

**Klonierung, rekombinante Expression und
Charakterisierung von Serpin1
aus *Branchiostoma lanceolatum***

Dissertation

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Technischen Fakultät
der Universität Bielefeld

von

Dipl.-Biol. Ulf Tödttmann

aus

Kirchlengern

2004

1. Gutachter: Prof. Dr. Herman Ragg
AG Zelluläre Genetik
Technische Fakultät, Universität Bielefeld

2. Gutachter: HD Dr. Karsten Niehaus
Lehrstuhl für Genetik, AG Phytopathologie
Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld

Tag der Disputation: 30.07.2004

Inhaltsverzeichnis

A Zusammenfassung	1
B Einleitung	2
B.1 <i>Branchiostoma lanceolatum</i>	2
B.2 Serpine.....	5
B.2.1 Struktur und Inhibitionsmechanismus.....	6
B.2.2 Physiologische Funktionen von Serpinen.....	9
B.3 Polyadenylierung.....	11
B.4 Sekretorischer Pfad und endoplasmatisches Rückführungssignal „KDEL“.....	14
B.5 Zielsetzung der Arbeit.....	19
C Material und Methoden	20
C.1 Material.....	20
C.1.1 Geräte.....	20
C.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	21
C.1.3 Kits.....	22
C.1.4 Dokumentation / Auswertung.....	23
C.1.5 <i>Branchiostoma lanceolatum</i>	23
C.1.6 Bakterienstämme.....	23
C.1.7 Nährmedien.....	24
C.1.8 Antibiotika.....	24
C.1.9 Enzyme	24
C.1.9.1 Restriktionsendonukleasen.....	24
C.1.9.2 Proteasen.....	25
C.1.9.2.1 Protease des Tabakätzvirus.....	25
C.1.9.2.2 Thrombin.....	26
C.1.9.3 Polymerasen.....	27
C.1.9.3.1 <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase.....	27
C.1.9.3.2 KOD Hot Start-DNA-Polymerase.....	27
C.1.9.3.3 KlenTherm-DNA-Polymerase.....	27
C.1.9.3.4 Klen- / <i>Pfu</i> -Polymerase-Mix.....	28
C.1.10 Antiseren.....	28
C.1.11 Plasmide.....	29
C.1.12 Primer.....	29
C.1.12.1 PCR-Primer.....	29
C.1.12.2 Sequenzierprimer mit IRD800-Markierung.....	30
C.1.13 Längenstandards.....	30
C.1.13.1 DNA-Längenstandards.....	30
C.1.13.2 Protein-Molekulargewichtsstandard.....	31
C.1.14 Allgemeines.....	32

C.2 Methoden.....	33
C.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	33
C.2.1.1 Isolierung von mRNA.....	33
C.2.1.2 Isolierung von Plasmiden.....	34
C.2.1.3 Quantitative DNA / RNA-Bestimmung mit dem Fotometer.....	35
C.2.1.4 Reverse Transkription von mRNA.....	36
C.2.1.5 Reverse Transkription von vollständigen mRNA-Enden.....	38
C.2.1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	41
C.2.1.7 PCR-Produkt-Aufreinigung und Konzentrierung.....	43
C.2.1.8 Agarose-Gelelektrophorese.....	43
C.2.1.9 Restriktionsspaltung.....	45
C.2.1.10 DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen.....	45
C.2.1.11 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4 DNA-Ligase.....	46
C.2.1.12 Zyklische Sequenzierung.....	46
C.2.1.13 Alignierung von DNA-Sequenzen.....	48
C.2.2 Umgang mit Bakterien.....	49
C.2.2.1 Kultivierung von Bakterien.....	49
C.2.2.1.1 Kultivierung auf Festmedien und Anlegen von Einzelkolonien	49
C.2.2.1.2 Kultivierung in Flüssigmedien.....	49
C.2.2.2 Anlegen von Glycerinkulturen.....	49
C.2.2.3 Klonierung mit dem TOPO TA Cloning Kit.....	50
C.2.2.3.1 „A-tailing“ von <i>Pfu</i> -PCR-Produkten.....	50
C.2.2.3.2 TOPO-Ligation in den Vektor pCR4-TOPO.....	50
C.2.2.3.3 Hitzeschock-Transformation.....	50
C.2.2.4 Elektro-Transformation.....	51
C.2.2.4.1 Herstellung elektrokompenter Zellen.....	51
C.2.2.4.2 Elektroporation	52
C.2.2.5 Proteinexpression.....	52
C.2.2.6 Zellaufschluss mittels French Press.....	53
C.2.3 Arbeiten mit Proteinen.....	53
C.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	53
C.2.3.2 Coomassiefärbung.....	55
C.2.3.3 Trocknen von Polyacrylamid-Gelen für die Dokumentation.....	56
C.2.3.4 Quantitative Proteinbestimmung mit dem Densitometer.....	56
C.2.3.5 Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen.....	56
C.2.3.6 Western-Blot.....	56
C.2.3.7 Chemilumineszenzdetektion.....	57
C.2.3.8 Komplexierung von Proteasen mit Serpin1	58
C.2.3.9 Proteinaufreinigung mittels „Fast Protein Liquid Chromatography“.....	59
C.2.3.10 Spaltung des Fusionsproteins mit der Protease des Tabakäzvirus.....	61

C.2.3.11 Entfernung von TEV-Protease und Glutathion-S-Transferase mittels Affinitätschromatografie.....	61
C.2.3.12 Dialyse.....	62
C.2.3.13 Lyse von tierischem Gewebe.....	63
C.2.4 Immunologische Methoden.....	63
C.2.4.1 Gewinnung von Antisera.....	63
C.2.4.2 Immunhistologische Färbung von Gefrierschnitten.....	64
C.2.4.2.1 Herstellung von Gefrierschnitten.....	64
C.2.4.2.2 Immunhistologische Färbung.....	65
C.2.4.2.3 Auswertung der immunhistologisch gefärbten Schnitte.....	65
C.2.5 Modellierung der Protein-Tertiärstruktur mit Swissmodel.....	65
D Ergebnisse.....	67
D.1 Identifizierung des 3'-Bereichs der cDNA von Serpin1.....	67
D.1.1 Isolierung von mRNA aus <i>Branchiostoma lanceolatum</i>	67
D.1.2 Reverse Transkription der mRNA.....	67
D.1.3 Kontrolle der cDNA-Integrität durch Calmodulin 2-spezifische PCR.....	67
D.1.4 Amplifizierung des 3'-Bereichs der cDNA für Serpin1.....	69
D.1.5 Klonierung der PCR-Produkte.....	72
D.1.6 Sequenzierung der Plasmide.....	73
D.2 Identifizierung der 5'-Bereiche der Serpin1-cDNAs.....	75
D.2.1 Reverse Transkription vollständiger mRNA.....	75
D.2.2 Kontrolle der cDNA-Integrität durch Calmodulin 2-spezifische PCR.....	75
D.2.3 Amplifizierung des 5'-Bereichs der cDNA von Serpin1.....	77
D.2.4 Klonierung des PCR-Produkts mit dem 5'-Bereich der cDNA von Serpin1.....	77
D.2.5 Sequenzierung des 5'-Bereichs der cDNA von Serpin1.....	78
D.2.6 Amplifikation des kodierenden Bereichs der cDNA von Serpin1.....	78
D.2.7 Versuche zur Amplifizierung des 5'-Bereichs der cDNA von Gruppe a.....	80
D.3 Analyse von Serpin1.....	81
D.3.1 Analyse der cDNA-Sequenz von Serpin1.....	81
D.3.2 Analyse der abgeleiteten Proteinsequenz von Serpin1.....	84
D.3.3 Modellierung der Tertiärstruktur von Serpin1.....	87
D.4 Gegenüberstellung der 3'-Bereiche der cDNA-Gruppen a und b.....	89
D.4.1 Gegenüberstellung der kodierenden Bereiche der cDNA.....	89
D.4.2 Gegenüberstellung der nicht translatierten Bereiche.....	92
D.5 Gewinnung von rekombinantem Serpin1.....	95
D.5.1 Konstruktion eines Plasmids zur Expression von rekombinantem Serpin1 als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase.....	95
D.5.2 Expression des Fusionsproteins.....	98
D.5.3 Aufreinigung des Fusionsproteins mittels Glutathion-Sepharose.....	101
D.5.4 Freisetzen von Serpin1 aus dem Fusionsprotein durch TEV-Proteaseverdau.....	104

D.5.5 Vergleich von Ni-NTA-Sepharose und TALON zur Entfernung der His ₆ -markierten Proteine.....	105
D.5.6 Dialyse.....	109
D.6 Nachweis der biologischen Aktivität von rekombinantem Serpin1.....	110
D.7 Charakterisierung von polyklonalen Antiseren gegen Serpin1.....	111
D.7.1 Auswahl der zu immunisierenden Kaninchen.....	111
D.7.2 Prüfung der polyklonalen Antiseren.....	112
D.8 Nachweis von Serpin1 in Gewebeextrakten von <i>Branchiostoma lanceolatum</i>	114
D.9 Versuche zur Serpin1-Lokalisation in <i>Branchiostoma lanceolatum</i> -Dünnschnitten..	115
E Diskussion.....	117
E.1 Isolierung und Identifizierung der cDNA von Serpin1.....	117
E.2 Polyadenylierungs-Varianten der Serpin1-cDNA.....	119
E.3 Das „cattt(a/c)ttt“-Element.....	120
E.4 Analyse der Aminosäuresequenz.....	122
E.5 Versuche zur phylogenetischen Einordnung.....	124
E.6 Expression von GST-Serpin1-Fusionsprotein und Aufreinigung von Serpin1.....	126
E.7 Nachweis der biologischen Aktivität.....	128
E.8 Gewinnung von spezifischen Antiseren.....	128
E.9 Identifizierung von Serpin1 und eines potentiellen Protease-Serpin1-Komplexes in <i>Branchiostoma lanceolatum</i> -Extrakten.....	128
E.10 Versuche zur Serpin1-Lokalisation in <i>Branchiostoma lanceolatum</i> -Dünnschnitten.	129
E.11 Mögliche Funktion von Serpin1.....	130
F Literaturverzeichnis.....	132
G Anhang.....	144
G.1 cDNA-Sequenz von Serpin1 mit abgeleiteter Proteinsequenz	144
G.2 Sequenzalignment der 3'-Bereiche von Gruppe a und b.....	146
G.3 Abkürzungsverzeichnis.....	148
G.4 Abbildungsverzeichnis.....	150
G.5 Tabellenverzeichnis.....	152
G.6 Danksagung.....	153

A Zusammenfassung

In dieser Arbeit ist es gelungen, die kompletten Sequenzen von 3 cDNA-Varianten des Serinprotease-Inhibitors Serpin1 (*Bl*-SPN1) von *Branchiostoma lanceolatum* ausgehend von einem von O. Krüger identifizierten PCR-Fragment zu isolieren und zu charakterisieren. Hierbei handelt es sich um die Erstbeschreibung eines Serpins aus diesem Organismus. Bei der Analyse der cDNAs (max. 2203 Bp) wurden 3 Polyadenylierungs-Varianten identifiziert. 11 - 13 Nukleotide 3'-terminal von den ersten beiden Polyadenylierungspositionen konnte ein bisher noch nicht beschriebenes „cattt(a/c)ttt“-Element festgestellt werden, das möglicherweise Einfluss auf die mRNA-Polyadenylierung hat.

Die abgeleitete Proteinsequenz aus 407 Aminosäuren weist bis zu 47% Ähnlichkeit mit Vertebraten-Serpinen auf und im Bereich der reaktiven Schleife (P17 - P2') ~74% mit dem inhibitorischen Serpin Antithrombin III. Des Weiteren wurden am N-Terminus von Serpin1 ein potentiell Signalpeptid sowie ein potentiell ER-Rückführungssignal mit der Aminosäureabfolge Lysin-Asparaginsäure-Glutaminsäure-Lysin festgestellt, das eine Lokalisation des Proteins im ER und in den Organellen des sekretorischen Pfads nahelegt.

Neben der vollständigen Serpin1-cDNA konnte ein 1262 Bp langes, 3'-terminales cDNA-Fragment mit ~94% Sequenzähnlichkeit auf Nukleotidebene bzw. ~97% auf Aminosäureebene zu Serpin1 isoliert werden. Auch bei diesem Fragment wurden 2 alternative Polyadenylierungspositionen identifiziert. Im Bereich der reaktiven Schleife konnte eine Häufung von Nukleotidsubstitutionen im Vergleich zur Serpin1-cDNA festgestellt werden, die jedoch alle ohne Einfluss auf die Aminosäuresequenz sind.

Serpin1 wurde rekombinant als GST-Fusionsprotein in *Escherichia coli* exprimiert und anschließend der Serpin1-Anteil in einem vierstufigen Verfahren abgespalten und in biologisch aktiver Form aufgereinigt (Wiederfindungsrate: ~60%; Ausbeute: 3,8 mg/L). Die Annahme, dass es sich bei Serpin1 um ein inhibitorisches Serpin handelt, wurde durch die Bildung SDS-stabiler Komplexe mit der Serinprotease Thrombin bestätigt. Zur Gewinnung von Antiseren wurden Kaninchen mit aufgereinigtem Fusionsprotein immunisiert und die Antiseren positiv auf ihre Spezifität gegenüber Serpin1 und dessen Komplexe mit Thrombin getestet. Mittels Westernblotanalysen konnte in Geweberohextrakten von *B. lanceolatum* endogenes Serpin1 mit einer Molekülgröße von ~62 kD nachgewiesen werden. Bei einer weiteren immunreaktiven Bande bei ~97 kD handelt es sich möglicherweise um den Komplex von Serpin1 mit einer natürlichen Zielprotease. Immunhistologische Untersuchungen von *B. lanceolatum* Dünnschnitten deuten auf ein möglicherweise weit verbreitetes Auftreten von Serpin1 in Geweben hin.

B Einleitung

B.1 Branchiostoma lanceolatum

Der Stamm der Chordata (Chordatiere) gliedert sich in 3 Unterstämme. Dies sind die Tunicata (Manteltiere), die Cephalochordata (auch Acrania, Schädellose) und die Vertebrata (Wirbeltiere) mit den Fische, Reptilien, Vögel und Säugern.¹ Die Chordata zeichnen sich durch 4 charakteristische morphologische Merkmale aus – die *Chorda dorsalis*, das Neuralrohr, den Kiemendarm und den muskulösen postanalen Schwanz. Die Angehörigen dieses Stamms sind morphologisch sehr verschieden, weisen die gemeinsamen Merkmale aber zumindest temporär - meist in der Embryonalentwicklung - auf. Bei der namensgebenden *Chorda dorsalis*, auch als Notochord bezeichnet, handelt es sich um ein langes, relativ steifes stabförmiges Gebilde aus großen flüssigkeitsgefüllten Zellen, die von fibrösem Gewebe umgeben sind. Sie ist in Funktion und Prinzip mit einem Hydroskelett vergleichbar. Die Chorda erstreckt sich fast über den ganzen Körper und bildet die zentrale Stützstruktur, an der auch die Muskelsegmente ansetzen. Bei den Vertebrata ist die *Chorda dorsalis* weitgehend zurückgebildet und findet sich z.B. nur noch als innerer Gallertkern der Bandscheiben zwischen den knöchernen Wirbelkörpern. Beim Stamm der Chordata liegt das Neuralrohr dorsal zur Chorda und ist in Bezug auf Entstehung und Position auf der dorsalen Körperseite einmalig. Aus dem Neuralrohr bildet sich das zentrale Nervensystem mit Gehirn und Rückenmark. Ventral zur Chorda findet sich der Kiemendarm. Dieser Verdauungskanal weist im Mundbereich mehrere paarige Kiemenspalten auf, durch die aufgenommenes Wasser den Mundraum (Schlund oder Pharynx) wieder verlassen kann. Bei vielen aquatisch lebenden, wirbellosen Chordata, die sich von Plankton ernähren, werden im Kiemenbereich die Nahrungspartikel aus dem vorbeiströmenden Wasser filtriert und dem Darm zugeführt. Über die Kiemen erfolgt bei den aquatischen Vertebrata zusätzlich auch der Gasaustausch. Bei den meisten Nicht-Chordata erstreckt sich der Verdauungstrakt bis zum Schwanzende und mündet dort in den After. Ein Merkmal der Chordata ist im Gegensatz hierzu der hinter dem After (postanal) gelegene muskulöse Schwanz, der vielfach der Fortbewegung im Wasser dient. Aus entwicklungsbiologischer Sicht sind die Cephalochordata von besonderem Interesse, da sie als die nächsten Verwandten der Vertebrata angesehen werden. In China entdeckte fossile

1 Campbell & Reece, 2003

Übergangsformen zwischen beiden Chordata-Unterstämmen und Vergleiche der Sequenzen von 18S-rRNA¹ und anderen Genen stützen diese Vermutung. Als entscheidende Schritte in der zu den Vertebrata führenden Entwicklung werden eine oder mehrere Genomverdopplungen postuliert, die erst nach der Trennung vom gemeinsamen Vorfahren mit den Cephalochordata aufgetreten sind.²

Der Unterstamm der Cephalochordata besteht aus nur einer Familie - den *Branchiostomidae*, die in die Gattungen *Branchiostoma* und *Epigonichthys* mit insgesamt 29 Spezies unterteilt wird.³ Die *Branchiostomidae* werden wegen ihrer skalpellähnlichen Form auch als Lanzettfischchen bezeichnet. Im angelsächsischen Sprachraum ist für die Gattung *Branchiostoma* auch die Bezeichnung „Amphioxus“ gebräuchlich, die sich auf den nicht mehr verwendeten Speziesnamen *Amphioxus lanceolatum*⁴ bezieht. Die Verwendung des Begriffs ist aber nicht einheitlich und die Bezeichnung wird auch häufig für die Spezies *B. belcheri*, *B. californiense*, *B. floridae*, *B. lanceolatum* bzw. als nicht näher definierter Gattungsname (*B. sp.*) verwendet.

Branchiostoma lanceolatum ist das zuerst beschriebene Mitglied der Lanzettfischchen⁵ und zeigt von allen Mitgliedern dieser Familie die weiteste Verbreitung.³ Die Hauptvorkommen erstrecken sich entlang der europäischen Küsten von Nordsee, Atlantik und Mittelmeer. Aber auch vor Ostafrika und im indischen Ozean ist das Tier beobachtet worden. *B. lanceolatum* ist als Meeresbewohner auf den sandigen Grund flacher Küstengebiete angewiesen und daher in der Verbreitung lokal begrenzt. An den wenigen Orten, an denen es sich ansiedelt, kann die Populationsdichte aber bis zu 5000 Tiere / m² erreichen.⁶ *B. lanceolatum* erreicht eine Körperlänge von etwa 5 cm⁷ und hat eine Lebenserwartung von ca. 3 Jahren. Die getrennt geschlechtlichen Tiere sind nach 4 Wochen ausgewachsen und nach 2 weiteren Wochen geschlechtsreif. Obwohl *B. lanceolatum* zu fischähnlichen Schwimmbewegungen in der Lage ist, ist die Lebensweise halbsessil und das Tier verbringt die meiste Zeit fast vollständig schräg im Sand eingegraben, wobei Kopf und Bauch nach oben zeigen (Abb. 1).

1 Wada & Satoh, 1994

2 Ohno, 1970; Holland *et al.*, 1994; Panopoulou *et al.*, 2003

3 Poss & Boschung, 1996

4 Yarrel W., 1836 (zitiert bei Poss & Boschung, 1996)

5 Pallas P. S., 1774; Costa O.G., 1834; Yarrel W., 1836 (alle zitiert bei Poss & Boschung, 1996)

6 Campbell & Reece, 2003

7 Wehner & Gehring, 1995

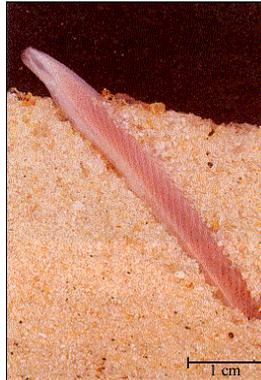


Abbildung 1: *Branchiostoma lanceolatum*

Das Foto zeigt ein im Sand eingegrabenes Tier. Kopf und Bauch zeigen nach oben (aus Campbell & Reece, 2003).

B. lanceolatum ernährt sich strudelnd, d.h. die Tiere erzeugen mit ihren Mundcirren (Abb. 2) einen Wasserstrom, mit dem die Nahrungspartikel an den Kiemenspalten vorbeigeführt werden. Hier werden sie mit Hilfe von Schleim aus dem Wasser herausfiltriert und dem Darm zugeführt. Das Wasser gelangt nach dem Passieren der Kiemenspalten in den Peribranchialraum und verlässt den Körper über den Atrioporus.

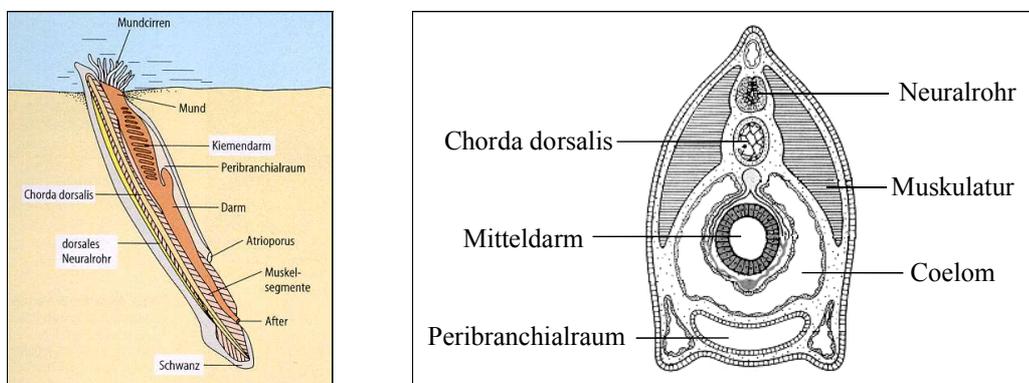


Abbildung 2: Schematischer Längs- und Querschnitt von *Branchiostoma lanceolatum*

Der Querschnitt zeigt den Bereich des Mitteldarms. Die Segmentierung der Muskulatur ist nicht dargestellt (aus Campbell & Reece, 2003; bzw. Wehner & Gehring, 1995).

Im Vergleich zu den Vertebrata ist *B. lanceolatum* deutlich einfacher aufgebaut. Das Exkretionssystem besteht aus Protonephridien und an Stelle von Augen hat *B. lanceolatum*

entlang des Rückenmarks angeordnete Pigmentbecherocellen.¹ Das Gehirn ist nicht gegliedert, sondern besteht nur aus einem Cerebralbläschen am vorderen Ende des Neuralrohrs. Es fehlt ein schützender Schädel, worauf auch die Bezeichnung „Cephalochordata“ oder „Schädellose“ für diesen Unterstamm basiert. Ein geschlossenes Blutgefäßsystem ist vorhanden, jedoch kein Herz. Die Pumpfunktion wird von Kiemenherzen (Bulbilli), kontraktilen Erweiterungen an der Basis der Kiemengefäße, übernommen.

B.2 Serpine

Bei den Serpinen handelt es sich um eine Superfamilie von Proteinen, der zur Zeit etwa 500 Mitglieder zugeordnet werden.² Serpine konnten bisher in allen höheren Organismen identifiziert werden, darunter Nematoden, Wirbeltiere, Insekten und Pflanzen, aber auch in einzelligen Eukaryoten (Genomprojekt von *Giardia lamblia* / O. Krüger, persönliche Mitteilung), einzelnen Prokaryoten und Viren.³ Der Name der Familie ist von der Fähigkeit der meisten Serpine abgeleitet, Serinproteasen zu inhibieren.⁴ Manche Familienmitglieder hemmen Cysteinproteasen oder weisen keine inhibitorischen Eigenschaften auf, wie z.B. Angiotensinogen. Serpine sind an einer Vielzahl von fundamentalen physiologischen Prozessen beteiligt, wie Blutgerinnung, Komplementaktivierung, Fibrinolyse, Angiogenese, Entzündungsreaktionen, Tumorsuppression, Hormonbindung oder als Chaperone bei der Proteinfaltung.⁵ Serpine sind einkettige Proteine mit etwa 350 - 500 Aminosäuren. Das Molekulargewicht beträgt ca. 40 - 60 kD. Obwohl die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen der Serpine teilweise nur 25% beträgt, sind die bisher bekannten Tertiärstrukturen hochkonserviert.⁶ Phylogenetische Untersuchungen auf Grundlage der Sequenzen und chromosomaler Lokalisation teilten die Familie in 16 Gruppen ein.⁷ Bezeichnet werden die Gruppen mit den Großbuchstaben A - P und jedes einzelne Mitglied mit einer fortlaufenden Nummer. Eine weitere Unterteilung der Vertebrata-Serpine in 6 Gruppen auf Grund der Exon-

1 Wehner & Gehring, 1995

2 van Gent *et al.*, 2003

3 Irving *et al.*, 2002

4 Carrell & Travis, 1985

5 Silverman *et al.*, 2001

6 Gettins, 2002

7 Irving *et al.*, 2000

Intron-Strukturen der Gene, sowie diagnostischer Aminosäuren wurde von Atchley *et al.*¹ und Ragg *et al.*² eingeführt.

B.2.1 Struktur und Inhibitionsmechanismus

Die Tertiärstruktur der Serpine ist gekennzeichnet durch 3 β -Faltblätter (sA - sC) und 8 - 9 α -Helizes (hA - hI) (Abb. 3).³ Das zentrale Element des Moleküls bildet Faltblatt sA, das im ungespaltenen Serpin aus 5 Strängen (s1A, s2A, s3A, s5A und s6A) besteht. Die Faltblätter sB und sC setzen sich aus 6 bzw. 4 kürzeren Strängen zusammen.

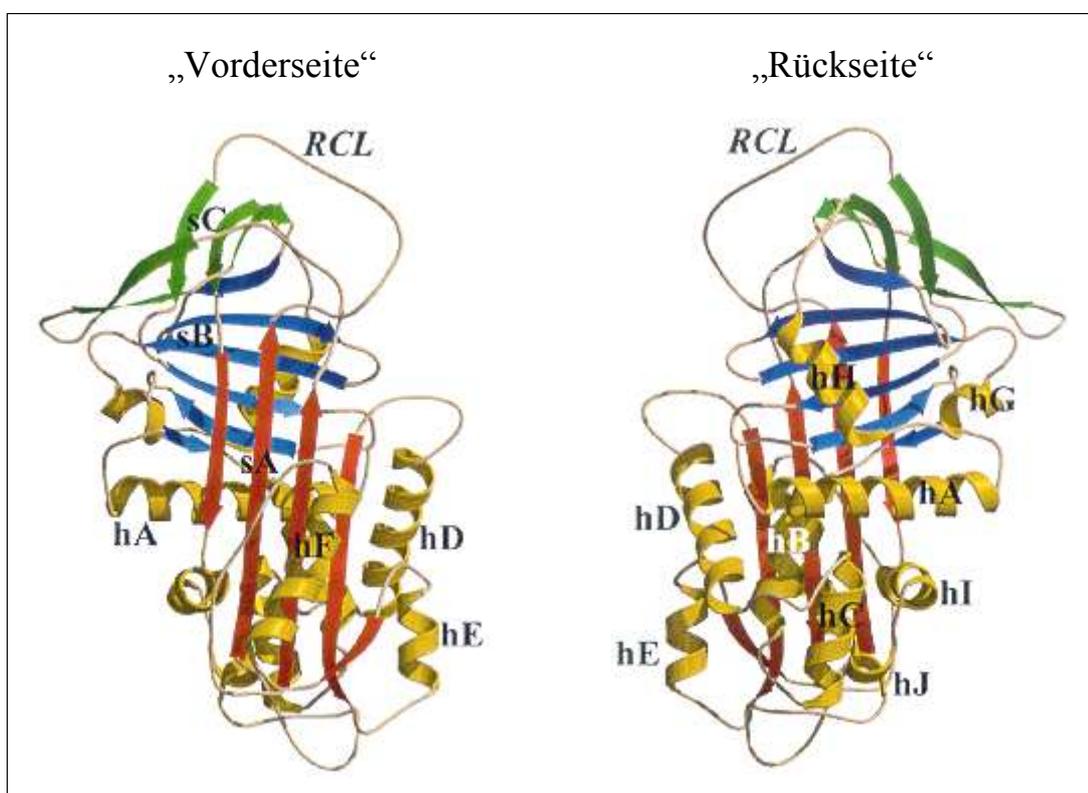


Abbildung 3: Molekülstruktur eines Serpins

Darstellung der Tertiärstruktur eines Serpins am Beispiel des α_1 -Antitrypsins in „Vorder-“ bzw. „Rückansicht“. β -Faltblätter: rot (sA), blau (sB) und grün (sC); α -Helizes hA - hI: gelb. Die 5 Stränge von β -Faltblatt A (s1A, s2A, s3A, s5A und s6A) sind in der Vorderansicht von rechts nach links abgebildet (aus Gettins, 2002).

1 Atchley *et al.*, 2001

2 Ragg *et al.*, 2001

3 Huber & Carrell, 1989; Gettins, 2002

Das biologisch aktive Zentrum eines Serpins ist die reaktive Schleife („reactive center loop“, RCL), die Strang 5 von Faltblatt A (s5A) mit Strang 1 von Faltblatt C (s1C) verbindet. Der exponierte RCL fungiert als Pseudosubstrat für Serin- bzw. Cysteinproteasen, die den RCL zwischen den Positionen P1 und P1' spalten. Die Nomenklatur geht auf Schechter und Berger¹ zurück und bezeichnet die Aminosäuren auf der N-terminalen Seite der Spaltstelle (reaktives Zentrum, „reactive site“) mit Pn und auf der C-terminalen mit Pn' von der Spaltstelle aus gezählt. Die Sequenz und Konformation des RCL haben einen maßgeblichen Einfluss auf die Funktionalität und Spezifität eines Serpins, insbesondere die Aminosäure an Position P1 ist wichtig für die Proteasespezifität.² Der Aufbau des RCL ist innerhalb der Serpin-Familie hoch variabel und ermöglicht die Hemmung eines weiten Spektrums von Zielproteasen.

Die Reaktion zwischen einem Serpin und einer Protease kann nach dem „branched-pathway“-Modell³ in mehrere Teilschritte unterteilt werden (Abb. 4). Im ersten Schritt erkennt die Serinprotease (E) die reaktive Schleife des Serpins (I) als Pseudosubstrat und bindet diese reversibel in der Substratbindetasche. Beide Proteine bilden einen so genannten Michaeliskomplex (E•I). Der Komplex kann wieder dissoziieren oder die Protease spaltet den RCL an der P1-Position unter Ausbildung eines kovalenten Acyl-Enzym-Intermediats (E•I'). An diesem Punkt gibt es 2 Möglichkeiten zur Fortsetzung der Reaktion. Beim nicht inhibitorischen Pfad wird der „Mechanismus der katalytischen Triade“ der Serinproteasen⁴ beendet. Dies führt zur Regenerierung der Protease durch Deacylierung und Freisetzung des gespaltenen Serpins (I*). In der inhibitorischen Reaktion lagert sich der gespaltene N-terminale RCL-Anteil zwischen Strang s3A und s5A als Strang s4A in das β -Faltblatt A ein. Dies bezeichnet man auch als S→R-Übergang⁵ („stressed“ → „relaxed“), worunter der Wechsel von einer thermodynamisch ungünstigen, „gespannten“ Konformation in eine thermodynamisch günstigere, „entspannte“ Struktur verstanden wird.⁶ In Folge dieses Vorgangs erfährt die kovalent an den RCL gebundene Protease eine Translokation von etwa 70 Å an das andere Ende des Inhibitors und wird gegen das Serpinmolekül gepresst.⁷ Hierbei

1 Schechter & Berger, 1967

2 Carrell & Travis, 1985

3 Gettins *et al.*, 1996; Gettins, 2002

4 Genest & Ptak, 1982; Lehninger *et al.*, 1994

5 Carrell & Owen, 1985

6 Bruch *et al.*, 1988

7 Huntington *et al.*, 2000

kommt es zu Strukturveränderungen in ~40% des Moleküls. Dies führt auch zur Deformation der Substratbindetasche mit der katalytischen Triade des aktiven Zentrums, die damit ihre Funktionsfähigkeit einbüßt. Die Inaktivierung der Protease verhindert die Deacylierungsreaktion und damit Regenerierung der Protease durch Freisetzen des gespaltenen Serpins. *In vitro* zerfällt der Enzym-Inhibitor-Komplex ($E \cdot I^\dagger$) innerhalb von Stunden bis Wochen wieder in seine Bestandteile (aktive Protease (E) und gespaltenes inaktives Serpin (I^*)), *in vivo* wird er innerhalb von Minuten abgebaut.

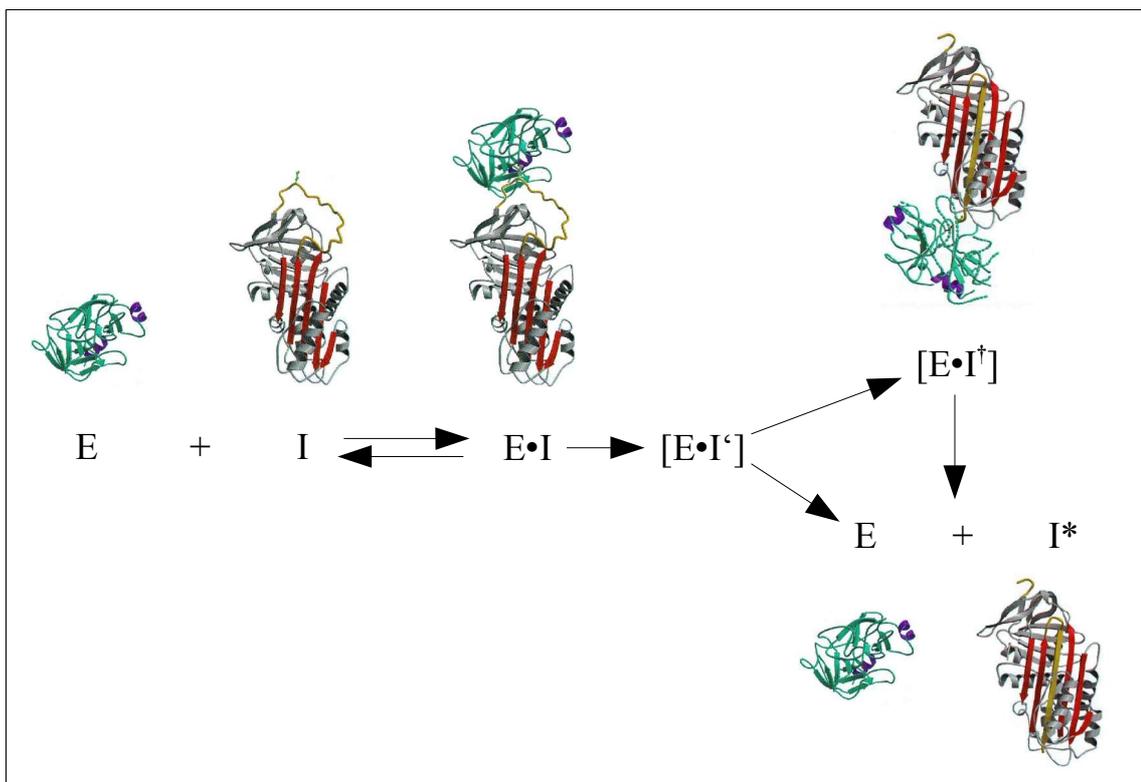


Abbildung 4: „Branched pathway“-Modell

Beispiel des „branched-pathway“-Modells an Hand der Inhibierungsreaktion von Trypsin (Serinprotease; zyan, violett) durch α_1 -Antitrypsin (Serpine: grau; reaktive Schleife: gelb; β -Faltblatt SA: rot) (nach Gettins *et al.*, 1996 und Huntington *et al.*, 2000; aus Krüger, 2003).

Die Länge des RCL beträgt etwa 20 - 25 Aminosäuren, wovon sich bis auf wenige Ausnahmen 17 der Aminosäuren N-terminal zur Spaltstelle finden.¹ Die konservierte Länge

¹ Gettins, 2002

des N-terminalen Bereichs hat vermutlich einen wichtigen Einfluss auf die Deformation der Protease, wenn diese an den Kern des Serpins gepresst wird. Von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche Hemmreaktion ist die Fähigkeit des RCL zur Insertion in das Faltblatt sA.¹ In diesem Zusammenhang sind die Positionen der Gelenkregion (Positionen P15 – P7) hervorzuheben. Sie sollten mit kleinen Aminosäuren besetzt sein, um eine Insertion des RCL zu ermöglichen. Bevorzugt befinden sich an den Positionen P15 Glycinreste und an den Positionen P12 – P7 Alaninreste.² Überschreitet der RCL eine kritische Länge, kann er auch im ungespaltenen Zustand partiell in das Faltblatt sA inserieren. Dieser Zustand wird als latent bezeichnet und das Serpin ist in dieser Form inaktiv, kann aber seine reaktive Form mit exponiertem RCL wieder einnehmen. Serpine können somit in drei Formen vorliegen - reaktiv mit exponiertem RCL, latent mit partiell inseriertem RCL und inaktiv mit gespaltenem RCL.³

B.2.2 Physiologische Funktionen von Serpinen

Proteasen werden häufig in Form einer inaktiven Vorstufe gebildet, als so genannte Zymogene.⁴ Diese werden erst durch proteolytische Spaltung aktiviert, die zum Teil auch autokatalytisch erfolgt. Da Proteasen an sehr vielen Stoffwechselfvorgängen beteiligt sind, ist ihre ausgewogene physiologische Regulation von entscheidender Bedeutung für das Überleben eines Organismus. Ein Teil dieses Kontrollapparats sind die Serpine, wodurch der starke Einfluss dieser Proteinfamilie auf eine Vielzahl von physiologischen Vorgängen erklärt wird (Abb. 5). Des Weiteren fungieren Serpine als Hormontransporter (z.B. „Thyroxinbindendes Globulin“, TBG⁵) oder als Chaperon („Hitzeschockprotein 47“, HSP47⁶).

Zur Entstehung einiger Krankheitsbilder kommt es neben dem Verlust der Inhibitionsfähigkeit durch Veränderungen des RCL, auch durch die Polymerisation von mutierten Serpinen.⁷ Hierbei inseriert die ungespaltene reaktive Schleife eines Serpinmoleküls in das β -Faltblatt A eines anderen Serpinmoleküls und es entsteht ein sogenanntes „loop-sheet-Polymer“. Ein Beispiel hierfür sind Leberzirrhosen und Lungenemphyseme, die durch Akkumulation von

1 Huntington *et al.*, 2000

2 Irving *et al.*, 2000

3 Whisstock *et al.*, 1998

4 Lehninger *et al.*, 1994

5 Gettins *et al.*, 1996

6 Clarke *et al.*, 1991; Nagata, 1998

7 Lomas & Carrell, 2002

polymerisiertem α_1 -Antitrypsin im endoplasmatischen Retikulum von Leberzellen hervorgerufen werden.¹

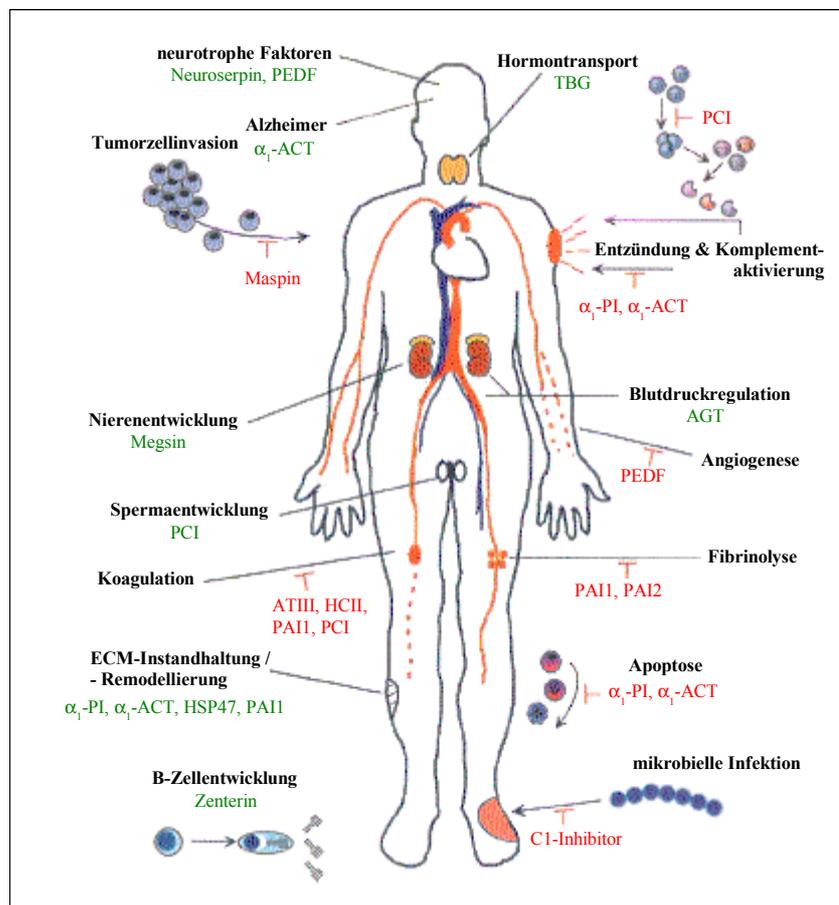


Abbildung 5: Biologische Funktionen einiger humaner Serpine

Humane Serpine sind an einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt. Einige Serpine (grün) wirken hierbei durch Protease-Inhibition (rot).

α_1 -ACT: α_1 -Antichymotrypsin, AGT: Angiotensinogen, ATIII: Antithrombin III, HCII: Heparinkofaktor 2, HSP47: Hitzeschockprotein 47 kD, PAII: Plasminogenaktivator-Inhibitor-1, PAI2: Plasminogenaktivator-Inhibitor-2, PCI: Protein C-Inhibitor, PEDF: „pigment epithelium-derived factor“, α_1 -PI: α_1 -Protease-Inhibitor, TBG: Thyroxin-bindendes Globulin; ECM: extrazelluläre Matrix (nach Silverman *et al.*, 2001).

¹ Lomas *et al.*, 1992; Lomas *et al.*, 1993

Die Einlagerung einer reaktiven Schleife kann auch in β -Faltblatt-Strukturen anderer Proteine erfolgen. Dies ist unter anderem bei der Alzheimer-Krankheit beobachtet worden, wo es zur Insertion des RCL von α_1 -Antichymotrypsin in ein Falblatt des β -Amyloid-Proteins kommt.¹ Die Aufklärung der Serpin-Funktionen in anderen Organismen steht erst am Anfang. Vom Serpin Nec („necrotic“) der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ist bekannt, dass es an der Regulation der Toll-vermittelten Immunantwort beteiligt ist.² Das Serpin *Bm*-SPN-2 des parasitären Nematoden *Brugia malayi* dient vermutlich dem Schutz vor Wirts-Proteasen³, wogegen das Serpin *Cm*-PS-1 des Riesen Kürbis *Cucurbita maxima* an der Abwehr von Parasiten mitwirkt.⁴

B.3 Polyadenylierung

Im Jahr 1976 identifizierten Proudfoot und Brownlee beim Vergleich der zu jener Zeit bekannten eukaryotischen mRNA-Sequenzen eine Abfolge von 6 Nukleotiden, die in allen Sequenzen auftrat. Die Nukleotidfolge „auaaaa“ erwies sich als generelles Signal für die Spaltung und Polyadenylierung von prä-mRNAs.⁵ Dieses Polyadenylierungssignal initiiert die Spaltung der prä-mRNA 12 - 30 Nukleotide stromabwärts des Signals an einem „ca“-Dinukleotid, auf das direkt eine „gu“-reiche Region folgt.⁶ Das Spaltensignal wird durch den „Spaltung- und Polyadenylierung-stimulierenden Faktor“ („cleavage and polyadenylation stimulation factor“, CPSF) erkannt und die „gu“-reiche Region durch den „Spaltung-stimulierenden Faktor“ („cleavage stimulation factor“, CstF) (Abb. 6). In Verbindung mit den Spaltungsfaktoren 1 und 2 („cleavage factors“, CF1 und CF2) erfolgt schließlich die Spaltung der prä-mRNA. An den 3'-Terminus der mRNA werden anschließend ca. 200 Adeninreste durch die Poly(A)-Polymerase (PAP) angefügt. Das Polyadenylierungssignal vermittelt nicht nur die Polyadenylierung, sondern terminiert auch gleichzeitig die prä-mRNA-Synthese durch die RNA-Polymerase II. Alle oben genannten Faktoren sind mit der C-terminalen Domäne der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II (Pol II-CTD) assoziiert, wodurch die Spaltungs-

1 Eriksson *et al.*, 1995

2 Robertson *et al.*, 2003

3 Zang *et al.*, 1999

4 Yoo *et al.*, 2000

5 Proudfoot & Brownlee, 1976

6 Colgan & Manley, 1997; Proudfoot, 2001

und Polyadenylierungs-Reaktionen deutlich beschleunigt werden.¹ Die gesamte Polyadenylierungs-Maschinerie besteht aus mindestens 6 multimeren Proteinfaktoren und steht im Zusammenhang mit weiteren, die prä-mRNA modifizierenden Prozessen, wie dem Anfügen der Kappe und dem Spleißen.²

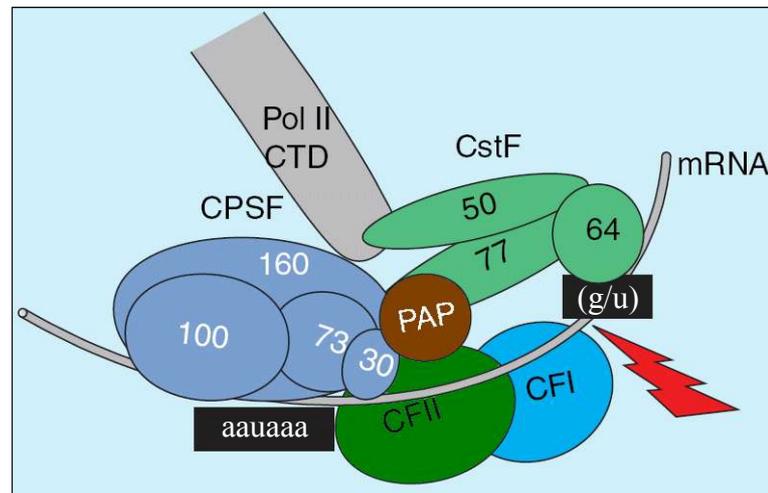


Abbildung 6: Darstellung der an der Polyadenylierung beteiligten Faktoren

Die Erkennung des Polyadenylierungssignals „aaupaaa“ erfolgt durch den „Spaltung- und Polyadenylierung-stimulierenden Faktor“ (CPSF, grau-blau), während die „gu“-reiche Region durch den „Spaltung-stimulierenden Faktor“ (CstF, hellgrün) erkannt wird. In Verbindung mit den Spaltungsfaktoren 1 und 2 (CF1 bzw. CF2, blau bzw. grün) und der C-terminalen Domäne (Pol II-CTD, grau) der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II wird die prä-mRNA an dem „ca“-Dinukleotid vor der „gu“-reichen Region gespalten (roter Pfeil). Direkt im Anschluß wird von der Poly(A)-Polymerase (PAP, braun) eine Abfolge von etwa 200 Adeninresten angefügt. Die Faktoren CPSF und CstF sind mit ihren Untereinheiten und ihren Größen [kD] abgebildet (aus Proudfoot & O'Sullivan, 2002).

Eine 3'-terminale Poly(A)-Sequenz ist für die Funktion einer mRNA von entscheidender Bedeutung, denn nur mit ihr wird sie aus dem Kern ins Cytoplasma exportiert. Nicht polyadenylierte mRNA wird dagegen schnell im Kern degradiert.³ Die Poly(A)-Sequenz hat auch einen direkten Einfluss auf die Translation. Im Cytoplasma bindet das „Poly(A)-

1 Hirose & Manley, 1998

2 Proudfoot *et al.*, 2002

3 Bousquet-Antonelli *et al.*, 2000

bindende Protein I^c („poly(A) binding protein I^c, PABPI) an die Poly(A)-Sequenz und unterstützt die Anlagerung von Ribosomen an die Kappe der mRNA.¹ Auch eine veränderte Position der Polyadenylierungsstelle kann unter Umständen Folgen für die Proteinsynthese haben. Dies manifestiert sich in Krankheiten wie der Thalassämie - einer besonders im Mittelmeerraum und Vorderasien verbreiteten autosomal-rezessiven Erbkrankheit, die sich in Hämoglobinopathien in Folge zu geringer Synthese der α - bzw. β -Globinketten äußert.² Bei einer Form dieser Erkrankung wird das Polyadenylierungssignal der ersten von 2 aufeinander folgenden Kopien der α - bzw. β -Globingene auf Grund von Punktmutationen innerhalb der Signalsequenz nicht erkannt. Die Terminierung der mRNA-Synthese erfolgt erst um bis zu 900 Nukleotide weiter 3'-terminal³ und wirkt sich störend auf die Transkription der zweiten direkt nachfolgenden Genkopie aus.⁴ Derartige Erkrankungen und Mutationsstudien⁵ machen den Einfluss der Polyadenylierungssignal-Sequenz auf Effizienz von Spaltung und Polyadenylierung der prä-mRNA deutlich.

