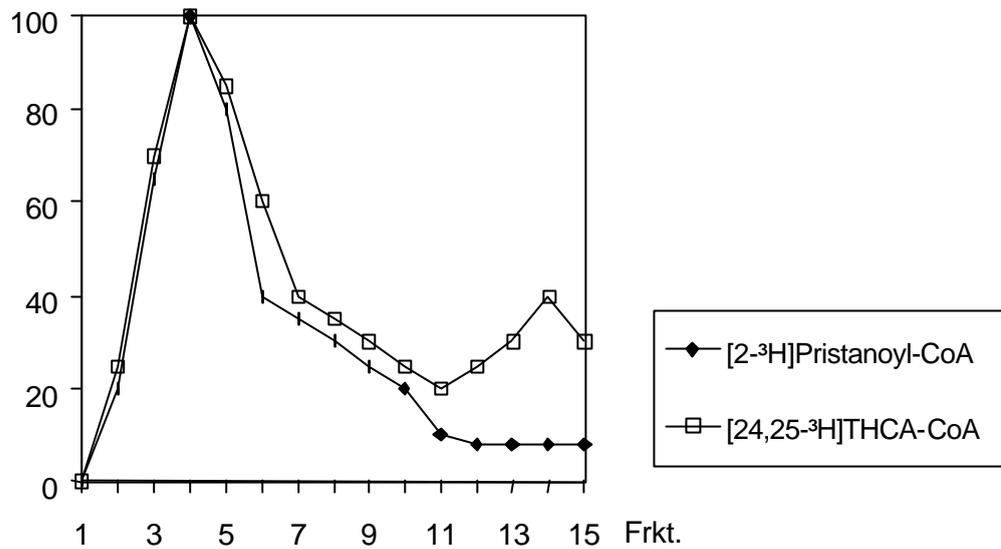


Abb. 3-19: Subzelluläre Lokalisation der α -Methylacyl-CoA-Racemase in Rattenleber. (Frische Rattenleber wurde homogenisiert und nach Fraktionierung auf einem Nycodenz/Saccharose-Gradienten die Racemaseaktivität (a) und die Leitenzyme (b) in den einzelnen Fraktionen bestimmt).

(a)

rel. Aktivität [%]



(b)

rel. Aktivität

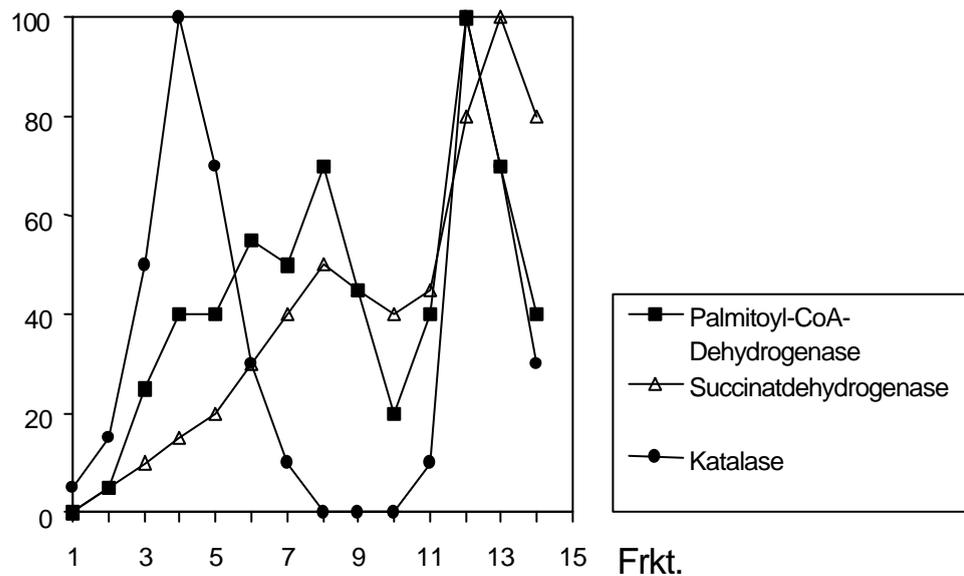


Abb. 3-20: Subzelluläre Verteilung der α -Methylacyl-CoA-Racemase in normalen Hautfibroblasten (Frisch geerntete Fibroblasten gesunder Probanden wurden homogenisiert und nach Fraktionierung auf einem Nycodenz / Saccharose-Gradienten die Racemaseaktivität (a) und die Leitenzyme (b) in den einzelnen Fraktionen bestimmt).

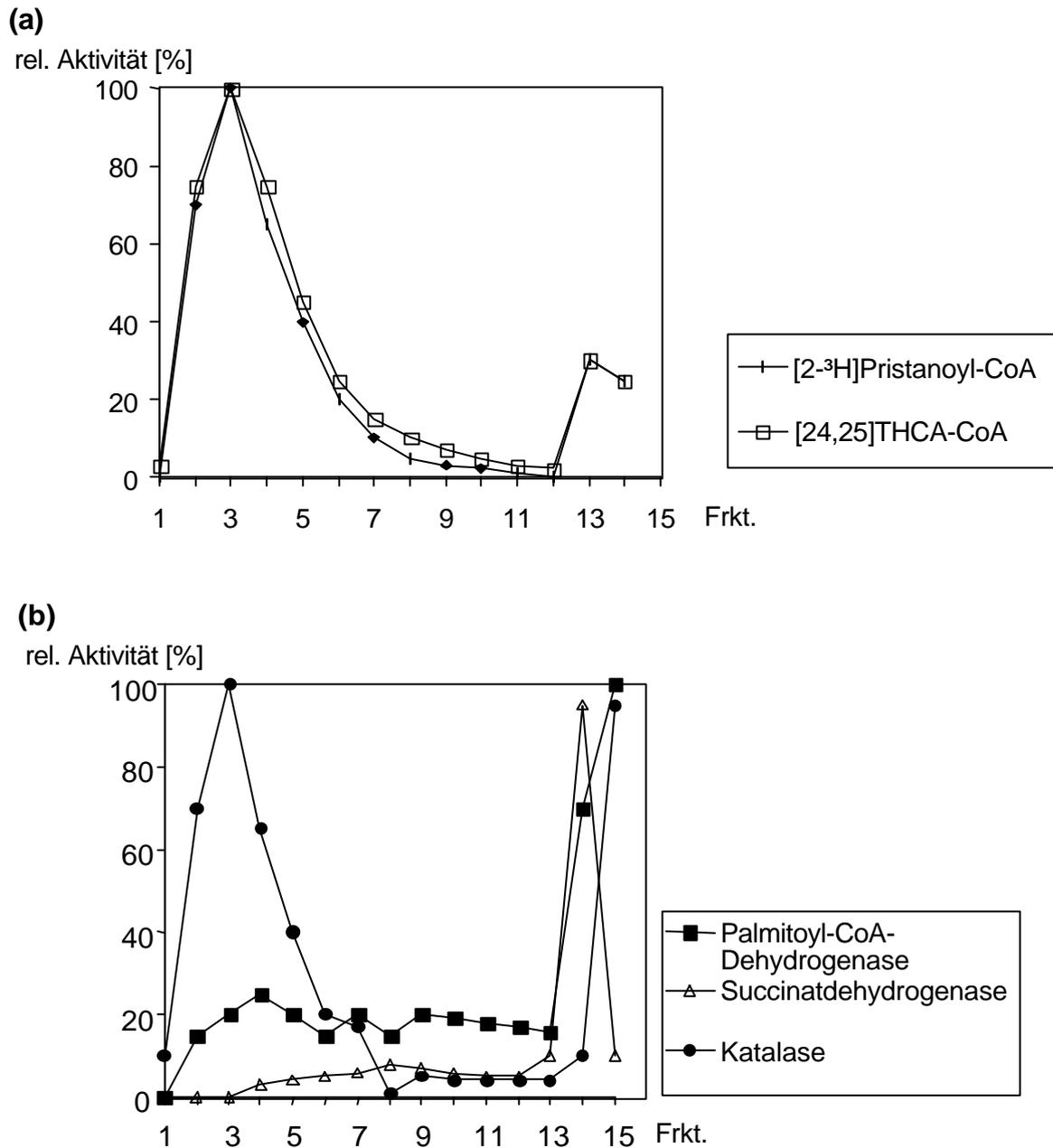


Abb. 3-21: Subzelluläre Verteilung der α -Methylacyl-CoA-Racemase in Hep-G2-Zellen (Frisch geerntete Hep-G2-Zellen wurden homogenisiert und nach Fraktionierung auf einem Nycodenz- / Saccharose-Gradienten die Racemaseaktivität (a) und die Leitenzyme (b) in den einzelnen Fraktionen bestimmt).

Neben den verschiedenen menschlichen Normalzelllinien wurde die subzelluläre Lokalisation der α -Methylacyl-CoA-Racemase in Zelllinien mit einem generalisierten Defekt in der peroxisomalen Biogenese (*Zellweger-Syndrom*) untersucht.

Dazu wurden zuerst Zellweger-Fibroblastenhomogenate im Vergleich zu Kontroll-homogenaten mit $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Pristanoyl-CoA}$ unter Standardbedingungen unterschiedlich lang inkubiert. Bei Zellen von ZS-Patienten wurden nur noch knapp 20 % $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ im Vergleich zur Normalkontrolle freigesetzt (Abb. 3-22), aus $[2,3\text{-}^3\text{H}]\text{Palmitoyl-CoA}$ wurde dagegen gleich viel $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ freigesetzt. Diese Reaktion findet ausschließlich in den Mitochondrien statt und stellt somit nur die Acyl-CoA-Dehydrogenase-Aktivität für langkettige Substrate dar (Rhead *et al.*, 1981).

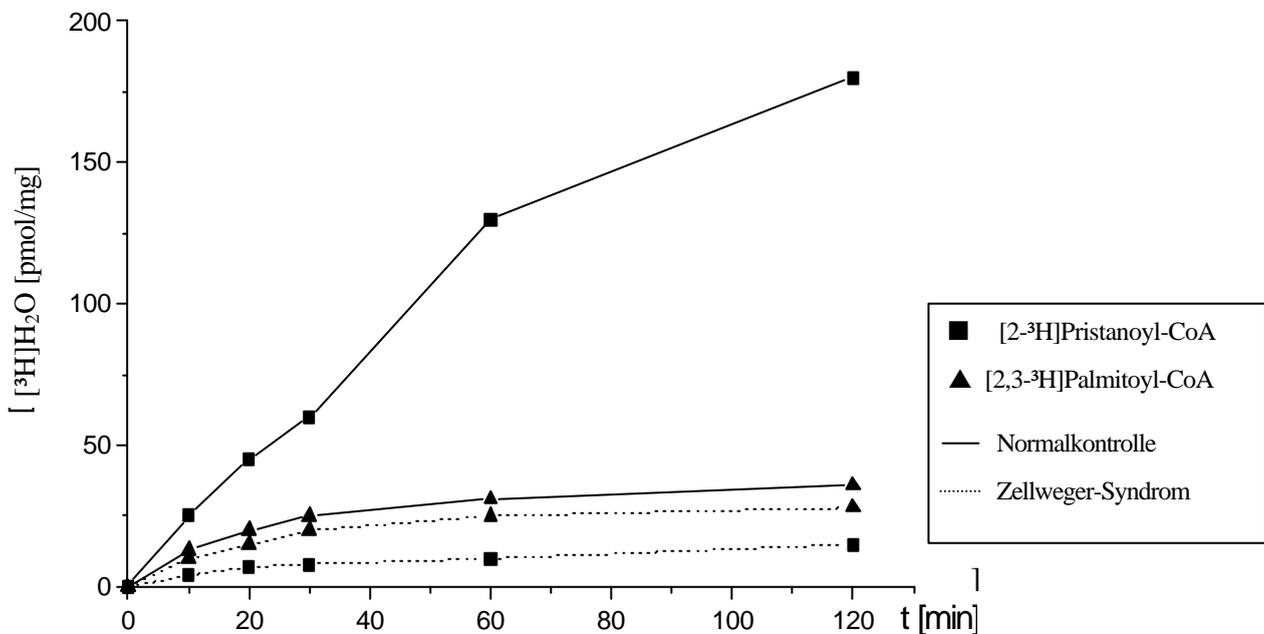
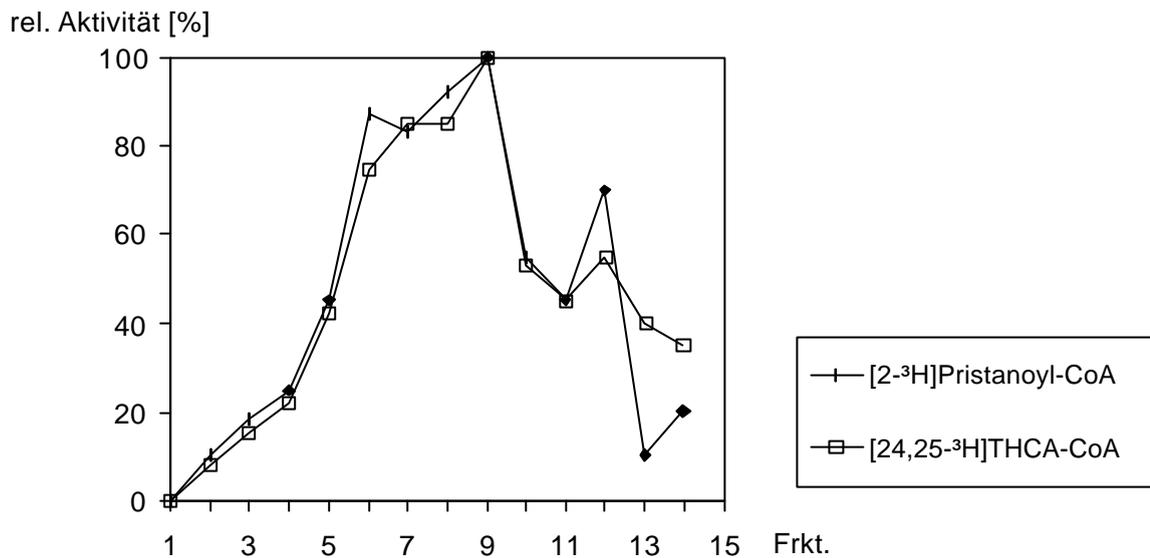


Abb. 3-22: Bildung von $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ aus $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Pristanoyl-CoA}$ und $[2,3\text{-}^3\text{H}]\text{Palmitoyl-CoA}$ durch menschliche Hautfibroblasten. (Frisch geerntete Hautfibroblasten von Patienten mit Zellweger-Syndrom im Vgl. zu Normalkontrollen wurden homogenisiert, je $100\ \mu\text{g}$ Protein mit $10\ \mu\text{M}$ $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Pristanoyl-CoA}$ bzw. $[2,3\text{-}^3\text{H}]\text{Palmitoyl-CoA}$ bei 37°C inkubiert und das freigesetzte $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ mit dem Standardassay bestimmt).

Bei einer subzellulären Fraktionierung von Fibroblasten von ZS-Patienten konnte nur noch in den Mitochondrien eine Restaktivität der Racemase lokalisiert werden (Abb. 3-23). Eine Defizienz der α -Methylacyl-CoA-Racemase-Aktivität konnte auch in Chorionzyten, in Chorionzottenhomogenaten

und Amnionzyten von Feten mit Zellweger-Syndrom anhand der $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ -Freisetzung aus $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Pristanoyl-CoA}$ nachgewiesen werden (Tab. 3-3), die Palmitoyl-CoA-Aktivität wurde jeweils als interne Kontrolle mitgemessen.

(a)



(b)

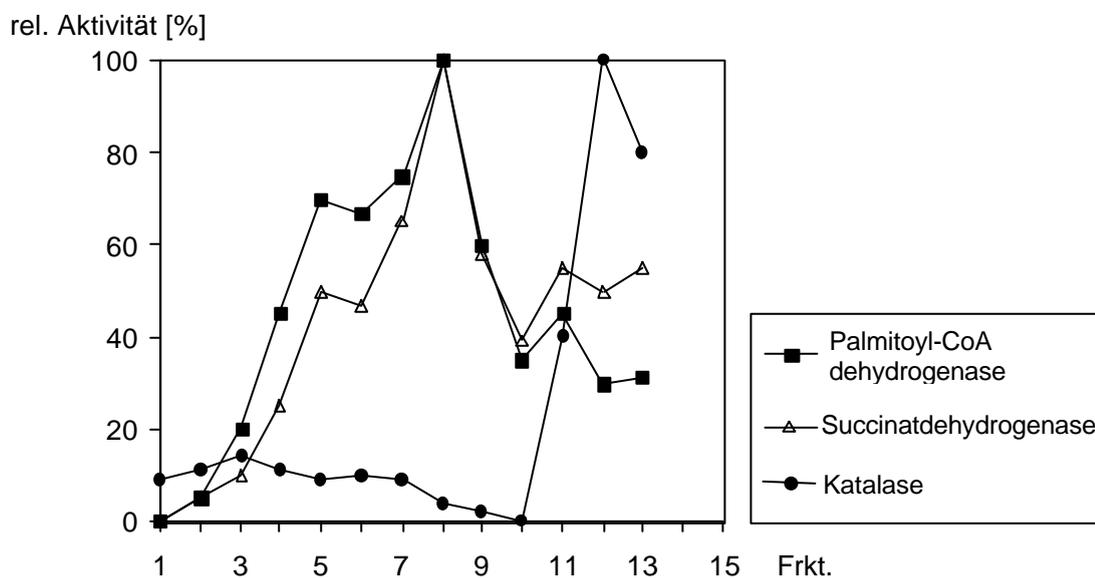


Abb. 3-23: Subzelluläre Verteilung der α -Methylacyl-CoA-Racemase in Hautfibroblasten von Patienten mit Zellwegersyndrom (Frisch geerntete Zellwegerfibroblasten wurden homogenisiert und nach Fraktionierung auf einem Nycodenz/Saccharose-Gradienten die Racemaseaktivität (a) und die Leitenzyme (b) in den einzelnen Fraktionen bestimmt).

3.3.9 Gewebsspezifische Aktivität der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase

Um zu untersuchen, inwieweit die Aktivität der α -Methylacyl-CoA-Racemase in verschiedenen Zellen und Geweben spezifisch ausgeprägt ist und dieser Nachweis auch für diagnostische Zwecke einsetzbar ist, wurde die Racemaseaktivität in Gewebshomogenaten gesunder Probanden und an einem generalisierten peroxisomalem Defekt (ZS, *Zellweger-Syndrom*) erkrankter Patienten durchgeführt. Neben [2-³H]Pristanoyl-CoA wurde auch [2,3-³H]Palmitoyl-CoA als Kontrolle eingesetzt und für den Vergleich der Racemaseaktivität das Verhältnis von Pristanoyl-CoA zu Palmitoyl-CoA bestimmt.

