

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Experimentelle Genetik

Charakterisierung neuer Mitglieder der  
Short-Chain-Dehydrogenase/Reduktase-Proteinfamilie

Marc Meier

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. H. H. D. Meyer

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. J. Adamski  
2. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner  
3. Univ.-Prof. Dr. J. J. Hauner

Die Dissertation wurde am 15.12.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 28.04.2009 angenommen.

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis . . . . .	vii
Zusammenfassung . . . . .	1
Abstract . . . . .	3
<b>1 Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1 Die Short-Chain-Dehydrogenase/Reduktase-Superfamilie . . . . .	5
1.1.1 Historischer Hintergrund . . . . .	5
1.1.2 Klassifizierung der Mitglieder der SDR-Proteinfamilie . . . . .	6
1.1.3 Strukturelle Merkmale der SDRs . . . . .	7
1.1.4 Substrate und metabolische Bedeutung der SDRs . . . . .	9
1.1.5 Medizinische Bedeutung der SDR-Proteinfamilie . . . . .	10
1.1.6 Vorstellung einiger bedeutender Mitglieder der SDR-Proteinfamilie . . . . .	11
1.2 Ziel der Arbeit . . . . .	17
<b>2 Ergebnisse</b>	<b>18</b>
2.1 Einleitende Worte . . . . .	18
2.2 Charakterisierung neuer Mitglieder der SDR-Proteinfamilie . . . . .	19
2.2.1 Auswahl der zu untersuchenden SDR-Kandidaten . . . . .	19
2.2.2 Analyse von Verwandtschaftsverhältnissen durch Phylogenie . . . . .	24
2.2.3 Studien zur subzellulären Lokalisation . . . . .	31
2.2.4 Untersuchungen zur Gewebeverteilung . . . . .	49
2.2.5 Bestimmung der Substratspezifität . . . . .	56
2.2.6 Expression und Aufreinigung der zu charakterisierenden Mitglieder der SDR-Proteinfamilie . . . . .	66
2.2.7 Identifizierung von Interaktionspartnern der zu charakterisierenden Mitglieder der SDR-Proteinfamilie . . . . .	73
2.3 Charakterisierung der Wwox-Funktion anhand der entsprechenden Mausmutante . . . . .	86
2.3.1 Etablierung der Mauskolonie Wwox . . . . .	86
2.3.2 Phänotypische Untersuchung der Wwox-Mauslinie . . . . .	92
2.3.3 Zusammenfassung zur Charakterisierung der Wwox-Funktion anhand der entsprechenden Mausmutante . . . . .	93
<b>3 Diskussion</b>	<b>94</b>
3.1 Generelle Anmerkungen . . . . .	94
3.2 Das Vorgehen - die gewählten Methoden im Visier . . . . .	94
3.2.1 Analyse von Verwandtschaftsverhältnissen durch Phylogenie . . . . .	94
3.2.2 Studien zur subzellulären Lokalisation . . . . .	96

3.2.3	Untersuchungen zur Gewebeverteilung . . . . .	103
3.2.4	Bestimmung der Substratspezifität . . . . .	106
3.2.5	Expression und Aufreinigung der zu charakterisierenden Mitglieder der SDR-Proteinfamilie . . . . .	109
3.2.6	Identifizierung von Interaktionspartnern der zu charakterisierenden Mitglieder der SDR-Proteinfamilie . . . . .	111
3.2.7	Etablierung einer KnockOut-Mauslinie . . . . .	115
3.3	Feststellungen zu den charakterisierten Mitgliedern der SDR-Proteinfamilie . . . . .	117
3.3.1	humanes CBR4 - Die „Carbonylreduktase“ der anderen Art . . . . .	117
3.3.2	humanes DHRS1 - das SDR-Enzym mit unbekannter Funktion . . . . .	122
3.3.3	humanes DHRS6 - eine neue, cytosolische Typ 2 R- $\beta$ -Hydroxybutyratdehydrogenase . . . . .	128
3.3.4	humanes HSDL1 - ein SDR-„Enzym“, ohne enzymatische Aktivität . . . . .	130
3.3.5	Retinoldehydrogenasen - Die „Mutter“ der SDRs? . . . . .	134
3.4	Charakterisierung der Wwox-Funktion anhand der entsprechenden Mausmutante . . . . .	135
3.5	Abschließende Worte und Ausblick . . . . .	136
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>137</b>
4.1	Generelle Methoden zur Arbeit mit Bakterien . . . . .	137
4.1.1	Nährmedien . . . . .	137
4.1.2	Inhibitorische und selektive Medienzusätze . . . . .	137
4.1.3	Zellanzucht . . . . .	137
4.1.4	Stammhaltung und Lagerung . . . . .	138
4.1.5	Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation von Plasmid-DNA . . . . .	138
4.2	Generelle Methoden zur Arbeit mit Hefen . . . . .	139
4.2.1	Nährmedien . . . . .	139
4.2.2	Zellkultivierung . . . . .	140
4.2.3	Herstellung kompetenter Hefen und Transformation von Plasmid-DNA . . . . .	140
4.2.4	Das Gal4-Yeast-Two-Hybrid-System (Y2H) . . . . .	142
4.2.5	Testen des Köders auf autonome Reportergen-Aktivierung . . . . .	142
4.2.6	Screening einer vortransformierten cDNA-Bibliothek durch Hefe-Mating . . . . .	144
4.2.7	Ermittlung der Mating-Effizienz und der Anzahl gescreenter Klone . . . . .	144
4.2.8	Der $\alpha$ -Galaktosidasetest . . . . .	145
4.3	Generelle Methoden zur Arbeit mit Säugetierzellkulturen . . . . .	145
4.3.1	Kultivierung von Zelllinien . . . . .	145
4.3.2	Allgemeine Methoden zur Zellkultur . . . . .	146
4.3.3	Aussähen von Zellen und Transfektion in unterschiedlichen Formaten . . . . .	147
4.3.4	Immuncytochemische Methoden für subzelluläre Lokalisationsstudien . . . . .	148
4.3.5	Zellkultur-Assays . . . . .	150
4.4	Molekulargenetische Methoden mit DNA . . . . .	151
4.4.1	Präparation von Plasmid-DNA . . . . .	151
4.4.2	Aufreinigung von dsDNA . . . . .	152
4.4.3	Isolierung genomischer DNA zur Genotypisierung . . . . .	153
4.4.4	Fällen von DNA . . . . .	153

4.4.5	Messung von DNA-Konzentration und Qualitätsabschätzung . . . . .	153
4.4.6	Klonierungsstrategien . . . . .	155
4.4.7	PCR-basierte Methoden . . . . .	156
4.5	Molekulargenetische Methoden mit RNA . . . . .	160
4.5.1	Isolierung und Präzipitierung von RNA . . . . .	160
4.5.2	Reverse Transkription von mRNA in cDNA . . . . .	161
4.5.3	Handhabung und Messung . . . . .	161
4.5.4	Analyse der Genexpression durch Northern Blot . . . . .	162
4.6	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	163
4.6.1	Proteinexpression und -aufreinigung in Bakterien . . . . .	163
4.6.2	Proteinexpression und -aufreinigung in Hefen . . . . .	166
4.6.3	Proteinexpression und -aufreinigung in Säugetierzellkultur . . . . .	167
4.6.4	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) . . . . .	167
4.6.5	Western Blot . . . . .	168
4.6.6	<i>In vitro</i> -Translation von Proteinen . . . . .	169
4.6.7	GST-Pulldown Assay . . . . .	170
4.6.8	Coimmunopräzipitation . . . . .	171
4.7	Messung der Substratspezifität . . . . .	172
4.7.1	Messung des Substratumsatzes im <i>in vivo</i> -System . . . . .	172
4.7.2	Messung des Substratumsatzes im <i>in vitro</i> -System . . . . .	173
4.7.3	Aufreinigung von HPLC-Proben mittels Festphasenextraktion . . . . .	174
4.7.4	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) . . . . .	174
4.8	Untersuchung des metabolischen Umfelds mittels FT-ICR-MS . . . . .	176
4.8.1	Probenvorbereitung . . . . .	176
4.8.2	Analyse von Metaboliten mittels FT-ICR-MS . . . . .	177
4.8.3	Auswertung der massenspektrometrischen Daten . . . . .	177
4.9	Etablierung einer Mauslinie . . . . .	177
4.10	Bioinformatische Methoden . . . . .	178
4.10.1	<i>In silico</i> Northern Blot . . . . .	178
4.10.2	Alignments und Phylogenie . . . . .	178
4.10.3	Bioinformatische Vorhersagen . . . . .	178
<b>5</b>	<b>Material, Organismen und Programme</b>	<b>180</b>
5.1	Material . . . . .	180
5.1.1	Antikörper . . . . .	180
5.1.2	Chemikalien, Medien, Seren und Zusätze . . . . .	180
5.1.3	Enzyme . . . . .	182
5.1.4	Equipment . . . . .	183
5.1.5	Kits . . . . .	184
5.1.6	Lösungen zur Zellfärbung . . . . .	185
5.1.7	Radionuklide . . . . .	185
5.1.8	Vektoren . . . . .	186
5.2	Organismen . . . . .	186
5.2.1	Bakterienstämme . . . . .	186

5.2.2	Hefestämme . . . . .	187
5.2.3	Säugetierzelllinien . . . . .	187
5.3	Programme . . . . .	187
<b>Literaturauswahl aus dem Forschungsfeld</b>		<b>191</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>		<b>192</b>
<b>A Anhang</b>		<b>205</b>
A.1	Protein-Identifikationsnummern der Datensätze zu den phylogenetischen Analysen	205
A.1.1	Datensatz zu hCBR4 . . . . .	205
A.1.2	Datensatz zu hDHRS1 . . . . .	205
A.1.3	Datensatz zu hDHRS6 . . . . .	206
A.1.4	Datensatz zu hHSDL1 . . . . .	206
A.2	Phylogenetische Stammbäume . . . . .	207
A.2.1	Phylogenetischer Stammbaum zu hCBR4 . . . . .	207
A.2.2	Phylogenetischer Stammbaum zu hDHRS1 . . . . .	208
A.2.3	Phylogenetischer Stammbaum zu hDHRS6 . . . . .	209
A.2.4	Phylogenetischer Stammbaum zu hHSDL1 - Februar 2005 . . . . .	211
A.2.5	Phylogenetischer Stammbaum zu hHSDL1 - Juli 2008 . . . . .	212
A.3	Verwendete Primer . . . . .	213
A.3.1	Primer und Schnittstellen zur Klonierung . . . . .	213
A.3.2	Primer zur quantitativen RealTime-PCR . . . . .	214
A.3.3	Primer zur Generierung der Northern Blot-Sonden . . . . .	215
A.3.4	Primer zum Expressionsnachweis der Kandidaten in HEK293-Zellen . . . . .	215
A.3.5	Primer zur Genotypisierung der Wwox-Mauslinie . . . . .	215
A.4	Publikationen . . . . .	216
	Danksagung . . . . .	217

## Abkürzungsverzeichnis

AHT	Anhydrotetracyclin
AKR	Aldo-Keto-Reduktase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintri-phosphat
BDH	Hydroxybutyratdehydrogenase
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CBR	Carbonylreduktase
CDS	Coding sequence
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cfu	colony forming units
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	Expressed Sequence Tag
et al.	et alteri
FBS	Fätales Rinderserum
FT-ICR-MS	Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometer
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
hCBR4	carbonic reductase 4 [ <i>Homo sapiens</i> ]
hDHRS1	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
hDHRS6	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 6 [ <i>Homo sapiens</i> ]
hHSDL1	hydroxysteroid dehydrogenase like 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSD	Hydroxysteroiddehydrogenase
HSD17BX	17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ X
IP <sub>3</sub> R	Inositol-1,4,5-Triphosphat-Rezeptor

---

IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
$\lambda$	Lambda, Wellenlänge
MCS	Multiple Cloning Site
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
NAD <sup>+</sup>	$\beta$ -Nicotinsäureamid-Adenosin-Dinucleotid
NADH	$\beta$ -Nicotinsäureamid-Adenosin-Dinucleotid, reduziert
NADP	$\beta$ -Nicotinsäureamid-Adenosin-Dinucleotid-3'-Phosphat
NADPH	$\beta$ -Nicotinsäureamid-Adenosin-Dinucleotid-3'-Phosphat, reduziert
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	RCSB Protein Data Bank
ppm	parts per million
PTGES	Prostaglandin E-Synthase
QDO	Quadrupole DropOut
qRT-PCR	quantitative RealTime-PCR
RDH	Retinoldehydrogenase
RFP	Rotfluoreszierendes Protein
RLU	<i>relative light units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	Umdrehungen pro Minute
R <sub>t</sub>	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
SDR	Short-Chain-Dehydrogenase/Reduktase
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	small interfering ribonucleic acid
TDO	Triple DropOut
TEMED	Tetramethylethylendiamin
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit (Einheit)
UAS	Upstream Activating Sequence
üN	über Nacht
UTR	Untranslatierte Region
w/v	Weight/volume (Gewicht/Volumen)
Wwox	WW domain-containing oxidoreductase [ <i>Mus musculus</i> ]
X- $\alpha$ -Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid
Y2H	Yeast-Two-Hybrid

---

## Zusammenfassung

Die Familie der Short-Chain-Dehydrogenasen/Reduktasen (SDRs) bildet eine große und medizinisch bedeutende Proteinfamilie. Ihre Mitglieder nehmen Schlüsselpositionen in unterschiedlichsten Stoffwechselwegen ein und ihre Fehlfunktionen sind nicht selten mit schweren Krankheitsbildern assoziiert. In Konsequenz ist zu erwarten, daß viele Erkrankungen, deren Ursachen bisher unbekannt sind, durch Funktionsstörungen noch unidentifizierter SDRs hervorgerufen werden. Diese Doktorarbeit hatte sich zum Ziel gesetzt, einige bislang nicht eingehender untersuchte Mitglieder der SDR-Familie umfassend funktionell zu charakterisieren und auf ihre Verbindung zu Stoffwechseldefekten zu überprüfen. Im Mittelpunkt stand dabei die Identifizierung und Beschreibung neuer, gänzlich uncharakterisierter SDR-Proteine. Durch die Kombination von bioinformatischen und experimentellen Untersuchungen wurden Verwandtschaftsverhältnisse, subzelluläre Lokalisation, Gewebeverteilung, Substratspezifität sowie proteomische Wechselwirkungen der ausgewählten Kandidaten bestimmt.

Das humane SDR-Enzym CBR4, laut Namensgebung eine Carbonylreduktase, ist ein in den Vertebraten hochkonserviertes Protein. Aufgrund eines nicht abgespaltenen, N-terminalen Lokalisationssignals wird es in die Mitochondrien transloziert und dort in die innere oder äußere Membran integriert. hCBR4 zeigt eine ubiquitäre Gewebeverteilung mit höchster Expression in Magen, Hypophyse und Uterus. Das Protein weist keinerlei enzymatische Aktivität gegenüber Steroiden und Chinonen auf, ein katalytisches Potential konnte lediglich gegenüber Prostaglandin E<sub>2</sub> nachgewiesen werden, dieses erscheint allerdings nicht von physiologischer Relevanz. Die tatsächliche Zugehörigkeit hCBR4s zur Familie der Carbonylreduktasen ist aufgrund der gravierenden Unterschiede zu den übrigen Mitgliedern der Enzymgruppe hCBR1 und hCBR3 in Frage zu stellen, stattdessen scheint eine Beteiligung des Enzyms am Fettstoffwechsel wahrscheinlich.

Das humane Mitglied der SDR-Proteinfamilie hDHRS1 weist lediglich Homologe unterschiedlicher Spezies mit hoher Sequenzidentität in seiner phylogenetischen Nachbarschaft auf und ist ein Enzym der Endoplasmatischen Retikulum-Membran. Sein Transport ins Zielkompartiment wird durch das Zusammenwirken zweier terminaler Signalsequenzen unterschiedlicher Dominanz vermittelt. hDHRS1 zeigt ein ubiquitäres Expressionsmuster mit vorherrschender Präsenz der zwei Transkriptionsvarianten in Lipid-metabolisierendem Gewebe. Das Protein weist keine katalytische Aktivität gegenüber Steroiden oder Prostaglandinen auf, eine Beteiligung an den entsprechenden Stoffwechselwegen kann somit ausgeschlossen werden. Aufgrund der

---

ermittelten Gewebeverteilung, einer beobachteten Veränderung der Mitochondrienmorphologie nach hDHRS1-Expression und den verifizierten Wechselwirkungen ist seine Rolle im Lipid- (evtl. Inositolphosphat-) oder Zucker-Metabolismus zu vermuten.

In vorliegender Arbeit konnte weiter das SDR-Enzym hDHRS6 als erste cytosolische Hydroxybutyratdehydrogenase charakterisiert werden. Als „Backup-System“ zur mitochondrialen Hydroxybutyratdehydrogenase scheint sie durch Verwertung von Hydroxybutyrat für den Energiegewinn in der Zelle mitverantwortlich. Darüberhinaus dient die cytosolische Generierung von Acetoacetyl-CoA vermutlich als Baustein für die Fettsäure- oder Sterolsynthese. Die zellbiologische und biochemische Charakterisierung des Proteins wurde in Kooperation mit dem Structural Genomics Consortium in Oxford durchgeführt.

Bei humanem HSDL1, einem engen Verwandten der  $17\beta$ -HSDs Typ 3 und 12, handelt es sich um eine mitochondriale SDR. Nach der Translokation des Proteins ins Zielorganell, basierend erneut auf dem Zusammenspiel zweier unterschiedlich dominanter terminaler Signale, integriert hHSDL1 in eine der beiden Mitochondrienmembranen. Das Protein ist im menschlichen Körper ubiquitär, allerdings vorwiegend in steroidogenem Gewebe exprimiert. Durchgeführte Aktivitätstests beweisen eine enzymatische Inaktivität hHSDL1s, begründet in einer Aminosäuresubstitution im aktiven Zentrum. Aufgrund der hohen Konservierung unter den Homologen der Vertebraten und der Identifizierung von Interaktionspartnern scheint hHSDL1 dennoch in einen bedeutenden Zellprozess involviert, wahrscheinlich ist eine Beteiligung am Steroid- oder Fettstoffwechsel.

Neben der Charakterisierung bislang unerforschter Mitglieder der SDR-Proteinfamilie wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein bereits teilweise beschriebenes SDR-Enzym, das murine Protein „WW domain-containing oxidoreductase“ (Wwox) eingehender untersucht. Zur detaillierten Bestimmung der *in vivo*-Funktion des Proteins von Interesse mit besonderem Fokus auf den durch die vorhandene SDR-Domäne vermittelten zellulären Prozessen stand zunächst die Etablierung einer entsprechenden KnockOut-Maus im Vordergrund. Die Eliminierung von Wwox zeigte sich bereits in der Embryonalentwicklung lethal. Dies verdeutlicht die signifikante Bedeutung des Proteins im Organismus.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte ein entscheidender Grundstein für die detaillierte Bestimmung der Rolle der untersuchten SDR-Enzyme im Stoffwechsel gelegt und ein entscheidender Beitrag zum generell besseren Verständnis der metabolischen Prozesse im Organismus geleistet werden.

---

## Abstract

The family of short-chain dehydrogenases/reductases constitutes a large protein family of medical importance. Its members play an essential role in a variety of metabolic pathways and their dysfunctions are often associated with severe disorders. In consequence, it is expected that many diseases of so far unknown origin are caused by dysfunctions of still unidentified SDRs. The aim of this PhD thesis was the functional characterization of up to now not further investigated members of the SDR family and the verification of their contribution to metabolic diseases. By combining bioinformatical and experimental investigations phylogenetic relationships, subcellular localization, tissue distribution, substrate specificity and proteomic interactions were determined.

The human SDR enzyme CBR4, annotated as carbonyl reductase, is a protein with high conservation among vertebrates. Mediated by a non-cleavable, N-terminal signal sequence it is translocated to mitochondria where it is subsequently integrated in the inner or outer membrane. hCBR4 shows an ubiquitous tissue distribution with highest expression in stomach, pituitary gland and uterus. The protein exhibits no enzymatic activity towards steroids and quinones, a catalytic potential could solely be demonstrated towards Prostaglandin E<sub>2</sub>, although this conversion doesn't seem to be of physiological relevance. Due to the significant differences to the two other members of the enzyme group, hCBR1 and hCBR3, the membership of hCBR4 to the family of carbonyl reductases has to be put into question. A contribution of the enzyme in fatty acid metabolism seems to be more probable.

The SDR enzyme hDHRS1 reveals only homologues of different species with high sequence identity in close proximity and is located in the endoplasmic reticulum membrane. Its transport to the target compartment is mediated through the coaction of two terminal signal sequences of varying dominance. hDHRS1 shows a ubiquitous expression pattern with predominant presence of two transcript variants in lipid metabolizing tissue. The protein shows no catalytic activity towards steroids and prostaglandins, therefore a contribution in the according metabolic pathways can be excluded. Due to the determined tissue distribution, an observed alteration in the morphology of mitochondria after hDHRS1 expression and the detected protein-protein interactions a role in lipid (possibly in inositol phosphate) or sugar metabolism can be assumed.

In the work at hand, the human SDR enzyme hDHRS6 could be characterized as novel, cytosolic hydroxybutyrate dehydrogenase. Acting as "backup" system for the mitochondrial hydroxybutyrate dehydrogenase it seems to participate in the utili-

---

zation of hydroxybutyrate for energy supply in the cell. A different role of cytosolic ketone body utilization might be the cytosolic generation of acetoacetyl-CoA as building block for fatty acid and sterol synthesis. The cell biological and biochemical characterization of the protein was conducted in cooperation with the Structural Genomics Consortium in Oxford.

Human HSDL1 is a close relative of  $17\beta$ -HSDs type 3 and 12 and turned out to be a mitochondrial SDR. Based on the coaction of two signal sequences of varying dominance, hHSDL1 integrates in one of the mitochondria membranes. In the human body, the protein is ubiquitously distributed with predominant expression in steroidogenic tissue. Activity assays proved the enzymatic inactivity of hHSDL1 caused by an amino acid substitution in the active center. Nevertheless, the high conservation among the vertebrate homologues and the identification of protein interactors implies an involvement of hHSDL1 in an essential cellular process. A participation in steroid or fatty acid metabolism is suggested.

In addition to the characterization of so far unexplored members of the SDR protein family, an already partially investigated SDR enzyme, the murine “WW domain-containing oxidoreductase” (Wwox) was analyzed in-depth. Detailed elucidation of the *in vivo* function with main focus on the cellular processes mediated by the present SDR domains centered initially on the establishment of a corresponding knockout mouse. The elimination of Wwox lead to lethality during embryogenesis. This observation emphasizes the significant role of the protein in the organism.

The work at hand constitutes the foundation for a more detailed analysis of the metabolic role of the investigated enzymes and contributes to a better understanding of affected biochemical pathways.

# 1 Einleitung

Die umfassenden Genomsequenzierungs-Projekte haben der Wissenschaft in den vergangenen Jahrzehnten eine beispielelose Fülle an molekularen Informationen zur Verfügung gestellt, die das Verständnis des Lebens grundlegend revolutionieren. Durch die Identifizierung und Charakterisierung von Genen ist es gelungen, die Basis für die erfolgreiche Aufklärung metabolischer Zusammenhänge zu schaffen. Da die Analyse von genomischen Sequenzen allein allerdings nur eingeschränkte Einsichten in die biochemischen Vorgänge erbringen kann, die die Funktion von Zellen oder Geweben bestimmen, befindet sich die Wissenschaft heute in einem Umbruch von der genomischen zur postgenomischen Ära und die Untersuchung des Proteoms ist in den Fokus der Forschungsarbeit gerückt. Proteomics ist der nächste biologische Flaschenhals im Zuge des umfassenden Verständnisses der Organismen, deren Genom bereits vollständig sequenziert werden konnte. Die unermessliche Anzahl bislang uncharakterisierter Proteine, sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Systemen, zeigt jedoch deutlich, daß die Aufklärung der zellulären Biochemie noch in den Kinderschuhen steckt und der Weg in Richtung einer effizienten Behandlung von assoziierten Erkrankungen noch ein weiter ist. Auch die vorliegende Arbeit schlägt diesen proteomischen Kurs ein und befasst sich mit einer Familie an Enzymen, die nachgewiesenermaßen in einer Vielzahl an vererbten Störungen des Stoffwechsels von entscheidender Bedeutung ist, der Proteinfamilie der Short-Chain-Dehydrogenase/Reduktasen.

## 1.1 Die Short-Chain-Dehydrogenase/Reduktase-Superfamilie

### 1.1.1 Historischer Hintergrund

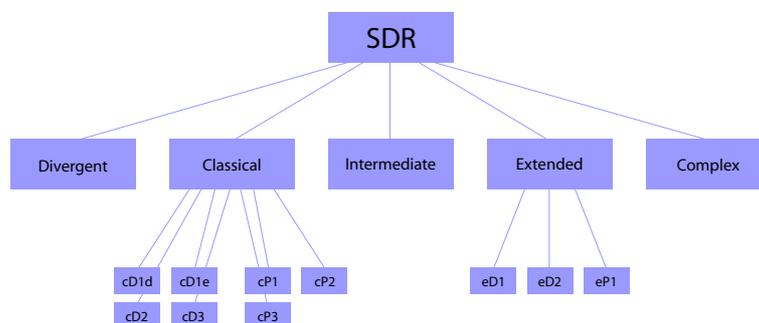
Basierend auf der Entdeckung einer prokaryotischen Ribitol-Dehydrogenase [43] [138] und einer Alkohol-Dehydrogenase aus *Drosophila melanogaster* [180] [198] wurde im Jahre 1981 die Enzymfamilie der Short-Chain-Dehydrogenasen/Reduktasen (SDRs) definiert [94]. Die zu diesem Zeitpunkt lediglich aus den besagten zwei Mitgliedern bestehende und im Zuge dessen zunächst als „insect type alcohol dehydrogenase family“ bezeichnete Enzymfamilie ließ sich in kürzester Zeit um zahlreiche Mitglieder erweitern, in erster Linie handelte es sich dabei um Proteine bakteriellen Ursprungs. Um eine klare Abgrenzung zu den klassischen, Zink-beinhaltenen Alkoholdehydrogenasen der „medium-chain dehydrogenase/reductase superfamily“ (MDR) zu erreichen - diese verfügen generell über deutlich längere Polypeptidketten -, erfolgte die Umbenennung der Enzymfamilie in „short-chain dehydrogenase/reductase superfamily“. Mit der 15-Hydroxyprostaglandindehydrogenase konnte im Jahre 1990 der erste humane Vertreter der SDR-Proteinfamilie beschrieben werden [106] und die erste umfassende Darlegung der grundlegenden Eigenschaften der SDRs [167] erlaubte in der Folge die Identifizierung und Eingliederung zahlreicher Proteine der unterschiedlichsten Vertebraten-Spezies sowie weiterer Proteine aus Prokaryoten, *Drosophila*

*melanogaster* und *Caenorhabditis elegans*. Während der Enzymfamilie der Short-Chain-Dehydrogenasen/Reduktasen 1994 noch etwa 60 Enzyme zuzuordnen waren [93], so umfasste sie im Jahre 1999 bereits 1000 [92], 2004 bereits 3000 Mitglieder aller Taxa [154]. Zum heutigen Zeitpunkt sind etwa 4000 zugehörige Primärstrukturen in Sequenz-Datenbanken annotiert, im menschlichen Genom sind etwa 70 für SDRs kodierende Gene bekannt.

### 1.1.2 Klassifizierung der Mitglieder der SDR-Proteinfamilie

Die Enzymfamilie der Short-Chain-Dehydrogenasen/Reduktasen übergreift diverse, von der IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) definierte EC-Klassen. Beim Großteil der ihr zugehörigen Mitglieder handelt es sich um Oxidoreduktasen (EC 1.x.x.x), darüberhinaus sind allerdings auch einige Lyasen (EC 4.x.x.x) und Isomerasen (5.x.x.x) der SDR-Proteinfamilie zuzuordnen.

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Versuche unternommen, die SDR-Proteinfamilie selbst in einer schlüssigen und verständlichen Art und Weise zu untergliedern. Zunächst waren lediglich „classical“ und „extended“ SDRs unterschieden worden, die Identifizierung weiterer Mitglieder der Enzymfamilie [166] unter Verwendung eines auf dem multiplen Alignment bekannter SDRs basierenden hidden Markov-Modells [99] [100] ließ allerdings eine Einteilung in lediglich zwei Familien nicht ausreichend erscheinen, stattdessen wurde eine Untergliederung in fünf Familien für sinnvoll erachtet. Es erfolgte die Etablierung der Familien „classical“, „extended“, „intermediate“, „divergent“ und „complex“, die klassischen SDRs wurden in weitere sieben Unterfamilien, die „extended“ SDRs in weitere drei Unterfamilien unterteilt (vergleiche Abbildung 1.1) [96].



**Abbildung 1.1:** Klassifizierung der SDR-Familie nach Kallberg et al. 2002 [96]. Auf der ersten Ebene werden die Mitglieder der SDR-Proteinfamilie in fünf Familien aufgeteilt, in der zweiten Ebene erfolgt eine weitere Untergliederung der klassischen Familie in sieben, der Familie der verlängerten SDRs in drei Unterfamilien.

Da sich das eingeführte Klassifizierungssystem allerdings deutlich von beispielsweise dem der Aldo-Keto-Reduktase-Familie unterscheidet - einem System, das lediglich auf Strukturmerkmalen beruht - und eine generelle, auch Familien-übergreifende Nomenklatur zur besseren Übersichtlichkeit anstrebenwert ist, haben sich die führenden Wissenschaftler auf dem Gebiet der Short-Chain-Dehydrogenasen/Reduktasen mit Forschern der verwandten Gebiete in der „The Short-Chain Dehydrogenase/Reductase (SDR) Nomenclature Initiative“ zusammengefunden [165], um eine neue Klassifizierung auszuarbeiten.

### 1.1.3 Strukturelle Merkmale der SDRs

Die meisten beschriebenen SDR-Proteine zeichnen sich durch eine Länge von 250 bis 400 Aminosäureresten aus. Ihre Zugehörigkeit zur Enzymfamilie wird durch die Anwesenheit definierter Sequenzmotive bestimmt, die gewöhnlich sehr stark konserviert sind (vergleiche Tabelle 1.1). Die Tertiärstruktur der SDRs weist eine Cofaktor-bindende Region im N-terminalen Abschnitt, ein katalytisches Zentrum im Mittelteil, eine Substrat-bindende Region und eine für die Oligomerisierung bedeutende Verlängerung am C-Terminus auf.

**Tabelle 1.1:** Typische Struktur motive der SDR-Enzymfamilie

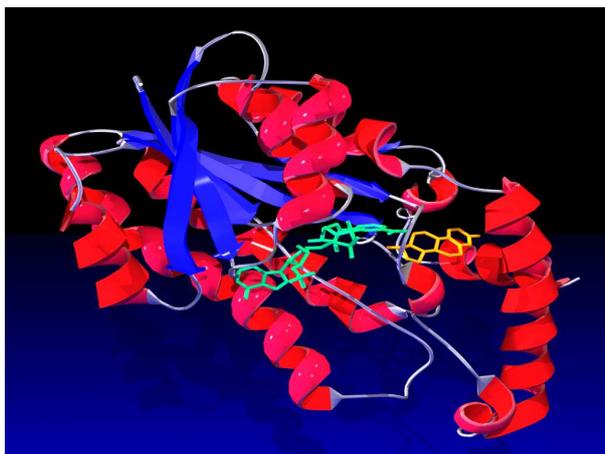
Motiv	Position	Funktion
TGxxxGxG	12-19	Cofaktor-Bindungsstelle, Aufrechterhaltung des zentralen $\beta$ -Faltblatts
D	60	Stabilisierung der Adeninring-Tasche, leichte Bindung zum Cofaktor
NNAG	86-89	Stabilisierung des zentralen $\beta$ -Faltblatts
N	111	Aktives Zentrum, Katalyse-unterstützend
S...Y...K	138, 151, 155	Aktives Zentrum
N	179	Verbindung zwischen Substrat-Bindungsstelle und aktivem Zentrum
PG	183-184	Bestimmung der Reaktionsrichtung
T	188	Bildung einer H-Brücke zum Carboxamid des Nicotinamid-Ringes

Die Position der Struktur motive in der Aminosäuresequenz ist für die bakterielle  $3\beta/17\beta$ -HSD aus *C. testosteroni* angegeben.

Obwohl ein Vergleich der Sequenzen verschiedener SDR-Enzyme lediglich eine Identität der Aminosäurereste von typischerweise 15-30 % offenbart, zeigen alle zum heutigen Zeitpunkt verfügbaren Kristallstrukturen (etwa 110 Einträge bei PDB) ein hochgradig ähnliches  $\alpha/\beta$ -Faltungsmuster in einer Ein-Domänenstruktur. Die  $\beta$ -Stränge bilden dabei ein vier- bis fünf-strängiges  $\beta$ -Faltblatt, welches auf jeder Seite von zwei bis drei  $\alpha$ -Helices umgeben ist. Dieses aus  $\beta\alpha\beta$ -Einheiten aufgebaute Dinukleotid-bindende Motiv wird als Rossmann-Faltung bezeichnet [175] (vergleiche exemplarisch Abbildung 1.2). Die Rossmann-Faltung ist innerhalb der SDR-Superfamilie sehr konserviert, toleriert aber einige Mutationen an jeder Position im Faltungsmotiv ohne Funktionsverlust [46].

Die gefalteten SDR-Monomere (durchschnittliches Molekulargewicht 27 kDA [163]) sind generell unfunktionell und zur Erlangung der enzymatischen Aktivität des SDR-Proteins ist gewöhnlich die Bildung von Dimeren oder Tetrameren erforderlich. Lediglich vereinzelte Ausnahmen sind als Monomere aktiv, als Beispiel sei an dieser Stelle die humane Carbonylreduktase des Typs 1 (hCBR1) genannt [212].

Die Oligomerisierung der einzelnen Untereinheiten kann auf zwei unterschiedliche Wege erfolgen. Eine Möglichkeit der Monomer-Assoziation ist die sogenannte P-Achsen-Verbindung, welche auf der antiparallelen Assoziation des  $\beta$ -Strangs G und der  $\alpha$ -Helix G jeder Untereinheit beruht [62]. Diese Art der Oligomerisierung findet sich gewöhnlich in homotetrameren SDRs und ist bislang lediglich in einer dimeren SDR identifiziert worden. Die Q-Achsen-Verbindung dagegen wird aus den  $\alpha$ -Helices E und F jeder Untereinheit gebildet, sie formen ein Vier-Helix-Bündel. Dieses repräsentiert das bedeutendste Strukturmotiv der Q-Achsen-Verbindung, vorrangig in dimeren SDR-Proteinen. Wenngleich mehr als die Hälfte der verfügbaren Kristallstrukturen eine überein-



**Abbildung 1.2:** Struktur der humanen  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 1, einem Mitglied der SDR-Proteinfamilie. Dargestellt sind die  $\beta$ -Stränge (blau), die  $\alpha$ -Helices (rot), das Substrat Estradiol (gelb) und der Cofaktor NADPH (grün) [135]. Die Daten gehen auf den PDB-Eintrag 1a27 zurück.

stimmende Quartärstruktur zeigen ist lediglich das Vier-Helix-Bündel unter den Mitgliedern der SDR-Proteinfamilie konserviert [62].

### Katalytische Triade und Reaktionsmechanismus der SDRs

Nahezu alle klassischen SDR-Enzyme weisen das Ser-Tyr-Lysin-Motiv (Positionen 138, 151, und 155 in der bakteriellen  $3\beta/17\beta$ -HSD aus *C. testosteroni*) als katalytische Triade auf [93]. Die Präsenz der besagten Aminosäuren ist ausschlaggebend für die enzymatische Funktionalität der SDR-Proteine, die ihr zugehörigen Reste bewahren eine definierte Position, relativ zum Gerüst der  $\beta\alpha\beta$ -Einheit und zum Sitz des Cofaktors. Das Tyrosin 151 fungiert als katalytische Base [93], seine Hydroxylgruppe ist der Protonendonator in einem elektrophilen Angriff auf die Carbonylgruppe des Substrats in einer Reduktionsreaktion [62]. Die positiv geladene Seitenkette des Lysins 155 geht zur Orientierung des Cofaktors Wasserstoffbrückenbindungen mit der Nicotinamid-Ribose ein, durch ihre Positionierung in unmittelbarer Nähe zum Sauerstoff-Atom der Tyrosin-Hydroxylgruppe begünstigt sie via elektrostatischer Wechselwirkungen den Protonentransfer [10] [16] [62]. Das Serin 138 ist ebenfalls an der Katalyse beteiligt, es stabilisiert zum einen die Reaktionsintermediate und ist darüberhinaus ein Bestandteil der Protonenübertragung [65]. Nachdem das Proton vom Tyrosin 151 auf das Substrat übertragen wurde, kann es durch die Umgebung regeneriert werden [46] [62].

In der überwiegenden Mehrheit aller SDRs ist zum aktiven Zentrum darüberhinaus ein einzelner, in der Helix  $\alpha E$  lokalisierter Asparaginrest (Asparagin 111) zu zählen, der die Triade zu einer Tetrade erweitert. Seine Seitenkette wird über Wasserstoffbrücken an nicht-konservierte Reste gebunden, es bildet sich ein Strukturmotiv, welches in der Tertiärstruktur als Knick an besagter Helix-Position erscheint. Dieser bringt das Rückgrat in eine Position, die es ihm ermöglicht eine Verbindung zum Lysin 155 des aktiven Zentrums herzustellen und anstelle der Aminogruppe des Valins 115 in der Hauptkette - dies wäre in einer helikalen Struktur zu erwarten - ein Wassermolekül zu binden [55]. SDR-Strukturen, die an Position 111 nicht über ein Asparagin verfügen, zeigen stattdessen einen

Serinrest, der die Ausbildung einer identischen Konfiguration mit einem verbindenden Wassermolekül zu Lysin 155 erlaubt [55]. Auf diese Weise wird eine Protonen-Weitergabe unter Einbeziehung der Tyrosin 151-OH-Gruppe, der 2'-OH-Gruppe der Nicotinamid-Ribose, des Lysins 155 und eines Wassermoleküls, das von Asparagin 111 oder einem homologen Serin positioniert wird, etabliert.

### Substratbindung

Die Mehrzahl der in der SDR-Proteinfamilie konservierten Aminosäuren findet sich im Kern der Rossmann-Faltung und ist vorwiegend hydrophob [46]. Im Substrat-bindenden Spalt sind lediglich die Aminosäuren der katalytischen Triade (Serin, Thyrosin und Lysin) konserviert, darüberhinaus verfügt das aktive Zentrum über keine konservierten Reste. Dies ist bezeichnend, da beispielsweise die Hydroxysteroiddehydrogenasen eine hohe Spezifität für ihre physiologischen, steroidogenen Substrate aufweisen.

Gewöhnlich besitzen SDR-Enzyme eine Substrat-bindende Schleife von mehr als 20 Resten, welche das aktive Zentrum bedeckt und nach einer Hydroxyl- oder Carbonyl-Substratbindung in sehr geregelter Form vorliegt. Die Schleife befindet sich zwischen  $\beta$ -Strang F ( $\beta$ F) und  $\alpha$ -Helix G ( $\alpha$ G) und ist in Apostrukturen der SDR-Enzyme (Strukturen ohne Substrat) oftmals ungeordnet. Nach der Bindung des Substrats zeigt die Schleife eine gut definierte, hauptsächlich  $\alpha$ -helikale Geometrie.

### 1.1.4 Substrate und metabolische Bedeutung der SDRs

Die Oxidoreduktasen der SDR-Proteinfamilie katalysieren die Umwandlung von Hydroxy- zu Keto- bzw. von Keto- zu Hydroxygruppen der verschiedensten Substrate. Im Zuge der Charakterisierung, im Speziellen der humanen Vertreter, zeigte sich, daß die Mitglieder der SDR-Enzymfamilie in der Lage sind, ein breites Spektrum an Verbindungen zu konvertieren. Sie nehmen somit entscheidende Stellungen im Aminosäure-, Fettsäure-, Gallensäure-, Prostaglandin-, Retinoid-, Steroid- und Zuckermetabolismus ein und sind in fast alle Bereiche des Intermediärstoffwechsels involviert.

#### SDR-Enzyme des Intermediärstoffwechsels

Zur Gruppe der am Intermediärstoffwechsel beteiligten SDR-Proteine sind nach heutigen Kenntnissen in erster Linie die Enzyme UDP-Galactose-Epimerase, Dihydropteridin-Reduktase, Sepiapterin-Reduktase, *R*-3-Hydroxybutyratdehydrogenase, Dienoyl-CoA-Reduktase und *trans*-Enoyl-CoA-Reduktase zu zählen [155]. Die UDP-Galactose-Epimerase katalysiert die Epimerisierung von UDP-Glucose zu UDP-Galactose oder, alternativ dazu, von UDP-*N*-Acetylglucosamin zu UDP-*N*-Acetylgalactosamin [119], die Dihydropteridin- und die Sepiapterin-Reduktase sind entscheidende Komponenten in der Tetrahydrobiopterin-Biosynthese [40]. Bei den Enzymen *R*-3-Hydroxybutyratdehydrogenase und Dienoyl-CoA-Reduktase handelt es sich um mitochondriale Proteine, die an der  $\beta$ -Oxidation und der Ketogenese beteiligt sind, die peroxisomale *trans*-Enoyl-CoA-Reduktase ist ebenfalls in den oxidativen Abbau von Fettsäuren involviert.

#### SDR-Enzyme des Hormon- und Xenobiotika-Metabolismus

Der größte Anteil an SDR-Enzymen ist durch eine Beteiligung am Lipid-vermittelten Metabolismus oder am Katabolismus von xenobiotischen Carbonyl-Verbindungen charakterisiert [156].

Die enzymatische Aktivität der besagten Proteine schließt zahlreiche Hydroxysteroiddehydrogenasen (HSDs), Prostaglandin-Dehydrogenasen sowie Retinoid-metabolisierende Enzyme ein. Aufgrund ihrer Substratspezifitäten und den von ihnen katalysierten chemischen Reaktionen, spielen die SDR-Proteine der besagten Kategorie eine essentielle Rolle in der Entwicklung und Physiologie der Vertebraten. Beispielsweise sind  $3\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen/ $\Delta 4$ -5-Isomerasen in der Biosynthese aller Arten von Steroidhormonen oder Gallensäuren unverzichtbar oder fungieren die  $11\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen als entscheidender Zelltyp-spezifischer „Schalter“ zwischen dem vom Glucocorticoid-Rezeptor gebundenen Cortisol und dem nicht-aktivierenden Metabolit Cortison. Darüberhinaus läßt die Identifizierung einiger Retinoiddehydrogenasen auf eine Beteiligung von SDR-Enzymen in Retinolsäure-abhängigen Entwicklungsprozessen sowie dem Prozess des Sehens schließen [47].

Mitunter weisen die Mitglieder der SDR-Proteinfamilie überschneidende Substratspezifitäten auf. So verfügen beispielsweise  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen oftmals auch über eine  $3\alpha$ - oder  $20\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase-Eigenschaft [160], die mikrosomale  $11\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 1 zeichnet sich u.a. durch ein katalytisches Potential gegenüber xenobiotischen Carbonylverbindungen aus [126] [156].

### 1.1.5 Medizinische Bedeutung der SDR-Proteinfamilie

Aufgrund der Verschiedenartigkeit der Substratspezifitäten und der katalysierten Reaktionen ist es nicht verwunderlich, daß Störungen in der Funktionalität der SDR-Enzyme zum Teil schwerste Erkrankungen nach sich ziehen. In der Vergangenheit konnte nahezu jede genetische Variation in einer Short-Chain-Dehydrogenase/Reduktase mit klinisch bedeutenden Symptomen in Verbindung gebracht werden. So schließt beispielsweise die Typ 3-Galactosämie zahlreiche beschriebene UDP-Galactose-Defizienzen ein, die mit allelischen Veränderungen im UDP-Galactose-Epimerase-Gen assoziiert sind [119] oder verursachen allelische Variationen im Gen der Dihydropteridin-Reduktase Phenylketonurie des Typs II. Andere SDR-Enzyme spielen bei der Entwicklung von Steroid-abhängigem Krebs [207] oder Entzündungs- bzw. degenerativen Defekten eine Rolle [134] [199] [208]. Tabelle 1.2 stellt einige der bereits erwähnten SDR-Enzyme exemplarisch zusammen und zeigt welche Krankheiten deren Dysfunktionalität zur Folge hat.

Die Tatsache, daß Defekte in Enzymen der SDR-Familie an einer Vielzahl schwerwiegender Erkrankungen beteiligt sind, macht diese zu einem interessanten Angriffspunkt im Rahmen medizinisch relevanter Studien. In den meisten Fällen handelt es sich hierbei um die Entwicklung spezifischer Inhibitoren (z.B. [45] [115]). Für die  $11\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 2 konnte beispielsweise ein sekundäres Amid als potenter und selektiver Inhibitor identifiziert werden [206], mit dessen Hilfe es möglich ist, Einfluss auf die lokale Konzentration aktiver Glucocorticoide zu nehmen.

**Tabelle 1.2:** Beispiele für humane SDR-Formen, die mit Krankheiten in Verbindung gebracht werden

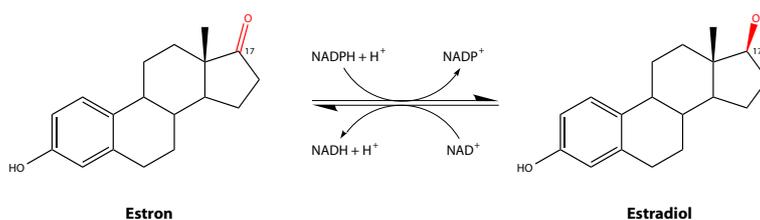
SDR	Assoziierte(s) Erkrankung/Syndrom
Dienoyl-CoA-Reduktase	Dienoyl-CoA-Reduktase-Defizienz
Dihydropteridin-Reduktase	Dihydropteridin-Reduktase-Defizienz, Phenylketonurie
Sepiapterin-Reduktase	Tetrahydrobiopterin-Defizienz
UDP-Galactose-Epimerase	Typ 3-Galactosämie
3 $\beta$ -HSD 1	Adrenale Hyperplasie
3 $\beta$ -HSD 2	Adrenogenitales Syndrom
11 $\beta$ -HSD 1	Metabolisches Syndrom
11 $\beta$ -HSD 2	„Apparent mineralocorticoid excess“-Syndrom
17 $\beta$ -HSD 1	Brust-/Prostatakrebs, Endometriose
17 $\beta$ -HSD 2	Brust-/Prostatakrebs, Endometriose
17 $\beta$ -HSD 3	Pseudohermaphroditismus, Fettsucht
17 $\beta$ -HSD 4	„D-specific bifunctional protein deficiency“, Prostatakrebs
17 $\beta$ -HSD 8	Polyzystische Nierenerkrankung
17 $\beta$ -HSD 10	Demenz, Alzheimer
17 $\beta$ -HSD 14	Brustkrebs
9cis/11cis-RDH	Retinis punctata albescens/Retinis pigmentosa
CBR1	Down-Syndrom
CBR3	Down-Syndrom

### 1.1.6 Vorstellung einiger bedeutender Mitglieder der SDR-Proteinfamilie

#### Steroid-metabolisierende Enzyme der SDR-Proteinfamilie - Die 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen

Der finale Schritt im Zuge der Generierung biologisch aktiver Steroide wird durch 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen katalysiert [162], Enzyme, die fast ausschließlich der Familie der Short-Chain-Dehydrogenase/Reduktasen zuzuordnen sind. Sie katalysieren die Cofaktor (NAD(P) bzw. NAD(P)H) abhängige Oxidation oder Reduktion an Position 17 des Steroidgerüsts (vergleiche Abbildung 1.3) und gliedern sich somit perfekt in das Konzept der Prä-Rezeptor-Regulation hormoneller Wirkung ein [164]. In ihrer Funktion als metabolischer „Schalter“ verändern sie auf effektive Weise die Affinität der Steroide zu ihren genomischen und nicht-genomischen Rezeptoren und Effektoren.

Bis heute sind in Vertebraten vierzehn Enzyme mit 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase-Aktivität identifiziert worden, der Mensch verfügt über zwölf von ihnen, die 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen des Typs 6 und 9 wurden lediglich in Nagetieren nachgewiesen. Mit Ausnahme der 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 5, ein Vertreter der Aldo-Keto-Reduktase-Familie [84] [135] [163], handelt es sich bei allen 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen um Mitglieder der SDR-Proteinfamilie. Sie entstammen unterschiedlichen Genen, variieren deutlich in ihrer Affinität zu Substraten und Cofaktoren, offenbaren verschiedene subzelluläre Lokalisationen und katalysieren unterschiedliche Reaktionsrichtungen [134] [161] [209]. Meier et al. liefert einen Überblick über die Beteiligung der diversen 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen in der Endokrinologie des Menschen



**Abbildung 1.3:** Redox-Reaktion an Position 17 des Steroidgerüsts, katalysiert durch  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen. Die dargestellte Konvertierung von Estron zu Estradiol ist ein Beispiel zur Illustrierung des stereospezifischen Charakters der Reaktion. Generell dient den  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen NADPH als bevorzugter Cofaktor zur Katalyse der Reduktion während NAD in der Oxidationsreaktion verwendet wird.

und ihre Assoziationen zu verschiedensten Erkrankungen [129] (siehe auch Tabelle 1.2). Die Identität der Enzyme basiert auf Analysen hinsichtlich ihrer Aktivität, der Zuordnung zu bestimmten Genen sowie der Chronologie ihrer Entdeckung.

Wenngleich vierzehn Typen der  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen bekannt sind, so sind nicht alle ausschließlich am Steroidmetabolismus beteiligt. Die  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen des Typs 1, 2 und 3, die Schlüsselenzyme in der Homeostase der Steroidhormone, werden bislang ausschließlich hinsichtlich einer exklusiven Rolle im Steroidmetabolismus diskutiert, aus Tiermodellen gewonnene Daten geben allerdings Anlaß dies in Frage zu stellen. Die Typen 6, 9 und 11 zeigen eine Aktivität in der Umwandlung von Retinoiden [19] [22] [192], Typ 13 scheint phylogenetisch den Retinoldehydrogenasen verwandt [15], publiziert wurde bis dato allerdings lediglich eine Assoziation mit Lipidvakuolen [80]. Den Typen 4, 8 und 12 konnte mehrfach eine Beteiligung am Fettsäure- oder Gallensäure-Stoffwechsel nachgewiesen werden [135] [137] [168]. Die  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 10 verfügt über ein breites Spektrum an potentiellen Substraten, hierzu zählen beispielsweise Isoleucin sowie Fett- und Gallensäuren [183].

**Erkrankungen und  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen.** Die molekulare Grundlage zahlreicher menschlicher Erkrankungen ist die Veränderung der genetischen Organisation in für  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen kodierenden Genen. Inaktivierende Mutationen in den Genen HSD17B3 und HSD17B4 verursachen Pseudohermaphroditismus und postnatal tödliche „D-specific bifunctional protein deficiency“. Duplikationen im HSD17B10-Gen führen zu Schwachsinn, das entsprechende Enzym wurde bereits mit der Alzheimer-Erkrankung in Verbindung gebracht. In einigen Fällen ist der Verlust der Heterozygotie, beispielsweise hervorgerufen durch eine Deletion eines Chromosomenabschnitts am Locus 16q [49], entscheidend mit dem Voranschreiten von Prostatakrebs assoziiert.

Studien hinsichtlich einer Beteiligung am Steroidmetabolismus werden bereits seit den 70er-Jahren durchgeführt [172]. Das Konzept der *in situ*-Produktion von aktiven Steroiden aus zirkulierenden Vorstufen wie Dehydroepiandrosteron (oder seines Sulfats) resultierte in der Definition der „Intrakrinologie“ [107]. Lokal produzierte Steroide werden als bedeutende Wachstumsfaktoren betrachtet [177], auch in Tumoren mit scheinbar Androgen-unabhängigem Status [189]. Einige  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen haben bereits einen prognostischen Wert in den verschiedensten Formen der Krebserkrankung. Hohe Expression der  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen des

Typs 1, 2 und 4 korrelieren mit schlechten Prognosen bezüglich Brust-, Kolon- und Prostata-Tumoren [69] [147] [148]. Gute prognostische Werte für Brustkrebs werden bei einer hohen Expression der  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 14 beobachtet [90].

### **Inhibition der $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase-Aktivität zur therapeutischen Intervention.**

Im Zuge der Anstrengungen, Mittel und Wege zu finden, die Prä-Rezeptor-vermittelte Wirkung von Steroidhormonen zu beeinflussen, sind einige  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen, z.B. die Typen 1, 3 und 5, in den Fokus der Entwicklung therapeutischer Inhibitoren gerückt [26] [27] [169]. Speziell im Kampf gegen Brust- oder Prostata-Krebs konzentrierten sich die wissenschaftlichen Bemühungen auf die Generierung sicherer und  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase-spezifischer Medikamente [111] [196]. Generell muß beim Design von Inhibitoren in Betracht gezogen werden, daß die Aktivierung und Inaktivierung von Steroidhormonen stets von unterschiedlichen Enzymen bewerkstelligt wird, beispielsweise synthetisiert die  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 1 Estradiol aus Estron während die  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 2 die Umkehrreaktion katalysiert. Folglich hat ein wirkungsvoller Inhibitor hochgradig Enzym-spezifisch zu sein um das Level an Steroiden erfolgreich an die therapeutisch erforderlichen Bedingungen anzupassen.

Unter den natürlich vorkommenden Substanzen sind die Phytoestrogene die potentesten Inhibitoren der  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen [2] [139]. Unglücklicherweise sind diese allerdings weitestgehend unspezifisch [38] und haben einen Einfluß auf alle Arten der SDRs oder andere Enzyme wie z.B. Kinasen. Bereits in der Vergangenheit wurde versucht, hoch-spezifische Inhibitoren für die  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 1 synthetisch zu generieren. Strategien der Inhibitor-Entwicklung umfassten Modifikationen des Steroidgerüsts an den Positionen 6, 16 oder 17 [4] [170] [200] oder die Substitution mittels Sulfamaten [171] oder Fluor [39]. Auch Hybrid-Inhibitoren, beispielsweise eine Verknüpfung von Estradiol mit Adenosin [18], wurden ebenso beschrieben wie nicht-steroidogene Inhibitoren der  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen des Typs 1 [25] und 2 [68].

Wenngleich die bislang entwickelten Inhibitoren noch nicht die Spezifität für eine therapeutische Intervention erreicht haben und weiterhin der Verbesserung bedürfen, so können sie zumindest der Forschung als wertvolles Hilfsmittel dienen. Alternativ zur Inhibition werden Versuche unternommen, die Aktivität der  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen unter Verwendung der RNAi-Technologie zu beeinflussen. RNA-Interferenz erlaubt die selektive und transiente Manipulation von Stoffwechselwegen aber auch von Prozessen, die an der Tumorentwicklung beteiligt sind. Unter den  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen sind zwei Anwendungen bezeichnend für das Potential dieser Methodik. Durch die selektive Herunterregulierung der  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 7 konnte deren vorherrschende Rolle in der Cholesterol-Biosynthese - nicht wie zunächst angenommen in der Estradiol-Biosynthese - demonstriert werden [67]. Im Disput über die Beteiligung der  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen des Typs 1 und 12 konnte das Hauptargument durch die eleganten Studien in Brustkrebs-Zelllinien geliefert werden [37]. Wenngleich die  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 12 in besagten Zellen hoch exprimiert ist, korrelierten lediglich die siRNA-vermittelten Variationen im Expressionslevel der  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 1 mit der Bildung von Estradiol.

### Carbonylreduzierende Enzyme in der SDR-Proteinfamilie

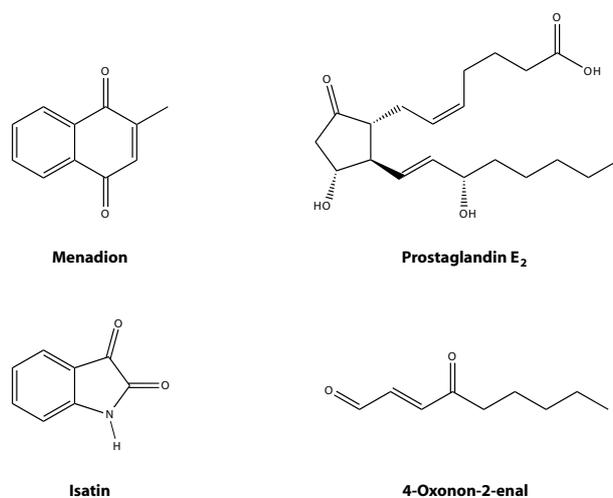
Metabolische Reduktion ist das Gegenstück zu oxidativen Stoffwechselwegen und spielt eine bedeutende Rolle im Phase I-Metabolismus Carbonylgruppen-tragender Substanzen. Unter Carbonylreduktion versteht man die Bildung einer Hydroxygruppe aus einem reaktiven Aldehyd- oder Ketonrest. Sie dient grundsätzlich der Inaktivierung oder Entgiftung, da der resultierende Alkohol leichter zu konjugieren und zu eliminieren ist [77]. Carbonyl-tragende Verbindungen sind nicht lediglich in der Umgebung weit verbreitet und in der Lage als Xenobiotika oder Verschmutzung in den Organismus einzudringen, sie können ebenso endogen durch normale katabolische Oxidation oder Desaminierung generiert werden. Zahlreiche endogene Verbindungen, wie biogene Amine, Steroide, Prostaglandine und andere Hormone werden über Carbonyl-Intermediate metabolisiert [77]. Bei den an ihrer Verwertung beteiligten Enzymen handelt es sich um NADPH-abhängige Reduktasen, die sich generell durch ein breites Substratspektrum auszeichnen. Bislang sind im Menschen zwölf pluripotente Carbonyl-reduzierende Enzyme bekannt, neben Vertretern der Aldo-Keto-Reduktase-Familie zählen auch Mitglieder der SDR-Proteinfamilie zu dieser Enzymgruppe. Im einzelnen sind dies 11 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 1, dehydrogenase/reductase (SDR family) member 4 (DHRS4), L-Xylulose-Reduktase und die sogenannten Carbonylreduktasen, denen bislang drei humane Enzyme zugeordnet werden (CBR1, CBR3 und CBR4) [127].

**Die humane Carbonylreduktase des Typs 1 (CBR1).** Die humane Carbonylreduktase des Typs 1 ist ein cytosolisches und monomeres (30 kDa) Mitglied der SDR-Proteinfamilie [59] [213] [215]. Das Enzym zeigt ein weitestgehend ubiquitäres Expressionsmuster mit einer vorherrschenden Verteilung in Leber, Epidermis, Magen, Dünndarm, Niere, Nerven- und Gliazellen des ZNS sowie in glatten Muskelfasern [59] [215]. Die erste Isolierung CBR1s erfolgte aus Gehirngewebe, aufgrund der im Zuge dessen bestimmten Eigenschaften des Enzyms wurde zunächst u.a. eine Identität mit der Prostaglandin-9-Ketoreduktase vorgeschlagen [212]. Heute ist bekannt, daß die Carbonylreduktase des Typs 1 die NADPH-abhängige Reduktion zahlreicher Carbonyl-Verbindungen katalysiert, die besten Substrate scheinen hierbei die aus polyzyklischen, aromatischen Kohlenwasserstoffen abgeleiteten *p*- und *o*-Chinone zu sein [212] [214]. In der Leber und der Plazenta des Menschen fungiert CBR1 als wichtigste Chinon-Reduktase, allerdings resultiert die enzymatische Reduktion von *o*-Chinonen im sogenannten „Redox cycling“, das die Generierung von Semichinonen und Superoxid-Anionen zur Folge hat [91]. CBR1 scheint somit an der „Entgiftung“ als auch an der „Vergiftung“ von Chinonen beteiligt zu sein.

Als endogene Substrate des Enzyms wurden Prostaglandine, einige 3-Ketosteroide sowie Isatin vorgeschlagen, wobei Isatin mit einer Affinität, die den *o*-Chinonen gleicht, das beste Substrat zu sein scheint [204]. Darüberhinaus katalysiert CBR1 die Reduktion von 4-Oxonon-2-enal, einem Produkt der Lipid-Peroxidation [42] (vergleiche Abbildung 1.4).

Neben den genannten Substraten reduziert humanes CBR1 auch zahlreiche therapeutisch und toxiologisch bedeutende Verbindungen [127]. Hierzu zählt Daunorubicin, ein Medikament, das die Reifung und Proliferation von Neoplasma zu hemmen vermag. Da dessen reduziertes Produkt nachgewiesenermaßen herzscheidend ist, wird CBR1 für die mit einer Daunorubicin-Behandlung einhergehende starke Kardiotoxizität verantwortlich gemacht [59].

Da für das CBR1-Allel homozygote KnockOut-Mäuse nicht lebensfähig sind [152], wurde eine nicht-redundante Rolle des Enzyms in der Signaltransduktion während der Embryogenese und der Ent-



**Abbildung 1.4:** Auswahl an Substraten, die von der humanen Carbonylreduktase des Typs 1 umgesetzt werden. Während es sich beim umgesetzten Menadion um ein synthetisch hergestelltes Modellchinon handelt, sind sowohl Prostaglandin E<sub>2</sub> als auch Isatin und 4-Oxonon-2-enal endogene Substrate des humanen Enzyms CBR1.

wicklung vorgeschlagen. Eine Studie der biologischen Funktion von CBR1 in einer Adenokarzinom-Zelllinie deutete auf eine Beteiligung am apoptotischen Prozess dieser Zellen hin [195]. Im Gegensatz dazu zeigten weitere Studien, daß eine Herunterregulierung der CBR1-Expression mit schlechten Überlebensraten und Lymph-Knoten-Metastasierungen bei Eierstockkrebs [203] und dem Wachstum von Lungenkrebstumoren korreliert ist [193].

**Die humane Carbonylreduktase des Typs 3 (CBR3).** Auf der Suche nach Genen, die am Down-Syndrom beteiligt sind, wurde 1998 eine neue Carbonylreduktase identifiziert, die seitdem unter der Bezeichnung CBR3 in den Datenbanken geführt wird [211] (siehe auch Tabelle 1.2). Das CBR3-Gen ist 62 kb downstream des CBR1-Gens auf Chromosom 21 lokalisiert, seine genomische Struktur unterscheidet sich lediglich in den Introns und den umgebenden Regionen, nicht aber in den drei Exons von der des benachbarten CBR1-Gens. Vergleiche der kodierenden Sequenzen offenbarten 71 % Aminosäure-Übereinstimmung, im Zuge dessen wurde CBR3 ebenfalls als monomere NADPH-abhängige Oxidoreduktase klassifiziert. Hinsichtlich der katalytischen Eigenschaften konnte bislang allerdings lediglich eine Aktivität des Enzyms gegenüber dem Modellchinon Menadion nachgewiesen werden [108]. Auch eine vorwiegend unter der afroamerikanischen Bevölkerung identifizierte, natürliche Allelvariante (V244M) zeigte hier ein enzymatisches Potential, der Polymorphismus beeinflusst jedoch die katalytischen Eigenschaften CBR3s. Ein im Chinesischen Hamster identifiziertes CBR3-Paralog - die Sequenzidentität zum humanen Enzym beträgt 86 % - zeigte eine im Vergleich zum humanen CBR3 hohe Aktivität gegenüber Daunorubicin sowie Isatin, offenbarte allerdings keine Oxidoreduktase-Eigenschaft gegenüber Prostaglandinen [197]. Angelehnt an das Expressionsprofil CBR1s wird auch für CBR3 eine ubiquitäre Gewebeverteilung vorgeschlagen, das Level der Expression scheint aber deutlich geringer zu sein [127]. Microarray-Analysen wiesen eine einheitliche Hochregulierung CBR3s in Narbengeschwürgewebe nach [140].

## **Eine SDR als Tumorsuppressor - Die Oxidoreduktase WWOX**

Bednarek et al. klonierten und beschrieben im Jahre 2000 ein Gen, das innerhalb der „Common Fragile Site (CFS)“ FRA16D auf Chromosom 16q23.3-24.1 lokalisiert ist [14]. Das WWOX-Gen besteht aus neun Exons und kodiert ein 46 kDa-Protein, das über zwei N-terminale WW-Domänen und eine SDR-Domäne verfügt. WW-Domänen sind gekennzeichnet durch die Präsenz von hochkonservierten Prolin- und Tryptophan-Resten [21], zusammen mit SH3-Domänen dienen sie der Interaktion mit Prolin-reichen Liganden und vermitteln somit Protein-Protein-Wechselwirkungen [86] [120].

WWOX interagiert über seine erste WW-Domäne mit dem PPPY-Motiv von p73 [7]. Das p73-Protein ist ein strukturelles und funktionelles Homolog zum Tumor-Suppressor-Protein p53 [95]. Neben seiner Fähigkeit der Erkennung und Bindung von p53-Response-Elementen ist es wie p53 in der Lage die Transkription von Zielgenen zu aktivieren. WWOX ist im Cytosol lokalisiert, seine Überexpression erhöht die proapoptotische Aktivität von p73 [7]. Es ist wahrscheinlich, daß der Verlust von WWOX in Tumorzellen eine reduzierte proapoptotische Wirkung von p73 im Cytoplasma zur Folge hat. Interessanterweise bindet humanes WWOX nicht den Tumor-Suppressor p53, während sein murines Ortholog, Wox1 (in dieser Arbeit im Folgenden Wwox) unter Stressbedingungen sowohl mit p53 als auch mit Jnk1 wechselwirkt. Wox1 interagiert synergistisch auch im Zuge der TNF-vermittelten Apoptose mit p53, diese proapoptotische Funktion wird durch die Wechselwirkung mit JNK negativ reguliert [30].

Neben der Interaktion zu p73 und einer weiteren zu ErbB4, einem Brustkrebs-Onkogen, konnte WWOX eine funktionelle Assoziation zu AP-2 $\lambda$  nachgewiesen werden [6]. AP-2 $\lambda$  kodiert einen Transkriptionsfaktor, der häufig bei Brustkrebs-Karzinomen identifiziert wird. WWOX bindet wiederum über seine erste WW-Domäne an das PPPY-Motiv von AP-2 $\lambda$ . Seine Expression löst die Umverteilung des nukleären Transkriptionsfaktors in das Cytoplasma der Zelle aus und unterdrückt somit dessen transaktivierende Funktion. Es wird vorgeschlagen, daß das WWOX-Protein die onkogene Aktivität AP-2 $\lambda$ s durch dessen Bindung im Cytosol inhibiert.

Eine nicht zu detektierende Expression von WWOX oder die Präsenz abweichender Transkripte konnte in verschiedensten Krebsarten festgestellt werden [75]. Die häufige Deletion von WWOX in multiplen Tumoren deutet auf dessen Wirkung als Tumor-Suppressor-Gen hin. Diese These wird unterstützt von der Feststellung, daß eine experimentelle Überexpression von WWOX in Krebszellen, die das Protein endogen nicht exprimieren, zur signifikanten Wachstumshemmung und zur Verhinderung der Tumorentwicklung führt [13] [52]. Des weiteren konnte gezeigt werden, daß die Wiederherstellung der WWOX-Expression in Krebszellen in Caspase-vermittelter Apoptose resultiert [52].

Während die Funktion der WW-Domäne weitestgehend geklärt zu sein scheint und dem WWOX-Protein den Status als Tumor-Suppressor einbrachte, so ist das Protein hinsichtlich seiner Eigenschaften als Mitglied der SDR-Proteinfamilie bislang nicht umfangreich untersucht worden. Zwar konnten die SDR-typischen Struktur motive in der Aminosäuresequenz eindeutig identifiziert werden, eine biologische Funktion konnte mit ihnen allerdings bisher nicht in Verbindung gebracht werden.

## 1.2 Ziel der Arbeit

Die Familie der Short-Chain-Dehydrogenasen/Reduktasen (SDRs) bildet eine große und für die Medizin bedeutende Proteinfamilie. Ihre Mitglieder nehmen Schlüsselstellungen in den unterschiedlichsten Stoffwechselwegen ein und ihre Fehlfunktionen sind nicht selten mit schweren Krankheitsbildern assoziiert. Im Zuge dessen ist es mehr als wahrscheinlich, daß viele Erkrankungen, deren Ursachen bisher unbekannt sind, durch Funktionsstörungen noch unidentifizierter SDRs hervorgerufen werden. Diese Doktorarbeit hat sich zum Ziel gesetzt, einige bislang nicht eingehender untersuchte Mitglieder der SDR-Familie umfassend funktionell zu charakterisieren und auf ihre Verbindung zu Stoffwechseldefekten zu überprüfen.

Im Mittelpunkt stand dabei die Identifizierung und zellbiologische sowie biochemische Beschreibung neuer, gänzlich uncharakterisierter SDR-Proteine. Durch die Kombination von zahlreichen bioinformatischen und experimentellen Untersuchungen zur Aufklärung von Verwandtschaftsverhältnissen, subzellulärer Lokalisation, Gewebeverteilung, Substratspezifität sowie proteomischer Wechselwirkungen der ausgewählten Kandidaten, sollte schlußendlich deren Rolle im Stoffwechsel verifiziert und ein entscheidender Beitrag zum generell besseren Verständnis der metabolischen Prozesse im Organismus geleistet werden.

Neben der Charakterisierung bislang unerforschter Mitglieder der SDR-Proteinfamilie sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein bereits teilweise beschriebenes SDR-Enzym, das murine Protein „WW domain-containing oxidoreductase“ (Wwox), eingehender untersucht werden. Zur detaillierten Bestimmung der *in vivo*-Funktion des Proteins von Interesse mit besonderem Fokus auf den durch die vorhandene SDR-Domäne vermittelten zellulären Prozessen wurde zunächst die Etablierung einer entsprechenden Mausmutante angestrebt. Durch die Charakterisierung einer Wwox-KnockOut-Maus sollte gezeigt werden, welche nichtredundanten Aufgaben das Protein *in vivo* erfüllt bzw. welche biochemischen Defekte durch sein Fehlen hervorgerufen werden. Die umfassende Phänotypisierung der Tiere sollte schlußendlich Rückschlüsse auf humanmedizinische Syndrome erlauben.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Einleitende Worte

Vorliegende Doktorarbeit hatte sich zur Aufgabe gemacht, neue, unter Umständen für den Intermediärstoffwechsel bedeutende Mitglieder der SDR-Proteinfamilie umfassend zu charakterisieren. In zwei voneinander unabhängigen Teilprojekten sollte zum einen die enzymatische und zellbiologische Funktion bisher lediglich in Sequenzdatenbanken hinterlegter Proteine ermittelt, zum anderen ein bereits partiell untersuchtes SDR-Enzym, die murine Oxidoreduktase Wwox, eingehender untersucht werden.

Das Kapitel „**Charakterisierung neuer Mitglieder der SDR-Proteinfamilie**“ befasst sich mit den Ergebnissen, die aus den Untersuchungen der bislang funktionell gänzlich uncharakterisierten Enzyme hervorgegangen sind. Nach Darlegung des bioinformatischen Prozesses zur Auswahl der zu behandelnden SDR-Kandidaten und ihrer, mittels phylogenetischer Analysen ermittelten Verwandtschaftsverhältnisse, beschreibt es im Detail - zum besseren Überblick, methodisch gegliedert - die experimentelle Verifizierung der subzellulären Lokalisation, der Gewebeverteilung und der Substratspezifität der Proteine von Interesse. Darüberhinaus gibt es die im Zuge der Expression und Aufreinigung sowie der Studien zur Identifizierung von Interaktionspartnern erzielten Resultate wieder. Der Übersichtlichkeit wegen findet sich eine kurze Zusammenfassung der jeweiligen Ergebnisse am Ende jedes Unterabschnitts.

Die durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich der angestrebten, detaillierten Aufklärung der *in vivo*-Funktion des bereits teilweise charakterisierten murinen Wwox-Proteins (WW domain-containing oxidoreductase) werden im Kapitel „**Charakterisierung der Wwox-Funktion anhand der entsprechenden Mausmutante**“ besprochen. Im Vordergrund steht hierbei die Darstellung der Ergebnisse, die im Rahmen der Etablierung der entsprechenden Mauslinie, von der Entwicklung einer verlässlichen Genotypisierungsstrategie bis hin zur Embryopräparation, durchgeführt mit dem Ziel für das Wwox-Allel homozygote Mäuse (Knock-Out-Maus) zu identifizieren, erzielt wurden. Ferner werden erste Resultate, hervorgegangen aus einer phänotypischen Untersuchung von Nachkommen der etablierten Wwox-Mauslinie, dargelegt. Zum Abschluß des Kapitels erfolgt erneut eine knappe Zusammenfassung der gewonnenen Ergebnisse.

## 2.2 Charakterisierung neuer Mitglieder der SDR-Proteinfamilie

### 2.2.1 Auswahl der zu untersuchenden SDR-Kandidaten

Die Short-Chain-Dehydrogenasen/Reduktasen (SDRs) bilden, wie bereits ausführlich unter 1.1 erläutert, eine große und bedeutende Enzymfamilie. Bis zum heutigen Tag sind etwa 4000 ihr zugehörige Aminosäuresequenzen in Datenbanken hinterlegt, eine umfassende Charakterisierung allerdings wurde lediglich für einen Bruchteil ihrer Mitglieder publiziert. Da sich vorliegende Arbeit zum Ziel gesetzt hat, einige bislang nicht eingehender untersuchte Mitglieder der SDR-Familie umfassend funktionell zu charakterisieren und auf ihre mögliche Verbindung zu Erkrankungen zu überprüfen, waren zunächst neue, die typischen SDR-Struktur motive aufweisende Primärstrukturen zu identifizieren und daraus, für die folgende detaillierte Analyse, eine Auswahl interessanter Proteine zu treffen. Die Selektion der Kandidaten stützte sich dabei im Wesentlichen auf vorbereitende Studien, durchgeführt von Frau Dr. Brigitte Keller [102] und Frau Dr. Rebekka Mindnich [132] (Helmholtz Zentrum München), und eigene phylogenetische Sequenzanalysen.

#### Ergebnisse des SDR-Finders dienen als Fundament der Selektion

Die Identifizierung neuer, uncharakterisierter Mitglieder der SDR-Proteinfamilie wurde von Frau Dr. Brigitte Keller im Rahmen ihrer Doktorarbeit realisiert [102]. Durch Prüfung der in Datenbanken hinterlegten Proteinprimärstrukturen auf typische SDR-Struktur motive unter Verwendung der Software SDR-Finder (BioNetWorks GmbH) konnten zunächst 94 Enzyme aus den Spezies Mensch, Maus und Ratte der Superfamilie der Short-Chain-Dehydrogenasen/Reduktasen zugeordnet werden. Nach Ausschluß von fälschlich als SDR-Enzym klassifizierten und bereits charakterisierten oder redundant identifizierten Proteinen verblieben 38 SDRs für eine potentielle Charakterisierung, von denen schließlich zwölf (vergleiche Tabelle 2.1) zur ausschließlichen Bearbeitung in dieser Doktorarbeit zur Verfügung gestellt wurden. Eine detaillierte Beschreibung des Identifizierungsverfahrens ist der Doktorarbeit von Frau Dr. Brigitte Keller zu entnehmen [102].

#### Überprüfung der getroffenen Vorauswahl auf Zugehörigkeit zur SDR-Superfamilie

Proteine bestehen im Allgemeinen aus einer oder mehreren funktionellen Einheiten, die man als Domänen bezeichnet. Ihre unterschiedliche Kombination ist Ursache für die große Diversität der Proteine in der Natur, ihre Identifizierung macht die Zuordnung zu bestimmten Proteinfamilien möglich und erlaubt es darüber hinaus, Rückschlüsse auf die Funktion der sie beherbergenden Proteine zu ziehen. Auch die Superfamilie der SDRs zeichnet sich durch das Auftreten von charakteristischen funktionellen Einheiten aus. In ihnen sind die beschriebenen Struktur motive, verantwortlich beispielsweise für Bindung von Substrat oder Cofaktor, zusammengefasst. Unter Verwendung der Datenbank Pfam (Wellcome Trust Sanger Institut) wurden die zwölf vorab ausgewählten Proteinsequenzen auf diese überprüft (Pfam-Identifizierung: adh\_short) und somit ihre Zugehörigkeit zu den Short-Chain Dehydrogenasen/Reduktasen abgesichert. Die erzielten Ergebnisse sind aus Tabelle 2.1 ersichtlich.

Abgesehen von den Proteinsequenzen BAB27025.1 (keine Domäne identifiziert), XP\_145308.2 (2-Hydroxysäure-Dehydrogenase-Domäne), AAH47501.1 (Zinkfinger-Domäne) und AAO15022.1 (Immunoglobulin V-set Domäne) konnte allen analysierten Primärstrukturen eine Zugehörigkeit

**Tabelle 2.1:** Identifizierung von Protein-Domänen zur Einordnung in die SDR-Superfamilie

Protein-ID	Name	Spezies	Chromosomale Position	identifizierte Domäne	SDR
NP_663399.1	Cradl	Maus	10D3	adh_short	ja
BAB27025.1	unnamed protein product	Maus	7B2	—	nein
NP_067532.2	RDH11	Maus	12C3	adh_short	ja
XP_284259.1	RIKEN cDNA 8430425D21	Maus	7A1	adh_short	ja
XP_143618.2	Sdr9	Maus	4A1	adh_short	ja
XP_134689.3	similar to Rdh8 [Rind]	Maus	9A3	adh_short	ja
XP_145308.2	similar to GAPDH [Ratte]	Maus	7A1	2-Hacid_dh	nein
NP_035433.1	DHRS3, retSDR1	Maus	4E1	adh_short	ja
NP_612461.1	DHRS1, FLJ25430	Mensch	14q11.2	adh_short	ja
AAH47501.1	ZNF329, FLJ12586	Mensch	19q13.43	zf-C2H2	nein
AAO15022.1	TREML2, FLJ13693	Mensch	16p21.1	V-set	nein
AAH21973.1	CBR4, FLJ14431	Mensch	4q32.3	adh_short	ja

zur Familie der Short-Chain-Dehydrogenasen/Reduktasen nachgewiesen werden. Eine manuelle Identifizierung der typischen konservierten SDR-Motive TGxxxGxG, D, NNAG, N, S-Y-K, N, PG und T durch Sequenz-Alignment bestätigte die durch PFAM-Analyse gewonnenen Resultate (vergleiche Abbildung 2.1). Die acht verbleibenden Proteine wurden weiter für eine mögliche Charakterisierung in Betracht gezogen.

### Endgültige Auswahl zu untersuchender SDR-Kandidaten durch phylogenetische Analysen

Die angestrebte umfassende Charakterisierung einzelner neuer Mitglieder der SDR-Proteinfamilie erforderte die weitere Einschränkung der zu untersuchenden Kandidaten. Diese erfolgte in erster Linie durch die Auswertung durchgeführter phylogenetischer Analysen. Zur Ermittlung ihrer Verwandtschaftsverhältnisse wurden zunächst umfangreiche Datensätze durch das Abrufen von den Kandidatenproteinen verwandten Sequenzen (annotiert in der NCBI-Datenbank) erstellt. Hierzu wurde der auf der entsprechenden Webseite verfügbare BLINK-Link verwendet. Erhaltene Sequenzen wurden nach der Qualität des Alignments mit der Kandidatensequenz ausgewählt (etwa jeweils 100), zumeist handelte es sich hierbei um metazoische Sequenzen, protozoische Primärstrukturen wurden nur in einigen Fällen in die Berechnungen einbezogen. Benötigte multiple Alignments wurden mittels des clustalW-Servers erstellt, die Berechnung der phylogenetischen Bäume erfolgte nach Aussonderung redundanter Sequenzen mittels der Software MEGA v.3.1 bzw. v.4.1 nach der Neighbor-Joining-Methode. Zum Test der Phylogenie wurde ein Bootstrapping mit 500 bzw. 1000 Wiederholungen gewählt.

Nach eingehender Begutachtung der errechneten Stammbäume wurde die vorerst endgültige Auswahl der in dieser Arbeit sowohl bioinformatisch als auch experimentell zu untersuchenden SDR-Proteine getroffen. Einige potentielle Kandidaten zeigten eine enge Verwandtschaft zur Familie der Retinoldehydrogenasen (Abbildungen nicht gezeigt). Diese wurden hinsichtlich einer Charakterisierung nicht weiter berücksichtigt, da besagte Enzymfamilie bereits seit vielen Jahren umfassend und

## 2 Ergebnisse

NP_663399.1	-----MWLYMVALLGLWMLLRFFRERQVVDHLQDKYVFI	36
BAB27025.1	-----	
NP_067532.2	-----MFGFLLLSLSPFLLYLVTPIKIRKMLSSGVCTSNVQLPGKVAIV	45
XP_284259.1	-----MSRFLLPVSVVGTVIGGTVLLKDYVAGGACPSKATIPGKTVIV	45
XP_143618.2	NPDVYASKGVCQNMSONLESVKNLLVFLGKSLLSVLEALLFHVISKPRKNVAGEIVLI	120
XP_134689.3	-----MASQQRITVLIS	12
XP_145308.2	-----MAFANLSKVLISDSLEPCCRKILQDGGLOVVEKQNLKSKKELTAELODCEGIIVRS	55
NP_035433.1	-----MVWKWLGALVVPFLQMIYLVTKAAVGMVLPKLRDLSRESVLI	45
NP_612461.1	-----MAAPMNGQVCVV	14
AAH47501.1	ALTLLEKPGTQEAICEYPGFGEHLTASSDLPPSQRVLATNGFHAPDSNVSGLCDPALPSY	110
AAO15022.1	-----MAPAFLLLLLWPQGCVSGPSADSVYTK	28
AAH21973.1	-----MDKVCVAVF	9
<b>SDR-Motive</b>	<b>TC</b>	
NP_663399.1	CGSGFNLLARQLDRRGMRLVLAACRKEEGAEELRRKTS-----ERLETVIL	91
BAB27025.1	---MTKALALDESRHGVRVNCISPGNIWTF-----	27
NP_067532.2	ANTGKGTAKDLAQRGARVYLACRDVDKGELAAREIQAVTGNVQVFRKLDLADTKSIR	105
XP_284259.1	ANTGKQTALELAKRGNVILACRDMEKCEVAAKDIRGETLNPRVRAERLDLALSKSIR	105
XP_143618.2	AGSGRLRLALQFARLGA-VLVLWVDVKNKEANDETHQLAREAGAARVHAYTC	179
XP_134689.3	CSSGILELALQLAHDPRQRYQVATMRDLGKKEPLEAAAGEALGKTLISVVL	72
XP_145308.2	ATKVTAVVINAEEKLQAVGRASTGVDNVVAEAMARKDILVMNTPNANSISAAEPTFAASF	115
NP_035433.1	GGRGIRHLAREFAERGARKIVLWGRTEKCLKETTEEIRQMG-TECHYFIC	104
NP_612461.1	ASRGIQRGALQLCKAGATVYITGRHLDTLRVVAQEAQSLGG--QCVPVVC	72
AAH47501.1	PKSYADKRTGDNDCAGKGFNHSMEVIHGRNPVREKPKYKYPESVKSFNHFTSLGHQKIMKR	170
AAO15022.1	VRLEGETLSVQCSYKQVKNRVEGKVVCKIRKKCEPGFARVWVKGPRLYLQDDAQAKVV	88
AAH21973.1	GSRGIRAVAQLMARKGYRLAVIARNLEGAKAAAGDLG-----GDHLAFSC	64
<b>SDR-Motive</b>	<b>xxxGxG D</b>	
NP_663399.1	AATQVWKERVGNRGLWGLVNNAGISVPSGP-----NEWMKKQDFASVLDV	145
BAB27025.1	-----LWEELAASTSDPRATILEGTLAQP	51
NP_067532.2	AFAKDFLAEK--LHLLNNAGVMMCP-----YSKTADGFEMHIGVNLHGHELLT	154
XP_284259.1	EFARKVIKEEER--VDILVNNAVMRCP-----HWTTEDEGFEMQFGVNYLGHFLLT	154
XP_143618.2	RVADQVKKEVGD--VSIILNNAGIVTGRN-----FLDCPDDLMKSFVDVNFKAHLWMY	230
XP_134689.3	VTDCLSHIEGGQ--VDVLVNNAGVGLVGP-----LEGLSLATMQSVFNTNFFGAVRLV	123
XP_145308.2	GVQQLPLEEIWPLCDFITITYPLLPSTTGLLHDSFTFAQCKKGVVREALMDEGGRLSGQCA	175
NP_035433.1	QMAKAVREKVGD--ITILVNNAAVVGHS-----LMSDDDDALLKSQHVNLTLGQFWT	155
NP_612461.1	SLFEQVDREQQGR-LDVLVNNAYAGVQTI LNTRNKAFWETPASMWDDINNVGLRGHYFCS	131
AAH47501.1	GKKSIEGKFNENI FTLSLSSLNENQRNLPGE---KQYRTECGKCFKRNSLVLHHRHTS	226
AAO15022.1	NITMVALKLQDSGRYWCNRNTSGILYPLMG---FQLDVSAPQTERNIPFTHLDNILKSG	145
AAH21973.1	NTFEEMKHLGR--VNFLVNAAGINRDGL-----LVRTKTEDMVSQHLTNLLGSMLTC	115
<b>SDR-Motive</b>	<b>NNAG N</b>	
NP_663399.1	LSMLP-LVRKARGRVNVVNSILGRVS-----LGGSGGYCISXYGIEAFSDSL	191
BAB27025.1	LGRMGQPAEVAAAALFLASEATFCTG-----LELLVTGGAEELGYGRKA	94
NP_067532.2	HLLLEKLKESAPSRIVNLSSLGHHLGRIFHFNHQGEK-FYSAGLAYCHSKLANILFTKEL	213
XP_284259.1	NLLLDKLIKASAPSRIINLSSLAHVAGHIDFDLWQMKKYDTKAAQCQSKLAVLFTKEL	214
XP_143618.2	KAFLPAMIANNHGHVLCISSAGLIG-----VNLSDYCASKFAALGFAESM	277
XP_134689.3	KAVLPGMKRRRQGHVVVSVMGLQG-----VMFNDVYAASKFALEGFFESL	170
XP_145308.2	GAALDIFTEEPPGLSGPREHHQLSPPGCQHQEGPELLWGGNRSPVCGHGTVQVVQTGS	235
NP_035433.1	KAFLPRLMELQNGHIVCLNSVLALSA-----IPGAIIDYCTS KASAFAMESL	202
NP_612461.1	VYGARLMVPAGQGLIVVISSPGSLQY-----MFNPVYGVKCAACDKLAADC	177
AAH47501.1	GEKPYTCNECGKSFSKNYNLIVHQRIHTGEKPYECSKCGKAFSDGSALTQHORIHTGEKP	286
AAO15022.1	TVTTGQAPTSQPDAPFTTGMVFTPG-----LITLPRLLASTRPAKSTGYSFTA	194
AAH21973.1	KAAMRTMIQQGGSI VNVGSI VGLKG-----NSGQSVYASKGGVGFSTRAL	162
<b>SDR-Motive</b>	<b>S Y K</b>	
NP_663399.1	RRELRYFG--VKVAIEPGFFLGMASSARLCSNIQMLWDQTSSEIREIYGEKYLASYL	248
BAB27025.1	SKSS-----LGEVPTLPNVH-----	110
NP_067532.2	AKRLKGSQ--VTYVHPGCTVHSELTRYSSIMR-----WLWQLFFVFIKTPQEGAQTS	264
XP_284259.1	SHRLQGSQ--VTVNALHPGVARTELGRHTGMHNSAFSGFMLGPFWLLFKSPQLAAQPS	271
XP_143618.2	FIELTLAKQWGIKTTIVCPFFIKTGMFEGCTTKCPTLLPILDPEYAVRKIIDALLQEQLY	337
XP_134689.3	AIQLRQFN--IFISMVPEGVPTDFEGKLLAQVSKAEFPDTPDPTLGYFRDLVLPASRE	227
XP_145308.2	LKNAGTCLSPVIVGLLREASKQADMNLLNAKLLVKEAGLNVTIFHNPVGPGEQGSGECL	295
NP_035433.1	TLGLLDPC--GVSATTVLPFHTSEMFGQMRVRFPNLFPPLKPEVARRTVDAVQQNQAL	260
NP_612461.1	AHELRRHG--VSCVSLWPGIVQTELLKHEMAKEEVLQDPVLKQKSAFSAETTELSGK	234
AAH47501.1	YECLECGKTFNRNSSLILHQRTHTGEKPYRCNECGKFTDISHLTVHLRIHTGEKPYECS	346
AAO15022.1	TSTTSQPRRTMGSQTVTASPNSARDSSAGPESISTKSGDLSTRSPTTGLCLSTRSLLNR	254
AAH21973.1	AKEVARCK--IRNVVA PGFVHTDMTKDLKEEHLKKNIPLGRFGETEVAHAVVFLLES	219
<b>SDR-Motive</b>	<b>PG T</b>	

**Abbildung 2.1:** Alignment der zwölf vorab ausgewählten Proteinsequenzen. Abgebildet ist lediglich ein Auszug des Sequenzvergleichs, die SDR-typischen Struktur motive sind grau hinterlegt und rot eingefärbt. Abgesehen von den Kandidaten BAB27025.1, XP\_145308.2, AAH47501.1 und AAO15022.1 weisen alle Primärstrukturen eine hohe Konservierung in den charakteristischen SDR-Motiven auf, andere Bereiche der Proteine zeigen einen schwachen Grad an Konservierung.

erfolgreich erforscht wird. Als deutlich interessanter wurden hingegen Proteine eingestuft, die aufgrund ihrer ermittelten Verwandtschaftsverhältnisse vermeintlich an sehr verschiedenen und bislang kaum untersuchten Stoffwechselwegen beteiligt sind. Aus diesem Grund wurden die Proteine CBR4 (AAH21973.1, im Folgenden **hCBR4**) und DHRS1 (NP\_612461.1, im Folgenden **hDHRS1**) zur eingehenden funktionellen Charakterisierung ausgewählt. Die Ergebnisse ihrer phylogenetischen Analysen werden gesondert besprochen.

### Erweiterung der Studien um zwei weitere Mitglieder der Superfamilie

Im Zuge ihrer Untersuchungen hinsichtlich des evolutionären Hintergrunds des Vertebraten-Enzyms  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 3 identifizierte Frau Dr. Rebekka Mindnich die Aminosäuresequenz des humanen Proteins HSDL1 (NP\_113651, im Folgenden **hHSDL1**) als weiteren bislang uncharakterisierten Vertreter der SDR-Proteinfamilie [132]. Seine Bearbeitung ging ergänzend zur Charakterisierung der bereits ausgewählten Enzyme hCBR4 und hDHRS1 in vorliegende Arbeit über.

Aufgrund einer Kooperation mit Herrn Dr. Udo Oppermann vom Structural Genomics Consortium (SGC) in Oxford/UK erweiterte sich die Gruppe der zu untersuchenden neuen SDR-Mitglieder um das Protein DHRS6 (NP\_064524, im Folgenden **hDHRS6**). Die im Rahmen dieser Arbeit durchzuführenden Studien beschränkten sich neben einer bioinformatischen Sequenzanalyse allerdings auf die phylogenetische Bestimmung von Verwandtschaftsverhältnissen und eine Untersuchung der subzellulären Lokalisation.

Um zunächst die Zugehörigkeit der beiden genannten Proteine zur Familie der Short-Chain-Dehydrogenasen/Reduktasen zu verifizieren, wurde auch für hHSDL1 und hDHRS6 eine Identifizierung von bekannten Domänen unter Verwendung der Datenbank Pfam und eine manuelle Ausweisung von SDR-typischen Strukturmotiven durchgeführt (vergleiche Tabelle 2.2 und Abbildung 2.2. Sowohl hHSDL1 als auch hDHRS6 konnten als Vertreter der SDR-Proteinfamilie bestätigt werden.

**Tabelle 2.2:** Identifizierung von Protein-Domänen zur Einordnung in die SDR-Superfamilie

Protein-ID	Name	Spezies	Chromosomale Position	identifizierte Domäne	SDR
NP_113651	HSDL1	Mensch	16q24.1	adh_short	ja
NP_064524	DHRS6	Mensch	4q24	adh_short	ja

Bei detaillierter Betrachtung der Aminosäuresequenz des Kandidaten hHSDL1 fällt auf, daß sie trotz einer generell hohen Konservierung eine bedeutende Abweichung innerhalb der SDR-typischen Struktur motive aufweist. Die ausgewiesene katalytische Triade der SDR-Enzyme (S-Y-K) zeigt einen Aminosäureaustausch des polaren Tyrosins gegen ein unpolares Phenylalanin (S-F-K, schwarz hinterlegt).

### Zusammenfassung der SDR-Kandidatenauswahl

Die zur umfassenden funktionellen Charakterisierung ausgewählten SDR-Kandidaten sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst.

hDHRS6	-MGRLDGKVIIL	TAAAGIG	QAAALAFAREGAKVIATDINESKLQELEKYPG-----IQ	53
hHSDL1	DLIKQYGRWAVVS	GATDGI	GKAYAEELASRGLNIIILISRNEEKLVVAKDIADTYKVETD	120
<b>SDR-Motive</b>		<b>TGxxxGIG</b>		
hDHRS6	TRVLDVTKKKQIDQFANEVER---	LDVLFNVAGFVHHG---	TVLDCEEKDWDFSMNLNVR	107
hHSDL1	IIVADFSSGREIYLP	IREALKDKDVGILVNNVGVFYPYPQYFTQLSEDKLWDI-	INVNIA	179
<b>SDR-Motive</b>	<b>D</b>	<b>NNAG</b>	<b>N</b>	
hDHRS6	SMYLMIKAFLPKMLAQKSGNIINM	SVASSVKGVVNRCVYSTTKAAVIGLTKSVAADFIQ	167	
hHSDL1	AASLMVHVVLPGMVERKKGAIVTIS	-SGSCCKTPQLAAASASKAYLDHFSRALQYEEYAS	238	
<b>SDR-Motive</b>		<b>S</b>	<b>Y K</b>	
hDHRS6	QGIRCNCVCPGTVD	PSLQER-----IQ	ARGNPEEARNDFLKRQKTGRFATAEEI	217
hHSDL1	KGIFVQSLIFFYVAT	GMTAPSNFLHRCSWLVPSPKVYAHHAVSTLGISKRRTGYWHSIIQ	298	
<b>SDR-Motive</b>	<b>PG T</b>			

**Abbildung 2.2:** Alignment der Proteinsequenzen von hDHRS6 und hHSDL1. Abgebildet ist lediglich ein Auszug des Sequenzvergleichs, die SDR-typischen Struktur motive sind grau hinterlegt und rot eingefärbt. Sowohl hDHRS6 als auch hHSDL1 kann aufgrund der Präsenz konservierter Aminosäurereste eindeutig eine Zugehörigkeit zur SDR-Proteinfamilie nachgewiesen werden. Auffällig jedoch ist ein Aminosäureaustausch in der katalytischen Triade des aktiven Zentrums (S-Y-K) von hHSDL1 (schwarz hinterlegt).

**Tabelle 2.3:** Zusammenfassung der SDR-Kandidatenauswahl

Protein-ID	Name	vollständige Bezeichnung	Spezies	Chromosomale Position
NP_116172	hCBR4	carbonic reductase 4	Mensch	4q32.3
NP_612461	hDHRS1	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1	Mensch	14q11.2
NP_064524	hDHRS6	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 6	Mensch	4q24
NP_113651	hHSDL1	hydroxysteroid dehydrogenase like 1	Mensch	16q24.1

## 2.2.2 Analyse von Verwandtschaftsverhältnissen durch Phylogenie

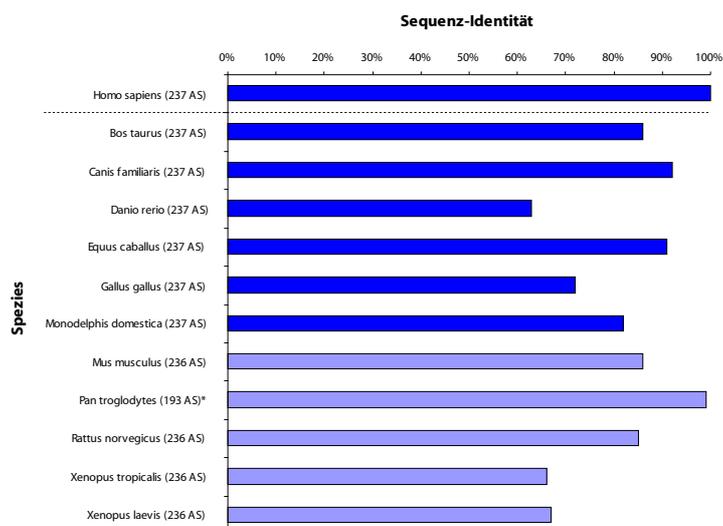
Zur Gewinnung erster Anhaltspunkte bezüglich einer möglichen Distribution der ausgewählten SDR-Kandidatenproteine in der Zelle (subzelluläre Lokalisation), ihres zu erwartenden Expressionsprofils im menschlichen Körper (Gewebeverteilung) oder ihrer potentiellen katalytischen Aktivität (Substratspezifität) wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst bioinformatische Untersuchungen hinsichtlich der Verwandtschaftsverhältnisse der Enzyme von Interesse durchgeführt. Die phylogenetische Analyse erfolgte dabei für die Kandidaten hCBR4, hDHRS1 und hHSDL1 sowohl vor Beginn der experimentellen Arbeiten (Februar 2005) als auch, aufgrund der sich stetig erweiternden Datensätze, ein weiteres Mal nach deren Abschluß (Juli 2008). Die Kalkulation für den Kandidaten hDHRS6 wurde lediglich einfach, hinsichtlich einer anstehenden Veröffentlichung, durchgeführt. Nach der Darstellung von Verwandtschaftsverhältnissen in Form phylogenetischer Stammbäume und deren Evaluierung wurde zur quantitativen Beurteilung der Proteinbeziehungen der Grad der Sequenzidentität zwischen den SDR-Kandidatenproteinen von Interesse und den Proteinen in ihrer unmittelbaren Nachbarschaft bestimmt. Dies erfolgte durch manuellen Sequenzvergleich unter Verwendung von Blast2seq.