Neue Daten aus Sequenzierprojekten von cDNA-Fragmenten verschiedener Vertebrata zeigen aber, dass neben dem klassischen Polyadenylierungssignal mit der Sequenz „auaaaa“ (bzw. „auuuaa“) noch andere divergierende Signalsequenzen auftreten, die in 1 bzw. 2 Nukleotiden von der klassischen Sequenz abweichen. Eine kurze Übersicht geben MacDonald & Redondo.⁶ Die verschiedenen Analysen zeigen, dass die Sequenz „auaaaa“ ~58% der ausgewerteten Polyadenylierungssignale ausmacht und die Sequenz „auuuaa“ ~12%. Divergierende Sequenzen wurden bei ~30% der cDNA-Fragmenten festgestellt. Die Abweichungen von diesen Durchschnittswerten können aber bei verschiedenen Spezies zum Teil beträchtlich sein. So beträgt der Anteil an divergierenden Polyadenylierungssignalen bei der Maus 66%.⁷

Die Diskrepanzen im häufigen Auftreten von Sequenzvarianten (s. Maus) und den Auswirkungen von Punktmutationen in Einzelfällen (s. Thalassämien) zeigen, dass eine Abschätzung der physiologischen Folgen von Veränderungen im Polyadenylierungssignal nicht ohne weiteres möglich ist.

1 Sachs *et al.*, 1997

2 Pschyrembel, 2002

3 Higgs *et al.*, 1983; Orkin *et al.*, 1985

4 Higgs *et al.*, 1989

5 Sheets *et al.*, 1990

6 MacDonald & Redondo, 2002

7 Graber *et al.*, 1999

B.4 Sekretorischer Pfad und endoplasmatisches Rückführungssignal „KDEL“

Die prozessierte, reife mRNA wird aus dem Zellkern ins Cytoplasma exportiert, wo die Information der mRNA an den Ribosomen in ein Protein translatiert wird.¹ Sezernierbare lösliche Proteine und Membranproteine enthalten an ihrem N-Terminus eine charakteristische Aminosäuresequenz, die als Signalpeptid fungiert. Das Signal wird vom „signal recognition particle“ (SRP) erkannt, das an den SRP-Rezeptor in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) bindet und so die Ribosomen mit der mRNA an die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) führt. Dies ist der Ausgangspunkt des so genannten „sekretorischen Pfads“², der sich über den Golgi-Apparat bis zur Zellmembran fortsetzt. Er dient der Modifikation und Sortierung von Proteinen, von denen ein großer Teil sezerniert wird. Die einzelnen Kompartimente unterscheiden sich in ihren spezifischen Umgebungsbedingungen und ihren Enzymausstattungen für die verschiedenen Protein-Modifikationen. Die von den Ribosomen synthetisierte Aminosäurekette wird direkt durch Kanäle ins Lumen des ER sezerniert. Kotranslational erfolgt bei entsprechend markierten Proteinen die N-glykosidische Kopplung von Oligosaccharidketten³ und die Ausbildung von korrekten Disulfidbrücken durch z.B. die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI). Das Signalpeptid hat nach dem Transfer des neuen Proteins ins ER-Lumen seine Funktion erfüllt und wird durch eine Signalpeptidase abgespalten. Die verbliebene Aminosäurekette nimmt noch während der Synthese ihre Tertiärstruktur ein. Zur Gewährleistung der korrekten Proteinfaltung dient eine aufwendige Qualitätskontrolle (QC), die in eine „primäre“ und eine „sekundäre“ QC unterteilt wird.⁴ Die primäre QC dient der allgemeinen Proteinfaltung. Teil des Systems sind Chaperone, wie z.B. das „binding protein“ (BiP), die an die wachsende Aminosäurekette binden und bei der Faltung assistieren. BiP erkennt auch hydrophobe Bereiche auf der Proteinoberfläche nicht korrekt gefalteter Proteine und führt diese der ER-assoziierten Degradation (ERAD) zu. Bei der ERAD werden die nicht korrekt gefalteten Proteine aus dem ER ins Cytosol exportiert, mit einer Ubiquitinmarkierung versehen und letztendlich in Proteasomen abgebaut. Die Chaperone Calreticulin bzw. Calnexin

1 Campbell & Reece, 2003

2 Palade, 1975; Lippincott-Schwartz *et al.*, 2000; Alberts *et al.*, 2004

3 Abeijon & Hirschberg, 1992; Kelleher *et al.*, 1992

4 Ellgard *et al.*, 1999; Trombetta & Parodi, 2003

identifizieren an Hand der N-Glykosylierung nicht korrekt gefaltete Proteine, worauf hin diese erneut dem Faltungsprozess unterworfen oder in der ERAD abgebaut werden. Die sekundäre QC zeichnet sich durch Chaperone aus, die auf die spezifische Interaktion mit einzelnen Proteinen zugeschnitten sind. Eins dieser Chaperone ist das Serpin „heat shock protein 47 kD“¹ (HSP47) bzw. das vermutliche humane Pendant „collagen binding protein 2“² (CBP2). HSP47 ist beteiligt an der Kollagen-Reifung und zeigt die höchste Affinität zur 3-fach helikalen Form des Prokollagens³. Die eigentliche Funktion von HSP47 ist noch nicht geklärt, aber es ist von essentieller Bedeutung, wie das Absterben von Mausembryonen ohne funktionsfähiges HSP47-Gen zeigt.⁴

Die neu synthetisierten und prozessierten Proteine werden unter Beteiligung des „coating protein complex 2“ (COPII) in Vesikel verpackt und diese aktiv entlang der Tubuli zum Golgi-Apparat transportiert. Auf ihrem Weg verlieren die Vesikel ihre COPII-Hülle und verschmelzen zu größeren Einheiten - den vesikulären tubulären Clustern (VTC), die dann in der Golgi-Membran aufgehen (Abb. 7). Der Golgi-Apparat wird in 3 Bereiche unterteilt - cis-Golgi-Netzwerk (CGN), Golgi-Stapel mit mindestens 3 Zisternen und trans-Golgi-Netzwerk (TGN). Vereinfacht kann gesagt werden, dass am CGN die Vesikel vom ER mit der Membran verschmelzen, in den Golgistapeln weitergehende Modifikationen der Proteine meist in Bezug auf die Glykosylierungen erfolgen (wie Modifizierungen der N-glykosidisch gekoppelten Oligosaccharidketten und schrittweise Synthese von O-glykosidisch gekoppelten Oligosacchariden) und im TGN die Proteine letztendlich auf Clathrin-umhüllte Vesikel verteilt werden um sie zu ihrem Bestimmungsort (z.B. Zellmembran oder Lysosomen) zu transportieren.

Der große Fluss von Proteinen und Membranbestandteilen vom ER zum Golgi-Apparat hat zur Folge, dass auch ER-residente Proteine ihr Kompartiment verlassen. Um eine dauerhafte und effiziente Nutzung des an das jeweilige Kompartiment angepassten Enzymapparates zu gewährleisten, sind die Proteine mit Signalen versehen, die charakteristisch für ihre Lokalisation sind.⁵ Man unterscheidet die Rückhaltesignale und die Rückführungssignale. Über die Rückhaltesignale ist bisher nur wenig bekannt. Ihr Vorhandensein wird aber durch

1 Nagata, 1998; Hendershot & Bulleid, 2000

2 Gettins, 2002

3 Tasab *et al.*, 2000

4 Nagai *et al.*, 2000

5 Teasdale & Jackson, 1996; Harter & Wieland, 1996; Trombetta & Parodi, 2003

die Beobachtung gestützt, dass ER-residente Proteine, deren Rückführungssignal deletiert wurde, nur verhältnismäßig langsam sezerniert werden.¹ Zwei der ER-Rückführungssignale sind das C-terminale Di-Lysin-Motiv KKXX (K = Lysin, X = beliebige Aminosäure) membranständiger Proteine² und das ebenfalls C-terminale KDEL-Motiv löslicher Proteine mit den Aminosäuren Lysin (K), Asparaginsäure (D), Glutaminsäure (E) und Leucin (L)³. Varianten der KDEL-Sequenz treten in allen Eukaryoten, aber auch bei bakteriellen und pflanzlichen Toxinen⁴ auf. Eine Übersicht über die Varianten und Proteine mit KDEL-Sequenz geben Pelham (1990) bzw. die HERA-Datenbank⁵. Allen Varianten des KDEL-Signals ist gemein, dass die beiden C-terminalen Aminosäurereste Glutaminsäure und Leucin sind, während für die beiden N-terminalen Aminosäurepositionen Variationen möglich sind.⁶ Proteine, die mit dem KDEL-Rückführungssignal versehen sind (z.B. PDI, Calreticulin und HSP47), werden im Golgi-Apparat vom membranständigen KDEL-Rezeptor ERD2⁷ erkannt und gebunden. Der Rezeptor bildet Oligomere und interagiert nach Phosphorylierung am cytosolischen C-Terminus⁸ unter anderem mit der membranständigen GTPase ARF1, dem ARF1-spezifischen GTPase-aktivierenden Protein (ARF-GAP) und dem „coating protein complex 1“ (COPI)⁹, einem ~700 kD großen Komplex aus 7 verschiedenen Coatomer-Proteinen. Die Bezeichnungen „COPI“ bzw. „COPII“ werden auch als Begriff für den Gesamtkomplex aus Coatomeren und assoziierten Proteinen, wie z.B. ARF1, verwendet, wobei sich COPI und COPII in ihrer Zusammensetzung unterscheiden.¹⁰ Die Interaktion hat die Verpackung des zurückzuführenden Proteins in Vesikel zur Folge. Die Vesikel verlieren nach der Knospung die COPI-Hülle, werden zum ER transportiert und verschmelzen dort mit der ER-Membran, womit das markierte Protein wieder an seinem Bestimmungsort angekommen ist.

1 Munro & Pelham, 1987; Teasdale & Jackson, 1996; Harter & Wieland, 1996

2 Nilsson *et al.*, 1989; Zerangue *et al.*, 2001

3 Munro & Pelham, 1987; Pelham, 1996

4 Lord & Roberts, 1998

5 Scott *et al.*, 2004

6 Pelham, 1990

7 Semenza *et al.*, 1990; Lewis & Pelham, 1990

8 Cabrera *et al.*, 2003

9 Majoul *et al.*, 2001

10 Harter & Wieland, 1996; Duden, 2003

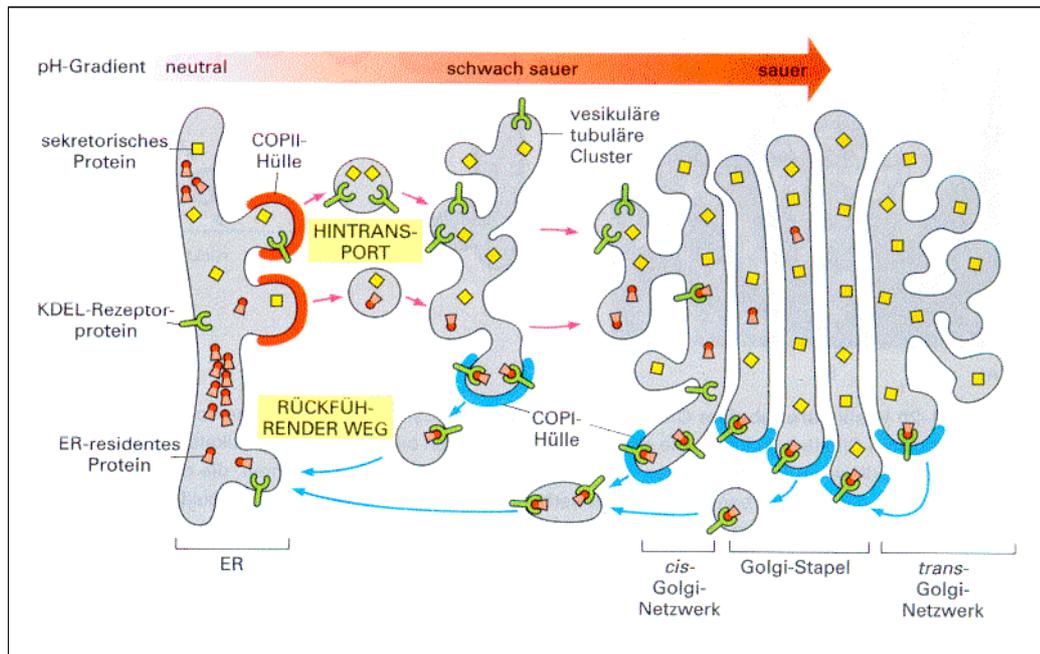


Abbildung 7: Modell zur Rückführung ER-residenter Proteine mit KDEL-Signal

Dargestellt ist der Aufbau des sekretorischen Pfads mit endoplasmatischem Retikulum (ER), den vesikulären tubulären Clustern (VTC) und den Kompartimenten des Golgi-Apparats, sowie der retrograde Transport eines ER-residenten Proteins mit KDEL-Signal (aus Alberts *et al.*, 2004).

Die Bindung und Freisetzung des markierten Proteins vom KDEL-Rezeptor geschieht vermutlich auf Grund eines pH-Gradienten zwischen den Kompartimenten. Der pH-Wert ändert sich von 7,2 im ER, über 6,2 im Golgi-Apparat bis zu 5,5 in den sekretorischen Vesikeln.¹ *In vitro*-Experimente zeigten, dass der Rezeptor ERD2 im sauren Milieu eine hohe Affinität zur KDEL-Sequenz hat und entsprechend markierte Proteine bindet, während die Affinität im neutralem pH-Wert geringer ist und die Proteine wieder freigesetzt werden² (Abb. 7). Der retrograde Transport zur Proteinrückführung findet hauptsächlich zwischen VTC bzw. CGN und ER statt³, kann aber auch vom TGN ausgehen⁴. Auf diese Weise wird der sekretorische Pfad in einem dynamischen Gleichgewicht gehalten.

1 Wu *et al.*, 2001

2 Wilson *et al.*, 1993

3 Stornaiuolo *et al.*, 2003

4 Griffiths *et al.*, 1994; Miesenbock & Rothman, 1995

Einige Proteine, wie z.B. PDI¹ und Calreticulin², können trotz ihres KDEL-Rückführungssignals den vollständigen sekretorischen Pfad bis zur Zellmembran durchlaufen und wurden auch im Cytosol und Zellkern nachgewiesen. Der Anteil an Calreticulin in der Zellmembran macht ~3% der Gesamtmenge in der Zelle aus³ und es fungiert in dieser Lokalisation als Rezeptor oder innerhalb von Signalketten. Die zu Grunde liegenden Transportmechanismen und die Frage, ob die Proteine in der Zellmembran dem retrograden Transport mittels KDEL-Rezeptor unterliegen, sind noch unklar. Einige bakterielle und pflanzliche Toxine gelangen über Endosomen von der Zellmembran zum Golgi-Apparat und nutzen teilweise das KDEL-Rückführungssignal, um mit Hilfe des retrograden Transports ins ER vorzudringen, wie z.B. das katalytische Polypeptid des Cholera-toxins oder das hitzelabile Enterotoxin von *E.coli*.⁴ Neben dem gut untersuchten HSP47⁵ und dem in dieser Arbeit vorgestellten Serpin1 aus *Branchiostoma lanceolatum* (Bl-SPN1) sind noch weiterer Serpine mit KDEL- bzw. ähnlichen Signalsequenzen bekannt. Diese stammen von *B. lanceolatum* (Bl-SPN2, KDEL)⁶, sowie *Ciona intestinalis* (Ci-Spn-10B, HDEL)⁷, *Drosophila melanogaster* (Dm-Spn4, HDEL)⁸ und *Anopheles gambiae* (Ag-SRPN10A, HEEL)⁹. Mit Hilfe der Analyse einer Maus-EST-Datenbank konnten 109 Proteine mit KDEL-Signal identifiziert werden, die zu 70% den Familien von Calreticulin, PDI und GRP94 (Glukose reguliertes Protein 94 kD) zugeordnet werden konnten.¹⁰ Angaben zu Serpinen wurden von den Autoren leider nicht gemacht.

-
- 1 Xiao *et al.*, 1999; Turano *et al.*, 2002
 - 2 Goicoechea *et al.*, 2000; Navazio *et al.*, 2002
 - 3 Cho *et al.*, 1999
 - 4 Lord & Roberts, 1998
 - 5 Satoh *et al.*, 1996
 - 6 O. Krüger, persönliche Mitteilung
 - 7 Krüger, 2003
 - 8 Han *et al.*, 2000; Krüger, 2003
 - 9 Danielli *et al.*, 2003
 - 10 Kimata *et al.*, 2000

B.5 Zielsetzung der Arbeit

Proteaseinhibitoren aus der Familie der Serpine besitzen eine wichtige Funktion bei der Regulation extrazellulärer Serin- und Cysteinproteasen. Die physiologische Rolle vieler intrazellulärer Serpine, besonders von denen mit organell-spezifischer Lokalisation ist jedoch weitgehend ungeklärt. Beim Durchmustern von cDNA-Banken aus *Branchiostoma lanceolatum* mit degenerierten Serpin-spezifischen PCR-Primern stieß O. Krüger (AG Zelluläre Genetik) auf das Fragment einer cDNA („Serpin1“ oder „Bl-SPN1“), deren abgeleitete Aminosäuresequenz das Auftreten eines Serpins mit Ähnlichkeit zu Antithrombin III vermuten ließ.

In der vorliegenden Arbeit sollte die vollständige cDNA von Serpin1 isoliert und ihre Sequenz ermittelt werden. Anschließend sollte das Protein in biologisch aktiver Form in einem bakteriellen Expressionssystem exprimiert werden. Da sich die Expression von biologisch aktiven Serpinen in Bakterien bisher häufig als problematisch erwiesen hat, sollte Serpin1 als Fusionsprotein hergestellt werden und aus diesem später durch spezifische enzymatische Spaltung freigesetzt werden. Nach Aufreinigung sollte die biologische Funktion von Serpin1 als Proteaseinhibitor geprüft werden. Des Weiteren sollten mit dem rekombinanten Protein spezifische Antiseren hergestellt und charakterisiert werden. Mit Hilfe der Antikörper sollte das Auftreten des Inhibitors in *B. lanceolatum*-Extrakten analysiert und immunhistologische Untersuchungen vorgenommen werden.

C Material und Methoden

C.1 Material

C.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Blot Module Xcell II	NOVEX
Digitalkamera Coolpix 990	Nikon
Elektroporationsgerät MicroPulser	BIO-RAD
FPLC-System:	
Liquid Chromatography Controller LCC-501 Plus	Amersham Biosciences
High Precision Pump P-500	Amersham Biosciences
Mixer, 24 V, 5 MPa	Amersham Biosciences
Conductivity Monitor	Amersham Biosciences
Monitor UV-1	Amersham Biosciences
Schreiber REC-102	Amersham Biosciences
Fraktionssammler FRAC-100	Amersham Biosciences
FPLCdirector Software 1.10	Amersham Biosciences
Leersäule C10 / 10	Amersham Biosciences
FrenchPress Hochdruck-Molekularpresse	SLM-Aminco
Aufschlusszelle 40 K	SLM-Aminco
Gefriermikrotom 2800 Frigocut	Reichert-Jung
Gelelektrophoresesystem Miniprotean	BIO-RAD
Geltrockner Model 583	BIO-RAD
Heizblock, TB1-Thermoblock	Biometra
Inkubationsschüttler	B. Braun Biotech
Magnetrührer IKAMAG-RCT	IKA-Labortechnik
Mikroskop, Fluoreszenz-, Axioskop	Zeiss
Netzgerät: BIO-RAD Model 200 / 2.0	BIO-RAD
Netzgerät: Electrophoresis Power Supply PS 3002	Life Technologies
PCR-Cycler Primus 25	MWG-Biotech
PCR-Cycler TGradient	Biometra
Pipetten	Eppendorf
Schüttler DuoMax 1030	Heidolph
Schüttelkolben, 1000 mL	B. Braun Biotech
Sequenzierautomat LiCor 4200S-1	LiCor
Spektralphotometer UV-1602	Shimadzu
Vortex Genie 2, G-560 E	Scientific Industries
Waage, analytisch, A120S	Sartorius
Waage, universell, U4800P	Sartorius
Zentrifuge, Ausschwingrotor, MicroCen13	Herolab
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Zentrifuge, gekühlt, Biofuge fresco	Heraeus
Zentrifuge RC5C Sorvall, Rotoren: SS-34 u. GS-3	Sorvall Instruments, Du Pont

C.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Substanz	Hersteller
Agarose peq Gold Universal Agarose (50 - 50000 Bp)	PeqLab
Ammoniumpersulfat (APS)	SERVA
Ampicillin	SIGMA
Blotpapier GB 002 bzw. GB 004	Schleicher & Schüll
Blot-Membran PVDF Hybond	Amersham Biosciences
Bovine Serum Albumin Fraction V (BSA)	PAA bzw. SIGMA (A 7906)
Bromphenolblau	SIGMA
Carbenicillin	Novagen
Coomassie R350	Amersham Biosciences
Deckgläser, 24 x 40 mm	Roth
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	SIGMA
DNA-Leiter, 100 Bp	GeneCraft
DNA-Leiter, 1 kb	GeneCraft
dNTP	PeqLab
Einbettmedium „Tissue Tek“	Sakura Finetek Europe B.V.
Entwickler D-19	Kodak
Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	Merck
Ethidiumbromid	SIGMA
Filter, Spritzenvorsatz-, 0,2 µm, Minisart	Sartorius
Fixierer Unifix	Kodak
Gellösung, 29:1, 40%	BIO-RAD
Gellösung, Sequenzier-, RapidGel XL, 40%	USB
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham Biosciences
Glycerin (~87%)	SIGMA
Glycin	Baker
Harnstoff	Amresco
Hefeextrakt	DIFCO
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences
Isopropanol	Roth
Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	SIGMA
Korkplatten	Marktkauf-Baumarkt
Küvetten	
Einwegküvetten, PMMA, halbmikro	Plastibrand
Quarzküvetten, Suprasil, ultramikro	Hellma
Low Molecular Weight Calibration Kit, 14,4 - 97 kD (LMW)	Amersham Biosciences
LB-Agar (Lennox L Agar)	Life Technologies
LB-Medium (Lennox L Broth Base)	Life Technologies
Ni-NTA-Agarose	QIAGEN
2-Mercaptoethanol	SIGMA
Methanol	Baker
Methylenblau	SIGMA
Moviol 4-88	Hoechst
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	FLUKA
Objektträger „Superfrost“	Menzel-Gläser, Braunschweig

Substanz	Hersteller
„Pap pen“	G. Kisker, Mühlhausen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	SIGMA
Pipettenspitzen, Einmal-	Brand
Pipettenspitzen, Filter-	Biozym
Polyethylenglykol - 8000 (PEG-8000)	SIGMA
Reaktionsgefäße 2,0 mL, Safelock	Eppendorf
Reaktionsgefäße 1,5 mL	Brand
Reaktionsgefäße 0,5 mL, Safelock	Eppendorf
Reaktionsgefäße 0,2 mL	PeqLab
RNase-Inhibitor	Perkin-Elmer
Slide-a-lyzer, Dialysekassette, 3500 MWCO, 0,1 - 0,5 mL	Pierce
Spritzen, 20 mL, Luerlock	B. Braun Melsungen
Stickstoff, flüssig	Linde
Talon-Affinitätsmatrix	BD Biosciences
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	SERVA
Thrombin aus Humanplasma, 3000 NIH units/mg	SIGMA
Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Tris-Base)	USB
Triton X-100	SERVA
Trypton	DIFCO
Tween 20	SERVA
Wiegeschalen / -papier	Roth
Xylencyanol	ICN

Alle anderen Chemikalien waren von „zur Analyse“-Qualität und stammten von Merck.

C.1.3 Kits

Kit	Hersteller
Oligotex mRNA Kit for isolation of mRNA from cells and tissue	QIAgen
QIAshredder	QIAgen
Omniscript RT Kit	QIAgen
GeneRacer Kit	Invitrogen
QIAquick PCR Purification Kit	QIAgen
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAgen
QIAprep Miniprep Kit	QIAgen
ThermoSequenase labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham Biosciences
TOPO TA cloning kit for sequencing mit chemisch kompetenten TOP10-Zellen	Invitrogen

C.1.4 Dokumentation / Auswertung

Verwendung / Gerät	Hersteller
Geldokumentationssystem: Transilluminator (312 nm) CCD-Videokamera Photo Finish ZSoft 3.0 WinCam Version 2.2	Biometra Biometra WordStar Atlanta Technology Center Cybertech, Berlin
Westernblot-Dokumentation: Hyperfilm ECL ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences Amersham Biosciences
Sequenzauswertung: BaseImagIR 4.10 AlignIR v.2.0	LiCor LiCor

C.1.5 *Branchiostoma lanceolatum*

Die Lanzettfischchen *Branchiostoma lanceolatum* wurden von der meeresbiologischen Station Helgoland bezogen. Die Lieferung erfolgte lebend in Meerwasser. Nach Erhalt wurden die Tiere sofort gewogen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die verwendeten adulten Tiere hatten ein Gewicht von ~200 mg.

C.1.6 Bakterienstämme***Escherichia coli* TOP10¹**

Genotyp: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) *f80lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *deoR* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* *endA1* *nupG*

Herkunft: Invitrogen

***Escherichia coli* BL21(DE3)²**

Genotyp: F⁻ *ompT* *hsdS_B*(*r_B-m_B*) *gal dcm* (DE3)

Herkunft: Novagen

1 Grant *et al.*, 1990

2 Studier *et al.*, 1990

C.1.7 Nährmedien

LB-Medium (Lennox L Broth Base)	LB-Agar (Lennox L Agar)	SOC-Medium
1% Peptone 140	1% Peptone 140	2% Trypton
0,5% Hefeextrakt	0,5% Hefeextrakt	0,5% Hefeextrakt
0,5% NaCl	0,5% NaCl	10 mM NaCl
	1,2% Agar	2,5 mM KCl
		10 mM MgCl ₂
		10 mM MgSO ₄
		20 mM Glukose

Der LB-Agar wird autoklaviert und bei einer Temperatur von etwa 40°C unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gegossen. Zum Zeitpunkt des Gießens können Antibiotika zugegeben werden. Nach dem Auskühlen werden die Platten bei 4°C verwahrt, wobei ein Austrocknen durch eine entsprechende Verpackung zu vermeiden ist. Das SOC-Medium kann nach Sterilfiltration (0,2 µm) mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden.

C.1.8 Antibiotika

Bei den verwendeten Antibiotika handelt es sich um Ampicillin und Carbenicillin. Das letztere ist ein Ampicillin-Derivat. Diese Antibiotika stören die Synthese des Peptidoglycangerüsts, indem sie die Quervernetzung der Peptidoglycane über Peptidbrücken hemmen. In Flüssigkulturen wird Ampicillin frisch zugegeben, wogegen bei Festmedien (Agarplatten) das stabilere Carbenicillin verwendet wird und so eine erhöhte Lagerdauer ermöglicht. Die Antibiotika werden als 1000-fach konzentrierte Stammlösungen in 500 µL Aliquots bei -20°C aufbewahrt und in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt.

C.1.9 Enzyme**C.1.9.1 Restriktionsendonukleasen**

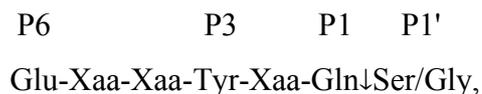
Restriktionsendonuklease	Erkennungssequenz und Spaltstelle	Hersteller
<i>Bam</i> HI	5' g↓gatcc 3'	New England Biolabs
<i>Eco</i> RI	5' g↓aattc 3'	New England Biolabs
<i>Xho</i> I	5' c↓tcgag 3'	New England Biolabs

Der Pfeil (↓) symbolisiert die Spaltstelle.

C.1.9.2 Proteasen

C.1.9.2.1 Protease des Tabakätzvirus

Bei der Infektion von Pflanzenzellen mit dem Tabakätzvirus („*tobacco etch virus*“, TEV) bilden sich in den Zellkernen Einschlusskörper aus zwei aggregierten Proteinen. Die Arbeitsgruppen um Carrington und Dougherty haben hieraus ein 49 kD großes Protein isoliert, das als „TEV nuclear inclusion a (NIa)“ bezeichnet wird. Das Protein setzt sich aus zwei Domänen zusammen. Dem C-terminalen Bereich konnte eine proteolytische Aktivität zugeordnet werden, die TEV NIa-Protease mit einer Molekulargewicht von 27 kD.¹ Vereinfacht wird die TEV NIa-Protease auch nur als TEV-Protease bezeichnet. In weiterführenden Untersuchungen konnte das Enzym als Cystein-Protease aus der Gruppe der Chymotrypsin-ähnlichen Proteasen klassifiziert werden (EC 3.4.22.44).² Die physiologische Funktion der Protease besteht in der Prozessierung des viruseigenen Polyproteins. Die aus natürlichen Substraten abgeleitete Erkennungssequenz erstreckt sich über sieben Aminosäuren und lautet:



wobei die proteolytische Spaltung (\downarrow) zwischen P1 und P1' erfolgt (Nomenklatur nach Schechter & Berger³, „Xaa“ entspricht einer beliebigen Aminosäure). Mutationsanalysen bestätigten die essentielle Bedeutung der konservierten Aminosäuren an den Positionen P6, P3 und P1 für die Spezifität und schnelle Substratumsetzung. Die anderen Aminosäuren sind nicht eindeutig festgelegt und erlauben Alternativen, die aber Auswirkungen auf die Umsetzungsgeschwindigkeit haben.⁴ Als optimale Erkennungssequenz gilt:



Die Beschränkung auf die Aminosäuren Glycin und Serin an Position P1' der Erkennungssequenz der natürlichen Substrate, sollte eigentlich eine hohe Spezifität der Protease an dieser Stelle erwarten lassen. Mutationsanalysen zeigten aber das Gegenteil. An dieser Position ist

1 Carrington & Dougherty, 1987a u. b; Dougherty & Parks, 1991

2 Dougherty *et al.*, 1989b; Parks *et al.*, 1995

3 Schechter & Berger, 1967

4 Dougherty *et al.*, 1988; Carrington & Dougherty, 1988; Dougherty *et al.*, 1989a; Dougherty & Parks, 1989

eine erstaunliche Vielfalt von Aminosäuren möglich ohne die Spaltung zu behindern¹, wobei diese die Umsetzungsgeschwindigkeit negativ beeinflussen.

In der Biotechnologie wird diese Variabilität ausgenutzt, um Schnittstellen in Fusionsproteine einzufügen, die bei ihrer Spaltung keine zusätzliche, evtl. störende Aminosäure am N-Terminus des abgespaltenen C-terminalen Proteinanteils zurücklassen. Interessant ist die Protease aber vor allem wegen ihrer 7 Aminosäuren langen Erkennungssequenz, die statistisch nur selten in Proteinen auftritt. Dadurch wird die Gefahr eines unspezifischen Verdauens des Fusionsproteins deutlich reduziert. Weitere für die Prozessierung von Fusionsproteinen interessante Eigenschaften sind die ausreichende Aktivität auch bei niedrigen Temperaturen (4°C)² und die Unempfindlichkeit gegenüber den gängigen Proteaseinhibitoren, die im Rahmen der Zellaufarbeitung Verwendung finden.³ Das hier verwendete Enzym stammt von der Firma Invitrogen. Es wird rekombinant in *E. coli* hergestellt und ist mit einer N-terminalen His₆-Markierung versehen.

C.1.9.2.2 Thrombin

Thrombin, auch als Faktor IIa bezeichnet, ist eins der Schlüsselenzyme der Blutgerinnung bei Vertebrata. Es bildet Fibrinmonomere durch Abspaltung endständiger Peptide von Fibrinogen, worauf sich die Monomere zu Fibrinsträngen anordnen. Durch Quervernetzung dieser entsteht ein dichter Verbund, der zum Wundverschluss dient, der so genannte Wundpfropf oder umgangssprachlich die Borke. Bei Thrombin (EC 3.4.21.5) handelt es sich um eine Serinprotease, die bevorzugt Arg-Gly-Bindungen spaltet. Aber auch Arg-Ser-Bindungen werden hydrolysiert.⁴ Verwendet wird Thrombin aus Humanplasma mit einer Aktivität von 3000 NIH units/mg der Firma SIGMA. Es wird eine Stammlösung mit 0,3 U/μL = 3 μM eingesetzt. Beim Umgang mit Thrombin muss beachtet werden, dass Thrombin an Glas adheriert und daher keine Glasgefäße bzw. -pipetten benutzt werden dürfen.

1 Kapust *et al.*, 2002

2 Polayes *et al.*, 1994; Haspel *et al.*, 2001

3 Dougherty *et al.*, 1989b

4 Lanchantin *et al.*, 1973; Lundblad *et al.*, 1976

C.1.9.3 Polymerasen

C.1.9.3.1 *Pfu*-DNA-Polymerase

Die *Pfu*-DNA-Polymerase¹ wurde ursprünglich aus dem hyperthermophilen marinen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* isoliert und wird als rekombinantes Protein von Promega bezogen. Sie besitzt keine 5'→3'-Exonuklease-Aktivität, verfügt aber über eine korrekturlesende 3'→5'-Exonuklease-Aktivität. Dadurch wird ihre DNA-Kopiertreue um den Faktor 10 gegenüber der *Taq*-DNA-Polymerase erhöht. Allerdings ist die Elongationsgeschwindigkeit mit ca. 500 Nukleotide / min bei 72°C nur halb so groß. Die *Pfu*-DNA-Polymerase weist keine reverse Transkriptase-Aktivität auf.²

C.1.9.3.2 KOD Hot Start-DNA-Polymerase

Aus dem extrem thermophilen Bakterium *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 konnte eine Polymerase isoliert werden³, die in ihren Eigenschaften mit der *Pfu*-Polymerase vergleichbar ist. Sie besitzt aber eine der *Taq*-Polymerase mindestens ebenbürtige Elongationsgeschwindigkeit von >1000 Nukleotide / min. Das Enzym wird rekombinant von der Firma Invitrogen hergestellt. In der Hot Start-Variante wird die Polymerase in Verbindung mit zwei Antikörpern ausgeliefert. Diese blockieren die aktiven Zentren der Polymerase und unterbinden so die Aktivität. Das Enzym wird erst aktiv, wenn sich die Antikörper während der Anfangsdenaturierung (Erhitzen auf 95°C) vom Enzym lösen. Damit können unerwünschte PCR-Produkte beim Ansetzen und Aufheizen der PCR-Reaktion durch Primerdimere oder unspezifische Primeranlagerungen vermieden werden.⁴

C.1.9.3.3 KlenTherm-DNA-Polymerase

Die KlenTherm-DNA-Polymerase⁵ ist ein Fragment der *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, welches auf Temperaturstabilität hin optimiert wurde. Die rekombinante KlenTherm-DNA-Polymerase verfügt weder über 5'→3'- noch 3'→5'-Exonuklease-Aktivität. Wie die *Taq*-Polymerase erzeugt auch sie den typischen 3'-Überhang von einem dAMP-

1 Lundberg *et al.*, 1991

2 Hogrefe *et al.*, 2001

3 Takagi *et al.*, 1997

4 Mizuguchi *et al.*, 1999

5 Barnes, 1992

Nukleotid, den die Polymerase Matrizen-unabhängig an die Sequenz eines PCR-Produkts anhängt. Die Polymerase wird über GeneCraft bezogen. Die Elongationsgeschwindigkeit wird mit 1000 Nukleotide / min angesetzt.

C.1.9.3.4 Klen- / Pfu-Polymerase-Mix

Durch Kombination von KlenTherm-DNA-Polymerase mit *Pfu*-Polymerase können die spezifischen Eigenschaften beider Enzyme genutzt werden.¹ Die hohe Elongationsrate und die Korrekturlesefunktion ermöglichen die Vervielfältigung sehr langer und schwieriger Matrizen. Verwendet wird ein Mischungsverhältnis Klen- / *Pfu*-Polymerase von 160:1 units.

C.1.10 Antiseren

Antiseren	Herkunft	Verdünnung im Westernblotting	Hersteller, Bestell-Nr.
Anti- <i>Bl</i> -SPN1	Kaninchen, Tiere 1 - 3	1:10000	Pineda-Antikörper-Service, Berlin
Anti-GST	Ziege	1: 2000	Amersham Biosciences, 27-4577-01
Anti-human Thrombin	Schaf	1: 1333	Affinity Biologicals, SAHT-IG
Anti-Schaf / Ziege-Ak, Peroxidase-gekoppelt	Maus	1:20000	SIGMA, A9452
Anti-Kaninchen-Ak, Peroxidase-gekoppelt	Esel	1: 4000	Amersham Biosciences, NA934
Anti-Kaninchen-Ak, TRITC-gekoppelt	Ziege	1: 300	SIGMA, T6778

Ak = Antikörper; GST = Glutathion-S-Transferase; TRITC = Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat (rot fluoreszierender Farbstoff)

¹ Barnes, 1994

C.1.11 Plasmide

Name	pCR4-TOPO ¹	pKM263 ²
Bezugsquelle	Invitrogen	Euroscarf, Frankfurt
Größe [Bp]	3957	5151
Verwendung	Sequenzierung	Expression von His ₆ -GST-Fusionsproteinen
Resistenzen	Ampicillin, Kanamycin	Ampicillin
Eigenschaften	kovalent gekoppelte Topoisomerase; geschnitten; t/a-Überhang; Selektion auf positive Klone durch letales <i>ccdB</i> -Gen, welches bei erfolgreicher Insertion inaktiviert wird	T7-Promotor; IPTG-induzierbar; nicht reprimiert; kodiert für Fusionsprotein mit His ₆ , GST und TEV-Protease-Spaltstelle

His₆ = N-terminale Markierung mit 6 Histidinenresten; GST = Glutathion-S-Transferase

C.1.12 Primer

Alle Primer wurden über die Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg, bezogen.

C.1.12.1 PCR-Primer

Name	Sequenz (5'→3')	Länge [Bp]	T _a [°C]
CaM2-AS25-33+	ggacggtaccatcaccacaaaggagctg	28	68,0
CaM2-AS132-124-	gtc gatgtcagcctctcggaccatctc	27	68,0
GeneRacer5'	cgactggagcagaggacactga	23	74,0
GeneRacer5'nested	ggacactgacatggactgaaggagta	26	78,0
GeneRacer3'	gctgtcaacgatacgctacgtaacg	25	76,0
GeneRacer3'nested	cgctacgtaacggcatgacagtg	23	72,0
GeneRacer Oligo dT	gctgtcaacgatacgctacgtaacggcatgac agtg (t) ₁₈	54	
GeneRacer RNA Oligo	cgacuggagcagaggacacugacauggacug aaggaguagaaa	44	
BL2_f2	ccggttcaaactcgcttacgac	22	64,0
BL2_f3	gcgtgaccttcacgtcaacca	21	62,0
BL2_f4	cagtgaacatgatgaaacggtcacttgatgg	31	66,8
BL2_r	ccatcaagtgaccgtttcacatcatgttcactg	31	66,8

1 Invitrogen, 2001a

2 Melcher, 2000

Name	Sequenz (5'→3')	Länge [Bp]	T _a [°C]
BL2_r2	cgactgacgtgaaggtcacgc	21	63,7
BL2_r3a	gccttgtggatgacctggt	19	66,0
BL2_b5'+	atatagctagcttttccacactgtggttcttat	32	63,1
BL2_b3'-	ttacagttcatcctttgtagttaatcctt	29	60,6
<i>Xho</i> I-TEV- <i>Bl</i> -SPN1+	ccatctcgagaatctttattttcaggcaactc tggaagctcc	43	63,0 ^a
<i>Bam</i> HI-BL2_b-	cagccggatccttacagttcatcctttgtagt taatcctt	40	60,6 ^b

T_a = Anlagerungstemperatur; ^a ab Nukleotid 26 berechnet, komplementär zum Anfang von Serpin1; ^b ab Nukleotid 12 berechnet, komplementär zum Ende von Serpin1

C.1.12.2 Sequenzierprimer mit IRD800-Markierung

Name	Sequenz (5'→3')	Länge [Bp]	T _a [°C]
BL2_f6+	gtggagggtcaacgaggag	18	58,2
GST-out5'	ctttgcagggctggcaagcc	20	66,6
T7-Promotor	taatacgactcactataggg	20	53,2
T7-Terminator	gctagttattgctcagcgg	19	56,7

IRD800 = „Infrared dye 800 nm“ (C.2.1.12); T_a = Anlagerungstemperatur

C.1.13 Längenstandards

C.1.13.1 DNA-Längenstandards

Die Längenbestimmung von doppelsträngigen linearen DNA-Fragmenten mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (C.2.1.8) erfolgt durch Vergleich mit Fragmenten bekannter Länge. Es werden Längenmarker angeboten, die sich aus definierten Fragmenten zusammensetzen und einen gewissen Längenbereich abdecken. Diese werden parallel zu den Proben aufgetragen. Die verwendeten Marker sind die „100 Bp-Leiter“ und die „1 kb-Leiter“ von GeneCraft mit einer Konzentration von 0,1 µg/µL. In dieser Arbeit werden immer 0,3 µg Marker eingesetzt.

Sie bestehen im Einzelnen aus Fragmenten der folgenden Längen in Nukleotidpaaren (Bp):

100 Bp-Leiter: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 und 100

1 kb-Leiter: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500 und 250

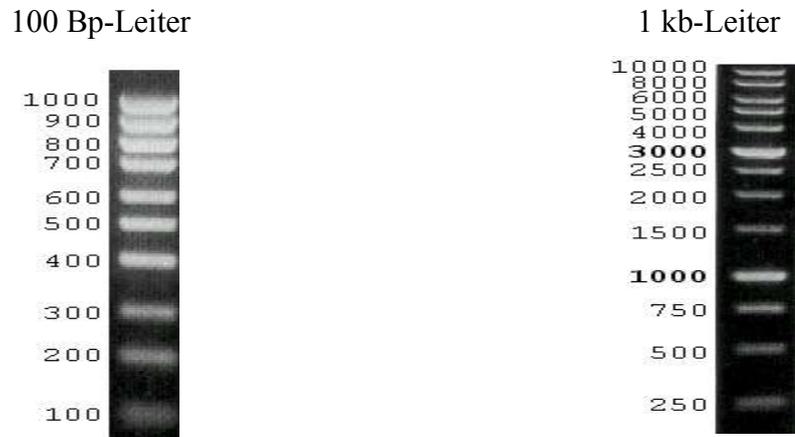


Abbildung 8: Gelbild der DNA-Längenstandards

C.1.13.2 Protein-Molekulargewichtsstandard

Molekulargewichte von Proteinen werden in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (C.2.3.1) durch den Vergleich mit Proteinen bekannter Größe ermittelt. Der hier verwendete Standard enthält 6 Proteine mit Molekulargewichten von 14,4 - 97 kD. Der Marker wird als Lyophilisat bezogen, in 100 μL dH_2O und 100 μL reduzierendem 2-fach konzentrierten Probenpuffer (C.2.3.1) aufgenommen und 5 min bei 95°C denaturiert.

Es werden jeweils 2,5 μL in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt.

„Low Molecular Weight Calibration Kit“ (LMW)

Protein	Molekulargewicht [kD]	Proteinkonzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	Proteinmenge [μg] pro 2,5 μL
Phosphorylase b	97,0	0,335	0,838
Albumin (aus Rinderserum)	66,0	0,415	1,038
Ovalbumin	45,0	0,735	1,838
Carboanhydrase	30,0	0,415	1,038
Trypsin-Inhibitor	20,1	0,400	1,000
α -Laktalbumin	14,4	0,580	1,450
		$\Sigma = 2,880$	$\Sigma = 7,200$

C.1.14 Allgemeines

Für alle Versuche werden ausschließlich sterile, autoklavierte Gefäße und sterile, autoklavierte Pipettenspitzen verwendet. Beim Umgang mit RNA kommen nur zertifiziert DNase / RNase-freie Einmalartikel und Filterpipettenspitzen zum Einsatz.

Das zur Herstellung von Medien und Puffern eingesetzte Wasser wird über eine Milli-Q-Anlage (Millipore, Eschborn) aufgereinigt. Für Restriktionsspaltungen und PCR-Reaktionen wird es zusätzlich autoklaviert und in Aliquots bei -20°C gelagert. Im weiteren wird dieses Reinstwasser durch dH_2O abgekürzt. Beim Arbeiten mit RNA wird das dH_2O zuvor mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Dieses modifiziert primäre und sekundäre Amine und inaktiviert autoklavierbeständige RNasen. Hierzu wird eine 0,1%-ige DEPC- dH_2O -Lösung 12 h bei 37°C inkubiert und anschließend zweimal autoklaviert, um das DEPC vollständig zu entfernen. Soweit nicht anders angegeben, erfolgen die Zentrifugationsschritte bei $13000\times g$ für 1 min.

C.2 Methoden

C.2.1 Molekularbiologische Methoden

C.2.1.1 Isolierung von mRNA

Die Isolierung von mRNA aus tierischem Gewebe erfolgt prinzipiell durch Lyse und Homogenisierung in Gegenwart von Guanidin-Isothiocyanat. Diese stark denaturierende Chemikalie unterstützt die Zersetzung des Gewebes und schützt die mRNA vor Degradierung durch sofortige Inaktivierung von RNasen. Die Poly(A)-mRNA wird anschliessend unter Hochsalz-Bedingungen an eine Poly(dT)-Matrix hybridisiert, gewaschen und durch Absenken der Ionenstärke eluiert.¹

Verwendet wird das „Oligotex mRNA Kit for isolation of mRNA from cells and tissue“ der Firma QIAgen im Miniprep-Maßstab (bis 100 mg Gewebe) nach Herstellervorgaben.²

Zur Gewinnung von Poly(A)-mRNA wird das Gewicht eines lebenden, adulten *Branchiostoma lanceolatum* bestimmt und dieser in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um eine Degradation der mRNA zu vermeiden. Das Gewebe wird dann in einem vorgekühlten Mörser unter flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zerstoßen. Nach Verdunsten des Stickstoffs wird das Pulver im noch gefrorenen Zustand unter Zuhilfenahme eines Wiegeschälchens in ein gekühltes 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Hier hinein füllt man 600 µL OL1-Puffer pro 100 mg Gewebe und gibt das Lysat unverzüglich in Portionen, die maximal 100 mg Gewebe entsprechen, in je einen QIAshredder. Dieser enthält eine Membran, durch welche das Lysat zentrifugiert und dabei aufgeschlossen wird. Nach Zugabe von 1200 µL ODB-Puffer zum Homogenisat wird mittels Auf-und-ab-Pipettieren gründlich durchmischt. Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation abgetrennt, und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zu diesem gibt man die Oligotex-Suspension (110 µL je 100 mg Gewebe), mischt gründlich und inkubiert für 10 min. Die Oligotex-Suspension enthält Polystyren-Latex-Partikel mit gekoppelten Oligo(dT₃₀)-Nukleotiden an die mRNAs über ihre Poly(A)-Sequenz hybridisieren. Zusammen mit den Trägerpartikeln kann die mRNA nun abzentrifugiert werden. Der Überstand wird vorsichtig mit einer Pipette entfernt und das Oligotex-mRNA-Pellet in 100 µL OL1-Puffer resuspendiert.

1 Kuribayashi *et al.*, 1988

2 QIAgen, 1999

Unspezifisch gebundene rRNA wird durch Zugabe von 400 µL ODB-Puffer und Inkubation für 3 min bei 70°C und 10 min bei Raumtemperatur entfernt. Zur Sedimentierung der Oligotex-mRNA-Partikel wird 5 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Das Pellet wird in 350 µL OW1-Puffer resuspendiert, auf eine Spinsäule aufgetragen und zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen und die Säule in ein frisches 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Mit je 350 µL OW2-Puffer wird das Pellet 2-mal gewaschen und erneut ein frisches Reaktionsgefäß verwendet. Die Elution der mRNA erfolgt mit 50 µL 70°C warmen OEB-Puffer, in dem das Oligotex-mRNA-Pellet durch Auf-und-ab-Pipettieren resuspendiert wird. Nach einer abschließenden Zentrifugation kann das Eluat mit der mRNA bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert werden.

C.2.1.2 Isolierung von Plasmiden

Die zur Gewinnung von Plasmiden eingesetzten Kits beruhen auf der alkalischen Lyse von Bakterien nach Birnboim und Doly¹, sowie der nachfolgenden Adsorption der freigesetzten Plasmid-DNA an Silica.² DNA hat die Eigenschaft bei pH-Werten unter 7,5 in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze an Silica zu adsorbieren.³ Durch die Wahl geeigneter Puffer- und Waschbedingungen kann gezielt doppelsträngige DNA von 100 Bp bis zu 10000 Bp, z.B. Plasmide, aus einem Reaktionsansatz aufgereinigt werden. Hierzu wird die DNA unter Hochsalzbedingungen an eine Silicagelmembran gebunden, gewaschen und mit einem Puffer geringer Ionenstärke bei pH 8,5 wieder eluiert. Verwendet wird das „QIAprep Miniprep Kit“ von QIAgen nach Vorschrift.⁴

1 - 5 mL einer über Nacht in LB-Medium gewachsenen *E. coli*-Kultur werden 5 min bei 4000xg sedimentiert und das Pellet in 250 µL Puffer P1 (incl. RNase A) vollständig resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgt durch Zugabe von 250 µL Puffer P2 und 350 µL Puffer N3. Die Zelltrümmer werden durch 10 min Zentrifugation abgetrennt und der Überstand auf eine QIAprep-Säule aufgetragen. Diese wird zentrifugiert, wobei die Plasmide an die Silicamatrix binden. Das Waschen erfolgt zuerst mit 500 µL Puffer PB und daran anschließend mit 750 µL Puffer PE. Zur Elution der aufgereinigten Plasmide dienen 50 µL

1 Birnboim & Doly, 1979; Birnboim, 1983

2 Vogelstein & Gillespie, 1979

3 Vogelstein & Gillespie, 1979; Hamaguchi & Geiduschek, 1962

4 QIAgen, 2001

Puffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5). Für die Aufreinigung von Plasmiden mit nur geringer Kopienzahl wird das Kulturvolumen auf 10 mL erhöht. In diesem Fall sind aber die eingesetzten Mengen der Puffer P1, P2 sowie N3 zu verdoppeln.