Bei den Patienten mit Zellweger-Syndrom war im Vergleich zu den Normalkontrollen die Racemaseaktivität deutlich reduziert (Tab. 3-3). Da Peroxisomen in allen Zelltypen (abgesehen von Erythrozyten) vorkommen, konnte, wie erwartet, diese Reduktion in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Allerdings ist die Häufigkeit der Peroxisomen vom jeweiligen Zelltyp abhängig, während z.B. die Leber peroxisomenreich ist, sind in Amnionzellen relativ wenige Peroxisomen zu finden (Roels *et al.*, 1991). Wie aus Tab. 3-3 zu ersehen ist, läßt die Messung jedoch in allen Geweben eine deutliche Abnahme der [³H]H₂O -Freisetzung erkennen, so daß die Messung der Racemaseaktivität auch im Hinblick auf diagnostische Zwecke einsetzbar ist.

Die eindeutige Verringerung der [³H]H₂O-Bildung in Zellen und Geweben fetaler Herkunft, sowohl in Amnionzyten und Chorionzyten als auch direkt im Chorionzottenbiopsat, ist in diesem Zusammenhang für Pränataldiagnosen von besonderem Interesse. Für die Pränataldiagnostik ist es von entscheidender Bedeutung, die Zeit bis zum Erhalt des Untersuchungsergebnisses möglichst gering zu halten. Eine Amniozentese kann erst in der 16. Schwangerschaftswoche p.m. (postmenstruum) erfolgen, wobei die Anzucht der Zellen die Untersuchung noch weiter verzögert. Das Ergebnis liegt durch eine Chorionbiopsie schon viel früher vor, da diese schon ab der 9. Schwangerschaftswoche p.m. gelingt und sich unmittelbar, d.h. ohne vorherige Zellzüchtung, mit dem Chorionzottenbiopsat ein sicheres Ergebnis erzielen läßt. Mit dem Anzüchten der Chorionzyten kann das Untersuchungsergebnis dann zusätzlich bestätigt werden.

Die Bestimmung der Racemaseaktivität im Chorionzottenbiopsat, in Chorion- und Amnionzyten, ermöglicht ein schnelles und sicheres Untersuchungsergebnis. Die Aktivitätsbestimmung der α -

Methylacyl-CoA-Racemase kann somit auch in der Pränataldiagnostik zur Untersuchung von Defekten der Peroxisomenbiogenese eingesetzt werden.

Gewebe	Probe	[2- ³ H]Pristanoyl-CoA	[2,3- ³ H]Palmitoyl-CoA	Pris-CoA/Palm-CoA
		[pmol/min/mg Protein]	[pmol/min/mg Protein]	[pmol/min/mg Protein]
Leber	Kontrolle	40,56	10,0	4,06
	ZS-Fall 1 (fetal)	0,46	3,94	0,12
	ZS-Fall 2 (fetal)	3,40	3,16	1,08
Herz-G2-		5,14	0,76	6,76
Haut-Fibroblasten	Kontrolle	2,94	0,87	3,38
	Kontrolle	4,62	2,61	1,77
	Kontrolle	10,41	6,85	1,52
	ALD	1,62	1,15	1,41
	ZS-Fall 2	0,69	2,74	0,25
	ZS-Fall 4	1,70	2,05	0,83
	ZS-Fall 6	2,54	9,98	0,26
	ZS-Fall 7	2,39	8,96	0,27
Amnionzvtten	Kontrolle	0,76	0,60	1,26
	Kontrolle	0,70	0,51	1,38
	ZS-Fall 2	0,12	0,47	0,25
Chorionzotten	Kontrolle	3,53	2,03	1,74
	Kontrolle	2,32	2,07	1,12
	Kontrolle	6,77	2,17	3,13
	ZS-Fall 2	1,28	6,68	0,19
	ZS-Fall 5	2,69	23,19	0,12
	ZS-Fall 8	2,37	13,65	0,17
Chorionzvtten	Kontrolle	3,34	1,76	1,90
	ZS-Fall 1	0,06	1,53	0,04
	ZS-Fall 2	0,13	1,58	0,08
	ZS-Fall 5	1,23	13,33	0,09
	ZS-Fall 8	0,65	3,87	0,17

Tab. 3-3: [³H]H₂O-Bildung aus [2-³H]Pristanoyl-CoA und [2,3-³H]Palmitoyl-CoA in verschiedenen menschlichen Geweben (Fälle 2/3 und 4/5 waren Zwillingss feten mit Zellweger-Syndrom (ZS)).

3.3.10 Immunchemische Charakterisierung der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase

Für die immunchemische Untersuchung des menschlichen Enzyms wurde ein polyklonales Antiserum gegen das gereinigte Rattenenzym aus Kaninchen gewonnen (Schmitz *et al.*, 1994).

3.3.10.1 Westernblot

Das polyklonale Antiserum gegen die α -Methylacyl-CoA-Racemase wurde zuerst im Westernblot (2.2.3.7) gegen Homogenate aus Human-, Maus- und Rattenleber eingesetzt (Abb. 3-24), wobei der Antikörper zwar stärker mit dem Rattenantigen als mit dem menschlichen bzw. dem Mausenzym reagierte, aber die Reaktion dennoch einen eindeutigen Nachweis zuließ (2.2.6.3).

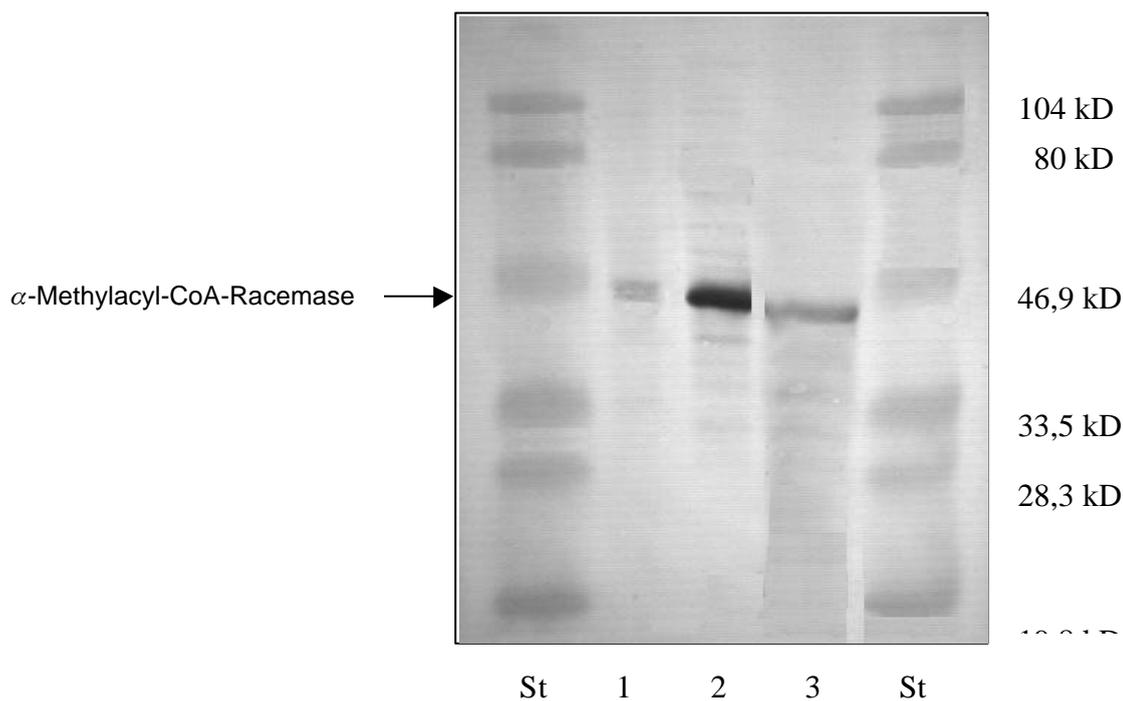


Abb. 3-24: Westernblot mit Antiserum gegen α -Methylacyl-CoA-Racemase aus menschlicher Leber (1), Rattenleber (2) und Mausleber (3), als Marker (St) wurde ein low range prestained Marker eingesetzt (2.2.3.4).

3.3.10.2 Immunopräzipitation

In einem Immunopräzipitationsversuch mit Rohextrakten aus Ratten- bzw. Humanleber (2.2.6.2) verhinderte das Antiserum gegen die α -Methylacyl-CoA-Racemase aus Rattenleber die $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ -Bildung aus $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Pristanoyl-CoA}$ und $[24,25\text{-}^3\text{H}]\text{Trihydroxycoprostanoyl-CoA}$ fast vollständig (Tab. 3-4). Nach Behandlung mit Präimmunsereum, d.h. in Gegenwart der Racemase, kam es zu einer signifikanten Bildung von $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ aus beiden genannten Substraten und das sowohl in Ratten- als auch in Humanleber. In Abwesenheit der Racemaseaktivität (nach Präzipitation mit Antiserum) kam die $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ -Freisetzung dagegen in beiden Geweben fast vollständig zum Erliegen.

	Immunsereum (IS)	Substrat	$[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ -Bildung [pmol/min]
Humanleber	Prä-IS	Pristanoyl-CoA	0,219
	Anti-IS	Pristanoyl-CoA	0,012
	Prä-IS	THCA-CoA	0,055
	Anti-IS	THCA-CoA	0,000
Rattenleber	Prä-IS	Pristanoyl-CoA	2,170
	Anti-IS	Pristanoyl-CoA	0,070
	Prä-IS	THCA-CoA	0,210
	Anti-IS	THCA-CoA	0,000

Tab. 3-4: Präzipitation der $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ -Bildung aus Human- und Rattenleberextrakten mit Antiserum gegen Rattenleber-Racemase. Experimentelles: 100 μl postnukleäre Überstände aus Human- und Rattenleber wurden mit Antiserum bzw. Präimmunsereum und Protein A-Sepharose behandelt und 150 μl der Überstände nach Immunpräzipitation mit $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Pristanoyl-CoA}$ bzw. mit $[24,25\text{-}^3\text{H}]\text{THCA-CoA}$ unter Standardbedingungen inkubiert. Das gebildete $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ wurde mit Hilfe des Standardassays bestimmt (2.2.5.1).

Hieraus wird deutlich, daß das polyklonale Antiserum gegen das Rattenenzym mit der humanen Racemase kreuzreagiert, und zwar sowohl mit dem peroxisomalen als auch mit dem mitochondrialen Enzym.

Außerdem zeigt sich, daß die $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ -Bildung in menschlichen Geweben, wie auch im Fall des Rattenenzym fast ausschließlich auf die α -Methylacyl-CoA-Racemase zurückgeht.

Insofern konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß die Racemase in der Tat das einzige Enzym ist, das in der Lage ist, aus den oben beschriebenen Substraten $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ freizusetzen. Der Effekt möglicher konkurrierender Enzyme, wie Oxidasen oder Dehydrogenasen bleibt damit vernachlässigbar. Somit ist dieser sensitive Standardtest als Enzymnachweis auch für Messungen im Rohextrakt geeignet.

Bei einem analogen Präzipitationsversuch wurde das Modellsubstrat α -Methyltetradecanoyl-CoA zum direkten Nachweis der Racemisierung eingesetzt. Nach einer Behandlung von Extrakten aus Human- und Rattenleber mit Anti-Immunsereum und Protein A-Sepharose und anschließender Inkubation mit (R)- und (S)- α -Methyltetradecanoyl-CoA wurde die α -Methylacyl-CoA-Racemase-Aktivität fast vollständig entfernt, während das Präimmunsereum keinen Effekt auf die Racemaseaktivität hatte (Tab. 3-5).

	Immunsereum (IS)	Substratkonfiguration	Produkte [%]	
			(S)	(R)
Humanleber	Prä-IS	(R)	23	77
	Prä-IS	(S)	70	30
	Anti-IS	(R)	7	93
	Anti-IS	(S)	95	5
Rattenleber	Prä-IS	(R)	45	55
	Prä-IS	(S)	56	44
	Anti-IS	(R)	2	98
	Anti-IS	(S)	95	5

Tab. 3-5: Präzipitation der α -Methylacyl-CoA-Racemase-Aktivität aus Human- und Rattenleberextrakten mit Antiserum gegen Rattenleber-Racemase. Experimentelles: 100 μl postnukleäre Überstände aus Human- und Rattenleber wurden mit Antiserum bzw. Präimmunsereum und Protein A-Sepharose behandelt und nach Immunpräzipitation 150 μl der Überstände entweder mit 200 nmol (R)- oder (S)-2-Methyltetradecanoyl-CoA für eine Stunde unter Standardbedingungen inkubiert. Nach Derivatisierung mit (R)-1-Phenylethylamin wurden die relativen Ausbeuten der (R)- und (S)-Enantiomere mittels GLC detektiert.

Mittels gaschromatographischer Analyse der Produkte wurde in den mit Präimmunsrum behandelten Ansätze die Racemisierung des jeweils eingesetzten (*R*)- bzw. (*S*)-CoA-Esters gezeigt. Bei den mit Antiserum behandelten Extrakten, d.h. nach Inaktivierung der Racemase, wurden die eingesetzten Enantiomere nahezu vollständig wiedergefunden. In Gegenwart der Racemase konnte eine Abnahme beider Stereoisomere gezeigt werden, ein Hinweis auf die Stereospezifität der für die weitere β -Oxidation zuständigen Enzyme.

3.4 Molekularbiologische Charakterisierung der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase

3.4.1 Ermittlung der cDNA-Sequenz

3.4.1.1 Allgemeine Strategie

Zur Ermittlung der cDNA-Sequenz der menschlichen α -Methylacyl-CoA-Racemase wurde zunächst anhand der bereits bekannten Sequenzen der entsprechenden Enzyme von Ratte und Maus (Schmitz *et al.*, 1997) in der Merck/Washington University EST (*expressed sequence tags*) Sequenz-Datenbank nach humanen cDNAs mit ähnlichen Sequenzen gesucht. Die entsprechenden Klone wurden, soweit erhältlich, amplifiziert und vollständig sequenziert.

Parallel dazu konnten anhand der aus den EST-Datenbanken erhaltenen Sequenzinformationen geeignete Primer synthetisiert werden, um mittels PCR aus mehreren cDNA-Banken (Marathon-ReadyTM und λ GT11 cDNA von ClonTech, Uni-ZAPTM XR Library von Stratagene) eigene, möglichst vollständige cDNA-Klone zu isolieren. Diese Primer sind in der Tabelle 3-6 mit ihren jeweiligen Sequenzpositionen, Schmelzpunkten und Nucleotidsequenzen aufgeführt. Zur besseren Orientierung sind die Sequenzpositionen der Primer und der sukzessive ermittelten Sequenzen auf die resultierende Gesamtsequenz der Racemase bezogen, die in Abb. 3-31 dargestellt ist. Des Weiteren wurde genomische DNA aus Leukozyten präpariert und für die PCR eingesetzt. Auf diese Weise gelang es, die vollständige 5'-UTR-Region zu amplifizieren, die in keiner anderen cDNA-Bank gefunden werden konnte.

Primer	Position	Sequenz (5' → 3')	Smp.[°C]
	[bp]		(2°+4°C)
H-18f	1- 18	GGCGCCGGGATTGGGAGG	64,0°C
H- 5f	6- 24	CGGGATTGGGAGGGCTTCT	62,0°C
H- 1f	21- 39	TCTTGCAGGCTGCTGGGC	60,0°C
H-20f	25- 42	TGCAGGCTGCTGGGCTGG	62,0°C
H-16f	68- 86	GCGGGGCACTGGGAAGCG	64,0°C
H-16r	87- 68	GCGCTTCCCAGTGCCCCGC	68,0°C
H- 6f	97- 114	GCAGGCATCTCGGTTCGT	60,0°C
H-Int-1r	332- 315	GGCGGAAGGGCTCCAGCA	62,0°C
H-Int-1f	333- 352	GCGGTGTCATGGAGAAACTC	62,0°C
H-RacII-Int-IIr	476- 454	ACAAAGGCAAATAGTTGATATCG	62,0°C
H-RacII-Int-IIIf	477- 497	TCAGGTGTTCTCTCAAAAATTG	60,0°C
H-RacII-1f	548- 568	GCTGGTGGTGGCCTTATGTGT	66,0°C
H-RacII-1r	568- 548	ACACATAAGGCCACCACCAGC	66,0°C
H-RacII-2f	597- 617	ACCGCACACGCACTGACAAGG	68,0°C
H-RacII-2r	617- 597	CCTTGTCAGTGCGTGTGCGGT	68,0°C
H-RacII-Int-IIIr1	640- 619	CATATCTGCATCAATGACCTGA	62,0°C
H-RacII-Int-IIIr2	640- 619	CATATTTGCGTCAATGACCTGA	62,0°C
H-RacII-Int-IIIf	641- 663	GTGGAAGGAACAGCATATTTAAG	64,0°C
H-RacII-Int-IVr	827- 817	CTTTGATCAGCAGCTCGTAGA	62,0°C
H-Int-4f	828- 848	GACTTGACTAAAGTCTGATG	60,0°C
H-RacII-Stop-1f	1215-1237	ATAAGGTAAAAGCTAGTCTCTAA	60,0°C
H-RacII-Stop-1r	1237-1215	TTAGAGACTAGCTTTTACCTTAT	60,0°C
H-RacII-Stop-2r	1257-1238	TTGAGCCGTGGCCTGGAAG	66,0°C
H-RacII-Stop-3f	1980-2002	GTTCTGGATCTTATAACCAACAC	66,0°C
H-RacII-Stop-3r	2041-2021	TTGGGGGGTCCTGAGATCTTT	64,0°C

Tab. 3-6: Darstellung der spezifischen Primer zur Amplifikation der α -Methylacyl-CoA-Racemase aus verschiedenen cDNA-Banken.

3.4.1.2 Marathon-Ready™ cDNA

Bei der Marathon-Ready™ cDNA von ClonTech handelt es sich um eine cDNA-Bank aus Humanleber, deren DNA-Stücke in spezifische Adaptoren (AP 1, AP 2) kloniert sind (2.4.1). Die Amplifikation der cDNA-Sequenz der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase gelang mit Hilfe von *nested PCR*, bei der erst der vektorspezifische äußere AP1-Primer und anschließend der innere AP 2-Primer kombiniert mit genspezifischen Primern (2.4.2) eingesetzt wurde.