### Phylogenie offenbart lediglich Homologe der Säugetierklasse als unmittelbare Verwandte des humanen CBR4

Die beiden unabhängig voneinander berechneten phylogenetischen Stammbäume für den SDR-Kandidaten hCBR4 gleichen sich trotz der umfangreichen Erweiterung der Datensätze über den Verlauf dieser Arbeit im Wesentlichen in ihrem Informationsgehalt. Aus diesem Grund werden an dieser Stelle lediglich die Ergebnisse der aktuellen Analyse erörtert, die graphische Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse ist dem Anhang zu entnehmen (vergleiche A.2.1).

Der SDR-Kandidat hCBR4 weist neben unterschiedlichen humanen Isoformen einige Carbonylreduktasen des Typs 4 anderer Säugetiere in unmittelbarer Nachbarschaft auf. Als nächsten Verwandten von hCBR4 offenbaren die phylogenetischen Analysen ein hypothetisches Protein des Schimpansen (*Pan troglodytes*). Darüber hinaus verfügen sowohl das Rind (*Bos taurus*), der Hund (*Canis familiaris*) und das Pferd (*Equus caballus*) als auch die Maus (*Mus musculus*), die Ratte (*Rattus norvegicus*), das Kurzschwanzopossum (*Monodelphis domestica*) und das Schnabeltier (*Ornithorhynchus anatinus*) über ein dem humanen Enzym homologes Protein. Weiter sind dem Stammbaum Vertreter der Amphibien (Krallenfrösche, *Xenopus tropicalis* und *Xenopus laevis*) und der Fische (Zebrabärbling, *Danio rerio*) als auch ein Repräsentant der Vögel (Haushuhn, *Gallus gallus*) zu entnehmen, deren Proteome Enzyme mit großen Übereinstimmungen zu hCBR4 aufweisen.

Die detaillierte Betrachtung der Verwandtschaftsverhältnisse durch Überprüfung der prozentualen Sequenzidentität zwischen hCBR4 und besagten Homologen (vergleiche Abbildung 2.3) verdeutlicht, daß der Grad der Konservierung unter den verschiedenen Spezies mit Werten von 66 % (*Xenopus tropicalis*) - 99 % (*Pan troglodytes*) außergewöhnlich hoch ist, was auf eine entscheidende Bedeutung der Carbonylreduktase des Typs 4 im Stoffwechsel schließen läßt. Da es sich bei allen identifizierten metazoischen Verwandten von hCBR4 allerdings um bislang uncharakterisierte Proteine handelt, ist eine Hypothese bezüglich der möglichen metabolischen Funktion des Enzyms nicht aufzustellen.



**Abbildung 2.3:** Sequenzidentität zwischen hCBR4 und seinen phylogenetisch identifizierten Homologen. Der Grad der Aminosäuresequenz-Konservierung unter den verschiedenen Spezies ist mit Werten von 66 % (*Xenopus tropicalis*) - 99 % (*Pan troglodytes*) außergewöhnlich hoch. Dargestellt sind im Diagramm sowohl Spezies deren Enzyme eine dem hCBR4 identische Proteinlänge aufweisen (dunkelblau), als auch solche, die sich in der Anzahl an Aminosäuren vom humanen Vertreter unterscheiden (hellblau). Die Sequenz des Schimpansen (*Pan troglodytes*) ist in der NCBI-Datenbank lediglich als „predicted“ annotiert und aus diesem Grund mit einem „\*“ versehen.

Die Annotierung des zu untersuchenden Proteins hCBR4 und seiner Homologen der unterschiedlichen Spezies als Carbonyl-Reduktase hatte zunächst erwarten lassen, daß eine Verwandtschaft dieser Enzymgruppe zu den bereits umfassend charakterisierten Carbonylreduktasen des Typs 1 und 3 (CBR1, CBR3) besteht. Überraschenderweise konnten diesbezüglich im Rahmen der phylogenetischen Analyse keine evolutionär bedingten Übereinstimmungen nachgewiesen werden. Ein manueller Sequenzvergleich offenbarte den geringen Grad der Sequenzidentität unter besagten Carbonylreduktasen, ersichtlich in Abbildung 2.4. Während hCBR1 und hCBR3 eine Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz von 71 % aufweisen, zeigt hCBR4 lediglich einen geringen Grad an Sequenzidentität von 25 % zu hCBR1 bzw. 24 % zu hCBR3.

Neben den bislang uncharakterisierten Homologen unterschiedlicher Spezies offenbarten die Untersuchungen der Verwandtschaftsverhältnisse von hCBR4 Sequenzähnlichkeiten zu den 3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein)-Reduktasen zahlreicher Protozoen. Die Beteiligung dieser Enzymgruppe an der Biosynthese von Fettsäuren läßt eine Funktion auch von hCBR4 im entsprechenden Stoffwechselweg vermuten.

### **Humanes DHRS1 verfügt neben Homologen der Vertebraten ausschließlich über uncharakterisierte Verwandte**

Vergleichbar mit der geschilderten Situation für hCBR4 offenbarten auch die Untersuchungen der Verwandtschaftsverhältnisse des SDR-Kandidaten hDHRS1 keine gravierenden Veränderungen im Zuge der Erweiterung der Datensätze über den Verlauf dieser Arbeit. Die Erläuterung der erziel-

## 2 Ergebnisse

hCBR1	MSSGIHVALVTGGNKGTGLATVRDLCLRFSGDVLVTARDVTRGQAAVQOL	50
hCBR3	MSSCSRVALVTCANRGTGLAIAARELCROFSGDVLVTARDVARGQAAVQOL	50
hCBR4	--MDKVCAVFGGSRGICRAVAQLMARKG-YRLAVIARNLEGAKAAAGDL	46
hCBR1	QAEGLSPRFHQLDIDDLQSIKALRDFLRKEYGGLDVLVNNAGIAFKVADP	100
hCBR3	QAEGLSPRFHQLDIDDLQSIKALRDFLRKEYGGLNVLVNNAAVAFKSDDP	100
hCBR4	GGDHIA---FSCDVAKEHDVQNTFEELEKHLGRVNFVNNAAGINRDGLLV	93
hCBR1	TPFHIQAEVTMKTNFFGTRDVTTELLPLIKPQ--GRVNVSSIMSVRALK	148
hCBR3	MPFDIKAEMLKTNFFATRNMGNELLPIMKPH--GRVNNISSLQCLRAFE	148
hCBR4	RTKTEDMVSQHLHTNLLGSMLEKKAAMRTMIQQQGSIVNVGSIIVGLKGN	143
hCBR1	SCSPELQOKFRSETITTEELVGLMKNFVEDTKKGVHKEGWPSAAVGVTK	198
hCBR3	NCSEDLQERFHSSETLLEGDLVDMKKFVEDTKNEVHEREGWPNSPYGVSK	198
hCBR4	GQ-----SVMSSASK	152
hCBR1	IGVTVLSRIHARKLSEQRKGDKILLNACCPGWRVTDMAKPKATKSPVEGA	248
hCBR3	LGVTVLSRILARRLDEKRAADRILVNACCPGVKTDMDGKDSIRTVEEGA	248
hCBR4	GGLVGFSSRALAKEVARKKIR---VNVVAPGFVHTDMTKDLKKEHLKKN	198
hCBR1	ETPVYLALLPPDAEGPHGQFVSEKRVQW-----	277
hCBR3	ETPVYLALLPPDATEPQQLVHDKVQVNW-----	277
hCBR4	PLGRFGETIEVAHAVVFLLESPIYTGHLVVVDGGLQLLIL	237

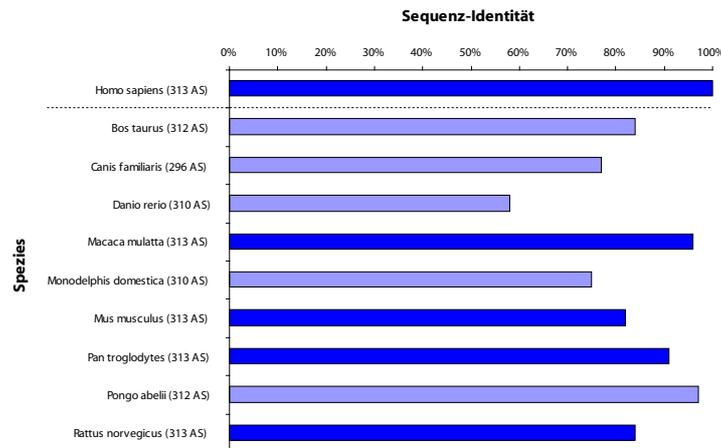
**Abbildung 2.4:** Alignment der humanen Carbonylreduktasen des Typs 1, 3 und 4. Übereinstimmungen sind hellgrau, Konservierungen über alle drei humanen Carbonylreduktasen dunkelgrau hinterlegt. Während hCBR1 und hCBR3 einen hohen Grad an Sequenzidentität aufweisen (71 %), zeigt hCBR4 eine nur geringe Übereinstimmung zu hCBR1 (25 %) und hCBR3 (24 %).

ten Ergebnisse bezieht sich demzufolge auch in diesem Fall lediglich auf den aktuell berechneten Stammbaum, abgebildet im Anhang (vergleiche A.2.2).

Auch der SDR-Kandidat hDHRS1 weist zunächst neben verschiedenen Homologen des Menschen zahlreiche sequenzähnliche Proteine metazoischer Spezies in unmittelbarer Nachbarschaft auf, die in den Unterstamm der Vertebraten einzuordnen sind. Es finden sich sowohl weitere Sequenzen aus der Ordnung der Primaten (Orangutan, *Pongo abelii*; Rhesusaffe, *Macaca mulatta*; Schimpanse, *Pan troglodytes*) als auch Sequenzen der Nager Maus (*Mus musculus*) und Ratte (*Rattus norvegicus*) sowie des Rindes (*Bos taurus*), des Hundes (*Canis familiaris*) und des Kurzschwanzopossums (*Monodelphis domestica*) auf dem phylogenetischen hDHRS1-Hauptast wieder. Als einziges nah verwandtes hDHRS1-Homolog der Vertebratengruppe, das nicht der Klasse der Säugetiere zuzuordnen ist, wurde ein Protein des Zebraärbling (*Danio rerio*) mit hoher Sequenzähnlichkeit identifiziert.

Die quantitative Evaluierung der Verwandtschaftsverhältnisse durch Überprüfung der Sequenzidentität offenbart, ähnlich wie im Falle der Carbonylreduktasen des Typs 4, einen hohen Grad an Konservierung unter den homologen Proteinen der Wirbeltiergruppe. Jeweils verglichen mit dem humanen Vertreter hDHRS1 erstrecken sich die ermittelten Werte von 58 % (*Danio rerio*) - 97 % (*Pongo abelii*) (vergleiche Abbildung 2.5).

Neben der bereits beschriebenen Gruppe, bestehend aus Angehörigen des Vertebraten-Unterstamms, zeichnet sich der errechnete Stammbaum für den SDR-Kandidaten in erster Linie durch die Präsenz weiterer uncharakterisierter Proteine aus. Mit den hDHRS1-verwandten Sequenzen des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* (Nematoda), des Purpur-Seeigels *Strongylocentrotus purpuratus* (Echinodermata) und des Pärchenegels *Schistosoma japonicum* (Plathelminthes) sowie der Seeanemone *Nematostella vectensis* (Cnidaria) und des vermeintlichen Ursprungsorganismus aller Tiere *Trichoplax adhaerens* (Placozoa) finden sich von Sequenzen komplexerer Metazoen bis hin zu Primärstrukturen der strukturell einfachsten aller vielzelligen Tiere im errechneten Stammbaum.



**Abbildung 2.5:** Sequenzidentität zwischen hDHRS1 und seinen phylogenetisch identifizierten Homologen. Der Grad der Aminosäuresequenz-Konservierung unter den verschiedenen Spezies erstreckt sich von 58 % (*Danio rerio*) - 97 % (*Pongo abelii*) und ist somit durchgehend hoch. Dargestellt sind im Diagramm sowohl Spezies deren Enzyme eine dem hDHRS1 identische Proteinelänge aufweisen (dunkelblau), als auch solche, die sich in der Anzahl an Aminosäuren vom humanen Vertreter unterscheiden (hellblau).

Darüber hinaus wurden Sequenzähnlichkeiten von hDHRS1 zu zahlreichen Proteinen identifiziert, deren Herkunftsspezies in Gruppen der Protozoen zusammenzufassen sind.

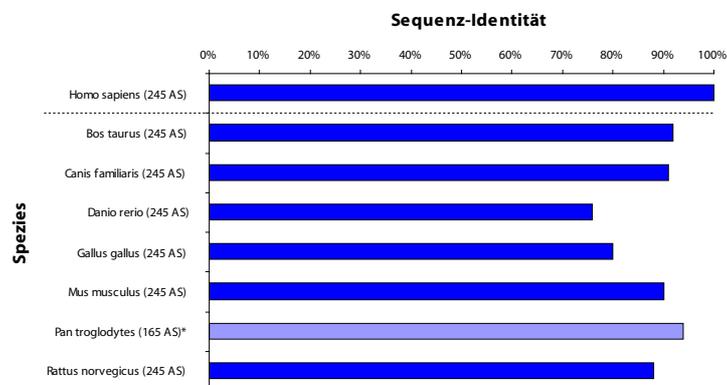
Wenngleich es sich bei allen identifizierten Homologen oder sequenzähnlichen Enzymen um uncharakterisierte Proteine handelt und aus diesem Grund eine Vorhersage hinsichtlich der enzymatischen Funktion nicht zu treffen ist, so weisen die großen Übereinstimmungen in den Aminosäuresequenzen speziell der Wirbeltierenzyme wiederum auf eine bedeutende Rolle des Proteins von Interesse im Metabolismus hin.

### Stammbaumanalyse für humanes DHRS6 zeigt Sequenzähnlichkeiten zu protozoischen $\beta$ -D-Hydroxybutyrat-Dehydrogenasen auf

Die im Rahmen der Kooperation mit Herrn Dr. Udo Oppermann vom Structural Genomics Consortium (SGC) in Oxford/UK durchgeführte und in dieser Arbeit erörterte Stammbaumanalyse zur Klärung der Verwandtschaftsverhältnisse von hDHRS6 basiert ausschließlich auf dem Datenbestand vom Juli 2005. Aufgrund der bereits veröffentlichten Ergebnisse der umfassenden Charakterisierung des besagten SDR-Kandidaten [70] wurde auf eine erneute phylogenetische Studie mit vermeintlich erweiterten Datensätzen nach Abschluß der experimentellen Arbeiten verzichtet.

Aus dem im Anhang abgebildeten Stammbaum (vergleiche A.2.3) ist ersichtlich, daß sich hDHRS6 zunächst in eine Gruppe homologer Vertebratenenzyme eingliedert. Der entsprechende phylogenetische Zweig trägt neben nicht redundanten humanen Sequenzen Primärstrukturen des Schimpansen (*Pan troglodytes*), des Rindes (*Bos taurus*), des Hundes (*Canis familiaris*), der Maus (*Mus musculus*) und der Ratte (*Rattus norvegicus*) sowie der Nichtsäuger Haushuhn (*Gallus gallus*) und Zebrafisch (*Danio rerio*). Diese weisen allesamt einen hohen Grad an Sequenzidentität zum humanen Homolog auf (vergleiche Abbildung 2.6), die prozentualen Werte belaufen sich hierbei auf 76 % (*Danio rerio*) - 94 % (*Pan troglodytes*). Da zum Zeitpunkt der Analyse keinerlei Studien

bezüglich der identifizierten Wirbeltier-Homologe vorlagen, konnte aufgrund der großen Sequenz-Übereinstimmungen innerhalb der Vertebraten-Gruppe lediglich eine essentielle Bedeutung von hDHRS6 im Organismus vermutet werden.



**Abbildung 2.6:** Sequenzidentität zwischen hDHRS6 und seinen phylogenetisch identifizierten Homologen. Der Grad der Aminosäuresequenz-Konservierung unter den verschiedenen Wirbeltieren beläuft sich auf hohe 76 % (*Danio rerio*) - 94 % (*Pan troglodytes*). Dargestellt sind im Diagramm sowohl Spezies deren Enzyme eine dem hDHRS6 identische Proteinelänge aufweisen (dunkelblau), als auch solche, die sich in der Anzahl an Aminosäuren vom humanen Vertreter unterscheiden (hellblau). Die Sequenz des Schimpansen (*Pan troglodytes*) ist in der NCBI-Datenbank lediglich als „predicted“ annotiert und aus diesem Grund mit einem „\*“ versehen.

Abgesehen von der bereits beschriebenen Gruppe an hDHRS6 homologen Vertebraten-Enzymen lieferte die Analyse der Datensätze keine weiteren metazoischen Aminosäuresequenzen. Im phylogenetischen Stammbaum zeigen sich demzufolge ausschließlich protozoische Primärstrukturen in näherer oder entfernterer Verwandtschaft, deren Annotation allerdings auf eine bislang unbekannte Funktion der entsprechenden Proteine schließen läßt. Eine Ausnahme bilden hierbei einige wenige 3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein)-Reduktasen verschiedener Protozoen und die beiden  $\beta$ -D-Hydroxybutyrat-Dehydrogenasen aus *Pseudomonas sp. GM101* und *Bordetella bronchiseptica RB50*, deren prozentuale Sequenzidentitäten zu hDHRS6 sich auf 34 % bzw. 36 % belaufen. Ihre Identifizierung als sequenzähnliche Proteine deutete bereits zu diesem Zeitpunkt der umfassenden Charakterisierung von hDHRS6 auf dessen mögliche Beteiligung am Fettstoffwechsel hin.

### Humanes HSDL1 weist eine Verwandtschaft zu den 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen Typ 3 und 12 auf

Im Gegensatz zu den bereits erläuterten phylogenetischen Analysen für hCBR4 und hDHRS1 wurden im Zuge der Bestimmung der Verwandtschaftsverhältnisse des SDR-Kandidaten hHSDL1 die Auswirkungen der Datensatzerweiterung über den Verlauf dieser Arbeit offensichtlich. Die errechneten Stammbäume, beide gezeigt im Anhang (vergleiche A.2.4 und A.2.5), offenbarten im direkten Vergleich signifikante Unterschiede bezüglich des Verwandtschaftsgrades sequenzähnlicher Proteine zu hHSDL1. Da sich die Versuchsdurchführungen und im Folgenden beschriebenen Ergebnisse zum Teil auf die zu Beginn dieser Arbeit durchgeführte phylogenetische Analyse stützen, konzentriert sich die Beschreibung der Resultate zunächst auf den zu diesem Zeitpunkt errechneten Stammbaum. Eindeutige Diskrepanzen, hervorgerufen durch die Aktualisierung des verwendeten

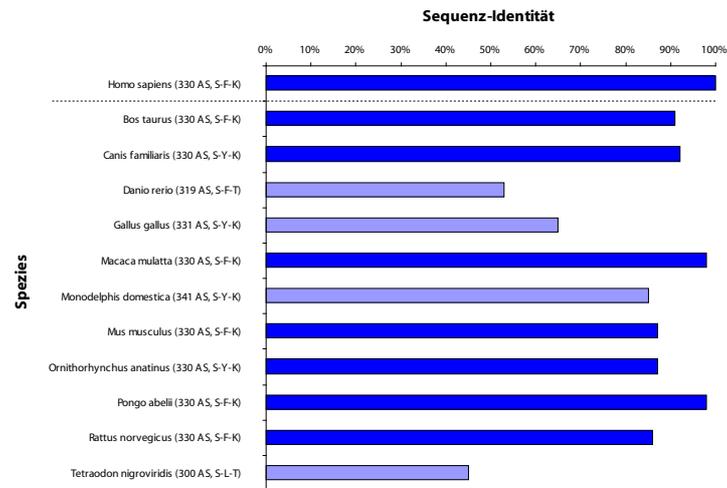
Datensatzes, werden ergänzend erörtert.

Der phylogenetische Stammbaum, errechnet für den Kandidaten hHSDL1, zeichnet sich durch die Präsenz zahlreicher homologer Aminosäuresequenzen des Unterstamms der Vertebraten in unmittelbarer Nachbarschaft des SDR-Kandidatenproteins aus. Neben Proteinen der Säugetiere Orang-Utan (*Pongo pygmaeus*), Maus (*Mus musculus*), Ratte (*Rattus norvegicus*) und Hund (*Canis familiaris*) sind mit dem Haushuhn (*Gallus gallus*), dem grünen Kugelfisch (*Tetraodon nigroviridis*) und dem Zebraärbling (*Danio rerio*) ebenfalls Repräsentanten der Vögel und der Fische in der hHSDL1-homologen Gruppe der Wirbeltiere vertreten. Durch die stetig anwachsende Anzahl in der Datenbank annotierter Proteine erweitert sich die Vertebratengruppe der hHSDL1-homologen Sequenzen mit Wiederholung der phylogenetischen Analyse um die Mitglieder Rhesusaaffe (*Macaca mulatta*), Rind (*Bos taurus*), Kurzschwanzopossum (*Monodelphis domestica*) und Schnabeltier (*Ornithorhynchus anatinus*) sowie um einige humane Isoformen. Die quantitative Beurteilung der Proteinbeziehungen durch Überprüfung des Grads der Sequenzidentität zwischen hHSDL1 und seinen identifizierten Homologen offenbart eine starke Konservierung, speziell unter den analysierten Säugetiersequenzen. Diese beläuft sich auf Prozentwerte von 85 % (*Monodelphis domestica*) - 98 % (*Macaca mulatta*, *Pongo pygmaeus*). Der grüne Kugelfisch (*Tetraodon nigroviridis*) als Vertreter der Knochenfische weist innerhalb der Wirbeltiergruppe die geringste Sequenzübereinstimmung mit hHSDL1 auf (45 %) (vergleiche Abbildung 2.7).

Ein besonderes Interesse galt im Rahmen des Sequenzvergleichs der Homologen dem Konservierungsgrad der ausgewiesenen katalytischen Triade der SDR-Enzyme (S-Y-K) innerhalb der Vertebratengruppe. Wie aus 2.2.1 hervorgeht, verfügt hHSDL1 über einen Aminosäureaustausch des polaren Tyrosins gegen ein unpolares Phenylalanin (S-F-K). Die detaillierte Betrachtung der homologen Wirbeltier-Sequenzen offenbart, daß der Großteil der analysierten Vertebraten ein dem hHSDL1 entsprechendes aktives Zentrum aufweist, lediglich der Hund (*Canis familiaris*), das Kurzschwanzopossum (*Monodelphis domestica*), das Schnabeltier (*Ornithorhynchus anatinus*) und das Haushuhn (*Gallus gallus*) verfügen über eine vermeintlich intakte katalytische Triade (vergleiche Abbildung 2.7).

Da es sich bei allen Proteinen der erläuterten Vertebratengruppe um uncharakterisierte Verwandte von hHSDL1 handelt und demzufolge keinerlei Information bezüglich seiner möglichen subzellulären Lokalisation oder Funktion aus den bislang ermittelten Verwandtschaftsverhältnissen gezogen werden konnte, erfolgte die Beurteilung des errechneten Stammbaums weiter unter Berücksichtigung der illustrierten Nebenäste. Der Stammbaum von hHSDL1 zeigt zunächst sequenzverwandte aber uncharakterisierte Proteine, die jeweils in den Gruppen Caenorhabditis, Neoptera oder weiterer Nematoda zusammenzufassen sind. Darüber hinaus offenbaren die phylogenetischen Analysen eine eindeutige Verwandtschaft hHSDL1s zu den Enzymgruppen  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 3 und 12. Bei den Mitgliedern dieser Gruppen handelt es sich ausschließlich um Proteine des Vertebraten-Unterstamms, ihre humanen Vertreter weisen zu hHSDL1 einen Grad an Sequenzidentität von 38 % ( $17\beta$ -HSD Typ 3) bzw. 41 % ( $17\beta$ -HSD Typ 12) auf. Nachgewiesene Verwandtschaft läßt auf eine Beteiligung von hHSDL1 am Androgen-/Estrogen- bzw. Fettsäuremetabolismus (verzweigt oder langkettig) schließen.

Durch die Wiederholung der phylogenetischen Analyse nach umfangreicher Erweiterung der Datensätze verändert sich der errechnete Stammbaum dahingehend, daß neben der ausgewiesenen Gruppen der Nematoden (Caenorhabditis, Nematoda) auch die Wirbeltiergruppe der  $17\beta$ -Hydroxy-



**Abbildung 2.7:** Sequenzidentität zwischen hHSDL1 und seinen phylogenetisch identifizierten Homologen. Der Grad der Aminosäuresequenz-Konservierung innerhalb der Vertebratengruppe beläuft sich auf 45 % (*Tetraodon nigroviridis*) - 98 % (*Macaca mulatta*, *Pongo pygmaeus*). Dargestellt sind im Diagramm sowohl Spezies deren Enzyme eine dem hHSDL1 identische Proteinlänge aufweisen (dunkelblau), als auch solche, die sich in der Anzahl an Aminosäuren vom humanen Vertreter unterscheiden (hellblau).

steroiddehydrogenasen des Typs 3 nicht mehr zu den unmittelbarsten Verwandten von hHSDL1 zählt. Durch die Aufstockung der in der Datenbank hinterlegten Sequenzen relativiert sich rein graphisch die enge Verwandtschaft des SDR-Kandidatenproteins hHSDL1 zur 17 $\beta$ -HSD des Typs 3.

### Zusammenfassung der Analyse von Verwandtschaftsverhältnissen durch Phylogenie

**Phylogenie offenbart lediglich Homologe der Säugetierklasse als unmittelbare Verwandte des humanen CBR4.** Der SDR-Kandidat hCBR4 weist neben unterschiedlichen humanen Isoformen einige Carbonylreduktasen des Typs 4 anderer Säugetiere mit hohem Grad an Sequenzidentität in unmittelbarer Nachbarschaft auf. Eine evolutionär bedingte Übereinstimmung zu den bereits charakterisierten Carbonylreduktasen des Typs 1 und 3 konnte im Rahmen der phylogenetischen Analyse nicht nachgewiesen werden.

**Humanes DHRS1 verfügt neben Homologen der Vertebraten ausschließlich über uncharakterisierte Verwandte.** Der errechnete Stammbaum für den SDR-Kandidaten hDHRS1 zeigt neben verschiedenen Homologen des Menschen und zahlreichen stark sequenzähnlichen Enzymen meta-zoischer Spezies des Vertebraten-Unterstammes lediglich uncharakterisierte Proteine in unmittelbarer Nachbarschaft.

**Stammbaumanalyse für humanes DHRS6 zeigt Sequenzähnlichkeiten zu protozoischen  $\beta$ -D-Hydroxybutyrat-Dehydrogenasen auf.** Der SDR-Kandidat hDHRS6 gliedert sich in eine Gruppe homologer Vertebratenenzyme ein, welche allesamt einen hohen Grad an Sequenzidentität zum humanen Vertreter aufweisen. In näherer oder entfernterer Verwandtschaft zeigt der errechnete

Stammbaum zahlreiche protozoische Sequenzen, von denen ein geringer Anteil als 3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein)-Reduktase oder  $\beta$ -D-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase ausgewiesen ist.

**Humanes HSDL1 weist eine Verwandtschaft zu den  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen Typ 3 und 12 auf.** Der phylogenetische Stammbaum, errechnet für den Kandidaten hHSDL1, zeichnet sich durch die Präsenz zahlreicher homologer Aminosäuresequenzen des Unterstamms der Vertebraten in unmittelbarer Nachbarschaft des SDR-Kandidatenproteins aus. Sämtliche identifizierte Homologe weisen einen hohen Grad an Sequenzidentität zum humanen Repräsentanten der Wirbeltier-Gruppe auf, der für hHSDL1 nachgewiesene Aminosäureaustausch innerhalb seiner katalytischen Triade ist in weiteren Spezies vertreten. Darüber hinaus kann mittels phylogenetischer Analyse eine nahe Verwandtschaft hHSDL1s zur Enzymgruppe der  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen des Typs 12 und eine etwas weitere zu den  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen des Typs 3 nachgewiesen werden.

### 2.2.3 Studien zur subzellulären Lokalisation

Die im Zuge der umfassenden Charakterisierung der ausgewählten SDR-Proteine durchgeführten Studien hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation erfolgten durch zwei voneinander unabhängige Herangehensweisen. Durch eine bioinformatische Vorhersage unter Verwendung von öffentlich verfügbaren Servern und der näheren Betrachtung der im Rahmen der phylogenetischen Analysen (vergleiche 2.2.2) bestimmten Verwandtschaftsverhältnisse sollte zunächst ein erster Anhaltspunkt bezüglich der Proteindistribution in der Zelle gewonnen werden.

Die Verifizierung der vorläufigen Erkenntnisse im Experiment erfolgte durch Klonierung der kodierenden Sequenz (CDS) der Gene von Interesse in geeignete Expressionsvektoren. Nach Transfektion der durch DNA-Sequenzierung für basentreu befundenen Konstrukte in HeLa-Zellen wurden diese für 24 h inkubiert und nach der unter 4.3.4 beschriebenen Vorgehensweise gefärbt.

#### Bioinformatische Vorhersage der subzellulären Lokalisation

Für im Vorfeld durchgeführte bioinformatische Analysen zur Vorhersage der subzellulären Lokalisation von gegebenen Proteinsequenzen stehen im Internet eine Vielzahl von frei zugänglichen Servern zur Verfügung. Aufgrund signifikanter Unterschiede in den verwendeten Algorithmen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine repräsentative Auswahl von sieben Servern zur bioinformatischen Vorhersage der subzellulären Lokalisation der zu untersuchenden SDR-Proteine herangezogen. Bezeichnungen und entsprechende Internet-Verknüpfungen sind Tabelle 5.14 zu entnehmen.

Während der Großteil der verwendeten Server Wahrscheinlichkeiten für eine Kompartimentspezifität in Prozent liefert (pSORTII, pTarget, SubLoc1.0 und MITOPROT), geben andere lediglich Wahrscheinlichkeits-Scores an. LOctree sagt die wahrscheinlichste Lokalisation unter Angabe eines Reliability index (RI) im Rahmen einer Skala von 1-10 voraus, wobei 10 das Maximum der Verlässlichkeit darstellt. TargetP1.1 verzichtet ebenfalls auf die prozentuale Ausgabeform und errechnet stattdessen, vergleichbar mit LOctree, ebenfalls Wahrscheinlichkeitswerte in Kombination mit Reliability classes (RC). Wenngleich die kalkulierten Scores keine echten Wahrscheinlichkeiten repräsentieren und sich nicht zwangsläufig zu 1 addieren, so ist nichts desto trotz der höchste erzielte Score gleichzusetzen mit der höchsten Wahrscheinlichkeit einer Lokalisation im entsprechenden

Kompartiment. Das Verhältnis der Scores untereinander (Reliability class, RC) dient als Hinweis auf die Sicherheit der Vorhersage. WoLF PSORT liefert eine Liste an Proteinen mit bekannter Lokalisation, die eine größtmögliche Ähnlichkeit in ihren Lokalisationscharakteristika zur eingegebenen Quelle aufweisen. Hierbei werden auch duale Lokalisationen einbezogen, wie sie für Proteine gelten, die beispielsweise zwischen Cytosol und Nukleus pendeln. Als Zusammenfassung wird die jeweilige Anzahl an gefundenen Proteinen für jeden Bestimmungsort ausgegeben.

Eine Außenseiterrolle in der Zusammenstellung an verwendeten Servern stellt MITOPROT dar. MITOPROT beschränkt sich im Gegensatz zu allen anderen aufgeführten Servern auf die Vorhersage einer Wahrscheinlichkeit hinsichtlich einer möglichen Lokalisation des Proteins von Interesse in den Mitochondrien.

### **Vorhersage der subzellulären Lokalisation aufgrund von Verwandtschaftsverhältnissen**

Ergänzend zur beschriebenen Vorhersage der subzellulären Lokalisation mittels bioinformatischen Servern wurde der wiederum lediglich theoretische Ansatz der Betrachtung von Verwandtschaftsverhältnissen gewählt, um erste hilfreiche Hinweise hinsichtlich der möglichen Zielkompartimente der Kandidatenproteine in der Zelle zu erlangen. Die durch die phylogenetischen Analysen identifizierten nächsten Verwandten der SDR-Proteine von Interesse wurden zu diesem Zweck einer eingehenden Literaturrecherche unterzogen und auf bereits bestimmte subzelluläre Lokalisationen überprüft.

### **Untersuchungen durch Expression in humaner Zellkultur**

Zur experimentellen Untersuchung ihrer subzellulären Lokalisation wurden die ausgewählten SDR-Proteine entweder in Fusion mit einem fluoreszierenden Protein oder einem durch Antikörper nachweisbaren Fusionstag in HeLa-Zellen exprimiert. Über die Fluoreszenz des fusionierten Proteins, in dieser Arbeit des grünfluoreszierenden Proteins (GFP), oder durch die Verwendung eines Fluoreszenz-gelabelten Antikörpers gegen das fusionierte Myc-Epitop war es möglich, die Verteilung der zu untersuchenden Proteine in der Zelle mit dem Erscheinungsbild gegengefärbter Zellorganellen zu vergleichen und somit ihren Bestimmungsort eindeutig zu identifizieren. Neben der im Vordergrund stehenden Ermittlung der subzellulären Lokalisation der Proteine von Interesse zielten die durchgeführten Experimente auf die Aufklärung möglicher Mechanismen der spezifischen Translokation in die entsprechenden Zellkompartimente. Da besagter Distribution generell das Auftreten definierter Signalsequenzen in der Primärstruktur zugrunde liegt, wurden die zu untersuchenden SDR-Enzyme auf solche überprüft bzw. diese durch Generierung zahlreicher N- bzw. C-terminal verkürzter (trunkierter) Fusionsproteine im Protein ausfindig gemacht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Christina Guggenberger (ehemals Helmholtz Zentrum München) und Frau Dr. Brigitte Keller ein umfangreiches Protokoll zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Proteinen durch deren Expression in humaner Zellkultur etabliert werden. Die Ergebnisse dieser Etablierung gehen sowohl aus 4.3.4 als auch aus den folgenden Abschnitten hervor.

**Die Zelllinie.** Sämtliche Experimente zur Ermittlung der subzellulären Lokalisation wurden unter Verwendung der humanen Epithelzelllinie HeLa durchgeführt. Neben ihrer starken Anhaftung

und ihrer guten Transfizierbarkeit empfahl sich besagte Zelllinie in erster Linie durch ihre morphologischen Eigenschaften. Im Vergleich zu den ebenfalls in Betracht gezogenen und in anderen Teilabschnitten dieser Arbeit Anwendung findenden HEK293-Zellen zeichnen sich HeLa-Zellen durch ein relativ großes Zellvolumen und ein länglicheres und nahezu ausgebreitetes Zellbild aus. Ihre Verwendung ermöglichte eine einwandfreie Visualisierung der einzelnen Kompartimente ohne ungewollte Überlagerungseffekte.

**Die Expressionskonstrukte.** Die CDS der Gene von Interesse wurden zunächst jeweils in die Expressionsvektoren pEGFP-C2 und pAcGFP1-N1 inseriert. Während pEGFP-C2 die Proteinexpression eines fluoreszierenden GFP am N-Terminus des zu untersuchenden Proteins kodiert, resultiert die Proteinexpression ausgehend von pAcGFP1-N1 in einem rekombinanten Protein, bestehend aus dem Enzym von Interesse und einem an seinem C-Terminus fusionierten GFP. Durch die Erzeugung beschriebener Fusionen sowohl am N- als auch am C-Terminus sollte einer eventuellen Maskierung eines terminalen Signalpeptids vorgebeugt werden.

Um sicherzustellen, daß jegliche für die zu untersuchenden Fusionsproteine beobachteten Translokationen in die entsprechenden Zellkompartimente lediglich auf den Eigenschaften der Kandidatenproteine selbst und nicht auf Charakteristika des GFP beruhen, wurde im Vorfeld die publizierte cytosolische Distribution von GFP [201] durch Transfektion der pEGFP-C2- und pAcGFP1-N1-Leervektoren in HeLa-Zellen überprüft. Die Detektion von GFP bestätigte die erwartete Verteilung (Abbildungen nicht gezeigt).

Alternativ zur Generierung der pAcGFP1-N1-Expressionskonstrukte wurden die CDS der Gene von Interesse in den Vektor pcDNA4 myc-his Version B kloniert. Die Proteinexpression, basierend auf besagten Konstrukten, hatte die Fusion eines Myc-His-Tags am C-Terminus des Enzyms von Interesse zur Folge.

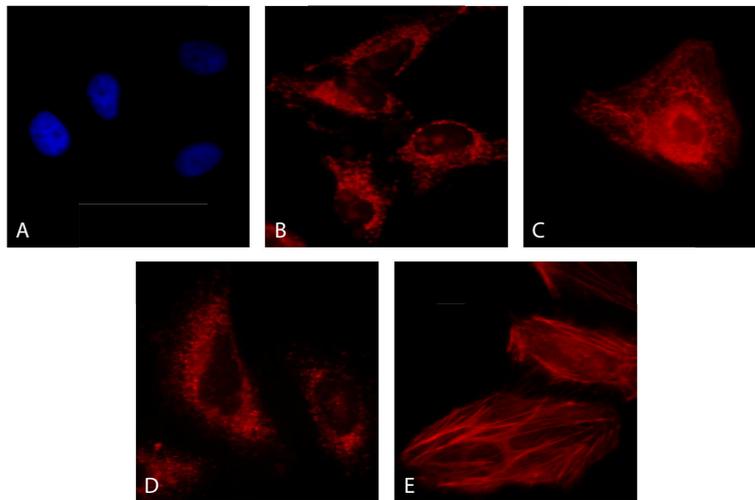
Zur Expression N- bzw. C-terminal trunkierter Fusionsproteine der Kandidaten hCBR4, hDHRS1 und hHSDL1 wurde ebenfalls auf die Generierung von pEGFP-C2- bzw. pcDNA4 myc-his Version B-Konstrukten zurückgegriffen.

Alle für die Subklonierung verwendeten Primerpaare gehen aus dem Anhang hervor (vergleiche A.3.1).

**Die Gegenfärbung der Kompartimente - Organellen im Visier.** Um die exprimierten Fusionsproteine einem spezifischen Bestimmungsort in der Zelle zuordnen zu können, wurde eine kompartimentspezifische Gegenfärbung der einzelnen Organellen mit Farbstoffen (ER, Mitochondrien, Zellkern) und/oder optional Antikörpern (Peroxisomen) durchgeführt. Alternativ konnte eine Visualisierung bestimmter Zellorganellen auch durch Expression kompartimentspezifischer Proteine erzielt werden. Typische Erscheinungsbilder der einzelnen Zellorganellen nach Färbung sind in Abbildung 2.8 zusammengefasst.

### **Humanes CBR4 ist ein mitochondriales Protein**

**Bioinformatische Vorhersage erlaubt eine Einschränkung der wahrscheinlichen subzellulären Lokalisation von hCBR4 auf Cytosol und Mitochondrien.** Tabelle 2.4 fasst die hinsichtlich der subzellulären Lokalisation von hCBR4 getroffenen Vorhersagen der sieben verwendeten Server zusammen. Ein Vergleich der Resultate zeigt auf, daß alle zur Kalkulation herangezogenen Server



**Abbildung 2.8:** Die Gegenfärbung der Kompartimente. Zusammenfassung typischer Erscheinungsbilder der einzelnen Zellorganellen nach Färbung. (A) Zellkern. (B) Mitochondrien. (C) Endoplasmatisches Retikulum. (D) Peroxisomen. (E) Cytoskelett (F-Actin).

entweder das Cytosol (pSORTII, SubLoc1.0, WoLF PSORT) oder die Mitochondrien (LOCtree, pTarget, TargetP1.1) als wahrscheinlichsten Bestimmungsort von hCBR4 errechnen. MITOPROT bekräftigt eine Lokalisation in den Mitochondrien durch die Angabe eines Wahrscheinlichkeitswertes von 98,2 %.

**Charakterisierte Mitglieder der Carbonylreduktase-Familie lokalisieren im Cytosol.** Die durchgeführten phylogenetischen Analysen identifizierten ausschließlich die homologen Enzyme aus Maus, Ratte oder Hund als nächste Verwandte von hCBR4. Untersuchungen bezüglich der subzellulären Lokalisationen besagter Proteine wurden bislang nicht veröffentlicht. Eine nicht auf Sequenzvergleich basierende Zugehörigkeit zur Familie der Carbonylreduktasen, macht hCBR1 und hCBR3 zumindest annotativ zu Verwandten von hCBR4. Für hCBR1 konnte eine Lokalisation im Cytosol bereits nachgewiesen werden [212], hCBR3 wird aufgrund seiner hohen Sequenzidentität zu hCBR1 ebenfalls als cytosolisches Enzym eingestuft [153].

**C-terminal markiertes hCBR4 unterliegt der Translokation in die Mitochondrien.** Abbildung 2.9 zeigt die intrazelluläre Lokalisation von hCBR4. Während das in N-terminaler Fusion mit EGFP exprimierte hCBR4 (pEGFP-C2/hCBR4) eine klar cytosolische Verteilung zeigt (1), konnte für das hCBR4-myc-his Fusionsprotein (hCBR4 fusioniert am N-Terminus des Myc-His, pcDNA4 myc-his Version B/hCBR4) eindeutig eine Translokation in die Mitochondrien nachgewiesen werden (2). Aus der Beobachtung, daß lediglich das am C-Terminus mit einem Myc-His-Epitop versehene hCBR4 seiner ursprünglichen Distribution in der Zelle nachkommt, wird bereits der mögliche Einfluss von Art und Position der verwendeten Fusion auf die subzelluläre Lokali-

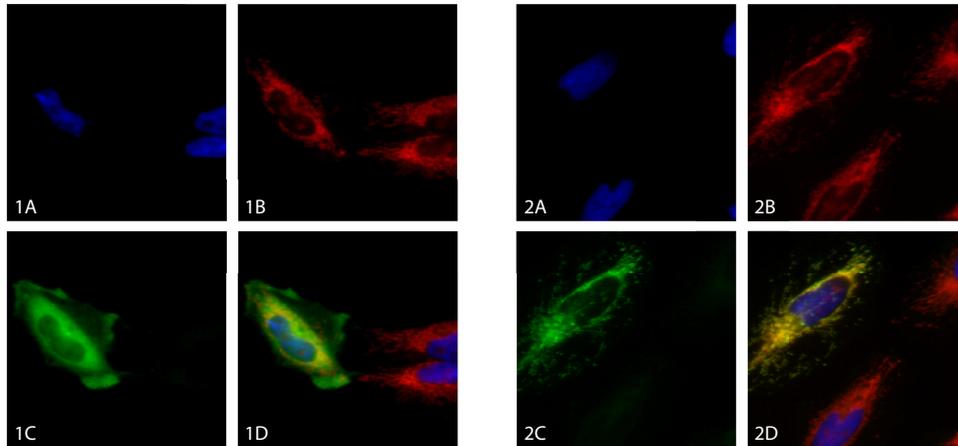
**Tabelle 2.4:** Bioinformatische Vorhersage der subzellulären Lokalisation von hCBR4

Server	hCBR4
LOCtree	mitochondrial RI = 5
pSORTII	39,1 % cytoplasmatisch; 34,8 % mitochondrial; 17,4 % nuklear; 4,3 % Vesikel des sekretorischen Systems; 4,3 % Cytoskelett
pTarget	100,0 % mitochondrial
SubLoc1.0	56,0 % cytoplasmatisch (RI = 1)
TargetP1.1	69,9 % mitochondrial; 37,2 % andere; 3,1 % Vesikel des sekretorischen Systems
WoLF PSORT	20,0 cytosolisch; 10,0 mitochondrial
MITOPROT	98,2 % <i>mitochondrial</i>

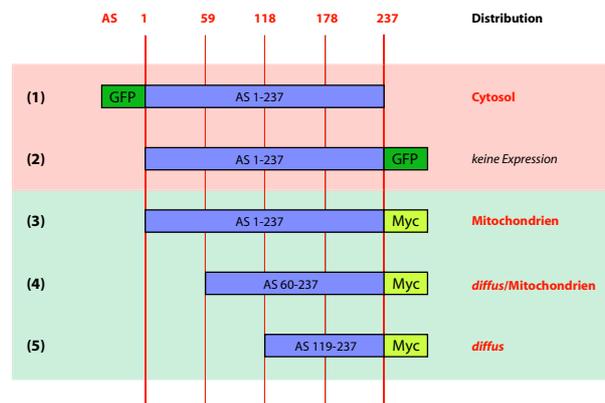
sation zu untersuchender Proteine ersichtlich. Im Falle von hCBR4 scheint ein frei zugänglicher N-Terminus (unfusioniert) für die Translokation des Proteins in die Mitochondrien essentiell zu sein. Eine mögliche Lokalisation von hCBR4 im ER, den Peroxisomen oder dem Zellkern konnte durch durchgeführte Gegenfärbungen (Abbildungen nicht gezeigt) ausgeschlossen werden. Die Transfektion des Konstrukts pAcGFP1-N1/hCBR4 führte nicht zur gewünschten Proteinexpression in den untersuchten HeLa-Zellen.

Nach Vergleich der erzielten Ergebnisse mit den erläuterten bioinformatischen Vorhersagen muß festgestellt werden, daß zumindest vier aus sieben verwendeten Servern die tatsächliche subzelluläre Lokalisation des Kandidatenproteins hCBR4 richtig prognostiziert haben. Dies entspricht einer Quote von 57,14 %. Die Analyse der Verwandtschaftsverhältnisse konnte den korrekten Bestimmungsort von hCBR4 nicht offenbaren.

**Aminosäuren 1-59 tragen die für die korrekte Verteilung von hCBR4 in der Zelle nötige Information.** Im Zuge der Identifizierung des für seine Translokation in die Mitochondrien verantwortlichen Proteinabschnitts wurden zwei verkürzte hCBR4-Fusionsproteine in HeLa-Zellen exprimiert und hinsichtlich Veränderungen in ihrer Verteilung, verglichen zur Distribution der Volle-Länge-Fusionsproteine, untersucht. Besagte Verkürzungen (Trunkierungen) erfolgten aufgrund der aus den bereits geschilderten Lokalisationsexperimenten gewonnenen Erkenntnisse lediglich am N-Terminus und beschränkten sich auf grobe Verkürzungen von hCBR4 um jeweils etwa ein Viertel des 237 Aminosäure langen Gesamtproteins (59 und 118 Aminosäuren). Alle generierten hCBR4-Fusionsproteine und die für sie ermittelten Bestimmungsorte sind aus Abbildung 2.10 ersichtlich. Anhand der durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, daß bereits die Verkürzung des Volle-Länge-Proteins um 59 Aminosäuren zu einem Verlust der eindeutigen mitochondrialen Distribution von hCBR4 führt. Wenngleich ein sehr geringer Anteil an betrachteten Zellen nach Expression von hCBR4trunkiert(AS60-237)-myc-his (4) weiterhin ein mit der Mitochondrienfärbung übereinstimmendes Fluoreszenzmuster zeigt, so ist dem Großteil an transfizierten HeLa-Zellen eine diffuse Proteinverteilung gemein, die weder einer mitochondrialen noch cytosolischen gleichkommt (Abbildungen nicht gezeigt). Mit der Verkürzung von hCBR4 um weitere 59 Aminosäuren (5) gehen



**Abbildung 2.9:** C-terminal getagtes hCBR4 unterliegt der Translokation in die Mitochondrien. Während GFP-CBR4 eine klar cytosolische Verteilung zeigt (1), weist hCBR4-myc-his eine eindeutige Lokalisation in den Mitochondrien auf (2). Beide Abbildungen zeigen jeweils die Gegenfärbung des Zellkerns (A) und der Mitochondrien (B), die Detektion des rekombinanten hCBR4-Proteins (C) und eine Überlagerung der einzelnen Fluoreszenzmuster (D).



**Abbildung 2.10:** Zusammenfassung aller generierten hCBR4-Fusionsproteine. Hierbei sind sowohl Voll-Länge-Fusionsproteine ((1)-(3)) als auch verkürzte Varianten ((4) und (5)) in der Aufstellung berücksichtigt. Aus den jeweils ermittelten subzellulären Lokalisationen geht hervor, daß die Aminosäuren 1-59 die für die korrekte Verteilung von hCBR4 in der Zelle nötige Information tragen.

letzte, den Mitochondrien zuordenbare Distributionen verloren, hCBR4trunkiert(AS119-237)-myc-his zeigt ausschließlich eine diffuse Verteilung in den untersuchten HeLa-Zellen (Abbildung ebenfalls nicht gezeigt). Die erzielten Ergebnisse deuten eindeutig darauf hin, daß der N-Terminus, im Speziellen die Aminosäuren 1-59, die für die Translokation von hCBR4 in die Mitochondrien erforderliche Information tragen. Eine mögliche Hypothese bezüglich des Auftretens einer Signalsequenz in der Primärstruktur wird unter 3.3.1 diskutiert.

### Humanes DHRS1 ist ein Protein des Endoplasmatischen Retikulums

**Bioinformatische Vorhersagen bzgl. der subzellulären Lokalisation von hDHRS1 lassen zunächst eine mitochondriale Distribution des Proteins vermuten.** Während die Vorhersagen der subzellulären Lokalisation von hCBR4 zwei wahrscheinliche Bestimmungsorte des Proteins in der Zelle errechneten, so ergibt sich für hDHRS1 bei näherer Betrachtung der Ergebnisse ein eindeutigeres Bild (vergleiche Tabelle 2.5). Der Großteil der verwendeten Server (fünf aus sieben) prognostiziert eine Lokalisation von hDHRS1 in den Mitochondrien (LOCtree, pTarget, SubLoc1.0, TargetP1.1, MITOPROT). Lediglich pSORTII und WoLF PSORT weichen in ihren Vorhersagen ab. pSORTII identifiziert mit einer Wahrscheinlichkeit von 33,3 % ein peroxisomales Targetingssignal, aus den Ergebnissen des WoLF PSORT-Servers läßt sich keine klare Präferenz ableiten.

**Tabelle 2.5:** Bioinformatische Vorhersage der subzellulären Lokalisation von hDHRS1

Server	hDHRS1
LOCtree	mitochondrial RI = 1
pSORTII	33,3 % peroxisomal; 22,2 % cytoplasmatisch; 22,2 % mitochondrial; 22,2 % nuklear
pTarget	62,6 % mitochondrial
SubLoc1.0	74,0 % mitochondrial (RI = 2)
TargetP1.1	58,2 % mitochondrial; 48,5 % andere; 2,2 % Vesikel des sekretorischen Systems
WoLF PSORT	10,0 extrazellulär; 9,8 cytosolisch-nuklear; 9,0 nuklear; 6,5 cytosolisch; 6,0 mitochondrial
MITOPROT	91,3 % mitochondrial

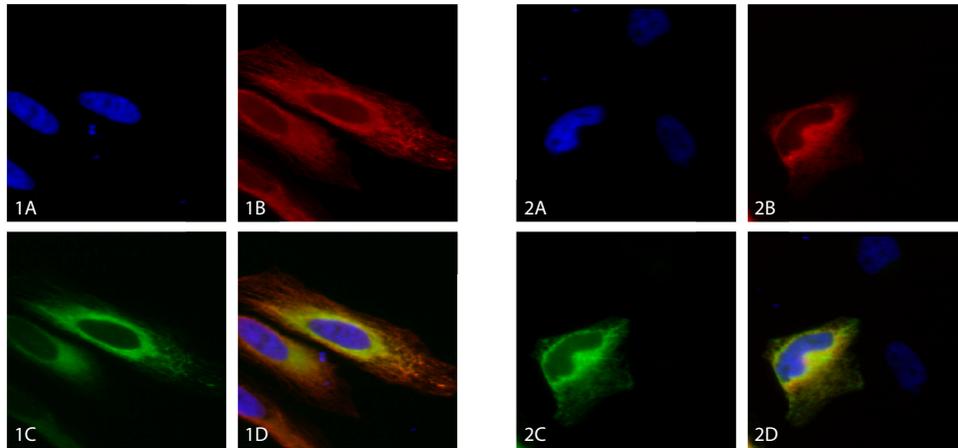
**Die subzellulären Lokalisationen der nächsten Verwandten sind unbekannt.** Aus den ermittelten Verwandtschaftsverhältnissen geht hervor, daß hDHRS1 ausschließlich bislang uncharakterisierte Proteine in nächster Nachbarschaft aufweist. Für die hDHRS1-Homologen verschiedenster Spezies konnten via Literaturrecherche keine Informationen hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation gewonnen werden.

**Sowohl C- als auch N-terminal fusioniertes hDHRS1 weisen eine Lokalisation im ER auf.** Im Rahmen der durchgeführten Studien zur Ermittlung der subzellulären Lokalisation von hDHRS1 konnte gezeigt werden, daß das in C-terminaler Fusion mit einem Myc-His-Epitop exprimierte hDHRS1 eine zum N-terminalen GFP-Pendant identische Verteilung in den verwendeten HeLa-Zellen aufweist (vergleiche Abbildung 2.11, (1)). Auffällig in diesem Zusammenhang ist, daß im Gegensatz zu den Beobachtungen hinsichtlich hCBR4 (siehe oben) keinerlei Abhängigkeit der Proteinverteilung von der Position der verwendeten Fusion festzustellen ist. Ein Einfluss der Fusionsart auf die korrekte Distribution in der Zelle ist allerdings auch in diesem Fall nicht von der Hand zu weisen. Im Expressionsmuster von hDHRS1-GFP (basierend auf der Transfektion des Expressionskonstrukts pAcGFP1-N1/hDHRS1) fallen im Gegensatz zum Erscheinungsbild nach Expression von hDHRS1-myc-his statt einer kompartimentspezifischen Fluoreszenzverteilung lediglich konzentrierte Proteinansammlungen in Form von Einschlüssen im HeLa-Zellvolumen auf. Diese beruhen allem Anschein nach auf der Verwendung des, dem generierten Expressionskonstrukt zugrunde liegenden Basisvektors pAcGFP1-N1. Im Zuge der Identifizierung des Bestimmungsortes von sowohl C- als auch N-terminal fusioniertem hDHRS1-Protein konnten zunächst durch spezifische Gegenfärbungen der Kompartimente die durch bioinformatische Vorhersage vorgeschlagenen Organellen (Mitochondrien, Peroxisomen) als tatsächliches Ziel der Distribution ausgeschlossen werden (Abbildungen nicht gezeigt). Übereinstimmungen im Fluoreszenzmuster konnten erst nach Gegenfärbung des Endoplasmatischen Retikulum erzielt werden (vergleiche Abbildung 2.11, (2)). Dies weist hDHRS1 eindeutig als Protein des ER aus.

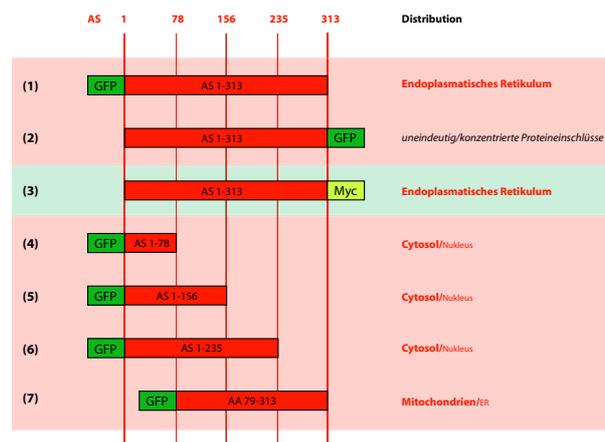
Bei rückwirkender Betrachtung der mittels Bioinformatik erzielten Ergebnisse wird deutlich, daß keiner der sieben verwendeten Servern die tatsächliche subzelluläre Lokalisation des Kandidatenproteins hDHRS1 im Endoplasmatischen Retikulum richtig vorhersagen konnte.

**Ausschließliche Distribution ins ER nur in Anwesenheit von N- und C-Terminus gewährleistet.** Bereits aus den Ergebnissen der Studien zur subzellulären Lokalisation der Volle-Länge-Fusionsproteine wird ersichtlich, daß die Situation bezüglich möglicher Signalsequenzen in der Primärstruktur von hDHRS1 nicht mit der für hCBR4 nachgewiesenen vergleichbar ist und sich deutlich komplexer darstellt. Durch Generierung und Expression von jeweils um ein Viertel (etwa 78 Aminosäuren) des 313 Aminosäure langen Gesamtproteins verkürzten hDHRS1-Fusionsproteinen (vergleiche Abbildung 2.12) sollten die für die Translokation ins Endoplasmatische Retikulum verantwortlichen Abschnitte in der Proteinsequenz aufgedeckt werden. Die Trunkierungen erfolgten dabei, anders als für hCBR4, sowohl am C- als auch am N-Terminus.

Aufgrund der bekannten Tatsache, daß der Großteil der Proteine, die zum ER transportiert werden, N-terminal orientierte Signal- oder Signalankersequenzen besitzen, wurde im Zuge der Untersuchungen zunächst das Aminoende von hDHRS1 hinsichtlich der für die Translokation ins ER essentiellen Information überprüft. Die Expression lediglich der ersten 78 Aminosäuren des Proteins hDHRS1 in N-terminaler Fusion mit GFP (Fusionsprotein GFP-hDHRS1trunkiert(AS1-78), (4)) führte zu einer cytosolischen/nukleären Lokalisation, die stark an das Fluoreszenzmuster nach Expression von GFP, basierend auf den Leervektoren pEGFP-C2 und pAcGFP1-N1, in HeLa-Zellen erinnert (siehe oben). Offensichtlich wird die Lokalisation des Proteins GFP-hDHRS1trunkiert(AS1-78) ausschließlich durch das N-terminal angehängte GFP bestimmt, die für den Transport ins Endoplasmatische Retikulum essentielle Information scheint indes durch die



**Abbildung 2.11:** Sowohl C- als auch N-terminal fusioniertes hDHRS1 weisen eine Lokalisation im ER auf. Die Proteinverteilung nach Coexpression von GFP-hDHRS1 (grün) und hDHRS1-myc-his (rot) in HeLa-Zellen zeigt ein übereinstimmendes Fluoreszenzmuster (1), welches eindeutig dem Endoplasmatischen Retikulum zuzuordnen ist (2). Abbildung (1) zeigt die Gegenfärbung des Zellkerns (A), die Detektion des rekombinanten Proteins hDHRS1-myc-his (B), die Detektion des rekombinanten Proteins GFP-hDHRS1 (C) und eine Überlagerung der einzelnen Fluoreszenzmuster (D). Abbildung (2) zeigt neben der Gegenfärbung des Zellkerns (A) und des Endoplasmatischen Retikulums (B) die Detektion des rekombinanten Proteins hDHRS1-myc-his (C) und eine Überlagerung der einzelnen Fluoreszenzmuster (D)



**Abbildung 2.12:** Zusammenfassung aller generierten hDHRS1-Fusionsproteine. Hierbei sind sowohl Voll-Länge-Fusionsproteine ((1)-(3)) als auch trunkierte Varianten ((4)-(7)) in der Aufstellung berücksichtigt. Aus den jeweils ermittelten subzellulären Lokalisationen geht hervor, daß sowohl die Aminosäuren 1-78 als auch die Aminosäuren 236-313 eine für die Translokation von hDHRS1 ins ER bedeutende Information tragen.

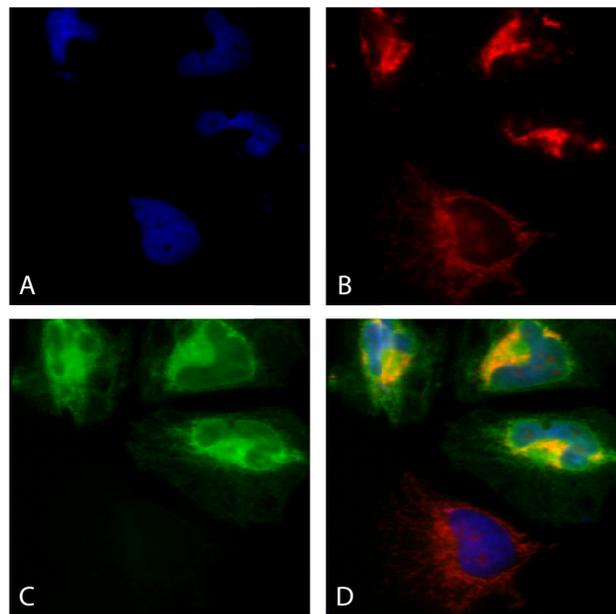
durchgeführte Verkürzung gänzlich verloren gegangen zu sein. Auch eine schrittweise Verlängerung des C-Terminus (Fusionsproteine GFP-hDHRS1trunkiert(AS1-156), (5) und GFP-hDHRS1trunkiert(AS1-235), (6)) führte nicht zur Wiedergewinnung der ER-Lokalisation. Zur Absicherung der Unbeteiligtheit des N- und der Verantwortlichkeit des C-Terminus im Translokationsprozess wurde ein weiteres Fusionsprotein generiert, welches über das Carboxyende, dagegen allerdings nicht über das Aminoende verfügt (Fusionsprotein GFP-hDHRS1trunkiert(AS79-313), (7)). Die alleinige Präsenz des C-Terminus führte wider Erwarten nicht zu einer eindeutigen Lokalisation des Proteins im Endoplasmatischen Retikulum. Wenngleich zwar ein geringer Anteil des exprimierten trunkierten hDHRS1 weiterhin das tatsächliche Zielorganell ER erreichte, so wurde der Großteil des Proteins allerdings in den Mitochondrien nachgewiesen. Mit dem Verlust des N-Terminus scheinen zumindest ergänzend notwendige Informationen abhanden gekommen zu sein. Die Diskussion einer möglichen Hypothese zum Zusammenspiel der beiden Termini von hDHRS1 in seinem Translokationsprozess ins Endoplasmatische Retikulum findet sich unter 3.3.2.

### **Mit Expression von hDHRS1 geht eine Veränderung der Mitochondrien-Verteilung einher.**

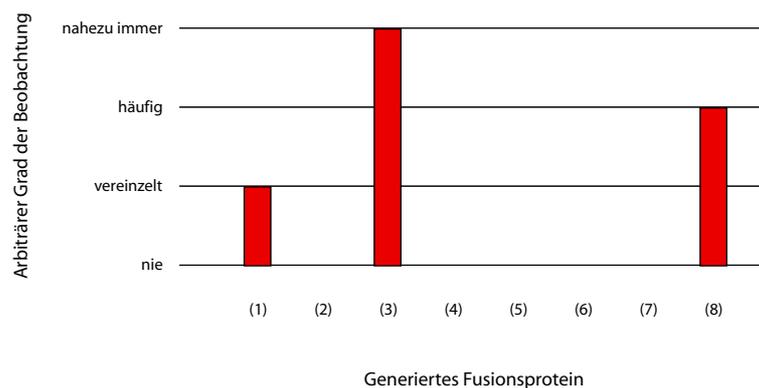
Im Verlauf der Studien zur subzellulären Lokalisation von hDHRS1 in HeLa-Zellen war mitunter eine vom Expressionsgrad des Proteins abhängige signifikante Veränderung der Mitochondrien-Verteilung zu beobachten. Je stärker sowohl GFP-hDHRS1 ((1)) als auch hDHRS1-myc-his ((3)) (beide sind Volle-Länge-Fusionsproteine) in der Zelle exprimiert wurden, desto gravierender zeigte sich eine konzentrierte Ansammlung der Mitochondrien um den Nukleus, ihre gewohnte Verteilung über einen großen Teil des Zellvolumens (vergleiche Abbildung 2.8, (B)) wurde vollständig aufgehoben. Exemplarisch sind in Abbildung 2.13 die Auswirkungen der Expression von hDHRS1(AS1-313)-myc-his ((3)) auf die Distribution der Organellen dargestellt. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Feststellung, daß weder das C-terminale Pendant zu GFP-hDHRS1, also hDHRS1-GFP ((2)), noch eines der trunkierten Fusionsproteine ((4)-(7)) ähnliche Auffälligkeiten nach Expression zeigten.

Um eine enzymatische Ursache der Mitochondrien-Abnormalitäten auszuschließen wurde ein im aktiven Zentrum mutiertes und somit inaktives hDHRS1 (Aminosäureaustausch in der katalytischen Triade von Tyrosin zu Phenylalanin) generiert (GFP-hDHRS1(Y163F) (8)) und auch hier der Einfluss seiner Expression auf die Mitochondrien überprüft. Trotz der Inaktivierung des Enzyms konnte ein eindeutiger Effekt nachgewiesen werden, eine enzymatische Aktivität von hDHRS1 scheint nicht die Ursache für die Veränderung der Mitochondrienverteilung in der Zelle zu sein. Abbildung 2.14 stellt die gemachten Beobachtungen zusammen. Es sei an dieser Stelle angemerkt, daß die im Diagramm erhobenen Häufigkeiten auf dem rein arbiträren Grad der Beobachtung beruhen, eine quantitative Auswertung wurde nicht durchgeführt.

Ein oftmals im Zuge beobachteter Mitochondrien-Abnormalitäten genannter Zellprozeß ist der programmierte Zelltod, die sogenannte Apoptose. Sie ist begleitet von zahlreichen morphologischen Veränderungen der betroffenen Zelle, wie beispielsweise auftretenden Abschnürungen der Plasmamembran, einer Kondensation des Zellkerns, der Degradierung des Cytoskeletts und in einem späten Stadium der Kondensation und dem Anschwellen der Mitochondrien. Im Zuge der Untersuchung einer proapoptotischen Wirkung der hDHRS1-Expression wurden gefärbte HeLa-Zellen zunächst hinsichtlich der offensichtlichen, für den programmierten Zelltod beschriebenen Merkmale untersucht. Als Kontrolle dienten hierbei HeLa-Zellen, in denen im Vorfeld der Färbungen durch



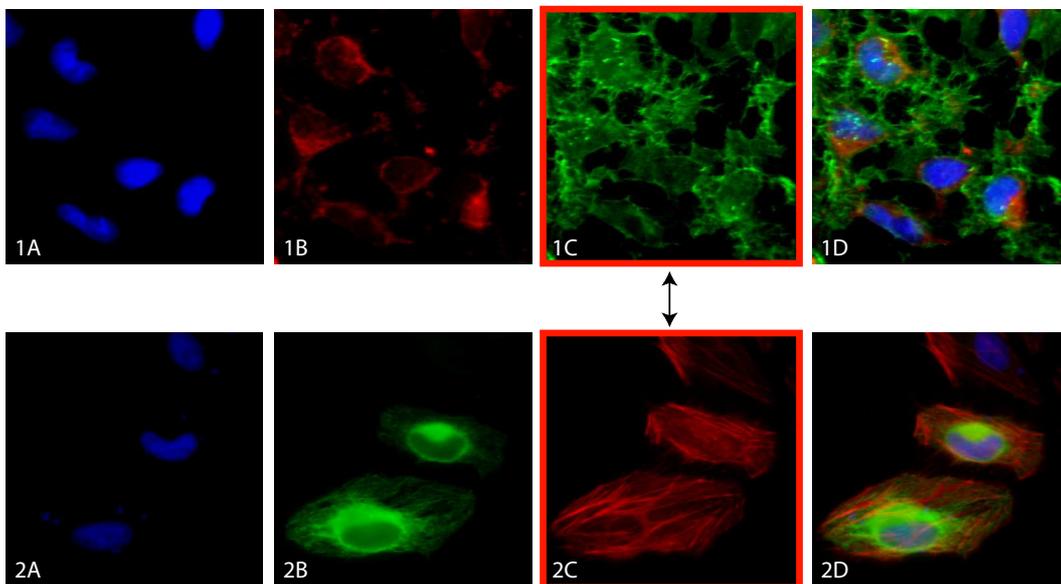
**Abbildung 2.13:** Mit Expression von hDHRS1 einhergehende Veränderung der Mitochondrien-Verteilung. Die Expression von hDHRS1(AS1-313)-myc-his führte zu einer konzentrierten Ansammlung der Mitochondrien um den Nukleus. Die gewohnte Verteilung über das Zellvolumen wurde aufgehoben. Die Abbildung zeigt die Gegenfärbung des Zellkerns (A) und der Mitochondrien (B), die Detektion des rekombinanten Proteins hDHRS1-myc-his (C) und eine Überlagerung der einzelnen Fluoreszenzmuster (D)



**Abbildung 2.14:** Zusammenstellung der Beobachtungen bezüglich der Mitochondrien-Verteilung nach hDHRS1-Expression. Aufgeführt sind die beobachteten Häufigkeiten (arbiträr) der Mitochondrien-Verteilung in Folge der Expression von GFP-hDHRS1 (1), hDHRS1-GFP (2), hDHRS1-myc-his (3), GFP-hDHRS1trunkiert(AS1-78) (4), GFP-hDHRS1trunkiert(AS1-156) (5), GFP-hDHRS1trunkiert(AS1-235) (6), GFP-hDHRS1trunkiert(AS79-313) (7) und GFP-hDHRS1(Y163F) (8)

Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Staurosporin aus *Streptomyces staurosporeus* zum Zellkulturmedium Apoptose induziert wurde. Die biologische Aktivität des Staurosporin beruht in der Inhibition von Proteinkinasen (u.a. Proteinkinase C) durch die Verhinderung ihrer ATP-Bindung aufgrund höherer Affinität [194] [219].

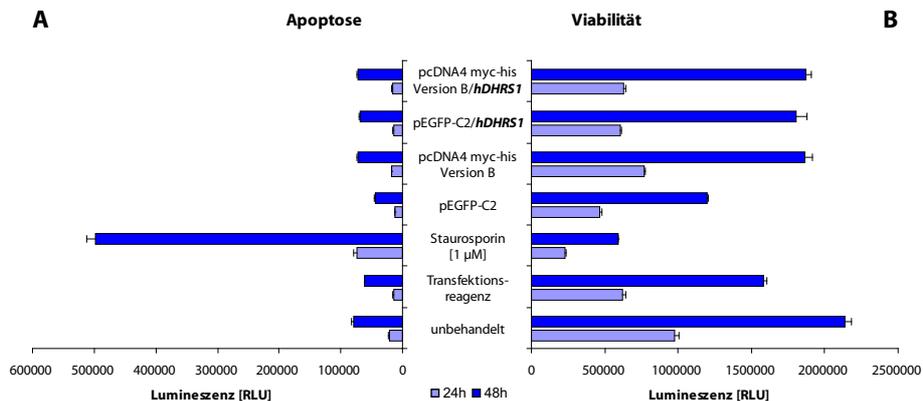
Wenngleich sich in den Kontrollzellen zwei Stunden nach Induktion der Apoptose die Zellkerne noch unauffällig zeigten, so waren signifikante Veränderungen sowohl hinsichtlich des Cytoskeletts als auch der Mitochondrien offensichtlich. Während die Zelle zunehmend ihre Struktur verlor, begannen sich die Mitochondrien wie erwartet um den Nukleus zu konzentrieren (vergleiche Abbildung 2.15, (1)) Die hDHRS1 (hDHRS1-myc-his) exprimierenden HeLa-Zellen zeigten weder Auffälligkeiten die Zellkerne noch das Cytoskelett betreffend (2). Sowohl die Nuklei als auch die Struktur der Zelle blieben vollständig in Takt.



**Abbildung 2.15:** Untersuchung der Zellmorphologie hinsichtlich Apoptose. Während die Behandlung der HeLa-Zellen mit Staurosporin eine Konzentrierung der Mitochondrien um den Nukleus und eine Degeneration des Cytoskeletts nach sich zieht, zeigen die hDHRS1 exprimierenden Zellen keine auffälligen Veränderungen, die auf eine proapoptotische Wirkung von hDHRS1 hindeuten. Abbildung (1) zeigt Apoptose-induzierte HeLa-Zellen mit Gegenfärbung des Zellkerns (A), der Mitochondrien (B), des Cytoskeletts (F-Actin, Phalloidin; (C)) und die Überlagerung der Fluoreszenzmuster (D)). Abbildung (2) zeigt hDHRS1 exprimierende HeLa-Zellen mit Gegenfärbung des Zellkerns (A), das detektierte rekombinante Protein hDHRS1-myc-his (B), die Gegenfärbung des Cytoskelettes und eine Überlagerung der einzelnen Fluoreszenzmuster (D).

Ergänzend und zur Absicherung der aus den Studien zur subzellulären Lokalisation gewonnenen Erkenntnisse wurde die quantitative Messung eines potentiellen proapoptotischen Effekts der Expression des Kandidatenproteins hDHRS1 in Zellkultur durchgeführt. Die Bestimmung der Apoptoseaktivität der HeLa-Zellen erfolgte unter Verwendung des Lumineszenzassays Caspase-Glo<sup>TM</sup>, die eng damit verknüpfte Zellviabilität wurde mittels des CellTiter-Glo<sup>TM</sup> Luminescent Cell Viability Assays überprüft (Abbildung 2.16). In Betracht gezogen wurden hierbei sowohl die Auswirkungen

gen der Zugabe des Transfektionsreagenzes Fugene6 als auch der Transfektion selbst (Leervektoren und generierte DNA-Konstrukte), bzw. der daraus resultierenden Expression der Fusionsproteine GFP-hDHRS1 und hDHRS1-myc-his. Als Positivkontrolle dienten wiederum mit  $1 \mu\text{M}$  Staurosporin behandelte und somit Apoptose-induzierte HeLa-Zellen. Die Messung angefertigter Triplikate erfolgte zum einen 24 h - dies entspricht dem Zeitpunkt des Zellfärbungsbeginns -, zum anderen 48 h nach Transfektion.



**Abbildung 2.16:** Apoptose und Zellviabilität in HeLa-Zellen nach Expression von hDHRS1-Fusionsproteinen. Die Zellen wurden 24 h bzw. 48 h nach Transfektion mit den entsprechenden Assay-Reagenzien behandelt und anschließend die Lumineszenz gemessen. (A) zeigt die Apoptosemessung, (B) gibt Viabilität der HeLa-Zellkultur wieder.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß sowohl 24 h als auch 48 h nach Transfektion keine proapoptotische Wirkung des verwendeten Transfektionsreagenzes Fugene6 oder der Expression der hDHRS1-Fusionsproteine nachzuweisen war. Die ermittelten Lumineszenzen lagen jeweils im Rahmen der für unbehandelte Zellen gemessenen (A). Auch eine Einschränkung der Zellviabilität war nicht festzustellen (B), die Ergebnisse gleichen im Wesentlichen denen des Apoptose-Assays. Apoptose kann somit als Ursache für die beobachteten Mitochondrien-Abnormalitäten ausgeschlossen werden.

Alternativ zum programmierten Zelltod wurde auch die Anhäufung Reaktiver Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS) als Grund für die offensichtliche Veränderung in der Mitochondrienverteilung in Betracht gezogen. Die oft auch ungenau als Sauerstoffradikale bezeichneten ROS sind schädliche Formen des Sauerstoffs, deren Auftreten bei oxidativem Stress und damit bei verschiedensten Erkrankungen oder auch dem Alterungsprozess eine wesentliche pathophysiologische Rolle spielen. Um die Stresswirkung auf HeLa-Zellen in Folge der Expression von hDHRS1-Fusionsproteinen zu überprüfen, wurde mittels des Image-iT LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection Kits versucht, die Bildung von ROS anhand emittierter grüner Fluoreszenz unter dem Mikroskop zu detektieren. Leider ist es nicht gelungen, die Vorgaben des Herstellers an die Eigenschaften und Bedürfnisse der verwendeten HeLa-Zellkultur anzupassen. Selbst eine Visualisierung von ROS nach Induktion von oxidativem Stress mittels des mitgelieferten TBHP (tert-Butylhydroperoxid, Positivkontrolle) schlug fehl.

### Humanes DHRS6 zeigt eine cytosolische Verteilung

**Bioinformatische Vorhersagen bzgl. der subzellulären Lokalisation von hDHRS6 zeigen große Varianz.** Die Resultate der bioinformatischen Vorhersage bzgl. der subzellulären Lokalisation von hDHRS6 (vergleiche Tabelle 2.6) zeigen deutliche Diskrepanzen in den errechneten potentiellen Zielkompartimenten des Proteins. Abhängig vom verwendeten Server werden sowohl das Cytosol (pSORTII), die Peroxisomen (pTarget) als auch die Mitochondrien (LOCtree, SubLoc1.0, WOLF PSORT) als möglicher Bestimmungsort vorgeschlagen. Da das auf mitochondriale Signalsequenzen spezialisierte MITOPROT die aufgrund der Häufigkeit an Nennungen (drei aus sechs Server) wahrscheinlichste Lokalisation von hDHRS6 in den Mitochondrien mit einer geringen Wahrscheinlichkeit von lediglich 20,8 % nahezu ausschließt, bleibt die bioinformatische Vorhersage uneindeutig.

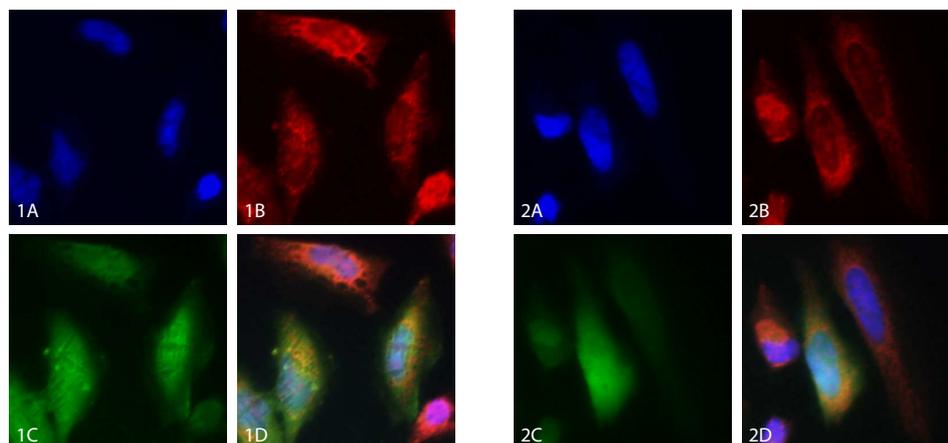
**Tabelle 2.6:** Bioinformatische Vorhersage der subzellulären Lokalisation von hDHRS6

Server	hDHRS6
LOCtree	mitochondrial RI = 5
pSORTII	60,9 % cytoplasmatisch; 13,0 % nuklear; 13,0 % mitochondrial; 8,7 % Endoplasmatisches Retikulum; 4,3 % extrazellulär (einschließlich Zellwand)
pTarget	87,6 % peroxisomal
SubLoc1.0	56,0 % mitochondrial (RI = 1)
TargetP1.1	49,2 % andere; 29,4 % Vesikel des sekretorischen Systems; 11,6 % mitochondrial
WoLF PSORT	15,0 mitochondrial; 12,0 cytosolisch; 7,5 cytosolisch-nuklear; 4,0 extrazellulär
MITOPROT	20,8 % mitochondrial

**Die Verwandtschaft von hDHRS6 zu BDHs deutet auf eine mitochondriale oder cytosolische Lokalisation hin.** Wie aus den phylogenetischen Analysen zu hDHRS6 hervorgeht, besteht eine eindeutige Verwandtschaft des DHRS6-Clusters der Vertebraten zu prokaryotischen R- $\beta$ -Hydroxybutyratdehydrogenasen (BDHs). Die Vertreter besagter Proteinfamilie aus dem Reich der Säugetiere und im Speziellen der Vertebraten werden fast ausschließlich als mitochondriale Proteine diskutiert [31] [125]. Einige wenige Veröffentlichungen liefern allerdings zwingende Beweise für die Existenz einer cytosolischen Typ II BDH [105] [112]. Subzelluläre Lokalisationen der zu hDHRS6 homologen Enzyme aus Huhn, Hund, Maus, Ratte oder Zebrafisch sind bis dato nicht bekannt.

**hDHRS6 offenbart ein mit cytosolischer Lokalisation übereinstimmendes Fluoreszenzmuster.** Die im Rahmen der Kooperation mit dem Structural Genomic Consortium (SGC)/Oxford durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich der subzellulären Lokalisation von hDHRS6 wiesen besagtes Protein eindeutig als cytosolisch aus. Sowohl das in N-terminaler Fusion mit EGFP exprimierte hDHRS6 (pEGFP-C2/hDHRS6) als auch hDHRS1-GFP, das C-terminale Analogon, folgten keiner

Translokation in spezifische Zellkompartimente, nachgewiesen durch die Gegenfärbung der Organellen, und waren über das ganze Zellvolumen detektierbar (vergleiche Abbildung 2.17). Auffällig in diesem Zusammenhang war ein grundsätzlich relativ schwaches Level der Expression, speziell nach Transfektion des Expressionskonstrukts basierend auf dem Vektor pAcGFP1-N1. Hieraus erklärt sich auch der hohe, in den Abbildungen ersichtliche Fluoreszenzhintergrund.



**Abbildung 2.17:** hDHRS6 offenbart ein mit cytosolischer Lokalisation übereinstimmendes Fluoreszenzmuster. Sowohl GFP-hDHRS6 (1) als auch hDHRS6-GFP (2) zeigen eine klar cytosolische Verteilung. Beide Abbildungen zeigen jeweils die Gegenfärbung des Zellkerns (A) und der Mitochondrien (B), die Detektion des rekombinanten hDHRS6-Proteins (C) und eine Überlagerung der einzelnen Fluoreszenzmuster (D).

Bezugnehmend auf die Ergebnisse der bioinformatischen Vorhersage bleibt festzustellen, daß erneut lediglich ein Server aus sieben die korrekte subzelluläre Lokalisation errechnet hat. Dies entspricht einer Quote von 14,29 %. Die Verwandtschaft zu den R- $\beta$ -Hydroxybutyratdehydrogenasen (BDHs) hatte eher ein Vorkommen hDHRS6 in den Mitochondrien vermuten lassen, wenngleich auch eine cytosolische Distribution aufgrund der im Vorfeld erhobenen phylogenetischen Daten nicht kategorisch ausgeschlossen werden konnte.

Durch die Bestimmung seiner cytosolischen Lokalisation erübrigten sich für den Kandidaten hDHRS6 jegliche Untersuchungen hinsichtlich des Auftretens definierter Signalsequenzen in der Primärstruktur.

### Humanes HSDL1 lokalisiert in den Mitochondrien

**Keine eindeutige Vorhersage der subzellulären Lokalisation durch Bioinformatik möglich.** Die bioinformatischen Vorhersagen hinsichtlich der subzellulären Lokalisation von hHSDL1 sind in Tabelle 2.7 zusammengefasst. Vergleichbar mit den Resultaten für hDHRS6 (siehe oben) weisen die Vorhersagen zu hHSDL1 eine große Varianz in den möglichen Bestimmungsorten auf. Eine eindeutige Prognose ist aufgrund der errechneten Wahrscheinlichkeiten auch in diesem Fall nicht zu stellen.

**Die nahen Verwandten 17 $\beta$ -HSD Typ 3 und 12 lokalisieren im ER.** Die durchgeführten phylogenetischen Analysen offenbarten eine Verwandtschaft von hHSDL1 zu den 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-

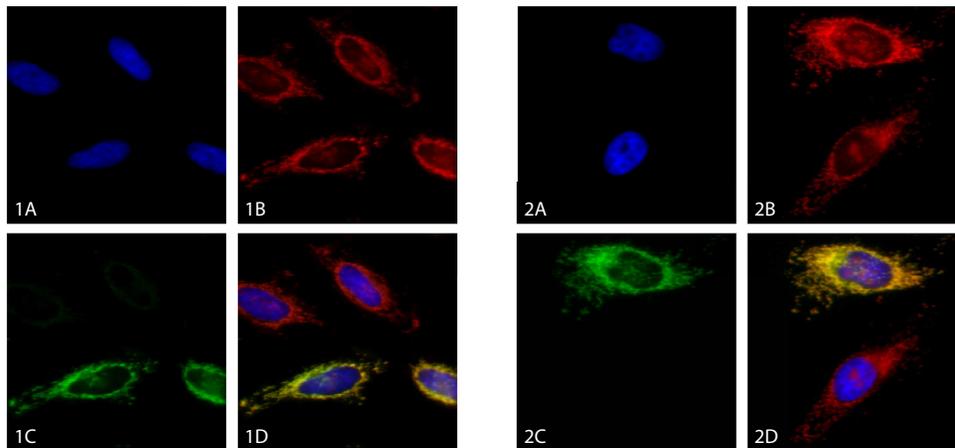
**Tabelle 2.7:** Bioinformatische Vorhersage der subzellulären Lokalisation von hHSDL1

Server	hHSDL1
LOCtree	mitochondrial RI = 3
pSORTII	39,1 % cytoplasmatisch; 17,4 % nuklear; 17,4 % mitochondrial; 13,0 % Endoplasmatisches Retikulum; 4,3 % Vesikel des sekretorischen Systems; 4,3 % Golgi; 4,3 % peroxisomal
pTarget	56,3 % peroxisomal
SubLoc1.0	74,0 % mitochondrial (RI = 2)
TargetP1.1	86,1 % andere; 19,7 % Vesikel des sekretorischen Systems; 5,0 % mitochondrial
WoLF PSORT	21,0 cytosolisch; 5,0 Plasmamembran; 3,0 Endoplasmatisches Retikulum-mitochondrial; 2,0 mitochondrial; 2,0 Endoplasmatisches Retikulum
MITOPROT	27,1 % mitochondrial

dehydrogenasen Typ 3 und 12. Für die beiden humanen Vertreter dieser Enzymgruppe wurde eine subzelluläre Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen [133] [137]. Die Bestimmungsorte der hHSDL1-Homologen wurden bislang nicht identifiziert.

**hHSDL1 unterliegt sowohl als N- als auch als C-terminales Fusionsprotein einer Translokation in die Mitochondrien.** Die experimentell bestimmte intrazelluläre Lokalisation von hHSDL1 ist aus Abbildung 2.18 ersichtlich. Durch spezifische Gegenfärbung der Mitochondrien konnte sowohl für das N- (GFP-hHSDL1) als auch das C-terminale GFP-Fusionsprotein (hHSDL1-GFP) eine Translokation in besagtes Kompartiment nachgewiesen werden. Erstaunlich in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, daß das fusionierte GFP, anders als beispielsweise im Falle von hCBR4 beobachtet, keinerlei Einfluss auf die korrekte Auslieferung des Proteins in der Zelle nimmt, unabhängig vom Terminus seiner Fusion. Ein frei zugängliches Amino- oder Carboxyende scheint für den Transport von hHSDL1 in die Mitochondrien demzufolge nicht von Nöten zu sein. Weiter bleibt festzuhalten, daß das Level der Expression, basierend auf dem Vektor pAcGFP1-N1, im Falle von hHSDL1 dem des N-terminalen Pendants gleichkam und somit für eine eindeutige Bestimmung der subzellulären Lokalisation weitaus ausreichte. Die aufgrund seines intensiven Fluoreszenzmusters eindeutigste Expression in den Mitochondrien zeigte allerdings das mit einem Myc-His-Epitop am C-Terminus (hHSDL1-myc-his) versehene Volle-Länge-Protein (Abbildung nicht gezeigt).

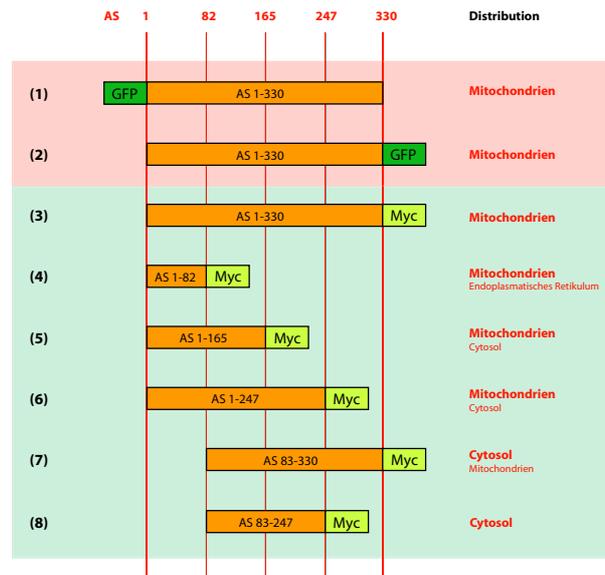
Vergleicht man das Ergebnis der experimentellen Studien zur subzellulären Lokalisation von hHSDL1 mit den bioinformatisch getroffenen Vorhersagen, so fällt auf, daß wiederum lediglich zwei aus sieben Servern den tatsächlichen Bestimmungsort des Proteins richtig prognostiziert hatten. Daraus errechnet sich eine Erfolgsquote von 28,57 %. Die aufgrund der Verwandtschaft zu den 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen Typ 3 und 12 vermutete Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum stellte sich als falsch heraus.



**Abbildung 2.18:** hHSDL1 unterliegt sowohl als N- als auch als C-terminales Fusionsprotein einer Translokation in die Mitochondrien. Sowohl GFP-hHSDL1 (1) als auch hHSDL1-GFP (2) werden nach ihrer Expression in die Mitochondrien transloziert. Beide Abbildungen zeigen jeweils die Gegenfärbung des Zellkerns (A) und der Mitochondrien (B), die Detektion des rekombinanten hHSDL1-Proteins (C) und eine Überlagerung der einzelnen Fluoreszenzmuster (D). Etwaige Hintergrundfluoreszenz beruht auf der Überlappung der Trennungsgrenzen der verwendeten Filter.

**Eine exklusive Verteilung von hHSDL1 in die Mitochondrien nur in Anwesenheit von N- und C-Terminus sichergestellt.** Vergleichbar mit den durchgeführten Versuchen zu hDHRS1 erforderte auch die Suche nach möglichen Signalsequenzen in der Primärstruktur von hHSDL1 die Generierung und Expression zahlreicher verkürzter Fusionsproteine. Um die für seine Translokation in die Mitochondrien essentiellen Abschnitte in der Proteinsequenz ausfindig zu machen, wurden auch im Falle von hHSDL1 jeweils um ein Viertel (das entspricht hier etwa 82 Aminosäuren) des 330 Aminosäure langen Gesamtproteins trunkierte Myc-His-Fusionsproteine (vergleiche Abbildung 2.19) auf ihren Bestimmungsort in den verwendeten HeLa-Zellen überprüft.

Angelehnt an Fachliteratur wurde zunächst der N-Terminus des hHSDL1-Proteins auf eine für den Proteintransport in die Mitochondrien bedeutende Information untersucht. Bereits die Expression lediglich der ersten 82 Aminosäuren des Proteins hHSDL1 in C-terminaler Fusion mit einem Myc-His-Epitop (Fusionsprotein hHSDL1trunkiert(AS1-82)-Myc-His, (4)) war ausreichend, um eine überwiegend erfolgreiche Translokation in die Mitochondrien zu gewährleisten. Lediglich in einem geringen Anteil an Zellen erreichte das exprimierte Protein sein Zielkompartiment nicht und zeigte stattdessen ein ER-charakteristisches Verteilungsmuster. Auch die schrittweise Verlängerung des C-Terminus (Fusionsproteine hHSDL1trunkiert(AS1-165)-myc-his, (5) und hHSDL1trunkiert(AS1-247)-myc-his, (6)) führte nicht zu einer exklusiven Auslieferung in die Mitochondrien, allerdings schien der kleine, nicht seinen Bestimmungsort erreichende Anteil an exprimiertem Fusionsprotein diesmal im Cytosol zu verbleiben, zu erkennen an einem, sich über das komplette Zellvolumen erstreckenden, fluoreszierenden Schatten. Die Situation bei Verlust der carboxyständigen Aminosäurereste zeigte sich spiegelbildlich. Während der Großteil an Fusions-



**Abbildung 2.19:** Zusammenfassung aller generierten hHSDL1-Fusionsproteine. Die gezeigte Aufstellung umfasst sowohl Volle-Länge- ((1)-(3)) als auch verkürzte Fusionsproteine ((4)-(8)). Aufgrund der jeweils ermittelten subzellulären Lokalisationen ist abzuleiten, daß sowohl das Amino- (Aminosäuren 1-82) als auch das Carboxyende (Aminosäuren 248-330) für die Translokation von hHSDL1 in die Mitochondrien essentielle Informationen beherbergen.

protein hHSDL1trunkiert(AS83-330)-myc-his ((7)) eine cytosolische Distribution aufweist, kann in einigen wenigen Zellen darüberhinaus eine schwache Translokationsrate in die Mitochondrien vermutet werden. Mit Trunkierung sowohl des N- als auch des C-Terminus (Fusionsprotein hHSDL1trunkiert(AS83-247)-myc-his ((8)) geht jegliche für die Translokation in die Mitochondrien essentielle Information verloren, es ist eine ausschließlich cytosolische Distribution von hHSDL1trunkiert(AS83-247)-myc-his in den Hela-Zellen zu beobachten. Offensichtlich ist die Kombination beider Termini für einen exklusiven Transport ins Zielkompartiment unentbehrlich. Eine mögliche Hypothese zu ihrem Zusammenwirken findet sich unter 3.3.4.

### Zusammenfassung der Studien zur subzellulären Lokalisation

**Humanes CBR4 (hCBR4) ist ein mitochondriales Protein.** Aufgrund einer innerhalb der aminoterminalen Aminosäuren 1-82 hinterlegten Information wird das Protein verlässlich in sein Zielkompartiment transloziert. Der tatsächliche Bestimmungsort wurde von 57,14 % der bioinformatischen Server richtig vorhergesagt, seine Lokalisation in den Mitochondrien unterscheidet hCBR4 von anderen Mitgliedern der Carbonylreduktase-Familie.

**Humanes DHRS1 (hDHRS1) ist ein Protein des Endoplasmatischen Retikulums.** Seine exklusive Distribution ins Zielkompartiment wird durch die Anwesenheit von N- (Aminosäuren 1-78) und C-Terminus (Aminosäuren 236-313) gewährleistet. Eine mit Expression von hDHRS1 einhergehende Veränderung der Mitochondrienverteilung liegt nicht in einer proapoptotischen Wirkung von hDHRS1 begründet. Keiner der verwendeten Server stellte eine korrekte Prognose bezüglich

des tatsächlichen Bestimmungsortes.

**Humanes DHRS6 (hDHRS6) zeigt eine cytosolische Verteilung.** Seine tatsächliche subzelluläre Lokalisation errechneten lediglich 14,29 % der verwendeten Server richtig. In Kombination mit den durchgeführten phylogenetischen Analysen liefert die Bestimmung der cytosolischen Distribution von hDHRS6 weitere Hinweise auf die mögliche Existenz einer cytosolischen Typ II R- $\beta$ -Hydroxybutyratdehydrogenase (BDH).

**Humanes HSDL1 (hHSDL1) lokalisiert in den Mitochondrien.** Eine ausschließliche Verteilung zum Bestimmungsort wird nur in Anwesenheit von Amino- (Aminosäuren 1-82) und Carboxyende (Aminosäuren 248-330) des Proteins sichergestellt. Die Mitochondrien als tatsächliches Zielkompartiment prognostizierten 28,57 % der verwendeten bioinformatischen Server. Die aufgrund der Verwandtschaft zu den 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen Typ 3 und 12 vermutete Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum stellte sich als falsch heraus.

## 2.2.4 Untersuchungen zur Gewebeverteilung

Vergleichbar mit den Studien zur subzellulären Lokalisation wurde auch im Rahmen der Untersuchungen zur Gewebeverteilung sowohl ein theoretischer als auch ein experimenteller Lösungsansatz zur Bestimmung des gewebespezifischen Expressionsmusters der ausgewählten Kandidatenproteine gewählt. Eine bioinformatische Analyse unter Verwendung eines am Helmholtz Zentrum München entwickelten automatisierten *in silico* Northern Blots (ISNB) und dem öffentlich verfügbaren Tool Unigene sollte zunächst erste Anhaltspunkte über die Verteilung der zu untersuchenden SDR-Enzyme im menschlichen Körper liefern. Nach Vergleich der auf diese Weise vorhergesagten Expressionsmuster mit den zum Teil bereits ermittelten Gewebeverteilungen der im Rahmen der phylogenetischen Analysen ausgewiesenen Verwandten, wurden diese anschließend durch mRNA-Nachweis überprüft. Hierfür war in erster Linie der Einsatz von Northern Blot-Technologie vorgesehen, alternativ kam die Methode der quantitativen RealTime-PCR zum Einsatz.