C.2.1.3 Quantitative DNA / RNA-Bestimmung mit dem Fotometer

Die Bestimmung der in einer Pufferlösung enthaltenen Menge an DNA / RNA erfolgt durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}). Als Vergleich dient der reine Puffer. Verwendet werden das Spektralphotometer UV-1602 der Firma Shimadzu und Ultramikroküvetten aus Quarzglas. Näherungsweise werden die in der folgenden Tabelle angeführten Werte zur Umrechnung herangezogen.¹

Verhältnis von OD_{260} zur Menge an Ribonukleinsäuren

Typ der Ribonukleinsäure	$OD_{260} = 1$ entspricht
doppelsträngige DNA	50 ng/ μ L
einzelsträngige DNA	33 ng/ μ L
einzelsträngige RNA	40 ng/ μ L

Mit Hilfe der folgenden Formel kann die entsprechende Stoffmenge berechnet werden.²

$$\text{Anzahl an DNA-Molekülen [pmol]} = \frac{\text{Masse an doppelsträngiger DNA } [\mu\text{g}] \times 10^6}{\text{Anzahl an Nukleotidpaaren pro DNA-Molekül} \times 660}$$

660 entspricht dem durchschnittlichen Molekulargewicht eines Nukleotidpaars in g/mol.

Vereinfacht lautet die Formel:

$$\text{Anzahl an DNA-Molekülen [pmol]} = \frac{\text{Masse an doppelsträngiger DNA } [\mu\text{g}] \times 1515,15}{\text{Anzahl an Nukleotidpaaren pro DNA-Molekül}}$$

Durch Vergleich mit der optischen Dichte bei 280 nm (OD_{280}), dem Extinktionsmaximum der aromatischen Reste von Proteinen, lässt sich auf die Reinheit der isolierten Nukleinsäuren

¹ Sambrook & Russell, 2001

² Stratagene, 1996

zurückschließen. Ein Koeffizient OD_{260} / OD_{280} von $>2,0$ bedeutet reine DNA bzw. reine RNA.¹

C.2.1.4 Reverse Transkription von mRNA

Bei der reversen Transkription wird eine einzelsträngige RNA-Matrize durch eine reverse Transkriptase in eine einzelsträngige, komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, welche anschließend mit Hilfe der PCR amplifiziert werden kann (C.2.1.6). Die reverse Transkriptase ist eine retrovirale RNA-abhängige DNA-Polymerase, die an die einzelsträngige mRNA-Matrize bindet und ausgehend von einem spezifischen Primer einen komplementären DNA-Strang synthetisiert, sodass ein RNA-DNA-Hybrid entsteht.

In dieser Arbeit wird die „Omniscript Reverse Transcriptase“ der Firma QIAGEN (Omniscript RT Kit) verwendet. Dabei handelt es sich um ein rekombinantes, heterodimeres Enzym, das in *E. coli* exprimiert wird. Die Vorteile dieses Enzyms sind hohe Effizienz und Sensitivität auch bei geringen RNA-Matrizen-Konzentrationen. Zudem besitzt es eine spezifische RNase H-Aktivität, die den RNA-Anteil in einem DNA-RNA-Hybrid abbaut und so die Sensitivität der anschließende PCR erhöht.² Abbildung 9 zeigt eine schematische Darstellung der Reaktionen.

Der unten angeführte Ansatz wird für 60 min bei 37°C inkubiert, anschließend zu 1 µL aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung in der PCR bei -80°C gelagert.

<u>RT-PCR-Ansatz:</u>	DEPC-dH ₂ O	8 µL
	10-fach konz. RT-Puffer	2 µL
	RNase-Inhibitor (20 U/µL)	1 µL
	dNTPs (je 5 mM)	2 µL
	GeneRacer Oligo (dT)-Primer (50 µM)	1 µL
	mRNA (20 ng/µl)	5 µL
	Omniscript Reverse Transcriptase (4 U/µL)	1 µL
		Σ 20 µL

1 Sambrook & Russell, 2001

2 QIAGEN, 2000c

Auf eine Anfangsdenaturierung der mRNA und eine abschließende Hitzeinaktivierung der reversen Transkriptase wird verzichtet, um eine Fragmentierung der mRNA zu vermeiden. Verwendet werden der RNase-Inhibitor von Perkin-Elmer und der GeneRacer Oligo (dT)-Primer von Invitrogen. Alles andere ist Bestandteil des „Omniscript RT Kit“ von QIAGEN. Das hier eingesetzte dH₂O wird zur Inaktivierung von RNasen einer DEPC-Behandlung unterzogen (C.1.14).

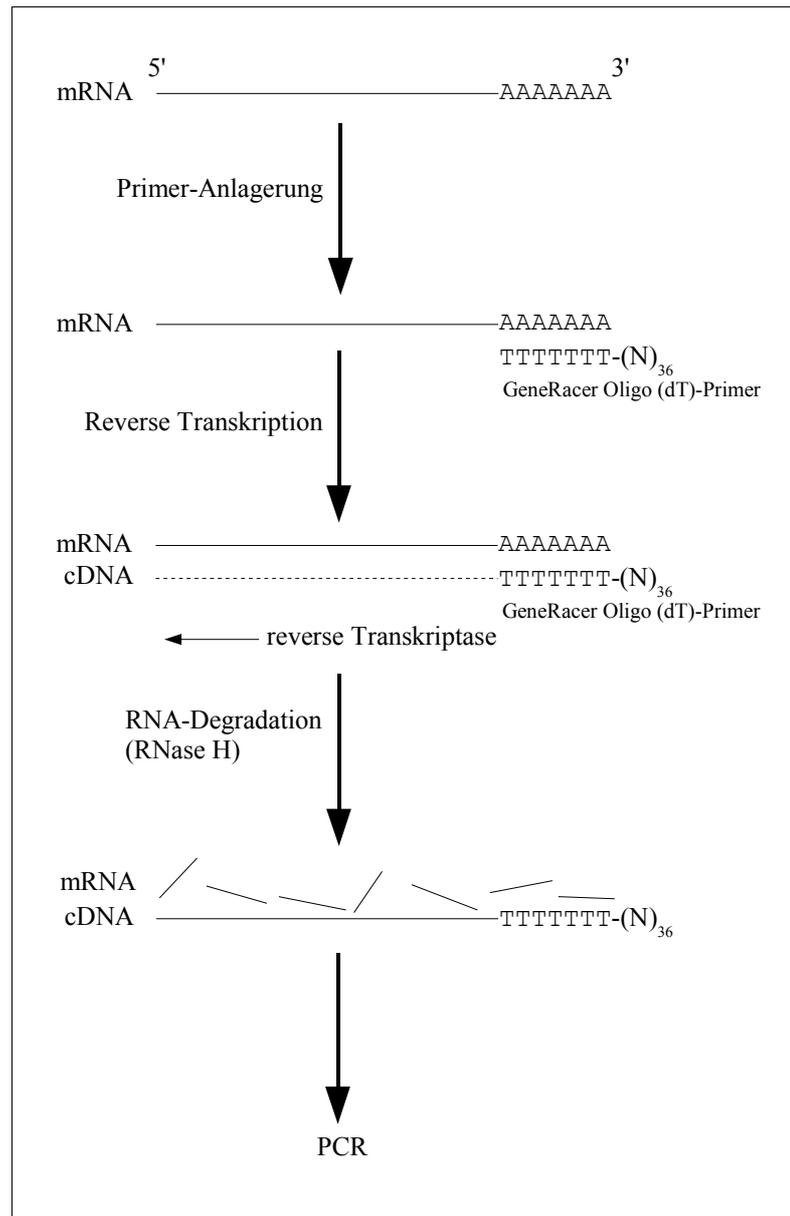
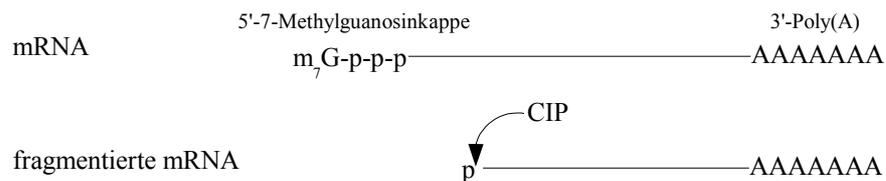


Abbildung 9: Schematische Darstellung einer reversen Transkription

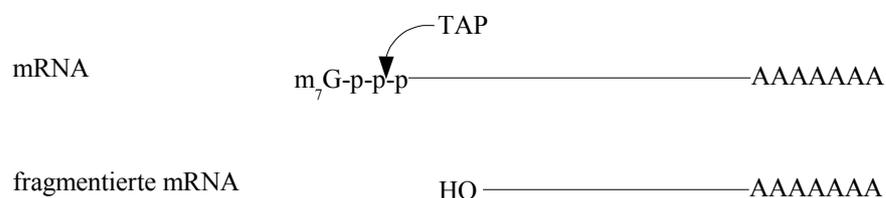
C.2.1.5 Reverse Transkription von vollständigen mRNA-Enden

Zur reversen Transkription von vollständigen 5'-Enden von mRNA wird im ersten Schritt ein synthetisches RNA-Oligonukleotid an das 5'-Ende der RNA-Moleküle gekoppelt. Da die Sequenz des Oligonukleotids bekannt ist, ist es nun möglich mit spezifischen Primern in einer nachfolgenden PCR-Reaktion (C.2.1.6) den 5'-Bereich der RNA zu amplifizieren.¹ Dieses Vorgehen wird auch als „RLM-RACE“ (RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends) bezeichnet.

Das verwendete Kit „GeneRacer Kit + Superscript II RT Module“ von Invitrogen bietet die Möglichkeit, nur intakte mRNA mit dem Oligonukleotid zu versehen. Bei fragmentierter mRNA oder rRNA unterbleibt eine Kopplung. Hierzu wird im ersten Schritt die Gesamt-RNA mit intestinaler Kälber-Phosphatase (calf intestinal phosphatase, CIP) behandelt. CIP dephosphoryliert die 5'-Enden aller RNA-Moleküle mit Ausnahme der intakten mRNAs. Diese tragen eine 7-Methylguanosinkappe, welche über eine 5'-5'-Triphosphat-Brücke mit dem folgenden Nukleotid verknüpft ist und so vor der Dephosphorylierung schützen.



Danach kann die Kappe der mRNA durch saure Pyrophosphatase aus Tabak (tobacco acid pyrophosphatase, TAP) entfernt werden, womit am 5'-Ende der mRNA ein freier Phosphatrest zugänglich wird. Intakte mRNAs sind somit die einzigen verbliebenen RNA-Moleküle mit einem 5'-Phosphatrest.

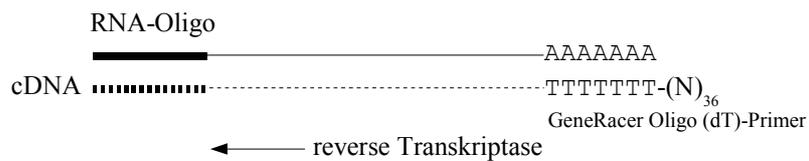


An diesen 5'-Phosphatrest der mRNAs wird mit Hilfe der T4-RNA-Ligase ein RNA-Oligonukleotid mit bekannter Sequenz ligiert.

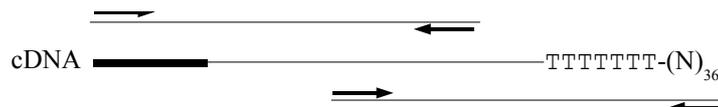
¹ Volloch *et al.*, 1994



Bei der nachfolgenden reversen Transkription unter Verwendung des „GeneRacer Oligo (dT)“-Primers entsteht eine vollständige cDNA mit bekannten Sequenzen an den 5'- und 3'-Enden.



Die äußeren Regionen der cDNA können in einer anschließenden PCR (C.2.1.6) mit zu den Enden komplementären und genspezifischen internen Primern amplifiziert werden.¹



Durchführung:

Alle verwendeten Reagenzien sind Bestandteile des „GeneRacer Kit“ und des „Superscript II RT Module“ von Invitrogen.²

1. Zur Dephosphorylierung der mRNA wird der folgende Ansatz verwendet und 60 min bei 50°C inkubiert.

Komponenten	Volumen
mRNA [50 - 250 ng]	x µL
10-fach konz. CIP-Puffer	1 µL
RNaseOut [40 U/µL]	1 µL
CIP [10 U/µL]	1 µL
DEPC-Wasser	y µL
	Σ 10 µL

1 Maruyama & Sugano, 1994; Schaefer, 1995

2 Invitrogen, 2001b

2. Anschließend erfolgt die Präzipitierung der mRNA. Zuerst werden zur Inaktivierung der Phosphatasen und Abtrennung der Proteine 90 µL DEPC-Wasser und 100 µL Phenol: Chloroform:Isoamylalkohol [25:24:1 (v/v/v)] zugegeben. Nach gründlichem Mischen und 5 min Zentrifugation befindet sich die mRNA in der oberen wässrigen Phase. Diese wird abgenommen und die mRNA mit 2 µL Muschel-Glykogen [10 µg/µL], 10 µL Natriumacetat [3 M, pH5,2] und 220 µL 95%-igen Ethanol ausgefällt. Die mRNA wird pelletiert und mit 500 µL 70%-igen Ethanol gewaschen. Das trockene Pellet wird in 7 µL DEPC-Wasser resuspendiert.

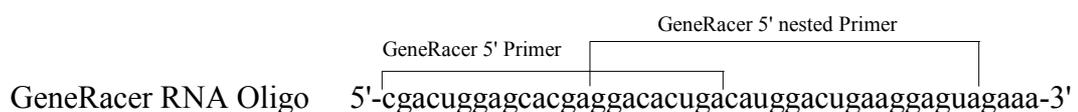
3. Zur Entfernung der mRNA-Kappe wird der folgende Ansatz 60 min bei 37°C inkubiert.

Komponenten	Volumen
dephosphorylierte mRNA	7 µL
10-fach konz. TAP-Puffer	1 µL
RNaseOut [40 U/µL]	1 µL
TAP [0,5 U/µL]	1 µL
	Σ 10 µL

4. Die mRNA wird nach Punkt 2 präzipitiert.

5. Zur kappenfreie mRNA werden 0,25 µg „GeneRacer RNA Oligo“ gegeben, 5 min bei 65°C inkubiert um Sekundärstrukturen aufzulösen und dann das RNA-Oligo in folgendem Ansatz ligiert. Inkubiert wird für 60 min bei 37°C.

Komponenten	Volumen
vorgelegte mRNA und Oligonukleotid	~6 µL
10-fach konz. Ligase-Puffer	1 µL
ATP [10 mM]	1 µL
RNaseOut [40 U/µL]	1 µL
T4 RNA-Ligase [5 U/µL]	1 µL
	Σ 10 µL



6. Die mRNA wird nach Punkt 2 präzipitiert und in 10 µL DEPC-Wasser resuspendiert.

7. Die reverse Transkription der mRNA mit dem „Superscript II RT-Module“ erfolgt durch Zugabe von 1 µL „GeneRacer Oligo (dT)-Primer“ [50 µM] und 1 µL dNTP-Mix [je 10 mM] zur ligierten mRNA. Erneut werden Sekundärstrukturen für 5 min bei 65°C aufgelöst und der folgende Ansatz 50 min bei 42°C inkubiert.

Komponenten	Volumen
vorgelegte ligierte mRNA, Oligo(dT) Primer und dNTP-Mix	~12 µL
5-fach konz. First-Strand-Puffer	4 µL
DTT [100 mM]	2 µL
RNaseOut [40 U/µL]	1 µL
Superscript II RT [200 U/µL]	1 µL
	Σ 20 µL

8. Die reverse Transkriptase wird 15 min bei 72°C inaktiviert und die an die cDNA hybridisierte mRNA durch Zugabe von 1 µL RNase H [2 U/µL] und Inkubation bei 37°C für 20 min abgebaut. Die cDNA wird zu 1 µL aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

C.2.1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Im Jahr 1983 entwickelte Kary Mullis die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)¹, eine *in vitro*-DNA-Amplifikationstechnik, die es erlaubt gezielt DNA-Abschnitte zu vervielfältigen.² Theoretisch lässt sich in jedem PCR-Zyklus die Anzahl der DNA-Kopien verdoppeln. Man erhält bei N_0 vorgelegten Ausgangskopien und n PCR-Zyklen eine Kopienzahl $N = N_0 \times 2^n$.³ Je nach Ausgangskonzentration der Vorlage werden etwa 35 PCR-Zyklen durchgeführt. Im ersten Schritt eines Zykluses wird zunächst eine doppelsträngige DNA-Vorlage durch Erhitzen auf 94°C denaturiert. In der nachfolgenden Anlagerungs- oder „Annealing“-Phase lagern sich 2 Oligonukleotid-Primer an die zu ihnen

1 Mullis, 1990

2 Saiki *et al.*, 1985; Saiki *et al.*, 1988

3 Lottspeich & Zorbas, 1998

komplementären DNA-Sequenz an und bilden damit die Enden des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitts auf der Ausgangsmatrize. Die Anlagerungstemperatur (meist 50 - 68°C) ist hierbei vom GC-Gehalt, insbesondere im 3'-Bereich der verwendeten Primer und deren Länge abhängig.¹ In der letzten Phase eines PCR-Zyklus, der Verlängerungs- oder Elongations-Phase, verlängert eine temperaturstabile DNA-Polymerase das 3'-Ende der Primer und synthetisiert zur jeweiligen Vorlage einen komplementären DNA-Strang. Für diesen Syntheseschritt liegt das Temperaturoptimum je nach verwendeter DNA-Polymerase bei 68 - 74°C. Zur Verifizierung des gebildeten PCR-Produkts kann die sogenannte „nested“-PCR eingesetzt werden. Bei dieser Variante dient das aufgereinigte PCR-Produkt als Vorlage und es erfolgt eine zweite PCR mit einem neuen spezifischen Primerpaar, dessen Anlagerungspositionen weiter innerhalb des amplifizierten Segments liegen. Wird einer der Ausgangsprimer beibehalten und nur ein neuer Primer eingesetzt, so spricht man von einer „seminested“-PCR.

Standard PCR-Ansatz

Die unten aufgeführten Komponenten werden auf Eis in einem 0,2 mL-PCR-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert, in den auf 95°C vorgeheizten Thermocycler gestellt und das unten aufgeführte Programm ausgeführt. Zu beachten ist, dass die Polymerase erst nach dem dNTP-Mix hinzugefügt werden darf, da es sonst bei Polymerasen mit Korrekturleseaktivität zur Primerdegradation durch die 3'→5'-Exonuklease-Aktivität kommen kann.

<u>PCR-Ansatz:</u> DNA-Vorlage	1 – 100 ng
10-fach konz. Polymerase-spezifischer Puffer	2,0 µL
Plus-Strangprimer [10 µM]	1,0 µL
Minus-Strangprimer [10 µM]	1,0 µL
dNTPs [je 2,5 mM]	1,5 µL
<i>Pfu</i> -Polymerase [3 U/µL]	0,2 µL
dH ₂ O	ad 20 µL

1 Rychlik, 1995

Standard PCR-Programm

Temperatur	Zeit	Zyklen	Schritt
95°C	120 s	1x	Denaturierung
94°C	30 s	35x	Denaturierung
T _a	30 s		Anlagerung („annealing“)
72°C	120 s je 1000 Bp		Verlängerung („elongation“)
72°C	300 s je 1000 Bp	1x	terminale Verlängerung

T_a: Anlagerungstemperatur des verwendeten Primers

C.2.1.7 PCR-Produkt-Aufreinigung und Konzentrierung

Das „QIAquick PCR Purification Kit“ nutzt die Eigenschaft von DNA bei pH-Werten unter 7,5 in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze an Silica zu adsorbieren (siehe auch C.2.1.2).¹ Die Durchführung erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers.²

Der PCR-Ansatz wird mit dem 5-fachen Volumen an Puffer PB gemischt und in eine Zentrifugationssäule überführt, die sich in einem 2 mL-Reaktionsgefäß befindet. Die Zentrifugationssäule enthält die Silicamembran, an welche die DNA bindet. Die Säule wird zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Nach Waschen mit 750 µL Puffer PE können die PCR-Produkte mit 30 µL Puffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) eluiert werden.

C.2.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese³ wandert DNA im elektrischen Feld auf Grund der negativen Ladung ihrer Phosphatgruppen zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA in der Agarosegelmatrix ist abhängig von Größe und Konformation der Moleküle. Für lineare DNA-Moleküle besteht dabei über einen weiten Größenbereich eine lineare Abhängigkeit zwischen dem negativen dekadischen Logarithmus der Länge der Fragmente in Nukleotidpaaren und der relativen Wanderungsdistanz im Agarosegel. Durch den Vergleich mit einer bekannten Menge an aufgetragenem DNA-Längenstandard können Größe und Konzentration der eingesetzten DNA abgeschätzt werden. Dafür wird die DNA meist mit Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid) angefärbt, welches

1 Hamaguchi & Geiduschek, 1962; Vogelstein & Gillespie, 1979

2 QIAgen, 2000b

3 Sambrook *et al.*, 2001

in die DNA interkaliert. Der interkalierte Farbstoff kann durch UV-Licht angeregt werden und emittiert oranges Licht der Wellenlänge 590 nm.

Je nach Größe der zu untersuchenden DNA werden 0,7 – 3% Agarose in TAE-Puffer aufgekocht, bis die Lösung klar wird und in eine Gelelektrophoresekammer gegossen. Das ausgehärtete Gel wird mit TAE-Puffer überschichtet und die mit 1/10 Volumen 10-fach konzentriertem Auftragspuffer vermischte DNA-haltige Probenlösung aufgetragen. Es wurden immer 3 µl Probe eingesetzt. Ein parallel aufgetragener DNA-Längenstandard (C.1.13.1) dient als Vergleich. Nach der Elektrophorese wird das Gel 5 min in Ethidiumbromidlösung gefärbt und 10 min gewässert. Auswertung und Dokumentation erfolgen auf dem Transilluminator bei einer Wellenlänge von 312 nm mit Hilfe einer CCD-Videokamera und der „Photo Finish Zsoft“-Software (C.1.4).

<u>TAE-Puffer:</u>	Tris-Base	40 mM
	Eisessig	40 mM
	EDTA	1 mM

<u>10-fach konz. Auftragspuffer:</u>	50-fach TAE-Puffer	20%
	Glycerin	50%
	EDTA	100 mM
	SDS	0,1%
	Bromphenolblau	0,1%
	Xylencyanol	0,1%

<u>Ethidiumbromid-Färbelösung:</u>	125 µL Stammlösung [40 ng/µL] auf 250 mL dH ₂ O
------------------------------------	--

C.2.1.9 Restriktionsspaltung

Für die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen (C.1.9.1) dient ein Ansatz nach folgendem Schema:

<u>Restriktionsspaltung:</u>	enzymspezifischer 10-fach konz. Puffer	1,5 µl
	Restriktionsenzym	10 U
	(Rinderserumalbumin (BSA) [10 µg/µL]	0,15 µl)
	DNA	x µg
	dH ₂ O	ad 15µL

Der Ansatz wird 60 min bei 37°C inkubiert. Gestoppt wird die Reaktion durch Zugabe von 1,5 µL 10-fach konzentriertem Auftragspuffer. Mit dem gesamten Ansatz erfolgt dann die Gelelektrophorese (C.2.1.8).

C.2.1.10 DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen

Die Qualität einer Plasmidpräparation (C.2.1.2) bzw. Restriktionsspaltung (C.2.1.9) wird in einem Agarosegel durch Ethidiumbromid-Färbung überprüft (C.2.1.8). Wird die DNA noch für weiterführende Experimente benötigt, so kann sie mit Hilfe einer Gelextraktion wieder zurückgewonnen werden. Die Gelmatrix wird in einem speziellen Puffer aufgelöst, um dann die DNA über Bindung an eine Silicamatrix aufzureinigen (siehe auch C.2.1.2). Die Durchführung erfolgt nach Herstellervorgaben.¹

Aus einem Agarosegel wird das Gelstück mit der gewünschten DNA herausgeschnitten und das Gewicht des Stücks bestimmt. Zu diesem gibt man 300 µl Puffer QG pro 100 mg Gel und inkubiert für mindestens 10 min bei 50°C bis sich das Gelstück vollständig aufgelöst hat. Nach Zugabe von einem Gelvolumen (Gelgewicht [mg] ≈ Gelvolumen [µl]) Isopropanol wird die Probe auf eine Zentrifugationssäule aufgetragen und zentrifugiert. Zum Waschen werden zuerst 500 µl Puffer QG und anschließend 750 µl Puffer PE verwendet. Die DNA wird in 30 µL Puffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) eluiert.

¹ QIAgen, 2000a

C.2.1.11 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4 DNA-Ligase

Das Einfügen von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren erfolgt mittels der T4 DNA-Ligase. Die T4 DNA-Ligase stammt ursprünglich aus dem Bakteriophagen T4, wird aber inzwischen rekombinant in *E. coli* hergestellt. Das Enzym katalysiert die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-Hydroxylgruppe von Ribose oder Desoxyribose in doppelsträngiger DNA bzw. RNA. Dabei verbindet das Enzym sowohl „blunt ends“, als auch „sticky ends“. Die Aktivität der T4 Ligase wird häufig in Weiss-Units angegeben.¹ Für die Ligation wird ein molares Vektor-Insert-Verhältnis von 1:3 empfohlen. Die hierfür notwendigen Konzentrationsbestimmungen werden fotometrisch durchgeführt (C.2.1.3).

Die Ligation erfolgt in einem 15 µL-Ansatz bestehend aus den DNA-Fragmenten, dem geschnittenen Vektor, 1,5 µl 10-fach konzentriertem Ligase-Reaktionspuffer und 10 Weiss-Units T4 DNA-Ligase. Der Ansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und das Ligationsprodukt in elektrokompente *E. coli*-Zellen transformiert (C.2.2.4.1).

C.2.1.12 Zyklische Sequenzierung

Die Sequenzierung nach Sanger² (auch Sanger-Coulson-Methode, Didesoxy-Sequenzierung oder Kettenabbruch-Verfahren) basiert auf einer DNA-Synthese *in vitro*, die in ihrem Ablauf prinzipiell mit einem einzelnen Temperaturzyklus einer PCR (C.2.1.6) vergleichbar ist. Im Gegensatz zur PCR wird hierbei nur ein Primer eingesetzt und der Reaktionsansatz enthält neben 2'-Desoxynukleotid-5'-Triphosphaten (dNTP) zusätzlich ein 2', 3'-Didesoxynukleotid-5'-Triphosphat (ddNTP). Das ddNTP konkurriert mit dem jeweiligen dNTP um den Einbau in den wachsenden Komplementärstrang. Wird ein ddNTP eingebaut, so kommt es zum Abbruch der Polymerisation, da die 3'-Hydroxy-Gruppe für die Verknüpfung des nächsten Nukleotids fehlt. Durch optimale Wahl des ddNTP / dNTP-Verhältnisses wird die Reaktion so gestaltet, dass es im statistischen Mittel an jeder Position zum Kettenabbruch kommt. Um eine Sequenzabfolge vollständig zu analysieren, wird für jedes der 4 Nukleotide ein Ansatz benötigt. Diese vier Ansätze werden parallel auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen, die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt und detektiert. Da nur geringe Mengen der einzelnen Kettenabbruch-Fragmente gebildet werden, sind hochsensitive Detektionsverfahren nötig, die

1 Weiss *et al.*, 1968

2 Sanger *et al.*, 1977

in der Regel auf Fluoreszenzfarbstoffen basieren. Bei der zyklischen Sequenzierung („cycle sequencing“) ermöglicht es der Einsatz thermostabiler Polymerasen die Sequenzierreaktion vergleichbar der PCR in mehreren aufeinander folgenden Temperaturzyklen zu durchlaufen und so eine deutlich höhere Produktausbeute zu erzielen.¹

In dieser Arbeit wird das LiCor „DNA Sequenzer 4200S-1“-Sequenziersystem eingesetzt. Die Markierung der Sequenzierfragmente erfolgt durch Primer, die mit dem Farbstoff IRD800, einem Heptamethincyanin-Fluoreszenzfarbstoff, gekoppelt sind. Der Farbstoff wird bei einer Wellenlänge von 788 nm angeregt und emittiert Licht der Wellenlänge 819 nm. Die Detektionseinheit des Systems ist auf das untere Ende des Laufbereichs im Polyacrylamidgel gerichtet und detektiert die Fragmente in den vier Reaktionsansätzen, wenn sie passieren. Mittels der zugehörigen Software kann die DNA-Sequenz aus den Daten abgeleitet werden.

Sequenzierreaktion

Für die Sequenzierreaktion wird das „ThermoSequenase labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ von Amersham Biosciences verwendet. Zuerst wird ein DNA-Primer-Mix bestehend aus 300 fmol Plasmid-DNA und 2 pmol Sequenzierprimer in einem Gesamtvolumen von 15 µL angesetzt. In jeweils ein 0,2 mL-PCR-Reaktionsgefäß werden 0,8 µL A-, C-, G- bzw. T-Reagenz auf Eis vorgelegt. Das Reagenz beinhaltet die Polymerase, Puffer, dNTPs, sowie jeweils ein ddNTP. Hierzu gibt man 3,2 µL des DNA-Primer-Mixes und überschichtet mit ca. 10 µL Mineralöl oder Wachs um Verdunstung zu verhindern. Die Reaktionsgefäße werden kurz zentrifugiert, dann direkt vom Eis in den auf 95°C vorgeheizten PCR-Cycler gesetzt und das „cycle sequencing“-Programm gestartet.

„cycle sequencing“-Programm

Temperatur	Zeit	Zyklen	Schritt
95°C	120 s	1x	Denaturierung
95°C	30 s	30x	Denaturierung
T _a	30 s		Anlagerung / „annealing“
70°C	30 s		Verlängerung / „elongation“
70°C	30 s	1x	terminale Verlängerung

T_a: Anlagerungstemperatur des verwendeten Primers

¹ Murray, 1989

Direkt vor dem Auftragen der Ansätze auf das Sequenziergel werden 4 µL Formamid-haltige Farb-Ladelösung zugegeben und der Ansatz für 2 min bei 70°C denaturiert. Bis zum Auftragen der Proben werden die Ansätze auf Eis gelagert. Zur Auftrennung der Kettenabbruch-Fragmente wird eine Gelelektrophorese in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel¹ (siehe unten) durchgeführt.

<u>41 cm Rapid Gel XL 0,2 mm:</u>	Harnstoff	10,5 g
	10-fach konz. TBE Long Run	2,5 mL
	dH ₂ O	14,0 mL
	Acrylamid-Gellösung, 40%, 19:1	3,75 mL
	DMSO	250 µL
	TEMED	37,5 µL
	10% Ammoniumpersulfat-Lösung	175 µL
<u>10-fach konz. TBE Long Run:</u>	Tris-Base [1,34 M]	162,0 g
	Borsäure [450 mM]	27,5 g
	Na ₂ -EDTA x 2 H ₂ O [25 mM]	9,3 g
		ad 1 L dH ₂ O

Die Gellösung wird filtriert (0,45 µm-Filter) und entgast. Nach Gießen und Aushärten des Gels wird zunächst ein Vorlauf für 10 min durchgeführt (2000 V, 35 mA, 45 W und 45°C Geltemperatur). Dann werden 1 - 1,5 µL der jeweiligen Proben aufgetragen. Der Sequenzierlauf erfolgt unter den gleichen Bedingungen wie der Vorlauf. Die Daten werden mit Hilfe der Software „BaseImagIR 4.1“ von LiCor aufgezeichnet und ausgewertet.

C.2.1.13 Alignierung von DNA-Sequenzen

Die Auswertung der Sequenzierdaten, Assemblierung und Alignierung der Sequenzen erfolgt mit dem Programm „AlignIR“, Version 2.0 der Firma LiCor. Zur grafischen Darstellung werden einige Alignments mit dem Programm „ClustalX“, Version 1.8² durchgeführt.

1 Facius *et al.*, 1999

2 Thompson *et al.*, 1997

C.2.2 Umgang mit Bakterien

C.2.2.1 Kultivierung von Bakterien

C.2.2.1.1 Kultivierung auf Festmedien und Anlegen von Einzelkolonien

Das Bakterienmaterial wird mit einem sterilen Glasstab bzw. Stocherholz aus einer Glycerinkultur (C.2.2.2) oder direkt von einer Einzelkolonie aufgenommen und auf einer LB-Agar-Platte mit dem geeigneten Antibiotikum ausgestrichen. Die Platten werden anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert und können danach für mehrere Monate bei 4°C gelagert werden, sofern sie gegen Austrocknen geschützt sind.

C.2.2.1.2 Kultivierung in Flüssigmedien

Werden größere Mengen an Zellen benötigt, so erfolgt die Anzucht der Bakterien in Flüssigmedium mit dem jeweiligen Antibiotikum. Das Animpfen kann direkt von einer Glycerinkultur oder einer Einzelkolonie mit einem sterilen Glasstab erfolgen. Bis zu 3 mL Kultur werden in Anzuchtröhrchen auf dem Rollinkubator kultiviert, bis 100 mL in entsprechend großen Flaschen (50 - 1000 mL) und bis zu 200 mL in 1000 mL-Anzuchtkolben auf dem Schüttler bei 200 U/min. Bei grösseren Volumina empfiehlt sich das Anlegen einer Vorkultur über Nacht von etwa 1/20 des Endvolumens. Vor dem Animpfen sollte das verbrauchte Medium der Vorkultur entfernt werden, da es die von den Bakterien zur Inaktivierung des Antibiotikums Ampicillin ins Medium sezernierte β -Lactamase enthält. Die Anzucht der Bakterien erfolgt in der Regel bei 37°C bis zur gewünschten optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}). Für die Expression von Proteinen wird bei einer Temperatur von 30°C kultiviert.

C.2.2.2 Anlegen von Glycerinkulturen

3 mL einer Übernachtskultur werden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 800 μ L LB-Medium resuspendiert. Anschließend werden 200 μ L Glycerin (~87%) zu der Bakteriensuspension gegeben, gemischt und die Kultur bei – 80°C gelagert. (Die Endkonzentration an Glycerin beträgt 17%).

C.2.2.3 Klonierung mit dem TOPO TA Cloning Kit

Die Versuchsdurchführung folgt den Anweisungen des Herstellers.¹

C.2.2.3.1 „A-tailing“ von *Pfu*-PCR-Produkten

PCR-Produkte, die mit korrekturlesenden Polymerasen wie *Pfu* erzeugt wurden, weisen an den Enden keinen 3'-A-Überhang auf, wie bei der Verwendung von z.B. *Taq*- oder KlenTherm-Polymerase. Da das zur Klonierung benutzte TOPO TA Cloning Kit aber auf einen A-Überhang angewiesen ist, muss dieser nachträglich angefügt werden. Dieser Vorgang wird auch „A-tailing“ genannt. Dazu werden die mit *Pfu*-Polymerase erzeugten und aufgereinigten PCR-Produkte mit KlenTherm-Polymerase [0,6 U/ μ L Ansatz] und dATP in einer Endkonzentration von 0,2 mM inkubiert. Die Inkubation erfolgt für 60 min bei 72°C. Vor der anschließenden TOPO-Ligation erfolgt eine Aufreinigung der PCR-Produkte mittels Gel-Extraktion (C.2.1.10).

C.2.2.3.2 TOPO-Ligation in den Vektor pCR4-TOPO

Für die Ligation wird aufgereinigtes PCR-Produkt mit A-Überhang verwendet. 4 μ L dieser DNA-Lösung, 1 μ L Salz-Lösung und 1 μ L Vektor-Lösung aus dem TOPO TA Cloning Kit werden gemischt und 5 min bei 25°C inkubiert.

C.2.2.3.3 Hitzeschock-Transformation

Für die Hitzeschock-Transformation werden kompetente TOP10-Zellen (C.1.6) aus dem TOPO TA Cloning Kit verwendet. Zu 50 μ L dieser Zellen werden 2 μ L des Ligationsansatzes gegeben, vorsichtig vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird ein Hitzeschock (30 s bei 42°C) durchgeführt. Nach 2 min Inkubation auf Eis werden 250 μ L 25°C warmes SOC-Flüssigmedium (C.1.7) zugegeben. Unter Schütteln wird der Transformationsansatz 60 min bei 37°C inkubiert. Danach werden 10 μ L, 50 μ L und 240 μ L dieses Ansatzes auf LB-Agarplatten mit 100 μ g/mL Carbenicillin zur Selektion ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nur Klone, die über eine Plasmid-vermittelte Antibiotika-Resistenz verfügen und ein Insert tragen, können auf diesen Platten zu Kolonien heranwachsen.

¹ Invitrogen, 2001a

C.2.2.4 Elektro-Transformation

Unter Transformation¹ wird in der Bakteriengenetik die Übertragung von DNA in Bakterienzellen verstanden. Eine natürliche Kompetenz, d.h. die Fähigkeit Merkmale durch aufgenommene DNA zu übernehmen, konnte bei verschiedenen Bakterien wie z.B. *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* oder Salmonellen festgestellt werden. Der Grad der Kompetenz hängt vom physiologischen Zustand der Zelle ab. Sie ist in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase am höchsten und sinkt danach rasch auf ein Minimum ab.² *Escherichia coli* besitzt kein natürliches System zur Aufnahme von DNA. Durch eine chemische Behandlung, beispielsweise mit CaCl₂, kann *E. coli* jedoch kompetent gemacht werden.³ Eine andere Vorgehensweise der DNA-Übertragung besteht in der Permeabilisierung der Zellmembran mit Hilfe elektrischer Felder.⁴ Diese erzeugen temporäre Poren in der Zellmembran, durch die DNA in die Zelle eindringen kann. Die dabei auftretenden Membranschäden können vom Bakterium wieder behoben werden. Die Herstellung elektrokompenter Zellen ist weniger aufwendig als die von chemisch kompetenten Zellen, da keine speziellen Puffer benötigt werden. Die Zellen müssen sich nur in der geeigneten Wachstumsphase befinden und salzfrei gewaschen vorliegen. Dieses Verfahren eignet sich für eine Vielzahl von Bakterienstämmen und auch für eukaryotische Zellen, wie Hefen oder Säugerzelllinien, für die es ursprünglich entwickelt wurde.⁵

Das im folgenden dargestellte Vorgehen orientiert sich am „MicroPulser“-Manual.⁶

C.2.2.4.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Die Zentrifugationsschritte erfolgen bei 4°C und 4000xg. 3 mL einer über Nacht gewachsenen *E. coli*-Kultur werden sedimentiert und 1000 mL LB-Medium mit dem Pellet beimpft. Die Kultur wird - wie in C.2.2.1.2 beschrieben - kultiviert, bis die OD₆₀₀ einen Wert von 0,6 erreicht hat. Die Zellsuspension wird in vorgekühlte Zentrifugenbecher transferiert, 30 min auf Eis abgekühlt und zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 1000 mL einer sterilen, eiskalten, 10%-igen Glycerinlösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Hierauf folgen weitere

1 Avery *et al.*, 1944 / 1979

2 Schlegel, 1985

3 Mandel & Higa, 1970; Cohen *et al.*, 1972

4 Dower *et al.*, 1988

5 Neumann *et al.*, 1982

6 BIO-RAD, 1999; Ausubel *et al.*, 1987; Miller & Nickoloff, 1995

Waschschritte mit 500 mL bzw. 20 mL der Glycerinlösung. Im letzten Schritt wird das Pellet in einem Endvolumen von 3 mL der sterilen, eiskalten 10%-igen Glycerinlösung resuspendiert, zu je 50 μ L aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

C.2.2.4.2 Elektroporation

Die Elektroporationsapparatur „MicroPulser II“ von BIO-RAD ermöglicht es elektrische Felder aufzubauen, die die Zellmembran permeabilisieren, so dass DNA eindringen kann. Der Versuch wird unter Kühlung mit Eis durchgeführt, damit die Kompetenz der Zellen erhalten bleibt. Damit kein Strom durch die Elektroden der Küvette fließen kann, müssen sowohl die Zellen als auch die DNA-Lösung salzfrei sein.

Zu den kompetenten Zellen (C.2.2.4.1) wird die Plasmidlösung gegeben und das Gemisch in eine vorgekühlte Elektroporations-Küvette (Spaltbreite: 1 mm) überführt. Die Küvette wird in die Halterung des MicroPulsers eingesetzt und die Elektroporation mit dem Programm „EC 1“ durchgeführt (Parameter: 1,8 kV, 1 Puls). Die Entladungszeit wird automatisch angezeigt und sollte etwa 5 ms betragen. Ein entscheidender Schritt für den Erfolg ist die sofortige Zugabe von 500 μ L SOC-Medium (C.1.7) zur Zellsuspension nach der Elektro-poration. Die Suspension wird anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt und 60 min bei 37°C inkubiert. Dann werden je 10 μ L, 50 μ L und 240 μ L des Ansatzes auf Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

C.2.2.5 Proteinexpression

Die Kultivierung einer Bakterienkultur zur Proteinexpression erfolgt im 200 mL-Maßstab in 1000 mL-Anzuchtkolben bei 200 U/min und einer Temperatur von 30°C . Das LB-Medium wird mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin versetzt und vor temperiert. Angeimpft wird mit dem Pellet einer 10 mL-Übernachtskultur. Bei einer OD_{600} von 1,0 erfolgt die Induktion der Proteinexpression durch 0,5 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG). Nach drei weiteren Stunden kann durch Zentrifugation bei 4000xg für 10 min bei 4°C geerntet werden. Der Überstand wird verworfen und das Bakterienpellet sofort in der French Press aufgeschlossen (C.2.2.6) oder bei -80°C gelagert.

C.2.2.6 Zellaufschluss mittels French Press

Zur Gewinnung der intrazellulär exprimierten Proteine wird das abzentrifugierte Zellmaterial von 200 mL Kultursuspension in 5 mL FPLC-Probenpuffer (C.2.3.9) resuspendiert. Es werden 1 mM EDTA und 1 mM PMSF zugegeben, um den proteolytischen Abbau des exprimierten Proteins durch beim Aufbrechen freigesetzte bakterielle Proteasen zu verhindern. Der Zellaufschluss erfolgt mit einer „French Press“-Hochdruck-Molekularpresse von SLM-Aminco in einer auf 4°C gekühlten 40k-Aufschlusszelle. Bei diesem Verfahren wird das Probenmaterial in der Aufschlusszelle einem Druck von 1415 bar (20000 psi) ausgesetzt und durch ein sehr kleines Ventil gepresst. Die plötzliche Druckentspannung und auftretende Scherkräfte bewirken ein Zerreißen der Zellen und die Freisetzung der Proteine. Zur Gewährleistung eines vollständigen Aufschlusses wird dieser Vorgang 2-mal durchgeführt. Die Zelltrümmer werden sofort durch Zentrifugation bei 30000xg für 30 min bei 4°C entfernt, der klare Überstand mit einem Spritzenfilter (0,2 µm) sterilfiltriert und die exprimierten Proteine mittels FPLC (C.2.3.9) aufgereinigt. Für diese Arbeiten konnte freundlicherweise die „French Press“-Anlage der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Pistorius verwendet werden.

C.2.3 Arbeiten mit Proteinen

C.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen auf Grund ihres Molekulargewichts in einer Polyacrylamid-Matrix.¹ Die Proteine werden bei der Probenvorbereitung mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) behandelt. SDS lagert sich an das Protein an, stört nicht-kovalente Wechselwirkungen und löst damit die Tertiärstruktur auf. Auf Grund eines konstanten Massenverhältnisses von 1,4 g SDS je g Protein (ca. 1 SDS-Molekül je 2 Aminosäuren), entsteht ein konstantes Verhältnis zwischen der Zahl der Ladungen und der Größe des Proteins, wobei die Eigenladung des Proteins überdeckt wird.² Die entstehenden negativ geladenen ellipsoiden Mischmicellen werden bei der Wanderung zur Anode durch den Siebeffekt der Gelmatrix auf Grund ihrer Größe (Stokesscher Radius) aufgetrennt, wobei sich

1 Shapiro *et al.*, 1967; Laemmli, 1970

2 Lottspeich & Zorbas, 1998

eine umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und der Wanderungsstrecke der SDS-Polypeptid-Micellen ergibt. Glykoproteine werden im Verhältnis zu ihrem Molekulargewicht weniger stark beladen als nicht glykosylierte Proteine und wandern daher in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese langsamer als nicht glykosylierte Proteine gleicher Größe. Weisen Proteine Disulfidbrücken auf, so werden sie weniger stark entfaltet (kleinerer Stokesscher Radius), was zu einer höheren Wanderungsgeschwindigkeit führt. Zur Bestimmung der Molekülgewichts müssen die Disulfidbrücken vorher durch ein reduzierendes Agenz, wie β -Mercaptoethanol aufgebrochen werden. Die Gelmatrix für die Gelelektrophorese entsteht durch chemische Kopolymerisation von Acrylamidmonomeren mit einem Quervernetzer, meist N'-N'- Methylenbisacrylamid. Verwendet werden die Gelkammern „Miniprotean II“ von BIO-RAD nach Herstellerangaben. Für die Versuche wird der LMW-Molekulargewichts-Marker (C.1.13.2) als Vergleichsstandard genutzt. Es werden jeweils 2,5 μ L in eine Geltasche aufgetragen. Zur Vorbereitung der Proben werden diese mit dem gleichen Volumen an 2-fach konzentriertem reduzierenden Probenpuffer vermischt und zur Denaturierung für 4 min bei 95°C erhitzt.

<u>2-fach konz. reduzierender Probenpuffer, pH 6,8:</u>	Tris-HCl	0,125 M
	Natriumdodecylsulfat	4%
	Bromphenolblau	0,005%
	Glycerin	20%
	β -Mercaptoethanol	5%
<u>Elektrophorese-Laufpuffer, pH 8,3:</u>	Tris-Base	24 mM
	Glycin	192 mM
	Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,1%
	pH-Wert nicht zusätzlich einstellen	
<u>Trenngelpuffer, pH 8,8:</u>	Tris-HCl	1,5 M
<u>Sammelgelpuffer, pH 6,8:</u>	Tris-HCl	0,5 M

Trenn- und Sammel-Gellösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

	Trenngel 0,375 M Tris, pH 8,8	Sammelgel 0,125 M Tris, pH 6,8
Monomerkonzentration	10%	4%
Acrylamid-Bis-Lösung (29:1, 40%)	2,5 mL	0,98 mL
dH₂O	4,85 mL	6,43 mL
Trenngelpuffer	2,5 mL	-
Sammelgelpuffer	-	2,5 mL
10% SDS-Lösung	100 µL	100 µL
Lösung 10 min entgasen		
10% APS-Lösung	50 µL	50 µL
TEMED	5 µL	10 µL

C.2.3.2 Coomassiefärbung

Die in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (C.2.3.1) aufgetrennten Proteine können direkt im Gel mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt werden. Dieser Farbstoff ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der ursprünglich für die Färbung von Seide und Wolle verwendet wurde. Der in dieser Arbeit verwendete Farbstoff Coomassie R-350 kann laut Herstellerangaben 50 - 100 ng Protein pro Bande nachweisen.

Das Gel wird in die Färbelösung (siehe unten) gelegt und unter Schütteln 20 min bei 50°C gefärbt. Zum Entfärben wird die Färbelösung durch Entfärber (20%-iger Isopropanol und 10%-iger Essigsäure) ersetzt und für 20 min bei 50°C geschüttelt. Hierauf folgen zwei Entfärbeschritte mit dH₂O ebenfalls für 20 min bei 50°C unter Schütteln.

Das Färben einer PVDF-Membran erfolgt durch 2 - 3 min Färben und 2-mal 5 min Entfärben mit Entfärber.

Coomassiefärbelösung: Eine Tablette Coomassie R-350 („PhastGel Blue R“) wird in 150 mL dH₂O aufgelöst und mit 50 mL Essigsäure und 100 mL Isopropanol versetzt. Ungelöste Partikel werden mit einem Papierfaltenfilter entfernt.

C.2.3.3 Trocknen von Polyacrylamid-Gelen für die Dokumentation

Nach der Färbung mit Coomassie können SDS-Polyacrylamid-Gele (C.2.3.1) zur Archivierung getrocknet werden. Das Gel wird 60 min in Konservierungslösung (2% Glycerin und 4% Essigsäure) equilibriert und zwischen zwei gequollene Einmachfolien gelegt. Dieses Sandwich wird 120 min bei 65°C im Geltrockner unter Vakuum getrocknet und kann anschließend fotografiert oder gescannt werden.

C.2.3.4 Quantitative Proteinbestimmung mit dem Densitometer

Die Quantifizierung von Proteinbanden in einem SDS-Polyacrylamid-Gel (C.2.3.1) erfolgt durch Vergleich der Bandenintensität nach Coomassiefärbung (C.2.3.2) mit einer bekannten Proteinmenge. Das Gel wird unter Zuhilfenahme eines Durchlichtscanners eingelesen und ein densitometrischer Vergleich mit der „WinCam“-Software (C.1.4) durchgeführt. Als Vergleichsstandard dient der „Low Molecular Weight Calibration Kit“ (LMW) von Amersham Biosciences (C.1.13.2).

C.2.3.5 Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen

Die Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen geschieht analog zur quantitativen Bestimmung (C.2.3.4) durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Allerdings erfolgt die Bestimmung durch Abgleich der Laufstrecken der einzelnen Proteinbanden im Gel mit denen des Standards. Verwendung findet auch in diesem Fall die „WinCam“-Software (C.1.4).

C.2.3.6 Western-Blot

In dieser Arbeit werden die in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine beim Western-Blot¹ mittels Elektroblot auf eine hydrophobe, inerte Polyvinyliden-difluorid-Membran (PVDF-Membran)² übertragen, immobilisiert und anschließend immunologisch nachgewiesen. Die Proteine bewegen sich beim Elektroblot auf Grund des gebundenen SDS zur Anode. Bei der Wanderung nimmt der Anteil an gebundenem SDS auf Grund des SDS-freien Transferpuffers wieder ab, so dass die Proteine über hydrophobe

1 Renart *et al.*, 1979; Towbin *et al.*, 1979

2 Gültekin & Heermann, 1988

Wechselwirkungen an die Membran binden können. Die geblottete Membran stellt somit ein Abbild des Gels da.