Für die PCR-Amplifikation (2.4.11) wurden Reaktionsansatz und Temperaturprogramm wie folgt gewählt:

PCR-Ansatz:

3,0 μ l 10x PCR-Puffer
 1,0 μ l AP1- bzw. AP2-Primer (10 μ M)
 1,0 μ l spez. Primer (10 μ M)
 4,0 μ l dNTPs (2 mM)
 1,0 μ l McDNA-Template (10 μ g/ml)
 19,8 μ l ddH₂O
 0,2 μ l Taq-Polymerase (4 U/ μ l) (Sigma)

PCR-Programm:

Denaturierung: 94°C, 1 min
 Schmelzen: 94°C, 30 sec
 Annealing: x°C², 50 sec
 Elongation: 72°C, 3 min
 Zyklenzahl: 32

Insgesamt wurden fünf cDNA-Klone mit Längen von 295 bis 1172 Basenpaaren erhalten. Alle Klone wurden mehrfach in beide Richtungen sequenziert. Der längste Klon (HSM 3.3) enthielt die vollständige codierende Sequenz (ORF, *open reading frame*) mit einer Gesamtlänge von 1146 bp. Die Sequenzen der anderen Klone waren in HSM 3.3 enthalten und bestätigten die ermittelte cDNA-Sequenz. Durch Vergleich aller fünf Sequenzen wurde eine Konsensus-Sequenz (McDNA-kon) erhalten (Abb. 3-25).

² spez. Annealing-Temperatur, siehe 2.4.2

Bezeichnung	BP	A	C	G	T/U	Sequenzposition ³
1 McDNA-kon	1172	522	441	529	549	69 - 1240
2 HSM 3-3	1172	280	273	344	274	69 - 1240
3 H 12-13	295	34	91	116	53	69 - 363
4 HSP 5	229	25	73	90	40	71 - 299
5 H 1-11	817	164	204	257	188	69 - 885
6 H 2-5	741	151	177	233	176	114 - 854

5'		70	80	90	100
McDNA-kon	51	GC	GGGGCACTGG	GAA-GCGCCA	TGGCACTGCA
HSM 3-3	-18	**	*****	***A*****	*****
H 12-13	-18	**	*****	***_*****	*****
HSP 5	-20		*****	***_*****	*****
H 1-11	-18	**	*****	***_*****	*****

		110	120	130	140	150
McDNA-kon	101	GGGCATCTCG	GTCATGGAGC	TGTCCGGCCT	GGCCCCGGGC	CCGTTCTGTG
HSM 3-3	33	*****	*****	*****	*****	*****
H 12-13	33	*****	***G*****	*****	*****	*****
HSP 5	31	*****	*****	*****	*****	*****
H 1-11	33	*****	*****	*****	*****	*****
H 2-5	-13-*****	**G*A*****	*****	*****

		160	170	180	190	200
McDNA-kon	151	CTATGGTCCT	GGCTGACTTC	GGGGCGCGTG	TGGTACGCGT	GGACCGGCC
HSM 3-3	83	*****	*****	*****	*****	*****
H 12-13	83	*****	*****	*****	*****	*****
HSP 5	81	*****	*****	*****	*****	*****
H 1-11	83	*****	*****	*****	*****	*****
H 2-5	38	*****	*****	*****	*****	***T*A***

		210	220	230	240	250
McDNA-kon	201	GGCTCCCGCT	ACGACGTGAG	CCGCTTGGGC	CGGGGCAAGC	GCTCGCTAGT
HSM 3-3	133	*****	*****	*****	*****	***A*****
H 12-13	133	*****	*****	*****	*****	*****
HSP 5	131	*****	*****	*****	*****	***A*****
H 1-11	133	*****	*****	*****	*****	*****
H 2-5	88	*****	*****	*****	*****	*****

		260	270	280	290	300
McDNA-kon	251	GCTGGACCTG	AAGCAGCCGC	GGGGAGCCGC	CGTGCTGCGG	CGTCTGTGCA
HSM 3-3	183	*****	*****	*****	*****	*****
H 12-13	183	*****	*****	*****	*****	*****
HSP 5	181	*****	*****	*****	*****	*****
H 1-11	183	*****	*****	*****	*****	*****T
H 2-5	138	*****	*****	*****	*****	*****

³ Sequenzposition auf die vollständige Sequenz (Abb. 3-31) bezogen

		310	320	330	340	350
McDNA-kon	301	AGCGGTCGGA	TGTGCTGCTG	GAGCCCTTCC	GCCGCGGTGT	CATGGAGAAA
HSM 3-3	233	*****	*****	*****	*****	*****
H 12-13	233	*****	*****	*****	*****	*****
H 1-11	233	*****	*****	*****	*****	*****
H 2-5	188	*****	*****	*****	*****	*****
		360	370	380	390	400
McDNA-kon	351	-CTCCAGCTG	GGCCCAGAGA	TTCTGCAGCG	GGAAAATCCA	AGGCTTATTT
HSM 3-3	283	-*****	*****	***C*****	*****	*****
H 12-13	283	A*****T	**G.....
H 1-11	283	-*****	*****	*****	*****	*****
H 2-5	238	-*****	*****	*****	*****	*****
		410	420	430	440	450
McDNA-kon	401	ATGCCAGGCT	GAGTGGATTT	GGCCAGTCAG	GAAGCTTCTG	CCGTTAGCT
HSM 3-3	333	*****	*****	A*****	*****	*****
H 1-11	333	*****	*****	*****	*****	*****
H 2-5	288	*****	*****	*****	*****	*****
		460	470	480	490	500
McDNA-kon	451	GGCCACGATA	TCAACTATTT	GGCTTTGTCA	GGTGTCTCT	CAAAAATTGG
HSM 3-3	383	*****	*****	*****	*****	*****
H 1-11	383	*****	*****	*****	*****	*****
H 2-5	338	*****	*****	*****	*****	*****
		510	520	530	540	550
McDNA-kon	501	CAGAAGTGGT	GAGAATCCGT	ATGCCCCGCT	GAATCTCCTG	GCTGACTTTG
HSM 3-3	433	*****	*****	*****	*****	*****
H 1-11	433	*****	*****	*****	*****	*****
H 2-5	388	*****	*****	*****	*****	*****
		560	570	580	590	600
McDNA-kon	551	CTGGTGGTGG	CCTTATGTGT	GCACTGGGCA	TTATAATGGC	TCTTTTGTGAC
HSM 3-3	483	*****	*****	*****	*****	*****
H 1-11	483	*****	*****	*****	*****	*****
H 2-5	438	*****	*****	*****	*****	*****
		610	620	630	640	650
McDNA-kon	601	CGCACACGCA	CTGACAAGGG	TCAGGTCATT	GATGCAAATA	TGGTGGGAAGG
HSM 3-3	533	*****	*****	*****	*****	*****
H 1-11	533	*****	*****	*****	**C*****	*****
H 2-5	488	*****	*****	*****	*****G**	*****
		660	670	680	690	700
McDNA-kon	651	AACAGCATAT	TTAAGTTCTT	TTCTGTGGAA	AACTCAGAAA	TCGAGTCTGT
HSM 3-3	583	*****	*****	*****	*****	*****
H 1-11	583	*****	*****	*****	*****	*****
H 2-5	538	*****	*****	*****	*****	*****
		710	720	730	740	750
McDNA-kon	701	GGGAAGCACC	TCGAGGACAG	AACATGTTGG	ATGGTGGAGC	ACCTTTCTAT
HSM 3-3	633	*****	*****	*****	*****	*****
H 1-11	633	*****	*****	*****	*****	*****
H 2-5	588	*****	*****	*****	*****	*****

		760	770	780	790	800
McDNA-kon	751	ACGACTTACA	GGGACAGCAG	ATGGGGAATT	CATGGCTGTT	GGAGCAATAG
HSM 3-3	683	*****	*****	*****	*****	*****
H 1-11	683	*****	**_*****	*****	*****	*****
H 2-5	638	*****_	*****	*****	*****	*****
		810	820	830	840	850
McDNA-kon	801	AACCCCAGTT	CTACGAGCTG	CTGATCAAAG	GACTTG-ACT	AAAGTCTGAT
HSM 3-3	733	*****	*****	*****	*****G**	*****
H 1-11	733	*****	*****	*****	*****_**	*****
H 2-5	688	*****	*****	*****	*****_**	*****
		860	870	880	890	900
McDNA-kon	851	GAACTTCCCT	CTCAGATGAG	CACGGATGAT	TGGCCAGAAA	TGAAGAAGAA
HSM 3-3	783	*****A	A*****	**T*****	*****	*****
H 1-11	783	*****C****	*C*****	*****	*****.....
H 2-5	738	***.....
		910	920	930	940	950
McDNA-kon	901	GTTTGCAGAT	GTATTTGCAA	AGAAGACGAA	GGCAGAGTGG	TGTCAAATCT
HSM 3-3	833	*****	*****	*****	*****	*****
		960	970	980	990	1000
McDNA-kon	951	TTGACGGCAC	AGATGCCTGT	GTGACTCCGG	TTCTGACTTT	TGAGGAGGTT
HSM 3-3	883	*****	*****	*****	*****	*****
		1010	1020	1030	1040	1050
McDNA-kon	1001	GTTTCATCATG	ATCACAACAA	GGAACGGGGC	TCGTTTATCA	CCAGTGAGGA
HSM 3-3	933	*****	*****	*****	*****	*****
		1060	1070	1080	1090	1100
McDNA-kon	1051	GCAGGACGTG	AGCCCCCGCC	CTGCACCTCT	GCTGTTAAAC	ACCCAGCCA
HSM 3-3	983	*****	*****	*****	*****	*****
		1110	1120	1130	1140	1150
McDNA-kon	1101	TCCCTTCTTT	CAAAAGGGAT	CCTTTCATAG	GAGAACACAC	TGAGGAGATA
HSM 3-3	1033	*****	*****	*****	*****	*****
		1160	1170	1180	1190	1200
McDNA-kon	1151	CTTGAAGAAT	TTGGATTCGG	CCGCGAAGAG	ATATATCAGC	TTAACTCAGA
HSM 3-3	1083	*****	*****	*****	*****	*****
		1210	1220	1230	1240	1250
McDNA-kon	1201	TAAAATCATT	GAAAGTAATA	AGGTAAAAGC	TAGTCTCTAA	
HSM 3-3	1133	*****	*****	*****	***** 3'

Abb. 3-25: Sequenzvergleich der mittels Marathon-ReadyTM cDNA erhaltenen Klone (HSM 3-3, H 12-13, HSP 5, H 1-11, H2 -5) und der daraus resultierenden Konsensus-Sequenz McDNA-kon (die übereinstimmenden Basen sind mit * markiert).

3.4.1.3 Uni-ZAPTM XR Library

Zur Überprüfung der bis zu diesem Zeitpunkt vorliegenden cDNA-Sequenz bezüglich ihrer Vollständigkeit und Fehlerfreiheit wurde mit der Uni-ZAPTM XR Library auch eine λ -Phagen-cDNA-Bank aus humaner Leber eingesetzt. Bei dieser Bank ist die cDNA in den Uni-ZAP-Vektor kloniert, das pBluescript Sk Phagemid (Abb. 2.1) kann im ZAP-System amplifiziert werden (2.4.1) und nach Reinigung der Phagen-DNA direkt als Template in der PCR zum Einsatz kommen. Als vektorspezifische Primer wurden T 3- und T 7-Primer (2.4.2.2) verwendet.

Die PCR-Amplifikation (2.4.11) wurde mit folgendem speziell abgestimmten Protokoll durchgeführt:

PCR-Ansatz:

3,0 μ l 10x PCR-Puffer
 2,0 μ l T3- bzw. T7-Primer (10 μ M)
 2,0 μ l spez. Primer (10 μ M)
 4,0 μ l dNTPs (2 mM)
 1,0 μ l ZAPcDNA-Template (10 μ g/ml)
 17,8 μ l ddH₂O
 0,2 μ l Taq-Polymerase (4 U/ μ l) (Sigma)

PCR-Programm:

Denaturierung: 94°C, 4 min
 Schmelzen: 94°C, 40 sec
 Annealing: x°C⁴, 50 sec
 Elongation: 72°C, 3 min
 Zyklenzahl: 32

Im ganzen wurden vier cDNAs mit einer Länge von 295 bis 1172 bp amplifiziert, die kloniert und mehrfach in beide Richtungen sequenziert wurden. Der Klon HS Z 3 mit einer Länge von 1169 bp enthielt die vollständige codierende Sequenz (ORF, Gesamtlänge 1146 bp). Die Sequenzen der drei anderen Klone waren in HS Z 3 enthalten, ein Vergleich aller Sequenzen führte zu der Konsensus-Sequenz Zap-kon (Abb. 3-26). Diese bestätigte die aus der Marathon-Ready cDNA-Bank erhaltene Sequenz für die humane α -Methylacyl-CoA-Racemase.

⁴ spez. Annealing-Temperatur, siehe 2.4.2

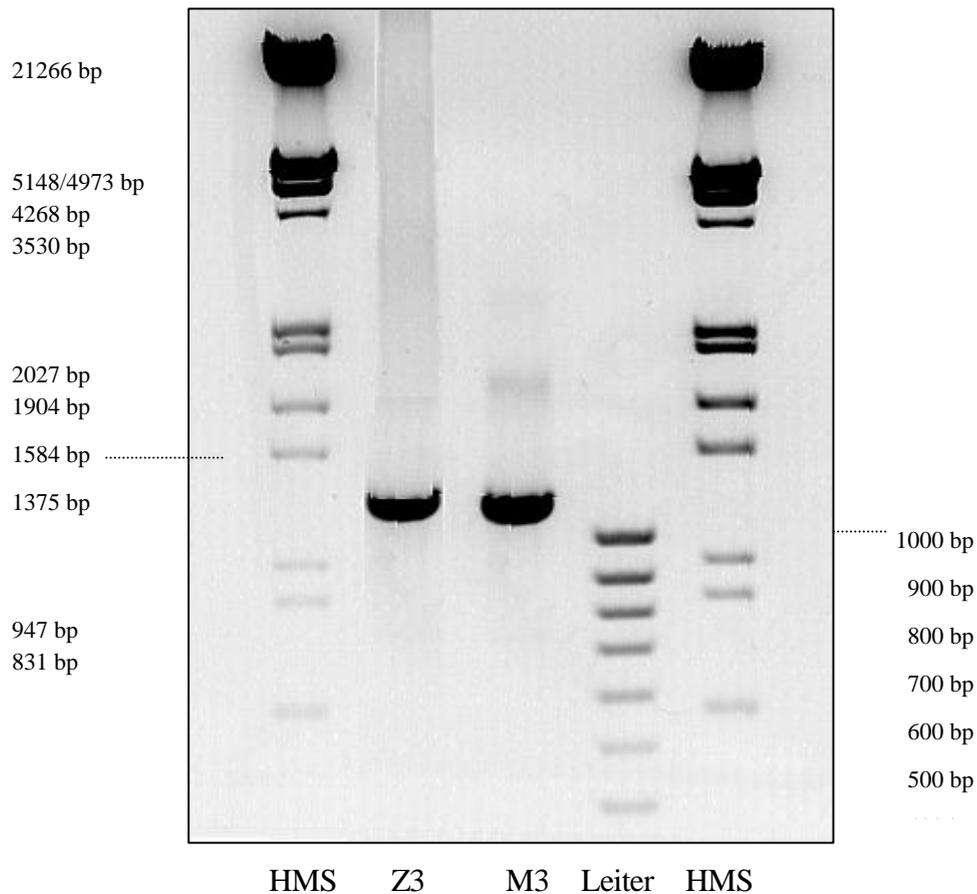


Abb. 3-26: 1%iges Agarosegel mit den full length-Klonen Z3 (aus λ -Zap-Bank) und M3 (aus Marathon cDNA-Bank): H16 f/ H-RacII Stop1r = 1169 bp.