### Bioinformatische Analyse des Expressionsmusters

Durch den sich ständig vergrößernden, in öffentlich zugänglichen Datenbanken hinterlegten Datenbestand an ESTs (*expressed sequence tags*) ist es möglich geworden, bereits im Vorfeld einer experimentellen Untersuchung Kenntnisse über die Gewebespezifität zu charakterisierender Proteine, bzw. der ihnen zugrunde liegenden mRNA zu gewinnen. Da eine auf ESTs basierende bioinformatische Analyse des Genexpressionsmusters der oftmals zu diesem Zweck im Experiment angewendeten Northern Blot-Technologie gleicht, wird sie gemeinhin als *in silico* Northern Blot (ISNB) bezeichnet. Während seine Durchführung früher auf einer manuellen BLAST-Suche gegen EST-Datenbanken und dem anschließenden gewebespezifischen Summieren der gefundenen Übereinstimmungen beruhte, so stehen heute zahlreiche automatisierte Verfahren zur Verfügung von denen zwei repräsentativ in vorliegender Arbeit Anwendung fanden. Angemerkt sei an dieser Stelle, daß die aus beiden Verfahren erzielten Ergebnisse lediglich hinsichtlich der auch im Rahmen der experimentellen Untersuchung (Northern Blot) in Betracht gezogenen Gewebe ausgewertet wurden.

**ISNB.** Die Verwendung des von der Gruppe BioDV am Institut für Experimentelle Genetik (Helmholtz Zentrum München) entwickelten Tools ermöglichte sowohl die Bestimmung des generellen Levels der Expression als auch des Auftretens und der Anzahl an Transkripten in bestimmten Geweben im Verhältnis zu anderen. Besagtes Programm bedient sich dabei einem automatischen Abgleich einer gegebenen mRNA-Sequenz von Interesse mit einer EST-Datenbank des entsprechenden Organismus unter Verwendung von `blastn`, verfügbar bei NCBI. Die erhaltenen Resultate werden daraufhin hinsichtlich spezifischer Transkripte überprüft, eine Kongruenz mit dem Gen von Interesse wird bei einer Sequenzidentität von  $\geq 85\%$  angenommen. Ermittelte ESTs werden auf Informationen bezüglich ihres Ursprungsgewebes untersucht und können abschließend aufgrund der erhaltenen Daten quantitativ ausgewertet werden.

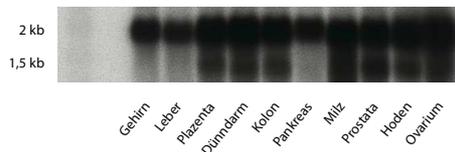
**UniGene.** Alternativ zum vom Helmholtz Zentrum München entwickelten ISNB kam zur bioinformatischen Analyse von mRNA-Expressionsmustern die Anwendung UniGene, verfügbar auf der NCBI-Webseite, zum Einsatz. Bei UniGene handelt es sich um ein experimentelles System zur automatischen Aufteilung von GenBank-Sequenzen in ein nicht-redundantes Set von Genorientierten Clustern aufgrund von DNA-Sequenzhomologien. Jedes UniGene-Cluster beinhaltet Sequenzen, die ein einziges Gen repräsentieren sowie mit ihm verknüpfte Informationen bezüglich der Gewebetypen, in denen das Gen exprimiert wurde, oder der Kartierung. Eine durchgeführte Suchanfrage liefert eine Aufzählung an ESTs mit starker Sequenzhomologie zur Quelle, analysiert nach ihrer Gewebeverteilung. In Konsequenz wird ein Expressionsprofil vorgeschlagen.

### **Experimentelle Untersuchung der Gewebeverteilung**

Die Verifizierung der auf bioinformatischem Wege gewonnenen Hinweise hinsichtlich des Expressionsmusters der zu untersuchenden SDR-Proteine erfolgte durch den Nachweis der ihnen zugrundeliegenden mRNA in den unterschiedlichen humanen Geweben. Generell stehen zur Detektion bestimmter mRNAs und der Bestimmung ihrer Menge in einer Probe an Total- oder Poly(A)-RNA eine Vielzahl an weit verbreiteten Methoden zur Verfügung. In dieser Arbeit fand zunächst die Technologie der Northern Blot-Analyse Anwendung. Wenngleich sie in ihrer Sensitivität im Vergleich zu anderen Verfahren deutliche Defizite aufweist, versprach ihr Einsatz neben einem vermeintlich einfachen Handling die Möglichkeit einer ungefähren Abschätzung der Transkriptgröße als auch der Identifizierung alternativer Splice-Varianten. Für den Kandidaten hCBR4 wurde die experimentelle Untersuchung seiner Gewebeverteilung darüberhinaus mittels quantitativer RealTime-PCR durchgeführt. Ihre Verwendung erlaubt es in Theorie das RNA-Transkript eines jeden Genes zu detektieren, unabhängig von der zur Verfügung stehenden Menge an Startmaterial oder der relativen Menge der spezifischen mRNA. Insbesondere letzteres, also die Möglichkeit eines Nachweises auch von Genen niedrigen Expressionslevels, ließ die quantitative RealTime-PCR zur zweiten Methode der Wahl werden.

**Northern Blot** Die Durchführung der Genexpressionsanalysen mittels Northern Blot erfolgte, wie unter 4.5.4 beschrieben, durch Hybridisierung der vorgefertigten Northern Blot-Membran First-Choice Northern Human Blot II von Ambion. Als Hybridisierungssonden (DNA) kamen hierbei jeweils Volle-Länge-PCR-Amplifikate der CDS der zu untersuchenden SDR-Kandidaten zum Einsatz. Die zur Amplifikation verwendeten Primer sind dem Anhang zu entnehmen. Zur Qualitäts-

kontrolle der Northern Blot-Membran wurde wiederholt ein spezifisches Fragment der CDS des humanen housekeeping-Gens  $\beta$ -Actin an die Membran hybridisiert. Wie erwartet konnten etwa gleichwertige Mengen an RNA in jeder Blot-Spur detektiert werden. Lediglich die mit mRNA aus Gehirn, Leber und Pankreas immobilisierten Spuren zeigten geringfügig kleinere Mengen an  $\beta$ -Actin (vergleiche Abbildung 2.20)



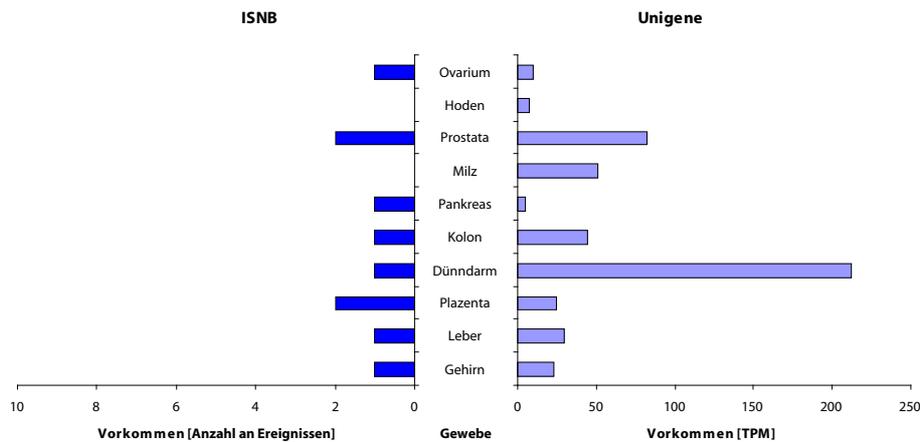
**Abbildung 2.20:** Northern Blot unter Verwendung einer  $\beta$ -Actin-Sonde zur Qualitätskontrolle. Die hybridisierte Membran FirstChoice Northern Human Blot II zeigt etwa gleichwertige Mengen an RNA in jeder Blot-Spur. Lediglich die mit mRNA aus Gehirn, Leber und Pankreas immobilisierten Spuren weisen geringfügig kleinere Mengen an  $\beta$ -Actin auf.

**Quantitative RealTime-PCR** Ergänzend zur Ermittlung der Gewebeverteilung auf mRNA-Ebene mittels Northern Blot-Technologie wurde im Rahmen dieser Arbeit für den Kandidaten hCBR4 ein Expressionsprofil durch quantitative RealTime-PCR unter Verwendung des Tissue Scan<sup>TM</sup> Human Major Tissue qPCR Arrays von Origene erstellt. Eine detaillierte Versuchsbeschreibung findet sich unter 4.4.7, die eingesetzten Primerpaare sind im Anhang aufgeführt (vergleiche A.3.2). Die Auswertung der Ergebnisse der quantitativen RealTime-PCR erfolgte nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Eine Normalisierung wurde sowohl gegen den Housekeeper GAPDH als auch gegen das niedrigste Expressionslevel durchgeführt.

### Humanes CBR4 ist ubiquitär exprimiert mit höchstem Expressionslevel in Magen, Hypophyse und Uterus

**In silico Northern Blots lassen eine ubiquitäre Gewebeverteilung vermuten.** Abbildung 2.21 fasst die Ergebnisse der *in silico* Northern Blots zusammen. Wenngleich die voneinander unabhängigen Tools ISNB und Unigene das höchste Level der Expression in unterschiedlichen Geweben zeigen (ISNB: Plazenta und Prostata; Unigene: Dünndarm und Prostata), ist aus den Ergebnissen beider bioinformatischen Analysen ein relativ ubiquitäres Expressionsmuster hCBR4s abzuleiten. Allen analysierten Geweben waren im Rahmen der automatisierten Datenbankrecherche ESTs hoher Sequenzhomologie zu hCBR4 zuzuordnen. Die Vorhersage der allgegenwärtigen Verteilung deckt sich mit dem bereits experimentell verifizierten Expressionsprofil der zumindest annotativ verwandten Carbonylreduktase des Typs 1 [59] [215] [216].

**Quantitative RealTime-PCR offenbart ubiquitäre Gewebeverteilung mit starker Expression in Magen, Hypophyse und Uterus.** Die im Zuge der Ermittlung des Expressionsprofils des SDR-Kandidaten hCBR4 durchgeführte Northern Blot-Analyse schlug fehl. Trotz mehrfacher Wiederholung und zahlreichen Versuchen der Optimierung des Experiments konnten weder unter Verwendung von Fuji-Phosphorimager-Platten noch autoradiographisch Signale auf der Northern



**Abbildung 2.21:** *In silico* Northern Blots lassen eine ubiquitäre Gewebeverteilung des Proteins hCBR4 vermuten. Trotz Abweichungen in den Ergebnissen hinsichtlich der Gewebe höchsten Expressionslevels zeigen ISNB (links) und Unigene (rechts) eine ubiquitäre Verteilung aller identifizierten ESTs über die analysierten Gewebe.

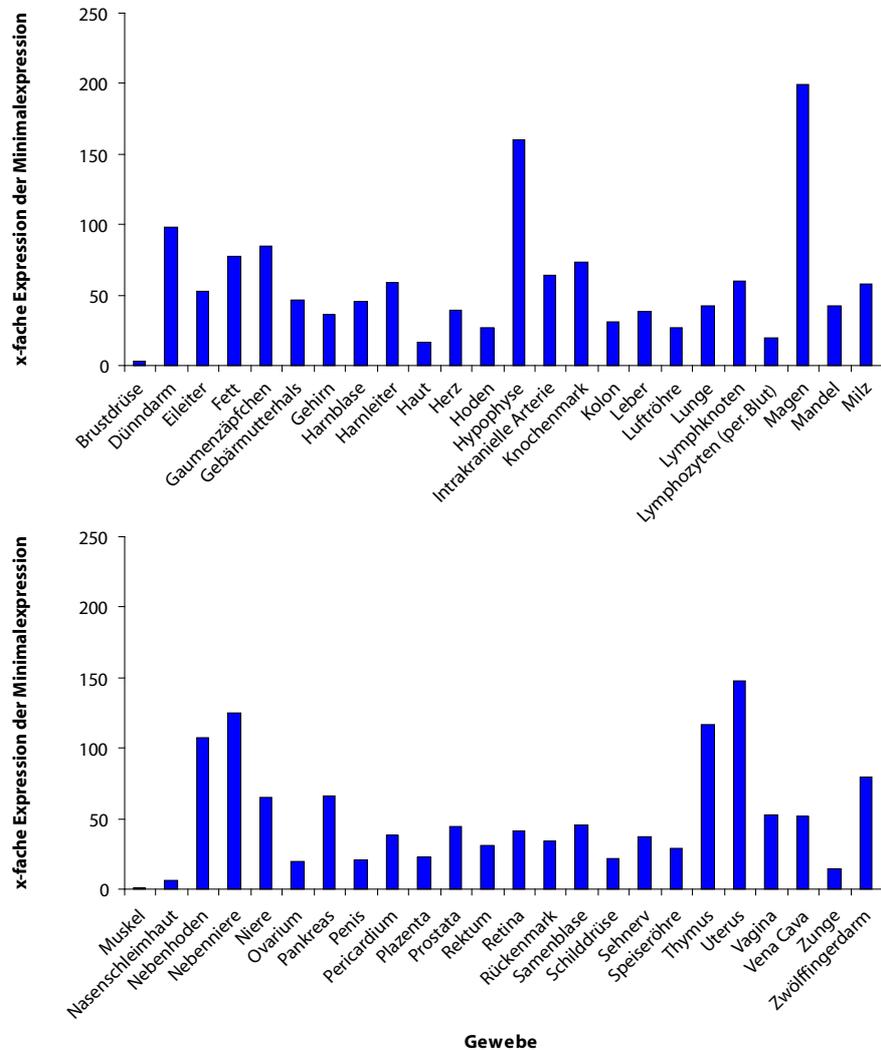
Blot-Membran detektiert werden. Offenbar ist das generell niedrige Level der hCBR4-Expression mittels der gewählten Technologie nicht detektierbar. Aufgrund ihrer bereits beschriebenen Unabhängigkeit von der relativen Menge an spezifischer mRNA in einer Probe wurde nach Scheitern der Northern Blot-Experimente zur Bestimmung der Gewebeverteilung des Kandidaten hCBR4 eine quantitative RealTime-PCR unter Verwendung des Tissue Scan<sup>TM</sup> Human Major Tissue qPCR Arrays durchgeführt. Die hierfür verwendeten Primer sind dem Anhang zu entnehmen. Abbildung 2.22 zeigt das ermittelte Expressionsprofil.

Aus dem dargestellten Diagramm geht deutlich hervor, daß es sich bei hCBR4 um ein ubiquitär exprimiertes Protein handelt. Die ihm zugrunde liegende mRNA konnte in allen 48 analysierten Geweben detektiert werden. Das Gewebe der geringsten Expression stellt dabei das Muskelgewebe dar, dessen  $C_t$ -Werte neben den für das housekeeping-Gen GAPDH gemessenen zur Normalisierung dienen. Auffällig im Expressionsprofil ist die hohe Expression von hCBR4 in Magen, Hypophyse und Uterus. Sie nimmt Werte zwischen dem etwa 150fachen (Hypophyse und Uterus) und dem 200fachen (Magen) des Minimalwertes (Expression in Muskel) an.

Werden zum Vergleich erneut die Ergebnisse der bioinformatischen Analyse herangezogen, muß festgestellt werden, daß sowohl der theoretische als auch der experimentelle Ansatz eine allgegenwärtige Gewebeverteilung von hCBR4 offenbaren und somit eine Übereinstimmung vorliegt. Es bleibt dennoch anzumerken, daß den im *in silico* Northern Blot am meisten EST zugeordneten Geweben Dünndarm, Plazenta und Prostata mittels quantitativer RealTime-PCR lediglich eine durchschnittliche Expression nachgewiesen werden konnte.

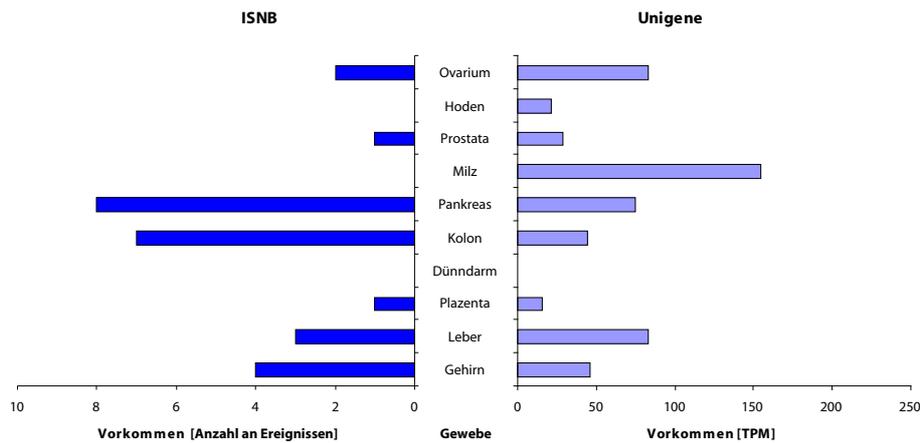
### Humanes DHRS1 wird vorwiegend in Dünndarm, Kolon und Milz exprimiert

**Bioinformatik erlaubt Schluß auf eine allgegenwärtige Verteilung.** Die Ergebnisse der *in silico* Northern Blots für hDHRS1 gleichen in ihrer Tendenz den bereits für hCBR4 beschriebenen. Wiederum fällt eine Diskrepanz in den Resultaten bezüglich der Gewebe höchsten Expression auf. Während ISNB die größte Anzahl an hDHRS1 sequenzhomologen ESTs in Pankreas und Kolon



**Abbildung 2.22:** Quantitative RealTime-PCR offenbart ubiquitäre Gewebeverteilung mit starker Expression in Magen, Hypophyse und Uterus. In allen 48 analysierten Geweben konnten hCBR4-Transkripte identifiziert werden. Die höchste Expression an hCBR4 zeigen die Gewebe Magen, Hypophyse und Uterus, als Gewebe der geringsten Expression wurde die Muskulatur identifiziert.

identifiziert, so ordnet Unigene der Milz die meisten transkribierten Nukleotidsequenzen zu (vergleiche Abbildung 2.23). Eine Übereinstimmung kann lediglich dahingehend festgestellt werden, daß beide Anwendungen ESTs aus allen analysierten Geweben identifizieren konnten, eine Ausnahme bildet jeweils das Dünndarmgewebe. Außer dem Schluß auf eine ubiquitäre Expression von hDHRS1 lassen die durchgeführten bioinformatischen Analysen keine Folgerungen zu. Aufgrund der Tatsache, daß hDHRS1 lediglich über uncharakterisierte Proteine in phylogenetischer Nachbarschaft verfügt, konnten anhand von Verwandtschaftsverhältnissen keine zusätzlichen Informationen gewonnen werden.

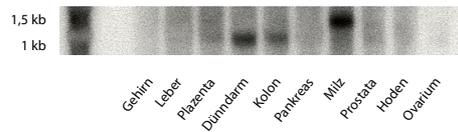


**Abbildung 2.23:** Bioinformatik erlaubt Schluß auf eine allgegenwärtige Verteilung des Proteins hDHRS1. Aufgrund der gravierenden Unterschiede hinsichtlich der Gewebe höchsten Expressionslevels lassen die Ergebnisse, erzielt mit den Anwendungen ISNB (links) und Unigene (rechts) lediglich die Folgerung einer ubiquitären Verteilung von hDHRS1 über die analysierten Gewebe, ausgenommen dem Dünndarm, zu.

### **Dünndarm, Kolon und Milz werden mittels Northern Blot als hDHRS1 exprimierende Gewebe identifiziert.**

Während sich die Northern Blot-Technologie im Falle von hCBR4 aufgrund ihrer geringen Sensitivität als ungeeignet herausstellte, zeigt sie sich im Rahmen der Erstellung des Expressionsprofils von hDHRS1 als ideale Methode der Wahl. Wie aus Abbildung 2.24 hervorgeht, konnte autoradiographisch eine starke Expression in den Geweben Dünndarm, Kolon und Milz nachgewiesen werden, eine aufgrund der bioinformatischen Analysen erwartete mehr oder weniger ubiquitäre Gewebeverteilung der hDHRS1-mRNA kann allenfalls erahnt werden. Die detektierten Signalintensitäten identifizieren den Dünndarm eindeutig als Gewebe der höchsten hDHRS1-Expression. Darüberhinaus ist das Auftreten unterschiedlicher Bandengrößen auf der Northern Blot-Membran auffällig. Die Spuren, immobilisiert mit mRNA, isoliert aus Dünndarm und Kolon weisen Signale bei einer Transkriptgröße von etwa 1,1 kb aus (evtl. auch schwach für Leber, Plazenta, Prostata, Hoden und Ovarium), die Bandengröße detektiert für das Milzgewebe (evtl. auch schwach für Plazenta und Prostata) beträgt etwa 1,5 kb. Gemachte Beobachtung deutet auf die Möglichkeit alternativer Splice-Varianten hin. Die erzielten Ergebnisse gleichen im Wesentlichen einer Expressionsanalyse von hDHRS1 in acht adulten humanen Geweben [218] und erweitern dessen Expressionsprofil um die Gewebe Dünndarm, Hoden, Kolon, Milz, Ovarium und Prostata.

## 2 Ergebnisse

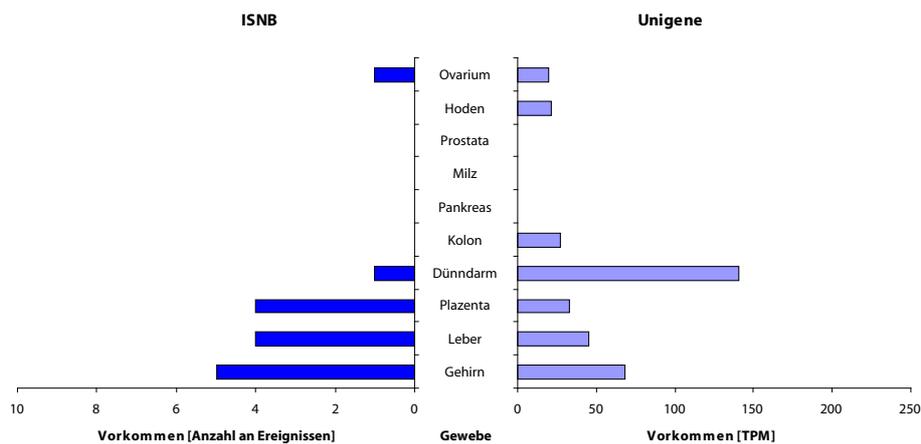


**Abbildung 2.24:** Dünndarm, Kolon und Milz werden mittels Northern Blot als hDHRS1 exprimierende Gewebe identifiziert. Die autoradiographische Auswertung erlaubt einen eindeutigen Nachweis von hDHRS1-mRNA in Dünndarm, Kolon und Milz. Eine ubiquitäre Gewebeverteilung ist aufgrund der ansonsten schwachen Expression lediglich zu erahnen. Auffällig sind zwei unterschiedliche Transkriptgrößen bei 1,1 kb und 1,5 kb.

Eine finale Gegenüberstellung der Ergebnisse aus *in silico* und experimentellem Northern Blot zeigt auf, daß zwar eine Übereinstimmung bezüglich eines hohen Expressionslevels von hDHRS1 in Kolon und Milz besteht, der Nachweis von mRNA im Dünndarmgewebe allerdings lediglich im praktischen Ansatz erbracht werden konnte. Weder ISNB noch Unigene konnten im Vorfeld ESTs besagtem Gewebe zuordnen.

### Humanes HSDL1 weist eine vorherrschende Expression in reproduzierendem Gewebe auf

**In silico Northern Blots deuten auf Expression in steroidogenem Gewebe hin.** Während die unterschiedlichen bioinformatischen Ansätze zur Bestimmung der Gewebespezifität der zu untersuchenden SDR-Kandidaten bislang stark divergierende Ergebnisse lieferten, so gleichen sich im Falle von hHSDL1 die erzielten Resultate aus ISNB- und Unigene-Analyse. Beide Anwendungen ordnen jeweils die größte Anzahl an hHSDL1 homologen ESTs dem Gehirn, der Leber und der Plazenta zu (vergleiche Abbildung 2.25), Geweben, die am lokalen Steroidmetabolismus beteiligt sind und nachgewiesenermaßen die nah verwandten Proteine 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen Typ 3 [35] [61] [63] [79] [190] und 12 [118] [137] [176] exprimieren. Unigene identifiziert darüber hinaus den Dünndarm als Gewebe höchster Expression.



**Abbildung 2.25:** *In silico* Northern Blots deuten auf Expression von hHSDL1 in steroidogenem Gewebe hin. Sowohl ISNB (links) als auch Unigene (rechts) identifizieren die größte Anzahl an homologen ESTs im Gehirn, der Leber und der Plazenta. Darüberhinaus zeigt Unigene ein hohes Expressionslevel im Dünndarmgewebe auf.

**Northern Blot weist hHSDL1-mRNA in reproduzierendem Gewebe nach.** hHSDL1 zeigt nach autoradiographischer Auswertung der hybridisierten Northern Blot-Membran eine im Gesamten lediglich schwache Expression. Trotz der geringen Signalintensitäten ließ sich die bioinformatisch prognostizierte relativ ubiquitäre Gewebeverteilung im Experiment bestätigen, in fast allen Geweben konnte entsprechende mRNA nachgewiesen werden (vergleiche Abbildung 2.26). Auffällig in diesem Zusammenhang ist eine Dominanz der Signale in reproduzierendem Gewebe (Hoden, Ovarien und Prostata). Die erzielten Ergebnisse bestätigen eindrucksvoll das Expressionsprofil, das im Zuge der Identifizierung des hHSDL1-Gens diskutiert wurde [83].



**Abbildung 2.26:** Northern Blot weist hHSDL1-mRNA in reproduzierendem Gewebe nach. Trotz des relativ geringen Expressionslevels kann in nahezu allen Geweben hHSDL1-mRNA detektiert werden, eine vorherrschende Expression ist in den Hoden, den Ovarien und der Prostata zu verzeichnen.

Nach der experimentellen Verifizierung der Gewebeverteilung von hHSDL1 muß bezugnehmend auf die erläuterten bioinformatischen Ergebnisse festgestellt werden, daß sich die erwartete starke Expression in steroidogenem Gewebe nicht bestätigen ließ. Stattdessen zeigten sich im Experiment eindeutige Signale in reproduzierenden Geweben, diese waren in der *in silico*-Analyse nicht in Erscheinung getreten.

### Zusammenfassung der Untersuchungen zur Gewebeverteilung

Tabelle 2.8 fasst die für die zu untersuchenden SDR-Kandidaten ermittelten Expressionsprofile zusammen.

**Tabelle 2.8:** Zusammenfassung der Untersuchungen zur Gewebeverteilung

SDR-Kandidat	Expressionsprofil
hCBR4	ubiquitär, höchste Expression in Magen, Hypophyse und Uterus
hDHRS1	ubiquitär, höchste Expression in Dünndarm, Kolon und Milz
hHSDL1	ubiquitär, höchste Expression in Hoden, Ovarium und Prostata

### 2.2.5 Bestimmung der Substratspezifität

Die Familie der Short-Chain-Dehydrogenasen/Reduktasen zeichnet sich, wie bereits aus 1.1.4 hervorgeht, durch ein äußerst breites Substratspektrum aus. Ihre Mitglieder nehmen entscheidende Stellungen im Aminosäure-, Fettsäure-, Gallensäure-, Prostaglandin-, Retinoid-, Steroid- und Zuckermetabolismus ein und sind somit in fast alle Bereiche des Intermediärstoffwechsels involviert. Aus diesem Grund kommt die Bestimmung ihres natürlichen Substrats der Suche einer

Nadel im Heuhaufen gleich und stellt in Folge dessen die größte Herausforderung im Rahmen der umfassenden Charakterisierung von SDR-Kandidatenproteinen dar.

### **Entwicklung unterschiedlicher Strategien zur Bestimmung der Substratspezifität der ausgewählten SDR-Kandidaten**

Aufgrund der geschilderten Vielseitigkeit der Short-Chain-Dehydrogenasen/Reduktasen und den damit verbundenen, schwierigen Voraussetzungen hinsichtlich der Aufklärung ihrer enzymatischen Aktivität, wurden zur Bestimmung der Substratspezifität der zu charakterisierenden SDR-Kandidaten verschiedene Herangehensweisen gewählt. Zunächst erfolgte die Überprüfung des Umsatzes ausgewählter, Tritium-markierter Substanzen durch die in Zellkultur exprimierten SDR-Enzyme in einem auf den Arbeiten von Castagnetta et al. [28] basierenden *in vivo*-System. Darüberhinaus umfasste die durchzuführende Charakterisierung der neuen Mitglieder der SDR-Proteinfamilie die Untersuchung ihrer Spezifität hinsichtlich weiterer Substanzklassen (Chinone, CoA-konjugierte Fettsäuren, Prostaglandine und Retinoide) unter Verwendung von nichtradioaktiven Substraten und Zugabe spezifischer Cofaktoren im *in vitro*-System.

Um das umfangreiche Spektrum an potentiellen Substraten der SDR-Enzyme best möglich abzudecken war als ergänzendes Vorgehen die Überprüfung einer Substratbibliothek im Rahmen einer Fluoreszenz-basierten Cofaktor-Bindungsstudie in Kooperation mit Herrn Dr. Udo Oppermann vom Structural Genomics Consortium (SGC) in Oxford/UK angestrebt. Da geplanter Assay allerdings die Verfügbarkeit von aufgereinigtem Protein voraussetzt, war vor Beginn der Messungen die Expression und Aufreinigung der zu untersuchenden SDR-Kandidaten im großen Maßstab durchzuführen. Die im Zuge dessen gewählte Vorgehensweise sowie die erzielten Resultate werden gesondert in Kapitel 2.2.6 erörtert.

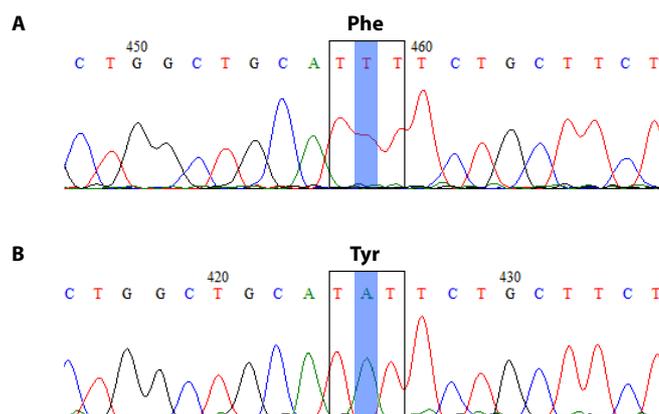
Ein alternativer Ansatz widmete sich nicht den potentiellen Substraten der zu untersuchenden SDR-Kandidatenproteine, sondern den nach ihrer Expression in humaner Zellkultur nachzuweisenden Produkten. Durch Vergleich des entstandenen metabolischen Umfelds mit dem einer Leerkontrolle, jeweils ermittelt unter Verwendung eines FT-ICR-Massenspektrometers, und der Detektion von Unterschieden in den entsprechenden Produktzusammenstellungen sollten wichtige Hinweise auf die Art der katalysierten Reaktionen gewonnen und somit Rückschlüsse auf natürliche Substrate der zu untersuchenden SDR-Kandidaten und deren Funktion im metabolischen Kontext gezogen werden.

**Die Zelllinie.** Sämtliche Assays in humaner Zellkultur (*in vivo*-, *in vitro*-Assay, Untersuchungen hinsichtlich des metabolischen Umfelds) wurden unter Verwendung der humanen embryonalen Nierengewebs-Zelllinie HEK293 durchgeführt. Die Wahl besagter Zelllinie basierte sowohl auf Erfahrungswerten von Frau Dr. Brigitte Keller und Frau Dr. Rebekka Mindnich als auch auf Literaturrecherche [83].

**Die Expressionskonstrukte.** Die Generierung der für die Assays in humaner Zellkultur erforderlichen Expressionskonstrukte erfolgte durch Subklonierung der CDS der Gene von Interesse in den Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen). Die Volle-Länge-CDS der SDR-Kandidaten von Interesse wurde durch PCR-Amplifikation auf entsprechender Plasmid-DNA (RZPD) oder im Falle von

hHSDL1 auf cDNA der humanen Zelllinie HEK293 gewonnen. Die zur Subklonierung verwendeten Primerpaare gehen aus dem Anhang hervor (vergleiche A.3.1).

**Wiederherstellung der SDR-typischen katalytischen Triade hHSDL1s durch gezielte Aminosäuresubstitution.** Die detaillierte Sequenzanalyse offenbarte eine Aminosäuresubstitution innerhalb der katalytischen Triade des SDR-Kandidaten hHSDL1 (vergleiche 2.2.1). Der Austausch des zentralen polaren Tyrosins gegen ein unpolares Phenylalanin und die damit einhergehende drastische Veränderung des für die Familie der Short-Chain-Dehydrogenasen/Reduktasen typischen aktiven Zentrums ließ auf eine mögliche katalytische Inaktivität des Enzyms schließen. Zur Überprüfung aufgestellter Hypothese, die im eindeutigen Widerspruch zur einzig bislang verfügbaren Veröffentlichung bezüglich hHSDL1 steht [83], wurde hinsichtlich der Untersuchungen zur Substratspezifität ein weiteres Expressionskonstrukt generiert, welches die Expression einer hHSDL1-Variante mit vermeintlich intakter katalytischer Triade (im Folgenden **hHSDL1(F218Y)**) zur Folge haben sollte. Die hierfür benötigte Substitution des vorhandenen Phenylalanins gegen Tyrosin erfolgte durch PCR-basierte, zielgerichtete Mutagenese. Die eingefügte Punktmutation innerhalb des für die entsprechende Aminosäure kodierenden Basen-Triplets wurde durch DNA-Sequenzierung verifiziert (vergleiche Abbildung 2.27).

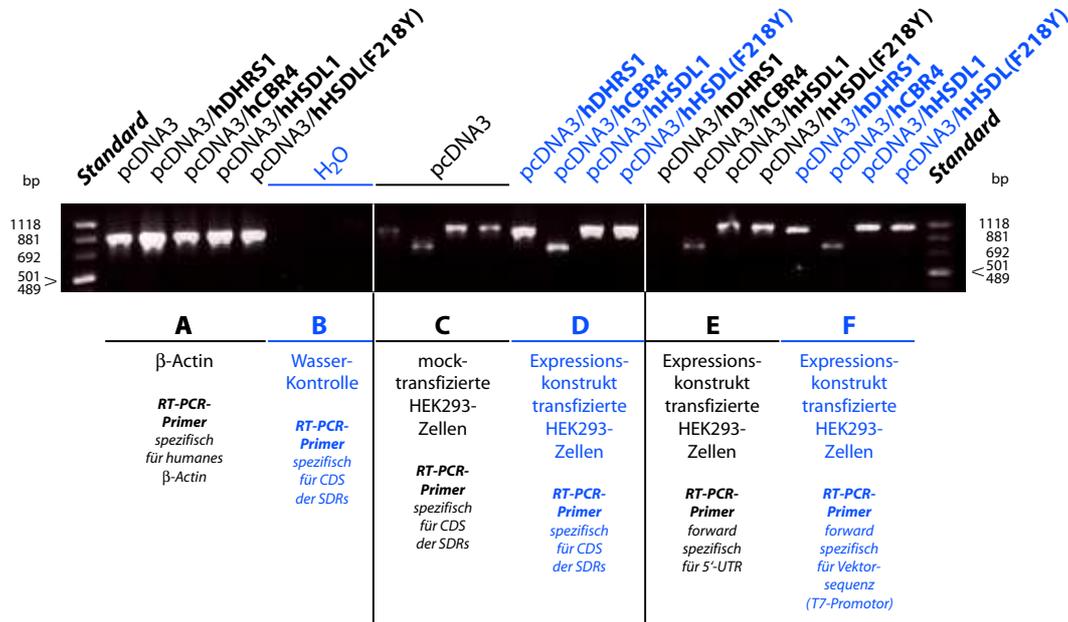


**Abbildung 2.27:** Wiederherstellung der SDR-typischen katalytischen Triade hHSDL1s durch gezielte Aminosäuresubstitution. Durch PCR-basierte, zielgerichtete Mutagenese (Punktmutation) wurde das für das Phenylalanin kodierende Basen-Triplett (TTT) in der CDS des hHSDL1 (A) gegen ein für Tyrosin kodierendes Triplett (TAT) substituiert (B). Generiertes Expressionskonstrukt sollte die Expression einer hHSDL1-Variante mit vermeintlich intakter katalytischer Triade (im Folgenden **hHSDL1(F218Y)**) zur Folge haben.

**Verifizierung der Kandidatenexpression in HEK293-Zellen durch mRNA-Nachweis.** Da es sich bei allen Proteinen von Interesse um bislang uncharakterisierte Mitglieder der SDR-Proteinfamilie handelt, waren zu Beginn der experimentellen Untersuchungen keine spezifischen Antikörper zur Detektion der Proteinexpression in den verwendeten HEK293-Zellen verfügbar. Ein proteinchemischer Nachweis eines fusionierten Tags war aufgrund der nativen Expression der SDR-Kandidaten ausgehend vom Vektor pcDNA3 ebenfalls nicht möglich.

Durch die Durchführung von RT-PCR auf cDNA (gewonnen aus mit den entsprechenden Expres-

sionskonstrukten transfizierten HEK293-Zellen) konnte zumindest auf mRNA-Level eine Überexpression der SDR-Kandidaten bestätigt werden (vergleiche Abbildung 2.28).



**Abbildung 2.28:** Verifizierung der Kandidatenexpression in HEK293-Zellen durch mRNA-Nachweis. (A) Kontrolle der cDNA-Synthese durch Amplifikation humaner  $\beta$ -Actin-cDNA; (B) Negativ-Kontrolle ohne Template, (C) Hintergrund-Expression in mock-transfizierten HEK293-Zellen, (D) Überexpression in transfizierten HEK293-Zellen, jeweils getestet unter Verwendung von für die CDS der entsprechenden SDR-Kandidaten spezifischen Primerpaaren (vergleiche Anhang); (E) Hintergrund-Expression in transfizierten HEK293-Zellen, getestet unter Verwendung eines für die UTR-Region der entsprechenden SDR-Kandidaten spezifischen forward-Primers, (F) Überexpression in transfizierten HEK293-Zellen, getestet unter Verwendung eines für das Grundgerüst des pcDNA3-Vektors (T7-Promotors) spezifischen forward-Primers. Eine Überexpression der SDR-Kandidaten in HEK293-Zellen konnte zumindest auf mRNA-Ebene eindeutig bestätigt werden.

Wenngleich die Existenz von mRNA keinen Beweis für die Translation der Proteine von Interesse darstellte, so lieferte sie doch einen starken Anhaltspunkt für deren erfolgreiche Überexpression.

### Auswahl der im *in vivo*- bzw. *in vitro*-System zu überprüfenden Substrate und Etablierung der entsprechenden Messverfahren

Short-Chain-Dehydrogenasen/Reduktasen sind aufgrund ihrer großen Vielfalt an unterschiedlichen intermediären Stoffwechselwegen beteiligt und weisen im Zuge dessen ein umfangreiches Substratspektrum auf. Da eine Überprüfung aller potentiellen Substrate aufgrund Zeitmangels und der Einschränkung an technischen Möglichkeiten nicht zu bewerkstelligen war, wurde hinsichtlich der angestrebten *in vivo*- bzw. *in vitro*-Assays eine Auswahl an zu überprüfenden Substraten getroffen. Als besonders interessant wurde die Stoffklasse der Steroide eingestuft. Im Zuge ihrer umfassenden Charakterisierung sollten die SDR-Kandidatenenzyme zunächst auf ihre Spezifität hinsichtlich Vertretern der Androgene (Androst-4-en-3,17-dion, Androsteron, Dehydroepiandrosteron, Dihydrotestosteron und Testosteron), der Estrogene (Estron und Estradiol) sowie der Glucocorticoide

(Corticosteron, Cortisol und Cortison) überprüft werden. Die Messung ihres Umsatzes durch die in Zellkultur exprimierten Proteine von Interesse erfolgte im *in vivo*-System, basierend auf Arbeiten von Castagnetta et al. [28] und Frau Dr. Brigitte Keller [102]. Die Verwendung besagter Methode erschien vielversprechend, da sie, abgesehen von einer veränderten Steroid- und Proteinkonzentration in der Zelle, eine Bestimmung der katalytischen Aktivität der Kandidaten-Genprodukte unter nahezu physiologischen Bedingungen erlaubt.

Aufgrund der Verwendung eines bereits etablierten HPLC-Systems [1] wurden die zu testenden Steroide in Tritium-markierter Form in den Assay eingesetzt. Ihre Auftrennung erfolgte für Androgene und Estrogene in einem Acetonitril/Wasser-, für Glucocorticoide in einem Methanol/Wasser-Gemisch, jeweils bei einer Flußrate von 1 mL/min, an einer Reverse Phase C18 Säule. Die unterschiedlichen Lösungsmittelverhältnisse der Eluenten sowie die daraus resultierenden Retentionszeiten ( $R_t$ ) sind Tabelle 2.9 zu entnehmen.

**Tabelle 2.9:** Lösungsmittelverhältnisse der Eluenten und Retentionszeiten zur Trennung Tritium-markierter steroidogener Substanzen

Substanz	Lösungsmittelverhältnis	$R_t$
Androst-4-en-3,17-dion	43 % ACN, 57 % H <sub>2</sub> O	8,0 min
Androsteron	43 % ACN, 57 % H <sub>2</sub> O	14,1 min
Corticosteron	58 % MeOH, 42 % H <sub>2</sub> O	6,8 min
Cortisol	43 % MeOH, 57 % H <sub>2</sub> O	17,0 min
Cortison	43 % MeOH, 57 % H <sub>2</sub> O	13,6 min
Dehydroepiandrosteron	43 % ACN, 57 % H <sub>2</sub> O	7,5 min
Dihydrotestosteron	43 % ACN, 57 % H <sub>2</sub> O	9,7 min
Estron	43 % ACN, 57 % H <sub>2</sub> O	7,5 min
Estradiol	43 % ACN, 57 % H <sub>2</sub> O	5,5 min
Testosteron	43 % ACN, 57 % H <sub>2</sub> O	6,0 min

Die Auswahl weiterer zu testender Substrate stütze sich zum einen auf Literaturrecherche, zum anderen auf im Laufe dieser Arbeit erzielte Ergebnisse.

Carbonylreduktasen konnte in zahlreichen Studien neben einer Beteiligung am Steroidstoffwechsel eine Mitwirkung am Prostaglandin-Metabolismus nachgewiesen werden [53] [113] [212]. Darüber hinaus zeigten die bislang charakterisierten Mitglieder CBR1 und CBR3 eine hohe Aktivität gegenüber ortho-Chinonen [214]. Aufgrund der Tatsache, daß hCBR4 zumindest annotativ besagter Familie zuzuordnen ist, wurden sowohl repräsentativ die Prostaglandine D<sub>2</sub>, E<sub>2</sub> und F<sub>2</sub>α zur Überprüfung von 9-Ketoprostaglandinreduktase- und 15-Hydroxyprostaglandindehydrogenase-Aktivität als auch das oft verwendete synthetische Chinon-Modellsubstrat Menadion (Vitamin K<sub>3</sub>) in die Studien zur Bestimmung der Substratspezifität einbezogen. Die Erweiterung der zu überprüfenden Substanzen um Coenzym Q1, einen weiteren Vertreter der Chinone, lag in den im Folgenden geschilderten Ergebnissen der Interaktionsstudien bezüglich hDHRs1s begründet (vergleiche 2.2.7).

Durch die im Zuge der Studien zur subzellulären Lokalisation identifizierte Distribution von

hCBR4 und hHSDL1 in den Mitochondrien lag es nahe, auch Produkte des Fettsäureabbaus auf ihren Umsatz durch die zu charakterisierenden SDR-Kandidaten zu untersuchen. Repräsentativ und aufgrund ihrer Verfügbarkeit gewählt, wurden die kurzkettigen CoA-konjugierten Fettsäuren Acetoacetyl-CoA (Mevalonat-Biosynthese) und Hydroxybutyryl-CoA (Aminosäuremetabolismus Lysin und Tryptophan) getestet.

Da seit langem bekannt ist, daß Mitglieder der SDR-Proteinfamilie entscheidend am Retinoid-Metabolismus beteiligt sind [101] [146] und speziell hHSDL1 eine Sequenzähnlichkeit zu den  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen aufweist, deren Vertreter zum Teil in der Lage sind Retinoide zu metabolisieren, ließen all-trans-Retinol sowie all-trans-Retinal ebenfalls als geeignete, zu überprüfende Substrate erscheinen.

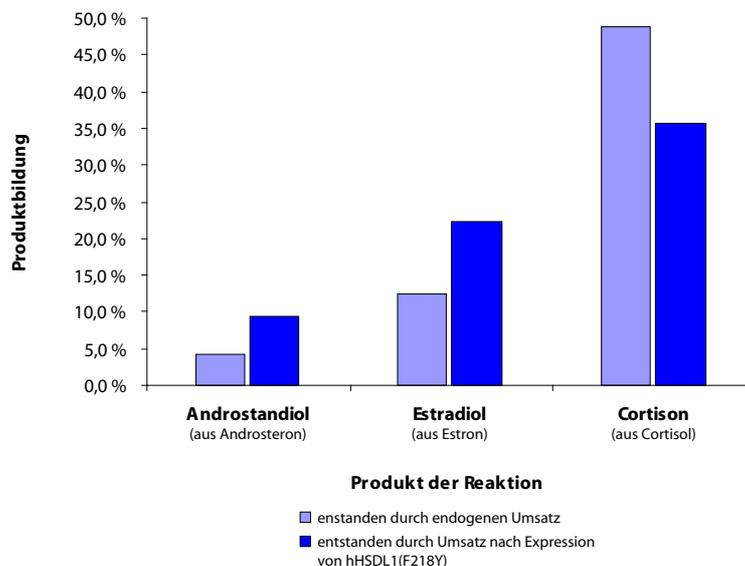
Sämtliche Messungen hinsichtlich der Aktivität der zu charakterisierenden Mitglieder der SDR-Proteinfamilie gegenüber den ausgewählten Chinonen, kurzkettigen CoA-konjugierten Fettsäuren, Prostaglandinen und Retinoiden erfolgten im Gegensatz zu den Experimenten mit Steroiden unter Verwendung von nichtradioaktiven Substraten und Zugabe spezifischer Cofaktoren im *in vitro*-System. Die Auftrennung der Substanzen wurde durch Verwendung einer Reverse Phase C18 Säule in einem Acetonitril/Wasser- (Retinoide, Prostaglandine und Coenzym Q1), in einem Methanol/Wasser- (Menadion) oder in einem Ammoniumacetat/Methanol-Gemisch, jeweils bei einer Flußrate von 1 mL/min, erreicht. Die unterschiedlichen Lösungsmittelverhältnisse und die daraus resultierenden Retentionszeiten ( $R_t$ ) sowie die zur UV-Detektion verwendeten Wellenlängen gehen aus Tabelle 2.10 hervor.

**Tabelle 2.10:** Lösungsmittelverhältnisse der Eluenten und Retentionszeiten zur Trennung nicht Tritium-markierter Substanzen

Substanz	Lösungsmittelverhältnis	$\lambda$	$R_t$
<b>Retinoide</b>			
all-trans-Retinol	92 % ACN, 8 % H <sub>2</sub> O	345 nm	4,6 min
all-trans-Retinal	92 % ACN, 8 % H <sub>2</sub> O	345 nm	5,4 min
<b>Prostaglandine</b>			
Prostaglandin D <sub>2</sub>	35 % ACN, 65 % H <sub>2</sub> O, 0,002 % TFA	220 nm	7,6 min
Prostaglandin E <sub>2</sub>	35 % ACN, 65 % H <sub>2</sub> O, 0,002 % TFA	220 nm	5,8 min
Prostaglandin F <sub>2</sub> $\alpha$	35 % ACN, 65 % H <sub>2</sub> O, 0,002 % TFA	220 nm	4,6 min
<b>Chinone</b>			
Menadion	70 % MeOH, 30 % H <sub>2</sub> O	260 nm	5,2 min
Coenzym Q1	70 % ACN, 30 % H <sub>2</sub> O	270 nm	6,3 min
<b>CoA-konjugierte Fettsäuren</b>			
Acetoacetyl-CoA	82 % NH <sub>4</sub> Ac (10 mM), 18 % MeOH	260 nm	5,0 min
Hydroxybutyryl-CoA	82 % NH <sub>4</sub> Ac (10 mM), 18 % MeOH	260 nm	6,6 min

### Überprüfung des Umsatzes steroidogener Substanzen im *in vivo*-System

Keines der untersuchten, nativen SDR-Enzyme zeigte einen Umsatz der im *in vivo*-System überprüften steroidogenen Substanzen. Weder hCBR4 noch hDHRS1 oder hHSDL1 konnte eine Aktivität gegenüber Androgenen, Estrogenen oder Glucocorticoiden nachgewiesen werden. Die Chromatogramme hingegen, erhalten nach Expression der hHSDL1-Variante mit vermeintlich intakter katalytischer Triade (hHSDL1(F218Y)) und anschließender standardmäßiger Durchführung des *in vivo*-Assays, offenbarten einen eindeutigen, wenngleich auch schwachen Umsatz von Androsteron zu Androstandiol (5,1 %, entspricht 64,4 fmol/h) sowie von Estron zu Estradiol (9,9 %, entspricht 98,6 fmol/h). Weiter zeigte sich nach Zugabe des Substrats Cortisol eine im Vergleich zur endogenen Kontrolle (HEK293-Zellen transfiziert mit dem pcDNA3-Leervektor) um 13,1 % (entspricht 68,8 fmol/h) reduzierte Produktbildung (Cortison) (vergleiche Abbildung 2.29). Da die Katalyse der entsprechenden Rückreaktion als mögliche Erklärung für diese Beobachtung aufgrund der fehlenden Aktivität hHSDL1(F218Y)s gegenüber Cortison ausgeschlossen werden muß, kann die Reduzierung an gebildetem Produkt unter Umständen in einer Fähigkeit hHSDL1(F218Y)s zur Bindung des zugegebenen Substrats aber fehlenden katalytischen Aktivität gegenüber Cortisol begründet liegen. Die erzielten Ergebnisse schließen zum einen eine enzymatische Beteiligung der zu untersuchenden Mitglieder der SDR-Familie hCBR4, hDHRS1 und hHSDL1 am Steroidmetabolismus aus und liefern zum anderen einen ersten Beweis für die prognostizierte katalytische Inaktivität des nativen hHSDL1-Proteins.



**Abbildung 2.29:** Zusammenfassung der im *in vivo*-System ermittelten Umsätze steroidogener Substanzen durch hHSDL1(F218Y). Die Durchführung des *in vivo*-Assays offenbarte eine schwache katalytische Aktivität hHSDL1(F218Y)s gegenüber Androsteron (Produkt Androstandiol) und Estron (Produkt Estradiol). Die Zugabe des Substrats Cortisol resultierte in einer Reduzierung des Cortisonlevels im analysierten Zellüberstand. Dargestellt sind jeweils die detektierten Produkte, hervorgegangen aus endogenem Umsatz des zugegebenen Substrats (hellblau) bzw. entstanden aus dem Umsatz des zugegebenen Substrats nach Expression des SDR-Kandidaten hHSDL1(F218Y) (dunkelblau).

### Bioinformatische Vorhersage der Cofaktor-Spezifität

Hinsichtlich der geplanten *in vitro*-Assays aber auch im Zuge der generellen Identifizierung der für die katalytische Aktivität der zu untersuchenden SDR-Kandidaten essentiellen Coenzyme wurde sich zunächst zur Bestimmung der Cofaktor-Spezifität einem bioinformatischen Ansatz bedient. Mittels eines frei im Internet verfügbaren Servers der Universität Linköping ([97] <http://bioinfo4.limbo.ifm.liu.se/coenzyme/>) ließ sich basierend auf einem Hidden Markov Modell und Sequenzanalyse unter Identifizierung von Rossmann-Faltungsmustern eine Coenzym-Spezifität (NAD, NADP oder FAD) für die Short-Chain-Dehydrogenasen/Reduktasen von Interesse vorhersagen. Während den Kandidaten hCBR4 und hDHRS1 eine Bindungsstelle für die phosphorylierte Form des Cofaktors NAD, also NADP, prognostiziert wurde, konnte der verwendete Server in der Tertiärstruktur des Kandidaten hHSDL1 (bzw. hHSDL1(F218Y)) kein Rossmann-Faltungsmuster detektieren - durch die durchgeführte Sequenzanalyse konnte eine Präsenz der erforderlichen Motive allerdings eindeutig bestätigt werden - und demzufolge keine Spezifität vorhersagen. Eine Unterscheidung zwischen oxidiertem (NADP) oder reduzierter Form der ermittelten Cofaktoren (NADPH) erlaubte der verwendete Server nicht.

### Bestimmung der enzymatischen Aktivität gegenüber ausgewählten Chinonen, kurzkettigen CoA-konjugierten Fettsäuren, Prostaglandinen und Retinoiden im *in vitro*-System

Trotz der bioinformatisch prognostizierten Cofaktorspezifität für NADP(H) wurden die zu untersuchenden Mitglieder der SDR-Proteinfamilie im *in vitro*-Assay unter Verwendung sämtlicher Nicotinamidadeninindinukleotide (phosphoryliert, unphosphoryliert; oxidiert, reduziert) hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität gegenüber ausgewählten Chinonen, kurzkettigen CoA-konjugierten Fettsäuren, Prostaglandinen und Retinoiden überprüft.

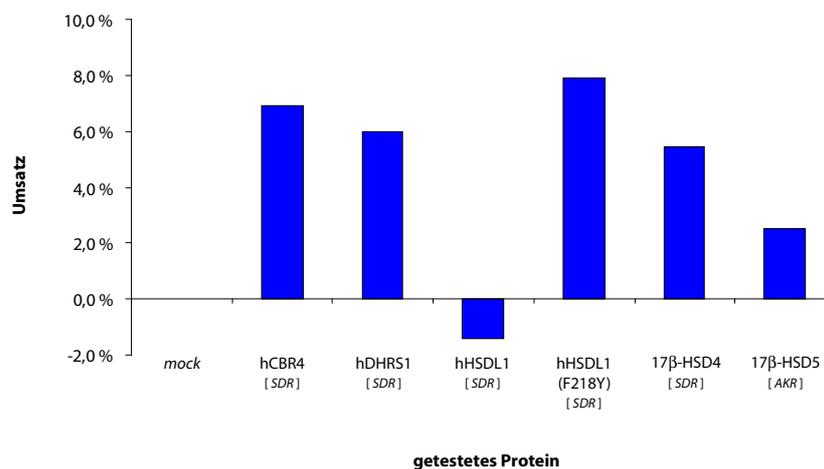
Die durchgeführten HPLC-Analysen offenbarten eine Inaktivität aller getesteten Proteine gegenüber den beiden Vertretern der kurzkettigen CoA-konjugierten Fettsäuren Acetoacetyl-CoA und Hydroxybutyryl-CoA.

Auch der Substanzklasse der Chinone, repräsentiert durch Menadion und Coenzym Q1, konnte im *in vitro*-Assay kein Umsatz durch hCBR4 und hHSDL1 bzw. hHSDL1(F218Y) nachgewiesen werden, lediglich der Kandidat hDHRS1 zeigte eine eindeutige, wenngleich sehr schwache Konvertierung (3,2 %, entspricht 3,7 nmol/h) des synthetischen ortho-Chinons Menadion unter Verwendung des Cofaktors NADPH. Eine Aktivität hDHRS1s gegenüber Coenzym Q1, einbezogen aufgrund der für den besagten Kandidaten erzielten und im Folgenden geschilderten Ergebnisse aus den Interaktionsstudien, konnte hingegen nicht detektiert werden.

Hinsichtlich der getesteten Prostaglandine wies allein hCBR4 katalytisches Potential auf. In drei unabhängigen Ansätzen konnte in Anwesenheit des Cofaktors NADPH eine Umwandlung von Prostaglandin E<sub>2</sub> im nahezu physiologischen Maßstab (30,0 %, entspricht 8,4 nmol/h) verifiziert werden. Aufgrund der fehlenden Identifizierung des entstandenen Produkts und der Tatsache, daß sich das erzielte Ergebnis unter Verwendung des entsprechenden Tritium-markierten Substrats trotz Beibehaltung der Versuchsbedingungen nicht reproduzieren ließ, blieb der durchgeführte *in vitro*-Assay den endgültigen Beweis für eine Aktivität hCBR4s gegenüber Prostaglandin E<sub>2</sub> schuldig.

In einem weiteren *in vitro*-Assay wurden die zu untersuchenden SDR-Enzyme aufgrund der nahen Verwandtschaft der Short-Chain-Dehydrogenasen/Reduktasen zur Familie der Retinoldehydroge-

nasen hinsichtlich eines Umsatzes von Retinoiden überprüft. Alle getesteten Enzyme, die über ein vermeintlich intaktes, SDR-typisches aktives Zentrum (S-K-Y) verfügen, zeigten eine deutliche, wenn auch schwache Umwandlung von all-trans-Retinal zu all-trans-Retinol in Anwesenheit des Cofaktors NADPH. Diese beläuft sich für hCBR4 auf 6,9 % (entspricht 345,0 pmol/h), für hDHRS1 auf 6,0 % (entspricht 300,0 pmol/h) und für hHSDL1(F218Y) auf 7,9 % (entspricht 395,0 pmol/h). hHSDL1, das native Protein, hingegen wies auch in diesem Fall wiederum keinen Umsatz auf. Die beschriebenen Beobachtungen führten zur Fragestellung, ob unter Umständen alle SDR-Enzyme in der Lage sind, Retinoide zu konvertieren. Um eine derartige Hypothese abzusichern, wurden zwei weitere Enzyme mit in den Assay einbezogen. Die humane 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 4, ebenfalls ein SDR-Enzym, zeigte mit 5,4 % (entspricht 240,0 pmol/h) einen den anderen Kandidaten mit intakter katalytischer Triade vergleichbaren Umsatz von all-trans-Retinal. Die humane 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 5, ein Mitglied der Aldo-Keto-Reduktase-Superfamilie und demzufolge als Negativ-Kontrolle in den Assay eingesetzt, nimmt mit 2,5 % (entspricht 125,0 pmol/h) eine Zwischenstellung zwischen aktivem und inaktivem SDR-Enzym ein. Die Ergebnisse des gesamten Assays sind graphisch in Abbildung 2.30 zusammengefasst.



**Abbildung 2.30:** Zusammenfassung des im *in vitro*-System ermittelten all-trans-Retinal-Umsatzes. Der durchgeführte *in vitro*-Assay offenbarte eine deutliche, wenn auch schwache Umwandlung von all-trans-Retinal zu all-trans-Retinol in Anwesenheit des Cofaktors NADPH durch alle getesteten Enzyme, die über eine vermeintlich intakte, SDR-typische katalytische Triade (S-K-Y) verfügen. hHSDL1, das native Protein, hingegen wies auch in diesem Fall wiederum keinen Umsatz auf, die als Negativ-Kontrolle eingesetzte humane 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 5 (AKR) zeigte eine in Relation zu den getesteten, aktiven SDRs eine geringere Aktivität gegenüber all-trans-Retinal.

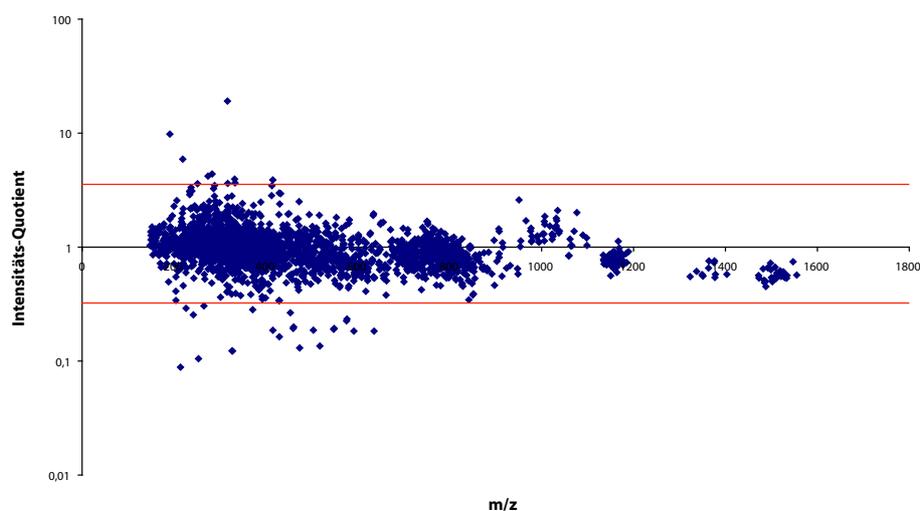
Wenngleich mittels der durchgeführten *in vitro*-Assays keine physiologisch bedeutende Spezifität der SDR-Kandidaten hinsichtlich der überprüften Substrate ermittelt werden konnte und auch der Ausschluß einer Beteiligung der Enzyme von Interesse an bestimmten Stoffwechselwegen aufgrund der geringen Auswahl an getesteten Substanzen nicht möglich war, so bestätigen die Analysen im *in vitro*-System zumindest die aufgestellte Hypothese der katalytischen Inaktivität des hHSDL1-Proteins. hHSDL1 ist aufgrund des Aminosäureaustausches innerhalb seines aktiven Zentrums zu keinerlei Umsatz von Substraten fähig.

### **Untersuchung des metabolischen Umfelds von HEK293-Zellen nach Expression der zu charakterisierenden SDR-Kandidatenproteine**

Der Vergleich des metabolischen Umfelds von HEK293-Zellen nach Expression der zu charakterisierenden SDR-Kandidatenproteine mit dem einer Leerkontrolle (Leervektor-transfizierte HEK293-Zellen), durchgeführt in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Verteilung, Bindung, Abbau des Instituts für Ökologische Chemie (Helmholtz Zentrum München), setzte zunächst ein verlässliches Verfahren zur Probenvorbereitung hinsichtlich der angestrebten FT-ICR-MS-Untersuchung voraus. Eine von Herrn Ferdinand Haller (Helmholtz Zentrum München) etablierte Methode zur Gewinnung und Aufbereitung von massenspektrometrisch zu analysierenden Zellüberständen (vergleiche 4.8.1) erwies sich im Laufe der Versuchsdurchführung als sehr gut geeignet. Sämtliche aus den Messungen erhaltenen Spektrogramme zeugten von einem hohen Reinheitsgrad der angefertigten Proben. Als problematisch hingegen zeigte sich die Evaluierung der gewonnenen massenspektrometrischen Daten hinsichtlich des Vergleichs der ermittelten Metabolitenzusammensetzungen. Bereits die Gegenüberstellung der aus den angefertigten Duplikaten gewonnenen Messergebnisse offenbarte signifikante Diskrepanzen. Wenngleich das verwendete FT-ICR-MS eine große Messgenauigkeit, die identifizierten Massen betreffend, erkennen ließ (bis hin zur dritten Dezimalstelle), so unterschieden sich die entsprechenden Peakintensitäten bereits unter den Duplikaten oftmals beträchtlich. Selbst zwei Spektrogramme, erhalten aus einer Wiederholungsmessung ein und der selben Probe, zeigten gravierende Abweichungen in den ermittelten Intensitäten. Nichts desto trotz wurden unter Verwendung einer jeweils durch Korrelation bereinigten Massenliste - Massen, die Abweichungen in den entsprechenden Intensitäten um den Faktor 5 aufzeigten oder lediglich in einer Probe identifiziert werden konnten, wurden nicht zur Auswertung herangezogen - Quotienten der entsprechend ermittelten Intensitäten berechnet, diese graphisch in einem Scatter-Plot dargestellt und dadurch signifikante Intensitätsunterschiede zwischen den zu untersuchenden Proben visualisiert. Exemplarisch ist der Scatter-Plot, erhalten aus dem Vergleich von Leerkontrolle und hHSDL1(F218Y)-überexprimierenden HEK293-Zellen (positiver Modus), in Abbildung 2.31 dargestellt. Massen, die aufgrund sehr hoher oder sehr niedriger Quotientenwerte gravierende Abweichungen in den ermittelten Intensitäten aufwiesen, wurden daraufhin unter Verwendung des MassTrix-Servers (Helmholtz Zentrum München) annotiert.

Bei genauer Begutachtung der mittels MassTrix identifizierten chemischen Verbindungen fällt zunächst auf, daß die nach Expression der unterschiedlichen SDR-Kandidaten unabhängig voneinander durchgeführten Analysen zahlreiche Übereinstimmungen lieferten. Aufgrund der bislang im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, beispielsweise hinsichtlich subzellulärer Lokalisation oder Gewebeverteilung, und der daraus hervorgehenden Uneinheitlichkeit der zu untersuchenden Enzyme ist auszuschließen, daß es sich bei diesen mehrfach identifizierten Verbindungen um natürliche Substrate der Proteine von Interesse handelt. Darüber hinaus offenbarte der Abgleich der identifizierten Massen mit der KEGG-Datenbank zahlreiche pflanzliche Verbindungen sowie synthetische Substanzen (Arzneimittel, Insektiziden, Herbizide, etc. ), die ebenfalls nicht als natürliche Substrate der humanen SDR-Proteine zu werten sind.

Lediglich einige wenige identifizierte chemische Verbindungen konnten hinsichtlich der zu untersuchenden SDR-Kandidaten als potentiell interessant eingestuft werden. Hierzu zählen das im Hypothalamus gebildete Thyreotropin Releasing Hormon (TRH,  $C_{16}H_{22}N_6O_4$ ,  $m/z = 361,16$ ) und einige Metaboliten des Inositolphosphat-Stoffwechsels (O18-Isotope von myo-Inositol-Penta-



**Abbildung 2.31:** Scatter-Plot, erhalten aus dem Vergleich von Leerkontrolle und hHSDL1(F218Y)-überexprimierenden HEK293-Zellen (positiver Modus). Massen, die signifikante Intensitätsunterschiede (sehr hohe oder sehr niedrige Quotientwerte) aufwiesen, wurden manuell identifiziert (gekennzeichnet durch rote Linie) und anschließend unter Verwendung des MassTriX-Servers annotiert.

kisphosphate, C<sub>6</sub>H<sub>17</sub>O<sub>21</sub>P<sub>5</sub>,  $m/z = 580,89$ ), jeweils identifiziert im Rahmen der Analyse nach Expression von hDHRS1 im negativen Modus, oder 6-Hydroxymelatonin (O18-Isotop, C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>,  $m/z = 251,13$ ) und 17 $\beta$ -Hydroxy-2 $\alpha$ -(methoxymethyl)-17-methyl-5 $\alpha$ -androstan-3-on (H<sup>+</sup> durch Na<sup>+</sup> ersetzt, C<sub>22</sub>H<sub>36</sub>O<sub>3</sub>,  $m/z = 371,26$ ), identifiziert nach Expression von hHSDL1(F218Y) im positiven Modus.

Aufgrund der geschilderten Messungenauigkeiten und dem Auftreten weiterer Unwägbarkeiten war die Signifikanz der erzielten Ergebnisse jedoch schlußendlich stark in Frage zu stellen. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß die Analyse des metabolischen Umfelds von HEK293-Zellen nach Expression der zu charakterisierenden SDR-Kandidatenproteine nur einen sehr geringfügigen Beitrag zur Bestimmung der Substratspezifität leisten konnte.

### Zusammenfassung der Bestimmung der Substratspezifität

Abschließend sind in Tabelle 2.11 die verwertbaren Resultate, erzielt im Zuge der Studien zur Bestimmung der Substratspezifität der zu untersuchenden SDR-Kandidaten hCBR4, hDHRS1, hHSDL1 und hHSDL1(F218Y), zusammengefasst. Die Aufstellung beschränkt sich hierbei auf Ergebnisse hervorgegangen aus den durchgeführten *in vivo*- und *in vitro*-Assays.

### 2.2.6 Expression und Aufreinigung der zu charakterisierenden Mitglieder der SDR-Proteinfamilie

Hinsichtlich der angestrebten, in Kooperation mit Herrn Dr. Udo Oppermann vom Structural Genomics Consortium (SGC) in Oxford/UK durchzuführenden Fluoreszenz-basierten Cofaktor-Bindungsstudie zur Überprüfung einer Bibliothek an ausgewählten Substraten, war die Expression und Aufreinigung der zu charakterisierenden Mitglieder der SDR-Proteinfamilie im großen Maßstab

**Tabelle 2.11:** Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Substratumsatz-Assays

Assay	Substrat	hCBR4	hDHRS1	hHSDL1	hHSDL1 (F218Y)
<i>in vivo</i>	<b>steroidogene Substanzen</b>				
	Androst-4-en-3,17-dion	-	-	-	-
	Androsteron	-	-	-	+
	Corticosteron	-	-	-	-
	Cortisol	-	-	-	+
	Cortison	-	-	-	-
	Dehydroepiandrosteron	-	-	-	-
	Dihydrotestosteron	-	-	-	-
	Estron	-	-	-	+
	Estradiol	-	-	-	-
	Testosteron	-	-	-	-
<i>in vitro</i>	<b>Chinone</b>				
	Coenzym Q1	-	-	-	-
	Menadion	-	+	-	-
	<b>CoA-konjugierte Fettsäuren</b>				
	Acetoacetyl-CoA	-	-	-	-
	Hydroxybutyryl-CoA	-	-	-	-
	<b>Prostaglandine</b>				
	Prostaglandin D <sub>2</sub>	-	-	-	-
	Prostaglandin E <sub>2</sub>	(+)	-	-	-
	Prostaglandin F <sub>2</sub> α	-	-	-	-
	<b>Retinoide</b>				
	all-trans-Retinol	-	-	-	-
	all-trans-Retinal	+	+	-	+

+ = Umsatz detektiert; (+) = Umsatz detektiert, jedoch nicht reproduziert; - = kein Umsatz detektiert

erforderlich. Ziel war es zunächst, möglichst große Mengen an löslichem, gefaltetem Protein in einer leicht aufzureinigenden Form zu gewinnen. Nach bioinformatischer Vorhersage der zu erwartenden Löslichkeit kamen unter Berücksichtigung ihrer jeweiligen Vor- und Nachteile zu diesem Zweck sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Expressionssysteme zum Einsatz.

### Bioinformatische Vorhersage der zu erwartenden Löslichkeit

Um im Vorfeld der geplanten Experimente zur Expression und Aufreinigung der zu charakterisierenden Mitglieder der SDR-Proteinfamilie bereits einen Eindruck über die zu erwartende Löslichkeit der Proteine von Interesse zu gewinnen, wurden unter Verwendung einer repräsentativen Auswahl an im Internet frei verfügbaren Servern (vergleiche Tabelle 2.12) bioinformatische Analysen durchgeführt. Durch die Vorhersage von hydrophoben Sequenzabschnitten und potentiellen Transmembrandomänen sollte ermittelt werden, ob es sich bei den zu untersuchenden Kandidaten unter Umständen um Membranproteine handeln könnte, deren Gewinnung in Reinstform sich angesichts der gegebenen Voraussetzungen, im Detail diskutiert unter 3.2.5, als äußerst schwierig gestalten würde.

**Tabelle 2.12:** Zusammenfassung der bioinformatischen Vorhersagen hinsichtlich der zu erwartenden Löslichkeit

Server	vorhergesagte Transmembranhelices (AS)		
	hCBR4	hDHRS1	hHSDL1 bzw. hHSDL1(F218Y)
HMMTOP	0	2 (137-155/275-299)	3 (24-41/170-189/240-257)
SOSUI	2 (119-141/211-233)	0	0
TMHMM v.2.0	0	0	0
TMpred	1 (209-229)	<b>2 (137-159/275-299)</b>	<b>3 (17-42/170-194/242-262)</b>
TopPred	1 (209-229)	<b>2 (137-157/276-296)</b>	<b>3 (173-193/240-260/296-316)</b>

Vom jeweiligen Server als „sicher“ eingestufte Vorhersagen sind fett, als „möglich“ bewertete Transmembranhelices sind kursiv abgedruckt.

**Für hCBR4 kann kein schlüssiges Modell zur Transmembran-Topologie vorgeschlagen werden.** Die im Rahmen der bioinformatischen Analyse gewonnenen Ergebnisse zur Vorhersage potentieller Transmembranhelices im SDR-Kandidaten hCBR4 weisen bedeutende Unterschiede auf. Während zwei der fünf verwendeten Server hCBR4 als Transmembranhelix-loses Protein identifizieren (HMMTOP, TMHMM v.2.0), errechnen die verbleibenden drei Algorithmen entweder ein (TMpred, TopPred) oder zwei Membran-durchspannende Elemente (SOSUI) im Enzym von Interesse. Da die für jede vorhergesagte Transmembranhelix ermittelten Wahrscheinlichkeitswerte vom jeweiligen Server jedoch als nicht signifikant eingestuft werden und demzufolge kein schlüssiges Modell zur Transmembran-Topologie erlauben, wird hCBR4 nach zusammenfassender Evaluierung der erzielten Resultate als lösliches Protein bewertet.

**Übereinstimmende Ergebnisse der Server erlauben die Vorhersage zweier Transmembrandomänen in hDHRS1.** Im Gegensatz zu den Analysen hinsichtlich des Kandidaten hCBR4 liefern die durchgeführten Untersuchungen für hDHRS1 ein deutlicheres Ergebnis. Wenngleich nur drei der fünf verwendeten Server Transmembranhelices im zu charakterisierenden SDR-Kandidaten vorhersagen (HMMPRED, TMPRED und TOPRED), so lässt die starke Übereinstimmung in den jeweils identifizierten und als zumeist „sicher“ beurteilten Aminosäuren auf eine tatsächliche Präsenz der zwei prognostizierten Transmembrandomänen in hDHRS1 schließen. Im einzelnen scheinen die Sequenzabschnitte zwischen den Aminosäuren 137-159 und 275-299 an der Integration von hDHRS1 in eine Membran beteiligt. Die Identifizierung von hDHRS1 als potentielles Transmembranprotein läßt Schwierigkeiten bei der angestrebten Aufreinigung im großen Maßstab erwarten.

**Bioinformatische Analyse prognostiziert hHSDL1/hHSDL1(F218Y) drei Membran-durchspannende Helices.** Die Resultate der bioinformatischen Analyse bezüglich des SDR-Kandidaten hHSDL1 (sowie hHSDL1(F218Y)) gleichen im Wesentlichen den für hDHRS1 erzielten. Wiederrum sagen die von SOSUI und TMHMM v.2.0 verwendeten Algorithmen keinerlei Transmembrandomänen in der Sekundärstruktur voraus, während die Server HMMPRED, TMPRED und TOPRED eindeutig und zumeist übereinstimmend Membran-durchspannende Elemente identifizieren. Eine Kongruenz in den Ergebnissen besteht im Wesentlichen in der Vorhersage zweier Transmembranhelices, definiert durch Bereiche in der Primärstruktur zwischen den Aminosäuren 170-194 und 240-262, prognostiziert durch alle drei Server. Darüber hinaus errechnen HMMPRED und TMPRED eine weitere Helix am N-Terminus des Proteins (im Bereich der Aminosäuren 17-42), TOPRED hingegen zeigt die Möglichkeit einer dritten Transmembrandomäne am C-Terminus (Aminosäuren 296-316) auf. Aufgrund der erzielten Ergebnisse muß davon ausgegangen werden, daß es sich bei hHSDL1 ebenfalls um ein unlösliches Transmembranprotein handelt, dessen Aufreinigung eine große Herausforderung darstellt.

### **Strategien zur Expression der zu untersuchenden Kandidatenproteine**

Prokaryotische Systeme zur Proteinexpression und -aufreinigung zeichnen sich in erster Linie durch die leichte Handhabung der zu verwendenden Kulturen, die hohe Wachstumsrate der Bakterienzellen sowie die Regulierbarkeit (manuelle Induzierbarkeit) der Proteinexpression aus. Aufgrund der genannten Vorteile werden sie, trotz ihrem Verzicht auf posttranslationale Modifikationen und ihrer oftmals ineffizienten Proteinproduktion, begründet im hohen Anteil an seltenen Codons, einer möglichen Toxizität des rekombinanten Proteins oder dessen Integration in Einschlußkörpern (inclusion bodies), vielfach genutzt und nicht selten dem eukaryotischen Proteinexpressionssystem vorgezogen. Auch in dieser Arbeit war die Proteinexpression im prokaryotischen System das erste Mittel der Wahl.

Als Bindeglied zwischen prokaryotischen Expressionssystemen und eukaryotischen Insekten- und Säugerzellsystemen stellen Hefen eine geeignete Maschinerie zur heterologen Proteinexpression dar. Sie kombinieren die Bereitstellung der meisten eukaryotischen posttranslationalen Modifikationen wie Phosphorylierung und Glycosylierung mit hohen, regulierbaren Expressionsraten bei kurzen Generationszeiten und geringen Nährmedienansprüchen und verzichten darüberhinaus auf einen im Zuge ihrer angestrebten Aufreinigung problematischen Einschluss der exprimierten, heterologen Proteine von Interesse in „inclusion bodies“. Besagte Gründe ließen auch das Hefe-System zur

Gewinnung der SDR-Kandidaten im großen Maßstab überaus vielversprechend erscheinen. Da es sich bei allen zu charakterisierenden Mitgliedern der SDR-Familie um Proteine des Menschen handelt, wurde neben ihrer Überproduktion in Bakterien oder der Hefe auch ihre Expression im Ursprungsorganismus angestrebt. Die Verwendung des humanen Zellsystems ermöglicht eine Proteinexpression unter nahezu nativen Bedingungen und liefert demzufolge einen hohen Anteil an korrekt gefalteten und posttranslational modifizierten Proteinen.

**Die Zelllinien.** Zur Proteinexpression im prokaryotischen System wurde vorzugsweise der *E. coli*-Stamm BL21 CodonPlus (DE3) RP verwendet. Die CodonPlus-Stämme der Firma Stratagene verfügen über zusätzliche Kopien an Genen, die für häufig die Translation heterologer Proteine in *E. coli* limitierende tRNAs kodieren. Im Stamm BL21 CodonPlus (DE3) RP handelt es sich hierbei um fernere Abschriften der Gene *argU* und *proL*, kodierend für tRNAs, welche die Arginin-Kodons AGA und AGG bzw. das Prolin-Kodon CCC erkennen. Verglichen mit der nur schwachen Überproduktion in herkömmlichen BL21-Zellen erlaubt die Verfügbarkeit beschriebener tRNAs in BL21 CodonPlus (DE3) RP Zellen die starke Expression heterologer, rekombinanter Gene. Die Überexpression der SDR-Kandidatenproteine im eukaryotischen Hefe-System erfolgte unter Verwendung des *S. cerevisiae*-Stamms CEN-PK2. Besagter Wildtyp-Stamm wurde sowohl aufgrund seiner ausgewiesenen Fähigkeit der Galaktose-Verwertung, einem Kriterium essentiell für die Induzierbarkeit der Proteinexpression, als auch aufgrund seiner vielfach erfolgreichen Nutzung im Zuge der heterologen Überproduktion, hervorgehend aus umfangreicher Literaturrecherche, gewählt.

Nach persönlicher Rücksprache mit Herrn Dr. Johannes Glöckner (Helmholtz Zentrum München) und in Anlehnung an die bereits beschriebenen Experimente zur Bestimmung der Substratspezifität wurden sämtliche Versuche hinsichtlich der Expression und späteren Aufreinigung der zu untersuchenden SDR-Kandidaten im Säugetierzell-System unter Einsatz der humanen embryonalen Nierengewebs-Zelllinie HEK293 durchgeführt.

**Die Expressions- und Aufreinigungssysteme.** Sämtlichen in dieser Arbeit Anwendung findenden Expressions- und Aufreinigungssystemen, ob prokaryotischer oder eukaryotischer Natur, liegt zunächst die zellinterne Überproduktion der zu untersuchenden SDR-Kandidaten, fusioniert an spezifische Protein-Tags, zugrunde. Das Anhängen definierter Aminosäuresequenzen an C- bzw. N-Terminus der Enzyme von Interesse und die damit einhergehende hohe Affinität der exprimierten Fusionsproteine zu speziell behandelten Matrices erlaubt deren einfache Aufreinigung und erleichtert im Zuge dessen ihre Gewinnung im großen Maßstab.

Hinsichtlich der bakteriellen Expression und der anschließenden Aufreinigung der SDR-Kandidatenproteine kamen in dieser Arbeit sowohl das Glutathion S-transferase (GST) Gene Fusion System (GST-Tag) als auch das StrepTag-System (Strep-Tag II) zum Einsatz (beide ausführlich beschrieben unter 4.6.1). Die Expression und Aufreinigung der rekombinanten Proteine von Interesse in *S. cerevisiae* erfolgte unter Verwendung des pYES2.1 TOPO TA Expression Kits (V5-His-Tag), ihre Gewinnung im Säugetierzell-System wurde mittels des Mem-PER Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kits (Myc-Tag) durchgeführt (vergleiche 4.6.2 und 4.6.3).

Die Expression der zu charakterisierenden Mitglieder der SDR-Proteinfamilie in Fusion mit unterschiedlichen Tags sowie ihre Akkumulierung in verschiedenen Zellkompartimenten (lediglich im

prokaryotischen System; Cytosol oder Periplasma) sollte in Kombination mit den entsprechenden Aufreinigungsstrategien schlußendlich für die Folgeanwendung ausreichende Mengen an Protein in Reinstform liefern.

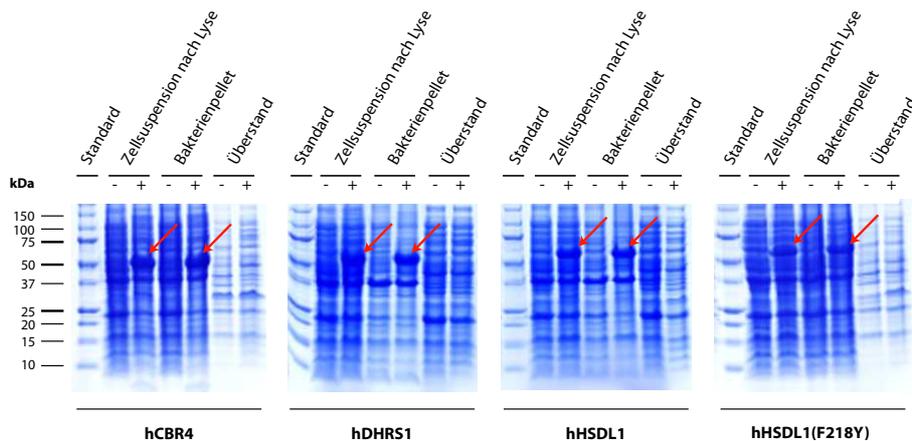
**Die Expressionskonstrukte.** Die für eine Expression und Aufreinigung im prokaryotischen und eukaryotischen System erforderlichen Expressionskonstrukte wurden durch Subklonierung der CDS der Gene von Interesse, gewonnen durch PCR-Amplifikation auf bereits erstellten pEGFP-C2- bzw. pAcGFP1-N1-Konstrukten (vergleiche 2.2.3), in entsprechende Expressionsvektoren generiert. Als prokaryotische Expressionsvektoren kamen sowohl pGEX $\Delta$ BamHI (N-terminale Fusion von GST) als auch die pASK-IBA-Plasmide 12 (periplasmatische Expression) und 13+ (cytosolische Expression) zum Einsatz (beide N-terminale Fusion von Strep-Tag II). Zur Überproduktion der rekombinanten Proteine von Interesse in *S. cerevisiae* wurde der zunächst zur Erleichterung des Klonierungsverfahrens um die MCS des pcDNA4 myc-his Version B-Plasmids erweiterte Basisvektor pYES2.1/V5-His-TOPO verwendet (C-terminale Fusion von V5-Epitop und His-Tag). Die Expression im eukaryotischen Säugetierzellsystem erfolgte nach Subklonierung der entsprechenden CDS in den Vektor pcDNA4 myc-his Version B (C-terminale Fusion von Myc- und His-Tag). Die zur Subklonierung verwendeten Primerpaare finden sich im Anhang (vergleiche A.3.1).

### **Zu charakterisierende SDR-Kandidaten lassen sich sowohl in Bakterien als auch in der Hefe erfolgreich überexprimieren**

Während die Überproduktion der zu charakterisierenden SDR-Kandidaten im eukaryotischen Säugetierzellsystem mehrfach fehl schlug, bzw. die nach Aufarbeitung der verwendeten HEK293-Zellen erhaltene Proteinmenge unterhalb der Nachweisgrenze der im Folgenden durchgeführten Coomassie-Färbung und auch des weitaus sensitiveren Western-Blots lag, konnte sowohl in *E. coli* als auch in *S. cerevisiae* nach Induktion der Transkription eine starke Überexpression der Proteine von Interesse erzielt werden. Exemplarisch sind in Abbildung 2.32 die Coomassie-gefärbten Proteingele dargestellt, angefertigt nach prokaryotischer Expression der zu untersuchenden Kandidatenproteine in N-terminaler Fusion mit GST. Sie zeigen einen eindeutigen Zuwachs des jeweiligen Proteins von Interesse nach Zugabe von IPTG (finale Konzentration 0,5 mM), deutlich ersichtlich in den analysierten Zellsuspensionen nach Lyse und den in PBS resuspendierten Bakterienpellets, und bestätigen somit den Erfolg der regulierten Überexpression der Fusionsproteine GST-hCBR4 (errechnete relative Molekülmasse ca. 52 kDa), GST-hDHRS1 (ca. 61 kDa) und GST-hHSDL1 (ca. 64 kDa) bzw. GST-hHSDL1(F218Y) (ca. 64 kDa) im verwendeten BL21 CodonPlus (DE3) RP-Stamm.

### **Proteine von Interesse zeigen sich unwiederbringlich in der unlöslichen Fraktion**

Für die erfolgreiche Aufreinigung der zu untersuchenden SDR-Kandidatenproteine, hinsichtlich der geplanten Cofaktor-Bindungsstudie angestrebt im großen Maßstab, ist das Vorliegen der Enzyme von Interesse in löslicher Form unabdingbar. Wie bereits aus Abbildung 2.32 hervorgeht, zeigte sich der Hauptanteil der im prokaryotischen System exprimierten GST-Fusionsproteine nach Lyse der verwendeten BL21 CodonPlus (DE3) RP-Zellen mittels Ultraschallbehandlung jedoch in der unlöslichen Fraktion, dem Bakterienpellet, Spuren der SDR-Kandidaten im gewonnenen

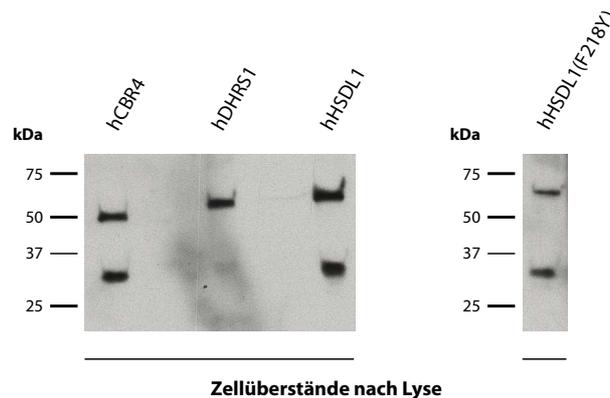


**Abbildung 2.32:** Prokaryotische Überexpression der zu charakterisierenden SDR-Kandidatenproteine in N-terminaler Fusion mit GST. Die abgebildeten, Coomassie-gefärbten Proteingele (10 % Tricin) bestätigen die angestrebte Steigerung der Proteinproduktion durch Zugabe von IPTG (+, finale Konzentration 0,5 mM) im Vergleich zu nicht-induzierten Kontrollkulturen (deutlich ersichtlich in den analysierten Zellsuspensionen nach Lyse und den in PBS resuspendierten Bakterienpellets) und erbringen somit den Beweis für den Erfolg der regulierten Überexpression der Fusionsproteine GST-hCBR4 (errechnete relative Molekülmasse ca. 52 kDa), GST-hDHRS1 (ca. 61 kDa) und GST-hHSDL1 (ca. 64 kDa) bzw. GST-hHSDL1(F218Y) (ca. 64 kDa) (allesamt angezeigt durch rote Pfeile) im verwendeten BL21 CodonPlus (DE3) RP-Stamm.

Zellüberstand konnten nach Anfärben der angefertigten Proteingele mit Coomassie-Blau allenfalls erahnt werden. Die Überprüfung besagter Zelllysate durch die Durchführung sensitiverer Western-Blots (Anti-GST-Antikörper) bestätigte zwar die Präsenz geringer Mengen von GST-hCBR4, GST-hDHRS1, GST-hHSDL1 und GST-hHSDL1(F218Y) in der jeweiligen löslichen Fraktion (vergleiche Abbildung 2.33), nach Aufreinigung des tatsächlich in Lösung vorliegenden Proteinanteils über Glutathion-Sepharose konnten die SDR-Kandidaten allerdings weder auf Coomassie-Blau gefärbten Proteingelen noch durch Antikörper-Detektion nachgewiesen werden.

Die Menge an exprimierten Fusionsproteinen in den jeweiligen Zellüberständen nach erfolgter Lyse war offensichtlich für ihre Aufreinigung im großen Maßstab um ein Vielfaches zu gering und konnte im Folgenden auch durch eine mehrfache Vergrößerung des Kulturvolumens oder die Optimierung des Lyseverfahrens (Ultraschallbehandlung/Frieren und Tauen) nicht ausreichend erhöht werden. Auch eine Erniedrigung der Inkubationstemperatur nach Induktion der Proteinexpression auf 28 °C bzw. 18 °C oder die Reduzierung der finalen Konzentration an IPTG im Ansatz auf bis zu 0,1 mM zur Vorbeugung eines möglichen Einschlusses der Proteine von Interesse in inclusion bodies führte nicht zur Steigerung der Menge an Protein von Interesse in der löslichen Fraktion.

Alternativ zum Glutathion S-transferase (GST) Gene Fusion System kam zur prokaryotischen Expression der zu charakterisierenden Mitglieder der SDR-Proteinfamilie das StrepTag-System zum Einsatz. Die erzielten Ergebnisse glichen im Wesentlichen den für das GST-System beschriebenen. Trotz des Einsatzes unterschiedlicher Vektoren zum Zwecke der Akkumulation der exprimierten Kandidatenenzyme in unterschiedlichen Zellkompartimenten (Cytosol und Periplasma) ist es nicht gelungen, signifikante und für eine erfolgreiche Aufreinigung ausreichende Mengen an rekombinantem Protein von Interesse in die lösliche Fraktion nach Zellyse zu überführen. Zu identischen



**Abbildung 2.33:** Überprüfung der nach Lyse gewonnenen Zellüberstände auf die Präsenz der GST-Fusionsproteine von Interesse mittels Western Blot-Technologie. Unter Verwendung des Anti-GST-Antikörpers konnten in den untersuchten löslichen Fraktionen jeweils geringe Mengen an GST-hCBR4, GST-hDHRS1, GST-hHSDL1 und GST-hHSDL1(F218Y) nachgewiesen werden. Die detektierten Signale bei einer relativen Molekülmasse von etwa 26 kDa entsprechen GST ohne Fusion des jeweiligen SDR-Kandidaten.

Beobachtungen führte die Analyse der Zellfraktionen nach Expression der SDR-Kandidaten in *S. cerevisiae*, der Versuch ihrer Gewinnung im Säugetierzell-System war, wie bereits erwähnt, schon an der Überproduktion der Proteine von Interesse in den verwendeten HEK293-Zellen gescheitert.

### Zusammenfassung der Expression und Aufreinigung der zu charakterisierenden Mitglieder der SDR-Proteinfamilie

Wenngleich zumindest im prokaryotischen als auch im eukaryotischen Hefe-System eine deutliche Überexpression der zu charakterisierenden Mitglieder der SDR-Proteinfamilie erreicht werden konnte, so ist es schließlich trotz Verwendung unterschiedlichster Strategien nicht gelungen, für eine Aufreinigung im großen Maßstab ausreichende Mengen an Protein von Interesse in die jeweilige lösliche Fraktion nach erfolgter Zellyse zu überführen. Die angestrebte Gewinnung von hCBR4, hDHRS1, hHSDL1 und hHSDL1(F218Y) in Reinstform schlug somit im vollen Umfang fehl, die erzielten Resultate lassen auf eine bereits teilweise durch die bioinformatische Analyse vorhergesagte Integration in bzw. eine Assoziation aller zu untersuchenden Enzyme an die bereits ermittelten Kompartimentmembranen schließen.

### 2.2.7 Identifizierung von Interaktionspartnern der zu charakterisierenden Mitglieder der SDR-Proteinfamilie

Neben der umfassenden Analyse der subzellulären Lokalisation, der Gewebeverteilung und der Substratspezifität, und dem Versuch der Expression und Aufreinigung der zu untersuchenden Mitglieder der SDR-Proteinfamilie, stellten die Studien hinsichtlich der proteomischen Umgebung der Enzyme von Interesse einen experimentellen Schwerpunkt dieser Arbeit dar.

### **Kombination aus Screening- und Verifizierungsverfahren soll Interaktionspartner der ausgewählten SDR-Kandidaten identifizieren**

Die eindeutige Identifizierung von Interaktionspartnern bislang uncharakterisierter Proteine erfordert stets die Kombination unterschiedlicher molekularbiologischer Verfahren. Im Zuge der angestrebten Aufklärung des proteomischen Umfelds der Proteine von Interesse ist oftmals das Yeast-Two-Hybrid-System die erste Methode der Wahl. Im Screening-Verfahren, einem eher empirischen Ansatz, durchgeführt unter Verwendung einer cDNA-Bibliothek als „Beute“, können zunächst mögliche Interaktionspartner identifiziert werden. Durch die Möglichkeit des sogenannten „single matings“ liefert das Yeast-Two-Hybrid-System darüberhinaus ein ideales Format zu einer ersten, gezielten Überprüfung aufgedeckter Wechselwirkungen.

Da es sich bei allen in dieser Arbeit zu untersuchenden Mitgliedern der SDR-Proteinfamilie um bislang uncharakterisierte Proteine handelt und demzufolge keine bereits beschriebenen Interaktionen zu verifizieren waren, galt es zu Beginn der Studien, ein möglichst breites Spektrum an potentiellen Wechselwirkungspartnern zu überprüfen. Hierfür schien der Einsatz des Yeast-Two-Hybrid-Systems die geeignete Strategie zu sein. Als „Beute“ wurde eine humane Plazenta-cDNA-Bibliothek in Betracht gezogen (generiert durch Frau Eva Lattka, Helmholtz Zentrum München). Neben seinem enormen Potential birgt das *in vivo*-ähnliche System Yeast-Two-Hybrid auch zahlreiche Schwierigkeiten in sich, im Detail erläutert unter 3.2.6. Die Interpretation der unter Verwendung der besagten Methode erzielten Ergebnisse hat demnach mit großer Vorsicht zu erfolgen, positive Interaktionen müssen stets mit weiteren proteinchemischen Techniken auch *in vitro* verifiziert werden. In dieser Arbeit fand zu diesem Zweck in erster Linie der GST-Pulldown Assay, alternativ hierzu - in einem Einzelfall - die Coimmunopräzipitation Anwendung.

**Die Expressionskonstrukte.** Die für die Durchführung des Yeast-Two-Hybrid-Systems erforderlichen Köder-Expressionskonstrukte wurden durch Subklonierung der CDS der Gene von Interesse in den Expressionsvektor pGBKT7 (Clontech) generiert. Die Gewinnung der Volle-Länge-CDS bzw. der zu untersuchenden Sequenzabschnitte der SDR-Kandidaten erfolgte durch PCR-Amplifikation auf bereits erstellten Vektorkonstrukten.

Im Rahmen der GST-Pulldown Assays kamen die hinsichtlich der prokaryotischen Expression angefertigten pGEX $\Delta$ BamHI-Konstrukte in Kombination mit isolierten pGADT7rec-Konstrukten der verwendeten cDNA-Bibliothek zum Einsatz, die Coimmunopräzipitation wurde mittels des generierten pGBKT7/hCBR4-Köderkonstrukts und eines weiteren angefertigten pcDNA3-Expressionskonstrukts durchgeführt. Die zur Subklonierung verwendeten Primerpaare gehen aus dem Anhang hervor (vergleiche A.3.1).

### **Neben den Volle-Länge-Proteinen werden auch verkürzte Konstrukte der SDR-Enzyme von Interesse im Yeast-Two-Hybrid-System zum Einsatz gebracht**

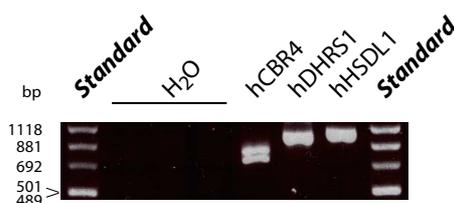
Um die für das Yeast-Two-Hybrid-System essentielle Translokation der SDR-Kandidaten in den Nukleus zu gewährleisten, wurden neben den Volle-Länge-Proteinen von Interesse zusätzlich trun-kierte Konstrukte zum Einsatz gebracht, in denen auf potentielle Transmembrandomänen verzichtet wurde. Die Auswahl der zu untersuchenden Sequenzabschnitte beruhte auf den Daten, gewonnen durch bioinformatische Vorhersage von hydrophoben Proteinregionen (vergleiche 2.2.6).