Angewandt wird das halb trockene („semiwet“) Blotverfahren¹ mit den „Xcell II“-Blotmodulen von NOVEX. Die PVDF-Membran (8 x 7 cm) wird kurz mit Methanol hydrophilisiert und anschließend für 10 min in Transferpuffer (12 mM Tris-Base, 96 mM Glycin, 20% Methanol) equilibriert. Das Polyacrylamidgel wird entsprechend den Angaben des Herstellers zusammen mit der equilibrierten PVDF-Membran luftblasenfrei zwischen zwei Blotpapiere (GB 004) und zwei offenporigen Schaumstoffkissen auf jeder Seite so in die Module eingesetzt, daß die Proteine beim nachfolgenden Elektrotransfer aus dem Gel Richtung Anode auf die Membran wandern. Die Transferkammer wird mit Transferpuffer befüllt und bei 25 V für 1,7 h geblottet.²

C.2.3.7 Chemilumineszenzdetektion

Für die Detektion der auf die PVDF-Membran transferierten Proteine werden zwei Antikörper eingesetzt. Der primäre Antikörper ist spezifisch für das zu untersuchende Protein. Der sekundäre Antikörper ist gegen den primären gerichtet und mit einer Meerrettich-Peroxidase („horse radish peroxidase“, HRP) konjugiert.² Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazidion) zu 5-Aminophthalsäure durch H₂O₂. Die dabei freiwerdende Energie wird in Form von Licht abgegeben (Chemilumineszenz). Intensität und Dauer der Lichtemission werden durch chemische Verstärker, wie z.B. Phenole, deutlich gesteigert („enhanced chemiluminescence“, ECL). Das emittierte Licht hat bei einer Wellenlänge von 428 nm seine größte Intensität und kann mit einem blaulichtsensitiven Autoradiografiefilm detektiert werden.³

Die PVDF-Membran mit den geblotteten Proteinen wird 60 min in 20 mL Blockierungslösung auf einem Schüttler inkubiert und 2-mal kurz in Waschpuffer gewaschen. Die Lösung mit dem 1. Antikörper wird auf die Membran gegeben und 60 min inkubiert. Danach wird 2-mal kurz mit Waschpuffer gespült und abschließend 15 min und 2-mal 5 min gewaschen. Dieses Vorgehen wird mit dem 2. Antikörper wiederholt. Zur Detektion werden jeweils 1 mL der beiden ECL Western-Blotting-Detektionslösungen gemischt und auf die Membran

1 Kyhse-Andersen, 1984

2 Novex, 1995

3 Whitehead *et al.*, 1979

gegeben. Es wird 2 min inkubiert, die überschüssige Flüssigkeit entfernt und die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen. In der Dunkelkammer wird das Filmmaterial „Hyperfilm ECL“ in einer Autoradiografiekassette auf die Membran gelegt und 15 - 900 s belichtet. Die Entwicklung der Filme erfolgt entsprechend den Vorgaben des Herstellers mit dem Entwickler „D19“ und dem Fixierer „Unifix“. Die Membran wird anschließend mit Coomassie gefärbt, um den Größenmarker sichtbar zu machen (C.1.13.2).

<u>PBS-Puffer, pH 7,4:</u>	NaCl	137,0 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	5,4 mM
	KH ₂ PO ₄	1,8 mM

Waschlösung: PBS, 0,3% BSA, 0,3% (w/v) Tween 20

Blockierungs-Puffer: PBS, 3,0% BSA, 0,3% (w/v) Tween 20

Antikörper-Puffer: PBS, 1,0% BSA, 0,3% (w/v) Tween 20

1. Antikörper-Lösung: Primärer Antikörper, gemäß C.1.10 in 20 mL Antikörper-Puffer verdünnt

2. Antikörper-Lösung: Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Antikörper, gemäß C.1.10 in 20 mL Antikörper-Puffer verdünnt

Blockierungs- und Antikörper-Lösung werden immer frisch angesetzt.

C.2.3.8 Komplexierung von Proteasen mit Serpin1

Inhibitorisch wirkende Serpine bilden mit ihren Zielproteasen SDS-stabile Komplexe, die im Western-Blot (C.2.3.6) oder im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel (C.2.3.1) nachgewiesen werden können. In dieser Arbeit dient das Verfahren der Bestätigung der biologischen Aktivität des rekombinant hergestellten Serpins *BI-SPN1*.

Für die Komplektierungsreaktion werden 10 µL einer *Bl*-SPN1-Lösung (als Fusionsprotein oder in abgespaltener Form) in verschiedenen stöchiometrischen Verhältnissen mit der Serinprotease Thrombin (C.1.9.2.2) versetzt und bis zu 450 min bei 30°C inkubiert. Hierbei muss beachtet werden, dass Thrombin an Glas adhiert und daher keine Glasgefäße und -pipetten benutzt werden dürfen. Abgestoppt wird die Komplektierungsreaktion mit dem gleichen Volumen an 2-fach konzentriertem reduzierenden Probenpuffer (C.2.3.1) und 5 min Denaturierung bei 95°C. Die anschließende Analyse der Proben erfolgt durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot.

C.2.3.9 Proteinaufreinigung mittels „Fast Protein Liquid Chromatography“

Zur Reinigung des Fusionsproteins wird die Eigenschaft des Enzyms Glutathion-S-Transferase (GST) genutzt, hoch spezifisch an Glutathion zu binden. Glutathion wird auf einer inerten Sepharosematrix immobilisiert und kann so in der Affinitätschromatografie als Ligand der GST verwendet werden, um dieses Protein aus einem komplexen Proteingemisch heraus anzureichern.¹ Der große Vorteil von GST als Affinitätsmarkierung sind die milden Elutionsbedingungen. Im Gegensatz zu anderen Markierungen, ist die Verwendung von physiologischen Puffern unter Zufügen von geringen Mengen an reduziertem Glutathion möglich.²

Die Proteinaufreinigung wird mit Hilfe einer „fast protein liquid chromatography“ (FPLC)-Anlage der Firma Amersham Biosciences durchgeführt. Die Anlage gewährleistet eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse durch die Automatisierung einzelner Teilschritte (Equilibrierung, Elution und Regeneration der Säule). Das FPLC-System besteht aus folgenden Komponenten: Controller LCC-501 Plus, 2 Pumpen P-500, Mixer, Injektionsventil MV-7, 2 Ventile MV-8, Leitfähigkeitsmonitor, UV₂₈₀-Monitor UV-1, Schreiber REC-102 und Fraktionssammler FRAC-100. Die Bedienung erfolgt wahlweise über die Controller-Konsole oder mit einem PC in Verbindung mit der FPLCdirector-Software. Abbildung 10 zeigt den schematischen Aufbau einer FPLC-Anlage.

1 Simons & van der Jagt, 1977

2 Smith & Johnson, 1988

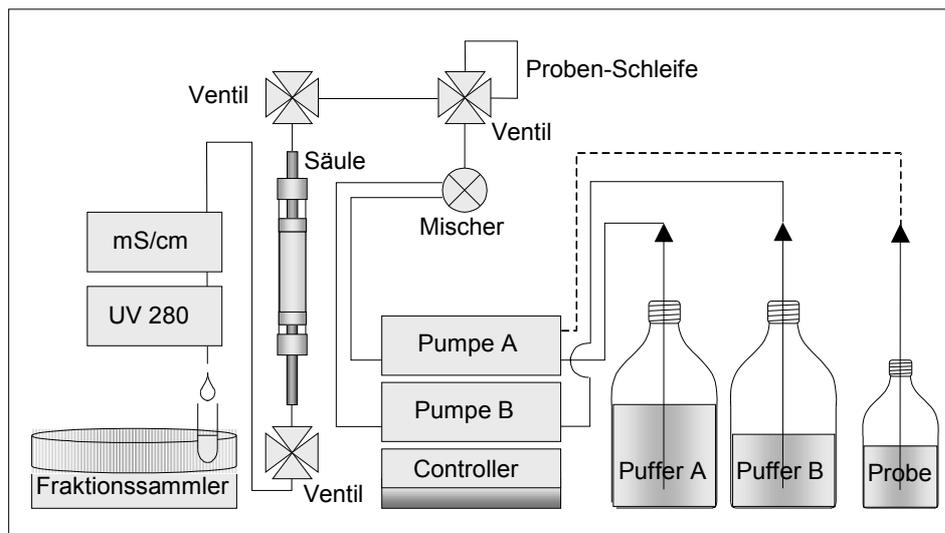


Abbildung 10: Schema der FPLC-Anlage
(aus Böhme, 2001)

In dieser Arbeit wird in der FPLC-Aufreinigung eine mit 5 mL Glutathion-Sepharose 4B gefüllte C10/10-Leersäule eingesetzt. Der Rohextrakt (C.2.2.6) wird vor dem Auftragen auf die Säule 30 min bei 30000xg und 4°C geklärt und mit einem Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm) sterilfiltriert, um unlösliche Bestandteile zu entfernen und ein Verblocken bzw. Kontamination der Säule zu vermeiden. Zu Beginn wird die GST-Sepharose-Säule mit 3 - 5 Säulenvolumen („column volume“, cv) Equilibrierungspuffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min gewaschen. Die Beladung der Säule mit dem geklärten Extrakt erfolgt mit einer Flußrate von 0,2 mL/min. Um unspezifisch gebundene Proteine und das Detergenz des Probenpuffers von der Säule zu spülen, wird mit PBS-Puffer gewaschen (1 mL/min) bis die OD_{280} des Durchlaufs wieder auf den Ausgangswert gefallen ist, mindestens aber mit 10 cv. Zur Elution wird der Elutionspuffer mit 0,3 mL/min über die Säule geleitet und Fraktionen von 1 mL Volumen gesammelt. (Das Fusionsprotein eluiert innerhalb der ersten 15 mL.) Nach der Elution wird die Säule mit mindestens 3 cv Regenerationspuffer (1 mL/min) gespült, um restliche, noch gebundene Proteine abzulösen. Zur Reduktion der Salzkonzentration wird mit PBS-Puffer nachgewaschen (3 cv, 1 mL/min).

<u>PBS-Puffer, pH 7,4:</u>	NaCl	137,0 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	5,4 mM
	KH ₂ PO ₄	1,8 mM
<u>Equilibrierungs-Puffer:</u>	PBS, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA	
<u>Probenpuffer:</u>	PBS, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF	
<u>Waschpuffer:</u>	PBS	
<u>Elutionspuffer:</u>	PBS, 20 mM reduziertes Glutathion (frisch angesetzt, pH 7,4)	
<u>Regenerationspuffer:</u>	PBS, 3 M NaCl	

Alle Puffer werden vor Gebrauch mit der Wasserstrahlpumpe entgast.

C.2.3.10 Spaltung des Fusionsproteins mit der Protease des Tabakätzvirus

In dieser Arbeit wird das Serpin *Bl*-SPN1 als Fusionsprotein mit His₆-markierter GST exprimiert und mittels Affinitätschromatografie an Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Zwischen N-terminaler GST und Serpin befindet sich eine Spaltstelle der Protease des Tabakätzvirus (TEV). Zur Abspaltung der GST wird das Fusionsprotein mit rekombinanter TEV-Protease inkubiert, die ebenfalls mit einer His₆-Markierung versehen ist.¹

Für den Verdau werden ~120 µg Fusionsprotein in 300 µL FPLC-Eluat (C.2.3.9) mit 20 U TEV-Protease versetzt und über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert.

C.2.3.11 Entfernung von TEV-Protease und Glutathion-S-Transferase mittels Affinitätschromatografie

Der Fusionsprotein-Spaltansatz enthält freies *Bl*-SPN1, freies His₆-GST, Reste an ungespaltenem His₆-GST-*Bl*-SPN1-Fusionsprotein, sowie His₆-markierte TEV-Protease.

¹ Parks *et al.*, 1994

Durch Bindung der Hexahistidinsequenz an eine Immobilisierte-Metall-Affinitäts-Chromatografie (IMAC)¹-Matrix, verbleibt nur *Bl*-SPN1 – als einzige Komponente ohne His₆-Markierung - in Lösung und kann somit leicht aufgereinigt werden. Das Chromatografie-Material (CM) besteht aus einer Sepharose-Matrix, an die über einen Spacer ein Chelatbildner gekoppelt ist. Der Chelator komplexiert ein zweiwertiges Metallion, wie z.B. Ni²⁺ oder Co²⁺. Über diese Ionen wiederum erfolgt die Komplexierung der His₆-Sequenz² und die Bindung der markierten Proteine an die Matrix. Als CM wurden Ni²⁺-NTA-Agarose³ und „Talon“, eine Co²⁺-CMA-Agarose⁴, getestet. Die Bestandteile der Ni²⁺-NTA-Agarose der Firma QIAGEN sind Nitrilotriessigsäure („nitrilotriacetic acid“, NTA) als Chelator und Sepharose CL-6B als Matrix. NTA besitzt 4 Koordinationssphären, die ein Ni²⁺-Ion binden. Über die 2 verbliebenen Sphären des Ni²⁺-Ions erfolgt die Komplexierung mit der His₆-Markierung. Beim „Talon“-Material (BD Biosciences) dient Carboxymethylaspartat (CMA) als Chelator. Die Bindung des Co²⁺-Ions erfolgt, wie bei NTA, über 4 Sphären. Das Co²⁺-Ion wiederum stellt 2 Sphären zur Bindung der His₆-Markierung bereit. Auf Grund der besonderen vierzahnigen Molekülstruktur soll CMA nach Herstellerangaben geringere Verluste an Co²⁺-Ionen durch Ausbluten aufweisen als NTA. Die im Vergleich zu Ni²⁺-Ionen erhöhte Spezifität der Co²⁺-Ionen für His₆-Markierungen beruht auf der geringeren Bindungsstärke, wodurch die Chelatisierung mit anderen Histidinhaltigen Proteinen reduziert wird.

Vor der Zugabe des Protease-Spaltansatzes (C.2.3.10) werden 100 µL des CM (50% (v/v) CM in 20%-igen Ethanol) 5-mal mit 450 µL PBS-Puffer (C.2.3.7) gewaschen. Der Puffer wird anschließend möglichst vollständig entfernt. Zu dem equilibrierten CM werden 300 µL rTEV-Protease-Spaltansatz gegeben und 15 min bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Das CM wird durch Zentrifugation bei 13000xg für 2 min im Ausschwingrotor sedimentiert und der Überstand mit dem nun gereinigten *Bl*-SPN1 abgenommen.

C.2.3.12 Dialyse

Da die Metallionen in den Chelatkomplexen der Chromatografie-Materialien nur relativ schwach gebunden sind, kann es zur Freisetzung von Metallionen in die eingesetzten Puffer

1 Porath *et al.*, 1975

2 Bush *et al.*, 1991

3 Hochuli *et al.*, 1987

4 Chaga *et al.*, 1999

kommen. Metallionen können störend auf die Aktivität von Proteasen wirken und sollten daher vor Versuchen zur Proteasehemmung entfernt werden. Dieses erfolgt mittels Dialyse unter Verwendung von „Slide-a-lyzer“-Dialysekassetten der Firma Pierce mit einer molekularen Ausschlußgrenze von 3,5 kD und einem Fassungsvermögen von bis zu 500 µL. Die Anwendung erfolgt gemäß den Vorgaben des Herstellers. Dialysiert werden 300 µL des Überstands aus Versuch C.2.3.11 gegen 2-mal 200 mL PBS für je 60 min bei 4°C unter leichtem Rühren.

C.2.3.13 Lyse von tierischem Gewebe

Zur Herstellung eines Gewebelysats¹ wird ein vollständiger, adulter *Branchiostoma lanceolatum* gewogen und in flüssigem Stickstoff staubfein zermörsert. Das gefrorene Pulver wird in ein frisches 1,5 mL Reaktionsgefäß mit Graduierung überführt und das Volumen geschätzt. (1mg Gewebe entspricht einem Volumen von ~ 1µl.) Resuspendiert wird im 5-fachen Volumen PBS-Puffer (C.2.3.7) mit Protease-Inhibitor (1 mM PMSF) und 5-fachen Volumen 2-fach konzentriertem reduzierenden Probenpuffer (C.2.3.1). Danach wird die Suspension 10 min bei 95°C erhitzt. Die unlöslichen Bestandteile werden durch 5 min Zentrifugation abgetrennt. Da nur ein verhältnismäßig kleines Pellet zurückbleibt wird vereinfacht mit einer Proteinkonzentration von 100 µg/µL gerechnet.

C.2.4 Immunologische Methoden

C.2.4.1 Gewinnung von Antiseren

Die gegen *Bl-SPN1* gerichteten Antiseren wurden von der Firma „Pineda Antikörper-Service“, Berlin, bezogen. Zur Immunisierung von drei Kaninchen wurde dem Unternehmen affinitätschromatografisch aufgereinigtes GST-*Bl-SPN1*-Fusionsprotein zur Verfügung gestellt. Die Gewinnung des Materials ist in Abschnitt C.2.3.9 beschrieben. Vor der Immunisierung wird den Kaninchen Präimmenserum abgenommen und auf unspezifische Kreuzreaktionen getestet. Das Ausbluten der Kaninchen 1 und 3 erfolgte 75 Tage nach Injektion des Fusionsproteins. Kaninchen 2 erhielt eine zusätzliche Injektion nach 60 Tagen und wurde nach insgesamt 100 Tagen ausgeblutet. Eine weitere Aufarbeitung der Seren fand

1 Sambrook *et al.*, 1989

nicht statt. Nähere Angaben zum Vorgehen bei der Immunisierung wurden von dem Unternehmen nicht mitgeteilt.

C.2.4.2 Immunhistologische Färbung von Gefrierschnitten

Bei einer immunhistologischen Färbung werden Proteine *in situ* auf Gewebeschnitten mittels spezifischer Antikörper markiert. Die Antikörper sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen, der bei entsprechender Anregung ein optisches Signal im mikroskopischen Bild liefert. Entweder ist der spezifische Antikörper direkt markiert oder es wird zusätzlich ein gegen den spezifischen Antikörper gerichteter sekundärer Antikörper mit Markierung verwendet. Das Verfahren ist prinzipiell mit dem Western-Blot (C.2.3.6) vergleichbar.

Die Arbeiten wurden am Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie, Prof. Dr. Jockusch, unter Betreuung von Herrn Dr. Heimann und Frau Piwek durchgeführt.

C.2.4.2.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Ein Lanzettfischchen *Branchiostoma lanceolatum* wird mit dem Skalpell in etwa 5 mm lange Stücke geteilt und diese mit einem Tropfen „Tissue Tek“-Einbettmedium auf dem Präparateträger fixiert. Der Träger besteht aus einer kleinen Korkplatte, auf der Blotpapier (GB 002) mit ebenfalls einem Tropfen Einbettmedium festgeklebt ist. Das Einfrieren geschieht mit flüssigem Propan, das zuvor in flüssigem Stickstoff auf -198°C abgekühlt wurde. Die Gefrierblöcke können nun bei -80°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet werden.

Zum Anfertigen der Gefrierschnitte wird der Block mit einem Tropfen Wasser auf dem -25°C kalten Objektisch angefroren, in das auf -25°C gekühlte Gefriermikrotom eingesetzt und mit einer Stärke von $8\ \mu\text{m}$ geschnitten. Die Schnitte werden durch Auflegen eines Superfrost-Objektträgers abgenommen und kurze Zeit bei Raumtemperatur getrocknet. Die Präparate können nun gefärbt und eingedeckt werden. Das Eindecken geschieht mit einem Tropfen Moviol-Lösung (siehe unten) und dem blasenfreien Auflegen eines Deckglases. Nach dem Eindecken werden die fertigen Präparate dunkel gelagert, um ein Ausbleichen der Farbstoffe zu vermeiden.

Moviol-Eindeck-Lösung:

10 g Moviol 4-88 werden 16 h in 40 mL PBS-Puffer (C.2.3.7) gerührt, danach 20 mL Glycerin zugegeben und erneut für 16 h gerührt. Ungelöste Bestandteile werden durch 60 min Zentrifugation bei $13000\times g$ abgetrennt und der Überstand zum Eindecken verwendet.

C.2.4.2.2 Immunhistologische Färbung

Zur immunhistologischen Färbung werden die noch nicht eingedeckten Schnitte mit dem „Pap pen“-Stift eingekreist. Der Stift enthält eine Lösung, die nach dem Eintrocknen eine hydrophobe Schicht auf dem Glas hinterläßt. Diese verhindert ein Fortlaufen der Färbelösungen bzw. Antiseren und ermöglicht so unterschiedliche Färbungen auf demselben Objektträger bzw. eine Verringerung der einzusetzenden Lösungsvolumina. Die Blockierung der Schnitte geschieht mit einigen Tropfen 1%-iger BSA-Lösung der Firma SIGMA für 60 min. Der primäre Antikörper wird 1:50 in der BSA-Lösung verdünnt und nach dem Abschütten der Blockierungslösung für 90 min auf den Schnitten belassen. Gewaschen wird 3-mal 5 min mit PBS-Puffer (C.2.3.7). Der sekundäre Antikörper (Anti-Kaninchenserum aus Ziege, C.1.10) ist mit dem rotfluoreszierenden Farbstoff TRITC (C.1.10) gekoppelt. Dieser wird 1:300 in der BSA-Lösung verdünnt und die Schnitte 60 min hiermit inkubiert. Gewaschen wird 3-mal 5 min mit PBS-Puffer. Zum Schluss werden die Präparate eingedeckt, wie in C.2.4.2.1 beschrieben.

Als primäre Antikörper werden die spezifischen Antiseren gegen *Bl*-SPN1 der Kaninchen 1 - 3 (C.1.10) eingesetzt. Die jeweiligen Präimmunsereen und der sekundäre Antikörper allein dienen als Negativkontrolle.

C.2.4.2.3 Auswertung der immunhistologisch gefärbten Schnitte

Die gefärbten Schnitte können nun unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und ausgewertet werden. Zur Beurteilung werden die Intensitäten der spezifisch angefärbten Objekte mit den Kontrollen verglichen und mit einer „Nikon Coolpix 990“-Digitalkamera dokumentiert.

C.2.5 Modellierung der Protein-Tertiärstruktur mit Swissmodel

Für die Funktion eines Proteins ist die Tertiärstruktur von entscheidender Bedeutung. Diese wird in aufwendigen Experimenten an hochreinen Proteinkristallen durch Röntgenstrukturanalyse ermittelt. Auf Basis der bekannten Strukturdaten kann die Struktur eines ähnlichen Proteins modelliert werden. Ausgehend von einem Homologievergleich der Aminosäuresequenz des zu untersuchenden Proteins mit den Sequenzen ähnlicher Proteine, werden der Sequenz die bekannten Strukturdaten zugeordnet und es wird ein hypothetisches Modell der tertiären Struktur abgeleitet.

Zur Berechnung des Modells wird das Programm „Swissmodel“¹ verwendet. Zuerst wird ein Homologievergleich der Aminosäuresequenz mit den Daten der ExNRL-3D-Datenbank durchgeführt. Diese ist Teil der ExpDB-Datenbank und enthält die Sequenzen und Daten der Proteine, von denen die Tertiärstrukturen bereits experimentell ermittelt wurden. Das Programm erstellt für die Modellierung eine Liste an empfohlenen Datensätzen, von denen die geeignetsten ausgewählt werden. Da Serpine in verschiedenen Formen (B.2.1) vorliegen können, werden nur solche Datensätze herangezogen, die von aktiven Serpinen stammen, das heißt keine inaktive, latente oder gespaltene Formen. Strukturdaten von Proteinen mit Mutationen oder Zusätzen, wie z.B. Peptide oder Saccharide, werden ebenfalls nicht berücksichtigt. Die Modellierung der Tertiärstruktur von *Bl-SPN1* erfolgt auf Grund der unten angeführten Datensätze. Alle Serpine sind humanen Ursprungs.

Name des humanen Serpins	ExpDB code	Auflösung [Å]	Homologiewert
Antithrombin III (ATIII)	1athA	3,2	1e-77
Heparinkofaktor II (HCII)	1jmjA	2,35	3e-57
α_1 -Antitrypsin (α_1 -AT)	1hp7A	2,1	1e-56
Plasminogenaktivator-Inhibitor 1 (PAI1)	1b3kA	2,99	1e-53

1 Swissmodel v. 36.0003; Schwede *et al.*, 2003

D Ergebnisse

D.1 Identifizierung des 3'-Bereichs der cDNA von Serpin1

D.1.1 Isolierung von mRNA aus *Branchiostoma lanceolatum*

Branchiostoma lanceolatum wurde lebend von der meeresbiologischen Station Helgoland bezogen. Direkt nach Erhalt wurde das Gewicht der einzelnen Tiere bestimmt (~200 mg) und diese schockgefroren (C.1.5). Die Gewinnung der mRNA erfolgte jeweils aus einem ganzen adulten Tier nach Methode C.2.1.1, wobei die mRNA mit insgesamt 100 µL Puffer eluiert wurde. Das Eluat wurde zu je 5 µL aliquotiert und bei -80°C gelagert. Eine photometrische Bestimmung der gepoolten mRNA (C.2.1.3) ergab eine Konzentration von 5,2 ng/µL, was einer Gesamtausbeute von 520 ng mRNA pro Tier entspricht. Das OD₂₆₀ / OD₂₈₀ -Verhältnis von 2,3 belegt die hohe Reinheit des isolierten Materials.

D.1.2 Reverse Transkription der mRNA

Die reverse Transkription der gewonnenen mRNA in cDNA erfolgte mit dem „GeneRacer Oligo dT Primer“ (Invitrogen) unter Verwendung des „Omniscript RT Kits“ von QIAGEN (C.2.1.4). Eingesetzt wurden 26 ng (5 µL) der isolierten mRNA. Die erzeugte cDNA wurde zu je 1 µL aliquotiert und bei -80°C gelagert.

D.1.3 Kontrolle der cDNA-Integrität durch Calmodulin 2-spezifische PCR

Zur Kontrolle der erfolgreichen reversen Transkription der *B. lanceolatum*-mRNA wurde die cDNA für Calmodulin 2 (CaM2)¹ durch PCR amplifiziert. CaM2 ist ein in allen eukaryotischen Zellen konstitutiv exprimiertes Protein. Es bindet Kalzium und moduliert die Funktion vieler verschiedener Enzyme, sowie Ionenpumpen und -kanäle. In der Literatur sind PCR-Primer und Reaktionsbedingungen beschrieben, die die spezifische Vervielfältigung eines Fragments der CaM2-cDNA erlauben. Verwendet wurde der von Karabinos & Bhattacharya¹ beschriebene PCR-Plus-Strangprimer K264, der in dieser Arbeit als CaM2_AS25-33+ bezeichnet wird. Der Primer wurde mit den Minus-Strangprimern GeneRacer3' und GeneRacer3'nested (C.1.12.1) - jeweils komplementär zum „GeneRacer

1 Karabinos & Bhattacharya, 2000

Oligo dT Primer“ - kombiniert und PCR-Reaktionen (C.2.1.6) ausgeführt. Das eingesetzte Volumen an cDNA betrug jeweils 1 µL (1% der ursprünglich synthetisierten cDNA).

Die Identität der PCR-Produkte wurde durch eine seminested PCR bestätigt (C.2.1.6). Als Plus-Strangprimer wurde CaM2_AS25-33+ beibehalten, für den Minus-Strang wurde CaM2_AS132-124- verwendet (C.1.12.1). Dieser Primer ist komplementär zu dem von Karabinos & Bhattacharya beschriebenen Oligonukleotid K265.

Abgeleitet aus der CaM2-mRNA-Referenz-Sequenz¹ wurden folgende Größen der PCR-Produkte erwartet:

Tabelle 1: Größen der für den 3'-Bereich der Calmodulin 2-spezifischen PCR-Produkte

Primerkombination	Größe des PCR-Produkts [Bp]
CaM2_AS25-33+ / GeneRacer3'	867
CaM2_AS25-33+ / GeneRacer3'nested	854
CaM2_AS25-33+ / CaM2_AS132-124-	325

Die Primerkombinationen CaM2_AS25-33+ / GeneRacer3' bzw. GeneRacer3'nested erbrachten PCR-Produkte der erwarteten Größen (Abb. 11). Jeweils eine seminested PCR mit der Primerkombination CaM2_AS25-33+ / CaM2_AS132-124- ermöglichte die Amplifikation des internen 325 Bp-Produkts von den vorherigen PCR-Produkten und bestätigten somit die gelungene cDNA-Synthese.

Da die verwendete *Pfu*-Polymerase (C.1.9.3.1) keine reverse Transkriptase-Aktivität aufweist, kann nur revers transkribierte cDNA als Vorlage gedient haben. Chromosomale DNA als Matrize ist ausgeschlossen, da die entsprechenden PCR-Produkte vom CaM2-Gen² in Folge der Präsenz von Intronsequenzen deutlich größer wären. Das Produkt der Primerkombination CaM2_AS25-33+ / CaM2_AS132-124- zum Beispiel würde auf Grund von 2 Intronsequenzen 1162 Bp groß sein. Die gelungene Amplifikation von CaM2-cDNA-spezifischen PCR-Produkten, sowie deren Bestätigung durch seminested PCR zeigten die Intaktheit der erzeugten *B. lanceolatum*-cDNA.

1 CaM2-mRNA: GenBank accession no: AJ133486

2 CaM2-chrDNA: GenBank accession no: AJ001092

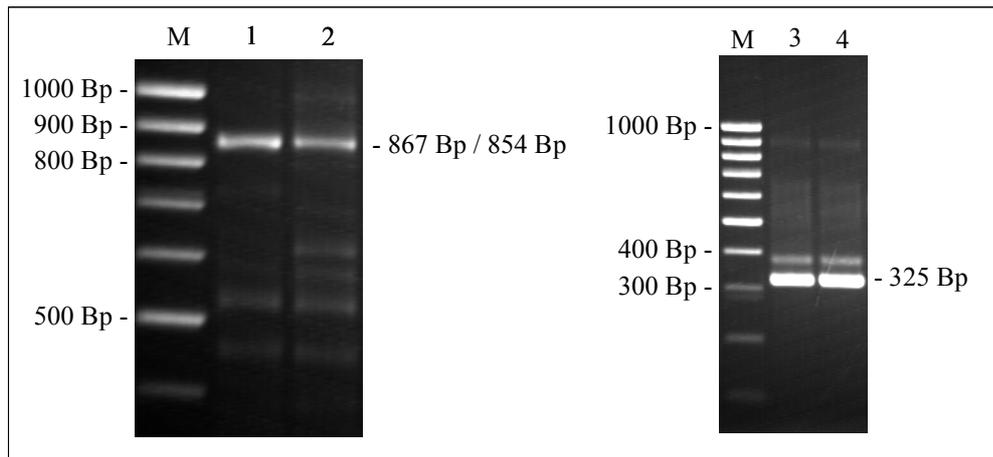


Abbildung 11: Kontrolle der reversen Transkription durch Calmodulin 2-spezifische PCR

linkes Gel: PCR-Reaktionen mit den Primerkombinationen CaM2_AS25-33+ / GeneRacer3' (Spur 1) bzw. CaM2_AS25-33+ / GeneRacer3'nested (Spur 2)

rechtes Gel: seminested PCR-Reaktionen mit der Kombination CaM2_AS25-33+ / CaM2_AS132-124- auf die PCR-Produkte von Spur 1 (Spur 3) bzw. 2 (Spur 4)

2%-Agarosegel; M: 1 kb-Leiter

D.1.4 Amplifizierung des 3'-Bereichs der cDNA für Serpin1

Ausgehend von dem durch O. Krüger (AG Zelluläre Genetik) identifizierten ~567 Bp großen Sequenzfragment (Nukleotide 700 - 1266 in Abb. 20 bzw. G.1) der cDNA für *Bl*-SPN1 (Serp1) von *B. lanceolatum* wurden PCR-Primer zur Amplifizierung des 3'-Bereichs der cDNA abgeleitet. Als Primersequenzen wurden Regionen von Serpin1 ausgewählt, die eine nur geringe Sequenzidentität zu anderen Serpinen aufweisen. Hierdurch wird eine hohe Spezifität der Primer gewährleistet. Es wurden 3 Primer konstruiert: BL2_f2, BL2_f3 und BL2_f4 (C.1.12.1). Alle 3 sind Plus-Strangprimer, die jeweils etwas weiter stromabwärts auf der Serpin1-cDNA-Sequenz hybridisieren (Abb. 12). Mit allen 3 Primern wurden PCR-Reaktionen von 50 Zyklen (C.2.1.7) in Verbindung mit dem Minus-Strangprimer GeneRacer3'nested und 1 μ L *B. lanceolatum*-cDNA als Matrize durchgeführt.

Über die Größe der gesuchten PCR-Produkte konnten nur Vermutungen gemacht werden, da nur ein internes Fragment der Serpin1-cDNA-Sequenz bekannt war und über die Länge des 3'-Bereichs keine Aussage getroffen werden konnte. In allen 3 Reaktionen wurde derselbe Minus-Strangprimer verwendet, weshalb sich die gesuchten PCR-Produkte durch den bekannten Abstand der Plus-Strangprimer zueinander unterscheiden (Tab. 2).

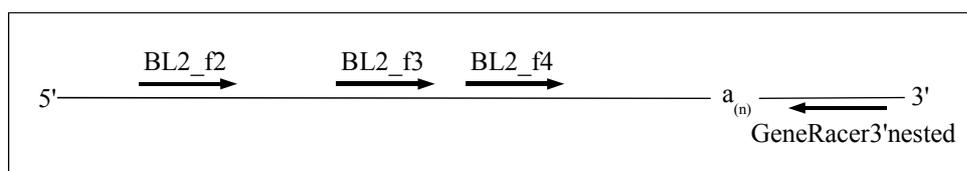


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Primerpositionen zur Amplifikation des 3'-Bereichs der Serpin1-cDNA

Tabelle 2: Abstände der Serpin1-spezifischen Plus-Strangprimer

Primer	Abstände der 5'-Primerenden [Bp]
BL2_f2 ↔ BL2_f3	308
BL2_f2 ↔ BL2_f4	391
BL2_f3 ↔ BL2_f4	83

Sollten mehrere Produkt gebildet werden, so können die gesuchten Amplifikate auf Grund der bekannten Größendifferenzen identifiziert werden. Die PCR mit dem Plus-Strangprimer BL2_f2 und dem Minus-Strangprimer GeneRacer3'nested erbrachte trotz verschiedener Optimierungsversuche kein Einzelprodukt. Es entstanden immer mehrere Produkte, unter ihnen 3 Fragmente mit ~1500 Bp, ~1300 Bp und ~1100 Bp. Obwohl 50 PCR-Zyklen durchgeführt wurden, war die Ausbeute jeweils nur sehr gering. BL2_f3 und BL2_f4 bildeten mit dem GeneRacer3'nested-Primer jeweils ein diskretes Produkt von ~1000 Bp, respektive ~900 Bp (Abb. 13).

Die Distanz der Plus-Strangprimer BL2_f3 und BL2_f4 beträgt 83 Nukleotide. Die Größendifferenz der PCR-Produkte in Spur 2 und 3 von etwa 100 Nukleotidpaaren deutete darauf hin, dass beide Banden von Serpin1 abstammen und somit die Amplifikation des 3'-Bereichs der Serpin1-cDNA erfolgreich war. Der Abstand zwischen den Primern BL2_f2 und BL2_f3 beträgt 308 Nukleotide. Es könnte sich also bei dem 1300 Bp-Produkt möglicherweise ebenfalls um ein Serpin1-cDNA-Fragment handeln.

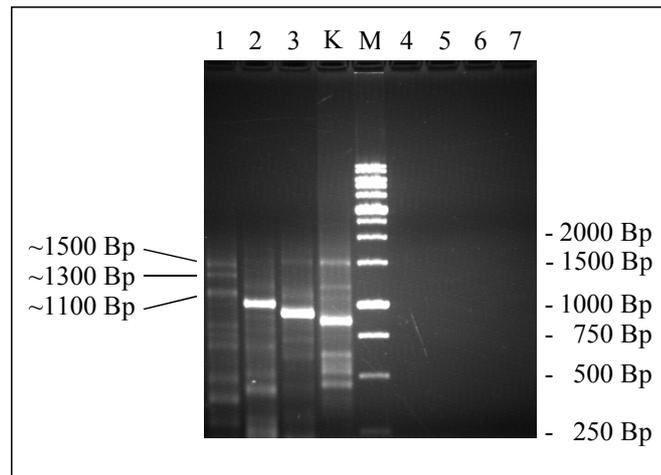


Abbildung 13: PCR-Produkte von *Branchiostoma lanceolatum*-cDNA mit Serpin1-spezifischen Primern

PCR-Reaktionen mit den Primerkombinationen BL2_f2 / GeneRacer3'nested (Spur 1), BL2_f3 / GeneRacer3'nested (Spur 2) und BL2_f4 / GeneRacer3'nested (Spur 3); K: Kontrolle mit der Primerkombination CaM2_AS25-33+ / GeneRacer3'nested (854 Bp). Die Spuren 4 - 7 zeigen die jeweiligen Negativkontrollen ohne cDNA.

1,5%-Agarosegel; M: 1 kb-Leiter

Zur weiteren Charakterisierung der 3 schwachen Produkte mit der Primerkombination BL2_f2 / GeneRacer3'nested wurden 20 PCR-Reaktionen mit dieser Primerkombination durchgeführt. Die Reaktionen wurden gepoolt, aufkonzentriert (C.2.1.7) und die Fragmente mit ~1500 Bp, ~1300 Bp und ~1100 Bp aus dem Gel aufgereinigt (C.2.1.10). Mit diesen als Matrize wurden PCR-Reaktionen für interne Bereiche der Serpin1-cDNA ausgeführt. Verwendet wurden der Plus-Strangprimer BL2_f2 und die Minus-Strangprimer BL2_r bzw. BL2_r2. Diese entsprechen den komplementären Primern BL2_f4 bzw. BL2_f3 (Abb. 12, C.1.12.1). Überraschenderweise konnten in der seminested PCR von allen 3 Amplifikaten Produkte der erwarteten Größen (328 bzw. 421 Bp) generiert werden (Abb. 14). Deshalb musste davon ausgegangen werden, dass es sich bei allen 3 PCR-Produkten um Varianten von Serpin1 oder eines ähnlichen Gens handelte.

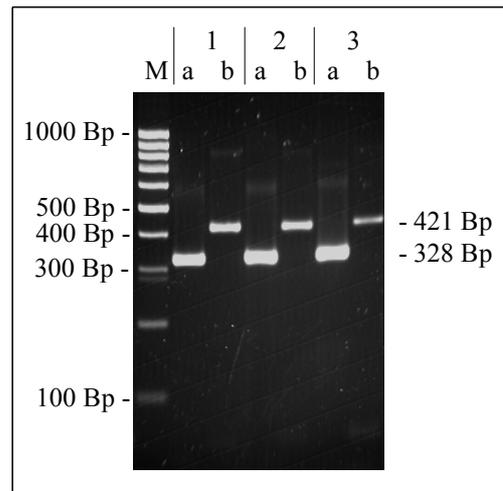


Abbildung 14: Seminested PCR zur Produkt-Charakterisierung (Primerkombination BL2_f2 / GeneRacer3'nested)
 seminested PCR-Reaktionen mit den Primerkombinationen BL2_f2 / BL2_r2 (a) bzw. BL2_f2 / BL2_r (b) mit den PCR-Produkten ~1100 Bp (1), ~1300 Bp (2) und ~1500 Bp der Primerkombination BL2_f2 / GeneRacer3'nested als Matrize
 2,5%-Agarosegel; M: 1kb-Leiter

Ergänzend sei erwähnt, dass es nur mit der *Pfu*-Polymerase gelang, den 3'-Bereich der Serpin1-cDNA zu amplifizieren. Mit allen anderen getesteten Polymerasen, wie KOD, KlenTherm oder Klen / *Pfu*-Mix (C.1.9.3) war dies nicht möglich. Im Gegensatz hierzu waren PCR-Reaktionen mit den Primerkombinationen BL2_f2 / BL2_r bzw. BL2_f2 / BL2_r2, deren Produkte vollständig im kodierenden Bereich liegen, mit den oben genannten Polymerasen problemlos durchzuführen.

D.1.5 Klonierung der PCR-Produkte

Für eine nähere Charakterisierung und Zuordnung wurden die PCR-Produkte subkloniert. Dafür wurden die Reaktionen mit den Primerkombinationen BL2_f2 / GeneRacer3'nested, sowie BL2_f3 / GeneRacer3'nested im 20-fachen Ansatz wiederholt. Die Ansätze wurden gepoolt, aufkonzentriert (C.2.1.7) und ein „A-Tailing“ durchgeführt (C.2.2.3.1). Daran anschließend erfolgte die Aufreinigung der 4 Fragmente aus dem Gel (C.2.1.10) und Klonierung in den pCR4-TOPO-Vektor (C.2.2.3.2). Nach Transformation in TOP10-Zellen (C.2.2.3.3) wurden die Plasmide isoliert (C.2.1.2) und einem *EcoRI*-Verdau (C.2.1.9) unterzogen. Dieses Restriktionsenzym schneidet den Vektor beidseitig der inserierten PCR-

Produkte und ermöglicht so nach Auftrennung im Agarosegel (C.2.1.8) eine Auswahl von Klonen mit einem Insert der erwarteten Größe. Tabelle 3 gibt eine Aufstellung der hergestellten Plasmide.

Tabelle 3: Plasmidkonstrukte mit PCR-Produkten des 3'-Bereichs der cDNA von Serpin1

Name	Primerkombination	Größe des Inserts [Bp]
pUT9	BL2_f2 / GeneRacer3'nested	~1500
pUT10	"/ "	~1300
pUT11	"/ "	~1100
pUT12	BL2_f3 / GeneRacer3'nested	~1000

D.1.6 Sequenzierung der Plasmide

Es wurden von jedem Plasmidkonstrukt 3 Klone ausgewählt und deren Inserts mit den Sequenzierprimern T7-Promotor und T7-Terminator (C.1.12.2), die den Insertionsbereich flankieren, von den Enden her ansequenziert (C.2.1.12). Bis auf eine Ausnahme waren die Sequenzen der Plasmidklone jedes Konstrukts untereinander identisch und es wurde jeweils ein Klon als Referenz zur vollständigen Ermittlung der Insertsequenz ausgewählt. Bei Konstrukt pUT10 wurden 2 Klone (pUT10a und pUT10b) identifiziert, die untereinander deutliche Differenzen aufwiesen. Daher wurden beide in die anschließenden Analysen einbezogen. Die vollständige Sequenzierung der Plasmidinserts erfolgte mit den Sequenzierprimern T7-Promotor, T7-Terminator, die die Insertionsbereiche des Vektors flankieren und so eine Sequenzierung des Inserts von beiden Enden her ermöglichen, und BL2_f6 (C.1.12.2). Die Sequenzierungen wurden mit mindestens 3-facher Abdeckung durchgeführt und die durchschnittliche Leseweite betrug etwa 660 Bp. Die ermittelten Sequenzen wurden mit der Software AlignIR 2.0 aligniert und assembliert (C.2.1.13). Von *B. lanceolatum* lagen bisher nur wenige genomische bzw. cDNA-Sequenzen vor. Die ermittelten Insertsequenzen zeigten in einer BLASTn-Datenbanksuche¹ keinerlei Homologien zu bekannten DNA-Sequenzen, so dass es sich um Neubeschreibungen handelt. Alle Plasmidinserts enthalten die für eukaryotische mRNAs charakteristische Poly(A)-Sequenz (21 – 26 Adeninreste).

¹ Blastn, Version 2.2.6, April 09.2003, Database: 10.10.2003; Altschul *et al.*, 1990

Auf der Basis der erhaltenen Sequenzen konnten die Inserts der 5 Konstrukte in 2 Gruppen eingeteilt werden (Abb. 15). Gruppe a wird durch pUT10a und pUT12 repräsentiert, wobei sich das Insert von pUT12 als Teilsequenz des Inserts von pUT10a erwies. Die Sequenz des Inserts von pUT12 beginnt auf Grund der weiter stromabwärts gelegenen Position des verwendeten Primers BL2_f3 um 306 Bp versetzt und weist direkt vor der Poly(A)-Sequenz eine Deletion von 17 Nukleotiden auf. Sie ist ansonsten aber identisch mit der des pUT10a-Inserts. Die Inserts der Plasmide pUT9, pUT10b und pUT11 bilden zusammen Gruppe b. Auch diese Sequenzen lassen sich von einer gemeinsame Sequenz ableiten, die des Inserts von pUT9. Die Inserts von pUT10b und pUT11 entsprechen dieser Sequenz, sind an ihren 3'-Enden aber um 132 bzw. 363 Bp verkürzt.

Die beiden Sequenzen der Gruppen a und b (repräsentiert durch pUT10a bzw. pUT9) sind zueinander weitgehend identisch, weisen jedoch einige auffällige Differenzen auf. Die Sequenzen und ihre Unterschiede werden in Kapitel D.4 ausführlich behandelt. Bei den Sequenzen beider Gruppen konnte nur ein offener Leserahmen („open reading frame“, ORF) identifiziert werden. Abbildung 15 zeigt eine grafische Darstellung der Zuordnung der Inserts zu den Gruppen a und b und Tabelle 4 die zugehörigen Daten.

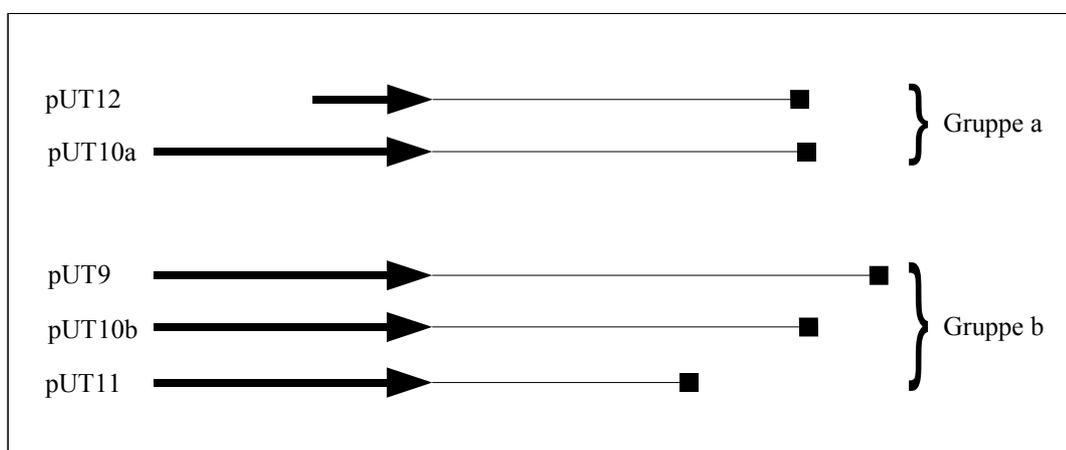


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Plasmidinserts und die Zuordnung zu den Sequenzgruppen

Die Darstellung zeigt die Zuordnung der Inserts der Plasmide pUT9 bis 12 zu den beiden Gruppen a und b. Die Pfeile (→) symbolisieren den ORF und die Linien (—) den nicht translatierten 3'-Bereich („untranslated region“, UTR). Die Quadrate (■) stehen für die Poly(A)-Sequenz.

Tabelle 4: Aufbau der Plasmidinserts mit den 3'-cDNA-Varianten von Serpin1

Gruppe	Plasmid	Größe des Inserts	ORF [AS]	3'-UTR	Poly(A)-Sequenz
a	pUT12	962	78	704	23
	pUT10a	1282	180	721	21
b	pUT9	1423	180	857	26
	pUT10b	1287	180	725	22
	pUT11	1056	180	494	22

(Angaben in Bp, soweit nicht anders angegeben)

D.2 Identifizierung der 5'-Bereiche der Serpin1-cDNAs

D.2.1 Reverse Transkription vollständiger mRNA

Um den unbekanntem 5'-Bereich der beiden cDNA-Gruppen von *B. lanceolatum* vollständig identifizieren zu können, kann vor der reversen Transkription ein Oligonukleotid bekannter Sequenz an das 5'-Ende der mRNAs ligiert werden. Dies ermöglicht in der nachfolgenden PCR die Verwendung eines Plus-Strangprimers bekannter Sequenz zur Vervielfältigung der unbekanntem cDNA-Region. Das Prinzip wird als „RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends“ (RLM-RACE) bezeichnet (C.2.1.5). Eingesetzt wurde das „GeneRacer Kit“ der Firma Invitrogen. Die Reaktion erfolgte mit 26 ng (5 µL) der in D.1.1 gewonnenen mRNA-Präparation. Die erzeugte vollständige cDNA wurde a 1 µL aliquotiert und bei -80°C gelagert.

D.2.2 Kontrolle der cDNA-Integrität durch Calmodulin 2-spezifische PCR

Zur Kontrolle einer erfolgreichen RLM-RACE wurde der 5'-Bereich der cDNA von CaM2 mittels PCR amplifiziert (C.2.1.6). Hierfür wurde der Minus-Strangprimer CaM2_AS132-124- eingesetzt, der zu dem von Karabinos & Bhattacharya¹ beschriebenen Primer K265 komplementär ist. Der Primer wurden mit den zum „GeneRacer RNA Oligo“ komplementären GeneRacer5'- und GeneRacer5'nested-Primern (C.1.12.1) kombiniert und PCR-Reaktionen ausgeführt. Das eingesetzte Volumen an cDNA betrug 1 µL. Abgeleitet aus

¹ Karabinos & Bhattacharya, 2000

der CaM2-mRNA-Sequenz¹ wurden die in Tabelle 5 aufgeführten PCR-Produktgrößen erwartet.