Bezeichnung	BP	A	C	G	T/U	Sequenzposition
1 Zap-kon	1169	277	273	343	276	1 - 1169
2 HS Z3	1169	277	273	343	276	1 - 1169
3 HS Z2	759	149	191	244	175	1 - 759
4 HSRZ14	500	77	137	173	113	1 - 500
5 HSZP13	167	49	29	46	35	572 - 738
		10	20	30	40	50
Zap-kon	1	GCGGGGCACT	GGGAAGCGCC	ATGGCACTGC	AGGGCATCTC	GGTCATGGAG
HS Z3	1	*****	*****	*****	*****	*****
HS Z2	1	*****	*****	*****	*****	*****
HSRZ14	1	*****	*****	*****	*****	*****

		60	70	80	90	100
Zap-kon	51	CTGTCCGGCC	TGGCCCCGGG	CCC GTTCTGT	GCTATGGTCC	TGGCTGACTT
HS Z3	51	*****	*****	*****	*****	*****
HS Z2	51	*****	*****	*****	*****	*****
HSRZ14	51	*****	*****	*****	*****	*****
		110	120	130	140	150
Zap-kon	101	CGGGGCGCGT	GTGGTACGCG	TGGACCGGCC	CGGCTCCCGC	TACGACGTGA
HS Z3	101	*****	*****	*****	*****	*****
HS Z2	101	*****	*****	*****	*****	*****
HSRZ14	101	*****	*****	*****	*****	*****
		160	170	180	190	200
Zap-kon	151	GCCGCTTGGG	CCGGGGCAAG	CGCTCGCTAG	TGCTGGACCT	GAAGCAGCCG
HS Z3	151	*****	*****	*****A*****	*****	*****
HS Z2	151	*****	*****	*****	*****	*****
HSRZ14	151	*****	*****	*****	*****	*****A
		210	220	230	240	250
Zap-kon	201	CGGGGAGCCG	CCGTGCTGCG	GCGTCTGTGC	TAGCGGTCGG	ATGTGCTGCT
HS Z2	201	*****	*****	*****	*****	*****
HS Z3	201	*****	*****	*****	A*****	*****
HSRZ14	201	*****	*****	*****	*****	*****
		260	270	280	290	300
Zap-kon	251	GGAGCCCTTC	CGCCGCGGTG	TCATGGAGAA	ACTCCAGCTG	GGCCAGAGA
HS Z3	251	*****	*****	*****	*****	*****
HS Z2	251	*****	*****	*****	*****	*****
HSRZ14	251	*****	*****	*****	*****	*****
		310	320	330	340	350
Zap-kon	301	TTCTGCAGCG	GGAAAATCCA	AGGCTTATTT	ATGCCAGGCT	GAGTGGATTT
HS Z3	301	*****	*****	*****	*****	*****
HS Z2	301	*****	*****	*****	*****	*****
HSRZ14	301	*****	*****	*****	*****	*****
		360	370	380	390	400
Zap-kon	351	GGCCAGTCAG	GAAGCTTCTG	CCGTTTAGCT	GGCCACGATA	TCAACTATTT
HS Z3	351	*****	*****	*****	*****	*****
HS Z2	351	*****	*****	*****	*****	*****C**
HSRZ14	351	*****	*****	*****	*****	*****
		410	420	430	440	450
Zap-kon	401	GGCTTTGTCA	GGTGTCTCT	CAAAAATTGG	CAGAAGTGGT	GAGAATCCGT
HS Z3	401	*****	*****	*****	*****	*****
HS Z2	401	*****	*****	*****	*****	*****
HSRZ14	401	*****	*****	*****	*****	*****
		460	470	480	490	500
Zap-kon	451	ATGCCCCGCT	GAATCTCCTG	GCTGACTTTG	CTGGTGGTGG	CCTTATGTGT
HS Z3	451	*****	*****	*****	*****	*****
HS Z2	451	*****	*****	*****	*****	*****
HSRZ14	451	*****	*****	*****	*****	*****
		510	520	530	540	550
Zap-kon	501	GCACTGGGCA	TTATAATGGC	TCTTTTGTGAC	CGCACACGCA	CTGACAAGGG
HS Z3	501	*****	*****	*****	*****	*****
HS Z2	501	*****	*****	*****	*****	*****
		560	570	580	590	600
Zap-kon	551	TCAGGTCATT	GATGCAAATA	TGGTGGAAAGG	AACAGCCTAT	TTAAGTTCTT
HS Z3	551	*****	*****	*****	*****	*****
HS Z2	551	*****	**C*****	*****	*****	*****

HSZP	-21T*****	*****	*****
		610	620	630	640	650
Zap-kon	601	TTCTGTGGAA	AACTCAGAAA	TCGAGTCTGT	GGGAAGCACC	TCGAGGACAG
HS Z3	601	*****	*****	*****	*****	*****
HS Z2	601	*****	*****	*****	*****	*****
HSZP13	30	*****	*****	*****	*****	*****
		660	670	680	690	700
Zap-kon	651	AACATGTTGG	ATGGTGGAGC	ACCTTTCTAT	ACGACTTACA	GGACAGCAGA
HS Z3	651	*****	*****	*****	*****	*****
HS Z2	651	*****	*****	*****	*****	*T*****
HSZP13	80	*****	*****	*****	*****	*****
		710	720	730	740	750
Zap-kon	701	TGGGGAATTC	ATGGCTGTTG	GAGCAATAGA	ACCCAGTTC	TACGAGCTGC
HS Z3	701	*****	*****	*****	*****	*****
HS Z2	701	*****	*****	*****	*****	*****
HSZP13	130	-*****-*	*-***-A-	*****-****	****-*-*..
		760	770	780	790	800
Zap-kon	751	TGATCAAAGG	ACTTGGACTA	AAGTCTGACG	AACTTCCCAA	TCAGATGAGC
HS Z3	751	*****	*****	*****	*****	*****
HS Z2	751	*****
		810	820	830	840	850
Zap-kon	801	ATGGATGATT	GGCCAGAAAT	GAAGAAGAAG	TTTGCAGATG	TATTTGCAAA
HS Z3	801	*****	*****	*****	*****	*****
		860	870	880	890	900
Zap-kon	851	GAAGACGAAG	GCAGAGTGGT	GTCAAATCTT	TGACGGCACA	GATGCCTGTG
HS Z3	851	*****	*****	*****	*****	*****
		910	920	930	940	950
Zap-kon	901	TGACTCCGGT	TCTGACTTTT	GAGGAGGTTG	TTCATCATGA	TCACAACAAG
HS Z3	901	*****	*****	*****	*****	*****
		960	970	980	990	1000
Zap-kon	951	GAACGGGGCT	CGTTTATCAC	CAGTGAGGAG	CAGGACGTGA	GCCCCCGCCC
HS Z3	951	*****	*****	*****	*****	*****
		1010	1020	1030	1040	1050
Zap-kon	1001	TGCACCTCTG	CTGTTAAACA	CCCCAGCCAT	CCCTTCTTTC	AAAAGGGATC
HS Z3	1001	*****	*****	*****	*****	*****
		1060	1070	1080	1090	1100
Zap-kon	1051	CTTTCATAGG	AGAACACACT	GAGGAGATAC	TTGAAGAATT	TGGATTGAGC
HS Z3	1051	*****	*****	*****	*****	*****
		1110	1120	1130	1140	1150
Zap-kon	1101	CGCGAAGAGA	TTTATCAGCT	TAACTCAGAT	AAAATCATTG	AAAGTAATAA
HS Z3	1101	*****	*****	*****	*****	*****
		1160	1170	1180	1190	1200
Zap-kon	1151	GGTAAAAGCT	AGTCTCTAA.
HS Z3	1151	*****	*****

Abb. 3-27: Sequenzvergleich der erhaltenen Klone aus der Uni-ZAPTM XR Library (HS Z3, HS Z2, HSRZ14, HSZP13) und der daraus resultierenden Konsensus-Sequenz Zap-kon (die übereinstimmenden Basen sind mit * gekennzeichnet).

3.4.1.4 Genomische DNA aus Leukozyten

Um die aus den cDNA-Banken Marathon-ReadyTM cDNA und Uni-ZAPTM XR Library bisher erhaltene cDNA-Sequenz zu überprüfen und zusätzliche Sequenzinformationen über die untranslatierten Bereiche zu erhalten, wurde auch humane genomische DNA aus Leukozyten präpariert (2.4.4) und für die PCR eingesetzt. Das hierzu angepaßte Protokoll ist nachfolgend aufgeführt:

PCR-Ansatz:

3,0 µl 10x PCR-Puffer
 je 2,0 µl spez. Primer (10 µM)
 4,0 µl dNTPs (2 mM)
 1,0 µl DNA-Template (10 µg/ml)
 17,8 µl ddH₂O
 0,2 µl Taq-Polymerase (4 U/µl) (Sigma)

PCR-Programm:

Denaturierung: 94°C, 4 min
 Schmelzen: 94°C, 40 sec
 Annealing: x°C⁵, 50 sec
 Elongation: 72°C, 2 min
 Zyklenzahl: 32

Da die Exon-/Intronstruktur des Racemase-Gens zum Zeitpunkt dieser Arbeiten noch unbekannt war, wurde versucht, relativ kleine DNA-Stücke (100 –300 bp) zu amplifizieren. Es gelang, zwei DNA-Stücke mit Längen von 332 und 122 Basenpaaren zu erhalten, die kloniert und mehrfach sequenziert wurden. Der Klon H 1813 (122 bp) befand sich innerhalb der codierenden Region, der längere Klon H 1-4 enthielt die vollständige Sequenz der 5'-UTR (Abb. 3-28).

Die aus den cDNA-Banken und der genomischen DNA resultierende Konsensus-Sequenz für die humane α -Methylacyl-CoA-Racemase (human cDNA) ist in Abb. 3-28 dargestellt.

Bezeichnung	BP	A	C	G	T/U	Sequenzposition
1 human cDNA	1238	282	290	372	293	1 - 1238
2 H 1-4	332	35	101	132	64	1 - 332
3 McDNA-kon	1170	275	274	345	275	69 - 1238
4 ZAP-kon	1170	276	273	344	276	69 - 1238
5 H 1813	122	25	28	35	34	526 - 647
		10		20	30	40 50

⁵ spez. Annealing-Temperatur, siehe 2.4.2

human cDNA	1	GGCGCCGGGA	TTGGGAGGGC	TTCTTGCAGG	CTGCTGGGCT	GGGGCTAAGG
H 1-4	1	*****	*****	*****	*****	*****
		60	70	80	90	100
human cDNA	51	GCTGCTCAGT	TTCCTTCAGC	GGGGCACTGG	GAAGCGCCAT	GGCACTGCAG
H 1-4	51	*****	*****	*****	*****	*****
McDNA-kon	-18**	*****	*****	*****
ZAP-kon	-18**	*****	*****	*****
		110	120	130	140	150
human cDNA	101	GGCATCTCGG	TCATGGAGCT	GTCCGGCCTG	GCCCCGGGCC	CGTTCTGTGC
H 1-4	101	*****	**G*****	*****	*****	*****
McDNA-kon	33	*****	*****	*****	*****	*****
ZAP-kon	33	*****	*****	*****	*****	*****
		160	170	180	190	200
human cDNA	151	TATGGTCCTG	GCTGACTTCG	GGGCGCGTGT	GGTACGCGTG	GACCGGCCCG
H 1-4	151	*****	*****	*****	*****	*****
McDNA-kon	83	*****	*****	*****	*****	*****
ZAP-kon	83	*****	*****	*****	*****	*****
		210	220	230	240	250
human cDNA	201	GCTCCCGCTA	CGACGTGAGC	CGCTTGGGCC	GGGGCAAGCG	CTCGCTAGTG
H 1-4	201	*****	*A*****	*****	*****	*****
McDNA-kon	133	*****	*****	*****	*****	*****
ZAP-kon	133	*****	*****	*****	*****	*****
		260	270	280	290	300
human cDNA	251	CTGGACCTGA	AGCAGCCGCG	GGGAGCCGCC	GTGCTGCGGC	GTCTGTGCAA
H 1-4	251	*****	*****	*****	*****	*****
McDNA-kon	183	*****	*****	*****	*****	*****
ZAP-kon	183	*****	*****	*****	*****	*****T*
		310	320	330	340	350
human cDNA	301	GCGGTCGGAT	GTGCTGCTGG	AGCCCTTCCG	CCGCGGTGTC	ATGGAGAAAC
H 1-4	301	*****	*****	*****	**.....
McDNA-kon	233	*****	*****	*****	*****	*****
ZAP-kon	233	*****	*****	*****	*****	*****
		360	370	380	390	400
human cDNA	351	TCCAGCTGGG	CCCAGAGATT	CTGCAGCGGG	AAAATCCAAG	GCTTATTTAT
McDNA-kon	283	*****	*****	*****	*****	*****
ZAP-kon	283	*****	*****	*****	*****	*****
		410	420	430	440	450

human cDNA	401	GCCAGGCTGA	GTGGATTTGG	CCAGTCAGGA	AGCTTCTGCC	GGTTAGCTGG
McDNA-kon	333	*****	*****	*****	*****	*****
ZAP-kon	333	*****	*****	*****	*****	*****
		460	470	480	490	500
human cDNA	451	CCACGATATC	AACTATTTGG	CTTTGTCAGG	TGTTCTCTCA	AAAATTGGCA
McDNA-kon	383	*****	*****	*****	*****	*****
ZAP-kon	383	*****	*****	*****	*****	*****
		510	520	530	540	550
human cDNA	501	GAAGTGGTGA	GAATCCGTAT	GCCCCGCTGA	ATCTCCTGGC	TGACTTTGCT
McDNA-kon	433	*****	*****	*****	*****	*****
ZAP-kon	433	*****	*****	*****	*****	*****
H1813KO.SEQ	-25*	*****	*****GC
		560	570	580	590	600
human cDNA	551	GGTGGTGGCC	TTATGTGTGC	ACTGGGCATT	ATAATGGCTC	TTTTTGACCG
McDNA-kon	483	*****	*****	*****	*****	*****
ZAP-kon	483	*****	*****	*****	*****	*****
H1813KO.SEQ	26	*****A****	*****	*****	*****	*****
		610	620	630	640	650
human cDNA	601	CACACGCACT	GACAAGGGTC	AGGTCATTGA	TGCAAATATG	GTGGAAGGAA
McDNA-kon	533	*****	*****	*****	*****	*****
ZAP-kon	533	*****	*****	*****	*****	*****
H1813KO.SEQ	76	*****	*T*****	*****C**	*T**	
		660	670	680	690	700
human cDNA	651	CAGCATATTT	AAGTTCTTTT	CTGTGGAAAA	CTCAGAAATC	GAGTCTGTGG
McDNA-kon	583	*****	*****	*****	*****	*****
ZAP-kon	583	*****	*****	*****	*****	*****
		710	720	730	740	750
human cDNA	701	GAAGCACCTC	GAGGACAGAA	CATGTTGGAT	GGTGGAGCAC	CTTTCTATAC
McDNA-kon	633	*****	*****	*****	*****	*****
ZAP-kon	633	*****	*****	*****	*****	*****
		760	770	780	790	800
human cDNA	751	GACTTACAGG	-ACAGCAGAT	GGGGAATTCA	TGGCTGTTGG	AGCAATAGAA
McDNA-kon	683	*****	G*****	*****	*****	*****
ZAP-kon	683	*****	-*****	*****	*****	*****
		810	820	830	840	850
human cDNA	801	CCCCAGTTCT	ACGAGCTGCT	GATCAAAGGA	CTTGACTAA	AGTCTGATGA
McDNA-kon	733	*****	*****	*****	****_*****	*****
ZAP-kon	733	*****	*****	*****	*****	*****C**
		860	870	880	890	900

human cDNA	851	ACTTCCCTCT	CAGATGAGCA	CGGATGATTG	GCCAGAAATG	AAGAAGAAGT
McDNA-kon	783	*****	*****	*****	*****	*****
ZAP-kon	783	*****AA*	*****	T*****	*****	*****
		910	920	930	940	950
human cDNA	901	TTGCAGATGT	ATTTGCAAAG	AAGACGAAGG	CAGAGTGGTG	TCAAATCTTT
McDNA-kon	833	*****	*****	*****	*****	*****
ZAP-kon	833	*****	*****	*****	*****	*****
		960	970	980	990	1000
human cDNA	951	GACGGCACAG	ATGCCTGTGT	GACTCCGGTT	CTGACTTTTG	AGGAGGTTGT
McDNA-kon	883	*****	*****	*****	*****	*****
ZAP-kon	883	*****	*****	*****	*****	*****
		1010	1020	1030	1040	1050
human cDNA	1001	TCATCATGAT	CACAACAAGG	AACGGGGCTC	GTTTATCACC	AGTGAGGAGC
McDNA-kon	933	*****	*****	*****	*****	*****
ZAP-kon	933	*****	*****	*****	*****	*****
		1060	1070	1080	1090	1100
human cDNA	1051	AGGACGTGAG	CCCCCGCCCT	GCACCTCTGC	TGTTAAACAC	CCCAGCCATC
McDNA-kon	983	*****	*****	*****	*****	*****
ZAP-kon	983	*****	*****	*****	*****	*****
		1110	1120	1130	1140	1150
human cDNA	1101	CCTTCTTTCA	AAAGGGATCC	TTTCATAGGA	GAACACACTG	AGGAGATACT
McDNA-kon	1033	*****	*****	*****	*****	*****
ZAP-kon	1033	*****	*****	*****	*****	*****
		1160	1170	1180	1190	1200
human cDNA	1151	TGAAGAATTT	GGATTGAGCC	GCGAAGAGAT	TTATCAGCTT	AACTCAGATA
McDNA-kon	1083	*****	*****G**	*****	A*****	*****
ZAP-kon	1083	*****	*****	*****	*****	*****
		1210	1220	1230	1240	1250
human cDNA	1201	AAATCATTGA	AAGTAATAAG	GTAAAAGCTA	GTCTCTAA..
McDNA-kon	1133	*****	*****	*****	*****..
ZAP-kon	1133	*****	*****	*****	*****..

Abb. 3-28: Sequenzvergleich der cDNA-Sequenzen der Uni-ZAPTM XR Library (ZAP-kon), der Marathon-ReadyTM-cDNA (McDNA-kon), genomischer DNA (H 1-4, H 1813) und der daraus resultierenden Konsensus-Sequenz (human cDNA) für die humane α -Methylacyl-CoA-Racemase (die übereinstimmenden Basen sind mit * markiert).

3.4.1.5 EST-Sequenzvergleich

Bei einem Vergleich mit verschiedenen EST-Sequenzen (*expressed sequence tags*) aus der Merck/Washington University EST Sequenz-Datenbank konnte die aus den cDNA-Banken ermittelte Sequenz für die humane α -Methylacyl-CoA-Racemase bestätigt werden. Mit Hilfe des BLAST-Programms (Altschul *et al.*, 1990) wurde nach Übereinstimmungen mit der cDNA-Sequenz der Racemase gesucht. Hierbei wurden mehrere Klone identifiziert, deren Sequenzen Ähnlichkeiten zur α -Methylacyl-CoA-Racemase aufwies. Diese EST-Sequenzen sind in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 3-7) aufgeführt, ihre jeweiligen Sequenzpositionen und -bereiche sind in Abb. 3-29 dargestellt.

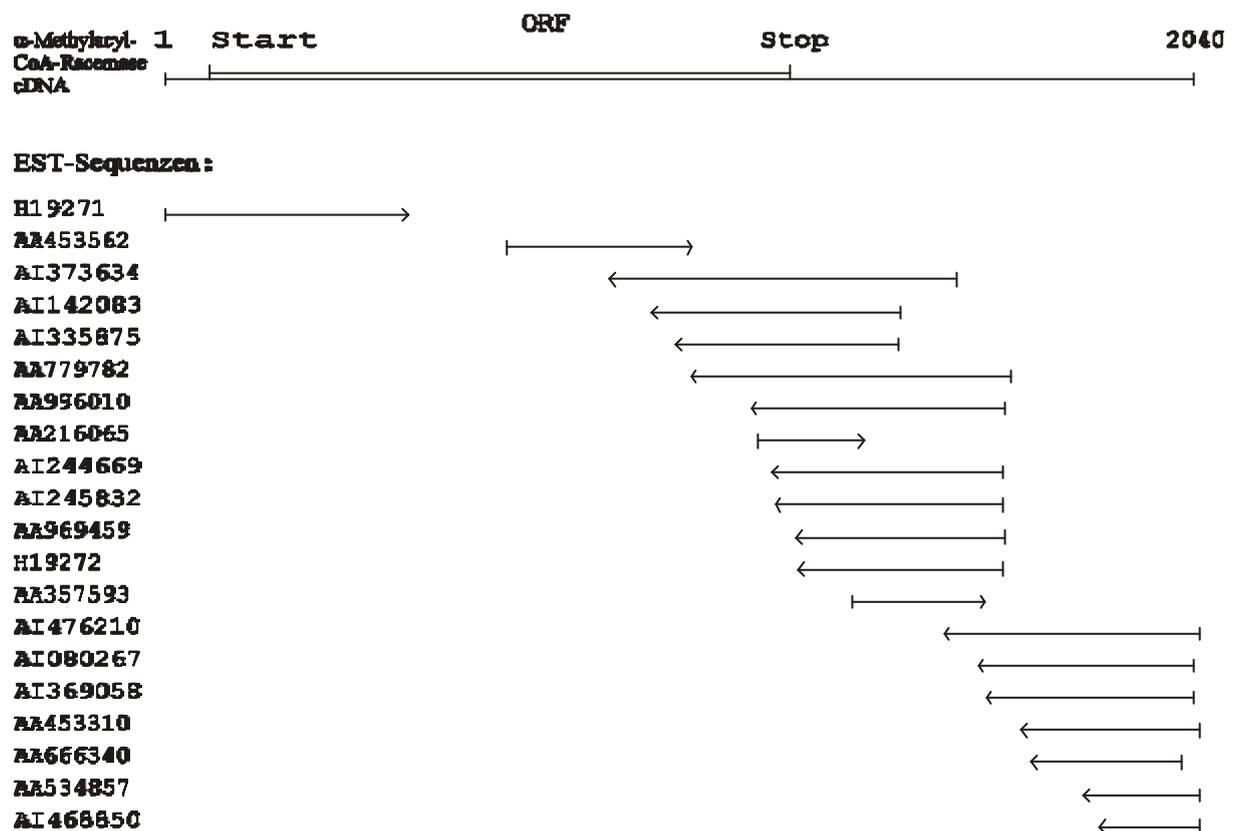


Abb. 3-29: Sequenzbereiche der zum Vergleich mit der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase herangezogenen EST-Sequenzen.

