

Die humane 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase
Entwicklung eines prokaryontischen Expressionssystems
Generierung von Antikörpern zum Nachweis
der α - und β -Untereinheit

Christoph Albert

2009

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Dietrich Reinhardt

Thema der Dissertation

Die humane 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase

**Entwicklung eines prokaryontischen Expressionssystems
Generierung von Antikörpern zum Nachweis der α - und β -Untereinheit**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christoph Albert

aus Bad Mergentheim

Jahr
2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Wulf Röschinger

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Rainer Haas
Priv. Doz. Dr. med Kai Hell

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. rer. nat. Sonja C. Stadler

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2009

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	1
2	Einleitung.....	1
2.1	Der 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase-Mangel	1
2.1.1	Biochemische Grundlagen	1
2.1.2	Epidemiologische und klinische Aspekte	3
2.1.3	Diagnostik der 3-MCC-Defizienz	4
2.1.4	Mutationsanalyse	4
2.1.5	Therapie und Prognose	5
2.2	Die 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase.....	6
2.2.1	Historische Übersicht	6
2.2.2	Molekularbiologische Grundlagen	7
2.2.3	Die Enzymfamilie der biotinabhängigen Carboxylasen	7
2.2.4	Mitochondrialer Proteinimport	11
2.2.5	Mitochondrialer Import der 3-MCC	12
3	Zielsetzung.....	13
4	Material.....	14
4.1	Geräte und Zubehör	14
4.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	15
4.3	Enzyme	16
4.4	Reinigung, Synthese und Nachweis-Kits.....	16
4.5	Antikörper	17
4.6	Vektoren.....	17
4.7	Bakterienstämme	17
4.8	Oligonukleotide	18
4.8.1	Oligonukleotide für die Herstellung der Expressionskonstrukte	18
4.8.2	Oligonukleotide für die Sequenzierung der <i>MCCA</i> cDNA	19
4.8.3	Oligonukleotide für die Sequenzierung der <i>MCCB</i> cDNA	19
4.8.4	Oligonukleotide für Clone screen PCR	19
4.8.5	Oligonukleotide für die gerichtete Mutagenese	20
4.9	Medien, Puffer und Stammlösungen.....	21

4.9.1	Anzuchtmedien für <i>E.coli</i>	21
4.9.2	Allgemeine Puffer und Lösungen	21
5	Methoden	22
5.1	Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren	22
5.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	22
5.1.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen	22
5.1.3	Konzentrationsbestimmung mittels Agarose-Gel	23
5.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	23
5.1.5	Amplifikation von cDNA für Expressionskonstrukte	23
5.1.6	Nachweis einer Insertion in rekombinanten Plasmiden mittels PCR...	25
5.1.7	Reinigung von PCR-Produkten	26
5.1.8	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	26
5.1.9	Isolierung von DNA aus Agarose Gel.....	27
5.1.10	Restriktionsverdau von DNA	27
5.1.11	Dephosphorylierung linearisierter Plasmide.....	27
5.1.12	Ligation von DNA-Fragmenten.....	28
5.1.13	Transformation chemisch-kompetenter <i>E.coli</i> Zellen	28
5.1.14	Gezielte Mutagenese von DNA <i>in vitro</i>	29
5.1.15	Erstellung von Expressionsvektoren	30
5.2	Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	32
5.2.1	Kultivierung	32
5.2.2	Lagerung	33
5.2.3	Herstellung dauerhaft chemisch kompetenter <i>E.coli</i> Zellen	33
5.3	Eukaryontische Zellkultur	34
5.3.1	Kultivierung von humanen Fibroblasten	34
5.3.2	Passagieren von Zellen.....	34
5.3.3	Kryokonservierung von humanen Fibroblasten.....	35
5.3.4	Auftauen von kryokonservierten humanen Fibroblasten	35
5.3.5	Zellernte von humanen Fibroblasten.....	36
5.3.6	Herstellen eines Fibroblasten-Zellextrakts	36
5.4	Proteinbiochemische Methoden	37
5.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	37
5.4.2	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).	38
5.4.3	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen	38

Inhaltsverzeichnis

5.4.4	Umpuffern und Einengen von Proteinlösungen	39
5.5	Expression und Reinigung rekombinanter Proteine	39
5.5.1	Expression von Proteinen in <i>E.coli</i>	39
5.5.2	Zellaufschluss und Gewinnung von Rohextrakt	40
5.5.3	Reinigung rekombinanter Proteine aus <i>E.coli</i>	41
5.5.4	Proteolytische Spaltung von MBP-Fusionsproteinen	43
5.6	Immunologische Methoden	44
5.6.1	Immunologischer Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter Proteine (Western Blot).....	44
5.6.2	Herstellung von polyklonalen Peptid-Immunsereen gegen MCC α und MCC β	46
5.6.3	Affinitätsreinigung der Peptid-Immunsereen gegen MCC α und MCC β . 47	
5.6.4	Generierung von polyklonalen Antikörper gegen MCC β	48
5.6.5	Affinitätsreinigung von polyklonalen Antikörpern gegen MCC β	49
6	Ergebnisse	51
6.1	Expression der 3-MCC-Untereinheiten in <i>E.coli</i>	51
6.1.1	Klonierung von <i>MCCA</i> ^{mat} und <i>MCCB</i> ^{mat} in ein prokaryontes Expressionssystem.....	51
6.1.2	Expression von MBP-MCC α - und MBP-MCC β -Fusionsproteinen in <i>E.coli</i>	52
6.1.3	Affinitäts-chromatographische Reinigung von MBP-MCC α und MBP-MCC β	55
6.1.4	Spaltung von MBP-Fusionsproteinen mit Faktor Xa	58
6.1.5	Versuch der Klonierung von <i>MCCA</i> ^{mat} und <i>MCCB</i> ^{mat} in einen prokaryontischen Expressionsvektor ohne <i>tag</i>	60
6.1.6	Klonierung von <i>MCCA</i> ^{mat} in den pQE-60 Expressionsvektor	63
6.2	Herstellung von Peptid-Antikörpern gegen MCC α und MCC β	64
6.2.1	Spezifische Reinigung der Peptid-Antikörper gegen MCC α und MCC β mit dem SulfoLink [®] -Kit	65
6.3	Generierung von polyklonalen Antikörpern gegen Proteinanteile von MCC α und MCC β	69
6.3.1	Klonierung, Expression und Reinigung von MCC α _(As 402-643)	69
6.3.2	Generierung von polyklonalen Antikörpern gegen MCC β _(As 321-543)	72

Inhaltsverzeichnis

6.3.3	Reinigung der Immunsereen gegen $MCC\beta_{(As321-543)}$	73
6.3.4	Austestung der polyklonalen Antikörper gegen $MCC\beta_{(As321-543)}$ im Western Blot.....	75
7	Diskussion	79
7.1	Entwicklung eines prokaryontischen Expressionssystems von $MCC\alpha$ und $MCC\beta$	79
7.2	Generierung von Antikörpern gegen $MCC\alpha$ und $MCC\beta$	84
7.3	Ausblick.....	89
8	Zusammenfassung	91
9	Literaturverzeichnis	93
10	Anhang	100
10.1	Alignment Analysen von Aminosäuresequenzen	100
10.1.1	Alignment der α -Untereinheiten von 3-MCC, PCC und PYC von <i>H.sapiens</i> (Paralogen-Alignment).....	100
10.1.2	Alignment der β -Untereinheiten von 3-MCC und PCC von <i>H.sapiens</i> (Paralogen Alignment).....	102
11	Abkürzungsverzeichnis	103
12	Danksagung	105
13	Lebenslauf	106

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 2.1: Abbau von L-Leucin, angrenzende Stoffwechselwege und akkumulierende Metabolite bei 3-MCC-Mangel	2
Abbildung 2.2: Mutationsspektrum der Gene <i>MCCA</i> und <i>MCCB</i>	5
Abbildung 2.3: Strukturformel von Biotin	8
Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des katalytischen Mechanismus biotinabhängiger Carboxylasen, am Beispiel der 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase.	10
Abbildung 2.5: Schematische Darstellung eines Polypeptids mit mitochondrialem Transportsignal.	11
Abbildung 5.1: Schematische Darstellung einer Anlage zur Säulenchromatographie	41
Abbildung 5.2: Lokalisation der Faktor Xa-Schnittstelle im pMAL-c2X Expressionsvektor	43
Abbildung 6.1: Schematische Darstellung des pMAL-c2X-Expressions-Systems	52
Abbildung 6.2: SDS-PAGE zeigt Expression von MBP-MCC α bzw. MBP-MCC β in <i>E.coli</i> nach Induktion mit 1 mM IPTG	54
Abbildung 6.3: Reinigung von MBP-Fusionsproteinen mit Amylose- Affinitätschromatographie.	56
Abbildung 6.4: SDS-PAGE zur affinitäts-chromatographischen Reinigung der Fusionsproteine MBP-MCC α und MBP-MCC β	57
Abbildung 6.5: SDS-Page zur Spaltung von MBP-MCC α -Fusionsprotein unter denaturierenden Bedingungen	59
Abbildung 6.6: PinPoint™ Xa-1 Vektor-Karte	62
Abbildung 6.7: Ursprünglich geplantes Doppelkonstrukt zur Co-Expression von MCC α und MCC β in <i>E.coli</i>	62
Abbildung 6.8: Strategie der Konstruktion von pQE-60MCCA ^{mat}	63
Abbildung 6.9: Prinzip der Kopplung von Peptiden an die SulfoLink®- Agarose Matrix	65

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 6.10: Nachweis von MBP-MCC α mit Peptid-Antikörpern gegen MCC α 3032 im Western Blot.....	67
Abbildung 6.11: Nachweis von MBP-MCC β Fusionsproteinen mit Peptidantikörper gegen MCC β 3034 im Western Blot.....	68
Abbildung 6.12: Alignment der MCC α -Untereinheit von 3-MCC, PYC und PCC.....	70
Abbildung 6.13: SDS-Page zur Überprüfung der mehrstufigen Reinigung von MBP-MCC β _(As 321-543)	73
Abbildung 6.14: Mögliche Optionen zur Isolierung von polyklonalen Antikörpern gegen MCC β aus Immuns serum.	75
Abbildung 6.15: Nachweis von MBP-MCC β -Fusionsproteinen (Spur 1-4) mit polyklonalen Antikörpern gegen MCC β _(As 321-543) im Western Blot ..	76
Abbildung 6.16: Nachweis von MCC β im Western Blot mittels polyklonaler Antikörper.....	78

2 Einleitung

2.1 Der 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase-Mangel

Der 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase-Mangel ist ein autosomal rezessiv vererbter Defekt im Abbau der Aminosäure L-Leucin und wurde 1982 erstmals beschrieben[10]. Es wurde über einen vietnamesischen Jungen im Alter von fünf Jahren berichtet, der nach Immigration in die Niederlande durch rezidivierendes Erbrechen auffällig wurde. Unter Flüssigkeits- und Kohlenhydratzufuhr besserte sich der Zustand des Kindes. Allerdings löste die Zufuhr von Proteinen erneutes Erbrechen aus, welches nach Proteinrestriktion wieder sistierte.

Im Rahmen der weiteren diagnostischen Abklärung wurde eine Analyse der organischen Säuren im Urin mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie durchgeführt und erhöhte Konzentrationen an 3-Hydroxyisovaleriansäure und 3-Methylcrotonylglycin festgestellt. Dieses Metabolitenmuster ließ einen Mangel der 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (3-MCC) vermuten, der enzymatisch bestätigt werden konnte. Neben der Proteinrestriktion wurde Biotin, ein essentieller Cofaktor der 3-MCC, in therapeutischen Dosen verabreicht. Hierdurch konnten die biochemischen Laborparameter jedoch nicht beeinflusst werden. Das späte Auftreten der Symptome im Alter von fünf Jahren, wurde mit der Umstellung von einer proteinarmen (in Vietnam) auf eine proteinreiche Kost (in den Niederlanden) erklärt.

2.1.1 Biochemische Grundlagen

Das Enzym 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase ist am Abbau der essentiellen verzweigtkettigen Aminosäure L-Leucin beteiligt. Unter Vermittlung des L-Transportsystems [63] wird L-Leucin in die Zelle aufgenommen, im Zytoplasma zu 2-Oxoisocaproinsäure desaminiert und durch einen für verzweigtkettige Aminosäuren spezifischen BCKA-Transporter [31] in die mitochondriale Matrix geschleust (Abbildung 2.1). Hier entsteht durch irreversible oxidative Decarboxylierung

Isovaleryl-CoA, welches dann zu 3-Methylcrotonyl-CoA dehydriert wird. Den folgenden Stoffwechselschritt katalysiert die 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase unter Verbrauch von ATP und Bicarbonat. Das gebildete 3-Methylglutaconyl-CoA wird zu 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA (β -HMG-CoA) hydratisiert, das (1) zu den Ketonkörpern Acetoacetat und 3-Hydroxy-Butyrat umgebaut wird, (2) mittels Acetyl-CoA in den Zitrat-Zyklus bzw. die Fettsäure-Biosynthese einmündet, oder (3) über Mevalonat der Cholesterin-Biosynthese dient.

3-MCC-Defizienz führt zu einer Akkumulation des Substrats 3-Methylcrotonyl-CoA, das vom Organismus in die renal ausscheidungsfähigen Formen 3-Hydroxyisovaleriansäure sowie 3-Methylcrotonyl-Glycin umgesetzt wird. Vermehrt anfallende Acyl-CoA-Verbindungen werden intramitochondrial an Carnitin gekoppelt. 3-Hydroxyisovaleryl-Carnitin ist der führende pathologische Metabolit, der sowohl im Blut als auch im Urin nachweisbar ist.

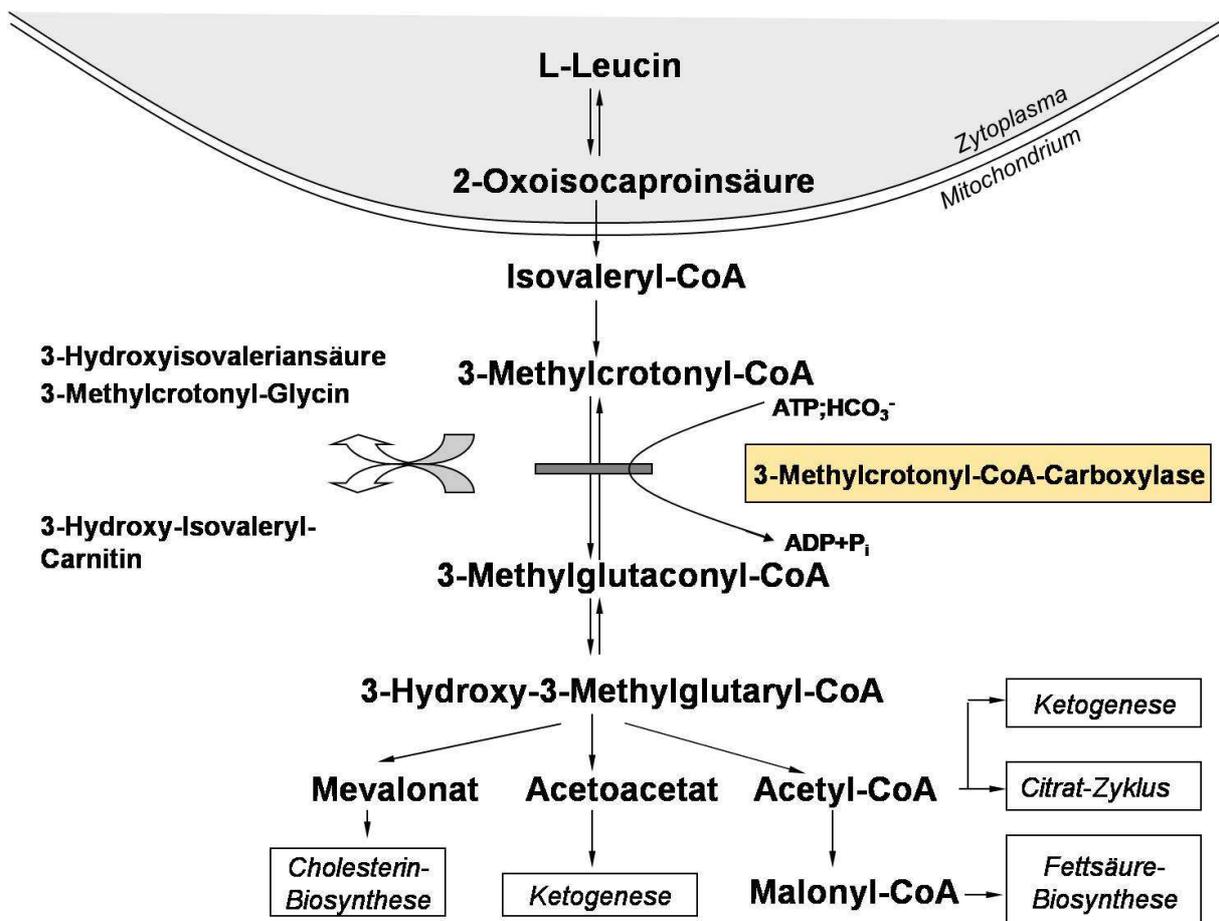


Abbildung 2.1: Abbau von L-Leucin, angrenzende Stoffwechselwege und akkumulierende Metabolite bei 3-MCC-Mangel

2.1.2 Epidemiologische und klinische Aspekte

Im Jahr 1999 wurde in Bayern das erweiterte Neugeborenen-Screening (NGS) eingeführt. Diese flächendeckende Untersuchung soll helfen, angeborene Stoffwechselerkrankungen und Endokrinopathien frühzeitig zu entdecken und damit Morbidität und Mortalität zu senken. Vor diesem Zeitpunkt wurden lediglich die Erkrankungen Galaktosämie, Phenylketonurie und Hypothyreose routinemäßig erfasst. Durch Einführung der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) können bis zu 30 Stoffwechselerkrankungen diagnostiziert werden; dazu zählen Störungen im Transport und Abbau von Fettsäuren, Defekte des Aminosäurestoffwechsels sowie organische Azidämien.

Der 3-MCC-Mangel gehört zur Gruppe der organischen Azidämien. Von Januar 1999 bis Dezember 2004 wurden im Rahmen des bayerischen Neugeborenen-Screening-Programms knapp 700 000 Kinder untersucht und 8 Kinder mit einem 3-MCC-Mangel entdeckt. Dies entspricht einer Inzidenz von 1:85.000. Auch weltweit findet das erweiterte NGS zunehmende Verbreitung. Die Daten aus verschiedenen Ländern zeigen für den 3-MCC-Mangel eine Inzidenz von 1:20.000 bis 1:250.000 [12, 30, 41, 50, 74, 97].

Im Zeitraum von 1982-2005 wurden weltweit 37 Individuen mit einem klinisch diagnostizierten und enzymatisch bestätigten 3-MCC-Mangel beschrieben. Deren Auswertung zeichnet ein sehr heterogenes klinisches Bild. Über ein Viertel der Patienten ist asymptomatisch [19, 32, 40, 57, 61, 81, 84]. In je einem Drittel der Fälle wird über muskuläre Hypotonie [5, 6, 9, 16, 17, 19, 20, 90] und psychomotorische Retardierung [5, 9, 16, 49, 57, 58, 79, 84, 95] berichtet. Außerdem sind andere neurologische Symptome [5, 6, 9, 10, 16, 20, 40, 49, 58, 61, 69, 79, 82, 84, 90], hypoglykämische Zustände [6, 9, 20, 40, 48, 79, 81], milde Azidosen [6, 9, 10, 20, 40, 48], mäßige Hyperammonämien [48, 81] und Gedeihstörungen [16, 17, 58, 84, 90] in der Literatur erwähnt. In einigen Berichten werden schwerwiegende Verläufe mit cerebralen Krampfanfällen [5, 40, 49, 58, 79, 81] beschrieben. Drei Todesfälle werden auf einen 3-MCC-Mangel zurückgeführt [5, 9, 16, 34, 40]. Es ist jedoch zu betonen, dass bei keinem der verstorbenen Patienten der 3-MCC-Mangel als sicher ursächlich angesehen werden kann. Die Erstmanifestation lag zwischen dem ersten Lebensjahr und dem Alter von 4,7 Jahren. Als mögliche Auslöser gelten katabole Stoffwechsellagen, wie sie im Rahmen von Fastenperioden, fieberhaften Infekten oder Gastroenteritiden auftreten.

2.1.3 Diagnostik der 3-MCC-Defizienz

Leitparameter im erweiterten Neugeborenen-Screening ist 3-Hydroxyisovaleryl-Carnitin (3-HIVA-Carnitin) [70, 83]. Die Bestimmung erfolgt aus Trockenblut einer betroffenen Filterpapierkarte mit Hilfe der Tandem-Massenspektrometrie. Bei erhöhten Konzentrationen kann ein 3-MCC-Mangel vorliegen. Die Konfirmationsdiagnostik besteht aus der Bestimmung von 3-HIVA-Carnitin im Vollblut oder Plasma sowie der Analyse von organischen Säuren (3-Hydroxyisovaleriansäure, 3-Methylcrotonylglycin) im Urin mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie. Neben diesen biochemischen Parametern ist die Messung der Enzymaktivität in Fibroblasten oder eine Mutationsanalyse obligat.

Differentialdiagnostisch muss immer an einen multiplen Carboxylase-Mangel gedacht werden, der nicht nur die 3-MCC, sondern zusätzlich die Acetyl-CoA-, die Pyruvat-, und die Propionyl-CoA-Carboxylase betrifft. Alle vier Enzyme benötigen den essentiellen Cofaktor Biotin und werden durch Biotinmangel oder Störungen im Biotin-Metabolismus gleichermaßen in ihrer Funktion beeinträchtigt. Deshalb sollte zur Sicherung der Diagnose eines isolierten 3-MCC-Mangels die normale Enzymaktivität mindestens einer weiteren Carboxylase nachgewiesen werden.

2.1.4 Mutationsanalyse

Der 3-MCC-Mangel hat eine genetische Ursache und wird autosomal rezessiv vererbt. Bei vielen der im Neugeborenen-Screening oder durch ihre klinische Symptomatik aufgefallenen Patienten wurde eine Mutationsanalyse durchgeführt. Mittlerweile sind über 40 Mutationen in der Literatur beschrieben, die in Abbildung 2.2 dargestellt sind. Diese liegen ohne punktuelle Häufung auf den beiden für 3-MCC codierenden Genen verteilt [13]. Eine Aussage zu Genotyp-Phänotyp-Korrelationen ist nicht möglich, da zum Beispiel für die Mutation E99Q sowohl ein letaler [5] als auch ein klinisch unauffälliger Verlauf [19] beschrieben wurde.

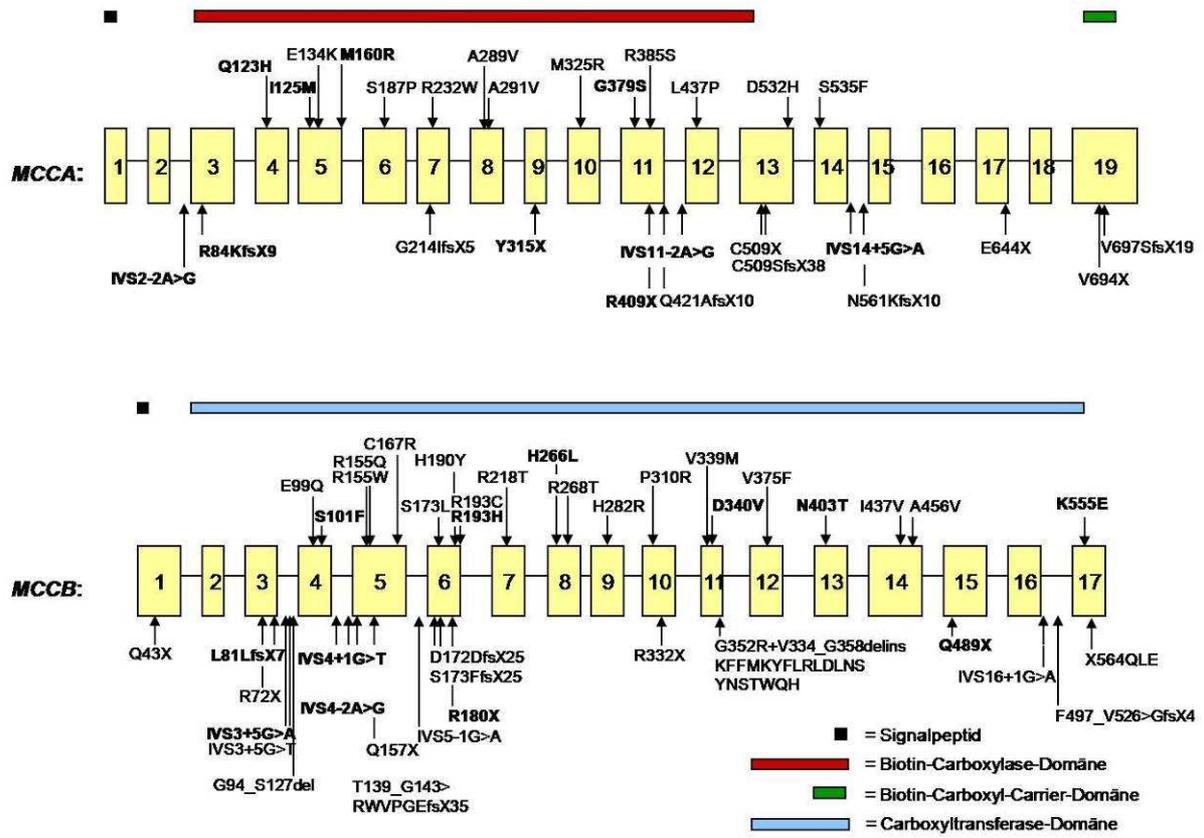


Abbildung 2.2: Mutationsspektrum der Gene MCCA und MCCB

Die schematische Darstellung der genomischen Strukturen zeigt die ungefähre Größe und Anzahl der Exone von *MCCA* und *MCCB*. Nach unten gerichtete Pfeile repräsentieren Missense-Mutationen. Nach oben gerichtete Pfeile repräsentieren Nonsense-Mutationen, Insertionen, Deletionen und Spleißstellen-Mutationen. Die fettgedruckten Mutationen sind Allel-Varianten, die in unserer Arbeitsgruppe neu entdeckt wurden. Es sind ebenfalls funktionelle Bereiche der beiden Untereinheiten eingezeichnet, die in Kapitel 2.2.3 ausführlich beschrieben werden. Diese Darstellung wurde der Publikation von Dr. Sonja C. Stadler et al. entnommen [77] und beruht auf Informationen aus der Human Gene Mutation Database (HGMD) und dem ExPASy Proteomics Server.

2.1.5 Therapie und Prognose

Die pathologische Relevanz des 3-MCC-Mangels ist nicht eindeutig gesichert. Insbesondere bei klinisch diagnostizierten Individuen sind jedoch folgende Maßnahmen zu empfehlen. Im Vordergrund stehen die vorsorgende Aufklärung und präventive Maßnahmen zur Vermeidung von metabolischen Krisen. Diese drohen vor allem bei kataboler Stoffwechsellage, die zu einem Abbau von körpereigenem

Eiweiß und damit zu einer endogenen Freisetzung von L-Leucin führt. Ebenso ist eine vermehrte Aufnahme von L-Leucin mit der Nahrung zu vermeiden. Hierzu soll eine angepasste Diät mit einer milden Proteinrestriktion von 1.5 g/kg x d eingehalten werden. Liegt dadurch die Gesamtproteinzufuhr unter den altersentsprechenden Empfehlungen, wird eine L-Leucin-freie Aminosäuren-Mischung substituiert.

Initial wird die Gabe von Biotin empfohlen, wenn auch bisher nur zwei Patienten mit einem biotinsensitivem 3-MCC-Mangel beschrieben wurden. In einem dieser Fälle führte Biotin in pharmakologischen Dosen zu einem Abfall der akkumulierenden Metabolite, in einem anderen Fall wurde auch über eine Besserung der klinischen Symptomatik berichtet [8]. Bei allen Patienten wird die Substitution mit Carnitin empfohlen, welches für die Veresterung von intramitochondrial akkumulierenden Acyl-CoA-Verbindungen benötigt wird. Einem regelmäßig zu beobachtenden sekundären Carnitin-Mangel kann dadurch vorgebeugt werden. In Episoden akuter Dekompensation ist eine rasche intravenöse Anabolisierung erforderlich.

2.2 Die 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase

2.2.1 Historische Übersicht

Erstmals wurde im Jahr 1959 über das Enzym 3-MCC berichtet, das die Carboxylierung von 3-Methylcrotonyl-CoA in Hühnerleber katalysiert [14]. Bereits zwei Jahre später konnte die 3-MCC der Familie der biotinabhängigen Carboxylasen zugeordnet werden [51]. In den folgenden Jahren wurde der L-Leucin-Katabolismus in Säugetieren und Bakterien (*Achromobacter*, *P.citroellii*) untersucht und dabei auch die 3-MCC in verschiedenen Organismen nachgewiesen [92]. 1979 gelang die nähere Charakterisierung nach Isolierung aus Rinderniere. Es konnte gezeigt werden, dass die bovine 3-MCC aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten besteht [47] und mitochondrial lokalisiert ist [46]. Anfang der 90er Jahre wurde die codierende cDNA-Sequenz der biotin-tragenden Enzymuntereinheit in einigen Pflanzen entschlüsselt [76, 87, 89]. 2000 konnte auch das für die kleinere Untereinheit codierende *MCCB*-Gen der Ackerschmalwand (*Arabidopsis Thaliana*)

kloniert werden [54]. Der hohe Konservierungsgrad der MCC-Gene von Pflanzen, Säugetieren und Menschen ermöglichte die Klonierung der humanen *MCCA* und *MCCB* Gene im Jahr 2001 [7, 18, 28]. Diese Entwicklung war die Grundlage für funktionelle Untersuchungen. 2005 wurde die Lokalisation in der mitochondrialen Matrix auch für die humane 3-MCC bestätigt und der Importmechanismus über N-terminale Präsequenzen in unserer Arbeitsgruppe aufgeklärt [78].

2.2.2 Molekularbiologische Grundlagen

3-MCC besteht aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten. Die größere biotintragende α -Untereinheit ($MCC\alpha$) hat eine Länge von 725 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 80,5 kDa. Die kleinere β -Untereinheit ($MCC\beta$) umfasst 563 Aminosäuren, das Molekulargewicht beträgt 61,3 kDa. Das für die α -Untereinheit codierende Gen *MCCA* ist auf Chromosom 3q26-28 lokalisiert und beinhaltet 18 Exone (2178 Basenpaare). Das *MCCB* Gen besteht aus 17 Exonen (1692 Basenpaare) und befindet sich auf Chromosom 5q13 [28].

In welcher Form sich die beiden Untereinheiten zum aktiven Enzym zusammenlagern, ist für die humane 3-MCC noch nicht geklärt. Bei dem aus Rinderniere isolierten Enzym konnte in detaillierten Studien ein Aufbau aus je sechs α - und je sechs β -Untereinheiten nachgewiesen werden [46]. Es wird vermutet, dass diese Form der Assemblierung auch für das humane Enzym zutrifft.

2.2.3 Die Enzymfamilie der biotinabhängigen Carboxylasen

1961 konnte Lynen zeigen, dass die 3-MCC zur Gruppe der biotinabhängigen Carboxylasen gehört [51]. Diese Gruppe umfasst die an der Fixierung von CO_2 beteiligten Enzyme Acetyl-CoA-Carboxylase, Pyruvat-Carboxylase, Propionyl-CoA-Carboxylase, 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase, Geranoyl-CoA-Carboxylase und die Harnstoff-Amidolyase [44]. Daneben gehören zu den biotinabhängigen Enzymen noch die Oxalacetat-Decarboxylase, Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase und Glutaconyl-CoA-Decarboxylase, die eine Freisetzung von CO_2 bewirken, sowie die

für den Transfer von Carboxylgruppen verantwortliche Transcarboxylase. Diese Enzyme zeigen viele strukturelle und katalytische Gemeinsamkeiten.

Für alle ist der Cofaktor Biotin essentiell, der in seiner aktiven Form kovalent an das Enzymprotein gebunden ist. Biotin, auch Vitamin H genannt, ist aus einem bicyclischen Ring mit Valerat-Seitenkette aufgebaut (Abbildung 2.3). Die Bindung von Biotin erfolgt über eine Säureamidbindung an die ϵ -Aminogruppe eines Lysylrests. Diese Art der posttranslationalen Modifikation wird durch das Enzym Holocarboxylase-Synthetase bewerkstelligt und führt dazu, dass aus tierischem Gewebe isoliertes Biotin nur in Form des Biocytins (ϵ -N-Biotinyllysin) vorkommt [53, 94].

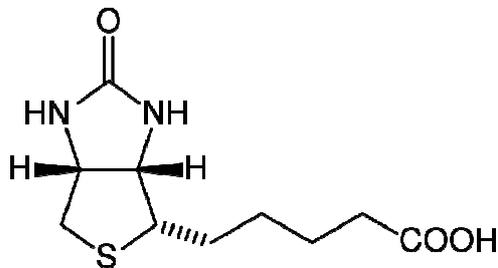


Abbildung 2.3: Strukturformel von Biotin

Gemeinsamer katalytischer Mechanismus

Die von den biotinabhängigen Carboxylasen katalysierten Reaktionen lassen sich in zwei Teilschritte untergliedern. Im ersten Schritt (1) wird Biotin unter Verbrauch von ATP und Bikarbonat carboxyliert. Im zweiten Schritt (2) wird das an Biotin gebundene CO_2 auf ein Akzeptor-Molekül übertragen.