Tabelle 5: Größen der für den 5'-Bereich der Calmodulin 2-spezifischen PCR-Produkte

Primerkombination	Größe des PCR-Produkts [Bp]
GeneRacer5' / CaM2_AS132-124-	572
GeneRacer5'nested / CaM2_AS132-124-	558
CaM2_AS25-33+ / CaM2_AS132-124-	325

Mit den Primerkombinationen GeneRacer5' / CaM2_AS132-124- bzw. GeneRacer5'nested / CaM2_AS132-124- konnten in einer ersten PCR keine Produkte der erwarteten Größe nachgewiesen werden. Erst eine nachträgliche Amplifikation mit der Kombination GeneRacer5'nested / CaM2_AS132-124- und 0,5 µL Reaktionsansatz der vorhergehenden PCR-Reaktionen als Matrize, erbrachte ein gewünschtes Produkt der erwarteten Größe von 558 Bp mit geringer Ausbeute.

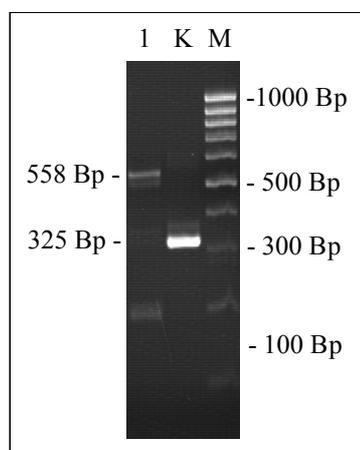


Abbildung 16: Kontrolle der reversen Transkription mittels Amplifikation des 5'-Bereichs der Calmodulin 2-cDNA

Amplifikation des 5'-Bereichs der CaM2-cDNA mit der Primerkombination GeneRacer5'nested / CaM2_AS132-124- (Spur 1) und Kontroll-Amplifikation eines internen CaM2-cDNA-Fragments mit der Primerkombination CaM2_AS25-33+ / CaM2_AS132-124- (Spur K)
2,0%-Agarosegel; M: 100 Bp-Leiter

¹ CaM2-mRNA: GenBank accession no: AJ133486

Die Amplifikation des internen Fragments (325 Bp) mit der Kombination CaM2_AS25-33+ / CaM2_AS132-124- gelang jedoch problemlos (Abb. 16). Wie auch in D.1.3 konnte chromosomale DNA als Matrize ausgeschlossen werden, da die verwendete Primerkombination über Exon / Intron-Grenzen hinwegreicht und das PCR-Produkt in diesem Fall 1162 Bp anstatt 325 Bp groß wäre.

D.2.3 Amplifizierung des 5'-Bereichs der cDNA von Serpin1

Zur Amplifizierung des 5'-Bereichs der cDNA von Serpin1, war es wie bei der CaM2-cDNA notwendig eine nested PCR durchzuführen. Die erste PCR erfolgte mit der Primerkombination GeneRacer5' / BL2_r und 1 μ L cDNA, erbrachte aber keine diskrete Produktbande. Von dieser Reaktion wurden 1 μ L einer 1:100-Verdünnung in einer nested PCR mit der Kombination GeneRacer5'nested / BL2_r2 eingesetzt, wobei ein diskretes \sim 1150 Bp großes Produkt amplifiziert werden konnte (Abb. 17).

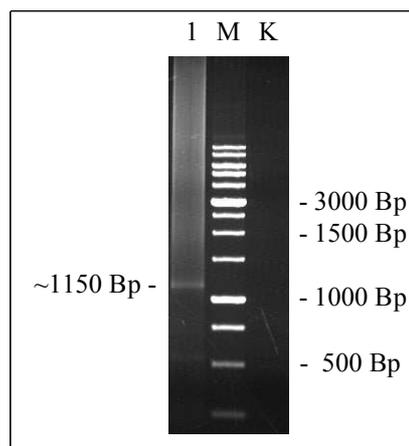


Abbildung 17: Nested PCR mit der Primerkombination GeneRacer5'-nested / BL2_r2 zur Amplifikation des 5'-Bereichs der cDNA von Serpin1
 PCR-Reaktion mit der Primerkombination GeneRacer5'-nested / BL2_r2 (Spur 1)
 und Kontrolle ohne DNA (Spur K)
 1,2%-Agarosegel; M: 1kb-Leiter

D.2.4 Klonierung des PCR-Produkts mit dem 5'-Bereich der cDNA von Serpin1

Die nested PCR mit der Primerkombination GeneRacer5'nested / BL2_r2 wurde im 20-fachen Ansatz wiederholt und die Reaktionen gepoolt und aufkonzentriert (C.2.1.7). Anschließend erfolgte ein „A-Tailing“ (C.2.2.3.1) und die Aufreinigung des \sim 1150 Bp-Fragments aus dem

Gel (C.2.1.10). Die erfolgreiche Reamplifikation eines 328 Bp großen Fragments durch seminested PCR mit der Primerkombination BL2_f2 / BL2_r2 von dem isolierten PCR-Produkt bestätigte, dass dieses homologe Bereiche zu den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Sequenzen des 3'-Bereichs von Serpin1 aufweist (Ergebnisse nicht gezeigt). Nach Klonierung in den pCR4-TOPO-Vektor (C.2.2.3.2) und Transformation in TOP10-Zellen (C.2.2.3.3) wurden die Plasmide isoliert (C.2.1.2) und mit einem *EcoRI*-Verdau (C.2.1.9) die korrekte Größe der Inserts überprüft. Das Konstrukt mit dem mutmaßlichem 5'-terminalen Bereich der Serpin1-cDNA erhielt die Bezeichnung „pUT14“.

D.2.5 Sequenzierung des 5'-Bereichs der cDNA von Serpin1

Es wurden 3 Klone des Konstrukts pUT14 von beiden Enden her über eine Länge von mindestens 400 Nukleotiden ansequenziert (C.2.1.12). Die Sequenzierung erfolgte mit den Sequenzierprimern T7-Promotor und T7-Terminator (C.1.12.2), die die Insertionsbereiche des Vektors flankieren und so eine Sequenzierung des Inserts von beiden Enden her ermöglichen. Da die erhaltenen Sequenzen der Klone vollständig übereinstimmten, wurde ein Klon als Referenz ausgewählt und das Insert zur Verifizierung weitere dreimal sequenziert. Die Alignierung ergab eine Sequenz mit 1134 Bp Länge. Aus der erhaltenen Sequenz konnte ein offener Leserahmen von 337 AS abgeleitet werden. Er beginnt an Position 124 mit einem Startkodon und umfasst 1011 Nukleotide. Die Sequenz war 3'-terminal über eine Länge von 327 Bp vollkommen identisch mit der 5'-terminalen Sequenz des 3'-Bereichs von Serpin1, Gruppe b. Die Identität zum 3'-Bereich von Serpin1, Gruppe a, betrug dagegen nur 94% (18 Differenzen auf 327 Bp). Daher repräsentieren der identifizierte 5'-Bereich und der 3'-Bereich von Serpin1, Gruppe b, aller Wahrscheinlichkeit nach eine cDNA-Sequenz, die nach Alignierung der Sequenzen eine Gesamtlänge von 2203 Bp hat, wobei die Poly(A)-Sequenz nicht berücksichtigt wurde. Nähere Einzelheiten werden in D.3 behandelt.

D.2.6 Amplifikation des kodierenden Bereichs der cDNA von Serpin1

Die isolierten Sequenzen der Gruppe b repräsentieren 5'- bzw. 3'-Teilbereiche eines ORF. Zur Bestätigung der Zugehörigkeit dieser Sequenzen wurden der 5'-nichttranslatierte und der vollständige kodierende Bereich zusammenhängend amplifiziert. Der eingesetzte Plus-Strangprimer BL2_b5'+ (Nukleotide 1 - 32, Abb. 22 bzw. G.1) war von der 5'-terminalen Sequenz der cDNA abgeleitet und der Minus-Strangprimer BL2_b3'- (Nukleotide 1347 -

1319, Abb. 22 bzw. G.1) von den letzten 29 Nukleotiden des offenen Leserahmens (C.1.12.1). Um ein PCR-Produkt mit der erwarteten Größe von 1347 Bp zu erhalten (Abb. 18), waren zwei aufeinander folgende PCR-Reaktionen (C.2.1.6) mit dieser Primerkombination erforderlich. Die erste Reaktion erfolgte ausgehend von 1 μ L cDNA, die zweite wurde mit 0,5 μ L der vorherigen PCR-Reaktion durchgeführt.

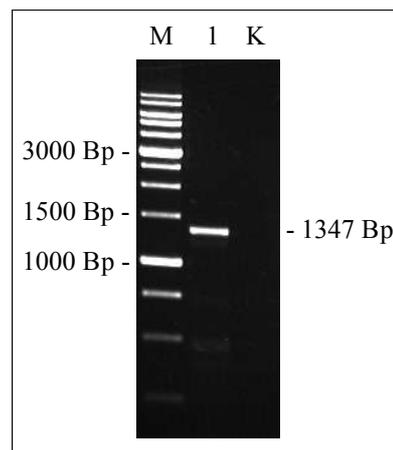


Abbildung 18: PCR-Amplifikation des gesamten kodierenden Bereichs der cDNA von Serpin1 mit der Primerkombination BL2_b5'+ / BL2_b3'-
 PCR-Reaktion mit der Primerkombination BL2_b5'+ / BL2_b3'- (Spur 1) und
 Negativ-Kontrolle ohne DNA (Spur K)
 1,2%-Agarosegel; M: 1kb-Leiter

Die Klonierung des 1347 Bp-Fragments (Plasmid pUT16) und Sequenzierung ergab eine vollständige Identität mit den ermittelten Sequenzen des 5'-Bereichs und des ORFs der cDNA von Serpin1, Gruppe b, und bewies die Zugehörigkeit der isolierten 5'- und 3'-Bereiche zu einer einzigen cDNA.

Sofern nicht anders angegeben wird im folgenden zur Vereinfachung die Bezeichnung „Serpin1, Gruppe b“ durch „Serpin1“ ersetzt.

Es ist somit gelungen, die vollständige Sequenz für die cDNA des Serpin1 von *Branchiostoma lanceolatum* zu ermitteln. Die Sequenz wurde in der EMBL-Nukleotidsequenz-Datenbank unter der Bezeichnung „*Branchiostoma lanceolatum* mRNA for serine protease inhibitor (spn1 gene)“ hinterlegt (Accession no: AJ548509; identification no: BLA548509).

D.2.7 Versuche zur Amplifizierung des 5'-Bereichs der cDNA von Gruppe a

Die Differenzen in den Sequenzen des 3'-Bereichs der cDNAs der Gruppen a und b erlaubten die Konstruktion eines PCR-Primers zur spezifischen Amplifikation des 5'-Bereichs der Sequenz von Gruppe a. Zur Gewährleistung einer hohen Spezifität boten sich die beiden benachbart liegenden Nukleotiddivergenzen an den Positionen 1130 Adenin / Guanin und 1131 Cytosin / Thymin an (Abb. 25 bzw. G.2, Gruppe b). Die Position des Minus-Strangprimers BL2_r3a (C.1.12.1) wurde so gewählt, dass die beiden 3'-terminalen Nukleotide nur zu Variante a komplementär waren. Die Spezifität des Primers in der PCR wurde in Vorversuchen an Hand der Plasmide getestet, die beide Gruppen des 3'-Bereichs der cDNAs von Serpin1 repräsentieren - pUT10a (Gruppe a) und pUT9 (Gruppe b). In Kombination mit dem Plus-Strangprimer BL2_f2, sollte der Primer BL2_r3a ein Produkt von 342 Bp erzeugen. Ein entsprechendes Produkt von Gruppe a konnte bis zu einer Anlagerungstemperatur von 70°C amplifiziert werden, wogegen dies bei der Gruppe b nur bis zu einer Temperatur von 64°C möglich war (Abb. 19). Es wurde somit gezeigt, dass der Minus-Strangprimer BL2_r3a in einem Temperaturbereich oberhalb von 66°C spezifisch für Gruppe a war und so die gezielte Amplifikation des 5'-Bereichs der cDNA von Gruppe a ermöglichen sollte.

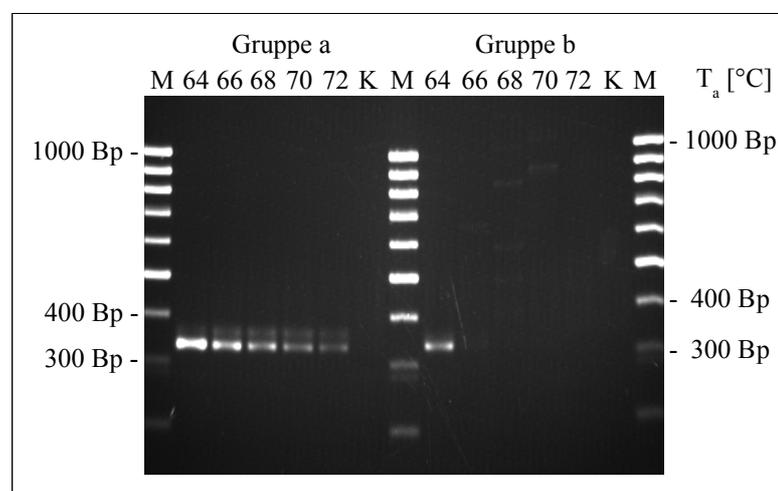


Abbildung 19: Ermittlung der optimalen Anlagerungstemperatur des Primers BL2_r3a

Es wurden PCR-Reaktionen mit den Plasmiden pUT10a als Referenz für Gruppe a (linke Gelhälfte) und pUT9 für Gruppe b (rechte Gelhälfte) bei Anlagerungstemperaturen (T_a) von 64 - 72°C durchgeführt. Die jeweiligen Temperaturen sind oberhalb der Spuren angegeben. Aus der Primerkombination BL2_f2 / BL2_r3a ergibt sich eine berechnete Größe von 342 Bp für das PCR-Produkt.

1,2%-Agarosegel; K: Negativ-Kontrolle ohne DNA; M: 100 Bp-Leiter

Mit dem Primer BL2_r3a wurden nun PCR-Reaktionen in Kombination mit den Plus-Strangprimern GeneRacer5' bzw. GeneRacer5'nested bei einer Anlagerungstemperatur von 66°C mit cDNA als Ausgangsmaterial durchgeführt. Diese verliefen jedoch negativ. Auch nachfolgende Reamplifikationsversuche bzw. nested- oder seminested-PCR-Reaktionen mit den Primern BL2_f2 und BL2_r2 in allen Kombinationsmöglichkeiten blieben ohne Erfolg. Nachdem die PCR direkt von cDNA zu keinem positiven Ergebnis führte, wurde ein PCR-Produkt als Template herangezogen. Dies war mit der Primerkombination GeneRacer5' / BL2_r erzeugt worden und bestand möglicherweise aus einem Gemisch von Sequenzen beider Gruppen. Das PCR-Produkt schließt den Bereich der Kombination GeneRacer5' / BL2_r3a mit ein. Aber auch hier erbrachten nachfolgende seminested und nested PCR-Reaktionen keinen Erfolg.

Auf Grund der Differenzen in den Sequenzen für die Gruppen a und b ergab sich desweiteren die Möglichkeit, beide Gruppen mittels Restriktionsspaltung zu unterscheiden. Durch zwei Nukleotiddivergenzen an den Positionen 1182 Thymin / Cytosin und 1185 Adenin / Guanin (Abb. 25 bzw. G.2, Gruppe b) fehlt in der Sequenz von Gruppe b die singuläre Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Pst*I. Die in einem nachfolgenden Experiment (D.2.6) erhaltenen Plasmidklone mit der Gesamtsequenz des proteinkodierenden Bereichs von Serpin1, wurden daraufhin durch *Pst*I-Spaltungen analysiert (C.2.1.9). Sie wiesen aber alle keine Schnittstelle auf, womit sie ausnahmslos als der Gruppe b zugehörig bestätigt wurden (Ergebnisse nicht gezeigt). Da der 5'-terminale Bereich der cDNA-Sequenz von Gruppe a nicht amplifiziert werden konnte, bleibt die Sequenz dieser Serpin1-cDNA unvollständig.

D.3 Analyse von Serpin1

D.3.1 Analyse der cDNA-Sequenz von Serpin1

Die Sequenz der cDNA von Serpin1 umfasst 2203 Nukleotide, auf die 26 Adeninreste folgen, so dass sich eine Gesamtlänge von 2229 Nukleotiden ergibt (Abb. 20). Die Nukleotidzusammensetzung und der GC-Gehalt sind in Tabelle 6 beschrieben. Von der cDNA konnten 3 Varianten mit unterschiedlich langen 3'-UTRs isoliert werden (Tab. 4, Gruppe b).

Die postulierten Polyadenylierungssignale entsprechen nicht der klassischen „aataaa“-Sequenz¹, sondern weichen an jeweils einer Position von dieser Sequenz ab (Tab. 7).

```

1  atatagctagcttttccacactgtgttcttatgacatgttaaactaaacattgcagacaa
61  agcaccgcttgtagacgctaaagaggggaaccgattcccagtttgtgcctcagggacagtga
121  accatgcccaggacacagttacagcctcttggcctcctggtgccatggcaactctggga
181  agctccgcatcacaagagtccaccccattggctgacatcaacagcgagtttgcctggag
241  ctgtacaagacgctacacaaggatcatcccgagaacatcttcttctcacccttcagtatc
301  tccacctgtctggccatggcttacctgggggcaaggaacgatacagcacaacagatgagt
361  cgagtgccttcgctttcacaagatggatgcctccgaccttcacgtgttggttccacgacctt
421  ctgaccagctgcaccactcagacaggccctacacactcaagaccgcaaaccggctcttc
481  ggtcagaactcattcgagttttcgcaaaagtcttctggatgaaacgtccagacattacagg
541  gcgcagttggctcccgtggacttcagtggaaacacagagggcgacggcaaactatcaac
601  agctgggtagaggaacaaacagagaacaaaatccaagatcttttagcaccaggaaccgtg
661  accctgctaccatgttagtactggccaacgccatctacttcaaaggcagctgggaaccgc
721  aagtttgaggagtcgctgacgaggctcggctaccttccacatcagccgacgagagaaggtc
781  gaggtacccatgatgcatcagcaaggccggttcaaactcgctacgacgaggacctcaac
841  tgccaaatcctagagatgccttaccaaggcaaacatcttagcatgctgttgggtgttgccg
901  gaaaagatggacgctctgagcaccatcgagacgtccttgacgccagacatactcgtcgc
961  tggcagaagtctatggacgaggtttccaccatgggtccaaatccccaaagtccaagctcgtc
1021  cacgatttcgtcctgaatgaaaagctggcggatatggggatgacggacctgttcagcatg
1081  gcggacgccgacctgtccgggatcacgggttcgctgaccttcacgtcagtcagggtcatc
1141  cataaggcgtttgtggaggtcaacgaggagggtagcagggccgcccggcgacggcggtg
1201  aacatgatgaaacgatcactggatggggagacgttctttgccgaccacccttctctgttc
1261  ctgatcagagacaatgactcaaactctatcctgtttcttggctcgactgggtgcgaccagaa
1321  ggattaactacaaaggatgaactgtaaaagcaaaaaaacattcatgtttttcatttttca
1381  ttagattatctttattagtctgaattagagttaaactgcaatttccaacacaagaatttg
1441  atcttacacaaatttcaactgaactccagtcctgatcaaggaatgtaattaatccttat
1501  cactacttgataaggactgaagctgattggccaataattgcagtaactgtttaactttg
1561  attaagaatgacttctaccaacacagatgaactttcaagtgaatttctttattagttgat
1621  aaaggttagacatctaggttaataagatatgtcaaatagcaggtacagtgctcgtgacgaa
1681  aggtagtggtatgctacttgaaacatctgacgtttccaaaatcatatccagtttctgctat
1741  ttggcaaatatctttattgtttaaaagtttgaagcttcagagatacacgagtatcaatca
1801  tcataattatgatcattatgataaaatgcattatgagaatcacctttgttgcatttcttta
1861  tgtgtgcaaacataagataaattggctaattgacatactggaagactagaaaattgatg
1921  aaaaaatcatggtgaggaatattgtataaccacgtgttaactgtagtattattagacaa
1981  gtatcatagtatattactatataattatcatagtatatgtgatcatagtatcatttcag
2041  tactagtacccaagtaaaagacaacagtcagcccttctgccataacatttatttcttttga
2101  aatcatatgttactcattagattgaaacagcctttgtatgatgtgacttaagttctgctt
2161  tatgtcaataggtttcttaaccacaataacaacatgtaaaatcaaaaaaaaaaaaaaaaa
2221  aaaaaaaaa

```

Abbildung 20: Sequenz der cDNA für Serpin1 von *Branchiostoma lanceolatum*

Türkis hervorgehoben sind die 2 potentiellen Startkodons und rot das Stoppkodon.

Die 3 alternativen Polyadenylierungssignale sind grün markiert und die jeweiligen

Polyadenylierungs-Positionen unterstrichen.

¹ Proudfoot & Brownlee, 1976

Tabelle 6: Nukleotidzusammensetzung und GC-Gehalt der cDNA von Serpin1

Nukleotid	Anzahl der Nukleotide		
	gesamte cDNA	ORF (Nukleotide 124 - 1347)	UTR
a	648	312	336
c	502	343	159
g	470	314	156
t	583	255	328
total	2203	1224	979
GC-Gehalt	44,1%	53,7%	32,2%

Die cDNA-Sequenz von Serpin1 wurde mit BLAST-Datenbanken abgeglichen und analysiert. Mittels des Programms „BLASTn“¹ wurde ein Vergleich der gesamten cDNA-Sequenz mit bereits in Datenbanken abgelegten Sequenzen durchgeführt. Diese ergab keine Identität mit bereits bekannten Genen. Nur in einer kurzen Region (Nukleotidpositionen 1133 bis 1181) wurden Ähnlichkeiten von 90% zu einem Serinprotease-Inhibitor (potentielles Antithrombin) aus *Xenopus laevis* (Krallenfrosch)² und einem potentiellen Cysteinprotease-Inhibitor aus *Rattus norvegicus* (Wanderratte)³ festgestellt. Es konnte ein ORF von 1224 Nukleotiden identifiziert werden, der sich über die Nukleotidpositionen 124 bis 1347 erstreckt und mit dem Stoppkodon „taa“ endet (Tab. 7).

Tabelle 7: Merkmale der cDNA von Serpin1

Merkmale der cDNA	Position
Startkodon 1	124 - 126
Startkodon 2	166 - 168
Stoppkodon (taa)	1345 - 1347
Poly(A)-Signal (gataaaa-n ₍₁₄₎ -c)	1820 - 1840
Poly(A)-Signal (agtaaaa-n ₍₁₃₎ -c)	2053 - 2072
Poly(A)-Signal (aataca-n ₍₁₁₎ -c)	2186 - 2203

(Positionen bezogen auf Abb. 20; n = beliebiges Nukleotid)

1 Blastn, Version 2.2.8, 05.01.2004, Database: 21.04.2004; Altschul *et al.*, 1997

2 GenBank accession no: BC041211.1 bzw. AF411693.1

3 GenBank accession no: BC060594.1 bzw. MN_199085.1

D.3.2 Analyse der abgeleiteten Proteinsequenz von Serpin1

Aus der Sequenz beginnend mit dem ersten Startkodon bei Nukleotid 124 bis zum Stoppkodon bei Nukleotid 1345, kann ein Protein von 407 Aminosäuren abgeleitet werden (Abb. 22). Mit dem Programm „PeptideMass“¹ wurde ein Molekulargewicht von 46,1 kD und ein theoretischer pI von 5,39 berechnet. Auf Grund der konservierten Domänen und abgeleiteten Tertiär-Struktur wird das Protein ab Aminosäureposition 23 durch das Programm „RPN-Blast“² eindeutig der Familie der Serinprotease-Inhibitoren (Serpinen) zugeordnet. Der Abgleich des Proteins mit bereits bekannten Sequenzen durch die Suchmaschine „BLASTp“³ verlief deutlich erfolgreicher, als der auf cDNA-Ebene. Sämtliche 50 Datenbankeinträge mit den höchsten Sequenzidentitäten (40 - 47% von ~380 Aminosäuren) sind Serpine höherer Vertebraten. Insbesondere die Sequenz der Aminosäurepositionen 348 - 366 zeigte eine Übereinstimmung von ~74% (14 von 19 AS sind identisch) mit der reaktiven Schleife des Serpins Antithrombin III verschiedener Organismen (z.B. *Homo sapiens*, der Brückenechse *Sphenodon punctatus* oder dem Krallenfrosch *Xenopus laevis*) (Abb. 21). Die Aminosäurepositionen 348 - 366 von Serpin1 entsprechen mutmaßlich den Positionen P17 - P2'. Von besonderer Bedeutung für die inhibitorische Wirkung eines Serpins sind kleine Aminosäuren im Bereich des Gelenks (P15 - P9), die die Insertion der reaktiven Schleife in das Faltblatt sA ermöglichen. Diese kleinen Aminosäuren finden sich auch bei Serpin1 an selbigen Positionen. Die Positionen P1 und P1' werden von einem Arginin- bzw. Serinrest besetzt. Dies läßt eine Trypsin- oder Thrombin-ähnliche Serinprotease als Zielenzym vermuten, wie es unter anderem beim ATIII der Fall ist.⁴

	P15	P9	P1
hATIII:	E E G S E A A A S T A V V I A G R S L		
Serpin1:	E E G S E A A A A T A V N M M K R S L		
	* * * * * * * *	* * *	* * *

Abbildung 21: Aminosäuresequenzen der reaktiven Schleifen (Positionen P17 - P2') von humanem Antithrombin III und Serpin1 von *Branchiostoma lanceolatum*
hATIII = humanes Antithrombin III; * = mit gleichen AS besetzte Positionen.

1 Wilkins *et al.*, 1997

2 RPN-Blast, v 2.2.8, 05.01.2004, Database: ccd v1.65; Altschul *et al.*, 1997; Marchler-Bauer *et al.*, 2003

3 Blastp, v 2.2.8, 05.01.2004, Database: 19.04.2004; Altschul *et al.*, 1997

4 Rosenberg, 1977

Die Zuordnung zu den Serpinen wurde durch die Identifikation der Serpin-Signatur-Sequenz „FfADHPFLFII“ innerhalb der Aminosäuren 371 - 381 durch das Programm „ScanProsite“¹ in Verbindung mit der Datenbank „Prosite“ bestätigt. Computeranalysen mit „Psort II“² wiesen ein potentielles Signalpeptid (Aminosäurepositionen 1 - 22) und eine entsprechende Signalpeptidase-Spaltstelle zwischen den Positionen 22 - 23 aus. Auch 2 potentielle N-Glykosylierungsstellen an den Positionen 72 - 74 und 384 - 386 konnten identifiziert werden, sowie ein C-terminales ER-Rückführungssignal mit der Aminosäure-Abfolge „KDEL“. Tabelle 8 gibt eine Auflistung der Merkmale, die in Abbildung 22 in Verbindung mit den zugehörigen Sequenzen dargestellt sind.

```

1  atatagctagcttttccacactgtgttcttatgacatgttaaactaaacattgcagacaa
61  agcaccgcttgtagacagctaaagaggaaccgattcccagtttgtgcctcagggacagtga

1  M P G H S Y S L F G L L V A M A T L G
121  accatgccaggacacagttacagcctctttggcctcctggttgccatggcaactctggga

20  S S A S Q E S T P L A D I N S E F A L E
181  agctccgcatcacaagagtccaccccattggctgacatcaacagcgagtttgccctggag

40  L Y K T L H K D H P E N I F F S P F S I
241  ctgtacaagacgctacacaaggatcatcccgagaacatcttcttctcacccttcagtatc

60  S T C L A M A Y L G A R N D T A Q Q M S
301  tccacctgtctggccatggcttacctgggggcaaggaacgatacagcacaacagatgagt

80  R V L R F H K M D A S D L H V L F H D L
361  cgagtgcttcgctttcacaagatggatgcctccgaccttcacgtggtggtccacgacctt

100  L T Q L H H S D R P Y T L K T A N R L F
421  ctgaccagctgcaccactcagacaggccctacacactcaagaccgcaaaccggctcttc

120  G Q N S F E F S Q K F L D E T S R H Y R
481  ggtcagaactcattcgagttttcgaaaagtcttctggatgaaacgtccagacattacagg

140  A Q L A P V D F S G N T E G A R Q T I N
541  gcgcagttggctcccgtggacttcagtggaaacacagagggcgcacggcaaactatcaac

160  S W V E E Q T E N K I Q D L L A P G T V
601  agctgggtagaggaacaaacagagaacaaaatccaagatcttttagcaccaggaaccgtg

180  T P A T M L V L V N A I Y F K G S W E R
661  accctgctaccatgtagtagtactgggtcaacgcatctacttcaaaggcagctgggaacgc

```

1 ScanProsite, Prosite Release 18.10; 12.10.2003; Bucher & Bairoch, 1994

2 Horton & Nakai, 1997

```

200   K F E E S R T R L G T F H I S R D E K V
721   aagtttgaggagtcgcgtacgaggctcgggtaccttccacatcagccgcgacgagaaggtc

220   E V P M M H Q Q G R F K L A Y D E D L N
781   gaggtacccatgatgcatcagcaaggccggttcaaactcgctacgacgaggacctcaac

240   C Q I L E M P Y Q G K H L S M L L V L P
841   tgccaaatcctagagatgccttaccaaggcaaacatcttagcatgctggttggtggtgccg

260   E K M D A L S T I E T S L T P D I L R R
901   gaaaagatggacgctctgagcaccatcgagacgtccttgacgccagacatactccgtcgc

280   W Q K S M D E V S T M V Q I P K F K L V
961   tggcagaagtctatggacgaggtttccaccatgggtccaaatccccaagttcaagctcgtc

300   H D F V L N E K L A D M G M T D L F S M
1021  cagatctcgtcctgaatgaaaagctggcggatatggggatgacggacctgttcagcatg

320   A D A D L S G I T G S R D L H V S Q V I
1081  gcggacgccgacctgtccgggatcacgggttcgcgtgaccttcacgtcagtcaggtcatc

340   H K A F V E V N E E G S E A A A A T A V
1141  cataaggcgtttgtggaggtcaacgaggagggtagcgaggccgcggcgacggcggtg

360   N M M K R S L D G E T F F A D H P F L F
1201  aacatgatgaaacgatcactggatggggagacgttctttgccgaccacccttccctgttc

380   L I R D N D S N S I L F L G R L V R P E
1261  ctgatcagagacaatgactcaaactctatcctgtttcttggtcgactggtgacgaccagaa

400   G L T T K D E L -
1321  ggattaactacaaaggatgaactgtaa

```

Abbildung 22: 5'-Bereich der Serpin1-cDNA und die abgeleitete Proteinsequenz

Hervorgehoben sind besondere Charakteristika (vergl. Tab. 8). (pot. Signalpeptid: rot; pot. N-Glykosylierungsstellen: türkis; Gelenk und reaktives Zentrum: grün; Serpin-Signatur: gelb; ER-Rückführungssignal: grau) Die abgeleiteten Aminosäuren stehen im Einbuchstabencode mittig über dem zugehörigen Nukleotidtriplett.

Tabelle 8: Charakteristische Merkmale der abgeleiteten Proteinsequenz von Serpin1

Eigenschaft	
Anzahl Aminosäuren	407
Molekulargewicht	46,1 kD
theoretischer pI	5,39
Signalpeptid	AS 1 - 22
Signalpeptidase-Spaltstelle (SSA↓SQ)	AS 22/23
N-Glykosylierungs-Erkennungssequenzen (NDT bzw. NDS)	AS 72 - 74 bzw. 384 - 386
Gelenk der reaktiven Schleife P15 - P9 (GSEAAAA)	AS 350 - 356
reaktives Zentrum P1 - P1' (RS)	AS 364 - 365
Serpinsignatur (FFADHPFLFLI)	AS 371 - 381
ER-Rückführungssignal (KDEL)	AS 404 - 407

(in Klammern die Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode; AS = Aminosäure und die Position in der abgeleiteten Proteinsequenz in Abb. 22)

D.3.3 Modellierung der Tertiärstruktur von Serpin1

Die Modellierung der Tertiärstruktur des von der cDNA abgeleiteten Proteins erfolgte mit dem Programm „Swissmodel“ (C.2.5) auf Grundlage der bekannten Strukturdaten für die humanen Serpine Antithrombin III (ATIII), Heparinkofaktor II (HCII), α_1 -Antitrypsin (α_1 -AT) und Plasminogenaktivator-Inhibitor 1 (PAI1). Es konnte die Serpin1-Struktur der Aminosäuren 24 - 400 berechnet werden (Abb. 23). Für die Aminosäuren 1 - 23 und 401 - 407 (AS 1 - 22: Signalpeptid; AS 404 - 407: ER-Rückführungssignal) war dies wegen fehlender Vergleichsdaten nicht möglich. Die Struktur entspricht der eines typischen Serpins mit 3 β -Faltblättern und 9 α -Helizes (B.2.1). Die Bezeichnung der Sekundärstrukturelemente erfolgte analog zum α_1 -AT.¹ Die Aminosäuren, denen auf Grund der Homologievergleiche die Funktionen von Gelenk und reaktivem Zentrum zugeordnet wurden (Tab. 8), konnten durch ihre Position im Strukturmodell bestätigt werden. Das Protein enthält 2 Cysteine, die in Helix hB (C62) bzw. Strang s2B (C240) lokalisiert sind. Die Distanz zwischen beiden beträgt ~ 34 Å und ist zu groß für die Ausbildung einer Disulfidbrücke, die eine Bindungslänge von ~ 2 Å aufweist.² Die 2 potentiellen N-Glykosylierungsstellen liegen in der Helix hC (AS 72 - 74,

1 Irving *et al.*, 2000

2 Holleman-Wiberg, 1995

NDT) bzw. zwischen den Strängen s4B und s5B (AS 384 - 386, NDS). Beide befinden sich auf der „Rückseite“ des Proteins und sind frei zugänglich, womit sie für eine Glykosylierung des nativen Proteins in Frage kommen.

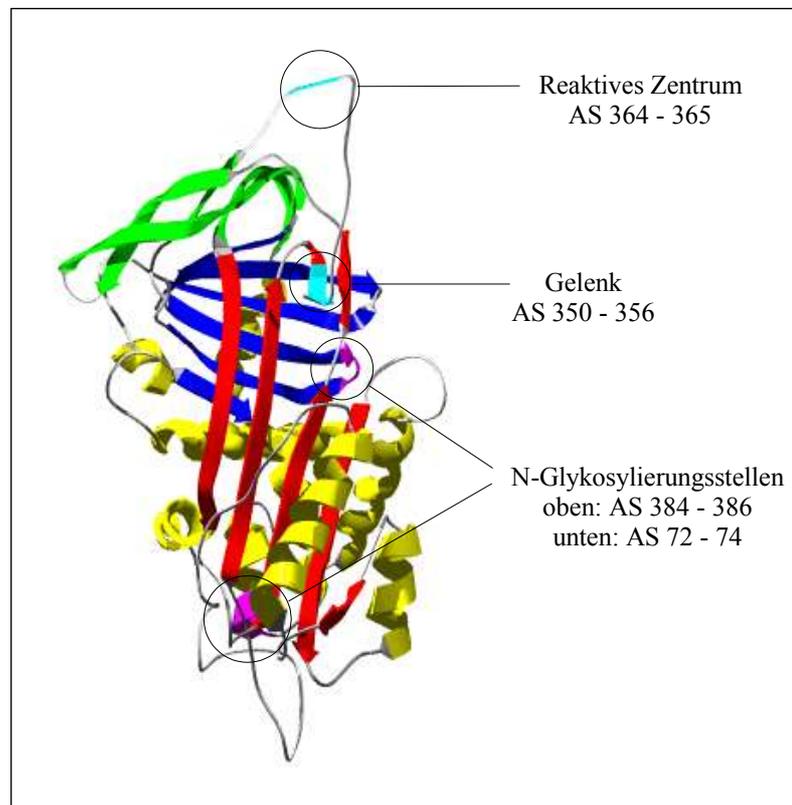


Abbildung 23: Modell der Tertiärstruktur von Serpin1

Helizes sind in gelb dargestellt und Faltsblätter in rot (sA), blau (sB) und grün (sC). Gelenk (P15 - P9) und reaktives Zentrum (P1 - P1') sind in türkis, sowie die potentiellen N-Glykosylierungsstellen in rosa hervorgehoben. Die darunter angegebenen Aminosäurepositionen beziehen sich auf Abbildung 24. Für nähere Details siehe Abbildung 3.

Die Zuordnung der Sekundärstrukturelemente des Modells von Serpin1 zur Aminosäuresequenz ist in Abbildung 24 gezeigt. Aus den erhaltenen Modelldaten war es nicht möglich die exakten Übergänge zwischen den Strängen s3C und s1B, sowie s2C und s6A zu ermitteln. Die mutmaßlichen Strukturübergänge wurden in Anlehnung an die zu Grunde liegenden Modelle abgeleitet. Für den auf Strang s3A folgenden Strang, fehlt eine vergleichbare Struktur im Modell des α_1 -AT. Dem Strukturmodell nach stellt sie eine Verlängerung von Strang s3A da und wird daher dieser Helix zugeordnet.



Abbildung 24: Sekundärstrukturelemente des Serpin1-Proteinmodells

Die Bezeichnung der Strukturen orientiert sich am Modell von α_1 -AT. Die Farbgebung erfolgt in Anlehnung an Abbildung 23. Gelb unterlegt sind Helizes, die Faltblätter in rot (sA), blau (sB) und grün (sC) und grau die Bereiche deren Struktur auf Grund fehlender Vergleichsdaten nicht vorhersagbar sind.

D.4 Gegenüberstellung der 3'-Bereiche der cDNA-Gruppen a und b

D.4.1 Gegenüberstellung der kodierenden Bereiche der cDNA

Die in D.1.6 beschriebenen Plasmidinserts konnten auf Grund ihrer Sequenzen in 2 Gruppen eingeteilt werden. Die Sequenzen einer jeweiligen Gruppe erwiesen sich als Varianten einer Sequenz mit unterschiedlich langen 3'-Termini. Die Sequenzen der beiden Gruppen a und b waren sehr ähnlich, wiesen aber einige Differenzen auf, die in den folgenden Kapiteln behandelt werden sollen. Der besseren Übersicht halber werden die kodierenden Bereiche und die 3'-UTRs der beiden Gruppen getrennt betrachtet.

Das Alignment (Abb. 25) der ORFs von Gruppe a und b zeigt die Unterschiede zwischen den Nukleotidsequenzen und ihre Bedeutung für die abgeleiteten Aminosäuresequenzen.

a	1	R	F	K	L	A	Y	D	K	D	L	N	C	Q	V	L	E	M	P	Y	Q
a	1	cggttcaaactcgctacgacaggacctcaactgccaggctcctagagatgccttaccaa																			
b	808	cggttcaaactcgctacgacaggacctcaactgccaatcctagagatgccttaccaa																			
b	229	R	F	K	L	A	Y	D	E	D	L	N	C	Q	I	L	E	M	P	Y	Q
a	21	G	K	H	L	S	M	L	F	V	L	P	D	K	M	D	A	L	S	T	I
a	61	ggaaacatttagcatgctgttggtgttgccggaagaatggacgctctgagcaccatc																			
b	868	ggaaacatttagcatgctgttggtgttgccggaagaatggacgctctgagcaccatc																			
b	249	G	K	H	L	S	M	L	L	V	L	P	E	K	M	D	A	L	S	T	I
a	41	E	T	S	L	T	P	D	L	L	R	R	W	Q	K	S	M	D	E	V	S
a	121	gagacgtccttaacgccagacttactccgctcgtggcagaagtctatggacgaggtttcc																			
b	928	gagacgtccttaacgccagacttactccgctcgtggcagaagtctatggacgaggtttcc																			
b	269	E	T	S	L	T	P	D	I	L	R	R	W	Q	K	S	M	D	E	V	S
a	61	T	M	V	Q	I	P	K	F	K	L	V	H	D	F	V	L	N	E	K	L
a	181	accatgggtccaaatccccaaagttcaaactcgtccacgattttgtcctaatgaaaagcta																			
b	988	accatgggtccaaatccccaaagttcaagctcgtccacgattttgtcctaatgaaaagctg																			
b	289	T	M	V	Q	I	P	K	F	K	L	V	H	D	F	V	L	N	E	K	L
a	81	A	D	M	G	M	T	D	L	F	S	M	A	D	A	D	L	S	G	I	T
a	241	gcggacatggggatgacggacctgttcagcatggcggacgccgacctgtcgggatcacg																			
b	1048	gcggacatggggatgacggacctgttcagcatggcggacgccgacctgtcgggatcacg																			
b	309	A	D	M	G	M	T	D	L	F	S	M	A	D	A	D	L	S	G	I	T
a	101	G	S	R	D	L	H	V	N	Q	V	I	H	K	A	F	V	E	V	N	E
a	301	ggttcgctgaccttcacgtcaaccagggtcatccacaaggcgtttgtggagggtcaacgag																			
b	1108	ggttcgctgaccttcacgtcaggtcagggtcatccacaaggcgtttgtggagggtcaacgag																			
b	329	G	S	R	D	L	H	V	S	Q	V	I	H	K	A	F	V	E	V	N	E
a	121	E	G	S	E	A	A	A	A	T	A	V	N	M	M	K	R	S	L	D	G
a	361	gagggcagtgaggctgcagcagcgacagcgggtgaacatgatgaaacgggtccttgacggg																			
b	1168	gagggtagcgaggcgcggcgcgacggcgggtgaacatgatgaaacgatcactggatggg																			
b	349	E	G	S	E	A	A	A	A	T	A	V	N	M	M	K	R	S	L	D	G
a	141	E	T	F	F	A	D	H	P	F	L	F	L	I	R	D	N	D	S	N	S
a	421	gagacgttcttgccgaccatcccttctgttctgatcaggatgaatgactcaaactct																			
b	1228	gagacgttcttgccgaccatcccttctgttctgatcaggatgaatgactcaaactct																			
b	369	E	T	F	F	A	D	H	P	F	L	F	L	I	R	D	N	D	S	N	S
a	161	I	L	F	L	G	R	L	V	R	P	E	G	L	T	T	K	D	E	L	-
a	481	atcctgtttcttggtcgcactggtgcgaccagaaggattaactacaaaggatgaactgtag																			
b	1288	atcctgtttcttggtcgcactggtgcgaccagaaggattaactacaaaggatgaactgtag																			
b	389	I	L	F	L	G	R	L	V	R	P	E	G	L	T	T	K	D	E	L	-

Abbildung 25: Alignment der kodierenden 3'-Bereiche der cDNA von Gruppe a und b

Das Sequenz-Alignment zeigt 36 Unterschiede auf 540 Nukleotide, wovon 29 still sind (türkis) und 7 (magenta) zu 6 Änderungen auf Ebene der abgeleiteten Aminosäuresequenzen (rot) führen. Die für ein Serpin charakteristischen Bereiche des Gelenks und des reaktiven Zentrums sind in grüner Schrift hervorgehoben. Die abgeleiteten Aminosäuren stehen im Einbuchstabencode mittig über dem zugehörigen Nukleotidtriplett. Der 5'-Bereich der Sequenz von Gruppe a ist nicht bekannt und daher beginnt die Nummerierung bei 1. Die Nummerierung von Gruppe b orientiert sich an der vollständigen cDNA-Sequenz (Abb. 20 bzw. 22).

Das postulierte Stoppkodon der Sequenz von Gruppe a lautet „tag“ (Nukleotide 538 - 540 in Abb. 25), das der Gruppe b „taa“ (Nukleotide 1345 - 1347). Neben diesem Unterschied treten im Bereich der ORFs mit 540 Nukleotiden noch 35 andere Substitutionen auf, was einem Anteil von 6,6% entspricht. In 29 Fällen handelt es sich um sogenannte Transitionen, die somit 81% der Substitutionen ausmachen. Die restlichen 7 der insgesamt 36 Differenzen können auf Transversionen zurückgeführt werden. Deletionen bzw. Insertionen konnten im kodierenden Bereich nicht beobachtet werden. Im Detail ist die Verteilung der Nukleotidsubstitutionen auf die Mutationstypen noch einmal in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Basensubstitutionen zwischen den Gruppen a und b

Art der Substitution	ausgetauschtes Nukleotid	Anzahl im ORF
Transition	a ↔ g	14
	c ↔ t	15
Transversion	a ↔ c	2
	a ↔ t	1
	c ↔ g	1
	g ↔ t	3
		Σ 36 (6,6%)
Deletion / Insertion		0

Bemerkenswert ist die Häufung der Nukleotidunterschiede im Bereich der reaktiven Schleife des potentiellen Serpins. Auf den Abschnitt der Nukleotide 364 - 417 bzw. 1171 - 1224 (Abb. 25) konzentrieren sich 10 der insgesamt 36 Unterschiede. Der Anteil an Substitutionen in diesem Bereich beträgt 19,2% auf 52 Nukleotide und ist somit 3-mal höher als der des gesamten kodierenden Bereichs. Jedoch führt keine der Substitutionen zu Veränderungen der Proteinsequenz in diesem Bereich. Die 7 restlichen Basensubstitutionen führen zu insgesamt 6 Änderungen in der Aminosäuresequenz, deren Positionen dem Strukturmodell von Serpin1 in zugeordnet wurden (Tab. 10).

Tabelle 10: Positionen von Basensubstitutionen mit Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz und die Lokalisation im Strukturmodell von Serpin1

Nukleotid-Position	829	847	891	903	949	1130, 1131
Gruppe a	a	g	t	c	t	a, c
Gruppe b	g	a	g	a	a	g, t
daraus resultierende Aminosäureunterschiede:						
AS-Position	236	242	256	260	276	336
Gruppe a	Lysin	Valin	Phenylalanin	Aspartat	Leucin	Asparagin
Gruppe b	Glutamat	Isoleucin	Leucin	Glutamat	Isoleucin	Serin
Lokalisation im Strukturmodell	1 AS nach s1B	s2B	s3B	2 AS nach s3B	hH	zwischen hI und s5A

(Nummerierung nach Abb. 25, Sequenz der Gruppe b)

D.4.2 Gegenüberstellung der nicht translatierten Bereiche

Auf die Sequenz des kodierenden Bereichs folgt der 3' nicht translatierte Bereich, der in der für Eukaryoten-mRNA typischen Poly(A)-Sequenz endet. In Abbildung 26 ist das Alignment der UTRs der beiden Gruppen a und b dargestellt. Erstellt wurde es mit dem Programm „ClustalX“ (C.2.1.13).

```

a 541 agctaaaaaaccattcatgtttttcatttttcatgagaatatcttaattagtcagaatta
b 1348 agcaaaaaaaccattcatgtttttcatttttcatttagattatctttattagctcgaatta
      *                               * * * *
a 601 gagttaaactgcaatttccaacacaagaatttaattcttgcccaaattttcaactgaactc
b 1408 gagttaaactgcaatttccaacacaagaatttgatcttacacaaattttcaactgaactc
      * * *
a 661 cagtccatatcaaggaatgcaattaatccttatcattccttgataaggactggagctgat
b 1468 cagtccgatcaaggaatgtaattaatccttatcattacttgataaggactgaagctgat
      * * * *
a 721 tggtcaaaaatttacagtaactgtttaactttgatttagaatgacttctaccaacacaga
b 1528 tggtcaaaaatttcagtaactgtttaactttgattaagaatgacttctaccaacacaga
      * *
a 781 tgaactttcaagtgaatttctttattagttgatgaaggtagacatctaggtaataagat
b 1588 tgaactttcaagtgaatttctttattagttgataaaggtagacatctaggtaataagat
      *
a 841 atgccaaatagctgttacagtgtcactgacgaaaggtaatgcaggctacttgaaacatct
b 1648 atgtcaaatagcaggtacagtgctcgtgacgaaaggtagtgatgctacttgaaacatct
      * * * * *

```

```

a 901 gacggtttctctaaatcatatccagtttctgctatctggcaaatatctttattgtttaaaa
b 1708 gacg-tttccaaaatcatatccagtttctgctattttggcaaatatctttattgtttaaaa
      *      *                               *

a 961 gtcaggctttgaagcttgtattgaatacgcgagtatcaatcatcatgattatgatcatta
b 1767 gt-----ttgaagcttcag--agatacacgagtatcaatcatcataaattatgatcatta
      *****          ***** *                               *

a 1021 tgataaatgcattatgagaatcacctttggttcattt-tttatatgtgcaaacataagaa
b 1819 tgataaaatgcattatgagaatcacctttggttcatttctttatgtgtgcaaacataag--
                                     *      *                               **

a 1080 tgatgaattggctaactgacatgctggaaagactggcaaattgattaaaaaaatcatagt
b 1877 --ataaattggctaattgacatactggaaagactagaaaattgatgaaaaaatcatggt
      ** *              *      *                               * *      *

a 1140 gaggaatactgtataaccacgtgttaactgta-----agattat-----
b 1935 gaggaatattgtataaccacgtgttaactgtagtattattagacaagtatcatagtatat
      *                                     ***** * *****

a 1180 -----tagtattatagtatatgtgatatcatagtatcatttcagtac-----ccaaa
b 1995 tactatatattatcatagtatatgtgatatcatagtatcatttcagtactagtacccaag
      ***** * *                                     ***** *

a 1227 taaaggacaacagtcagtccttctgccataacatttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1282
b 2055 taaaggacaacagtcagcccttctgccataacatttatttcttttgaatcatatgttact
      *

a -----
b 2115 cattagattgaaacagcctttgtatgatgtgacttaagttctgctttatgtcaataggtt

a -----
b 2175 tcttaaccacaaatacaacatgtaaaatcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 2229

```

Abbildung 26: Alignment der nicht translatierten 3'-Bereiche der cDNA-Sequenzen der Gruppen a und b

Die alternativen Polyadenylierungssignale sind grün markiert und die Polyadenylierungspositionen durch Unterstreichung dargestellt. Die Deletionen bzw. Nukleotidunterschiede sind durch * markiert. Es wird die Nummerierung von Abbildung 25 fortgeführt.