In erster Linie dienten hierbei die Ergebnisse des verwendeten HMMTOP-Servers als Grundlage. Die Identifizierung von Interaktionspartnern des Kandidaten hDHRS1 erfolgte unter Verwendung der Köder hDHRS1 (Volle-Länge-Protein), hDHRS1trunkiert(AS1-136) (N-Terminus des Proteins) und hDHRS1trunkiert(AS156-274) (Sequenzabschnitt zwischen den beiden prognostizierten Transmembranhelices), Wechselwirkungen des Kandidaten hHSDL1 wurden mittels der Köder hHSDL1 (Volle-Länge-Protein) und hHSDL1trunkiert(AS190-330) (Sequenzabschnitt nach der vorhergesagten Transmembrandomäne zwischen den Aminosäuren 170-189) untersucht. Lediglich für den SDR-Kandidaten hCBR4 wurde aufgrund seiner bioinformatischen Identifizierung als lösliches Protein keine Verkürzung der Aminosäuresequenz vorgenommen. Eine Aufstellung aller getesteten Proteine bzw. Proteinfragmente ist Tabelle 2.14 zu entnehmen.

### Expression der zu untersuchenden SDR-Kandidaten in Plazenta-Gewebe erlaubt die Verwendung einer entsprechenden cDNA-Bibliothek im angestrebten Yeast-Two-Hybrid-Assay

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen zur Gewebeverteilung konnte allen zu charakterisierenden Mitgliedern der SDR-Proteinfamilie ein ubiquitäres Expressionsmuster nachgewiesen werden (vergleiche 2.2.4). Auch in Plazenta-Gewebe ließ sich mRNA der Kandidaten hCBR4, hDHRS1 und hHSDL1 detektieren, aufgrund der jeweils lediglich geringen bis durchschnittlichen Intensität der Signale, sowohl nach Durchführung der Northern Blots als auch der quantitativen RealTime-PCR, sollte die Verwendbarkeit der humanen Plazenta-cDNA-Bibliothek vor Beginn der Yeast-Two-Hybrid-Screenings allerdings erneut abgesichert werden. Die Überprüfung der Kandidaten-Expression erfolgte mittels RT-PCR auf angefertigter humaner Plazenta-cDNA unter Verwendung spezifischer Primer (vergleiche A.3.2).

Für alle Proteine von Interesse konnte die Präsenz entsprechender mRNA in Plazenta-Gewebe bestätigt werden (vergleiche Abbildung 2.34). Das Auftreten unterschiedlicher Bandengrößen für den Kandidaten hCBR4 deutet darüber hinaus auf die Möglichkeit eines alternativen Splicings hin. Die erzielten Ergebnisse erlaubten die Verwendung der humanen Plazenta-cDNA-Bibliothek.



**Abbildung 2.34:** Expression der zu untersuchenden SDR-Kandidaten in Plazenta-Gewebe erlaubt die Verwendung einer entsprechenden cDNA-Bibliothek im angestrebten Yeast-Two-Hybrid-Assay. Allen zu charakterisierenden Mitgliedern der SDR-Proteinfamilie konnte mittels RT-PCR die Präsenz entsprechender mRNA in Plazenta-Gewebe nachgewiesen werden. Die Detektion unterschiedlicher Bandengrößen nach Amplifikation der mRNA des Kandidaten hCBR4 auf dem angefertigten Agarosegel (1,5 %) läßt das Auftreten alternativer Splice-Varianten vermuten.

### Hefe-Stämme AH109 und Y187 weisen den erwarteten Phänotyp auf

Zum Ausschluß eines autarken Wachstums der in den Yeast-Two-Hybrid-Screenings zu verwendenen Hefe-Stämme auf Minimal-Medien wurden die von der Firma Clontech angegebenen Phänotypen des AH109- und Y187-Stamms durch Ausplattieren entsprechender Kolonien auf verschiedenen DropOut-Medien (Medien, in denen eine oder mehrere essentieller Substanzen fehlten) verifiziert. Laut Angaben des Herstellers ist der Stamm AH109 auxotroph gegen die Aminosäuren Histidin, Leucin und Tryptophan und die Purin-Base Adenin, kann somit diese Substanzen im Vergleich zu Wildtyp-Stämmen nicht synthetisieren und ist demzufolge auf deren Zugabe zum Medium angewiesen. Der Stamm Y187 weist laut Protokoll neber einer Auxotrophie gegenüber den bereits genannten chemischen Verbindungen eine weitere gegenüber der Pyrimidin-Base Uracil auf. Beiden *S. cerevisiae*-Stämmen sollte in Konsequenz kein Wachstum auf entsprechend selektiven DropOut-Medien möglich sein.

Während dem Stamm Y187, wie erwartet, keinerlei Wachstum auf den verwendeten DropOut-Medien nachzuweisen war, zeigte sich auf dem Selektivmedium mit Mangel an Histidin ein schwaches Hintergrundwachstum des Stammes AH109, möglicherweise hervorgerufen durch minimale Basalexpression (leaky expression) des His3-Reportergens. Darüber hinaus konnte allerdings auch für den Stamm AH109 ein selbstständiges Wachstum auf den getesteten Minimal-Medien ausgeschlossen und somit die Angaben der Firma Clontech bestätigt werden. Auf YPDA-Agar, einem Medium, welches alle essentiellen Nährstoffe enthält, zeigten sowohl AH109 als auch Y187 wie gewünscht ein starkes Wachstum.

### Western Blots bestätigen die erfolgreiche Expression der Köder-Fusionsproteine im Hefe-Stamm Y187

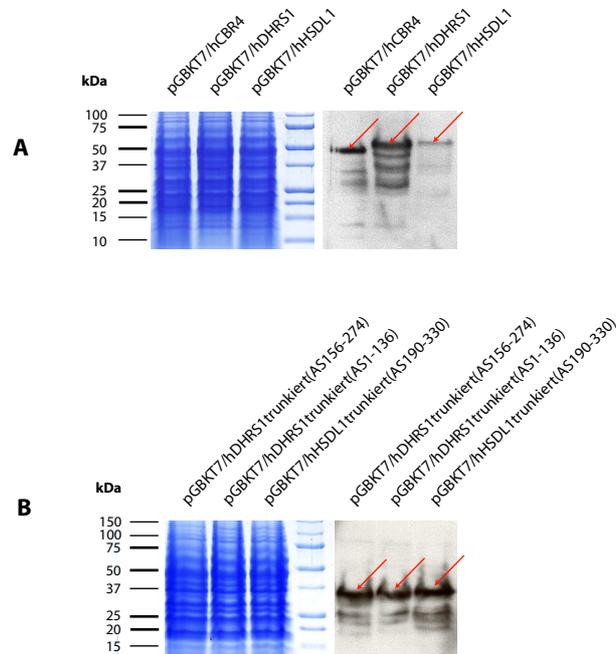
Eine Grundvoraussetzung für den Erfolg der angestrebten Yeast-Two-Hybrid-Screenings war die effektive Expression der an die N-terminalen 147 Aminosäurereste der Gal4-Bindungsdomäne fusionierten Köder-Proteine von Interesse im verwendeten Hefe-Stamm Y187. Der schlüssige Beweis hierfür wurde durch die Durchführung von Western Blots unter Verwendung des monoklonalen Primärantikörpers anti-Myc 9B11 aus Maus erbracht, welcher das zwischen Gal4-Bindungsdomäne und MCS des pGBT7-Vektors gelegene Myc-Epitop erkennt. Die für die jeweiligen Köderkonstrukte errechneten relativen Molekülmassen gehen aus Tabelle 2.13 hervor.

**Tabelle 2.13:** Errechnete relative Molekülmassen der zum Einsatz gebrachten Köderproteine

Köder-Fusionsprotein	errechnete relative Molekülmasse
Gal4-BD/Myc-hCBR4	ca. 46 kDa
Gal4-BD/Myc-hDHRS1	ca. 55 kDa
Gal4-BD/Myc-hDHRS1trunkiert(AS1-136)	ca. 36 kDa
Gal4-BD/Myc-hDHRS1trunkiert(AS156-274)	ca. 34 kDa
Gal4-BD/Myc-hHSDL1	ca. 58 kDa
Gal4-BD/Myc-hHSDL1trunkiert(AS190-330)	ca. 37 kDa

Für alle getesteten Köder-Fusionsproteine konnte eine Expression im Hefe-Stamm Y187 bestätigt

werden (ersichtlich an Banden starker Intensität bei den erwarteten Molekülmassen) (vergleiche Abbildung 2.35). Das Auftreten von Signalen niedrigerer Intensität und Molekülmasse liegt vermutlich in einer Degradierung der Proteine im Laufe des Extraktionsprozesses begründet.



**Abbildung 2.35:** Western Blots bestätigen die erfolgreiche Expression der Köder-Fusionsproteine im Hefe-Stamm Y187. Die Abbildung zeigt die angefertigten Proteingele (10 % Tricin, Coomassie-Färbung) und Western Blots nach Auftrennung der gewonnenen Proteinextrakte aus Y187-pGBKT7/*SDR-Kandidat* (A) bzw. Y187-pGBKT7/*SDR-Kandidat* *trunkiert* (B). Als primärer Antikörper wurde anti-Myc 9B11 aus Maus verwendet, die Visualisierung der Fusionsproteine erfolgte mittels des Peroxidase-gekoppelten AffiniPure Goat anti-Mouse IgG + IgM Antikörpers und anschließender ECL-Färbung. Die im Western Blot detektierten Köder-Fusionsproteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

### Autonome Reporter-gen-Aktivierung kann durch Selektion für alle getesteten Köderkonstrukte ausgeschlossen werden

Um der ungewollten Identifizierung einer Vielzahl von falsch-positiven Klonen vorzubeugen, wurden alle zu testenden Köderkonstrukte pGBKT7/*SDR-Kandidat* sowie der Leervektor pGBKT7 vor der Durchführung der Yeast-Two-Hybrid-Screenings gegen die humane Plazenta-cDNA-Bibliothek auf autonome Reporter-gen-Aktivierung überprüft. Nach Ausplattieren der entsprechenden Plasmid-tragenden Hefen (Y187) auf selektiven DropOut-Medien zeigten alle getesteten Klone wie erwartet Wachstum auf YPDA und SD/-Trp, während auf SD/-Leu, SD/-Leu/-Trp, SD/-Leu/-Trp/-His (TDO) und SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp (QDO) + X- $\alpha$ -Gal kein Wachstum zu verzeichnen war. Eine Autoaktivierung der Reportergene Ade2, His3, LacZ, Leu2 und Mel1 konnte hierdurch eindeutig ausgeschlossen, Y187 als Köder-Stamm bedenkenlos verwendet werden.

### **Mating von Beute- und Köder-Stamm führt zur Identifizierung von zahlreichen positiven Klonen**

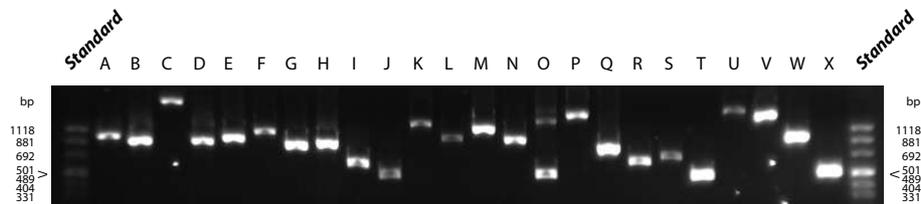
In vorliegender Arbeit wurden insgesamt sieben Yeast-Two-Hybrid-Screenings gegen die humane Plazenta-cDNA-Bibliothek durchgeführt. Das Mating von Beute- und Köderstamm erfolgte wie unter 4.2.6 beschrieben. Um sicherzustellen, daß der größtmögliche Anteil der Hefezellen mit cDNA-Inserts einen Matingpartner findet, zeigt sich während dieses Vorgangs im Optimalfall der die cDNA-Bibliothek tragende Stamm AH109 als der limitierende Partner. Nach Bestimmung der Anzahl lebensfähiger Klone konnte dies für die angestrebten Screenings mit hDHRS1, hHSDL1 und hHSDL1trunkiert(AS190-330) als Beute-Fusionsprotein bestätigt werden, alle anderen Matings wiesen Y187 als limitierenden Partner auf. Laut Angaben des Herstellers Clontech wird weiter für das erfolgreiche Screening einer vortransformierten cDNA-Bibliothek durch Hefe-Mating eine Mating-Effizienz von über 2 % vorausgesetzt. Mit Werten von 3,32 % (hDHRS1trunkiert(AS156-274)-Screen) - 42,06 % (hCBR4-Screen) erfüllten alle durchgeführten Matings diese grundsätzliche Bedingung.

Dem erfolgten Mating schloß sich eine bis zu zweiwöchige Inkubation der DropOut-Platten im Brutschrank bei 30 °C an. Klone, die auf inkubierten TDO-Platten gewachsen waren, wurden zur weiteren Selektion auf QDO + X- $\alpha$ -Gal-Medium ausgestrichen. Aufgrund der deutlichen Zeiterparnis wurde der Mating-Ansatz alternativ in einigen Screenings direkt auf letzterem ausplattiert. Klone hoher Stringenz zeigen ein Wachstum auf QDO-Medium, was auf eine starke Interaktion von Beute- und Köder-Fusionsprotein schließen läßt. Dagegen offenbaren Klone einer mittleren Stringenz lediglich ein Wachstum auf TDO-, nicht aber auf QDO-Platten. Wenngleich das Auftreten von Klonen ausschließlich auf TDO-Medium oftmals auf falsch-positiven Interaktionen beruht, so ist durch die Verwendung entsprechender Platten die Detektion auch von schwachen Wechselwirkungen zwischen den Fusionsproteinen möglich. Aufgrund der in allen durchgeführten Screens immensen Anzahl an Kolonien, die auf den QDO + X- $\alpha$ -Gal-Platten gewachsen waren, wurden allerdings in dieser Arbeit die lediglich auf TDO-Medium gewachsenen Klone nicht zur weiteren Analyse herangezogen. Zur Verifizierung des gezeigten Phänotyps erfolgte ein weiteres Ausplattieren der zunächst als QDO + X- $\alpha$ -Gal positiv identifizierten Klone auf selbigem Medium und die erneute Analyse hinsichtlich der erwarteten, eindeutig blauen Färbung. Aus Tabelle 2.14 gehen neben den errechneten Mating-Effizienzen und jeweiligen Anzahlen an gescreenten Klonen die Summen an gewonnenen und in die weitere Untersuchung eingeflossenen positiven Klonen hervor.

### **PCR-basierter Kolonie-Screen mit Lysaten QDO + X- $\alpha$ -Gal positiver Klone liefert eine Vielzahl an sequenzierbaren Produkten**

Zur Gewinnung der Bibliotheks-cDNA-Inserts diploider Klone wurden Zelllysate der in den Yeast-Two-Hybrid-Screenings als QDO + X- $\alpha$ -Gal positiv identifizierten Klone angefertigt und unmittelbar in eine PCR-Reaktion eingesetzt. Unter Verwendung pGADT7rec-spezifischer Primer konnten in der Mehrheit aller Fälle einzelne, definierte Banden auf den im Folgenden angefertigten Agarosegelen detektiert werden. Die entsprechenden PCR-Produkte wurden direkt aufgereinigt und sequenziert. In anderen Ansätzen führte die durchgeführte PCR-Reaktion hingegen zur Gewinnung mehrerer DNA-Amplifikate, visualisiert durch Doppel- oder Dreifach-Banden auf dem Agarosegel. Nach dem getrennten Ausschneiden besagter Banden und der anschließenden Auf-

reinigung der DNA wurde auch ihre Basenfolge bestimmt. Generell ist zu bemerken, daß zur erleichterten Handhabung gegebenenfalls eine Limitierung der in die Sequenzierungsreaktion eingesetzten PCR-Produkte erfolgte. Abbildung 2.36 zeigt exemplarisch die Ergebnisse eines PCR-Kolonie-Screens ausgewählter Klone, Tabelle 2.14 fasst die Resultate aller durchgeführten Yeast-Two-Hybrid-Screenings zusammen.



**Abbildung 2.36:** PCR-basierter Kolonie-Screen mit Lysaten QDO + X- $\alpha$ -Gal positiver Klone liefert eine Vielzahl an sequenzierbaren Produkten. Das Agarosegel (1,5 %) zeigt einen Anteil der im Zuge der Identifizierung der Bibliotheks-Inserts erzielten PCR-Amplifikate unter Verwendung pGADT7rec-spezifischer Primer.

### Sequenzierung der gewonnenen PCR-Produkte offenbart potentielle Bindungspartner der zu untersuchenden SDR-Kandidaten

Die Sequenzierung der erhaltenen PCR-Produkte erfolgte unter Verwendung eines T7-Sequenzierungsprimers. Wie aus Tabelle 2.15 hervorgeht, konnten nicht für alle Klone verwertbare Sequenzen gewonnen werden, in vereinzelten Fällen brachte die Analyse lediglich Mischsequenzen oder für eine Auswertung zu kurze Basenfolgen hervor. Die Vielzahl der Sequenzierungen lieferte hingegen eindeutige Elektropherogramme, die entsprechenden Nukleotidsequenzen wurden daraufhin mittels blastn gegen die NCBI-Nukleotidatenbank geblastet. Um sicherzustellen, daß der mögliche Wechselwirkungskandidat tatsächlich als Protein exprimiert wird, erfolgte darüberhinaus ein Sequenzvergleich gegen die NCBI-Proteindatenbank (tblastn). Abhängig vom durchgeführten Screening offenbarten 42,0 % (hDHRS1) - 87,0 % (hDHRS1trunkiert(AS156-274)) der analysierten Sequenzen im Alignment kein signifikantes BLAST-Ergebnis. Nach Ausschluß von weiteren 6,1 % (hCBR4) - 36,0 % (hDHRS1) an vermeintlich falsch-positiven Interaktoren, identifiziert im Rahmen zahlreicher Yeast-Two-Hybrid-Studien [73], konnte lediglich ein geringer Anteil an ermittelten Sequenzen (10,2 % für hCBR4 - 22,0 % für hDHRS1) - als potentielle Bindungspartner der zu charakterisierenden Mitglieder der SDR-Proteinfamilie in Betracht gezogen werden.

Dennoch sei an dieser Stelle festgehalten, daß mittels der durchgeführten Screenings für fast alle getesteten Köderproteine positive Ergebnisse erzielt werden konnten (aufgrund der Fülle an Daten wird hier auf eine detaillierte Aufstellung der Resultate des Primärscreens verzichtet). Lediglich die Screenings für hCBR4 und hDHRS1trunkiert(AS156-274) blieben hinter den Erwartungen zurück. Für das Köderprotein hCBR4 konnten im durchgeführten Screening lediglich sehr wenige potentielle Interaktionspartner aufgezeigt werden, die Wiederholung des Experiments schlug gänzlich fehl. Der Screen unter Verwendung des C-Terminus von hDHRS1 (hDHRS1trunkiert(AS156-274)) lieferte neben zahlreichen falsch-positiven keinerlei verwertbaren Treffer.

**Tabelle 2.14:** Zusammenfassung der Resultate aus den durchgeführten Yeast-Two-Hybrid-Screenings - Teil 1

Screen	Mating-Effizienz [%]	Limitierender Partner	Anzahl gescreenter Klone	TDO-positive Klone
hCBR4	42,06	Y187	$1,43 \times 10^7$	148
hCBR4 ( <i>Wiederholung</i> )	12,84	Y187	$2,10 \times 10^6$	—
hDHRS1	5,97	AH109	$1,17 \times 10^7$	379
hDHRS1trunkiert(AS1-136)	4,94	Y187	$1,13 \times 10^7$	—
hDHRS1trunkiert(AS156-274)	3,23	Y187	$5,57 \times 10^6$	—
hHSDL1	8,94	AH109	$2,43 \times 10^7$	457
hHSDL1trunkiert(AS190-330)	3,68	AH109	$1,09 \times 10^7$	—

Screen	QDO-positive Klone*	QDO + X- $\alpha$ -Gal-positive Klone	gewonnene PCR-Produkte
hCBR4	49	47	50
hCBR4 ( <i>Wiederholung</i> )	0	0	0
hDHRS1	101	56	53
hDHRS1trunkiert(AS1-136)	467	356	red. auf 106
hDHRS1trunkiert(AS156-274)	464	400	red. auf 106
hHSDL1	92	48	48
hHSDL1trunkiert(AS190-330)	359	187	red. auf 192

\* = inkl. Wiederausstrich von TDO

Eine erhöhte Anzahl an gewonnenen PCR-Produkten im Vergleich zur Summe der ihnen zugrunde liegenden, als QDO + X- $\alpha$ -Gal-positiv identifizierten Klone beruht auf der vereinzelt Gewinnung mehrerer DNA-Amplifikate im Zuge der durchgeführten PCR-Reaktion.

**Tabelle 2.15:** Zusammenfassung der Resultate aus den durchgeführten Yeast-Two-Hybrid-Screenings - Teil 2

Screen	gewonnene PCR- Produkte	gewonnene Sequenzen	BLAST- Ergebnis insignifikant
hCBR4	50	49	39
hCBR4 ( <i>Wiederholung</i> )	0	0	0
hDHRS1	53	50	21
hDHRS1trunkiert(AS1-136)	red. auf 106	106	61
hDHRS1trunkiert(AS156-274)	red. auf 106	100	87
hHSDL1	48	43	28
hHSDL1trunkiert(AS190-330)	red. auf 192	180	139

Screen	falsch- positive Interaktoren	potentielle Bindungs- partner
hCBR4	5	5
hCBR4 ( <i>Wiederholung</i> )	0	0
hDHRS1	18	11
hDHRS1trunkiert(AS1-136)	29	16
hDHRS1trunkiert(AS156-274)	13	0
hHSDL1	9	6
hHSDL1trunkiert(AS190-330)	11	30

### Cotransformation von Beute- und Köderkonstrukten in den Stamm AH109 schließt einige aus dem Primärscreen hervorgegangene Proteine als Interaktionspartner aus.

Da die Aussagekraft der Ergebnisse eines Yeast-Two-Hybrid Screenings oftmals in Frage zu stellen ist, wurden alle identifizierten potentiellen Interaktionspartner (Anzahl vergleiche Tabelle 2.15) einem ersten Verifizierungsschritt, ebenfalls basierend auf der Methodik des Yeast-Two-Hybrid Systems, unterzogen. Hierzu wurden zunächst aus den QDO + X- $\alpha$ -Gal positiven Klonen mit interessanten Inserts die Plasmide isoliert. Zur Trennung von Beute- und Köderkonstrukt erfolgte eine Transformation der Plasmidmischung in *E. coli*-Zellen und die Selektion von Transformanten auf LB-Amp Platten. Aufgrund des Ampicillin-Resistenzgens, hinterlegt auf dem pGADT7rec-Vektor, sollten lediglich Transformanten mit aufgenommenem Beute-Plasmid Wachstum auf dem besagten Medium zeigen. Da es unwahrscheinlich ist, daß Bakterien-Zellen während des Transformationsvorgangs zwei Plasmide aufnehmen, wurde eine ausschließliche Präsenz des Beute-Konstrukts in den gewachsenen Transformanten angenommen. Nach einer weiteren Plasmid-Isolierung erfolgte neben der Retransformation der gewonnenen Beute-Konstrukte (zur Überprüfung einer möglichen Autoaktivierung der Reportergene) die Cotransformation von Beute-Plasmid und pGBKT7-Leervektor (Negativ-Kontrolle) bzw. pGBKT7-Köderkonstrukt in den Hefe-Stamm AH109. Durch Ausplattieren der Transformationsansätze auf definierten DropOut-Medien - das für die Verifizierung einer Interaktion erforderliche Wachstumsmuster ist in Tabelle 2.16 illustriert - war es schließlich möglich, zahlreiche, aus dem Primärscreen hervorgegangene Wechselwirkungen zu bestätigen, einige Proteine dagegen auch als tatsächliche Bindungspartner der SDR-Enzyme von Interesse auszuschließen. Abbildung 2.37 fasst die Ergebnisse des ersten Verifizierungsschritts zusammen.

**Tabelle 2.16:** Erforderliches Wachstumsmuster zur Verifizierung einer Interaktion

Transformation	SD/-Leu/-Trp	QDO + X- $\alpha$ -Gal
pGADT7rec/ <i>Interaktionspartner</i>	-	-
pGADT7rec/ <i>Interaktionspartner</i> - pGBKT7	+	-
pGADT7rec/ <i>Interaktionspartner</i> - pGBKT7/ <i>SDR-Kandidat</i>	+	+

### GST-Pulldown Assays bestätigen einige Interaktionspartner von hDHRS1 und hHSDL1

Zur Absicherung der erzielten Resultate wurde eine Auswahl identifizierter Interaktionspartner einem weiteren Verifizierungsschritt unterzogen. Bei besagtem Experiment handelte es sich um eine vom Yeast-Two-Hybrid-System vollständig unabhängige Methode, den GST-Pulldown Assay. Zur Untersuchung ausgewählt wurden potentielle Wechselwirkungskandidaten, die bereits im ersten Verifizierungsschritt positive Resultate zeigten (vergleiche 2.2.7), deren kodierende Sequenz sich im Leseraster der für das Yeast-Two-Hybrid-Screening essentiellen Aktivierungsdomäne befand und die darüberhinaus aufgrund von Mehrfachidentifizierung, besonders starker Blaufärbung etc. als besonders interessante Kandidaten bewertet wurden. Ihre Gewinnung erfolgte durch *in vitro*-Translation, ausgehend vom T7-Promotor des entsprechenden pGADT7rec-Vektorkonstrukts. Die ebenfalls für den GST-Pulldown Assay erforderlichen GST-Fusionsproteine der Köderenzyme

## 2 Ergebnisse

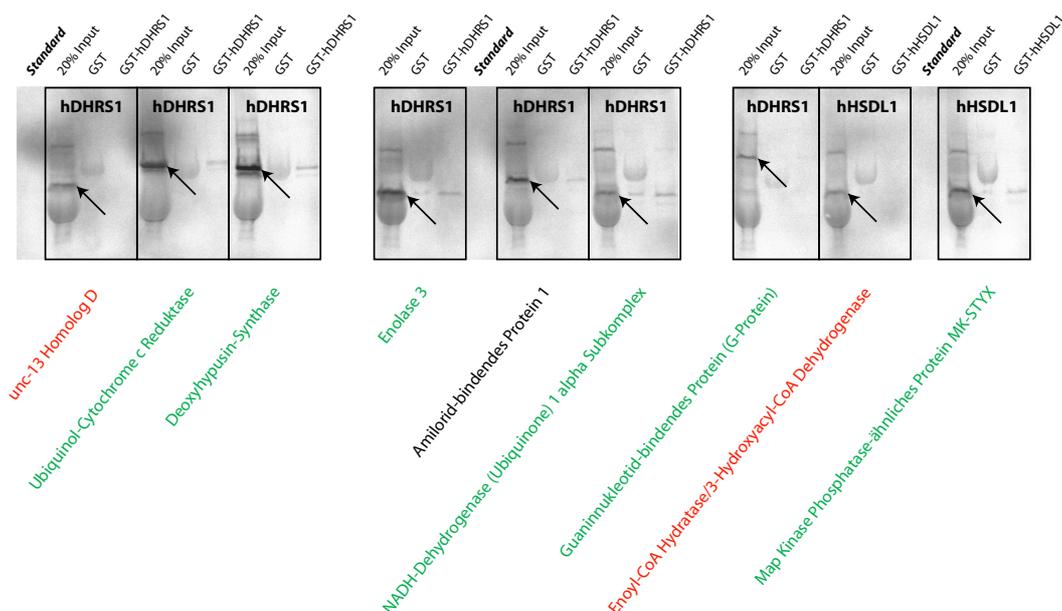
Screen	Potentieller Interaktionspartner Protein blast	Identifizierungen	Frame mit AD	Verifizierung
hCBR4	cullin 5, isoform CRA_a	3	i	-
	microtubule-associated protein 1B isoform 2	1	k	-
	hCG30600, isoform CRA_c	1	k	-
hDHR51	Ribonuclease P protein subunit p20 (RNaseP protein p20) (hPOP7)	1	k	+
	Enolase 3 (beta, muscle)	1	k	++
	unc-13 homolog D	4	k	++
	family with sequence similarity 46, member A	1	k	++
	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I	1	k	++
	lamin A/C, isoform CRA_c	1	k	++
	similar to Complement C3 precursor, isoform CRA_a	1	k	+
	golgi autoantigen, golgin subfamily b, macrogolgin (with transmembrane signal), 1, isoform CRA_b	1	i	-
hDHR51 trunkiert(AS1-136)	deoxyhypusine synthase, isoform CRA_c	1	k	++
	PP1 1347	1	i	++
	Enolase 3 (beta, muscle)	6	k	++
	amiloride binding protein 1 (amine oxidase (copper-containing)), isoform CRA_d	2	k	++
	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 3, 9kDa	1	k	++
	chromosome 3 open reading frame 60, isoform CRA_a	1	k	++
	absent in melanoma 1-like	1	k	++
	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1, isoform CRA_c	1	k	++
	chorionic somatomammotropin hormone 1 isoform 2	1	k	n. d.
	cytochrome c oxidase subunit II	1	k	n. d.
hHSDL1	Chain A, Crystal Structure Of Human Dead-Box Rna Helicase Ddx3x	2	i	-
	ALDH7A1 protein	1	i	n. d.
	corticotropin releasing hormone precursor	1	i	++
	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 4 (putative), isoform CRA_b	1	i	++
	TAK1-binding protein 3, isoform CRA_b / TPA: augmented in rheumatoid arthritis 2 / HMGA2e	1	i	++
	hHSDL1 trunkiert(AS190-330)	hCG2038631	1	i
hCG1820921		1	i	-
v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian), isoform CRA_b		1	i	-
glycosyltransferase 28 domain containing 1, isoform CRA_a		1	i	++
ubiquitin-activating enzyme E1 (A1S9T and BN75 temperature sensitivity complementing)		1	i	++
protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A		3	i	++
prostaglandin transporter hPGT		1	i	++
trans-prenyltransferase variant		1	i	-
G protein-coupled receptor 4		2	i	++
UNC-112 related protein 2, isoform CRA_a		2	i	++
scotin, isoform CRA_c		2	k	-
scotin, isoform CRA_c		1	i	++
keratin associated protein 1.5		1	i	++
GTPase		1	i	++
ancient ubiquitous protein 1, isoform CRA_c		2	i	++
enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase alpha-subunit of trifunctional protein		1	k	++
amino acid transporter, isoform CRA_c		1	i	++
apoptosis associated protein		2	i	++
eukaryotic translation elongation factor 1 gamma, isoform CRA_a		1	?	++
phosphoribosylglycinamide formyltransferase, phosphoribosylglycinamide synthetase		1	i	++
RAB11 family interacting protein 5 (class I), isoform CRA_a		1	i	-
abhydrolase domain containing 9		1	i	++
absent in melanoma 1-like		1	k	-
map kinase phosphatase-like protein MK-STYX	1	k	++	

**Abbildung 2.37:** Cotransformation von Beute- und Köderkonstrukten in den Stamm AH109 schließt einige aus dem Primärscreen hervorgegangene Proteine als Interaktionspartner aus. Die dargestellte Abbildung fasst alle im Primärscreen identifizierten möglichen Bindungspartner der getesteten SDR-Enzyme bzw. -Proteinfragmente zusammen. Neben der Anzahl an jeweiligen Identifizierungen ist angegeben, welche Wechselwirkungskandidaten im korrekten Leseraster (Frame) mit der für das Yeast-Two-Hybrid-System essentiellen Aktivierungsdomäne (AD) kloniert wurden (k = korrekt, i = inkorrekt). Positive Verifizierungen sind mit + gekennzeichnet (+ für Wachstum, ++ für Wachstum und Blaufärbung; n. d. = kein Klon verfügbar, deshalb keine Verifizierung durchgeführt), der Grad der Koloniefärbung geht aus den gewählten Blautönen hervor. Aufgrund von inkorrektem Leseraster (i) oder negativer Verifizierung (-) von weiteren Analysen ausgeschlossene Proteine sind rot eingefärbt, für die Verifizierung in einem weiteren Experiment ausgewählte Interaktoren sind grün markiert.

hDHRS1 und hHSDL1 (beide volle Länge) - der SDR-Kandidat hCBR4 wurde aufgrund des Mangels an potentiellen Bindungspartnern nach den Yeast-Two-Hybrid-Screenings nicht in die GST-Pulldown Assays einbezogen - wurden durch prokaryotische Expression gewonnen.

Im GST-Pulldown Assay - zur Absicherung der Resultate dreimalig durchgeführt - konnten für das zu charakterisierende Mitglied der SDR-Proteinfamilie hDHRS1 die Proteine Deoxyhypusinsynthase (EAW84289), Guaninnukleotid-bindendes Protein (EAW53694), NADH-Dehydrogenase (Ubiquinon) 1 alpha Subkomplex (NP\_004533) und Ubiquinol-Cytochrom C Reduktase (NP\_003356) als Interaktionspartner verifiziert werden (jeweils dreimal bestätigt). Eine Wechselwirkung hDHRS1 zu Enolase 3 (AAH17249) ließ sich in zwei der drei durchgeführten Experimente nachweisen, das Amilorid-bindende Protein 1 (EAW54087) zeigte lediglich in einem der Assays ein positives Resultat. Das unc-13 Homolog (NP\_954712) mußte nach radiographischer Auswertung als Bindungspartner von hDHRS1 ausgeschlossen werden.

Die durchgeführten GST Pulldown Assays bestätigten weiter das Map Kinase Phosphatase-ähnliche Protein MK-STYX (NP\_057170) als Interaktionspartner von hHSDL1 (zweimal bestätigt), die mittels Yeast-Two-Hybrid-Technologie eindeutig identifizierte Wechselwirkung zur Enoyl-CoA Hydratase (BAA03941) stellt sich dahingegen als unzutreffend heraus. Abbildung 2.38 zeigt exemplarisch die Ergebnisse eines der durchgeführten GST-Pulldown Assays.



**Abbildung 2.38:** GST-Pulldown Assays bestätigen einige Interaktionspartner von hDHRS1 und hHSDL1. Dargestellt ist das Autoradiogramm eines nach Durchführung eines GST-Pulldown Assays angefertigten 10 %igen Proteingels (20 % Input: 20 % des Ansatzes zur *in vitro*-Translation des möglichen Interaktionspartners; GST: Leerkontrolle, GST ohne Fusion gebunden an GT-Sepharose Beads; GST-SDR-Kandidat: GST-Fusionsprotein gebunden an GT-Sepharose Beads). Abgebildete Pfeile zeigen auf den *in vitro*-translatierten, potentiellen Bindungspartner. Bei positiver Wechselwirkung zeigt sich in der jeweils dritten Gelspur (GST-SDR-Kandidat) ein deutliches Signal der entsprechenden Größe. Als Interaktionspartner verifizierte Proteine sind grün eingefärbt, Proteine, denen keine Wechselwirkung nachgewiesen werden konnte, sind rot markiert.

### Coimmunopräzipitation schließt Interaktion von hCBR4 und Prostaglandin E-Synthase aus

Aufgrund des im *in vitro*-System nachgewiesenen katalytischen Potentials hCBR4s gegenüber Prostaglandin E<sub>2</sub> (vergleiche 2.2.5) wurde zwischenzeitlich eine Beteiligung des SDR-Kandidaten am entsprechenden Metabolismus in Erwägung gezogen. Da die Katalyse eines jeden Stoffwechselweges durch das enge Zusammenwirken unterschiedlicher Enzyme bewerkstelligt wird, erschien auch für hCBR4 im Falle seines tatsächlichen Mitwirkens am Prostaglandin-Metabolismus eine Interaktion mit anderen involvierten Proteinen nicht unwahrscheinlich. In erster Linie kam als potentieller Wechselwirkungspartner die vor einer möglichen Umwandlung von Prostaglandin E<sub>2</sub> durch hCBR4 aktive Prostaglandin E-Synthase (katalysiert die Isomerisierung von Prostaglandin H<sub>2</sub> zu Prostaglandin E<sub>2</sub>) in Betracht. Die zur Überprüfung der vorgeschlagenen Interaktion durchgeführte Coimmunopräzipitation - die *in vitro*-Translation der zu untersuchenden Proteine basierte auf den generierten Vektorkonstrukten pGBKT7/hCBR4 und pcDNA3/PTGES - schloß allerdings eine Wechselwirkung von hCBR4 und Prostaglandin E-Synthase eindeutig aus.

### Zusammenfassung der Identifizierung von Interaktionspartnern der zu charakterisierenden Mitglieder der SDR-Proteinfamilie

Die Studien zur Identifizierung von möglichen Interaktionen der zu charakterisierenden SDR-Enzyme deckten für hDHRS1 und hHSDL1 einige vielversprechende Bindungspartner auf, lediglich für hCBR4 konnten im Rahmen der Analysen keine Wechselwirkungen identifiziert werden. Tabelle 2.17 fasst die erzielten Ergebnisse zusammen.

**Tabelle 2.17:** Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Studien zur Identifizierung von Interaktionspartnern

SDR-Kandidat	Bindungspartner	Protein-ID
hDHRS1	Amilorid-bindendes Protein 1	EAW54087
	Deoxyhypusin-Synthase	EAW84289
	Enolase 3	AAH17249
	Guaninnukleotid-bindendes Protein	EAW53694
	NADH-Dehydrogenase (Ubiquinon) 1 alpha Subkomplex	NP_004533
	Ubiquinol-Cytochrom C Reduktase	NP_003356
hHSDL1	Map Kinase Phosphatase-ähnliches Protein MK-STYX	NP_057170)

## 2.3 Charakterisierung der Wwox-Funktion anhand der entsprechenden Mausmutante

### 2.3.1 Etablierung der Mauskolonie Wwox

Neben der Charakterisierung neuer Mitglieder der SDR-Proteinfamilie (vergleiche 2.2) sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein bereits teilweise beschriebenes SDR-Enzym, das murine Protein „WW domain-containing oxidoreductase“ (Wwox), eingehender untersucht werden.

Die angestrebten Studien zur detaillierten Aufklärung der *in vivo*-Funktion des Proteins von Interesse anhand einer spezifischen Mausmutante setzten zunächst die erfolgreiche Etablierung der entsprechenden Mauskolonie voraus. Die Durchführung dieses Teilprojekts wurde durch den Umstand erleichtert, daß bereits zu Beginn der Doktorarbeit für das Wwox-Allel heterozygote Mäuse am Helmholtz Zentrum München verfügbar waren. Bei der bereitgestellten, als „W088C04“ bezeichneten Mauslinie handelt es sich um eine Linie, die durch das German GeneTrap Consortium (GGTC; angesiedelt z.T. auch am Helmholtz Zentrum München) generiert wurde. Ihre Erzeugung geht auf Klone muriner embryonaler Stammzellen zurück (ES-Zelllinie 129P2, früher 129/Ola), die über eine, durch den Einsatz des non-retroviralen GeneTrap-Vektors pT1 $\beta$ geo herbeigeführte, zufällige Integration einer lacZ-Reporter-Kassette im Gen, kodierend für Wwox, verfügen. Verpaarungen innerhalb dieser Mauslinie zielten auf die Generierung einer Nullmutante, einer so genannten homozygoten Knock-Out-Maus, die aufgrund der Inaktivierung des Gens Wwox durch besagte Integration nicht mehr in der Lage ist, das entsprechende Protein funktionell zu exprimieren. Eine phänotypische Untersuchung besagter Knock-Out-Maus bezüglich Reproduktionsbiologie, Knochenaufbau oder metabolischer Parameter sollte schlußendlich wichtige Erkenntnisse über Funktion und Signifikanz des Wwox-Enzyms im Stoffwechsel liefern.

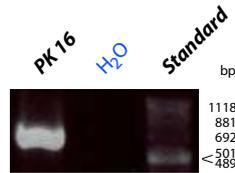
#### Entwicklung einer Strategie zur Genotypisierung der Wwox-Mauslinie

Die Etablierung der Mauskolonie erforderte zunächst die Verfügbarkeit einer verlässlichen Genotypisierungsstrategie. Da sich die Genotypen der zur Verfügung gestellten Wwox-Mäuse sowohl durch Polymerasekettenreaktion (PCR) als auch durch Southern Blot-Technologie nach Vorgaben des German GeneTrap Consortiums trotz mehrfacher Wiederholung nicht bestimmen ließen, war vor dem Ansetzen erster Züchtungsverpaarungen die Entwicklung eines alternativen, funktionstüchtigen Protokolls erforderlich. Alle Anstrengungen konzentrierten sich hierbei auf eine Verwendung der PCR-Methodik, da diese in Anbetracht der erwarteten Vielzahl an Nachkommen einfacher zu handhaben, schneller und kostengünstiger im Vergleich zu anderen Verfahren ist. Aufgrund der Tatsache, daß sich erste Züchtungsschritte lediglich auf Rückkreuzungen gegen C57-BL/6-Wildtyp-Mäuse beschränken sollten, war es anfänglich ausreichend, ein Verfahren zur Differenzierung von Wildtyp- und heterozygoten Mäusen zu entwickeln. Um im weiteren Verlauf der Linien-Etablierung allerdings auch heterozygote von homozygoten Mäusen unterscheiden zu können, war die Entwicklung einer weiteren PCR-Strategie von Nöten, die im Gegensatz zur bereits beschriebenen die Bestimmung der exakten Insertionsposition der lacZ-Reporter-Kassette im Wwox-Gen voraussetzte.

**Detektion der Reporter-kassette erlaubt Unterscheidung zwischen Wildtyp- und heterozygoten (bzw. homozygoten) Wwox-Mäusen.** Zur erfolgreichen Identifizierung von heterozygoten (oder homozygoten) Nachkommen der Wwox-Mauslinie war lediglich die Insertion der lacZ-Reporter-kassette, ausgestattet mit einem *engrailed-2*-Splice-Akzeptor (*en-2-SA*), dem bakteriellen  $\beta$ -Galaktosidase-Reportergen (*lacZ*) und dem Resistenzmarker Neomycin (*neo*, in Kombination als  $\beta$ -Geo bezeichnet) im Wwox-Gen zu detektieren. Unter Verwendung einer Kassetten-spezifischen Primerkombination (forward-Primer *en-2*-spezifisch, reverse-Primer *lacZ*-spezifisch) und einer weiteren Primerkombination als Positiv-Kontrolle (forward- und reverse Primer *en-2*-spezifisch zur Amplifizierung von endogenem *en-2*) ist es gelungen, eine sehr zuverlässige Genotypisierungsstrategie zu etablieren, die zwar keine Differenzierung zwischen hetero- und homozygoten Tieren erlaubte, dafür aber den zunächst angestrebten Ausschluß von Wildtyp-Mäusen aus dem weiteren Züchtungsbetrieb möglich machte. Die entwickelte Methode fand alleinig Anwendung bis zur fünften Nachkommengeneration (Umfang der durchgeführten Rückkreuzungen) und wurde auch im späteren Verlauf der Linien-Etablierung stets ergänzend zur Überprüfung der auf anderem Wege erzielten Ergebnisse eingesetzt.

**lacZ-Reporter-kassette inseriert am 3'-Ende des zwischen den Wwox-Exons 4 und 5 gelegenen Introns.** Die für eine Identifizierung der angestrebten Knock-Out-Maus unabdingbare Unterscheidung zwischen hetero- und homozygoten Wwox-Nachkommen erforderte zunächst die Ermittlung der genauen Position der lacZ-Reporter-kassetten-Insertion im Wwox-Gen. Durch Analyse einer vom German GeneTrap Consortium zur Verfügung gestellten Nukleotidsequenz - diese war durch RACE-PCR erhalten worden -, konnte die zwischen den Exons 4 und 5 (insgesamt 9 Exons) gelegene nicht-kodierende Region (im Folgenden als Intron 4-5 bezeichnet) als Kassetten-tragender Sequenzabschnitt bestimmt werden. Aufgrund der immensen Größe des besagten Introns von 40.559 bp war vor der Etablierung der Genotypisierungsstrategie allerdings die weitere Eingrenzung der Insertionsposition von Nöten. Mittels Longrange-PCR-Technologie wurde unter Verwendung von 16 verschiedenen forward-Primern, gesetzt in 5 kb-Schritten, dabei beginnend am 3'-Ende des vorgehenden Exons, und einem spezifischen Kassettenprimer (reverse-Primer), die gesamte Länge des Introns 4-5 auf die Präsenz der lacZ-Reporter-kassette überprüft. Der Erhalt eines etwa 700 bp großen PCR-Produkts aus der Primerkombination 16 (vergleiche Abbildung 2.39; forward-Primer spezifisch für die Basenpaare 37.543-37.570 des Introns 4-5, reverse-Primer *en-2*-spezifisch) und dessen anschließende Sequenzierung identifizierten im erhaltenen Amplifikat eindeutig einen Sequenzabschnitt des Wwox-Genes und erlaubten somit die Lokalisierung der lacZ-Reporter-kassette am 3'-Ende des Introns 4-5. Wenngleich eine basengenaue Bestimmung der Insertion aufgrund der schlechten Qualität der gewonnenen Sequenzen nicht möglich war, so reichte die erzielte Eingrenzung für die Entwicklung der angestrebten Genotypisierungsstrategie aus.

**Kurze Elongationszeit schließt die Amplifizierung eines Wildtyp-spezifischen PCR-Produkts in homozygoten Knock-Out-Mäusen aus.** Durch die präzise Lokalisierung der lacZ-Reporter-kassette im murinen Wwox-Gen und der damit einhergehenden Identifizierung auch direkt benachbarter Sequenzbereiche sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende der Kassette (entspricht Sequenzbereichen des Introns 4-5) war es möglich, eine PCR-Genotypisierung zu etablieren, die eine Unterscheidung zwischen hetero- und homozygoten Mäusen erlaubte. Die entwickelte Strategie ba-

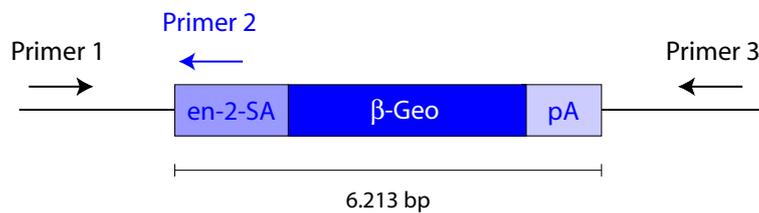


**Abbildung 2.39:** lacZ-Reporterkassette insertiert am 3'-Ende des zwischen den Wwox-Exons 4 und 5 gelegenen Introns. Der abgebildete Auszug aus dem angefertigten Agarosegel (1 %) offenbart eindeutig die erfolgreiche Amplifikation eines etwa 700 bp großen PCR-Produkts unter Verwendung der Primerkombination 16 (PK 16; forward-Primer spezifisch für die Basenpaare 37.543-37.570 des Introns 4-5, reverse-Primer *en-2*-spezifisch).

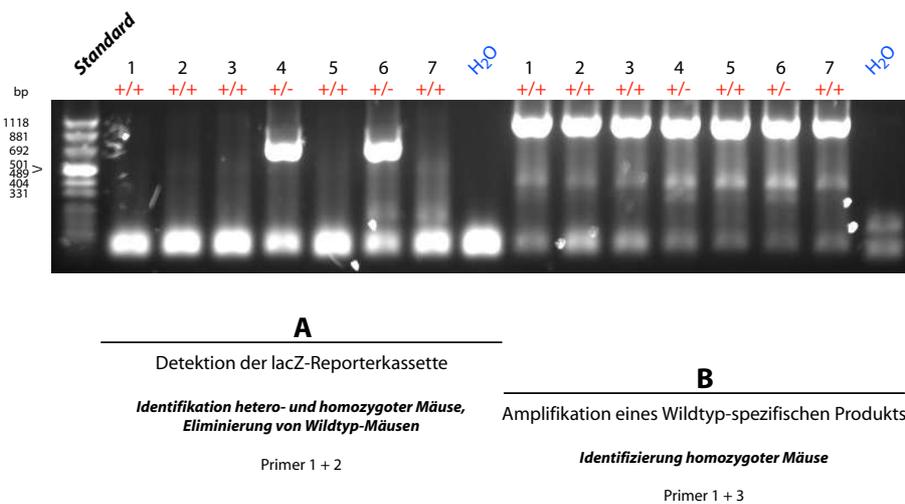
sierte auf einer Kombination aus der Detektion der Reporterkassette (Identifikation hetero- und homozygoter Mäuse, Eliminierung der Wildtypen) und dem Ausschluß der Amplifikation eines Wildtyp-spezifischen PCR-Produkts in homozygoten Nachkommen. Neben der bereits im Rahmen der Kassettenortung eingesetzten Primerkombination 16 (forward-Primer spezifisch für die Basenpaare 37.543-37.570 des Introns 4-5, reverse-Primer *en-2*-spezifisch) - diese diente dem Nachweis der Insertion -, kam ein weiteres Primerpaar zum Einsatz (forward-Primer spezifisch für die Basenpaare 37.543-37.570, reverse-Primer spezifisch für die Basenpaare 38.612-38.639 des Introns 4-5), mit dessen Hilfe gegebenenfalls ein Wildtyp-spezifisches PCR-Produkt erzielt werden konnte. Die Regulierung seiner Amplifikation erfolgte durch eine sehr kurz gewählte Elongationszeit (1 min 20 sec). Aufgrund einer Elongationsgeschwindigkeit der verwendeten, hauseigenen Taq-Polymerase von etwa 1.000 bp pro min (entspricht etwa 1.200 bp im Zeitfenster der Kettenverlängerung) und einer Größe der möglicherweise insertierten Kassette (6.213 bp) weit über der zu bewerkstellenden Nukleotidanzahl, war die Amplifizierung eines Produktes unter Verwendung dieser Primerkombination nur bei Wildtyp- oder heterozygoten Nachkommen zu erwarten. Eine Gewinnung des spezifischen Amplifikats in den angestrebten homozygoten Knock-Out-Mäusen, die in beiden Kopien des Wwox-Gens über die Insertion der lacZ-Reporterkassette verfügen, konnte ausgeschlossen werden. Abbildung 2.40 stellt die etablierte Genotypisierungsstrategie schematisch dar, Tabelle 2.18 fasst die erwarteten Bandenmuster auf dem im Anschluß an die PCR anzufertigenden Agarosegel zusammen. Exemplarisch und zum Beweis der Funktionalität der entwickelten Strategie ist das Abbild eines solchen in Abbildung 2.41 gezeigt.

**Tabelle 2.18:** Erwartetes Bandenmuster nach Anwendung der etablierten Genotypisierungsstrategie

Genotyp	Bandenmuster	Produkt-Größe
Wildtyp	1 Bande	1.097 bp (Primer 1 + 3)
heterozygot	2 Banden	ca. 700 bp (Primer 1 + 2) 1.097 bp (Primer 1 + 3)
homozygot	1 Bande	ca. 700 bp (Primer 1 + 2)



**Abbildung 2.40:** Kurze Elongationszeit schließt die Amplifizierung eines Wildtyp-spezifischen PCR-Produkts in homozygoten Knock-Out-Mäusen aus. Zum Nachweis der lacZ-Reporterkassette kamen ein forward-Primer (Primer 1), spezifisch für die Basenpaare 37.543-37.570 des Introns 4-5 und ein reverse-Primer (Primer 2), *en-2*-spezifisch, zum Einsatz. Dies ermöglichte die Identifikation von hetero- und homozygoten Mäusen und die Eliminierung von Wildtypen. Die Identifizierung der homozygoten Knock-Out-Mäuse erfolgte unter Verwendung des identischen forward-Primers (Primer 1) in Kombination mit einem reverse-Primer (Primer 3), spezifisch für die Basenpaare 38.612-38.639 des Introns 4-5. Die Amplifizierung des Wildtyp-spezifischen PCR-Produkts (Primerpaar 1 + 3) wurde in homozygoten Mäusen durch die kurz gewählte Elongationszeit von 1 min 20 sec ausgeschlossen (Größe der insertierten Reporter-kassette 6.213 bp).



**Abbildung 2.41:** Exemplarische Darstellung eines Genotypisierungsergebnisses. Das abgebildete Agarosegel (1,5 %) weist zunächst die Mäuse 4 und 6 als hetero- (+/-) oder homozygot (-/-) aus. In beiden Tieren kann die lacZ-Reporterkassette mittels des Primerpaares 1 + 2 detektiert (A) und somit ein Wildtyp-Genotyp (+/+) ausgeschlossen werden. Da sowohl Maus 4 als auch Maus 6 nach Amplifikation unter Verwendung der Primer 1 und 3 ein Wildtyp-spezifisches Produkt hervorbringen (B), kann es sich bei beiden Tieren nicht um für das *Wwox*-Allel homozygote Mäuse handeln. Die Mäuse 4 und 6 werden als heterozygote Nachkommen identifiziert.

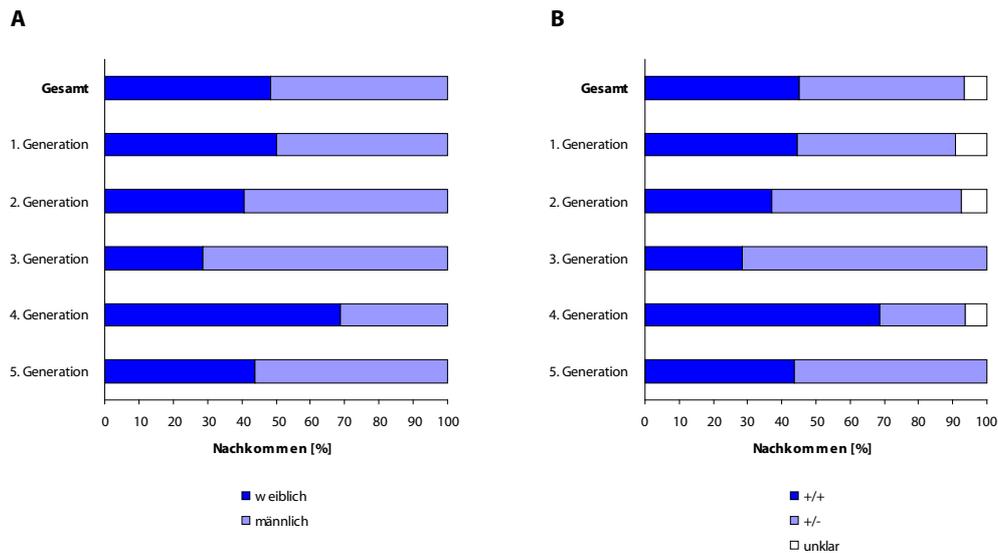
### **Rückkreuzungen auf C57/Bl6J-Mäuse definieren den genetischen Hintergrund der Wwox-Mauslinie**

Voraussetzung für die Untersuchung der Effekte eines herbeigeführten Knock-Outs auf den Phänotyp der betreffenden Maus ist die Definition ihres genetischen Hintergrundes im Vorfeld der auf eine Nullmutante zielenden Züchtung. Die einzelnen Mauslinien wie z.B. Swiss Sentinel und C57/Bl6J weisen Unterschiede in einer Vielzahl an Parametern auf, die im Rahmen der Analyse der angestrebten GeneTrap-Knock-Out-Maus fälschlicherweise als Auswirkungen der durch Insertion der lacZ-Reporterkassette herbeigeführten Infunktionalität des Proteins von Interesse ausgelegt werden könnten. Um etwaigen Missinterpretationen vorzubeugen, wurden die vom German GeneTrap Consortium zur Verfügung gestellten, für das Wwox-Allel heterozygoten Mäuse (vier Männchen, ein Weibchen; Ursprungsstrang Swiss Sentinel, nach krankheitsbedingtem Embryotransfer C57/Bl6J) mit C57/Bl6J-Mäusen verpaart, die hervorgegangenen Nachkommen nach beschriebener Art und Weise genotypisiert und als heterozygot identifizierte Tiere erneut auf C57Bl/6-Hintergrund rückgekreuzt. Die Definition des genetischen Hintergrundes durch Rückkreuzung erstreckte sich bis hin zur fünften Generation der zu etablierenden Wwox-Mauslinie, wobei durchweg eine normale Fortpflanzungsfähigkeit (Wurfzahlen von zwei bis zwölf Nachkommen) der heterozygoten Wwox-Mäuse zu beobachten war. Über die gesamte Zuchtspanne der Rückkreuzung (1. - 5. Generation) wurden im Durchschnitt 7,1 Junge pro Wurf geboren. Das Verhältnis zwischen weiblichen und männlichen Tieren unterlag dabei zwar geringen Schwankungen, pendelte sich aber schlußendlich, die Gesamtzahl der Nachkommen betrachtet, in etwa bei dem statistisch erwarteten von 50 %/50 % ein (48,3 % weiblich, 51,7 % männlich; vergleiche Abbildung 2.42, A).

Entscheidend für die stetige Fortsetzung des Züchtungsbetriebs war die Gewinnung von heterozygoten Tieren in der jeweiligen Nachkommengeneration. Wenngleich auch hier generationsspezifische Unterschiede zu verzeichnen waren, konnte nach Auswertung der Genotypen aller während der Rückkreuzung geborenen Tiere das erwartete, ausgeglichene Verhältnis zwischen Wildtyp- (45,0 %) und heterozygoten Mäusen (48,3 %) bestätigt werden (vergleiche Abbildung 2.42, B; von 6,7 % aller Nachkommen ließ sich der Genotyp nicht eindeutig bestimmen). Die Vielzahl an geborenen heterozygoten Tieren ermöglichte einerseits die problemlose Etablierung des C57/Bl6J-Hintergrundes in der Wwox-Mauslinie und lieferte zum anderen eine stabile Basis für die Generierung der angestrebten Nullmutante.

### **Verpaarungen heterozygoter Nachkommen der fünften Generation bringen keine homozygoten Knock-Out-Mäuse hervor**

Zur Gewinnung der angestrebten homozygoten KnockOut-Maus erfolgten nach Abschluß der durchgeführten Rückkreuzungen zahlreiche Verpaarungen für das Wwox-Allel heterozygoter Tiere, beginnend in der fünften Generation. Obwohl den heterozygoten Wwox-Mäusen während der vorhergehenden Züchtungsspanne eine normale Fortpflanzungsfähigkeit bescheinigt werden konnte, war nach ihrer Kreuzung untereinander ein deutlicher Rückgang in der Anzahl an Nachkommen pro Wurf zu verzeichnen, große Wurfgrößen von neun bis zwölf Neugeborenen, wie aus den Rückkreuzungen gewohnt, blieben gänzlich aus. Durchschnittlich wurden in den beiden Folgegenerationen (6. und 7. Generation) lediglich 4,4 Junge pro Wurf geboren, was, verglichen mit der für die 1. bis 5. Generation errechneten Anzahl an Mäusen, einer Reduzierung um 2,7 Nachkommen pro Wurf



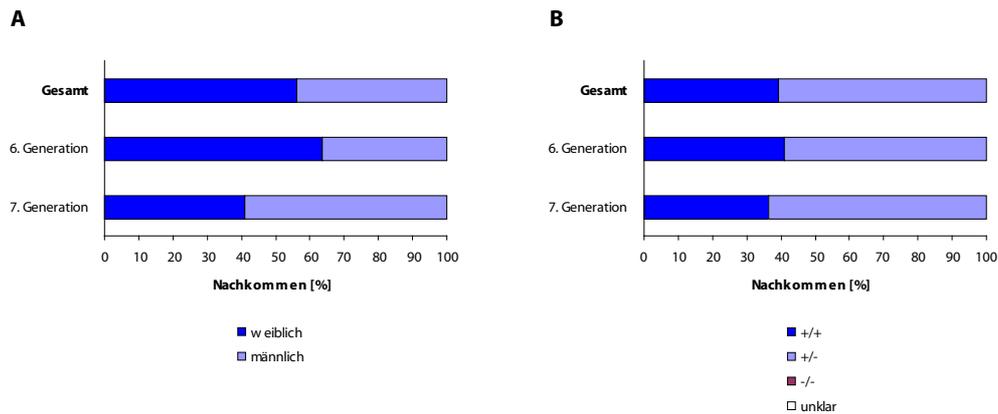
**Abbildung 2.42:** Rückkreuzungen auf C57/Bl6J-Mäuse definieren den genetischen Hintergrund der Wwox-Mauslinie. Trotz geringer generationenspezifischer Abweichungen offenbart die Beurteilung aller über die Zuchtspanne der Rückkreuzung geborenen Nachkommen sowohl hinsichtlich der bestimmten Geschlechter (A; 48,3 % weiblich, 51,7 % männlich) als auch der identifizierten Genotypen (B; 45,0 % Wildtyp +/+, 48,3 % heterozygot +/-, 6,7 % Genotyp unklar) ein ausgeglichenes Verhältnis.

entspricht. Das Verhältnis an weiblichen (56,1 %) und männlichen Nachkommen (43,9 %) zeigte sich dabei allerdings erneut als mehr oder weniger ausgeglichen (vergleiche Abbildung 2.43, A).

Den Genotyp betreffend, war für die aus der Verpaarung zweier heterozygoter Mäuse hervorgehenden Nachkommen ein prozentuales Verhältnis von 25 % (Wildtyp)/25 % (homozygot)/50 % (heterozygot) zu erwarten. Statistisch gesehen sollte ein Viertel der geborenen Tiere aus der 6. und 7. Generation den für das Wwox-Allel angestrebten Knock-Out aufweisen, tatsächlich konnte allerdings keine der 66 analysierten Mäuse als homozygot identifiziert werden. Stattdessen offenbarte die durchgeführte Genotypisierung eine im Vergleich zu den Rückkreuzungen leicht erhobene Anzahl an Mäusen mit heterozygotem Genotyp (60,6 %), in den verbleibenden 39,4 % aller Nachkommen wurde, charakteristisch für Wildtyp-Mäuse, keine lacZ-Reporterkassette nachgewiesen (Vergleiche Abbildung 2.43, B). Aufgrund der bereits zu diesem Zeitpunkt repräsentativen Anzahl an überprüften Individuen, exemplarisch ist in Abbildung 2.41 ein typisches Agarosegel dargestellt, wurde die Verpaarung von heterozygoten Wwox-Mäusen zum Zwecke einer weiteren Genotypisierung geborener Nachkommenschaft eingestellt.

### Genotypisierung von präpariertem Dottersackgewebe identifiziert lediglich Wildtyp- und heterozygote Embryonen

Da aufgrund der erzielten Ergebnisse, erhalten aus den Genotypisierungen der Nachkommen der 6. und 7. Wwox-Generation, eine Lebensfähigkeit homozygoter Wwox-Knock-Out-Mäuse in Frage zu stellen war, wurde die Identifizierung möglicher homozygoter Embryonen angestrebt. Nach der erneuten Verpaarung von heterozygoten Mäusen der 7. Generation - lediglich ein Ansatz - wurde



**Abbildung 2.43:** Verpaarungen heterozygoter Nachkommen der fünften Generation bringen keine homozygoten Knock-Out-Mäuse hervor. Die Begutachtung aller nach Kreuzung von heterozygoten *Wwox*-Mäusen geborenen Nachkommen zeigt wie erwartet ein mehr oder weniger ausgeglichenes Verhältnis zwischen weiblichen (56,1 %) und männlichen Tieren (43,9 %) (A). Die durchgeführte Genotypisierung weist 39,4 % aller überprüften Nachkommen als Wildtyp- (+/+) und 60,6 % als heterozygote Mäuse (+/-) aus, die angestrebte homozygote Knock-Out-Maus (-/-) kann im Rahmen der Analyse nicht identifiziert werden (B).

das Weibchen auf einen vaginalen Pfropf aus Samenflüssigkeit untersucht und der Tag des Nachweises als Embryonaltag 0,5 festgelegt. Am Embryonaltag 10,5 (E10,5) post coitum wurden dem Weibchen sämtliche Embryonen (insgesamt zehn) entnommen, wenn möglich das Dottersackgewebe (sowie die Embryonen selbst für eventuelle *in situ*-Hybridisierungen im weiteren Verlauf der Arbeit) präpariert (ein Embryo war resorbiert, somit konnte kein Dottersack gewonnen werden) und nach Aufreinigung der genomischen DNA nach bekannter Strategie eine Genotypisierung durchgeführt. Wenngleich aufgrund jeweils uneindeutiger Ergebnisse drei Wiederholungen der PCR von Nöten waren, konnten schließlich die Genotypen aller neun verbleibenden Embryonen bestimmt werden. Keiner der analysierten Föten zeigte den gewünschten, für das *Wwox*-Allel homozygoten KnockOut-Genotyp. Auffällig in diesem Zusammenhang war eine unverhältnismäßig hohe Anzahl an heterozygoten Embryonen (88,9 %) im Vergleich zu den als Wildtyp identifizierten (11,1 %). Dieses Verhältnis entsprach weder den statistischen Erwartungen, noch den Beobachtungen, gemacht im Rahmen der Genotypisierung von geborenen Nachkommen der 6. und 7. Generation und deutet auf eine eventuelle Verunreinigung der analysierten Dottersäcke durch im Zuge ihrer Präparation nicht ausreichend entferntes maternales Gewebe hin.

### 2.3.2 Phänotypische Untersuchung der *Wwox*-Mauslinie

Aufgrund der Tatsache, daß im Rahmen der gesamten Zuchtungsperiode keine auf das *Wwox*-Allel homozygote Knock-Out-Maus geboren wurde, konnten lediglich die heterozygoten Nachkommen der Linie auf phänotypische Unterschiede zu den erhaltenen Wildtyp-Mäusen untersucht werden. Alle 98 als heterozygot identifizierten Tiere (58 Mäuse aus der 1. - 5. Generation, 40 Mäuse aus der 6. und 7. Generation) zeigten dabei äußerlich keine Auffälligkeiten. Weder bezüglich der offensichtlichen Charakteristika Größe und Verhalten noch hinsichtlich der Fortpflanzungsfähigkeit, beurteilt anhand der erreichten Wurfgrößen im Zuge der durchgeführten Rückkreuzungen, konnte

eine Diskrepanz zu Wildtyp-Nachkommen festgestellt werden. Auf eine detailliertere Analyse hinsichtlich Knochenaufbau, metabolischer oder immunologischer Parameter etc. wurde aufgrund der gemachten Beobachtungen verzichtet.

### **2.3.3 Zusammenfassung zur Charakterisierung der Wwox-Funktion anhand der entsprechenden Mausmutante**

Durch Rückkreuzung der vom German GeneTrap Consortium zur Verfügung gestellten, für das Wwox-Allel heterozygoten Mäuse auf den C57/Bl6J-Inzuchtstamm ist es über eine Zuchtspanne von fünf Generationen gelungen, den genetischen Hintergrund der Mauslinie W088C04 erfolgreich zu definieren. Nach Lokalisierung der lacZ-Reporterkassette am 3'-Ende des Wwox-Introns 4-5 und der Etablierung einer verlässlichen, PCR-basierten Genotypisierungsstrategie zur Unterscheidung der verschiedenen Genotypen konnte unter 66 geborenen und analysierten Nachkommen keine homozygote KnockOut-Maus identifiziert werden. Auch die Präparation und anschließende Genotypisierung von Embryonen am Embryonaltag 10,5 offenbarte nicht die gewünschte Nullmutante. Die *in vivo*-Funktion des Wwox-Proteins konnte demzufolge nicht wie angestrebt im Detail aufgeklärt werden, die geplanten phänotypischen Untersuchungen beschränkten sich notgedrungen auf heterozygote Tiere, die allerdings allesamt keine äußerlich erkennbaren Auffälligkeiten zeigten.

## 3 Diskussion

### 3.1 Generelle Anmerkungen

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, durch die Charakterisierung neuer Mitglieder der SDR-Proteinfamilie einen Beitrag zum besseren Verständnis des Intermediärstoffwechsels zu leisten und auf diese Weise mögliche Angriffspunkte für eine therapeutische Intervention bei mit ihnen assoziierten Erkrankungen zu liefern.

Die detaillierte Beschreibung von Proteinen, im Speziellen von Enzymen, ist ein komplexer Prozeß, der grundsätzlich die unterschiedlichsten Herangehensweisen erlaubt. Schlußendlich ist es aber lediglich die sinnvolle Kombination aus biochemischen, bioinformatischen, biophysikalischen, genetischen und zellbiologischen Methoden, durch die eine umfassende Aufklärung der Funktion der Proteine und demzufolge ihrer Bedeutung für die Zelle bzw. den Organismus erreicht werden kann. Im ersten Abschnitt dieses Kapitels soll ausgeführt werden, welcher Nutzen sich hinsichtlich einer erfolgreichen Charakterisierung der SDR-Enzyme von den jeweils gewählten Verfahren versprochen wurde, welches Versuchsdesign sich als sinnvoll entpuppte und welche Erwartungen sich im Verlauf der Untersuchungen erfüllten. Des Weiteren werden Ansatzpunkte genannt, die zukünftig ein ähnliches Vorhaben erleichtern können.

Nach der zunächst methodischen Diskussion der Doktorarbeit widmet sich der zweite Abschnitt dieses Kapitels den neuen Mitgliedern der SDR-Proteinfamilie selbst. Die im Rahmen ihrer Charakterisierung erzielten Ergebnisse werden im Einzelnen diskutiert und hinsichtlich der unterschiedlichsten Fragestellungen in einen übergeordneten Zusammenhang gebracht. Weiter wird versucht, aus den gewonnenen Erkenntnissen eine mögliche Bedeutung der jeweiligen Enzyme im Stoffwechsel herzuleiten und ihr Potential in Bezug auf weiterführende Studien zu unterstreichen.

### 3.2 Das Vorgehen - die gewählten Methoden im Visier

#### 3.2.1 Analyse von Verwandtschaftsverhältnissen durch Phylogenie

Die Durchführung phylogenetischer Analysen erwies sich über die vergangenen Jahre als bedeutendes Hilfsmittel im Zuge der Enzym-Charakterisierung. Durch die stetig anwachsende Anzahl an öffentlich zugänglichen Sequenzen unterschiedlichster Spezies, die in umfangreichen Datenbanken hinterlegt sind, ist es möglich geworden, evolutionär konservierte und verwandte Primärstrukturen zu identifizieren. Basierend auf der Annahme, daß der Konservierung von Funktion eine zumindest partielle Konservierung der Aminosäuresequenz zugrunde liegt [20], bedienen sich Wissenschaftler heute der Berechnung von phylogenetischen Stammbäumen, einer bioinformatischen Analyse die

Genom und Evolution in einen Zusammenhang stellt und deshalb gemein hin als *Phylogenomics* bezeichnet wird [48]. *Phylogenomics* eignet sich nicht nur zur Darstellung von Verwandtschaften verschiedener Spezies sondern darüber hinaus zur Aufdeckung von Beziehungen unter Proteinen einer oder mehrerer Enzymfamilien. Auch zur Vorhersage konservierter Funktion von Mitgliedern der SDR-Proteinfamilie kam die Phylogenetik bereits umfassend zum Einsatz. In diversen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß die Analyse der Verwandtschaftsverhältnisse besagter Enzyme oftmals eine Prognose hinsichtlich ihrer subzellulärer Lokalisation, Substratspezifität und somit der Beteiligung an spezifischen Stoffwechselwegen erlaubt [124] [132]. Aus diesem Grund erschien die Kalkulation von phylogenetischen Stammbäumen auch für die erfolgreiche Charakterisierung der hier vorgestellten neuen Mitglieder der SDR-Proteinfamilie ein vielversprechender Ausgangspunkt zu sein.

### **Die Abhängigkeit vom Datensatz - Nicht immer ist der Nachbar ein Verwandter**

Die Analyse von Verwandtschaftsverhältnissen durch Phylogenie ist wie beschrieben ein rein bioinformatisches Verfahren, ihr Nutzen steht und fällt mit dem Umfang des zu ihrer Durchführung zur Verfügung stehenden und schlußendlich verwendeten Datensatzes. Je geringer die Anzahl an Sequenzen ist, die in die Kalkulation einbezogen werden, desto weniger aussagekräftig sind die in einem Stammbaum graphisch illustrierten Verwandtschaftsverhältnisse. Überspitzt formuliert, ein Sequenzvergleich zwischen lediglich zwei Proteinsequenzen hat zur Folge, daß den beiden analysierten Primärstrukturen aus rein phylogenetischer Betrachtungsweise eine direkte Verwandtschaft attestiert wird, unabhängig davon, wie groß die Ähnlichkeit (Grad an Sequenzidentität) zwischen ihnen tatsächlich ist. Um also die Verwandtschaftsverhältnisse der zu charakterisierenden SDR-Kandidaten möglichst authentisch darstellen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit relativ umfangreiche Datensätze ihnen verwandter Sequenzen erstellt, die sich im Durchschnitt auf jeweils etwa 100 Primärstrukturen beliefen und aus diesem Grund als repräsentativ bewertet werden konnten. Da durch voranschreitende Genomsequenzierung unterschiedlichster Spezies die Anzahl an öffentlich zugänglichen Sequenzen stetig anwächst, erfolgte dieser Prozess sowohl vor Beginn der experimentellen Arbeiten (Februar 2005) als auch ein weiteres Mal nach deren Abschluß (Juli 2008).

Wenngleich sich die phylogenetischen Stammbäume für die Mehrzahl der analysierten SDR-Enzyme trotz der umfangreichen Erweiterung der Datensätze über den Verlauf dieser Arbeit im Wesentlichen in ihrem Informationsgehalt glichen, so mußten die für den Kandidaten hHSDL1 in der ersten Analyse ermittelten Verwandtschaftsverhältnisse nach wiederholter Durchführung relativiert werden. Die zunächst graphisch als eng verwandt identifizierte Enzymgruppe der 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen des Typs 3 zählte nach der Aufstockung des Datensatzes nicht mehr zu den etwa 100 hHSDL1-ähnlichsten Sequenzen (das humane Homolog wurde lediglich an Position 356 der hHSDL1-ähnlichen Proteine geführt) und trat aus diesem Grund im illustrierten Stammbaum trotz nach wie vor gegebener Sequenzähnlichkeit nicht erneut in Erscheinung. Auch an diesem Beispiel wird deutlich, wie groß die Abhängigkeit der phylogenetisch bestimmten und graphisch dargestellten Verwandtschaftsverhältnisse vom eingesetzten Datenbestand ist. Eine Ermittlung der tatsächlichen Sequenzähnlichkeit unter den im errechneten Stammbaum ins Verhältnis gesetzten Primärstrukturen kann aus diesem Grund lediglich durch die Überprüfung der Sequenzidentität anhand paarweiser Alignments erreicht werden.

### **Prozentuale Sequenzidentität - Ein Spiegel der Wahrheit?**

Die quantitative Beurteilung der im Rahmen der phylogenetischen Analyse offenbarten Verwandtschaftsverhältnisse erfordert stets die Bestimmung des Grads an Sequenzidentität zwischen den Proteinen in Nachbarschaft. Dies ist beispielsweise durch die Verwendung des auf der NCBI-Homepage verfügbaren Blast2seq-Algorithmus zu bewerkstelligen. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, daß besagtes Tool zur Berechnung des prozentualen Wertes an Identität unter Verwendung der standardmäßigen Einstellungen nicht die vollständige Länge der zur Analyse freigegebenen Sequenzen zur Grundlage nimmt, sondern sich lediglich auf kleinere oder größere, allerdings in jeder Kalkulation unterschiedliche Teilabschnitte mit der höchsten Übereinstimmung beschränkt. Die Angabe der Sequenzidentität, die mittels des beschriebenen Verfahrens errechnet wurde, ist infolgedessen stets mit Vorsicht zu genießen und aus dem Vergleich verschiedener errechneter Sequenzidentitäten lediglich eine Tendenz hinsichtlich z.B. Konservierung unter Spezies abzuleiten. Um diesbezüglich eine bessere Genauigkeit erzielen zu können, wäre eine Veränderung des verwendeten Algorithmus in Richtung Volle-Länge-Analyse denkbar. Hierbei wäre zunächst durch einen Vergleich des zu analysierenden Sequenzpaares die maximale Länge an Aminosäuren zu ermitteln (Protein 1: 220 AS, Protein 2: 240 AS; maximale Länge 240 AS) und anschließend ein paarweises Alignment durchzuführen, wobei die überzähligen Aminosäuren (im Beispiel 20 AS) in der Berechnung des endgültigen prozentualen Identitätswertes als negative Übereinstimmung zu bewerten wären. In den in dieser Arbeit angestellten Kalkulationen hätte eine derartige bioinformatische Analyse unter Umständen eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Spezies untereinander ermöglicht.

### **3.2.2 Studien zur subzellulären Lokalisation**

Im Zuge der Charakterisierung bislang unbekannter Proteine können Studien zur subzellulären Lokalisation bedeutende Hinweise auf deren physiologische Rolle im Metabolismus liefern. Die subzelluläre Lokalisation bestimmt das Umfeld in dem Proteine operieren. Durch die Definition optimaler biochemischer Bedingungen, beispielsweise des pH-Wertes, und die Kontrolle der Zugänglichkeit zu bzw. der Verfügbarkeit von molekularen Interaktionspartnern jeglicher Art - im Falle von Enzymen handelt es sich hierbei in erster Linie um ihre entsprechenden Substrate und Cofaktoren - beeinflusst das kompartimentspezifische Milieu entscheidend ihre Funktion. Die angemessene Ausführung der für die Proteine charakteristischen biochemischen Aufgaben ist demzufolge von ihrer Translokation in das korrekte intra- oder extrazelluläre Kompartiment abhängig, falsch geleitete Proteine sind oftmals nicht in der Lage die ihnen typischen chemischen Reaktionen im geeigneten Maße auszuführen. Die Bedeutung der adäquaten Umgebung wird u.a. am Beispiel zahlreicher Hydroxysteroiddehydrogenasen deutlich, die ihre Fähigkeit zur bidirektionalen Katalyse bestimmter biologischer Prozesse sowohl *in vivo* als auch unter definierten Bedingungen *in vitro* unter Beweis gestellt haben [104].

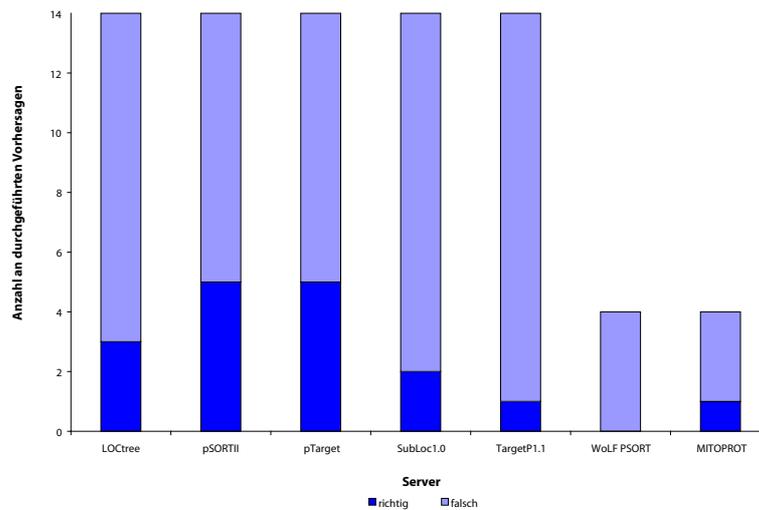
### **Die bioinformatische Vorhersage - Eine ernsthafte Alternative zum praktischen Versuch?**

Für die gewöhnlich im Vorfeld der experimentellen Verifizierung durchgeführte bioinformatische Vorhersage der subzellulären Lokalisation von gegebenen Proteinsequenzen stehen im Internet mehr als 20 frei zugängliche Server zur Verfügung [179], die aufgrund der Berücksichtigung von unter-

schiedlichen Protein-Charakteristika in vier Gruppen eingeteilt werden können [41]. Während einige Algorithmen die generelle Aminosäurezusammenstellung des zu analysierenden Proteins beurteilen [82] [174] oder ausschließlich auf Homologie basierend dessen wahrscheinlichen Bestimmungsort errechnen [116] [123], versuchen andere, definierte Signalsequenzen in der eingegebenen Primärstruktur zu identifizieren [17] [50]. Lediglich in sogenannten Hybrid-Modellen werden unterschiedliche Informationsquellen zur Vorhersage der Lokalisation in Betracht gezogen [44] [143] [181]. Aufgrund der erläuterten, signifikanten Unterschiede in den jeweils angewandten Algorithmen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine repräsentative Auswahl von sieben Servern (LOCtree [141], pSORTII [142], pTarget [66], SubLoc1.0 [82], TargetP1.1 [50], WoLF PSORT [81] und MITOPROT [34] zur Bestimmung der vermeintlichen Zielkompartimente der zu charakterisierenden Mitglieder der SDR-Proteinfamilie herangezogen, die spezifischen Ergebnisse sind im Detail unter 2.2.3 geschildert. Wenngleich bereits nach der Gegenüberstellung der für die Kandidaten hCBR4, hDHRS1, hDHRS6 und hHSDL1 getroffenen Vorhersagen mit den tatsächlich im Experiment ermittelten subzellulären Lokalisationen die Verlässlichkeit der bioinformatischen Analyse in Frage zu stellen ist - lediglich in 25,00 % der Fälle konnte eine Übereinstimmung festgestellt werden - wurden zu einer umfassenderen Beurteilung der Leistungsfähigkeit besagter Server, in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Brigitte Keller, zehn weitere Proteine sowohl bioinformatisch als auch experimentell auf ihre subzelluläre Lokalisation überprüft [103]. Nach der Erweiterung des zu analysierenden Datensatzes auf insgesamt 14 Primärstrukturen deckten sich nur noch lediglich 21,79 % aller vorhergesagten Zielkompartimente mit der im Experiment verifizierten subzellulären Lokalisation. Im Rahmen der durchgeführten Studie erwiesen sich die Server pSORTII und pTarget mit jeweils fünf aus 14 korrekt prognostizierten Bestimmungsorten (entspricht 35,71 %) als die noch „Vertrauenswürdigsten“ (vergleiche Abbildung 3.1).

Betrachtet man die erzielten Ergebnisse im Detail, so fällt auf, daß die wenigen richtig getroffenen Vorhersagen sich nicht auf ein bestimmtes Zellkompartiment beschränken, sondern sich, ganz im Gegenteil, ohne erkennbares Muster über alle überprüften Organellen verteilen. Eine spezifische Schwäche der Server kann demzufolge nicht ausgemacht werden, die bioinformatische Vorhersage als Gesamtpaket muß, zumindest die Ergebnisse dieser SDR-spezifischen Untersuchung betreffend, als äußerst unzuverlässig bewertet werden. Da allerdings nicht davon auszugehen ist, daß die Translokation von nicht-SDR-Proteinen in ihre entsprechenden Zielkompartimente auf anderen Mechanismen und Lokalisierungssignalen beruht, sollte die Beurteilung der aus der bioinformatischen Analyse zur subzellulären Lokalisation gewonnenen Ergebnisse generell mit großer Vorsicht erfolgen.

Worin aber liegt die nachgewiesene, so mäßige Effizienz der Server begründet, die die derzeit verfügbare bioinformatische Analyse zu einem mehr oder weniger nutzlosen Hilfsmittel macht [179]? Mögliche Ursachen liegen auf der Hand. Zunächst einmal ist davon auszugehen, daß die Zelle zahlreiche Proteine beherbergt, die nicht über die bereits charakterisierten sondern über unkonventionelle oder, mit Sicherheit ebenso wahrscheinlich, bislang unbekannte Targeting-Signale ihren Bestimmungsort erreichen. Weiter wurden mittlerweile cotranslationale Wege des Protein-Imports in Organellen beschrieben [36], die bislang noch nicht von den gängigen Algorithmen erfasst werden können. Selbiges Problem stellt sich für Proteine, die sich für den erfolgreichen Transport zum entsprechenden Zielkompartiment spezifischen Protein-Wechselwirkungen (backpacking) bedienen. Neben den geschilderten Limitationen der Bioinformatik als Grund für die geringe Verlässlichkeit



**Abbildung 3.1:** Zuverlässigkeit der verwendeten Server zur bioinformatischen Vorhersage der subzellulären Lokalisation. Der Vergleich der für 14 Proteine bioinformatisch vorhergesagten Zielkompartimente mit ihren jeweils im Experiment verifizierten, tatsächlichen Bestimmungsorten offenbart eine erschreckend geringe Verlässlichkeit der verwendeten Server. Die Algorithmen, angewendet in pSORTII und pTarget, zeigen sich mit jeweils fünf aus 14 korrekt prognostizierten Bestimmungsorten (entspricht 35,71 %) als die vertrauenswürdigsten, TargetP1.1 und WoLF PSORT (lediglich für die Vorhersage von vier Primärstrukturen eingesetzt) erscheinen am unzuverlässigsten.

der zur Verfügung stehenden Server muß ebenso in Betracht gezogen werden, daß es sich bei der zu analysierenden subzellulären Lokalisation nicht zwangsläufig um eine statische Begebenheit handeln muß. Dem humanen Homolog des in vorliegender Arbeit untersuchten murinen Wwox-Proteins (hWWOX) beispielsweise konnte eine eindeutig mitochondriale Distribution nachgewiesen werden, nach seiner Aktivierung unterliegt es jedoch einer Translokation in den Zellkern [29]. Es ist demzufolge vorstellbar, daß auf den ersten Anschein die vorhergesagten und eindeutig als falsch beurteilten Bestimmungsorte in Wirklichkeit alternative Lokalisationen unter veränderten Bedingungen sind. Wo auch immer die Gründe tatsächlich liegen mögen, fest steht, daß die Methode der bioinformatischen Vorhersage der subzellulären Lokalisation allgemein breite Anwendung findet und demzufolge ohne Zweifel eine höhere Zuverlässigkeit bieten muß. Um dies zu erreichen, wäre u.a. eine Berücksichtigung auch von sekundären Merkmalen durch die angewandten Algorithmen denkbar. Durch beispielsweise die zusätzliche Identifizierung von Protease-Spaltstellen, die zur Abtrennung des hydrophoben Signalpeptids mitochondrialer Proteine benötigt werden, oder die Überprüfung der Anzahl an potentiellen, intramolekularen Disulfid-Brücken zur Vorhersage einer ER-Lokalisation, könnte die Effizienz der bioinformatischen Vorhersage entscheidend verbessert werden. Bis jedoch eine verlässliche Methode zur Verfügung steht, bleibt die Bestimmung der tatsächlichen subzellulären Lokalisation von Proteinen in erster Linie dem Experiment vorbehalten.

### Die experimentelle Verifizierung - Der Weg zu einem verlässlichen experimentellen Design

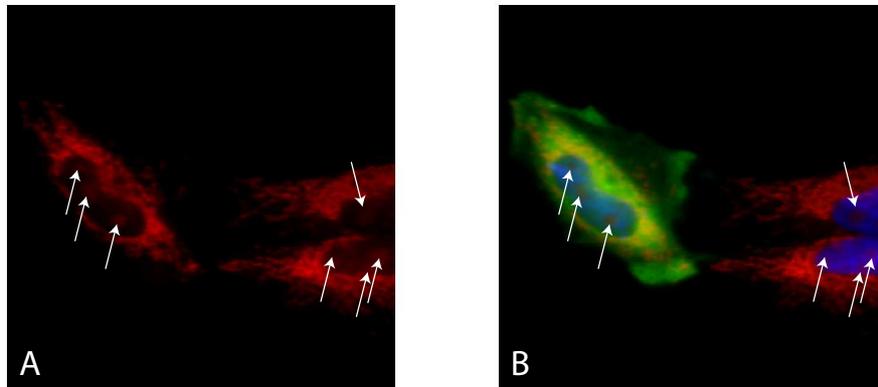
Die experimentelle Bestimmung der subzellulären Lokalisation der zu charakterisierenden Mitglieder der SDR-Proteinfamilie erfolgte in vorliegender Arbeit durch Expression der Proteine von Inte-

resse im Zellsystem. Im Laufe der zahllosen durchgeführten Untersuchungen zur Ermittlung des tatsächlichen Zielkompartiments und zur Aufklärung möglicher Mechanismen der spezifischen Translokation, kristallisierte sich heraus, daß eindeutige Ergebnisse nur durch ein optimales Design der Experimente zu erzielen sind.

**Eine Linie verschafft den Durchblick - Die Verwendung der HeLa-Zellen** Da es sich bei allen in dieser Arbeit zu untersuchenden SDR-Kandidaten um Proteine des Menschen handelt, bot es sich an eine humane Zelllinie für die Studien zur subzellulären Lokalisation zu verwenden. Wenngleich das zelluläre System zur Direktion von Proteinen zumindest unter den Vertebraten konserviert und demzufolge auch speziesübergreifend die Distribution ins tatsächliche Zielkompartiment gewährleistet scheint - als Beispiel hierfür kann die nachgewiesene Übereinstimmung in der subzellulären Lokalisation von hHSDL1 sowie seinem Homolog aus Zebrafisch genannt werden [130] - konnte durch ihren Einsatz ein annähernd physiologisches Umfeld geschaffen und somit das Risiko einer falschen Expression oder Distribution der Proteine von Interesse aufgrund von etwaigen Veränderungen oder Behinderungen des entsprechenden Zellapparates minimiert werden. Als humane Zelllinie der Wahl erwies sich die aus einem Cervixkarzinom hervorgegangene Epithelzelllinie HeLa. Neben ihrer Fähigkeit zur starken Anhaftung (Adhärenz) - einem essentiellen Kriterium im Zuge der angestrebten Experimente, da das anzuwendende Zellfärbungsprotokoll zahlreiche Waschschriffe beinhaltet - und ihrer nachgewiesenen, guten Transfizierbarkeit, empfahl sich besagte Zelllinie durch ihre ausgezeichneten morphologischen Eigenschaften. Das ihr eigene, große Zellvolumen und ihr gestrecktes und nahezu ausgebreitetes Erscheinungsbild machten eine einwandfreie Visualisierung der unterschiedlichen Kompartimente möglich, etwaige Überlagerungseffekte, wie beispielweise bei den zunächst ebenfalls für die Untersuchungen in Betracht gezogenen Hek293-Zellen beobachtet, blieben gänzlich aus.

**Die Gegenfärbung der Kompartimente - die Organellen im Visier** Die eindeutige Zuordnung zu analysierender Proteinen zu einem spezifischen Bestimmungsort in der Zelle erfordert stets die individuelle Gegenfärbung der einzelnen Organellen. Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Studien zur subzellulären Lokalisation wurden diesbezüglich drei unterschiedliche Strategien verfolgt. Das Handling betreffend zeigte sich die Verwendung von kompartimentspezifischen Trackern als ein durchaus pragmatisches. Durch die Zugabe des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes zum Zellkulturmedium und eine anschließende 30-minütige Inkubation der verwendeten HeLa-Zellen konnte die Markierung des gewünschten Zellkompartiments (Mitochondrien oder Endoplasmatisches Retikulum) auf schnelle und unkomplizierte Art und Weise erreicht werden. Der zur Färbung der Mitochondrien eingesetzte MitoTracker Orange CMTMRos, ein Fluoreszenzmarkiertes Molekül, das passiv durch die Plasmamembran diffundiert und anschließend in aktiven Mitochondrien akkumuliert, rechtfertigte seine Verwendung durch stets verlässliche Resultate und ein gut zu detektierendes Fluoreszenzsignal. Lediglich die oftmals beobachtete aber als charakteristisch eingestufte Parallelfärbung der Kernkörperchen (Nukleoli, vergleiche Abbildung 3.2) kann unter Umständen von Nachteil sein, in den hier durchgeführten Untersuchungen war der geschilderte Nebeneffekt nicht von Bedeutung.

Während der verwendete MitoTracker Orange CMTMRos über die gesamte Dauer der Zellfärbungsprozedur bis hin zur Analyse der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop stets ein stabiles

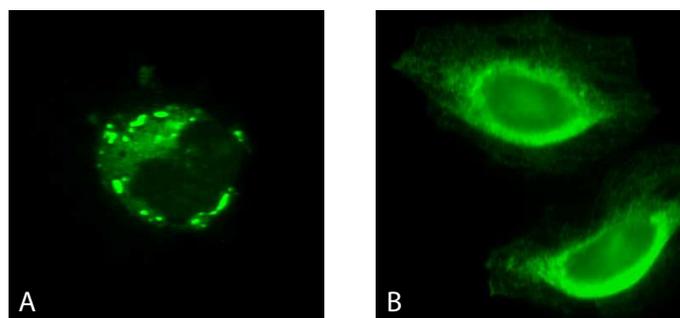


**Abbildung 3.2:** MitoTracker Orange CMTMRos färbt parallel zu den Mitochondrien die Kernkörperchen (Nucleoli). Dargestellt sind erneut die Ergebnisse, erzielt im Rahmen der Identifizierung von hCBR4 als mitochondriales Protein (vergleiche auch Abbildung 2.9). (A) zeigt die mittels MitoTracker Orange CMTMRos gegengefärbten Mitochondrien und Nucleoli, (B) die Überlagerung der einzelnen erzielten Fluoreszenzmuster. Die angefärbten Nucleoli sind mit Pfeilen markiert.

les Signal lieferte, hielt der zur Färbung des ER verwendete ER-Tracker Blue-White DPX der Aldehyd-basierten Fixierung und der für eine Antikörper-Färbung notwendigen Permeabilisierung der Zellen gewöhnlich nicht stand. Im Gegensatz zum MitoTracker wird er nicht kovalent im Zielkompartiment gebunden und demzufolge im Zuge der auf seine Verwendung folgenden Schritte des Färbungsprotokolls kontinuierlich ausgewaschen. Dies zog in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten einen derart drastischen Qualitätsverlust des Fluoreszenzsignals nach sich, daß auf den Einsatz des ER-Trackers Blue-White DPX in der Folge verzichtet wurde. Stattdessen wurde die Gegenfärbung des Endoplasmatischen Retikulums im weiteren Versuchsverlauf durch Coexpression der Proteine von Interesse mit ER-spezifischen Fusionsproteinen erreicht, die entweder direkt über Autofluoreszenz (Signalsequenz und Rückhaltesignal von Calreticulin in Fusion mit *Discosoma sp.* RFP) oder über den Einsatz eines Fluoreszenz-markierten Antikörpers (17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 12A aus Zebrafisch in C-terminaler Fusion mit einem Myc-Tag) zu detektieren waren. Wenngleich die Expression beider Fusionsproteine in den hier geschilderten Experimenten stets eine einwandfreie Markierung des gewünschten Zellkompartiments lieferte und die durchgeführte Coexpression allem Anschein nach keinerlei negative Auswirkungen auf die korrekte Distribution der Proteine von Interesse hatte, bleibt eine generelle Anwendung dieses Verfahrens aufgrund der bestehenden Möglichkeit der Verfälschung der Resultate durch die simultane Überexpression zweier Proteine in den verwendeten Zellen kritisch zu beurteilen. Um derartige Effekte rigoros ausschließen zu können, bietet sich, falls entsprechende Antikörper verfügbar, die immunfluoreszente Detektion von endogen exprimierten Proteinen an, wie sie im Rahmen der peroxisomalen Gegenfärbung zum Einsatz kam. Durch Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen

17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 4 und dessen Detektion durch einen zweiten, fluoreszenzmarkierten Antikörper konnten die Peroxisomen wunschgemäß markiert werden.

**Ein Expressionsvektor mit Schwächen - Das Problemkind pAcGFP1-N1** Im Zuge der Bestimmung der subzellulären Lokalisation der zu charakterisierenden SDR-Kandidatenproteine kamen in vorliegender Arbeit verschiedene Expressionskonstrukte zum Einsatz. Während die Überproduktion der Proteine von Interesse, basierend auf den Vektoren pEGFP-C2 und pcDNA4 myc-his Version B, in fast allen durchgeführten Experimenten eine eindeutige Distribution der exprimierten Fusionsproteine in ihre entsprechenden Zielkompartimente zur Folge hatte, erwies sich die Expression der SDR-Enzyme, basierend auf dem Vektor pAcGFP1-N1, zumeist als überaus problematisch. Zunächst bleibt festzustellen, daß die Transfektion von generierten und als basentreu befundenen pAcGFP1-N1-Konstrukten nicht immer zur ausreichenden Expression der Kandidatenproteine in der HeLa-Zellkultur führte. Nach Transfektion des Konstrukts pAcGFP1-N1/hCBR4 beispielsweise war keinerlei grüne Fluoreszenz in den HeLa-Zellen zu detektieren, die Transfektion von pAcGFP1-N1/hDHRS6 hatte augenscheinlich lediglich eine sehr schwache Expression des fluoreszierenden Fusionsproteins hDHRS6-GFP zur Folge. Die beobachteten Umstände mögen zum einen auf einer schlechten Expressionsfähigkeit des Vektors hinsichtlich spezifischer Proteine beruhen, lassen sich zum anderen aber auch mit den schwachen Fluoreszenzeigenschaften des fusionierten AcGFP begründen. Der Vektor pAcGFP1-N1 kodiert ein GFP aus *Aequorea coerulea*, welches im Gegensatz zu EGFP (eine in den Rot-Bereich verschobene Variante des Wildtyp-GFPs, kodiert vom Vektor pEGFP-C2) nicht auf eine hellere Fluoreszenz und höhere Expression im Säugetierzellsystem optimiert ist und demzufolge, im Vergleich zu EGFP bzw. seinen entsprechenden Fusionsproteinen, deutlich schwerer zu detektieren ist. Neben den bereits erläuterten offenbarte die Verwendung des pAcGFP1-N1-Vektors weitere gravierende Schwächen. Die Expression basierend auf dem Vektor pAcGFP1-N1 lieferte immer wieder Resultate, die nicht in Einklang mit den Ergebnissen, erhalten aus der von pEGFP-C2 oder pcDNA4 myc-his Version B kodierten Proteinexpression, zu bringen waren. Exemplarisch sind in Abbildung 3.3 die Verteilungen von hDHRS1-GFP (hDHRS1 fusioniert am N-Terminus des GFP; Expressionskonstrukt pAcGFP1-N1/hDHRS1) und hDHRS1-myc-his (hDHRS1 fusioniert am N-Terminus des Myc-His; Expressionskonstrukt pcDNA4 myc-his Version B/hDHRS1) dargestellt.