Der Carboxylierungsreaktion liegt ein gemeinsamer katalytischer Mechanismus zugrunde. Die meisten der biotinabhängigen Carboxylasen besitzen drei funktionelle

Domänen: Die Biotin-Carboxylierungs-Domäne (BC) mit der ATP-Bindungstasche, die Biotin-Carboxyl-Carrier-Domäne (BCC) und die Carboxyltransferase-Domäne (CT). Diese Regionen sind strukturell hoch konserviert und zeigen typische Motive in der Aminosäure-Sequenz [42, 65]. In Abbildung 2.4 ist der Reaktionsmechanismus der 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase dargestellt, welcher in ähnlicher Form auch für die anderen Carboxylasen zutrifft.

Die $MCC\alpha$ -Untereinheit trägt die BC (As 48-494) sowie die BCC-Domäne (As 629-714). $MCC\beta$ besteht zu großen Teilen aus der CT-Domäne (As 55-557). Die beiden Untereinheiten lagern sich zum aktiven Enzym zusammen, wobei der Oligomerisierungs-Status in der Abbildung unberücksichtigt bleibt. Für die Bindung von CO_2 an Biotin ist die Kooperation der BCC- mit der BC-Domäne notwendig, die sich einander annähern. Als CO_2 -Quelle dient Carboxyphosphat, welches durch Reaktion von Hydrogencarbonat mit ATP entsteht [38]. Das carboxylierte Biotin bewegt sich dann zur $MCC\beta$ -Untereinheit, die für die Übertragung des CO_2 auf das Substrat 3-Methylcrotonyl-CoA zuständig ist. Das Reaktionsprodukt ist 3-Methylglutaconyl-CoA.

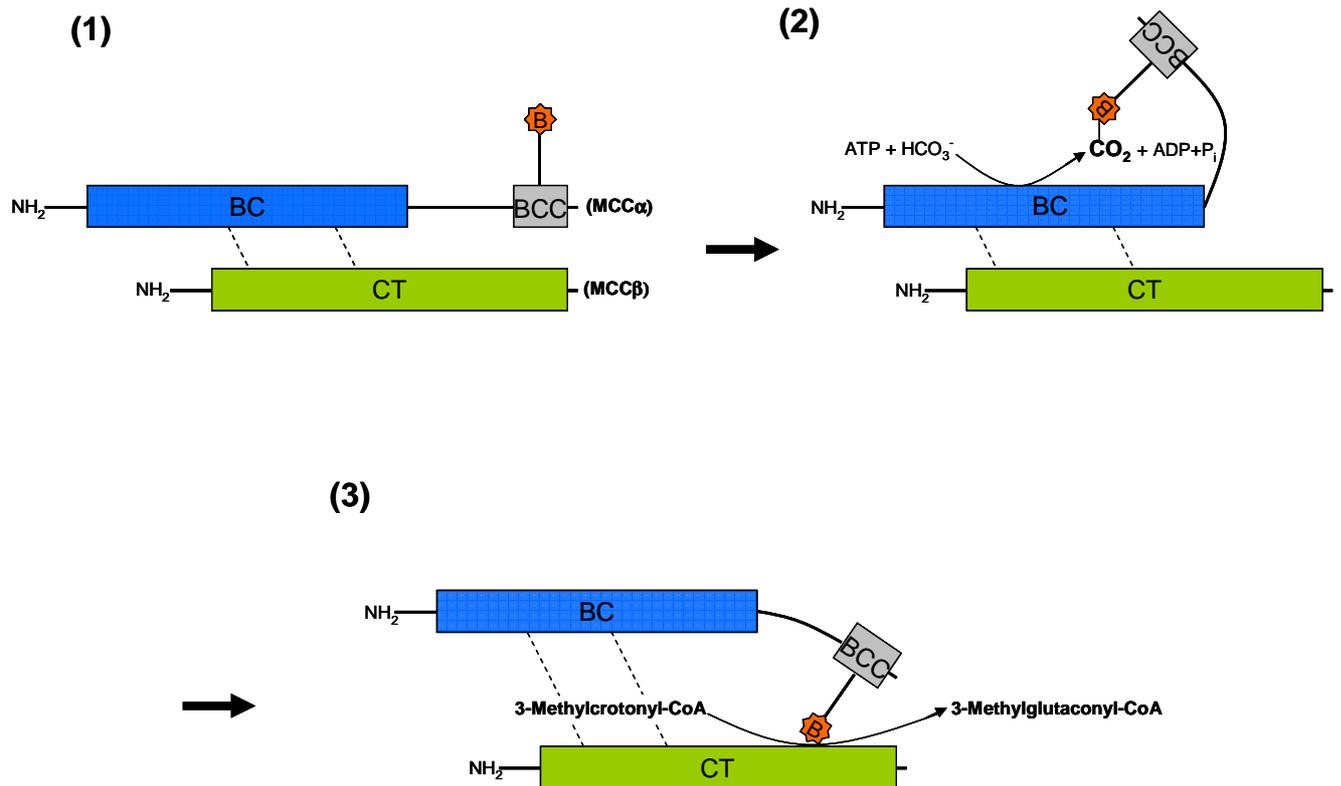


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des katalytischen Mechanismus biotinabhängiger Carboxylasen, am Beispiel der 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase.

(1) Die Enzymuntereinheiten sind mit ihren funktionellen Domänen gezeigt. MCC α enthält die Biotin-Carboxylierungsdomäne (BC) und die Biotin (B) bindende Biotin-Carboxyl-Carrier-Domäne (BCC). MCC β wird fast vollständig von der Carboxyltransferase-Domäne (CT) eingenommen. Die Assemblierung der Untereinheiten ist durch die Verbindungsstriche angedeutet. (2) Durch Kooperation der BC- mit der BCC-Domäne, wird CO₂ energieabhängig an Biotin fixiert. (3) Das carboxylierte Biotin bewegt sich nun zur MCC β -Untereinheit, die den Transfer von CO₂ auf das Substrat 3-Methylcrotonyl-CoA katalysiert.

Die humanen biotinabhängigen Carboxylasen

Beim Menschen findet man vier Reaktionen im Intermediärstoffwechsel, die von biotinabhängigen Carboxylasen katalysiert werden. Die cytosolisch lokalisierte Acetyl-CoA-Carboxylase ist beteiligt bei der Umsetzung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA, einem Vorläufer der Fettsäurebiosynthese. Bei der Pyruvat-Carboxylase, Propionyl-CoA-Carboxylase und der 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase handelt es sich um mitochondriale Enzyme die große strukturelle Übereinstimmungen aufweisen. Die Pyruvat-Carboxylase katalysiert eine sogenannte anaplerotische Reaktion des Citratzyklus in der aus Pyruvat Oxalacetat gebildet wird und gilt als

Schlüsselenzym in der Gluconeogenese. Die Propionyl-CoA-Carboxylase hat eine wichtige Funktion beim Abbau der Aminosäuren Valin, Isoleucin, Methionin und Threonin sowie ungeradzahligter Fettsäuren. Ihr Defekt führt zur autosomal rezessiv vererbten Propionazidämie, die ebenfalls im NGS detektiert werden kann. Die Aufgabe der 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase im L-Leucin-Katabolismus wurde bereits unter Punkt 2.1.1 ausführlich erörtert.

2.2.4 Mitochondrialer Proteinimport

Von den circa 1000 mitochondrialen Proteinen werden die meisten an cytosolischen Polysomen synthetisiert. Sie besitzen ein N-terminales Signalpeptid mit einer Länge von 10-80 Aminosäuren, das den Transport ins Mitochondrium vermittelt (Abbildung 2.5). Charakteristischerweise zeigt das Signalpeptid eine positiv geladene und hydrophobe Oberfläche [1, 68].

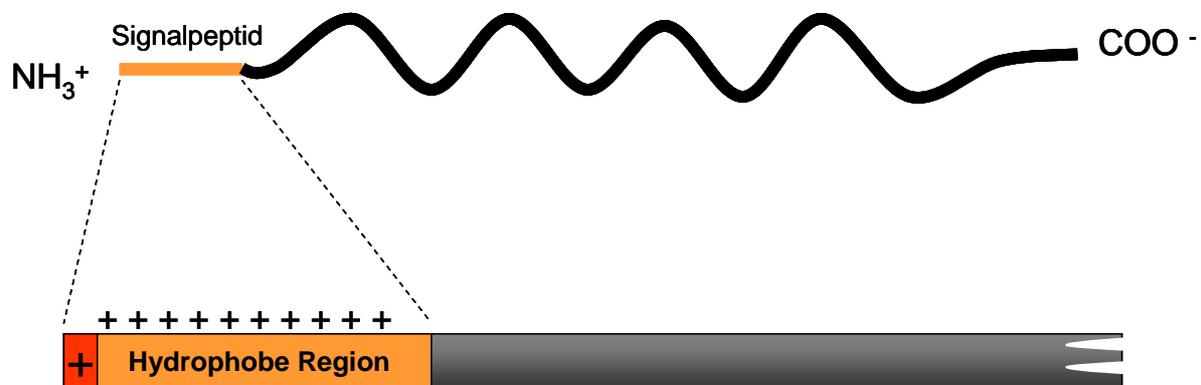


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung eines Polypeptids mit mitochondrialem Transportsignal.

Die Signalsequenz ist aminoterminal lokalisiert und besteht aus Aminosäuren, die eine α -Helix mit hydrophober, positiv geladener Oberfläche ausbilden. Diese Oberflächenstruktur spielt eine wichtige Rolle zur Erkennung des Porenkomplexes (TIM/TOM) in der mitochondrialen Membran.

Der Transport der ungefalteten Präproteine vom Cytosol in den Matrixraum des Mitochondriums erfolgt durch Porenkomplexe der äußeren (Translokase der Äußeren Mitochondrienmembran, TOM) und der inneren Membran (Translokase der Inneren Mitochondrienmembran, TIM). Im Matrixraum wird die Signalsequenz durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase abgespalten [25] und anschließend werden die „reifen“ Proteine unter Assistenz bestimmter Chaperonine (Hsp 70; Hsp 60) zu ihrer aktiven Form gefaltet [35, 60].

2.2.5 Mitochondrialer Import der 3-MCC

2005 wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass die Untereinheiten der 3-MCC ebenfalls über N-terminale Signalpeptide in die mitochondriale Matrix geschleust werden [78]. Dort findet die Abspaltung der Präsequenzen statt, die eine Faltung und Assemblierung zum aktiven Enzym ermöglicht. $MCC\alpha$ besitzt eine 41 Aminosäuren lange Signalsequenz, d.h. die prozessierte Untereinheit beginnt mit der Aminosäure an Position 42. Für $MCC\beta$ wurde ein mitochondriales Importsignal nachgewiesen, das die Aminosäuren 1-22 umfasst. Folglich bildet die Aminosäure an Position 23 den N-terminalen Anfang des prozessierten Polypeptids.

Die genaue Kenntnis über die Aminotermini der gereiften (prozessierten) Enzymuntereinheiten bildet die Grundlage für die rekombinante Expression von $MCC\alpha$ und $MCC\beta$.

3 Zielsetzung

Der 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (3-MCC)-Mangel stellt eine der häufigsten organischen Azidämien des Menschen dar. Die genetische Lokalisation der angeborenen Störung und ein breites Spektrum von Mutationen sind in der Literatur beschrieben. Es lässt sich jedoch bisher keine Korrelation beobachten zwischen klinischem Phänotyp (Symptome, Verlauf), biochemischem Phänotyp (akkumulierende Metabolite, Enzymaktivität) und zugrunde liegendem Genotyp. Mögliche Auswirkungen von nachweisbaren Mutationen auf die Stabilität, Funktion und Interaktion der Enzym-Untereinheiten sind weitgehend unverstanden.

Ziel dieser Arbeit war es daher, Voraussetzungen zu schaffen für eine weitergehende biochemische Charakterisierung der 3-MCC auf Proteinebene. Hierfür sollte ein prokaryontisches Expressionssystem etabliert werden, das detaillierte Untersuchungen der Enzym-Untereinheiten $MCC\alpha$ und $MCC\beta$ ermöglicht. Die rekombinant hergestellten Untereinheiten sollten säulenchromatographisch aufgereinigt und nach erfolgreicher Rekonstitution auf messbare Enzymaktivität überprüft werden.

Ein weiterer Schwerpunkt war die Generierung von Antikörpern. Peptid-Antikörper sollten dem Nachweis der in *E.coli* exprimierten Enzymuntereinheiten dienen. Zusätzlich war die Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen $MCC\alpha$ und $MCC\beta$ vorgesehen, welche Immunpräzipitationen und somit Protein-Protein-Interaktionsstudien ermöglichen sollten.

4 Material

4.1 Geräte und Zubehör

Neben der üblichen Laborausstattung wurden verwendet:

PCR-Thermocycler	Mastercycler personal, Eppendorf (Hamburg)
PAGE-Apparatur	XCell SureLock™ Mini Cell, Invitrogen (Karlsruhe)
Ultraschallstab	Sonifier W-2500, Branson (Danbury, USA)
Gewebs-Homogenisator	Polytron PT2100, Kinematica (Luzern, Schweiz)
Elektroblotapparatur	X Cell II Blot Module, Invitrogen (Karlsruhe)
Platten-Multifunktionsreader	FLUOstar Optima, BMG Labtech (Offenburg)
Spektrophotometer	Ultrospect 1000, Pharmacia Biotech (Cambridge, England) Bio Photometer, Eppendorf (Hamburg)
ÄKTAprime FPLC-Anlage	Amersham Biosciences Europe (Freiburg)
Größenausschluss-Chromatographie-Säule (HiLoad Superdex 75)	GE Healthcare Bio-Sciences (Uppsala, Schweden)
Fertigsäule (HiTrap™ Protein A HP)	GE Healthcare Bio-Sciences (Uppsala, Schweden)
Fertigsäule (HiTrap™ Desalting)	GE Healthcare Bio-Sciences (Uppsala, Schweden)
Leersäule (Chromatographie-Säule XK 16/20)	GE Healthcare Bio-Sciences (Uppsala, Schweden)

4.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in *p.a.*-Qualität von folgenden Firmen bezogen. Bio-Rad (München), Biozym Diagnostik (Oldendorf), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva Feinbiochemica (Heidelberg), SIGMA-ALDRICH GmbH (Steinheim, Taufkirchen)

DNA Polymerization Mix (20 mM/dNTP)	Amersham Biosciences (Freiburg)
1 kb DNA Längenstandard	Invitrogen (Karlsruhe)
DNA Molecular Weight Marker V	Roche Diagnostics (Mannheim)
Proteingrößenstandard (SeeBlue [®])	Invitrogen (Karlsruhe)
Proteingrößenstandard (MultiMark Standard)	Invitrogen (Karlsruhe)
Proteingrößenstandard (PageRuler [™])	Fermentas (St. Leon-Rot)
Proteingrößenstandard (SeeBlue [®] plus2)	Invitrogen (Karlsruhe)
Chemilumineszenz Substrat (CDP-Star [™])	Roche Diagnostics (Mannheim)
Nitrocellulosemembran (Optitran BA-S85)	Schleicher & Schuell (Dassel)
Säulenmatrix (Amylose-Resin E8021L)	New England BioLabs (Frankfurt)
Immobilized Protein A	Perbio Science Deutschland (Bonn)
Zentrifugen-Konzentrator (Amicon Centriplus RC/YM, 10.000 MWCO)	Millipore Corporation (Bedford, USA)
Zentrifugen-Konzentrator (VIVASPIN; 30.000 MWCO, 3.000 MWCO)	Vivascience (Hannover)
Dialysemembran (Zellu Trans 6.0, MWCO 8.000-10.000)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Dialysemembran (SpectraPor [®] , MWCO 15.000)	Spectrum Laboratories, Inc. (Rancho Dominguez, USA)
Medium (DMEM Low Glucose)	PAA (Pasching, Österreich)
Versen-Trypsin	Apotheke Klinikum Innenstadt der LMU
Fötales Kälberserum	Biochrom (Berlin)
Antibiotic-Antimycotic-Solution	PAA (Pasching, Österreich)
L-Glutamin 200 mM	Biochrom (Berlin)
NuPAGE [®] BisTris Gel 4-12%	Invitrogen (Karlsruhe)
NuPAGE [®] 4x LDS Sample Buffer	Invitrogen (Karlsruhe)

NuPAGE [®] 10x Reducing Agent	Invitrogen (Karlsruhe)
NuPAGE [®] 20x MOPS SDS Running Buffer	Invitrogen (Karlsruhe)
NuPAGE [®] Antioxidant Reagent	Invitrogen (Karlsruhe)
Coomassie Brilliant Blue	BIO-RAD (München)

4.3 Enzyme

Sämtliche Restriktionsenzyme sowie deren Puffer wurden von der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) bezogen.

<i>Taq</i> DNA Polymerase	Roche Diagnostics (Mannheim)
T4 DNA Ligase	Invitrogen (Karlsruhe)
CIP	New England BioLabs (Frankfurt)
Faktor Xa Cleavage Kit	Novagen (Darmstadt) New England BioLabs (Frankfurt)

4.4 Reinigung, Synthese und Nachweis-Kits

Expand High Fidelity PCR System	Roche (Mannheim)
Expand Long Template PCR System	Roche (Mannheim)
Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Warrington, USA)
BIO-RAD Protein Assay	BIO-RAD, (München)
Venor [®] GeM Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs (Berlin)
QIAGEN Plasmid Mini Kit	QIAGEN (Hilden)
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN (Hilden)
SulfoLink [®] -Kit	Perbio Science Deutschland (Bonn)

4.5 Antikörper

Primärantikörper (Anti-MBP-Antiserum)	New England BioLabs (Frankfurt)
Primärantikörper (Penta-His-Antibody)	QIAGEN (Hilden)
Sekundärantikörper (Anti-Rabbit IgG AP-Conjugate)	Promega Corporation (Madison, USA)
Sekundärantikörper (Anti-Mouse IgG AP-Conjugate)	Promega Corporation (Madison, USA)

4.6 Vektoren

pMAL-c2X (Amp ^R)	New England BioLabs (Frankfurt)
pGEX-3X (Amp ^R)	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Pin Point™ Xa-1, Xa-2, Xa-3 (Amp ^R)	Promega (Mannheim)
pQE-30; pQE-60 (Amp ^R)	QIAGEN (Hilden)
pBAD/His Kit oder pBad/Myc-His-Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
pOTB7 (Chloramphenicol ^R)	Deutsches Ressourcenzentrum
pGEM-T Easy (Amp ^R)	Promega GmbH, (Mannheim)

4.7 Bakterienstämme

Escherichia coli

DH5α	supE44, ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15), hsdR17, recA1, gyrA96, thi-1, relA1 (Hanahan 1983; Bethesda Research Lab.1986)
XL-1 Blue	endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+) (Stratagene La Jolla ,CA,USA; Bullock 1987)

BL 21 Codon Plus-RIL	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) (Stratagene)
TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galk rpsL(StrR) endA1 λ- (Casdaban, M. and Cohen, [1980] Grant, SG.N. et al. [1990], Invitrogen)
M15[pREP4]	Nal ^S Str ^S Rif ^S Thi ⁻ Lac ⁻ Ara ⁺ Gal ⁺ Mtl ⁻ F ⁻ RecA ⁺ Uvr ⁺ Lon ⁺ (Bestandteil des Kits „QIAexpress Type IV“; Qiagen, Hilden)

4.8 Oligonukleotide

T_A gibt die in der jeweiligen PCR verwendete Annealingtemperatur an.

4.8.1 Oligonukleotide für die Herstellung der Expressionskonstrukte

Amplifikationsprimer	Sequenz	T _A
MCCApMAL-c2X <i>EcoRI</i>	5'-CCGAATTCAATGACAACAGCCACAG-3'	52°C
MCCApMAL-c2X <i>HindIII</i>	5'-AAAAGCTTTTATTCCGATTCCCTTTTG-3'	52°C
MCCBpMAL-c2X <i>EcoRI</i>	5'-GGGAATTCATGTATCACGGGGAC-3'	52°C
MCCBpMAL-c2X <i>HindIII</i>	5'-ATAGGATCCGCTAACCTTAAGAGG-3'	52°C
MCCA_AKpGEX-3X <i>BamHI</i>	5'-CAGGGATCCTAGTGACCTCTCT-3'	52°C
MCCA_AKpGEX-3X <i>EcoRI</i>	5'-TTGGAATTCTTAAGAAGATAAGTATTG-3'	52°C
MCCA-AK- <i>BamHI</i> for	5'-CAGGGATCCGTGCACCTCTCT-3'	52°C
MCCA-AK- <i>HindIII</i> rev	5'-TTGAAGCTTTTAAGAAGATAAGTATTTG-3'	52°C
MCCB_AKpMAL-c2X <i>EcoRI</i>	5'-ATAGGATCCGCTAACCTTAAGAGG-3'	52°C
MCCB_AKpMAL-c2X <i>HindIII</i>	5'-AAAAGCTTTTACATCCTGAAGATAACC-3'	52°C
MCCA 42 <i>BamHI</i> for	5'-CCGGATCCATGACAACAGCCACAG-3'	52°C

4.8.2 Oligonukleotide für die Sequenzierung der *MCCA* cDNA

cDNA	Sequenzierprimer	5' Sequenz 3'
<i>MCCA1</i>	600r	GCAGATGGAGGAGGGCCTAT
	biotEx8r	GCCATGGTGATCACCAAACACC
	1280r	CGAAGGCATGGCCCTGCAGAG
<i>MCCA2</i>	3r	GATGAAATCAGTGTGCACGTTCC
	1920r	GGTAAGTGCAGTCTCCCTCGC
	7r	AGAGAGAAGACACTACTTAACTGG

4.8.3 Oligonukleotide für die Sequenzierung der *MCCB* cDNA

cDNA	Sequenzierprimer	5' Sequenz 3'
gesamt	330r	CCTCTTGATATGTGAAGTGCTCG
	IIr	CGGCCAAAGTGGTCTCGATCTGG
	IIIr	AACTATTCCATACAATTCATCAGC
	IVr	CATAGTTTCCGGCTCCATAGGAGC
	Vr	GGCTACTACATGTGTTAATTTTCAG

4.8.4 Oligonukleotide für Clone screen PCR

Primername	Sequenz
malE	5'-GGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC-3'
SP6	5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3'
pQE forward	5'-CGGATAACAATTTACACAG-3'
pQE reverse	5'-GTTCTGAGGTCATTAAGTGG-3'

4.8.5 Oligonukleotide für die gerichtete Mutagenese

Mutagenese-primer	5' Sequenz 3'
pMAL-c2XMBP-stop N368	GCCCTGAAAGACGCGCAGACTTAGTCGAGCTCGAA
pMAL-c2XMBP-stop N368_antisense	TTCGAGCTCGACTAAGTCTGCGCGTCTTTCAGGGC
pQE-60-A115T	TTAAAGAGGAGAAATTAACCTTGGGAGGATCCAGATCT C
pQE-60A115T_antisense	GAGATCTGGATCCTCCCAAGGTTAATTTCTCCTCTTTAA

4.9 Medien, Puffer und Stammlösungen

4.9.1 Anzuchtmedien für *E.coli*

LB-Medium:	10 g	Pepton
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	NaCl
	Ad 1000 ml	H ₂ O, pH 7.4
Rich broth:	10 g	Trypton
	2 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
	2 g	Glucose
	Ad 1000 ml	H ₂ O, pH 7.4
Selektive LB-Agarplatten:	20 g	Agar-Agar
	ad 1000 ml	LB-Medium, autoklavieren
	50 µg/ml	Ampicillin oder Chloramphenicol (Zugabe von Antibiotikum nach Abkühlung auf 50°C)
LB-Glycerin-Lösung:	50 %	LB-Medium
	50 %	Glycerin
	Mischen und Autoklavieren für 20 min bei 21°C	

4.9.2 Allgemeine Puffer und Lösungen

TBE-Puffer:	90 mM	Tris-HCl, pH 8.0
	90 mM	Borsäure
	2 mM	EDTA
TBS-Puffer:	20 mM	Tris-HCl, pH 7.5
	140 mM	NaCl
TE-Puffer	10 mM	TrisHCl, pH 8.0
	1 mM	EDTA

Die oben genannten Puffer wurden mit aqua bidest hergestellt, welches über die Apotheke Klinikum Innenstadt der LMU bezogen wurde. Anwendungsspezifische Puffer werden im Methodenteil beschrieben.

5 Methoden

5.1 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

5.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die Reinigung von Plasmid-DNA wurde unter Verwendung des QIAGEN Plasmid Mini- bzw. Midi-Kits nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Plasmid-DNA-Präparation mit dem QIAGEN-Kit funktioniert nach dem Prinzip der „Alkalischen Lyse“ [11]. Unter alkalischen Bedingungen wird chromosomale DNA denaturiert, superhelikale Plasmid-DNA dagegen verbleibt in seiner nativen Konformation. Bakterien einer Übernachtskultur werden im alkalischen Milieu in Gegenwart von SDS lysiert, und durch Zugabe von Natriumacetat neutralisiert. Eine sich anschließende Zentrifugation trennt präzipitierte chromosomale DNA und Proteine von der Plasmid-DNA in der wässrigen Phase. Die Isolierung der Plasmide aus der wässrigen Phase erfolgt durch reversible Bindung an eine Silikamatrix.

Bei der Präparation mit dem Midi-Kit wurde die Plasmid-DNA durch Erhöhung der Salzkonzentration von der Matrix eluiert, anschließend mit Isopropanol gefällt, getrocknet und in 100-150 μl H_2O resuspendiert. Bei der Präparation mit dem Mini-Kit wurde die Plasmid-DNA mit 50 μl H_2O eluiert.

5.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte durch Messung der UV-Absorption bei $\lambda=260$ nm mit Hilfe eines UV/VIS-Spectrometers. Es besteht eine lineare Abhängigkeit der Absorption von der Konzentration. Die OD_{260} von 1, entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA. Als Kriterium für die Reinheit einer DNA-Präparation wird das Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ herangezogen. Für reine DNA

schwankt dieser Wert je nach GC-Gehalt der Probe zwischen 1.8 und 2.0. Niedrigere Quotienten zeigen Proteinverunreinigungen an, höhere lassen auf die Anwesenheit von RNA schließen.

5.1.3 Konzentrationsbestimmung mittels Agarose-Gel

Beim Umgang mit geringen DNA-Mengen wurde die Quantifizierung mittels Agarose-Gel angewendet, die noch einen Nachweis bis zu 5 ng DNA ermöglicht. Dazu wurden unterschiedliche Volumina der jeweiligen Probe zusammen mit einem DNA-Größenmarker mit bekanntem DNA-Gehalt auf ein Agarose-Flachbett-Gel aufgetragen. Im UV-Licht konnte aufgrund des Vergleichs der Bandenintensität die Konzentration abgeschätzt werden.

5.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine sehr effektive Methode, um *in vitro* große Mengen einer spezifischen DNA-Sequenz zu erzeugen. Grundlage ist ein zyklischer dreistufiger Prozeß. Dieser besteht aus dem wiederholten Ablauf von Strangtrennung (Denaturierung), Bindung zweier spezifischer Oligonukleotide (Annealing) und DNA-Synthese (Elongation) mit hitzestabiler DNA-Polymerase. Für analytische Zwecke (z.B. Screening von Bakterienklonen) wurde die Taq-DNA-Polymerase verwendet. Für Klonierungsexperimente wurde die Expand-High-Fidelity-Polymerase gewählt. Diese besitzt eine „Proofreading“-Exonukleaseaktivität, die im Vergleich zur Taq-Polymerase zu einer zehnfach höheren Genauigkeit der DNA-Synthese führt.

5.1.5 Amplifikation von cDNA für Expressionskonstrukte

Grundlage zur Konstrukterstellung war die komplette cDNA von *MCCA* im Plasmidvektor pOTB7 und *MCCB* im Plasmidvektor pGEM-T Easy. Diese bereits im

Labor vorhandenen Konstrukte dienten als Template für nachfolgende PCR-Reaktionen.

Die 18-30 Basenpaare langen PCR-Primer wurden so konzipiert, dass an deren 5'-Ende eine Restriktionsschnittstelle eingeführt wurde [73]. Neben einem Guanidin- und Cytosin-Gehalt von 40-60 % wurde auch eine möglichst geringe Komplementarität innerhalb der Primer und zwischen den Primer-Paaren angestrebt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Materialteil dieser Arbeit angegeben.

Zur Generierung des „Insert“ wurde folgender PCR-Ansatz gewählt

2 µl Template (*MCCA*-cDNA und *MCCB*-cDNA)

1 µl forward primer

1 µl reverse primer

1 µl dNTP-Mix

5 µl 10x PCR-Puffer

0.75 µl Expand High Fidelity Polymerase

Ad 50 µl aqua bidest.

PCR-Programm

Die Temperatur für die Elongation und die abschließende Auffüllreaktion war abhängig von der Größe des PCR-Produkts. Bei PCR-Produkten kleiner als 3 kb, wurde eine Elongations-Temperatur von 72°C gewählt, bei größeren Fragmenten 68°C. Die Aktivität der Polymerase wird vom Hersteller mit 0.7 min/kb PCR-Produkt beziffert.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	2 min	1x
Denaturierung	94°C	45 sec	30x
Annealing	53°C	45 sec	
Elongation	72°C	3 min	
Auffüllreaktion	72°C	10 min	1x
Kühlen	4°C		

5.1.6 Nachweis einer Insertion in rekombinanten Plasmiden mittels PCR

Um korrekt transformierte Klone zu identifizieren, wurde eine Clone-screen-PCR durchgeführt. Hierzu wurden einzelne Bakterienklone von einer Agarplatte mit einer Pipettenspitze gepickt und in 20 µl H₂O suspendiert. 5 µl dieser Suspension wurden mit 15 µl PCR-Master-Mix gemischt. Entscheidend bei der darauf folgenden PCR war eine ausreichend lange initiale Denaturierung, um die in den Bakterien enthaltene Plasmid-DNA freizulegen. Es wurden jeweils ein Vektor-Primer und ein Insert-Primer benutzt. Zeigte die spätere gel-elektrophoretische Auswertung ein spezifisches PCR-Produkt, war dies ein Hinweis für eine gelungene Insertion.

Clone-Screen-PCR-Mastermix (für 10 Ansätze)

- 2 µl Taq-Polymerase
- 2 µl Insert primer
- 2 µl Vektor primer
- 20 µl 10x PCR-Puffer + dNTP

Ad 150 µl aqua bidest.

Clone screen PCR-Standard-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	10 min	1x
Denaturierung	94°C	40 sec	24x
Annealing	52°C	40 sec	
Elongation	72°C	40 sec	
Auffüllreaktion	72°C	5 min	1x
Kühlen	4°C		

Automatische Sequenzierung von DNA

Basierend auf der Kettenabbruch-Methode nach Sanger [72] wurde die DNA-Sequenzierung mit Hilfe des BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit durchgeführt.

Sequenzieransatz

0.5-2 µl gereinigtes PCR-Produkt oder Plasmid Präparation
(ca. 450 ng reine DNA)

1 µl Sequenzier Primer (10 pmol/µl)

2 µl BigDye v.3.1 Sequencing Mix

Ad 5 µl aqua bidest

PCR-Programm zur Sequenzierung mit BigDye v3.1

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95°C	2 min	29x
Annealing	50°C	30 sec	
Elongation	60°C	4 min	
Kühlen	4°C	Hold	

Die Proben wurden von der Firma Medigenomix präzipitiert, gereinigt und auf einem ABI 3730 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Weiterstadt) analysiert. Die Sequenz-Daten wurden mit dem Computerprogramm Sequence Navigator (Applied Biosystems, Weiterstadt) ausgewertet.

5.1.7 Reinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden zur Abtrennung von Template und Polymerasen mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellervorschrift gereinigt. Am Ende der Säulenreinigung wurde das PCR Produkt mit 30-50 µl H₂O bidest eluiert.

5.1.8 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Analyse von DNA-Fragmenten erfolgte durch Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht mit Hilfe der Gelelektrophorese. Verwendet wurden Agarose-Flachbett-Gele, in denen entsprechend der zu erwartenden Fragmentgrößen die Agarose-Konzentrationen zwischen 0.7 bis 2 % variiert wurden. Die Agarose wurde in 100 ml 1x TBE-Puffer aufgekocht und nach einigen Minuten bei Raumtemperatur mit 2 Tropfen Ethidiumbromid-Lösung (0.625 mg/ml) versetzt. Die Proben wurden

vor dem Gelauftrag mit „loading buffer“ gemischt. Als Längenstandard diente der Marker 1 kb und Marker V. Zur Elektrophorese wurde eine Spannung von 80-120 V angelegt, bis die gewünschte Trennung der DNA-Fragmente erreicht war. Die Gele wurden bei 312 nm UV-Durchlicht fotografiert.

5.1.9 Isolierung von DNA aus Agarose Gel

Nach der Agarose-Gel-Elektrophorese, wurde die gewünschte Bande unter UV-Licht detektiert und möglichst präzise ausgeschnitten. Die weitere Reinigung wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellervorschrift durchgeführt. Dieses Kit beruht auf der modifizierten Methode von Vogelstein und Gillespie [85], bei der nach Schmelzen der Agarose die DNA in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen spezifisch an Silikagel adsorbiert und bei niedrigerer Salzkonzentrationen und einer basischen Umgebung von pH 7.5 bis 8.0 eluiert werden kann. Die Elution der DNA erfolgte mit 30-50 µl H₂O bidest.

5.1.10 Restriktionsverdau von DNA

Die in dieser Arbeit verwendeten Typ II-Restriktionsendonukleasen sind Enzyme bakteriellen Ursprungs, die spezifische DNA-Sequenzen erkennen und schneiden. Dabei entstehen glatte (blunt ends) oder einander komplementäre 5'- bzw. 3'-überhängende (sticky ends) Enden. Der Restriktionsverdau von DNA wurde in Volumina von 20 µl (analytisch) oder 50 µl (präparativ) durchgeführt. Es wurden die vom Hersteller (Roche) empfohlenen 10x-Reaktionspuffer verwendet und eine DNA-Menge von 0.2-10 µg eingesetzt. Die Ansätze wurden für 1-3 h bei 37°C inkubiert und im Anschluss Aliquote mittels Agarose-Gel-Elektrophorese analysiert.