Mit Hilfe dieser Sequenzen wurde die cDNA-Sequenz der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase unabhängig überprüft. Die entsprechenden EST-Klone wurden bestellt, amplifiziert und vollständig sequenziert, so daß die Fehler der veröffentlichten Sequenzen eliminiert werden konnten.

Zwar reichte keiner der erhaltenen EST-Sequenzen über die gesamte cDNA-Sequenz (Abb. 3-29), durch die mehrfachen Überlappungen kann die so erhaltene Konsensus-Sequenz jedoch als gesichert angesehen werden. Die noch fehlende Sequenzinformation über die untranslatierte Region am 3'-Ende wurde vollständig bis zur polyA-Sequenz ermittelt. Für die 5'-UTR und den Anfang des ORF stand jedoch nur die bruchstückhafte und fehlerbehaftete veröffentlichte EST-Sequenz H19271 zur Verfügung, der entsprechende Klon war leider nicht vorhanden. Es gab zwar für diesen Bereich noch weitere Klone, es stellte sich aber später heraus, daß diese falsch zugeordnet waren und zur Sequenz des murinen Enzyms gehörten.

EST-Sequenz	mRNA-Sequenz		Definition
	Sequenzposition von [bp]	bis [bp]	
H19271	5'	1 482	<i>yn50d10.r1</i> Gehirn, N2b5HB55y, IMAGE:171859
AI335875	3'	570 1013	<i>qt25g10.x1</i> , NCI-CGAP-GC4, IMAGE: 1948674
AA453562	5'	677 1044	<i>zx32c11.r1</i> Fötus, Nb2HF8-9w, IMAGE:788180
AI373634	3'	881 1568	<i>qz53d12.x1</i> Niere, NCI-CGAP-Kid11, IMAGE: 2030615
AI142083	3'	965 1457	<i>oo25h07.x1</i> , NSF-F8-9w, OT-PA-P-S1, IMAGE:1567261
AA779782	3'	1043 1676	<i>af44b01.s1</i> Fötus, Nb2HF8-9w, IMAGE:1034473
AA996010	3'	1163 1663	<i>os26c11.s1</i> Niere, NCI-CGAP, IMAGE:1606484
AA216065	5'	1174 1387	<i>hp0475.seq.</i> fötales Herz, λ ZAP Express cDNA
AI244669	3'	1204 1662	<i>qj97b11.x1</i> Niere, NCI-CGAP, IMAGE:1867389
AI245832	3'	1211 1662	<i>qk32e07.x1</i> Niere, NCI-CGAP, IMAGE:1870692
W37077	5'	1226 1632	<i>zb20g09.r1</i> fötale Lunge, NbHL19w, IMAGE:302656
AA969459	3'	1252 1663	<i>oo81c02.s1</i> Niere, NCI-CGAP, IMAGE:1572578
H19272	3'	1255 1662	<i>yn50d10.s1</i> Gehirn, N2b5HB55y, IMAGE:171859
AA357593	3'	1363 1626	<i>zx32c11.r1</i> Fötus, Nb2HF8-9w, IMAGE:788180
AI476210	3'	1548 2049	<i>ti72a07.x1</i> Niere, NCI-CGAP-Kid11, IMAGE:2137524
AI080267	3'	1613 2041	<i>oz47h05.x1</i> NhHMPu-S1, IMAGE:1678521
AI369058	3'	1629 2040	<i>qw29e12.x1</i> Uterus, NCI-CGAP-Ut4, IMAGE: 1992526
AA453310	3'	1697 2050	<i>zx32c11.s1</i> Fötus, Nb2HF8-9w, IMAGE:788180
AA666340	3'	1717 2016	<i>ac39e06.s1</i> Stratagene hNTneuron, IMAGE:858850
AA534857	3'	1821 2049	<i>nf78d12.s1</i> Darm, NCI-CGAP-Co3, IMAGE:926039
AI468850	3'	1849 2048	<i>ti42f08.x1</i> Lymphknoten, NCI-CGAP-Lym12, IMAGE:2133159

Tab. 3-7: Liste der verwendeten EST-Klone zum Sequenzvergleich mit der humanen cDNA-Sequenz der α -Methylacyl-CoA-Racemase.

Bei der Untersuchung der EST-Klone, die vom poly A-Ende aus sequenziert werden, wurde festgestellt, daß die cDNA in zwei verschiedenen langen Versionen vorlag. Neben den EST-Klonen, deren 3'-Ende bei 2039 bp (ohne poly A) beginnt, fand man eine relativ große Anzahl von EST-Klonen, deren 3'-Ende nicht bei 2039 bp, sondern erst bei ungefähr 1660 bp beginnt (Tab. 3-7 und Abb. 3-29). Diese verschiedenen langen 3'-Enden sind vermutlich auf zwei unterschiedlich starke Polyadenylierungssignale zurückzuführen (Sheets, 1990). Neben dem klassischen Signal **AATAAA** bei 2020 bp könnte das etwas oberhalb von 1660 bp liegende **GATAAA** ein verkapptes Polyadenylierungssignal darstellen (Abb. 3-30).

EST-Sequenz		Sequenzposition				
1	Racemase.SEQ	5'	1	-	2039	
2	AA779728.SEQ	3'	1043	-	1678	
3	AA996010.SEQ	3'	1163	-	1665	
4	AI244669.SEQ	3'	1204	-	1662	
5	AI245832.SEQ	3'	1213	-	1662	
6	AA969459.SEQ	3'	1252	-	1668	
7	AI288257.SEQ	3'	1271	-	1666	
8	H 19272.SEQ	3'	1255	-	1662	
9	AI080267.SEQ	3'	1613	-	2041	
10	AI369058.SEQ	3'	1629	-	2039	

		1610	1620	1630	1640	1650
RACEMASE.SEQ	1601	CTACAATGTA	GAAAATGAGG	AAATGCCACA	AATTGTATGG	TGATAAAAAGT
AA779728.SEQ	559	CTACAATGTA	GAAAATGAGG	AAATGCCACA	AATTGTATGG	TGATAAAAAGT
AA996010.SEQ	439	CTACAATGTA	GAAAATGAGG	AAATGCCACA	AATTGTATGG	TGATAAAAAGT
AI244669.SEQ	398	CTACAATGTA	GAAAATGAGG	AAATGCCACA	AATTGTATGG	TGATAAAAAGT
AI245832.SEQ	389	CTACAATGTA	GAAAATGAGG	AAATGCCACA	AATTGTATGG	TGATAAAAAGT
AA969459.SEQ	350	CTACAATGTA	GAAAATGAGG	AAATGCCACA	AATTGTATGG	TGATAAAAAGT
AI288257.SEQ	331	TTACAATGTA	GAAAATGAGG	AAATGCCACA	AATTGTATGG	TGATAAAAAGT
H 19272.SEQ	347	CTACAATGTA	GAAAATGAGG	AAATGCCACA	AATTGTATGG	TGATAAAAAGT
AI080267.SEQ	-12AAATGAGG	AAATGCCACA	AATTGTATGG	TGATAAAAAGT
AI369058.SEQ	-28CA	AATTGTATGG	TGATAANAGT

		1660	1670	1680	1690	1700
RACEMASE.SEQ	1651	CACGTGAAAC	AGAGTGATTG	GTTGCATCCA	GGCCTTTTGT	CTTGGTGTTT
AA779728.SEQ	609	CACGTGAAAC	AGAGTGATTG	GTTG CAAA
AA996010.SEQ	489	CACGTGAAAC	AGAAA
AI244669.SEQ	448	CACGTGAAAC	AGAA
AI245832.SEQ	439	CACGTGAAAC	AGAA
AA969459.SEQ	400	CACGTGAAAC	AGAAAAAA
AI288257.SEQ	381	CACGTGAAAC	AGAGT GAA
H 19272.SEQ	397	CACGTGAAAGCAG				
AI080267.SEQ	39	CACGTGAAAC	AGAGTGATTG	GTTGCATCCA	GGCCTTTTGT	CTTGGTGTTT
AI369058.SEQ	23	CACGTGAAAC	AGAGTGATTG	GTTGCATCCA	GGCCTTTTGT	CTTGGTGTTT

$\delta // \delta$

		2010	2020	2030	2040	2050
Racemase.SEQ	2001	CACACAGCAA	CATCCAGAAA	TAAA AGATCTC	AGGACCCCCC	AA
AI080267.SEQ	363	CACACAGCAA	CATCCAGAAA	TAAA AGATCTC	AGGACCCCCC	A
AI369058.SEQ	389	CACACAGCAA	CATCCAGAAA	TAAA AGATCTC	AGGACCCCCC

Abb. 3-30: 3'-Enden verschiedener EST-Klone (Die Sequenzierung erfolgte vom poly A-Ende bis zur jeweils oben aufgeführten Sequenzposition).

3.4.1.6 Vollständige cDNA-Sequenz der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase

Nach Auswertung aller zur Verfügung stehender Informationen kann die nachfolgende Sequenz als gesicherte cDNA-Sequenz für die humane α -Methylacyl-CoA-Racemase angesehen werden. Die vollständige Sequenz hat eine Gesamtlänge von 2039 Basenpaaren (ohne poly A) mit einem offenen Leseraster (ORF, *open reading frame*) von 1146 bp. Die Sequenz beginnt mit einer 5'-UTR-Sequenz (*untranslated region*) von 88 bp. Das Startcodon ATG ist in eine klassische Kozak-Sequenz zum Translationsstart (Kozak, 1986) eingebettet. Das folgende ORF endet mit -KASL am C-Terminus und ähnelt dem PTS (*peroxisomal targeting signal*)-KANL einiger Katalasen von Säugetieren (Purdue & Lazarow, 1996). Die untranslatierte Region (UTR) am 3'-Ende besteht aus 802 Basenpaaren, 16 bp vor dem poly A-Ende liegt ein AATAAA-Polyadenylierungssignal. Zusätzlich liegt zwischen den Nukleotiden 1642 und 1647 mit der Sequenz GATAAA ein weiteres, weniger effizientes Polyadenylierungssignal (vgl. 3.4.1.5 und Abb. 3-30) vor.

cDNA-Sequenz der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase:

```

1      GGCGCCGGGA TTGGGAGGGC TTCTTGCAGG CTGCTGGGCT GGGGCTAAGG
51     GCTGCTCAGT TTCCTTCAGC GGGGCACTGG GAAGCGCCAT GGCACTGCAG
101    GGCATCTCGG TCATGGAGCT GTCCGGCCTG GCCCCGGGCC CGTTCTGTGC
151    TATGGTCCTG GCTGACTTCG GGGCGCGTGT GGTACGCGTG GACCGGCCCG
201    GCTCCCGCTA CGACGTGAGC CGCTTGGGCC GGGGCAAGCG CTCGCTAGTG
251    CTGGACCTGA AGCAGCCGCG GGGAGCCGCC GTGCTGCGGC GTCTGTGCAA
301    GCGGTCGGAT GTGCTGCTGG AGCCCTTCCG CCGCGGTGTC ATGGAGAAAC
351    TCCAGCTGGG CCCAGAGATT CTGCAGCGGG AAAATCCAAG GCTTATTTAT
401    GCCAGGCTGA GTGGATTTGG CCAGTCAGGA AGCTTCTGCC GGTTAGCTGG
451    CCACGATATC AACTATTTGG CTTTGTCAGG TGTTCTCTCA AAAATTGGCA
501    GAAGTGGTGA GAATCCGTAT GCCCCGCTGA ATCTCCTGGC TGACTTTGCT
551    GGTGGTGGCC TTATGTGTGC ACTGGGCATT ATAATGGCTC TTTTGGACCG
601    CACACGCACT GACAAGGGTC AGGTCATTGA TGCAAATATG GTGGAAGGAA
651    CAGCATATTT AAGTTCTTTT CTGTGGAAAA C'TCAGAAATC GAGTCTGTGG
701    GAAGCACCTC GAGGACAGAA CATGTTGGAT GGTGGAGCAC CTTTCTATAC
751    GACTTACAGG ACAGCAGATG GGAATTCAT GGCTGTTGGA GCAATAGAAC
801    CCCAGTTCTA CGAGCTGCTG ATCAAAGGAC TTGGACTAAA GTCTGATGAA
851    CTTCCTCTC AGATGAGCAC GGATGATTGG CCAGAAATGA AGAAGAAGTT
901    TGCAGATGTA TTTGCAAAGA AGACGAAGGC AGAGTGGTGT CAAATCTTTG
951    ACGGCACAGA TGCCTGTGTG ACTCCGGTTC TGACTTTTGA GGAGGTTGTT
1001   CATCATGATC ACAACAAGGA ACGGGGCTCG TTTATCACCA GTGAGGAGCA
1051   GGACGTGAGC CCCCGGCCTG CACCTCTGCT GTTAAACACC CCAGCCATCC
1101   CTTCTTTCAA AAGGGATCCT TTCATAGGAG AACACACTGA GGAGATACTT
1151   GAAGAATTTG GATTCAGCCG CGAAGAGATT TATCAGCTTA ACTCAGATAA

```

```

1201  AATCATTGAA AGTAATAAGG TAAAAGCTAG TCTCTAA
                                     -           K A S L * stop
                                           CTT CCAGGCCAC
1251  GGCTCAAGTG AATTTGAATA CTGCATTTAC AGTGTAGAGT AACACATAAC
1301  ATTGTATGCA TGGAAACATG GAGGAACAGT ATTACAGTGT CCTACCACTC
1351  TAATCAAGAA AAGAATTACA GACTCTGATT CTACAGTGAT GATTGAATTC
1401  TAAAAATGGT TATCATTAGG GCTTTTGTATT TATAAACTT TGGGTACTTA
1451  TACTAAATTA TGGTAGTTAT TCTGCCTTCC AGTTTGCTTG ATATATTTGT
1501  TGATATTAAG ATTCTTGACT TATATTTTGA ATGGGTTCTA GTGAAAAAGG
1551  AATGATATAT TCTTGAAGAC ATCGATATAC ATTTATTTAC ACTCTTGATT
1601  CTACAATGTA GAAAATGAGG AAATGCCACA AATTGTATGG TGATAAAAGT
1651  CACGTGAAAC A           poly A (I)
1652                GAGTGATTG GTTGCATCCA GGCCTTTTGT CTTGGTGTTC
1701  ATGATCTCCC TCTAAGCACA TTCCAACTT TAGCAACAGT TATCACACTT
1751  TGTAATTTGC AAAGAAAAGT TTCACCTGTA TTGAATCAGA ATGCCTTCAA
1801  CTGAAAAAAA CATATCCAAA ATAATGAGGA AATGTGTTGG CTCACTACGT
1851  AGAGTCCAGA GGGACAGTCA GTTTTAGGGT TGCCTGTATC CAGTAACTCG
1901  GGGCCTGTTT CCCCCTGGGT CTCTGGGCTG TCAGCTTCC TTTCTCCATG
1951  TGTTTGATTT CTCCTCAGGC TGGTAGCAAG TTCTGGATCT TATACCCAAC
2001  ACACAGCAAC ATCCAGAAAT AAAGATCTCA GGACCCCCCA AAAAAAAA...
                                           poly A (II)

```

Abb. 3-31: cDNA-Sequenz der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase, Gesamtlänge: 2039 bp (ohne poly A II) bzw. 1661 bp (ohne poly A I).

3.4.2 Proteinsequenzanalyse der α -Methylacyl-CoA-Racemase

Die cDNA-Sequenz der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase enthält ein offenes Leseraster von 89-1237 bp, das entspricht einer Länge von 1146 bp, incl. des Stop-Codons TAA. Die Translation beginnt mit ATG in einer klassischen Kozak-Sequenz und endet mit –KASL als C-Terminus. Das ORF codiert ein Protein aus 382 Aminosäuren mit einem theoretischen Molekulargewicht von 42,4 kDa. Die Sequenz des daraus resultierenden Proteins ist in der folgenden Abbildung (Abb. 3-32) dargestellt.