**Abbildung 3.3:** Durch GFP-Expression auftretende Probleme bei der Zellfärbung. HeLa-Zellen transfiziert mit (A) pAcGFP1-N1/hDHRS1 (Expression von hDHRS1-GFP) und (B) pcDNA4 myc-his Version B/hDHRS1 (Expression von hDHRS1-myc-his).

Die in C-terminaler Fusion mit AcGFP exprimierten Proteine von Interesse neigten in den verwendeten HeLa-Zellen grundsätzlich dazu, sich in zahlreichen konzentrierten Einschlüssen zu akkumulieren, sie wurden somit nicht zu ihrem eigentlichen Bestimmungsort transportiert. pEGFP-C2-kodierte Proteinexpression führte nur in ganz vereinzelt Fällen zu einem vergleichbaren Erscheinungsbild, das sich allerdings weitaus milder zeigte und die Ergebnisse in keinsten Weise beeinflusste. Da das im Zuge der Verwendung des pAcGFP1-N1-Vektors aufgetretene Phänomen nicht lediglich in dieser Arbeit, sondern darüberhinaus in anderen Studien beobachtet wurde [103], muß davon ausgegangen werden, daß die nachgewiesenen Proteinansammlungen nicht auf der spezifischen Kombination zwischen den hier untersuchten Enzymen und dem C-terminal fusionierten AcGFP, sondern in der generellen Verwendung des besagten Basis-Vektors begründet liegen. Aufgrund der geschilderten Schwierigkeiten wurde die Strategie der C-terminalen Fusion zu einer ausschließlichen Verwendung des pcDNA4 myc-his Version B-Vektors verändert.

**Auto- oder Immunfluoreszenz? - Ein Tag für alle Fälle** Neben der akkuraten Expression und Distribution der Proteine von Interesse in der verwendeten Zellkultur ist die erfolgreiche Detektion eine Grundvoraussetzung für die experimentelle Verifizierung der subzellulären Lokalisation. In vorliegender Arbeit wurde dies sowohl über Auto- als auch über Immunofluoreszenz bewerkstelligt. Abgesehen von den bereits erläuterten Problemen im Zuge der Verwendung einiger GFP-Expressionskonstrukte (pAcGFP1-N1) zeigte sich im Verlauf der Studien, daß die tatsächlichen Bestimmungsorte der zu untersuchenden SDR-Enzyme nach ihrer rekombinanten Expression in Fusion mit einem Myc-Epitop, basierend auf dem Expressionsvektor pcDNA4 myc-his Version B, oftmals einfacher zu bestimmen waren. Speziell in den feinen Strukturen der Zellorganellen, wie beispielsweise den Randbereichen des Endoplasmatischen Retikulums, konnten die Proteine von Interesse durch den Einsatz von fluoreszierenden Antikörpern detaillierter visualisiert werden. Die Bestimmung der subzellulären Lokalisation von Proteinen durch Epitop-Markierung und anschließende Detektion über Immunfluoreszenz erscheint aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse die erste Methode der Wahl. Von einer Unbrauchbarkeit des auf Autofluoreszenz basierenden und somit deutlich zeitsparenden Verfahrens kann dennoch nicht die Rede sein. Auch nach Expression von GFP-Fusionsproteinen, vorwiegend basierend auf dem Vektor pEGFP-C2, ist es zumeist gelungen, die Zielkompartimente der zu charakterisierenden SDR-Mitglieder eindeutig und überzeugend zu identifizieren. Nach sorgfältiger Auswahl des zu verwendenden Expressionsvektors (nicht pAcGFP1-N1) kann die Strategie der Autofluoreszenz-Fusion ebenfalls bedenkenlos eingesetzt werden.

**Maskierung von Signalsequenzen - Die Bedeutung der Fusions-Orientierung** Wenngleich die in dieser Arbeit Anwendung findende Methode der Tag-Fusion unbestritten ein wertvolles Hilfsmittel zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von Proteinen darstellt - in den seltensten Fällen sind Antikörper verfügbar, die deren direkte Detektion erlauben -, so muß bei ihrer Verwendung immer in Betracht gezogen werden, daß, unabhängig davon, ob es sich beim fusionierten Tag um ein vollständiges Protein (GFP) oder ein kleines Epitop (Myc-Epitop) handelt, die Möglichkeit einer Beeinflussung der korrekten Protein-Lokalisation durch die Maskierung von Signalsequenzen gegeben ist. Für GFP-Fusionsproteine beispielweise konnte gezeigt werden, daß die richtig ausgewählte Position des Tags (C- oder N-Terminus) für die korrekte Verteilung der analysier-

ten Proteine in deren tatsächliches Zielkompartiment oftmals von entscheidender Bedeutung sein kann [186]. Um einer möglichen Blockierung von Signalsequenzen, assoziiert mit dem Import in die spezifischen Zellorganellen, vorzubeugen, wurden die im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchenden SDR-Enzyme sowohl amino- als auch carboxyständig markiert. Während drei der SDR-Kandidaten (hDHRS1, hDHRS6 und hHSDL1) unabhängig von der Position des angehängten Tags den Weg zu ihrem Bestimmungsort fanden, konnte hCBR4 lediglich mit einem frei zugänglichen N-Terminus korrekt transferiert werden. Die Fusion von GFP am Aminoende des Proteins hatte ein Verbleiben im Cytosol zur Folge und erlaubte bereits erste Spekulationen hinsichtlich einer N-terminalen Signalsequenz.

#### **Trunkierte Proteinkonstrukte - Eine Chance zur Aufdeckung von Translokationsmechanismen**

Durch die durchgeführten Studien zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation konnten im Rahmen dieser Arbeit drei der vier zu charakterisierenden Mitglieder der SDR-Proteinfamilie als organellspezifische Enzyme identifiziert werden. Da sowohl dem co- als auch dem posttranslationalen Transport von Proteinen in spezifische Zellkompartimente generell das Auftreten definierter Signalsequenzen in der Primärstruktur zugrunde liegt, war zu vermuten, daß auch die Proteine von Interesse über charakteristische Abfolgen an Aminosäuren verfügen, die ihre Translokation zum Bestimmungsort gewährleisten. Nachdem diesbezüglich durch bioinformatische Analyse keine verlässlichen Aussagen getroffen werden konnten, wurde erneut der experimentelle Weg gewählt, um die zu untersuchenden SDR-Kandidaten auf zielsteuernde Transitpeptide zu überprüfen bzw. diese gegebenenfalls im Enzym ausfindig zu machen. Eine zu diesem Zweck verbreitete Methode ist die Verkürzung (Trunkierung) der Proteine von Interesse um möglicherweise am Translokationsprozess beteiligte Aminosäuren und die anschließende Verifizierung der Auswirkungen des Verlustes auf die Distribution des Proteins in der Zelle. Basierend auf den Erkenntnissen der vorangegangenen Untersuchungen wurden für die Kandidaten hCBR4, hDHRS1 und hHSDL1 zahlreiche N- bzw. C-terminale trunkierte Fusionsproteine generiert. Da keinerlei detaillierte Vorinformation verfügbar war und somit nicht die basengenaue Identifizierung von Signalsequenzen sondern lediglich eine Eingrenzung von verantwortlichen Proteinabschnitten das Ziel sein durfte, beschränkten sich die durchgeführten Trunkierungen auf grobe Verkürzungen der Enzyme von Interesse um ein bis mehrere Viertel des Gesamtproteins. Wenngleich sich die ermittelten Verteilungen oftmals indifferent zeigten, so konnte schlußendlich auf diese Weise für alle SDR-Kandidaten eine Hypothese hinsichtlich ihres Transports in das entsprechende Zielkompartiment aufgestellt werden. Eine endgültige Verifizierung der Ergebnisse durch beispielsweise chimäre Proteine konnte aus Zeitgründen nicht erfolgen.

#### **3.2.3 Untersuchungen zur Gewebeverteilung**

Die Regulation der Expression ist das entscheidende Mittel eines Organismus, sich seinen momentanen Bedürfnissen anzupassen. Es wird von Bakterien bis hin zu höheren Metazoen wie den Vertebraten genutzt, um die erforderliche Zusammensetzung an Proteinen in einem bestimmten Gewebe, bzw. dessen Zellen, zu einem spezifischen Zeitpunkt oder zu spezifischen Bedingungen zu gewährleisten. Das Expressionsmuster ist der Spiegel dieser Bedürfnisse und im Zuge dessen ein essentieller Anhaltspunkt bezüglich der Funktion der erzeugten Genprodukte. Während ubiquitär exprimierte Gene - als typische Vertreter seien an dieser Stelle  $\beta$ -Actin oder das Glykolyseenzym

Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) genannt - Funktionen erwarten lassen, die einer strukturellen Aufrechterhaltung der Zelle oder einer Aufrechterhaltung des grundlegenden Metabolismus dienen, so zeigen spezialisiertere Proteine deutlich spezifischere Expressionsmuster. Die  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen des Typs 1, 2 und 3 beispielsweise, die Schlüsselenzyme in der Homöostase der Steroidhormone, sind gemäß ihrer Funktion hauptsächlich in steroidogenem Gewebe exprimiert [129] [136]. Auch innerhalb eines Gewebes ist die Expression nicht statisch sondern an die gegebenen Bedingungen angepaßt, ein Umstand der besonders in der Entwicklung der Organismen von Bedeutung ist. Gene der Cholesterol-Biosynthese z.B. sind während der Embryogenese in bestimmten Geweben lediglich zu definierten Zeiten exprimiert [109] [110].

#### **in silico Northern Blots - Anwendung mit generell schwacher Effizienz**

Eine gängige Vorgehensweise im Zuge der Bestimmung der Gewebeverteilung von zu charakterisierenden Proteinen bzw. der ihnen zugrunde liegenden mRNA ist es, sich im Vorfeld der experimentellen Untersuchungen durch bioinformatische Analysen einen Überblick zu verschaffen. Die im Verlauf der letzten Jahre signifikant erweiterten EST (expressed sequence tags)-Datenbanken bieten hierfür eine vielversprechende Voraussetzung und erlauben generell eine breitgefächerte Analyse über eine Vielzahl an Geweben. Auch vorliegende Arbeit machte sich diese Grundlage zu Nutze. Unter Verwendung der zwei, unterschiedliche Strategien verfolgenden und somit unabhängigen *in silico* Northern Blot-Anwendungen ISNB und Unigene (vergleiche 2.2.4) wurde eine bioinformatische Vorhersage bezüglich des zu erwartenden Expressionsmusters der zu charakterisierenden Mitglieder der SDR-Proteinfamilie durchgeführt. Im Rahmen der Analysen mußte zunächst eine große Divergenz zwischen den Ergebnissen der beiden Verfahren festgestellt werden. Hinsichtlich der ermittelten Gewebe der wahrscheinlich höchsten Expression erzielten die beiden Anwendungen generell keine Einigkeit, verglichen zu den im Anschluß experimentell verifizierten Daten lagen beide Algorithmen - abgesehen von einer Ausnahme (hDHRS1) - grundlegend falsch. Lediglich die mehr oder weniger ubiquitäre Gewebeverteilung der drei SDR-Kandidaten konnte aus der bioinformatischen Vorhersage abgeleitet werden. Zusammenfassend muß der *in silico* Northern Blot-Analyse eine schwache Effizienz bescheinigt werden, zur Verwendung der einen oder anderen Anwendung bei zukünftig durchzuführenden Untersuchungen kann aufgrund der erzielten Ergebnisse nicht geraten werden.

#### **Northern Blot vs. quantitative RealTime-PCR - And the winner is ...!**

Zur experimentellen Verifizierung des Expressionsmusters, basierend auf mRNA-Nachweis, kam in dieser Arbeit zunächst ausschließlich die Northern Blot-Technologie zum Einsatz. Die Verfügbarkeit einer entsprechenden, bereits vorgefertigten Membran (FirstChoice Northern Human Blot II) und die im Zuge dessen erwartete, relativ schnelle und einfache Durchführung des Experiments ließ besagtes Verfahren zum ersten Mittel der Wahl werden. Alle durchgeführten Hybridisierungen erfolgten zunächst unter Verwendung lediglich einer Membran, was deren erfolgreiches Strippen zwischen den einzelnen Experimenten voraussetzte. Die Kontrolle des Stripping-Vorgangs durch Autoradiographie offenbarte, daß sich die eingesetzten radioaktiven Sonden nicht problemlos wieder von der Membran entfernen ließen. Im Speziellen die zur Qualitätskontrolle des Blots eingesetzte  $\beta$ -Actin-Sonde bereitete immense Schwierigkeiten. Die gemachte Beobachtung erforderte in Konsequenz eine Optimierung des Stripping-Protokolls sowie eine Abstrahlungsperiode zwischen zwei

Membranhybridisierungen, die die Eindeutigkeit der erzielten Ergebnisse sicherstellte. Für die Kandidaten hDHR51 und hHSDL1 konnte unter Verwendung der Northern Blot-Technologie die Gewebeverteilung, wenngleich auch erst nach mehreren Anläufen, eindeutig bestimmt werden. Ihr Einsatz stellte sich dahingehend als vorteilhaft heraus, da sich im Zuge der Untersuchungen für den Kandidaten hDHR51 unterschiedliche Transkriptionsvarianten identifizieren ließen, welche unter Verwendung anderer Methoden aller Voraussicht nach unerkannt geblieben wären. Lediglich für das zu untersuchende SDR-Protein hCBR4 war trotz mehrmaliger Wiederholung unter stets aufs neue optimierten Versuchsbedingungen keine Bestimmung des Expressionsmusters möglich. Als Grund hierfür wird ein Expressionslevel des Kandidaten angenommen, das deutlich unter der Nachweisgrenze der Methodik liegt. Hinsichtlich der Sensitivität hat der zudem lediglich semi-quantitative mRNA-Nachweis durch Northern Blot-Hybridisierung im Vergleich zu anderen Verfahren deutliche Schwächen. Schlußendlich wurde das Expressionsprofil für den Kandidaten hCBR4 im Rahmen dieser Arbeit durch quantitative RealTime-PCR unter Verwendung des Tissue Scan<sup>TM</sup> Human Major Tissue qPCR Arrays erstellt. Das Verfahren zeigte sich als außerordentlich schnell und benutzerfreundlich und darüberhinaus als sehr sensitiv. Lediglich das Versuchsdesign des Herstellers zeigte sich als umständlich und gibt Anlaß zur Kritik. Da lediglich ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet werden konnte, mußte die Amplifizierung von Targetgen und endogener Kontrolle in unterschiedlichen Reaktionen erfolgen, was hinsichtlich der zu erfolgenden Normalisierung als nicht optimal zu bewerten ist. Zusammenfassend muß festgestellt werden, daß die quantitative RealTime-PCR das einfachere Verfahren ist. Trotz der auf den ersten Blick höheren Kosten - die Erfahrungen mit der Northern Blot-Technologie relativieren diesen Aspekt - rechtfertigt die hohe Sensitivität sowie der eindeutig geringe Aufwand ihren Einsatz.

### **Proteinviefalt durch Transkriptvarianten - Das alternative Splicing**

Im Rahmen der durchgeführten Northern Blot-Experimente konnten dem Kandidaten hDHR51, wie bereits angekündigt, zwei unterschiedlich große mRNA-Transkripte nachgewiesen werden. Allem Anschein nach scheint die dem Protein zugrundeliegende prä-mRNA einem alternativen Splicing zu unterliegen, welches die Bildung mehrerer verschiedener reifer mRNA-Moleküle und somit, durch deren Translation, die Generierung von mehreren unterschiedlichen Polypeptiden zur Folge hat. Ob es sich dabei schlußendlich um tatsächlich lediglich zwei Transkripte handelt, bleibt nach Bewertung dieser Ergebnisse in Frage zu stellen. Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, daß weitere Transkripte erzeugt werden, die allerdings in den untersuchten Geweben nicht exprimiert sind oder aufgrund der generell schlechten Auflösung der Northern Blot-Technologie bei ähnlicher Transkriptlänge nicht von den detektierten unterschieden werden können. Wie auch immer, die Präsenz unterschiedlicher Varianten von hDHR51 kann ein Indiz für die Vielseitigkeit des zu untersuchenden Proteins sein, wenngleich die generelle Bedeutung des alternativen Splicings bislang weitestgehend unklar ist. Der Mythos, ein möglicherweise im Verhältnis zu anderen Spezies gehäuftes Auftreten des alternativen Splicings sei dafür verantwortlich, daß der Mensch der vermutlich komplexeste Organismus ist, mußte im Verlauf zahlreicher Studien als falsch befunden werden. Die Anzahl an Splicing-Geschehnissen ist im Tierreich im Allgemeinen mehr oder weniger vergleichbar, es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen Mensch und anderen Spezies [23]. Erwähnenswert in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, daß es sich beim „Rekordhalter“ für alternatives Splicing um ein *Drosophila*-Gen, genannt DScam, handelt, das über 38.016 Splice-Varianten verfügt.

### 3.2.4 Bestimmung der Substratspezifität

Enzyme sind die Biokatalysatoren der Zelle. Durch die Verminderung der Aktivierungsenergie beschleunigen sie die Gleichgewichtseinstellung chemischer Reaktionen und ermöglichen so die Umsetzung von Ausgangsstoffen (Substraten) in ihre Reaktionsprodukte in einem physiologisch bedeutenden Maßstab. Auch die Mitglieder der SDR-Proteinfamilie sind der Gruppe der Enzyme zuzuordnen, sie katalysieren mittels ihrer Oxidoreduktase-Eigenschaft die Umwandlung von Hydroxy- zu Keto- bzw. von Keto- zu Hydroxygruppen der verschiedensten Substrate und nehmen somit eine Schlüsselstellung in den unterschiedlichsten Stoffwechselwegen ein. Im Zuge dessen versteht es sich von selbst, daß die Verifizierung der Substratspezifität ein Schwerpunkt einer Charakterisierung von SDR-Proteinen sein muß. Erst die Kenntnis ihrer natürlichen Substrate bzw. der chemischen Reaktion, die durch sie beschleunigt wird, gibt den endgültigen Aufschluß über die Rolle der Enzyme im Metabolismus und eröffnet eine entscheidende Möglichkeit der therapeutischen Intervention, beispielsweise durch die Entwicklung spezifischer Inhibitoren, bei mit ihnen assoziierten Erkrankungen.

#### pcDNA3 - der Verzicht auf ein Tag kann den Unterschied machen

Alle in dieser Arbeit Anwendung findenden Strategien zur Bestimmung der Substratspezifität der ausgewählten SDR-Kandidaten setzten zunächst deren Überexpression in einer eukaryotischen Zelllinie voraus. Grundsätzlich stehen hierfür eine Vielzahl an Vektoren zur Verfügung, deren Verwendung neben zahlreichen Vorteilen allerdings meistens auch gewisse Nachteile mit sich bringt, die bei ihrer Auswahl berücksichtigt werden müssen. Wengleich eine Überproduktion in Fusion mit einem Tag den Nachweis der Proteine von Interesse mittels Western Blot-Technologie erlaubt, so kann die Präsenz eines Tags einen ungewollten Einfluss auf die Faltung oder die ordnungsgemäße Verteilung des Enzyms in der Zelle haben. Dies konnte im Rahmen der Studien zur subzellulären Lokalisation eindrucksvoll bestätigt werden. Da beide Kriterien jedoch eine Grundvoraussetzung für die funktionelle Aktivität von Enzymen sind, wurde von der Strategie der Fusionsexpression abgesehen und stattdessen der Vektor pcDNA3 verwendet.

#### HEK293-Zellen - eine geeignete Expressionsmaschinerie

Aufgrund des humanen Ursprungs der zu charakterisierenden SDR-Enzyme, wurde wie für die Studien zur subzellulären Lokalisation auch für die Bestimmung der Substratspezifität hauptsächlich die Verwendung einer humanen Zelllinie in Betracht gezogen. Wiederum sollte auf diese Weise ein nahezu den physiologischen Bedingungen entsprechendes Umfeld geschaffen werden, um die Funktionalität der Proteine von Interesse zu gewährleisten (vergleiche auch 3.2.2). Ein entscheidendes Kriterium bei der Auswahl der Zelllinie war das Ausmaß der endogenen Umwandlung der zu testenden Substrate im *in vivo*-System (Inkubationszeit 24 h). Da im Rahmen der angestrebten Untersuchungen die Überprüfung der katalytischen Aktivität gegenüber steroidogenen Substanzen im Vordergrund stand, konnte sich auf Erfahrungswerte von Frau Dr. Brigitte Keller und Frau Dr. Rebekka Mindnich bezogen werden. Nach der Sicherstellung einer erfolgreichen Überexpression der Kandidatenproteine durch mRNA-Nachweis, wurde zur bestmöglichen Minimierung des ungewünschten Effekts die oftmals eingesetzte humane embryonale Nierengewebs-Zelllinie HEK293 (vergleiche z.B. [83]) gewählt. Diese zeigte über den Verlauf der *in vivo*-Untersuchungen gene-

rell den erwartet geringen Hintergrundumsatz, lediglich hinsichtlich des zugegebenen Substrats Cortisol wurde eine bedeutende endogene Aktivität gemessen, die allerdings für die erfolgreiche Durchführung der Experimente weiter keine große Bewandnis hatte. Für die ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen im *in vitro*-System war die endogene Substratkonvertierung aufgrund der kurz gewählten Inkubationszeit ohnehin nicht von Bedeutung, nichtsdestotrotz wurden auch in diesem Fall stets Leervektor-transfizierte Kontrollen mitgeführt.

#### **in vivo- und in vitro-System - ein zuverlässiges Gespann**

Die Überprüfung der katalytischen Aktivität der zu untersuchenden SDR-Enzyme gegenüber ausgewählten Substraten erfolgte im Rahmen dieser Arbeit unter der Verwendung zweier unterschiedlicher Assays. Ein auf den Arbeiten von Castagnetta et al. [28] basierendes *in vivo*-System, von Frau Dr. Brigitte Keller optimiert auf die Durchführung im 12 well Format, sollte zunächst Aufschluß über das Umsetzungspotential der zu untersuchenden Kandidaten gegenüber steroidogenen Substanzen liefern. Aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften sind diese in der Lage, sowohl die Plasmamembran als auch intrazelluläre Membranen durch passive Diffusion zu überwinden, was ihre Messung in lebenden Zellen nach dem unter 4.7.1 beschriebenen Verfahren möglich macht. Wenngleich der besagte *in vivo*-Assay in den hier durchgeführten Studien als auch vergleichbare Versuchsdesigns, beispielsweise im Zuge der Charakterisierung der  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 12 [118], mehrfach erfolgreich Anwendung fanden, muß festgehalten werden, daß Lebendzell-Messungen zum einen nur für eine limitierte Anzahl an Stoffklassen und zum anderen lediglich für eine „Umsatz: Ja oder Nein“-Entscheidung geeignet sind. Für im Laufe der Bestimmung der Substratspezifität oftmals angestrebte Kinetik-Studien erscheint der *in vivo*-Assay nur bedingt einsetzbar, da der Einfluß der Zellvermehrung auf die erzielten Ergebnisse nur schwer faßbar und demzufolge nicht einzukalkulieren ist.

Neben den beschriebenen *in vivo*-Studien umfasste die durchzuführende Charakterisierung der neuen Mitglieder der SDR-Proteinfamilie die Untersuchung ihrer Spezifität hinsichtlich weiterer Substanzklassen (Chinone, CoA-assoziierte Fettsäuren, Prostaglandine und Retinoide) im *in vitro*-System. Abgesehen von der Tatsache, daß die Durchführung aufgrund der Möglichkeit des Einsatzes nichtradioaktiver Substanzen und den im Vergleich zum *in vivo*-Assay deutlich verkürzten Inkubationsperioden eine praktische Erleichterung erfuhr, erlaubte es die Überprüfung der katalytischen Aktivität unter manuell definierten Bedingungen. Beispielsweise konnten durch die Zugabe von spezifischen Cofaktoren Hinweise auf die Art der chemischen Reaktion (Oxidation bzw. Reduktion) und somit auf die präferierte Reaktionsrichtung der Enzyme von Interesse gewonnen werden. In Zusammenarbeit mit Herrn Ferdinand Haller (Helmholtz Zentrum München) ist es gelungen, die Analysesysteme für CoA-konjugierte Fettsäuren und Retinoide zu optimieren und darüberhinaus neue Verfahren für die Auftrennung der ausgewählten Chinone und Prostaglandine zu etablieren. Kritisch zu bemerken sind lediglich die im Zusammenhang mit den Messungen der Spezifität gegenüber den Prostaglandinen aufgetretenen Detektionsschwierigkeiten. Da die meisten Prostaglandine und ihre Metaboliten aufgrund isolierter Doppelbindungen und dem Fehlen weiterer Chromophore lediglich bei einer Wellenlänge von 192 nm absorbieren [57], waren sie mit dem verwendeten UV-Detektor nur schwer nachzuweisen. Zur Absicherung der erzielten Ergebnisse wurde aufgrund dessen das alleinig umgesetzte Prostaglandin  $E_2$  in radioaktiv-markierter Form angeschafft und in den Assay eingesetzt.

### Metabolomics statt Proteomics - Gut gedacht, schlecht gemacht?

Seit der nahezu vollständigen Sequenzierung des menschlichen Genoms ist das Hauptziel der funktionellen Genomik die Funktion der Produkte neu identifizierter Gene zu bestimmen, sowie diejenigen unter ihnen ausfindig zu machen, die als Angriffspunkt für die Therapie von Krankheiten dienen können. Bis heute konzentrierten sich die im Zuge dessen angewandten Strategien größtenteil auf die Untersuchung der Genexpression (Transcriptomics), sowie die Erstellung von Proteinprofilen (Proteomics). Mit der Entwicklung zahlreicher Verfahren, die es erlauben, niedrig molekulargewichtige Moleküle zu identifizieren und deren jeweilige Konzentration zu bestimmen, ist es möglich geworden, auch die Stoffwechselaktivität messbar zu machen. Die Herangehensweise, die den metabolischen Zustand zu definierten Endpunkten aber auch intermediäre Prozesse durch Dynamikerfassung quantifizieren oder differenzieren kann, wird als Metabolomics bezeichnet. Metabolomics beschreibt die vollständige Zusammensetzung an Metaboliten bzw. Intermediaten mit niedrigem Molekulargewicht, die abhängig vom Kontext und entsprechend der Physiologie, der Entwicklung oder des pathologischen Zustandes einer Zelle, eines Gewebes oder eines Organismus variiert [150] [151]. Anders formuliert: Metabolomics ist die systematische Untersuchung des einzigartigen, chemischen Fingerabdrucks, den spezifische zelluläre Prozesse hinterlassen.

Alternativ zu den alt bewährten „proteomischen“ Ansätzen zur Bestimmung der Substratspezifität der zu charakterisierenden Mitglieder der SDR-Proteinfamilie wurde auch in dieser Arbeit eine Studie durchgeführt, die sich nicht, wie gewohnt, den potentiellen Substraten der zu untersuchenden Kandidatenenzyme, sondern den nach ihrer Expression in humaner Zellkultur nachzuweisenden Produkten widmete. Die Verwendung des FT-ICR-Massenspektrometers sollte einen Vergleich der entstandenen Metabolitenzusammensetzung zu der einer Leerkontrolle und somit die Identifizierung der durch die Enzyme von Interesse katalysierten Reaktion erlauben. Wenngleich die Idee nach wie vor als generell vielversprechend eingestuft wird, so zeigten die erzielten Ergebnisse auf, daß das angewendete System, abgesehen von der als ideal zu bewertenden Probenvorbereitung, einer intensiven Optimierung bedarf. Zunächst war eine deutliche Diskrepanz in den für die jeweiligen Metaboliten ermittelten Peakintensitäten selbst unter den gemessenen Duplikaten aufgefallen, was einen verlässlichen Vergleich zweier unterschiedlicher Proben, wie angestrebt, nahezu unmöglich machte. Da das verwendete Gerät eine große Präzision die identifizierten Massen betreffend offenbarte, ist nicht davon auszugehen, daß die beobachteten Varianzen lediglich auf Messungenauigkeiten des Massenspektrometers zurückzuführen sind. Stattdessen könnte die Komplexität der zu untersuchenden Metabolitenzusammensetzung für die aufgetretenen Unregelmäßigkeiten verantwortlich sein. Die analysierten Gemische an unterschiedlichsten Molekülen unterliegen während des Ionisierungsprozesses in der Quelle des Massenspektrometers einer kontinuierlichen Konkurrenz um die angebotenen Ladungen. Diese werden auf die einzelnen Analyten verteilt, bei derartigen komplexen Lösungen geschieht dies allerdings von Probe zu Probe vermutlich in unterschiedlicher Art und Weise. Eine ungleichmäßige Ionisierung schlägt sich beim Vergleich zweier Metabolitenzusammensetzungen folglich in unterschiedlichen Signalintensitäten ( $m/q$ ) nieder.

Worin auch immer die Unterschiede schlußendlich im Detail begründet liegen mögen, ihnen ist entgegenzuwirken durch eine Erhöhung der Anzahl an gemessenen Proben pro jeweiligem Transfektionsansatz. Die anschließende Bildung eines Mittelwertes aus einer Vielzahl an Peakintensitäten (im Vergleich zu lediglich zwei) würde eine realistischere Darstellung der tatsächlichen metabolischen Situation in der Zelle erlauben. Weiter muß die Frage gestellt werden, ob die durch eine

transiente Überexpression der SDR-Kandidaten in den HEK293-Zellen herbeigeführten Veränderungen in der Metabolitenzusammensetzung generell signifikant genug sind, um durch das besagte Verfahren detektiert werden zu können. Dieser Problematik wäre beispielsweise durch die Generierung einer stabil transfizierten Zelllinie zu begegnen, die die Expression der Enzyme von Interesse nicht nur für einen begrenzten Zeitraum sondern kontinuierlich erlaubt und somit aller Voraussicht nach einen deutlicheren Effekt auf das Metabolom der verwendeten Zellen hätte. Ein auf das selbe Resultat zielender, aber generell gegensätzlicher Ansatz wäre die Ausschaltung (KnockOut) oder die Herunterregulierung (KnockDown) der den SDR-Kandidaten zugrundeliegenden Gene beispielsweise durch RNAi-Technologie.

### 3.2.5 Expression und Aufreinigung der zu charakterisierenden Mitglieder der SDR-Proteinfamilie

Die Verfügbarkeit von Protein in Reinstform ist einer der entscheidenden Trümpfe im Zuge der erfolgreichen Charakterisierung von bislang unbekanntem Proteinen. Sie ermöglicht die Anwendung einer Vielzahl an Verfahren, die jeweils für sich oder in Kombination mit anderen, einen erheblichen Beitrag zur umfassenden Aufklärung der physiologischen Funktion von Proteinen leisten können. Durch den Einsatz aufgereinigter Enzyme gelingt es beispielsweise, ihr katalytisches Potential gegenüber ausgewählten Substraten im eng definierten *in vitro*-System im Detail zu ermitteln und gegebenenfalls eine Inhibition der Reaktion durch definierte Zugabe von chemischen Komponenten zu erreichen. Darüberhinaus ist es möglich Wechselwirkungen mit anderen Proteinen durch die Durchführung von Methoden wie GST-Pulldown Assay oder Coimmunopräzipitation zu erfassen und somit auch hier einen Angriffspunkt für die therapeutische Intervention zu liefern (vergleiche auch 3.2.6). Das wohl größte Potential des Proteins in Reinstform liegt in der Möglichkeit seiner Verwendung zur Strukturaufklärung. Durch Röntgenkristallographie und andere Verfahren kann die Tertiärstruktur der Proteine von Interesse exakt bestimmt und somit essentielle Bereiche für z.B. Substrat- oder Cofaktorbinding aufgedeckt werden. Besagtes Wissen läßt sich dann wiederum zur Entwicklung spezifischer Inhibitoren und langfristig zur Generierung von vielversprechenden Medikamenten nutzen.

In dieser Arbeit verfolgte die Expression und Aufreinigung der zu charakterisierenden Mitglieder der SDR-Proteinfamilie in erster Linie das Ziel, ihre natürlichen Substrate zu ermitteln. Die angestrebte Durchführung einer fluoreszenz-basierten Cofaktor-Bindungsstudie - oftmals bereits erfolgreich genutzt zur Aufklärung der Spezifität von SDR-Enzymen, als Beispiel sei an dieser Stelle lediglich humanes DHRS10 genannt [117] - in Kooperation mit Herrn Dr. Udo Oppermann vom Structural Genomics Consortium (SGC) setzte zunächst die Verfügbarkeit der Enzyme von Interesse in Reinstform voraus.

#### **Vorhersage der Proteintopologie - ein wertvolles Hilfsmittel!**

Zur Einschätzung der zu erwartenden Löslichkeit bzw. der Möglichkeit einer Membranständigkeit von aufzureinigenden Proteinen sind im Internet zahlreiche Algorithmen verfügbar, die eine Vorhersage der Protein-Topologie (Orientierung und Lage von Transmembranhelices) erlauben. Ein Großteil dieser Anwendungen basiert auf einem typischen hidden-Markov-Modell oder der einfachen Beurteilung der Hydrophobizität, andere hingegen stellen eine statistische Analyse gegen

Datenbanken natürlich vorkommender Transmembranproteine an [32]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen beschränkten sich repräsentativ auf fünf der zugänglichen Server (HMMTOP [202], SOSUI [76], TMHMM [188], TMPred [78] und TopPred [51] [210] [187], die erzielten Ergebnisse sind unter 2.12 zusammengefasst. Im Vergleich zu den bioinformatischen Vorhersagen zur subzellulären Lokalisation gestaltet sich die Bewertung der im Rahmen dieser Analyse erzielten Ergebnisse deutlich schwieriger, da die im Anschluß durchgeführten Experimente keine detaillierte Verifizierung zulassen. Während die einzelnen Server zumeist eine wahrscheinliche Anzahl an Transmembrandomänen und deren jeweilige Position in der Aminosäuresequenz vorschlagen, konnten die Versuche zur Expression und Aufreinigung lediglich einen Beleg dafür liefern, ob es sich bei den Kandidaten hCBR4, hDHR51 und hHSDL1 um lösliche Proteine handelt oder nicht. Nichts desto trotz kann nach den gewonnenen Erkenntnissen festgestellt werden, daß im Gesamten 60,00 % der getroffenen Vorhersagen hinsichtlich einer generellen Löslichkeit der zu untersuchenden Proteine mit dem experimentellen Resultat übereinstimmten, TopPred zeigte hierbei mit 100,00 % die höchste Effizienz. Wenngleich dies im Vergleich zur bioinformatischen Bestimmung der subzellulären Lokalisation für eine große Verlässlichkeit der verwendeten Server spricht, muß die weitaus geringere Anzahl an analysierten Sequenzen angemerkt werden (drei Sequenzen gegenüber 14 Sequenzen, 15 Vorhersagen gegenüber 98 Vorhersagen), die den repräsentativen Wert der hier durchgeführten bioinformatischen Vorhersage zur Topologie mehr als in Frage stellt. Auch wenn die Bewertung der Anwendung TopPred als zuverlässigster Algorithmus eindeutig der in einer umfangreichen Studie gewonnenen Erkenntnis, daß Hydrophobizitäts-basierte Methoden weniger akkurat sind, als fortschrittlichere (z.B. hidden-Markov-Modell) entgegensteht [32], scheint die in der Gesamtanalyse ermittelte Tendenz die richtige zu sein. Zumindest um einen Eindruck über die zu erwartende Löslichkeit der Proteine von Interesse zu gewinnen offenbart sich die Topologie-Vorhersage als wertvolles Hilfsmittel.

### **Bakterien, Hefe, Zellkultur - Drei Systeme, ein Ergebnis**

Die Aufreinigung von Proteinen im großen Maßstab kann durch die Verfolgung unterschiedlichster Strategien erreicht werden. Eine weit verbreitete Methode ist ihre rekombinante Expression in Fusion mit einem spezifischem Tag (His-Tag, GST-Tag, etc. ), das dem Protein von Interesse eine Bindungsaffinität verleiht, über die es unter nativen Bedingungen nicht verfügt, und somit dessen Gewinnung aus der Gesamtheit aller in der Zelle exprimierten Proteine deutlich erleichtert. Auch im Rahmen dieser Arbeit war besagtes Verfahren das Mittel der Wahl. Zur rekombinanten Expression der SDR-Kandidaten mit dem Ziel ihrer anschließenden Aufreinigung in ausreichender Menge (hinsichtlich des geplanten Assays), kamen sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Systeme zum Einsatz, von denen zwar jedes seine individuellen Stärken und Schwächen aufweist (vergleiche 2.2.6), die aber schlußendlich alle eine gemeinsame Einschränkung teilen. Sie alle gelangen an ihre Grenze, sobald es sich bei den zu gewinnenden Proteinen von Interesse um Membran- bzw. membranassoziierte Proteine handelt. Diese Erkenntnis bestätigte sich im vollem Umfang im Zuge der Untersuchungen. Unabhängig davon, ob es sich beim verwendeten System um Bakterien oder Hefen - die Expression in Zellkultur schlug generell fehl, hätte aber ein ähnliches Resultat zur Folge gehabt -, oder beim fusionierten Tag um ein GST-, Strep- oder V5-His-Tag handelte, ist es nicht gelungen, die zu gewinnenden SDR-Enzyme in ausreichendem Maße in die nach Zellyse erhaltene lösliche Fraktion zu überführen, um sie anschließend über ihre Affinität zu speziell behandelten

Matrizes in Reinstform gewinnen zu können. Ursächlich dafür ist aller Wahrscheinlichkeit nach eine Integration der Proteine von Interesse in die jeweiligen Membranen ihrer Zielkompartimente. Wenngleich die erhoffte Aufreinigung der Kandidatenenzyme nicht bewerkstelligt werden konnte, so lieferten die gewonnenen Ergebnisse zumindest einen deutlichen Beleg für die Membranständigkeit der zu charakterisierenden Proteine.

### **Der Einsatz von Detergenzien - nicht immer führt der Weg zum Ziel**

Detergenzien sind eine Klasse von polaren, wasserlöslichen Lipiden, deren einzigartige Eigenschaften die Manipulation von Wechselwirkungen zwischen hydrophoben und hydrophilen Molekülen in biologischen Proben erlauben. In der Wissenschaft werden sie u.a. zur Zellyse und zur Solubilisierung von Membranproteinen verwendet. Da es, wie erwähnt, trotz Verwendung unterschiedlichster Expressionssysteme nicht gelungen ist, die rekombinanten SDR-Enzyme von Interesse in löslicher Form zu gewinnen, wurde auch im Rahmen dieser Arbeit der Einsatz von Detergenzien in Erwägung gezogen. Aus zwei Gründen, die im Folgenden erläutert werden, wurde schlußendlich von ihrer Verwendung abgesehen.

**Denaturierung der Proteinstruktur.** Der Einsatz von Detergenzien kann zu einer Denaturierung und somit zu einem Aktivitätsverlust des aufzureinigenden Proteins führen. Speziell ionische Detergenzien, die ein enormes Solubilisierungspotential aufweisen, neigen dazu, die Tertiärstruktur gravierend zu zerstören. Da die SDR-Proteine von Interesse nach Aufreinigung einem Bindungsassay unterzogen werden sollten, erschien ihre Verwendung ein zu risikoreiches Unterfangen, zumal aufgrund der zunächst unbekanntem Substratspezifität der Enzyme hCBR4, hDHRS1, hHSDL1 und hHSDL1(F218Y) keine Überprüfung der Faltung/Aktivität, beispielsweise in einem *in vitro*-Substratassay, möglich war. Durch die Verifizierung eines Retinoidumsatzes im späteren Verlauf der Arbeit steht nun ein geeignetes Kontrollsystem zur Verfügung, das unter Umständen die Solubilisierung durch Detergenzien erlaubt.

**Beeinflussung der Folgeanwendung.** Detergenzien, die weniger denaturierende Eigenschaften besitzen, sind beispielsweise nicht-ionische Verbindungen. Hinsichtlich des Faltungsmusters kann ihr Einsatz bedenkenlos erfolgen. Im Gegensatz zu ionischen Detergenzien lassen sie sich allerdings nur schwer aus der angefertigten Probe dialysieren, ein Umstand, der eventuell eine Beeinflussung der im Anschluß durchzuführenden Anwendung nach sich zieht. Hinsichtlich der geplanten Fluoreszenz-basierten Cofaktor-Bindungsstudien zur Überprüfung einer Bibliothek an ausgewählten Substraten, wurde auch auf ihre Verwendung verzichtet.

### **3.2.6 Identifizierung von Interaktionspartnern der zu charakterisierenden Mitglieder der SDR-Proteinfamilie**

Proteine werden in ihrer physiologischen Funktion oftmals durch nicht-kovalente Interaktionen beeinflusst. Sie wirken gemeinsam mit Bindungspartnern oder als Komponenten eines großen Multiproteinkomplexes, die zeitliche und räumliche Variabilität der bestehenden Wechselwirkungen ermöglicht es der Zelle, ihre Funktionen auszuführen und den äußeren Bedingungen anzupassen.

Entscheidend für das umfassende Verständnis biologischer Stoffwechselwege bzw. mit ihnen assoziierter Krankheitsbilder und für die im Zuge dessen unerläßliche Aufklärung der physiologischen Rolle von bislang uncharakterisierten Proteinen, wie beispielsweise den in dieser Arbeit zu untersuchenden Mitgliedern der SDR-Proteinfamilie, ist es demzufolge, deren spezifische Wechselwirkungspartner zu identifizieren und besagte Interaktionen im Detail zu verstehen.

Für eine Vielzahl an SDR-Enzymen ist es in den vergangenen Jahren bereits gelungen, Interaktoren zu bestimmen und somit einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung ihrer Funktion im Organismus zu leisten. Als repräsentatives Beispiel sei an dieser Stelle die 11 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 1 genannt. Besagtes Enzym katalysiert die Konvertierung der inaktiven Glucocorticoide Cortison und 11-Dehydrocorticosteron unter Verwendung von NADPH in ihre aktiven Formen Cortisol und Corticosteron. Die Verfügbarkeit des benötigten Cofaktors wird dabei durch die Hexose-6-phosphat-Dehydrogenase (H6PDH) gesteuert [74]. In umfassenden Studien konnte gezeigt werden, daß H6PDH nicht, wie zunächst angenommen, lediglich funktionell an 11 $\beta$ -HSD 1 gekoppelt ist, sondern die beiden Proteine direkt, durch Protein-Protein-Wechselwirkung, miteinander interagieren [9]. Während sowohl 11 $\beta$ -HSD 1 als auch H6PDH schon früher als Ziel eines therapeutischen Eingriffs in die mit der Oxoreduktase-Aktivität des Enzyms 11 $\beta$ -HSD 1 assoziierten menschlichen Krankheiten (Insulin-Resistenz, Metabolisches Syndrom) in Erwägung gezogen wurden, so eröffnet die gewonnene Erkenntnis eine neue Möglichkeit der Intervention, beispielsweise durch die Entkopplung der wechselwirkenden Enzyme mittels kleinmolekularer Liganden.

#### **Yeast-Two-Hybrid - Ein System mit Einschränkungen**

Aufgrund seiner einfachen und schnellen Handhabung und der im Vergleich zu anderen Verfahren großen Kostenersparnis ist das Yeast-Two-Hybrid-System seit seiner erstmaligen Beschreibung [54] zu einer der beliebtesten Technologien zur Detektion von Protein-Protein-Wechselwirkungen avanciert. Die Möglichkeit, eine Untersuchung von Interaktionen in zumindest *in vivo*-ähnlichen Verhältnissen, d.h. im Milieu einer Zelle und mit den für Eukaryoten typischen posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierung, Palmitoylierung oder Faltung durch Chaperone durchführen zu können ohne dabei über Vorkenntnisse hinsichtlich der potentiell interagierenden Proteine verfügen zu müssen, hat das Verfahren in zahlreichen Studien, wie auch in dieser Arbeit, zum ersten Mittel der Wahl werden lassen. Insbesondere in der Erforschung von Signalkaskaden spielte das Yeast-Two-Hybrid-System in der Vergangenheit vielfach eine bedeutende Rolle, da der Wechselwirkungsnachweis durch Reporterogenaktivierung im Vergleich zu direkten biochemischen Methoden erlaubt, auch die für diese Prozesse charakteristischen schwachen oder transienten Interaktionen zu detektieren. Wenngleich die genannten Vorzüge dem Yeast-Two-Hybrid-System zweifellos ein enormes Potential bescheinigen, so bleibt anzumerken, daß besagte Methode auch Einschränkungen unterliegt, die vor oder im Zuge ihrer Verwendung in Betracht gezogen werden müssen. So eignen sich beispielsweise einige Proteinklassen generell nicht für die Analyse im besagten System. Hierzu zählen u.a. Transkriptionsfaktoren, die die Transkription der Reportergene ohne jegliche Interaktion aktivieren könnten, Membranproteine, die nicht der essentiellen Translokation in den Nukleus unterliegen oder Proteine die im Vorfeld einer Wechselwirkung die Modifikation durch cytoplasmatische oder membran-assoziierte Enzyme benötigen.

Da es sich bei allen in dieser Arbeit zu untersuchenden Mitgliedern der SDR-Proteinfamilie um

bislang uncharakterisierte Proteine handelte und demzufolge keine bereits beschriebenen Interaktionen zu verifizieren, sondern stattdessen unbekannte aufzudecken waren, erschien das Yeast-Two-Hybrid-System die einzig vielversprechende Methode zu sein. Eine Zugehörigkeit zur Proteinklasse der Transkriptionsfaktoren konnte im Vorfeld ausgeschlossen werden, die Problematik der hydrophoben Transmembrandomänen wurde im Verlauf der Analysen durch Generierung von trunkierten Enzymkonstrukten umschifft. Im Verlauf der Untersuchungen taten sich dafür andere System-charakteristische Schwierigkeiten auf, diese sind detailliert im Folgenden besprochen.

**Frame oder nicht Frame - das ist hier die Frage!** Dem Yeast-Two-Hybrid-System liegt zunächst die Generierung von Expressionkonstrukten zu Grunde, die eine Fusion der Proteine von Interesse an die Aktivierungs- bzw. Bindedomäne des Transkriptionsfaktors Gal4 gewährleisten. Während im Falle des eingesetzten Köderkonstrukts (Insert: CDS des auf Interaktionspartner zu untersuchenden Kandidaten) die Einhaltung des erforderlichen Leserasters (Frame) durch die definierte Amplifikation des Inserts und die gewählte Klonierungsstrategie einfach zu bewerkstelligen ist, so ist die Erzeugung der Beutekonstrukte (Insert: cDNA-Bibliothek) ein weitestgehend zufälliger Prozess. Somit weist durchschnittlich lediglich etwa jede sechste klonierte cDNA ein identisches Leseraster mit der Gal4-Aktivierungsdomäne auf [205], die im Rahmen eines Yeast-Two-Hybrid-Screening erhaltenen Nukleotidsequenzen potentieller Interaktionspartner müssen demzufolge stets hinsichtlich des korrekten Frames überprüft werden. Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigte sich dieser oftmals versetzt. Wenngleich die Hefe generell in der Lage ist, translationale Leserrasterverschiebungen vorzunehmen und in einigen Fällen ein großer ORF (Open Reading Frame) im falschen Raster durchaus mit dem exprimierten Protein korrespondieren kann, so ist deutlich wahrscheinlicher, daß Transkription und Translation basierend auf den entsprechenden Konstrukten die Generierung eines unnatürlichen Beuteproteins zur Folge hat, welches zwar mit dem Köderprotein interagieren kann, physiologisch aber keinerlei Bedeutung hat. Da eine zusätzliche Verifizierung der identifizierten Wechselwirkungspartner im falschen Leseraster einen immensen Mehraufwand bedeutet hätte (Amplifizierung ihrer Vollen-Länge-CDS, Klonierung eines im GST-Pulldown Assay oder der Coimmunopräzipitation nutzbaren Expressionskonstrukts), wurden diese in der weiteren Analyse nicht berücksichtigt.

**Interaktion: falsch-positiv - Die Identifizierung „falscher Freunde“.** Transkription ist ein nukleärer Prozess. Die erfolgreiche Durchführung eines Yeast-Two-Hybrid-Screening setzt demzufolge, wie mehrfach beschrieben, die erfolgreiche Translokation der generierten und zu analysierenden Fusionsproteine in den Zellkern voraus. Durch spezifische Verfahren, wie beispielsweise die bewußte Aussparung von hydrophoben Transmembrandomänen, ist der Transfer in den Nukleus, zumindest für die zu untersuchenden Köderproteine, weitestgehend sicherzustellen. Eine zellkernspezifische Problematik, auf die dagegen keinen Einfluß genommen werden kann, ist die Faltung der transferierten Proteine im Hefe-Zellkern. Da sich dessen Milieu von dem der Kompartimente, in denen sich die zu untersuchenden Proteine gewöhnlich aufhalten, unterscheidet, muß in Betracht gezogen werden, daß ihre Tertiärstrukturen nicht immer den Faltungsmustern in der ursprünglichen Umgebung entsprechen. Dies kann zur Folge haben, daß Proteine, die normalerweise miteinander interagieren, im Hefezellkern aufgrund ihrer veränderten Oberflächenstruktur keine Wechselwirkung zeigen (falsch-negativ), für andere sich dagegen Interaktionen nachweisen lassen,

die unter den eigentlichen Faltungsbedingungen nicht möglich wären (falsch-positiv). Neben diesen zumeist in einem nachfolgenden Verifizierungsschritt aufgedeckten, spezifischen falsch-positiven Wechselwirkungen, offenbaren Yeast-Two-Hybrid-Screenings in der Regel eine Reihe an Interaktoren, die aufgrund ihres immer wiederkehrenden und offensichtlich vom eingesetzten Köderprotein unabhängigen Auftretens in einer Vielzahl an Studien ebenfalls als falsch-positiv eingestuft werden. Besagte Proteine scheinen im Falle einer Fusion an die Gal4-DNA-Bindungsdomäne selbstständig in der Lage, die Transkription der Reportergene zu aktivieren. Eine Zusammenfassung verbreiteter falsch-positiver Wechselwirkungspartner findet sich auf der Homepage von Erica Golemis et al. (<http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/InteractionTrapInWork.html>). Zu ihnen sind neben zahlreichen Collagen-verwandten, mitochondrialen oder ribosomalen Proteinen beispielsweise Heatshock- und Zinkfinger-Proteine sowie Ferritin, die Transfer-RNA-Synthase und Untereinheiten des Proteasoms zu zählen. Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Yeast-Two-Hybrid-Assays konnten 18,93 % aller identifizierten Interaktoren eindeutig dieser Gruppe zugeordnet und somit als falsch-positiv bewertet werden. Auf ihre weitere Analyse mittels vom Yeast-Two-Hybrid unabhängiger biochemischer Verfahren wurde im Zuge dessen verzichtet.

**Partner nur für den Moment - Bindungen ohne physiologische Relevanz.** Da im Yeast-Two-Hybrid-System durch die Verwendung einer cDNA-Bibliothek als „Beute“ idealerweise alle vorstellbaren Kombinationen an Protein-Protein-Interaktionen des Köderproteins überprüft werden, ist im Laufe eines durchgeführten Screening-Verfahrens stets die Möglichkeit einer Identifizierung von artefaktischen Partnern gegeben. Aufgrund der sogenannten Zeit/Raum-Beschränkung ist es vorstellbar, daß die als potentielle Wechselwirkungspartner bestimmten Proteine sich unter physiologischen Bedingungen nie in unmittelbarer Nähe zueinander befinden. Dies wäre beispielsweise der Fall, wenn besagte Proteine in unterschiedlichen Zelltypen exprimiert werden oder in verschiedenen subzellulären Kompartimenten der selben Zelle lokalisiert sind. Darüberhinaus ist eine Expression der interagierenden Proteine zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Embryogenese oder des Zellzyklus denkbar. Es ist demnach essentiell, nach der Identifizierung zweier wechselwirkender Partner, die biologische Relevanz ihrer Interaktion zu bestimmen. In dieser Arbeit erfolgte dies erst nach Verifizierung der im Yeast-Two-Hybrid-System aufgedeckten Wechselwirkungen durch den GST-Pulldown-Assay, für einige der ermittelten Interaktionen war daraufhin eine physiologische Bedeutung in Frage zu stellen.

#### **GST-Pulldown-Assay - Verifizierung leicht gemacht**

Da die Aussagekraft der Ergebnisse eines Yeast-Two-Hybrid-Screenings nicht zuletzt aufgrund der genannten Aspekte oftmals in Frage zu stellen ist, ist zu einer eindeutigen Verifizierung von aufgedeckten Interaktionen stets die darauffolgende Anwendung einer alternativen, von besagtem System unabhängigen Methode erforderlich. Hierfür stehen generell eine Vielzahl an biochemischen Verfahren zur Verfügung, in vorliegender Arbeit bot sich durch die Verfügbarkeit der benötigten Expressionskonstrukte in erster Linie der Einsatz des GST-Pulldown-Assays an. Besagte Methode stellte sich als unkompliziert heraus und lieferte weitestgehend unzweifelhafte Ergebnisse. Für die beiden SDR-Kandidaten hDHRS1 und hHSDL1 konnten auf diese Weise im Yeast-Two-Hybrid-System identifizierte Wechselwirkungspartner bestätigt werden.

Kritisch anzumerken ist in diesem Zusammenhang lediglich, daß durch das gewählte Versuchs-

design keinerlei Aufschluß über die Stärke einer verifizierten Bindung zwischen SDR-Kandidat und seinem Interaktionspartner gegeben werden konnte. Hierzu wäre der Einsatz einer definierten Proteinmenge in den Assay zwingend gewesen. Wenngleich dies für die *in vitro*-translatierten Interaktionspartner nach Messung der Protein-Konzentration im Ansatz einfach zu bewerkstelligen gewesen wäre, so hätte die Bindung einer festgesetzten Menge an SDR-Protein (in Fusion mit GST) an die verwendeten Glutathion-Sepharose-Beads zunächst dessen erfolgreiche Aufreinigung erfordert. Da dies im gesamten Verlauf der Arbeit nicht gelungen ist, wurde ohne vorherige Verifizierung die maximal mögliche GST-Fusionsproteinmenge gebunden. Der Einfachheit halber wurde hinsichtlich der Negativ-Kontrolle (GST alleine an die Sepharose immobilisiert) ebenso verfahren. Natürlich stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, inwieweit aufgrund der unterschiedlich gekoppelten Proteinmengen ein Vergleich zwischen eigentlichem Reaktionsansatz und seiner Negativ-Kontrolle zulässig ist, wie verlässlich die erzielten Ergebnisse des GST-Pulldown-Assays unter diesen Bedingungen wirklich sind. In diesem Zusammenhang ist zu bemerken, daß das entscheidende Kriterium für die tatsächliche Verlässlichkeit des angewandten Systems der Überschuß an gebundenem Protein in der Negativ-Kontrolle ist. Bekanntermaßen handelt es sich bei GST um ein Protein, das nach Expression und Zellaufschluss vollständig in Lösung vorliegt. Demzufolge wurde beim durchgeführten Bindungsprozess (Gesamtes Zellysate auf 100  $\mu$ L Glutathion-Sepharose-Beads) eine große Menge an GST-Protein an die Sepharose immobilisiert. Es ist sogar davon auszugehen, daß die verwendeten Beads aufgrund der perfekten Bindungseigenschaften des GST nach Abschluß der Kopplung gesättigt waren. Im Gegensatz dazu waren die SDR-Kandidaten in Fusion mit GST nach Überproduktion und Lyse nur in sehr geringem Maße im Zellüberstand vertreten, was unter identischen Bindungskonditionen aller Wahrscheinlichkeit nach die Immobilisierung einer weitaus geringeren Proteinmenge an die Glutathion-Sepharose zur Folge hatte. Im Bestfall hätte aber auch hier maximal eine Sättigung der Beads erreicht werden können. Aufgrund der definierten Menge an in den Assay eingesetztem Trägermaterial konnte also ein eindeutiges Signal bzw. ein Signal höherer Intensität in der zu analysierenden Probe im Vergleich zur Negativ-Kontrolle nicht auf eine größere Menge an gekoppeltem Protein zurückgeführt werden, sondern als gültiger Beweis für eine tatsächliche Interaktion gelten.

### 3.2.7 Etablierung einer KnockOut-Mauslinie

Im Laufe des letzten Jahrhunderts hat sich die Maus aufgrund der starken genetischen als auch physiologischen Ähnlichkeiten zum Menschen und der leichten Beeinflußbarkeit und Analysierbarkeit ihres Genoms zum beliebtesten Säugetiermodell der genetischen Forschung entwickelt. Wenngleich Hefen, Würmer und Fliegen exzellente Modelle zur Studie des Zellzyklus oder einer Vielzahl entwicklungsbiologischer Prozesse sind, erwies sich die Maus als weitaus besseres Hilfsmittel zur Untersuchung von komplexen physiologischen Systemen, Systemen, die allen Säugetieren gemein sind. Wie Menschen und andere Vertreter der Säugetierspezies entwickelt auch die Maus Erkrankungen, die diese Systeme betreffen. Hierzu zählen beispielsweise Atherosklerose, Bluthochdruck, Diabetes, Krebs, Osteoporose und der grüne Star. Darüberhinaus können bestimmte Krankheitsbilder, die gewöhnlich lediglich der Mensch aber nicht die Maus entwickelt, wie z.B. Mukoviszidose und Alzheimer, durch Steuerung des Umwelteinflusses oder Manipulation des Mausgenoms induziert werden. Eine weit verbreitete Methode der genetischen Manipulation ist der KnockOut. Der KnockOut von Genaktivität liefert wertvolle Hinweise darauf, welcher Funktion das entsprechende

Gen im Organismus nachkommt. Da Mensch und Maus in einer Vielzahl an Genen Übereinstimmungen zeigen, erlaubt die phänotypische Untersuchung von KnockOut-Mäusen ein besseres Verständnis darüber, wie spezifische Gene eine menschliche Erkrankung verursachen oder zu ihrer Entstehung beitragen.

Auch hinsichtlich der Erforschung der SDR-Proteinfamilie leistete die Mausgenetik bereits signifikante Beiträge. Die Inaktivierung der  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 4 durch KnockOut beispielsweise wurde bereits im Jahre 2000 publiziert [11] und offenbarte eine primäre Rolle des Enzyms im Fettsäuremetabolismus. Besagtes Modell liefert bis heute ein bedeutendes Hilfsmittel zur detaillierten Untersuchung der menschlichen Erkrankung „D-specific bi-functional protein deficiency“. Des weiteren konnte u.a. aufgrund von Daten aus der Analyse diverser loss-of-function-Modelle eine über den Steroidstoffwechsel hinausgehende Funktion für die  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen des Typs 1 und 2 prognostiziert werden [129]. Dem in dieser Arbeit zu charakterisierenden SDR-Protein Wwox wurden bislang lediglich Interaktionen mit p53, p73, JNK1 oder anderen Proteinen unterschiedlichster Signalkaskaden nachgewiesen, was ihm den Status eines neuen Vermittlers von apoptotischen Prozessen oder Antwort auf Stress einbrachte. Mit den SDR-typischen Sequenzmotiven konnte im Falle von Wwox allerdings bislang keine biologische Funktionen in Verbindung gebracht werden. Durch die Charakterisierung einer entsprechenden KnockOut-Maus sollte gezeigt werden, welche nichtredundanten Funktionen das Protein *in vivo* erfüllt, bzw. welche biochemischen Defekte durch sein Fehlen hervorgerufen werden. Unter Umständen sollte eine umfassende Phänotypisierung sogar erlauben, ähnlich wie für  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen des Typs 4 beschrieben, Rückschlüsse auf humanmedizinische Syndrome zu ziehen.

#### **Definition des genetischen Hintergrundes - C57/Bl6J die Linie der Wahl**

Im Zuge der Etablierung einer aussagekräftigen Mauslinie ist die Eliminierung von genetischen Hintergrundeffekten vor der Analyse der durch Manipulation herbeigeführten Mutation ein entscheidender Aspekt [221]. Dies erfolgt gewöhnlich durch eine mehrere Generationen überdauernde Rückkreuzung der mutanten Mauslinie auf einen Standard-Inzuchtstamm. Für diesen als Definition des genetischen Backgrounds bezeichneten Vorgang stehen eine Vielzahl an Inzuchtlinien zur Verfügung. Da in Studien gezeigt werden konnte, daß eine einzige Mutation signifikant unterschiedliche Phänotypen zur Folge haben kann, abhängig davon wie der genetische Hintergrund definiert ist, ist die Auswahl der Inzuchtlinie von großer Bedeutung. Ist man beispielsweise an der Untersuchung des Fellfarbe-Phänotyps interessiert, sollte als Background keine Albino-Linie gewählt werden, da deren Melatonin-Synthese genetisch defekt ist. Andere Inzuchtstämme wie C3H, die eine rezessive retinaldegenerierenden Mutation tragen [184], sind dagegen für Untersuchungen visueller Funktion nicht geeignet. Da hinsichtlich des murinen Wwox-Gens keine Einflüsse des KnockOuts auf spezielle physiologische Systeme untersucht werden, sondern sich stattdessen ein breiter Überblick über Veränderungen möglichst vieler Körperfunktionen verschafft werden sollte, wurde ein genetischer Hintergrund gewählt, der dies aller Voraussicht nach gewährleisten kann. Die Inzuchtmaus C57/Bl6J ist eine über viele Forschungsgebiete eingesetzte Mauslinie die neben einer im Alter eintretenden gravierenden Gehörlosigkeit lediglich geringfügigere Auffälligkeiten wie eine niedrige Knochendichte oder eine Anfälligkeit gegenüber Futter-abhängiger Adipositas, Diabetes des Typs 2 oder Atherosklerose zeigt. Aufgrund der Tatsache, daß jede verfügbare Inzuchtlinie

ihre Defizite aufweist und bezüglich des Wwox-KnockOuts im Vorfeld der Untersuchungen keine zu erwartenden Phänotypen definiert werden konnten, erschien die sich gut vermehrende, langlebende und grundsätzlich für jede Mutation verwendbare C57/Bl6J-Mauslinie ein geeigneter genetischer Hintergrund zu sein.

### **Gefangen im Trap - Probleme im Zuge der zufälligen Integration der Reporter-Kassette**

Zur Generierung von KnockOut-Mäusen ist im Wesentlichen die Anwendung zweier Strategien denkbar. Während im Zuge des sogenannten Gene-Targetings durch homologe Rekombination im Nukleus von ES-Zellen eine definierte Manipulation eines spezifischen Gens erreicht wird, so basiert das Gene-Trapping-Prinzip auf einer zufälligen Integration einer Reporter-Kassette im Genom der Maus zur Mutation und Identifizierung des „gefangenen“ Locus. Beide Verfahren zeichnen sich sowohl durch Vor- als auch durch Nachteile aus [58], ihr Einsatz ist stark vom angestrebten Versuchsziel abhängig. Da im Rahmen dieser Arbeit nicht die Neugenerierung eines KnockOuts angestrebt war, sondern für die detaillierte Aufklärung der *in vivo*-Funktion des Proteins von Interesse anhand einer spezifischen Mausmutante bereits für das Wwox-Allel heterozygote Tiere, erzeugt durch GeneTrap-Technologie, zur Verfügung gestellt wurden, erübrigte sich die Auswahl des anzuwendenden gentechnischen Verfahrens.

Im Verlauf der durchgeführten Untersuchungen stellte sich allerdings der ursprüngliche Einsatz des Gene-Trappings zur Generierung der KnockOut-Maus schon rein experimentell als nachteilig heraus. In erster Linie bereitete die Genotypisierung der Nachkommen der Wwox-Mauslinie erhebliche Schwierigkeiten, da sie zunächst die Identifizierung der zufällig integrierten lacZ-Reporter-kassette im Wwox-Gen voraussetzte. Durch ein angefertigtes RACE-PCR-Produkt konnte zwar auf einfache Weise der Ort der Integration eingegrenzt werden (Intron 4-5, 40.559 bp), die zur Etablierung einer verlässlichen Genotypisierungsstrategie essentielle Lokalisierung ihrer exakten Position war dagegen überaus zeit- und kostenintensiv. Die beschriebene Problematik wäre bei einer definierten Mutation durch Gene-Targeting-Technologie nicht gegeben gewesen. Ein Einsatz besagten Verfahrens ist bezüglich des Wwox-KnockOuts grundsätzlich vorstellbar, da die Sequenz des entsprechenden murinen Gens seit längerem bekannt ist. Hinsichtlich der Effizienz des angefertigten KnockOuts ist nur schwer eine Aussage zu treffen, Spekulationen diesbezüglich finden sich in einem späteren Kapitel (vergleiche 3.4).

## **3.3 Feststellungen zu den charakterisierten Mitgliedern der SDR-Proteinfamilie**

### **3.3.1 humanes CBR4 - Die „Carbonylreduktase“ der anderen Art**

Die Identifizierung der humanen Carbonylreduktase des Typs 4 als Mitglied der SDR-Proteinfamilie geht auf die Arbeiten von Frau Dr. Brigitte Keller zurück [102]. Die Annotierung von hCBR4 als Carbonylreduktase ließ zunächst eine phylogenetische als auch funktionelle Verwandtschaft zu den bereits charakterisierten Angehörigen dieser Proteingruppe vermuten, im Zuge dessen steht ein Vergleich zu den menschlichen Carbonylreduktasen des Typs 1 und 3 im Fokus dieser Diskussion.

### Phylogenie

Die sowohl zu Beginn als auch gegen Ende der experimentellen Untersuchungen angestellten phylogenetischen Analysen offenbarten lediglich Homologe der Säugetierklasse als unmittelbare Verwandte der humanen Carbonylreduktase des Typs 4. Aus dem ermittelten, hohen Grad an Sequenzidentität im illustrierten CBR4-Cluster wurde auf eine signifikante Bedeutung des Kandidaten im Stoffwechsel der Vertebraten geschlossen. Überraschenderweise traten die humanen Carbonylreduktasen des Typs 1 und 3 gegen alle Erwartungen nicht im kalkulierten Stammbaum in Erscheinung. Eine detaillierte Analyse hinsichtlich der Ähnlichkeiten der entsprechenden Proteine ließ zwar große Übereinstimmungen in den Aminosäuresequenzen von hCBR1 und hCBR3 erkennen, hCBR4 wies jedoch zu beiden Enzymen lediglich geringe Sequenzidentität auf (25 % zu hCBR1 bzw. 24 % zu hCBR3). Eine sequenzbedingte, enge Verwandtschaft kann demzufolge ausgeschlossen werden, ein eventuell gemeinsamer evolutionärer Ursprung erscheint weitestgehend unwahrscheinlich.

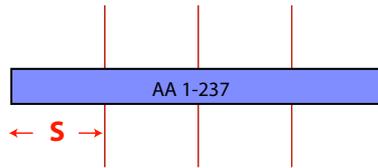
Wenngleich mit der Konservierung von Funktion oftmals ein hoher Grad an Konservierung der Aminosäuresequenz verbunden ist [20], so ist der Umkehrschluß, signifikante Unterschiede in der Sequenz würden eine gemeinsame Funktion generell ausschließen, nicht zulässig. Dies wird u.a. am Beispiel der humanen 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 12 deutlich, die trotz einer relativ geringen Sequenzidentität von lediglich 24 % in der Lage ist, die in erster Linie durch die humane 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 1 bewerkstelligte Reduktion von Estron zu Estradiol zu katalysieren [118]. Aus diesem Grund wurde eine zumindest funktionelle Verbindung zwischen dem ermittelten CBR4-Cluster und den Enzymgruppen CBR1 und CBR3 weiter in Erwägung gezogen.

### Subzelluläre Lokalisation und Proteintopologie

Die im Rahmen vorliegender Arbeit durchgeführten Studien identifizierten hCBR4 eindeutig als mitochondriales Protein. Dies war in sofern unerwartet, da der Vielzahl an bislang charakterisierten Carbonyl-reduzierenden Enzymen - darunter auch hCBR1 [212], für hCBR3 wird aufgrund seiner hohen Sequenzidentität zu hCBR1 selbiges stark angenommen [153] - eine subzelluläre Lokalisation im Cytosol nachgewiesen werden konnte [59]. Daß die Reduzierung von Carbonylgruppen jedoch nicht zwangsläufig cytosolischen Enzymen vorbehalten ist, zeigen u.a. die Untersuchungen der tetramerischen pulmonalen Carbonylreduktasen diverser Nagetiere (beispielsweise CBR2 der Maus), die, wie hCBR4, als mitochondriale Proteine identifiziert wurden [128] [145].

Wenngleich somit die Lokalisation von hCBR4 in den Mitochondrien einen tatsächlichen Carbonylreduktase-Charakter des Enzyms nicht ausschließt, so bleibt an dieser Stelle festzuhalten, daß neben den erheblichen Sequenzabweichungen zu hCBR1 und hCBR3 nun auch ein Zielkompartiment ermittelt wurde, das nicht dem der beiden anderen humanen Carbonylreduktasen entspricht. Es stellte sich die Frage welcher Abschnitt des hCBR4-Proteins den Unterschied macht, welches Segment für diese abweichende Verteilung in der Zelle verantwortlich ist. Durch die Generierung von trunkierten Fusionsproteinen ist es gelungen, einen Aminosäurebereich am N-Terminus zu identifizieren (AS 1-59), in dem die benötigte Information für den Transport ins Zielorganell hinterlegt ist (vergleiche Abbildung 3.4).

Die Verifizierung der aminoständigen Reste als Signalsequenz-tragendes Element entspricht im



**Abbildung 3.4:** Signalhypothese zur Translokation des SDR-Kandidaten hCBR4 in die Mitochondrien. Die benötigte Information für den Transport ins Zielorganell ist in einem Sequenzabschnitt am N-Terminus (S, innerhalb der ersten 59 Aminosäuren) hinterlegt.

Grundsatz dem gängigen Modell der Zielsteuerung in die Mitochondrien. Dennoch ist schwer vorstellbar, daß hCBR4 dem konservativen Mechanismus, beschrieben für den Import von Proteinen in besagtes Kompartiment, folgt. Dieser beruht auf einem N-terminalen Signalpeptid - 15-35 AS, die eine amphipathische  $\alpha$ -Helix ausbilden -, welches nach Erfüllung seiner Aufgabe von einer Signalpeptidase entfernt wird, um ein tatsächlich funktionsfähiges Protein zu schaffen. Bei Betrachtung der Aminosäuresequenz von hCBR4 fällt auf, daß mehr oder weniger unmittelbar am N-Terminus das SDR-typische Cofaktor-Bindungsmotif TGxxxGxG lokalisiert ist, dessen Abspaltung zweifellos zu einem Funktionsverlust des Enzyms führen würde. Stattdessen scheint im Falle von hCBR4 die N-terminale und somit eindeutig essentielle Abschnitte der Rossmann-Faltung beinhaltende Signalsequenz erhalten zu bleiben, eine Beobachtung die bereits für andere Mitglieder der SDR-Proteinfamilie, beispielsweise die  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 10 [60] [56], gemacht wurde. Auf welche Art und Weise hCBR4 schließlich in sein Zielorganell gelangt, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr geklärt werden. Die posttranslationale Translokation mitochondrialer Proteine zu ihrem Bestimmungsort ist nicht zuletzt aufgrund des komplexen Aufbaus des Organells (Äußere Membran, Intermembranraum, Innere Membran, Matrix) ein kompliziertes Unterfangen und erfordert deshalb eine detaillierte Analyse. Aufgrund der Tatsache, daß es sich bei hCBR4 bewiesenermaßen um ein unlösliches Protein handelt (vergleiche 2.2.6), das durch Fusion einer Gal4-Bindungsdomäne als Volle-Länge-Protein nicht in den Hefe-Zellkern zu überführen war (vergleiche unten), kann lediglich auf eine Integration des Enzyms von Interesse, beispielweise über die zwar vage aber mehrfach vorhergesagte Transmembrandomäne zwischen den Aminosäuren 209 und 229, in eine der beiden Kompartimentmembranen geschlossen werden.

### Gewebeverteilung

Durch die Durchführung einer quantitativen RealTime-PCR konnte ein ubiquitäres Expressionsmuster von hCBR4 mit höchsten Leveln in Magen, Hypophyse und Uterus ermittelt werden. Dies deckt sich grundsätzlich mit der bereits ermittelten Gewebeverteilung von hCBR1 [59] [215] [216]. Besagtem Enzym konnte durch immunohistochemische Färbung ebenfalls eine Präsenz in allen analysierten Geweben nachgewiesen werden, hierbei zeigten sich Leber, Epidermis, Magen, Dünndarm, Niere, Nerven- und Gliazellen sowie glatte Muskelfasern als die Gewebe höchster Expression. Für hCBR3 wird ein vergleichbares Expressionsprofil vorgeschlagen, wenngleich ein weitaus geringeres Expressionslevel zu erwarten ist [127]. Aufgrund der Tatsache, daß lediglich unter Verwendung der Northern Blot-Technologie die Gewebeverteilung von hCBR4 nicht bestimmt werden konnte, muß auch für das Enzym von Interesse eine im Vergleich zu hCBR1 geringere Expression angenommen

werden. Im Falle einer tatsächlich übereinstimmenden metabolischen Funktion - diese läßt sich für hCBR4 allein aus der ubiquitären Gewebeverteilung nicht herleiten - wäre demzufolge von einer untergeordneten Rolle hCBR4s im entsprechenden Stoffwechselweg auszugehen.

### Substratspezifität

Carbonylreduktasen sind in der Lage ein breites Spektrum an Substraten zu metabolisieren. Ihr Ziel ist es dabei, die chemisch reaktive Carbonyl-Gruppe zu „entgiften“ oder zu inaktivieren. Zahlreiche Untersuchungen weisen auf eine Beteiligung der bislang charakterisierten Mitglieder der Enzymgruppe im Prostaglandin und Steroidmetabolismus hin [53] [113] [212]. Nicht physiologisch hohe  $K_m$ - und niedrige Turnover-Werte in einigen Geweben geben allerdings Grund zur Annahme, daß es sich bei den besagten Stoffklassen nicht um die tatsächlichen endogenen Substrate handelt [178] [214]. Wermuth zeigte, daß Chinone, abgeleitet aus polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffverbindungen, deutlich bessere Substrate darstellen als Prostaglandine und Steroide [214].

Basierend auf diesem Wissen wurde die Spezifität hCBR4s in erster Linie für eine Auswahl an steroidogenen Substanzen, Prostaglandinen sowie Chinonen bestimmt. Das Enzym von Interesse zeigte keinerlei Aktivität gegenüber den getesteten Steroiden, eine Beteiligung am Steroidstoffwechsel kann somit eindeutig ausgeschlossen werden. Auch gegenüber dem Modellchinon Menadion, das sowohl von hCBR1 als auch von hCBR3 in beträchtlichem Maße umgesetzt wird, offenbarte hCBR4 keinerlei katalytisches Potential, was aufgrund des repräsentativen Charakters der in den Assay eingesetzten Verbindung eine Metabolisierung von Chinonen mehr als unwahrscheinlich macht. In den durchgeführten Messungen konnte lediglich ein Umsatz von Prostaglandin  $E_2$  detektiert werden. Wenngleich dieser in einem durchaus physiologischen Maßstab nachzuweisen war, geben einige Aspekte Anlaß, die aufgedeckte Spezifität mit Skepsis zu beurteilen. Zunächst muß festgehalten werden, daß die Umsetzung von Prostaglandin  $E_2$  trotz zunächst mehrmaliger Verifizierung im UV-basierten HPLC-System nach Verwendung eines Tritium-markierten Substrats nicht mehr zu reproduzieren war. Darüberhinaus ist es schlußendlich nicht gelungen, das aus der Reaktion hervorgegangene Produkt eindeutig zu identifizieren und somit die katalytische Reaktion klar einzuordnen. Die bislang durchgeführten *in vitro*-Assays blieben in Konsequenz den endgültigen Beweis für eine Aktivität hCBR4s gegenüber Prostaglandin  $E_2$  schuldig. Sollte sich ein katalytisches Potential in weiterführenden Studien bestätigen lassen, so ist nichts desto trotz die biologische Relevanz der Katalyse in Frage zu stellen. Das aufgrund einer möglichen Prostaglandin  $E_2$ -9-Ketoreduktase-Eigenschaft hCBR4s (nachgewiesen u.a. für hCBR1 [212]) erwartete Produkt der Reaktion Prostaglandin  $F_2\alpha$  bindet an einen spezifischen Rezeptor, der in der Plasma-Membran verankert ist [71] [173]. Aufgrund der nachgewiesenen subzellulären Lokalisation des Enzyms von Interesse in den Mitochondrien erscheint eine entsprechende Umsetzung als äußerst unökonomisch und aus diesem Grund wenig wahrscheinlich. Ernsthaft Sinn würde eine Verbindung dieser Art lediglich dann machen, sollte die Zelle neben dem integrierten Membranrezeptor eine zusätzliche, intrazelluläre Isoform besitzen, wie sie beispielsweise dem Prostaglandin  $E_2$ -Rezeptor nachgewiesen werden konnte [72]. Die Funktion hCBR4s als 15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase (ebenfalls nachgewiesen für hCBR1 [212]) zur Inaktivierung des potenten Prostaglandin  $E_2$  - das Produkt wäre 13,14-Dihydro-15-Ketoprostaglandin  $E_2$  - ist aufgrund des im *in vitro*-Assay zugegebenen Cofaktor NADPH ohnehin auszuschließen.

### Protein-Protein-Wechselwirkungen

Dem zu charakterisierenden SDR-Kandidaten hCBR4 konnten durch die Durchführung zweier Yeast-Two-Hybrid-Screenings im Rahmen vorliegender Arbeit keine Interaktionen nachgewiesen werden. Dennoch ist nicht auszuschließen, daß das Enzym von Interesse seine Aufgabe in der Zelle durch das Zusammenwirken mit anderen Proteinen verrichtet. Das Scheitern der Experimente muß vielmehr mit dem gewählten Versuchsdesign in Verbindung gebracht werden. Zahlreiche Anhaltspunkte deuten auf eine Membranständigkeit des Enzyms hCBR4 hin, der Einsatz lediglich des Volle-Länge-Proteins im Rahmen der Screenings verhinderte demzufolge aller Voraussicht nach das für die Verifizierung von Wechselwirkungen unter Verwendung des besagten Systems essentielle Eintreten des Enzyms in den Zellkern der Hefe. Um der aufgetretenen Problematik Abhilfe zu schaffen, wäre ein erneutes Screening mit trunkierten, potentielle Transmembrandomänen ausschließenden hCBR4-Fragmenten oder die Anwendung neuer, alternativer Assays, die nicht mehr von der Translokation von Beute und Köder in den Nukleus abhängig sind und somit auch die Interaktionen von membranintegrierten bzw. membran-assoziierten Proteinen erlauben, denkbar. Nachdem zwischenzeitlich eine Beteiligung des SDR-Kandidaten am Prostaglandin-Metabolismus in Erwägung gezogen wurde, erfolgte ergänzend zu den Yeast-Two-Hybrid-Screenings eine spezifische Überprüfung der Wechselwirkung von hCBR4 mit der nachgewiesenermaßen beteiligten Prostaglandin E-Synthase durch Coimmunopräzipitation. Die erhoffte Interaktion konnte nicht verifiziert werden, ein weiteres Indiz dafür, daß hCBR4 in der Metabolisierung von Prostaglandin E<sub>2</sub> keine Rolle spielt.

### Metabolischer Kontext

Carbonylreduktasen sind laut Definition alle Enzyme, die in der Lage sind Carbonylgruppen zu reduzieren. In der Nomenklatur wird der Begriff der Carbonylreduktase allerdings deutlich enger gefasst. Als Carbonylreduktase werden lediglich diejenigen Enzyme bezeichnet, die zum einen Mitglieder der SDR-Proteinfamilie sind - also keine Aldo-Keto-Reduktasen beispielsweise -, zum anderen dabei aber nicht der Enzymgruppe der Hydroxysteroiddehydrogenasen angehören [213]. Somit konnten im Menschen bislang lediglich zwei entsprechende Enzyme, die Carbonylreduktasen des Typs 1 (hCBR1) und 3 (hCBR3), identifiziert und eingehend charakterisiert werden. Die Sequenzierung des humanen Genoms offenbarte die Existenz einer dritten humanen Isoform, der Carbonylreduktase des Typs 4 (hCBR4), deren durch die Namensgebung abzuleitende Verwandtschaft zu hCBR1 und hCBR3, aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse mehr als in Frage zu stellen ist. Abgesehen von den gravierenden Sequenzunterschieden ist auch ein gemeinsames Substratspektrum der verglichenen Enzyme nahezu auszuschließen, eine entscheidende Bedeutung hCBR4s im Steroid- und Prostaglandin-Metabolismus oder eine Beteiligung an der Chinon-Verwertung erscheint nach den gewonnenen Erkenntnissen mehr als unwahrscheinlich. Aufgrund seiner Lokalisation in den Mitochondrien ist dagegen für hCBR4 eine Rolle im Fettsäurestoffwechsel denkbar. Beispielsweise wäre eine Metabolisierung von endogenen Carbonyl-Verbindungen, die aus der Lipid-Peroxidation hervorgehen oder von fettartigen Aldehyden möglich, wie sie bereits für die tetrameren mitochondrialen Carbonylreduktasen, isoliert aus der Lunge diverser Spezies, vorgeschlagen wurde [144]. Wenngleich die im Rahmen vorliegender Arbeit durchgeführte Charakterisierung nicht endgültig Aufschluß über die tatsächliche Funktion der humanen

Carbonylreduktase des Typs 4 geben konnte, so ist es gelungen, einen bedeutenden Grundstein für die Verifizierung der metabolischen Bedeutung des Enzyms zu legen. Ob die Annotation als Carbonylreduktase, die zweifellos eine funktionelle Verwandtschaft zu hCBR1 und hCBR3 impliziert, schließlich eine glückliche ist, wird erst nach weiterführenden Studien zu bewerten sein.

### 3.3.2 humanes DHRS1 - das SDR-Enzym mit unbekannter Funktion

Der humane Kandidat „dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1“ (hDHRS1) wurde ebenfalls im Rahmen der Doktorarbeit von Frau Dr. Brigitte Keller [102] identifiziert und floß für eine umfassende Charakterisierung, ebenso wie hCBR4, in vorliegende Arbeit ein. Zu Beginn der Untersuchungen war neben der Beschreibung seiner Entdeckung durch „large-scale“-Sequenzierung lediglich ein Expressionprofil veröffentlicht, das sich allerdings auf acht analysierte Gewebe beschränkte [218].

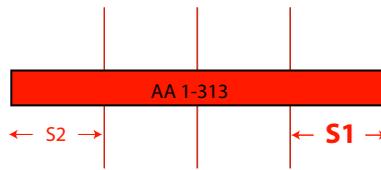
#### Phylogenie

Die beiden unabhängig voneinander kalkulierten Stammbäume zur Ermittlung von Verwandtschaftsverhältnissen des Kandidaten hDHRS1 sind ein Beispiel dafür, daß phylogenetische Analysen im Zuge einer Proteincharakterisierung nicht immer von erheblichem Nutzen sind. Neben verschiedenen Homologen des Vertebraten-Unterstammes konnten lediglich uncharakterisierte Proteine in unmittelbarer Nachbarschaft identifiziert werden. Als einzig wertvolle Information ist der beträchtliche Grad an Konservierung zu beurteilen, der aus dem Vergleich der Aminosäuresequenzen des hDHRS1-Clusters hervorgeht. Aus der ermittelten, hohen Sequenzidentität ist eine essentielle Rolle des Proteins von Interesse im Metabolismus der Wirbeltiere abzuleiten.

#### Subzelluläre Lokalisation und Proteintopologie

Durch die Expression diverser hDHRS1-Fusionsproteine konnte dem zu charakterisierenden Mitglied der SDR-Proteinfamilie eindeutig eine subzelluläre Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen werden. Auffällig in diesem Zusammenhang ist, daß im Gegensatz zu den Beobachtungen hinsichtlich hCBR4 (siehe oben) keinerlei Abhängigkeit der Proteinverteilung von der Position der verwendeten Fusion festzustellen war, ein frei zugänglicher Amino- oder Carboxy-Terminus scheint demnach nicht für die korrekte Translokation des Proteins von Interesse ins Zielkompartiment essentiell zu sein. Nichtsdestotrotz konnte in durchgeführten „Fine mapping“-Experimenten (Generierung zahlreicher trunkierter hDHRS1-Varianten) die Bedeutung der beiden Termini für den ordnungsgemäßen Transport des Proteins von Interesse in das Endoplasmatische Retikulum aufgedeckt werden. Aufgrund der jeweils für die unterschiedlichen Proteinfragmente ermittelten Zellverteilungen scheint hDHRS1 über ein schwaches Lokalisationssignal am N-Terminus (innerhalb der ersten 78 Aminosäuren) und ein weiteres, deutlich stärkeres, am C-Terminus (innerhalb der Aminosäuren 236 und 313) zu verfügen (vergleiche Abbildung 3.5)

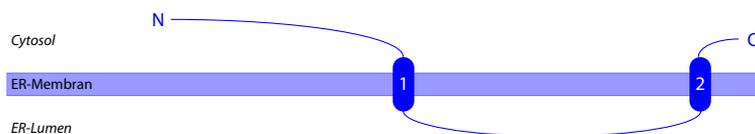
Die Beobachtung, daß lediglich die Präsenz beider Proteinabschnitte, in diesem Fall mit einem besonderen Einfluß des C-Terminus - die Verteilung des Enzyms von Interesse in das Endoplasmatische Retikulum gewährleistet, ist dahingehend überraschend, da der vorgeschlagene Translokationsmechanismus nicht mit dem allgemein gültigen übereinstimmt. Dieser beruht auf lediglich einer Signal- oder Signalankersequenz am N-terminalen Ende des zu leitenden Proteins, die etwa 16-36



**Abbildung 3.5:** Signalhypothese zur Translokation des SDR-Kandidaten hDHRS1 in das Endoplasmatische Retikulum. Lediglich das Zusammenwirken eines starken Signals am C-Terminus (S1, innerhalb der Aminosäuren 236 und 313) und eines schwächeren am N-Terminus (S2, innerhalb der ersten 78 Aminosäuren) gewährleistet den ordnungsgemäßen Transport des Proteins in das Zielkompartiment.

Aminosäuren lang ist und auf der Lumenseite des ER von einer Signalpeptidase abgespalten wird. Das aminoterminal Signal des hDHRS1 ist mit diesem nicht gleichzusetzen, da bereits die Aminosäure 13 einen essentiellen Bestandteil der SDR-typischen Cofaktor-Bindungsstelle TGxxxGxG repräsentiert und eine Abspaltung in Konsequenz eine Inaktivität des Enzyms zur Folge hätte. Lediglich im Falle des C-terminalen Signals wäre eine derartige Modifikation vorstellbar, da das Carboxyende von hDHRS1 in keinerlei SDR-Strukturmotiv einbezogen ist. Wenngleich die durchgeführten Experimente keinen Aufschluß über den genauen Ablauf des Transports des Proteins von Interesse in das Endoplasmatische Retikulum geben konnten, so ist dennoch festzustellen, daß die Translokation einem Mechanismus folgt, der bislang unbekannt ist. Eine interne Signalsequenz wie sie für einige Proteine des ER beschrieben wurde, ist für hDHRS1 ebenfalls auszuschließen, da in diesem Fall der Verlust von C- und N-Terminus, anders als beobachtet, keinerlei Einfluß auf die Translokation in das Zielkompartiment hat.

Hinsichtlich des genauen Aufenthaltsortes des zu untersuchenden SDR-Enzyms im Zellorganell wird aufgrund der schlechten Löslichkeit hDHRS1 - diese offenbarte sich im Zuge der Versuche seiner Aufreinigung - eine Integration in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums vermutet. Unter Einbeziehung der weitestgehend übereinstimmenden bioinformatischen Vorhersagen wird in Abbildung 3.6 ein Modell vorgeschlagen, das aufgrund der Präsenz zweier Transmembranhelices sowohl das N- als auch das C-terminale Ende von hDHRS1 dem Cytosol zugerichtet sieht.



**Abbildung 3.6:** Schematische Darstellung einer möglichen Membranintegration von hDHRS1. Das abgebildete Modell basiert auf den Vorhersagen der Server TMpred und TopPred. Potentielle Transmembranhelices sind mit 1 (AS 137-159) und 2 (AS 275-299) bezeichnet, sie durchqueren die Membran des Endoplasmatischen Retikulums.

Im Zuge der Identifizierung des SDR-Kandidaten hDHRS1 als Protein des Endoplasmatischen Retikulums war mitunter eine vom Expressionsgrad des Enzyms abhängige signifikante Veränderung der Mitochondrien-Verteilung zu beobachten. Zunächst war als Ursache für den drastischen Effekt eine möglicherweise proapoptotische Wirkung hDHRS1 in Betracht gezogen worden. Der

programmierte Zelltod (Apoptose) schien eine schlüssige Erklärung für das aufgetretene Phänomen zu sein, da er bekanntermaßen von zahlreichen morphologischen Veränderungen der Zelle, u.a. auch der Kondensation und dem Anschwellen der Mitochondrien, begleitet ist [98]. Nach Einsatz zweier unabhängiger Zellkultur-Assays mußte von der aufgestellten Theorie allerdings ebenso abgesehen werden wie von einem enzymatischen Ursprung der verifizierten Organell-Abnormalitäten. Letzteres war durch die Generierung eines vermeintlich inaktiven hDHRS1-Enzyms - das zentrale, polare Tyrosin der katalytischen Triade wurde gemäß hHSDL1 gegen ein unpolares Phenylalanin ausgetauscht - auszuschließen, da dessen Expression ebenfalls eine veränderte Verteilung der Mitochondrien nach sich zog. Wenngleich bis heute aufgrund eines fehlgeschlagenen Experiments kein eindeutiger Hinweis erbracht werden konnte, so erscheint auch die Anhäufung von Reaktiven Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS) als Grund für die offensichtliche Veränderung in der Mitochondrienverteilung in Frage zu kommen. Weiter ist vorstellbar, daß die anomale Distribution der Mitochondrien auf einen, durch die Expression von hDHRS1 bedingten, unausgeglichenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt in der Zelle zurückzuführen ist. Zahlreiche Studien offenbarten eine Koordination der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwirkung zwischen ER und Mitochondrien [24] [220]. Das ER ist der bedeutendste intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher und die regulierte Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus besagtem Organell ist essenziell für die zelluläre Signalgebung. Es wird vorgeschlagen, daß sich zur Erleichterung der Vermittlung von Signalen die Mitochondrien an Orten in der Zelle lokalisieren, an denen  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER freigesetzt wird [122]. Oftmals zeigt sich dies in einer Konzentrierung der Mitochondrien, wie auch des Inositol-1,4,5-Triphosphat-Rezeptors ( $\text{IP}_3\text{R}$ , ligandenaktivierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal in der Membran des ER) - um den Zellkern [88]. Ob weiterführende Experimente in die eine oder andere Richtung schlußendlich die beobachteten Organell-Anomalien erklären können oder ein bislang völlig außer Acht gelassener Aspekt für die veränderte Verteilung der Mitochondrien in der Zelle verantwortlich ist, bleibt abzuwarten.

### Gewebeverteilung

Dem SDR-Kandidaten hDHRS1 konnte im Rahmen der Untersuchungen zur Gewebeverteilung neben einer schwachen ubiquitären Expression ein hohes Level an mRNA in den Geweben Dünndarm, Kolon und Milz nachgewiesen werden. Ergänzt man zur Erstellung eines umfassenderen Expressionsprofils die Ergebnisse des durch Wu et al. veröffentlichten Northern Blots [218], so zeigt hDHRS1 die stärkste Expression in den Geweben Dünndarm, Herz, Kolon, Leber und Milz. Da der Großteil dieser Gewebe entscheidend am Lipidmetabolismus beteiligt ist, erlaubt ihre Identifizierung als Ort der höchsten mRNA-Präsenz, eine Beteiligung des Enzyms von Interesse im entsprechenden Stoffwechsel zu vermuten. Generell ist hDHRS1 aber nach der Zusammenfassung beider Analysen eine allgegenwärtige Verteilung zu bescheinigen, in der auch beispielsweise endokrine Gewebe wie Pankreas und Plazenta geringfügig in Erscheinung treten.

Abgesehen von der erläuterten Gewebeverteilung offenbarte das durchgeführte Experiment mit dem Nachweis unterschiedlich langer Transkripte einen weiteren interessanten Aspekt. Auch diese Beobachtung war bereits von Wu et al. dokumentiert worden und es wird wiederum nach Vergleich der beiden durchgeführten Analysen ersichtlich, daß sich beide Transkripte (etwa 1,1 kb und 1,5 kb) grundlegend in ihrer Gewebeverteilung unterscheiden (vergleiche Tabelle 3.1). Aus dieser Beobachtung ist unter Umständen eine Multifunktionalität des Enzyms von Interesse abzuleiten, das gewebe- und womöglich auch lokalisationspezifisch seine Aufgabe in der Zelle erfüllt.

**Tabelle 3.1:** Zusammenfassung der hDHRS1-Transkriptverteilung über die Gewebe

Transkript	Gewebeverteilung
1,1 kb	Dünndarm, Herz, Kolon (Hoden, Leber, Niere, Ovarium, Pankreas, Plazenta, Prostata, Skelettmuskel)
1,5 kb	Leber, Milz (Herz, Niere, Pankreas, Plazenta, Prostata, Skelettmuskel)

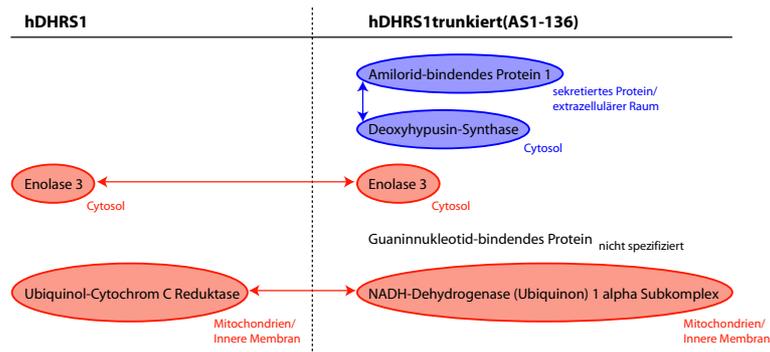
### Substratspezifität

Von allen in vorliegender Arbeit zu charakterisierenden Proteinen wird am Beispiel des Kandidaten hDHRS1 am stärksten deutlich, daß die Bestimmung der Substratspezifität der Mitglieder der SDR-Proteinfamilie ein schwieriges Unterfangen ist und oftmals der Suche nach der berühmten Nadel im Heuhaufen gleicht. Ohne wichtige Hinweise aus der vorhergehenden phylogenetischen Analyse oder einem eindeutigen Expressionsprofil wurden in den durchgeführten *in vivo*- und *in vitro*-Assays zahlreiche Substanzklassen, die zum einen interessant erschienen und zudem leicht verfügbar waren, auf einen Umsatz durch hDHRS1 überprüft. Bedauerlicherweise zeigte der Kandidat, abgesehen von einem verschwindend geringen katalytischen Potential gegenüber dem Modellchinon Menadion, keinerlei enzymatische Aktivität. Aufgrund der Überprüfung einer repräsentativen Auswahl an Androgenen, Estrogenen und Glucocorticoiden kann zumindest eine Beteiligung des Enzyms von Interesse am Steroidmetabolismus mit ziemlicher Sicherheit ausgeschlossen werden. Auch eine Rolle in der Verstoffwechslung von Prostaglandinen erscheint aufgrund der erzielten Ergebnisse eher unwahrscheinlich. Die nachgewiesene Umsetzung von Menadion ist dagegen kein entscheidender Fingerzeig in Richtung Substratspezifität, da nach Aussage von Herrn Dr. Wermuth (persönliches Gespräch) eine Vielzahl an SDR-Proteinen in der Lage sind, das besagte Modellchinon zu konvertieren. Mit Coenzym Q1, in den Assay einbezogen aufgrund der Ergebnisse aus den Studien zur Identifizierung von Interaktionspartnern, konnte kein tatsächliches Chinon-Substrat des Enzyms hDHRS1 identifiziert werden. Ebenso wurden mit Acetoacetyl-CoA und Hydroxybutyryl-CoA nicht die treffenden Vertreter des Lipidstoffwechsels ausgewählt. Da die Messung von lediglich zwei CoA-konjugierten Fettsäuren allerdings nicht als repräsentativ für die Klasse der Lipide eingeschätzt werden kann, erscheint weiter eine Beteiligung am entsprechenden Metabolismus denkbar. Vielleicht ist es möglich in naher Zukunft anhand der kürzlich von der Arbeitsgruppe um Dr. Udo Oppermann in der PDB-Datenbank veröffentlichten Kristallstruktur (PDB-ID 2qq5) einen Anhaltspunkt auf das natürliche Substrat von hDHRS1 zu gewinnen.