5.1.11 Dephosphorylierung linearisierter Plasmide

Um die Selbstligation des geschnittenen Vektors zu verhindern, wurden mit Hilfe des Enzyms Alkalische Phosphatase (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, CIP) die 5'-

Phosphat-Reste der Vektor-DNA abgespalten. Plasmidvektoren wurden zunächst durch Verdau mit geeigneten Restriktionsendonukleasen linearisiert. Zu dem Restriktionsansatz wurde 1 µl des CIP-Enzyms hinzupipettiert und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und gereinigt.

5.1.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Für den Einbau eines DNA-Fragments in einen linearisierten Klonierungsvektor wurde das Enzym T4 DNA-Ligase verwendet. Dieses Enzym katalysiert die Verknüpfung von freien 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-Gruppen doppelsträngiger DNA.

Es wurde folgender Ligationsansatz gewählt

4 µl 5x Ligasepuffer (inkl. ATP)

2-3 µl geschnittener Plasmidvektor (10-20 ng/µl)

4-8 µl DNA-Fragment (20-40 ng/µl)

0.5 µl T4 DNA-Ligase (1 U/µl)

Ad 20 µl H₂O bidest.

Für die Ligation wurde das zu inserierende DNA-Fragment in einem dreifach molaren Überschuß gegenüber dem Vektor eingesetzt und der Reaktionsansatz über Nacht bei 16-17°C inkubiert.

5.1.13 Transformation chemisch-kompetenter *E.coli* Zellen

Kompetente *E.coli* Bakterien sind in der Lage, bei kurzfristiger Erhöhung der Temperatur auf 42°C Plasmid-DNA aufzunehmen. Die auf den verwendeten Plasmiden codierten Antibiotika-Resistenz-Gene (Ampicillin) dienen der späteren Selektion erfolgreich transformierter Bakterien. Eine eiskalte Suspension chemisch kompetenter *E.coli* wurde vorsichtig mit 2-5 µl Ligationsansatz gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte im Wasserbad bei 42°C für 90

Sekunden. Anschließend wurde der Ansatz sofort wieder auf Eis gekühlt, und nach 2 min mit 500 µl LB-Medium vermischt. Nach Inkubation von 1 h bei 37°C in einem Thermomixer, wurde der Transformationsansatz zentrifugiert (2000 Upm; 2 min) und der Überstand bis auf ca. 100 µl abgenommen. Die Zellen wurden in dem verbliebenen Rest resuspendiert und auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

5.1.14 Gezielte Mutagenese von DNA *in vitro*

Mit dieser Technik können gezielt Punktmutationen in doppelsträngige DNA eingefügt werden. Ebenso ist das Hinzufügen oder Entfernen eines Basentriplets möglich. Das Prinzip beruht auf zwei synthetischen Oligonukleotid-Primern mit einer Länge von 25-45 Basen, die möglichst zentral die gewünschte Mutation tragen. Nach Denaturierung der doppelsträngigen Ausgangs-Plasmid-DNA, binden diese an den jeweils komplementären Strang. Die im Kit enthaltene *PfuTurbo* DNA Polymerase verlängert die Primer zu einem linearen DNA-Strang mit der gewünschten Mutation. Die Ursprungs-DNA wird durch Verdau mit DPN I Endonuklease entfernt. In einem letzten Schritt werden durch Transformation in XL-1 Blue *E.coli* die linearisierten Stränge wieder zu einem Ring geschlossen. Die gerichtete Mutagenese wurde entsprechend den Anweisungen des „QuickChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) durchgeführt. Mutagenese-Primer wurden mit dem web-basierten QuickChange[®]-Primer-Design-Programm von Stratagene konzipiert.

PCR-Programm zur gezielten Mutagenese

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	30 sec	1x
Denaturierung	95°C	30 sec	12-18x
Annealing	55°C	1 min	
Elongation	68°C	1 min/kb Plasmid-Länge	
Kühlen	4°C	Hold	

5.1.15 Erstellung von Expressionsvektoren

Herstellung von Plasmidvektoren für die Expression von MCC α und MCC β in *E.coli*

***MCCA*^{mat}/p-mal-c2X**

Als Template diente das *MCCA*/pOTB7 Konstrukt. Die PCR mit dem Primerpaar *MCCApMAL-c2XEcoRI* und *MCCApMAL-c2XHindIII* lieferte ein DNA-Fragment mit Restriktionsschnittstellen für *EcoRI* und *HindIII*. Dieses Fragment (*MCCA*^{mat}) entsprach der codierenden cDNA für das reife MCC α Protein, also ohne aminoterminalen Importsignal. Der pMAL-c2X Vektor wurde entsprechend mit *EcoRI* und *HindIII* Restriktionsenzymen verdaut und die *MCCA*^{mat}-cDNA mit dem geschnittenen Vektor ligiert. Nach Transformation in *E.coli*, wurden die entstandenen Bakterienklone mit Clone-screen-PCR und Restriktionsverdau überprüft. Abschließend wurde die Richtigkeit der cDNA-Sequenz und die Einhaltung des Leserahmens durch Sequenzierung bestätigt.

Resultierendes rekombinantes Protein: MBP-MCC α

***MCCB*^{mat}/p-mal-c2X**

Als Template diente das *MCCB*/pGEM-T-Easy Konstrukt. Dieses wurde mit dem *MCCBpMAL-c2XEcoRI* und *MCCBpMAL-c2XHindIII* Primerpaar amplifiziert. Die verwendeten Primer besaßen an ihren 5'-Enden „Linker“-Sequenzen mit denen *EcoRI* und *HindIII* Restriktionsschnittstellen in das PCR-Produkt eingeführt wurden. Der Translationsstart wurde durch den Primer *MCCBpMAL-c2XEcoRI* so versetzt, dass MCC β ab AS 23 hergestellt wurde, also ohne aminoterminalen Importsignal. Die *MCCB*^{mat}-cDNA wurde nun in den mit *EcoRI* und *HindIII* Restriktionsenzymen geschnittenen pMAL-c2X Vektor mit Hilfe von T4 DNA-Ligase eingefügt. Die Insertion des cDNA Fragments wurde zunächst mit einer Clone-Screen-PCR überprüft, gefolgt von einem Restriktionsverdau. Abschließend wurde durch Sequenzierung die Korrektheit der *MCCB*^{mat} cDNA-Sequenz und die Einhaltung des Leserahmens bestätigt.

Resultierendes rekombinantes Protein: MBP-MCC β

MCCA^{mat}/pQE- 60

Zunächst wurde unter Verwendung der Mutagenese-Oligonukleotide pQE-60A115T und pQE-60A115T_antisense das Vektor eigene ATG an Position 115 inaktiviert. Der modifizierte pQE-60 Vektor wurde anschließend mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III geschnitten und dadurch der für den His-tag codierende Bereich aus dem Vektor entfernt. Die Generierung des Insert-Fragments erfolgte von der Matrize MCCA_{pOTB7} mit Hilfe des Primerpaares MCCA 42 *Bam*HI for/MCCA_{pMAL-c2X} *Hind*III. Abschließend wurde das Insert in den geschnittenen Vektor kloniert.

Resultierendes rekombinantes Protein: MCC α

Herstellung von Expressionskonstrukten für die Generierung von polyklonalen Antikörpern

MCCB_AK/pMAL-c2X

Als Matrize diente der MCCB/pGEM-T-Easy Vektor, aus dem das gewünschte cDNA Fragment (umfasste die Basenpaare 963-1629) mit Hilfe der beiden Primer MCCB_AK_{pMAL-c2X}*Eco*RI und MCCB_AK_{pMAL-c2X}*Hind*III amplifiziert wurde. Nach Restriktionsverdau mit *Eco*RI und *Hind*III wurde das PCR-Fragment in den pMAL-c2X-Vektor ligiert. Durch abschließende Sequenzierung konnte die Richtigkeit des Konstrukts bestätigt werden.

Resultierendes rekombinantes Protein: MBP-MCC β _(As321-543)

MCCA_AK/pGEX-3X

Das MCCA_Ak-Fragment wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer MCCA_AK_{pGEX-3X} *Bam*HI und MCCA_AK_{pGEX-3X} *Eco*RI generiert. Als Matrize diente das Ausgangskonstrukt MCCA/pOTB7. Das gereinigte PCR-Fragment wurde in den *Eco*RI/*Hind*III verdauten pGEX-3X Vektor kloniert und durch Sequenzierung auf seine Richtigkeit überprüft.

Resultierendes rekombinantes Protein: GST-MCC α _(As402-643)

MCCA_AK/pQE-30

Die PCR-Reaktion zur Generierung des *MCCA_Ak*-Fragments wurde mit dem Primerpaar *MCCA-AK-BamHI* for und *MCCA-AK-HindIII* rev durchgeführt. Auch hier diente der *MCCA/pOTB7* Vektor als Matrize. Der pQE-30 Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *HindIII* geschnitten und anschließend das PCR-Fragment mit den komplementären Enden inseriert.

Resultierendes rekombinantes Protein: His-MCC $\alpha_{(As402-643)}$

Mutagenese des pMAL-c2X-Vektors zur Herstellung von MBP

Der Ausgangsvektor pMAL-c2X wurde mit dem Mutagenese Primerpaar N368/N368antisense amplifiziert und dadurch ein Stop-Codon am 3`-Ende des *malE*-Gens generiert. Das *malE* Gen codiert für das Maltose-Bindende-Protein (MBP). Die erfolgreiche Einführung des Stop-Codons wurde durch Sequenzierung bestätigt.

5.2 Arbeiten mit *Escherichia coli*

Alle wässrigen Lösungen und Geräte zur Kultivierung von *E.coli* wurden 25 min bei 121°C autoklaviert. Antibiotika und andere Medienzusätze (Glucose), die nicht autoklavierbar waren, wurden steril filtriert und den Medien nach Abkühlen zugesetzt.

5.2.1 Kultivierung

Die Anzucht von *E.coli* erfolgte bei 37°C auf einem Flachbett-Schüttler (150-200 Upm). Als Nährmedium diente LB-Medium mit entsprechenden Zusätzen. Das Wachstum der Kultur wurde anhand der optischen Dichte bei $\lambda = 600$ nm mit einem Spektralphotometer gemessen. Als Leerwert diente steriles LB-Medium.

5.2.2 Lagerung

Für die Langzeitlagerung von *E.coli* wurde zunächst eine 5 ml Übernachtskultur angelegt, am folgenden Tag zentrifugiert (3000 g) und der Überstand verworfen. Die verbliebenen Bakterien wurden in 1 ml LB-Glycerin-Lösung resuspendiert, und bei -80°C eingefroren.

5.2.3 Herstellung dauerhaft chemisch kompetenter *E.coli* Zellen

Um kompetente *E.coli*-Zellen für die Transformation von Plasmid-DNA zu erhalten, wurden 100 ml Psi-Broth mit 1 ml Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5-0.6 auf einem Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Die Ernte der Bakterien erfolgte nach Abkühlen auf Eis durch Zentrifugation bei 4000 g und 4°C für 10 min. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen vorsichtig in 30 ml eiskaltem TFB 1-Puffer resuspendiert und für weitere 90 min auf Eis belassen. Anschließend wurden die Bakterien erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 4 ml eiskaltem Puffer TFB 2 gelöst. In der Zwischenzeit wurden sterile 1.5 ml Reaktionsgefäße in flüssigem Stickstoff vorgekühlt und abschließend mit je 100 µl Zellsuspension befüllt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Medien und Lösungen zur Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*

Puffer TFB 1:	100 mM RbCl ₂	Puffer TFB 2:	10 mM MOPS
	50 mM MnCl ₂		10 mM RbCl ₂
	30 mM Kaliumacetat		75 mM CaCl ₂ ,
	15 % Glycerinlösung		15 % Glycerinlösung
	10 mM CaCl ₂		pH 6.8; eisgekühlt
	pH 5.8; eisgekühlt		
Psi-Broth:	4 mM MgSO ₄		
	10 mM KCl		
	In LB-Medium lösen		

5.3 Eukaryontische Zellkultur

5.3.1 Kultivierung von humanen Fibroblasten

Sämtliche Arbeiten wurden unter Laminafluss in einer Sterilbank durchgeführt und ausschließlich sterile Medien, Lösungen und Geräte verwendet. Die Vermehrung der Zellen erfolgte in horizontal gelagerten Zellkulturflaschen bei 37°C, 5 % CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Für alle Zell-Linien wurde das gleiche Kulturmedium eingesetzt. Bei den SV40 transformierten HF1/D3 Fibroblasten und SV40 transformierten Patienten-Zell-Linien erfolgte der Mediumwechsel alle 2-3 Tage. Daneben wurden auch nicht transformierte Wildtyp- und Patienten-Fibroblasten kultiviert. Hier bewährte sich ein Mediumwechsel in Abständen von 5-7 Tagen.

Herstellung von Kulturmedium

- 500 ml DMEM-Medium („low glucose“)
- + 50 ml Fötale Kälberserum (FCS)
- + 5 ml Antibiotic-Antimycotic (Fa. Gibco, Paisley, Scotland, U.K.)
- + 5 ml L-Glutamin 200 mM

5.3.2 Passagieren von Zellen

In dieser Arbeit wurden nur adhärent auf dem Boden des Kulturgefäßes wachsende Zellen verwendet. Diese wurden bei Erreichen von Konfluenz passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt, dann mit 5 ml PBS gewaschen, um das im Medium enthaltene FCS zu entfernen. Die Zugabe von 1 ml Versen-Trypsin und anschließende 5 minütige Inkubation bei 37°C diente der Ablösung der Zellen von ihrer Unterlage. Der Trypsinierungsprozess wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop beobachtet und durch Zugabe von 9 ml Kulturmedium gestoppt. Die gewonnene Zellsuspension konnte in der gewünschten Menge auf frische Zellkulturgefäße verteilt werden.

5.3.3 Kryokonservierung von humanen Fibroblasten

Zunächst wurde das Einfriermedium vorbereitet und zusammen mit 5 Kryoröhrchen auf Eis gestellt. Die adhärent wachsenden Zellen wurden durch Trypsin-Behandlung abgelöst (siehe oben). Nach mikroskopischer Kontrolle wurden 9 ml Medium zugegeben, die Zellsuspension in ein 10 ml Falcon-Röhrchen transferiert und anschließend für 5 min bei 300 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 0.5 ml Medium aufgenommen. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Den resuspendierten Zellen wurde tropfenweise 7 ml Einfrierlösung zugegeben und diese Mischung auf die Kryoröhrchen verteilt. Das Einfrieren sollte langsam erfolgen, um Schäden durch Kristallisation zu vermeiden. Deshalb wurde ein Freezing Container („Mr Frosty“) verwendet, der in einen -80°C Kühlschrank gestellt wird, und die Proben um ein Grad pro Minute abkühlt. Für die langfristige Lagerung wurden die Kryoröhrchen am nächsten Tag in einen Flüssig-Stickstoffbehälter überführt.

Einfrierlösung für eine Zelllinie: 5 ml fötales Kälberserum
4 ml DMEM (low glucose) mit Antibiotikum
1.25 ml DMSO

5.3.4 Auftauen von kryokonservierten humanen Fibroblasten

Die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Zellen wurden zügig im 37°C Wasserbad aufgetaut und in ein Zentrifugenröhrchen gekippt, in welchem sich 8 ml Kulturmedium befanden. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (5 min; 300 g; Raumtemperatur) und anschließend der Überstand mit der Pasteurpipette abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 5 ml Medium resuspendiert und nach Überführung in eine kleine Zellkulturflasche bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

5.3.5 Zellernte von humanen Fibroblasten

Die Fibroblasten zweier dicht bewachsener Zellkulturflaschen wurden durch Trypsin-Behandlung (siehe oben) von ihrer Unterlage gelöst und in jeweils 5 ml PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein 10 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 5 min bei 300 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet erneut mit 5 ml PBS gewaschen und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die gereinigten Zellen konnten nun in 300 µl Lysepuffer oder in 350 µl Mitochondrien-Isolierungs-Puffer resuspendiert werden. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -20°C.

Lysepuffer: PBS, pH 7.4
 5 mM EDTA
 1 % Triton X-100
 Protease Inhibitor (1 Tablette Complete Mini auf 25 ml Puffer)

Mitochondrien- 200 mM Mannitol
Isolierungs- 70 mM Sucrose
Puffer: 1 mM EGTA
 10 mM Hepes
 Protease Inhibitor (1 Tablette Complete Mini auf 25 ml Puffer)

5.3.6 Herstellen eines Fibroblasten-Zellextrakts

Hierfür wurden Fibroblasten verwendet, die in Lysepuffer vorlagen. Nach schonendem Auftauen auf Eis, erfolgte die Zell-Lyse mit Hilfe eines Ultraschallstabs (Amplitude von 10 %; Impulszeit 2x10 sec; dazwischen 1 Minute Pause) in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß. Das Zell-Lysat wurde hochtourig zentrifugiert (20 000 g; 15 min; 4°C), der Überstand vorsichtig abgenommen und dessen Proteingehalt mittels Bradford-Assay bestimmt. Anschließend wurde ein Western Blot durchgeführt, um das Zielprotein (hier MCC α oder MCC β) spezifisch nachzuweisen.

Anreicherung von Mitochondrien aus humanen Fibroblasten

Die Mitochondrien wurden durch eine Kombination von Zentrifugationsschritten angereichert. Dies ist möglich, da sich die verschiedenen Zellorganellen in ihrer Dichte unterscheiden. Die in Mitochondrien-Isolierungs-Puffer vorliegenden Fibroblasten wurden auf Eis aufgetaut. Die Homogenisierung der Zellen erfolgte mit einer 28½G Insulin-Spritze, indem die Zellsuspension 20-mal durch die Nadel bewegt wurde. Das Homogenat wurde zentrifugiert (10 min; 1000 g; 4°C), der Überstand abgenommen und das aus Zelltrümmern bestehende Pellet verworfen. Die im Überstand enthaltenen Mitochondrien wurden in einem zweiten Zentrifugationsschritt (15 000 g; 15 min; 4°C) sedimentiert und nochmals mit 1 ml Mitochondrien-Isolierungs-Puffer gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation (15 000 g; 15 min; 4°C) wurde das gewaschene Pellet in 80 µl Mitochondrien-Isolierungs-Puffer gelöst. Die Anreicherung konnte mittels Bradford-Assay und Western Blot analysiert werden.

5.4 Proteinbiochemische Methoden

5.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration von Proteingemischen kann nach der kolorimetrischen Methode von Bradford bestimmt werden. Der Test beruht auf einer Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250 an Proteine in saurer Lösung; durch die Bindung wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 auf 595 nm verschoben. Die Proteinbestimmung wurde mit Hilfe des Protein Assay der Firma Biorad nach Herstellervorschrift durchgeführt. Zur Messung des Proteingehalts wurden 5 µl Probe mit 200 µl Farbstofflösung in einer 96-Well-Platte gemischt und 10 min bei Raumtemperatur bis zur Ausbildung stabiler Farbstoff-Protein-Komplexe inkubiert. Die Extinktion wurde im FLUOstar Optima Multi-Plattenreader bei 595 nm gemessen und die Werte gegen eine BSA-Eichreihe kalibriert.

5.4.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die Untersuchung von Proteingemischen erfolgte durch vertikale, diskontinuierliche SDS-Gel-Elektrophorese. Diese trennt Proteine unter denaturierenden Bedingungen anhand ihrer Mobilität im elektrischen Feld, die proportional zum Molekulargewicht ist. Vorgefertigte Polyacrylamid-Gele, Chemikalien und die Proteingel-Apparatur wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Vor dem Auftrag wurden die Proben mit 4x-LDS-Sample-buffer und 10x-Reducing-Agent versetzt und für 5 min bei 95°C im Heizblock denaturiert. Die Gelkammer wurde nach den Angaben des Herstellers zusammengesetzt, mit den entsprechenden Laufpuffern befüllt und zur Elektrophorese eine konstante Spannung von 200 V (60-120 mA) für 60-90 min angelegt. Die aufgetrennten Proteine und ein mitgeführter Molekulargewichtsstandard konnten anschließend mit Coomassie Brilliant blue gefärbt werden oder wurden zur Immunodetektion auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen.

- Laufpuffer 1:** 50 ml NuPAGE® 20x MOPS SDS Running Buffer ad 1000 ml H₂O bidest
- Laufpuffer 2:** 200 ml Laufpuffer 1
+ 500 µl Antioxidant Reagent

5.4.3 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine im SDS-Polyacrylamid-Gel sichtbar zu machen, wurden die Gele mit Coomassie brilliant blue Lösung für mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gel mit Entfärber (45 % Methanol; 10 % Essigsäure) bis zur optimalen Darstellung der Banden entfärbt und konnte dann für einige Tage in H₂O aufbewahrt werden. Zur dauerhaften Konservierung wurden die gefärbten Gele mit einem Vakuum-Geltrockner bei 80°C auf Whatman-Filterpapier getrocknet.

5.4.4 Umpuffern und Einengen von Proteinlösungen

Während der mehrstufigen chromatographischen Reinigung von Proteinen musste in vielen Fällen ein Pufferaustausch vorgenommen werden, um störende niedermolekulare Stoffe aus der Protein-Lösung zu entfernen. Hierfür wurden Dialyse, Gelfiltration und Ultrafiltration eingesetzt. Abhängig vom Probenvolumen und der Größe des Zielproteins, standen Dialyse-Schläuche aus Cellulose mit unterschiedlichen Ausschlussgrenzen zur Verfügung. Nach Rehydratisierung wurden diese mit Protein-Lösung befüllt, dicht verschlossen und über Nacht bei 4°C gegen ein mindestens 200-faches Puffervolumen (z.B. PBS) dialysiert.

Zur raschen Trennung von hochmolekularen und niedermolekularen Substanzen wurde die Gelfiltration mittels HiTrap™ Desalting Säulen (GE Healthcare) eingesetzt. Die Säulenmatrix besitzt Poren definierter Größe, in die kleine Moleküle hineindiffundieren können. Größere Moleküle können nicht eindringen und benötigen deshalb deutlich weniger Zeit für die Säulenpassage. Das Einengen von Protein-Lösungen erfolgte mit Zentrifugen-Konzentratoren der Firma Millipore und Vivascience. Die Wahl der Ultrafiltrationsmembran, und damit deren Ausschlußgrenze, orientierte sich am Molekulargewicht des Zielproteins. Die Zentrifugationsbedingungen wurden nach Empfehlungen der Hersteller gewählt.

5.5 Expression und Reinigung rekombinanter Proteine

5.5.1 Expression von Proteinen in *E.coli*

Zur Produktion von rekombinanten Fusionsproteinen wurde das pMAL™ Vektorsystem eingesetzt. Dieses nutzt zur Regulation der Transkription den tac-Promotor, welcher durch den künstlichen Induktor Isopropylthio-β-D-Galactosid (IPTG) gesteuert werden kann. Zunächst wurde LB-Amp-Medium (100 µg/ml Ampicillin) mit transformierten Bakterien beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese Vorkultur wurde mit Rich Broth Medium im Verhältnis 1:100 vermischt und in einem großlumigen Kolben bei 37°C auf einem Flachbett-Schüttler kultiviert. Das

Bakterienwachstum in der Hauptkultur ließ sich durch photometrische Messungen beobachten; bei Erreichen einer $OD_{600}=0.5$ wurde mit IPTG induziert. Abhängig vom Expressionskonstrukt wurden IPTG-Konzentrationen zwischen 0.3 mM und 1 mM eingesetzt. Nach weiteren 3-6 h auf dem Schüttelinkubator bei 37°C erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation bei 4000 g für 30 min und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und jeweils etwa 1 g Bakterienpellet in 10 ml eiskaltem Puffer A resuspendiert. Um einer frühzeitigen Degradation von Proteinen vorzubeugen, enthielt der Puffer A standardmäßig Protease-Inhibitoren (1 Tablette / 20 ml Puffer). Die Bakteriensuspension wurde anschließend bei -20°C tiefgefroren.

Puffer A: 20 mM Tris-HCl, pH 7.4
200 mM NaCl
1 mM EDTA
(Optional: 1 Tablette Complete Mini / 20 ml Puffer)

5.5.2 Zellaufschluss und Gewinnung von Rohextrakt

Die geernteten *E.coli* Zellen wurden bei -20°C in Puffer A gelagert, vor Anwendung schonend im Eiswasserbad aufgetaut und anschließend mit Hilfe eines Ultraschallstabs lysiert. Bei einer Amplitude von 40 % wurden fünf Einzelimpulse von jeweils 30 Sekunden appliziert. Um eine Erwärmung des Bakterienlysats zu vermeiden, wurde das Probengefäß in ein Ethanol-Eisbad gestellt und einminütige Pausen zwischen den Impulsen eingehalten. Im Anschluss wurden Zellfragmente durch hochtourige Zentrifugation (15 000 g, 30 min, 4°C) entfernt, der Überstand sorgfältig abgenommen und mit einem Spritzenfilters der Porengröße 0.45 µm filtriert.

5.5.3 Reinigung rekombinanter Proteine aus *E.coli*

Grundlagen

Zur säulenchromatographischen Trennung von Proteingemischen diente das Äktaprime *Fast Protein Liquid Chromatographie* (FPLC) System der Firma Amersham Bioscience (Freiburg). Die Abbildung 5.1 beschreibt die Funktionsweise einer solchen Anlage. Mit Hilfe einer Pumpe wird Puffer bzw. Probe auf eine Trennsäule aufgetragen und der Säulendurchlauf mit einem nachgeschalteten UV-Detektor auf seinen Proteingehalt untersucht. Dieser Detektor ist mit einem Computer verbunden, der die Daten dokumentiert. Die gereinigten Proteine werden mit einem Fraktionen-Sammler aufgefangen. Die Auswertung der gesammelten Chromatographie-Daten erfolgte mit Hilfe der UNICORN Prime Software.

Angestrebt wurde eine präparative Proteinreinigung, d.h. ein Zielprotein sollte in hoher Reinheit aus einem Proteingemisch isoliert werden. Für eine schnelle und schonende Reinigung war eine Kombination verschiedener Methoden erforderlich. Alle Puffer wurden vor Verwendung mit einem Celluloseacetatfilter (0.45 µm Sartorius) von makroskopischen Partikeln befreit und 30 min im Vakuum entgast.

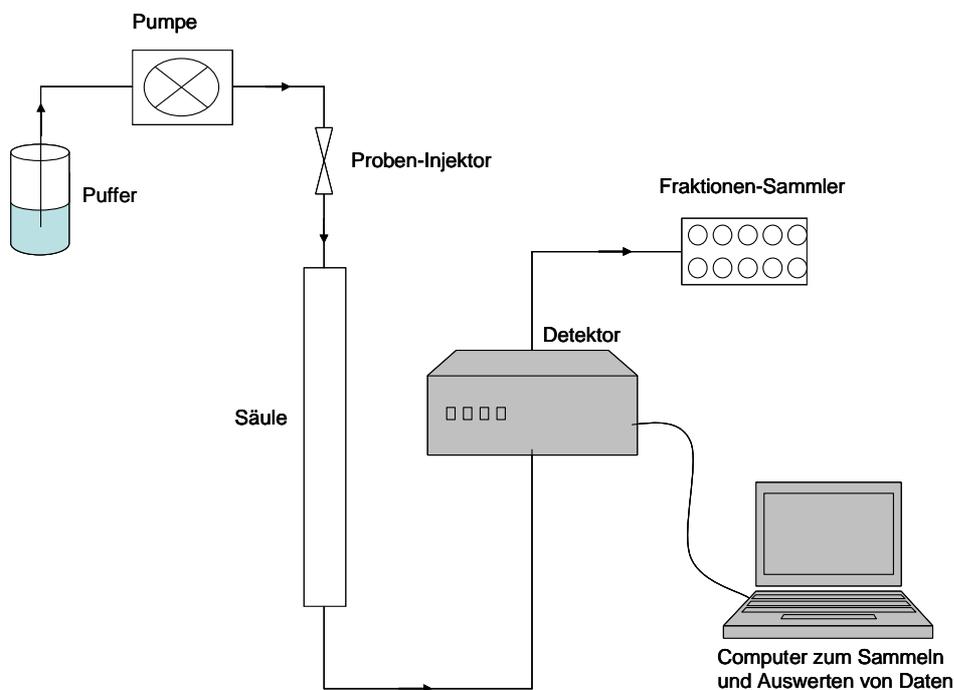


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung einer Anlage zur Säulenchromatographie

Affinitätschromatographie von MBP-Fusionsproteinen

Durch rekombinante Expression in *E.coli* wurde das Zielprotein mit einem so genannten *tag* versehen, der eine definierte Affinität zu einem immobilisierten Bindungspartner zeigt. Als *tag* diente in unserem Fall das Maltose-Bindende-Protein (MBP), welches spezifisch an immobilisierte Amylose der Säulenmatrix bindet. Für die Reinigung wurde eine XK 16/20 Leersäule mit 15 ml Amylose-Harz beschickt. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C und einer Flußgeschwindigkeit von 0.4 ml/min durchgeführt. Nach Äquilibration der Affinitätsmatrix mit 5 Säulenvolumina Puffer A (Punkt 5.5.1) wurden 20 bis 50 ml des filtrierten *E.coli* Zellextrakts aufgetragen. Anschließend wurde erneut mit 4 Säulenvolumina Puffer A gespült, während derer das UV-Signal auf den Ausgangswert zurückging. Das nun selektiv an die Matrix gebundene Fusionsprotein konnte mit 2 Säulenvolumina Puffer B eluiert werden. Die im Puffer enthaltene Maltose verdrängt hierbei kompetitiv das Zielprotein aus seiner Bindung. Die eluierten Proteine wurden in 1,5 ml Fraktionen gesammelt und durch Bradford-Assay und SDS-Page hinsichtlich Proteinkonzentration bzw. Reinheit untersucht.

Puffer B: 20 mM Tris-HCl, pH 7.4
200 mM NaCl
1 mM EDTA
10 mM Maltose

Größenausschluss-Chromatographie von MBP-Fusionsproteinen

Die Größenausschluss-Chromatographie ermöglicht die Trennung von Proteinen anhand ihrer Molekülgröße. Hier wurde sie als präparatives Trennverfahren im Anschluss an die Affinitätschromatographie genutzt. Ziel war eine Feinreinigung (Polishing) des Zielproteins und der gleichzeitige Pufferaustausch. Zunächst wurden die Elutionsfraktionen der vorangegangenen Reinigung vereint und mit Hilfe eines Zentrifugen-Konzentrators auf 2 ml eingengt. Dieser Schritt ist notwendig, da für eine maximale Trennleistung das Probenvolumen weniger als 2 % des Säulenvolumens betragen soll. Abgeschlossen wurde die Probenvorbereitung durch Zentrifugation bei 20 000 g und 4°C, um die Säulenmatrix vor eventuell vorhandenen Schwebstoffen zu schützen. Zur Größenausschluss-Chromatographie wurde eine Superdex 75 Säule verwendet, die mit einer Flußgeschwindigkeit von 0.8 ml/min und

einem Drucklimit bei 30 kPa betrieben wurde. Alle Reinigungsschritte erfolgten bei 4°C. Als Laufpuffer diente PBS. Die Säule wurde mit 3 Säulenvolumina Puffer äquilibriert, dann die Probe aufgetragen und schließlich die aufgetrennten Proteine in 1 ml Fraktionen gesammelt. Die Beurteilung des Reinigungsergebnisses war mittels Bradford-Assay und SDS-Page möglich.

5.5.4 Proteolytische Spaltung von MBP-Fusionsproteinen

Zur Herstellung von freiem MCC α und MCC β Protein, sollten die zuvor durch Affinitätschromatographie gereinigten MBP-Fusionsproteine enzymatisch gespalten werden. Hierzu wurde Faktor Xa verwendet, eine Serinprotease, die vorzugsweise die C-terminale Peptidbindung der Aminosäure-Sequenz Ile-Glu-Gly-Arg schneidet. Im pMAL-Vektorsystem ist diese Proteasen-Schnittstelle bereits vorgesehen, Abbildung 5.2 zeigt die genaue Lokalisation.

pMAL-c2X Polylinker-Sequenz

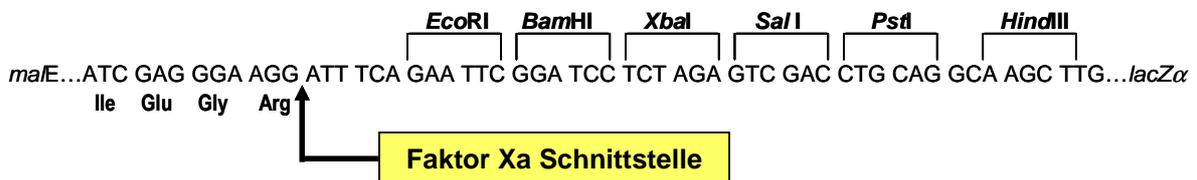


Abbildung 5.2: Lokalisation der Faktor Xa-Schnittstelle im pMAL-c2X Expressionsvektor

Faktor Xa schneidet Peptidbindungen an der Carboxyl-Seite von Arginin.

Anfangs wurde das empfohlene Verhältnis 1:100 von Protease zu Fusionsprotein eingesetzt, die Reaktion für 3 h bis 36 h inkubiert, und zusätzlich die Temperatur zwischen 4°C, Raumtemperatur und 37°C variiert. Die im Anschluss durchgeführte Analyse per SDS-Page ergab eine nur unzureichende Trennung von Zielprotein und *tag*. Deshalb wurden zahlreiche andere Bedingungen ausgetestet, die im Folgenden näher beschrieben werden.

