

1	Einleitung	1
2	Materialien und Methoden	16
2.1	Chemikalien und Enzyme	16
2.2	Proteinchemische Methoden	16
2.2.1	Quantitative Methoden	16
2.2.1.1	Proteinbestimmung nach Bradford	16
2.2.1.2	Phosphatbestimmung	16
2.2.2	Aufschlußtechniken für Gewebe und Zellen, Lagerung und Konzentrierung von Proteinen	17
2.2.2.1	Handhabung und Lagerung von Proteinen	17
2.2.2.2	Dialyse	17
2.2.2.3	Konzentrierung von Proteinen	17
2.2.2.4	Proteinfällung	17
2.2.2.5	Homogenisierung von Humanleber	17
2.2.2.6	Subzelluläre Fraktionierung	18
2.2.3	Gelelektrophorese	18
2.2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	18
2.2.3.2	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	19
2.2.3.3	Quantitative Elution von Proteinen aus Polyacrylamid-Gelen	20
2.2.3.4	Eichproteine für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese	20
2.2.3.5	Proteinfärbungen	21
2.2.3.6	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	22
2.2.3.7	Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulose	23
2.2.4	Chromatographie	25
2.2.4.1	Low pressure Chromatographie (LPC)	25
2.2.4.1.1	Reversed Phase Chromatographie (RPC)	25
2.2.4.1.2	Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose	25
2.2.4.1.3	Chromatographie an Hydroxylapatit	26
2.2.4.1.4	Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)	26
2.2.4.1.5	Gelchromatographie	27
2.2.4.1.6	Affinitätschromatographie an immobilisierten Farbstoffen	28
2.2.4.2	High pressure/performance liquid Chromatography (HPLC)	29
2.2.5	Enzymatische Bestimmungen	30
2.2.5.1	Bildung von [³ H]H ₂ O aus Carbonsäurederivaten (³ H-Standardassay)	30
2.2.5.2	Palmitoyl-CoA-Dehydrogenase	31
2.2.5.3	Racemisierung von (<i>S</i>)- und (<i>R</i>)-2-methyl-tetradecanoyl-CoA	31

2.2.5.4	Katalase	32
2.2.5.5	Dihydroxyacetonphosphat-Acyl-Transferase	32
2.2.5.6	Succinatdehydrogenase	33
2.2.5.7	β -Hexosaminidasen	33
2.2.6	Immunchemische Methoden	33
2.2.6.1	Antikörperherstellung (Kaninchen-anti-Rattenleber-Racemase-Antikörper)	33
2.2.6.2	Immunpräzipitation von α -Methylacyl-CoA-Racemase	34
2.2.6.3	Immunchemischer Antigennachweis nach Elektrotransfer	34
2.3	Mikrobiologische Methoden	35
2.3.1	Sterilisationstechniken	35
2.3.2	Kulturmedien	35
2.3.2.1	Flüssigmedien	35
2.3.2.2	Supplemente	36
2.3.2.3	Puffer	36
2.3.2.4	Festmedien	37
2.3.3	Selektive Kulturmethoden	37
2.3.4	Herstellung kompetenter Zellen	37
2.3.5	Konservierung und Lagerung von Bakterienkulturen	38
2.4	Molekularbiologische Methoden	39
2.4.1	DNA-Banken	39
2.4.1.1	cDNA-Banken	39
2.4.1.2	Genomische DNA-Bank	41
2.4.2	Oligonukleotide	42
2.4.2.1	Sequenzspezifische Primer	42
2.4.2.2	Vektorspezifische Primer	42
2.4.3	Klonierung mit TA Cloning Kit (Invitrogen)	43
2.4.3.1	Ligation	43
2.4.3.2	Transformation	43
2.4.4	Präparation genomischer DNA	44
2.4.5	Präparation von PAC-DNA	44
2.4.6	Plasmidpräparation	45
2.4.6.1	Plasmid-Minipräparation	45
2.4.6.2	Plasmidpräparation mit Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (BIORAD)	46
2.4.6.3	Plasmidpräparation mit Qiaprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)	46
2.4.7	Reinigung, Fällung und Trocknung von DNA	47
2.4.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	47

2.4.9	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen	48
2.4.10	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	48
2.4.10.1	DNA-Größenstandards	49
2.4.10.2	Elution von DNA aus Agarose-Gelen	50
2.4.11	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR)	51
2.4.12	Automatisierte DNA-Sequenzierung	52
2.4.13	³² P-Markierung von DNA	52
2.4.14	Northern Blot	53
3	<i>Ergebnisse</i>	54
3.1	Enzymatische Bestimmung der α-Methylacyl-CoA-Racemase	54
3.2	Präparation und Reinigung von humaner α-Methylacyl-CoA-Racemase	55
3.2.1	Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose	56
3.2.2	Hydroxylapatitchromatographie	57
3.2.3	Gelfiltration	58
3.2.4	Affinitätschromatographie an immobilisierten Farbstoffsäulen	58
3.2.5	HPLC-Chromatographie	60
3.2.5.1	HPLC-Chromatographie an DEAE-Cellulose	60
3.2.5.2	HPLC-Chromatographie an Hydroxylapatit	62
3.2.6	Übersicht der Aufreinigung der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase	63
3.2.7	Analyse der Reinheit der präparierten α -Methylacyl-CoA-Racemase aus humaner Leber	64
3.2.7.1	HPLC-Chromatographie an WAEX-DEAE	64
3.2.7.2	SDS-PAGE-Analyse	65
3.3	Biochemische Charakterisierung der humanen α-Methylacyl-CoA-Racemase	66
3.3.1	Molekulargewichtsbestimmung	66
3.3.1.1	Gelfiltration	66
3.3.1.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	67
3.3.2	Bestimmung des isoelektrischen Punktes	68
3.3.3	Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität	70
3.3.4	Thermostabilität	71
3.3.5	pH-Abhängigkeit	72
3.3.6	Enzymkinetik der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase	73
3.3.7	Inhibition der α -Methylacyl-CoA-Racemisierung	75
3.3.8	Subzelluläre Verteilung der α -Methylacyl-CoA-Racemase	76
3.3.9	Gewebsspezifische Aktivität der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase	82

3.3.10	Immunchemische Charakterisierung der humanen α -Methyl-acyl-CoA-Racemase	84
3.3.10.1	Westernblot	84
3.3.10.2	Immunopräzipitation	85
3.4 Molekularbiologische Charakterisierung der humanen		
	α-Methylacyl-CoA-Racemase	87
3.4.1	Ermittlung der cDNA-Sequenz	87
3.4.1.1	Allgemeine Strategie	87
3.4.1.2	Marathon-Ready™ cDNA	89
3.4.1.3	Uni-ZAP™ XR Library	93
3.4.1.4	Genomische DNA aus Leukozyten	97
3.4.1.5	EST-Sequenzvergleich	101
3.4.1.6	Vollständige cDNA-Sequenz der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase	104
3.4.2	Proteinsequenzanalyse der α -Methylacyl-CoA-Racemase	105
3.4.3	Northern Blot	108
3.4.4	Genomische Analyse des humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase-Gens	109
3.4.4.1	Genomischer Aufbau	109
3.4.4.1.1	Exon-/ Intronstruktur	114
3.4.5	Chromosomale Lokalisation des humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase-Gens	119
4	<i>Diskussion</i>	121
5	<i>Zusammenfassung</i>	152
6	<i>Literaturverzeichnis</i>	156
7	<i>Anhang</i>	167
7.1	DNA-Sequenzen	167
7.2	Abkürzungsverzeichnis	176