Der Anteil an Nukleotidunterschieden in den 3'-UTRs liegt mit ~6,2% (45 Nukleotide bei insgesamt 721 Positionen bei Gruppe a bzw. 742 Positionen bei Gruppe b) in derselben Größenordnung wie auch beim ORF (Tab. 11).

Tabelle 11: Substitutionen im nicht translatierten 3'-Bereich der Gruppen a und b

Art der Substitution	ausgetauschtes Nukleotid	Anzahl im UTR
Transition	a ↔ g	19
	c ↔ t	8
Transversion	a ↔ c	3
	a ↔ t	8
	c ↔ g	2
	g ↔ t	5
		Σ 45 (~6,2%)

Allerdings konnten hier im Gegensatz zur kodierenden Region auch einige Deletionen bzw. Insertionen beobachtet werden. Durch den Vergleich von nur 2 Sequenzen kann im Einzelfall nicht ermittelt werden, ob es sich um Deletionen bzw. Insertionen handelt.

Bei den cDNA-Sequenzen von Gruppe a konnten 2 Polyadenylierungsvarianten festgestellt werden. Bei der kürzeren Version (repräsentiert in Konstrukt pUT12) erfolgt das Anhängen der Poly(A)-Sequenz 704 Nukleotide hinter dem postulierten Stoppkodon. Vor der Poly(A)-Sequenz kann ein klassisches Polyadenylierungssignal¹ identifiziert werden. Dieses besteht aus einem „aataaa“-Motiv und einem 13 Positionen weiter 3'-terminal gelegenen Cytosinrest (aataaa-n₍₁₃₎-c), an dem die Spaltung und das Anfügen der Poly(A)-Sequenz erfolgen (Tab. 12). Bei der 17 Nukleotide längeren cDNA-Variante (repräsentiert in pUT10a) beginnt die Poly(A)-Sequenz 721 Nukleotide 3'-terminal des kodierenden Bereichs an einem Thyminrest an Stelle eines Cytosinrests. Im Bereich von etwa 13 Nukleotiden stromaufwärts kann keine typische Signalsequenz erkannt werden. Möglicherweise dient hier die gleiche Sequenz, wie bei pUT12 (30 Nukleotide stromaufwärts der Polyadenylierungsposition) zur Initiation der Polyadenylierung. Gruppe b ist durch 3 Varianten mit unterschiedlichen Größen der 3'-UTRs vertreten. Die UTR-Bereiche von pUT11, pUT10b und pUT9 haben Längen von 494, 725 bzw. 857 Nukleotiden. Ein eindeutiges Polyadenylierungssignal kann in keinem der drei Fällen identifiziert werden. Jedoch weisen die postulierten Signalsequenzen Ähnlichkeiten zum klassischen Signal auf.

¹ Proudfoot & Brownlee, 1976

Tabelle 12: Postulierte Polyadenylierungssignale der verschiedenen cDNA-Varianten

	Konstrukt	Polyadenylierungssignal	Position in Abb. 26	UTR-Länge [Bp]
Varianten Gruppe a	pUT12	aataaaa-n ₍₁₃₎ -c	1225	704
	pUT10a	aataaaa-n ₍₃₀₎ -t	1225	721
Varianten Gruppe b	pUT11	gataaaa-n ₍₁₄₎ -c	1820	494
	pUT10b	agtaaaa-n ₍₁₃₎ -c	2053	725
	pUT9	aataca-n ₍₁₁₎ -c	2186	857

D.5 Gewinnung von rekombinantem Serpin1

D.5.1 Konstruktion eines Plasmids zur Expression von rekombinantem Serpin1 als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase

Um das von der Serpin1-cDNA kodierte Protein charakterisieren zu können, wurde es in *E. coli* exprimiert. Die Expression von Serpin1 erfolgte als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST) als N-terminaler Domäne. GST zeigt ein hochspezifisches Bindungsverhalten bezüglich Glutathion und ermöglicht so die Aufreinigung des Fusionsproteins aus einem Zellrohextrakt durch Bindung an Matrix-gekoppeltes Glutathion.¹ Daneben wirkt sich GST in vielen Fällen positiv auf die Faltung und damit die Aktivität des gekoppelten Proteins aus. Zusätzlich ist die hier verwendete GST an ihrem N-Terminus mit einer Abfolge von sechs Histidinen versehen. Diese His₆-Sequenz dient der weitergehenden Aufreinigung (C.2.3.11). Zur Expression des Fusionsproteins wurde der Vektor pKM263 eingesetzt (C.1.11)², der neben der GST-Sequenz auch die für die His₆-Markierung bereitstellt. Auf die GST-Sequenz folgt die Spaltstelle für die TEV-Protease und eine multiple Klonierregion („multiple cloning site“, MCS) zum Einfügen der Sequenz eines zweiten Proteins, das mit GST fusioniert exprimiert werden soll. Die Sequenz der Spaltstelle kodiert für eine Abfolge von 7 Aminosäuren, die von einer Protease des Tabakäzavirus, der TEV-Protease (C.1.9.2.1), als Substrat erkannt wird. Die Protease hydrolysiert die Peptidbindung zwischen der 6. und 7. Aminosäure der Erkennungssequenz (P1 und P1' nach der Nomen-

1 Smith & Johnson, 1988

2 Melcher, 2000

Das PCR-Produkt wurde mit der Primerkombination *XhoI*-TEV-*Bl*-SPN1+ und *Bam*HI-BL2_b- (C.1.12.1) amplifiziert. Der Minus-Strangprimer *Bam*HI-BL2_b- ist komplementär zur 3'-terminalen Sequenz von Serpin1 (einschließlich des *taa*-Stoppkodons) und enthält zusätzlich 3'-terminal die Sequenz einer *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle über die die Insertion in den Vektor erfolgte. Das erzeugte PCR-Produkt und der Expressionsvektor pKM263 wurden jeweils mit den Restriktionsendonukleasen *Xho*I und *Bam*HI geschnitten (C.2.1.9), im Gel gereinigt (C.2.1.10) und ligiert (C.2.1.11). Mit dem erzeugten Plasmid, „pUT19“ (Abb. 28) wurden *E. coli* TOP10-Zellen durch Elektroporation transformiert (C.2.2.4). Von einigen Klonen wurden Plasmide isoliert und mit den Sequenzierprimern GST-out5' und T7-term (C.1.12.2) zur Kontrolle ansequenziert (C.2.1.12) und ein Klon für die Expression ausgewählt. Zur Produktion von rekombinantem Serpin1 wurde das Plasmid in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) (C.1.6) umgesetzt.

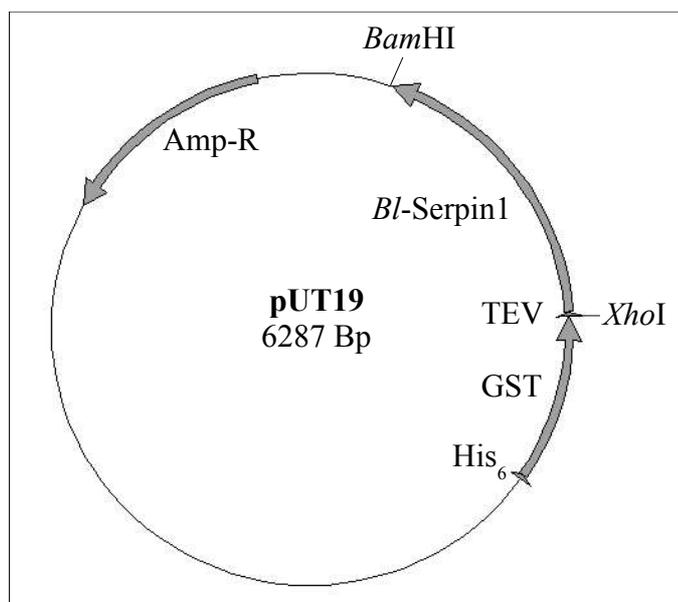


Abbildung 28: Karte des Konstrukts pUT19

Länge, Position und Orientierung einiger ausgewählter Elemente sind durch Pfeile symbolisiert. His₆: N-terminale His₆-Markierung; GST: Gen für die Glutathion-S-Transferase; TEV: Erkennungssequenz der TEV-Protease (Positionen P6 - P1); *Bl*-Serpin1: Gen des Serpin1 von *B. lanceolatum* ab Aminosäureposition 16; Amp-R: Ampicillin-Resistenzgen; *Xho*I: Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *Xho*I; *Bam*HI: Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *Bam*HI

D.5.2 Expression des Fusionsproteins

Die Expression von rekombinantem Serpin1 in Form eines Fusionsproteins mit N-terminaler His₆-Markierung und GST erfolgte in *E. coli* BL21(DE3). Die Kultivierung wurde im 200 mL-Maßstab bei 30°C in Schüttelkolben durchgeführt (C.2.2.5). Der hier verwendete Vektor pKM263 (C.1.11) besitzt einen IPTG-induzierbaren T7-Promotor. Die Stärke der Induktion ist abhängig von der eingesetzten IPTG-Konzentration. Zur Ermittlung der optimalen Bedingungen wurden die Produktionskulturen mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen (0, 0,5, 1 und 2 mM) bei einer OD₆₀₀ von 1,0 induziert und die Zunahme der Zellzahl densito-metrisch verfolgt. Nach 60, 120 und 180 min wurde die OD₆₀₀ bestimmt (Tab. 13, Abb. 29) und jeweils 100 µL Probe entnommen.

Tabelle 13: Verlauf der OD₆₀₀ unter dem Einfluss verschiedener IPTG-Konzentrationen

	OD₆₀₀ zum Zeitpunkt t vor bzw. nach Induktion [min]						
	-165	-105	-45	0	60	120	180
IPTG-Konzentration [mM]	Animpfen			Induktion			Ernte
0	0,29	0,37	0,67	1,00	1,47	1,86	2,14
0,5	0,30	0,39	0,69	1,02	1,46	1,67	1,85
1,0	0,29	0,37	0,67	1,02	1,45	1,65	1,85
2,0	0,30	0,38	0,68	1,04	1,45	1,67	1,85

Die Wachstumskurve (Abb. 29) der Kontrolle zeigt den typischen Verlauf der Zellzahlzunahme des *E. coli*-Stammes BL21(DE3) unter nicht induzierten Kultivierungsbedingungen (C.2.2.1.2). Ungefähr drei Stunden nach Animpfen mit der Vorkultur wurde die OD₆₀₀ von 1,0 erreicht und nach weiteren 4 Stunden die unter den Versuchsbedingungen maximal erreichbare Zelldicht von etwa 2,3 (Ergebnisse nicht gezeigt). Die mit IPTG induzierten Kulturen zeigten die übliche Abnahme der Zellteilungsrate, da ihr Stoffwechsel von der Produktion des rekombinanten Proteins in Anspruch genommen wurde. Alle induzierten Kulturen erreichten nach 3 stündiger IPTG-Behandlung eine OD₆₀₀ von 1,85. Zwischen den Wachstumskurven bei verschiedenen IPTG-Konzentrationen von 0,5 bis 2 mM war kein Unterschied zu beobachten.

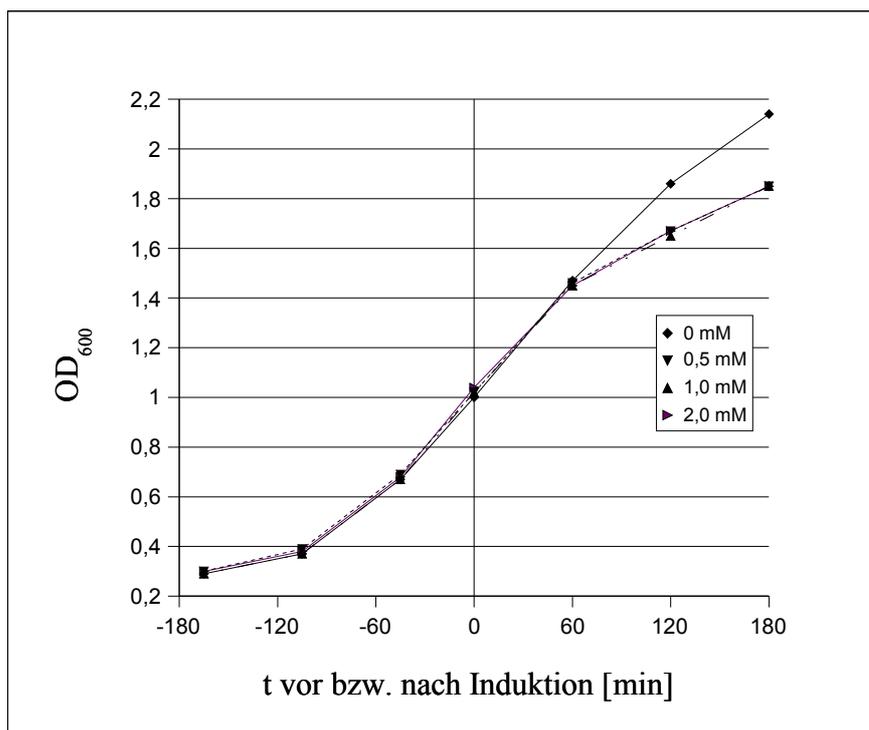


Abbildung 29: Wachstumskurven unter dem Einfluss von IPTG

Die Wachstumskurven zeigen den Einfluss verschiedener IPTG-Konzentrationen auf die OD₆₀₀ einer Kultur von *E. coli* BL21(DE3) / pUT19.

Die im Abstand von 60 min über 180 min genommenen Proben wurden im gleichen Volumen an 2-fach konzentriertem reduzierende Probenpuffer (C.2.3.1) für 5 min bei 95°C erhitzt und 2 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden 10 µL über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (C.2.3.1) aufgetrennt und anschließend mit Coomassiefärbung analysiert (C.2.3.2, Abb. 30). Als Vergleich dient eine nicht induzierte Kultur (180 min-Wert). In Abbildung 30 ist in Spur K die Expression von unfusioniertem GST (180 min mit 0,5 mM IPTG) gezeigt (Vektor pKM263 ohne Insert). GST ist als deutliche Bande mit einem Molekulargewicht von 28 kD zu erkennen. In den Proben der Fusionsprotein-Konstrukte ist statt dessen eine Bande von ~66 kD zu sehen, die gut mit dem Molekulargewicht des Fusionsproteins von 71,8 kD (berechnet mit PeptideMass¹) übereinstimmt. Die Stärke der Fusionsproteinbande nimmt mit Dauer der IPTG-Induktion zu, wobei die Zunahme allerdings nur mäßig im Vergleich mit der nicht induzierten Kontrolle ist.

1 Wilkins *et al.*, 1997

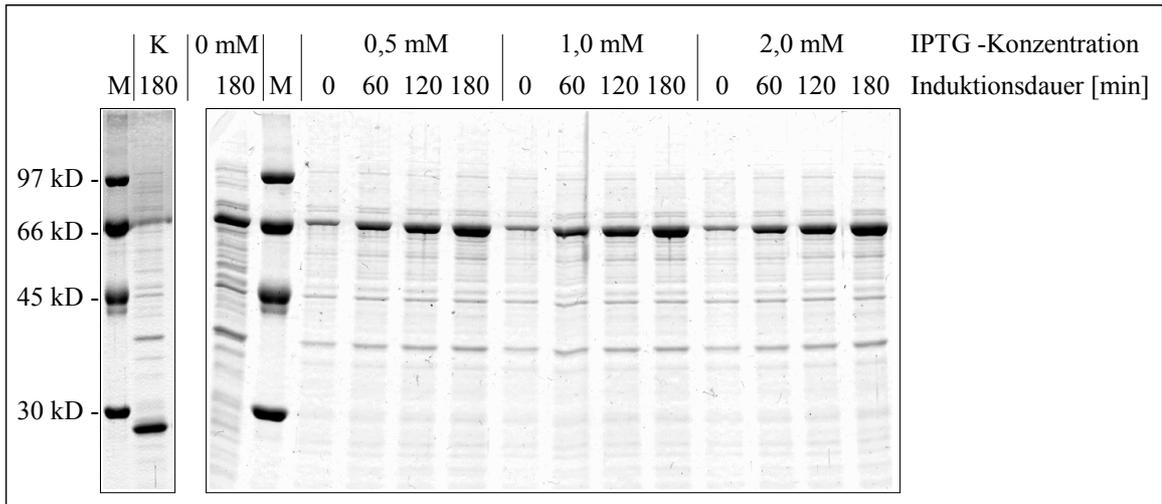


Abbildung 30: Einfluss verschiedener IPTG-Konzentrationen auf die Proteinexpression

K: unfusioniertes GST; 10%-SDS-Polyacrylamid-Gel; Coomassiefärbung; M: Größenmarker LMW

Zum Abgleich der relativen Proteinausbeute wurden alle Probenvolumina einer OD_{600} von 1,85 entsprechenden Zellzahl verdünnt (Abb. 31) und die Proteinbanden bei 66 kD densitometrisch verglichen (C.2.3.4). Die ermittelten Werte sind relative Werte über die Fläche und Intensität der Proteinbanden und treffen keine Aussage über die tatsächliche Proteinmenge (Tab. 14).

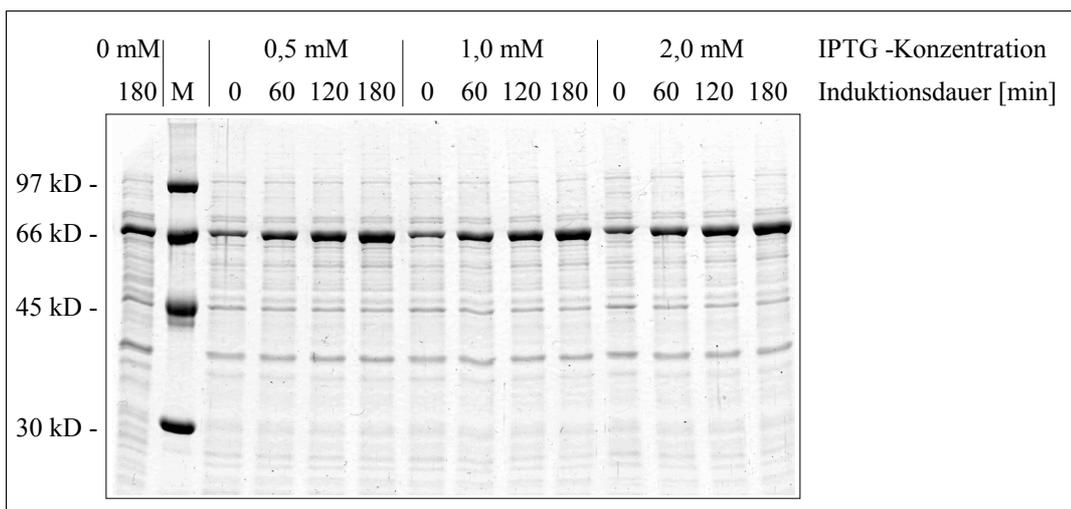


Abbildung 31: Einfluss verschiedener IPTG-Konzentrationen auf die Proteinexpression

nach Normierung auf eine OD_{600} von 1,85

10%-SDS-Polyacrylamid-Gel; Coomassiefärbung; M: Größenmarker LMW

Tabelle 14: Vergleich der auf eine OD₆₀₀ von 1,85 normierten Fusionsprotein-Banden

IPTG-Konzentration [mM]	Induktionsdauer [min]			
	0	60	120	180
0	/	/	/	12,9
0,5	7,2	12,1	15,1	18,6
1,0	7,2	12,2	14,7	17,8
2,0	7,7	12,7	16,3	18,9

(Werte angegeben als relative Bandenfläche)

In den Abbildungen 30 und 31 war die Bande des rekombinanten Proteins bereits bei Induktionsbeginn deutlich zu erkennen und auch in der nicht induzierten Kontrolle (180 min). Das Auftreten kann auf die fehlende Repression der Expression von T7-Polymerase im Produktionsstamm zurückgeführt werden.¹ Dies führte zu einer Grundexpression der Polymerase und damit zu einer konstitutiven Synthese des rekombinanten Proteins auch im nicht induzierten Zustand. Aus Tabelle 14 ist zu ersehen, dass eine Erhöhung der IPTG-Konzentration über 0,5 mM hinaus keine zusätzliche Produktivitätssteigerung erbrachte. Deshalb wurden alle folgenden Experimente mit einer IPTG-Konzentration von 0,5 mM durchgeführt. Eine weitere Optimierung bezüglich Induktionszeiten von mehr als 180 min wurde nicht vorgenommen.

Zur Ernte der Bakterien wurde die Kulturbrühe zentrifugiert und das Pellet mit den Bakterien und dem intrazellulären Protein bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Das Aufbrechen des Pellets erfolgte mittels Frenchpress (C.2.2.6). Das trübe Zellysats wurde durch Zentrifugation bei 30000xg für 30 min geklärt, sterilfiltriert und auf die equilibrierte Glutathion-Sepharosesäule aufgetragen (C.2.3.9).

D.5.3 Aufreinigung des Fusionsproteins mittels Glutathion-Sepharose

Das geklärte Zellysats wurde mittels einer FPLC-Anlage bei einer Flußrate von 0,3 mL/min auf die equilibrierte Affinitäts-Chromatografiesäule aufgetragen (C.2.3.9). Die Säule enthielt eine Sepharosematrix mit kovalent gekoppeltem Glutathion. Nach Bindung des GST-Fusionsproteinanteils an das immobilisierte Glutathion wurde die Säule mit Waschpuffer gewaschen, um Reste des Lysats und des Lysepuffers zu entfernen. Das gebundene

¹ Lottspeich & Zorbas, 1998

Fusionsprotein wurde mit 20 mM reduziertem Glutathion in PBS-Puffer vom Säulenmaterial verdrängt und eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen a 1 mL aufgefangen und für weitergehende Untersuchungen bei -80°C verwahrt. Die Elution wurde durch Messung der OD_{280} verfolgt (Abb. 32).

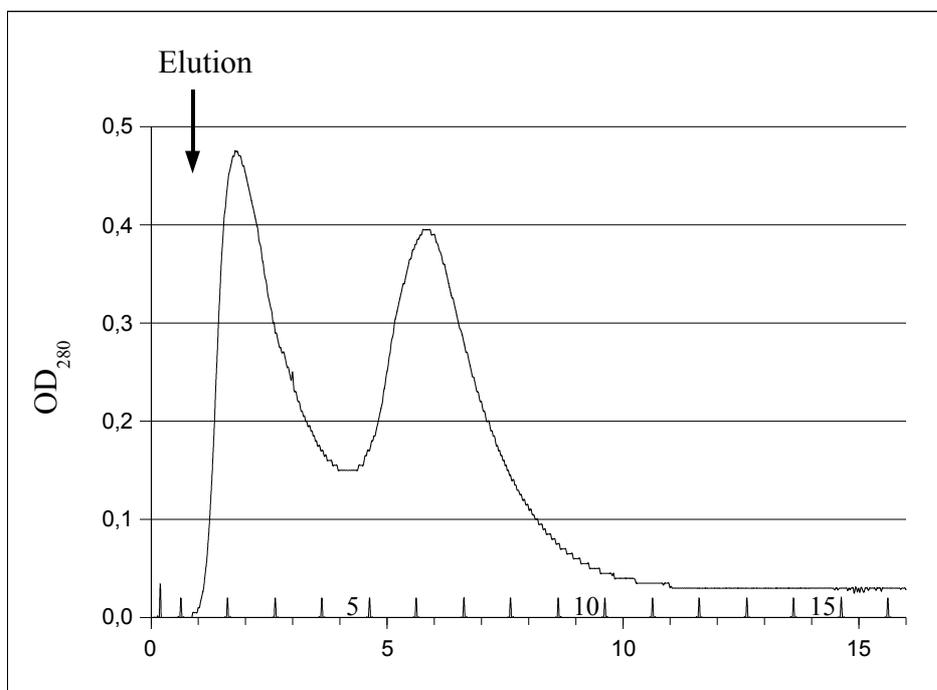


Abbildung 32: Elutionsprofil einer Fusionsprotein-Aufreinigung an Glutathion-Sepharose

Die Grafik zeigt den Verlauf der OD_{280} . Unterhalb der x-Achse ist das Elutionsvolumen in mL angegeben, oberhalb die zugeordnete Fraktionsnummer des Eluats.

Die OD_{280} begann nach 1,1 mL Elutionsvolumen (Fraktion 2) zügig anzusteigen, zeigte 2 deutliche Maxima und erreichte nach 11,0 mL (Fraktion 12) wieder den Extinktionswert des Elutionspuffers.

Eine Auftrennung der FPLC-Fraktionen 2 - 12 im SDS-Polyacrylamid-Gel (C.2.3.1 u. C.2.3.2) ließ nach Coomassiefärbung eine Einzelbande mit einem Molekulargewicht von ca. 66 kD erkennen und zeigte die hohe Reinheit des aufgereinigten Fusionsproteins. Die Zunahme der Proteinmenge in den einzelnen Fraktionen (Abb. 33) korrelierte gut mit dem Verlauf des OD_{280} -Profils und ließ ebenfalls zwei Maxima erkennen. Es wurden keine

Unterschiede hinsichtlich elektrophoretischer Mobilität der Proteinbanden aus den beiden Maxima festgestellt. Die Ursache für das unterschiedliche Elutionsverhalten ist nicht bekannt.

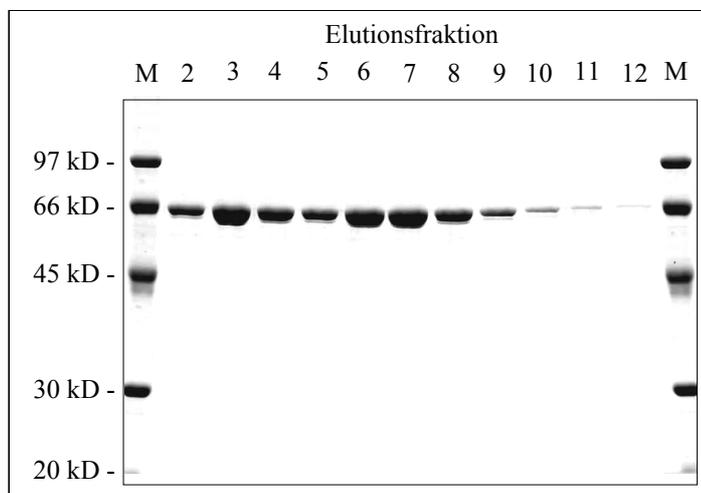


Abbildung 33: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Elutionsfraktionen einer Fusionsprotein-Aufreinigung an Glutathion-Sepharose
 Proben: Elutionsfraktionen 2 - 12, jeweils 5 μ l
 10%-SDS-Polyacrylamid-Gel; Coomassiefärbung; M: Größenmarker LMW

An Hand des densitometrischen Vergleichs (C.2.3.4) mit den Bandenintensitäten des Größenmarkers (C.1.13.2) wurden die in Tabelle 15 angeführten Proteinkonzentrationen der Banden abgeschätzt.

Tabelle 15: Konzentration des Fusionsproteins in den Fraktionen einer Glutathion-Sepharose-Aufreinigung

Fraktion	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Proteinkonzentration [ng/μL]	184	392	256	194	358	372	230	88	<10	<10	<10

Im Gel konnte eine schwache zweite Bande mit einem etwas geringeren Molekulargewicht (~64 kD) beobachtet werden (Abb. 33). Von Dr. S. Brand am Lehrstuhl für Genetik, Fakultät für Biologie, wurde ein tryptischer Verdau der Proteine mit anschließender massenspektrometrischer Analyse (MALDI-TOF-MS) durchgeführt. Beide Proteine konnten eindeutig als GST-Serpin1-Fusionsprotein identifiziert werden. Bei dem ~64 kD-Protein wurde das Fehlen der zwei C-terminalen Trypsin-Spaltfragmente mit insgesamt

13 Aminosäuren (~1,5 kD) bemerkt. Aus technischen Gründen konnte nicht festgestellt werden, ob statt dessen ein neues Fragment auftrat, bestehend aus einer Teilsequenz der fehlenden Fragmente. Bei der kleineren Bande handelte es sich somit um das Fusionsprotein, welches am C-Terminus des Serpin1-Anteils um maximal 13 Aminosäuren verkürzt war. Ursache hierfür ist vermutlich Abbau durch bakterielle Proteasen.

Im Rahmen der Versuche wurde beobachtet, dass es bei der Verwendung von 1,5 mL-Reaktionsgefäßen der Firma Brand zu deutlichen Verlusten von Probenmaterial kam. Vermutlich ist Adhäsion des Proteins an die Gefäßwand dafür verantwortlich. Dies konnte zwar durch Zusatz von 0,1% Triton X-100 zum jeweiligen Puffer unterbunden werden, hätte aber unter Umständen negativen Einfluss bei Versuchen zur biologischen Aktivität. Diese wurden daher grundsätzlich ohne Detergenz in 0,7 mL-Reaktionsgefäßen der Firma Eppendorf durchgeführt, bei denen der beobachtete Adhäsionseffekt gering war.

D.5.4 Freisetzen von Serpin1 aus dem Fusionsprotein durch TEV-Proteaseverdau

Zwischen den beiden Hauptbestandteilen des Fusionsproteins - GST und Serpin1 - war eine TEV-Protease-Spaltstelle lokalisiert. Die kommerziell erhältliche TEV-Protease wurde rekombinant in *E. coli* produziert und war zur Aufreinigung mit einer His₆-Markierung versehen worden (C.1.9.2.1). Zur Freisetzung von Serpin1 aus dem Fusionsprotein wurden 300 µL einer proteinhaltigen FPLC-Fraktion mit 20 U TEV-Protease [10 U/µl] versetzt und über Nacht unter leichtem Schütteln bei 4°C inkubiert (C.2.3.10). Verwendet wurde die Fraktion 3 mit einer Fusionsprotein-Konzentration von ca. 0,4 µg/µL, entsprechend einer Gesamtmenge von ~120 µg. Das Fusionsprotein / Protease-Verhältnis entspricht daher 6 µg Protein / U TEV-Protease. Zur Kontrolle der Spalteffizienz wurden 5 µl Probe vor bzw. nach TEV-Protease-Inkubation mittels eines SDS-Polyacrylamid-Gels aufgetrennt und mit Coomassieblau gefärbt (C.2.3.1, C.2.3.2) (Abb. 34).

Nach 16 h Inkubation bei 4°C konnte eine fast vollständige Spaltung des Fusionsproteins in seine beiden Komponenten festgestellt werden. GST weist eine Größe von 28 kD (berechnetes Molekulargewicht: 27,4 kD) auf, und Serpin1 konnte der Bande mit 44 kD zugeordnet werden. Dieser Wert korreliert sehr gut mit der durch PeptidMass¹ vorhergesagten Größe von 44,5 kD. Auch hier war das C-terminal proteolytisch verkürzte Serpin1 (D.5.3) unterhalb der Hauptbande zu erkennen. Die Proteine wurden auch in diesem Fall durch massen-

1 Wilkins *et al.*, 1997

spektrometrische Analysen (MALDI-TOF-MS) identifiziert. Die Spaltung war in FPLC-Elutionspuffer (20 mM Glutathion in PBS-Puffer, C.2.3.9) vorgenommen worden und verlief fast vollständig. Dies zeigte, dass ein Pufferwechsel mittels Dialyse vor dem Proteaseverdau nicht notwendig war, der erfahrungsgemäß mit großen Verlusten an Probenmaterial verbunden ist.

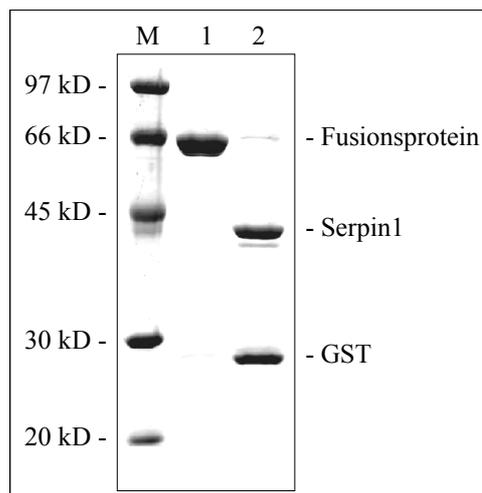


Abbildung 34: Spaltung des Fusionsproteins mit TEV-Protease

Fusionsprotein-Spaltansatz vor (Spur 1) bzw. nach 16 h Inkubation bei 4°C (Spur 2) mit TEV-Protease. In Spur 2 sind die Spaltprodukte Serpin1 und GST zu erkennen.

10%-SDS-Polyacrylamid-Gel; Coomassiefärbung; M: Größenmarker LMW

D.5.5 Vergleich von Ni-NTA-Sepharose und TALON zur Entfernung der His₆-markierten Proteine

Vor der Durchführung von Versuchen zur biologischen Aktivität von Serpin1 ist es notwendig die TEV-Protease zu entfernen, da diese Interaktionspartner von Serpin1 spalten könnte. Das vollständige Fusionsprotein, die abgespaltene GST selbst und die verwendete TEV-Protease waren mit einer His₆-Markierung versehen. Hierdurch ist es möglich diese Proteine affinitätschromatografisch aus dem Spaltungsansatz zu entfernen (D.5.4), so dass nur reines Serpin1 in Lösung verbleibt. Die Entfernung erfolgte mittels Affinitätschromatografie über die Ausbildung eines Chelat-Komplexes zwischen der His₆-Sequenz mit einem matrixgekoppelten Metallion der Übergangsgruppe, wie z.B Ni²⁺ oder Co²⁺. Als Matrix dienten Sepharosebeads, die zusammen mit den gebundenen Proteinen sedimentiert und entfernt wurden.

In dieser Arbeit wurde die Eignung der Affinitätschromatografie-Materialien „Ni-NTA-Agarose“ (QIAGEN) und „TALON“ (BD Biosciences), einer mit Co^{2+} beladenen Sepharosematrix, verglichen (C.2.3.11). Hierzu wurden jeweils 10 μL des TEV-Protease-Spaltansatzes mit 10 μL einer 50%-igen Suspension des jeweiligen Chromatografiematerials vermischt und 15 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Das Material wurde durch 2 min Zentrifugation sedimentiert und 5 μL des Überstands abgenommen. Der Überstand sollte jetzt nur noch Serpin1 enthalten. Als Kontrolle dienten 10 μL Probe ohne Zusatz von Affinitätschromatografie-Material. Zum Volumenausgleich wurden 5 μl Elutionspuffer hinzugegeben. Die Überprüfung der Resultate erfolgte durch Auftrennen der abgenommenen Überstände im SDS-Polyacrylamid-Gel mit anschließender Coomassiefärbung (C.2.3.1, C.2.3.2) (Abb. 35). Die Spaltung wurde mit einem deutlichen Überschuß an TEV-Protease durchgeführt (0,5 U/ μg Fusionsprotein anstatt der in D.5.4 eingesetzten 0,17 U/ μg), um die TEV-Protease im Gel visualisieren zu können. Die aufgetragene Proteasemenge entspricht einer Aktivität von 0,66 U. Getestet wurden neben den Chromatografiematerialien auch verschiedene Puffer. Grundlage war in allen Fällen der FPLC-Elutionspuffer (20 mM Glutathion in PBS-Puffer, C.2.3.9), dem noch zusätzlich 150 mM NaCl, 0,1% PEG 8000 bzw. 20 mM Imidazol zugegeben wurden. Diese Zusätze sollten nach Herstellerangaben die unspezifische Bindung von Serpin1 an die Chromatografiematerialien und daraus resultierende Verluste reduzieren. Das Material wurde vor Verwendung fünfmal in 500 μL des jeweiligen Puffers equilibriert.

Durch die hohe Konzentration an TEV-Protease im Ansatz verlief die Spaltung des Fusionsproteins vollständig und es konnte daher in der Kontrolle keine Bande auf Höhe des Fusionsproteins bei ~66 kD mehr beobachtet werden. Die 29 kD-Bande der TEV-Protease verschwand bei allen Ansätzen aus dem Überstand.

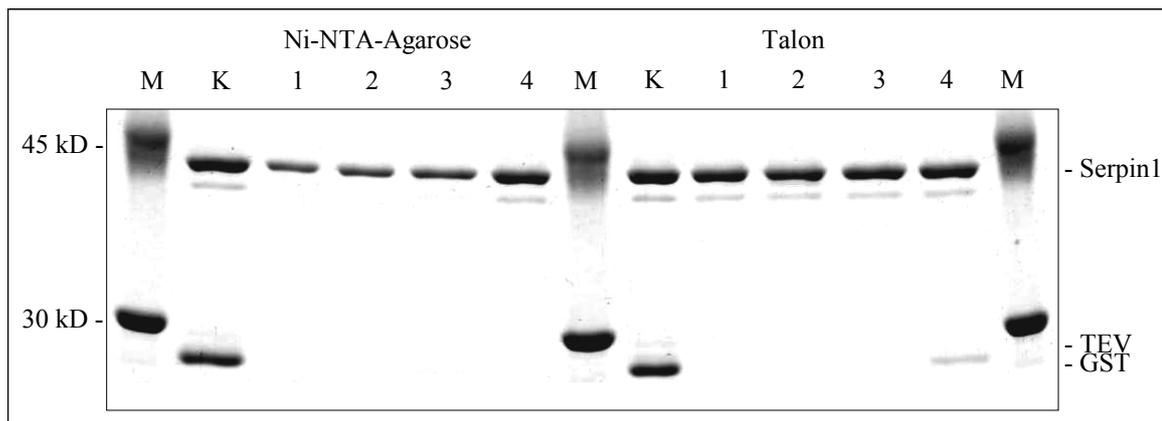


Abbildung 35: Versuch zur Entfernung der His₆-markierten GST und TEV-Protease
 Aufreinigungen im Batchverfahren mit verschiedenen Pufferzusätzen unter
 Verwendung von Ni-NTA-Agarose (linke Gelhälfte) und Talon (rechte Gelhälfte)
 Spur 1: FPLC-Elutionspuffer (EP); Spur 2: EP + 150 mM NaCl; Spur 3: EP + 0,1%
 PEG 8000; Spur 4: EP + 20 mM Imidazol; K: Kontrolle mit EP ohne
 Chromatografiematerial
 10%-SDS-Polyacrylamid-Gel; Coomassiefärbung; M: Größenmarker LMW

Die Proteinbanden von GST (28 kD) und Serpin1 (44 kD) wurden densitometrisch verglichen (C.2.3.4) und die Ergebnisse in Tabelle 16 u. 17 dargestellt. Als 100% wurde der Proteingehalt in der Kontrolle mit Elutionspuffer ohne Zusatz von Chromatografiematerial gesetzt.

Tabelle 16: Relative Serpin1-Menge (% der Kontrolle K) im Überstand

Proben-Nr.	1	2	3	4
Puffer	Elutionspuffer	Elutionspuffer + 150 mM NaCl	Elutionspuffer + 0,1% PEG 8000	Elutionspuffer + 20 mM Imidazol
Ni-NTA	36	41	53	81
TALON	94	95	96	100

Tabelle 17: Relative GST-Menge (% der Kontrolle K) im Überstand

Proben-Nr.	1	2	3	4
Puffer	Elutionspuffer	Elutionspuffer + 150 mM NaCl	Elutionspuffer + 0,1% PEG 8000	Elutionspuffer + 20 mM Imidazol
Ni-NTA	0	0	0	1
TALON	0	0	0	11

Die densitometrische Auswertung des Coomassie-gefärbten Gels zeigt bei der Verwendung von Ni-NTA-Agarose hohe Verluste an Serpin1 durch unspezifische Adsorption an das Chromatografiematerial. Bei Gebrauch des reinen Elutionspuffers verblieben nur 36% des eingesetzten Proteins in Lösung, d.h. fast 2/3 des Proteins gingen verloren. Der Zusatz von 150 mM NaCl konnte die unerwünschte Adsorption nur geringfügig reduzieren und verbesserte die Rückgewinnung um 5% auf 41%. Durch Einsatz von 0,1% PEG 8000 wurden immerhin 53% zurückbehalten, aber erst der Zusatz von 20 mM Imidazol ermöglichte die Gewinnung von 81% des eingesetzten Serpin1. Allerdings wurde durch das Imidazol auch die spezifische Bindung der His₆-markierten Proteine geschwächt, so dass GST nicht mehr vollständig aus der Lösung entfernt wurde und noch 1% im Überstand nachzuweisen waren (in Abb. 35 nicht zu erkennen).

Die Ausbeute an Serpin1 ist bei Einsatz von TALON deutlich höher als bei Ni-NTA-Agarose. Bereits bei Verwendung von Elutionspuffer wurde eine Ausbeute von 94% erzielt, die durch den Zusatz von NaCl bzw. PEG 8000 in den oben genannten Konzentrationen nur noch um maximal 2% verbessert werden konnte. 20 mM Imidazol ermöglichten die vollständige Unterdrückung von unspezifischer Adsorption und die Verluste an Serpin1 wurden komplett unterbunden. Jedoch kam es zur Verunreinigung mit nicht gebundener GST, von der sogar noch 11% der Ausgangsmenge nach Inkubation mit dem Chromatografiematerial im Überstand nachweisbar waren und zu einer gut sichtbaren Bande im Gel führten.

Bei beiden Ansätzen führte die Verwendung von 20 mM Imidazol zur Verringerung der Proteinbindung an das Chromatografiematerial, sowohl der spezifischen als auch der unspezifischen. Dieses führte zu einer unzureichenden Abreicherung der His₆-markierten Proteine und daher war Imidazol in dieser Konzentration als Pufferzusatz ungeeignet. Mit zusätzlichen 150 mM NaCl bzw. 0,1% PEG 8000 war keine zufriedenstellende Steigerung der Ausbeute möglich. Weiterhin konnten störende Einflüsse der Zusätze bei nachfolgenden Versuchen nicht ausgeschlossen werden und hätten daher weitergehende Aufreinigungsschritte (Umpufferung bzw. Dialyse) erfordert. Von der Zugabe dieser Substanzen wurde deshalb Abstand genommen. Die Möglichkeit der Verwendung von Elutionspuffer ohne Zusätze in Verbindung mit einer Rückgewinnungsrate von 94% zeigten die bessere Eignung des TALON-Chromatografiematerials gegenüber der Ni-NTA-Agarose. Daher wurde das TALON-Material bei allen weiteren Serpin1-Aufreinigungen zur Abreicherungen von GST und TEV-Protease nach Spaltung des Fusionsproteins eingesetzt.

D.5.6 Dialyse

Zur Entfernung des im Elutionspuffer enthaltenen Glutathions und eventuell vom Chromatografiematerial freigesetzter Metallionen wurde der Überstand einer Dialyse mit PBS-Puffer unterzogen (C.2.3.12). Dieser Dialyse-Schritt war nochmals mit Verlusten von 33% im Vergleich zum Proteingehalt nach der Aufreinigung mit Talon-Chromatografiematerial verbunden, wie ein densitometrischer Vergleich der Spuren 3 und 4 in Abbildung 36 ergab. Die Dialyse wurde aber als notwendig erachtet, da in Vorversuchen (Ergebnisse nicht gezeigt) festgestellt wurde, dass es bei Verwendung von Ni-NTA-Agarose zur Freisetzung von Ni^{2+} -Ionen kam. Diese führten zur Inaktivierung der in Inhibitionsexperimenten (C.2.3.8) eingesetzten Protease Thrombin. Die Aktivität des Thrombins ließ sich durch Zugabe von EDTA zur Entfernung der Metallionen wiederherstellen. Bei der Verwendung von Talon konnte die Inaktivierung von Thrombin nicht beobachtet werden. Ob von diesem Material keine Co^{2+} -Ionen freigesetzt wurden oder ob diese keinen Einfluss auf Thrombin hatten, kann an dieser Stelle nicht gesagt werden. In Abbildung 36 sind die Ergebnisse der einzelnen Teilschritte einer vollständigen Aufreinigung von Serpin1 dargestellt.

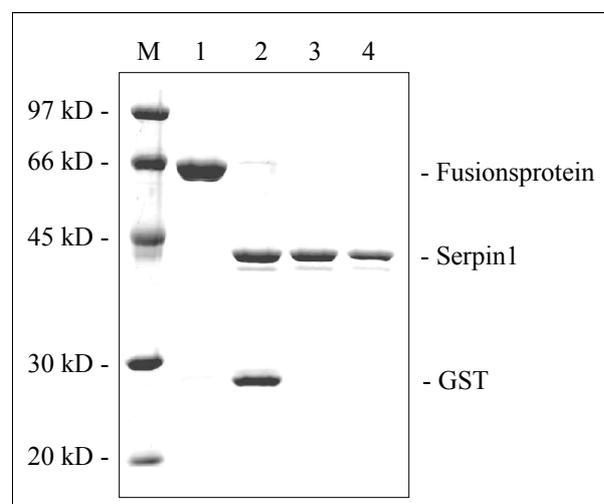


Abbildung 36: Darstellung der Teilergebnisse einer Serpin1-Aufreinigung

In Spur 1 ist die Fusionsproteinbande bei 66 kD nach FPLC-Aufreinigung zu erkennen (D.5.3). Spur 2 zeigt die weitgehend vollständige TEV-Protease-Spaltung des Fusionsproteins in Serpin1 (44 kD) und GST (28 kD) (D.5.4). Nach der Aufreinigung mit Talon-Chromatografiematerial (Spur 3) liegt das Serpin1 in reiner Form vor (D.5.5), woraufhin mittels Dialyse ein abschließender Pufferwechsel durchgeführt wurde (Spur 4) (D.5.6).

10%-SDS-Polyacrylamid-Gel; Coomassiefärbung; M: Größenmarker LMW

Das Serpin1 konnte durch die hier aufgezeigte Strategie erfolgreich aufgereinigt werden und stand somit für biochemische Tests zur Verfügung. Legt man die Ausbeute der durchgeführten Aufreinigung zu Grunde, so können aus 200 ml-Bakterienkultur ~2 mg Fusionsprotein (Summe der FPLC-Fractionen 2 - 9, Tab. 15) isoliert werden. Diese beinhalten einem Anteil von ~1,3 mg Serpin1. Nach Abspaltung und Reinigung verbliebe eine Ausbeute von ~770 µg rekombinantes Serpin1 pro 200 ml Bakterienkultur bzw. 3,8 mg/L. Die Ausbeute nach Aufreinigung beträgt etwa 60% des produzierten Serpin1.

D.6 Nachweis der biologischen Aktivität von rekombinantem Serpin1

Serpin1 von *Branchiostoma lanceolatum* weist, wie bereits in Abschnitt D.3 erläutert, in der reaktiven Schleife die typischen Aminosäuren inhibitorischer Serpine auf, wobei die Sequenzidentität der reaktiven Schleifen von Serpin1 und Antithrombin III ~74% beträgt (Abb. 21). Eine wichtige Zielprotease von Antithrombin III ist Thrombin (C.1.9.2.2), das vorwiegend Peptidbindungen zwischen den Aminosäureresten Arginin und Serin hydrolysiert, aus denen auch die reaktiven Zentren von Antithrombin III und dem hypothetischen Serinprotease-Inhibitor Serpin1 bestehen. Inhibitorische Serpine bilden mit ihren Zielproteasen SDS-stabile Komplexe, die im Westernblot detektiert werden können.¹

Zur Überprüfung, ob Serpin1 SDS-stabile Komplexe mit Thrombin bildet, wurde eine 3,9 µM Serpin1-Lösung im molaren Verhältnis von 14:1 mit Thrombin versetzt und bei 30°C inkubiert (C.2.3.8). Nach jeweils 0, 30, 60, 150, 300 und 450 min wurden Proben entnommen. Die Reaktionen wurden mit 2-fach konzentriertem Probenpuffer und Erhitzen auf 95°C für 5 min (C.2.3.1) abgestoppt. Die Proben wurden im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und ein Westernblot (C.2.3.6) mit einem Anti-Thrombin-Antiserum (C.1.10) durchgeführt (Abb. 37).

Gut war die Intensitätsabnahme der Thrombinbande (34 kD) im Verlauf der Inkubationskinetik zu erkennen. Nach Ablauf von 450 min war kein freies Thrombin mehr nachweisbar. Statt dessen erschien eine Bande bei ca. 72 kD, die den Komplex aus Thrombin und Serpin1 repräsentierte. Mit zunehmender Inkubationsdauer erschienen unterhalb des 72 kD-Komplexes zwei zusätzliche Banden von ~57 bzw. ~66 kD. Bei diesen handelte es sich vermutlich um Abbauprodukte des Komplexes durch Thrombinrestaktivität.

¹ Gettins, 2002

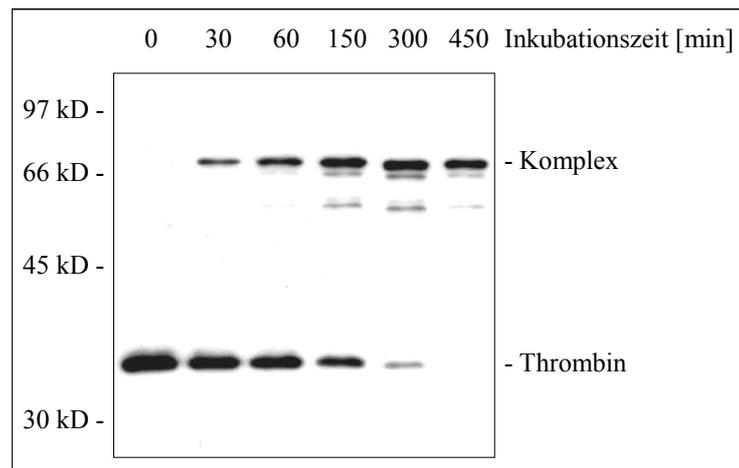


Abbildung 37: Bildung SDS-stabiler Komplexe zwischen Thrombin und Serpin1

Da für die Detektion ein Anti-Thrombin-Antiserum verwendet wurde, können Thrombin und seine Komplexe mit Serpin1 erkannt werden, nicht jedoch Serpin1.
10%-SDS-Polyacrylamid-Gel; Westernblot; Expositionszeit: 30 s

Durch dieses Experiment wurde demonstriert, dass in *E. coli* exprimiertes Serpin1 aus *B. lanceolatum* zumindest partiell biologisch aktiv ist und mit Thrombin-ähnlichen Proteasen SDS-stabile Komplexe bilden kann.