### Protein-Protein-Wechselwirkungen

Durch die Durchführung von Yeast-Two-Hybrid-Screenings unter Einsatz dreier verschiedener Köderproteine ist es gelungen, einige vermeintliche Wechselwirkungspartner von hDHRS1 zu identifizieren. Auffällig in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, daß lediglich das Volle-Länge-Protein hDHRS1 und die verkürzte Variante hDHRS1trunkiert(AS1-136) Interaktionen offenbarten, nicht aber hDHRS1trunkiert(AS156-274), der vermeintlich nicht im Cytosol sondern im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums befindliche Abschnitt des Proteins von Interesse. Die gemachte Be-

obachtung unterstützt somit die in Abbildung 3.6 vorgeschlagene Orientierung hDHRS1s in der Kompartimentmembran. Des weiteren ist aus den Ergebnissen der beiden erfolgreichen Screenings ersichtlich, daß sich unter den mit unterschiedlichen Ködern ermittelten Interaktionspartnern Proteine befinden, die mehrfach identifiziert wurden oder denen in der Vergangenheit eine funktionelle Verbindung nachgewiesen werden konnte (vergleiche Abbildung 3.7). Diese Feststellung erhöht zweifellos die Wahrscheinlichkeit einer tatsächlichen physiologischen Relevanz der entdeckten und im GST-Pulldown-Assay verifizierten Wechselwirkungen.



**Abbildung 3.7:** Zusammenfassung der verifizierten Wechselwirkungspartner des SDR-Kandidaten hDHRS1. Interagierende Proteine, die unter Einsatz eines Köderproteins mehrfach identifiziert wurden oder eine funktionelle Verbindung aufweisen sind blau gekennzeichnet, Interaktionspartner, die aus unabhängigen Screenings hervorgehen und eine entsprechende Art der Übereinstimmung zeigen sind rot markiert. Falls bekannt sind zusätzlich die jeweiligen subzellulären Lokalisationen vermerkt.

Die identifizierten Interaktionspartner Amilorid-bindendes Protein 1 (ABP1) und Deoxyhypusin-Synthase werden beide mit dem Wachstumsfaktor Spermidin in Verbindung gebracht. Während ABP1 als Diamino-Oxidase an der generellen Degradierung von Polyaminen wie Putrescin, Histamin, Spermin und auch Spermidin beteiligt ist [182], so katalysiert die Deoxyhypusin-Synthase die oxidative Spaltung von Spermidin und den darauffolgenden Transfer des Butylamin-Restes auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines spezifischen Lysin-Restes des eIF-5A-Vorläuferproteins zur Bildung eines intermediären Deoxyhypusin-Restes [157] [158]. Wenngleich besagte Prozesse im weitesten Sinne der Biosynthese der Aminosäuren zuzuordnen sind und auch SDR-Proteine hierbei eine Rolle spielen können, scheint aber im Falle von Spermidin eine Beteiligung von hDHRS1 als Dehydrogenase bzw. Reduktase aufgrund fehlender Keto- oder Hydroxygruppen in besagter Verbindung nicht schlüssig. Die in beiden Screenings unabhängig identifizierte Enolase 3 wird als Enzym der Glykolyse beschrieben. Nach heutiger Erkenntnis katalysiert sie die reversible Umsetzung von 2-Phospho-D-glycerat zu Phosphoenolpyruvat, also den vorletzten Schritt des energiegewinnenden Abbaus der Glucose zu Pyruvat. Da auch Mitglieder der SDR-Proteinfamilie in den Metabolismus der Zucker involviert sind - als exemplarischer Vertreter sei hier lediglich die humane UDP-Galaktose-Epimerase genannt - klingt die nachgewiesene Wechselwirkung zwischen dem cytosolischen Protein und hDHRS1 zunächst sehr vielversprechend, nach Vergleich der jeweiligen Expressionmuster muß die biologische Relevanz der Interaktion allerdings in Frage gestellt werden. Laut Literatur scheint die Enolase 3 ihre Funktion hauptsächlich im Skelettmuskel zu erfüllen, hDHRS1 dagegen zeigt eine weitestgehend ubiquitäre Gewebeverteilung mit höchstem Expressionslevel in Lipid-metabolisierendem

Gewebe. Lediglich das  $\alpha$ - $\alpha$ -Homodimer der Enolase (Enolase 1) wird in den meisten adulten Geweben, einschließlich Leber, Gehirn, Niere, Milz und Fettgewebe, exprimiert [131]. Sollte sich in weiterführenden Studien eine Interaktion von hDHRS1 speziell mit der  $\alpha$ -Untereinheit der Enolase nachweisen lassen, so erscheint auch eine Beteiligung des Enzyms von Interesse am Zuckerstoffwechsel möglich.

Ebenfalls unter Einsatz zweier unterschiedlicher Köderproteine identifizierte Wechselwirkungspartner sind der NADH-Dehydrogenase (Ubiquinon) 1 alpha Subkomplex und die Ubiquinol-Cytochrom C Reduktase, Enzyme, die eng mit der Atmungskette verknüpft sind. Aufgrund ihrer subzellulären Lokalisation in der Inneren Mitochondrienmembran erscheint auch in diesem Fall eine Interaktion mit dem im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierten hDHRS1 physiologisch irrelevant. Wenn gleich es sich bei den detektierten Proteinen vermutlich also um falsch-positive Interaktoren handelt (vergleiche wiederum <http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/InteractionTrapInWork.html>), stellt sich die Frage, ob nicht die verifizierten Interaktionen in irgendeiner Art und Weise für die nachweislich drastische Veränderung der Mitochondrienverteilung nach Überexpression des Kandidaten hDHRS1 verantwortlich sein könnten. Um hierauf eine klare Antwort zu finden, sind in der Folge weitere umfassende Untersuchungen hinsichtlich der beschriebenen Mitochondrienalteration von Nöten.

### **Metabolischer Kontext**

Die Ergebnisse der Untersuchungen des Kandidaten hDHRS1 ausschweifend zu diskutieren und in einen schlüssigen metabolischen Zusammenhang zu bringen, stellt eine besonders große Herausforderung dar. Anders als bei den übrigen zu untersuchenden Mitgliedern der SDR-Proteinfamilie waren an seine experimentelle Charakterisierung keinerlei Erwartungen geknüpft, weder seine Benennung noch die mittels phylogenetischer Analyse offenbarten Verwandtschaftsverhältnisse ließen im Vorhinein eine potentielle Rolle im Stoffwechsel erahnen. Trotz der unterschiedlichsten Herangehensweisen ist es im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht gelungen, die tatsächliche Funktion von hDHRS1 endgültig zu bestimmen. Fest steht, darauf weist sowohl die hohe Sequenzidentität unter den homologen Wirbeltiersequenzen als auch das weitestgehend ubiquitäre Expressionsmuster hin, daß das Enzym von Interesse an einem oder aufgrund der zwei nachgewiesenen Transkripte sogar an mehreren essentiellen zellulären Prozessen beteiligt ist. Der Steroidmetabolismus kann diesbezüglich mit ziemlicher Sicherheit ausgeschlossen werden, dagegen erscheint aufgrund der erzielten Ergebnisse eine Mitwirkung am Lipid- oder Zuckermetabolismus möglich. Von besonderem Interesse ist hierbei die Verknüpfung des in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisierten hDHRS1 mit gravierenden Effekten in einem anderen Zellkompartiment, den Mitochondrien. Unter Einbeziehung aller im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse scheint diesbezüglich eine Beeinflussung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes in der Zelle durch hDHRS1 am wahrscheinlichsten. Dies könnte sowohl auf der Ebene des Zuckerstoffwechsels (als Interaktionspartner wurde Enolase 3 identifiziert) als auch des Phospholipidmetabolismus (die Untersuchungen des metabolischen Umfelds offenbarten Veränderungen in Inositolphosphat-Stoffwechsel-spezifischen, chemischen Verbindungen) geschehen und eine gesteigerte Bindung von Inositol-1,4,5-trisphosphat an seinen in der ER-Membran verankerten Rezeptor ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) zur Folge haben. In Konsequenz wird vermehrt  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER freigesetzt, die Mitochondrien konzentrieren sich um den Ort der Freisetzung (Konzentrierung um den Zellkern) und nutzen das  $\text{Ca}^{2+}$  beispielsweise als Stimulus für

die Oxidative Phosphorylierung zur Erhöhung der Atmungskettenaktivität und demzufolge der ATP-Produktion. Um die erzielten Ergebnisse allerdings in einen eindeutigen zellulären Kontext stellen zu können, ist die Ermittlung des physiologischen Substrats des Enzyms von Interesse als entscheidende Grundlage unentbehrlich.

### **3.3.3 humanes DHRS6 - eine neue, cytosolische Typ 2 R- $\beta$ -Hydroxybutyratdehydrogenase**

Das bislang gänzlich uncharakterisierte Mitglied der SDR-Proteinfamilie hDHRS6 wurde aufgrund einer Kooperation mit Herrn Dr. Udo Oppermann vom Structural Genomics Consortium (SGC) in Oxford/UK in diese Doktorarbeit einbezogen. Neben der in der NCBI-Datenbank hinterlegten Nukleotid- und Aminosäuresequenz waren zu Beginn der Untersuchungen keinerlei Informationen bezüglich des Kandidaten verfügbar.

#### **Phylogenie**

In zwei unabhängig voneinander durchgeführten, bioinformatischen Analysen wurden zunächst zahlreiche DHRS6-Homologe der unterschiedlichsten Spezies identifiziert, die untereinander einen hohen Grad an Sequenzidentität aufweisen und somit auf eine entscheidende Bedeutung des Enzyms von Interesse im Metabolismus schließen lassen. Des weiteren offenbarten die phylogenetischen Stammbäume - sowohl der in dieser Arbeit kalkulierte, als auch der des Structural Genomics Consortium - eine starke Sequenzähnlichkeit des DHRS6-Clusters zu bakteriellen Hydroxybutyratdehydrogenasen. Die vorliegende Arbeit beziffert diese auf 34 - 36 %, das SGC fasst die Identitäten geringfügig weiter und bestimmte sie in einem Bereich von 30 - 40 %, ein Level das in jedem Fall höher ist als die bislang für jedes andere SDR-Paralog ermittelten (30 %). Bereits diese Erkenntnisse zu Beginn der Studien deuteten auf eine mögliche Funktion von hDHRS6 (bzw. seinen Homologen) als Hydroxybutyratdehydrogenase hin.

#### **Subzelluläre Lokalisation**

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation konnte hDHRS6 eindeutig als cytosolisches Protein identifiziert werden. Hinsichtlich der phylogenetisch prognostizierten, metabolischen Rolle des Enzyms von Interesse schien dies zunächst im Widerspruch zu stehen, da alle charakterisierten Säugetier- bzw. Vertebraten-BDHs bis dato lediglich als mitochondriale Proteine diskutiert wurden [31] [125]. Aufgrund der Tatsache, daß weitere Publikationen allerdings zwingende Beweise für die Existenz einer Typ 2 BDH mit cytosolischer Verteilung lieferten [105] [112], wurde speziell die aufgestellte Hypothese in ergänzenden Studien weiterverfolgt.

#### **Substratspezifität und Kristallstruktur**

Die umfassende Charakterisierung von hDHRS6 erfolgte größtenteils durch am Structural Genomics Consortium in Oxford durchgeführte Untersuchungen. Ein Substrat-Screening unter Verwendung eines Fluoreszenz-basierten Assays [70] [117] mit zahlreichen Hydroxybutyryl-Derivaten offenbarte eine katalytische Aktivität des Enzyms gegenüber R- $\beta$ -Hydroxybutyrat allerdings nicht

gegenüber dessen S-Enantiomer, R- oder S-Hydroxybutyryl-CoA-Derivaten oder S- oder R-Hydroxyisobutyrat. Für die  $\text{NAD}^+$ -abhängige Umwandlung von R- $\beta$ -Hydroxybutyrat zu Acetoacetat wurde ein  $K_m$ -Wert von ungefähr 10 mM bestimmt, dies entspricht in etwa dem Plasma-Level zirkulierender Ketonkörper in Situationen des Hungerns oder der Ketoazidose. Der Gruppe um Dr. Udo Oppermann ist es weiter gelungen, das Enzym von Interesse zu kristallisieren und in Folge dessen seine Struktur zu bestimmen. Humanes DHRS6 zeigte dabei eine tetramerische Organisation mit den SDR-typischen Faltungsmustern. Docking-Analysen von R- $\beta$ -Hydroxybutyrat im aktiven Zentrum offenbarten ein mit den Experimenten übereinstimmendes Modell der Carboxylat-Bindung und eine katalytisch kompetente Orientierung. Wenngleich die Möglichkeit besteht, daß hinsichtlich der Spezifität aufgrund der engen Auswahl an überprüften Verbindungen mögliche natürliche Substrate übersehen wurden, so offenbarte die Begutachtung des aktiven Zentrums von hDHRS6 eine äußerst kompakte Liganden-bindende Tasche, die wahrscheinlich nicht geeignet ist, längere Kettenlängen als C4 von Fettsäure-Acyl-Resten zu beherbergen. Eine bioinformatische Suche gegen die KEGG-Liganden-Datenbank beschränkte die im Zuge dessen vorstellbaren Substrate auf die ohnehin bereits getesteten. Mit R- $\beta$ -Hydroxybutyrat scheint demnach das tatsächlich physiologische Substrat identifiziert worden zu sein.

### Metabolischer Kontext

Entsprechend der gewonnenen Erkenntnisse könnte hDHRS6, wie unter Umständen auch seine identifizierten Homologen, eine signifikante Rolle in der peripheren Verwertung von R- $\beta$ -Hydroxybutyrat spielen.

Wenngleich der Vergleich der kinetischen Parameter zwischen rekombinanten mitochondrialen BDHs und hDHRS6 zeigt, daß letzteres eine in etwa 2- bis 3-fach niedrigere katalytische Spezifität gegenüber R- $\beta$ -Hydroxybutyrat aufweist [31] [64], so bestätigt der für hDHRS6 ermittelte  $K_m$ -Wert dessen Fähigkeit bei hohen Leveln an zirkulierendem R- $\beta$ -Hydroxybutyrat zu agieren, wie sie zu Zeiten des langfristigen Hungerns oder der Ketoazidose gegeben sind. Des weiteren erlaubt das hohe cytosolische Niveau an oxidiertem  $\text{NAD}^+$  eine effiziente Umsetzung in Acetoacetat, welches anschließend in die Mitochondrien eintreten und in den Zitratzyklus eingespeist werden kann. Besagte Aspekte deuten auf eine mögliche Bedeutung von hDHRS6 als „Backup“-System zur Verwertung von Hydroxybutyrat zum Energiegewinn hin, einem zellulären Prozess bei dem zweifellos die in den Mitochondrien lokalisierte Typ 1 BDH die Hauptrolle spielt. Eine weitere Bedeutung der Nutzung cytosolischer Ketonkörper ist mutmaßlich die Vor-Ort-Generierung von Acetoacetyl-CoA als Baustein zur Fettsäure- oder Sterolsynthese. Diese Spekulation wird unterstützt durch den Nachweis einer cytosolischen Acetoacetyl-Synthetase [149], die effizient Acetoacetat zu Acetoacetyl-CoA konvertiert, welches in Lipide eingebunden wird. In diesem Stoffwechselweg könnte hDHRS6 als Enzym zur Bereitstellung genügend großer Mengen an cytosolischem Acetoacetat fungieren. Im Einklang mit dieser Hypothese steht die Identifizierung von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in der Promotor-Region von hDHRS6, die bekanntermaßen am Lipidmetabolismus beteiligt sind. Entsprechend der für hDHRS6 beschriebenen Funktionen ist eine Defizienz des Enzyms möglicherweise mit Störungen der Keton-Verwertung (wie beispielsweise bei einem hyperketonischen, hypoglykämischen Zustand) oder der Fettsäure- oder Cholesterolsynthese in Verbindung zu bringen. Zur Absicherung der postulierten Rolle des Mitglieds der SDR-Proteinfamilie hDHRS6 sind sicherlich weitere Studien in zellulären Modellen von Nöten. Schlußendlich bleibt aber festzustellen, daß

nicht zuletzt die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen einen entscheidenden Beitrag zur Identifizierung einer neuen, cytosolischen Typ 2 R- $\beta$ -Hydroxybutyratdehydrogenase geleistet haben [70].

### 3.3.4 humanes HSDL1 - ein SDR-„Enzym“, ohne enzymatische Aktivität

Im Zuge ihrer umfangreichen phylogenetischen Untersuchungen hinsichtlich des evolutionären Hintergrunds der Vertebraten-Enzyme 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 3 und 12 identifizierte Frau Dr. Rebekka Mindnich die Aminosäuresequenz des humanen Proteins „hydroxysteroid dehydrogenase like 1“ (hHSDL1) als weiteren bislang uncharakterisierten Vertreter der SDR-Proteinfamilie [132]. In der Hoffnung ein weiteres Enzym mit entscheidender Bedeutung am Metabolismus identifizieren zu können, ging die Bearbeitung des bislang lediglich in einer Veröffentlichung Erwähnung findenden Proteins [83] ergänzend in vorliegende Arbeit mit ein.

#### Phylogenie und Sequenzanalyse

Die zur Ermittlung des Ursprungs und möglicher Funktionen des humanen HSDL1 durchgeführten phylogenetischen Analysen offenbarten zunächst zahlreiche stark verwandte Aminosäuresequenzen der Vertebraten in nächster Verwandtschaft. Die hohe Sequenzidentität der identifizierten Primärstrukturen, speziell unter den Säugetieren, zeigt den starken Konservierungsgrad hHSDL1s auf und deutet auf eine signifikante Bedeutung im entsprechenden Organismus hin.

Hinsichtlich einer möglichen Funktion des HSDL1-Clusters bestätigten sich die Erkenntnisse von Frau Dr. Rebekka Mindnich, das zu untersuchende Protein geht zusammen mit den 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen des Typs 3 und 12 auf den selben evolutionären Ursprung zurück. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, daß letztere zwar phylogenetisch eng verwandt sind [132], hinsichtlich ihrer Funktion allerdings nicht übereinstimmen [136]. Wengleich beide Enzyme steroidogene Substrate akzeptieren, so ist die physiologische Rolle der 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 12 eher im Fettsäuremetabolismus einzuordnen. Demnach konnte anhand der phylogenetischen Daten eine Beteiligung von hHSDL1 sowohl am Steroid- als auch am Lipidstoffwechsel in Betracht gezogen werden.

Für alle in die phylogenetischen Analysen eingeflossenen humanen HSDL1-Sequenzen wurde im Rahmen der Untersuchungen ein Aminosäureaustausch des polaren Tyrosins (Y) gegen ein unpolares Phenylalanin (F) im konservierten, für die SDR-Proteinfamilie charakteristischen katalytischen Motiv S-Y-K [96] [154] [165] identifiziert. Diese Beobachtung widerspricht der Veröffentlichung von Huang, der eine vollständig intakte katalytische Triade aufzeigt [83]. Da die Aminosäure Tyrosin 218 als katalytische Base erachtet wird, mußte die aufgedeckte Substitution bereits zu diesem frühen Zeitpunkt der Studien auf eine enzymatische Inaktivität hHSDL1 schließen lassen.

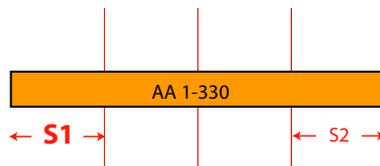
Ein multiples Alignment mit homologen Sequenzen offenbarte, daß das humane Enzym das modifizierte aktive Zentrum mit einer Vielzahl verwandter Sequenzen des vertebraten Ursprungs teilt - eingeschlossen die Vertreter der Primaten und der Nager, das Rind sowie der Zebrabärbling -, ein erster Beweis dafür, daß der Identifizierung des (S-F-K)-Motivs des hHSDL1 nicht lediglich ein Annotierungs- bzw. Sequenzierungsfehler zugrunde liegt. Letzte Zweifel dahingehend konnten durch Sequenzierungen der kodierenden Sequenz hHSDL1s, gewonnen durch Amplifizierung auf einer Vielzahl an unterschiedlichen humanen Zelllinien-cDNAs, ausgeräumt werden. Die Tatsache,

daß Sequenzen anderer Vertebraten gegen alle Erwartungen eine intakte katalytische Triade aufweisen, unterstützt die Vermutung eines evolutionär bedingten Verlusts des zentralen Tyrosin-Restes in *Homo sapiens*, *Danio rerio* und anderen.

### Subzelluläre Lokalisation und Proteintopologie

Die Studien zur subzellulären Lokalisation zeigten eine eindeutige Verteilung von hHSDL1 in den Mitochondrien, eine Beobachtung, die überraschend war, da den durch phylogenetische Analyse identifizierten Verwandten 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 3 und 12 erst kürzlich eine Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen worden war [133] [137]. Besagter Aspekt könnte auf eine von den bereits charakterisierten Enzymgruppen abweichende Funktion hHSDL1s im Organismus hindeuten.

Hinsichtlich des Transports in die Mitochondrien selbst fiel auf, daß hHSDL1 das Zielkompartiment erreichte, unabhängig davon, an welchem Terminus eine Fusion erfolgte. Wenngleich entsprechend dieser Beobachtung ein freies Amino- oder Carboxyende offensichtlich nicht für den Transport ins Zielkompartiment erforderlich ist (oder das Tag potentielle Signalsequenzen im Protein nicht ausreichend maskiert), wurde die Bedeutung der beiden Termini im Translokationsprozeß im Laufe der durchgeführten „Fine mapping“-Experimente (Generierung zahlreicher trunkierter hHSDL1-Varianten) ersichtlich. Gemäß der erzielten Ergebnisse muß von einem starken mitochondrialen Lokalisationssignal am N-Terminus (innerhalb der ersten 82 Aminosäuren) und einem zweiten, etwas schwächeren, am C-Terminus (zwischen den Aminosäuren 248 und 330) ausgegangen werden (vergleiche Abbildung 3.8)



**Abbildung 3.8:** Signalhypothese zur Translokation des SDR-Kandidaten hHSDL1 in die Mitochondrien. Lediglich das Zusammenwirken eines starken Signals am N-Terminus (S1, innerhalb der ersten 82 Aminosäuren) und eines schwächeren am C-Terminus (S2, zwischen den Aminosäuren 248 und 330) gewährleistet die ordnungsgemäße Auslieferung des Proteins in das Zielkompartiment.

Offensichtlich stellt, ähnlich wie bei hDHRS1, auch im Falle von hHSDL1 ausschließlich das Zusammenwirken beider Proteinabschnitte - mit einem vorherrschenden Einfluß des N-Terminus - die ordnungsgemäße und exklusive Verteilung hHSDL1s in das Zielorganell sicher. Ob die identifizierten Proteinbereiche lediglich Signalsequenzen beherbergen oder stattdessen tatsächliche Signalpeptide beinhalten, die nach der Translokation in die Mitochondrien abgespalten werden, konnte im Rahmen der Analyse nicht bestimmt werden. Fest steht, daß hHSDL1 sowohl am N- als auch am C-Terminus über Sequenzabschnitte verfügt, die nicht unmittelbar die SDR-typischen Struktur motive tragen. Die für die Cofaktorbindung essentielle Aminosäurefolge TGxxxGxG findet sich im Protein von Interesse (in geringfügig abgewandelter Form) erst bei Aminosäure 73 wieder. Weiter ist die Frage zu klären in welchem Bestandteil des Zellorganells hHSDL1 tatsächlich lokalisiert ist. Da sich das Protein von Interesse im Rahmen der Aufreinigungsversuche als gänzlich

unlöslich zeigte und somit als Membranprotein eingestuft wird, ist eine Integration in die Innere oder Äußere Mitochondrienmembran, beispielsweise über die vorhergesagten und als sicher geltenden Transmembrandomänen wahrscheinlich. Ein mögliches Modell der Integration, erstellt anhand der Vorhersagen der Server HMMTOP und TMPred, ist in Abbildung 3.9 ersichtlich.



**Abbildung 3.9:** Schematische Darstellung einer möglichen Membranintegration von hHSDL1. Das abgebildete Modell basiert auf den Vorhersagen der Server HMMTOP und TMPred. Potentielle Transmembranhelices sind mit 1 (AS 17-42), 2 (AS 170-194) und 3 (AS 240-262) bezeichnet, sie durchqueren die Innere bzw. Äußere Mitochondrienmembran.

### Gewebeverteilung

In einer ersten Beschreibung konnte dem SDR-Kandidaten hHSDL1 durch Northern Blot-Technologie unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Gewebe-Panels ein hohes Level an mRNA-Expression in Prostata-Gewebe nachgewiesen werden [83]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die gewonnenen Erkenntnisse ebenfalls auf Basis besagter Methode überprüft und das Expressionsprofil des SDR-Proteins um weitere humane Gewebe erweitert. Die erzielten Ergebnisse bestätigen eindrucksvoll die publizierte Gewebeverteilung. In allen analysierten Geweben konnte, trotz generell schwachem Expressionslevel, hHSDL1-mRNA detektiert werden. Als mRNA-reichste Gewebe zeigten sich Plazenta, Prostata und Ovarien. Die gemachte Beobachtung deutet auf eine Beteiligung hHSDL1s in steroidogenem Gewebe spezifischem Metabolismus hin und erscheint auch im Vergleich zu den Gewebeverteilungen der phylogenetisch verwandten  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen des Typs 3 und 12 überaus schlüssig. Während die  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 3 hauptsächlich im Hoden exprimiert wird (darüberhinaus im Gehirn, im Blut, in der Haut und in Fettgewebe) [35] [61] [63] [79] [190] zeigte die  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 12 eine generell ubiquitäre Gewebeverteilung mit vorherrschender Expression in Lipid-metabolisierendem (Leber, Herz, Niere und Skelettmuskel) und endokrinem Gewebe (Hoden, Hypophyse, Nebenniere, Pankreas und Plazenta) [118] [137] [176].

### Substratspezifität

Gemäß den Erwartungen, basierend auf der intensiven Sequenzanalyse, zeigte hHSDL1 in den durchgeführten Messungen zur Bestimmung seiner Spezifität keinerlei katalytisches Potential gegenüber den überprüften Substanzen, weder gegen die aufgrund der phylogenetischen Verwandtschaft zu den  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen des Typs 3 und 12 als wahrscheinlichste Substrate eingestuften steroidogenen Verbindungen, noch gegenüber den getesteten Chinonen, CoA-konjugierte Fettsäuren oder Prostaglandinen. Erst eine Wiederherstellung der katalytischen Triade durch Substitution des zentralen Phenylalanins gegen das SDR-typische Tyrosin in Position 218 der Aminosäuresequenz hatte eine enzymatische Aktivität gegenüber Estron und Androsteron zur Folge. Des weiteren konnte eine Reduzierung der Produktbildung verglichen zu Kontrollzellen nach

Zugabe von Cortisol beobachtet werden, die sich lediglich mit einer erlangten Bindungsfähigkeit des mutanten Proteins hHSDL1(F218Y) gegenüber dem angebotenen Substrat begründen läßt. Aufgrund seiner ausschließlichen Reduktaseeigenschaft scheint es allerdings nicht über das katalytische Potential zu verfügen, das aufgenommene Cortisol tatsächlich zu metabolisieren.

Wenngleich die gemessenen Umsatzraten weit unter der physiologischen Relevanz liegen, sind die im Rahmen der Untersuchung gewonnenen Daten ausreichend, um die enzymatische Aktivität der hHSDL1-Mutante hHSDL1(F218Y) und in Konsequenz die Inaktivität des nativen Proteins zu belegen. Eine von Herrn Dr. Udo Oppermann (Structural Genomics Consortium, Oxford/UK) in einem persönlichen Gespräch geäußerte Vermutung, das aktive Zentrum des SDR-Proteins hHSDL1 sei unter Umständen lediglich geringfügig in Richtung des C-Terminus verschoben, kann mit den erzielten Ergebnissen eindrucksvoll widerlegt werden. Durch die nachgewiesenen Übereinstimmungen im Substratspektrum mit den 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen des Typs 3 und 12 unterstreicht die generierte hHSDL1-Mutante auf der einen Seite die nahe Verwandtschaft des HSDL1-Clusters zu den besagten Oxidoreduktasen und liefert auf der anderen Seite den klaren Beweis für den bereits vermuteten Verlust der hHSDL1-Aktivität im Zuge der Evolution. Kombiniert man die gemachten Beobachtungen mit dem verifizierten Expressionsprofil, muß von einer nicht enzymatischen Rolle des nativen Proteins (sowie aller Homologen ohne intakte katalytische Triade) im Organismus ausgegangen werden.

#### **Protein-Protein-Wechselwirkungen**

Aufgrund der nachgewiesenen Inaktivität des zu charakterisierenden Mitglieds der SDR-Proteinfamilie hHSDL1 waren die Studien zur Identifizierung seiner Interaktionspartnern von besonderer Bedeutung. Unter Einsatz des Volle-Länge-Proteins sowie einer verkürzten Variante (zur Sicherstellung der Translokation des Proteins von Interesse in den Nukleus der Hefe) konnten im Yeast-Two-Hybrid-Screening zwei mögliche Wechselwirkungspartner identifiziert werden. Bei der Enoyl-CoA-Hydratase/3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (Alpha-Untereinheit des trifunktionellen Proteins) handelt es sich um ein in den Mitochondrien lokalisiertes und demnach auch von der biologischen Relevanz sehr interessantes Enzym. Es katalysiert den zweiten Schritt in der  $\beta$ -Oxidation (Umsetzung von trans-2(oder 3)-Enoyl-CoA zu 3S-3-Hydroxyacyl-CoA, reversibel) und ist demzufolge ein essentieller Bestandteil des Fettsäuremetabolismus [3] [12]. Das Map-Kinase-Phosphatase-ähnliche Protein MK-STYX wird als mögliche Pseudophosphatase beschrieben, deren Bindungstasche zumindest ausreichend konserviert ist um phosphorylierte Substrate zu binden und diese vor der Phosphorylierung durch Phosphatasen zu bewahren [121] [185] [217]. Die Expression MK-STYXs ist in Säugetiergewebe nahezu ubiquitär [191], die subzelluläre Lokalisation des Proteins ist bislang unbekannt. In einem anschließenden GST-Pulldown-Assay konnte eine Wechselwirkung zwischen hHSDL1 und letzterem bestätigt werden. Da trifunktionelle Proteine *in vitro* oder in Bakterien lediglich als Unterdomänen und nicht als vollständiges Protein - die molekulare Masse beträgt in diesem Fall mehr als 80 kDa [114] - exprimiert werden können, wird die nicht nachgewiesene Interaktion mit der Enoyl-CoA-Hydratase/3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase auf eine Beschränkung des Verifizierungssystems zurückgeführt.

### Metabolischer Kontext

Die Familie der Short-Chain-Dehydrogenasen/Reduktasen definiert sich in erster Linie durch die Präsenz von einigen wenigen konservierten Sequenzmotiven und fasst mit Oxidoreduktasen, Lyasen und Isomerasen eine große Vielzahl unterschiedlicher **Enzyme** zusammen. Trotz der eindeutig nachgewiesenen SDR-typischen Strukturmerkmale erfüllt der im Rahmen dieser Arbeit charakterisierte Kandidat hHSDL1 laut Definition ein entscheidendes Kriterium für seine Einordnung in besagte Proteinfamilie nicht: er weist keinerlei katalytische Aktivität auf. Mit seiner umfassenden Charakterisierung scheint ein Beispiel dafür gefunden worden zu sein, daß neben Proteinen, die sich durch die Katalyse chemischer Reaktionen auszeichnen, auch solche der Familie angehören, die ihre Funktion in der Zelle auf nicht enzymatische Weise erfüllen. Aufgrund der Konservierung des SDR-Mitglieds hHSDL1 über zahlreiche Spezies, die Präsenz entsprechender kodierender mRNA in den unterschiedlichsten Geweben und den Nachweis von spezifischen Wechselwirkungspartnern, kann trotz des fehlenden katalytischen Potentials von einer bedeutenden Rolle des Proteins in einem essentiellen Prozeß des Zellmetabolismus ausgegangen werden. Wenngleich eine konkrete Hypothese aufgrund der erzielten Ergebnisse nicht möglich ist, so scheint eine Beteiligung von hHSDL1 am Steroid- oder Fettsäurestoffwechsel wahrscheinlich [130].

### 3.3.5 Retinoldehydrogenasen - Die „Mutter“ der SDRs?

Es ist seit langem bekannt, daß auch Mitglieder der SDR-Proteinfamilie entscheidend am Retinoid-Metabolismus beteiligt sind [101] [146]. In der Retina beispielsweise zählen die RDHs zu den bedeutenden Elementen des Seh-Prozesses und ihre Mutationen sind nicht selten mit retinalen Erkrankungen verknüpft. Exemplarisch seien an dieser Stelle lediglich *Fundus albipunctatus* (11-cis RDH) [85] oder CSRD (childhood-onset of severe retinal dystrophy, RDH12) [89] genannt. Aus diesem Grund erschien es überaus sinnvoll, auch die in dieser Arbeit zu charakterisierenden SDR-Enzyme auf eine Aktivität gegenüber all-trans-Retinol und all-trans-Retinal zu überprüfen. Im Zuge der durchgeführten *in vitro*-Assays wurde diesbezüglich eine interessante Entdeckung gemacht. Alle getesteten Enzyme, die über ein vermeintlich intaktes, SDR-typisches aktives Zentrum (S-K-Y) verfügen (hCBR4, hDHRS1, hHSDL1(F218Y) und h17 $\beta$ -HSD 4), zeigten eine deutliche, wenn auch schwache Umwandlung von all-trans-Retinal zu all-trans-Retinol in Anwesenheit des Cofaktors NADPH. hHSDL1, das nachgewiesenermaßen inaktive Protein hingegen, wies keinen Umsatz auf. Wenngleich die Anzahl der überprüften SDR-Enzyme nicht als repräsentativ gelten kann, so läßt sich aufgrund der erzielten Ergebnisse zumindest darüber spekulieren, ob nicht alle Mitglieder der SDR-Proteinfamilie Retinoide als Substrat akzeptieren und in der Lage sind, deren Umwandlung zu katalysieren. Könnte für die aufgebrachte Theorie durch die Überprüfung einer großen Vielzahl an SDR-Enzymen ein Beweis erbracht werden, so würde dies unter Umständen auf einen Ursprung der SDR-Familie im Retinoid-Metabolismus hindeuten. Rein evolutionär wäre damit ein gemeinsamer Vorläufer denkbar, aus dem sich die große Vielfalt der SDR-Enzyme über die Jahrtausende entwickelt hat.

### 3.4 Charakterisierung der Wwox-Funktion anhand der entsprechenden Mausmutante

Zur detaillierten Aufklärung der *in vivo*-Funktion des bereits teilweise charakterisierten murinen SDR-Proteins Wwox war im Rahmen dieser Arbeit die Generierung einer entsprechenden KnockOut-Mauslinie angestrebt. Während die Wechselwirkungen der Tryptophan-reichen Domänen mit diversen Proteinen unterschiedlichster Signalkaskaden bereits im Ansatz verstanden sind und dem Protein von Interesse den Status eines neuen Vermittlers von apoptotischer Antwort oder Antwort auf Stress einbrachten, so konnten mit den SDR-typischen Strukturmotiven bislang keinerlei biologische Funktionen in Verbindung gebracht werden. Die angestrebte phänotypische Untersuchung der besagten KnockOut-Maus bezüglich Reproduktionsbiologie, Knochenaufbau oder metabolischer Parameter sollte schlußendlich in erster Linie wichtige Erkenntnisse über die Rolle des Wwox-Proteins als Short-Chain-Dehydrogenase/Reduktase im Metabolismus liefern.

Bedauerlicherweise ist es allerdings über die gesamte Dauer vorliegender Arbeit nicht gelungen, für das Wwox-Allel homozygote Mäuse in der Nachkommenschaft zu identifizieren, die hinsichtlich der genannten Aspekte mit Wildtyp-Tieren verglichen hätten werden können. Aus diesem Grund muß sich die Diskussion zum jetzigen Zeitpunkt auf das Faktum beschränken, daß die vollständige Inaktivierung des Wwox-Gens offensichtlich schon während der Embryonalentwicklung lethal zu sein scheint. Der beobachtete Umstand unterstreicht auf der einen Seite die bereits verifizierte Signifikanz des Wwox-Proteins im Organismus, ist auf der anderen Seite aber mehr als verwunderlich, da Daten aus der Untersuchung einer unabhängig generierten Wwox-KnockOut-Mauslinie hiermit nicht korrelieren. Von Aqeilan et al. unter Verwendung des Gene-Targeting-Verfahrens erzeugte, für das Wwox-Allel heterozygote Mäuse - diese waren genau wie in vorliegender Studie rein äußerlich nicht von Wildtyp-Tieren zu unterscheiden -, brachten nach Verpaarung untereinander durchaus homozygote KnockOut-Mäuse zur Welt, die erst im Alter von etwa 4 Wochen verstarben [8]. Als mögliche Ursache für die abweichenden Resultate wurden zunächst die unterschiedlichen KnockOut-Strategien in Erwägung gezogen, bei ihrer genauen Begutachtung fällt allerdings auf, daß eine embryonale Letalität, wenn überhaupt, eher bei den von Aqeilan et al. generierten Mäusen zu erwarten gewesen wäre. Während die Insertion der GeneTrap-Reporter-Kassette erst im Wwox-Intron 4-5 erfolgte und somit in den entsprechenden Mäusen ein Proteinfragment exprimiert wird, das zumindest noch die vom Exon 4 kodierten Aminosäuren mit einschließt, so wurden von Aqeilan et al. mittels Rekombination die Exons 2, 3 und 4 durch die eingefügte Reporter-Kassette ersetzt und somit ein weitaus kürzeres Protein mit noch geringerer Chance auf Funktionalität exprimiert. Ein einfaches Genotypisierungsproblem kann als Grund für den unterschiedlichen Verlauf der beiden Studien ebenfalls ausgeschlossen werden. Selbst wenn die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Genotypisierungsstrategie gegen alle Erwartungen fehlerhaft sein sollte und keine tatsächliche Unterscheidung der Genotypen erlaubt, so wären im Alter von 4 Wochen etwa 25 % der aus der Verpaarung von heterozygoten Tieren hervorgegangenen Nachkommen, also die homozygoten KnockOut-Mäuse, verstorben, eine Gegebenheit, die nicht aufgetreten ist. Abschließend bleibt zu bemerken, daß keine logische Erklärung für die unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse gefunden werden konnte. Eine Identifizierung für das Wwox-Allel homozygoter Embryonen in weiterführenden Studien wäre eine Möglichkeit der Letalität des KnockOuts weiter auf den Grund zu gehen und darüberhinaus die *in vivo*-Funktion von Wwox zu verifizieren.

### 3.5 Abschließende Worte und Ausblick

In vorliegender Dissertation wurden einige weitere humane Mitglieder der SDR-Proteinfamilie im Detail beschrieben und somit ein entscheidender Beitrag zum besseren Verständnis der metabolischen Prozesse im menschlichen Organismus geleistet. Im Rahmen der durchgeführten Studien, die sowohl bioinformatische Analysen als auch experimentelle Untersuchungen umfassten, ist die Komplexität dieses Unterfangens mehr als deutlich zum Ausdruck gekommen. Aufgrund ihrer immensen Vielseitigkeit stellt die Charakterisierung der Short-Chain-Dehydrogenasen/Reduktasen eine Herausforderung dar, der nur durch die Kombination der unterschiedlichsten Methoden aus den verschiedensten Forschungsfeldern beizukommen ist. In den vergangenen Kapiteln wurde eine Herangehensweise aufgezeigt, mit der es mir schlußendlich gelungen ist, einen bedeutenden Grundstein für die Identifizierung der physiologischen Funktion der Proteine von Interesse zu legen, die dargestellten Ergebnisse verdeutlichen aber auch, daß bis zu einer erfolgreichen Vollendung der angestrebten Beschreibung oftmals ein langer Weg ist, der über das Gezeigte hinaus alternative Ansätze und die Fortführung der Untersuchungen erfordert.

Beispielsweise wäre der Regulation der zu untersuchenden Enzyme von einer anderen Seite zu begegnen als sie hier gezeigt wurde. Promotor-Studien, die die Gen-Transkription und deren antreibende (bzw. inhibierende) Faktoren beleuchten, sind in den vergangenen Jahren zu einem wichtigen Hilfsmittel im Zuge der Funktionsbestimmung von Proteinen aber auch der Aufklärung der ihnen zugrunde liegenden Mechanismen geworden. Hinsichtlich der in der vorliegenden Arbeit untersuchten SDR-Proteine muß in naher Zukunft selbstverständlich die Bestimmung der Substratspezifität im Vordergrund stehen. Wenngleich in den vorgestellten Untersuchungen ein gewisses Spektrum an Substanzen abgedeckt und somit eine Beteiligung der Enzyme von Interesse an ihrer Umsetzung ausgeschlossen werden konnte, so war die getroffene Auswahl an Substraten nicht umfangreich und repräsentativ genug um die biologisch relevante, katalytische Aktivität der SDR-Kandidaten zu ermitteln. Mit der Verifizierung eines Retinoidumsatzes durch alle zu charakterisierenden Proteine ist allerdings nun ein Kontrollsystem geschaffen, das deren Aufreinigung unter Verwendung von Detergenzien und im Anschluß die Überprüfung, wie ursprünglich angestrebt, einer Substratbibliothek oder ihre Kristallation erlaubt. Die Identifizierung des natürlichen Substrats ist der Schlüssel zur Rolle des Enzyms im Stoffwechsel, er öffnet, möglicherweise zusammen mit einem generierten Mausmodell, ungeahnte Türen der therapeutischen Intervention bei eventuell assoziierten Erkrankungen. Denn gerade in der erfolgreichen Entwicklung von Enzym-Inhibitoren steckt das große Potential, den Menschen langfristig gesünder zu machen, unter Umständen bereits präventiv bei einer bestehenden genetischen Prädisposition.

## 4 Methoden

### 4.1 Generelle Methoden zur Arbeit mit Bakterien

#### 4.1.1 Nährmedien

Alle verwendeten Nährmedien wurden bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Festmedien wurde vor dem Autoklavieren Agar in einer Konzentration von 1,5 % (w/v) zugesetzt. Temperaturempfindliche Zusätze wurden sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren zugegeben.

- **LB-Medium**

- 10 g Casein-Hydrolysat
- 5 g Hefe-Extrakt
- 4 g NaCl
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (pH 7,4), ad 1 L

- **SOC-Medium**

- 2 g Trypton
- 0,5 g Hefe-Extrakt
- 0,2 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O
- 0,25 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O
- 0,36 g Glucose
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (pH 7,4), ad 0,1 L

#### 4.1.2 Inhibitorische und selektive Medienzusätze

Die verwendeten Hemmstoffe und Medienzusätze wurden sterilfiltriert und nach dem Abkühlen der Medien auf ~50 °C (Festmedien) oder unmittelbar vor Inokulation (Flüssigmedien) zugesetzt. Als selektive Antibiotika kamen Ampicillin in einer Arbeitskonzentration von 50-100 µg/mL und Kanamycin in einer Arbeitskonzentration von 30 µg/mL (beide gelöst in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>) zum Einsatz.

#### 4.1.3 Zellanzucht

Das Überimpfen von *E. coli* auf Festmedien oder die Inokulation von Flüssigkulturen wurde mit einer ausgeglühten Impföse oder einer sterilen Pipettenspitze, ausgehend von Einzelkolonien auf Agarplatten oder Glycerinkulturen, durchgeführt. Flüssigkulturen mit einem Volumen größer als

30 mL wurden aus üN gewachsenen Vorkulturen (5 mL) in Verdünnung 1:100 beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C in Brutschränken bzw. Rundschüttlern bei mind. 200 rpm.

#### 4.1.4 Stammhaltung und Lagerung

üN bei 37 °C inkubierte *E. coli*-Kulturen können auf mit Parafilm (American National Can) umwickelten Agarplatten über mehrere Monate bei einer Temperatur von 4 °C gelagert werden. Für eine langfristige Aufbewahrung wurden, ausgehend von Flüssigkulturen, Glycerinkulturen angefertigt, die bei -80 °C über mehrere Jahre stabil sind. Zu deren Herstellung wurden Einzelkolonien in 5 mL Selektivmedium üN bei 37 °C kultiviert. 800 µL dieser Kulturen wurden entnommen, in einem Verhältnis von 1:1 mit 80 %igem sterilen Glycerin gemischt und in Cryo Tube™ Vials (Nunc) bei -80 °C gelagert.

#### 4.1.5 Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation von Plasmid-DNA

##### Herstellung chemokompetenter *E. coli* (RbCl-Methode, 1994)

250 mL LB-Medium, versetzt mit 20 mM MgSO<sub>4</sub>, wurden mit einer *E. coli* üN-Kultur in einem Verhältnis von 1:100 angeimpft und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600 nm</sub>) von 0,4-0,6 inkubiert. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation der Bakteriensuspension bei 4 °C und 4500 rpm wurde das Pellet in 1 mL kaltem TFB1 resuspendiert, die entstandene Suspension 5 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es erfolgte die Aufnahme der Bakterien in 10 mL kaltem TFB2. Nach einer 15-60 minütigen Inkubation auf Eis wurde die Suspension in 100 µL Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

- **TFB1**

- 30 mM KAc

- 100 mM RbCl

- 10 mM CaCl<sub>2</sub>

- 50 mM MnCl<sub>2</sub>

- 10 % Glycerin

- mit KAc auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren*

- **TFB2**

- 10 mM MOPS

- 10 mM RbCl

- 75 mM CaCl<sub>2</sub>

- 15 % Glycerin

- mit KAc auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren*

### Transformation chemokompetenter *E. coli* durch Hitzeschock

Die verwendete Methode der chemischen Transformation folgt der Beschreibung von Mandel und Higa (1970) und Cohen et al. (1972). Auf Eis aufgetaute, kommerziell erhältliche oder selbst hergestellte hitzekompetente Bakterienzellen (50-100  $\mu\text{L}$  Aliquots) wurden mit 1-5 ng Plasmid-DNA oder einem Aliquot eines Ligationsansatzes (1-8  $\mu\text{L}$ ) sanft vermischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach erfolgtem Hitzeschock von 30-60 sec (abhängig vom verwendeten Bakterienstamm) in einem 42 °C-Wasserbad und einer unmittelbar anschließenden Kühlung des Ansatzes für 1 min auf Eis, wurden den Zellen 400  $\mu\text{L}$  SOC-Medium oder, alternativ dazu, antibiotikumfreies LB-Medium zugegeben und die Bakterienkultur für 45-60 min unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurden 20-400  $\mu\text{L}$  Bakterienzellsuspension auf LB-Agar mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert.

## 4.2 Generelle Methoden zur Arbeit mit Hefen

### 4.2.1 Nährmedien

Alle verwendeten Nährmedien wurden bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Festmedien wurde, wenn nicht im Folgenden anders beschrieben, vor dem Autoklavieren Agar in einer Konzentration von 2 % (w/v) zugesetzt. Temperaturempfindliche Zusätze wurden sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren zugegeben.

- **SD-Medium**

26,7 g Minimal SD Base

entsprechende Menge an jeweiligem DropOut(DO)-Zusatz (laut Vorgabe des Herstellers)

H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (pH 7,4), ad 1 L

- **SD-Agar**

46,7 g Minimal SD Agar Base

entsprechende Menge an jeweiligem DropOut(DO)-Zusatz (laut Vorgabe des Herstellers)

H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (pH 7,4), ad 1 L

- **YPDA-Medium**

50 g YPD

0,003 % (w/v) Adeninhemisulfat

H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (pH 7,4), ad 1 L

- **YPDA-Agar**

50 g YPD

0,003 % (w/v) Adeninhemisulfat

2 % Agar

H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (pH 7,4), ad 1 L

- **SD-Agar/X- $\alpha$ -Gal**

46,7 g Minimal SD Agar Base

entsprechende Menge an jeweiligem DropOut(DO)-Zusatz (laut Vorgabe des Herstellers)

2 mL X- $\alpha$ -Gal (20 mg/mL in DMF)

H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (pH 7,4), ad 1 L

## 4.2.2 Zellkultivierung

### Kultivierung in Flüssigkultur

Zu verwendende Hefen wurden, ausgehend von Glycerolstocks oder angefertigten Stock-Agarplatten (Kolonien nicht älter als 2 Monate), in 3-5 mL YPDA-Medium inokuliert und bis zu zwei Tage im Rundschtüttler bei 30 °C und 250 rpm inkubiert. Zur Selektion mit bestimmten Plasmiden transformierter Hefen wurde im Anschluß ein Aliquot der angezogenen Flüssigkultur auf ein geeignetes, einen Mangel an entsprechenden Aminosäuren bzw. Nukleotiden aufweisendes DropOut-Medium überführt.

### Kultivierung auf festen Nährmedien

Alternativ zur Flüssigkultur können Hefen ebenso auf Agar-Platten kultiviert werden. Um, ausgehend von einem Glycerolstock, eine Vereinzellung der Kolonien zu erreichen, wurden die Hefen auf YPDA-Agar ausgestrichen und bei 30 °C für 3-5 Tage im Brutschrank inkubiert. Für transformierte Hefen, die bereits Plasmide mit spezifischen Reportergenen tragen, erfolgte ein weiteres Ausstreichen der erhaltenen Kolonien auf ein geeignetes, einen Mangel an entsprechenden Aminosäuren bzw. Nukleotiden aufweisendes DropOut-Medium. Hefen, die aus Transformations- oder Mating-Ansätzen hervorgingen, wurden direkt mittels steriler Glasperlen auf DropOut-Medium ausplattiert.

### Stammhaltung und Lagerung

Die Stammhaltung und Lagerung von Hefekulturen entspricht im Wesentlichen der für Bakterien beschriebenen (vergleiche 4.1.4). Zur Anfertigung von Glycerolstocks zur Langzeit-Aufbewahrung von *S. cerevisiae* wurden 800  $\mu$ L einer angezogenen Flüssigkultur in einem Verhältnis von 1:1 mit sterilem 50 %igem Glycerin in Cryo Tube™ Vials (Nunc) gemischt. Eine Lagerung bei -80 °C ermöglicht eine Aufbewahrung der Stocks über mehrere Jahre.

## 4.2.3 Herstellung kompetenter Hefen und Transformation von Plasmid-DNA

Die in dieser Arbeit angewandte Technik der Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Hefe-Zellen folgte der Lithiumacetat- (LiAc-) vermittelten Methode, beschrieben von Ito et al. [87].

### Herstellung kompetenter Hefen

Die zur Transformation benötigten Hefe-Stämme wurden ausgehend von einem Glycerolstock auf YPDA-Agarplatten ausgestrichen und für 3-5 Tage bei 30 °C in einem Brutschrank inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde in 1 mL YPDA-Flüssigmedium inokuliert und nach einer weiteren Inkubation in 50 mL YPDA überführt. Diese 50 mL Kultur wurde unter Schütteln bei 250 rpm und 30 °C bis zur stationären Phase ( $\sim 2$  Tage;  $OD_{600\text{ nm}} \geq 1,5$ ) angezogen. Einer anschließenden Verdünnung der Zellen in YPDA-Medium auf eine  $OD_{600\text{ nm}}$  von 0,2-0,3 und einer Inkubation bei 30 °C bis zu einer  $OD_{600\text{ nm}}$  von 0,4-0,5 folgten zunächst ein Zentrifugationsschritt von 5 min bei 1000 x g und 4 °C und das Waschen des Zellpellets in 25 mL sterilem, deionisiertem  $H_2O$ . Im Anschluß an eine weitere Zentrifugation von 5 min bei 1000 x g und RT wurde das Pellet in 500  $\mu\text{L}$  1.1x TE/1.1x LiAc resuspendiert. Die gewonnenen kompetenten Hefezellen wurden unmittelbar nach ihrer Erzeugung für die Transformation verwendet.

- **10x TE**

100 mM Tris-HCL (pH 7.4)

10 mM EDTA (pH 8.0)

- **1.1x TE/1.1x LiAc**

1,1 mL 10x TE

1,1 mL 1 M LiAc

$H_2O_{\text{bidest}}$  (pH 7,4), ad 10 mL

### Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Hefen

Die Transformation der Köder-Plasmide und die Cotransformation von Köder- und Beute-Plasmiden in kompetente Hefe-Zellen wurde angelehnt an das small-scale yeast transformation Protokoll des Clontech BD Matchmaker™ Library Construction & Screening Kit Manuals durchgeführt. In einem 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden zunächst 0,1-0,25  $\mu\text{g}$  der jeweiligen Plasmid-DNA, 100  $\mu\text{g}$  denaturierter Heringssperma-Träger-DNA und 100  $\mu\text{L}$  kompetenter Hefe-Zellen gemischt. Nach Zugabe von 600  $\mu\text{L}$  steriler PEG/LiAc-Lösung und einem sanftem Vortexen wurde der Ansatz für 30 min bei 30 °C und 200 rpm inkubiert und es erfolgte das Beimischen von 70  $\mu\text{L}$  DMSO. Nach anschließendem Invertieren der Reaktionsgefäße und einem Hitzeschock der Zellen für 15 min in einem 42 °C Wasserbad wurde der Ansatz für 2-5 min auf Eis inkubiert. Das durch eine 15-sekundige Zentrifugation bei 14000 rpm und RT erhaltene Pellet wurde in 1 mL YPDA-Medium resuspendiert. Nach einer Inkubation unter Schütteln für 90 min bei 30 °C wurde die Kultur erneut für 15 sec bei 14000 rpm und RT abzentrifugiert und das resultierende Pellet in 1 mL NaCl-Lösung (0,2 %) resuspendiert. 100  $\mu\text{L}$  einer 1:10-, 1:100- und 1:1000-Verdünnung wurden - abhängig vom Nährstoff-Marker, getragen vom jeweiligen Plasmid - auf 100 mm SD/-Leu oder SD/-Trp-Platten ausplattiert. Die Platten wurden bei 30 °C für 2-4 Tage im Brutschrank inkubiert und die erhaltenen Klone zur Anfertigung von Master-Platten auf adäquatem Selektiv-Medium erneut ausgestrichen.

- **PEG/LiAc-Lösung**

- 8 mL 50 % PEG 3350

- 1 mL 10x TE

- 1 mL 1 M LiAc

#### 4.2.4 Das Gal4-Yeast-Two-Hybrid-System (Y2H)

Das Yeast-Two-Hybrid-System (Y2H) ist ein wertvolles Hilfsmittel für den Nachweis von neuen Protein-Protein-Interaktionen *in vivo*. In einem Gal4-basierten System wird das Köder-Gen als Fusion an die DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors Gal4 exprimiert (Hefestamm Y187; Ködervektor pGBKT7, Selektionsmarker Tryptophan), während ein weiteres Gen einer cDNA-Bibliothek als Fusion an die Gal4-Aktivierungsdomäne exprimiert wird (Hefestamm AH109; Beutevektor pGADT7rec, Selektionsmarker Leucin). Die entsprechend transformierten Hefestämme AH109 und Y187 werden durch ein Mating zu diploiden Hefezellen verschmolzen. Im Falle einer Interaktion zwischen Köder- und Beute-(Bibliotheks-)Fusionsprotein werden die beiden Domänen von Gal4 in enge Nachbarschaft gebracht und hierdurch die Transkription verschiedener Reportergene (His3, Ade2 und Mel1) aktiviert (vergleiche Abbildung 4.1).

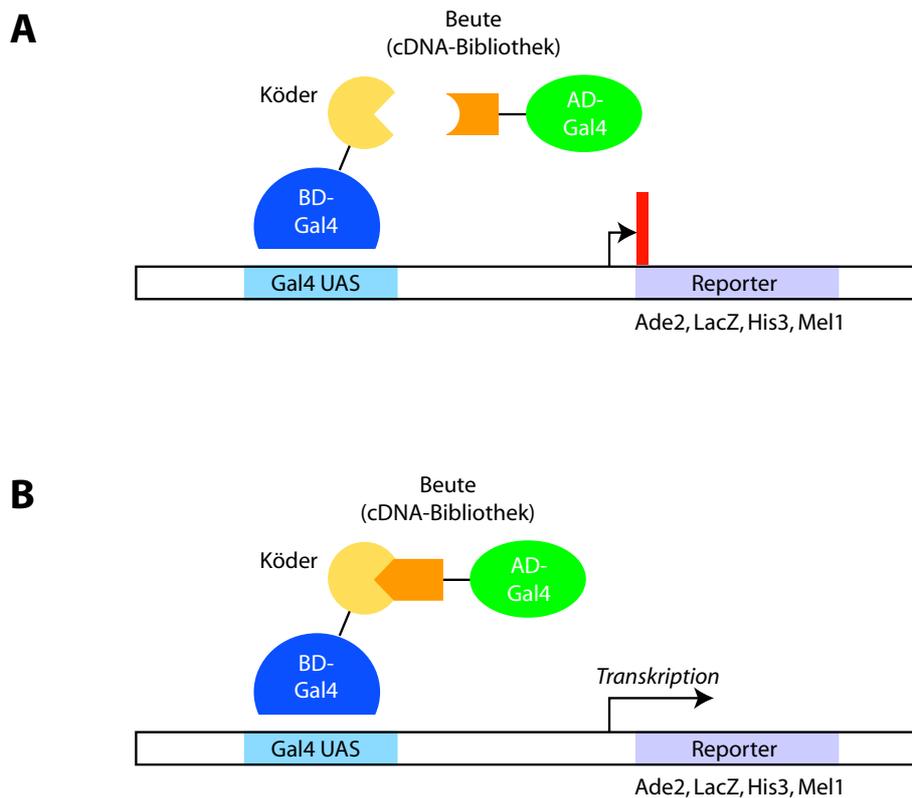
Die Expression von His3 und Ade2 verleiht den Hefezellen die Eigenschaft zur *de novo* Synthese von Histidin und Adenin, wodurch ihnen ein Wachstum auf histidin- und adeninfreiem Medium möglich wird. Die Transkription von Mel1 führt zur Bildung einer  $\alpha$ -Galaktosidase.

Der Nachweis einer Proteininteraktion kann durch Selektion der diploiden Hefeklonen auf Medium ohne Adenin, Histidin, Tryptophan und Leucin erfolgen. Das Wachstum auf adenin- und histidinfreiem Medium wird dabei durch die Aktivierung der Reportergene (Interaktion von Köder und Beute) erreicht, während das Wachstum auf tryptophan- und leucinfreiem Medium durch die entsprechenden Gene auf dem Köder- und Beuteplasmid möglich ist. Die Aktivierung des  $\alpha$ -Galaktosidasegens wird durch einen  $\alpha$ -Galaktosidasetest geprüft (siehe 4.2.8). Um falsch positive Interaktoren, die entweder selbst oder über andere Transkriptionsfaktoren an eine strangaufwärts liegende Sequenz eines Reportergens binden, weitestgehend auszuschließen werden für jedes Reportergen unterschiedliche UAS und TATA-Box-Sequenzen verwendet.

In dieser Studie wurden zur Identifizierung potentieller Interaktoren der drei zu untersuchenden Kandidatenproteine Screenings gegen eine humane Plazenta-cDNA-Bibliothek (hergestellt durch Frau Eva Lattka, Institut für Experimentelle Genetik, Helmholtz Zentrum München) unter Verwendung des BD Matchmaker<sup>TM</sup> Library Construction & Screening Kits der Firma Clontech durchgeführt.

#### 4.2.5 Testen des Köders auf autonome Reportergen-Aktivierung

Die generierten Köderkonstrukte pGBKT7/SDR-Kandidat (sowie der Leervektor pGBKT7) wurden in den Hefe-Stamm Y187, der eine Defizienz für His, Ade, Trp und Leu aufweist, transformiert. Das Trp-Gen des Vektors pGBKT7 erlaubte die positive Selektion von Plasmid-tragenden Hefen. Ein positiv getesteter Klon wurde daraufhin auf SD/-Leu, SD/-Leu/-Trp und SD/-Leu/-Trp/-His



**Abbildung 4.1:** Das Gal4-Yeast-Two-Hybrid-System (Y2H). (A) Das Köder-Gen wird als Fusion an die DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors Gal4 (BD-Gal4) exprimiert, welche an Upstream Activating Sequenzen (UASs) auf dem Hefe-Chromosom bindet, während Gene der cDNA-Bibliothek als Fusion an die Gal4-Aktivierungsdomäne (AD-Gal4) exprimiert werden. Sind Köder- und Beuteprotein nicht in der Lage miteinander zu interagieren, führt dies zu einer Entkopplung von Aktivierungsdomäne und DNA-Bindungsdomäne und somit zu einem Funktionsverlust. Die Reportergene werden nicht transkribiert. (B) Im Falle einer Interaktion zwischen Köder- und Beuteprotein, werden BD-Gal4 und AD-Gal4 in unmittelbare Nachbarschaft gebracht und können so die Transkription der Reportergene Ade2, His3, LacZ und Mel1 einleiten.

(TDO) ausplattiert, um den Köder auf autonome Reporter-gen-Aktivierung von Leu und His zu testen. Die Platten wurden für 4 Tage bei 30 °C inkubiert.

#### 4.2.6 Screening einer vortransformierten cDNA-Bibliothek durch Hefe-Mating

Zur Herstellung einer konzentrierten üN-Kultur des mit dem entsprechenden Köderkonstrukt transformierten Hefestamms Y187 wurde eine 2-3 mm große, weniger als 2 Monate alte Kolonie in 50 mL SD/-Trp Flüssigmedium inokuliert und üN unter Schütteln bei 30 °C und 250 rpm inkubiert. Angezogene Zellen wurden bei 600 x g für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 5 mL SD/-Trp Medium resuspendiert. Diese 5 mL Kultur wurde mit einem 1 mL Aliquot der vortransformierten AH109 cDNA-Bibliothek in einem sterilen 2 L Erlenmeyerkolben kombiniert. Nach Zugabe von 45 mL YPDA-Medium und zweimaligem Waschen des Bibliothek-Vials mit jeweils 1 mL YPDA erfolgte eine Inkubation der Zellen für 24 h bei 30 °C unter leichtem Schütteln (45 rpm). Der Mating-Ansatz wurde bei 1000 x g für 10 min abzentrifugiert und der verwendete Kolben zweifach mit jeweils 50 mL YPDA-Medium gewaschen. Die zugegebenen 100 mL YPDA-Medium wurden im Anschluß unmittelbar zur Resuspendierung des Pellets verwendet. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 1000 x g für 10 min wurde das Zellpellet final in 7 mL YPDA-Medium aufgenommen. 200 µL der Zellsuspension wurden mittels steriler Glasperlen auf 25 SD/-His/-Leu/-Trp (Triple DropOut, TDO) Platten (150 mm) ausplattiert. Es erfolgte eine bis zu zweiwöchige Inkubation der Platten im Brutschrank bei 30 °C. Klone, die auf den inkubierten TDO-Platten gewachsen waren, wurden zur weiteren Selektion auf SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp (Quadrupole DropOut, QDO) + X-α-Gal-Platten (siehe 4.2.8) ausgestrichen. Alternativ hierzu wurde der Mating-Ansatz ebenfalls direkt auf 25 QDO + X-α-Gal Platten (150 mm) ausplattiert. Lediglich Klone einer Größe ≥ 2 mm mit eindeutig blauer Färbung wurden als Ade+/His+/lacZ+ Klone erachtet und zur weiteren Analyse herangezogen.

#### 4.2.7 Ermittlung der Mating-Effizienz und der Anzahl gescreenter Klone

Zur Ermittlung der Mating-Effizienz und der Anzahl gescreenter Klone wurden jeweils 100 µL einer 1:10-, 1:100-, 1:1000- und 1:10000-Verdünnung des Mating-Ansatzes auf SD/-Trp, SD/-Leu und SD/-Leu/-Trp Platten (100 mm) ausplattiert. Nach Inkubation der Platten für 4 Tage bei 30 °C wurden die gewachsenen Klone (30-300 cfu) ausgezählt und zunächst die Anzahl der lebensfähigen Zellen (cfu/mL) nach folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{cfu}}{\text{Ausplattiertes Volumen (mL)} \times \text{Verdünnungsfaktor}} = \text{lebensfähige Zellen (cfu/mL)}$$

# cfu/mL von SD/-Leu = Lebensfähigkeit des AH109-Matingpartners

# cfu/mL von SD/-Trp = Lebensfähigkeit des Y187-Matingpartners

# cfu/mL von SD/-Leu/-Trp = Lebensfähigkeit der Diploiden

Der Stamm mit der geringsten Lebensfähigkeit (cfu/mL) ist der limitierende Matingpartner, im Optimalfall ist dies der die cDNA-Bibliothek tragende Stamm AH109. Dies stellt sicher, dass der größte Anteil der Hefezellen mit cDNA-Inserts einen Matingpartner findet. Die Kalkulation der Mating-Effizienz erfolgte anhand folgender Formel:

$$\frac{\# \text{ Lebensfähigkeit Diploide (cfu/mL)} \times 100}{\# \text{ Lebensfähigkeit limitierender Matingpartner (cfu/mL)}} = \% \text{ Diploide}$$

Die Anzahl der gescreenten Klone wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$\# \text{ Lebensfähigkeit Diploide (cfu/mL)} \times \text{Resuspensionsvolumen (mL)} = \# \text{ gescreenter Klone}$$

### 4.2.8 Der $\alpha$ -Galaktosidasetest

Zum Ausschluß möglichst vieler falsch-positiver Klone kann neben Ade2 und His3 die Expression eines dritten Reportergens, Mel1, getestet werden. Um die selektierten Hefeklone auf ihre  $\alpha$ -Galaktosidaseaktivität zu überprüfen, wurde den verwendeten QDO-Platten X- $\alpha$ -Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid) in einer Konzentration von 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  zugegeben. Da das Enzym  $\alpha$ -Galaktosidase X- $\alpha$ -Gal in einen blauen Farbstoff umwandeln kann, ist die Expression des Mel1-Gens durch die Blaufärbung der entsprechenden Hefeklone direkt nachweisbar.

## 4.3 Generelle Methoden zur Arbeit mit Säugetierzellkulturen

### 4.3.1 Kultivierung von Zelllinien

**HeLa-Zellen.** HeLa-Zellen sind humane Epithelzellen eines Cervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs) und die ersten menschlichen Zellen, aus denen eine permanente Zelllinie etabliert wurde. Sie zeichnen sich in erster Linie durch ihre gute Anhaftung und ihre gute Transfizierbarkeit aus. HeLa-Zellen wurden in Modified Eagle Medium (MEM; Gibco), versetzt mit 10 % Fetal Bovine Serum (FBS; Gibco), 2 mM L-Glutamin (Gibco) und jeweils 100 U/mL Penicillin und Streptomycin (Gibco), kultiviert.

**HEK293-Zellen.** Bei den HEK293-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie aus humanem embryonalen Nierengewebe (human embryonal kidney). Sie wurden in High Glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco), versetzt mit 10 % FBS, 2 mM L-Glutamin (Gibco), 100 U/mL Penicillin und 100 U/mL Streptomycin (Gibco), kultiviert.

### 4.3.2 Allgemeine Methoden zur Zellkultur

#### Auftauen von Zellen

In flüßigem Stickstoff kryokonservierte eukaryotische Zellen wurden bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in 10 mL vorgewärmtem Kulturmedium aufgenommen. Nach einer Zentrifugation für 2-3 min bei 1000-1700 rpm und Abnahme des Überstands wurde das Zellpellet in 3 mL frischem Medium resuspendiert und in eine 25 mL Zellkulturflasche mit vorgelegtem Medium überführt. Da das im Einfriermedium enthaltene DMSO (Dimethylsulfoxid) für aufgetaute Zellen toxisch ist, sollte der Vorgang des Auftauens möglichst zügig durchgeführt werden.

#### Passagieren von Zellen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen wachsen als epithelienähnlicher Monolayer. Während HeLa-Zellen eine Verdopplungszeit von 40-48 h besitzen, verzweifacht sich die Zellzahl in einer HEK293-Kultur bereits in etwa 24 h. Spätestens bei Erreichen einer Konfluenz von 90-100 % ist ein Transfer der Zellen in eine neue Kulturflasche nötig (Splitting). Hierzu wurde zunächst das verbrauchte Medium abgenommen, die Zellen mit vorgewärmten PBS gewaschen und zu deren Ablösung 1 mL (25 mL Zellkulturflasche) bzw. 2-3 mL (75 mL Zellkulturflasche) Trypsin/EDTA (Gibco) zugegeben. Nach einer Inkubation für 3-5 min bei 37 °C wurde die Trypsinierung durch Zugabe von Medium gestoppt, die Zellen 2 min bei 1500 rpm abzentrifugiert und das Pellet, in frischem Medium (Volumen abhängig vom gewünschten Verdünnungsverhältnis) resuspendiert. Die Verdünnung wurde je nach Wachstumsrate der jeweiligen Zelllinie und Anforderungen des Experiments gewählt und lag üblicherweise zwischen 1:2 und 1:20.

- **PBS**

- 10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,4
- 150 mM NaCl

#### Kryokonservierung von Zellen zur langfristigen Aufbewahrung

Zur Kryokonservierung wurden Zellen in einer 75 mL Zellkulturflasche bis zu einer maximalen Konfluenz von 90 % kultiviert. Nach Absaugen des Mediums und Waschen mit 10 mL PBS wurden die Zellen mit 2 mL Trypsin/EDTA (Gibco) abgelöst (Inkubation für 3-5 min bei 37 °C) und in 10 mL frischem Medium aufgenommen. Es erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 1000 rpm, ein Verwerfen des Überstands und das Resuspendieren der Zellen in 3 mL Einfriermedium (Medium mit 10 % DMSO). Die Zellsuspension wurde abschließend auf zwei Cryo Tube™ Vials (Nunc) verteilt, die in einem auf RT temperierten Einfrierkontainer (Cryo 1 °C Freezing Container; Nalgene) mit einer Abkühlrate von -1 °C pro min bei -80 °C eingefroren wurden. Für eine langfristige Aufbewahrung wurden die Zellen in flüßigen Stickstoff überführt.

### Transiente Transfektion

In dieser Arbeit wurde zur transienten Transfektion von eukaryotischen Zelllinien das Reagenz Fugene6 (Roche) verwendet. Fugene6 ermöglicht den Einschluß der zu transfizierenden Plasmid-DNA in Lipid-Tröpfchen, die im Folgenden an die Plasmamembran der Zielzelle fusioniert werden können.

Die transienten Transfektionen wurden je nach Anforderung des Experiments in unterschiedlichen Volumina durchgeführt. Sie erfolgten gewöhnlich bei einer Konfluenz der Zellen von 30-40 % basierend auf dem Protokoll des Herstellers.

Nach Zugabe des Transfektionsreagenzes Fugene6 zu serumfreiem Medium und einer Inkubation für 5 min bei RT wurde die zu transformierende Plasmid-DNA beigemischt. Für alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien geschah dies in einem Verhältnis Fugene6 ( $\mu\text{L}$ ) zu transfizierender DNA ( $\mu\text{g}$ ) von 3:1. Es erfolgte eine weitere Inkubation für 20 min bei RT bevor der Transfektionsansatz dann tropfenweise auf die Zellen gegeben und diese bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert wurden.

### Zählen von Zellen

Für zahlreiche Anwendungen war die Bestimmung der Zellzahl in Kultur unabdingbar. Zu diesem Zweck wurden angezogene Zellen zunächst in 10 mL PBS gewaschen, mittels 2 mL Trypsin/EDTA (Gibco) vom Flaschenboden (75 mL Zellkulturflasche) gelöst und in 10 mL des entsprechenden Kulturmediums resuspendiert. Zum Zählen der Zellen wurden 25  $\mu\text{L}$  der Suspension in eine Neubauer-Zählkammer überführt, vier Quadrate unter dem Mikroskop (Axiovert 40 CFL, Zeiss) ausgezählt und ein Mittelwert ermittelt. Erhaltener Mittelwert multipliziert mit  $10^4$  ergab die Anzahl der Zellen pro mL Suspension ( $X \times 10^4 = \text{Zellzahl/mL}$ ).

### Ernten von Zellen

Zur Gewinnung von Zellpellets definierter Zellzahl, wie sie beispielsweise zur Messung der Substratspezifität *in vitro* (vergleiche 4.7.2) benötigt wurden, war das Ernten angezogener Zellen von Nöten. 24-48 h nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen hierzu wie gewohnt zunächst in 10 mL PBS gewaschen, mittels 2 mL Trypsin/EDTA (Gibco) vom Flaschenboden (75 mL Zellkulturflasche) gelöst und in 10 mL des entsprechenden Kulturmediums resuspendiert. Nach Ermittlung der Zellzahl wurde die Zellsuspension für 5 min bei 1000 x g zentrifugiert und der Mediumüberstand vorsichtig abgenommen. Das Zellpellet wurde in einem adäquaten Volumen an PBS resuspendiert und die Suspension anschließend in Aliquots von jeweils 1-4 x 10<sup>6</sup> Zellen (abhängig von der Folgeanwendung) auf 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Eine abschließende Zentrifugation für 10 min bei 15000 x g und 4 °C und das Abnehmen der Überstände erbrachte die erwünschten Zellpellets, die dann bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert werden konnten.

### 4.3.3 Aussähen von Zellen und Transfektion in unterschiedlichen Formaten

Für alle im folgenden beschriebenen Anwendungen wurden die entsprechenden Zellen entweder in 6 bzw. 12 well Platten oder 75 mL Zellkulturflaschen ausgesät. Um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im Medium zu gewährleisten, wurden sowohl Platten als auch Flaschen leicht horizontal in

Form eines Aichters geschwenkt. Vor den anstehenden Transfektionen erfolgte eine  $\text{üN}$ -Inkubation der Zellen bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $5\text{ }\%$   $\text{CO}_2$ .

### **Anzucht von HeLa-Zellen für subzelluläre Lokalisationsstudien**

Zur Durchführung von Experimenten zur subzellulären Lokalisation wurden  $5 \times 10^4$  HeLa-Zellen in jedes well einer 6 well Platte ausgesät. In diese waren zuvor sterile Deckgläschen (Menzel Glaeser) und 2 mL Zellkulturmedium vorgelegt worden. Die Transfektion erfolgte mit  $1\text{ }\mu\text{g}$  DNA pro well.

### **Anzucht von HEK293-Zellen zur Messung der Substratspezifität *in vivo***

Für Assays zur Überprüfung des Substratumsatzes wurden HEK293-Zellen in mit  $900\text{ }\mu\text{L}$  Zellkulturmedium befüllte 12 well Platten ausgesät. Nach Anzucht der Zellen in einer 75 mL Zellkulturflasche bis zu einer Konfluenz von 90-100 % wurden die Zellen wie beschrieben trysiniert und anschließend in 15 mL Medium aufgenommen. In jedes well einer 12 well Platte wurden  $1,5 \times 10^5$  Zellen ausgesät und es folgte eine Inkubation für 24 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $5\text{ }\%$   $\text{CO}_2$ . Zur Transfektion der Zellen wurden  $0,5\text{ }\mu\text{g}$  DNA (pcDNA3-Expressionskonstrukte, Leervektor von Invitrogen) in jedes well zugegeben.

### **Anzucht von HEK293-Zellen zur Messung der Substratspezifität *in vitro***

In Vorbereitung der Messung zur Substratspezifität *in vitro* wurden HEK293-Zellen zunächst in einer 75 mL Zellkulturflasche bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $5\text{ }\%$   $\text{CO}_2$  bis zu einer Konfluenz von 30-40 % angezogen. Nach Transfektion der Zellen mit  $8\text{ }\mu\text{g}$  DNA erfolgte eine weitere Inkubation für 24-48 h.

### **Anzucht von HEK293-Zellen zur Proteinaufreinigung bzw. zur Untersuchung ihres Metaboloms nach Proteinexpression**

Die Anzucht von HEK293-Zellen zur Proteinaufreinigung bzw. zur Detektion von Veränderungen hinsichtlich ihres Metaboloms nach Expression der in dieser Arbeit zu charakterisierenden Proteine entsprach der Vorgehensweise, die für die Anzucht zur Messung der Substratspezifität *in vitro* gewählt wurde.

## **4.3.4 Immuncytochemische Methoden für subzelluläre Lokalisationsstudien**

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation der zu untersuchenden Kandidatenproteine wurden ausschließlich HeLa-Zellen verwendet. Diese erschienen besonders geeignet, da sie sich morphologisch durch ein relativ großes Zellvolumen auszeichnen, was eine Visualisierung der subzellulären Lokalisation erleichtert.

### **Färbung der Mitochondrien und des ER**

**Färbung der Mitochondrien und des ER unter Verwendung kompartimentspezifischer Tracker.** Zur Färbung der Mitochondrien und des Endoplasmatischen Retikulums (ER) wurden Fluoreszenzgekoppelte Tracker verwendet. Der Transport der besagten Tracker in die entsprechenden Zellkompartimente erfolgt aktiv, d.h. zur Färbung von Mitochondrien und ER bedient man sich zellinterner Mechanismen. Demzufolge erfolgte dieser Schritt jeweils zu Beginn der Färbungsprozeduren

in noch lebenden HeLa-Zellen. Beide Tracker (Molecular Probes) wurden in Zellkulturmedium (MEM; Gibco) verdünnt (Endkonzentrationen MitoTracker Orange CMTMRos: 300 nM, ER-Tracker Blue-White DPX: 500 nM) und zu den Zellen gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen anschließend 2x mit sterilem PBS gewaschen.

### **Alternative Färbung des ER durch Expression von kompartimentspezifischen Fusionsproteinen.**

Alternativ zur Verwendung des spezifischen Trackers erfolgte die Färbung des ER durch Expression kompartimentspezifischer Proteine (entweder 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 12A aus Zebrafisch in Fusion mit einem C-terminalen Myc-Tag oder Signalsequenz und Rückhaltesignal von Calreticulin in Fusion mit *Discosoma sp.* RFP). Hierzu wurden entsprechende DNA-Konstrukte (pcDNA4 myc-his Version B/zf17 $\beta$ HSD12; pDsRed2-ER (Clontech)) in die HeLa-Zellen transformiert und die exprimierten Fusionsproteine, gegebenenfalls mittels Antikörpern, detektiert (siehe unten).

### **Fixierung der Zellen**

Die Fixierung der HeLa-Zellen erfolgte durch Zugabe von 2 mL 3,7 % Formaldehyd (in PBS) und Inkubation bei 37 °C für 10 min. Anschließend wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen.

### **Permeabilisierung der Zellen**

Eine für Antikörper- oder Phalloidin-Färbung notwendige Permeabilisierung der fixierten HeLa-Zellen wurde durch die Zugabe von 2 mL 0,5 % Triton-X (in PBS) in jedes Well und eine Inkubation für 5 min bei RT erreicht. Es folgte ein zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS.

### **Antikörper-Färbung**

Für die Antikörper-Färbung bestimmter zellulärer Kompartimente oder zu untersuchender Myc-getaggtter Proteine wurden die permeabilisierten Zellen zunächst zur Vermeidung einer unspezifischen Antikörperbindung für 30 min in 3 % BSA (in PBS) bei RT blockiert. Primäre und sekundäre Antikörper wurden in Blockierungslösung verdünnt und jeweils für 1 h auf die Zellen gegeben. Vor und nach deren Zugabe erfolgte ein zweimaliges Waschen der Zellen in PBS.

**Anfärben der Peroxisomen mittels Immunfluoreszenz.** Zur Anfärbung der Peroxisomen wurde endogen in den verwendeten HeLa-Zellen exprimierte 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 4 mittels des monoklonalen Antikörpers IgM h32 5A7-1-1 aus Ratte (unverdünnt; Dr. Elisabeth Kremmer, Helmholtz Zentrum München) immunocytochemisch detektiert. Als zweiter Antikörper kam goat-anti-mouse IgG, gekoppelt mit Cy3 (Verdünnungsverhältnis 1:800; Dianova), zum Einsatz.

**Immunfluoreszente Detektion von Myc-fusionierten rekombinanten Proteinen.** Myc-fusionierte Proteine wurden durch die Verwendung des monoklonalen Antikörpers 9B11 aus Maus (Verdünnungsverhältnis 1:1000; New England Biolabs) detektiert. Als zweiter Antikörper kam goat-anti-mouse IgG, gekoppelt mit AlexaFluor488 ((Verdünnungsverhältnis 1:2000; Invitrogen), zum Einsatz.

### **Färbung des Cytoskeletts**

Die Färbung des Cytoskeletts erfolgte durch die Visualisierung des zellulären F-Actins mittels Phalloidin. Phalloidin, ein Toxin des Grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*), hier markiert mit AlexaFluor488 (grün) oder AlexaFluor568 (rot, beide Invitrogen) wurde 1:50 in 5% FBS/PBS verdünnt und 30 min bei RT im Dunkeln auf den Zellen inkubiert. Nach der Färbung erfolgte ein zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS.

### **Färbung des Zellkerns**

Zur Visualisierung des Zellkerns kamen sowohl Hoechst33342 als auch DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) (beide Invitrogen) zum Einsatz. Hoechst33342 wurde in einer 1:5000-Verdünnung in PBS, DAPI in einer Konzentration von 300 nM in Wasser für 1-2 Minuten auf die Zellen gegeben. Abschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS.

### **Einbetten der gefärbten Zellen**

Nach Abschluß der Färbungsprozedur wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und auf Super-Frost Plus Objektträgern (Menzel Glaeser), versehen mit einem Tropfen des Fluoreszenzverstärkers Vectashield (Vectalabs), eingebettet.

### **Detektion der Fluoreszenz und Dokumentation**

Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit einem Zeiss Axiophot Fluoreszenzmikroskop, ausgestattet mit einem geeigneten Filterset, unter Verwendung eines 40x Ölimmersions-Objektives. Über eine angeschlossene Kamera konnten die angefärbten HeLa-Zellen mit Hilfe der ISIS Software (Metasystems) fotografiert werden. Eine Auftrennung der Farbkanäle wurde durch die Verwendung von Photoshop CS (Adobe) erreicht.

## **4.3.5 Zellkultur-Assays**

### **Assay zur Messung von Apoptose**

Zur Messung eines potentiellen proapoptotischen Effekts der Expression des Kandidatenproteins hDHR51 in Zellkultur wurde der Caspase-Glo™ 3/7-Assay (Promega) verwendet. Beim Caspase-Glo 3/7-Assay handelt es sich um einen Lumineszenz-Assay, welcher die Aktivitäten von Caspase 3 und Caspase 7 - zweier Proteasen, denen eine Schlüsselrolle bei der Apoptose in Säugetierzellen zukommt - in der Zelle misst. Der Assay enthält ein prolumineszierendes Caspase 3/7-Substrat nach dessen Spaltung ein Substrat für Luciferase (Aminoluceferin) freigesetzt wird. Eine anschließende Luciferase-Reaktion hat die Produktion von Licht zur Folge. Nach Angaben des Herstellers ist der Assay für eine Hochdurchsatz-Anwendung im 96 well Format ausgelegt. In dieser Arbeit erfolgte die Durchführung im 12 well Format, etabliert und optimiert durch Frau Dr. Christina Guggenberger (ehemals Institut für Experimentelle Genetik, Helmholtz Zentrum München). Zum Zeitpunkt der Messung wurde verbrauchtes Zellkulturmedium abgenommen und die verwendeten HeLa-Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nach Lyse der Zellen in je 200  $\mu$ L 1x Passive Lysis Buffer und Schütteln für 15 min bei RT wurden aus jedem well 3 x 20  $\mu$ L in eine weiße 96 well

Platte (Nunc) überführt. Anschließend wurden in jedes well 20  $\mu\text{L}$  Caspase-Glo 3/7 Reagenz zugegeben, die Lösungen zum Mischen leicht geschwenkt und nach 10 min das Luciferasesignal gemessen. Dies erfolgte im GeniosPro (Tecan) mit Hilfe der XFlour4GeniosPro Software. Das gemessene Lumineszenz-Signal ist direkt proportional zur Menge der aktiven Caspase.

### **Assay zur Überprüfung der Zellviabilität**

Die Ermittlung der Anzahl lebender Zellen in Kultur erfolgte mit Hilfe des CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assays (Promega). Besagter Assay basiert auf der Quantifizierung des in metabolisch aktiven Zellen vorhandenen ATP. Luciferin wird durch das Enzym Firefly Luciferase in Anwesenheit von  $\text{Mg}^{2+}$ , ATP und molekularem Sauerstoff zu Oxyluciferin umgewandelt. Die Menge an ATP wird als direkt proportional zu der Anzahl an metabolisch aktiven Zellen angenommen. Nach Angaben des Herstellers ist der Assay für eine Anwendung im 96 well Format ausgelegt. In dieser Arbeit erfolgte die Durchführung im 12 well Format, etabliert und optimiert durch Frau Dr. Christina Guggenberger (ehemals Institut für Experimentelle Genetik, Helmholtz Zentrum München). Zum Zeitpunkt der Messung wurde verbrauchtes Zellkulturmedium abgenommen und die verwendeten HeLa-Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nach Lyse der Zellen in je 200  $\mu\text{L}$  1x Passive Lysis Buffer und Schütteln für 15 min bei RT wurden aus jedem well 3 x 20  $\mu\text{L}$  in eine weiße 96 well Platte (Nunc) überführt. Anschließend wurden in jedes well 20  $\mu\text{L}$  CellTiter-Glo Reagenz zugegeben, die Lösungen zum Mischen leicht geschwenkt und nach 10 min Inkubation bei RT das Luciferasesignal gemessen. Dies erfolgte im GeniosPro (Tecan) mit Hilfe der XFlour4GeniosPro Software.

### **Detektion von ROS (Reactive Oxygen Species) als Indikator für oxidativen Stress**

Zur Detektion von ROS (Reaktive Oxygen Species) als Indikator für oxidativen Stress in lebenden Säugetierzellkulturen (in dieser Arbeit HeLa-Zellen) wurde der Image-iT LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection Kit (Invitrogen) verwendet. Das im Assay enthaltene nichtfluoreszierende 5-(und-6)-Carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetat (Carboxy- $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ) dringt in lebende Zellen ein und wird von unspezifischen, intrazellulären Esterasen deacetyliert. In Anwesenheit von nichtspezifischen ROS, welche unter Normalbedingungen in kontrolliertem Maße, in Zeiten oxidativen Stress jedoch gehäuft auftreten, wird die reduzierte Fluorescein-Verbindung oxidiert und emittiert helle, grüne Fluoreszenz, die mittels eines Zeiss Axiophot Fluoreszenzmikroskops detektiert werden kann (siehe auch 4.3.4). Der Image-iT LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection Kit wurde strikt nach Vorgaben des Herstellers verwendet.

## **4.4 Molekulargenetische Methoden mit DNA**

### **4.4.1 Präparation von Plasmid-DNA**

#### **Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde je nach gewünschter DNA-Menge in zwei unterschiedlichen Maßstäben durchgeführt: Für die Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab

(Mini-Präparation) wurden 1-5 mL üN-Kultur und das NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey & Nagel) verwendet, die Isolierung im mittleren Maßstab (Midi-Präparation) erfolgte unter Verwendung einer 50 mL üN-Kultur und des NucleoBond PC100 Kit (Macherey & Nagel). Nach Ernte der Bakterien durch Zentrifugation bei 4 °C und 4500 rpm folgte eine Resuspendierung des Zellpellets im entsprechenden Puffer des Kits. Die Isolierung der DNA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die im Zuge der Mini-Präparation durchzuführende Elution der DNA von der Säule erfolgte mit 35-50  $\mu\text{L}$  AE-Puffer (enthalten im Kit) oder  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ , die aus der Midi-Präparation gewonnene DNA wurde gewöhnlich in 105  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  resuspendiert.

### Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe wurde der ChargeSwitch Plasmid Yeast Mini Kit (Invitrogen) verwendet. Diese Aufreinigung basiert auf Magnetbead-Technologie und liefert Plasmid-DNA ohne Verunreinigung durch genomische DNA oder Protein. Die Plasmid-Präparation erfolgte ausgehend von 1 mL üN-Kultur nach Vorgabe des Herstellers.

## 4.4.2 Aufreinigung von dsDNA

### Aufreinigung von dsDNA aus wässrigen Lösungen

Die Aufreinigung von dsDNA aus Lösungen, die Enzyme, dNTPs oder Salze aus Pufferlösungen enthalten, erfolgte mittels des Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Systems (Promega) oder des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen), jeweils nach Angaben des Herstellers. Zur Elution wurden 35  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  zugegeben.

### Aufreinigung von dsDNA aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von dsDNA aus Agarosegelen wurde diese zunächst unter Verwendung von Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und anschließend mit Hilfe eines Skalpellens aus dem verwendeten TAE-Gel ausgeschnitten. Das die DNA enthaltende Gelfragment wurde in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und die dsDNA gemäß den Herstellerangaben mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) oder dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit 30-35  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ .

- **50x TAE**

- 2 M Tris

- 1 M Essigsäure

- 0,1 M EDTA

- ad 1 L  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

### 4.4.3 Isolierung genomischer DNA zur Genotypisierung

#### Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen

Die Genotypisierung lebensfähiger Nachkommen der im Rahmen dieser Arbeit zu etablierenden Mauslinie setzte zunächst die Isolierung genomischer DNA voraus. Hierzu wurde drei bis vier Wochen alten Mäusen etwa 0,5 mm der Schwanzspitze entfernt und hieraus anschließend die genomische DNA unter Verwendung des Wizard SV Genomic DNA Purification Systems (Promega) gewonnen. Die Isolierung wurde nach der Spin-Methode, strikt nach Angaben des Herstellers, durchgeführt. Die finale Elution der genomischen DNA erfolgte mit  $2 \times 200 \mu\text{L H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ .

#### Isolierung genomischer DNA aus Dottersack-Gewebe

Zur Genotypisierung von Embryonen der zu etablierenden Mauslinie wurde trächtigen Weibchen am ausgewählten Embryonaltag fetales Dottersackgewebe entnommen. Die Isolierung der genomischen DNA hieraus erfolgte mittels des Wizard SV Genomic DNA Purification Systems (Promega) nach der Spin-Methode und den Vorgaben des Herstellers. Die genomische DNA wurde mit  $2 \times 150 \mu\text{L H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  von den Säulchen eluiert.

### 4.4.4 Fällen von DNA

Sehr stark verdünnte oder verunreinigte DNA kann zur Erhöhung der Konzentration oder des Reinheitsgrades gefällt werden. Hierzu wurden der DNA-Lösung sowohl ein Zehntel Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) als auch 2,5 Volumen Ethanol (absolut) zugegeben. Nach Mischen der Lösung und einer Inkubation für mindestens 2 h bei  $-20^\circ\text{C}$  erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm und  $4^\circ\text{C}$  und das Verwerfen des Überstands. Das resultierende Pellet wurde in  $-20^\circ\text{C}$  kaltem 70 % Ethanol gewaschen (Zentrifugation für 10 Minuten bei 14000 rpm und  $4^\circ\text{C}$ ), getrocknet und abschließend in einem angemessenen Volumen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  resuspendiert.

### 4.4.5 Messung von DNA-Konzentration und Qualitätsabschätzung

#### Auftrennung und Betrachtung mittels Agarose-Gelelektrophorese

Für die qualitative Evaluierung von DNA wurden zu untersuchende DNA-Lösungen mittels der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert. Zum Erreichen einer optimalen Auftrennung wurde, entsprechend der zu erwartenden Größe der DNA-Fragmente, unterschiedlich konzentrierte Agarose (0,5 % für dsDNA  $\geq 5$  kb, 1 % für dsDNA  $\sim 2$ -5 kb, 2 % für dsDNA  $\sim 0,5$ -2 kb und 3 % für dsDNA  $\leq 0,5$  kb) in 1x TBE verwendet. Für die Analyse wurde 6x Loading Dye zur DNA-Lösung gegeben, gemischt und auf ein Gel, versetzt mit  $0,5 \mu\text{g/mL}$  Ethidiumbromid, aufgetragen. Die Auftrennung der DNA erfolgte in einem konstanten elektrischen Feld von 80-200 V (abhängig von Gelgröße und Agarosekonzentration). Die DNA-Banden wurden mittels eines UV-Transilluminators ( $\lambda = 254$  nm, BioVision Gel-Dokumentationssystem; PeqLab) visualisiert und mit Hilfe der angeschlossenen Kamera dokumentiert. Durch die Zugabe von 6x Loading Dye zu den Proben konnte der Gellauf während der Elektrophorese beobachtet und entsprechend gestoppt werden. Die Färbelösungen enthalten Bromphenolblau und Xylencyanol FF und verhalten sich auf einem 0,8 %igem Agarosegel wie dsDNA-Fragmente mit 0,3 und 4 kb Größe.

- **10x TBE**

108 g Tris  
55 g Borsäure  
9,3 g EDTA  
ad 1 L H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

- **6x Loading Dye**

15% Ficoll 400 (Pharmacia)  
0,25% Bromphenolblau  
0,25% Xylencyanol FF  
*oder als Fertiglösung käuflich erworben bei MBI Fermentas.*

### Größenbestimmung von DNA-Fragmenten

Innerhalb einer Agarosegel-Matrix ist die Laufgeschwindigkeit von linearen dsDNA-Fragmenten umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichts. Somit ist es möglich, die Länge von DNA-Fragmenten unbekannter Größe im Vergleich zu den R<sub>F</sub>-Werten von Längen standardisierter Fragmente abzuschätzen. Aus diesem Grund wurde jedes Gel neben den zu untersuchenden DNA-Fragmenten mit einem DNA-Standard beladen. In dieser Arbeit kamen hierzu, je nach erwarteter Fragmentgröße, die Marker pUC Mix (Marker 8), λDNA/EcoRI + HindIII (Marker 3) bzw. O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder (alle MBI Fermentas) zum Einsatz.

### Photometrische Konzentrationsbestimmung

Zur Ermittlung von Quantität und Qualität angefertigter Nukleinsäure-Präparationen wurde die optische Dichte (OD) der DNA- (oder RNA-) haltigen Lösungen bei den Wellenlängen  $\lambda = 260$  nm (zur Quantifizierung) und  $\lambda = 280$  nm (zur Qualitätsabschätzung) mit Hilfe eines UV-Spektrophotometers bestimmt. Hierbei kamen sowohl das ND-1000 UV/Vis Spectrophotometer der Firma NanoDrop als auch das Gerät DU530 der Firma Beckmann zum Einsatz. Bei Verwendung des DU530 war im Vorfeld der Messung die Herstellung einer Verdünnung in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> erforderlich. Die Konzentration der Nukleinsäurelösung wurde anschließend anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \text{ ng}/\mu\text{L} = c \text{ [ng}/\mu\text{L}]$$

Die Qualitätsbestimmung erfolgte anhand des Wertes R, der das Verhältnis von OD<sub>260 nm</sub> zu OD<sub>280 nm</sub> beschreibt. Der Quotient aus OD<sub>260 nm</sub> und OD<sub>280 nm</sub> sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen, der optimale Wert für dsDNA liegt bei R = 1,8.

### 4.4.6 Klonierungsstrategien

#### Klonieren über Restriktionsschnittstellen

Für die Generierung der meisten DNA-Konstrukte wurden DNA-Fragmente über Restriktionsschnittstellen in die gewünschten Vektoren inseriert. Der Verdau von DNA-Fragment und Vektor mit Restriktionsendonukleasen erzeugt DNA-Enden, die für die im Anschluß folgende Ligation genutzt werden können.

**Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.** Restriktionsendonukleasen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, doppelsträngige DNA an definierten Erkennungssequenzen (üblicherweise vier bis acht Nukleotide lang) zu schneiden. Einige Restriktionsendonukleasen spalten hierbei beide DNA-Stränge in der Mitte der Erkennungssequenz (blunt-end), die meisten Restriktionsenzyme, die in dieser Arbeit Anwendung fanden, hingegen produzieren überhängende Enden, sog. sticky-ends. Über diese ist es möglich, zwei identisch geschnittene DNA-Fragmente in definierter Reihenfolge und, bei Verwendung zweier unterschiedlicher Restriktionsenzyme, gerichtet wieder zusammenzufügen. Für die Generierung von DNA-Konstrukten als auch für die Analyse von Plasmiden wurden DNA-Fragmente und Vektoren mit speziellen Restriktionsendonukleasen verdaut. Dabei wurden 1-10  $\mu\text{g}$  DNA in einem 20-50  $\mu\text{L}$  Reaktionsansatz, der die entsprechend konzentrierten Puffer und gegebenenfalls BSA (im Falle der Verwendung von New England Biolabs Enzymen) enthielt, mit 5-20 U des Enzyms für 2-16 h bei 37 °C inkubiert. Der Berechnung der angemessenen Menge von einzusetzendem Enzym wurde die Annahme zugrunde gelegt, dass 1 U Enzym unter optimalen Bedingungen in 1 h 1  $\mu\text{g}$  DNA verdaut. Das Stoppen der Reaktion erfolgte wenn möglich durch Hitzeinaktivierung. Optional wurde das Enzym unter Verwendung des Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, siehe auch Kapitel 4.4.2) aus dem Ansatz entfernt. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme stammten von den Firmen MBI Fermentas und New England Biolabs. Die Erkennungssequenzen, Reaktionspuffer und Inkubations- sowie Hitzeinaktivierungsbedingungen sind den Produktbeschreibungen der Hersteller zu entnehmen.

**Dephosphorylierung von linearen DNA-Fragmenten durch alkaline Phosphatase.** Um eine Religation von restriktionsverdautem, linearisiertem Vektor zu verhindern, können unter Verwendung von alkaliner Phosphatase terminale 5'-Phosphatgruppen abgespalten werden. Diese Dephosphorylierung kann im vorhandenen Restriktionsendonukleasen- oder in einem speziellen, mit dem Enzym gelieferten Puffer durchgeführt werden. Gewöhnlich wurde dem Vektorverdau für die letzten 30 min der Inkubation aus Kalbsdarm gewonnene alkaline Phosphatase (CIAP, MBI Fermentas) direkt zugegeben und mit dem Restriktionsansatz hitzeinaktiviert bzw. aufgereinigt.

**Ligation von DNA-Fragmenten.** Die Ligation eines gewünschten und verdauten Inserts mit einem entsprechend linearisierten Vektor wurde unter Verwendung des Enzyms T4 DNA Ligase (MBI Fermentas oder New England Biolabs) durchgeführt. Für gewöhnlich wurden 150 ng Vektor-DNA mit der fünffachen molaren Menge an Insert-DNA gemischt und zusammen mit 1x Ligasepuffer und 5 U T4 DNA Ligase in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{L}$  für 2-4 h bei RT oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Das Protokoll zur anschließenden Transformation ist Kapitel 4.1.5 zu entnehmen.

**Nachverdau der Ligation.** Im Falle einer blunt-end-Klonierung kann zum Ausschluß einer späteren Transformation von religiertem Vektor ein Nachverdau des Ligationsansatzes durchgeführt werden. Hierbei bedient man sich der Tatsache, dass durch das Insertieren eines DNA-Fragments in einen blunt-end verdauten Vektor, die ursprüngliche Erkennungssequenz zerstört wird. Lediglich in einem religierten Vektor bleibt diese erhalten und kann durch die erneute Zugabe der entsprechenden Endonuklease wiederum gespalten werden. Die Aufnahme von linearisiertem Vektor durch die anschließende Transformation vermittelt dem Bakterium nicht die erforderliche Resistenz auf Selektivmedium. Zum Nachverdau eines Ligationsansatzes (20  $\mu\text{L}$ ) wurden diesem 10  $\mu\text{L}$  entnommen, erneut mit 5-20 U des entsprechenden Restriktionsenzym und Reaktionspuffers versehen, und für 1-2 h bei 37 °C inkubiert. Besagter Ansatz konnte nach erneuter Hitzeinaktivierung oder Aufreinigung direkt in den Transformationsansatz eingesetzt werden.

### TOPO-TA Klonierung

Um die Sequenzierung von aus PCR-Reaktionen gewonnenen DNA-Fragmenten zu erleichtern, konnten diese gegebenenfalls direkt und ohne vorherige Aufreinigung unter Verwendung des TOPO-TA Cloning Kits (Invitrogen) subkloniert werden. Die beschriebene Methode bedient sich der nicht-template abhängigen terminalen Transferase-Aktivität der Taq-Polymerase, die während des Elongationsschrittes einzelne Deoxyadenosine (A) an das 3'-Ende des PCR-Produkts anhängt. Der im Kit enthaltene linearisierte Vektor verfügt über einzelne 3' Deoxythymidin (T) Reste, welche dem PCR-Insert eine erfolgreiche Ligation mit dem gewünschten TOPO-Vektor ermöglichen. Die Effizienz der Ligation wird dabei durch die Topoisomerase erhöht, die an der Klonierungsstelle des Vektors verankert ist (TOPO-Klonierung). Nach der Amplifikation der DNA mittels PCR wurden 4  $\mu\text{L}$  des Reaktionsmixes in die Ligationsreaktion mit den Vektoren pCRII, pCR2.1 oder pENTR/U6 eingesetzt. Anschließend wurde der Ansatz nach Angabe des Herstellers in chemo-kompetente TOP10-Zellen transformiert (vergleiche 4.1.5).

## 4.4.7 PCR-basierte Methoden

### Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden PCRs im 20 und 50  $\mu\text{L}$  Maßstab durchgeführt. Die jeweiligen Ansätze setzten sich aus 0,2 mM dNTP-Mix, jeweils 0,5  $\mu\text{M}$  Forward- und Reverse-Primer und 0,5-2,5 U Polymerase in 1x PCR-Puffer zusammen. Für Screening-PCRs wurde die hauseigene Taq DNA Polymerase verwendet, bei schwer zu amplifizierenden Templates oder speziellen Anwendungen, wie möglichst fehlerfreien PCRs zu Klonierungszwecken, kam entweder PfuTurbo DNA Polymerase oder Herculase Hotstart DNA Polymerase (beide Stratagene) zum Einsatz. Als DNA-Templates dienten in dieser Arbeit sowohl genomische DNA, Plasmid-DNA, lineare dsDNA, cDNA, und primäre PCRs (ohne vorherige Aufreinigung) als auch Bakterien- und Hefe-Kulturen. Das Standard-Programm an einer RoboCycler-PCR-Maschine (Stratagene), welches in Abhängigkeit vom verwendeten Template leicht angepaßt wurde, beinhaltete eine anfängliche Denaturierung für 5 min bei 95 °C (im Falle von genomischer DNA 10 min) gefolgt von 35 Zyklen à 30 sec bei 95 °C, 35 sec bei Annealing-Temperatur ( $T_a$ ;  $T_a$  = spezifische Schmelztemperatur des eingesetzten Primerpaares ( $T_m$ ) - 3°C) und 1 min pro 1 kb bei 72 °C. Abschließend erfolgte ein Elongationsschritt für 10 min bei 72 °C.

- **10x PCR Buffer**

100 mM Tris-HCl, pH 9,0

500 mM KCl

15 mM MgCl<sub>2</sub>

### **PCR-basierte, zielgerichtete Mutagenese**

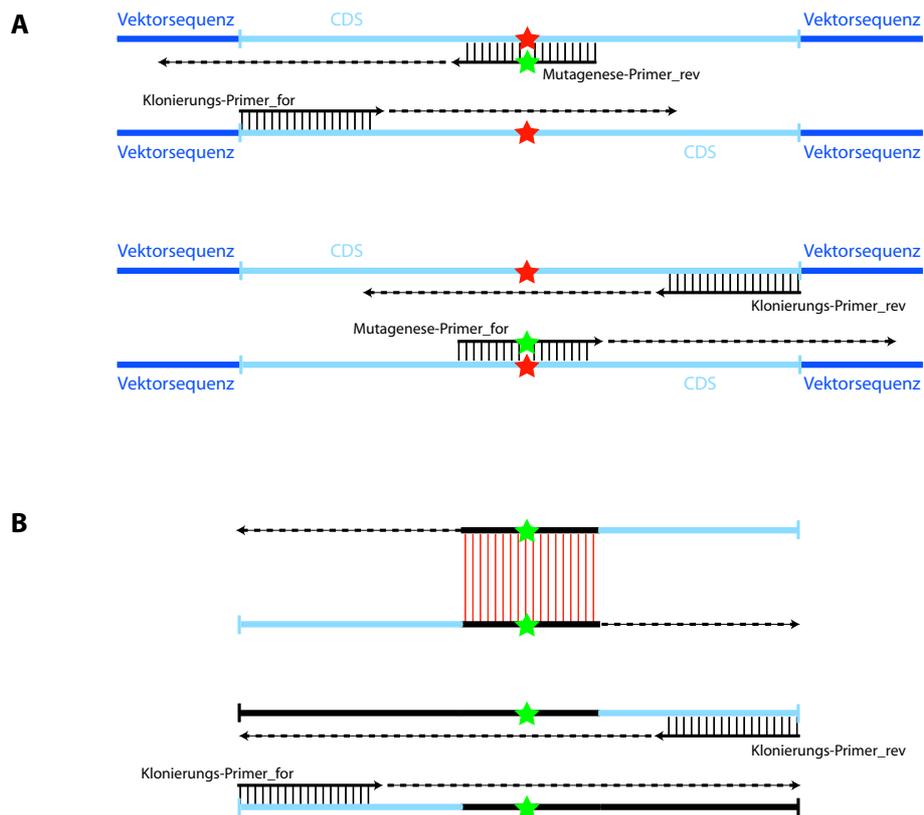
Insert-Sequenzen von Plasmiden können durch zielgerichtete Mutagenese manipuliert werden. Zum Zweck des Austausches, des Entfernens oder des Hinzufügens einer bestimmten Anzahl von Nukleotiden wurde ein Paar komplementärer und spezifischer Primer designed, welche die Mutation in ihrer Kernregion einbinden und sie sowohl in 3'- als auch in 5'-Richtung um 15-20 bp flankieren. In dieser Arbeit wurde die PCR-basierte, zielgerichtete Mutagenese in erster Linie zur Nukleotidsubstitution und einem daraus resultierenden Aminosäureaustausch nach Translation eingesetzt. Durch die jeweilige Kombination der Mutagenese-Primer mit Primern, die ursprünglich der Volle-Länge-Amplifikation der entsprechenden cDNA dienten, wurden zwei PCR-Fragmente gewonnen, die im Anschluß in einer weiteren Reaktion als Template dienen und unter Verwendung der beiden Volle-Länge-Primer fusioniert werden konnten (Vergleiche Abbildung 4.2). Reaktionsansatz und PCR-Programm entsprachen dabei im Wesentlichen den Standardangaben.

### **Sequenzierung von DNA**

Die Identifizierung oder Verifizierung von DNA-Fragmenten oder Plasmiden wurden auf dem ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) durchgeführt. Für die Sequenzier-PCR wurde der BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Aufreinigung der Proben erfolgte entweder mit dem Dye Ex 2.0 Spin Kit (Qiagen) oder dem Montage<sup>TM</sup> SEQ<sub>96</sub> Sequencing Reaction Cleanup Kit (Millipore) jeweils nach Herstellerprotokoll.

### **Quantitative RealTime-PCR**

Die quantitative RealTime-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht, darüber hinaus aber die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus (RealTime) erfasst werden. In vorliegender Arbeit erfolgte die Detektion mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, einem interkalierenden Farbstoff, der sich in die doppelsträngige DNA einlagert. Der so entstehende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge von 480 nm und emittiert grünes Licht bei 520 nm. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufs (der aus mehreren Zyklen besteht) wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen.



**Abbildung 4.2:** PCR-basierte, zielgerichtete Mutagenese. (A) Unabhängige PCR-Reaktionen zur Amplifizierung zweier Teilfragmente der durch zielgerichtete Mutagenese zu manipulierenden Insert-Sequenz. Durch die Verwendung von komplementären und spezifischen Primern (Mutagenese-Primern) in Kombination mit Primern, die ursprünglich der Volle-Länge-Amplifikation der entsprechenden cDNA dienten (Klonierungs-Primer), entstehen zwei Teilfragmente, die beide die gewünschte Mutation aufweisen. (B) In einer Fusions-PCR, bei der die im ersten Schritt erhaltenen Teilfragmente als Template dienen, wird unter Verwendung der beiden Klonierungs-Primer eine vollständige Insert-Sequenz amplifiziert, welche die erwünschte Mutation in sich trägt.

**Template zur Expressionsanalyse.** Die Erstellung eines Expressionsprofils auf mRNA-Ebene der in dieser Arbeit zu untersuchenden Proteine wurde unter Verwendung des Tissue Scan<sup>TM</sup> Human Major Tissue qPCR Arrays (Origene) durchgeführt. Besagte Panels enthalten 48 first-strand cDNAs, die aus unterschiedlichen menschlichen Geweben gewonnen wurden. Zum Ausschluß einer Detektion von individuellen Unterschieden in der Genexpression aus Individuen mit verschiedener ethnischer Herkunft wurden diese gepoolt. Die große Variabilität an Templates ermöglichte eine umfassende gewebespezifische Analyse.

**Selektion und Test der Primer.** Zum Design adäquater Primer für die angestrebten quantitativen RealTime-PCRs wurde das frei im Internet verfügbare Programm Primer3 verwendet. Die Kriterien zur Auswahl der Primer sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

**Tabelle 4.1:** Parameter für die Primerauswahl mit Primer3.

Parameter	Auswahlbereich
Mispriming Library	Human
Target	X,20 <sup>1</sup>
Produktgröße	120-220 bp
Max 3' Stability	7
Max Mispriming	10
Pair Max Mispriming	20
Primerlänge	18-22 bp
Schmelztemperatur Primer (T <sub>m</sub> )	58-61 °C
Max T <sub>m</sub> Differenz	1,50
GC-Gehalt	45-56 %
Max Self Complementarity	6
Max 3' Self Complementarity	2

<sup>1</sup> „X“ kennzeichnet eine Exon-Intron-Grenze; die Zahl „20“ hinter dem Komma gibt dabei an, dass der Bereich 10 bp vor und hinter dieser Grenze auf jeden Fall im Amplifizierungsprodukt einbezogen sein muss.

Alle mittels Primer3 designten Primerpaare wurden vor der eigentlichen quantitativen RealTime-PCR-Analyse auf ihre Eignung überprüft. Zur Ermittlung von Spezifität und Linearität der Reaktion wurden Verdünnungsreihen verfügbarer cDNAs (zumeist 1:10, 1:100 und 1:1000) unter Verwendung des standardisierten Amplifizierungsprotokolls getestet. Die Beurteilung der Spezifität erfolgte durch Auswertung der Schmelzkurven eines Amplifizierungsproduktes der qRT-PCR. Zeigte die Spitze einer Schmelzkurve einen einzelnen Peak mit einem Maximum, das einen klar erkennbaren Schmelzpunkt definiert, so wurde das verwendete Primerpaar als geeignet eingeschätzt. Primerpaare, die hingegen zusätzliche Peaks oder Verschiebungen in der Schmelztemperatur und somit unerwünschte Nebenprodukte aufzeigten, wurden verworfen.

**Standardisierte Amplifizierungsbedingungen.** Aufgrund der Verwendung des vorgefertigten Tissue Scan<sup>TM</sup> Human Major Tissue qPCR Arrays (Origene) und lediglich eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR Green I) mußte die Amplifizierung von Targetgen und endogener Kontrolle in unterschiedli-

chen Reaktionen erfolgen. Aus diesem Grund wurden alle Experimente am TaqMan RealTime-PCR Detektionssystem ABI Prism 9700HT (Applied Biosystems) nach standardisierten Bedingungen (vergleiche Tabelle 4.2) durchgeführt.

**Tabelle 4.2:** Amplifizierungsprotokoll für den ABI Prism 9700HT.

Prozess	Temperatur	Zeit [min]	Anzahl Zyklen
Aktivierung der Hotstart Taq	95 °C	10:00	1
Denaturierung	95 °C	0:15	39
Annealing und Amplifizierung	60 °C	1:00	
Schmelzkurve	95 °C	0:15	1
	60 °C	0:15	
	95 °C	0:15	

Die einzelnen PCR-Ansätze wurden mit dem 2x konzentrierten iTaq™ SYBR Green Supermix with ROX (BioRad) angesetzt (vergleiche Tabelle 4.3). Das cDNA-Template lag bereits in definierter Konzentration und lyophilisiert im Panel vor.

**Tabelle 4.3:** Reaktionsansatz für die quantitative RealTime-PCR.

Reagenz	eingesetztes Volumen
iTaq SYBR Green Supermix with ROX (2x)	750 $\mu$ L
Primer forward (10 $\mu$ M)	50 $\mu$ L
Primer reverse (10 $\mu$ M)	50 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	650 $\mu$ L

**Auswertung der qRT-PCR-Ergebnisse.** Die Auswertung der Ergebnisse der quantitativen RealTime-PCR erfolgte nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Eine Normalisierung wurde sowohl gegen den Housekeeper GAPDH als auch gegen das niedrigste Expressionslevel durchgeführt.

## 4.5 Molekulargenetische Methoden mit RNA

### 4.5.1 Isolierung und Präzipitierung von RNA

#### Gewinnung von gesamt-RNA aus eukaryotischen Zelllinien

Zur Isolierung von gesamt-RNA aus eukaryotischen Zelllinien wurde das SV Total RNA Isolation System (Promega) verwendet. Nach direkter Zugabe von 175  $\mu$ L  $\beta$ -mercaptoethanol-haltigem SV RNA Lysis Buffer auf die zweifach mit kaltem PBS gewaschenen Zellen (gewöhnlich  $3 \times 10^6$  Zellen oder ein konfluent bewachsenes Well einer 6-well-Platte) und dem Überführen der Suspension in

ein steriles 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß erfolgte die Gewinnung der gesamt-RNA strikt nach Herstellerangaben. Alternativ wurde das Lysat bis zur RNA-Extraktion bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die RNA wurde mit einem Volumen von  $40\text{ }\mu\text{L}$  nukleasefreiem  $\text{H}_2\text{O}$  von den Säulen eluiert. Nach erfolgter Isolierung wurden Quantität und Qualität der angefertigten Nukleinsäure-Präparation wie unter 4.4.5 angegeben ermittelt.

### Präzipitierung von RNA

Ähnlich wie bei DNA kann die Konzentration und die Reinheit von RNA in sehr stark verdünnter oder ungenügend reiner Lösung durch Fällung erhöht werden. Die angewendete Methode entspricht der bereits für DNA beschriebenen (siehe 4.4.4).

### 4.5.2 Reverse Transkription von mRNA in cDNA

Die reverse Transkription von mRNA in cDNA wurde mit dem RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas) nach den Angaben der Hersteller durchgeführt. Je nach Anwendung erfolgte die Umschreibung mit Oligo (dT)<sub>15</sub> oder Random Hexamer Primern.

### 4.5.3 Handhabung und Messung

Nach Präparation von RNA wurden dieser zur Verhinderung ihrer Degradierung 20-40 U Ribonuklease-Inhibitor (MBI Fermentas) zugegeben. Die Aufbewahrung der gewonnenen RNA erfolgte bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte analog zur Bestimmung der Konzentration von DNA (vergleiche 4.4.5). Ihre Berechnung erfolgte gemäß folgender Formel:

$$\text{OD}_{260\text{ nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40\text{ ng}/\mu\text{L} = c\text{ [ng}/\mu\text{L}]$$

Die Qualitätsabschätzung erfolgte anhand des Wertes R, der das Verhältnis von  $\text{OD}_{260\text{ nm}}$  zu  $\text{OD}_{280\text{ nm}}$  beschreibt. Der Quotient aus  $\text{OD}_{260\text{ nm}}$  und  $\text{OD}_{280\text{ nm}}$  sollte für RNA optimalerweise bei  $R = 1,8$  liegen.

#### Bestimmung der RNA-Integrität mittels Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Integrität isolierter RNA wurde diese auf einem 1 %igem Agarosegel in TBE-Puffer (vergleiche 4.4.5) aufgetrennt. Obwohl für die RNA-Separation normalerweise denaturierende Formaldehydgele mit MOPS-Puffer verwendet werden, reicht die Auftrennung über TBE-Agarosegele für die Abschätzung ihrer Qualität aus.

#### 4.5.4 Analyse der Genexpression durch Northern Blot

##### Hybridisierung von cDNA-Sonden an membrangebundene RNA: Northern Blot

Zur Durchführung von Genexpressions-Analysen kann RNA an Nylonmembranen immobilisiert und anschließend mit DNA- oder RNA-Sonden hybridisiert werden. Der Prozeß des Transfers und der Immobilisierung von RNA auf besagte Membranen wird in Anlehnung an die entsprechende DNA-Technik (Southern Blot; benannt nach seinem Entwickler Edward Southern) als Northern Blotting bezeichnet.

In vorliegender Arbeit wurde die bereits vorgefertigte Northern Blot-Membran FirstChoice Northern Human Blot II (Ambion) in Kombination mit den empfohlenen Wasch- als auch Ultrahyb-Hybridisierungslösungen nach Angaben des Herstellers verwendet.

Als Hybridisierungssonden kamen jeweils aufgereinigte (vergleiche 4.4.2) und mittels des Strip-EZ DNA Kit (Ambion) und [<sup>32</sup>P]- $\alpha$ -ATP Nukleotiden (Amersham Biosciences) radioaktiv markierte PCR-Produkte, strikt nach Protokoll des Herstellers, zum Einsatz. Bei besagten Produkten handelte es sich zumeist um Volle-Länge-Amplifikate der kodierenden Sequenz der zu untersuchenden Gene.

Sowohl Prähybridisierung als auch Hybridisierung der Northern Blot-Membran wurden unter Verwendung der auf 68 °C vorgewärmten Ultrahyb-Lösung in einem Rotationsofen bei 42 °C durchgeführt. Am Folgetag erfolgte zunächst ein zweimaliges Waschen der hybridisierten Membran mit Ambion's NorthernMax Low Stringency Wash-Lösung bei 42 °C, im Anschluß eine Wiederholung des Waschschrittes mit NorthernMax High Stringency Wash-Lösung, ebenfalls bei 42 °C.

Nach dem Waschen wurde die Northern Blot-Membran in Klarsichtfolie eingeschweißt und bis zur späteren Exposition in einer mit Verstärkerfolie ausgestatteten Filmkassette (Kodak) aufbewahrt.

##### Detektion der Signale und Dokumentation

Für eine schnelle und umgehende Detektion von Signalen wurden Fuji-Phosphoimager-Platten für 2 h auf der Membran exponiert. Das Auslesen der Signale wurde mittels des Phosphoimagers FLA3000 (FujiFilm) durchgeführt, zum Scannen der Bilder wurde AIDA Software verwendet. Im Falle von lediglich schwachen Signalen, für deren Detektion das Verfahren des Phosphoimaging aufgrund niedriger Sensitivität ungeeignet ist, erfolgte die Detektion autoradiographisch unter Verwendung von BioMax XAR Filmen (Kodak). Besagte Filme wurden über Nacht bis hin zu einigen Tagen auf der radioaktiven Membran exponiert und anschließend in einem Filmentwickler entwickelt.

##### Strippen einer bereits hybridisierten Membran

Vor der Wiederverwendung, d.h. einer erneuten Hybridisierung einer bereits genutzten Northern Blot Membran war ein sogenanntes Strippen von Nöten, welches nach dem Protokoll des Strip-EZ DNA Kits (Ambion) durchgeführt wurde. Zur Überprüfung des Verfahrens wurden radioaktive Signale sowohl mit einer Ionisierungskammer ausgemessen als auch autoradiographisch detektiert.

## 4.6 Proteinbiochemische Methoden

### 4.6.1 Proteinexpression und -aufreinigung in Bakterien

#### Überexpression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Es ist bekannt, daß Plasmid-kodierte Gene in Bakterien in selbem Maße wie zelleigene Gene exprimiert werden. Da die Produktion von Fremdproteinen während des Wachstums der Bakterien toxisch wirken kann, wird der *tac*-Promotor des verwendeten pGEX/GST-Vektors (pGEX $\Delta$ BamHI, basierend auf pGEX 2T, Amersham) während der exponentiellen Wachstumsphase durch den Plasmid-kodierten *lac*-Repressor inhibiert. Erst bei einer optischen Dichte OD<sub>600 nm</sub> von ca. 0,7 (Übergang zur stationären Phase) wird die Proteinproduktion durch Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid (IPTG) zur Bakteriensuspension induziert. Die Repression wird aufgehoben, da IPTG eine weitere Kopplung des *lac*-Repressors an den *tac*-Promotor verhindert. In Folge der Induktion produziert die Bakterienkultur das GST-Protein über mehrere Stunden in großen Mengen.

**Überexpression.** Die Synthese von rekombinanten GST-Fusionsproteinen erfolgte durch regulierte Überexpression in *E. coli*. Um lediglich die Induzierbarkeit der Proteinexpression zu überprüfen wurden 25 mL, für die Expression hinsichtlich einer späteren Aufreinigung der rekombinanten Proteine wurden 200 mL LB-Amp Medium mit einem, das entsprechende DNA-Konstrukt tragenden Bakterienklon (üblicherweise BL21 CodonPlus (DE3) RP) angeimpft (zumeist mit einer 1/100-Verdünnung einer vorbereiteten Übernachtskultur). Bei Erreichen einer optischen Dichte OD<sub>600 nm</sub> von 0,6-1,0 (Zeitspanne von etwa 3 h) wurde die Expression des Fusionsproteins durch Zugabe von IPTG (finale Konzentration 0,1-0,5 mM) induziert und die Kultur bei 37 °C (um einer Bildung von inclusion bodies vorzubeugen wahlweise auch bei 18 °C oder 28 °C) weiter geschüttelt. Bei einer optischen Dichte OD<sub>600 nm</sub> von >2,8 (Zeitspanne nach Induktion etwa 3,5 h) wurden Bakterienpellets (im Falle der Testexpression lediglich aus 1,8 mL-Aliquots der Zellsuspension, ansonsten aus der Gesamtkultur) durch 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 4500 rpm gewonnen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

**Zellaufschluß.** Das im Rahmen der Überexpression eines Proteins erhaltene Bakterienpellet (die im Folgenden beschriebene Durchführung bezieht sich auf die Aufarbeitung eines Bakterienpellets, resultierend aus einer 200 mL Kultur) wurde in 5 mL PBS resuspendiert und die Suspension im Anschluß mit Protease-Inhibitor (final 1x) und Lysozym (finale Konzentration 0,1 mg/mL) versetzt. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT erfolgte der Zellaufschluß durch mehrmaliges Einfrieren in flüßigem Stickstoff und unmittelbarem Auftauen der Bakteriensuspension in einem warmen Wasserbad. Alternativ hierzu konnte der Zellaufschluß auch durch Ultraschallbehandlung (4-5x [10 s Ultraschall, 15 s auf Eis]) erzielt werden. Die Zugabe von ca. 1 U Benzonase (= Endonuklease) und 300  $\mu$ L 100 mM MgCl<sub>2</sub> führte nach einer Inkubation von 45 min bei RT zur vollständigen Degradierung der in der Suspension befindlichen genomischen DNA. Eine finale Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 4500 rpm befreite die Suspension von Zelltrümmern und DNA-Bestandteilen und lieferte ein klares, proteinreiches Lysat.

**Proteinaufreinigung.** Die Aufarbeitung der exprimierten GST-Fusionsproteine erfolgte nach Vorschrift des GST Gene Fusion Systems (Amersham Biosciences). 400  $\mu$ L Glutathion-Sepharose-

Beads (Glutathion-Sepharose 4 B, Amersham Biosciences) wurden zunächst bei 500 rpm und 4 °C für 5 min abzentrifugiert und im Anschluß 3x mit dem 10fachen Volumen an eiskaltem PBS gewaschen. Bevor das Proteinextrakt (5 mL, vergleiche Zellaufschluß) auf die vorbereitete Matrix gegeben wurde, konnte optional eine Probe von 10 µL (Proteinextrakt vor der Kopplung an die Beads) zur späteren Analyse auf einem SDS-Gel entnommen werden. Die Anbindung der GST-Proteine an die Matrix erfolgte üN bei 4 °C in einem Rotorschüttler. Anschließend wurden die Beads bei 500 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand für die Kontrolle der Reinigung auf einem analytischen SDS-Proteingel gesammelt. Die Matrix wurde erneut 3x mit dem 10fachen Volumen an eiskaltem PBS gewaschen. Die einzelnen Waschschrirte waren ebenfalls aufzubewahren.

Die Abtrennung des gebundenen Proteins von der Matrix konnte durch zwei unterschiedliche Verfahren erreicht werden. Da der verwendete Vektor derart konstruiert ist, daß sich zwischen GST und dem inklonierten Protein eine Thrombin-Spaltstelle befindet, konnte das Protein von Interesse zum einen durch Verdau mit der Serinprotease Thrombin von GST abgespalten und dadurch von der Säule eluiert werden. Hierzu wurden auf die mit GST-Fusionsprotein beladenen Sepharose-Beads jeweils 400 µL Thrombinlösung (20 µL Thrombin, 1:20 in eiskaltem PBS verdünnt) gegeben und für 3 h bei RT im Rotorschüttler inkubiert. Es folgte das Abzentrifugieren der Sepharose-Matrix und die Abnahme des Überstands, der nun das vom GST abgespaltene Protein enthielt. Wiederum wurde die Matrix im Anschluß 3x mit 200 µL eiskaltem PBS gewaschen und die einzelnen Waschschrirte für das analytische SDS-Gel gesammelt. Optional bestand die Möglichkeit, die vorliegende Proteinfraktion abschließend vom eingesetzten, sich nach wie vor in der Lösung befindlichen Thrombin zu befreien. Dies geschah durch eine weitere Aufreinigung unter Verwendung von Benzamidin-Sepharose 4 fast flow (Amersham Biosciences). Zu diesem Zweck wurden 100 µL Benzamidin-Sepharose-Beads bei 500 rpm und 4 °C für 5 min abzentrifugiert und im Anschluß 3x mit dem 10fachen Volumen an eiskaltem PBS gewaschen. Die Anbindung der in der Lösung erhaltenen Serinprotease Thrombin an die Matrix erfolgte üN bei 4 °C in einem Rotorschüttler. Anschließend wurden die Beads bei 500 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser enthielt nun das gewünschte Protein in Reinstform. Die Benzamidin-Matrix wurde abschließend 3x mit dem 10fachen Volumen an eiskaltem PBS gewaschen und die einzelnen Waschschrirte zum späteren Auftragen auf ein analytisches SDS-Proteingel aufbewahrt.

Eine weitere Möglichkeit zur Wiedergewinnung des an die Glutathion-Sepharose gebundenen Proteins war die Elution des GST-Fusionsproteins durch Verwendung von reduziertem Glutathion (Kompetition). Bei Verwendung dieses Verfahrens wird das interessierende Protein als Fusionsprotein von der Matrix gelöst. Das GST verbleibt nicht, wie nach der eben geschilderten Thrombinspaltung, an der Matrix gebunden, sondern ist nach der Elution weiter an das Protein von Interesse angehängt. Nach Zugabe von 200 µL reduziertem Glutathion auf die Sepharose-Matrix folgte eine Inkubation von 3 h bei RT im Rotorschüttler. Die Beads wurden anschließend für 10 min bei 500 rpm und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und für das Überprüfen der Reinigung auf einem SDS-Proteingel gesammelt. Der Vorgang war mit frischen Aliquots des reduzierten Glutathions zwei weitere Male zu wiederholen.

### Überexpression von StrepTag-Fusionsproteinen

Die StrepTag-Technologie (IBA Technologies) basiert auf der höchst selektiven Bindung von gentechnisch manipuliertem Streptavidin (Strep-Tactin) an StrepTagII-Fusionsproteine. Laut Angaben des Herstellers erlaubt sie die einfache Aufreinigung fast aller rekombinanten Proteine unter, für das Bewahren ihrer Bioaktivität essentiellen, physiologischen Bedingungen. Das StrepTag-System kann dazu verwendet werden, funktionelle StrepTagII-Proteine aus grundsätzlich jedem Expressionssystem (z.B. Baculovirus, Säugetierzellen, Hefen oder Bakterien) zu gewinnen. In dieser Arbeit wurde besagtes System, alternativ zum bereits beschriebenen GST Gene Fusion System, zur prokaryotischen Proteinexpression eingesetzt.

Die Expressionskassetten der pASK-IBA-Vektoren stehen unter der Kontrolle des tetA-Resistenzgens, das nach Zugabe von geringen, nicht antibiotisch wirksamen Konzentrationen an Anhydrotetracyclin (AHT) die Expression der klonierten cDNA induziert. In Abwesenheit des Induktors wird der Promotor durch das ebenfalls auf dem Vektor kodierte tet-Repressorgen reprimiert, um einen Wachstumsnachteil der Bakterien durch die Produktion des Fremdproteins zu vermeiden. Da der tetA-Promotor/Operator keinen weiteren zellulären Regulationsmechanismen unterliegt, kann weitestgehend jeder *E. coli*-Bakterienstamm verwendet werden.

Durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Vektoren (pASK-IBA12 zur periplasmatischen, pASK-IBA13+ zur cytosolischen Expression der Proteine von Interesse; beide fusionieren das acht Aminosäuren lange Strep-Tag WSHPQFEK am N-Terminus des rekombinanten Proteins) sollte eine Expression der Proteine von Interesse im großen Maßstab hinsichtlich einer späteren Aufreinigung erzielt werden.

**Überexpression.** Die Synthese von rekombinanten StrepTag-Fusionsproteinen erfolgte, wie auch die der GST-Fusionsproteine, durch eine regulierte Überexpression in *E. coli*. Um im Vorfeld einer möglichen Gewinnung im großen Maßstab die Induzierbarkeit der Proteinexpression zu überprüfen, wurden 25 mL LB-Amp Medium mit einem, das entsprechende DNA-Konstrukt tragenden Bakterienklon (üblicherweise BL21 CodonPlus (DE3) RP) angeimpft (zumeist mit einer 1/100-Verdünnung einer vorbereiteten Übernachtskultur). Bei Erreichen einer optischen Dichte  $OD_{600\text{ nm}}$  von 0,6-1,0 (Zeitspanne von etwa 3 h) wurde die Expression des Fusionsproteins durch Zugabe von Anhydrotetracyclin (finale Konzentration 200  $\mu\text{g/L}$ ) induziert und die Kultur bei 37 °C (um einer Bildung von inclusion bodies vorzubeugen wahlweise auch bei 18 °C oder 28 °C) weiter geschüttelt. Bei einer optischen Dichte  $OD_{600\text{ nm}}$  von >2,8 (Zeitspanne nach Induktion etwa 3,5 h) wurden Bakterienpellets aus 1,8 mL-Aliquots der Zellsuspension durch 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 4500 rpm gewonnen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

**Zellaufschluß.** Die Gewinnung eines klaren proteinreichen Lysats nach cytosolischer als auch periplasmatischer Expression der StrepTag-Fusionsproteine erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (IBA Technologies). Alternativ hierzu wurden die nach Expression gewonnenen Bakterienpellets nach dem beschriebenen Protokoll zur Präparation von GST-Fusionsprotein-haltigen Lysaten aufgearbeitet.

### 4.6.2 Proteinexpression und -aufreinigung in Hefen

Für die heterologe Proteinexpression stellen Hefen ein Bindeglied zwischen prokaryotischen Expressionssystemen und eukaryotischen Insekten- und Säugerzellsystemen dar. Sie kombinieren die Vorteile der Bereitstellung der meisten eukaryotischen post-translationalen Modifikationen wie Phosphorylierung und Glycosylierung mit hohen Expressionsraten bei kurzen Generationszeiten und geringen Nährmedienansprüchen.

In typischen *S. cerevisiae*-Laborstämmen ist die Transkription, ausgehend vom GAL1-Promotor, in Anwesenheit von Glucose reprimiert. Das Entfernen der Glucose und die Zugabe von Galactose als Kohlenstoffquelle induzieren die Transkription. Hält man die Zellen in Glucose, so ist die größtmögliche Repression und die geringste basale Transkription des GAL1-Promotors gewährleistet. Erst der Transfer der Zellen von Glucose- zu Galactose-reichem Medium hebt die Repression des GAL1-Promotors auf und induziert die Transkription der Zielgene. In dieser Arbeit kam zur Expression der rekombinanten Proteine von Interesse in Hefen das pYES2.1 TOPO TA Expression Kit (Invitrogen) zum Einsatz. Mittels des um eine MCS (basierend auf pcDNA4 myc-his Version B; Invitrogen) erweiterten pYES2.1/V5-His-TOPO-Vektors (Invitrogen) sollte nach dessen Transformation in den *S. cerevisiae*-Stamm CEN-PK2 und anschließender Induktion der Transkription mittels Galactose eine für die im Folgenden geplante Aufreinigung hinreichende Expression der gewünschten Fusionsproteine (C-terminale Fusion mit V5-Epitop und His-Tag) erzielt werden.

**Überexpression.** Die Gewinnung von rekombinanten V5-His-Fusionsproteinen im eukaryotischen System erfolgte durch regulierte Expression in *S. cerevisiae*. Nach Inokulation einer Einzelkolonie des, das generierte pYES2.1-Konstrukt tragenden CEN-PK2-Stammes (entnommen von einer Masterplate oder einem Glycerolstock) in 50 mL Induktionsmedium wurden die Hefezellen für 1-2 Tage bei 30 °C und 250 rpm angezogen. Anschließend wurden die Zellen bei 1500 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und erhaltenes Pellet in 500 µL sterilem H<sub>2</sub>O resuspendiert. Nach Überführen der Suspension in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß und einer finalen Zentrifugation für 30 sec bei 14000 rpm wurde der Überstand erneut abgenommen und die Pellets bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

- **Induktionsmedium**

6,70 g Yeast Nitrogen Base

0,77 g DropOut(DO)-Zusatz (-Ura)

ad 900 mL H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (pH 7,4)

*Autoklavieren des Nährmediums bei 121 °C für 20 min*

100 mL 20 % Galactose (steril-filtriert)

**Zellaufschluß.** Das im Rahmen der Überexpression erhaltene Hefepellet (die im Folgenden beschriebene Durchführung bezieht sich auf die Aufarbeitung eines Hefepellets, resultierend aus einer 50 mL Kultur) wurde in 500 µL Breaking-Puffer aufgenommen und die erhaltene Suspension im Anschluß für 5 min bei 1500 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands erfolgte ein erneutes Resuspendieren der Zellen in 500 µL Breaking-Puffer und die Zugabe des entsprechenden

Volumens an sterilen Glasperlen (Sigma). Zur endgültigen Lyse der Hefezellen wurde die Zellsuspension 30 sec gevortext und anschließend 30 sec auf Eis gekühlt. Dieser Schritt war im Folgenden weitere vier Male zu wiederholen. Es folgte eine Zentrifugation der die Glasperlen enthaltenden Suspension für 10 min bei 14000 rpm. Der erhaltene Überstand wurde sorgfältig abgenommen und in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das proteinreiche Lysat konnte daraufhin mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe 4.6.4) analysiert werden.

- **Breaking-Puffer**

50 mM Natriumphosphat ( $\text{NaP}_i$ , pH 7,4)

1 mM PMSF

5 % Glycerol

### 4.6.3 Proteinexpression und -aufreinigung in Säugetierzellkultur

Zur Expression und späteren Aufreinigung der Kandidatenproteine in Säugetierzellkultur wurden zunächst HEK293-Zellen angezogen und mit den entsprechenden pcDNA4 myc-his Version B (Invitrogen)-Konstrukten transient transfiziert (vergleiche Anzucht von HEK293-Zellen zur Messung der Substratspezifität *in vitro*, 4.3.3). Zur Gewinnung der Proteine von Interesse wurde der Mem-PER Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit (Pierce Biosciences) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

### 4.6.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Schagger und von Jagow erreicht. Die Wahl der Prozentigkeit des Gels richtete sich dabei nach der Größe und dem gewünschten Trennungsgrad der aufzutragenden Proteine. Für jeweils zwei Tricingele, gegossen unter Verwendung des Mini-PROTEAN 3 Systems (BioRad), wurden folgende Komponenten eingesetzt (vergleiche Tabelle 4.4):

**Tabelle 4.4:** Trenn- und Sammelgel für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.

Reagenz	10 % Trenngel	4 % Sammelgel
30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid	3,30 mL	0,67 mL
Gelpuffer	3,00 mL	0,67 mL
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	1,00 mL	3,67 mL
50 % Glycerin	2,50 mL	
TEMED	20 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$
10 % APS	50 $\mu\text{L}$	40 $\mu\text{L}$

Die für die Gelelektrophorese bestimmten Proteinlösungen wurden mit 5x Lämmli-Auftragspuffer

versetzt und 5 min auf 95 °C erhitzt. Nach Vorbereitung der Proben konnten diese in die Gel-taschen des Sammelgels pipettiert und die für die Auftrennung erforderliche Spannung angelegt werden. Die Elektrophorese wurde mit einem konstanten elektrischen Feld von 80 V gestartet und nach Einlaufen der Probenfront in das Trenngel für ca. 90 min bei 100-140 V fortgeführt. Der Lauf wurde beendet, nachdem die Farbstoff-Front das Ende des Gels erreicht hatte. Nach Entnahme der Gele aus der Elektrophorese-Kammer wurden diese für ca. 30 min bei RT in Coomassie-Blau gefärbt. Im Anschluß wurde nicht spezifisch an das Protein gebundener Farbstoff durch Aufkochen oder Inkubation des Gels in 10 %iger Essigsäure entfernt. Zur längeren Aufbewahrung wurde das Gel zwischen zwei Lagen Zellophan im Vakuum 2 h bei 80 °C getrocknet (Slab Gel Dryer, BioRad).

- **Gelpuffer**

3 M Tris/HCl, pH 8,45

0,3 % SDS

- **Kathodenpuffer**

100 mM Tris

100 mM Tricin

0,1 % SDS

- **Anodenpuffer**

200 mM Tris/HCl, pH 8,9

- **SDS-Probenpuffer (5x Lämmli)**

50 % Glycerin

160 mM Tris/HCl, pH 6,8

5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol

2 % SDS

0,02 % Bromphenolblau

- **Coomassie-Färbelösung**

500 mg Coomassie Brilliant Blue G-280

200 mL Methanol

5 mL Essigsäure

ad 500 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

### 4.6.5 Western Blot

Proteine, die durch SDS-PAGE aufgetrennt wurden, können auf Nitrocellulose-Membranen übertragen und mit proteinspezifischen Antikörpern detektiert werden. Zu diesem Zweck wurde eine auf Größe des Proteingels zugeschnittene PVDF-Membran (Pall Corporation) zunächst mit 100 %igem Methanol benetzt und anschließend in Blot-Puffer überführt. Das zuvor angefertigte

Proteingel wurde zur Equilibrierung ebenfalls für 15-30 min in den Blot-Puffer gegeben, entsprechend zugeschnittene Filterpapiere wurden in besagtem Blot-Puffer getränkt. Nach Ablauf der Equilibrierungszeit wurden zwei Filterpapiere, die Membran, das Proteingel und erneut zwei Filterpapiere zwischen die Elektroden des Blot-Geräts geschichtet (BioRad Trans-Blot, SDSemidry-Blot-System). Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 20 V für 30 min. Um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren wurde die geblotete Membran anschließend etwa 30 min in 5 % Magermilchpulver geschwenkt und anschließend mit PBS gewaschen. Nach 1h-Inkubation der Membran mit dem ersten Antikörper, verdünnt in 0,5 % Milchpulverlösung, bei 4 °C und dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Membran für weitere 1-2 h mit einem zweiten Antikörper (Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG + IgM, Dianova, verdünnt 1:1000 in 0,5 % Milchpulverlösung) bei RT inkubiert. Verwendete Antikörper sind unter 5.1.1 aufgeführt. Abschließend erfolgten erneut drei Waschschrirte mit PBS und die Visualisierung mittels DAB- bzw. ECL-Färbung. Zur Färbung mittels DAB wurde die Membran in entsprechender Färbelösung inkubiert. Nach ca. 10 min war eine ausreichende Färbung erreicht und die Reaktion konnte durch Waschen der Membran mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  gestoppt werden. Abschließend erfolgte eine Trocknung der Membran. Alternativ hierzu wurde eine ECL-Färbung unter Verwendung des Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer) durchgeführt. Sie erfolgte strikt nach Angaben des Herstellers. Zur Visualisierung der Signale wurde die Blotmembran auf BioMax XAR Filmen (Kodak) exponiert.

- **Blot-Puffer**

- 48 mM Tris
- 39 mM Glycin
- 1,3 mM SDS
- 20 % Methanol

- **DAB-Färbepuffer (5x)**

- 0,225 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
- 1,590 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 11,000 g NaCl
- 8,500 g Imidazol
- 625  $\mu\text{L}$  Tween-20
- ad 250 mL  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

Zur Herstellung des 1x Färbepuffers wurden 5 mL 5x Färbepuffer mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  auf 25 mL aufgefüllt. Anschließend wurden 100  $\mu\text{L}$   $\text{CoCl}_2$  (10 mg/mL) und eine Spatelspitze 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (Sigma) zugegeben. Kurz vor der Färbung folgte die Zugabe von 10  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

#### 4.6.6 In vitro-Translation von Proteinen

Zellfreie Systeme für die Genexpression und Proteinsynthese *in vitro* existieren für zahlreiche prokaryotische [222] und eukaryotische Systeme [5] [159]. Bei den sogenannten gekoppelten zellfreien Systemen wird eine prokaryotische Phagen-RNA Polymerase mit eukaryotischen Extrakten kom-

biniert und zur *in vitro*-Synthese des Proteins von Interesse der Phagen Promotor (T7, SP6 oder T3) auf dem Vektortemplate verwendet. Somit können Transkription und Translation direkt in einem Reaktionsansatz erfolgen. In dieser Arbeit wurde zum Zwecke der *in vitro*-Translation von Proteinen das TNT Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) verwendet. Die Translation der Proteine erfolgte mit Hilfe von Kaninchen Reticulozyten Lysat in Anwesenheit von [<sup>35</sup>S]-Methionin im 25  $\mu$ L Maßstab. Die jeweiligen Ansätze setzten sich aus 20  $\mu$ L TNT T7 Quick Master Mix, 1  $\mu$ L [<sup>35</sup>S]-Methionin (1  $\mu$ M), 0,5  $\mu$ g Plasmid-DNA (mit T7-Promotor) und H<sub>2</sub>O<sub>bide</sub>st (ad 25  $\mu$ L) zusammen. Es folgte eine Inkubation des Reaktionsansatzes für 2-4 h bei 30 °C.

Zur Überprüfung der Translation wurden 5  $\mu$ L des Translationsansatzes mit 20  $\mu$ L 5x Lämmli-Auftragspuffer versetzt, 10 min auf 95 °C erhitzt, 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert und 7,5  $\mu$ L des daraus resultierenden Überstands auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend für 15 min in 10 %iger Essigsäure inkubiert und im Geltrockner zwischen Zellophan bei 80 °C getrocknet. Das translatierte Protein enthält radioaktives [<sup>35</sup>S]-Methionin und ist nach einer  $\alpha$ N-Exponierung des Gels autoradiographisch an entsprechender Stelle nachweisbar.

#### 4.6.7 GST-Pulldown Assay

Zur Verifizierung von Protein-Protein-Interaktionen wurden GST-Pulldown Assays durchgeführt. Bei besagtem Assay wird das zu untersuchende GST-Fusionsprotein X über den GST-Teil an das Trägermaterial (Glutathion-Sepharose) immobilisiert und mit dem *in vitro*-translatierten, [<sup>35</sup>S]-markierten potentiellen Interaktionspartner Y inkubiert. Interagieren Protein X und Protein Y miteinander, bleibt die Radioaktivität auch nach mehreren Waschsritten in der Probe und kann mittels SDS-PAGE und Autoradiographie nachgewiesen werden.

Für den GST-Pulldown Assay wurden 100  $\mu$ L Glutathion-Sepharose-Beads in 15 mL Falcon-Tubes überführt und dreimal mit 1 mL kaltem PBS gewaschen (Zentrifugation: 500 rpm/4 °C/5 min). Zur Immobilisierung des exprimierten GST-Fusionsproteins an die Glutathion-Sepharose-Beads wurde der bei der Lyse gewonnene Zellüberstand auf die Beads gegeben. Die Kopplung erfolgte unter Schütteln (850 rpm) bei 4 °C für mindestens 2 h, als Negativ-Kontrolle wurde GST alleine an die Sepharose immobilisiert. Anschließend wurden die immobilisierten Beads erneut dreimal mit 1 mL PBS gewaschen (Zentrifugation: 500 rpm/4 °C/5 min), ein Volumen von 10  $\mu$ L auf 1,5 mL Eppendorf-Tubes aliquotiert, mit 10  $\mu$ L des *in vitro*-translatierten, [<sup>35</sup>S]-markierten Proteins versetzt und bei 4 °C in 200  $\mu$ L Bindungspuffer für mindestens 2 h im Schüttler inkubiert. Nach drei Waschsritten à 20 min mit jeweils 200  $\mu$ L Waschpuffer (Zentrifugation: 500 rpm/RT/2 min) und Abnehmen des Überstands wurden die Beads mit 20  $\mu$ L 5x Lämmli-Auftragspuffer versetzt, 10 min auf 95 °C erhitzt und anschließend für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. 7,5  $\mu$ L des resultierenden Überstands wurden gelelektrophoretisch mittels SDS-Page aufgetrennt. Zur Kontrolle wurden zusätzlich 20 % des *in vitro*-translatierten, [<sup>35</sup>S]-markierten Proteins auf das Gel aufgetragen. Nach dem Lauf wurde das Gel 15 min in 10 %iger Essigsäurelösung inkubiert, bevor es bei 80 °C zwischen Zellophan unter Vacuum getrocknet wurde. Das getrocknete Gel wurde abschließend mittels des Phosphoimagers FLA3000 (Fujifilm) oder BioMax XAR Filmen (Kodak) autoradiographisch - dies erfolgte sowohl manuell als auch densitometrisch - ausgewertet.

- **Bindungspuffer**

- 100 mM NaCl
- 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4
- 1 mM MgCl<sub>2</sub>
- 10 % Glycerol
- 0,1 % Tween-20
- 1,5 % BSA

- **Waschpuffer**

- 100 mM NaCl
- 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4
- 1 mM MgCl<sub>2</sub>
- 10 % Glycerol
- 0,1 % Tween-20

#### 4.6.8 Coimmunopräzipitation

Alternativ zum GST-Pulldown Assay kam in dieser Arbeit zur Verifizierung von Protein-Protein-Interaktionen die sogenannte Coimmunopräzipitation zum Einsatz. Hierbei wird zunächst durch Co-Inkubation zweier *in vitro*-translatierter und [<sup>35</sup>S]-markierter Proteine (Fusionsprotein X und Protein Y) die Bildung eines Proteinkomplexes ermöglicht. Durch die spezifische Erkennung eines Antikörpers und die anschließende Immobilisierung des entstandenen Antikörper/Protein-Komplexes an ein Trägermaterial (Protein A/G-Sepharose) wird das Fusionsprotein X, im Falle einer Interaktion der Protein-Komplex aus Fusionsprotein X und Protein Y präzipitiert. Der Nachweis erfolgt, wie auch beim GST-Pulldown Assay, mittels SDS-Page und Autoradiographie.

Für die Coimmunopräzipitation wurden zunächst die auf ihre Interaktion zu untersuchenden Proteine mit dem TNT Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) in Anwesenheit von [<sup>35</sup>S]-Methionin *in vitro*-translatiert. Zum Zwecke einer ersten Reinigung der Lysate wurden je 10+10 µL Lysat mit 500 µL TNT-Coimmunopräzipitationspuffer gemischt, die Mischung auf 10 µL Protein A-Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences), vorgelegt in einem 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß, gegeben und unter Rotieren für 1 h bei 4 °C inkubiert. Nach dem Pelletieren der Beads durch kurze Zentrifugation (30 sec, 14000 rpm) und der Abnahme des Überstands erfolgte die Bindung des Antikörpers an das Fusionsprotein durch Zugabe von 5 µL des monoklonalen Antikörpers anti-Myc 9B11 aus Maus (New England Biolabs) zum Überstand und eine 1h-Inkubation unter Rotieren bei 4 °C. Anschließend wurden 10 µL Protein A-Sepharose zugegeben und die Lösung erneut unter Rotieren bei 4 °C für 1-2 h inkubiert. Der Probenansatz wurde für 2 min in einer Tischzentrifuge bei 14000 rpm zentrifugiert, die radioaktiven Überstände entsorgt und das Protein A-Sepharosepellet fünf mal mit TNT-Coimmunopräzipitationspuffer gewaschen. Nach dem restlosen Entfernen des flüssigen Überstands wurde die Sepharose mit 10 µL 5x Lämmli-Auftragspuffer versetzt, 10 min auf 95 °C erhitzt und anschließend für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. 7,5 µL des resultierenden Überstands wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Kontrolle wurden zusätzlich 20 % des *in vitro*-translatierten, [<sup>35</sup>S]-markierten Proteins auf das Gel aufgetragen. Nach dem Lauf wurde das Gel 15 min in 10 %iger Essigsäurelösung inkubiert, bevor

es bei 80 °C zwischen Zellophan unter Vacuum getrocknet wurde. Das getrocknete Gel wurde abschließend mittels des Phosphoimagers FLA3000 (Fujifilm) oder BioMax XAR Filmen (Kodak) autoradiographisch ausgewertet.

- **TNT-Coimmunopräzipitationspuffer**

20 mM Tris/HCl, pH 7,5

150 mM NaCl

1 mM DTT

0,5 mM PMSF

0,1 % Tween-20

## 4.7 Messung der Substratspezifität

### 4.7.1 Messung des Substratumsatzes im *in vivo*-System

Im Zuge der umfassenden Charakterisierung neuer Mitglieder der SDR-Proteinfamilie sollten diese u.a. auf ihre Spezifität hinsichtlich steroidogener Substanzen überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde für eine Vielzahl von steroidogenen, Tritium-markierten Substanzen (Perkin-Elmer, ARC) eine Messung ihres Umsatzes durch die in Zellkultur exprimierten SDR-Enzyme im *in vivo*-System durchgeführt. Besagter Assay basiert auf den Arbeiten von Castagnetta et al. [28], die eingesetzten Substanzen und ihre entsprechenden Konzentrationen sind Tabelle 4.5 zu entnehmen.

**Tabelle 4.5:** Tritium-markierte, steroidogene Substanzen, verwendet zur Messung des Substratumsatzes im *in-vivo*-System

Steroid	<sup>3</sup> H-markierte Position	Konzentration der Stocklösung
Androst-4-en-3,17-dion	1, 2, 6, 7- <sup>3</sup> H (N)	11,0 μM
Androsteron	9,11- <sup>3</sup> H (N)	30,3 μM
Corticosteron	1,2- <sup>3</sup> H (N)	20,8 μM
Cortisol	1,2,6,7- <sup>3</sup> H (N)	12,6 μM
Cortison	1,2- <sup>3</sup> H (N)	20,0 μM
Dehydroepiandrosteron	1,2,6,7- <sup>3</sup> H (N)	15,9 μM
Dihydrotestosteron	1,2,4,5,6,7- <sup>3</sup> H (N)	8,4 μM
Estron	2,4,6,7- <sup>3</sup> H (N)	23,9 μM
Estradiol	6,7- <sup>3</sup> H (N)	20,0-24,0 μM*
Testosteron	3,7- <sup>3</sup> H (N)	14,3 μM

\* = Konzentration abhängig vom verwendeten Lot

Nach Aussähen, Anzucht und Transfektion der im Assay verwendeten HEK293-Zellen im 12 well Format und einer Inkubation von 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> (vergleiche 4.3.3) wurde zur

Überprüfung des Substratumsatzes zunächst 1  $\mu\text{L}$  Tritium-markiertes Substrat in den Zellkulturüberstand gegeben. Nach einer weiteren Inkubation von 24 h bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  erfolgte die Abnahme des Zellkulturüberstandes und dessen Aufreinigung für die folgende HPLC-Analyse (vergleiche 4.7.3). Um repräsentative Resultate zu erzielen wurden sämtliche Tests in Mehrfachbestimmung durchgeführt.

#### 4.7.2 Messung des Substratumsatzes im *in vitro*-System

Die im Rahmen dieser Arbeit durchzuführende Charakterisierung neuer Mitglieder der SDR-Proteinfamilie umfasste neben den bereits beschriebenen Überprüfungen bezüglich ihres Umsatzes von steroidogenen Substanzen die Untersuchung ihrer Spezifität hinsichtlich einiger weiterer Substanzklassen. Die Messung ihrer Aktivität gegenüber ausgewählten Chinonen, kurzkettigen CoA-konjugierten Fettsäuren, Prostaglandinen und Retinoiden (vergleiche Tabelle 4.6) erfolgte im Gegensatz zu den Experimenten mit Steroiden unter Verwendung von nichtradioaktiven Substraten und Zugabe spezifischer Cofaktoren im *in-vitro*-System.

**Tabelle 4.6:** Substanzen, verwendet zur Messung des Substratumsatzes im *in-vitro*-System

Substanz	Konzentration der Stocklösung	Cofaktor
<b>Chinone</b>		
Menadion	5,8 mM	NADH, NADPH
Coenzym Q1	8,0 mM	NADH, NADPH
<b>CoA-konjugierte Fettsäuren</b>		
Acetoacetyl-CoA	1,0 mM	NADH, NADPH
Hydroxybutyryl-CoA	1,0 mM	NAD, NADP
<b>Prostaglandine</b>		
Prostaglandin D <sub>2</sub>	2,8 mM	NAD, NADP, NADH, NADPH
Prostaglandin E <sub>2</sub>	2,8 mM	NAD, NADP, NADH, NADPH
Prostaglandin F <sub>2</sub> $\alpha$	2,8 mM	
<b>Retinoide</b>		
all-trans-Retinol	5,0 mM	NAD, NADP <sup>+</sup>
all-trans-Retinal	5,0 mM	NADH, NADPH

Nach Aussähen, Anzucht, Transfektion und Ernten der im Assay verwendeten HEK293-Zellen, ausgehend von einer 75 mL Zellkulturflasche (vergleiche 4.3.2 und 4.3.3) wurden zur Überprüfung des Substratumsatzes zunächst angefertigte Aliquots von  $1 \times 10^6$  Zellen in 450  $\mu\text{L}$  Reaktionspuffer resuspendiert und in Reagenzgläsern überführt. Nach Zugabe von 5  $\mu\text{L}$  Substrat und 50  $\mu\text{L}$  des entsprechenden Cofaktors (5 mg/mL) zum Starten der Reaktion erfolgte eine Inkubation des Reaktionsansatzes für 15 bzw. 30 min unter Schütteln im Inkubator (HLC) bei 37 °C. Zum Stoppen der Reaktion nach Ablauf der definierten Inkubationszeit wurden 200  $\mu\text{L}$  eiskaltes MeOH zugegeben. Für die Messungen der kurzkettigen CoA-konjugierten Fettsäuren wurde lediglich eine Zellzahl von  $0,5 \times 10^6$  in den Assay eingesetzt. Bei einem eingesetzten Volumen von 10  $\mu\text{L}$  Substrat betrug

die Inkubationszeit für diese Substanzklasse aufgrund ihrer hohen Instabilität lediglich 5-15 min. Abschließend erfolgte die Aufreinigung für die folgende HPLC-Analyse (vergleiche 4.7.3). Um repräsentative Resultate zu erzielen wurden sämtliche Tests in Mehrfachbestimmung durchgeführt, aufgrund der hohen Lichtempfindlichkeit der Retinoide erfolgten beschriebene Arbeiten für diese Substanzklasse ausschließlich im Dunkeln.

- **Reaktionspuffer**  
50 mM NaPi, pH 7,4  
1 mM EDTA (optional)

### 4.7.3 Aufreinigung von HPLC-Proben mittels Festphasenextraktion

Die Aufreinigung von Proben für die folgende HPLC-Analyse erfolgte mittels Festphasenextraktion. Abhängig von der aufzureinigenden Substanz kam hierbei unterschiedliches Säulenmaterial zum Einsatz (vergleiche Tabelle 4.7). Nach Standardprotokoll wurden die verwendeten Säulchen zunächst 2x mit jeweils 1 mL MeOH gewaschen und anschließend 2x mit 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> equilibriert. Nach Auftragen der Probe und zweimaligem Waschen der Säulchen erfolgte die Elution der Metabolite mit 2x 200 µL MeOH oder im Falle der kurzkettigen CoA-konjugierten Fettsäuren mit 2x 200 µL Ethylacetat. Die Aufreinigung der Retinoide wurde nach einem von Chetyrkin et al. veröffentlichten Protokoll durchgeführt [33].

**Tabelle 4.7:** Aufreinigung von HPLC-Proben mittels Festphasenextraktion

Substanz	Säulenmaterial	Hersteller
Chinone	Strata C8	Phenomenex
CoA-konjugierte Fettsäuren	Oasis HLB 1cc	Waters
Prostaglandine	Oasis HLB 1cc	Waters
Retinoide	Strata C-18E	Phenomenex
steroidogene Substanzen	Strata C-18E	Phenomenex

### 4.7.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

#### Detektion mittels Radioaktivitätsmonitor

Die chromatographische Trennung von Tritium-markierten, steroidogenen Substanzen sowie Tritium-markiertem Prostaglandin E<sub>2</sub> und seinen möglichen Konversionsprodukten wurde durch die Verwendung einer Reverse Phase Luna 5 µ C18 Säule (125 mm x 4 mm, Partikelgröße 5 µm, Phenomenex) bei einer Flußrate von 1 mL/min erreicht. Aufgrund der unpolaren Beschaffenheit besagter Säule verbleiben Substanzen mit niedrigerer Polarität länger an das Trägermaterial gebunden, eine geringere Ähnlichkeit zur immobilen Phase führt zu kürzeren Retentionszeiten.

Die unterschiedlichen Lösungsmittelverhältnisse (mobile Phase), die im Rahmen dieser Arbeit zur Anwendung kamen, und die daraus resultierenden Retentionszeiten ( $R_t$ ) für die einzelnen Tritium-markierten Substanzen sind Tabelle 4.8 zu entnehmen. Das verwendete HPLC-System Gold Basic (Beckman-Coulter) bestand aus zwei HPLC-Pumpen und einem UV-Detektor und unterlag der Kontrolle der 32Karat-Software (Beckman-Coulter). Die Detektion der Tritium-markierten Substanzen erfolgte nach Mischen des Eluats mit Szintillations-Flüssigkeit (Mischverhältnis 1:1, Ready Flow III, Beckman-Coulter) durch einen Radioaktivitätsmonitor LB 506D (Berthold). Die erhaltenen Chromatogramme wurden mittels der oben erwähnten Software analysiert. Die Berechnung des Substratumsatzes erfolgte durch den Vergleich von integrierten Peakflächen.

**Tabelle 4.8:** HPLC-Bedingungen und Retentionszeiten zur Trennung Tritium-markierter Substanzen

Substanz	Lösungsmittelverhältnis	$R_t$
<b>Prostaglandine</b>		
Prostaglandin E <sub>2</sub>	35 % ACN, 65 % H <sub>2</sub> O, 0,002 % TFA	8,1 min
<b>steroidogene Substanzen</b>		
Androst-4-en-3,17-dion	43 % ACN, 57 % H <sub>2</sub> O	8,0 min
Androsteron	43 % ACN, 57 % H <sub>2</sub> O	14,1 min
Corticosteron	58 % MeOH, 42 % H <sub>2</sub> O	6,8 min
Cortisol	43 % MeOH, 57 % H <sub>2</sub> O	17,0 min
Cortison	43 % MeOH, 57 % H <sub>2</sub> O	13,6 min
Dehydroepiandrosteron	43 % ACN, 57 % H <sub>2</sub> O	7,5 min
Dihydrotestosteron	43 % ACN, 57 % H <sub>2</sub> O	9,7 min
Estron	43 % ACN, 57 % H <sub>2</sub> O	7,5 min
Estradiol	43 % ACN, 57 % H <sub>2</sub> O	5,5 min
Testosteron	43 % ACN, 57 % H <sub>2</sub> O	6,0 min

#### Detektion mittels UV-Monitor

Die chromatographische Trennung von nicht Tritium-markierten Chinonen, kurzkettigen CoA-konjugierten Fettsäuren, Prostaglandinen und Retinoiden, sowie ihren möglichen Konversionsprodukten wurde durch die Verwendung einer Reverse Phase Synergi 4  $\mu$  Fusion RP18 Säule (150 mm x 4,6 mm, Partikelgröße 4  $\mu$ m, Phenomenex) bei einer Flußrate von 1 mL/min erreicht. Die unterschiedlichen Lösungsmittelverhältnisse (mobile Phase), die im Rahmen dieser Arbeit zur Anwendung kamen, und die daraus resultierenden Retentionszeiten ( $R_t$ ) sowie Detektionswellenlängen ( $\lambda$ ) für die einzelnen Substanzen sind Tabelle 4.9 zu entnehmen. Zur Analyse wurde das HPLC-System Series 200 (Mikropumpen, Autosampler) von Perkin Elmer verwendet. Es unterlag der Kontrolle der TotalChrom-Software (Perkin Elmer). Die Detektion der Substanzen erfolgte durch einen UV/Vis-Monitor (Perkin Elmer). Die erhaltenen Chromatogramme wurden mittels der erwähnten Software analysiert. Die Berechnung des Substratumsatzes erfolgte durch den Vergleich von integrierten Peakflächen.

**Tabelle 4.9:** HPLC-Bedingungen und Retentionszeiten zur Trennung nicht Tritium-markierter Substanzen

Substanz	Lösungsmittelverhältnis	$\lambda$	$R_t$
<b>Chinone</b>			
Coenzym Q1	70 % ACN, 30 % H <sub>2</sub> O	270 nm	6,3 min
Menadion	70 % MeOH, 30 % H <sub>2</sub> O	260 nm	5,2 min
<b>CoA-konjugierte Fettsäuren</b>			
Acetoacetyl-CoA	82 % NH <sub>4</sub> Ac (10 mM), 18 % MeOH	260 nm	5,0 min
Hydroxybutyryl-CoA	82 % NH <sub>4</sub> Ac (10 mM), 18 % MeOH	260 nm	6,6 min
<b>Prostaglandine</b>			
Prostaglandin D <sub>2</sub>	35 % ACN, 65 % H <sub>2</sub> O, 0,002 % TFA	220 nm	7,6 min
Prostaglandin E <sub>2</sub>	35 % ACN, 65 % H <sub>2</sub> O, 0,002 % TFA	220 nm	5,8 min
Prostaglandin F <sub>2</sub> $\alpha$	35 % ACN, 65 % H <sub>2</sub> O, 0,002 % TFA	220 nm	4,6 min
<b>Retinoide</b>			
all-trans-Retinol	92 % ACN, 8 % H <sub>2</sub> O	345 nm	4,6 min
all-trans-Retinal	92 % ACN, 8 % H <sub>2</sub> O	345 nm	5,4 min

## 4.8 Untersuchung des metabolischen Umfelds mittels FT-ICR-MS

In Ergänzung zu den Messungen der Substratspezifität (vergleiche 4.7) wurde im Rahmen dieser Arbeit auch eine Untersuchung des metabolischen Umfelds von HEK293-Zellen nach Expression der SDR-Kandidatenproteine durchgeführt. Unter Verwendung eines Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometers (FT-ICR-MS) wurde die nach Expression entstandene Metabolitenzusammenstellung analysiert und mit der einer Leerkontrolle verglichen. Detektierte Unterschiede sollten Hinweise auf die Art der katalysierten Reaktion liefern und Rückschlüsse auf natürliche Substrate der zu untersuchenden SDR-Enzyme und deren Funktion im metabolischen Kontext erlauben.

### 4.8.1 Probenvorbereitung

Nach Aussähen, Anzucht, Transfektion und Ernten der verwendeten HEK293-Zellen, ausgehend von einer 75 mL Zellkulturflasche (vergleiche 4.3.2 und 4.3.3) wurden zur Untersuchung ihres metabolischen Umfelds zunächst angefertigte Aliquots von  $1 \times 10^6$  Zellen 2x mit jeweils 1 mL sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen. Auf ein Resuspendieren des Zellpellets wurde hierbei bewusst verzichtet. Nach Aufnahme in 100  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> erfolgte der Aufschluß der Zellen durch Ultraschallbehandlung (4-5x [10 s Ultraschall, 15 s auf Eis]) und die Zugabe von 400  $\mu$ L eiskaltem, HPLC geeignetem MeOH zur Proteinfällung. Ein finaler Zentrifugationsschritt für 15 min bei 4 °C und 14000 rpm lieferte einen metabilitenhaltigen Überstand, der zur folgenden Analyse im FT-ICR-Massenspektrometer in entsprechende Glas-Vials mit Snap-Cap-Verschluß überführt wurde.

### 4.8.2 Analyse von Metaboliten mittels FT-ICR-MS

Die Metabolitenzusammensetzung transfizierter HEK293-Zellen wurde mittels des FT-ICR-MS Systems Apex Qe 12 T (Bruker Daltonics) analysiert. Die Ionisierung erfolgte über Elektrospray (Quelle Apollo II ESI) nach Direktinfusion mittels Spritzenpumpe sowohl im positiven als auch im negativen Modus. Die Ionisierungsspannung betrug 3,5 kV bei einem Gegendruck von 0,5 psi. Beide MS-Elektroden wurden auf 0 V gesetzt, der Fluß des auf 200 °C erhitzten Heater-Gases betrug 4 L s<sup>-1</sup>. Sämtliche Spektren wurden im Breitband-Modus aufgenommen, die Kalibrierung des Instruments erfolgte unter Verwendung von Arginin-Cluster-Ionen (10 ppm in 50 % MeOH/0,1 % Ameisensäure) im erforderlichen Massenbereich. Die Einstellungen des Massenspektrometers wurden derart abgestimmt, daß eine optimale Sensitivität und Auflösung zwischen m/z 200 und 300 erreicht wurde. Die Spektren wurden im Massenbereich von m/z 147-2000 mit einer time domain size von 1 Mword aufgenommen. Die Akkumulationsdauer der Ionen im Hexapole H2 (Kollisionszelle) betrug 100 ms. Die Flugzeit der Ionen von der Quelle zur ICR (Ionenzyklotronresonanz)-Zelle betrug 1,2 ms. Für ein vollständiges Spektrum wurden 500 Scans akkumuliert, die jeweiligen Proben wurden jeweils im Duplikat gemessen.

### 4.8.3 Auswertung der massenspektrometrischen Daten

Die für jede gemessene Probe vom FT-ICR-MS identifizierten Massepeaks und ihre entsprechenden Intensitäten wurden zunächst als Datentabelle exportiert. Der Abgleich der Werte, die durch die Messung einzelner Duplikate gewonnen wurden, erfolgte durch ihre Korrelation. Um Messungenauigkeiten entgegenzuwirken, wurden hierbei lediglich drei Dezimalstellen der identifizierten Massen berücksichtigt. Werte, die Abweichungen in den entsprechenden Intensitäten um den Faktor 5 aufzeigten, wurden nicht zur Auswertung herangezogen. Vergleiche der Metabolitenzusammensetzung transfizierter HEK293-Zellen erfolgten ebenfalls durch Korrelation der gemessenen Daten. Massen, die lediglich in einer Probe identifiziert werden konnten, wurden nicht berücksichtigt. Dadurch ergab sich eine korrigierte Massenliste. Die Quotienten entsprechender Intensitäten wurden in einem Scatter-Plot graphisch dargestellt und dadurch signifikante Intensitätsunterschiede visualisiert. Die Annotierung der gefundenen Massen erfolgte unter Verwendung des MassTriX-Servers (Helmholtz Zentrum München).

## 4.9 Etablierung einer Mauslinie

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Etablierung der Mauslinie Wwox (W088C04) erfolgte gemäß den Kriterien der FELASA. Die Organisation und die Überprüfung des Hygienestatus wurde von der Abteilung für vergleichende Medizin (AVM) durchgeführt. Die vom German GeneTrap Consortium (GGTC) erhaltenen, für das Wwox-Allel heterozygoten Mäuse wurden zunächst zur Definition des genetischen Hintergrundes über fünf Generationen auf C57Bl/6-Tiere rückgekreuzt. Zur Gewinnung der angestrebten homozygoten Knock-Out-Mäuse erfolgten Verpaarungen heterozygoter Tiere, beginnend in der fünften Generation. Nachkommen wurden jeweils im Alter von 3 Wochen abgesetzt und genotypisiert. Erneute Verpaarungen erfolgten im Alter von 8 Wochen.

## 4.10 Bioinformatische Methoden

### 4.10.1 In silico Northern Blot

In Ergänzung zur experimentellen Bestimmung von mRNA-Expressionsmustern mittels quantitativer RealTime-PCR- oder Northern Blot-Technologie wurden im Rahmen dieser Arbeit bioinformatische Analysen, sogenannte *in silico* Northern Blots (ISNBs), durchgeführt. Unter Verwendung eines von der Gruppe BioDV am Institut für Experimentelle Genetik (Helmholtz Zentrum München) entwickelten Tools (<http://anthea.gsf.de/isbn2.html>) konnten sowohl das generelle Level der Expression als auch das Auftreten und die Anzahl an Transkripten in bestimmten Geweben im Verhältnis zu anderen ermittelt werden. Besagtes Programm bedient sich dabei einem automatischen Abgleich einer gegebenen mRNA-Sequenz von Interesse mit einer EST-(Expressed Sequence Tag) Datenbank des entsprechenden Organismus unter Verwendung von `blastn`, verfügbar bei NCBI. Die erhaltenen Resultate werden daraufhin hinsichtlich spezifischer Transkripte überprüft, eine Kongruenz mit dem Gen von Interesse wird bei einer Sequenzidentität von  $\geq 85\%$  angenommen. Ermittelte ESTs werden auf Informationen bezüglich ihres Ursprungsgewebes untersucht und können abschließend aufgrund der erhaltenen Daten quantitativ ausgewertet werden. Alternativ zum beschriebenen Vorgehen kam zur bioinformatischen Analyse von mRNA-Expressionsmustern die auf der NCBI-Webseite verfügbare Anwendung UniGene zum Einsatz.

### 4.10.2 Alignments und Phylogenie

Der Vergleich zweier Protein- bzw. DNA-Sequenzen erfolgte unter Verwendung von `bl2seq`, einem auf der NCBI-Webseite verfügbarem Alignment-Tool. Zur Generierung von multiplen Sequenz-Alignments wurde der `clustalW`-Server herangezogen. Für die Erstellung der paarweisen oder multiplen Sequenzvergleiche mittels der aufgeführten Programme wurden sämtliche wählbaren Parameter in der default-Einstellung belassen.

Zur Durchführung von phylogenetischen Analysen wurden zunächst umfangreiche Datensätze durch das Abrufen von den Kandidatenproteinen verwandten, in der NCBI-Datenbank annotierten Sequenzen erstellt. Hierzu wurde der auf der entsprechenden Webseite verfügbare BLink-Link verwendet. Erhaltene Sequenzen wurden nach der Qualität des Alignments mit der Kandidatensequenz ausgewählt, zumeist handelte es sich hierbei lediglich um metazoische Sequenzen, protozoische Sequenzen wurden nur in einigen Fällen berücksichtigt. Benötigte multiple Alignments wurden mittels des `clustalW`-Servers erstellt, die Berechnung der phylogenetischen Bäume erfolgte mittels der Software MEGA v.3.1 bzw. v.4.1 nach der Neighbor-Joining-Methode. Für erste Testkalkulationen wurde ein Bootstrapping mit 500 bzw. 1000 Wiederholungen gewählt. Die erhaltenen Sequenzanalysen wurden manuell auf redundante Sequenzen überprüft und diese vor einer Neuberechnung der phylogenetischen Bäume aus dem multiplen Alignment entfernt.

### 4.10.3 Bioinformatische Vorhersagen

#### Bioinformatische Vorhersage der subzellulären Lokalisation

Zur bioinformatischen Vorhersage der subzellulären Lokalisation von Proteinen sind im Internet zahlreiche Server frei verfügbar. Aufgrund signifikanter Unterschiede in den verwendeten Algorith-

men wurde im Rahmen dieser Arbeit eine representative Auswahl an Servern zur bioinformatischen Analyse herangezogen. Bezeichnungen und entsprechende Internet-Verknüpfungen sind Tabelle 5.14 zu entnehmen.

#### **Bioinformatische Vorhersage zur Topologie von Transmembranproteinen**

Für Vorhersagen hinsichtlich potentieller Transmembrandomänen bzw. der Topologie von Transmembranproteinen stehen im Internet ebenfalls eine Vielzahl von öffentlich zugänglichen Servern zur Verfügung. Ähnlich wie die Werkzeuge zur Vorhersage der subzellulären Lokalisation von Proteinen bedienen sich auch diese Server unterschiedlichen Algorithmen. Aus diesem Grund kamen im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Server, aufgelistet in Tabelle 5.15, zum Einsatz.

# 5 Material, Organismen und Programme

## 5.1 Material

### 5.1.1 Antikörper

#### Primäre Antikörper

17 $\beta$ -HSD4 h32 5A7-1-1 IgM, monoklonal rat

anti-GST mouse

anti-His

anti-Myc 9B11, monoklonal mouse

anti-FLAG IgG, polyklonal rabbit

StrepTactin HRP conjugate

anti-V5

Dr. Elisabeth Kremmer, Helmholtz Zentrum München

Zymed

Boehringer Mannheim

New England Biolabs

Sigma Aldrich

IBA Technologies

Invitrogen

#### Sekundäre Antikörper

AlexaFluor 488 Goat anti-Mouse IgG

AlexaFluor 568 Goat anti-Mouse IgG

Cy3 conjugated Goat anti-Rat IgG

Peroxidase conjugated AffiniPure Goat anti-Mouse IgG + IgM

Molecular Probes

Molecular Probes

Dianova

Dianova

### 5.1.2 Chemikalien, Medien, Seren und Zusätze

Adeninhemisulfat

Acetoacetyl-CoA

Acetonitril (HPLC Grade)

Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %)

Agarose

all-trans-Retinal

all-trans-Retinol

Ammoniumperoxodisulfat (APS)

Ampicillin

Ampuwa

Anhydrotetracyclin

Bacto-Agar

Sigma Aldrich

Sigma Aldrich

Sigma Aldrich

Roth

Biozym

Sigma Aldrich

Sigma Aldrich

Merck

Fluka

Fresenius

IBA Technologies

Difco

Bacto-Pepton	Difco
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck
Benzamidin-Sepharose 4 fast flow	Amersham Biosciences
Borsäure	neolab
BSA	New England Biolabs
Casein-Hydrolysat	Difco
Coomassie blue G250	Biomol
Coenzym Q1	Sigma Aldrich
3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich
dNTPs	MBI Fermentas
DropOut(DO)-Zusatz	BD Biosciences (Clontech)
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Biomol
Essigsäure	Merck
Ethanol (HPLC Grade)	Merck
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich
Ethylacetat (HPLC Grade)	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Biomol
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom AG
Formaldehyd, 37 %	Roth
FuGene6	Roche Diagnostics
Galactose	Fluka
Glucose	Merck
Glutathion	Sigma Aldrich
Glutathion-Sepharose 4 B	Amersham Biosciences
Hefe-Extrakt	Nordwald
Heringsperma-Träger-DNA	Sigma Aldrich
High Glucose Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco
Hydroxybutyryl-CoA	Sigma Aldrich
Imidazol	Sigma Aldrich
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid (IPTG)	DCL
Kaliumacetat	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Kanamycin	Sigma Aldrich
$\lambda$ DNA/EcoRI + HindIII (Marker 3)	MBI Fermentas
Lithiumacetat	Sigma Aldrich
L-Glutamin	Gibco
Loading Dye (6x)	MBI Fermentas
Manganchlorid (Tetrahydrat)	Sigma Aldrich
Menadion	Sigma Aldrich
Methanol (HPLC Grade)	Merck
Minimal SD Base	BD Biosciences (Clontech)
Minimal SD Agar Base	BD Biosciences (Clontech)

Modified Eagle Medium (MEM)	Gibco
NAD	Serva
NADH	Sigma Aldrich
NADP	Sigma Aldrich
NADPH	Fluka
Natriumacetat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Merck
NorthernMax High Stringency Wash	Ambion
NorthernMax Low Stringency Wash	Ambion
O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas
PEG 3350	BD Biosciences
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Precision Plus Protein Prestained Standards, All Blue	Biorad
2-Propanol	Merck
Prostaglandin D <sub>2</sub>	Calbiochem
Prostaglandin E <sub>2</sub>	Calbiochem
Prostaglandin F <sub>2</sub> α	Calbiochem
Protein A-Sepharose 4 Fast Flow	Amersham Biosciences
pUC Mix (Marker 8)	MBI Fermentas
Ready Flow III	Beckman-Coulter
Rubidiumchlorid	Sigma Aldrich
TEMED	Sigma Aldrich
Trifluoressigsäure	Sigma Aldrich
Trisbase	Merck
Triton-X100	Merck
TRIzol	Invitrogen
Trypsin/EDTA	Invitrogen
Trypton	Difco
Tween-20	Merck
Ultrahyb-Hybridisierungslösung	Ambion
Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus	Perkin Elmer
X-α-Gal	Glycosynth
YPD-Medium	BD Biosciences (Clontech)

### 5.1.3 Enzyme

Alkaline Phosphatase	Roche Diagnostics
Benzonase	Sigma Aldrich
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	MBI Fermentas
Herculase Hotstart DNA Polymerase	Stratagene
Lysozym	Merck
PfuTurbo DNA Polymerase	Stratagene

Protease-Inhibitor	Roche Diagnostics
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, New England Biolabs
Ribonuklease-Inhibitor	MBI Fermentas
RQ1 RNase-free DNase I	Promega
Taq DNA Polymerase	MBI Fermentas, Helmholtz Zentrum München
T3, T7 und SP6 RNA Polymerasen	MBI Fermentas
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Promega
Thrombin	Sigma Aldrich
Trypsin	Gibco

### 5.1.4 Equipment

#### Laborgeräte

ABI PRISM 3730 DNA-Analyzer	Applied Biosystems
Axiophot Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Axiovert 40 CFL	Zeiss
BioVision Gel-Dokumentationssystem	Peqlab
Brutschränke/Inkubatoren	Heareus Instruments
CO <sub>2</sub> Incubator MCO-17 A/C	Sanyo
Concentrator 5301	Eppendorf
Einfrierkontainer Cryo 1 °C Freezing Container	Nalgene
FT-ICR-MS System Apex Qe 12 T	Bruker Daltonics
Gene Pulser II	Biorad
GeniosPro	Tecan
HPLC Radioaktivitätsmonitor LB 506D	Berthold
HPLC-System Gold Basic	Beckman-Coulter
HPLC-System Series 200	Perkin-Elmer
HPLC Series 200 UV/Vis-Detektor	Perkin-Elmer
Kühlzentrifuge Universal 32 R	Hettich
Life Science UV/Vis Spectrophotometer DU530	Beckman-Coulter
Mikropipetten	Gilson
Mini-PROTEAN 3 System	Biorad
ND-1000 UV/Vis Spectrophotometer	NanoDrop Technologies
Oasis HLB 1cc Säule	Waters
pH-Meter 766 calimatic	Knick
Phosphoimager FLA3000	FujiFilm
Power Supply PA300	Biorad
Reverse phase LUNA 5 µ C18 (2) Säule	Phenomenex
Reverse phase Synergi 4 µ Fusion RP18 Säule	Phenomenex
RoboCycler 96	Stratagene
Strata C8 Säule	Phenomenex

Strata C-18E Säule	Phenomenex
SubCell GT Elektrophoresekammer	Biorad
TaqMan RealTime-PCR Detektionssystem ABI Prism 9700HT	Applied Biosystems
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
Tischzentrifuge Avanti J-20	Beckman-Coulter
Trans-Blot SD - Semidry Transfer Cell	Biorad
Varioklav	H + P
Vortexer	Scientific Industries Vortex Genie
Wasserbad Hanke P5 DC10	Hanke

### Sonstiges

6 well und 12 well Platten	Becton & Dickinson oder NUNC
Biomax X-Omat AR-5, XAR-5 Photofilme	Kodak
Cryo Tube™ Vials, 1,8 mL	NUNC
Deckgläschen	Menzel Glaeser
Eppendorf-Reaktionsgefäße, 1,5 mL und 2 mL	Eppendorf
Falcon tubes, 15 mL und 50 mL	Becton & Dickinson
Filmkassetten	Kodak
FluoroTrans W Membran (PVDF)	Pall Corporation
Fuji-Phosphoimager-Platten	FujiFilm
Glasbeads	Sigma Aldrich
Northern Blot Membran FirstChoice Northern Human Blot II	Ambion
Parafilm	American National Can
PCR Tubes, Streifen und Platten	Applied Biosystems
Petri-Schalen	Becton & Dickinson
Super-Frost Plus Objektträger	Menzel Glaeser
Zellkulturflaschen, T25 and T75	NUNC

### 5.1.5 Kits

BD Matchmaker™ Library Construction & Screening Kit	BD Biosciences (Clontech)
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Caspase-Glo™ 3/7-Assay	Promega
CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay	Promega
ChargeSwitch Plasmid Yeast Mini Kit	Invitrogen
Dye Ex 2.0 Spin Kit und DyeEx96	Qiagen
Image-iT LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection Kit	Invitrogen
iTaq™ SYBR Green Supermix with ROX	Biorad
Mem-PER Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit	Pierce Biosciences
Montage™ SEQ <sub>96</sub> Sequencing Reaction Cleanup Kit	Millipore

Nucleobond PC100 Kit	Machery & Nagel
NucleoSpin Plasmid Kit	Machery & Nagel
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
RevertAid <sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit	MBI Fermentas
Strip-EZ DNA Kit	Ambion
SV Total RNA Isolation Kit	Promega
Tissue Scan <sup>TM</sup> Human Major Tissue qPCR Array	Origene
TNT Quick Coupled Transcription/Translation System	Promega
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega
Wizard SV Genomic DNA Purification System	Promega

### 5.1.6 Lösungen zur Zellfärbung

4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	Molecular Probes
ER-Tracker Blue-White DPX	Molecular Probes
Hoechst33342	Molecular Probes
MitoTracker Orange CMTMRos	Molecular Probes
Phalloidin, AlexaFluor488 oder 568	Molecular Probes
Vectashield	Vectalabs

### 5.1.7 Radionuklide

#### Tritium-markierte Substanzen

Androst-4-en-3,17-dion (1,2,6,7- <sup>3</sup> H (N))	Perkin-Elmer
Androsteron (9,11- <sup>3</sup> H (N))	Biotrend (ARC)
Corticosteron (1,2- <sup>3</sup> H (N))	Perkin-Elmer
Cortisol (1,2,6,7- <sup>3</sup> H (N))	Perkin-Elmer
Cortison (1,2- <sup>3</sup> H (N))	Amersham Biosciences/Biotrend (ARC)
Dehydroepiandrosteron (1,2,6,7- <sup>3</sup> H (N))	Perkin-Elmer
Dihydrotestosteron (1,2,4,5,6,7- <sup>3</sup> H (N))	Perkin-Elmer
Estron (2,4,6,7- <sup>3</sup> H (N))	Perkin-Elmer
Estradiol (6,7- <sup>3</sup> H (N))	Perkin-Elmer
Prostaglandin E <sub>2</sub> (5,6,8,11,12,14,15- <sup>3</sup> H (N))	Perkin-Elmer
Testosteron (3,7- <sup>3</sup> H (N))	Perkin-Elmer

#### Phosphor-markierte Substanzen

[ <sup>32</sup> P]-α-dATP	Amersham Biosciences
---------------------------	----------------------

## Schwefel-markierte Substanzen

[<sup>35</sup>S]-Methionin Amersham Biosciences

## 5.1.8 Vektoren

pAcGFP1-N1	Clontech
pASK-IBA12	IBA Technologies
pASK-IBA13+	IBA Technologies
pcDNA3	Invitrogen
pcDNA4 myc-his Version B	Invitrogen
pcDNA4 myc-his Version B/zf17βHSD12	Ferdinand Haller, Helmholtz Zentrum München
pCR2.1	Invitrogen
pCRII	Invitrogen
pEGFP-C2	Clontech
pENTR/U6	Invitrogen
pGADT7rec	Clontech
pGEXΔ BamHI (ursprünglich pGEX 2T PL2)	Amersham
pGBKT7	Clontech
pDsRed2-ER	Clontech
pYES2.1/V5-His-TOPO	Invitrogen

## 5.2 Organismen

### 5.2.1 Bakterienstämme

#### ***E. coli* BL21 CodonPlus (DE3) RP** (Stratagene)

B F<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdS*(rB<sup>-</sup>, mB<sup>-</sup>), *dcm*<sup>+</sup>, Tet<sup>r</sup>, gal λ(DE3), *endA*, Hte [*argU*, *proL*, Cam<sup>r</sup>]

#### ***E. coli* DH5α** (Stratagene)

F<sup>-</sup>, Φ80dlacZDM15, D(*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), *phoA*, *supE44*, λ-*thi-1*, *gyrA96*, *relA1* [F' *proAB lacI<sup>q</sup> ZΔM15 Tn10* (Tet<sup>r</sup>)]

#### ***E. coli* TOP10** (Invitrogen)

F<sup>-</sup>, *mcrA*, Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*), Φ80dlacZΔM15, Δ*lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139* Δ(*ara-leu*)7697, *galU*, *gal/K*, *rpsL*(Str<sup>r</sup>), *endA1*, *nupG*

#### ***E. coli* XL1-Blue MRF'** (Stratagene)

Δ(*mcrA*)183, Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac* [F' *proAB lacI<sup>q</sup> ZΔM15 Tn10* (Tet<sup>r</sup>)]

## 5.2.2 Hefestämme

### *S. cerevisiae* AH109 (Clontech)

MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , LYS2 :: GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3, GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2, URA3 : : MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ, MEL1

### *S. cerevisiae* CEN.PK2 (Clontech)

MATa/MAT $\alpha$ , ura3-52/ura3-52, trp1-289/trp1-289, leu2-3.112/leu2-3.112, his3 $\Delta$ 1/his3 $\Delta$ 1, MAL2-8<sup>c</sup>/MAL2-8<sup>c</sup>, SUC2/SUC2

### *S. cerevisiae* Y187 (Clontech)

MAT $\alpha$ , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 $\Delta$ , met-, gal80 $\Delta$ , URA3 :: GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ, MEL1

## 5.2.3 Säugetierzelllinien

HeLa (*human cervix carcinoma*)

DMSZ

HEK293 (*human embryonal kidney*)

DMSZ

## 5.3 Programme

### 32Karat (Beckman-Coulter)

Kontrolle des HPLC-Systems Gold Basic von Beckman-Coulter. Des weiteren eingesetzt zur Analyse der erhaltenen Chromatogramme.

### AIDA (Advanced Image Data Analysis, Fuji)

Auswertung und Annotierung von Bildmaterial mit spezifischen Modulen für alle relevanten Bio-Imaging-Anforderungen.

### BioEdit (Ibis Therapeutics)

Analyse von Aminosäure- und Nukleotidsequenzen mit Hauptaugenmerk auf Alignment und Phylogenie.

Freier Download unter <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>

### BLAST (basic linear alignment search tool, NCBI)

Vergleich von Aminosäure- und Nukleotidsequenzen paarweise oder gegen Datenbanken.

bl2seq: Paarweiser Vergleich zweier Sequenzen unter Verwendung eines der verfügbaren BLAST-Programme

blastn: Vergleich Nukleotidsequenz gegen Nukleotidsequenz

blastp: Vergleich Aminosäuresequenz gegen Aminosäuresequenz

blastx: Vergleich translatierte Nukleotidsequenz gegen translatierte Nukleotidsequenz

tblastn: Vergleich translatierte Nukleotidsequenz gegen Aminosäuresequenz

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

### **clustalW (EMBL-EBI)**

Generierung multipler Alignments von Aminosäure- und Nukleotidsequenzen.

<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>

### **FinchTV (Geospiza)**

Ansicht und Editierung von DNA-Sequenzierungsdaten (Elektropherogrammen).

Freier Download unter <http://www.geospiza.com/finchTV.html>

### **ISIS3 V2.33 (MetaSystems)**

Aufnahme und Verarbeitung von digitalem Bildmaterial.

### **ISNB (BioDV/Helmholtz Zentrum München)**

Ermittlung sowohl des generellen Levels der Expression als auch des Auftretens und der Anzahl an Transkripten in bestimmten Geweben im Verhältnis zu anderen.

<http://anthea.gsf.de/isbn2.html>

### **KEGG Compound (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)**

Chemische Struktur-Datenbank für metabolische Verbindungen und andere chemische Substanzen, die in biologischen Systemen von Relevanz sind.

<http://www.genome.jp/kegg/compound/>

### **MassTriX (MIPS u. IÖC/Helmholtz Zentrum München)**

Annotierung von Metaboliten in Massenspektrometrie-Daten und Markierung der identifizierten chemischen Verbindungen in Organismus-spezifischen KEGG-Stoffwechselwegen.

<http://mips.gsf.de/proj/metabolomics/>

### **MEGA V3.1**

Phylogenetische Analyse von Aminosäure- und Nukleotidsequenzen.

Freier Download unter <http://www.megasoftware.net>

### **Primer3**

Design adäquater Primer für quantitative RealTime-PCRs.

<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.www.cgi>

### Reverse Complement

Konvertierung von DNA-Sequenzen (revers, komplementär, revers-komplementär).

[http://www.bioinformatics.org/SMS/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/SMS/rev_comp.html)

### Rossmann fold prediction (Universität Linköping)

Vorhersage eines Rossmann-Faltungsmusters in Aminosäuresequenzen und einer hypothetischen Cofaktor-Präferenz der entsprechenden Enzyme.

<http://bioinfo4.limbo.ifm.liu.se/coenzyme/coenz1.pl>

### TotalChrom (Perkin Elmer)

Kontrolle des HPLC-Systems Series 200 von Perkin Elmer. Des weiteren eingesetzt zur Analyse der erhaltenen Chromatogramme.

### Unigene (NCBI)

Bioinformatische Analyse von mRNA-Expressionsmustern.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>

### Vector NTI (Informax)

Verwaltung und Analyse von Aminosäure- und Nukleotidsequenzen.

### Vorhersage der subzellulären Lokalisation

Zur bioinformatischen Vorhersage der subzellulären Lokalisation von Proteinen wurden folgende, frei im Internet verfügbare Server verwendet:

**Tabelle 5.14:** Server, verwendet zur bioinformatischen Vorhersage der subzellulären Lokalisation von Proteinen.

Server	URL
LOctree	<a href="http://cubic.bioc.columbia.edu/services/loctree">http://cubic.bioc.columbia.edu/services/loctree</a>
pSORTII	<a href="http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html">http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html</a>
pTarget	<a href="http://bioinformatics.albany.edu/~ptarget/">http://bioinformatics.albany.edu/~ptarget/</a>
SubLoc1.0	<a href="http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/eu_predict.htm">http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/eu_predict.htm</a>
TargetP1.1	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/</a>
WoLF PSORT	<a href="http://wolfpsort.seq.cbrc.jp/">http://wolfpsort.seq.cbrc.jp/</a>
MITOPROT	<a href="http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html">http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html</a>

### Vorhersage zur Topologie von Transmembranproteinen

Die bioinformatischen Vorhersage zur Topologie von Transmembranproteinen erfolgte unter Verwendung der folgenden, frei im Internet verfügbare Server:

**Tabelle 5.15:** Server, verwendet zur bioinformatischen Vorhersage zur Topologie von Transmembranproteinen.

Server	URL
HMMTOP	<a href="http://www.enzim.hu/hmmtop/">http://www.enzim.hu/hmmtop/</a>
SOSUI	<a href="http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosuisignal/sosuisignal_submit.html">http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosuisignal/sosuisignal_submit.html</a>
TMHMM v.2.0	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM">http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM</a>
TMpred	<a href="http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/TMPRED_from_parser">http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/TMPRED_from_parser</a>
TopPred	<a href="http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html">http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html</a>

### **XFlour4GeniosPro (Tecan)**

Generelle Bedienung des GeniosPro und Darstellung erhaltener Rohdaten in Excel.

## Literaturauswahl aus dem Forschungsfeld

R. I. Aqeilan, A. Palamarchuk, R. J. Weigel, J. J. Herrero, Y. Pekarsky, und C. M. Croce. Physical and functional interactions between the wwox tumor suppressor protein and the ap-2gamma transcription factor. *Cancer Res*, 64(22):825661, 2004.

G. L. Forrest und B. Gonzalez. Carbonyl reductase. *Chem Biol Interact*, 129(1-2):2140, 2000.

F. Hoffmann und E. Maser. Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug Metab Rev*, 39(1):87144, 2007.

Y. Huang, R. Tang, J. Dai, S. Gu, W. Zhao, C. Cheng, M. Xu, Z. Zhou, K. Ying, Y. Xi, und Y. Mao. A novel human hydroxysteroid dehydrogenase like 1 gene (hsdl1) is highly expressed in reproductive tissues. *Mol Biol Rep*, 28(4):18591, 2001.