Faktor Xa wurde in Anteilen von 2.5 %, 5 % und 7 % dem Reaktionsansatz hinzu gegeben und die anderen Parameter (Zeit, Temperatur) wie oben beschrieben verändert. Um die Konformation des Fusionsproteins zu verändern und damit die Faktor Xa Schnittstelle offen zu legen, wurden Detergenzien wie SDS (Anteil im Puffer; 0.005 % oder 0.05 %), Triton X-100 (1 %) und N-Lauroylsucrosyl (3 %) eingesetzt. Die MBP-Fusionsproteine lagen nach der Amylose-Säulen-Reinigung im Maltose-Elutionspuffer vor. Dieser wurde versuchsweise durch Schneidepuffer ersetzt. In einem weiteren Experiment wurde *E.coli* Rohextrakt in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß mit Amylose-Harz inkubiert, und somit die Fusionsproteine an die Matrix gebunden. Nach mehreren Waschsritten wurde Faktor Xa zum Ansatz pipettiert, und nach Inkubation über Nacht bei 4°C der Überstand auf freies MCC α bzw. MCC β Protein untersucht. Außerdem wurde der Versuch unternommen, das Fusionsprotein mit 6 M Harnstoff zu denaturieren und langsam in der Anwesenheit von Faktor Xa zu renaturieren.

5.6 Immunologische Methoden

5.6.1 Immunologischer Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter Proteine (Western Blot)

Zunächst wurden durch SDS-PAGE die einzelnen Proteinfractionen aufgetrennt und direkt im Anschluss auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Zu diesem Zweck wurde das X Cell II Blot Modul der Firma Invitrogen verwendet. Die Anordnung von Gel und Membran sowie Zusammensetzung des Transferpuffers entsprachen den Herstellerangaben. Der Elektrotransfer erfolgte für 60 min bei 30 V und einer Stromstärke von 90-125 mA. Nach Übertragung der Proteine wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht mit 5 % Magermilch-TBS-Puffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Vor Zugabe des primären Antikörpers wurde die geblockte Membran mit TBS gespült und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die optimale Verdünnung des primären Antikörpers und der Milchpulver-Anteil im TBS-Puffer wurden für jede Antikörperpräparation empirisch ermittelt. Nach 1 h bei RT auf einem Rollenschüttler wurden ungebundene

Antikörper durch dreimaliges Waschen mit TBS-Tween entfernt. Der mit dem Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelte sekundäre Antikörper wurde 1:7500 (v/v) in 10% Milchpulver-TBS-Puffer verdünnt, zur Nitrozellulose-Membran zugegeben, und der Ansatz für 1 h bei RT inkubiert. Wie zuvor wurde die Membran mehrmals sorgfältig gewaschen und anschließend für 5 min in AP-Detektionspuffer gelegt. Im nächsten Schritt wurde der AP-Detektionspuffer durch verdünnte CDP-Star-Lösung ersetzt und für weitere 5 min auf der Membran belassen. CDP-Star enthält ein Substrat, das durch alkalische Phosphatase dephosphoryliert wird und dessen instabiles Zwischenprodukt Licht bei 466 nm emittiert. Nach Inkubation in der Substrat-Lösung wurde überschüssiges Reagenz entfernt, die Membran mit Klarsichtfolie luftblasenfrei umschlossen und in eine Autoradiographiekassette geklebt. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und zwischen 30 sec und 60 min exponiert. Abschließend erfolgte die Entwicklung und Fixierung des Films.

Transfer-Puffer:	5 % 20x NuPAGE® Transfer Buffer 20 % (v/v) Methanol 0.1 % (v/v) Antioxidant Reagent (Invitrogen)
TBS:	20 mM Tris-HCl, pH 7.5 140 mM NaCl
TBS-Tween:	0.5 % Tween 20 in TBS
AP-Detektionspuffer:	100 mM Tris-HCl, pH 9.5 100 mM NaCl
CDP-Star™:	1 % (v/v) CDP-Star™ Reagenz in AP-Detektionspuffer

5.6.2 Herstellung von polyklonalen Peptid-Immunsereen gegen MCC α und MCC β

Zur Herstellung spezifischer Antiseren wurden chemisch synthetisierte Oligopeptide als Antigene eingesetzt, die in nachfolgender Tabelle aufgelistet sind. Die Peptid-Synthese und die Immunisierung von Kaninchen erfolgte durch die Firma INBIOS, Martinsried. Um als Immunogen wirksam zu sein, wurden die Peptide über endständige Cysteinreste an das Trägerprotein Ovalbumin gebunden. Jeweils zwei Kaninchen (IN35A/B) wurde die äquimolare Mischung der Peptide 3031/3032 injiziert. Die beiden Kaninchen IN36A/B wurden nach gleichem Vorgehen mit den Peptiden 3033/3034 immunisiert.

Zu Beginn meiner Labortätigkeit, lagen die Präimmunsereen (jeweils 2 ml), Antiseren (jeweils 50 ml) und die synthetisierten Peptide (jeweils 5 mg, lyophilisiert) bereits vor.

Bezeichnung der Firma INBIOS	Gewählter AS- Sequenzbereich	Synthetisiertes Antigen
3031	MCC α AS 178-190	VEGYHGEDQSDQC (13 Reste)
3032	MCC α AS 698-710	FYREGAQANRHTPC (13 Reste + C)
3033	MCC β AS 185-198	FPDRDHFGRTFYNNQC (14 Reste + C)
3034	MCC β AS 484-497	TITKDQRAREGKQFC (14 Reste + C)

Bezeichnung der Kaninchen	Injizierte Peptide; äquimolare Mischung
IN35 A	3031/3032
IN35 B	
IN36 A	3033/3034
IN36 B	

5.6.3 Affinitätsreinigung der Peptid-Immunsereen gegen MCC α und MCC β

Herstellung spezifischer Affinitätssäulen

Die Reinigung der Antiseren erfolgte mit dem SulfoLink[®]-Kit der Firma Pierce. Das Kit enthält eine spezielle Agarose-Matrix, an die Peptide und Proteine kovalent gekoppelt werden können. Um an die Säulenmatrix zu binden, muss der jeweilige Ligand freie, reduzierte Sulfhydrylgruppen besitzen, d.h. eventuell vorhandene Disulfidbrücken müssen vor der Kopplung gelöst werden. Hier wurden die chemisch synthetisierten Peptide 3031, 3032, 3033 und 3034 verwendet, die am Carboxyterminus einen bereits reduzierten Cystein-Rest tragen. 5 mg lyophilisiertes Peptid wurden in 3 ml Kopplungspuffer gelöst und dann nach Herstellervorschrift an das Gelmaterial gekoppelt. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch 50 mM Cystein-HCl-Kopplungspuffer abgesättigt. Abschließend wurde die Matrix mit 6 Säulenvolumina Waschpuffer gespült und in PBS (mit 0.05 % Natriumazid) bei 4°C gelagert.

SulfoLink[®]-Kopplungspuffer: 50 mM Tris-HCl,
5 mM EDTA-Na
pH 8.5 bei Raumtemperatur

SulfoLink[®]-Waschpuffer: 1 M NaCl
0.05 % NaN₃

Affinitätsreinigung der Peptid-Antikörper

Für die Antikörper-Reinigung standen vier präparierte Affinitäts-Säulen mit jeweils einem gekoppelten Peptid zur Verfügung. Es wurde keine FPLC-Anlage verwendet, sondern die Pufferlösungen wurden direkt auf die Säulenmatrix pipettiert und flossen infolge der Schwerkraft durch die Säule. Die gesamte Reinigung erfolgte bei Raumtemperatur. Zunächst wurden 2 ml Affinitätsmatrix mit 10 ml PBS äquilibriert, dann von der Säule in ein Falcon-Röhrchen überführt und dort mit 17 ml Immunsereum für 15 min auf dem Rollenmischer und weitere 45 min in Ruhe

inkubiert. Die Affinitätsmatrices mit den gebundenen Peptiden 3031 und 3032 wurden mit jeweils 17 ml Mischserum der Kaninchen IN35A und IN35B (8.5 ml Serum von IN35A + 8.5 ml Serum von IN35B) beladen. Durch dieses Vorgehen sollten Peptid-Antikörper gegen die MCC α -Untereinheit isoliert werden. Für die Reinigung von Antikörpern gegen die MCC β -Untereinheit wurden jeweils 8.5 ml Serum von Kaninchen IN36A und IN36B vereint und in getrennten Ansätzen mit den Säulenmatrices 3033 und 3034 inkubiert.

Im Anschluss wurde die Suspension aus Agarose-Kügelchen und Serum vorsichtig zurück in die Säule gefüllt und nach Sedimentation mit 20 ml PBS gewaschen. Die Elution der spezifisch gebundenen Antikörper erfolgte mit 8 ml Glycin-Puffer. Die gesammelten 1 ml Elutionsfraktionen wurden direkt mit 100 μ l 1M Tris-HCl, pH 7.5 neutralisiert und deren Proteingehalt durch photometrische Messung bei 280 nm ermittelt. Die Fraktionen mit einer hohen Proteinkonzentration wurden vereint und über Nacht bei 4°C gegen PBS dialysiert.

Glycin-Puffer: 100 mM Glycin, pH 2.5 bei Raumtemperatur

5.6.4 Generierung von polyklonalen Antikörper gegen MCC β

Für die Herstellung von polyklonalen Antikörpern wurde ein Teil der MCC β -Untereinheit (As 321-543) ausgewählt und die entsprechende cDNA in den pMAL-c2X Vektor kloniert. Das MCC β -Fragment wurde als Fusionsprotein in *E.coli* überexprimiert. Bakterienanzucht, Zellaufschluss, Affinitätsreinigung und Größenausschluss-Chromatographie erfolgten wie bei den anderen MBP-Fusionsproteinen beschrieben. Am Ende der Reinigungsprozedur lagen die MBP-MCC β _(As321-543)-Fusionsproteine in PBS vor. Nach Einstellung der Proteinkonzentration auf 1.5-2 mg/ml konnte die Präparation zur Immunisierung von Kaninchen verwendet werden. Mit dieser Aufgabe wurde die Firma Metabion, Martinsried beauftragt. Es wurden zwei Kaninchen gegen das Antigen immunisiert und nach 70 Tagen Präimmunserum (2 ml) und Immunserum (jeweils 50 ml) geliefert.

5.6.5 Affinitätsreinigung von polyklonalen Antikörpern gegen MCCβ

Affinitätsreinigung von Immuns serum mit Protein-A-Sepharose

Protein A wird von *Staphylococcus aureus* produziert und bindet spezifisch an die F_c-Region von Immunglobulinen. Durch Immobilisierung von Protein A auf einer Sepharose Matrix lässt sich diese Eigenschaft zur Aufreinigung von Antikörpern nutzen. Zur Affinitätsreinigung diente eine HiTrap Protein A HP-Säule mit einem Säulenvolumen von 1 ml. Alle Chromatographie-Schritte wurden bei RT an einer Äkta Prime FPLC-Anlage durchgeführt. Für den Säulenauftrag wurden 5 ml Immuns serum mit 5 ml Laufpuffer gemischt, 20 min bei 15 000 g zentrifugiert und der Überstand mit einem Spritzenfilter (Porengröße 0.45 µm) filtriert. Die Äquilibriumierung der Protein-A-Sepharose-Säule erfolgte mit 15 ml Laufpuffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min. Dann wurde das vorbereitete Immuns serum mit einer Geschwindigkeit von 0.5 ml/min über die Säule gepumpt, und anschließend wiederum mit 15 ml Laufpuffer gespült. Die gebundenen IgG wurden durch 5 ml Elutionspuffer von der Säule gewaschen und in 1 ml großen Fraktionen gesammelt. Um Säure empfindliche Antikörper zu schützen, wurde der pH-Wert durch Zugabe von 0.25 ml Neutralisierungspuffer auf physiologische Werte angehoben. Mit Hilfe von Bradford-Assay und SDS-Page konnte das Reinigungsergebnis überprüft werden.

Laufpuffer: 20 mM Natriumphosphat; pH 7
Elutionspuffer: 100 mM Citronensäure; pH 3
Neutralisierungspuffer: 1 M Tris-HCl; pH 9

Weitergehende Reinigung von polyklonalen Antikörpern gegen MCCβ

Da die Immunisierung mit einem MBP-Fusionsprotein durchgeführt wurde, war die Anwesenheit von MBP-Antikörpern zu erwarten. Um diese zu entfernen wurde folgendes Vorgehen gewählt:

Herstellung einer MBP-Amylose-Säule

Zunächst wurde durch gerichtete Mutagenese das pMAL-c2X_{stop} Konstrukt erstellt (Kapitel 5.1.15). Der mutagenisierte Vektor wurde in *E.coli* BL 21 transformiert und durch Induktion mit IPTG das Maltose-Bindende-Protein (MBP) exprimiert. Durch Amylose-Affinitätschromatographie gefolgt von Größenausschluss-Chromatographie konnte MBP in seiner reinen Form dargestellt werden. Dieses reine MBP wurde nun erneut an eine Amylose-Affinitätsmatrix gebunden. Dazu wurden 5 ml Amylose-Harz in eine Leersäule gefüllt, mit 40 ml Puffer A äquilibriert und anschließend 15 mg MBP (gelöst in 3 ml Puffer A) aufgetragen. Die gesamte Präparation der Säulenmatrix erfolgte bei 4°C an einer Äkta prime F PLC-Anlage mit einer Flußgeschwindigkeit von 0.4 ml/min.

Entfernung von MBP-Antikörpern mittels MBP-Amylose-Säule

Direkt nach Herstellung der MBP-Amylose-Säule wurden die zuvor mit der Protein A Sepharose gereinigten IgG aufgetragen. Etwa 10 mg IgG lagen in 2 ml neutralisiertem Elutionspuffer vor; sie wurden mit einer Geschwindigkeit von 0.4 ml/min auf die Säule gepumpt und dort für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die nicht gebundenen Antikörper wurden in 1 ml Fraktionen gesammelt. Die Überprüfung des Reinigungseffekts erfolgte im Western blot. Schließlich wurde das MBP mit den gebundenen MBP-Antikörpern von der Säule mit Maltosepuffer eluiert und mittels SDS-Page analysiert.

6 Ergebnisse

6.1 Expression der 3-MCC-Untereinheiten in *E.coli*

6.1.1 Klonierung von $MCCA^{\text{mat}}$ und $MCCB^{\text{mat}}$ in ein prokaryontes Expressionssystem

Als prokaryontes Expressionssystem wurde der pMAL-c2X Vektor ausgewählt. Mit diesem System lassen sich rekombinante Proteine exprimieren, die einen aminoterminalen MBP (Maltose-Bindendes-Protein)-Fusionspartner aufweisen. Dieses MBP dient in erster Linie der Affinitätsreinigung mittels einer Amylose-Säule. Zusätzlich wirkt sich MBP positiv auf Löslichkeit und Faltung des Zielproteins aus [36]. Die Abbildung 6.1 zeigt das Prinzip des pMAL-c2X-Expressions-Systems. Die gewünschte cDNA wird neben das für MBP codierende *mal* E-Gen in den Vektor eingefügt. Nach Transformation des Konstrukts in *E.coli* kann durch Zugabe von IPTG in das Medium die Bildung von Fusionsproteinen induziert werden. Bei Erreichen des optimalen Expressionsniveaus werden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und die löslichen MBP-Zielproteine durch Amylose-Affinitätschromatographie isoliert. Abschließend kann das Zielprotein durch die spezifische Protease Faktor Xa von seinem Fusionspartner getrennt werden.

Die Expressionskonstrukte $MCCA^{\text{mat}}$ /p-mal-c2X und $MCCB^{\text{mat}}$ /p-mal-c2X wurden wie unter Punkt 5.1.15 beschrieben erstellt. Die in den Vektor eingefügte cDNA codiert jeweils für das reife Protein, d.h. bei $MCC\alpha$ ab Aminosäure 42 und bei $MCC\beta$ ab Aminosäure 23. Die Richtigkeit der Konstrukte wurde durch Sequenzierung bestätigt.

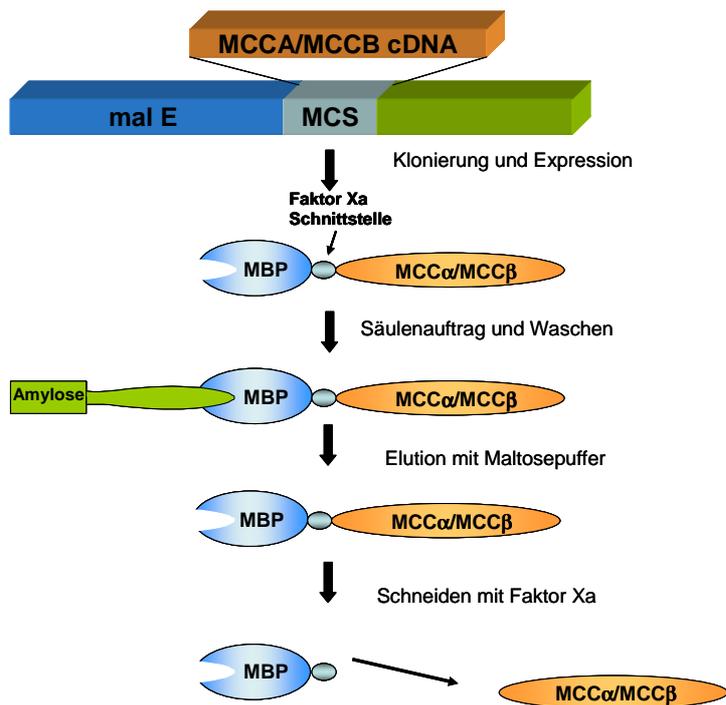


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung des pMAL-c2X-Expressions-Systems

6.1.2 Expression von MBP-MCC α - und MBP-MCC β -Fusionsproteinen in *E.coli*

Die Vektoren $MCCA^{mat}/p\text{-mal-c2X}$ und $MCCB^{mat}/p\text{-mal-c2X}$ wurden in *E.coli* BL 21 RIL Zellen transformiert. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte gemäß Punkt 5.5.1. Durch Zugabe von IPTG wurde die Expression der MBP-Fusionsproteine induziert. Nach Ultraschallbehandlung wurde der Gesamtzellextrakt zentrifugiert, wodurch unlösliche Proteinaggregate und Zelltrümmer abgetrennt werden konnten. Die löslichen Proteine im Überstand waren für eine spätere Affinitätsreinigung von Interesse. Sowohl der Gesamtzellextrakt als auch die lösliche Proteinfraction wurden abschließend mittels SDS-PAGE analysiert.

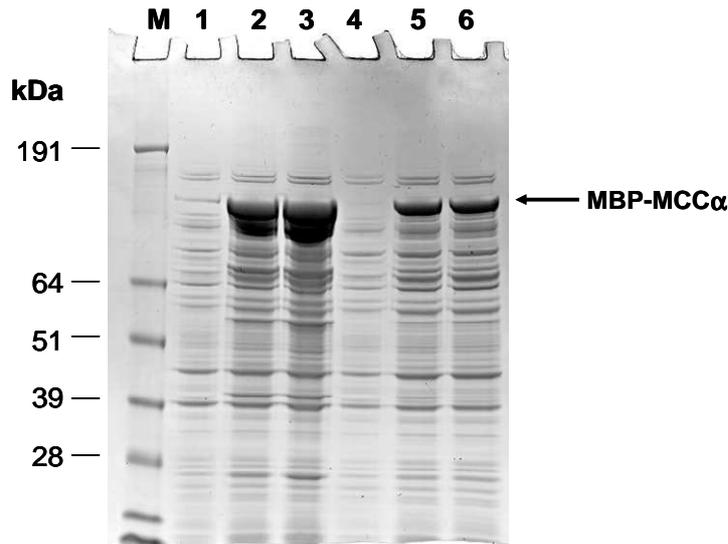
Die Abbildung 6.2 zeigt, dass vor der Induktion mit 1 mM IPTG fast keine rekombinanten Proteine gebildet werden. 1.5 h nach der Induktion ist eine deutliche Überexpression von MBP-MCC α und MBP-MCC β zu sehen. Die beiden Zielproteine werden in ähnlichem Umfang gebildet, wobei auffällt, dass zwar die unlöslichen

Proteine im Zeitraum zwischen 1.5 h und 2.5 h nach IPTG Zugabe deutlich zunehmen, die löslichen Fraktionen jedoch annähernd unverändert bleiben.

Zur Optimierung der Expressionsbedingungen wurden unterschiedliche Inkubationszeiten ausgetestet. Hierbei zeigte sich keine signifikante Steigerung der Proteinausbeute durch Verlängerung der Inkubationszeiten. Bei Kultivierung länger als 5 h wurde sogar eine leichte Degradierung der Zielproteine festgestellt. Die Reduzierung der Kulturtemperatur auf 30°C führte ebenfalls zu keiner Zunahme der löslichen Proteine, sondern senkte die Proteingesamtausbeute. Als dritter Parameter wurde die IPTG Konzentration im Bereich von 0.3 mM bis 1 mM variiert. Höhere Konzentrationen führten zu keiner weiteren Steigerung der Genexpression.

Folgende Bedingungen wurden als optimal zur Expression von MBP-MCC α und MBP-MCC β festgelegt: Temperatur 37°C; Induktion mit 0.3 mM IPTG; Inkubation nach Zugabe von IPTG für 3 h.

(A)



(B)

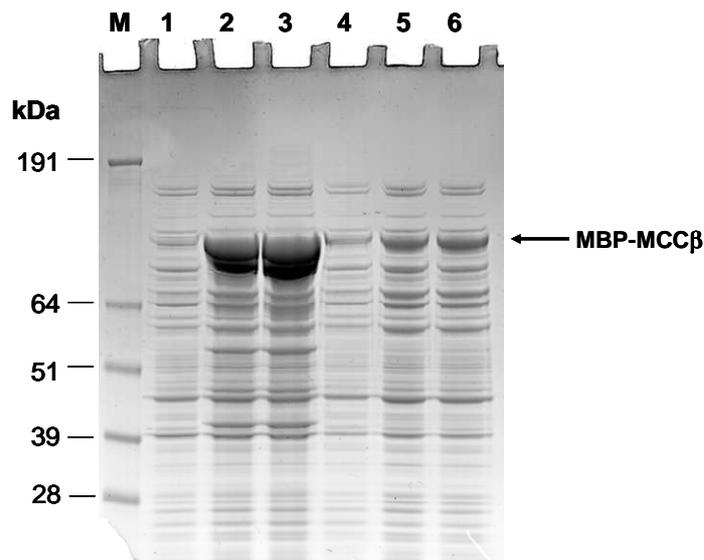


Abbildung 6.2: SDS-PAGE zeigt Expression von MBP-MCC α bzw. MBP-MCC β in *E.coli* nach Induktion mit 1 mM IPTG

(A) Spur 1: intrazelluläres Gesamtprotein vor Induktion, Spur 2: intrazelluläres Gesamtprotein 1.5 h nach Induktion, Spur 3: intrazelluläres Gesamtprotein 2.5 h nach Induktion, Spur 4: lösliche intrazelluläre Proteine vor Induktion, Spur 5: lösliche intrazelluläre Protein 1.5 h nach Induktion, Spur 6: lösliche intrazelluläre Proteine 2.5 h nach Induktion.

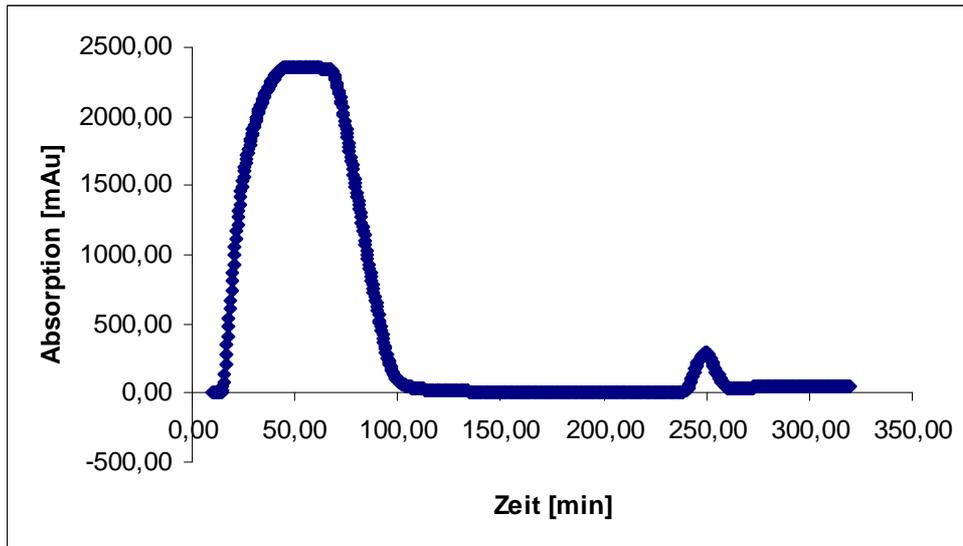
(B) Spur 1: intrazelluläres Gesamtprotein vor Induktion, Spur 2: intrazelluläres Gesamtprotein 1.5 h nach Induktion, Spur 3: intrazelluläres Gesamtprotein 2.5 h nach Induktion, Spur 4: lösliche intrazelluläre Proteine vor Induktion, Spur 5: lösliche intrazelluläre Protein 1.5 h nach Induktion, Spur 6: lösliche intrazelluläre Proteine 2.5 h nach Induktion.

6.1.3 Affinitäts-chromatographische Reinigung von MBP-MCC α und MBP-MCC β

Nach Optimierung der Expression sollten die löslichen MBP-Proteine affinitäts-chromatographisch gereinigt werden. Aus einem Liter Bakterienkultur wurde ein Zellextrakt hergestellt (Kapitel 5.5.2), welcher auf eine vorher äquilibrierte Amylose-Trennsäule aufgetragen wurde. Durch mehrfaches Waschen der Säule mit Auftragspuffer erfolgte die Entfernung unspezifisch gebundener Proteine. MBP-MCC α und MBP-MCC β konnten schließlich mit Maltose-haltigem Puffer eluiert werden. Der Reinigungsprozess wurde in einem Chromatogramm dokumentiert, wie es in Abbildung 6.3 für MBP-MCC α und MBP-MCC β dargestellt ist.

Auf der Abszisse ist die Zeit, auf der Ordinate sind die UV₂₈₀ Absorptionswerte aufgetragen. Die Absorptionskurve zeigt zunächst einen hohen Absorptionsgipfel (ca. 2500 mAu). Dieser entspricht dem Durchlauf, d.h. zelluläre Proteine, die nicht an die Matrix gebunden haben. Durch Spülen der Säule mit Puffer sinkt die Kurve wieder auf ihren Ausgangswert. Dies korreliert mit einer Abnahme der Proteinkonzentration im Durchlauf. Die eluierten MBP-Fusionsproteine erscheinen in Form des zweiten, kleineren Gipfels. Beim Vergleich der Chromatogramme beider Fusionsproteine fällt die etwas bessere Ausbeute bei MBP-MCC β auf (ca. 500 mAu im Vergleich zu 250 mAu bei MBP-MCC α). Aus einem Liter Bakterien-Kultur konnten ca. 20-30 mg MBP-Fusionsproteine isoliert werden.

(A)



(B)

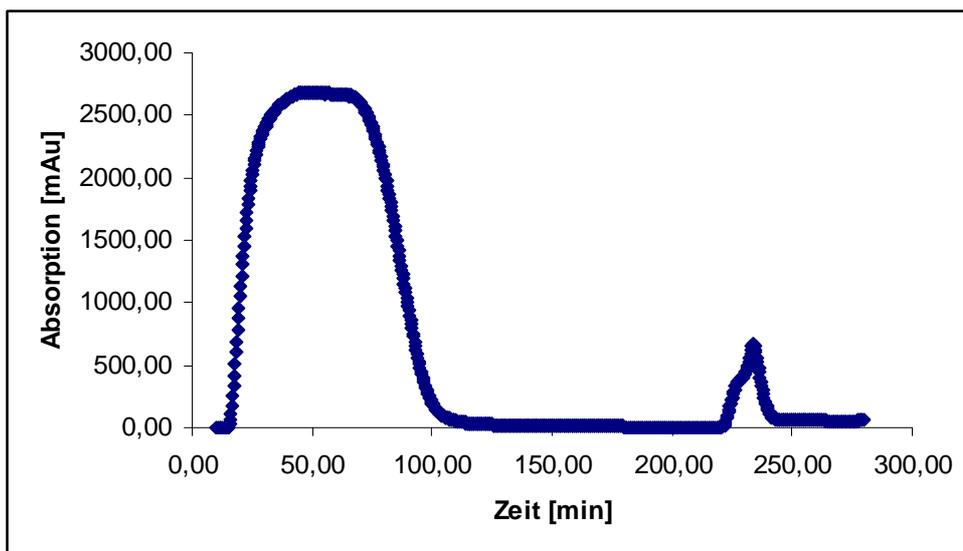


Abbildung 6.3: Reinigung von MBP-Fusionsproteinen mit Amylose-Affinitätschromatographie.

Der große Peak stellt Proteine dar, die nicht an die Säulenmatrix gebunden haben. Durch Spülen mit Säulenpuffer sinkt die Absorptionskurve wieder auf ihren Ausgangswert. Der kleinere Peak entspricht MBP-Fusionsproteinen, die zunächst an die Matrix gebunden haben und nun mit Maltosepuffer eluiert werden.

(A) Chromatogramm bei Reinigung von MBP-MCC α .

(B) Chromatogramm bei Reinigung von MBP-MCC β

Die Reinheit der Eluate wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Die Spur 4 in Abbildung 6.4 zeigt den Rohextrakt von MBP-MCC β mit einer besonders deutlichen Bande, die im Säulen-Durchlauf (Spur 5) deutlich reduziert ist. Die Proteine dieser Bande werden demnach an die Säule gebunden. In Spur 2,3,6,7 sind die gereinigten Proteinfractionen zu sehen. Die Nebenbanden sind zwar im Vergleich zum Rohextrakt wesentlich schwächer, weisen aber daraufhin, dass einige Proteine unspezifisch an die Matrix gebunden haben. Deshalb wurde in einigen Fällen noch eine Feinreinigung (Polishing) mittels Größenausschluss-Chromatographie angeschlossen.

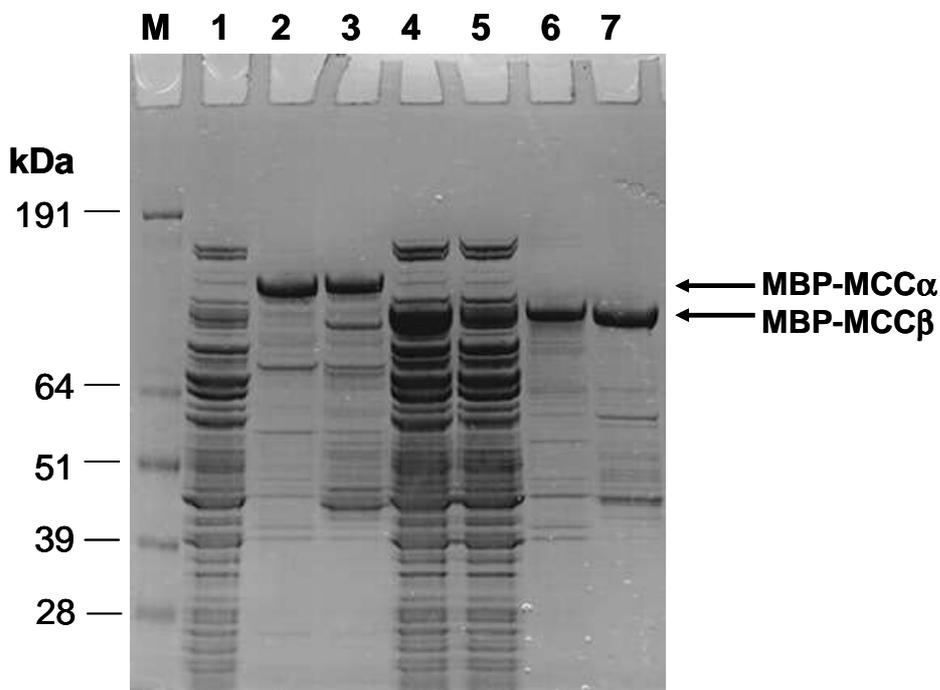


Abbildung 6.4: SDS-PAGE zur affinitäts-chromatographischen Reinigung der Fusionsproteine MBP-MCC α und MBP-MCC β

Spur 1: Durchlauf der Amylose-Säule nach Auftrag von MBP-MCC α -Rohextrakt

Spur 2: Gereinigte Fraktion von MBP-MCC α aus einer frühen Phase der Elution

Spur 3: Gereinigte Fraktion von MBP-MCC α aus einer späten Phase der Elution

Spur 4: Rohextrakt von MBP-MCC β vor dem Auftrag auf die Amylose-Säule

Spur 5: Durchlauf der Amylose-Säule nach Auftrag von MBP-MCC β -Rohextrakt

Spur 6: Gereinigte Fraktion von MBP-MCC β aus einer frühen Phase der Elution

Spur 7: Gereinigte Fraktion von MBP-MCC β aus einer späten Phase der Elution

6.1.4 Spaltung von MBP-Fusionsproteinen mit Faktor Xa

Mit einem 3-MCC-Radio-Enzymassay wurde untersucht, ob die in *E.coli* hergestellten Untereinheiten einen katalytisch aktiven Komplex bilden. Der Assay wurde von Dr. Sonja Stadler durchgeführt und basiert auf der Inkorporation von radioaktiv markiertem Bicarbonat in das Substrat 3-Methylcrotonyl-CoA. Die in äquimolaren Mengen vereinten Proteine MBP-MCC α und MBP-MCC β zeigten im Vergleich zu Leerproben keine Enzymaktivität

In einem weiteren Experiment wurde von Dr. Sonja Stadler eine *in vitro* Translation durchgeführt, bei der die Fusionsproteine MBP-MCC α und MBP-MCC β zusammen mit den Chaperoninen groES und groEL co-exprimiert wurden. Auch mit diesem Vorgehen konnte kein katalytisch aktives Enzym generiert werden.