D.7 Charakterisierung von polyklonalen Antiseren gegen Serpin1

D.7.1 Auswahl der zu immunisierenden Kaninchen

Zur spezifischen Detektion von Serpin1 im Westernblot und in histologischen Schnitten mußten Antiseren hergestellt werden. Die Gewinnung der Antiseren wurde von der Firma „Pineda-Antikörperservice, Berlin“ durchgeführt. Als Antigen zur Immunisierung von Kaninchen wurde dem Unternehmen FPLC-gereinigtes GST-Serpin1-Fusionsprotein (D.5.3) zur Verfügung gestellt. Vor der Immunisierung wurden 3 Kaninchen ausgewählt, deren Präimmunsere im Westernblot (C.2.3.6) keine unspezifischen Kreuzreaktionen gegen Serpin1 und den in der Fusionsprotein-Produktion verwendeten Bakterienstamm *E. coli* BL21 (DE3) (C.1.6) aufzeigten. Zur Prüfung dienten 100 ng FPLC-gereinigtes Fusionsprotein und das Rohlysat einer *E. coli* BL21(DE3)-Kultur. Für das Rohlysat wurde das Pellet von 10 µl Bakterienkultur ($OD_{600} = 1$) 5 min in 20 µl 1-fach konzentriertem reduzierendem Auftrags-

puffer (C.2.3.1) aufgekocht. Das Lysat wurde 2 min zentrifugiert und 2 µl des Überstands im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Im anschließenden Westernblot wurden die Präimmunsere in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt.

75 Tage nach Injektion des Antigens wurden die Seren von 2 Kaninchen gewonnen. Einem der Tiere (Kaninchen Nr. 2) wurde nach 60 Tagen ein zweites Mal das Antigen injiziert und dessen Serum nach insgesamt 100 Tagen abgenommen.

D.7.2 Prüfung der polyklonalen Antiseren

Zum Nachweis der Spezifität der polyklonalen Antiseren gegen Serpin1 und Ermittlung der Nachweisgrenze wurden 5, 2,5, 1, 0,5 und 0,1 ng aufgereinigtes Serpin1 im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit den drei Antiseren im Westernblot detektiert (Abb. 38). Nach einem Vergleich verschiedener Antiserum-Verdünnungen (Ergebnisse nicht gezeigt) wurde eine Verdünnung von 1:10000 im Weiteren als Standard eingesetzt.

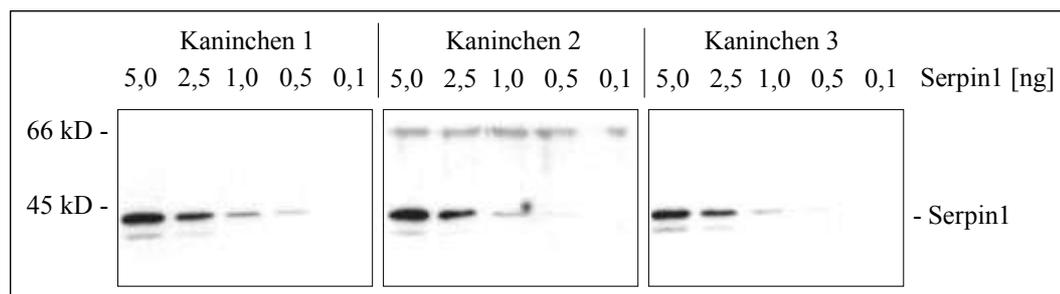


Abbildung 38: Nachweis der Spezifität und Ermittlung der Nachweisgrenze von Serpin1 mittels der Antiseren von 3 Kaninchen
10%-SDS-Polyacrylamid-Gel; Verdünnung der Antiseren jeweils 1:10000;
Expositionszeit 30 s; Größenmarker LMW

Nach einer Expositionszeit von 30 s konnte mit dem Serum von Kaninchen 1 eine Serpin1-Menge von 0,5 ng nachgewiesen werden, mit den anderen Seren 1 ng. Die Banden erschienen als Doppelbanden (~44 kD bzw. ~42 kD), bedingt durch die intakte und die C-terminal degradierte Form von Serpin1 (D.5.3). Bei dem Serum von Kaninchen 2 war eine Artefaktbande bei ca. 65 kD zu erkennen, die beim Serum von Kaninchen 3 nach 300 s

Belichtungszeit ebenfalls auftrat. Das Auftreten der Artefaktbande ist ein bekanntes Phänomen, aber die Ursache ist bisher unklar.¹

Es wurde geprüft, ob mit den Antiseren auch Serpin1-Komplexe mit Thrombin nachzuweisen sind. Dazu wurden Komplexierungsreaktionen von Serpin1 bzw. FPLC-gereinigtem GST-Serpin1-Fusionsprotein mit Thrombin in einem molaren Verhältnis von 14:1 bei 30°C und 450 min Inkubationsdauer durchgeführt (C.2.3.8) und die Detektion wie oben beschrieben vorgenommen (Abb. 39).

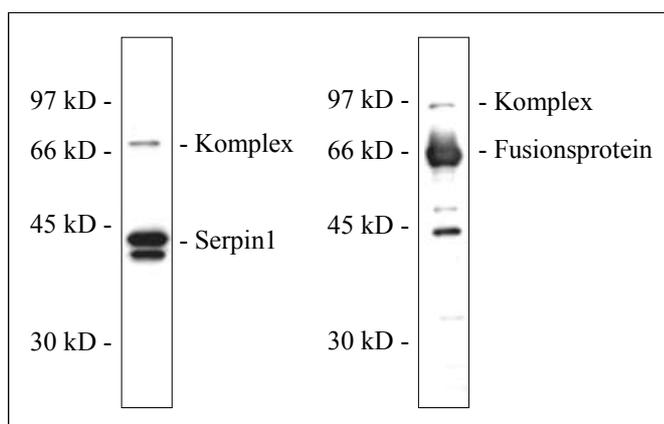


Abbildung 39: Nachweis von gereinigtem Serpin1 bzw. GST-Serpin1-Fusionsprotein und der Thrombinkomplexe mit dem Antiserum von Kaninchen 1

Komplexierungsreaktionen von Serpin1 (linkes Bild) bzw. Fusionsprotein (rechtes Bild) mit Thrombin

10%-SDS-Polyacrylamid-Gel, Größenmarker LMW, Expositionsdauer: 30 s

Mit allen drei Antiseren konnten aufgereinigtes Serpin1 (~44 kD), GST-Serpin1-Fusionsprotein (~66 kD) und die jeweiligen Komplexe mit Thrombin (~75 kD bzw. ~97 kD) nachgewiesen werden, wobei die Seren aller 3 Tiere in ihrer Spezifität keine deutlichen Unterschiede erkennen ließen (Ergebnisse der Kaninchen 2 u. 3 nicht gezeigt). In der Probe mit dem Fusionsprotein (rechtes Bild) konnten mehrere Banden unterhalb des Fusionsproteins beobachtet werden. Diese waren bei Verwendung von Präimmunsrum nicht detektiert worden und auch in der Coomassiefärbung der Blotmembran nicht nachweisbar (Ergebnisse nicht gezeigt). Möglicherweise handelte es sich hierbei um Abbauprodukte des Fusionsproteins durch Thrombinrestaktivität.

¹ Hashimoto *et al.*, 1983; Hengen, 1996

Die Coomassie-gefärbten Membranen zeigten in den Spuren mit *B. lanceolatum*-Extrakt (Spuren 2 u. 3) erwartungsgemäß einen Proteinschmier über den gesamten Molekulargewichtsbereich mit 2 stark überwiegender Banden von ~43 kD und ~50 kD. Dass der immunologische Nachweis von rekombinantem Serpin1 (44 kD-Bande) prinzipiell auch im Proteingemisch des Gesamtextrakts möglich ist, ist in Spur 2 gezeigt. Die Verstärkung des Signals von Serpin1 in der Probe mit dem Extrakt (Spur 2) im Vergleich zu reinem Serpin1 (Spur 1) kann auf einen Schutzeffekt des Proteingemisches gegenüber Abbau oder Adhäsion an die Wand der Reaktionsgefäße zurückgeführt werden. Von allen Antiseren wird in den Proben mit Gesamtextrakt (Spuren 2 u. 3) eine markante Doppelbande mit einem Molekulargewicht von ~62 kD (± 1 kD) nachgewiesen. Hierbei handelt es sich allen Anscheins nach um das endogene Serpin1 von *B. lanceolatum*, das möglicherweise auf Grund unterschiedlicher Glykosylierungen, anderer Modifikationen bzw. partiellen Abbaus in 2 Varianten auftritt. Die Doppelbande von ~97 kD, die nur bei Verwendung des Antiserums von Kaninchen 1 auftritt, repräsentiert möglicherweise einen Komplex zwischen dem endogenen Serpin1 und einer Zielprotease.

Die Banden bei ~43 kD und ~50 kD im Westernblot beruhen auf unspezifischen Kreuzreaktionen mit den starken Proteinbanden des *B. lanceolatum*-Extrakts. Der Ursprung der Bande mit ~27 kD Molekulargewicht bei Kaninchen 1 ist nicht bekannt.

D.9 Versuche zur Serpin1-Lokalisation in *Branchiostoma lanceolatum*-Dünnschnitten

Zur immunhistologischen Lokalisation von Serpin1 im Gewebe von *B. lanceolatum* wurden histologische Quer- und Längsschnitte eines adulten Tieres angefertigt. Die Fixierung des Präparates erfolgte durch Einfrieren in -198°C kaltem Propan und die Ausführung der Schnitte mit einem Gefriermikrotom bei -25°C (C.2.4.2.1). Die Schnitte wurden auf einem Objektträger platziert und mit 1%-iger BSA-Lösung blockiert. Nach Inkubation mit den Antiseren von Kaninchen 1 - 3 und TRITC-markiertem Sekundärantikörper (C.1.10) wurden die Präparate dauerhaft versiegelt (C.2.4.2.2) und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Dokumentiert wurden die Aufnahmen mit einer „Nikon Coolpix 990“-Digitalkamera (C.2.4.2.3). Die Bestimmung der unspezifischen Immunreaktion geschah

durch Verwendung der jeweiligen Präimmunseren anstelle der Antiseren, sowie einer Detektionsreaktion nur unter Verwendung des markierten Sekundärantikörpers.

Die Verwendung der Präimmunseren führte zu einer weitgehend gleichmäßig schwachen unspezifischen Anfärbung des gesamten Gewebeschnitts (Abb. 41, mittig). Verstärkt treten Epidermis und Chorda hervor. Die spezifischen Antiseren führen insgesamt zu einer verstärkten Färbung (Abb. 41, links), aber es konnten keine Organe oder Strukturen identifiziert werden, die im Vergleich zur Kontrolle mit den Präimmunseren eine deutlich intensivere Markierung aufwiesen. Der Hintergrund durch unspezifische Bindung des markierten Sekundärantikörpers ist vernachlässigbar (Abb. 41, rechts). Alle drei verwendeten Antiseren verhielten sich in der Immunhistologie ähnlich, so dass an dieser Stelle exemplarisch nur die Ergebnisse mit dem Antiserum von Kaninchen 1 gezeigt werden. Die Ergebnisse wurden durch die Untersuchungen an den Längsschnitten von *B. lanceolatum* bestätigt. Mittels immunhistologischer Detektion konnte Serpin1 somit in keinem Organ oder Gewebestruktur spezifisch lokalisiert werden. Die Ergebnisse deuten vielmehr auf ein ubiquitäres Auftreten des Proteins hin. Es muß aber berücksichtigt werden, dass in allen sonstigen Experimenten denaturiertes Serpin1 verwendet wurde. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die Antiseren nicht mit nativem Serpin1 reagieren.

Die immunhistologischen Arbeiten wurden am Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie unter Betreuung von Herrn Dr. Heimann und Frau Piwek durchgeführt.

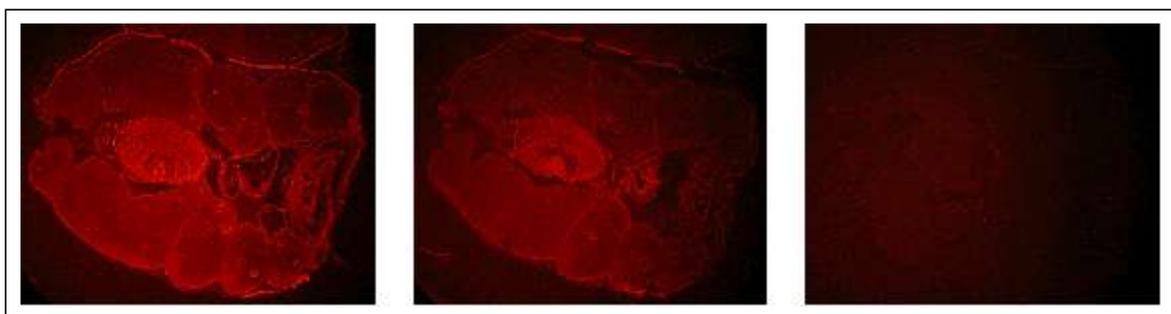


Abbildung 41: Versuche zur immunhistologischen Lokalisation von Serpin1 in Querschnitten von *Branchiostoma lanceolatum*

Das linke Bild zeigt exemplarisch eine Färbung mit dem Serpin1-spezifischen Antiserum von Tier 1. Die beiden anderen Bilder zeigen Negativkontrollen mit dem Präimmunserum bzw. alleiniger Verwendung des TRITC-markierten Sekundärantikörpers. Auf Grund der gewählten Vergrößerung war keine gleichmäßige Ausleuchtung des Präparates gewährleistet. Besonders zum rechten Rand hin lässt die Lichtstärke nach und die Objekte erscheinen hier unverhältnismäßig dunkel.

E Diskussion

Das folgende Kapitel behandelt zunächst die Isolierung der cDNA von Serpin1 aus *Branchiostoma lanceolatum* (E.1), sowie die Bewertung der cDNA- (E.1) und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen (E.4). Des Weiteren werden das Auftreten mehrerer Polyadenylierungs-Varianten (E.2), ein neues potentielles Polyadenylierungssignal (E.3) und ein zweites cDNA-Fragment mit hoher Ähnlichkeit zu Serpin1 (E.2 - E.4) diskutiert.

In den folgenden Abschnitten wird auf die rekombinante Expression von Serpin1 (E.6), den Nachweis der biologischen Aktivität (E.7) und die Gewinnung von Antiseren (E.8) eingegangen. Weitere Punkte sind die Identifizierung des endogenen Serpin1 aus *B. lanceolatum* und eines möglichen Komplexes mit einer Zielprotease (E.9), wie auch Versuche zur Lokalisation von Serpin1 in Gewebeschnitten (E.10).

E.1 Isolierung und Identifizierung der cDNA von Serpin1

In der vorliegenden Arbeit wurde die vollständige Sequenz der cDNA von Serpin1, einem Serinprotease-Inhibitor aus der Serpin-Familie, von *B. lanceolatum* ermittelt. Die Amplifizierung der cDNA erfolgte mittels *Pfu*-Polymerase, die über eine korrekturlesende 3'→5'-Exonuklease-Aktivität verfügt, wodurch die Qualität der erhaltenen Sequenzen gewährleistet wurde. Mit anderen Polymerasen wurden keine Amplifikate erhalten, auch nicht mit dem aus eigener Erfahrung zuverlässig arbeitenden Klen- / *Pfu*-Polymerase-Mix. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich im 3'-UTR-Bereich zu suchen, da PCR-Amplifikationen des kodierenden Bereichs mit allen Polymerasen erfolgreich waren (D.1.4). Die Ursachen für die Schwierigkeiten könnten der geringe GC-Gehalt des 3'-UTR-Bereichs, wie auch schwierige Sekundärstrukturen sein, die zum Ablösen bzw. zum Stoppen der Polymerasen führen. Die Amplifikation des 5'-Bereichs über, mittels RLM-RACE erzeugter cDNA (C.2.1.5) erforderte 2 aufeinander folgende PCR-Reaktionen (D.2.3). Dies kann auf die niedrige Zahl an Matrizen-mRNAs zurückgeführt werden, da sowohl die Isolierung der Matrizen-mRNAs aus tierischem Gewebe, wie auch die Kopplung der RNA-Oligos in der RLM-RACE in mehrstufigen Prozessen erfolgten. So waren die Fällungs- und Waschschriffe, sowie die Kopplungsreaktion mit Einbußen an Ausgangsmaterial verbunden. Diese Annahme wird dadurch bestärkt, dass auch für die Kontroll-PCR zur Amplifikation des 5'-Bereichs der cDNA von Calmodulin 2 eine Reamplifikation erforderlich war (D.2.2). Bei der

Vervielfältigung des 3'-Bereichs war dies nicht notwendig, da die cDNA hier in einer herkömmlichen RT-PCR (C.2.1.4) ohne Fällungs- und Waschschriffe hergestellt werden konnten. Es wurden die 5'- und 3'-Bereiche der cDNA von Serpin1 amplifiziert, deren Sequenzen eine Überlappung von mehr als 100 Nukleotiden aufweisen (Ergebnis nicht gezeigt). Die zusätzliche Amplifikation des vollständigen kodierenden Bereichs als ununterbrochenes DNA-Fragment (D.2.6) bestätigte die ermittelte Sequenz.

Bei zukünftigen Versuchen zur Amplifikation der cDNA weiterer Serpine empfiehlt es sich zur Gewährleistung einer ausreichenden Menge an Ausgangsmaterial, die Effizienz der mRNA-Isolierung durch Verwendung leistungsfähigerer Isolationssysteme zu steigern bzw. Gesamt-RNA einzusetzen, sowie verschiedene DNA-Polymerasen zu testen.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind in Literatur und Sequenz-Datenbanken keine Angaben über Serpine von *B. lanceolatum* oder anderen Mitgliedern aus der Familie der *Branchiostomidae* zu finden. Es handelt sich daher mit Serpin1 um die Erstbeschreibung eines Proteins dieser Familie in diesem Organismus. Ein Vergleich der Serpin1-cDNA-Sequenz mit bereits bekannten Nukleotidsequenzen aus der BLAST-Datenbank¹ erbringt nur geringe Ähnlichkeiten. Lediglich eine kurze Region von Position 1133 bis 1181 weist 90% Sequenzähnlichkeit zu Serpinen höherer Vertebrata, wie *Xenopus laevis* (Krallenfrosch) oder *Rattus norvegicus* (Wanderratte) (D.3.1) auf. Diese Sequenz kodiert für einen hoch konservierten Bereich innerhalb der Aminosäuresequenz von Serpinen, der sogenannten „breach“-Region.² Die „breach“-Region bildet den Übergang von Faltblatt s5A zur reaktiven Schleife (Abb. 3). Sie ist verantwortlich für die Exposition der Schleife und ermöglicht dieser auch die nötige räumliche Umlagerung zur Insertion in Faltblatt s5. Die Insertion ist essentiell für die inhibitorische Funktion eines Serpins, worauf die hohe Konservierung dieser Region zurückgeführt werden kann. Ergänzend kommt hinzu, dass über die Hälfte der hier befindlichen Aminosäuren durch jeweils nur 2 Nukleotidtripletts kodiert werden können und somit die Variationsmöglichkeiten zur Kodierung dieser Aminosäuresequenz auf DNA-Ebene stark eingeschränkt sind.

1 RPN-Blast, v 2.2.8, 05.01.2004, Database: ccd v1.65; Altschul *et al.*, 1997; Marchler-Bauer *et al.*, 2003

2 Irving *et al.*, 2000

E.2 Polyadenylierungs-Varianten der Serpin1-cDNA

Die Analyse der Serpin1-cDNA (in dieser Arbeit auch bezeichnet als Gruppe b) zeigten 3 alternative Polyadenylierungspositionen (repräsentiert in den Inserts von pUT9, pUT10b und pUT11; Abb. 15). Stromaufwärts fanden sich Polyadenylierungssignale, die allerdings von der klassischen „aataaa“- bzw. „aattaa“-Sequenz¹ an jeweils einer Position abweichen (Tab. 12). Sheets *et al.*² zeigten, dass die Effizienz der Transkriptionstermination, wie auch Spaltung und Polyadenylierung der prä-mRNA im Zusammenhang mit der Sequenz und damit zur Stärke des Polyadenylierungssignals stehen. Entspricht das Signal nicht der optimalen Nukleotidabfolge, so erfolgt die Termination und das Ablösen der RNA-Polymerase II mit geringerer Wahrscheinlichkeit. Das Signal wird unter Umständen überlesen und die Synthese der prä-mRNA weiter stromabwärts terminiert (s. Thalassämien³, B.3).

Neben der cDNA von Serpin1 wurde der 3'-Bereich einer weiteren cDNA (bezeichnet als Gruppe a) isoliert, die eine sehr große Sequenzähnlichkeit (~94%) mit Serpin1 aufweist (D.4). Auch bei der unvollständigen cDNA von Gruppe a wurden 2 alternative Polyadenylierungspositionen festgestellt (repräsentiert durch die Inserts von pUT12 und pUT10a; Abb. 15), die aber möglicherweise auf ein gemeinsames Polyadenylierungssignal (Abb. 26) zurückgeführt werden können. Von den in dieser Arbeit behandelten Polyadenylierungssignalen entspricht allein dieses der klassischen „aataaa“-Sequenz (Tab. 12). Die Polyadenylierung beginnt 14 (pUT12) bzw. 31 (pUT10a) Nukleotide weiter stromabwärts des Signals. Sowohl beim Insert von pUT12 (Gruppe a), als auch bei dem von pUT10b (Gruppe b), beginnt die Polyadenylierung an einem „cc“-Motiv an Stelle einer „ca“-Sequenz. Dass hier trotzdem die Spaltung und Polyadenylierung der prä-mRNA erfolgen, liegt möglicherweise am Einfluss eines „cattt(a/c)ttt“-Elements, das im folgenden Abschnitt diskutiert wird. Bei der längeren Variante der cDNA von Gruppe a (pUT10a) beginnt die Polyadenylierung an einem ungewöhnlichen „ta“-Motiv. Die Mengen der entsprechenden PCR-Amplifikate legen nahe, dass die cDNA des Inserts von pUT10a in deutlich geringerem Maße vorliegt als die des Inserts von pUT12. Unter Umständen wird in einigen Fällen das suboptimale „cc“-Motiv überlesen und die Polyadenylierung statt dessen am späteren „ta“-Motiv initiiert.

1 MacDonald & Redondo, 2002

2 Sheets *et al.*, 1990

3 Higgs *et al.*, 1983; Orkin *et al.*, 1985; Higgs *et al.*, 1989

Das Auftreten alternativer Polyadenylierungssignale ist bereits beim human „Monozyten / neutrophiler Elastaseinhibitor“ (NEI), einem Serpin der Ovalbuminfamilie, beschrieben worden.¹ Die 3 postulierten Polyadenylierungssignale des NEI-Gens² entsprechen aber alle den klassischen „aataaa“- bzw. „aattaa“-Sequenzen. Die Nutzung der ersten beiden alternativen Varianten konnte durch Isolation der zugehörigen cDNA experimentell bestätigt werden. Auch beim Serpingen SPN6 von *Drosophila melanogaster* konnten mehrere potentielle Polyadenylierungssignale mit klassischer Sequenz beobachtet werden.³ Ob diese allerdings Verwendung finden, bedarf noch der Klärung.

Die physiologische Bedeutung der 3 alternativen Polyadenylierungs-Signale der Serpin1-mRNA (Gruppe b) ist unklar. Da die mRNA aus einem kompletten Tier isoliert wurde, könnte es sich auch um gewebespezifische Transkripte handeln, die möglicherweise von Bedeutung für die physiologische Funktion von Serpin1 durch z.B. unterschiedliche Halbwertszeiten der jeweiligen mRNA sind. Der Einfluss verschieden langer 3'-UTRs auf die Lebensdauer von mRNAs konnte bereits an den Beispielen der mRNAs für das „cAMP response element modulator gene“⁴ und das „high-glucose-regulated gene“⁵ gezeigt werden. In diesen Fällen finden sich bei den längeren mRNA-Varianten so genannte ARE-Sequenzen⁶ (mehrfache Wiederholungen von „attta“-Motiven) in den 3'-terminalen Bereichen der 3'-UTRs, die zu einer schnellen Degradierung der mRNA führen. Bei den in dieser Arbeit ermittelten cDNA-Sequenzen konnten jedoch keine ARE-Elemente festgestellt werden.

E.3 Das „cattt(a/c)ttt“-Element

Die Spaltung von prä-mRNA und das Anfügen der Poly(A)-Sequenz erfolgen etwa 12 - 30 Nukleotide stromabwärts des Polyadenylierungssignals an einen „ca“-Motiv auf das direkt eine g/u-reiche Region folgt (s. B.3).⁷ Die Sequenzdaten der cDNA von Serpin1 (Gruppe b) lassen jeweils 11 - 13 Nukleotide 3'-terminal der ersten beiden Polyadenylierungspositionen ein „catttttt“- bzw. „catttattt“-Element erkennen (G.2). Ein derartiges „cattt(a/c)ttt“-Motiv als

1 Zeng *et al.*, 1998

2 NEI-chrDNA: GenBank accession no: AF053630

3 O. Krüger, persönliche Mitteilung

4 Lee *et al.*, 1995

5 Abdel Wahab *et al.*, 1998

6 Caput *et al.*, 1986; Shaw & Kamen, 1986; Bevilacqua *et al.*, 2003

7 Proudfoot, 2001

mögliches Funktionselement bei der Polyadenylierung wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben. Zur Sequenz der prä-mRNA nach der dritten Polyadenylierungsposition liegen keine Daten vor, da die chromosomale Sequenz nicht bekannt ist.

Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt, erfolgt in den Fällen der Inserts von pUT12 (Gruppe a) und pUT10b (Gruppe b) die Polyadenylierung an einem nicht optimalen „cc“-Motiv an Stelle einer „ca“-Sequenz. Bei dem Insert von pUT10b wurde ein „catttattt“-Element 13 Nukleotide stromabwärts der Polyadenylierungsposition identifiziert (s. o.) und bei pUT12 eine „cattta“-Sequenz im gleichen Abstand. Ob diese Sequenz das Fragment eines vollständigen „catttattt“-Elements darstellt, kann auf Grund fehlender chromosomaler Sequenzdaten nicht festgestellt werden. Bei beiden Inserts hat das Element möglicherweise Einfluss auf den Prozess der Polyadenylierung und es kommt trotz des abweichenden „cc“-Motivs zur Spaltung der prä-mRNA und zum Anhängen der Poly(A)-Sequenz. Ob die Polyadenylierung am ungewöhnlichen „ta“-Motiv des Inserts von pUT10a (Gruppe a) ebenfalls durch ein „cattt(a/c)ttt“-Element beeinflusst wird, könnte auch hier mit Hilfe der Gensequenzen beantwortet werden.

Zur Erweiterung des Datenumfangs wurde daraufhin eine Analyse der NEI-Gensequenz¹ durchgeführt und ein „catttcttt“-Element 8 Nukleotide stromabwärts der ersten Polyadenylierungsposition identifiziert. Nach der zweiten Polyadenylierungsposition folgt im Abstand von etwa 9 - 21 Nukleotiden ein Bereich aus mehreren aufeinanderfolgenden Blöcken von 2 - 3 Thyminresten, die jeweils durch eine anderes Nukleotid getrennt sind. Ob dieser Bereich eine „einfache“ g/u-reiche Region darstellt oder möglicherweise die gleiche Funktion wie das „cattt(a/c)ttt“-Element erfüllen, kann nicht gesagt werden. Stromabwärts der dritten potentiellen Polyadenylierungsposition konnte kein derartiges Motiv erkannt werden. Von dieser Variante konnte auch keine entsprechende cDNA isoliert werden (s. E.2)², was darauf hindeutet, dass an dieser Position die Polyadenylierung unterbleibt. Möglicherweise ist das Fehlen eines „cattt(a/c)ttt“-Elements hierfür die Ursache.

Auf Grund der vorliegenden Hinweise zum hypothetischen Einfluss des „cattt(a/c)ttt“-Elements auf die Polyadenylierung stellt sich die Frage, ob diese Sequenz möglicherweise zusätzlich bzw. anstatt der g/u-reichen Region durch den Polyadenylierungsfaktor CstF oder einen bisher unbekanntem Faktor - zumindest bei *B. lanceolatum* - erkannt wird und das

1 NEI-chrDNA: GenBank accession no: AF053630

2 Zeng *et al.*, 1998

Modell der Polyadenylierung um diesen Aspekt erweitert werden kann. Die Bedeutung dieses Elements müsste durch entsprechende Versuche, wie z.B. zum Einfluss von Mutationen auf die Menge an synthetisierter mRNA in Echtzeit-PCR oder Northernblotanalysen, untermauert werden.

E.4 Analyse der Aminosäuresequenz

Aus der isolierten Serpin1-cDNA wurde eine Proteinsequenz von 407 Aminosäuren abgeleitet (D.3.2). Durch einen computerunterstützten Vergleich konservierter Domänen konnte das Protein ab Aminosäureposition 23 der Serpin-Familie zugeordnet werden. Des Weiteren konnte die Serpinsignatur - eine für Serpine charakteristische Abfolge von 11 Aminosäuren, die C-terminal der reaktiven Schleife lokalisiert ist - identifiziert werden. Auch ein Datenbankabgleich mit bekannten Proteinsequenzen stützt die Zuordnung zur Serpinfamilie, da Sequenzähnlichkeiten von bis zu 47% zu Serpinen höherer Vertebrata auftraten. Der Bereich der reaktiven Schleife (P17 - P2') zeigt eine große Ähnlichkeit mit den entsprechenden Sequenzen von Antithrombin III aus verschiedenen Vertebrata (Abb. 21). Diese Region stimmt in beiden Proteinen zu ~74% überein, wobei insbesondere die für den Wirkmechanismus entscheidenden Positionen des Gelenks (P15 - P10), sowie die Positionen P1 und P1' des reaktiven Zentrums identisch sind. Eine markante Differenz zwischen Serpin1 und den ATIII-Sequenzen zeigt sich in den Positionen P5 - P2. An den Positionen P4 und P3 finden sich bei Serpin1 2 Methioninreste, die bei keiner der ATIII-Varianten auftreten. Methioninreste an diesen Positionen sind aber grundsätzlich nicht ungewöhnlich bei Serpinen, wie Datenbankanalysen zeigen. Sie finden sich unter anderem auch beim humanen plazentalen Thrombin-Inhibitor (SerpinB6 oder PI6)¹, einem Serpin aus der Ovalbuminfamilie. Die Oxidation von Methioninresten im Bereich des reaktiven Zentrums wird als Möglichkeit zur Regulation der Serpinaktivität diskutiert. So konnte für α_1 -Antitrypsins gezeigt werden, dass die Oxidation des Methioninrests an der P1-Position die Aktivität um den Faktor 2000 reduziert.²

Computeranalysen der Aminosäuresequenz weisen die Aminosäurepositionen 1 - 22 als potielles Signalpeptid mit der zugehörigen Signalpeptidase-Spaltstelle zwischen den Positionen 22 und 23 aus. Interessant ist die endoplasmatische Rückführungssequenz mit den

1 Coughlin *et al.*, 1993

2 Beatty *et al.*, 1980

Aminosäuren „KDEL“ am C-Terminus von Serpin1. Bisher konnten nur wenige Serpine identifiziert werden, die ebenfalls dieses Merkmal aufweisen. Von denen ist HSP47, das als Chaperon an der Prozessierung von Collagen beteiligt ist, am besten charakterisiert.¹ Die Lokalisation von HSP47 im ER und die Rückführungsfunktion der C-terminalen „RDEL“-Sequenz konnten von Satoh *et al.*² nachgewiesen werden. Andere bisher beschriebene Serpine mit ER-Rückführungssignalen stammen aus *Branchiostoma lanceolatum* (Bl-SPN2, KDEL)³, *Ciona intestinalis* (Ci-Spn-10B, HDEL)⁴, *Drosophila melanogaster* (Dm-Spn4, HDEL)⁵ und *Anopheles gambiae* (Ag-SRPN10A, HEEL)⁶. Die Funktionen dieser Serpine sind bisher noch unklar.

Das bereits oben erwähnte 3'-terminale cDNA-Fragment der Gruppe a mit einem unvollständigen kodierenden Bereich weist eine Nukleotidsequenz-Ähnlichkeit von ~94% zu Serpin1 auf (D.4.1). Auffällig ist die Häufung der Nukleotiddifferenzen im Bereich der reaktiven Schleife, insbesondere an den Positionen P15 - P9 des Gelenks bzw. P1 - P3' des reaktiven Zentrums. An diesen Positionen unterscheiden sich 5 von 7 bzw. alle 4 Kodons in jeweils der dritten Position des Triplets. Augenscheinlich handelt es sich hier um einen „hot spot“ für Mutationen, der auch bei Serpinen von Maus, Ratte⁷ und *Ciona intestinalis*⁸ beobachtet wurde. Im Gegensatz zu den Genen dieser Organismen treten bei den beiden potentiellen Serpin1-Gruppen von *B. lanceolatum* keine Änderungen der Aminosäuresequenz auf.

Die Unterschiede zwischen den beiden Serpin1-Sequenzgruppen haben 6 Differenzen innerhalb der alignierten 179 Aminosäuren zur Folge (D.4.1), was einem Anteil von ~3% entspricht. Die Differenzen wurden den entsprechenden Positionen und Strukturen im Modell der Tertiärstruktur von Serpin1 zugeordnet (Tab. 10) und die strukturellen Auswirkungen abgeschätzt. Die Differenzen in den Positionen 242(V/I), 256(F/L), 260(D/E), 276(L/I) und 336(N/S) sind konservativer Natur, so dass nur geringe Effekte auf die Tertiärstruktur und

1 Hendershot & Bulleid, 2000

2 Satoh *et al.*, 1996

3 O. Krüger, unveröffentlichte Daten

4 Krüger, 2003

5 Han *et al.*, 2000; Krüger, 2003

6 Danielli *et al.*, 2003

7 Hill & Hastie, 1987

8 Krüger, 2003

somit die Funktion zu erwarten wären. Interessanter in dieser Hinsicht ist Position 236(K/E), wo ein Lysin- gegen einen Glutamatrest ausgetauscht ist.

Es muss aber berücksichtigt werden, dass die Aminosäuresequenz der Gruppe a nicht vollständig vorliegt und damit keine verlässlichen Aussagen hinsichtlich Aufbau und Funktion des resultierenden Proteins gemacht werden können.

Bei den beiden cDNAs handelt es sich auf Grund der deutlichen Differenzen im kodierenden und 3'-UTR-Bereich wahrscheinlich nicht um Allele eines Gens. Sie kodieren für 2 Proteine, die im bekannten Bereich zu ~97% identisch sind. Unter der Voraussetzung, dass der fehlende 5'-Bereich von Gruppe a eine vergleichbare Sequenzähnlichkeit besitzt und für eine intakte cDNA kodiert, handelt es sich vermutlich um 2 erst kürzlich verdoppelte Genkopien. Auch vom humanen „squamous cell carcinoma antigen“ sind 2 Gene (SCCA1 und SCCA2) mit einer Ähnlichkeit von ~92% auf Aminosäureebene bekannt¹, deren Genprodukte sich aber in ihrer Proteasespezifität unterscheiden.

E.5 Versuche zur phylogenetischen Einordnung

Eine phylogenetische Einordnung der Serpin1-Aminosäuresequenz auf Basis des Serpin-Interspeziesbaums von O. Krüger² zeigt eine Verwandtschaft zum humanen Plasminogenaktivator-Inhibitor 2 (PAI2; Ovalbumin-Familie) auf, der zusammen mit den Serpinen Spn-6, Spn-7 und Spn-8 von *Ciona intestinalis* eine gesonderte Gruppe bildet (Ergebnisse nicht gezeigt). Eine Bewertung der Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb dieser Gruppe erweist sich als schwierig, da die mit verschiedenen Baumrekonstruktionsverfahren erhaltenen Unterstützungswerte deutlich voneinander abweichen (86% - 38%).² Die Gruppierung kann auch nicht mit Hilfe der Genstrukturen unterstützt werden, da sich die oben genannten *C. intestinalis*-Serpine durch das Fehlen von Introns auszeichnen. Zur Exon / Intronstruktur, wie auch der chromosomalen Kolokalisation von Serpin1 mit anderen Serpingenen in *B. lanceolatum* liegen keine Daten vor, weshalb auch auf eine Klassifizierung nach Irving *et al.*³ verzichtet wurde.

1 Silverman *et al.*, 1998

2 Krüger, 2003

3 Irving *et al.*, 2000

Zur Ermittlung diagnostischer Aminosäurepositionen nach Ragg *et al.*¹ wurde ein Alignment mit Vertretern aller Serpine durchgeführt und die diagnostischen Positionen verglichen (Ergebnisse nicht gezeigt). Nur der Serinrest an Position 267 von Serpin1 entspricht einer diagnostischen Aminosäure (Position 261 in der oben angeführten Literatur) von Serpinen der Gruppe 3. Da Gruppe 3-Serpine aber durch insgesamt 6 diagnostische Aminosäurepositionen charakterisiert sind, kann diese eine Übereinstimmung nicht als überzeugend gelten. Eine phylogenetische Einordnung von Serpin1 ist somit auf Grundlage der vorliegenden Daten nicht möglich.

Aus der ermittelten Nukleotid-Sequenz von Serpin1 ergeben sich dennoch wertvolle Hinweise bezüglich der Evolution der Serpinfamilie bei den Chordata. In der Proteinsequenz finden sich an den Positionen 55 und 58 zwei Serinreste (G.1), die innerhalb der Serpinfamilie hoch konserviert sind. In der Vergleichssequenz des α_1 -Antitrypsins handelt es sich um die Positionen 53 bzw. 56. Krem und Di Cera² erkannten bei Sequenzvergleichen eine Dichotomie der für diese Aminosäuren verwendeten Kodons. Sie stellten fest, dass die Verwendung zweier unterschiedlicher Kodonvarianten mit der Aufspaltung des Stammbaums in Protostomata (z.B. Insekten und Krebse) und Deuterostomata (z.B. Chordata) korreliert. Die meisten Protostomata verwenden für das Serin an Position 58 das Kodon „tcn“, Chordata dagegen „agy“ (n = beliebiges Nukleotid; y = c oder t). Der entwicklungsgeschichtlich am frühesten abgespaltene aller untersuchten Chordata war *Petromyzon* (Neunauge). *Petromyzon* gehört zu den Agnatha (Kieferlosen) und gilt als einer der ursprünglichsten Vertebrata. Auch bei Serpin1 von *B. lanceolatum* wird das Serin an Position 58 durch „agt“ kodiert. *B. lanceolatum*, ein Vertreter der Acrania (Schädellose), ist als Cephalochordat evolutionär älter als der Vertebrat *Petromyzon* und erweitert den Nachweis der „agy“-Kodonnutzung beim konservierten Serin an Position 58 als Marker der Aufspaltung von Protostomata und Deuterostomata, von den Vertebrata auf die Cephalochordata. Die These von Krem und Di Cera² konnte somit mit den Ergebnissen dieser Arbeit bestätigt und in ihrer Aussage erweitert werden.

1 Ragg *et al.*, 2001

2 Krem & Di Cera, 2003

E.6 Expression von GST-Serpin1-Fusionsprotein und Aufreinigung von Serpin1

In der vorliegenden Arbeit wurde Serpin1 als GST-Fusionsprotein rekombinant in *E. coli* exprimiert und eine Aufreinigungsstrategie für Serpin1 nach Abspaltung des GST-Anteils entwickelt.

Die Expression von Serpinen als Fusionsprotein in *E. coli* wurde bereits erfolgreich durchgeführt, worüber Bird *et al.* eine kurze Übersicht geben.¹ Dabei wurde unter anderem auch GST als Fusionspartner eingesetzt, eine Vorgehensweise, die sich häufig positiv auf die Faltung des zweiten Fusionsproteinbestandteils auswirkt.² Die exprimierten Serpine wurden oft als ungespaltenes Fusionsprotein für die weiterführende Charakterisierung verwendet, da die häufig zur Fusionsproteinspaltung eingesetzten Proteasen (wie z.B. Thrombin, C.1.9.2.2) mit der reaktiven Schleife von Serpinen interagieren und spalten können.³ Der GST-Fusionsproteinanteil mit einem Molekulargewicht von ~27 kD könnte aber Experimente zur Wechselwirkung von Serpinen mit Proteasen beeinflussen. Deshalb sollte ein System verwendet werden, dass die Entfernung des GST-Fusionsproteinanteils und die Gewinnung von biologisch aktivem Serpin1 ermöglicht. Es wurde der pKM263-Vektor⁴ (C.1.11) eingesetzt, der für eine TEV-Protease-Fusionsproteinspaltstelle kodiert. Durch die seltene Erkennungssequenz der TEV-Protease konnte ein unspezifischer Verdau des Serpin1-Fusionsproteins, wie auch Inhibitionsreaktionen mit dem Serpinanteil vermieden werden. Die Ausbeute von 3,8 mg/L rekombinanten GST-Serpin1-Fusionsprotein (D.5.6) liegt im Rahmen dessen, was mit 3 mg/L für lösliches GST-SCCA2-Fusionsprotein in einem vergleichbaren System erzielt werden konnte.³ Die erreichten Produktausbeuten können allerdings von Serpin zu Serpin variieren.⁵ Der im pKM263-Vektor eingesetzte T7-Promotor führt aber in Verbindung mit dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3) zu einer erheblichen Grundexpression (D.5.2), die durch eine geringe Expression der T7-Polymerase auch im nicht induzierten Zustand hervorgerufen wird.⁶ Um dies in zukünftigen Experimenten zu vermeiden, könnte auf den Stamm BL21(DE3)pLysS ausgewichen werden, der konstitutiv T7-Lysozym auf geringem

1 Bird *et al.*, 2004

2 Schick *et al.*, 1997; Kawamura *et al.*, 1998

3 Schick *et al.*, 1997

4 Melcher, 2000

5 Bird *et al.*, 2004

6 Lottspeich & Zorbas, 1998

Level exprimiert, das die T7-RNA-Polymerase inhibiert und so die Grundaktivität unterdrückt.¹

Die affinitätschromatografische Aufreinigung mittels Glutathion-Sepharose ermöglicht die zuverlässige und reproduzierbare Aufkonzentrierung von GST-Serpin1-Fusionsprotein aus Bakterienrohextrakt. Bei der Elution wurden 2 Maxima (D.5.3) beobachtet, deren reproduzierbares Auftreten bei Aufreinigungen verschiedener GST-Serpin-Fusionsproteine von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bestätigt werden konnte. Das GST-Serpin1-Fusionsprotein beider Maxima wies hinsichtlich elektrophoretischer Mobilität oder massenspektrometrischer Analysen (MALDI-TOF-MS) keinerlei Unterschiede auf. Somit kann davon ausgegangen werden, dass beide Proteinfractionen in ihrer Aminosäuresequenz identisch sind.

Die TEV-Protease erwies sich als sehr gut zur Spaltung des GST-Serpin1-Fusionsproteins geeignet. Die Spaltung des Fusionsproteins erfolgte unter den etablierten Bedingungen nahezu vollständig und es wurde kein unspezifischer Abbau beobachtet (D.5.4). Zur Abtrennung der His₆-markierten Proteine (TEV-Protease, abgespaltene GST und ungespaltenes Fusionsprotein) wurden 2 Affinitäts-Matrizes auf ihre Eignung hin verglichen (D.5.5). Hierbei zeigte sich das Talon-Affinitätsmaterial (BD Biosciences) in Bezug auf die Rückgewinnung von Serpin1 gegenüber der Ni²⁺-NTA-Agarose (QIAGEN) als überlegen, da die Verluste durch unspezifische Adsorption von Serpin1 deutlich geringer waren. Die Ursache liegt offenbar in der geringeren Bindungsstärke des Co²⁺-Ions des Talon-Materials zu intramolekularen Histidinresten im Vergleich zum Ni²⁺-Ion der NTA-Agarose.² Auf die Gesamtausbeute an Serpin1 hat sich die abschließende Dialyse sicherlich negativ ausgewirkt, da sie mit zusätzlichen Verlusten von etwa 30% im Vergleich zur Ausbeute nach der Talon-Affinitätsaufreinigung verbunden war (D.5.6). Möglicherweise könnte dieser Dialyseschritt eingespart werden, aber dazu müsste vorab geklärt werden, in welchem Umfang es zur Freisetzung von Co²⁺-Ionen durch das Talon-Material kommt und in wieweit sich diese oder der Glutathion enthaltene Elutionspuffer auf nachfolgende Experimente störend auswirken. Die in dieser Arbeit ausgearbeitete Vorgehensweise zur Produktion von Serpin1 als GST-Fusionsprotein in *E. coli*, sowie Spaltung durch TEV-Protease und Abreicherung der His₆-

1 Moffat & Studier, 1987; Studier *et al.*, 1990

2 Chaga *et al.*, 1999

markierten Proteine mittels TALON-Affinitätsmaterial zur Gewinnung des gereinigten Serpins kann als gut praktikabel und effizient angesehen werden.

E.7 Nachweis der biologischen Aktivität

Die Expression von biologisch aktiven Serpinen in Bakterien hat sich häufig als problematisch erwiesen, da eine korrekte Proteinfaltung dieser Klasse von Inhibitoren in bakteriellen Systemen nicht immer gewährleistet ist. Zum Nachweis der biologischen Aktivität von rekombinantem Serpin1 als Proteaseinhibitor wurden Komplexierungsexperimente mit Thrombin durchgeführt, da die natürlichen Zielproteasen von Serpin1 nicht bekannt sind. Die Wahl fiel auf Thrombin, da die reaktive Schleife von Serpin1 eine hohe Sequenzähnlichkeit mit der des endogenen Thrombin-Inhibitors ATIII aufweist (s. o.) und die Aminosäuren des reaktiven Zentrums, welche die Proteasespezifität festlegen, identisch sind. Es konnten SDS-stabile Komplexe von Serpin1 und humanem Thrombin nachgewiesen werden (D.6) und so die biologische Aktivität des produzierten Serpin1 dokumentiert werden. Da die Komplexierungsreaktion sehr langsam verläuft, wurde auf die Bestimmung einer Geschwindigkeitskonstante verzichtet. Die Reaktion lässt sich auch nicht durch den Zusatz von Heparin oder anderer Glykosaminoglykane beschleunigen (Ergebnisse nicht gezeigt), wie dies z.B. bei der Reaktion von Thrombin mit ATIII bzw. HCII der Fall ist.¹

E.8 Gewinnung von spezifischen Antiseren

Zur spezifischen Detektion von Serpin1 wurden Antiseren gewonnen, die durch Immunisierung von 3 Kaninchen mit aufgereinigtem GST-Serpin1-Fusionsprotein hergestellt wurden. Alle Antiseren zeigten spezifische Reaktionen mit rekombinantem Serpin1 und Serpin1-Thrombinkomplexen. Als Nachweisgrenze konnten ca. 0,5 - 1 ng Serpin1 ermittelt werden (D.7).

E.9 Identifizierung von Serpin1 und eines potentiellen Protease-Serpin1-Komplexes in *Branchiostoma lanceolatum*-Extrakten

Zur Identifizierung von endogenem Serpin1 wurden Gewebeextrakte von *B. lanceolatum* mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Westernblot eine Detektion

¹ Gettins, 2002

mit den Antiseren durchgeführt (D.8). In einem Mischexperiment konnte gezeigt werden, dass die Detektion von rekombinantem Serpin1 in Mengen nahe der Nachweisgrenze in einem komplexen Proteingemisch (1 ng rekombinantes Serpin1 auf 100 µg Gewebeextrakt) möglich war (Positivkontrolle) und es zu keinem proteolytischen Abbau kam. In den Extrakten wurde mit allen Antiseren eine Doppelbande bei ~62 kD detektiert, die bei 2 Antiseren (Kaninchen 2 und 3) das mit Abstand stärkste Signal ergaben. Dies und die fehlende Detektion in den Negativkontrollen (Präimmunseren und anti-GST-Antiserum; nicht gezeigt), sprechen für die hohe Spezifität der Immunreaktion und belegen, dass es sich bei der Doppelbande um endogenes Serpin1 handelt. Das Molekulargewicht von ~62 kD ist im Vergleich zum rekombinanten Serpin1 (~44 kD), um ~18 kD erhöht und kann möglicherweise durch Glykosylierungsvarianten erklärt werden, entsprechend dem Auftreten von 2 Signalsequenzen für N-Glykosylierungen (AS-Positionen 72 - 74 bzw. 384 - 386, D.3.2). Die Modifizierung der Glykosylierungen erfolgt möglicherweise gewebespezifisch, wie es für Calreticulin¹ gezeigt werden konnte. Für andere mit einem ER-Rückführungssignal gekennzeichnete Proteine, wie z.B. PDI² und Calreticulin,³ wurde gezeigt, dass sie vor der Rückführung ins ER den Golgi-Apparat vollständig durchlaufen können, wobei es zur Modifizierung der N-Glykosylierungen kommt. Auch ein partieller Abbau von Serpin1 kann letztendlich nicht ausgeschlossen werden.

Das Antiserum von Kaninchen 1 zeigt eine zusätzliche deutliche Immunreaktion gegen eine Doppelbande bei ~97 kD. Möglicherweise handelt es sich hier um Komplexe der Serpin1-Glykosylierungsvarianten mit einer Zielprotease.