H. Jornvall, B. Persson, M. Krook, S. Atrian, R. Gonzalez-Duarte, J. Jeffery, und D. Ghosh. Short-chain dehydrogenases/reductases (sdr). *Biochemistry*, 34(18):600313, 1995.

Y. Kallberg, U. Oppermann, H. Jornvall, und B. Persson. Short-chain dehydrogenases/reductases (sdrs). *Eur J Biochem*, 269(18):440917, 2002.

G. Moeller und J. Adamski. Multifunctionality of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol*, 248(1-2):4755, 2006.

U. Oppermann. Carbonyl reductases: the complex relationships of mammalian carbonyl- and quinone-reducing enzymes and their role in physiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47:293322, 2007.

U. Oppermann, C. Filling, M. Hult, N. Shafqat, X. Wu, M. Lindh, J. Shafqat, E. Nordling, Y. Kallberg, B. Persson, und H. Jornvall. Short-chain dehydrogenases/reductases (sdr): the 2002 update. *Chem Biol Interact*, 143-144:24753, 2003.

Q. Wu, M. Xu, C. Cheng, Z. Zhou, Y. Huang, W. Zhao, L. Zeng, J. Xu, X. Fu, K. Ying, Y. Xie, und Y. Mao. Molecular cloning and characterization of a novel dehydrogenase/reductase (sdr family) member 1 gene from human fetal brain. *Mol Biol Rep*, 28(4):1938, 2001.

# Literaturverzeichnis

- [1] J. Adamski, W. D. Sierralta, and P. W. Jungblut. Assignment of estradiol-17 beta dehydrogenase and of estrone reductase to cytoplasmic structures of porcine endometrium cells. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 121(2):161–7, 1989.
- [2] H. Adlercreutz. Phytoestrogens and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 83(1-5):113–8, 2002.
- [3] G. Agnihotri and H. W. Liu. Enoyl-CoA hydratase. reaction, mechanism, and inhibition. *Bioorg Med Chem*, 11(1):9–20, 2003.
- [4] G. M. Allan, H. R. Lawrence, J. Cornet, C. Bubert, D. S. Fischer, N. Vicker, A. Smith, H. J. Tutill, A. Purohit, J. M. Day, M. F. Mahon, M. J. Reed, and B. V. Potter. Modification of estrone at the 6, 16, and 17 positions: novel potent inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Med Chem*, 49(4):1325–45, 2006.
- [5] C. W. Anderson, J. W. Straus, and B. S. Dudock. Preparation of a cell-free protein-synthesizing system from wheat germ. *Methods Enzymol*, 101:635–44, 1983.
- [6] R. I. Aqeilan, A. Palamarchuk, R. J. Weigel, J. J. Herrero, Y. Pekarsky, and C. M. Croce. Physical and functional interactions between the Wwox tumor suppressor protein and the AP-2gamma transcription factor. *Cancer Res*, 64(22):8256–61, 2004.
- [7] R. I. Aqeilan, Y. Pekarsky, J. J. Herrero, A. Palamarchuk, J. Letofsky, T. Druck, F. Trapasso, S. Y. Han, G. Melino, K. Huebner, and C. M. Croce. Functional association between Wwox tumor suppressor protein and p73, a p53 homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(13):4401–6, 2004.
- [8] R. I. Aqeilan, F. Trapasso, S. Hussain, S. Costinean, D. Marshall, Y. Pekarsky, J. P. Hagan, N. Zanesi, M. Kaou, G. S. Stein, J. B. Lian, and C. M. Croce. Targeted deletion of Wwox reveals a tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(10):3949–54, 2007.
- [9] A. G. Atanasov, L. G. Nashev, L. Gelman, B. Legeza, R. Sack, R. Portmann, and A. Odermatt. Direct protein-protein interaction of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase in the endoplasmic reticulum lumen. *Biochim Biophys Acta*, 1783(8):1536–43, 2008.
- [10] G. Auerbach, A. Herrmann, M. Gutlich, M. Fischer, U. Jacob, A. Bacher, and R. Huber. The 1.25 Å crystal structure of sepiapterin reductase reveals its binding mode to pterins and brain neurotransmitters. *EMBO J*, 16(24):7219–30, 1997.
- [11] M. Baes, S. Huyghe, P. Carmeliet, P. E. Declercq, D. Collen, G. P. Mannaerts, and P. P. Van Veldhoven. Inactivation of the peroxisomal multifunctional protein-2 in mice impedes the degradation of not only 2-methyl-branched fatty acids and bile acid intermediates but also of very long chain fatty acids. *J Biol Chem*, 275(21):16329–36, 2000.
- [12] B. J. Bahnson, V. E. Anderson, and G. A. Petsko. Structural mechanism of enoyl-CoA hydratase: three atoms from a single water are added in either an E1cb stepwise or concerted fashion. *Biochemistry*, 41(8):2621–9, 2002.
- [13] A. K. Bednarek, C. L. Keck-Waggoner, R. L. Daniel, K. J. Laffin, P. L. Bergsagel, K. Kiguchi, A. J. Brenner, and C. M. Aldaz. WWOX, the FRA16D gene, behaves as a suppressor of tumor growth. *Cancer Res*, 61(22):8068–73, 2001.
- [14] A. K. Bednarek, K. J. Laffin, R. L. Daniel, Q. Liao, K. A. Hawkins, and C. M. Aldaz. WWOX, a novel

- WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3-24.1, a region frequently affected in breast cancer. *Cancer Res*, 60(8):2140–5, 2000.
- [15] O. V. Belyaeva and N. Y. Kedishvili. Comparative genomic and phylogenetic analysis of short-chain dehydrogenases/reductases with dual retinol/sterol substrate specificity. *Genomics*, 88(6):820–30, 2006.
- [16] J. Benach, S. Atrian, R. Gonzalez-Duarte, and R. Ladenstein. The catalytic reaction and inhibition mechanism of *Drosophila* alcohol dehydrogenase: observation of an enzyme-bound NAD-ketone adduct at 1.4 Å resolution by X-ray crystallography. *J Mol Biol*, 289(2):335–55, 1999.
- [17] J. D. Bendtsen, H. Nielsen, G. von Heijne, and S. Brunak. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, 340(4):783–95, 2004.
- [18] M. Berube and D. Poirier. Synthesis of simplified hybrid inhibitors of type 1 17β-hydroxysteroid dehydrogenase via cross-metathesis and sonogashira coupling reactions. *Org Lett*, 6(18):3127–30, 2004.
- [19] M. G. Biswas and D. W. Russell. Expression cloning and characterization of oxidative 17β- and 3α-hydroxysteroid dehydrogenases from rat and human prostate. *J Biol Chem*, 272(25):15959–66, 1997.
- [20] D. Boffelli, J. McAuliffe, D. Ovcharenko, K. D. Lewis, I. Ovcharenko, L. Pachter, and E. M. Rubin. Phylogenetic shadowing of primate sequences to find functional regions of the human genome. *Science*, 299(5611):1391–4, 2003.
- [21] P. Bork and M. Sudol. The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends Biochem Sci*, 19(12):531–3, 1994.
- [22] P. Brereton, T. Suzuki, H. Sasano, K. Li, C. Duarte, V. Obeyesekere, F. Haeseleer, K. Palczewski, I. Smith, P. Komesaroff, and Z. Krozowski. Pan1b (17βHSD11)-enzymatic activity and distribution in the lung. *Mol Cell Endocrinol*, 171(1-2):111–7, 2001.
- [23] D. Brett, H. Pospisil, J. Valcarcel, J. Reich, and P. Bork. Alternative splicing and genome complexity. *Nat Genet*, 30(1):29–30, 2002.
- [24] P. S. Brookes, Y. Yoon, J. L. Robotham, M. W. Anders, and S. S. Sheu. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287(4):C817–33, 2004.
- [25] W. M. Brown, L. E. Metzger, J. P. Barlow, L. A. Hunsaker, L. M. Deck, R. E. Royer, and D. L. Vander Jagt. 17-β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: computational design of active site inhibitors targeted to the rossmann fold. *Chem Biol Interact*, 143-144:481–91, 2003.
- [26] P. Brozic, T. Lanisnik Risner, and S. Gobec. Inhibitors of 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Curr Med Chem*, 15(2):137–50, 2008.
- [27] M. C. Byrns, S. Steckelbroeck, and T. M. Penning. An indomethacin analogue, N-(4-chlorobenzoyl)-melatonin, is a selective inhibitor of aldo-keto reductase 1C3 (type 2 3α-HSD, type 5 17β-HSD, and prostaglandin F synthase), a potential target for the treatment of hormone dependent and hormone independent malignancies. *Biochem Pharmacol*, 75(2):484–93, 2008.
- [28] L. A. Castagnetta, G. Carruba, A. Traina, O. M. Granata, M. Markus, M. Pavone-Macaluso, C. H. Blomquist, and J. Adamski. Expression of different 17β-hydroxysteroid dehydrogenase types and their activities in human prostate cancer cells. *Endocrinology*, 138(11):4876–82, 1997.
- [29] N. S. Chang. A potential role of p53 and WOX1 in mitochondrial apoptosis (review). *Int J Mol Med*, 9(1):19–24, 2002.
- [30] N. S. Chang, J. Doherty, and A. Ensign. JNK1 physically interacts with WW domain-containing oxidoreductase (WOX1) and inhibits WOX1-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, 278(11):9195–202, 2003.

- [31] D. Chelius, C. Loeb-Hennard, S. Fleischer, J. O. McIntyre, A. R. Marks, S. De, S. Hahn, M. M. Jehl, J. Moeller, R. Philipp, J. G. Wise, and W. E. Trommer. Phosphatidylcholine activation of human heart (R)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase mutants lacking active center sulfhydryls: site-directed mutagenesis of a new recombinant fusion protein. *Biochemistry*, 39(32):9687–97, 2000.
- [32] C. P. Chen, A. Kernytsky, and B. Rost. Transmembrane helix predictions revisited. *Protein Sci*, 11(12):2774–91, 2002.
- [33] S. V. Chetyrkin, O. V. Belyaeva, W. H. Gough, and N. Y. Kedishvili. Characterization of a novel type of human microsomal 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase: unique tissue distribution and catalytic properties. *J Biol Chem*, 276(25):22278–86, 2001.
- [34] M. G. Claros. MitoProt, a Macintosh application for studying mitochondrial proteins. *Comput Appl Biosci*, 11(4):441–7, 1995.
- [35] A. M. Corbould, M. J. Bawden, T. C. Lavranos, R. J. Rodgers, and S. J. Judd. The effect of obesity on the ratio of type 3 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase mRNA to cytochrome P450 aromatase mRNA in subcutaneous abdominal and intra-abdominal adipose tissue of women. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26(2):165–75, 2002.
- [36] K. S. Crowley and R. M. Payne. Ribosome binding to mitochondria is regulated by GTP and the transit peptide. *J Biol Chem*, 273(27):17278–85, 1998.
- [37] J. M. Day, P. A. Foster, H. J. Tutill, M. F. Parsons, S. P. Newman, S. K. Chander, G. M. Allan, H. R. Lawrence, N. Vicker, B. V. Potter, M. J. Reed, and A. Purohit. 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, and not type 12, is a target for endocrine therapy of hormone-dependent breast cancer. *Int J Cancer*, 122(9):1931–40, 2008.
- [38] D. Deluca, A. Krazeisen, R. Breitling, C. Prehn, G. Moller, and J. Adamski. Inhibition of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases by phytoestrogens: comparison with other steroid metabolizing enzymes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 93(2-5):285–92, 2005.
- [39] D. Deluca, G. Moller, A. Rosinus, W. Elger, A. Hillisch, and J. Adamski. Inhibitory effects of fluorine-substituted estrogens on the activity of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol*, 248(1-2):218–24, 2006.
- [40] I. Dianzani, L. de Sanctis, P. M. Smooker, T. J. Gough, C. Alliaudi, A. Brusco, M. Spada, N. Blau, M. Dobos, H. P. Zhang, N. Yang, A. Ponzzone, W. L. Armarego, and R. G. Cotton. Dihydropteridine reductase deficiency: physical structure of the QDPR gene, identification of two new mutations and genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat*, 12(4):267–73, 1998.
- [41] P. Donnes and A. Hoglund. Predicting protein subcellular localization: past, present, and future. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2(4):209–15, 2004.
- [42] J. A. Doorn, E. Maser, A. Blum, D. J. Claffey, and D. R. Petersen. Human carbonyl reductase catalyzes reduction of 4-oxonon-2-enal. *Biochemistry*, 43(41):13106–14, 2004.
- [43] J. M. Dothie, J. R. Giglio, C. B. Moore, S. S. Taylor, and B. S. Hartley. Ribitol dehydrogenase of *Klebsiella aerogenes*. Sequence and properties of wild-type and mutant strains. *Biochem J*, 230(3):569–78, 1985.
- [44] A. Drawid and M. Gerstein. A bayesian system integrating expression data with sequence patterns for localizing proteins: comprehensive application to the yeast genome. *J Mol Biol*, 301(4):1059–75, 2000.
- [45] W. L. Duax and D. Ghosh. Structure and function of steroid dehydrogenases involved in hypertension, fertility, and cancer. *Steroids*, 62(1):95–100, 1997.
- [46] W. L. Duax, D. Ghosh, and V. Pletnev. Steroid dehydrogenase structures, mechanism of action, and disease. *Vitam Horm*, 58:121–48, 2000.

- [47] G. Duester. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem*, 267(14):4315–24, 2000.
- [48] J. A. Eisen and C. M. Fraser. Phylogenomics: intersection of evolution and genomics. *Science*, 300(5626):1706–7, 2003.
- [49] J. P. Elo, P. Harkonen, A. P. Kyllonen, O. Lukkarinen, M. Poutanen, R. Vihko, and P. Vihko. Loss of heterozygosity at 16q24.1-q24.2 is significantly associated with metastatic and aggressive behavior of prostate cancer. *Cancer Res*, 57(16):3356–9, 1997.
- [50] O. Emanuelsson, H. Nielsen, S. Brunak, and G. von Heijne. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol*, 300(4):1005–16, 2000.
- [51] D. M. Engelman, T. A. Steitz, and A. Goldman. Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annu Rev Biophys Chem*, 15:321–53, 1986.
- [52] M. Fabbri, D. Iliopoulos, F. Trapasso, R. I. Aqeilan, A. Cimmino, N. Zanasi, S. Yendamuri, S. Y. Han, D. Amadori, K. Huebner, and C. M. Croce. WWOX gene restoration prevents lung cancer growth in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(43):15611–6, 2005.
- [53] R. L. Felsted and N. R. Bachur. Mammalian carbonyl reductases. *Drug Metab Rev*, 11(1):1–60, 1980.
- [54] S. Fields and O. Song. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340(6230):245–6, 1989.
- [55] C. Filling, K. D. Berndt, J. Benach, S. Knapp, T. Prozorovski, E. Nordling, R. Ladenstein, H. Jornvall, and U. Oppermann. Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *J Biol Chem*, 277(28):25677–84, 2002.
- [56] C. Filling, X. Wu, N. Shafqat, M. Hult, E. Martensson, J. Shafqat, and U. C. Oppermann. Subcellular targeting analysis of SDR-type hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol*, 171(1-2):99–101, 2001.
- [57] S. Fischer. Analysis of cardiovascular eicosanoids in man with special reference to HPLC. *Chromatographia*, 22:416–420, 1986.
- [58] T. Floss and W. Wurst. Functional genomics by gene-trapping in embryonic stem cells. *Methods Mol Biol*, 185:347–79, 2002.
- [59] G. L. Forrest and B. Gonzalez. Carbonyl reductase. *Chem Biol Interact*, 129(1-2):21–40, 2000.
- [60] S. Furuta, A. Kobayashi, S. Miyazawa, and T. Hashimoto. Cloning and expression of cDNA for a newly identified isozyme of bovine liver 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and its import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1350(3):317–24, 1997.
- [61] W. M. Geissler, D. L. Davis, L. Wu, K. D. Bradshaw, S. Patel, B. B. Mendonca, K. O. Elliston, J. D. Wilson, D. W. Russell, and S. Andersson. Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3. *Nat Genet*, 7(1):34–9, 1994.
- [62] D. Ghosh, Z. Wawrzak, C. M. Weeks, W. L. Duax, and M. Erman. The refined three-dimensional structure of 3 alpha,20 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and possible roles of the residues conserved in short-chain dehydrogenases. *Structure*, 2(7):629–40, 1994.
- [63] D. V. Gnatenko, L. D. Cupit, E. C. Huang, A. Dhundale, P. L. Perrotta, and W. F. Bahou. Platelets express steroidogenic 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. Distinct profiles predict the essential thrombocytic phenotype. *Thromb Haemost*, 94(2):412–21, 2005.
- [64] D. Green, A. R. Marks, S. Fleischer, and J. O. McIntyre. Wild type and mutant human heart (R)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase expressed in insect cells. *Biochemistry*, 35(25):8158–65, 1996.
- [65] C. Grimm, E. Maser, E. Mobus, G. Klebe, K. Reuter, and R. Ficner. The crystal structure of 3alpha -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni* shows a

- novel oligomerization pattern within the short chain dehydrogenase/reductase family. *J Biol Chem*, 275(52):41333–9, 2000.
- [66] C. Guda and S. Subramaniam. pTARGET [corrected] a new method for predicting protein subcellular localization in eukaryotes. *Bioinformatics*, 21(21):3963–9, 2005.
- [67] C. Guggenberger, D. Ilgen, and J. Adamski. Functional analysis of cholesterol biosynthesis by RNA interference. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 104(3-5):105–9, 2007.
- [68] D. Gunn, C. Akuche, J. Baryza, M. L. Blue, C. Brennan, A. M. Campbell, S. Choi, J. Cook, P. Conrad, B. Dixon, J. Dumas, P. Ehrlich, T. Gane, T. Joe, J. Johnson, J. Jordan, R. Kramss, P. Liu, J. Levy, D. Lowe, I. McAlexander, R. Natero, A. M. Redman, W. Scott, T. Seng, R. Sibley, M. Wang, Y. Wang, J. Wood, and Z. Zhang. 4,5-Disubstituted cis-pyrrolidinones as inhibitors of type II 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Part 2. SAR. *Bioorg Med Chem Lett*, 15(12):3053–7, 2005.
- [69] C. Gunnarsson, P. L. Jerevall, K. Hammar, B. Olsson, B. Nordenskjold, A. Jansson, and O. Stal. Amplification of HSD17B1 has prognostic significance in postmenopausal breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 108(1):35–41, 2008.
- [70] K. Guo, P. Lukacik, E. Papagrigoriou, M. Meier, W. H. Lee, J. Adamski, and U. Oppermann. Characterization of human DHRS6, an orphan short chain dehydrogenase/reductase enzyme: a novel, cytosolic type 2 R-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 281(15):10291–7, 2006.
- [71] S. Hammarstrom. Biosynthesis and biological actions of prostaglandins and thromboxanes. *Arch Biochem Biophys*, 214(2):431–45, 1982.
- [72] H. Hasegawa, H. Katoh, Y. Yamaguchi, K. Nakamura, S. Futakawa, and M. Negishi. Different membrane targeting of prostaglandin EP3 receptor isoforms dependent on their carboxy-terminal tail structures. *FEBS Lett*, 473(1):76–80, 2000.
- [73] P. N. Hengen. False positives from the yeast two-hybrid system. *Trends Biochem Sci*, 22(1):33–4, 1997.
- [74] K. N. Hewitt, E. A. Walker, and P. M. Stewart. Minireview: hexose-6-phosphate dehydrogenase and redox control of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity. *Endocrinology*, 146(6):2539–43, 2005.
- [75] R. Hezova, J. Ehrmann, and Z. Kolar. WWOX, a new potential tumor suppressor gene. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 151(1):11–5, 2007.
- [76] T. Hirokawa, S. Boon-Chieng, and S. Mitaku. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics*, 14(4):378–9, 1998.
- [77] F. Hoffmann and E. Maser. Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug Metab Rev*, 39(1):87–144, 2007.
- [78] K. Hofmann and W. Stoffel. TMbase - a database of membrane spanning proteins segments. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 374:166, 1993.
- [79] U. Hoppe, P. M. Holterhus, L. Wunsch, D. Jocham, T. Drechsler, S. Thiele, C. Marschke, and O. Hiort. Tissue-specific transcription profiles of sex steroid biosynthesis enzymes and the androgen receptor. *J Mol Med*, 84(8):651–9, 2006.
- [80] Y. Horiguchi, M. Araki, and K. Motojima. 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 13 is a liver-specific lipid droplet-associated protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 370(2):235–8, 2008.
- [81] P. Horton, K. J. Park, T. Obayashi, N. Fujita, H. Harada, C. J. Adams-Collier, and K. Nakai. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res*, 35(Web Server issue):W585–7, 2007.
- [82] S. Hua and Z. Sun. Support vector machine approach for protein subcellular localization prediction. *Bioinformatics*, 17(8):721–8, 2001.

- [83] Y. Huang, R. Tang, J. Dai, S. Gu, W. Zhao, C. Cheng, M. Xu, Z. Zhou, K. Ying, Y. Xi, and Y. Mao. A novel human hydroxysteroid dehydrogenase like 1 gene (HSDL1) is highly expressed in reproductive tissues. *Mol Biol Rep*, 28(4):185–91, 2001.
- [84] D. Hyndman, D. R. Bauman, V. V. Heredia, and T. M. Penning. The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chem Biol Interact*, 143-144:621–31, 2003.
- [85] A. Iannaccone, S. A. Tedesco, K. T. Gallaher, H. Yamamoto, S. Charles, and T. P. Dryja. Fundus albipunctatus in a 6-year old girl due to compound heterozygous mutations in the RDH5 gene. *Doc Ophthalmol*, 115(2):111–6, 2007.
- [86] J. L. Ilesley, M. Sudol, and S. J. Winder. The WW domain: linking cell signalling to the membrane cytoskeleton. *Cell Signal*, 14(3):183–9, 2002.
- [87] H. Ito, Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol*, 153(1):163–8, 1983.
- [88] M. Jaconi, C. Bony, S. M. Richards, A. Terzic, S. Arnaudeau, G. Vassort, and M. Puceat. Inositol 1,4,5-trisphosphate directs Ca(2+) flow between mitochondria and the endoplasmic/sarcoplasmic reticulum: a role in regulating cardiac autonomic Ca(2+) spiking. *Mol Biol Cell*, 11(5):1845–58, 2000.
- [89] A. R. Janecke, D. A. Thompson, G. Utermann, C. Becker, C. A. Hubner, E. Schmid, C. L. McHenry, A. R. Nair, F. Ruschendorf, J. Heckenlively, B. Wissinger, P. Nurnberg, and A. Gal. Mutations in RDH12 encoding a photoreceptor cell retinol dehydrogenase cause childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet*, 36(8):850–4, 2004.
- [90] A. K. Jansson, C. Gunnarsson, M. Cohen, T. Sivik, and O. Stal. 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 14 affects estradiol levels in breast cancer cells and is a prognostic marker in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Res*, 66(23):11471–7, 2006.
- [91] J. Jarabak and R. G. Harvey. Studies on three reductases which have polycyclic aromatic hydrocarbon quinones as substrates. *Arch Biochem Biophys*, 303(2):394–401, 1993.
- [92] H. Jornvall, J. O. Hoog, and B. Persson. SDR and MDR: completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature. *FEBS Lett*, 445(2-3):261–4, 1999.
- [93] H. Jornvall, B. Persson, M. Krook, S. Atrian, R. Gonzalez-Duarte, J. Jeffery, and D. Ghosh. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry*, 34(18):6003–13, 1995.
- [94] H. Jornvall, M. Persson, and J. Jeffery. Alcohol and polyol dehydrogenases are both divided into two protein types, and structural properties cross-relate the different enzyme activities within each type. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(7):4226–30, 1981.
- [95] C. A. Jost, M. C. Marin, and Jr. Kaelin, W. G. p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature*, 389(6647):191–4, 1997.
- [96] Y. Kallberg, U. Oppermann, H. Jornvall, and B. Persson. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Eur J Biochem*, 269(18):4409–17, 2002.
- [97] Y. Kallberg and B. Persson. Prediction of coenzyme specificity in dehydrogenases/reductases. A hidden markov model-based method and its application on complete genomes. *FEBS J*, 273(6):1177–84, 2006.
- [98] M. Karbowski and R. J. Youle. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ*, 10(8):870–80, 2003.
- [99] K. Karplus, C. Barrett, and R. Hughey. Hidden Markov models for detecting remote protein homologies. *Bioinformatics*, 14(10):846–56, 1998.
- [100] K. Karplus, R. Karchin, G. Shackelford, and R. Hughey. Calibrating E-values for hidden Markov models using reverse-sequence null models. *Bioinformatics*, 21(22):4107–15, 2005.

- [101] N. Y. Kedishvili, C. L. Stone, K. M. Popov, and E. A. Chernoff. Role of alcohol dehydrogenases in steroid and retinoid metabolism. *Adv Exp Med Biol*, 414:321–9, 1997.
- [102] B. Keller. *Search for new steroid hormone metabolizing enzymes: functional genomics of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily*. PhD thesis, 2006.
- [103] B. Keller, M. Meier, and J. Adamski. Comparison of predicted and experimental subcellular localization of two putative rat steroid dehydrogenases from the short-chain dehydrogenase/reductase protein superfamily. *Mol Cell Endocrinol*, 2008.
- [104] N. Khan, K. K. Sharma, S. Andersson, and R. J. Auchus. Human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases types 1, 2, and 3 catalyze bi-directional equilibrium reactions, rather than unidirectional metabolism, in HEK-293 cells. *Arch Biochem Biophys*, 429(1):50–9, 2004.
- [105] P. P. Koundakjian and A. M. Snoswell. Ketone body and fatty acid metabolism in sheep tissues. 3-hydroxybutyrate dehydrogenase, a cytoplasmic enzyme in sheep liver and kidney. *Biochem J*, 119(1):49–57, 1970.
- [106] M. Krook, L. Marekov, and H. Jornvall. Purification and structural characterization of placental NAD(+)-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase. The primary structure reveals the enzyme to belong to the short-chain alcohol dehydrogenase family. *Biochemistry*, 29(3):738–43, 1990.
- [107] F. Labrie. Intracrinology. *Mol Cell Endocrinol*, 78(3):C113–8, 1991.
- [108] S. S. Lakhman, D. Ghosh, and J. G. Blanco. Functional significance of a natural allelic variant of human carbonyl reductase 3 (CBR3). *Drug Metab Dispos*, 33(2):254–7, 2005.
- [109] D. Laubner, R. Breitling, and J. Adamski. Surprising expression pattern of cholesterologenic enzymes during embryonic mouse development. *Developmental Biology*, 235(1):195198, 2001.
- [110] D. Laubner, R. Breitling, and J. Adamski. Embryonic expression of cholesterologenic genes is restricted to distinct domains and colocalizes with apoptotic regions in mice. *Brain Res Mol Brain Res*, 115(1):87–92, 2003.
- [111] H. R. Lawrence, N. Vicker, G. M. Allan, A. Smith, M. F. Mahon, H. J. Tutill, A. Purohit, M. J. Reed, and B. V. Potter. Novel and potent 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors. *J Med Chem*, 48(8):2759–62, 2005.
- [112] P. J. Leblanc and J. S. Ballantyne. Novel aspects of the activities and subcellular distribution of enzymes of ketone body metabolism in the liver and kidney of the goldfish, *Carassius auratus*. *J Exp Zool*, 286(4):434–9, 2000.
- [113] S. C. Lee and L. Levine. Prostaglandin metabolism. I. Cytoplasmic reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent and microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide-dependent prostaglandin E 9-ketoreductase activities in monkey and pigeon tissues. *J Biol Chem*, 249(5):1369–75, 1974.
- [114] F. Leenders, J. G. Tesdorpf, M. Markus, T. Engel, U. Seedorf, and J. Adamski. Porcine 80-kDa protein reveals intrinsic 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, fatty acyl-CoA-hydratase/dehydrogenase, and sterol transfer activities. *J Biol Chem*, 271(10):5438–42, 1996.
- [115] M. P. Leese, H. A. Hejaz, M. F. Mahon, S. P. Newman, A. Purohit, M. J. Reed, and B. V. Potter. A-ring-substituted estrogen-3-O-sulfamates: potent multitargeted anticancer agents. *J Med Chem*, 48(16):5243–56, 2005.
- [116] Z. Lu, D. Szafron, R. Greiner, P. Lu, D. S. Wishart, B. Poulin, J. Anvik, C. Macdonell, and R. Eisner. Predicting subcellular localization of proteins using machine-learned classifiers. *Bioinformatics*, 20(4):547–56, 2004.
- [117] P. Lukacik, B. Keller, G. Bunkoczi, K. L. Kavanagh, W. H. Lee, J. Adamski, and U. Oppermann. Structural and biochemical characterization of human orphan DHRS10 reveals a novel cytosolic enzyme with steroid dehydrogenase activity. *Biochem J*, 402(3):419–27, 2007.

- [118] V. Luu-The, P. Tremblay, and F. Labrie. Characterization of type 12 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, an isoform of type 3 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase responsible for estradiol formation in women. *Mol Endocrinol*, 20(2):437–43, 2006.
- [119] P. Maceratesi, N. Daude, B. Dallapiccola, G. Novelli, R. Allen, Y. Okano, and J. Reichardt. Human UDP-galactose 4' epimerase (GALE) gene and identification of five missense mutations in patients with epimerase-deficiency galactosemia. *Mol Genet Metab*, 63(1):26–30, 1998.
- [120] M. J. Macias, S. Wiesner, and M. Sudol. WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Lett*, 513(1):30–7, 2002.
- [121] J. P. MacKeigan, L. O. Murphy, and J. Blenis. Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat Cell Biol*, 7(6):591–600, 2005.
- [122] C. A. Mannella, K. Buttle, B. K. Rath, and M. Marko. Electron microscopic tomography of rat-liver mitochondria and their interaction with the endoplasmic reticulum. *Biofactors*, 8(3-4):225–8, 1998.
- [123] E. M. Marcotte, I. Xenarios, A. M. van Der Blik, and D. Eisenberg. Localizing proteins in the cell from their phylogenetic profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(22):12115–20, 2000.
- [124] Z. Marijanovic, D. Laubner, G. Moller, C. Gege, B. Husen, J. Adamski, and R. Breitling. Closing the gap: identification of human 3-ketosteroid reductase, the last unknown enzyme of mammalian cholesterol biosynthesis. *Mol Endocrinol*, 17(9):1715–25, 2003.
- [125] A. R. Marks, J. O. McIntyre, T. M. Duncan, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and S. Fleischer. Molecular cloning and characterization of (R)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase from human heart. *J Biol Chem*, 267(22):15459–63, 1992.
- [126] E. Maser and U. C. Oppermann. Role of type-1 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in detoxification processes. *Eur J Biochem*, 249(2):365–9, 1997.
- [127] T. Matsunaga, S. Shintani, and A. Hara. Multiplicity of mammalian reductases for xenobiotic carbonyl compounds. *Drug Metab Pharmacokinet*, 21(1):1–18, 2006.
- [128] K. Matsuura, A. Hara, H. Sawada, Y. Bunai, and I. Ohya. Localization of pulmonary carbonyl reductase in guinea pig and mouse: enzyme histochemical and immunohistochemical studies. *J Histochem Cytochem*, 38(2):217–23, 1990.
- [129] M. Meier, G. Moeller, and J. Adamski. Perspectives in understanding the role of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, im Druck, 2008.
- [130] M. Meier, J. Tokarz, F. Haller, R. Mindnich, and J. Adamski. Human and zebrafish hydroxysteroid dehydrogenase like 1 (HSDL1) proteins are inactive enzymes but conserved among species. *Chem Biol Interact*, im Druck, 2008.
- [131] T. Merkulova, L. E. Thornell, G. Butler-Browne, C. Oberlin, M. Lucas, N. Lamande, M. Lazar, and A. Keller. The beta enolase subunit displays three different patterns of microheterogeneity in human striated muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 20(1):55–63, 1999.
- [132] R. Mindnich. *Identifikation and characterization of zebrafish 17beta HSD type 1 and type 3: A0 comparative analysis of androgen/estrogen activity regulators, Year = 2004*. PhD thesis.
- [133] R. Mindnich, F. Haller, F. Halbach, G. Moeller, M. Hrabe de Angelis, and J. Adamski. Androgen metabolism via 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 3 in mammalian and non-mammalian vertebrates: comparison of the human and the zebrafish enzyme. *J Mol Endocrinol*, 35(2):305–16, 2005.
- [134] R. Mindnich, G. Moller, and J. Adamski. The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol*, 218(1-2):7–20, 2004.

- [135] G. Moeller and J. Adamski. Multifunctionality of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol*, 248(1-2):47–55, 2006.
- [136] G. Moeller and J. Adamski. Multifunctionality of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases: an update. *Mol Cell Endocrinol*, im Druck, 2008.
- [137] Y. A. Moon and J. D. Horton. Identification of two mammalian reductases involved in the two-carbon fatty acyl elongation cascade. *J Biol Chem*, 278(9):7335–43, 2003.
- [138] C. H. Moore, S. S. Taylor, M. J. Smith, and B. S. Hartley. *Atlas of Protein Sequence*, volume 5. National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., 1978.
- [139] C. Morrissey and R. W. Watson. Phytoestrogens and prostate cancer. *Curr Drug Targets*, 4(3):231–41, 2003.
- [140] G. Y. Na, S. K. Seo, S. J. Lee, D. W. Kim, M. K. Kim, and J. C. Kim. Upregulation of the NNP-1 (novel nuclear protein-1, D21S2056E) gene in keloid tissue determined by cDNA microarray and in situ hybridization. *Br J Dermatol*, 151(6):1143–9, 2004.
- [141] R. Nair and B. Rost. Mimicking cellular sorting improves prediction of subcellular localization. *J Mol Biol*, 348(1):85–100, 2005.
- [142] K. Nakai and P. Horton. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci*, 24(1):34–6, 1999.
- [143] K. Nakai and M. Kanehisa. A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics*, 14(4):897–911, 1992.
- [144] M. Nakanishi, Y. Deyashiki, K. Ohshima, and A. Hara. Cloning, expression and tissue distribution of mouse tetrameric carbonyl reductase. Identity with an adipocyte 27-kDa protein. *Eur J Biochem*, 228(2):381–7, 1995.
- [145] T. Nakayama, K. Matsuura, M. Nakagawa, A. Hara, and H. Sawada. Subcellular distribution and properties of carbonyl reductase in guinea pig lung. *Arch Biochem Biophys*, 264(2):492–501, 1988.
- [146] J. L. Napoli. Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin Immunol Immunopathol*, 80(3 Pt 2):S52–62, 1996.
- [147] O. O. Oduwole, Y. Li, V. V. Isomaa, A. Mantyniemi, A. E. Pulkka, Y. Soini, and P. T. Vihko. 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is an independent prognostic marker in breast cancer. *Cancer Res*, 64(20):7604–9, 2004.
- [148] O. O. Oduwole, M. J. Makinen, V. V. Isomaa, A. Pulkka, P. Jernvall, T. J. Karttunen, and P. T. Vihko. 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2: independent prognostic significance and evidence of estrogen protection in female patients with colon cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 87(2-3):133–40, 2003.
- [149] M. Ohnuki, N. Takahashi, M. Yamasaki, and T. Fukui. Different localization in rat brain of the novel cytosolic ketone body-utilizing enzyme, acetoacetyl-CoA synthetase, as compared to succinyl-CoA:3-oxoacid CoA-transferase. *Biochim Biophys Acta*, 1729(3):147–53, 2005.
- [150] S. G. Oliver. From DNA sequence to biological function: the new “voyage of the beagle“. *Biochem Soc Trans*, 24(1):291–2, 1996.
- [151] S. G. Oliver. Functional genomics: lessons from yeast. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 357(1417):17–23, 2002.
- [152] L. E. Olson, D. Bedja, S. J. Alvey, A. J. Cardounel, K. L. Gabrielson, and R. H. Reeves. Protection from doxorubicin-induced cardiac toxicity in mice with a null allele of carbonyl reductase 1. *Cancer Res*, 63(20):6602–6, 2003.
- [153] U. Oppermann. Carbonyl reductases: the complex relationships of mammalian carbonyl- and quinone-reducing enzymes and their role in physiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47:293–322, 2007.

- [154] U. Oppermann, C. Filling, M. Hult, N. Shafqat, X. Wu, M. Lindh, J. Shafqat, E. Nordling, Y. Kallberg, B. Persson, and H. Jornvall. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem Biol Interact*, 143-144:247–53, 2003.
- [155] U. C. Oppermann, C. Filling, and H. Jornvall. Forms and functions of human SDR enzymes. *Chem Biol Interact*, 130-132(1-3):699–705, 2001.
- [156] U. C. Oppermann and E. Maser. Molecular and structural aspects of xenobiotic carbonyl metabolizing enzymes. Role of reductases and dehydrogenases in xenobiotic phase I reactions. *Toxicology*, 144(1-3):71–81, 2000.
- [157] M. H. Park, Y. B. Lee, and Y. A. Joe. Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. *Biol Signals*, 6(3):115–23, 1997.
- [158] M. H. Park, E. C. Wolff, and J. E. Folk. Is hypusine essential for eukaryotic cell proliferation? *Trends Biochem Sci*, 18(12):475–9, 1993.
- [159] H. R. Pelham and R. J. Jackson. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem*, 67(1):247–56, 1976.
- [160] H. Peltoketo, V. Luu-The, J. Simard, and J. Adamski. 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/17-ketosteroid reductase (KSR) family; nomenclature and main characteristics of the 17HSD/KSR enzymes. *J Mol Endocrinol*, 23(1):1–11, 1999.
- [161] H. Peltoketo, P. Vihko, and R. Vihko. Regulation of estrogen action: role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Vitam Horm*, 55:353–98, 1999.
- [162] T. M. Penning. Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocr Rev*, 18(3):281–305, 1997.
- [163] T. M. Penning. Hydroxysteroid dehydrogenases and pre-receptor regulation of steroid hormone action. *Hum Reprod Update*, 9(3):193–205, 2003.
- [164] T. M. Penning, Y. Jin, T. L. Rizner, and D. R. Bauman. Pre-receptor regulation of the androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol*, 281(1-2):1–8, 2008.
- [165] B. Persson, J. Bray, B. Bruford, S.L. Dellaporta, R. Gonzalez Duarte, H. Jornvall, Y. Kallberg, K. L. Kavanagh, N. Kedishvili, S. Orchard, T.M. Penning, J. Thornton, J. Adamski, and U. Oppermann. The Short-Chain Dehydrogenase/Reductase (SDR) Nomenclature Initiative. *Chem Biol Interact*, im Druck, 2008.
- [166] B. Persson, Y. Kallberg, U. Oppermann, and H. Jornvall. Coenzyme-based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chem Biol Interact*, 143-144:271–8, 2003.
- [167] B. Persson, M. Krook, and H. Jornvall. Short-chain dehydrogenases/reductases. *Adv Exp Med Biol*, 372:383–95, 1995.
- [168] V. Z. Pletnev and W. L. Duax. Rational proteomics IV: modeling the primary function of the mammalian 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 8. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 94(4):327–35, 2005.
- [169] D. Poirier. Inhibitors of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Curr Med Chem*, 10(6):453–77, 2003.
- [170] D. Poirier, H. J. Chang, A. Azzi, R. P. Boivin, and S. X. Lin. Estrone and estradiol C-16 derivatives as inhibitors of type 1 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Mol Cell Endocrinol*, 248(1-2):236–8, 2006.
- [171] D. Poirier, L. C. Ciobanu, and M. Berube. A multidetachable sulfamate linker successfully used in a solid-phase strategy to generate libraries of sulfamate and phenol derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, 12(20):2833–8, 2002.

- [172] K. Pollow, H. Lubbert, and B. Pollow. Studies on 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human endometrium and endometrial carcinoma. III. Partial purification and characterization of the microsomal enzyme. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 80(2):355–64, 1975.
- [173] C. V. Rao and C. W. Harker. Prostaglandin E and F<sub>2</sub>α receptors in bovine corpus luteum plasma membranes are two different macromolecular entities. *Biochem Biophys Res Commun*, 85(3):1054–60, 1978.
- [174] A. Reinhardt and T. Hubbard. Using neural networks for prediction of the subcellular location of proteins. *Nucleic Acids Res*, 26(9):2230–6, 1998.
- [175] M. G. Rossmann, D. Moras, and K. W. Olsen. Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature*, 250(463):194–9, 1974.
- [176] N. Sakurai, Y. Miki, T. Suzuki, K. Watanabe, T. Narita, K. Ando, T. M. Yung, D. Aoki, H. Sasano, and H. Handa. Systemic distribution and tissue localizations of human 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 12. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 99(4-5):174–81, 2006.
- [177] H. Sasano, T. Suzuki, Y. Miki, and T. Moriya. Intracrinology of estrogens and androgens in breast carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 108(3-5):181–5, 2008.
- [178] A. Schieber, R. W. Frank, and S. Ghisla. Purification and properties of prostaglandin 9-ketoreductase from pig and human kidney. Identity with human carbonyl reductase. *Eur J Biochem*, 206(2):491–502, 1992.
- [179] G. Schneider and U. Fechner. Advances in the prediction of protein targeting signals. *Proteomics*, 4(6):1571–80, 2004.
- [180] M. F. Schwartz and H. Jornvall. Structural analyses of mutant and wild-type alcohol dehydrogenases from drosophila melanogaster. *Eur J Biochem*, 68(1):159–68, 1976.
- [181] M. S. Scott, D. Y. Thomas, and M. T. Hallett. Predicting subcellular localization via protein motif co-occurrence. *Genome Res*, 14(10A):1957–66, 2004.
- [182] N. Seiler. Catabolism of polyamines. *Amino Acids*, 26(3):217–33, 2004.
- [183] N. Shafqat, H. U. Marschall, C. Filling, E. Nordling, X. Q. Wu, L. Bjork, J. Thyberg, E. Martensson, S. Salim, H. Jornvall, and U. Oppermann. Expanded substrate screenings of human and Drosophila type 10 17β-hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs) reveal multiple specificities in bile acid and steroid hormone metabolism: characterization of multifunctional 3α/7α/7β/17β/20β/21-HSD. *Biochem J*, 376(Pt 1):49–60, 2003.
- [184] R. L. Sidman and M. C. Green. Retinal degeneration in the mouse: Location of the Rd locus in linkage group Xvii. *J Hered*, 56:23–9, 1965.
- [185] C. Siligan, J. Ban, R. Bachmaier, L. Spahn, M. Kreppel, K. L. Schaefer, C. Poremba, D. N. Aryee, and H. Kovar. EWS-FLI1 target genes recovered from Ewing’s sarcoma chromatin. *Oncogene*, 24(15):2512–24, 2005.
- [186] J. C. Simpson, R. Wellenreuther, A. Poustka, R. Pepperkok, and S. Wiemann. Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing. *EMBO Rep*, 1(3):287–92, 2000.
- [187] L. Sipos and G. von Heijne. Predicting the topology of eukaryotic membrane proteins. *Eur J Biochem*, 213(3):1333–40, 1993.
- [188] E. L. Sonnhammer, G. von Heijne, and A. Krogh. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, 6:175–82, 1998.
- [189] M. Stanbrough, G. J. Bublely, K. Ross, T. R. Golub, M. A. Rubin, T. M. Penning, P. G. Febbo, and S. P. Balk. Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res*, 66(5):2815–25, 2006.

- [190] S. Steckelbroeck, B. Stoffel-Wagner, R. Reichelt, J. Schramm, F. Bidlingmaier, L. Siekmann, and D. Klingmuller. Characterization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in brain tissue: testosterone formation in the human temporal lobe. *J Neuroendocrinol*, 11(6):457–64, 1999.
- [191] A. I. Su, T. Wiltshire, S. Batalov, H. Lapp, K. A. Ching, D. Block, J. Zhang, R. Soden, M. Hayakawa, G. Kreiman, M. P. Cooke, J. R. Walker, and J. B. Hogenesch. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(16):6062–7, 2004.
- [192] J. Su, M. Lin, and J. L. Napoli. Complementary deoxyribonucleic acid cloning and enzymatic characterization of a novel 17beta/3alpha-hydroxysteroid/retinoid short chain dehydrogenase/reductase. *Endocrinology*, 140(11):5275–84, 1999.
- [193] K. Takenaka, E. Ogawa, H. Oyanagi, H. Wada, and F. Tanaka. Carbonyl reductase expression and its clinical significance in non-small-cell lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14(8):1972–5, 2005.
- [194] T. Tamaoki, H. Nomoto, I. Takahashi, Y. Kato, M. Morimoto, and F. Tomita. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca<sup>++</sup>-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, 135(2):397–402, 1986.
- [195] M. Tanaka, R. Bateman, D. Rauh, E. Vaisberg, S. Ramachandani, C. Zhang, K. C. Hansen, A. L. Burlingame, J. K. Trautman, K. M. Shokat, and C. L. Adams. An unbiased cell morphology-based screen for new, biologically active small molecules. *PLoS Biol*, 3(5):e128, 2005.
- [196] B. Tchédam Ngatcha, V. Luu-The, F. Labrie, and D. Poirier. Androsterone 3alpha-ether-3beta-substituted and androsterone 3beta-substituted derivatives as inhibitors of type 3 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase: chemical synthesis and structure-activity relationship. *J Med Chem*, 48(16):5257–68, 2005.
- [197] T. Terada, Y. Sugihara, K. Nakamura, H. Mizobuchi, and M. Maeda. Further characterization of chinese hamster carbonyl reductases (CHCRs). *Chem Biol Interact*, 143-144:373–81, 2003.
- [198] D. R. Thatcher. The complete amino acid sequence of three alcohol dehydrogenase alleloenzymes (AdhN-11, AdhS and AdhUF) from the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *Biochem J*, 187(3):875–83, 1980.
- [199] J. W. Tomlinson, E. A. Walker, I. J. Bujalska, N. Draper, G. G. Lavery, M. S. Cooper, M. Hewison, and P. M. Stewart. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocr Rev*, 25(5):831–66, 2004.
- [200] M. R. Tremblay, R. P. Boivin, V. Luu-The, and D. Poirier. Inhibitors of type 1 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase with reduced estrogenic activity: modifications of the positions 3 and 6 of estradiol. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 20(2):153–63, 2005.
- [201] R. Y. Tsien. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 67:509–44, 1998.
- [202] G. E. Tusnady and I. Simon. Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J Mol Biol*, 283(2):489–506, 1998.
- [203] M. Umemoto, Y. Yokoyama, S. Sato, S. Tsuchida, F. Al-Mulla, and Y. Saito. Carbonyl reductase as a significant predictor of survival and lymph node metastasis in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer*, 85(7):1032–6, 2001.
- [204] N. Usami, K. Kitahara, S. Ishikura, M. Nagano, S. Sakai, and A. Hara. Characterization of a major form of human isatin reductase and the reduced metabolite. *Eur J Biochem*, 268(22):5755–63, 2001.
- [205] W. Van Criekinge and R. Beyaert. Yeast Two-Hybrid: State of the art. *Biol Proced Online*, 2:1–38, 1999.
- [206] N. Vicker, X. Su, H. Lawrence, A. Cruttenden, A. Purohit, M. J. Reed, and B. V. Potter. A novel 18 beta-glycyrrhetic acid analogue as a potent and selective inhibitor of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2. *Bioorg Med Chem Lett*, 14(12):3263–7, 2004.

- [207] P. Vihko, P. Harkonen, P. Soronen, S. Torn, A. Herrala, R. Kurkela, A. Pulkka, O. Oduwole, and V. Isomaa. 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases—their role in pathophysiology. *Mol Cell Endocrinol*, 215(1-2):83–8, 2004.
- [208] P. Vihko, A. Herrala, P. Harkonen, V. Isomaa, H. Kaija, R. Kurkela, Y. Li, L. Patrikainen, A. Pulkka, P. Soronen, and S. Torn. Enzymes as modulators in malignant transformation. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 93(2-5):277–83, 2005.
- [209] P. Vihko, A. Herrala, P. Harkonen, V. Isomaa, H. Kaija, R. Kurkela, and A. Pulkka. Control of cell proliferation by steroids: the role of 17HSDs. *Mol Cell Endocrinol*, 248(1-2):141–8, 2006.
- [210] G. von Heijne. Membrane protein structure prediction. hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol*, 225(2):487–94, 1992.
- [211] K. Watanabe, C. Sugawara, A. Ono, Y. Fukuzumi, S. Itakura, M. Yamazaki, H. Tashiro, K. Osoegawa, E. Soeda, and T. Nomura. Mapping of a novel human carbonyl reductase, CBR3, and ribosomal pseudogenes to human chromosome 21q22.2. *Genomics*, 52(1):95–100, 1998.
- [212] B. Wermuth. Purification and properties of an NADPH-dependent carbonyl reductase from human brain. Relationship to prostaglandin 9-ketoreductase and xenobiotic ketone reductase. *J Biol Chem*, 256(3):1206–13, 1981.
- [213] B. Wermuth, K. M. Bohren, G. Heinemann, J. P. von Wartburg, and K. H. Gabbay. Human carbonyl reductase. Nucleotide sequence analysis of a cDNA and amino acid sequence of the encoded protein. *J Biol Chem*, 263(31):16185–8, 1988.
- [214] B. Wermuth, K. L. Platts, A. Seidel, and F. Oesch. Carbonyl reductase provides the enzymatic basis of quinone detoxication in man. *Biochem Pharmacol*, 35(8):1277–82, 1986.
- [215] H. Wirth and B. Wermuth. Immunohistochemical localization of carbonyl reductase in human tissues. *J Histochem Cytochem*, 40(12):1857–63, 1992.
- [216] H. P. Wirth and B. Wermuth. Immunohistochemical localisation of aldehyde and aldose reductase in human tissues. *Prog Clin Biol Res*, 174:231–9, 1985.
- [217] M. J. Wishart and J. E. Dixon. Gathering STYX: phosphatase-like form predicts functions for unique protein-interaction domains. *Trends Biochem Sci*, 23(8):301–6, 1998.
- [218] Q. Wu, M. Xu, C. Cheng, Z. Zhou, Y. Huang, W. Zhao, L. Zeng, J. Xu, X. Fu, K. Ying, Y. Xie, and Y. Mao. Molecular cloning and characterization of a novel Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1 gene from human fetal brain. *Mol Biol Rep*, 28(4):193–8, 2001.
- [219] K. Yamaki, J. Hong, K. Hiraizumi, J. W. Ahn, O. Zee, and K. Ohuchi. Participation of various kinases in staurosporine induced apoptosis of RAW 264.7 cells. *J Pharm Pharmacol*, 54(11):1535–44, 2002.
- [220] M. Yi, D. Weaver, and G. Hajnoczky. Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit. *J Cell Biol*, 167(4):661–72, 2004.
- [221] A. Yoshiki and K. Moriwaki. Mouse phenome research: implications of genetic background. *ILAR J*, 47(2):94–102, 2006.
- [222] G. Zubay. In vitro synthesis of protein in microbial systems. *Annu Rev Genet*, 7:267–87, 1973.

# A Anhang

## A.1 Protein-Identifikationsnummern der Datensätze zu den phylogenetischen Analysen

Die den abgebildeten phylogenetischen Stammbäumen zugrunde liegenden Datensätze wurden aus folgenden Protein-Identifikationsnummern (NCBI-Datenbank) erstellt. Nicht alle Sequenzen treten in der graphischen Darstellung in Erscheinung, da einige aus dem Grund der Redundanz entfernt und andere, zur besseren Übersichtlichkeit, in Gruppen zusammengefaßt wurden.

### A.1.1 Datensatz zu hCBR4

A4IFA7.1, AAH09118.1, **AAH21973.1**, AAH33650.1, AAH65615.1, AAH68653.1, AAH80139.1, AAH86378.1, AAI34483.1, AAP70488.1, AAV82180.1, ABA88684.1, ABB26702.1, ABB34391.1, ABB56716.1, ABC19264.1, ABC44435.1, ABI45582.1, ABP67197.1, ABR48906.1, ABV87814.1, ABW30582.1, ACH40108.1, BAB55045.1, BAC31519.1, BAD79035.1, BAE29830.1, BAE84449.1, BAF84445.1, BAG03212.1, CAE08367.1, CAG74702.1, CAH10582.1, CAK27584.1, CAO91447.1, CAO97068.1, EAQ69571.1, EAQ74970.1, EAT15928.1, EAT53246.1, EAU70455.1, EAX04797.1, EAX04798.1, EBK51016.1, ECA17139.1, ECA17873.1, ECR00102.1, ECR03022.1, ECV84936.1, ECW46386.1, EDA75174.1, EDC95842.1, EDL28650.1, EDL28651.1, EDL87203.1, EDL87204.1, NP\_001007873.1, NP\_001077186.1, NP\_001084717.1, NP\_116172.2, NP\_663570.1, NP\_872613.1, NP\_897943.1, NP\_991219.1, Q68ER2.1, Q6NUE2.1, Q6P0H7.1, Q7TS56.1, Q8N4T8.2, Q91VT4.2, XP\_001365677.1, XP\_001499252.1, XP\_001508580.1, XP\_420403.1, XP\_526726.2, XP\_534547.1, YP\_001180388.1, YP\_001226937.1, YP\_001320565.1, YP\_001502349.1, YP\_001519901.1, YP\_001658404.1, YP\_001760421.1, YP\_001907951.1, YP\_002139904.1, YP\_049897.1, YP\_155729.1, YP\_171555.1, YP\_356854.1, YP\_377746.1, YP\_380946.1, YP\_399703.1, YP\_429807.1, YP\_444200.1, YP\_518893.1, YP\_731339.1, ZP\_01079595.1, ZP\_01084914.1, ZP\_01312316.1, ZP\_01369664.1, ZP\_01470074.1

### A.1.2 Datensatz zu hDHRS1

2QQ5, AAA82327.2, AAF60486.1, AAG24139.2, AAH03930.1, AAH14057.1, AAH15943.1, AAH72703.1, AAH79263.1, AAI12529.1, AAI64751.1, AAN32660.1, AAP06340.1, AAX27589.2, ABA24503.1, ABG51825.1, ABG94404.1, ABG98410.1, ABP43742.1, ABQ22778.1, ABQ22854.1, ACB53874.1, ACC81222.1, BAB23093.1, BAB71694.1, BAB74951.1, BAD56131.1, BAD58430.1, BAE02536.1, BAE27072.1, BAE35519.1, BAE40086.1, BAE40112.1, CAD38773.1, CAD62314.1, CAF97706.1, CAF97711.1, CAH92610.1, CAL37921.1, CAL38469.1, CAP25711.1, CAP32799.1, CAP36449.1, CAQ13505.1, EAM50760.1, EAW43550.1, EAW66036.1, EAW66037.1, EAW66038.1, EAW66039.1, EAW66040.1, EAZ88942.1, EDI14392.1, EDL36244.1, EDL36245.1, EDM14275.1, EDO34536.1, EDP33330.1, EDT61238.1, EDV25953.1, EDV25954.1, NP\_001002205.1, NP\_001007622.1, NP\_001039759.1, NP\_081095.2, NP\_487292.1, NP\_498146.1, NP\_505327.2, NP\_508580.2, **NP\_612461.1**, Q96LJ7.1, Q99L04.1, XP\_001113707.1, XP\_001113806.1, XP\_001113836.1, XP\_001169595.1, XP\_001182580.1, XP\_001369623.1, XP\_001626636.1, XP\_001664845.1, XP\_001674527.1, XP\_001676394.1, XP\_001897810.1, XP\_002111986.1, XP\_002111987.1, XP\_509871.2, XP\_537393.2, XP\_797581.1, YP\_001132530.1, YP\_001805940.1, YP\_001866165.1, YP\_117495.1, YP\_119794.1, YP\_325398.1, YP\_702562.1, YP\_706568.1, YP\_722298.1, ZP\_00516163.1, ZP\_01631835.1, ZP\_01731642.1, ZP\_02941202.1

### A.1.3 Datensatz zu hDHR56

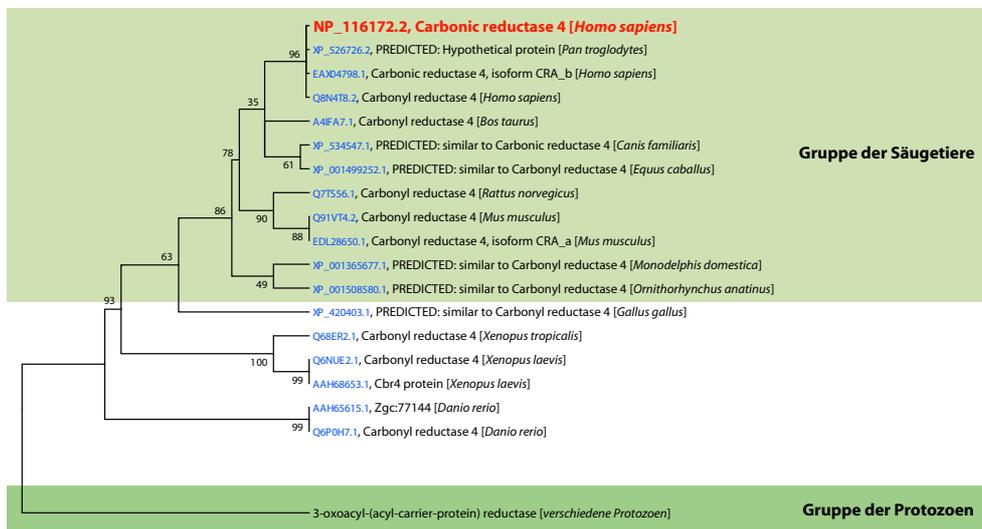
A99950, AAF75282.1, AAH01953.1, AAH37277.1, AAH95414.1, AAQ89200.1, AF3105, B86724, B95928, BAB51360.1, CAA68181.1, CAG33590.1, D85885, F98181, NP\_001017809.1, **NP\_064524.3**, NP\_081484.1, NP\_228136.1, NP\_229523.1, NP\_274915.1, NP\_283350.1, NP\_311324.2, NP\_416921.3, NP\_624679.1, NP\_639406.1, NP\_644485.1, NP\_659924.1, NP\_708278.2, NP\_754842.1, NP\_769975.1, NP\_770554.1, NP\_812682.1, NP\_880609.1, NP\_884542.1, NP\_888293.1, NP\_890607.1, NP\_903084.1, NP\_948811.1, NP\_978135.1, P37440, XP\_215705.3, XP\_371837.1, XP\_420669.1, XP\_517375.1, XP\_518649.1, XP\_535676.1, XP\_593322.1, XP\_638521.1, XP\_664259.1, YP\_006017.1, YP\_044476.1, YP\_070103.1, YP\_110801.1, YP\_145316.1, YP\_149744.1, YP\_167644.1, YP\_195711.1, YP\_203176.1, YP\_209169.1, YP\_213513.1, YP\_217431.1, YP\_221006.1, YP\_245216.1, ZP\_00006816.1, ZP\_00207054.1, ZP\_00213766.1, ZP\_00213851.1, ZP\_00279106.1, ZP\_00302322.1, ZP\_00302621.1, ZP\_00382185.1, ZP\_00421178.1, ZP\_00447483.1, ZP\_00460867.1, ZP\_00472600.1, ZP\_00501320.1, ZP\_00508605.1, ZP\_00533224.1, ZP\_00570670.1, ZP\_00573577.1, ZP\_00599786.1, ZP\_00600581.1, ZP\_00601484.1, ZP\_00601805.1, ZP\_00611583.1, ZP\_00622136.1

### A.1.4 Datensatz zu hHSDL1

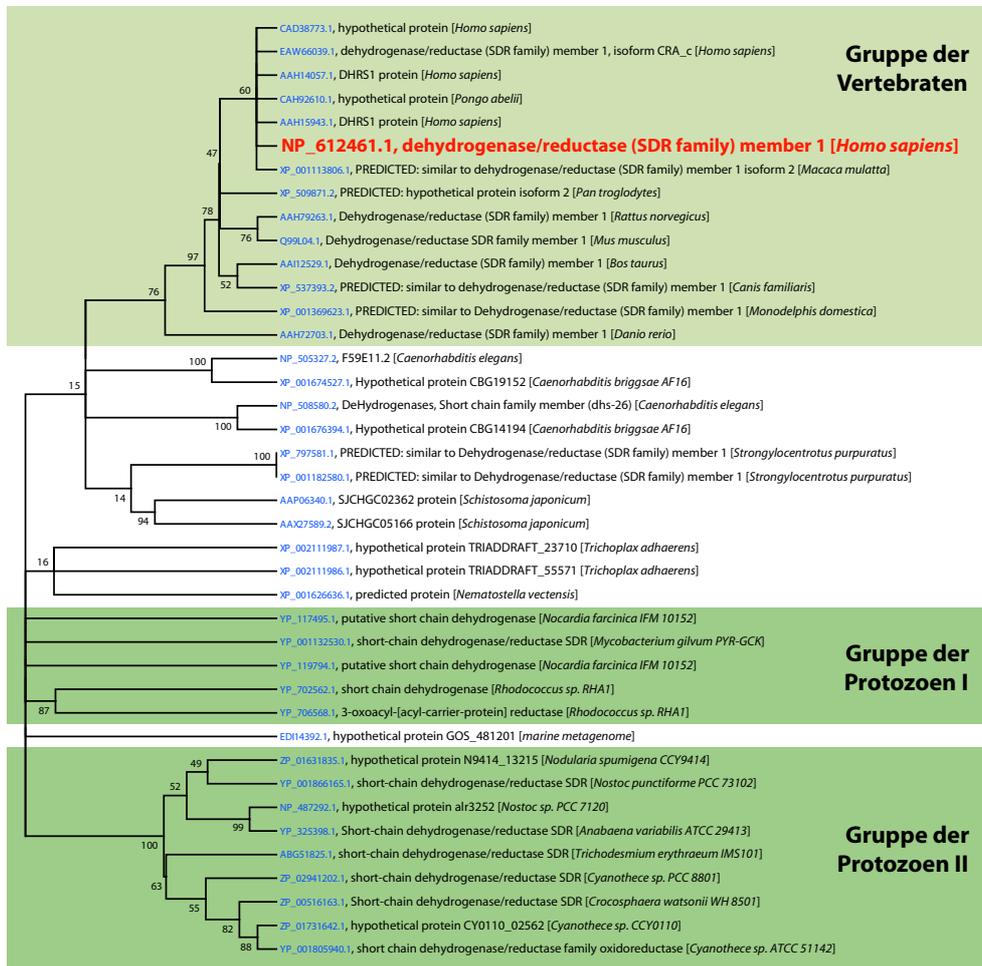
A5PJF6.1, A5WWC6.1, AAD44482.1, AAF53580.3, AAH12043.1, AAH18084.2, AAH41194.1, AAH48053.1, AAH61543.1, AAH65074.1, AAH74162.1, AAH84629.1, AAH86821.1, AAH97457.1, AAI04219.1, AAI04220.1, AAI06918.1, AAI42093.1, AAK15047.1, AAK16927.1, AAM11201.1, AAN10974.1, AAN10975.1, AAN10976.2, AAN71421.1, AAP36605.1, AAS58450.1, AAS58451.1, AAW25162.1, AAW27771.1, AAW27868.1, AAX08960.1, AAY42207.1, ABW03509.1, BAC11262.1, BAC40340.1, BAC40401.1, BAD08526.1, BAD96601.1, BAE29726.1, BAE31180.1, BAF85314.1, BAG52039.1, BAG52086.1, CAE59108.1, CAE66201.1, CAE66202.1, CAE68425.1, CAE72516.1, CAG12961.1, CAG32125.1, CAH71615.1, CAH92260.1, CAI11665.1, CAJ83357.1, CAN88283.1, D89134, EAL31581.1, EAL33589.1, EAL39713.1, EAW68082.1, EAW68088.1, EAW95502.1, EAW95503.1, EAW95504.1, EDL11602.1, EDL79606.1, EDL92671.1, EDO41444.1, EDV25139.1, EDV54886.1, EDV99297.1, EDW11504.1, NP\_001005837.1, NP\_001008607.1, NP\_001017234.1, NP\_001020067.1, NP\_001074384.1, NP\_001080055.1, NP\_001088370.1, NP\_001092341.1, NP\_001097168.1, NP\_001126323.1, NP\_032317.1, NP\_057226.1, **NP\_113651.3**, NP\_114455.1, NP\_446459.1, NP\_498386.2, NP\_506449.1, NP\_507092.1, NP\_508591.1, NP\_572420.1, NP\_609816.1, NP\_609817.1, NP\_724022.2, NP\_724023.1, NP\_780394.1, NP\_955907.1, NP\_957175.1, Q10130, Q28IU1.1, Q3SXM5.2, Q4V8B7.1, Q53GQ0.2, Q5E9H7.1, Q5R7K0.1, Q5XG41.1, Q5ZJG8.1, Q6P7R8.1, Q8AVY8.1, Q8BTX9.1, T15867, XP\_001112230.1, XP\_001112266.1, XP\_001158375.1, XP\_001179990.1, XP\_001189408.1, XP\_001356525.1, XP\_001374727.1, XP\_001509376.1, XP\_001603427.1, XP\_001633507.1, XP\_001949331.1, XP\_001974486.1, XP\_001993372.1, XP\_002002062.1, XP\_002113029.1, XP\_317611.2, XP\_317612.2, XP\_341697.1, XP\_393710.2, XP\_396586.1, XP\_520709.1, XP\_536765.1, XP\_536765.2, XP\_788968.2, XP\_848504.1, XP\_966502.1

## A.2 Phylogenetische Stammbäume

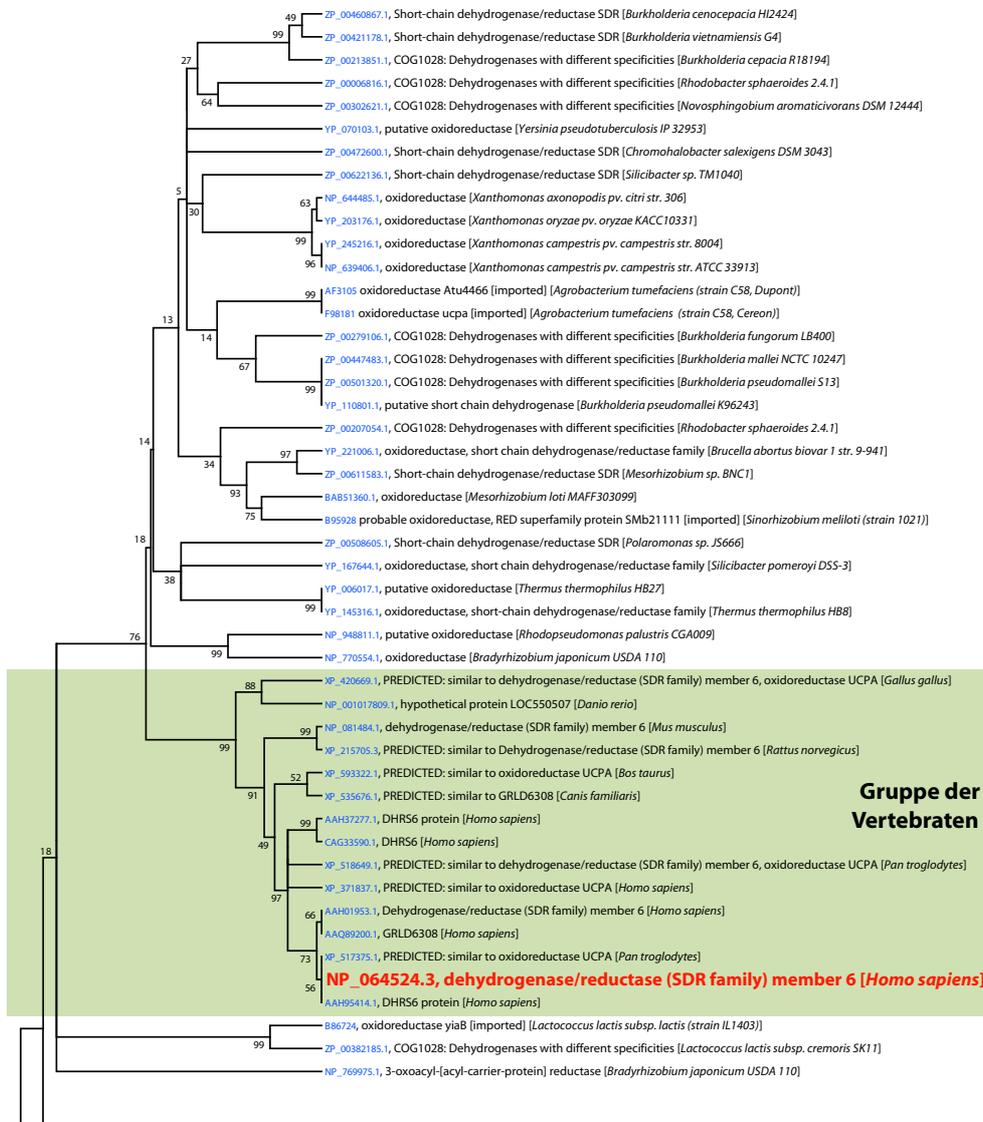
### A.2.1 Phylogenetischer Stammbaum zu hCBR4



## A.2.2 Phylogenetischer Stammbaum zu hDHR51



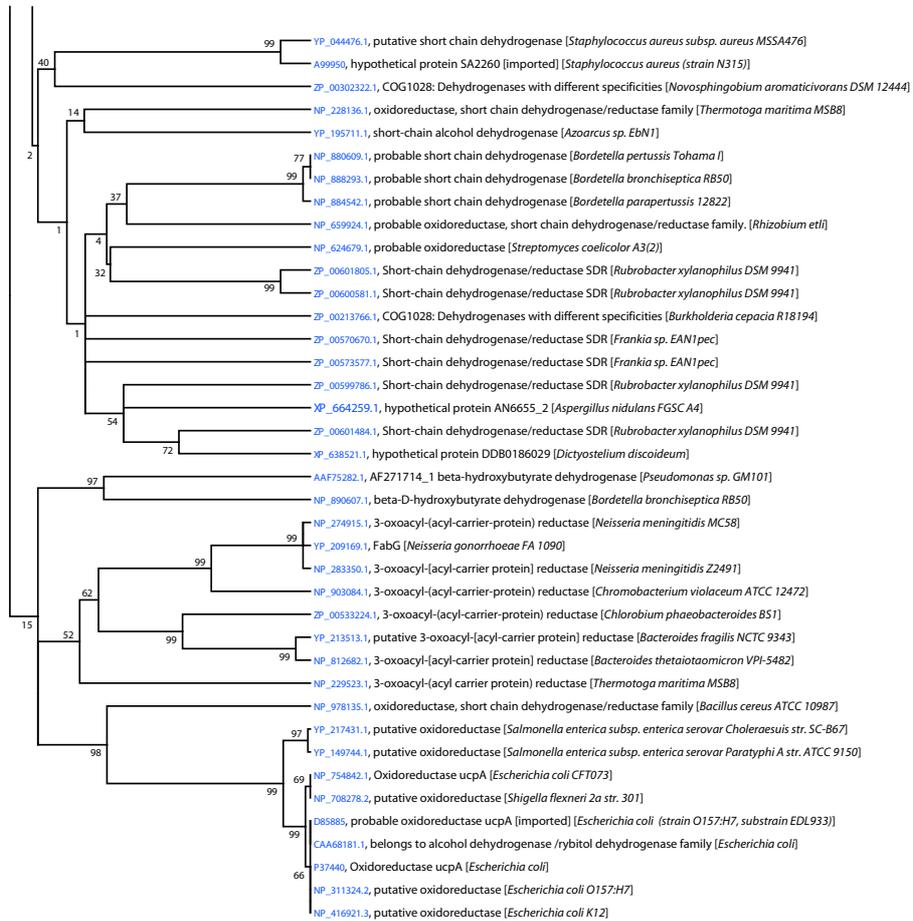
### A.2.3 Phylogenetischer Stammbaum zu hDHRS6



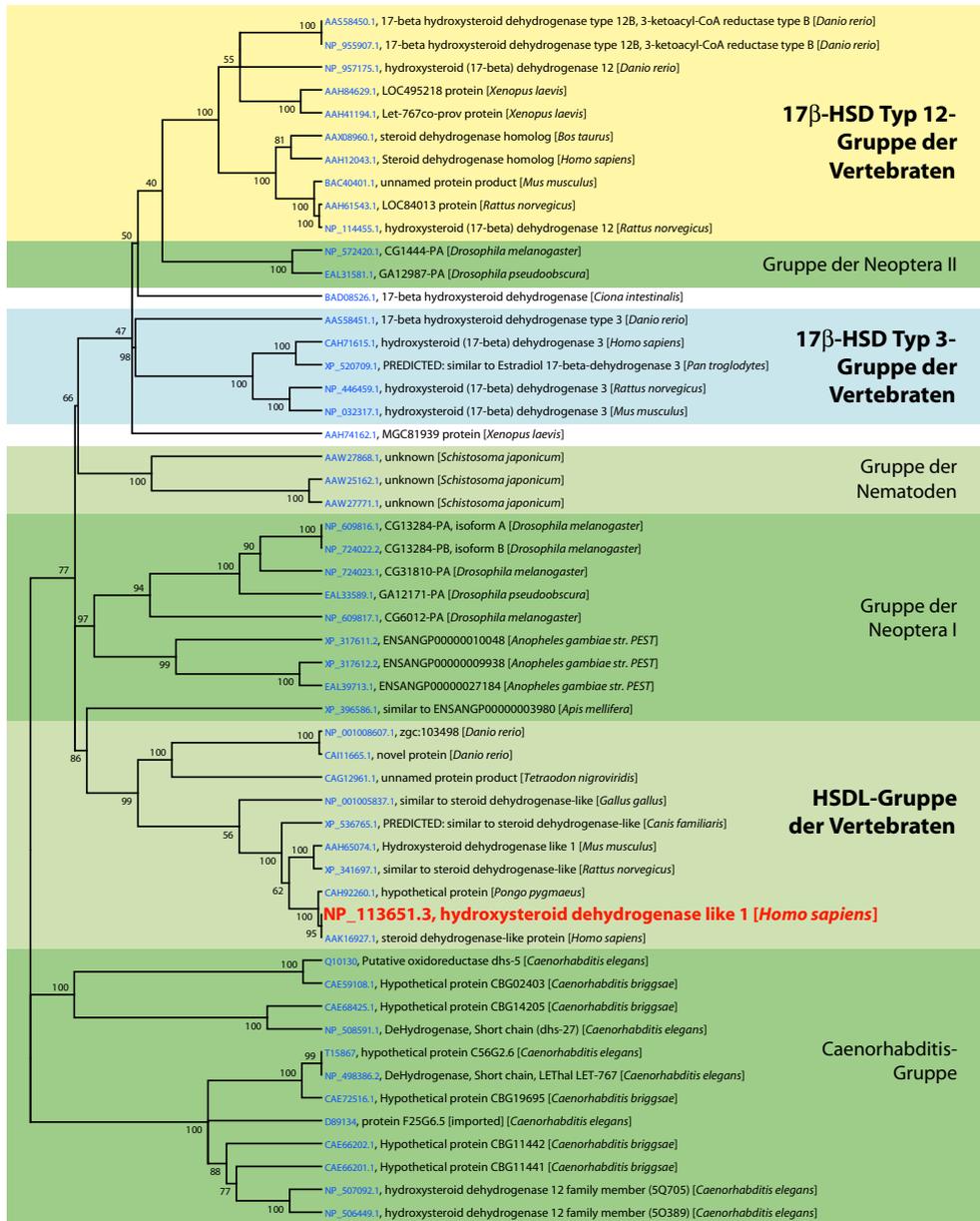
Fortsetzung des phylogenetischen Stammbaums folgt auf der nächsten Seite.

## A Anhang

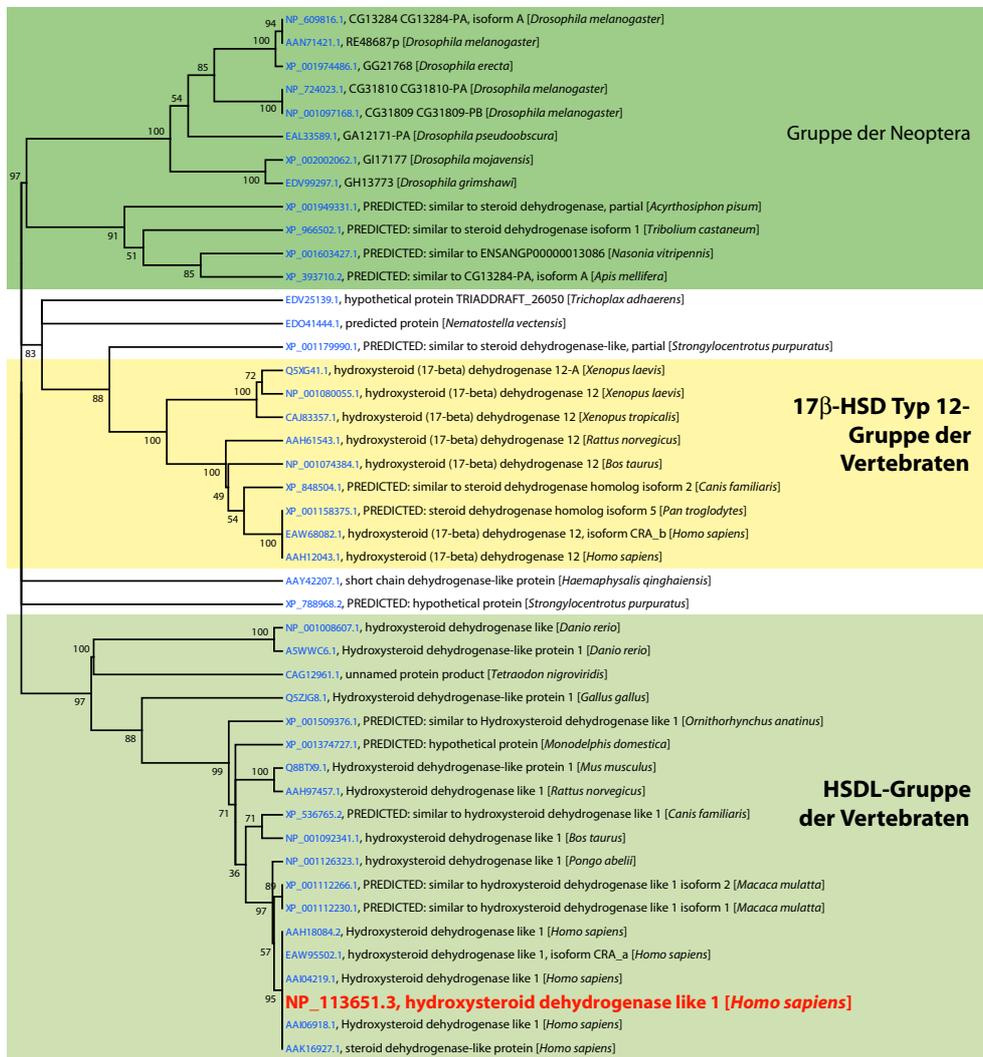
Fortsetzung des phylogenetischen Stammbaums zu hDHRS6.



A.2.4 Phylogenetischer Stammbaum zu hHSDL1 - Februar 2005



## A.2.5 Phylogenetischer Stammbaum zu hHSDL1 - Juli 2008



## A.3 Verwendete Primer

Forward-Primer (for) binden am 5′-, Reverse-Primer (rev) am 3′-Ende des entsprechenden PCR-Produkts.

### A.3.1 Primer und Schnittstellen zur Klonierung

Gen		Primersequenz	Vektor	RS
hDHRS1	for	TATAAAGCTTATGGCAGCTCCCATGAATGGCCAAGT	1, 3, 4, 9	HindIII
bzw.	for	TATAGAATTCATGGCAGCTCCCATGAATGG	2, 5, 6, 7	EcoRI
hDHRS1	for	CATGGCAGCTCCCATGAATGG	8	-
(Y163F)	rev	TTAACCGCGGAACTTGCTAGTGTAGAGGGCAATA	1, 4, 9	SacII
	rev	TTAACCCGGGTTAGAACTTGCTAGTGTAGAGGGCA	2	XmaI
	rev	TTAAGAATTCCTTAGAACTTGCTAGTGTAGAGGGCA	3	EcoRI
	rev	TTAAAAGCTTTTAGAACTTGCTAGTGTAGAGGGCA	5, 6, 7	HindIII
	rev	TTAAGAATTCCTTAGAACTTGCTAGTGTAGAGGGCA	8	EcoRI
hDHRS1tr.	for	TATAGAATTCATGGCAGCTCCCATGAATGG	2	EcoRI
(AS1-78)	rev	TTAACCCGGGTTACACTTGCTCAAACAGGCTTCGC	2	XmaI
hDHRS1tr.	for	TATAGAATTCATGGCAGCTCCCATGAATGG	2	EcoRI
(AS1-156)	rev	TTAACCCGGGTTACTGCAGGCTTCCTGGGGAGG	2	XmaI
hDHRS1tr.	for	TATAGAATTCATGGCAGCTCCCATGAATGG	2	EcoRI
(AS1-235)	rev	TTAACCCGGGTTAACATTTGCCACTCAATTCTGTGG	2	XmaI
hDHRS1tr.	for	TATAGAATTCGATCGGGAACAGCAAGGGC	2	EcoRI
(AS79-313)	rev	TTAACCCGGGTTAGAACTTGCTAGTGTAGAGGGCA	2	XmaI
hDHRS1tr.	for	CATGGCAGCTCCCATGAATGG	8	-
(AS1-136)	rev	TTAAGAGCTCTTACCGTGCCCCATACACTGAG	8	SalI
hDHRS1tr.	for	CCAGTATATGTTCAATGTCCCCTATGG	8	SmaI
(AS156-313)	rev	TTAAGAATTCCTTAGAACTTGCTAGTGTAGAGGGCA	8	EcoRI
hDHRS1tr.	for	CCAGTATATGTTCAATGTCCCCTATGG	8	SmaI
(AS156-274)	rev	TTAAGAGCTCTTAGTCTTGGACGGGGCGGCC	8	SalI
hHSDL1	for	TATAAAGCTTATGGCTGCTGTTGACAGTTTC	1, 3, 4, 9	HindIII
bzw.	for	TATAGAATTCATGGCTGCTGTTGACAGTTTC	2, 5, 6, 7, 8	EcoRI
hHSDL1	rev	TTAACTGCAGGGCTGTGCAGCATAAAGC	1	PstI
(F218Y)	rev	TTAAGGATCCTCAGGCTGTGCAGCATAAAGC	2	BamHI
	rev	TTAAGGATCCTCAGGCTGTGCAGCATAAAGGCTTCC	3, 8	BamHI
	rev	TTAAGGATCCGGCTGTGCAGCATAAAGC	4	BamHI
	rev	TTAAAAGCTTTCAGGCTGTGCAGCATAAAGC	5, 6, 7	HindIII
	rev	TTAACCGCGGGGCTGTGCAGCATAAAGC	9	SacII
hHSDL1tr.	for	TATAAAGCTTATGGCTGCTGTTGACAGTTTC	4	HindIII
(AS1-82)	rev	TTAAGGATCCGGCTTTTCCAATCCCATCTG	4	BamHI
hHSDL1tr.	for	TATAAAGCTTATGGCTGCTGTTGACAGTTTC	4	HindIII
(AS1-165)	rev	TTAAGGATCCCAGCTGAGTGAAATACTGCGG	4	BamHI

## A Anhang

hHSDL1tr. (AS1-247)	for	TATAAAGCTTATGGCTGCTGTTGACAGTTTC	4	HindIII
	rev	TTAAGGATCCGATTAGACTCTGTACAAAGATTCCTTTAG	4	BamHI
hHSDL1tr. (AS83-330)	for	TATAAAGCTTATGTACGCTGAAGAGTTAGCAAGC	4	HindIII
	rev	TTAAGGATCCGGCTGTGCAGCATAAAGGC	4	BamHI
hHSDL1tr. (AS83-247)	for	TATAAAGCTTATGTACGCTGAAGAGTTAGCAAGC	4	HindIII
	rev	TTAAGGATCCGATTAGACTCTGTACAAAGATTCCTTTAG	4	BamHI
hHSDL1tr. (AS190-330)	for	TATAGAATTCCCGGGAATGGTGGAGAGAAAGAAAGG	8	EcoRI
	rev	TTAAGGATCCTCAGGCTGTGCAGCATAAAGGCTTCC	8	BamHI
hCBR4	for	TATAAAGCTTATGGACAAAAGTGTGTGCTGTTTTTTG	1, 3, 4, 9	HindIII
	for	TATAGAATTCATGGACAAAAGTGTGTGCTGTTTTTTG	2, 5, 6, 7, 8	EcoRI
	rev	TTAACTGCAGCAAAAATGAGTTGTAATCCCCATCC	1	PstI
	rev	TTAAGGATCCTTACAAAATGAGTTGTAATCCCCCA	2, 3, 8	BamHI
	rev	TTAAGGATCCCAAAAATGAGTTGTAATCCCCCA	4	BamHI
	rev	TTAAAAGCTTTTACAAAATGAGTTGTAATCCCCCA	5, 6, 7	HindIII
	rev	TTAACCGCGCAAAAATGAGTTGTAATCCCCCA	9	SacII
hCBR4tr. (AS60-237)	for	TATAAAGCTTATGGAACATGATGTTCAAAATACATTTG	4	HindIII
	rev	TTAAGGATCCCAAAAATGAGTTGTAATCCCCCA	4	BamHI
hCBR4tr. (AS119-237)	for	TATAAAGCTTATGAGGACTATGATTCAACAACAGG	4	HindIII
	rev	TTAAGGATCCCAAAAATGAGTTGTAATCCCCCA	4	BamHI
hDHRS6	for	TATAAAGCTTATGGGTCGACTTGATGGGAAAGTCATC	1	HindIII
	for	TATAGAATTCATGGGTCGACTTGATGGGAAAGTCATC	2	EcoRI
	rev	TTAACCGCGCAAGCTCCAGCCTCCATCAATGATG	1	SacII
	rev	TTAAGGATCCTCACAAAGCTCCAGCCTCCATCAATG	2	BamHI
PTGES	for	TATAGGATCCATGCCTGCCACAGCCTGGTG	3	BamHI
	rev	TTAAGAATTCACAGGTGGCGGGCCGCTTC	3	EcoRI

Die verwendeten Vektoren sind mit folgenden Nummern bezeichnet: pAcGFP1-N1 = 1, pEGFP-C2 = 2, pcDNA3 = 3, pcDNA4 myc-his Version B = 4, pGEXΔBamHI = 5, pASK-IBA12 = 6, pASK-IBA13+ = 7, pGBKT7 = 8, pYES2.1/V5-His-TOPO erweitert um MCS von pcDNA4 myc-his Version B = 9; Die Spalte „RS“ gibt die in die Primer einbezogene und anschließend zur Klonierung verwendete Restriktionsschnittstelle an.

### A.3.2 Primer zur quantitativen RealTime-PCR

Gen	Primersequenz
GAPDH	for Sequenz unbekannt (Origene)
	rev Sequenz unbekannt (Origene)
hCBR4	for GGTTCCATGCTGACCTGTAAA
	rev CTGGCACTGTAAACGGACTG

### A.3.3 Primer zur Generierung der Northern Blot-Sonden

Gen		Primersequenz	Produktlänge [bp]
h $\beta$ -Actin	for	GGATTCCTATGTGGGCGACGAGG	868
	rev	CACGGAGTACTTGCGCTCAGGAGG	
hCBR4	for	TATAAAGCTTATGGACAAAGTGTGTGCTGTTTTTG	734
	rev	TTAAGGATCCTTACAAAATGAGTTGTAATCCCCCA	
hDHRS1	for	TATAAAGCTTATGGCAGCTCCCATGAATGGCCAAGT	962
	rev	TTAAGAATTCTTAGAACTTGCTAGTGTAGAGGGCA	
hHSDL1	for	TATAAAGCTTATGGCTGCTGTTGACAGTTTC	1.013
	rev	TTAAGGATCCTCAGGCTGTGCAGCATAAGGCTTCC	

### A.3.4 Primer zum Expressionsnachweis der Kandidaten in HEK293-Zellen

Gen		Primersequenz	Bindung
h $\beta$ -Actin	for	GGATTCCTATGTGGGCGACGAGG	CDS
	rev	CACGGAGTACTTGCGCTCAGGAGG	CDS
hCBR4	for	TATAAAGCTTATGGACAAAGTGTGTGCTGTTTTTG	CDS
	for	CCTCCGAGTTTGTGACTCCG	UTR
	rev	TTAAGGATCCTTACAAAATGAGTTGTAATCCCCCA	CDS
hDHRS1	for	TATAAAGCTTATGGCAGCTCCCATGAATGGCCAAGT	CDS
	for	CCAGATTCCCATATCCAGGC	UTR
	rev	TTAAGAATTCTTAGAACTTGCTAGTGTAGAGGGCA	CDS
hHSDL1 bzw. hHSDL1 (F218Y)	for	TATAAAGCTTATGGCTGCTGTTGACAGTTTC	CDS
	for	ACGGAGCCACATACTGCTGAC	UTR
	rev	TTAAGGATCCTCAGGCTGTGCAGCATAAGGCTTCC	CDS

CDS = kodierende Sequenz; UTR = untranslatierte Region.

### A.3.5 Primer zur Genotypisierung der Wwox-Mauslinie

Gen		Primersequenz	Unterscheidung
Wwox	for	CTAACAAAGAGGACAAGCGGCCTCGC	+ / +; + / -
	rev	CTACTCGCTGTCCGACTTGCCCTCC	
	rev	GGTGTAGATGGGCGCATCGTAACCG	
	for	GATCTGATGGCCTCCATGTACCATACAC	+ / +; + / -; - / -
	rev	CCTACAACACACACTCCAACCTCCG	
	rev	AGGCTCAGAGACTCATGTCACTCCAGAC	

+ / + = Wildtyp-Maus; + / - = heterozygote Maus; - / - = homozygote (KnockOut-)Maus.

## A.4 Publikationen

### Wissenschaftliche Veröffentlichungen

M. Meier, J. Tokarz, F. Haller, R. Mindnich, und J. Adamski. Human and zebrafish hydroxysteroid dehydrogenase like 1 (HSDL1) proteins are inactive enzymes but conserved among species. *Chem. Biol. Interact.*, **2008**, Manuskript im Druck.

M. Meier, G. Moeller, und J. Adamski. Perspectives in understanding the role of human 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases in health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2008**, Manuskript im Druck.

B. Keller\*, M. Meier\*, und J. Adamski. Comparison of predicted and experimental subcellular localization of two putative rat steroid dehydrogenases from the short-chain dehydrogenase/reductase protein superfamily. *Mol Cell Endocrinol*, **2008**, Manuskript im Druck.

\* gleichwertige Erstautoren

K. Guo, P. Lukacik, E. Papagrigoriou, M. Meier, W.H. Lee, J. Adamski, und U. Oppermann. Characterization of human DHRS6, an orphan short chain dehydrogenase/reductase enzyme: a novel, cytosolic type 2 R- $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase. *J Biol Chem*. 281 (15): 10291-7, **2006**.

### Wissenschaftliche Präsentationen

M. Meier, F. Haller, C. Spielhaupter und J. Adamski. CBR4 - A New Member of the Carbonyl Reductase Enzyme Family. Poster-Präsentation, 14<sup>th</sup> *International Meeting on Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism, Kranjska Gora, Slovenien*, **2008**.

B. Keller, M. Meier und J. Adamski. In Search for Short-Chain Dehydrogenase/Reductase Function: Systematic Ways to Analyze Subcellular Localization. Poster-Präsentation, 14<sup>th</sup> *International Meeting on Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism, Kranjska Gora, Slovenien*, **2008**.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben:

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Jerzy Adamski. Seinem Engagement und seiner fachlichen Betreuung hab ich es im Wesentlichen zu verdanken, daß ich diese Arbeit nun zu einem Abschluß bringen konnte. Ich danke ihm für die Überlassung des Themas, sein stets offenes Ohr für Fragen und Probleme jeglicher Art und für sein Vertrauen, das mir erlaubt hat, meine eigenen Ideen zu verwirklichen und sowohl wissenschaftlich als auch menschlich zu wachsen. Am meisten danke ich ihm allerdings für sein Verständnis und seine für mich nicht selbstverständliche Unterstützung, besonders in den Zeiten, als ich zu kämpfen hatte. Tausend Dank dafür, daß Du stets an mich geglaubt hast, Jurek!

Bei allen Mitarbeitern der AG Adamski möchte ich mich für das phantastische Arbeitsklima und für die tolle Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bedanken. Ein besonderes Dankeschön gebührt Frau Dr. Rebekka Mindnich, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand, mich nie den Blick für das Wesentliche verlieren ließ und mir durch unzählige Gespräche in jeder Hinsicht eine große Hilfe war. Ebenso danken möchte ich Frau Dr. Gabriele Möller für ihre stete Hilfsbereitschaft und ihre moralische Unterstützung. Meinem Doktorandenkollegen Ferdinand Haller danke ich für die vielen Freundschaftsdienste innerhalb und außerhalb des Labors, ohne die ich heute nicht wäre wo ich bin, für zahlreiche hilfreiche fachliche als auch aufbauende persönliche Gespräche und nicht zuletzt für das produktive Korrekturlesen dieser Arbeit. Meinen Mitstreitern der ersten Stunde Frau Dr. Brigitte Keller und Frau Dr. Christina Guggenberger möchte ich Danke sagen für die ausgelassene Stimmung im manchmal so trüben Forschungsalltag, für die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft über all die Jahre und die tolle Freundschaft, die uns bis heute verbindet. Ich sage ein großes Dankeschön an meinen „Lieblings-Italiener“ Herrn Antonio Gallo, der in allen Belangen immer uneingeschränkt für mich da war, allzeit ein offenes Ohr für mich hatte, mir oftmals die Mensa-Küche erspart hat und mir darüber hinaus die beste „Carbonara“ meines Lebens bescherte. Herrn Dr. Christian „Spielhauptinho“ Spielhaupter gebührt ein Dankeschön für all seine wissenschaftliche und organisatorische Unterstützung, seine leckeren Thai-Suppen, die mir einige Male das Leben retteten, und die fröhliche Arbeitsatmosphäre. Frau Eva Lattka und Frau Janina Tokarz danke ich für den so herzlichen Kontakt zur Bench-Gegenseite und ihre stete Hilfsbereitschaft, Frau Dr. Cornelia Prehn und Frau Elke Lanzinger für ihre Unterstützung und viele nette Gespräche. Ein großer Dank gilt auch unseren guten Seelen des Labors, den technischen Assistenten. Allen voran bedanke ich mich bei Frau Kerstin Schwerdtner, die mir so oft eine riesige Hilfe gewesen ist und nie müde wurde, anzubieten, mir noch mehr unter die Arme zu greifen. Frau Marion Schieweg danke ich für den Beistand in vielen praktischen Dingen und zahlreiche erfrischende Unterhaltungen, Frau Tamara „Helix“ Hallex gilt ein Dankeschön für viele amüsante Kommentare vom Rechner gegenüber und dafür daß sie mir immer wieder aufs Neue bewiesen hat, daß ich auf diesem Planeten nicht der einzige Mensch mit schlechtem Musikgeschmack bin ©. *Last, but for sure not least*, möchte ich Frau Gabriele Zieglmeier danken, einfach nur dafür, daß sie so ist wie sie ist!

Ein großes Dankeschön gebührt weiter Herrn Dr. Gerhard Przemec und Frau Nina Scheffler, die mir bei der ungeliebten Arbeit mit meinen Mäusefreunden in erster Linie praktisch aber auch moralisch sehr zur Seite gestanden haben.

---

Vielen Dank an PD Dr. Philippe Schmitt-Kopplin und Dr. Basem Kanawati für ihre praktische Hilfe und Expertise am FT-ICR-MS.

Ich bedanke mich bei allen Diplomanden/innen, Master- bzw. Bachelorstudenten/innen und HiWis, die meinen Weg kreuzten, für die Erfrischung des Arbeitsklimas. Besonderer Dank gilt Frau Martina Brandl für ihr unheimlich fröhliches Gemüt und die Vielzahl an Sonnenstrahlen, die so manche dunkle Phase erhellen. Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Auszubildenden und Praktikanten, die ich betreuen durfte, für ihre wertvolle Unterstützung.

Von Herzen danken möchte ich meinen Freunden, die mir hoffentlich verzeihen, daß ich sie gerade in der letzten Zeit so schändlich vernachlässigt habe. Ich danke ihnen dafür, daß sie mir immer den Rücken freigehalten haben, mich beispiellos unterstützt und immer an mich geglaubt haben. Besonderen Dank möchte ich Vio und Basti und Natalie und Clemens aussprechen, ohne deren Hilfe ich so vieles nicht bewerkstelligt hätte. Thanks also to Xristina especially for her sympathy and patience in the last few month.

Ein ganz besonders herzliches Dankeschön gilt meinen Eltern, für deren Unterstützung es keine adäquaten Worte geben kann. Keine Danksagung der Welt kann dem gerecht werden, was Ihr für mich getan habt und bis heute für mich tut. Ich danke Euch von Herzen dafür, daß es Euch gibt.