Proteinsequenz der α -Methylacyl-CoA-Racemase:

```

5'   1  ATG GCA CTG CAG GGC ATC TCG GTC ATG GAG CTG TCC GGC CTG GCC CCG
     1  M  A  L  Q  G  I  S  V  M  E  L  S  G  L  A  P

    49  GGC CCG TTC TGT GCT ATG GTC CTG GCT GAC TTC GGG GCG CGT GTG GTA
    17  G  P  F  C  A  M  V  L  A  D  F  G  A  R  V  V

    97  CGC GTG GAC CGG CCC GGC TCC CGC TAC GAC GTG AGC CGC TTG GGC CCG
    33  R  V  D  R  P  G  S  R  Y  D  V  S  R  L  G  R

```

145	GGC	AAG	CGC	TCG	CTA	GTG	CTG	GAC	CTG	AAG	CAG	CCG	CGG	GGA	GCC	GCC
49	G	K	R	S	L	V	L	D	L	K	Q	P	R	G	A	A
193	GTG	CTG	CGG	CGT	CTG	TGC	AAG	CGG	TCG	GAT	GTG	CTG	CTG	GAG	CCC	TTC
65	V	L	R	R	L	C	K	R	S	D	V	L	L	E	P	F
241	CGC	CGC	GGT	GTC	ATG	GAG	AAA	CTC	CAG	CTG	GGC	CCA	GAG	ATT	CTG	CAG
81	R	R	G	V	M	E	K	L	Q	L	G	P	E	I	L	Q
289	CGG	GAA	AAT	CCA	AGG	CTT	ATT	TAT	GCC	AGG	CTG	AGT	GGA	TTT	GGC	CAG
97	R	E	N	P	R	L	I	Y	A	R	L	S	G	F	G	Q
337	TCA	GGA	AGC	TTC	TGC	CGG	TTA	GCT	GGC	CAC	GAT	ATC	AAC	TAT	TTG	GCT
113	S	G	S	F	C	R	L	A	G	H	D	I	N	Y	L	A
385	TTG	TCA	GGT	GTT	CTC	TCA	AAA	ATT	GGC	AGA	AGT	GGT	GAG	AAT	CCG	TAT
129	L	S	G	V	L	S	K	I	G	R	S	G	E	N	P	Y
433	GCC	CCG	CTG	AAT	CTC	CTG	GCT	GAC	TTT	GCT	GGT	GGT	GGC	CTT	ATG	TGT
145	A	P	L	N	L	L	A	D	F	A	G	G	G	L	M	C
481	GCA	CTG	GGC	ATT	ATA	ATG	GCT	CTT	TTT	GAC	CGC	ACA	CGC	ACT	GAC	AAG
161	A	L	G	I	I	M	A	L	F	D	R	T	R	T	D	K
529	GGT	CAG	GTC	ATT	GAT	GCA	AAT	ATG	GTG	GAA	GGA	ACA	GCA	TAT	TTA	AGT
177	G	Q	V	I	D	A	N	M	V	E	G	T	A	Y	L	S
577	TCT	TTT	CTG	TGG	AAA	ACT	CAG	AAA	TCG	AGT	CTG	TGG	GAA	GCA	CCT	CGA
193	S	F	L	W	K	T	Q	K	S	S	L	W	E	A	P	R
625	GGA	CAG	AAC	ATG	TTG	GAT	GGT	GGA	GCA	CCT	TTC	TAT	ACG	ACT	TAC	AGG
209	G	Q	N	M	L	D	G	G	A	P	F	Y	T	T	Y	R
673	ACA	GCA	GAT	GGG	GAA	TTC	ATG	GCT	GTT	GGA	GCA	ATA	GAA	CCC	CAG	TTC
225	T	A	D	G	E	F	M	A	V	G	A	I	E	P	Q	F
721	TAC	GAG	CTG	CTG	ATC	AAA	GGA	CTT	GGA	CTA	AAG	TCT	GAT	GAA	CTT	CCC
241	Y	E	L	L	I	K	G	L	G	L	K	S	D	E	L	P
769	AAT	CAG	ATG	AGC	ACG	GAT	GAT	TGG	CCA	GAA	ATG	AAG	AAG	AAG	TTT	GCA
257	N	Q	M	S	T	D	D	W	P	E	M	K	K	K	F	A
817	GAT	GTA	TTT	GCA	AAG	AAG	ACG	AAG	GCA	GAG	TGG	TGT	CAA	ATC	TTT	GAC
273	D	V	F	A	K	K	T	K	A	E	W	C	Q	I	F	D
865	GGC	ACA	GAT	GCC	TGT	GTG	ACT	CCG	GTT	CTG	ACT	TTT	GAG	GAG	GTT	GTT
289	G	T	D	A	C	V	T	P	V	L	T	F	E	E	V	V
913	CAT	CAT	GAT	CAC	AAC	AAG	GAA	CGG	GGC	TCG	TTT	ATC	ACC	AGT	GAG	GAG
305	H	H	D	H	N	K	E	R	G	S	F	I	T	S	E	E
961	CAG	GAC	GTG	AGC	CCC	CGC	CTT	GCC	CCT	CTG	CTG	TTA	AAC	ACC	CCA	GCC
321	Q	D	V	S	P	R	L	A	P	L	L	L	N	T	P	A
1009	ATC	CCT	TCT	TTC	AAA	GGG	GAT	CCT	TTC	ATA	GGA	GAA	CAC	ACT	GAG	GAG
337	I	P	S	F	K	G	D	P	F	I	G	E	H	T	E	E
1057	ATA	CTT	GAA	GAA	TTT	GGA	TTC	AGC	CGC	GAA	GAG	ATT	TAT	CAG	CTT	AAC
353	I	L	E	E	F	G	F	S	R	E	E	I	Y	Q	L	N
1105	TCA	GAT	AAA	ATC	ATT	GAA	AGT	AAT	AAG	GTA	AAA	GCT	AGT	CTC	TAA	
369	S	D	K	I	I	E	S	N	K	V	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	*	3'

Abb. 3-32: cDNA-Sequenz (oben) und Proteinsequenz der α -Methylacyl-CoA-Racemase.

Anhand der über die cDNA-Sequenz bestimmten Aminosäuresequenz läßt sich die humane α -Methylacyl-CoA-Racemase wie folgt biochemisch charakterisieren:

Aminosäurezahl: 382

<u>Aminosäurezusammensetzung:</u>	Ala (A) 29	7.6 %
	Arg (R) 25	6.5 %
	Asn (N) 11	2.9 %
	Asp (D) 22	5.8 %
	Cys (C) 6	1.6 %
	Gln (Q) 13	3.4 %
	Glu (E) 27	7.1 %
	Gly (G) 35	9.2 %
	His (H) 5	1.3 %
	Ile (I) 18	4.7 %
	Leu (L) 44	11.5 %
	Lys (K) 21	5.5 %
	Met (M) 11	2.9 %
	Phe (F) 20	5.2 %
	Pro (P) 20	5.2 %
	Ser (S) 26	6.8 %
	Thr (T) 15	3.9 %
	Trp (W) 4	1.0 %
	Tyr (Y) 9	2.4 %
	Val (V) 21	5.5 %

Anzahl negativ geladener Reste (Asp + Glu): 49

Anzahl positiv geladener Reste (Arg + Lys): 46

Molekulargewicht: 42,366 kD

Theoretischer pI: 6,06

Die theoretisch berechnete Molekülmasse von 42,4 kDa ist etwa kleiner als die mittels SDS-PAGE bestimmte Größe von 47,1 kDa. Die α -Methylacyl-CoA-Racemase aus Ratte zeigt im SDS-PAGE ebenfalls ein langsames Laufverhalten als theoretisch erwartet. Bei der Expression definierter Konstrukte, deren Größen also exakt vorhersagbar waren, zeigte sich, daß die exprimierten Proteine im SDS-PAGE stets einige kDa größer erschienen als erwartet (W.Schmitz, persönliche Mitteilung).

3.4.3 Northern Blot

Um zu überprüfen, ob die in Kapitel 3.4.1.5 erwähnten unterschiedlich langen Transkripte der α -Methylacyl-CoA-Racemase mit einer Gesamtlänge von 1661 bp bzw. 2039 bp (Abb. 3-31) möglicherweise gewebsspezifisch vorkommen, wurde ein Northern Blot mit mRNAs verschiedener menschlicher Gewebe durchgeführt (2.4.14).

Pro Spur enthielt der eingesetzte MTN (Multiple Tissue Northern) Blot je 2 μ g mRNA aus Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas. Zur Hybridisierung wurde das mit [α - 32 P]dCTP radioaktiv markierte PCR-Produkt H1.4 eingesetzt, welches dem Abschnitt 1-332 bp der α -Methylacyl-CoA-Racemase-cDNA-Sequenz entspricht (2.4.13).

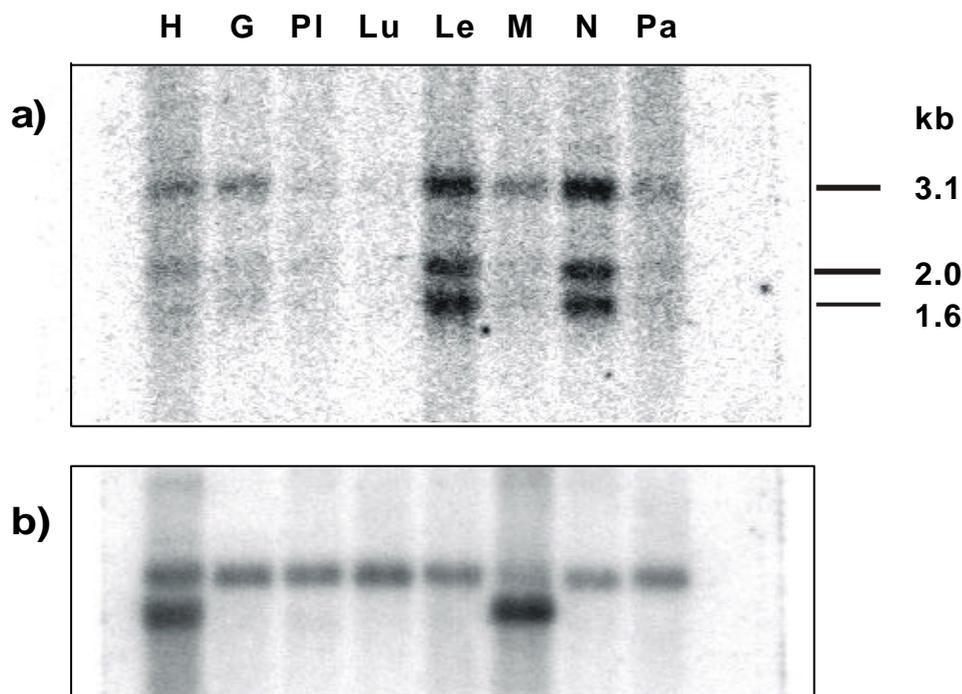


Abb. 3-33: Northern Blot (Human MTN Blot), pro Spur sind je 2 μ g isolierte humane mRNA aus Herz (H), Gehirn (G), Plazenta (Pl), Lunge (Lu), Leber (Le), Skelettmuskel (M), Niere (N) und Pankreas (P) aufgetragen. Blot (a): hybridisiert mit dem Oligonukleotid [α - 32 P]H1.4 (1-332 bp), Blot (b): hybridisiert mit humaner β -Actin cDNA-Kontrollprobe.

Anhand der Northern Blot-Analyse konnte gezeigt werden, daß die humane α -Methylacyl-CoA-Racemase gewebspezifisch exprimiert wird. In Geweben, wie Leber und Niere, von denen bekannt ist, daß sie besonders peroxisomenreich sind, konnte eine sehr starke Expressionen der mRNA nachgewiesen werden. In den weiteren untersuchten menschlichen Geweben, wie Herz, Gehirn, Skelettmuskel und Pankreas, fällt die Expression deutlich niedriger aus, in Plazenta und Lunge wird die Racemase nur in äußerst geringem Umfang exprimiert.

In allen Geweben sind mehrere Transkripte der α -Methylacyl-CoA-Racemase zu finden. Wie nach der Sequenzanalyse erwartet worden war, entsprachen die Banden Transkripten der Größen 1,6 und 2,0 kb, zusätzlich findet noch bei 3,1 kb eine vermutlich unspezifische Hybridisierung statt. Obwohl die Expression in den einzelnen Geweben unterschiedlich stark ausfällt, betrifft dies alle Transkripte in gleichem Umfang, es liegt keine spezifische Expression eines einzelnen Transkripts vor.

3.4.4 Genomische Analyse des humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase-Gens

3.4.4.1 Genomischer Aufbau

Zur Untersuchung der genomischen Struktur des α -Methylacyl-CoA-Racemase-Gens wurde mit Hilfe der aus genomischer DNA erhaltenen Klone H 1-4 (1-332 bp) und H 18-13 (526-647 bp) (3.4.1.4) über das DHG-Projekt (Resource Center of the German Human Genome Projekt, Heidelberg) nach genomischen Klonen gesucht, die mit diesen Sequenzen hybridisiert werden konnten. Untersucht wurden dazu humane genomische DNA PAC-Banken (pCYPAC2-Bank: *RPCII, 3-5 Human PAC, No. 704*, konstruiert von P. de Jong und P. Ioannou am Roswell Park Cancer Institut). Insgesamt konnten elf Klone identifiziert werden (siehe Tab. 3-8), die mit den genomischen DNA-Sequenzen hybridisierten (2.4.1.2).

Zur weiteren Charakterisierung wurden Informationen über die genomische Organisation des entsprechenden Racemase-Gens bei der Maus herangezogen, die freundlicherweise von T. Kotti und K. Hiltunen (Universtät Oulu, Finnland) zur Verfügung gestellt wurden.

Nr.	PAC-Klone
(A1)	RPCIP704O01181Q25
(A2)	RPCIP704P01181Q25
(A4)	RPCIP704B8394Q2
(A6)	RPCIP704H15649Q2
(B1)	RPCIP704M05720Q2
(B2)	RPCIP704L21804Q2
(B4)	RPCIP704K03969Q2
(B5)	RPCIP704M03969Q2
(B6)	RPCIP704O01181Q25
(C1)	RPCIP704N17985Q2
(C3)	RPCIP704B041122Q2

Tab. 3-8: PAC-Klone der Genbank RPCII, 3-5 Human PAC, Nr. 704, hybridisiert mit H 1-4 und H 18-13.

Nach Reinigung der DNA aus den PAC-Klonen (2.4.5) wurde zuerst überprüft, ob die Klone auch tatsächlich Inserts enthielten. Dazu wurde eine Restriktionsanalyse mit EcoRI durchgeführt (Abb. 3-34). Die Klone A6 und C1 wurden als negativ identifiziert und blieben deswegen für weitere Untersuchungen unberücksichtigt.

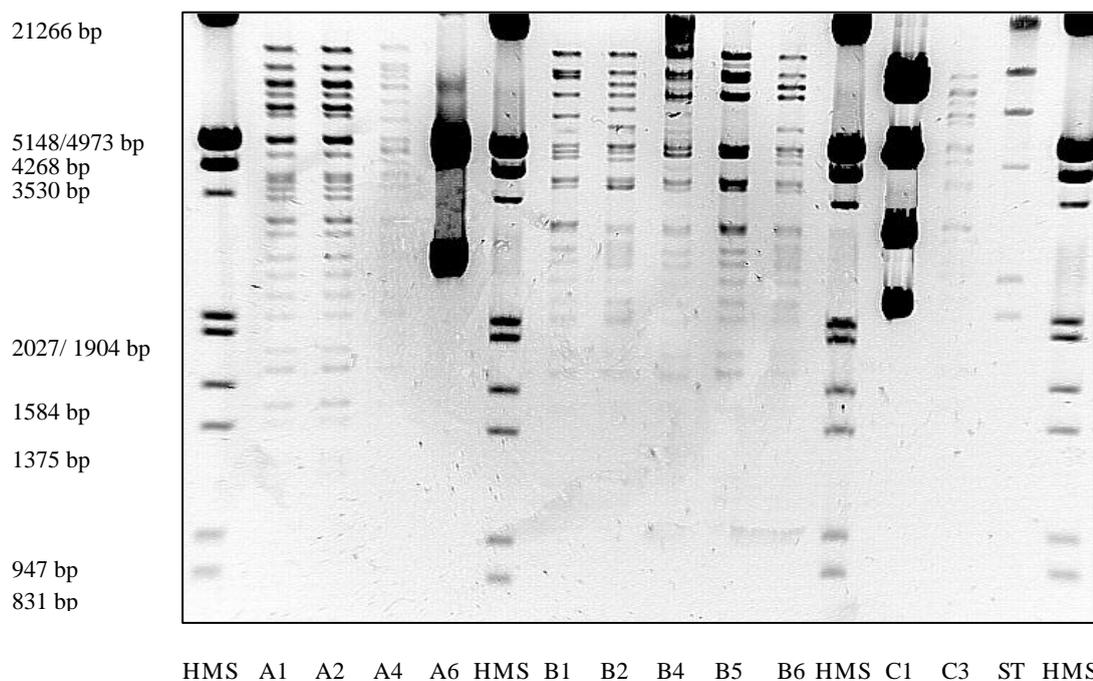


Abb. 3-34: 0,6%iges Agarosegel: EcoRI-Restriktion der genomischen Klone A1-C3 (1U/ μ g EcoRI, 4 h, 37°C), HMS (high molecular standard).

Die positiven genomischen Klone A1, A2, A4, B1, B2, B4, B5, B6 und C3 wurden anschließend dahingehend überprüft, ob das Racemase-Gen tatsächlich vollständig vorlag. Hierzu wurde zuerst versucht, das mögliche Exon 1 mittels PCR in den aus der Maus-Racemase bekannten Grenzen (T. Kotti, persönliche Mitteilung) zu amplifizieren.