Es wurde vermutet, dass der große MBP-tag (42.5 kDa) die Assemblierung zu einem aktiven Komplex stört. Deshalb sollten die gereinigten Untereinheiten durch die Endoprotease Faktor Xa vom MBP-Protein abgetrennt werden (Kapitel 5.5.4).

In den Experimenten zum Verdau der MBP-Fusionsproteine wurde immer eine Probe ohne Faktor Xa mitgeführt, um die Wirkung der Protease von anderen Prozessen abgrenzen zu können. Hierbei konnten MBP-MCC α und MBP-MCC β noch nach 36 h bei 25°C nahezu unverändert in der SDS-PAGE nachgewiesen werden. Zur Trennung von MBP und Zielprotein wurden zahlreiche Bedingungen ausgetestet. Faktor Xa wurde in Konzentrationen von 1 %, 2.5 %, 5 % und 7 % eingesetzt, ohne eine signifikante Optimierung des Schneide-Ergebnisses zu erzielen.

Als weiterer Parameter wurde die Inkubationstemperatur (4°C, 25°C und 37°C) variiert. Eine Temperatur von 37°C erhöhte die Enzymaktivität von Faktor Xa. Dies konnte an einer Abnahme von Fusionsprotein und Zunahme von freiem MBP im Polyacrylamid-Gel verfolgt werden. Jedoch waren keine freien MCC α - und MCC β -Proteine nachweisbar. Auch eine Verlängerung der Inkubationszeit (3 h bis 36 h) führte nicht zu einem vollständigen Verdau. Deshalb wurde vermutet, dass die Faktor Xa-Schnittstelle durch die räumliche Struktur der Fusionsproteine verdeckt werden könnte. Durch den Einsatz der Detergenzien SDS (0.005-0.05 %), Triton X-100 und N-Lauroylsucrosyl sollte die Schnittstelle offengelegt werden. Eine geringgradige Steigerung der Schneide-Effizienz war durch die Zugabe von 0.05 % SDS möglich. In einem anderen Experiment wurden die MBP-Fusionsproteine an

eine Amylose-Harz-Matrix gebunden und anschließend mit Faktor Xa inkubiert. Auch mit dieser Methode war keine zufriedenstellende Spaltung des Fusionsproteins möglich.

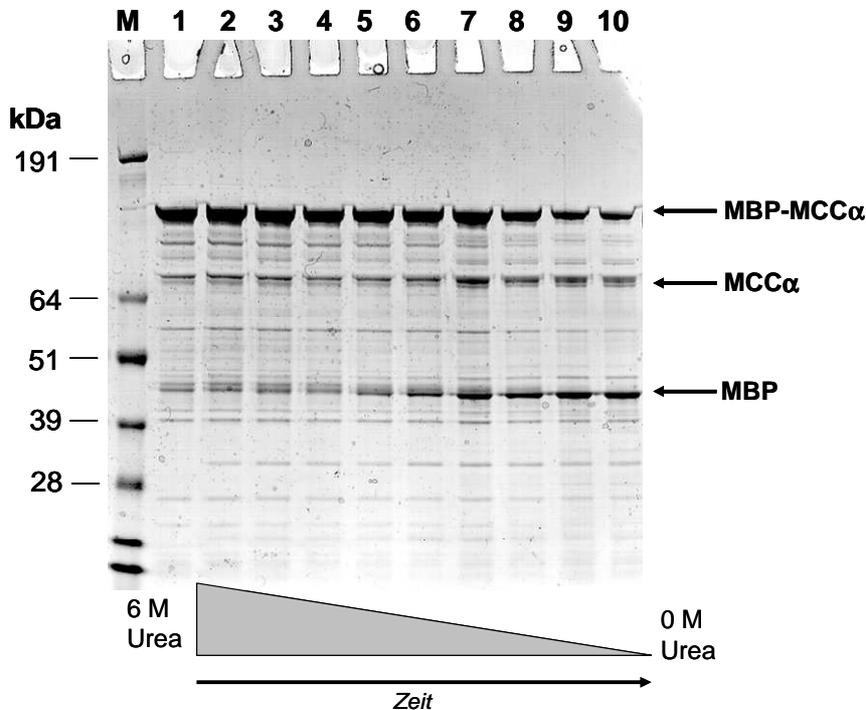


Abbildung 6.5: SDS-Page zur Spaltung von MBP-MCC α -Fusionsprotein unter denaturierenden Bedingungen.

Das MBP-MCC α -Fusionsprotein wurde durch 6 M Harnstoff vollständig denaturiert und innerhalb von 8 Stunden im Dialyseschlauch mit abnehmender Harnstoffkonzentration wieder renaturiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Proteinfaltung wurden Proben entnommen und mit 1 % Faktor Xa für 4 h bei RT verdaut.

- Spur 1: Kontrolle zur Proteinestabilität von MBP-MCC α ; initiale Denaturierung und langsame Renaturierung ohne Zugabe von Faktor Xa
- Spur 2: MBP-MCC α , nach vollständiger Denaturierung durch 6 M Harnstoff
- Spur 3: MBP-MCC α , Probenentnahme nach 1 h in 3 M Harnstoff
- Spur 4: MBP-MCC α , Probenentnahme nach 2 h in 3 M Harnstoff
- Spur 5: MBP-MCC α , Probenentnahme nach 1 h in 1.5 M Harnstoff
- Spur 6: MBP-MCC α , Probenentnahme nach 2 h in 1.5 M Harnstoff
- Spur 7: MBP-MCC α , Probenentnahme nach 1 h in 0.75 M Harnstoff
- Spur 8: MBP-MCC α , Probenentnahme nach 2 h in 0.75 M Harnstoff
- Spur 9: MBP-MCC α , Probenentnahme nach 1 h ohne Harnstoff im Dialyse-Puffer
- Spur 10: MBP-MCC α , Probenentnahme nach 2 h ohne Harnstoff im Dialyse-Puffer

Bei dem in Abbildung 6.5 dargestellten Experiment wurde MBP-MCC α mit 6 M Harnstoff denaturiert und dann wieder langsam renaturiert. Während der Renaturierungsphase wurden in festgelegten Abständen Proben entnommen und mit

Faktor Xa verdaut. In den Spuren 2 bis 10 ist eine deutliche Abschwächung der MBP-MCC α Bande zu sehen. Im Gegenzug steigt die Menge an freiem MBP und in geringerem Maße auch die Menge an freiem MCC α .

Nach dem Verdau war die Elimination der Protease aus dem Ansatz und ein zusätzlicher Chromatographie-Schritt vorgesehen, um ungeschnittenes Fusionsprotein bzw. freies MBP zu entfernen. Letztlich konnten mit keinem der oben beschriebenen Schneide-Versuche die für eine weitere Verarbeitung notwendigen Mengen an freiem MCC α und MCC β gewonnen werden. Infolgedessen musste ein prokaryontisches Expressionssystem gefunden werden, welches die Bildung der Untereinheiten ohne *tag* erlaubt.

6.1.5 Versuch der Klonierung von *MCCA*^{mat} und *MCCB*^{mat} in einen prokaryontischen Expressionsvektor ohne *tag*

Die 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase gehört zu den biotinabhängigen Carboxylasen. Die α -Untereinheit trägt ein kovalent gebundenes Biotin, welches zur Affinitätsreinigung mit einer Avidin-Matrix genutzt werden kann. Diese günstige Eigenschaft von MCC α macht einen speziellen „Reinigungs-*tag*“ überflüssig. Wenn man die Interaktion von MCC α mit MCC β berücksichtigt, können beide Untereinheiten in einem gemeinsamen Chromatographie-Schritt isoliert werden.

Mit einem von Kelson et al. entwickelten Plasmid-Doppelkonstrukt konnten die α - und β -Untereinheit der Propionyl-CoA-Carboxylase (PCC) in *E.coli* erfolgreich co-exprimiert werden [37]. PCC zeigt einen ähnlichen Molekulaufbau wie 3-MCC und trägt ebenfalls eine biotinylierte α -Untereinheit. Kelson transformierte die Bakterien zusätzlich mit pGroESL, welches für Chaperonin-Proteine codiert, und erzielte auf diese Weise PCC-Aktivitäten vergleichbar mit humanen Leberzellextrakten. Deshalb wurde in Analogie zu diesem Doppelkonstrukt ein *E.coli*-Expressions-System für 3-MCC konzipiert, um damit aktives Enzym zu synthetisieren.

Als Expressions-System diente der PinPoint-Vektor (Promega). Wie in Abbildung 6.6 dargestellt, enthält der Vektor einen Sequenzbereich, der für einen Biotin-Purification-*tag* codiert. Da aber ein solcher *tag* nicht benötigt wurde, sollte dieser Abschnitt mit Hilfe der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *HindIII* entfernt werden.

Stattdessen sollte die *MCCA* cDNA ohne Mitochondriale-Targeting-Sequenz (MTS) an dieser Stelle inseriert werden. Es war geplant, die *MCCB^{mat}* cDNA - wie in Abbildung 6.7 dargestellt - über die *Bam*HI und *Not*I Schnittstelle in den Vektor zu klonieren. Zur Expression beider Untereinheiten sollte neben dem vorhandenen tac-Promotor noch ein trc-Promotor integriert werden. Beide sind durch IPTG induzierbar.

Zuerst wurde die *MCCA* cDNA aus dem *MCCA^{mat}/p-mal-c2X*-Konstrukt durch die Restriktionsenzyme *Eco*RI und *Hind*III ausgeschnitten. Die anschließende Subklonierung in den PinPoint-Vektor erwies sich als nicht möglich, da die außerhalb der Multiple Cloning Site liegende *Eco*RI Schnittstelle nicht erkannt wurde. Dies hatte zur Folge, dass die *MCCA^{mat}* cDNA an der *Hind*III Schnittstelle korrekt in den Vektor integriert wurde, die Position der *Eco*RI Schnittstelle jedoch stets variierte. Um dieses Problem zu beheben, wurden die PinPoint-Vektoren -Xa-1; -Xa-2; -Xa-3 verwendet. Ferner wurden Restriktionsenzyme verschiedener Hersteller getestet, die Konzentrationsverhältnisse von Vektor-DNA zu Restriktionsenzym abgeändert und die übrigen Reaktionsbedingungen (Temperatur; Zeit) optimiert. Auch DNA-Präparationen hoher Reinheit steigerten nicht die Spezifität des *Eco*RI Restriktionsenzym. Deshalb wurde das Konzept der Klonierung überarbeitet. Es sollte zunächst *MCCB^{mat}* über die *Pst*I und *Hind*III Schnittstelle in den Vektor inseriert werden (Abbildung 6.6). Auch hier lag die *Pst*I Schnittstelle außerhalb der multiple cloning site und wurde wiederum nicht erkannt. Nach zahlreichen Experimenten und Probe-Sequenzierungen mit negativem Resultat wurde ein neues prokaryontes Expressionssystem gesucht.

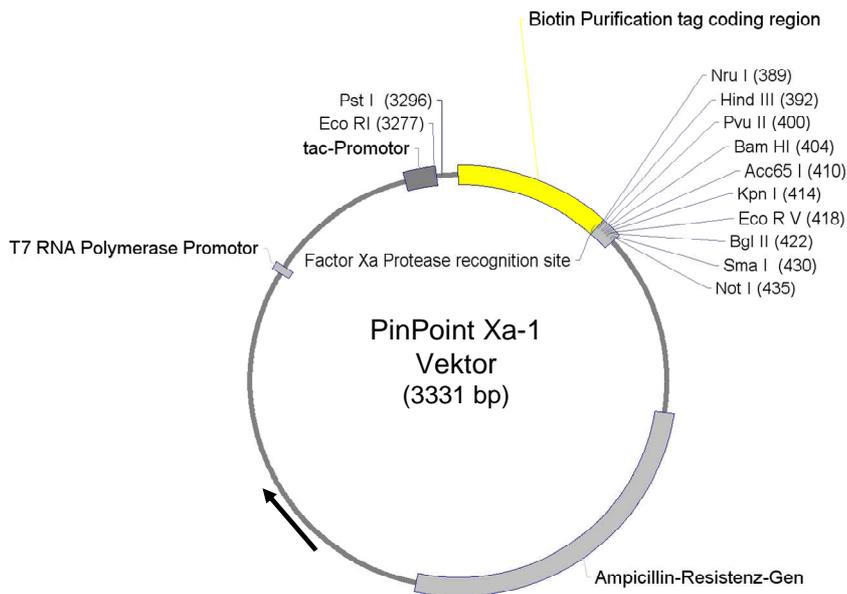


Abbildung 6.6: PinPoint™ Xa-1 Vektor-Karte.

Es sind nur wesentliche Merkmale des Vektorsystems dargestellt

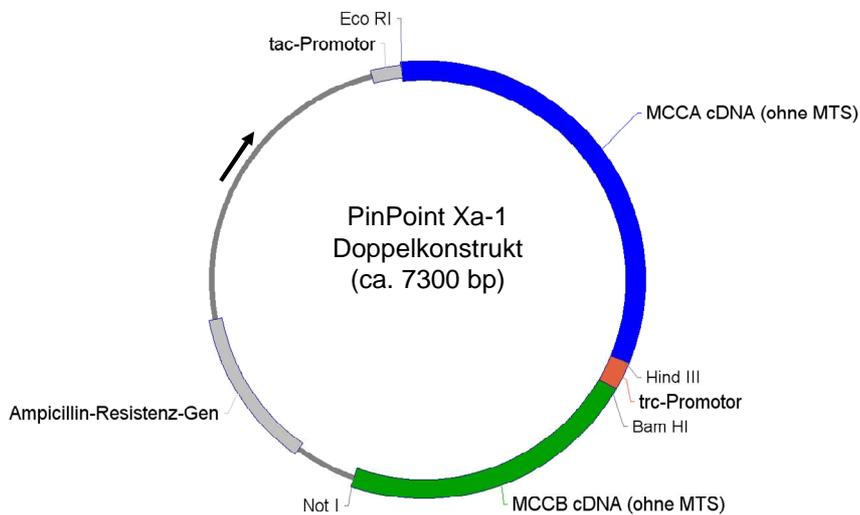


Abbildung 6.7: Ursprünglich geplantes Doppelkonstrukt zur Co-Expression von $MCC\alpha$ und $MCC\beta$ in *E.coli*

Die beiden cDNA Sequenzen von *MCCA* und *MCCB*, ohne Mitochondriale-Targeting-Sequenz (MTS), sollten in den PinPoint Xa-1 Vektor kloniert werden. Zusätzlich sollte ein *trc*-Promotor integriert werden.

6.1.6 Klonierung von $MCCA^{mat}$ in den pQE-60 Expressionsvektor

Aufgrund der Schwierigkeiten, aktive 3-MCC in einem prokaryonten Expressionssystem herzustellen, wurde die Zielsetzung der Arbeit modifiziert. Über die Interaktion von α - und β -Untereinheit der humanen 3-MCC ist bislang wenig bekannt. Diese Interaktion sollte durch einen Pull-Down-Assay näher untersucht werden. Hierfür wird ein Protein mit *tag* benötigt (z.B. MBP-MCC β), welches an eine Affinitätsmatrix (Amylose) gebunden wird. Der Interaktionspartner (MCC α) befindet sich in der mobilen Phase, die über die Matrix läuft.

Für den Assay ist die MCC α -Untereinheit ohne *tag* erforderlich. Zur Expression in *E.coli* wurde der pQE-60 Vektor ausgewählt. Das an Position 115-117 gelegene ATG-Codon wurde durch „site-directed-mutagenesis“ inaktiviert (Abbildung 6.8). Diese Funktion des Translations-Starts übernahm später ein ATG im $MCCA^{mat}$ Insert, welches mit Hilfe des Primerpaares *MCCA* 42 *Bam*HI for/ *MCCA*pMAL-c2X *Hind*III von dem Ausgangskonstrukt *MCCA*/pOTB7 amplifiziert wurde. Durch Verdau des mutierten Vektors mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III wurde die 6x-His-*tag* codierende Sequenz ausgeschnitten und anschließend durch die mit komplementären Enden versehene $MCCA^{mat}$ cDNA ersetzt.

Die Klonierung wurde erfolgreich durchgeführt und durch Sequenzierung bestätigt. Expressionsversuche in *E.coli*, Affinitätsreinigung und der Pull-Down-Assay stehen noch aus.

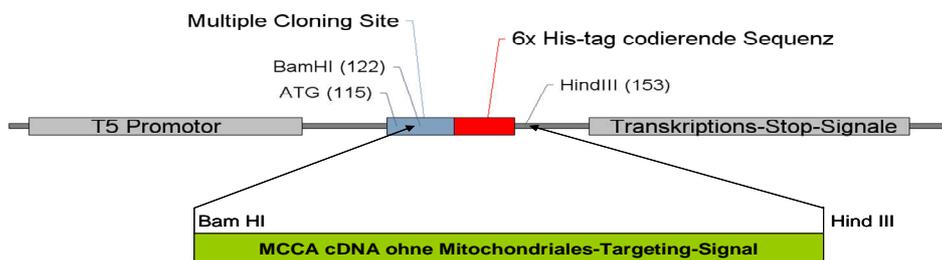


Abbildung 6.8: Strategie der Konstruktion von pQE-60 $MCCA^{mat}$

Dargestellt ist ein wichtiger Sequenzabschnitt des pQE-60 Vektors. Durch gerichtete Mutagenese wurde das Basentriplett ATG (Position 115-117) in TTG umgewandelt. Der Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III verdaut und an dieser Stelle die mit komplementären Enden ausgestattete $MCCA^{mat}$ cDNA inseriert.

6.2 Herstellung von Peptid-Antikörpern gegen MCC α und MCC β

Spezifische Antikörper sind von großer Bedeutung für die Proteinanalytik und werden z.B. im Western Blot oder für eine Immunopräzipitation benötigt. In Bezug auf 3-MCC waren Antikörper zum Nachweis der α - und β -Untereinheit erforderlich. Da die rekombinante Expression von MCC α - und MCC β -Fusionsproteinen noch nicht etabliert war, wurden zunächst polyklonale Peptidantikörper hergestellt. Peptidantikörper werden durch Immunisierung mit einem chemisch synthetisierten Oligopeptid erzeugt und sind deshalb nur gegen eine Antigene Determinante gerichtet. Um überhaupt als Antigen wirksam zu sein, ist eine Kopplung an ein Trägerprotein notwendig. Für die Konstruktion eines synthetischen Peptids wurden einzeln definierte Abschnitte der Aminosäure-Sequenz von MCC α und MCC β ausgewählt. Zu diesem Zweck wurden Alignment-Analysen mit den anderen, mitochondrial lokalisierten biotinabhängigen Carboxylasen PCC (Propionyl-CoA-Carboxylase) und PYC (Pyruvat-Carboxylase) durchgeführt, um Bereiche geringer Homologie ausfindig zu machen. Für MCC α wurden die Sequenzabschnitte As 178-190 (Peptid 3031) und As 698-710 (Peptid 3032) zur Peptidsynthese verwendet. Bei MCC β eigneten sich die Bereiche As 185-198 (Peptid 3033) und As 484-497 (Peptid 3034) aufgrund geringer Homologie zu PCC und PYC zur Herstellung von Peptidantikörpern.

Die Synthese der Peptide und die anschließende Immunisierung der Kaninchen erfolgte durch die Firma INBIOS, Martinsried. Den beiden Kaninchen IN35A und IN35B wurde eine äquimolare Mischung der Peptide 3031/3032 injiziert. Entsprechend dienten die Peptide 3033/3034 zur Immunisierung der Kaninchen IN36A und IN36B. Nach Abschluss des Immunisierungsprotokolls wurden in dem von der Firma INBIOS durchgeführten ELISA-Test hohe Antikörper-Titer festgestellt.

6.2.1 Spezifische Reinigung der Peptid-Antikörper gegen MCC α und MCC β mit dem SulfoLink[®]-Kit

Die Firma INBIOS lieferte je Kaninchen 40 ml Immuns Serum, 2 ml Präimmuns Serum und je 5 mg der chemisch synthetisierten Peptide (3031, 3032, 3033, 3034). In den ersten Western Blot Analysen wurde ungereinigtes Immuns Serum eingesetzt. Es zeigte sich jedoch ein starkes Hintergrundsignal auf dem Röntgenfilm. Um dieses zu reduzieren, sollten die gewünschten Peptidantikörper aus dem Serum isoliert werden. Die Isolierung erfolgte mit Hilfe des SulfoLink[®]-Kit, welches die Kopplung von Sulfhydryl-haltigen Peptiden an eine Agarose-Matrix erlaubt. Das Prinzip wird in Abbildung 6.9 verdeutlicht. Die endständig angebrachte Iodoacetylgruppe reagiert mit einer Peptid-gebundenen Sulfhydryl-Gruppe zu einer dauerhaften Thioether-Bindung. Alle vier zur Immunisierung verwendeten Peptide 3031, 3032, 3033 und 3034 wurden auf diese Weise an eine eigene Säulen-Matrix gebunden.

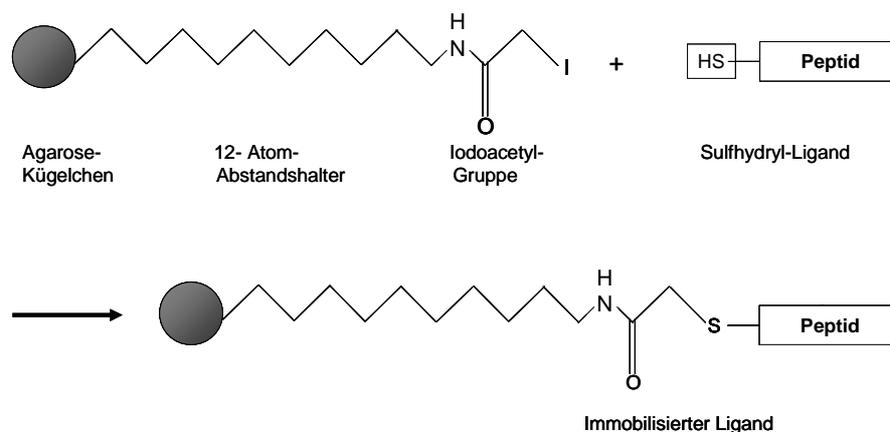


Abbildung 6.9: Prinzip der Kopplung von Peptiden an die SulfoLink[®]-Agarose Matrix

Die Matrix besteht aus Agarose-Kügelchen mit einer Iodoacetyl-Gruppe die sich am Ende eines 12-Atom-Spacer befindet. Diese Iodoacetyl-Gruppe kann mit Sulfhydryl-haltigen Verbindungen dauerhafte Thioether-Brücken bilden. Bei den hier immobilisierten Peptiden MCC α 3031, MCC α 3032, MCC β 3033 und MCC β 3034 wurde die Sulfhydryl-Gruppe durch carboxyterminale Cystein-Reste bereitgestellt.

Die Herstellung der vier Affinitätssäulen ist im Kapitel 5.6.3 ausführlich beschrieben. Zur Reinigung wurde Serum von Kaninchen IN35A und IN35B vereint und mit dem Peptid 3031- bzw. Peptid 3032-SulfoLink[®] Säulenmaterial inkubiert. Mit diesem Schritt sollten die gegen Aminosäureabschnitte von MCC α gerichteten

Peptidantikörper isoliert werden. Das gleiche Vorgehen wurde auch für das Serum von Kaninchen IN36A und IN36B gewählt. Dieses Peptidantikörper gegen die MCC β -Untereinheit enthaltende Serum wurde mit dem Peptid 3033 bzw. Peptid 3034 gekoppelten Säulenmaterial inkubiert. Nach Bindung der spezifischen Antikörper an die Matrix folgten mehrere Waschschriffe, um die übrigen Serumbestandteile zu beseitigen. Eluiert wurde durch eine pH-Änderung (Glycin-Puffer pH 2.5). Die Elutionsfraktionen wurden direkt im Anschluss neutralisiert und über Nacht dialysiert.

Der Western Blot in Abbildung 6.10 zeigt den Reinigungsverlauf der Antikörper gegen Peptid 3032. Alle Taschen eines Polyacrylamid-Gels wurden mit der gleichen Menge MBP-MCC α -Fusionsprotein beladen, die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und dann auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. In Spur 1 wurde die Membran mit Präimmunserum inkubiert. Erwartungsgemäß ist keine spezifische Bande zu sehen. Das in Spur 2 verwendete Immunserum produziert viel „unspezifischen Hintergrund“ auf dem Röntgenfilm, lässt aber den Nachweis von MBP-MCC α zu. Die Isolierung der Antikörper aus dem Immunserum bewirkt eine starke Reduktion von Hintergrundsignalen (Spur 3 und 4). Jedoch sind neben der MBP-MCC α noch zwei andere Banden der Größe 85 kDa und 65 kDa zu sehen, bei denen es sich wahrscheinlich um unvollständige Fusionsproteine von MCC α handelt. Die in Spur 4 verwendeten Antikörper wurden nach der ersten Reinigung nochmals an die 3032-SulfoLink[®]-Säule gebunden, die Säule ausgiebig gespült und die Antikörper danach wieder eluiert. Eine Verbesserung bezüglich der Reinheit der Antikörperpräparation ist im Western Blot nicht feststellbar. Als Vergleichsstandard wurde in Spur 5 MBP-MCC α mit anti-MBP-Serum der Firma New England BioLabs nachgewiesen.

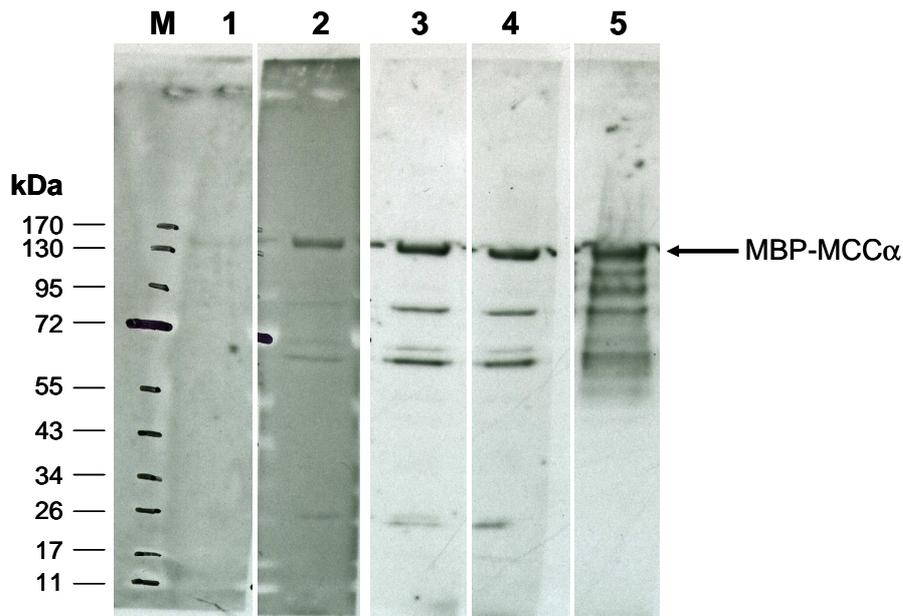


Abbildung 6.10: Nachweis von MBP-MCC α mit Peptid-Antikörpern gegen MCC α 3032 im Western Blot.

Jeweils 8 μ g Fusionsprotein wurde auf die Spuren 1-5 aufgetragen und im SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran wurde mit unterschiedlichen Antikörper-Präparationen inkubiert.

Spur 1: Nachweis mit Präimmunserum (1:2000 in 0.1 % Milchpulverlösung). Spur 2: Nachweis mit Immunsereum von Kaninchen IN35A (1:2000 in 0.1 % Milchpulverlösung). Das Serum enthält Antikörper gegen die Peptid-Fragmente MCC α 3031 und MCC α 3032. Spur 3: Nachweis mit Peptid-Antikörpern gegen MCC α 3032 nach 1-facher Reinigung mit dem SulfLink[®]-Kit (1:200 in 0.1 % Milchpulverlösung). Spur 4: Nachweis mit Peptid-Antikörpern gegen MCC α 3032 nach 2-facher Reinigung mit dem SulfLink[®]-Kit (1:200 in 0.1 % Milchpulverlösung). Spur 5: Nachweis der Fusionsproteine mit anti-MBP Antikörpern (1:10000 in 5 % Milchpulverlösung); New England BioLabs.

Der Nachweis von MBP-MCC β mit Antikörpern gegen Peptid 3034 ist in Abbildung 6.11 dargestellt. Der Western Blot wurde in Analogie zu Abbildung 6.10 durchgeführt. Auffallend ist das starke Hintergrundsignal in Spur 1, welches durch die Reinigung mit dem SulfoLink[®]-Kit fast vollständig verschwindet (Spur 2+3). Im Gegensatz zu Abbildung 6.10 ist hier ein deutlicher Unterschied zwischen einfacher und zweifacher Reinigung des Antiserums erkennbar. In Spur 3 ist nur noch eine kräftige Bande zu sehen, die sich dem MBP-MCC β -Fusionsprotein zuordnen lässt. Dies spricht für eine erfolgreiche Steigerung der Reinheit und Spezifität der Antikörper durch Affinitätsreinigung. In Spur 4 zeigt das kommerziell erworbene anti-MBP-Serum vermehrt unspezifische Signale, jedoch kann eine besonders starke Bande mit einer molekularen Masse von ca. 100 kDa ausgemacht werden, die MBP-MCC β entspricht.

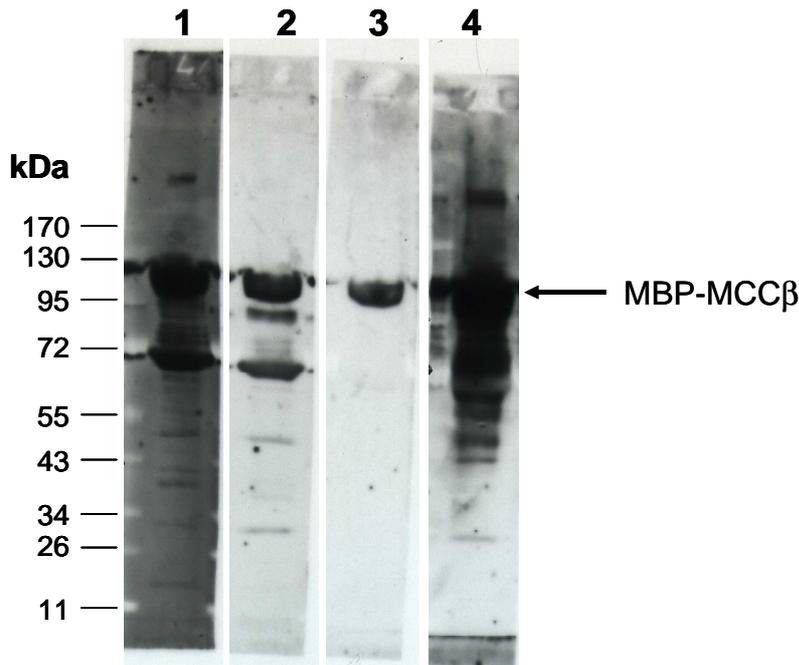


Abbildung 6.11: Nachweis von MBP-MCC β Fusionsproteinen mit Peptidantikörper gegen MCC β 3034 im Western Blot.

Jeweils 7 μ g Fusionsprotein wurde auf die Spuren 1-4 aufgetragen und nach Auftrennung im SDS-PAGE auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Der Nachweis erfolgte mit verschiedenen Antikörper-Präparationen. Spur 1: Nachweis mit Immuns serum von Kaninchen IN36A (1:2000 in 0.1 % Milchpulverlösung). Das Serum enthält Antikörper gegen die Peptid-Fragmente MCC β 3033 und MCC β 3034. Spur 2: Nachweis mit Peptid-Antikörpern gegen MCC β 3034 nach 1-facher Reinigung mit dem SulfoLink[®]-Kit (1:200 in 0.1 % Milchpulverlösung), Spur 3: Nachweis mit Peptid-Antikörpern gegen MCC β 3034 nach 2-facher Reinigung mit dem SulfoLink[®]-Kit (1:200 in 0.1 % Milchpulverlösung), Spur 4: Nachweis der Fusionsproteine mit anti-MBP Antikörpern (1:10000 in 5 % Milchpulverlösung); New England BioLabs.

Die gegen Peptid 3031 gerichteten Antikörper lieferten im Western Blot nur ein schwaches Signal. Die aus dem Antiserum von Kaninchen IN36A und IN36B mittels immobilisierten Peptid 3033 gereinigten Antikörper zeigten ein ähnliches Signal wie die Antikörper gegen Peptid 3034.

Neben dem Nachweis der in *E.coli* überexprimierten 3-MCC-Untereinheiten wurde auch die Detektion von MCC α und MCC β in humanen Fibroblasten angestrebt. Hierfür wurden Fibroblasten durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und die Lysate im Western Blot analysiert. Mit keinem der vorhandenen Peptidantikörper war ein zuverlässiger Nachweis möglich. Auch eine Mitochondrienanreicherung, wie sie in Kapitel 5.3.6 beschrieben ist, führte nicht zu einem deutlichen Detektionssignal im Western Blot.

6.3 Generierung von polyklonalen Antikörpern gegen Proteinanteile von MCC α und MCC β

Zum Nachweis von Protein-Interaktionen zwischen der 3-MCC α - und β -Untereinheit und möglicherweise weiteren Bindungspartnern sollte eine Immunopräzipitation durchgeführt werden. Die bereits vorhandenen Peptidantikörper sind aufgrund ihrer monovalenten Bindung an Antigene nur eingeschränkt zur Präzipitation geeignet. Deshalb sollten polyklonale Antikörper gegen MCC α und MCC β generiert werden. Außerdem wurde der Nachweis der Enzymuntereinheiten in Wildtyp- und Patienten-Fibroblasten angestrebt, um die Auswirkungen von Mutationen auf die Proteinstabilität semiquantitativ im Western Blot zu erfassen. Dies war mit den Peptidantikörpern bislang nicht möglich.

Für die Generierung von polyklonalen Antikörpern wurden Aminosäure-Sequenz-Bereiche mit geringer Homologie zu den Paralogen PCC und PYC ausgewählt. Zusätzlich sollten die Bereiche keine funktionell konservierten Domänen enthalten. Die entsprechende cDNA wurde in *E.coli* Expressionsvektoren kloniert und als Fusionsprotein überexprimiert. Die Reinigung der Fusionsproteine erfolgte durch Affinitäts- und anschließende Größenausschluss-Chromatographie. Zur Immunisierung von Kaninchen dienten die in PBS vorliegenden Fusionsproteine hoher Reinheit, die eine Antikörperbildung sowohl gegen MCC α bzw. MCC β als auch gegen den *tag* induzieren sollten.

6.3.1 Klonierung, Expression und Reinigung von MCC α _(As 402-643)

Nach Vergleich der Aminosäure-Sequenz von MCC α mit den anderen mitochondrial lokalisierten biotin-abhängigen Carboxylasen PCC und PYC wurde der Abschnitt As 402-643 für die Generierung von Antikörpern ausgewählt. Abbildung 6.12 zeigt die zugehörige Alignment-Analyse.

MCCA_h	361	R	A	A	G	E	K	I	P	L	S	Q	E	E	T	L	Q	G	H	A	F	E	A	R	T	Y	A	E	D	P	S	N	N	F	M	P	V	A	G	P	L	V	H	L	S	T	P	R	A	D	P	S	T	R	L	E	T	G	V		
PYC_H	361	G	L	R	Q	E	N	I	R	I	N	G	C	A	I	Q	C	R	V	T	T	E	D	P	A	R	S	E	Q	P	D	T	G	R	I	E	V	F	R	S	C	E	G	M	G	I	R	L	D	N	A	S	A	F	Q	G	A	V	L	S	P
PCCA_H	361	Q	A	D	I	R	I	N	G	W	A	V	E	C	R	V	Y	A	E	D	P	Y	K	S	F	G	L	P	S	I	G	R	L	S	O	Y	Q	E	P	L	H	L	P	G	V	R	V	D	S	G	I	Q	P	G	S	D	L	S	I	Y	
MCCA_h	421	R	Q	G	D	E	V	S	V	H	Y	D	P	M	I	A	K	L	V	V	W	A	A	D	R	Q	A	A	L	T	K	L	R	Y	S	L	R	Q	Y	N	I	V	G	L	P	T	N	I	D	L	L	N	L	S	G	H	P	E	F	E	
PYC_H	421	H	Y	D	S	L	L	V	K	V	I	A	H	G	K	D	H	P	T	A	A	T	K	M	S	R	A	L	A	E	F	R	V	R	G	V	K	T	N	I	A	F	L	Q	N	V	L	N	Q	O	F	L	A	G	V	D	T	Q	F		
PCCA_H	421	D	P	M	I	S	K	L	I	T	Y	G	S	D	R	T	E	A	L	K	R	M	A	D	A	L	D	N	Y	V	I	R	G	V	T	H	N	I	A	L	L	R	E	V	I	L	N	S	R	F	V	K	G	D	I	S	T	K	F	L	S
MCCA_h	481	A	G	N	V	H	T	D	F	I	P	Q	H	K	Q	L	L	S	R	K	A	A	K	E	S	L	C	Q	A	A	L	G	L	L	K	E	K	A	M	T	D	T	F	T	L	Q	A	H	D	Q	F	S	P	F	S	S					
PYC_H	481	I	D	E	N	P	E	L	F	Q	L	R	P	A	Q	N	R	A	Q	K	L	L	H	Y	L	G	H	V	M	V	N	G	P	T	T	P	I	P	V	K	A	S	P	S	P	T	D	P	V	V	P	A	V	P	I	G	P	P	A	G	
PCCA_H	481	D	V	Y	P	D	G	F	K	G	H	M	L	T	K	S	E	K	N	Q	L	L	A	I	A	S	S	I	F	V	A	F	Q	L	R	A	Q	H	F	Q	E	N	S	R	M	P	V	I	K	P	D	I	A	N	W	E	L	S	V	K	L
MCCA_h	541	S	G	R	I	N	I	S	Y	T	R	N	M	T	L	K	D	G	K	N	N	V	A	T	A	V	T	Y	N	H	D	G	S	S	M	Q	T	E	D	K	T	F	Q	V	L	G	N	I	Y	S	E	G	D	C	T	Y	L	K			
PYC_H	541	F	R	D	L	L	R	E	C	P	E	G	F	A	R	A	V	R	N	H	P	G	L	L	M	D	T	T	F	R	D	A	H	Q	S	L	L	A	T	R	V	R	T	H	D	L	K	K	I	A	P	Y	V	A	H	N	F	S	K		
PCCA_H	541	H	D	K	V	H	T	V	V	A	S	N	G	S	V	F	S	V	E	V	D	C	S	K	L	N	V	T	S	T	W	N	L	A	S	P	L	L	S	V	S	V	D	G	T	Q	R	T	V	Q	L	S	R	E	A	G	N	M			
MCCA_h	601	S	V	N	G	V	A	S	K	A	K	L	I	L	L	E	N	T	I	Y	L	F	S	K	E	G	S	T	E	D	I	P	V	P	K	Y	L	S	S	V	S	S	Q	E	T	Q	G	C	P	L	A	D	M	T	G	T	I	K	V		
PYC_H	601	L	F	S	M	E	N	W	G	G	A	T	F	D	V	A	M	R	F	L	Y	E	C	P	R	R	I	Q	E	L	R	E	L	I	P	N	I	P	F	Q	M	L	L	R	G	A	N	A	V	G	Y	T	N	Y	P	D	N	V	V	F	
PCCA_H	601	S	I	Q	F	L	G	T	V	Y	K	V	N	L	L	T	R	L	A	A	E	L	N	K	L	M	L	E	K	V	T	E	D	T	S	S	V	L	R	S	P	M	P	G	V	V	V	A	V	S	V	K	P	G	D	A	V	A	E	G	Q

Abbildung 6.12: Alignment der MCC α -Untereinheit von 3-MCC, PYC und PCC

Ausgewählt wurde der Aminosäure-Sequenzbereich 402-643 (rot umrandeter Bereich), der nur geringe Homologie zu seinen Paralogen PCC und PYC aufweist und keine funktionell konservierten Domänen besitzt. Verwandte Aminosäuren sind grau, exakte Übereinstimmungen sind schwarz hinterlegt.

Die diesen Proteinbereich codierende cDNA wurde in den pGEX-3X Vektor kloniert, da eine Klonierung in den pMAL-c2X-Vektor scheiterte. Der pGEX-3X-Vektor erzeugt Fusionsproteine mit aminoterminalen GST-tag, welches zur Affinitätsreinigung mittels Glutathion-Sepharose dient. Das durch Sequenzierung auf seine Richtigkeit überprüfte Konstrukt wurde in *E.coli* BL 21 transformiert. Die Expression von GST-MCC α (As402-643) wurde durch IPTG induziert und führte zur Bildung von *inclusion bodies*, d.h. inaktiven Proteinaggregaten. Diese *inclusion bodies* konnten nach Zellaufschluss durch differentielle Zentrifugation isoliert werden. Die Zugabe einer 8 M Harnstofflösung bewirkte eine vollständige Solubilisierung der aggregierten Proteine. Es folgte die schrittweise Renaturierung der Proteine. Dieses Protokoll lieferte GST-MCC α (As402-643) Proteine mit hoher Reinheit, die allerdings extrem verdünnt vorlagen (in ca.150 ml Puffer) und weitere Konzentrierungsschritte erforderten. Die dabei auftretenden Verluste waren so hoch, dass selbst aus einigen Litern Bakterienkultur nicht genügend Fusionsproteine zur Immunisierung eines Kaninchens gewonnen werden konnten.

Deshalb wurde wiederum das prokaryonte Expressionssystem gewechselt. Der ausgewählte Aminosäure-Sequenz-Bereich (As 402-643) wurde beibehalten und die entsprechende cDNA mit dem Primerpaar *MCCA-AK-BamHI for / MCCA-AK-HindIII rev* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den pQE-30 Vektor kloniert. Dieser Vektor ermöglicht die rekombinante Expression von Fusionsproteinen mit einem aminoterminalen His-*tag*. Dieser *tag* besteht aus lediglich sechs Histidin-Resten und ist aufgrund seiner geringen Größe kaum immunogen. Das sequenzierte Konstrukt wurde in M15 *E.coli* transformiert und die Zielproteine nach Zugabe von IPTG gebildet. Auch hier zeigte die Auswertung von Expressionsversuchen mittels SDS-PAGE, dass der überwiegende Teil der Fusionsproteine als *inclusion bodies* vorlag. Außerdem war der Anteil von His-MCC α am Gesamtprotein sowohl in der löslichen als auch in der unlöslichen Fraktion niedrig. Zur Reinigung unter nativen Bedingungen wurden die Bakterien einer 1L-Kultur mit Ultraschall aufgeschlossen, die unlöslichen Bestandteile durch hochtourige Zentrifugation abgetrennt und der Überstand auf eine Säule mit immobilisierten Nickel-Ionen geladen. Unspezifische Bindung von bakteriellen Proteinen an das Säulenmaterial und der geringe Anteil von löslichem His-MCC $\alpha_{(As402-643)}$ im Ausgangsmaterial reduzierten die Reinigungseffizienz. Auch mit diesem Ansatz konnten keine zur Immunisierung ausreichenden Mengen an Antigen gewonnen werden. Aus diesem Grund wurde der Versuch unter denaturierenden Bedingungen wiederholt. Hierzu wurden die Bakterien einer 1L-Kultur nach der Zellernte in 8 M Harnstoffpuffer lysiert. Die aggregierten Proteine gingen unter diesen Bedingungen in Lösung. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand wieder mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie gereinigt. Auch hier konnte His-MCC $\alpha_{(As402-643)}$ nur unvollständig von anderen zellulären Proteinen abgetrennt werden und die Ausbeute wurde nur unwesentlich gesteigert. Bei der sich anschließenden langsamen Renaturierung fielen die Proteine zudem im Dialyseschlauch aus.

Derzeit wird sowohl an einer Optimierung der Präparation von GST-MCC $\alpha_{(As402-643)}$ als auch von His-MCC $\alpha_{(As402-643)}$ gearbeitet.

6.3.2 Generierung von polyklonalen Antikörpern gegen MCC β (As 321-543)

Auch für die 3-MCC β -Untereinheit wurden Alignment-Analysen mit den Paralogen PCC und PYC durchgeführt. Der Aminosäure-Sequenz-Bereich 321-543 zeigte geringe Homologie und enthielt keine funktionell konservierten Domänen (Alignment-Analyse im Anhang). Die diesen Abschnitt codierende cDNA wurde in den pMAL-c2X-Vektor kloniert, das Konstrukt in BL 21 *E.coli* transformiert und MBP-MCC β _(As321-543) exprimiert. Expression, Zellaufschluss und Reinigung über eine Amylose-Harz-Matrix erfolgte in gleicher Weise wie bei den bereits beschriebenen MBP-Fusionsproteinen. Zusätzlich wurde die Größenausschluss-Chromatographie zur Feinreinigung und zum Umpuffern in PBS eingesetzt. Abbildung 6.13 dokumentiert den Reinigungsverlauf von MBP-MCC β _(As321-543). Spur 3 zeigt, dass die zuerst von der Amylose-Harz-Matrix eluierten Proteine bereits in hoher Reinheit vorliegen. In einer späteren Elutionsphase (Spur 4) werden allerdings auch unspezifisch gebundene Proteine von der Säule gewaschen. Die unterschiedlichen Elutionsfraktionen wurden vereint, aufkonzentriert und dann durch Größenausschluss-Chromatographie weiter aufgetrennt. Die prominente Gel-Bande in Spur 5,6,7 entspricht MBP-MCC β _(As321-543) und als sehr schwache Bande ist das freie MBP zu sehen. Dieses wurde wahrscheinlich während des Reinigungsprozesses freigesetzt. In Spur 8 und 9 sind die mittels Größenausschluss-Chromatographie abgetrennten Verunreinigungen auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen, die aufgrund ihrer geringeren Molekülgröße länger für die Säulenpassage benötigt haben.

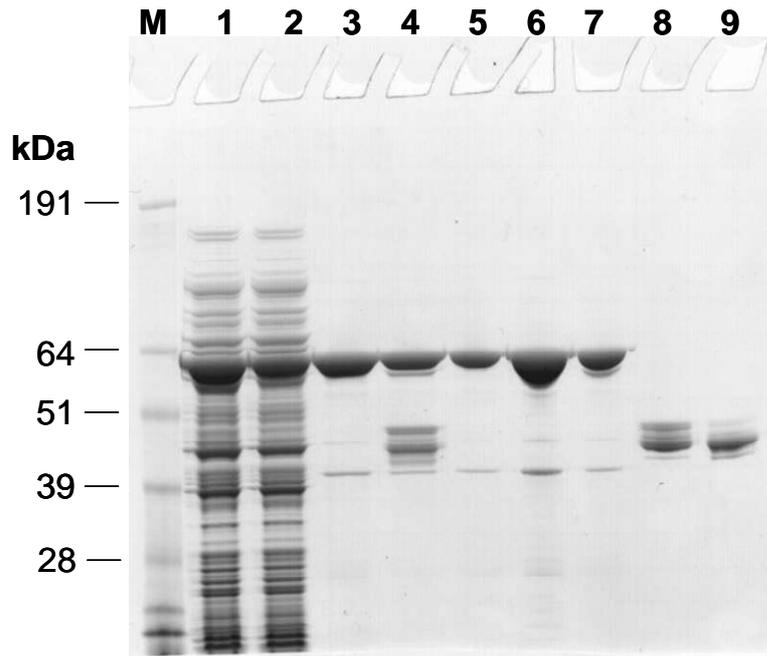


Abbildung 6.13: SDS-Page zur Überprüfung der mehrstufigen Reinigung von MBP-MCC β (As 321-543).

Spur 1: *E.coli* Rohextrakt, der das überexprimierte MBP-MCC β (As321-543) enthält, Spur 2: Durchlauf der Amylosesäule. Spur 3+4: Elutionsfraktionen der Amylosesäule; frühe und mittlere Elutionsphase. Spur 5+6+7: MBP-MCC β (As321-543) nach Größenausschluss-Chromatographie. Spur 8+9: Proteine, die von MBP-MCC β (As321-543) durch Größenausschluss-Chromatographie abgetrennt werden konnten.

Die gereinigten Fraktionen wurden auf 1.5 mg MBP-Fusionsprotein pro ml PBS eingestellt und an die Firma Metabion, Martinsried, geschickt. Mit der Antigen-Präparation wurden zwei Kaninchen immunisiert und nach 70 Tagen jeweils 2 ml Präimmenserum und 50 ml Immenserum generiert.

6.3.3 Reinigung der Immenserum gegen MCC β (As321-543)

Die Kaninchen wurden mit einem Fusionsprotein immunisiert, welches sich aus einem MBP-tag mit einem Molekulargewicht von 42.5 kDa und einem MCC β -Fragment von 18 kDa zusammensetzt. Deshalb waren sowohl Antikörper gegen das MBP als auch gegen MCC β (As321-543) im Antiserum zu erwarten. Diese Konstellation ergibt mehrere Reinigungsoptionen, die in Abbildung 6.14 schematisch aufgeführt sind. Die einfachste Möglichkeit war, keine Reinigung des Immenserums

durchzuführen. Da das Maltose-Bindende-Protein in eukaryontischen Zellen nicht vorkommt, spielen die gegen MBP-gerichteten Antikörper bei der Immunopräzipitation und bei Western-Blot-Analysen von Fibroblasten-Extrakten keine Rolle. Allerdings können andere im Serum enthaltene Immunglobuline und Bestandteile zu einem unspezifischen Hintergrundsignal führen. In Western-Blot-Experimenten mit ungereinigtem Immuns serum (Abbildung 6.15; Spur 2) bestätigte sich dies jedoch nicht.

Bei einem anderen Reinigungsverfahren wurde in einem ersten Schritt die gesamte IgG-Fraktion aus dem Serum isoliert. Hierzu diente eine Protein A-Sepharose-Säule, deren immobilisierter Ligand Protein A spezifisch an die F_c -Region von Immunglobulinen bindet. Die gebundenen Antikörper konnten mit Hilfe eines pH-Shift wieder von der Säule eluiert werden. In einem zweiten Schritt wurden Anti-MBP-Antikörper entfernt, indem die gereinigten Antikörper mit immobilisierten MBP inkubiert wurden. Der Durchlauf sollte frei von Anti-MBP-Antikörpern sein. Zur Herstellung der MBP-Affinitätssäule wurde zunächst reines MBP in Bakterien exprimiert, gereinigt und dann reversibel an Amylose-Harz gebunden. Die genaue Durchführung ist unter Punkt 5.6.5 beschrieben.

Die dritte Möglichkeit zur Aufreinigung des Immuns erums liefert eine Präparation, die theoretisch nur noch gegen $MCC\beta$ gerichtete Antikörper enthält. Das homologe Antigen, also $MBP-MCC\beta_{(As321-543)}$, wurde in hoher Reinheit hergestellt und sollte anschließend mit Hilfe des SulfoLink[®]-Kit immobilisiert werden. Dazu wurden die Sulfhydryl-Gruppen der MBP-Fusionsproteine nach Herstellerangaben mit 2-Mercaptoethylamin reduziert und im Anschluss an das SulfoLink[®]-Gelmaterial gebunden. Durch den geringen Gehalt an Sulfhydryl-Gruppen war die Binde-Effizienz jedoch unzureichend. Außerdem wurde das empfindliche $MBP-MCC\beta_{(As321-543)}$ wahrscheinlich schon bei der Vorbereitung der Säule degradiert. Somit konnte auf diesem Weg keine spezifische Reinigung des Antiserums erfolgen. Eine andere Option ist die kovalente Kopplung des Antigens über NH_2 -Gruppen an Agarose-Kügelchen. Da die NH_2 -Gruppe am N-Terminus eines jeden Polypeptids und an der Seitenkette von Lysin auftreten, ist mit einer erhöhten Binde-Effizienz zu rechnen. Die Umsetzung dieser Immobilisierungs-Technik steht noch aus. Dementsprechend kann der zweite Reinigungsschritt zur Abtrennung von Anti-MBP-Antikörpern derzeit nicht durchgeführt werden.

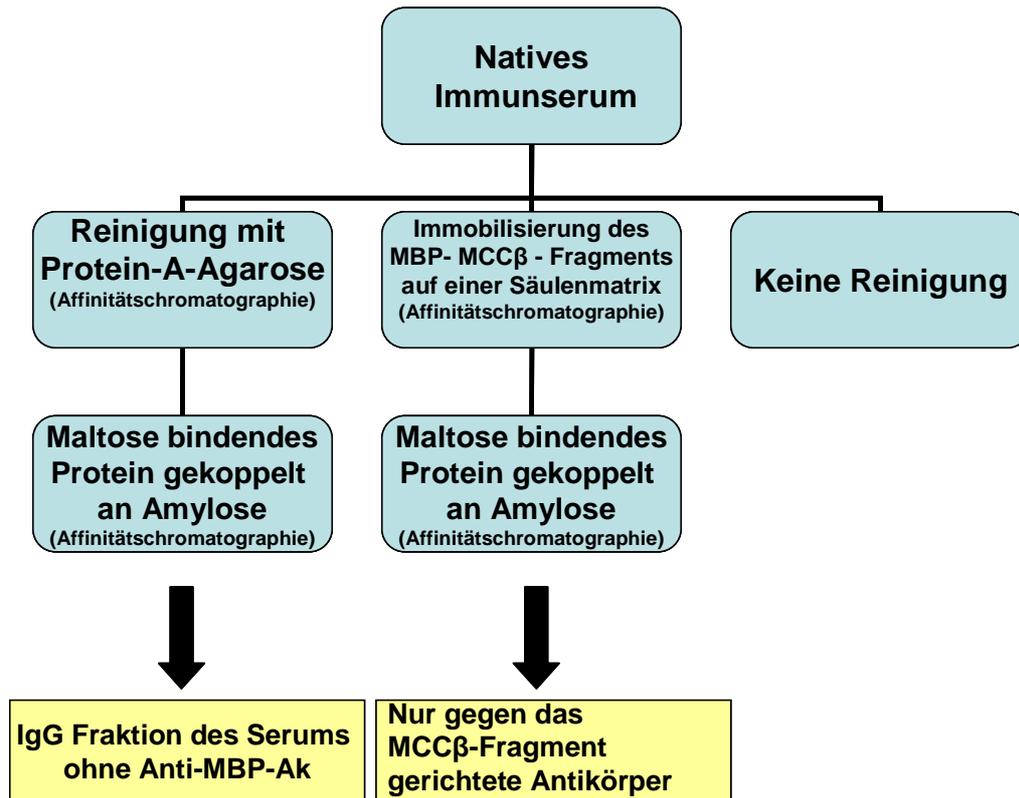


Abbildung 6.14: Mögliche Optionen zur Isolierung von polyklonalen Antikörpern gegen MCC β aus Immunerum.

6.3.4 Austestung der polyklonalen Antikörper gegen MCC β _(As321-543) im Western Blot

Für die Anwendung als Primär-Antikörper im Western Blot standen ungereinigtes Immunerum, die mittels Protein-A-Sepharose gereinigten Immunglobuline und zusätzlich über MBP-Amylose-Harz gereinigte Fraktionen zur Verfügung. Diese Präparationen lagen von Kaninchen Nr.1 und Kaninchen Nr.2 vor. Die polyklonalen Antikörper gegen MCC β _(As321-543) sollten zunächst an rekombinantem MBP-MCC β getestet werden. Der Vergleich von Spur 1 und Spur 2 in Abbildung 6.15 zeigt, dass die Immunisierung erfolgreich war. Bei der Inkubation der Nitrozellulose-Membran mit Präimmunerum (Spur1) ist keine Bande zusehen, im Gegensatz zu Spur 2, wo durch das Immunerum neben MBP-MCC β noch einige andere Proteine detektiert werden. Spur 2, 3 und 4 zeigen ein ähnliches Bandenmuster. Die schwächere Bande bei 45 kDa entspricht am ehesten dem MBP. Bei der kräftigen Bande mit einem

Molekulargewicht von ca. 60 kDa handelt es sich wahrscheinlich um MCC β ohne MBP-tag. In Spur 4 findet man deutlich weniger Nebenbanden als in Spur 2 und 3. Dies kann mit der Entfernung von Anti-MBP-Antikörpern aus der Präparation erklärt werden, da auch das Detektionssignal für MBP abgeschwächt ist. In Spur 5 wurde das zur Immunisierung verwendete MBP-MCC $\beta_{(As321-543)}$ im Western Blot nachgewiesen.

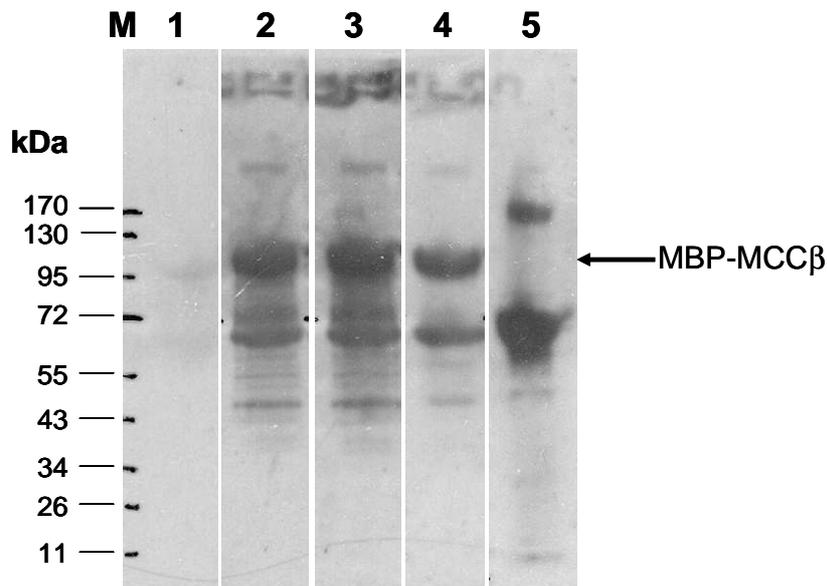


Abbildung 6.15: Nachweis von MBP-MCC β -Fusionsproteinen (Spur 1-4) mit polyklonalen Antikörpern gegen MCC $\beta_{(As\ 321-543)}$ im Western Blot

Jeweils 7 μ g Fusionsprotein wurden auf die Spuren 1-4 aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Der Nachweis erfolgte mit verschiedenen Antikörper-Präparationen von Kaninchen Nr.2. Spur 1: Inkubation mit Präimmunserum (1:1000 in 0.1 % Milchpulverlösung), Spur 2: Nachweis mit Immunserum (1:1000 in 0.1 % Milchpulverlösung) Spur 3: Nachweis mit Protein A-Affinitätschromatographie gereinigter Antikörperfraktion (1:1500 in 0.1 % Milchpulverlösung) Spur 4: Nachweis mit Protein A- und Amylose-MBP-Affinitätschromatographie gereinigten Antikörpern (1:300 in 0.1 % Milchpulverlösung), Spur 5: Hier wurde das zur Immunisierung verwendete MBP-MCC $\beta_{(As321-543)}$ auf die Nitrozellulose-Membran transferiert. Nachweis mit Protein A- und Amylose-MBP-Affinitätschromatographie gereinigten Antikörpern.

Schließlich wurden die polyklonalen Antikörper an Leberzellextrakten und Mitochondrienanreicherungen getestet. Hier konnten keine einheitlichen Ergebnisse beim Nachweis von MCC β erzielt werden. Der Leberzellextrakt wurde durch Aufschluss von humanen Hepatozyten aus der Zellkultur gewonnen, und 15 μ g Gesamtprotein zum Western Blot eingesetzt. Abbildung 6.16 zeigt ein relativ schwaches Detektionssignal bei ca. 60 kDa, welches mit dem Molekulargewicht von MCC β übereinstimmt. Hier wurde der SeeBlue[®] plus2 Marker als Molekulargewichts-Standard aufgetragen. In einem weiteren Experiment sollte die β -Untereinheit in humanem Nierengewebe nachgewiesen werden, da Nierengewebe reich an 3-MCC ist. Für die Mitochondrien-Anreicherung wurde humanes Nierengewebe (aus dem Institut für Rechtsmedizin der LMU München) homogenisiert und die Mitochondrien durch differentielle Zentrifugation angereichert. 15 μ g der mitochondrialen Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Als Primär-Antikörper dienten wie beim Leberzellextrakt mittels Protein-A-Sepharose gereinigte Immunglobuline. Auf dem Röntgenfilm ist eine deutliche Bande zu sehen, die wahrscheinlich MCC β entspricht. Die darüber liegende schwächere Bande kann keinem bestimmten Protein zugeordnet werden. Auch von HF1 Fibroblasten wurde eine Mitochondrien-Anreicherung durchgeführt und mittels Western Blot analysiert. Hier zeigt sich eine deutliche Bande bei circa 85 kDa, die bezüglich des Molekulargewichts nicht mit MCC β vereinbar ist. Diese Bande konnte mit Immuns serum von Kaninchen Nr.1 und Nr.2 reproduzierbar nachgewiesen werden. Deshalb stellt sich die Frage, ob die Antikörper spezifisch ein anderes Protein erkennen oder ob MCC β in einer modifizierten Form vorliegt.

Zusammenfassend sind die polyklonalen Antikörper gegen MCC $\beta_{(As321-543)}$ zum Nachweis von rekombinanten MBP-MCC β geeignet. Auch in Leber- und Nierengewebe ist ein Nachweis der β -Untereinheit möglich. Die Western Blot Analyse an Fibroblasten-Zelllysaten weist ein bislang unbekanntes Protein nach. Derzeit wird untersucht, um welches Protein es sich dabei handelt.

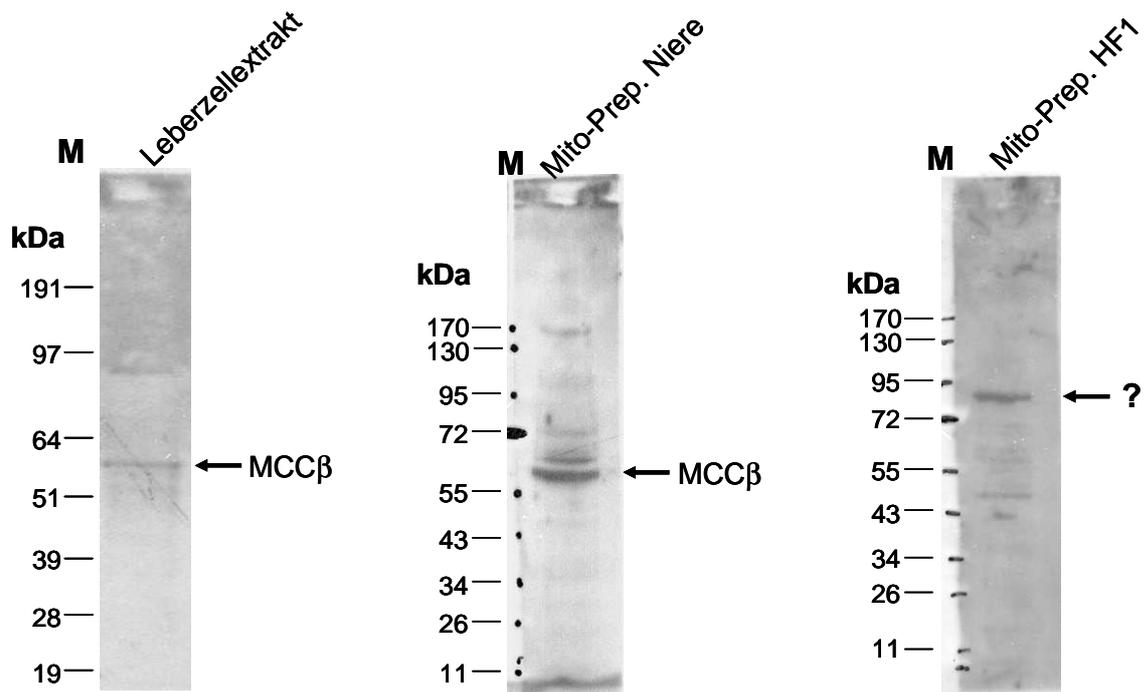


Abbildung 6.16: Nachweis von MCCβ im Western Blot mittels polyklonaler Antikörper.

Jeweils 15 µg Gesamtprotein von Leberzell-extrakt und zweier Mitochondrien-Anreicherungen wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Anschluss auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Der Nachweis erfolgte im Fall des Leberzell-extrakts und der Mitochondrien-Präparation aus humaner Niere mit gereinigten (Protein A-Säule) Antikörpern von Kaninchen Nr.1 (1:500 in 0.1 % Milchpulverlösung). Die Mitochondrien-Präparation von humanen HF1-Fibroblasten wurde mit Protein A-Affinitätschromatographie gereinigten Antikörpern von Kaninchen Nr.2 (1:500 in 0.1 % Milchpulverlösung) untersucht.

7 Diskussion

Seit der Erstbeschreibung im Jahr 1959 [14] konnte die 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase hinsichtlich vieler Aspekte charakterisiert werden. Schon früh wurde die Zugehörigkeit zur Familie der biotinabhängigen Carboxylasen [51] und die Funktion im L-Leucin-Katabolismus aufgeklärt [92]. Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass sich die 3-MCC aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten ($MCC\alpha$ und $MCC\beta$) zusammensetzt und mitochondrial lokalisiert ist [46, 47]. Seit der Erstbeschreibung eines Patienten mit konfirmiertem 3-MCC-Mangel 1982 [10], sowie bei unerwartet hoher Inzidenz betroffener Kinder nach Einführung des erweiterten Neugeborenen-Screenings ist das Enzym auch von klinischem Interesse.

Die Klonierung der humanen cDNA-Sequenzen der Gene *MCCA* und *MCCB* im Jahr 2001 [7, 18, 28], zusammen mit dem Wissen über die exakten Aminotermini der prozessierten Untereinheiten [78], bildeten die Grundlage für die rekombinante Expression in *E.coli*.

7.1 Entwicklung eines prokaryontischen Expressionssystems von $MCC\alpha$ und $MCC\beta$

Zur Untersuchung von Struktur und Funktion der 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase sollte ein prokaryontes Expressionssystem etabliert werden. Die für die reifen Untereinheiten codierenden cDNA-Sequenzen *MCCA*^{mat} und *MCCB*^{mat} wurden in den pMAL-c2X Vektor kloniert. Dieser Vektor erzeugt Fusionsproteine aus einem Zielprotein und dem aminoterminal lokalisierten Maltose-Bindenden-Protein (MBP), das in erster Linie der Affinitätsreinigung dient. Das MBP ist mit einem Molekulargewicht von 42.5 kDa ein großer Fusionspartner. Das bedeutet einen entsprechend hohen Verbrauch an Energie und zellulären Ressourcen für die Synthese eines jeden Fusionsproteins. Zudem sind die großen Moleküle für manche Applikationen wie zum Beispiel kristallographische Untersuchungen sterisch ungünstig. In vielerlei Hinsicht ist der MBP-*tag* jedoch von Vorteil. So konnte gezeigt

werden, dass MBP die Löslichkeit und Stabilität rekombinant exprimierter Proteine erhöht [15, 36] und damit die Bildung von Einschlusskörperchen (inclusion bodies) verhindert [36]. Einschlusskörperchen bestehen aus partiell gefalteten Proteinen, die als unlösliche Aggregate in der Zelle vorliegen. Mit einem von Wilkinson und Harrison entwickelten Verfahren kann die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Proteinaggregaten aus der Aminosäuresequenz berechnet werden [91]. Die Analyse ergab für MCC α eine Wahrscheinlichkeit von 68.5% für das Vorliegen von unlöslichen Proteinen. Im Falle von MCC β lag der Wert sogar bei 75.5%. Deshalb erschien die Fusion der Untereinheiten mit dem Maltose-Bindenden-Protein sinnvoll, um korrekt gefaltete und damit lösliche Proteine zu erhalten. Nach der Reinigung sollte der MBP-*tag* mit Hilfe der Protease Faktor Xa von den Untereinheiten wieder abgetrennt werden.