Touch down PCR:

Denaturierung: 94°C, 5 min

7 x Schmelzen: 94°C, 40 sec / Annealing: 60°C, 1 min / Elongation: 72°C, 2 min

10 x Schmelzen: 94°C, 40 sec / Annealing: 57°C, 50 sec / Elongation: 72°C, 2 min

15 x Schmelzen: 94°C, 40 sec / Annealing: 55°C, 50 sec / Elongation: 72°C, 2 min

Elongation: 72°C, 8 min

Reaktionsansatz: 0,1 µl DNA-Template (100 ng/µl)
 3,0 µl 10x PCR-Puffer
 je 2,0 µl spez. Primer
 4,0 µl dNTPs (2 mM)
 18,7 µl ddH₂O
 0,2 µl Taq-Polymerase (4 U/µl) (Sigma)

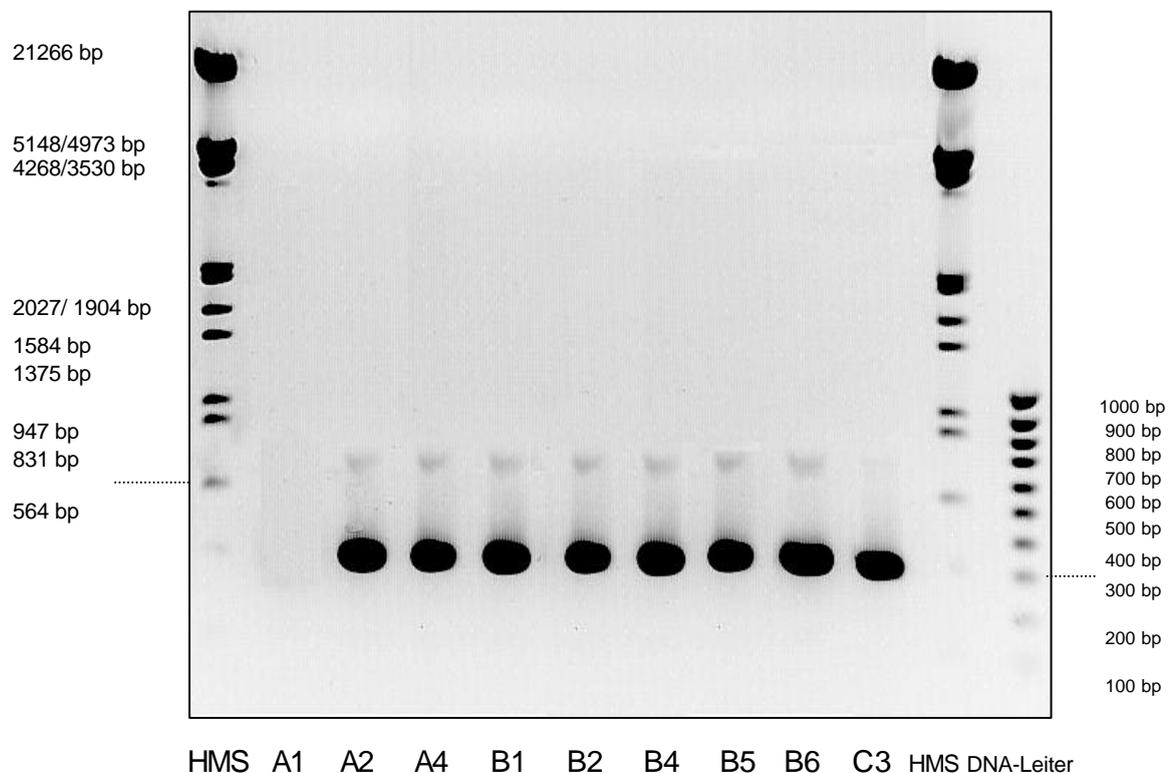


Abb. 3-35: 1%iges Agarosegel zur Überprüfung der genomischen Klone A1-C3 anhand des Exons 1 (5'-Ende) (332 bp) mittels touch down PCR mit den Primern H 18f und Int 1r.

Es zeigte sich, daß mit Ausnahme von Klon A1 (*RPCIP704O01181Q25*) in allen anderen untersuchten Klonen das 5'-Ende enthalten war (Abb. 3-35). Anschließend wurde dann unter gleichen PCR-Bedingungen eine *touch down* PCR mit den Primern Int 4f und Stop 3r zur Amplifikation des Exons 5 durchgeführt, um zu überprüfen, ob das Gen vollständig vorlag (Abb. 3-36). Bis auf den Klon B6 (*RPCIP704O01181Q25*) war das 3'-Ende in allen übrigen Klonen vorhanden. Für die weiteren Untersuchungen konnten somit die Klone A2, A4, B1, B2, B4, B5 und C3 eingesetzt werden.

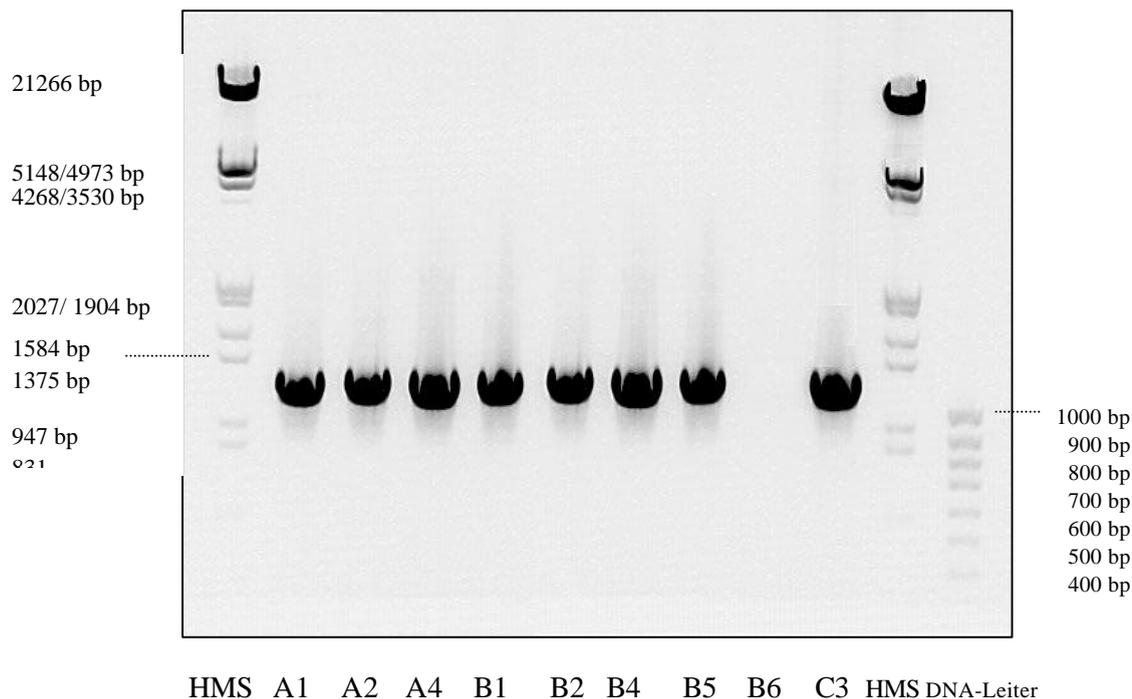


Abb. 3-36: 1%iges Agarosegel zur Überprüfung der genomischen Klone A1-C3 anhand des Exons 5 (3'Ende) (1214 bp) mittels *touch down* PCR mit den Primern Int 4f und Stop 3r.

Zum Vergleich der bisher erhaltenen humanen cDNA-Sequenz der α -Methylacyl-CoA-Racemase wurde zuerst versucht, aus dem Klon B2 (*RPCIP704L21804Q2*) die Exons an den zu erwartenden Exon/Intron-Grenzen (T. Kotti, persönliche Mitteilung) mittels PCR zu amplifizieren. Fünf Exons konnten erfolgreich amplifiziert werden (Abb. 3-37). Die humane DNA-Sequenz enthält demzufolge im Vergleich zur Maus keine zusätzlichen Introns.

Alle fünf Exons wurden kloniert und mehrfach sequenziert. Die 3'-UTR, die bislang nur aus den EST-Sequenzvergleichen bestimmt worden war, konnte durch die Sequenzanalyse der genomischen DNA verifiziert werden. Die so ermittelte DNA-Sequenz stimmte vollständig mit der bisher bekannten cDNA-Sequenz der humanen Racemase überein (Abb. 3-40).

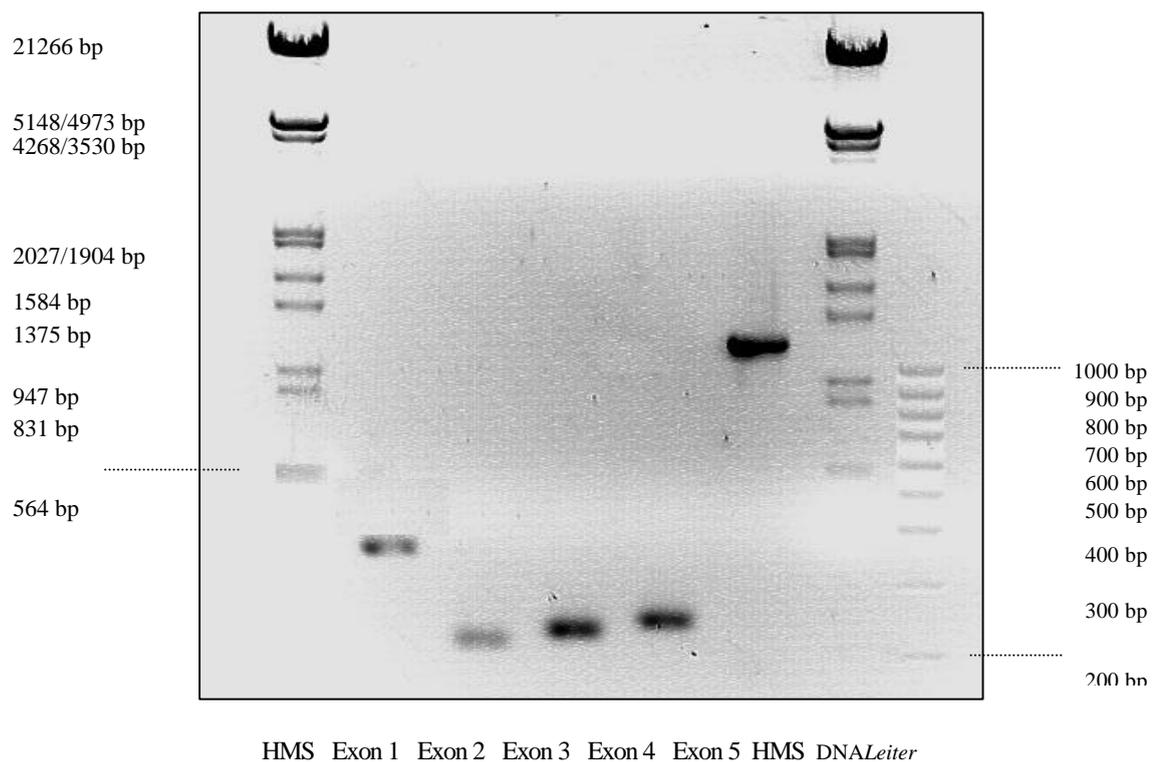


Abb. 3-37: 1%iges Agarosegel mit den Exons 1-5 aus dem genomischem Klon B2(RPCIP704L21804Q2): Exon I (H18f/H-Int1r) = 332 bp, Exon II (H-Int1f/H-Int2r) = 144 bp, Exon III (H-Int2f/H-Int3r1) = 164 bp, Exon IV (H-Int3f/H-Int4r) = 187 bp, Exon V (H-Int4f/ H-Stop3r) = 1214 bp. Die Exons 1-5 wurden mittels touch down PCR amplifiziert: 4' 94°C [7x (40" 94°C, 1' 60°C, 2' 72°C), 10x (40" 94°C, 1' 57°C, 2' 72°C), 15x (40" 94°C, 1' 55°C, 2' 72°C)] 8' 72°C.

3.4.4.1.1 Exon-/ Intronstruktur

Wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt werden konnte, enthält das humane Gen im Vergleich zum murinen Gen keine weiteren Introns. Des weiteren wurde überprüft, ob beim Menschen an den entsprechenden Stellen tatsächlich Introns vorliegen und diese auch an exakt den gleichen Sequenzpositionen zu finden sind.

Die präzisen Exon-/ Introngrenzen sowie die genauen Introngrößen wurden unter verschiedenen PCR-Bedingungen analysiert, wobei exemplarisch der PAC-Klon B2 (*RPCIP704L21804Q2*) verwendet wurde. Um die z.T. sehr großen DNA-Stücke zu erhalten, wurde die Taq Plus Precision-Polymerase von Stratagene eingesetzt. Diese besteht aus einem Gemisch von Taq- und Pfu-Polymerase, und erzielt bei relativ kurzer Elongationszeit (1min/kB) und langer Halbwertszeit (120 min bei 95°C) eine hohe Präzision. Bei der Amplifikation wurden die Primer so gewählt, daß die Introns jeweils zusammen mit den sie umgebenden Exons amplifiziert wurden, um die Exon-/ Introngrenzen genau zu bestimmen.

PCR-Ansatz:

3,0 µl 10x Taq Plus Prec.-Puffer
 je 2,0 µl spez. Primer (10 µM)
 8,0 µl dNTPs (2 mM)
 0,2 µl DNA-Template (PAC-B2; 100 ng/µl)
 14,3 µl ddH₂O
 0,5 µl Taq-Plus Precision (10 U/µl) (Stratagene)

PCR-Programm:

Denaturierung: 94°C, 4 min
 32x [Schmelzen: 94°C, 35 sec
 Annealing: 7x 60°C, 1 min
 10x 57°C, 50 sec
 15x 55°C, 50 sec
 Elongation: 72°C, 1 min / kb]
 Elongation: 72°C, 7 min

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden z.T. kloniert und mehrfach sequenziert, wobei möglichst weit in den Intronbereich hinein sequenziert wurde (siehe Anhang). Es wurden, wie im murinen Gen, insgesamt vier Introns erhalten, die sich an ähnlichen Positionen befinden, vgl. Abb. 4-4. Alle Introns beginnen mit der Sequenz *GT* und enden mit *AG*. Die ermittelten exakten Exon-/ Introngrenzen sind in Abb. 3-40 und Tab. 3-9 dargestellt. Die Größe der PCR-Produkte wurde durch die Auftrennung in einem 0,6%igen Agarosegel (Abb. 3-38 und Abb. 3-39) bestimmt. Durch Subtraktion der Exon-Anteile konnte damit die Größe der Introns festgestellt werden: Intron I = 1,8 kb, Intron II = 1,3 kb, Intron III = 8,8 kb, Intron IV = 2,2 kb (Tab. 3-9).

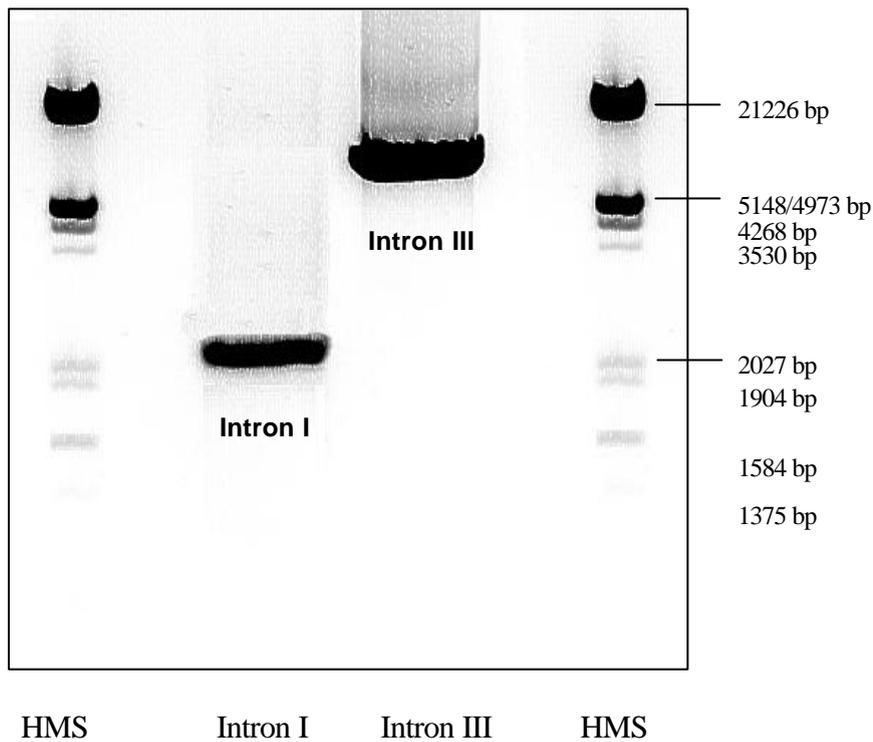


Abb. 3-38: 0,6%iges Agarosegel nach touch down PCR mit dem PAC-Klon B2 (RPCIP704L21804Q2) von **Intron I** (H16f/Int2r) und **Intron III** (Int2f/Int4r).

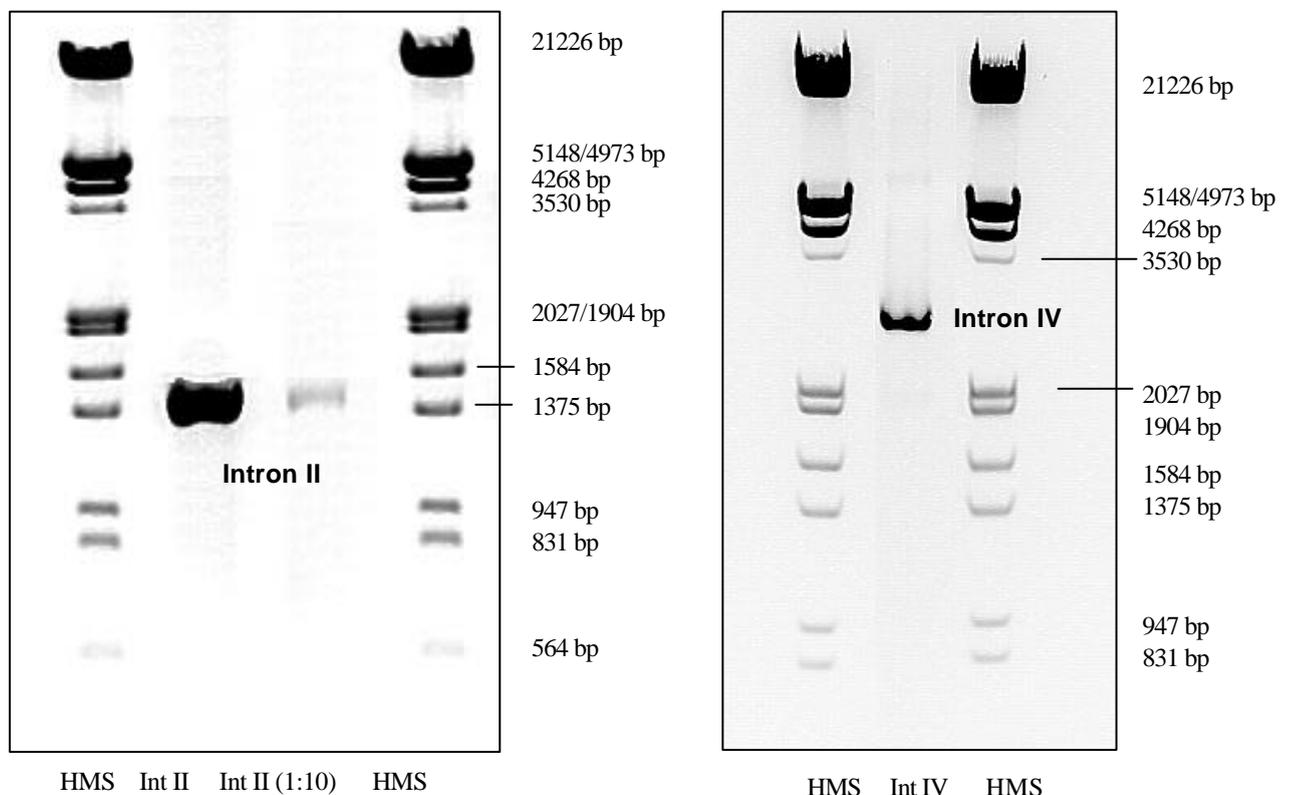


Abb. 3-39: 0,6%ige Agarosegele nach touch down PCR mit dem PAC-Klon B2 (RPCIP704L21804Q2) von **Intron II** (Int1f/Int3r) und **Intron IV** (Int3f/Stop 1r).