Für die rekombinante Expression von MCC α und MCC β wurden *E.coli* BL 21 RIL-Zellen verwendet. Diese enthalten zusätzliche Kopien bestimmter tRNA Gene, da die Produktion von heterologen Proteinen in *E.coli* durch einen Mangel an tRNA-Molekülen limitiert sein kann. Zudem ist dieser Stamm Protease-defizient [23], was einerseits zu einer Steigerung der Ausbeute an Fremdprotein führt, andererseits den natürlichen Abbau von missgefalteten und aggregierten Proteinen verhindert. In der Folge können hierdurch toxische Eiweiße in der Zelle akkumulieren und den Zellmetabolismus stören [26].

Die Bildung der rekombinanten Proteine wurde durch IPTG induziert. Die anschließende Analyse ergab, dass sowohl die α - als auch die β -Untereinheit effizient in *E.coli* überexprimiert werden können, und deren Anteil am zellulären Gesamtprotein über 50 % liegt. Dies weist daraufhin, dass MBP-MCC α und MBP-MCC β keine toxischen Effekte auf den Stoffwechsel der Zelle ausüben. Beide Untereinheiten wurden als lösliche Proteine im Überstand und in ihrer unlöslichen Form im Zellsediment nachgewiesen. Je länger die Bakterien nach der Induktion kultiviert wurden, desto größer wurde der Anteil unlöslicher Proteine. Dies spricht für eine begrenzte Löslichkeit der MBP-Fusionsproteine im Zytoplasma, bei deren Überschreitung es zur Aggregation kommt. Allerdings könnte auch ein unzureichender Zellaufschluss zu einer vermeintlichen Anhäufung des unlöslichen Proteins führen, da intrazelluläre Proteine von intakten Bakterien nicht im Überstand zu finden sind, sondern erst in der SDS-PAGE der Sedimentfraktion sichtbar werden.

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob sich die rekombinant exprimierten Proteine MBP-MCC α und MBP-MCC β zu einem aktiven Enzym zusammenlagern können und somit die Umsetzung von 3-Methylcrotonyl-CoA in 3-Methylglutaconyl-CoA katalysieren. Hierzu wurden gleiche Mengen der löslichen Proteine aus *E.coli*-Zellextrakten vereint und mittels 3-MCC-Radioenzymassay untersucht. Es zeigte sich keine nachweisbare Enzymaktivität, was darauf schließen lässt, dass die Untereinheiten nicht spontan zusammengefunden haben. Der Faltungs- und Assemblierungsprozess findet normalerweise in der mitochondrialen Matrix statt und wird von Helferproteinen wie dem Hsp70, Hsp 60 oder Peptidyl-Prolyl-Isomerasen unterstützt [35, 60, 64, 71]. Diese Chaperonine fehlen im bakteriellen Zellextrakt; zusätzlich finden sich viele bakterielle Proteine, die eine Interaktion der Untereinheiten stören könnten. Auch das Vorhandensein von Proteasen könnte zu einer frühzeitigen Degradierung der MBP-Fusionsproteine führen und die Bildung aktiver Enzymkomplexe unmöglich machen.

Um diese ungünstigen Störfaktoren zu reduzieren, wurde eine *in vitro* Translation mit dem *E.coli* S30 Extract System durchgeführt. In einem Experiment wurden MBP-MCC α und MBP-MCC β simultan in einem kleinen Volumen hergestellt und dadurch die Interaktion der Enzymuntereinheiten erleichtert. Die Gefahr proteolytischer Prozesse ist im Vergleich zum nativen Zellextrakt geringer, da die OmpT-Endoproteinase und die Ion-Protease inaktiviert sind. In einem weiteren Ansatz wurden neben den MBP-Fusionsproteinen auch die Chaperonine groES und groEL co-exprimiert, um eine korrekte Faltung der neu synthetisierten Proteine zu erreichen [21, 37, 96]. Die Chaperonine führten zu einer Steigerung der nachweisbaren Proteinmenge in der SDS-PAGE, jedoch war in beiden Ansätzen keine Enzymaktivität messbar.

Dies könnte zum einen an dem 3-MCC-Radioenzymassay selbst liegen, der ursprünglich für die Messung der Enzymaktivität in humanen Fibroblasten und Leukozyten konzipiert wurde. Die Konzentrationen von Substrat, ATP und Bicarbonat wurden hinsichtlich der 3-MCC-Enzymkonzentrationen in Fibroblasten-Zellextrakten bzw. Leukozyten optimiert. Diese Bedingungen sind möglicherweise nur bedingt übertragbar auf Konzentrationsverhältnisse, wie sie nach *in vitro* Translation oder im *E.coli*-Zellextrakt vorliegen.

Ein weiterer Grund für die beobachtete, fehlende Enzymaktivität könnte in der gestörten Assemblierung der Untereinheiten infolge des N-terminal lokalisierten MBP-*tag* begründet sein.

Für das aus Rinderniere isolierte 3-MCC wird eine Zusammenlagerung der α - und β -Untereinheiten zu einem Dodecamer $(\alpha\beta)_6$ postuliert [46]. Die gleiche Konformation wird für das humane Enzym vermutet. Dies würde einem Molekulargewicht des funktionellen Enzymkomplexes von ca. 850 kDa entsprechen. Durch das an jeder Untereinheit befindliche MBP würde das Molekulargewicht auf 1360 kDa ansteigen. Über die Auswirkungen auf die sterische Konformation lässt sich nur spekulieren, allerdings erscheint eine Behinderung der Assemblierung der Untereinheiten als wahrscheinlich.

Deshalb sollte der MBP-*tag* nach Reinigung von MBP-MCC α und MBP-MCC β abgetrennt werden. Aus einem Liter Bakterienkultur konnten mittels Affinitäts-Chromatographie ca. 20-30 mg rekombinante Proteine isoliert werden, die in relativ hoher Reinheit vorlagen. Zur Spaltung der MBP-Fusionsproteine wurde die Endoprotease Faktor Xa eingesetzt, die natürlicherweise in der Blutgerinnungskaskade für die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin zuständig ist. Sie ist eine spezifische Protease und schneidet an der Carboxyl-Seite des Aminosäuresequenzmotivs IEGR. Dieses Sequenzmotiv ist auch in MBP-MCC α und MBP-MCC β enthalten; dennoch gelang keine vollständige Abtrennung des *tag*. Es wurden zahlreiche Optimierungsversuche unternommen, die unter anderem darauf abzielten, die Schnittstelle für Faktor Xa zugänglich zu machen. Ineffizientes und auch unspezifisches Schneiden von Faktor Xa ist für verschiedene Fusionsproteine in der Literatur beschrieben, erscheint aber besonders im Zusammenhang mit MBP Fusionsproteinen von Bedeutung zu sein [27, 39, 75, 86]. Die Einführung von fünf Glycin-Resten in direkter Nachbarschaft zur Faktor Xa-Schnittstelle, die die Trennungseffizienz von MBP und Zielprotein zu verbessern vermag [67], wurde nicht getestet. Ein weiteres Problem ergab sich aus der Instabilität von geschnittenem MCC α und MCC β , die beide nach der Abspaltung des MBP innerhalb kürzester Zeit degradiert wurden. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung bei Etablierung des Radioenzymassays, dass 3-MCC eine niedrige Halbwertszeit besitzt. So verliert der aus den Mitochondrien freigesetzte, intakte Enzymkomplex selbst bei -80°C innerhalb von 12 Stunden seine Aktivität. Die ungeschnittenen, gereinigten MBP-

Fusionsproteine erwiesen sich dagegen als sehr beständig und konnten selbst nach 36 Stunden bei Raumtemperatur noch in der SDS-PAGE detektiert werden.

Auch bei anderen Proteinen wird über eine rasche Degradierung nach Entfernung des MBP-*tag* berichtet [88]. Die Abnahme der Proteinestabilität ist eventuell mit der sogenannten „N-end-rule“ begründbar. Diese wurde in systematischen Studien ausgearbeitet und besagt, dass die Stabilität eines Proteins *in vivo* von seinem N-terminalen Aminosäure-Rest abhängig ist [3, 4, 22]. Diese Regel wurde später auch für *E.coli* formuliert [80]. Die aminoterminal lokalisierten Aminosäuren Lysin, L-Leucin, Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan reduzieren demnach die Halbwertszeit eines Proteins erheblich. Betrachtet man die reife β -Untereinheit ohne Fusionspartner, findet sich am N-Terminus ein Tyrosin-Rest, der zu einer verkürzten Halbwertszeit beitragen könnte. Da die „N-end-rule“ jedoch für Proteine *in vivo* entwickelt wurde, ist unklar, in wie weit sie Gültigkeit für Degradierungsprozesse *in vitro* besitzt. Der Regel widerspricht das reife MCC α , welches N-terminal die Aminosäure Threonin trägt und damit nicht zum frühzeitigen Abbau prädisponiert sein sollte, aber dennoch eine große Labilität aufweist.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass der MBP-*tag* zwar positiv auf die Stabilität und Löslichkeit der überexprimierten Proteine wirkt, sich aber nur schwer von den labilen Proteinen MCC α und MCC β abtrennen lässt. Aus diesem Grund sollte ein prokaryontes Expressionssystem nach dem Vorbild von Kelson et al. etabliert werden [37], das die simultane Expression der 3-MCC-Untereinheiten ohne Affinitäts-*tag* gestattet. Die simultane Expression wurde angestrebt, da sich die Untereinheiten bereits im Zytoplasma von *E.coli* zum funktionellen Enzymkomplex zusammenlagern sollten. Für die Propionyl-CoA-Carboxylase, einem eng verwandten Enzym, konnte gezeigt werden, dass eine frühzeitige Assemblierung vor Degradierung der Untereinheiten schützt [59]. Die Klonierung des Doppelkonstrukts für 3-MCC erwies sich als nicht durchführbar. Der Grund waren die außerhalb der „multiple cloning Site“ liegenden Schnittstellen, die von den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *PstI* nicht spezifisch erkannt wurden. In der Folge wurde der Plasmidvektor in unterschiedlichen Versuchen an der „falschen“ Stelle geschnitten. Diese sogenannte „Star-Aktivität“ ist vor allem von *EcoRI* bekannt, das sehr empfindlich auf Glycerol, Mangan-Ionen, Dimethylsulfoxid (DMSO) und Änderung der Ionenstärke reagiert [29, 52, 62, 66, 93]. Unter optimalen Pufferbedingungen schneidet *EcoRI* nur die Basensequenz GAATTC. Sind Störfaktoren vorhanden, wird

die DNA auch an Stellen geschnitten, die das Sequenzmotiv AATT enthalten. Der verwendete PinPoint[®] Vektor enthält im Bereich der *EcoRI*-Schnittstelle mehrfach das verkürzte Sequenzmotiv AATT und könnte dadurch ein unspezifisches Schneiden der DNA verstärkt haben. Für das Restriktionsenzym *PstI* sind weit weniger Fälle von „Star-Aktivität“ beschrieben [52]. Dennoch wurde auch hier wiederholt das cDNA-Template an nicht korrekter Position in den Vektor inseriert.

Nach zahlreichen, nicht zielführenden Optimierungsversuchen wurde das Klonierungskonzept überarbeitet, und die für die reife α -Untereinheit codierende cDNA erfolgreich in den pQE-60 Vektor kloniert. Das ohne Affinitäts-tag exprimierte MCC α kann für einen Pull-Down-Assay eingesetzt werden, welcher die Untersuchung der Interaktion zwischen α - und β -Untereinheit ermöglicht. Diese Interaktion ist bislang für die humane 3-MCC weitgehend unerforscht, erscheint aber von besonderem Interesse, da für das nah verwandte Enzym Propionyl-CoA-Carboxylase gezeigt werden konnte, dass viele Genmutationen nicht den katalytischen Mechanismus betreffen, sondern vor allem die Aneinanderlagerung der Untereinheiten stören [33].

7.2 Generierung von Antikörpern gegen MCC α und MCC β

Für die geplante rekombinante Expression von MCC α und MCC β war eine immunologische Nachweismöglichkeit erforderlich. Da keine spezifischen Antikörper in unserem Labor zur Verfügung standen und nicht käuflich zu erwerben waren, sollten geeignete Antikörper generiert werden. Die einfachste Methode, Antikörper zu erzeugen, ist die Immunisierung von Tieren mit den entsprechenden Antigenen. Die gewonnenen polyklonalen Antiseren sind häufig hoch sensitiv und spezifisch. Für dieses Verfahren waren jedoch keine ausreichenden Mengen von reinem MCC α bzw. MCC β -Protein verfügbar, weswegen eine alternative Technik angewendet wurde. Diese sieht die Immunisierung von Kaninchen mit synthetisch hergestellten Peptid-Antigenen vor [55, 56]. Durch Vergleich der Aminosäure-Sequenz mit den eng verwandten Enzymen Propionyl-CoA-Carboxylase und Pyruvat-Carboxylase konnten Bereiche ausgewählt werden, die geringe Homologie aufweisen und keine hoch konservierten Abschnitte enthalten [2]. Damit können unerwünschte

Kreuzreaktivitäten der Antikörper minimiert werden. Für MCC α wurde die Aminosäure-Abfolge As 178-190 und As 698-710, für MCC β die Bereiche As 185-198 und As 484-497 für die Peptid-Synthese ausgesucht. Vor der Immunisierung wurden die Peptide an den Carrier Ovalbumin gekoppelt, um eine Immunantwort zu induzieren. Die nach Durchführung des Immunisierungsprotokolls erhaltenen Antiseren von vier Kaninchen wiesen im ELISA-Test hohe Antikörper-Titer auf. Lediglich das Peptid MCC α As 178-190 führte zu einer nur geringen Antikörper-Bildung und folglich zu einem schwachen Signal im ELISA. Im Western Blot sollten die rekombinanten Proteine MBP-MCC α und MBP-MCC β mit Hilfe der Peptid-Antikörper nachgewiesen werden. Das Präimmunserum, also vor Antigen-Kontakt gewonnenes Serum, zeigte erwartungsgemäß kein Detektionssignal (Abbildung 6.10; 6.11). Mit dem Immunserum aller vier Kaninchen war ein Nachweis der Fusionsproteine möglich, wobei ein starkes Hintergrundsignal die Auswertung beeinträchtigte. Deshalb wurden die gegen die synthetischen Peptide gerichteten Antikörper mit Hilfe des SulfoLink[®]-Kits aus dem Serum isoliert. Der störende Hintergrund konnte durch diesen Reinigungsschritt wirksam beseitigt werden, was eine trennscharfe Darstellung der MBP-Fusionsproteine erlaubte. Die noch vorhandenen schwachen Nebenbanden entsprechen wahrscheinlich Fragmenten von MBP-MCC α bzw. MBP-MCC β , die entweder von *E.coli* unvollständig gebildet wurden oder bei der Reinigung und Lagerung durch Degradierungsprozesse entstanden sind. Ein unspezifischer Nachweis anderer bakterieller Proteine, die in Spuren auch in den gereinigten Fraktionen der MBP-Fusionsproteine enthalten sind, liegt höchstwahrscheinlich nicht vor.

Eine Detektion der 3-MCC-Enzymuntereinheiten in Fibroblastenlysaten und Mitochondrienanreicherungen war dagegen nicht möglich. Dies könnte durch das niedrige Expressionslevel der 3-MCC in Fibroblasten bedingt sein. Da aber mit guten Antikörperpräparationen die Nachweissensitivität im attomolaren Bereich liegt [43], scheint diese Ursache wenig wahrscheinlich. Für die Herstellung von Fibroblastenlysaten wurden die Zellen und Mitochondrien mit einem Ultraschallstab aufgeschlossen und die löslichen Proteine für den Western Blot eingesetzt. Der fehlende Nachweis könnte durch eine vollständige Degradierung des Enzyms während der Präparation erklärt werden oder auf einen mangelnden Zell- bzw. Mitochondrienaufschluss zurückzuführen sein. Da in den Western Blot-Analysen von Fibroblasten-Zellextrakten keinerlei Banden zu erkennen waren, liegen auch keine

ersichtlichen Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen vor, was bezüglich der Spezifität positiv zu werten ist. Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Peptid-Antikörper den sicheren Nachweis von rekombinant exprimierten MCC α und MCC β ermöglichen, jedoch nicht zur Detektion der Enzym-Untereinheiten in Fibroblastenlysaten geeignet sind.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Herstellung von polyklonalen Antikörpern. Diese bieten aufgrund ihrer polyvalenten Bindung an das Antigen die Möglichkeit, eine Immunopräzipitation durchzuführen. Diese Methode dient der Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen und wäre interessant mit Blick auf die Interaktion von α - und β -Untereinheit der 3-MCC und eventuell weiteren Bindungspartnern. Darüber hinaus sollten die polyklonalen Antikörper den Nachweis von MCC α und MCC β in Fibroblastenlysaten erlauben. Durch Vergleich von Wildtyp- und Patienten-Fibroblasten im Western Blot könnte der Einfluss von Mutationen auf die Stabilität des Enzyms untersucht werden. Für die Generierung der polyklonalen Antikörper wurden, ähnlich wie bei den Peptid-Antikörpern, Aminosäuresequenz Bereiche mit geringer Homologie zu den Paralogen Propionyl-CoA-Carboxylase und Pyruvat-Carboxylase ausgewählt, um spätere Kreuzreaktionen zu vermeiden. Die Proteinabschnitte sind über 200 Aminosäuren lang und bieten dadurch viele Antigen-Determinanten. Für MCC α wurde der Sequenzbereich von Aminosäure 402 bis 643 gewählt. Bei MCC β erschien der Bereich As 321-543 geeignet zur Induktion einer spezifischen Immunantwort. Die für die ausgewählten Proteinfragmente codierende cDNA wurde in prokaryontische Vektorsysteme mit Affinitäts-*tag* kloniert. Der *tag* ermöglicht eine selektive Aufreinigung der Fusionsproteine, die in diesem Fall von besonderer Bedeutung ist, da die Qualität der erzeugten Antikörper maßgeblich von der Reinheit der Antigenpräparation abhängt. Auch die schon unter Kapitel 7.1 beschriebene stabilisierende Wirkung des *tag* auf die rekombinant exprimierten Proteine und die Erhöhung der Löslichkeit sind günstige Eigenschaften, weswegen die Immunisierung mit Fusionsproteinen ein häufig in der Literatur beschriebenes Verfahren darstellt. Probleme bei der Generierung von Antikörpern mittels Fusionsproteinen können auftreten, wenn sich die Immunantwort vor allem gegen die Epitope auf dem Affinitäts-*tag* richtet oder durch die Proteinkonformation wichtige Bereiche des Ziel-Antigens verdeckt werden.

MCC $\alpha_{(As321-543)}$ wurde mit Hilfe des pGEX-3X Vektorsystems in *E.coli* exprimiert. Die gebildeten Fusionsproteine mit einem aminoterminalen Glutathion-S-Transferase-*tag* (GST-*tag*) lagen in der Zelle als *inclusion bodies* vor, welche in hoher Reinheit isoliert werden konnten und damit eine Affinitäts-Reinigung über Glutathion-Sepharose überflüssig machten. Bei der Solubilisierung der Proteinaggregate und anschließender Renaturierung traten jedoch hohe Verluste auf, so dass keine ausreichenden Mengen GST-MCC $\alpha_{(As402-643)}$ zur Immunisierung von Kaninchen gewonnen werden konnten. Alternativ wurde die für MCC $\alpha_{(As321-543)}$ codierende cDNA in den pQE-30 Plasmidvektor inseriert. Die gebildeten rekombinanten Proteine wurden mit einem N-terminalen His-*tag* versehen, der aus lediglich sechs Histidinresten besteht und der Affinitätsreinigung über eine Nickel-Säule dient. Im Gegensatz zum GST-*tag* (26 kDa) ist der His-*tag* (1 kDa) sehr klein. Dadurch ist er weniger immunogen, leistet allerdings keinen Beitrag, die Löslichkeit und Stabilität des Fusionsproteins zu steigern. Auch hier lag das gebildete His-MCC $\alpha_{(As402-643)}$ überwiegend in Form von *inclusion bodies* vor. Als zusätzlicher Nachteil erwies sich das insgesamt niedrige Expressionsniveau der rekombinanten Proteine. Die Ursache könnte das pQE-Vektorsystem sein, dessen Plasmide nur in geringer Zahl in der Zelle gebildet werden (Low-Copy-Plasmide) im Gegensatz zu den sonst verwendeten Vektorsystemen pGEX-3X und pMAL-c2X, die eine hohe Kopienzahl aufweisen. Zur Aufreinigung wurden die aggregierten Proteine in hochmolarem Harnstoff aufgelöst und anschließend an eine Nickel-Säule gebunden. Hierbei zeigte sich, dass viele andere Proteine unspezifisch an die Matrix binden und den Reinigungseffekt reduzieren. Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Antigen-Präparation konnten bislang noch keine Kaninchen gegen MCC $\alpha_{(As402-643)}$ immunisiert werden. Gegenwärtig wird an einer Optimierung der Expression und Reinigung von GST-MCC $\alpha_{(As402-643)}$ und His-MCC $\alpha_{(As402-643)}$ gearbeitet. Denkbar wäre ein Verzicht auf die schwierige Renaturierung von GST-Fusionsproteinen, da die korrekte Proteinfaltung für die Immunisierung unerheblich ist.

Das nach Homologie-Analysen ausgewählte Fragment MCC $\beta_{(As321-543)}$ konnte als MBP-Fusionsprotein in *E.coli* exprimiert werden. Wie bei den vollständigen Untereinheiten der 3-MCC war auch hier eine effiziente Affinitätsreinigung über eine Amylose-Matrix möglich. Die angeschlossene Feinreinigung mittels Größenausschluss-Chromatographie führte zu einer hoch reinen Präparation, die zur

Immunisierung von zwei Kaninchen verwendet wurde. Aufgrund der Größe des MBP-tag ist mit einer Antikörperbildung gegen das Maltose-Bindende-Protein zu rechnen. Eine starke Immunantwort gegen MBP lässt sich auch phylogenetisch erklären, da das Maltose-Bindende-Protein nur in Prokaryonten vorkommt und deshalb viele fremde Antigene-Determinanten aufweist. Dagegen ist die phylogenetische Distanz zwischen der humanen 3-MCC und dem Enzym des Kaninchens relativ gering, so dass sich die beiden Proteine möglicherweise nur in wenigen Aminosäuren unterscheiden. Dies könnte zu einer gewissen Toleranz gegenüber dem MCC $\beta_{(As321-543)}$ Fragment führen und in der Folge zu einer schwachen Antikörperbildung [24, 45]. Die Immunisierung wurde wie bei den Peptid-Antikörpern von einem externen Labor durchgeführt. Die erhaltenen Antiseren wurden versuchsweise ohne weitere Reinigung im Western Blot eingesetzt und zeigten ein nur schwaches Hintergrundsignal. Jedoch sollten auch hier spezifische Präparationen der polyklonalen Antikörper hergestellt werden. Eine Aufreinigung mit Hilfe des SulfoLink[®]-Kits war wegen fehlender Sulfhydryl-Gruppen von MBP-MCC $\beta_{(As321-543)}$ nicht möglich. Deshalb wurde die gesamte IgG-Fraktion des Serums durch Protein A-Affinitätschromatographie isoliert. In einem zweiten Reinigungsschritt über eine MBP-Amylose-Matrix konnten die gegen das Maltose-Bindende-Protein gerichteten Antikörper teilweise entfernt werden. Präimmunserum, Immunserum und die gereinigten Antikörper beider Kaninchen wurden im Immunoblot gegen rekombinant exprimiertes MBP-MCC β getestet. Der Vergleich von Präimmunserum und Immunserum macht deutlich, dass eine spezifische Antikörperbildung erfolgreich induziert wurde (Abbildung 6.15). Der Nachweis mit höchster Spezifität und geringstem Signalrauschen war mit der zweifach gereinigten Antikörperfraktion möglich. Die Austestung der polyklonalen Antikörper in humanen Leberzellextrakten und Mitochondrienanreicherungen von humaner Niere beziehungsweise Fibroblasten ergab ein uneinheitliches Bild. Im Leberzellextrakt konnte ein Protein mit einem Molekulargewicht von circa 60 kDa nachgewiesen werden, welches wahrscheinlich der β -Untereinheit der 3-MCC entspricht. In der Mitochondrienanreicherung aus humanem Nierengewebe konnte MCC β deutlich nachgewiesen werden. Die Western Blot-Analyse von Wildtyp-Fibroblasten zeigte in mehreren Experimenten reproduzierbar eine starke Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 80 kDa. Da aber MCC β ein errechnetes Molekulargewicht

von ca. 62 kDa besitzt, ist unklar, welches Protein spezifisch von den Antikörpern detektiert wurde. Eine Kreuzreaktion mit den Paralogen Propionyl-CoA-Carboxylase (β -Untereinheit 54 kDa) und der Pyruvat-Carboxylase (130 kDa) liegt nicht vor. Die Proteine der Mitochondrienanreicherung wurden für die SDS-PAGE vollständig denaturiert und eventuell vorhandene Disulfidbrücken durch Reduktionsmittel gelöst. Aus diesem Grund kann die Zunahme des Molekulargewichts um 20 kDa nicht durch Anlagerung von Interaktionspartnern erklärt werden. Eine Möglichkeit wäre die kovalente Bindung eines Liganden an die β -Untereinheit der 3-MCC. Dies ist aber bislang nicht in der Literatur beschrieben und erscheint unrealistisch, weil im Leber- und Nierengewebe MCC β in der vorgesehenen Größe nachgewiesen wurde. Es liegt demzufolge mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Kreuzreaktion vor. Deshalb ist eine selektive Isolierung der gegen MCC $\beta_{(As321-543)}$ gerichteten Antikörper geplant. Die erfolgreiche Generierung polyklonaler Antikörper gegen MCC β ermöglicht den Nachweis der rekombinant exprimierten Untereinheit und erlaubt mit gewissen Einschränkungen auch die Detektion von MCC β in Gewebeextrakten.

7.3 Ausblick

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurden Werkzeuge für eine Charakterisierung der humanen 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase auf Proteinebene geschaffen. Um die Assemblierung und Funktionsweise der 3-MCC zu verstehen sind weitere detaillierte Studien erforderlich. Die im Folgenden aufgeführten Experimente sollen zunächst am Wildtyp-Enzym und sekundär an Zelllinien von Patienten mit konfirmiertem 3-MCC-Mangel durchgeführt werden.

Bislang ist wenig über die Interaktion von α - und β -Untereinheit und deren Assemblierung bekannt. Lediglich für das bovine Enzym ist die Oligomerisierung zu einem Dodecamer aufgeklärt. Die Wechselwirkungen können mit Hilfe eines Pull-Down-Assays untersucht werden. Eine andere Möglichkeit für *in vitro* Interaktionsstudien ist die Durchführung einer Co-Immunopräzipitation. Für dieses immunologische Verfahren ist die Generierung von polyklonalen Antikörpern gegen MCC α ein vordringliches Ziel. Die Kombination verschiedener Verfahren scheint für die Validierung der Ergebnisse erforderlich.

Der Einfluss von Mutationen auf die Stabilität der 3-MCC kann ebenfalls mit Hilfe polyklonaler Antikörper semiquantitativ untersucht werden. Das Experiment sieht die Inkubation von elektrophoretisch aufgetrennten Fibroblasten-Zellextrakten mit Antikörpern gegen $MCC\alpha$ bzw. $MCC\beta$ vor.

Inwieweit die 3-MCC mit anderen zellulären Proteinen in Wechselwirkung tritt, lässt sich mit dem Yeast Two Hybrid System aufklären. Alternativ ist die chipbasierte SELDI-TOF (surface enhanced laser desorption ionisation) Technik einsetzbar, die eine Hochdurchsatz-Analyse von komplexen Proteinmischungen ermöglicht

Neben diesen Untersuchungen auf Proteinebene ist die jeweilige „Quantifizierung“ der 3-MCC-Defizienz im intakten Zellsystem von besonderem Interesse. Zum einen kann die Flux-Messung von radioaktiv markiertem L-Leucin in humanen Fibroblasten dazu beitragen, die funktionelle Bedeutung eines 3-MCC-Defekts sowie möglicherweise vorliegenden Kompensationsmechanismen näher zu charakterisieren.

Zum anderen können in „pulse-chase“-Experimenten zunächst die bei der Translation gebildeten Enzymuntereinheiten radioaktiv markiert und anschließend in der Zelle verfolgt werden. Diese Technik erlaubt beispielsweise, eine potenziell frühzeitige Degradierung der Enzymuntereinheiten in der Zelle nachzuweisen, was bei Vorliegen unterschiedlicher Mutationen in *MCCA* bzw. *MCCB* zu postulieren ist.

8 Zusammenfassung

Die mitochondrial lokalisierte 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (3-MCC) gehört zur Familie der biotinabhängigen Carboxylasen und ist am Abbau der verzweigtkettigen Aminosäure L-Leucin beteiligt. 3-MCC besteht aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten, $MCC\alpha$ und $MCC\beta$, die von den Genen *MCCA* und *MCCB* codiert werden. Der autosomal rezessiv vererbte 3-MCC-Mangel wird den organischen Azidämien zugeordnet. Die Erweiterung des Neugeborenen Screenings in Bayern mittels Tandem-Massenspektrometrie ergab eine unerwartet hohe Inzidenz von 1:85000. Der klinische Phänotyp wird in der Literatur sehr heterogen beschrieben und reicht von mehrheitlich asymptomatischen bis hin zu einzelnen letalen Verläufen. Aufgrund fehlender Prädiktoren für einen komplizierten klinischen Verlauf ist die Beratung betroffener Familien bei postnatal in der Regel asymptomatischen Neugeborenen hinsichtlich Verlauf, Notwendigkeit einer therapeutischen Intervention und Prognose schwierig.

Nachdem die Molekulargenetik der humanen 3-MCC aufgeklärt werden konnte und ein breites Spektrum an Mutationen beschrieben wurde, sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Voraussetzungen geschaffen werden für die weitere Charakterisierung des Enzyms auf Proteinebene.

Durch Etablierung eines prokaryontischen Expressionssystems konnten die α - und β -Untereinheiten als rekombinante Fusionsproteine in *E.coli* exprimiert werden. Als Fusionspartner diente Maltose-Bindende-Protein (MBP), welches die affinitätschromatographische Reinigung der Zielproteine ermöglichte. Die rekombinant hergestellten Untereinheiten zeigten keine messbare Enzymaktivität. Da eine vorgesehene Abtrennung des MBP-Proteins mit Hilfe der Protease Faktor Xa nicht erreicht werden konnte, und eine Co-Expression beider Untereinheiten in *E.coli* sich als nicht durchführbar erwies, wurde das *MCCA*-Gen in einen Vektor ohne Fusionspartner kloniert. Das $MCC\alpha$ -Protein steht nun für Interaktionsstudien (Pull-Down-Assay) zur Verfügung.

Parallel wurden Antikörper für den immunologischen Nachweis der 3-MCC-Untereinheiten hergestellt. Durch Immunisierung von Kaninchen mit synthetischen Peptiden konnten Antikörper gegen $MCC\alpha$ und $MCC\beta$ erzeugt werden, die nach

Aufreinigung des Serums den spezifischen Nachweis der rekombinant exprimierten Untereinheiten zulassen. Da eine Detektion der Enzym-Untereinheiten in humanen Fibroblasten nicht möglich war und Peptid-Antikörper für eine Immunopräzipitation nur bedingt geeignet sind, wurden zusätzlich polyklonale Antikörper gegen MCC β generiert. Die polyklonalen Antikörper erlauben den Nachweis von MCC β in verschiedenen Gewebelysaten. Die Produktion von polyklonalen Antikörpern gegen die α -Untereinheit steht noch aus.

9 Literaturverzeichnis

1. Abe, Y., T. Shodai, T. Muto, K. Mihara, H. Torii, S. Nishikawa, et al., *Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20*. Cell, 2000. **100**(5): p. 551-60.
2. Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman, *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol, 1990. **215**(3): p. 403-10.
3. Bachmair, A., D. Finley, and A. Varshavsky, *In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue*. Science, 1986. **234**(4773): p. 179-86.
4. Bachmair, A. and A. Varshavsky, *The degradation signal in a short-lived protein*. Cell, 1989. **56**(6): p. 1019-32.
5. Bannwart, C., B. Wermuth, R. Baumgartner, T. Suormala, and U.N. Wiesmann, *Isolated biotin-resistant deficiency of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase presenting as a clinically severe form in a newborn with fatal outcome*. J Inher Metab Dis, 1992. **15**(6): p. 863-868.
6. Bartlett, K., M.J. Bennett, R.P. Hill, L.S. Lashford, R.J. Pollitt, and H.G. Worth, *Isolated biotin-resistant 3-methylcrotonyl CoA carboxylase deficiency presenting with life-threatening hypoglycaemia*. J Inher Metab Dis, 1984. **7**(4): p. 182.
7. Baumgartner, M.R., S. Almashanu, T. Suormala, C. Obie, R.N. Cole, S. Packman, et al., *The molecular basis of human 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency*. J Clin Invest, 2001. **107**(4): p. 495-504.
8. Baumgartner, M.R., M.F. Dantas, T. Suormala, S. Almashanu, C. Giunta, D. Friebel, et al., *Isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: evidence for an allele-specific dominant negative effect and responsiveness to biotin therapy*. Am J Hum Genet, 2004. **75**(5): p. 790-800.
9. Baykal, T., G.H. Gokcay, Z. Ince, M.F. Dantas, B. Fowler, M.R. Baumgartner, et al., *Consanguineous 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: Early-onset necrotizing encephalopathy with lethal outcome*. J Inher Metab Dis, 2005. **28**(2): p. 229-333.
10. Beemer, F.A., K. Bartlett, M. Duran, H.K. Ghneim, S.K. Wadman, L. Bruinvis, et al., *Isolated biotin-resistant 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in two sibs*. Eur J Pediatr, 1982. **138**(4): p. 351-354.
11. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
12. Chace, D.H., T.A. Kalas, and E.W. Naylor, *The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2002. **3**: p. 17-45.
13. Dantas, M.F., T. Suormala, A. Randolph, D. Coelho, B. Fowler, D. Valle, et al., *3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: mutation analysis in 28 probands, 9 symptomatic and 19 detected by newborn screening*. Hum Mutat, 2005. **26**(2): p. 164-175.
14. Del Campillo-Campbell, A., E.E. Dekker, and M.J. Coon, *Carboxylation of beta-methylcrotonyl coenzyme A by a purified enzyme from chicken liver*. Biochim Biophys Acta, 1959. **31**(1): p. 290-2.