Amplifizierte Sequenz	Eingesetzte Primer	Größe (inkl. Exonanteile)	Introngröße	Intronposition
Intron I	H 16f, Int 2f	2,2 kb	1,8 kb	335 bp ↔ 336 bp
Intron II	Int 1f, Int 3r	1,5 kb	1,3 kb	479 bp ↔ 480 bp
Intron III	Int 2f, Int 4r	9,0 kb	8,8 kb	640 bp ↔ 641 bp
Intron IV	Int 3f, Stop 1r	2,7 kb	2,2 kb	827 bp ↔ 828 bp

Tab. 3- 9: Bestimmung von Größe und Position der Introns des humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase-Gen.

Genomischer Aufbau und DNA-Sequenz des humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase-Gens

:

humRac-gen	1	10	20	30	40	50
Ex-1 ko	1	GGCGCCGGGA	TTGGGAGGGC	TTCTTGCAGG	CTGCTGGGCT	GGGGCTAAGG
		*****	*****	*****	*****	*****
humRac-gen	51	60	70	80	90	100
Ex-1 ko	51	GCTGCTCAGT	TTCCTTCAGC	GGGGCACTGG	GAAGCGCCAT	GGCACTGCAG
		*****	*****	*****	*****	*****
humRac-gen	101	110	120	130	140	150
Ex-1 ko	101	GGCATCTCGG	TCGTGGAGCT	GTCCGGCCTG	GCCCCGGGCC	CGTTCTGTGC
		*****	*****	*****	*****	*****
humRac-gen	151	160	170	180	190	200
Ex-1 ko	151	TATGGTCCTG	GCTGACTTCG	GGGCGCGTGT	GGTACGCGTG	GACCGGCCCG
		*****	*****	*****	*****	*****
humRac-gen	201	210	220	230	240	250
Ex-1 ko	201	GCTCCCGCTA	CGACGTGAGC	CGCTTGGGCC	GGGGCAAGCG	CTCGCTAGTG
		*****	*****	*****	*****	*****
humRac-gen	251	260	270	280	290	300
Ex-1 ko	251	CTGGACCTGA	AGCAGCCGCG	GGGAGCCGCC	GTGCTGCGGC	GTCTGTGCAA
		*****	*****	*****	*****	*****
humRac-gen	301	310	320	330	340	350
Ex-1 ko	301	GCGGTCGGAT	GTGCTGCTGG	AGCCCTTCCG	CCGCGGTGTC	ATGGAGAAAC
		*****	*****	*****	***** ψ	
					↓GT...→...→...	
Intron I						
					 ←...←...AG◇
Ex-2 ko	-35				ψ *****	*****
humRac-gen	351	360	370	380	390	400
Ex-2 ko	16	TCCAGCTGGG	CCCAGAGATT	CTGCAGCGGG	AAAATCCAAG	GCTTATTTAT
		*****	*****	*****	*****	*****
humRac-gen	401	410	420	430	440	450
Ex-2 ko	66	GCCAGGCTGA	GTGGATTTGG	CCAGTCAGGA	AGCTTCTGCC	GGTTAGCTGG
		*****	*****	*****	*****	*****

humRac-gen	451	460	470	480	490	500
Ex-2 ko	116	CCACGATATC	AACTATTTGG	CTTTGTCAGG	TGTTCTCTCA	AAAATTGGCA
		*****	*****	*****ψ		
↓GT...→...→.....						
Intron II						
.....←...←...AG◇						
Ex-3 ko	-29			ψ*	*****	*****
humRac-gen	501	510	520	530	540	550
Ex-3 ko	22	GAAGTGGTGA	GAATCCGTAT	GCCCCGCTGA	ATCTCCTGGC	TGACTTTGCT
		*****	*****	*****	*****	*****
humRac-gen	551	560	570	580	590	600
Ex-3 ko	72	GGTGGTGGCC	TTATGTGTGC	ACTGGGCATT	ATAATGGCTC	TTTTTGACCG
		*****	*****	*****	*****	*****
humRac-gen	601	610	620	630	640	650
Ex-3 ko	122	CACACGCACT	GGCAAGGGTC	AGGTCATTGA	TGCAGATATG	GTGGAAGGAA
		*****	*****	*****	*****ψ	
↓GT...→...→						
Intron III						
.....←...←...AG◇						
Ex-4 ko	-40				ψ*****	
humRac-gen	651	660	670	680	690	700
Ex-4 ko	11	CAGCATATTT	AAGTTCTTTT	CTGTGGAAAA	CTCAGAAATC	GAGTCTGTGG
		*****	*****	*****	*****	*****
humRac-gen	701	710	720	730	740	750
Ex-4 ko	61	GAAGCACCTC	GAGGACAGAA	CATGTTGGAT	GGTGGAGCAC	CTTCTATAC
		*****	*****	*****	*****	*****
humRac-gen	751	760	770	780	790	800
Ex-4 ko	111	GACTTACAGG	ACAGCAGATG	GGGAATTCAT	GGCTGTTGGA	GCAATAGAAC
		*****	*****	*****	*****	*****
humRac-gen	801	810	820	830	840	850
Ex-4 ko	161	CCCATTCTTA	CGAGCTGCTG	ATCAAAGGAC	TTGGACTAAA	GTCTGATGAA
		*****	*****	*****ψ		
↓GT...→...→.....						
Intron IV						
.....←...←...AG◇						
Ex-5 ko	-27			ψ***	*****	*****
humRac-gen	851	860	870	880	890	900
Ex-5 ko	24	CTTCCCAATC	AGATGAGCAT	GGATGATTGG	CCAGAAATGA	AGAAGAAGTT
		*****	*****	*****	*****	*****
humRac-gen	901	910	920	930	940	950
Ex-5 ko	74	TGCAGATGCA	TTTGCAAAGA	AGACGAAGGC	AGAGTGGTGT	CAAATCTTTG
		*****	*****	*****	*****	*****
humRac-gen	951	960	970	980	990	1000
Ex-5 ko	124	ACGGCACAGA	TGCCTGTGTG	ACTCCGGTTC	TGACTTTTGA	GGAGGTGTGT
		*****	*****	*****	*****	*****
humRac-gen	1001	1010	1020	1030	1040	1050
Ex-5 ko	174	CATCATGATC	ACAACAAGGA	ACGGGGCTCG	TTTATCACCA	GTGAGGAGCA
		*****	*****	*****	*****	*****
humRac-gen	1051	1060	1070	1080	1090	1100
Ex-5 ko	224	GGACGTGAGC	CCCCGCCCTG	CACCTCTGCT	GTTAAACACC	CCAGCCATCC
		*****	*****	*****	*****	*****
humRac-gen	1101	1110	1120	1130	1140	1150
Ex-5 ko	274	CTTCTTTCAA	AAGGGATCCT	TTCATAGGAG	AACACACTGA	GGAGATACTT
		*****	*****	*****	*****	*****
humRac-gen	1151	1160	1170	1180	1190	1200
Ex-5 ko	324	GAAGGATTTG	GATTCAGCCG	CGAAGAGATT	TATCAGCTTA	ACTCAGATAA
		*****	*****	*****	*****	*****

humRac-gen	1201	1210	1220	1230	1240	1250
Ex-5 ko	374	AATCATTGAA *****	AGTAATAAGG *****	TAAAAGCTAG *****	TCTCTAACCT *****	TCCAGGCCCA *****
humRac-gen	1251	1260	1270	1280	1290	1300
Ex-5 ko	424	CGGCTCAAGT *****	GAAATTTGAA *****	TACTGCATTT *****	ACAGTGTAGA *****	GTAACACATT *****
humRac-gen	1301	1310	1320	1330	1340	1350
Ex-5 ko	474	AACATTGTAT *****	GCCATGGAAA *****	CATGGAAGGA *****	ACAGTTATTA *****	CAGTGTCCTA *****
humRac-gen	1351	1360	1370	1380	1390	1400
Ex-5 ko	524	CCACTCTAAT *****	CAAGAAAAGA *****	ATTACAGACT *****	CTGATTCTAC *****	AGTGATGATT *****
humRac-gen	1401	1410	1420	1430	1440	1450
Ex-5 ko	574	GAATTCTAAA *****	AATGGTTATC *****	ATTAGGGCTT *****	TTGATTTATA *****	AAACTTTGGG *****
humRac-gen	1451	1460	1470	1480	1490	1500
Ex-5 ko	624	TACTTATACT *****	AAATTATGGT *****	AGTTATTCTG *****	CCTTCCAGTT *****	TGCTTGATAT *****
humRac-gen	1501	1510	1520	1530	1540	1550
Ex-5 ko	674	ATTTGTTGAT *****	ATTAAGATTC *****	TTGACTTATA *****	TTTTGAATGG *****	GTTCTAGTGA *****
humRac-gen	1551	1560	1570	1580	1590	1600
Ex-5 ko	724	AAAAGGAATG *****	ATATATTCTT *****	GAAGACATCG *****	ATATACATTT *****	ATTTACACTC *****
humRac-gen	1601	1610	1620	1630	1640	1650
Ex-5 ko	774	TTGATTCTAC *****	AATGTAGAAA *****	ATGAGGAAAT *****	GCCACAAATT *****	GTATGGTGAT *****
humRac-gen	1651	1660	1670	1680	1690	1700
Ex-5 ko	824	AAAAGTCACG *****	TGAAACAGAG *****	TGATTGGTTG *****	CATCCAGGCC *****	TTTTGTCTTG *****
humRac-gen	1701	1710	1720	1730	1740	1750
Ex-5 ko	874	GTGTTTCATGA *****	TCTCCCTCTA *****	AGCACATTCC *****	AAACTTTAGC *****	AACAGTTATC *****
humRac-gen	1751	1760	1770	1780	1790	1800
Ex-5 ko	924	ACACTTTGTA *****	ATTTGCAAAG *****	AAAAGTTTCA *****	CCTGTATTGA *****	ATCAGAATGC *****
humRac-gen	1801	1810	1820	1830	1840	1850
Ex-5 ko	974	CTTCAACTGA *****	AAAAAACATA *****	TCCAAAATAA *****	TGAGGAAATG *****	TGTTGGCTCA *****
humRac-gen	1851	1860	1870	1880	1890	1900
Ex-5 ko	1024	CTACGTAGAG *****	TCCAGAGGGA *****	CAGTCAGTTT *****	TAGGGTTGCC *****	TGTATCCAGT *****
humRac-gen	1901	1910	1920	1930	1940	1950
Ex-5 ko	1074	AACTCAGGGC *****	CTGTTTCCCC *****	GTGGGTCTCT *****	GGGCTGTCAG *****	CTTTCCTTTC *****
humRac-gen	1951	1960	1970	1980	1990	2000
Ex-5 ko	1124	TCCATGTGTT *****	TGATTTCTCC *****	TCAGGCTGGT *****	AGCAAGTTCT *****	GGATCTTATA *****
humRac-gen	2001	2010	2020	2030	2040	2050
Ex-5 ko	1174	CCCAACACAC *****	AGCAACATCC *****	AGAAATAAAG *****	ATCTCAGGAC *****	CCCCCAAAAA *****

Abb. 3-40: DNA-Sequenz (*humRac-gen*) der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase aus dem genomischen PAC-Klon B2 (RPCIP704L21804Q2), die Introns sind entsprechend markiert.

3.4.5 Chromosomale Lokalisation des humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase-Gens

Zur Feststellung der chromosomalen Lokalisation des α -Methylacyl-CoA-Racemase-Gens wurde die DNA des PAC-Klons B2 (*RPCIP 704 L21804 Q2*), wie in Abschnitt 2.4.5 beschrieben, gereinigt. Mit freundlicher Unterstützung von Dr. Nanda (Humangenetisches Institut der Universität Würzburg) konnte anschließend mittels FISH-Hybridisierung (*fluorescence in-situ hybridisation*) die Position des Racemase-Gens lokalisiert werden. Die fluoreszenzmarkierte DNA-Probe hybridisierte mit der Region 5p1.3. Das Gen der α -Methylacyl-CoA-Racemase liegt somit also auf dem Chromosom 5 p nahe am Centromer. Zusätzlich wurde mit der cDNA-Sequenz der Racemase nach Übereinstimmungen mit bereits chromosomal lokalisierten Gensequenzen gesucht. Tatsächlich konnte ein STS (*sequence tagged site*)-Klon *WI-16117* (Tab. 3-10), kartiert vom *International Hybrid Mapping Consortium*, identifiziert werden. Dieser ist mit dem EST-Klon H19272 identisch und zu der Racemasesequenz im Bereich von 1255 –1666 bp homolog (siehe Anhang).

	WI-161117
ID:	EST 279210 (H19272) yn50d10.s1 Homo sapiens cDNA Klon 171859 3'
Quelle:	WICGR: dbSTS Derivat aus dbEST-Sequenz (G21632)
Chromosom:	Chr 5
Physikalische Position:	121.56 cR3000 (P0.90)
Intervall:	D5S651-D5S634 (46.6-59.9 cM)
Genetische Größe:	13 Cm
Physikalische Größe:	24 cR3000
RH Details:	RHdb RH59978
Typisiert:	Whitehead
Whitehead-Kartierung:	Chr. 5, 132,3 cR

Tab. 3-10: Detailbeschreibung des dbSTS-Klon sWI-161117.

Der STS-Klon WI-16117 (STS-Derivat von G21632, genauere Beschreibung siehe Tab. 3-10) bestätigte die durch die FISH-Hybridisierung bekannte chromosomale Lokalisation auf dem Chromosom 5 p nahe des Centromers (Abb. 3-41): im Intervall von D5S651 (46,6 cM) und D5S634 (59.9 cM), genauer von dem Mikrosatellit-Anker D5S651 bei 46,6 cM (119,97 cR) zum Mikrosatellit-Anker D5S426 bei 51,6 cM (124,16 cR), zwischen dem humanen Transkriptionsfaktor SGC32812 bei 119,97 cR und dem EST-Klon stSG15058 bei 121,60 cR (Deloukas *et al.*,1998). Die Abbildung Abb. 3-41 zeigt schematisch die Lokalisation des STS-Klons WI-16117 auf dem kurzen Arm des Chromosoms 5.

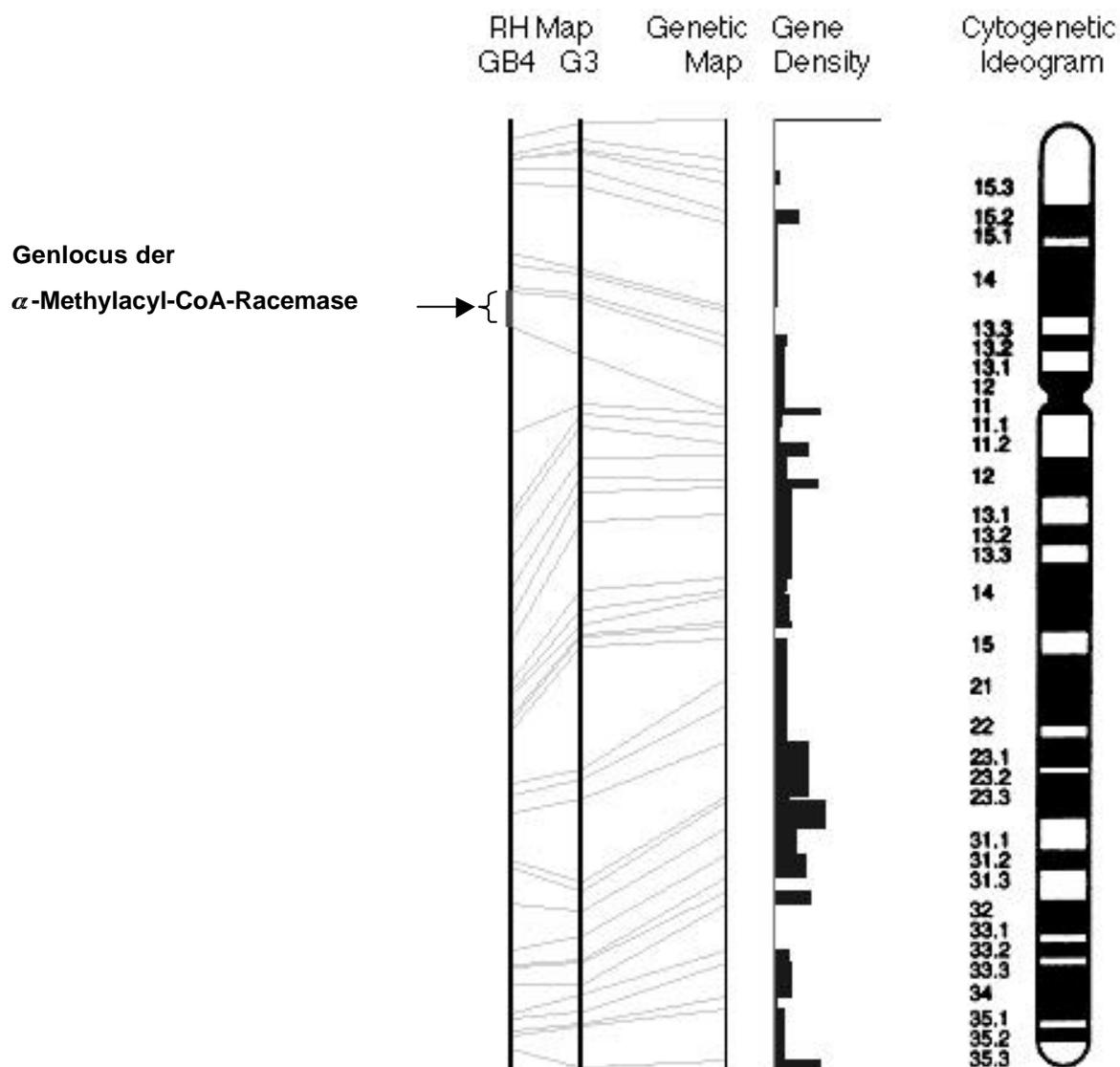


Abb. 3-41: GB4-Kartierung: Chromosom 5: D5S651-D5S634.