15. di Guan, C., P. Li, P.D. Riggs, and H. Inouye, *Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in Escherichia coli by fusion to maltose-binding protein*. Gene, 1988. **67**(1): p. 21-30.
16. Dodelson de Kremer, R., A. Latini, T. Suormala, E.R. Baumgartner, L. Larovere, G. Civallero, et al., *Leukodystrophy and CSF purine abnormalities associated with isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency*. Metab Brain Dis, 2002. **17**(1): p. 13-18.
17. Elpeleg, O.N., S. Havkin, V. Barash, C. Jakobs, B. Glick, and R.S. Shalev, *Familial hypotonia of childhood caused by isolated 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase deficiency*. J Pediatr, 1992. **121**(3): p. 407-410.
18. Gallardo, M.E., L.R. Desviat, J.M. Rodríguez, J. Esparza-Gordillo, C. Pérez-Cerdá, B. Pérez, et al., *The molecular basis of 3-methylcrotonylglycinuria, a disorder of leucine catabolism*. Am J Hum Genet, 2001. **68**: p. 334-346.
19. Gibson, K.M., M.J. Bennett, E.W. Naylor, and D.H. Morton, *3-Methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase deficiency in Amish/Mennonite adults identified by detection of increased acylcarnitines in blood spots of their children*. J Pediatr, 1998. **132**(3 Pt 1): p. 519-523.
20. Gitzelmann, R., B. Steinmann, A. Niederwieser, S. Fanconi, T. Sourmala, and R. Baumgartner, *Isolated (biotin-resistant) 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency presenting at age 20 months with sopor, hypoglycaemia and ketoacidosis*. J Inherit Metab Dis, 1987. **10**(Suppl. 2): p. 290-292.
21. Goloubinoff, P., A.A. Gatenby, and G.H. Lorimer, *GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose bisphosphate carboxylase oligomers in Escherichia coli*. Nature, 1989. **337**(6202): p. 44-7.
22. Gonda, D.K., A. Bachmair, I. Wunning, J.W. Tobias, W.S. Lane, and A. Varshavsky, *Universality and structure of the N-end rule*. J Biol Chem, 1989. **264**(28): p. 16700-12.
23. Gottesman, S., *Minimizing proteolysis in Escherichia coli: genetic solutions*. Methods Enzymol, 1990. **185**: p. 119-29.
24. Hanly, W.C., J.E. Artwohl, and B.T. Bennett, *Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry*. Ilar J, 1995. **37**(3): p. 93-118.
25. Hawlitschek, G., H. Schneider, B. Schmidt, M. Tropschug, F.U. Hartl, and W. Neupert, *Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein*. Cell, 1988. **53**(5): p. 795-806.
26. Hayes, S.A. and J.F. Dice, *Roles of molecular chaperones in protein degradation*. J Cell Biol, 1996. **132**(3): p. 255-8.
27. He, M., L. Jin, and B. Austen, *Specificity of factor Xa in the cleavage of fusion proteins*. J Protein Chem, 1993. **12**(1): p. 1-5.
28. Holzinger, A., W. Röschinger, F. Lagler, P.U. Mayerhofer, P. Lichtner, T. Kattenfeld, et al., *Cloning of the human MCCA and MCCB genes and mutations therein reveal the molecular cause of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(12): p. 1299-1306.
29. Hsu, M. and P. Berg, *Altering the specificity of restriction endonuclease: effect of replacing Mg²⁺ with Mn²⁺*. Biochemistry, 1978. **17**(1): p. 131-38.
30. Huang, H.P., K.L. Chu, Y.H. Chien, M.L. Wei, S.T. Wu, S.F. Wang, et al., *Tandem mass neonatal screening in Taiwan--report from one center*. J Formos Med Assoc, 2006. **105**(11): p. 882-6.
31. Hutson, S.M. and S.L. Rannels, *Characterization of a mitochondrial transport system for branched chain alpha-keto acids*. J Biol Chem, 1985. **260**(26): p. 14189-93.

32. Ihara, K., R. Kuromaru, Y. Inoue, T. Kuhara, I. Matsumoto, M. Yoshino, et al., *An asymptomatic infant with isolated 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase deficiency detected by newborn screening for maple syrup urine disease*. Eur J Pediatr, 1997. **156**(9): p. 713-715.
33. Jiang, H., K.S. Rao, V.C. Yee, and J.P. Kraus, *Characterization of four variant forms of human propionyl-CoA carboxylase expressed in Escherichia coli*. J Biol Chem, 2005. **280**(30): p. 27719-27.
34. Jurecki, E.R. and S. Packman, *Nutrition therapy for β -methylcrotonylglycinuria*, in *Metabolic Currents*, P.B. Acosta, Editor. 1992, Ross Laboratories: Columbus, Ohio. p. 9-12.
35. Kang, P.J., J. Ostermann, J. Shilling, W. Neupert, E.A. Craig, and N. Pfanner, *Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins*. Nature, 1990. **348**(6297): p. 137-43.
36. Kapust, R.B. and D.S. Waugh, *Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused*. Protein Sci, 1999. **8**(8): p. 1668-74.
37. Kelson, T.L., T. Ohura, and J.P. Kraus, *Chaperonin-mediated assembly of wild-type and mutant subunits of human propionyl-CoA carboxylase expressed in Escherichia coli*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(3): p. 331-7.
38. Knowles, J.R., *The mechanism of biotin-dependent enzymes*. Annu Rev Biochem, 1989. **58**: p. 195-221.
39. Ko, Y.H., P.J. Thomas, M.R. Delannoy, and P.L. Pedersen, *The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Overexpression, purification, and characterization of wild type and delta F508 mutant forms of the first nucleotide binding fold in fusion with the maltose-binding protein*. J Biol Chem, 1993. **268**(32): p. 24330-8.
40. Kobori, J.A., K. Johnston, L. Sweetman, K. Schmidt, E. Jurecki, B. Wolf, et al., *Isolated 3-methylcrotonyl CoA carboxylase deficiency presenting as a Reyes-like syndrome*. Pediatr Res, 1989. **25**: p. 142A (Abstract).
41. Koeberl, D.D., D.S. Millington, W.E. Smith, S.D. Weavil, J. Muenzer, S.E. McCandless, et al., *Evaluation of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening*. J Inherit Metab Dis, 2003. **26**(1): p. 25-35.
42. Kondo, H., K. Shiratsuchi, T. Yoshimoto, T. Masuda, A. Kitazono, D. Tsuru, et al., *Acetyl-CoA carboxylase from Escherichia coli: gene organization and nucleotide sequence of the biotin carboxylase subunit*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(21): p. 9730-3.
43. Laing, P., *Luminescent visualization of antigens on blots*. J Immunol Methods, 1986. **92**(2): p. 161-5.
44. Lane, M.D., J. Moss, and S.E. Polakis, *Acetyl coenzyme A carboxylase*. Curr Top Cell Regul, 1974. **8**(0): p. 139-95.
45. Larsson, A., R.M. Balow, T.L. Lindahl, and P.O. Forsberg, *Chicken antibodies: taking advantage of evolution--a review*. Poult Sci, 1993. **72**(10): p. 1807-12.
46. Lau, E.P., B.C. Cochran, and R.R. Fall, *Isolation of 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase from bovine kidney*. Arch Biochem Biophys, 1980. **205**(2): p. 352-9.
47. Lau, E.P., B.C. Cochran, L. Munson, and R.R. Fall, *Bovine kidney 3-methylcrotonyl-CoA and propionyl-CoA carboxylases: each enzyme contains nonidentical subunits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(1): p. 214-8.

48. Layward, E.M., M.S. Tanner, R.J. Pollitt, and K. Bartlett, *Isolated biotin-resistant 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency presenting as a Reye syndrome-like illness*. J Inherit Metab Dis, 1989. **12**(3): p. 339-340.
49. Lehnert, W., H. Niederhoff, T. Suormala, and E.R. Baumgartner, *Isolated biotin-resistant 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: long-term outcome in a case with neonatal onset*. Eur J Pediatr, 1996. **155**(7): p. 568-572.
50. Ly, T.B., V. Peters, K.M. Gibson, M. Liesert, W. Buckel, B. Wilcken, et al., *Mutations in the AUH gene cause 3-methylglutaconic aciduria type I*. Hum Mutat, 2003. **21**(4): p. 401-407.
51. Lynen, F., J. Knappe, E. Lorch, G. Jutting, E. Ringelmann, and J.P. Lachance, *Zur biochemischen Funktion des Biotins. II. Reinigung und Wirkungsweise der β -Methyl-crotonyl-Carboxylase*. Biochem Z, 1961. **335**: p. 123.
52. Malyguine, E., P. Vannier, and P. Yot, *Alteration of the specificity of restriction endonucleases in the presence of organic solvents*. Gene, 1980. **8**(2): p. 163-77.
53. McAllister, H.C. and M.J. Coon, *Further studies on the properties of liver propionyl coenzyme A holocarboxylase synthetase and the specificity of holocarboxylase formation*. J Biol Chem, 1966. **241**(12): p. 2855-61.
54. McKean, A.L., J. Ke, J. Song, P. Che, S. Achenbach, B.J. Nikolau, et al., *Molecular characterization of the non-biotin-containing subunit of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase*. J Biol Chem, 2000. **275**(8): p. 5582-90.
55. Merrifield, R.B., *Automated synthesis of peptides*. Science, 1965. **150**(693): p. 178-85.
56. Merrifield, R.B. and J.M. Stewart, *Automated peptide synthesis*. Nature, 1965. **207**(996): p. 522-3.
57. Mourmans, J., J. Bakkeren, J. de Jong, R. Wevers, O.P. van Diggelen, T. Suormala, et al., *Isolated (biotin-resistant) 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: four sibs devoid of pathology*. J Inherit Metab Dis, 1995. **18**(5): p. 643-645.
58. Murayama, K., M. Kimura, S. Yamaguchi, T. Shinka, and K. Kodama, *Isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in a 15-year-old girl*. Brain Dev, 1997. **19**(4): p. 303-305.
59. Ohura, T., J.P. Kraus, and L.E. Rosenberg, *Unequal synthesis and differential degradation of propionyl CoA carboxylase subunits in cells from normal and propionic acidemia patients*. Am J Hum Genet, 1989. **45**(1): p. 33-40.
60. Ostermann, J., A.L. Horwich, W. Neupert, and F.U. Hartl, *Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis*. Nature, 1989. **341**(6238): p. 125-30.
61. Pearson, M.A., K.A. Aleck, and R.A. Heidenreich, *Benign clinical presentation of 3-methylcrotonylglycinuria*. J Inherit Metab Dis, 1995. **18**(5): p. 640-641.
62. Polisky, B., P. Greene, D.E. Garfin, B.J. McCarthy, H.M. Goodman, and H.W. Boyer, *Specificity of substrate recognition by the EcoRI restriction endonuclease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3310-4.
63. Prentki, M. and A.E. Renold, *Neutral amino acid transport in isolated rat pancreatic islets*. J Biol Chem, 1983. **258**(23): p. 14239-44.
64. Rasso, J. and N. Pfanner, *Protein biogenesis: chaperones for nascent polypeptides*. Curr Biol, 1996. **6**(2): p. 115-8.
65. Reche, P., Y.L. Li, C. Fuller, K. Eichhorn, and R.N. Perham, *Selectivity of post-translational modification in biotinylated proteins: the carboxy carrier*

- protein of the acetyl-CoA carboxylase of Escherichia coli.* Biochem J, 1998. **329 (Pt 3)**: p. 589-96.
66. Robinson, C.R. and S.G. Sligar, *Molecular recognition mediated by bound water. A mechanism for star activity of the restriction endonuclease EcoRI.* J Mol Biol, 1993. **234(2)**: p. 302-6.
67. Rodriguez, P.L. and L. Carrasco, *Improved factor Xa cleavage of fusion proteins containing maltose binding protein.* Biotechniques, 1995. **18(2)**: p. 238, 241-3.
68. Roise, D., S.J. Horvath, J.M. Tomich, J.H. Richards, and G. Schatz, *A chemically synthesized pre-sequence of an imported mitochondrial protein can form an amphiphilic helix and perturb natural and artificial phospholipid bilayers.* Embo J, 1986. **5(6)**: p. 1327-34.
69. Rolland, M.O., P. Divry, M.T. Zobot, P. Guibaud, S. Gomez, A. Lachaux, et al., *Isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in a 16-month-old child.* J Inherit Metab Dis, 1991. **14(5)**: p. 838-839.
70. Röschinger, W., D.S. Millington, D.A. Gage, Z.H. Huang, T. Iwamoto, S. Yano, et al., *3-Hydroxyisovalerylcarnitine in patients with deficiency of 3-methylcrotonyl CoA carboxylase.* Clin Chim Acta, 1995. **240(1)**: p. 35-51.
71. Rospert, S., R. Looser, Y. Dubaquitte, A. Matouschek, B.S. Glick, and G. Schatz, *Hsp60-independent protein folding in the matrix of yeast mitochondria.* Embo J, 1996. **15(4)**: p. 764-74.
72. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74(12)**: p. 5463-7.
73. Scharf, S.J., G.T. Horn, and H.A. Erlich, *Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences.* Science, 1986. **233(4768)**: p. 1076-8.
74. Schulze, A., M. Lindner, D. Kohlmüller, K. Olgemöller, E. Mayatepek, and G.F. Hoffmann, *Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications.* Pediatrics, 2003. **111(6 Pt 1)**: p. 1399-1406.
75. Sharma, D.R., *Cloning, Overexpression, Purification, and Characterization of the Carboxyl-terminal Nucleotide Binding Domain of P-glycoprotein* J Biol Chem, 1995. **Volume 270**(Issue of June 9): p. pp. 14085-14093.
76. Song, J., E.S. Wurtele, and B.J. Nikolau, *Molecular cloning and characterization of the cDNA coding for the biotin-containing subunit of 3-methylcrotonoyl-CoA carboxylase: identification of the biotin carboxylase and biotin-carrier domains.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91(13)**: p. 5779-83.
77. Stadler, S.C., R. Polanetz, E.M. Maier, S.C. Heidenreich, B. Niederer, P.U. Mayerhofer, et al., *Newborn screening for 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: population heterogeneity of MCCA and MCCB mutations and impact on risk assessment.* Hum Mutat, 2006. **27(8)**: p. 748-59.
78. Stadler, S.C., R. Polanetz, S. Meier, P.U. Mayerhofer, J.M. Herrmann, K. Anslinger, et al., *Mitochondrial targeting signals and mature peptides of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **334(3)**: p. 939-946.
79. Steen, C., E.R. Baumgartner, M. Duran, W. Lehnert, T. Suormala, R. Fingerhut, et al., *Metabolic stroke in isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency.* Eur J Pediatr, 1999. **158(9)**: p. 730-733.

80. Tobias, J.W., T.E. Shrader, G. Rocap, and A. Varshavsky, *The N-end rule in bacteria*. Science, 1991. **254**(5036): p. 1374-7.
81. Tsai, M.Y., D.D. Johnson, L. Sweetman, and S.A. Berry, *Two siblings with biotin-resistant 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase deficiency*. J Pediatr, 1989. **115**(1): p. 110-113.
82. Tuchman, M., S.A. Berry, L.P. Thuy, and W.L. Nyhan, *Partial methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase deficiency in an infant with failure to thrive, gastrointestinal dysfunction, and hypertonia*. Pediatrics, 1993. **91**(3): p. 664-666.
83. van Hove, J.L., S.L. Rutledge, M.A. Nada, S.G. Kahler, and D.S. Millington, *3-Hydroxyisovalerylcarnitine in 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency*. J Inherit Metab Dis, 1995. **18**(5): p. 592-601.
84. Visser, G., T. Suormala, G.P. Smit, D.J. Reijngoud, M.T. Bink-Boelkens, K.E. Niezen-Koning, et al., *3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in an infant with cardiomyopathy, in her brother with developmental delay and in their asymptomatic father*. Eur J Pediatr, 2000. **159**(12): p. 901-904.
85. Vogelstein, B. and D. Gillespie, *Preparative and analytical purification of DNA from agarose*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(2): p. 615-9.
86. Wang, C., A.F. Castro, D.M. Wilkes, and G.A. Altenberg, *Expression and purification of the first nucleotide-binding domain and linker region of human multidrug resistance gene product: comparison of fusions to glutathione S-transferase, thioredoxin and maltose-binding protein*. Biochem J, 1999. **338** (Pt 1): p. 77-81.
87. Wang, X., E.S. Wurtele, G. Keller, A.L. McKean, and B.J. Nikolau, *Molecular cloning of cDNAs and genes coding for beta-methylcrotonyl-CoA carboxylase of tomato*. J Biol Chem, 1994. **269**(16): p. 11760-8.
88. WB Muse, R.B., *The Amino-Terminal 100 Residues of the Nitrogen Assimilation Control Protein (NAC) Encode All Known Properties of NAC from Klebsiella aerogenes and Escherichia coli* Journal of Bacteriology, 1999. **Vol.181**: p. pp.934-940.
89. Weaver, L.M., L. Lebrun, A. Franklin, L. Huang, N. Hoffman, E.S. Wurtele, et al., *Molecular cloning of the biotinylated subunit of 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase of Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol, 1995. **107**(3): p. 1013-4.
90. Wiesmann, U.N., T. Suormala, J. Pfenninger, and E.R. Baumgartner, *Partial 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in an infant with fatal outcome due to progressive respiratory failure*. Eur J Pediatr, 1998. **157**(3): p. 225-229.
91. Wilkinson, D.L. and R.G. Harrison, *Predicting the solubility of recombinant proteins in Escherichia coli*. Biotechnology (N Y), 1991. **9**(5): p. 443-8.
92. Wood, H.G. and R.E. Barden, *Biotin enzymes*. Annu Rev Biochem, 1977. **46**: p. 385-413.
93. Woodbury, C.P., Jr., O. Hagenbuchle, and P.H. von Hippel, *DNA site recognition and reduced specificity of the Eco RI endonuclease*. J Biol Chem, 1980. **255**(23): p. 11534-48.
94. Wright, L.D., E.L. Cresson, H.R. Skeggs, R.L. Peck, D.E. Wolf, T.R. Wood, et al., *The elucidation of biocytin*. Science, 1951. **114**(2972): p. 635-6.
95. Yap, S., A.A. Monavari, P. Thornton, and E. Naughten, *Late-infantile 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency presenting as global developmental delay*. J Inherit Metab Dis, 1998. **21**(2): p. 175-6.

-
96. Zheng, X., L.E. Rosenberg, F. Kalousek, and W.A. Fenton, *GroEL, GroES, and ATP-dependent folding and spontaneous assembly of ornithine transcarbamylase*. J Biol Chem, 1993. **268**(10): p. 7489-93.
 97. Zytковicz, T.H., E.F. Fitzgerald, D. Marsden, C.A. Larson, V.E. Shih, D.M. Johnson, et al., *Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two-year summary from the New England Newborn Screening Program*. Clin Chem, 2001. **47**(11): p. 1945-1955.

10 Anhang

10.1 Alignment Analysen von Aminosäuresequenzen

10.1.1 Alignment der α -Untereinheiten von 3-MCC, PCC und PYC von *H.sapiens* (Paralogen-Alignment)

```

MCCAhs  1  MAAASAVSVLLVAAERNRWHRIPLSLLPERTWVWRQRTMKYTTATGRNITKVLIANRGEI
PCCAhs  1  -----MLSAALRTLKHVLY--YSRQCLMVSRNLGSGVGYDPNEKTFEKLIVANRGEI
PYChs   1  -----MLKFRTVHGGIR-LLGIRRTSTAPAASPNVRRLEYKFKIKVMVANRGEI

MCCAhs  61  ACRVMRTAKKLGVCQTVAYSEADRNSMHVIMADEAYSIG-PAPSCQSYLSMKLIQVAKT
PCCAhs  50  ACRVIRTCKKMGIKTVAIHSDVDASSVHVIMADEAVCVG-PAPTSKSYLNMIAIMEAIKK
PYChs   49  AIRVFRACTELGIQTVAYSECDTGMHRQFADEAYLIGRGLAPVQAYLHDPDIIVAKE

MCCAhs  120  SAAQATHPGCGFLSENMEFAELCKQEGITFIGPPSAIRDMGTKSTSKSITMAAGVPVVE
PCCAhs  109  TRAQAVHPGYGFLSENKEFARCLAEIVVFIGPDTHAIQAMGDKIESKLLAKKAEVNTIP
PYChs   109  NNVDVAVHPGYGFLSERADFAQACQDAGVDFIGPSPEVVRKMGDKVEARAIATAAGVPVVP

MCCAhs  180  GYHGEDCSDOCLKEHARIGYPVMIKAVRGGGKGMRIVRSEQEFQECLESARREAKKSF
PCCAhs  169  GFDGVRKDAEEAVRIAREIGYPVMIKASGGGKGMRIAWDDEETRDGFRLSSEQEAASSF
PYChs   169  GTDAFRTSLHEAHEFSNTYGFELIFKAAVGGGGRGMRVHSHHELEENYTRAYSEALAAF

MCCAhs  240  NDDAMLIEKFVDTPRHVEVQVEGDHGGNAVYLFERDCSVQRRHOKIIEEAPAPGKSEVR
PCCAhs  229  GDELLIEKFIDNPRHIEIQVLGDKHGNAIWNERECSIQRRNOKVVEEAPSIFLDAETR
PYChs   229  GNCALFVEKFIKPRHIEVQILGDQYGNITHLIERDCSIQRRHOKVVEIAPAHLDPQLR

MCCAhs  300  KKLGEAVRAAKAVNYVAGTVEFIMDSKNECFMEMNTRLQVEHPVTEMITGIDLVEWQ
PCCAhs  289  RAMGCAVQLARAVKYSAGTVEFLVDSKKNFYFLEMNTRLQVEHPVTECITGIDLVQEM
PYChs   289  TRLTSDSVLAKQVGYENAGTVEFLVDRGKHYFLEVNSRLQVEHTVTEIITDIDLVHAQ

MCCAhs  360  LRIAAG---EKIFLSQEEITLQGHAFERITYAEDPSNNF-MFVAGELVHLSHPRADPSTR
PCCAhs  349  IRVAKG---YPLRHQCADIRINGWAVECRVYAEADPYKSEGLPSIGRLSQVQEPHLHLPQVR
PYChs   349  IHVAEGRSLPDLGLRQENIRINGCAIQCRVTTEDPARSF-CEDTGRIEVRSQEGMGIRL

MCCAhs  416  IETGVRQGEVSVHYDPMIAKLYVWAADROAALTKLRYSLROYNIYGLPTNIDFILLNLSG
PCCAhs  406  VDSGIQEGSDISIIYDPMISKLITYGSDRTEALKRMADALDNYVIRGVTEHNIALREVI I
PYChs   408  DNASAFQGAVISPHYDSLIVKVIAGKDEPTAATKMSRALAEFRVRGVKTNIAFLQNVLN

MCCAhs  476  HPEFEAGNVHTDFIQHKKQLLSRKAANESLCOAALGLILKEKAMTDTFTLCAHDQFS
PCCAhs  466  NSRFVKGDLSTKFLSIVYPTGFKGHMLTKSEKNOLLAIASSLFFVAFQLRAQHFGENSRMP
PYChs   468  NQCFLAGVDTQFIDEN-PELEQLRFAQNRQAQKLLHYLGHVVMVNGPTTPIPVKASFSPTD

MCCAhs  536  PFSSSSG-----RRLNLSY
PCCAhs  526  VIKPDIAN-----WELSVKL
PYChs   527  PVVEAVPIGPPPAGFRDILLREGPEGFARAVRNHPGLLLMDTTFRDAHQSLLATRVRTHD

MCCAhs  550  TRNMTLKGKNNVAIAVTYNHD-----
PCCAhs  541  HDKVHTVVASNNGSVFSVPIVG-----
PYChs   587  LKKIAPVVAHNFSKLFSMENWGGATFDVAMRFLYECPWRLQELRELI PNIPFQMLLRGA

```

```

MCCAhs 572 -----
PCCAhs 563 -----
PYChs 647 NAVGYTNYPDNVVFKFCEVAKENGMDVFRVFDLSNLYLPNMLLGMEAAGSAGGVVEAAISY

MCCAhs 572 -----GSYSMCIEDKTFQVIGNTYS-----
PCCAhs 563 -----SKLNVSTWNLASPLLSVSV-----
PYChs 707 TGDVADPSTRTKYSLQYYMGLAEELVRAGTHILCIKDMAGLLKPTACTMLVSSLRDRFPDL

MCCAhs 592 -----
PCCAhs 583 -----
PYChs 767 FLHIHTHDTSGAGVAAMLACAQAGADVVDVAADSMGMTSQPSMGALVACTRGTPLDTEV

MCCAhs 592 -----EGDCTYLKCSVNGVASKAKLIILENT-----
PCCAhs 583 -----DGTQRTVQCLSREAGGNMSIQFLG-----
PYChs 827 PMERVPDYSEYEWEGARGLYAAFICATMKSGNSDVYENEIPGGQYTNLHFQAHSMGLGSK

MCCAhs 618 -----IYLSKEGSIEIDIEVFKYLSS-----
PCCAhs 607 -----T-VYKVNILTRIAEILNKFMLE-----
PYChs 887 FKEVKKAYVEANQMLGELIKVTFSSKIIVGDLAQCFMVQNGLSRAEAEAQAEEELSFPRSVVE

MCCAhs 640 -----
PCCAhs 628 -----
PYChs 947 FLQGYIGVPHGGFPEPFRSKVLKDLPRVEGRPGASLPPLDLQALEKELVDRHGEEVTPED

MCCAhs 640 -----
PCCAhs 628 -----
PYChs 1007 VLSAAMYPDVFAHFKDFATFGPLDSLNTLRFLOGPKIAEEFEVELELGRKTLHIKALAVS

MCCAhs 640 -----VSSQETQGGPLAPMIGTIEKVFVK-----
PCCAhs 628 -----KVTEDTSSVLRSPMPGVVVAVSVK-----
PYChs 1067 DLNRAGQRQVFFELNGQLRSILVKDQAMKEMHFHPKALRDVKGQIGAPMPGRVIDIKVV

MCCAhs 664 AGDKVKAGDSLVMVTAMKMEHTIKSPKDGTVKVFYREGAQANRHTPLVEEPEEESDKRE
PCCAhs 652 EGDVAEAGQETCVIEAMKMNSTAGKIGTVRSVHCOAGDTVGEGLLVELE-----
PYChs 1127 AGAKVARGQELCVLSAMKMETVVTSEMEGTVRKVHVTKDMTEGDDLILELE-----

MCCAhs 724 SE
PCCAhs --
PYChs --

```

10.1.2 Alignment der β -Untereinheiten von 3-MCC und PCC von *H.sapiens* (Paralogen Alignment)

```

MCCBhs 1 MWAVLRRLALRPCARASVAGPFRAYHGDSVASLGTQPDLSALYQENYKMKATVNLHERV
PCCBhs 1 MAAALRVAA-----VG-----AR-LSVLASGLRAAVRSLCSQATSVNERIENKR

MCCBhs 61 EHIKLGGEKARALHISRGKLLFRERIDNLLDPGSPFTELSQFAGYQLYDN-----EEV
PCCBhs 44 RTALLGGGQRIDAQHRGKLTARERISILLDPGS-FVESDMFVEHRCADFGMAADKNKF

MCCBhs 115 PGGGIITGIGRVSGVECMIIANDATVRGGAYYPVTVKQDRAQEIAMQNRLPCIYLVDSG
PCCBhs 103 PGDSVVTVGRGRINGRLVYVFSQDFTVEGGSLSGAHAQKICKIMDCAITVGAFVIGLINDSG

MCCBhs 175 GAYLPRQATVFPDRDHEGRTFYNOATMSKNIQAQAVVMGSCCTAGGAYVPAMADENIIVR
PCCBhs 163 GARIQEGVESLAG----YADIFLRNVTSAGVIFQISLIMGECAGGAVYSPALTDFTFMVK

MCCBhs 235 KQGTIFLAGPPLVKAMTCEEVSAEDLGGADLHCRKSGVSDHWALDDHHALHLTRKVVRL
PCCBhs 219 DTSYLFITGPDVVKSVINELVTCQELGGAKTHTTMSGVAHRAFENDVDALCNLRDFFNYL

MCCBhs 295 NYQKLDVTEPSEEP-LFPADELYGIVGANLKRSDVREVIARIVDGSRTTEFKAFYGD
PCCBhs 279 PLSSQDPASVRECHDPSDRLVPELDTIVPLESTKAYNMVDIIHSVVDEREPEEIMPNYAK

MCCBhs 354 TLVTGFARIFGYFVGVGN-----NGVLFSESAKKGTHFVQLCCQRNIPLFLQNIITGFM
PCCBhs 339 NIIVGFARMNGRTVGVGNQPKVASGGLDINSSVKGARFVRFCDAFNIPLTFVDVPGFL

MCCBhs 409 VGREYEAEGIAKDGAKMVAAVACAQVPKTIILIGGSYGAGNYGMCGRAYSPRFLYIWPNA
PCCBhs 399 PGTACEYGGIIRHGAKLIYAFAEATVPKVTVIITRKAYGGAYDVMSSKHLCGDTNYAWPTA

MCCBhs 469 RISVMGGEQAANVLAITTKDQRAREGKQFSSADEAALKPEI IKKFEENPNFYSSARVVD
PCCBhs 459 EIAVMG---AKGAVEIIFKGHEN-----VEAAQAEYIEKFNPEPAAVRGEV

MCCBhs 529 DGIIDPADTRLVIGLSFSAALNAFTERTDFGIFRM--
PCCBhs 503 DEIICPSSTRARICCDLDVLAASKVCFPWRKHANIPL

```

11 Abkürzungsverzeichnis

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
Amp ^R	Ampicillin-Resistenzgen
AP	Alkalische Phosphatase
As	Aminosäure(n)
BSA	Rinderserumalbumin
Cam ^R	Chloramphenicol-Resistenzgen
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
dd	Didesoxy-
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ExPASy	Expert Protein Analysis System
FCS	Fötale Kälberserum
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	9,81 m/s ²
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GST	Glutathion-S-Transferase
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
h	Stunde(n)
Hsp	Hitzeschockprotein
IPTG	Isopropylthio- β -D-Galactosid
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
MBP	Maltose-bindendes Protein
3-MCC	3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase
MCCA	Gen der α -Untereinheit
MCCB	Gen der β -Untereinheit
MCC α	α -Untereinheit der 3-MCC
MCC β	β -Untereinheit der 3-MCC
MCS	Multiple cloning site
min	Minute(n)
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino) Propansulfonsäure
MPP	Mitochondriale Prozessierungspeptidase
NGS	Neugeborenen-Screening
N-terminal	Aminoterminal
OD	Optische Dichte
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
P _i	anorganisches Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-Buffered-Saline-Puffer

PCC	Propionyl-CoA-Carboxylase
PYC	Pyruvat-Carboxylase
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNAse A	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
TBS	Tris-Saline-Puffer
TBS-T	Tris-Saline-Puffer mit Tween 20
TIM	Translokase der inneren Mitochondrienmembran
TOM	Translokase der äußeren Mitochondrienmembran
Tween	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
ÜS	Überstand
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
WT	Wildtyp

12 Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn PD Dr. Wulf Röschinger für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe promovieren zu dürfen. Seine engagierte Betreuung und seine wertvollen Ratschläge waren für das Entstehen dieser Arbeit von großer Bedeutung.

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an Dr. Sonja Stadler richten, unter deren Anleitung diese Arbeit entstand. Ihre Unterstützung, ihr fundiertes Wissen und die freundschaftliche Zusammenarbeit haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. A. A. Roscher danke ich für die Möglichkeit im Forschungszentrum Kubus zu arbeiten und für sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Ein großer Dank gilt Sylvia Heidenreich für ihre tatkräftige Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Laborarbeit.

Ulrich Schatz möchte ich für seine Hilfe und Geduld bei zahlreichen Computer- und Klonierungsproblemen danken.

Ein herzliches Dankeschön geht an die Mitarbeiter des Labors K0.21 für deren Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Abschließend möchte ich mich besonders bei meiner Familie bedanken, ohne deren Unterstützung und Rückhalt weder mein Studium noch diese Arbeit möglich gewesen wäre. Vielen Dank!

13 Lebenslauf

Name: Christoph Albert
Geburtsdatum: 21.04.1981
Geburtsort: Bad Mergentheim
Eltern: Dr. med. Rainer Albert
Irene Albert, geb. Westhofen

Schulbildung

1987-1991 Besuch der Grundschule Niedernhall
1991-2000 Besuch des Ganerben-Gymnasiums Künzelsau,
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zeitraum zwischen Schule und Studium

11/2000-8/2001 Freiwilligendienst in Israel
11/2001-3/2002 Freiwilligendienst in Indien

Studium

4/2002-12/2008 Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
6/2007-6/2008 Praktisches Jahr:
Innere Medizin; Krankenhaus München Schwabing
Chirurgie; Philippine General Hospital, Manila, Philippinen
Neurologie; Klinikum Harlaching, München
12/2008 Zweite Ärztliche Prüfung