E.10 Versuche zur Serpin1-Lokalisation in *Branchiostoma lanceolatum*-Dünnschnitten

Die Experimente zur Lokalisation von endogenem Serpin1 in Gewebeschnitten von *B. lanceolatum* ließen keine Strukturen oder Gewebe erkennen, die spezifisch mit dem Antiserum gegen Serpin1 reagierten. Die gleichmäßig verteilte Färbung deutet möglicherweise auf ein ubiquitäres Auftreten hin (D.9). Diese Aussage ließe sich in weiterführenden gewebespezifischen Expressionsstudien mittels PCR oder Chipexperimenten näher

1 Baksh & Michalak, 1996

2 Xiao *et al.*, 1999; Turano *et al.*, 2002

3 Goicoechea *et al.*, 2000; Navazio *et al.*, 2002

untersuchen. Es muß aber berücksichtigt werden, dass in allen vorangegangenen Versuchen denaturiertes Serpin1 eingesetzt wurde. Es ist möglich, dass die Antiseren nicht mit nativem Serpin1 reagieren und es sich bei der vermeidlichen Färbung um ein Artefakt handelt. Der Nachweis der zellulären Lokalisation von Serpin1 im ER könnte mittels immunhistologischer Verfahren in der Fluoreszenz- oder Elektronenmikroskopie erfolgen.

E.11 Mögliche Funktion von Serpin1

Die physiologische Bedeutung von Serpin1 ist unklar. Der Aufbau der reaktiven Schleife mit den basischen Aminosäuren und der hohen Ähnlichkeit zu ATIII, sowie die Fähigkeit mit Thrombin SDS-stabile Komplexe zu bilden, deuten darauf hin, dass die Funktion von Serpin1 möglicherweise die Inhibition von Trypsin-ähnlichen Proteasen¹ ist.

In Frage kommen aber auch Zielproteasen vom Subtilisin-Typ, zu denen die im sekretorischen Pfad lokalisierten Pro-Hormon- / -Proteinkonvertasen² (PC) gehören. Zu den Proprotein-konvertasen PC2, PC1/PC3 und PC6 verschiedener Vertebrata homologe Enzyme konnten ebenfalls in *Branchiostoma californiensis* identifiziert werden.³ PCs werden als Zymogene produziert und teilweise durch autokatalytische Spaltung nach einem Lysin-Arginin-Motiv aktiviert.² Ein solches Motiv findet sich bei Serpin1 an den P2- und P1-Positionen. Serpin1 könnte PCs auf zweierlei Arten regulieren, einmal durch Verhinderung der (vorzeitigen) Aktivierung des Zymogens durch Inhibition der spaltenden Protease oder durch direkte Inhibition des aktiven Zentrums der PC, womit die autokatalytische Aktivierung unterbunden bzw. bereits aktivierte Proteasen inhibiert werden. Über die natürliche Regulation von PCs ist bisher nur wenig bekannt⁴ und so könnte die Aufklärung der Funktionsweise und physiologischen Bedeutung von Serpin1 einen Beitrag zur Entwicklung von PC-Inhibitoren leisten.

Neben den Proteasen, die wie PCs im ER bzw. Golgi-Apparat und sich davon ableitenden Organellen lokalisiert sind, kommen auch solche als Zielproteasen in Betracht, die für die Sekretion vorgesehen sind und auf ihrem Transport zu früh aktiviert wurden. Zur Vermeidung von unkontrollierter Proteolyse müssen diese Proteasen wieder inaktiviert werden. So konnten

1 Rawlings & Barrett, 1994

2 Seidah & Chrétien, 1999

3 Oliva *et al.*, 1995; Oliva *et al.*, 2000

4 Fugere & Day, 2002

die cDNAs für 2 potentielle Mannose-bindende Lektin-assoziierte Serinproteasen (MASP-1 bzw. MASP-3) - im Blutplasma zirkulierende Faktoren des Mannan-Bindungs-Lektin-Wegs des Komplementsystems¹ - in *Branchiostoma belcheri* identifiziert werden.² Da über deren proteolytische Spezifität noch keine Daten vorliegen³, kann keine Aussage gemacht werden, ob sie als Zielproteasen in Frage kommen.

Untersuchungen zeigen, dass Serpine innerhalb der reaktiven Schleife mehrere alternative reaktive Zentren aufweisen können und mit Proteasen interagieren, die sich in ihrer Spezifität deutlich unterscheiden. So konnte für ATIII eine Interaktion mit den Cysteinproteasen Papain bzw. Cathepsin L über die Positionen P2 - P1 und P2' - P3' nachgewiesen werden.⁴ Die Inhibition der Cysteinproteasen scheint in diesen Fällen aber auf einem anderen Mechanismus als bei den Serinproteasen zu beruhen. Auch für das Chaperon HSP47, das nach vorherrschender Meinung als inaktiv gegenüber Proteasen anzusehen ist, wurde eine Interaktion mit Cathepsin L über die Positionen P16 - P15 und P2' - P3' gezeigt.⁵ Das Auftreten noch nicht identifizierter alternativer reaktiver Zentren muss auch für Serpin1 in Betracht gezogen werden.

Eine weitere in Frage kommende Funktion von Serpin1 liegt in der Abwehr viraler, bakterieller oder pflanzlicher Toxine, die nach endosomaler Aufnahme den sekretorischen Pfad in retrograder Richtung durchlaufen, bevor sie ihre toxische Wirkung entfalten.⁶

1 Janeway *et al.*, 2002

2 Endo *et al.*, 2003

3 Chen & Wallis, 2004

4 Bjork *et al.*, 1998

5 Siavash *et al.*, 2002

6 Lord & Roberts, 1998

F Literaturverzeichnis

- Abdel Wahab N., Gibbs J., Mason R. M. (1998) Regulation of gene expression by alternative polyadenylation and mRNA instability in hyperglycaemic mesangial cells. *Biochem. J.* **336**: 405-411
- Abeijon C., Hirschberg C. B. (1992) Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 32-36
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2004) *Molekularbiologie der Zelle*, 4. Auflage. Wiley-VCH, Weinheim
- Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402
- Atchley W. R., Lokot T., Wollenberg K., Dress A., Ragg H. (2001) Phylogenetic analyses of amino acid variation in the serpin proteins. *Mol. Biol. Evol.* **18**: 1502-1511
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (eds.) (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York
- Avery O. T., MacLeod C. M., McCarty M. (1944/1979) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Inductions of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.* **149**: 297-326
- Baksh S., Michalak M. (1996) Calreticulin (Michalak M., Ed.), Seiten 11 - 30. Springer-Verlag, New York
- Barnes W. M. (1992) The fidelity of Taq polymerase catalyzing PCR is improved by an N-terminal deletion. *Gene* **112**: 29-35
- Barnes W. M. (1994) PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2216-2220
- Beatty K., Bieth J., Travis J. (1980) Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized alpha-1-proteinase inhibitor and alpha-1-antichymotrypsin. *J. Biol. Chem.* **255**: 3931-3934
- Bevilacqua A., Ceriani M. C., Capaccioli S., Nicolini A. (2003) Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. *J. Cell Physiol.* **195**: 356-372
- Bird P. I., Pak S. C., Worrall D. M., Bottomley S. P. (2004) Production of recombinant serpins in *Escherichia coli*. *Methods* **32**: 169-176
- Birnboim H. C., Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523
- Birnboim H. C. (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **100**: 243-255
- BIO-RAD (1999) *MicroPulser Electroporation Apparatus Operating Instructions and Applications Guide*, rev. b

- Bjork I., Nordling K., Raub-Segall E., Hellman U., Olson S. T. (1998) Inactivation of papain by antithrombin due to autolytic digestion: a model of serpin inactivation of cysteine proteinases. *Biochem. J.* **335**: 701-709
- Böhme C. (2001) Untersuchungen zur Wechselwirkung von Heparinkofaktor II aus Plasma und rekombinanten Zellen mit Glykosaminoglykanen. Dissertation, Technische Fakultät, Universität Bielefeld
- Bousquet-Antonelli C., Presutti C., Tollervey D. (2000) Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell* **102**: 765-775
- Bruch M., Weiss V., Engel J. (1988) Plasma serine proteinase inhibitors (serpins) exhibit major conformational changes and a large increase in conformational stability upon cleavage at their reactive sites. *J. Biol. Chem.* **263**: 16626-16630
- Bucher P., Bairoch A. (1994) A generalized profile syntax for biomolecular sequence motifs and its function in automatic sequence interpretation. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* **2**: 53-61
- Bush G. L., Tassin A. M., Friden H., Meyer D. I. (1991) Secretion in yeast. Purification and in vitro translocation of chemical amounts of prepro-alpha-factor. *J. Biol. Chem.* **266**: 13811-13814
- Cabrera M., Muniz M., Hidalgo J., Vega L., Martin M. E., Velasco A. (2003) The retrieval function of the KDEL receptor requires PKA phosphorylation of its C-terminus. *Mol. Biol. Cell* **14**: 4114-4125
- Campbell N. A., Reece J. B. (2003) *Biologie*, 6. Auflage. Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg
- Caput D., Beutler B., Hartog K., Thayer R., Brown-Shimer S., Cerami A. (1986) Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 1670-1674
- Carrell R. W., Owen M. C. (1985) Plakalbumin, alpha 1-antitrypsin, antithrombin and the mechanism of inflammatory thrombosis. *Nature* **317**: 730-732
- Carrell C., Travis J. (1985) α_1 -Antitrypsin and the serpins: variation and countervariation. *Trends Biochem. Sci.* **10**: 20-24
- Carrington J. C., Dougherty W. G. (1987a) Smallnuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genome is a protease. *J. Virol.* **61**: 2540-2548
- Carrington J. C., Dougherty W. G. (1987b) Processing of the tobacco etch virus 49k protease requires autoproteolysis. *Virology* **160**: 355-362
- Carrington J. C., Dougherty W. G. (1988) A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 3391-3395
- Chaga G., Hopp J., Nelson P. (1999) Immobilized metal ion affinity chromatography on Co²⁺-carboxymethylaspartate-agarose Superflow, as demonstrated by one-step purification of lactate dehydrogenase from chicken breast muscle. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **29**: 19-24
- Chen C. B., Wallis R. (2004) Two mechanisms for mannose-binding protein modulation of the activity of its associated serine proteases. *J. Biol. Chem.* (Apr. 1, Epub. ahead of print)

- Cho J. H., Homma K., Kanegasaki S., Natori S. (1999) Activation of human neutrophils by a synthetic anti-microbial peptide, KLKLLLLLKLK-NH₂, via cell surface calreticulin. *Eur. J. Biochem.* **266**: 878-885
- Clarke E. P., Cates G. A., Ball E. H., Sanwal B. D. (1991) A collagen-binding protein in the endoplasmic reticulum of myoblasts exhibits relationship with serine protease inhibitors. *J. Biol. Chem.* **266**: 17230-17235
- Cohen S. N., Chang A. C., Hsu L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 2110-2114
- Colgan D. F., Manley J. L. (1997) Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev.* **11**: 2755-2766
- Coughlin P., Sun J., Cerruti L., Salem H. H., Bird P. (1993) Cloning and molecular characterization of a human intracellular serine proteinase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 9417-9421
- Danielli A., Kafatos F. C., Loukeris T. G., (2003) Cloning and characterization of four *Anopheles gambiae* serpin isoforms, differentially induced in the midgut by *Plasmodium berghei* invasion. *J. Biol. Chem.* **278**: 4184-4193
- Dougherty W. G., Carrington J. C., Cary S. M., Parks T. D. (1988) Biochemical and mutational analysis of a plant virus polyprotein cleavage site. *EMBO J.* **7**: 1281-1287
- Dougherty W. G., Cary S. M., Parks T. D. (1989a) Molecular genetic analysis of a plant virus polyprotein cleavage site: a model. *Virology* **171**: 356-364
- Dougherty W. G., Parks T. D., Cary S. M., Bazan J. F., Fletterick R. J. (1989b) Characterization of the catalytic residues of the tobacco etch virus 49-kDa proteinase. *Virology* **172**: 302-310
- Dougherty W. G., Parks T. D. (1989) Molecular genetic and biochemical evidence for the involvement of the heptapeptide cleavage sequence in determining the reaction profile at two tobacco etch virus cleavage sites in cell-free assays. *Virology* **172**: 145-155
- Dougherty W. G., Parks T. D. (1991) Post-translational processing of the tobacco etch virus 49-kDa small nuclear inclusion polyprotein: identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. *Virology* **183**: 449-456
- Dower W. J., Miller J. F., Ragsdale C. W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6127-6145
- Duden R. (2003) ER-to-Golgi transport: COP I and COP II function. *Mol. Membr. Biol.* **20**: 197-207
- Ellgaard L., Molinari M., Helenius A. (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* **286**: 1882-1888
- Endo Y., Nonaka M., Saiga H., Kakinuma Y., Matsushita A., Takahashi M., Matsushita M., Fujita T. (2003) Origin of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 and MASP-3 involved in the lectin complement pathway traced back to the invertebrate, amphioxus. *J. Immunol.* **170**: 4701-4707
- Eriksson S., Janciauskiene S., Lannfelt L. (1995) Alpha 1-antichymotrypsin regulates Alzheimer beta-amyloid peptide fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 2313-2317

- Facius D., Fartmann B., Huber J., Nikoleit K., Schondelmaier J., Steinhauser S. (1999) Sequencing Brochure, Version 4. MWG-Biotech AG, Ebersberg
- Fugere M., Day R. (2002) Inhibitors of the subtilase-like pro-protein convertases (SPCs). *Curr. Pharm. Des.* **8**: 549-562
- Genest M., Ptak M. (1982) Interactions between Asp, His, Ser residues within models of the active site of serine proteases. A theoretical empirical study. *Int. J. Pept. Protein Res.* **19**: 420-431
- Gent van D., Sharp P., Morgan K., Kalsheker N. (2003) Serpins: structure, function and molecular evolution. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**: 1536-1547
- Gettins P. G., Patston P. A., Olson S. T. (1996) Serpins: structure, function and biology. Springer-Verlag, Heidelberg
- Gettins P. G. (2002) Serpin structure, mechanism, and function. *Chem. Rev.* **102**: 4751-4804
- Goicoechea S., Orr A. W., Pallero M. A., Eggleton P., Murphy-Ullrich J. E. (2000) Thrombospondin mediates focal adhesion disassembly through interactions with cell surface calreticulin. *J. Biol. Chem.* **275**: 36358-36368
- Graber J. H., Cantor C. R., Mohr S. C., Smith T. F. (1999) In silico detection of control signals: mRNA 3'-end-processing sequences in diverse species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 14055-14060
- Grant S. G., Jessee J., Bloom F. R., Hanahan D. (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4645-4649
- Griffiths G., Ericsson M., Krijnse-Locker J., Nilsson T., Goud B., Soling H. D., Tang B. L., Wong S. H., Hong W. (1994) Localization of the Lys, Asp, Glu, Leu tetrapeptide receptor to the Golgi complex and the intermediate compartment in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **127**: 1557-1574
- Gültekin H., Heermann K. H. (1988) The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal. Biochem.* **172**: 320-329
- Hamaguchi K., Geiduschek E. P. (1962) The effect of electrolytes on the stability of deoxyribonucleate helix. *J. Am. Chem. Soc.* **84**: 1329-1337
- Han J., Zhang H., Min G., Kemler D., Hashimoto C. (2000) A novel *Drosophila* serpin that inhibits serine proteases. *FEBS Lett.* **468**: 194-198
- Harter C., Wieland F. (1996) The secretory pathway: mechanisms of protein sorting and transport. *Biochim. Biophys. Acta* **1286**: 75-93
- Hashimoto F., Horigome T., Kanbayashi M., Yoshida K., Sugano H. (1983) An improved method for separation of low-molecular-weight polypeptides by electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.* **129**: 192-199
- Haspel J., Blanco C., Jacob J., Grumet M. (2001) System for cleavable Fc fusion proteins using tobacco etch virus (TEV) protease. *Biotechniques* **30**: 60-61, 64-66
- Hendershot L. M., Bulleid N. J. (2000) Protein-specific chaperones: the role of hsp47 begins to gel. *Curr. Biol.* **10**: R912-915

- Hengen P. N. (1996) Methods and reagents. Eliminating banding artifacts from SDS-PAGE. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 191-193
- Higgs D. R., Goodbourn S. E., Lamb J., Clegg J. B., Weatherall D. J., Proudfoot N. J. (1983) Alpha-thalassaemia caused by a polyadenylation signal mutation. *Nature* **306**: 398-400
- Higgs D. R., Vickers M. A., Wilkie A. O., Pretorius I. M., Jarman A. P., Weatherall D. J. (1989) A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. *Blood* **73**: 1081-1104
- Hill R. E., Hastie N. D. (1987) Accelerated evolution in the reactive centre regions of serine protease inhibitors. *Nature* **326**: 96-99
- Hirose Y., Manley J. L. (1998) RNA polymerase II is an essential mRNA polyadenylation factor. *Nature* **395**: 93-96
- Hochuli E., Dobeli H., Schacher A. (1987) New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr.* **411**: 177-184
- Hogrefe H. H., Cline J., Lovejoy A. E., Nielson K. B. (2001) DNA polymerases from hyperthermophiles. *Methods Enzymol.* **334**: 91-116
- Holland P. W., Garcia-Fernandez J., Williams N. A., Sidow A. (1994) Gene duplications and the origins of vertebrate development. *Dev. Suppl.* : 125-133
- Holleman-Wiberg (1995) *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, 101. Auflage. de Gruyter, Berlin
- Horton P., Nakai K. (1997) Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* **5**: 147-152
- Huber R., Carrell R. W. (1989) Implications of the three-dimensional structure of alpha 1-antitrypsin for structure and function of serpins. *Biochemistry* **28**: 8951-8966
- Huntington J. A., Read R. J., Carrell R. W. (2000) Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* **407**: 923-926
- Invitrogen (2001a) Instruction manual TOPO TA Cloning Kit for Sequencing, Version H.
- Invitrogen (2001b) Instruction manual GeneRacer Kit, Version F.
- Irving J. A., Pike R. N., Lesk A. M., Whisstock J. C. (2000) Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Res.* **10**: 1845-1864
- Irving J. A., Steenbakkens P. J., Lesk A. M., Op den Camp H. J., Pike R. N., Whisstock J. C. (2002) Serpins in prokaryotes. *Mol. Biol. Evol.* **19**: 1881-1890
- Janeway C. A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. (2002) *Immunologie*, 5. Auflage. Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg
- Kapust R. B., Tozser J., Copeland T. D., Waugh D. S. (2002) The P1' specificity of tobacco etch virus protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **294**: 949-955

- Karabinos A., Bhattacharya D. (2000) Molecular evolution of calmodulin and calmodulin-like genes in the cephalochordate *Branchiostoma*. *J. Mol. Evol.* **51**: 141-148
- Kawamura K., Hayata D., Fujiwara S., Yubisui T. (1998) Serine protease inhibitors expressed in the process of budding of tunicates as revealed by EST analysis. *J. Biochem. (Tokyo)* **124**: 1004-1012
- Kelleher D. J., Kreibich G., Gilmore R. (1992) Oligosaccharyltransferase activity is associated with a protein complex composed of ribophorins I and II and a 48 kd protein. *Cell* **69**: 55-65
- Kimata Y., Ooboki K., Nomura-Furuwatari C., Hosoda A., Tsuru A., Kohno K. (2000) Identification of a novel mammalian endoplasmic reticulum-resident KDEL protein using an EST database motif search. *Gene* **261**: 321-327
- Krem M. M., Di Cera E. (2003) Conserved Ser residues, the shutter region, and speciation in serpin evolution. *J. Biol. Chem.* **278**: 37810-37814
- Kuribayashi K., Hikata M., Hiraoka O., Miyamoto C., Furuichi Y. (1988) A rapid and efficient purification of poly(A)-mRNA by oligo(dT)₃₀-Latex. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **19**: 61-64
- Krüger O. (2003) Eine phylogenetische Analyse von Serpin-Genen aus eukaryotischen Genomprojekten. Dissertation, Technische Fakultät, Universität Bielefeld
- Kyhse-Andersen J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **10**: 203-209
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lanchantin G. F., Friedmann J. A., Hart D. W. (1973) Two forms of human thrombin. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* **248**: 5956-5966
- Lee J. S., Lalli E., Masquillier D., Schlotter F., Molina C. A., Foulkes N. S., Sassone-Corsi P. (1995) *Inducible Gene Expression*, 2nd edn. (Bauerle P. A. ed.), pp. 9-12. Birkhauser, New York
- Lehninger A. L., Nelson D. L., Cox M. M. (1994) *Prinzipien der Biochemie*. Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg
- Lewis M. J., Pelham H. R. (1990) A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature* **348**: 162-163
- Lippincott-Schwartz J., Roberts T. H., Hirschberg K. (2000) Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**: 557-589
- Lomas D. A., Evans D. L., Finch J. T., Carrell R. W. (1992) The mechanism of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver. *Nature* **357**: 605-607
- Lomas D. A., Evans D. L., Stone S. R., Chang W. S., Carrell R. W. (1993) Effect of the Z mutation on the physical and inhibitory properties of alpha 1-antitrypsin. *Biochemistry* **32**: 500-508
- Lomas D. A., Carrell R. W. (2002) Serpinopathies and the conformational dementias. *Nat. Rev. Genet.* **3**: 759-768

- Lord J. M., Roberts L. M. (1998) Toxin entry: retrograde transport through the secretory pathway. *J. Cell Biol.* **140**: 733-736
- Lottspeich F., Zorbas H. (eds) (1998) *Bioanalytik*. Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg
- Lundberg K. S., Shoemaker D. D., Adams M. W., Short J. M., Sorge J. A., Mathur E. J. (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* **108**: 1-6
- Lundblad R. L., Kingdon H. S., Mann K. G. (1976) Thrombin. *Methods Enzymol.* **45**: 156-176
- MacDonald C. C., Redondo J. L. (2002) Reexamining the polyadenylation signal: were we wrong about AAUAAA? *Mol. Cell Endocrinol.* **190**: 1-8
- Majoul I., Straub M., Hell S. W., Duden R., Soling H. D. (2001) KDEL-cargo regulates interactions between proteins involved in COPI vesicle traffic: measurements in living cells using FRET. *Dev. Cell* **1**: 139-153
- Mandel M., Higa A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 159-162
- Marchler-Bauer A., Anderson J. B., DeWeese-Scott C., Fedorova N. D., Geer L. Y., He S., Hurwitz D. I., Jackson J. D., Jacobs A. R., Lanczycki C. J., Liebert C. A., Liu C., Madej T., Marchler G. H., Mazumder R., Nikolskaya A. N., Panchenko A. R., Rao B. S., Shoemaker B. A., Simonyan V., Song J. S., Thiessen P. A., Vasudevan S., Wang Y., Yamashita R. A., Yin J. J., Bryant S. H. (2003) CDD: a curated Entrez database of conserved domain alignments. *Nucleic Acids Res.* **31**: 383-387
- Maruyama K., Sugano S. (1994) Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. *Gene* **138**: 171-174
- Melcher K. (2000) A modular set of prokaryotic and eukaryotic expression vectors. *Anal. Biochem.* **277**: 109-120 (Erratum: *Anal. Biochem.* (2000) **282**: 266)
- Miesenbock G., Rothman J. E. (1995) The capacity to retrieve escaped ER proteins extends to the trans-most cisterna of the Golgi stack. *J. Cell. Biol.* **129**: 309-319
- Miller E. M., Nickoloff J. A. (1995) *Escherichia coli* electrotransformation. *Methods Mol. Biol.* **47**: 105-113
- Mizuguchi H., Nakatsuji M., Fujiwara S., Takagi M., Imanaka T. (1999) Characterization and application to hot start PCR of neutralizing monoclonal antibodies against KOD DNA polymerase. *J. Biochem. (Tokyo)* **126**: 762-768
- Moffatt B. A., Studier F. W. (1987) T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell* **49**: 221-227
- Mullis K. B. (1990) Eine Nachtfahrt und die Polymerases-Kettenreaktion. *Spektrum der Wissenschaft* **6**: 60-67
- Munro S., Pelham H. R. (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**: 899-907

- Murray V. (1989) Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **17**: 8889
- Nagai N., Hosokawa M., Itohara S., Adachi E., Matsushita T., Hosokawa N., Nagata K. (2000) Embryonic lethality of molecular chaperone hsp47 knockout mice is associated with defects in collagen biosynthesis. *J. Cell Biol.* **150**: 1499-1506
- Nagata K. (1998) Expression and function of heat shock protein 47: a collagen-specific molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *Matrix Biol.* **16**: 379-386
- Navazio L., Miuzzo M., Royle L., Baldan B., Varotto S., Merry A. H., Harvey D. J., Dwek R. A., Rudd P. M., Mariani P. (2002) Monitoring endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic of a plant calreticulin by protein glycosylation analysis. *Biochemistry* **41**: 14141-14149
- Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P. H. (1982) Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* **1**: 841-845
- Nilsson T., Jackson M., Peterson P. A. (1989) Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* **58**: 707-718
- Novex (1995) Novex Western Transfer Apparatus Instructions
- Ohno S. (1970) Evolution by Gene Duplication. Springer-Verlag, Heidelberg
- Oliva A. A. Jr., Steiner D. F., Chan S. J. (1995) Proprotein convertases in amphioxus: predicted structure and expression of proteases SPC2 and SPC3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 3591-3595
- Oliva A. A. Jr., Chan S. J., Steiner D. F. (2000) Evolution of the prohormone convertases: identification of a homologue of PC6 in the protochordate amphioxus. *Biochim. Biophys. Acta.* **1477**: 338-348
- Orkin S. H., Cheng T. C., Antonarakis S. E., Kazazian H. H. Jr. (1985) Thalassemia due to a mutation in the cleavage-polyadenylation signal of the human beta-globin gene. *EMBO J.* **4**: 453-456
- Palade G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**: 347-358
- Panopoulou G., Hennig S., Groth D., Krause A., Poustka A. J., Herwig R., Vingron M., Lehrach H. (2003) New evidence for genome-wide duplications at the origin of vertebrates using an amphioxus gene set and completed animal genomes. *Genome Res.* **13**: 1056-1066
- Parks T. D., Leuther K. K., Howard E. D., Johnston S. A., Dougherty W. G. (1994) Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase. *Anal. Biochem.* **216**: 413-417
- Parks T. D., Howard E. D., Wolpert T. J., Arp D. J., Dougherty W. G. (1995) Expression and purification of a recombinant tobacco etch virus NIa proteinase: biochemical analyses of the full-length and a naturally occurring truncated proteinase form. *Virology* **210**: 194-201
- Pelham H. R. (1990) The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem. Sci.* **15**: 483-486
- Pelham H. R. (1996) The dynamic organisation of the secretory pathway. *Cell Struct. Funct.* **21**: 413-419

- Polayes D., Goldstein A., Ward G., Hughes A. (1994) TEV protease, recombinant: a site-specific protease for efficient cleavage of affinity tags from expressed proteins. *Focus* **16**: 2-5 (Zeitschrift der Firma Invitrogen)
- Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**: 598-599
- Poss S. G., Boschung H. T. (1996) Lancelets (Cephalochordata: *Branchiostomatidae*). How many species are valid? *Isr. J. Zool.* **42**: 513-566
- Proudfoot N. J., Brownlee G. G. (1976) 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature* **263**: 211-214
- Proudfoot N. J. (2001) Genetic dangers in poly(A) signals. *EMBO Rep.* **2**: 891-892
- Proudfoot N. J., Furger A., Dye M. J. (2002) Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* **108**: 501-512
- Proudfoot N., O'Sullivan J. (2002) Polyadenylation: a tail of two complexes. *Curr. Biol.* **12**: R855-857
- Pschyrembel W. (2002) *Klinisches Wörterbuch*, 259. Auflage. de Gruyter, Berlin
- QIAgen (1999) *Oligotex Handbook*, „Oligo direct mRNA protocol for isolation of poly A⁺mRNA from animal tissues“
- QIAgen (2000a) *QIAquick Spin Handbook*, „QIAquick Gel Extraction Kit Protocol“
- QIAgen (2000b) *QIAquick Spin Handbook*, „QIAquick PCR Purification Kit Protocol“
- QIAgen (2000c) *Handbuch für den Omniscript RT Kit*
- QIAgen (2001) *QIAprep Miniprep Handbook*, „QIAprep Miniprep Kit“
- Ragg H., Lokot T., Kamp P. B., Atchley W. R., Dress A. (2001) Vertebrate serpins: construction of a conflict-free phylogeny by combining exon-intron and diagnostic site analyses. *Mol. Biol. Evol.* **18**: 577-584
- Rawlings N. D., Barrett A. J. (1994) Families of serine peptidases. *Methods Enzymol.* **244**: 19-61
- Renart J., Reiser J., Stark G. R. (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 3116-3120
- Robertson A. S., Belorgey D., Lilley K. S., Lomas D. A., Gubb D., Dafforn T. R. (2003) Characterization of the necrotic protein that regulates the Toll-mediated immune response in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* **278**: 6175-6180
- Rosenberg R. D. (1977) Chemistry of the hemostatic mechanism and its relationship to the action of heparin. *Fed. Proc.* **36**: 10-18
- Rychlik W. (1995) Priming efficiency in PCR. *Biotechniques* **18**: 84-86, 88-90

- Sachs A. B., Sarnow P., Hentze M. W. (1997) Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell* **89**: 831-838
- Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2. Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Sambrook J., Russell D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3. Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467
- Satoh M., Hirayoshi K., Yokota S., Hosokawa N., Nagata K. (1996) Intracellular interaction of collagen-specific stress protein HSP47 with newly synthesized procollagen. *J. Cell Biol.* **133**: 469-483
- Schaefer B. C. (1995) Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal. Biochem.* **227**: 255-273
- Schechter I., Berger A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**: 157-162
- Schick C., Kamachi Y., Bartuski A. J., Cataltepe S., Schechter N. M., Pemberton P. A., Silverman G. A. (1997) Squamous cell carcinoma antigen 2 is a novel serpin that inhibits the chymotrypsin-like proteinases cathepsin G and mast cell chymase. *J. Biol. Chem.* **272**: 1849-1855
- Schlegel H. G. (1985) *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Schwede T., Kopp J., Guex N., Peitsch M. C. (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* **31**: 3381-3385
- Scott M., Lu G., Hallett M., Thomas D. Y. (2004) The Hera database and its use in the characterization of endoplasmic reticulum proteins. *Bioinformatics* **20**: 937-944
- Seidah N. G., Chretien M. (1999) Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res.* **848**: 45-62
- Semenza J. C., Hardwick K. G., Dean N., Pelham H. R. (1990) ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell* **6**: 1349-1357 (Erratum: *DNA Seq.* (1991) **1**: 219)
- Shapiro A. L., Vinuela E., Maizel J. V. Jr. (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **28**: 815-820
- Shaw G., Kamen R. (1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* **46**: 659-667

- Sheets M. D., Ogg S. C., Wickens M. P. (1990) Point mutations in AAUAAA and the poly (A) addition site: effects on the accuracy and efficiency of cleavage and polyadenylation in vitro. *Nucleic Acids Res.* **18**: 5799-5805
- Siavash H., Lopes M., Norris K., Hebert C., Nikitakis N., Sauk J. J. (2002) Inhibition of cysteine proteinases by autolytic digestion is mediated by CBP2/Hsp47. *Connect. Tissue Res.* **43**: 589-594
- Silverman G. A., Bartuski A. J., Cataltepe S., Gornstein E. R., Kamachi Y., Schick C., Uemura Y. (1998) SCCA1 and SCCA2 are proteinase inhibitors that map to the serpin cluster at 18q21.3. *Tumour Biol.* **19**: 480-487
- Silverman G. A., Bird P. I., Carrell R. W., Church F. C., Coughlin P. B., Gettins P. G., Irving J. A., Lomas D. A., Luke C. J., Moyer R. W., Pemberton P. A., Remold-O'Donnell E., Salvesen G. S., Travis J., Whisstock J. C. (2001) The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J. Biol. Chem.* **276**: 33293-33296
- Simons P. C., van der Jagt D. L. (1977) Purification of glutathione S-transferases from human liver by glutathione-affinity chromatography. *Anal. Biochem.* **82**: 334-341
- Smith D. B., Johnson K. S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**: 31-40
- Stornaiuolo M., Lotti L. V., Borgese N., Torrisi M. R., Mottola G., Martire G., Bonatti S. (2003) KDEL and KKXX retrieval signals appended to the same reporter protein determine different trafficking between endoplasmic reticulum, intermediate compartment, and Golgi complex. *Mol. Biol. Cell* **14**: 889-902
- Stratagene (1996) pCR-Script Amp SK(+) Cloning Kit, Instruction Manual
- Studier F. W., Rosenberg A. H., Dunn J. J., Dubendorff J. W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**: 60-89
- Takagi M., Nishioka M., Kakihara H., Kitabayashi M., Inoue H., Kawakami B., Oka M., Imanaka T. (1997) Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. strain KOD1 and its application to PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4504-4510
- Tasab M., Batten M. R., Bulleid N. J. (2000) Hsp47: a molecular chaperone that interacts with and stabilizes correctly-folded procollagen. *EMBO J.* **19**: 2204-2211
- Teasdale R. D., Jackson M. R. (1996) Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**: 27-54
- Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D. G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876-4882
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354
- Trombetta E. S., Parodi A. J. (2003) Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**: 649-676

- Turano C., Coppari S., Altieri F., Ferraro A. (2002) Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J. Cell Physiol.* **193**: 154-156
- Vogelstein B., Gillespie D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 615-619
- Volloch V., Schweitzer B., Rits S. (1994) Ligation-mediated amplification of RNA from murine erythroid cells reveals a novel class of beta globin mRNA with an extended 5'-untranslated region. *Nucleic Acids Res.* **22**: 2507-2511
- Wada H., Satoh N. (1994) Details of the evolutionary history from invertebrates to vertebrates, as deduced from the sequences of 18S rDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 1801-1804
- Wehner R., Gehring W. (1995) *Zoologie*, 23. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Weiss B., Jacquemin-Sablon A., Live T. R., Fareed G. C., Richardson C. C. (1968) Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J. Biol. Chem.* **243**: 4543-4555
- Whisstock J., Skinner R., Lesk A. M. (1998) An atlas of serpin conformations. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 63-67
- Whitehead T. P., Kricka L. J., Carter T. J., Thorpe G. H. (1979) Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin. Chem.* **25**: 1531-1546
- Wilkins M. R., Lindskog I., Gasteiger E., Bairoch A., Sanchez J. C., Hochstrasser D. F., Appel R. D. (1997) Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS - a World-Wide-Web-accessible tool. *Electrophoresis* **18**: 403-408
- Wilson D. W., Lewis M. J., Pelham H. R. (1993) pH-dependent binding of KDEL to its receptor in vitro. *J. Biol. Chem.* **268**: 7465-7468
- Wu M. M., Grabe M., Adams S., Tsien R. Y., Moore H. P., Machen T. E. (2001) Mechanisms of pH regulation in the regulated secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **31**: 33027-33035
- Xiao G., Chung T. F., Pyun H. Y., Fine R. E., Johnson R. J. (1999) KDEL proteins are found on the surface of NG108-15 cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **72**: 121-128
- Yoo B. C., Aoki K., Xiang Y., Campbell L. R., Hull R. J., Xoconostle-Cazares B., Monzer J., Lee J. Y., Ullman D. E., Lucas W. J. (2000) Characterization of *Cucurbita maxima* phloem serpin-1 (CmPS-1). A developmentally regulated elastase inhibitor. *J. Biol. Chem.* **275**: 35122-35128
- Zang X., Yazdanbakhsh M., Jiang H., Kanost M. R., Maizels R. M. (1999) A novel serpin expressed by blood-borne microfilariae of the parasitic nematode *Brugia malayi* inhibits human neutrophil serine proteinases. *Blood* **94**: 1418-1428
- Zeng W., Silverman G. A., Remold-O'Donnell E. (1998) Structure and sequence of human M/NEI (monocyte/neutrophil elastase inhibitor), an Ov-serpin family gene. *Gene* **213**: 179-187
- Zerangue N., Malan M. J., Fried S. R., Dazin P. F., Jan Y. N., Jan L. Y., Schwappach B. (2001) Analysis of endoplasmic reticulum trafficking signals by combinatorial screening in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 2431-2436

G Anhang

G.1 cDNA-Sequenz von Serpin1 mit abgeleiteter Proteinsequenz

```

1  atatagctagcttttccacactgtggttcttatgacatgttaaactaaacattgcagacaa
61  agcaccgcttgtagacgctaaagaggggaaccgattcccagtttgtgcctcagggacagtga

1  M P G H S Y S L F G L L V A M A T L G
121  accatgccaggacacagttacagcctctttggcctcctggttgccatggcaactctggga

20  S S A S Q E S T P L A D I N S E F A L E
181  agctccgcatcacaagagtccaccccattggctgacatcaacagcagagtttgcctggag

40  L Y K T L H K D H P E N I F F S P F S I
241  ctgtacaagacgctacacaaggatcatcccgagaacatcttcttctcacccttcagtatc

60  S T C L A M A Y L G A R N D T A Q Q M S
301  tccacctgtctggccatggcttacctgggggcaaggaacgatacagcacaacagatgagt

80  R V L R F H K M D A S D L H V L F H D L
361  cgagtgccttcgctttcacaagatggatgcctccgaccttcacgtggttggccacgacctt

100  L T Q L H H S D R P Y T L K T A N R L F
421  ctgaccagctgcaccactcagacaggccctacacactcaagaccgcaaaccggctcttc

120  G Q N S F E F S Q K F L D E T S R H Y R
481  ggtcagaactcattcgagttttcgcaaaagtttctggatgaaacgtccagacattacagg

140  A Q L A P V D F S G N T E G A R Q T I N
541  gcgcagttggctcccgtggacttcagtggaaacacagagggcgcacggcaaactatcaac

160  S W V E E Q T E N K I Q D L L A P G T V
601  agctgggtagaggaacaaacagagaacaaaatccaagatcttttagcaccaggaaccgtg

180  T P A T M L V L V N A I Y F K G S W E R
661  accctgctaccatgtagtagtactgggtcaacgccatctacttcaaaggcagctgggaacgc

200  K F E E S R T R L G T F H I S R D E K V
721  aagtttgaggagtcgcgtacgaggctcggtaccttcacatcagccgcgacgagaaggtc

220  E V P M M H Q Q G R F K L A Y D E D L N
781  gaggtaccatgatgcatcagcaaggccggttcaaactcgcctacgacgaggacctcaac

240  C Q I L E M P Y Q G K H L S M L L V L P
841  tgccaaatcctagagatgccttaccaggcaaacatcttagcatgctggtggtggtgcc

260  E K M D A L S T I E T S L T P D I L R R
901  gaaaagatggacgctctgagcaccatcgagacgtccttgacgccagacatactccgtcgc

280  W Q K S M D E V S T M V Q I P K F K L V
961  tggcagaagtctatggacgaggtttccaccatggtccaaatccccaagttcaagctcgtc

```

```

300   H D F V L N E K L A D M G M T D L F S M
1021  cacgatttcgctcctgaatgaaaagctggcggatgaggggatgacggacctgttcagcatg

320   A D A D L S G I T G S R D L H V S Q V I
1081  gcggacgccgacctgtccgggatcacgggttcgcgtgaccttcacgtcagtcaggatcatc

340   H K A F V E V N E E G S E A A A A T A V
1141  cataaggcggtttgtggagggtcaacgaggagggtagcagaggccgcggcgacggcggtg

360   N M M K R S L D G E T F F A D H P F L F
1201  aacatgatgaaacgatcactggatggggagacgttctttgccgaccacccttctctgttc

380   L I R D N D S N S I L F L G R L V R P E
1261  ctgatcagagacaatgactcaaactctatcctgtttcttggtcgactggtgcgaccagaa

400   G L T T K D E L -
1321  ggattaactacaaaggatgaactgtaaagcaaaaaaccattcatgtttttcatttttca
1381  ttagattatctttatttagtctgaattagagttaaactgcaatttccaacacaagaatttg
1441  atcttacacaaatttcaactgaactccagtcctgatcaaggaatgtaattaatccttat
1501  cactacttgataaggactgaagctgattggtcaaaaatttgacagtaactgtttaactttg
1561  attaagaatgacttctaccaacacagatgaactttcaagtgaatttctttattagttgat
1621  aaaggttagacatctaggtaataagatatgtcaaatagcaggtacagtgctcgctgacgaa
1681  aggtagtgatgctacttgaaacatctgacgtttccaaaatcatatccagtttctgctat
1741  ttggcaaatatctttattgtttaaaagtttgaagcttcagagatacacgagatcaatca
1801  tcataattatgatcattatgataaaatgcattatgagaatcacctttggtgcatttcttta
1861  tgtgtgcaaacataagataaaattggctaattgacatactggaagactagaaaattgatg
1921  aaaaaatcatggtgaggaatattgtataaccacgtgtaactgtagtattattagacaa
1981  gtatcatagtataattactatataattatcatagtatatgtgatcatagatcatttcag
2041  tactagtaccaagtaaaagacaacagtcagcccttctgccataaacatttatttcttttga
2101  aatcatatgttactcattagattgaaacagcctttgtatgatgtgacttaagttctgctt
2161  tatgtcaataggtttcttaaccacaataacaacatgtaaaatcaaaaaaaaaaaaaaaaa
2221  aaaaaaaaaa

```

Die abgeleiteten Aminosäuren stehen im Einbuchstabencode mittig über dem zugehörigen Nukleotidtriplett.

Farbmarkierung:

a) Aminosäuresequenz: pot. Signalpeptid: rot; pot. N-Glykosylierungsstellen: türkis; Gelenk und reaktives Zentrum: grün; Serpin-Signatur: gelb; ER-Rückführungssignal: grau (Details: Tab. 8)

b) DNA-Sequenz: pot. Polyadenylierungssignale: grün; Polyadenylierungs-Startpunkte: unterstrichen; „cattt(a/c)ttt“-Motive: gelb

G.2 Sequenzalignment der 3'-Bereiche von Gruppe a und b

```

a   1   R F K L A Y D K D L N C Q V L E M P Y Q
a   1   cggttcaaactcgcctacgacgaggacctcaactgccgtcctagagatgccttaccaa
b  808   cggttcaaactcgcctacgacgaggacctcaactgccgtcctagagatgccttaccaa
b  229   R F K L A Y D E D L N C Q I L E M P Y Q

a   21   G K H L S M L F V L P D K M D A L S T I
a   61   gggaaacatttgagcatgctgtttggtggtgccggacaaagatggacgctctgagcaccatc
b  868   gggaaacatcttagcatgctgtttggtggtgccggacaaagatggacgctctgagcaccatc
b  249   G K H L S M L L V L P E K M D A L S T I

a   41   E T S L T P D L L R R W Q K S M D E V S
a  121   gagacgctcttgacgccagacttactccgctcgctggcagaagttctatggacgaggtttcc
b  928   gagacgctcttgacgccagacttactccgctcgctggcagaagttctatggacgaggtttcc
b  269   E T S L T P D I L R R W Q K S M D E V S

a   61   T M V Q I P K F K L V H D F V L N E K L
a  181   accatggtccaaatccccagttcaagctcgtccacgattttgtcctaaatgaaagcta
b  988   accatggtccaaatccccagttcaagctcgtccacgattttgtcctaaatgaaagctg
b  289   T M V Q I P K F K L V H D F V L N E K L

a   81   A D M G M T D L F S M A D A D L S G I T
a  241   gcggacatggggatgacggacctgttcagcatggcggacgccgacctgtctcgggatcacg
b 1048   gcggacatggggatgacggacctgttcagcatggcggacgccgacctgtctcgggatcacg
b  309   A D M G M T D L F S M A D A D L S G I T

a  101   G S R D L H V N Q V I H K A F V E V N E
a  301   ggttcgctgaccttcacgtcaaccaggtcatccaaaggcgtttgtggaggtcaacgg
b 1108   ggttcgctgaccttcacgtcaaccaggtcatccaaaggcgtttgtggaggtcaacgg
b  329   G S R D L H V S Q V I H K A F V E V N E

a  121   E G S E A A A A T A V N M M K R S L D G
a  361   gagggcagtggaggctgcagcagcgacagcggtgaacatgatgaaacggtccttgacggg
b 1168   gagggcagtggaggctgcagcagcgacagcggtgaacatgatgaaacggtccttgacggg
b  349   E G S E A A A A T A V N M M K R S L D G

a  141   E T F F A D H P F L F L I R D N D S N S
a  421   gagacgttcttgccgaccatcccttctgtttctgatcagggataatgactcaaactct
b 1228   gagacgttcttgccgaccacccttctgtttctgatcaggagacaatgactcaaactct
b  369   E T F F A D H P F L F L I R D N D S N S

a  161   I L F L G R L V R P E G L T T K D E L -
a  481   atcctgtttcttggtcgactggtgcgaccagaaggattaactacaaggatgaactgtag
b 1288   atcctgtttcttggtcgactggtgcgaccagaaggattaactacaaggatgaactgtaa
b  389   I L F L G R L V R P E G L T T K D E L -

a  541   agctaaaaaaccattcatgtttttcatttttcatgagaatatcttaattagtcagaatta
b 1348   agcaaaaaaaccattcatgtttttcatttttcattagattatctttattagtctgaatta
          *                               * * * *

a  601   gagttaaactgcaatttccaacacaagaatttaatctttgcccaaattttcaactgaactc
b 1408   gagttaaactgcaatttccaacacaagaatttgatcttacaaattttcaactgaactc
          * * * *

```

```

a 661 cagtccatatcaaggaatgcaattaatccttatcattccttgataaggactggagctgat
b 1468 cagtcggtatcaaggaatgtaattaatccttatcattacttgataaggactgaagctgat
          *                *                *                *

a 721 tggtcaaaaatttacagtaactgtttaactttgatttagaatgacttctaccaacacaga
b 1528 tggtcaaaaatttgcagtaactgtttaactttgattaagaatgacttctaccaacacaga
          *                *

a 781 tgaactttcaagtgaatttctttattagttgatgaagggttagacatctaggaataagat
b 1588 tgaactttcaagtgaatttctttattagttgataaagggttagacatctaggaataagat
          *

a 841 atgccaaatagctgttacagtgctcactgacgaaaggtaatgcaggctacttgaacatct
b 1648 atgtcaaatagcaggtacagtgctcgctgacgaaaggtagtgatgctacttgaacatct
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

a 901 gacggtttcctaaatcatatccagtttctgctatctggcaaatatctttattgtttaaaa
b 1708 gacg-tttccaaaatcatatccagtttctgctatctggcaaatatctttattgtttaaaa
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

a 961 gtcaggctttgaagcttgtattgaatacgcgagtatcaatcatcatgattatgatcatta
b 1767 gt-----ttgaagcttcag--agatacacgagtatcaatcatcataattatgatcatta
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

a 1021 tgataaatgcattatgagaatcacctttgttgcattt-tttatatgtgcaaacataagaa
b 1819 tgataaatgcattatgagaatcacctttgttgcatttctttatgtgtgcaaacataag--
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

a 1080 tgatgaattggcctaactgacatgctggaaagactggcaaattgattaaaaaaaaatcatagt
b 1877 --ataaattggcctaattgacatactggaaagactagaaaattgatgaaaaaaaaatcatggt
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

a 1140 gaggaatactgtataaccacgtgttaactgta-----agattat-----
b 1935 gaggaatattgtataaccacgtgttaactgtagtattattagacaagtatcatagtatat
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

a 1180 -----tagtattatagtatatgtgatatcatagtatcatttcagtac-----ccaaa
b 1995 tactatatattatcatagtatatgtgatatcatagtatcatttcagtagtagtaccaaag
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

a 1227 aagacaacagtcagtccttctgccataacatttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1282
b 2055 aagacaacagtcagcccttctgccataacatttatttctttgaaatcatatgttact
          *

a -----
b 2115 cattagattgaaacagcctttgtatgatgtgacttaagttctgctttatgtcaataggt

a -----
b 2175 tcttaaccacaaaatacacatgtaaaatcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 2229

```

Die abgeleiteten Aminosäuren stehen im Einbuchstabencode mittig über dem zugehörigen Nukleotidtriplett. Der 5'-Bereich der Sequenz von Gruppe a ist nicht bekannt und daher

beginnt die Nummerierung bei 1. Die Sequenz von Gruppe b repräsentiert die vollständige cDNA-Sequenz von Serpin1.

Farbmarkierung:

a) kodierender Bereich: Differenzen auf Aminosäureebene: rot; stille Basensubstitutionen: türkis; Basensubstitutionen mit Einfluss auf die Aminosäuresequenz: magenta; Serpin-charakteristische Bereiche (Gelenk P15 - P9, reaktive Schleife P1 - P1'): grüne Schrift

b) nicht kodierender Bereich: pot. Polyadenylierungssignale: grün; Polyadenylierungs-Startpunkte: unterstrichen; „cattt(a/c)ttt“-Motive: gelb; Deletionen bzw. Nukleotid-unterschiede: *

G.3 Abkürzungsverzeichnis

α_1 -ACT	α_1 - <u>Ant</u> ichymotrypsin
α_1 -AT	α_1 - <u>Ant</u> itrypsin
α_1 -PI	α_1 - <u>P</u> rotease- <u>I</u> nhibitor
AGT	<u>A</u> ngiotensinogen
Ak	<u>A</u> ntikörper
ARE	<u>A</u> denin-Uracil- <u>r</u> eiche <u>E</u> lemente
ARF1	<u>ARF</u> 1-GTPase
ARF-GAP	<u>ARF</u> 1-spezifisches <u>G</u> TPase- <u>a</u> ktivierendes <u>P</u> rotein
AS	<u>A</u> minosäure
ATIII	<u>A</u> ntithrombin III
BiP	„ <u>b</u> inding protein“
BSA	<u>b</u> ovines <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin
CaM2	<u>C</u> almodulin 2
CIP	„ <u>c</u> alf <u>i</u> ntestinal <u>p</u> hosphatase“
CBP2	<u>C</u> ollagen- <u>b</u> indendes <u>P</u> rotein 2
CF1	„ <u>c</u> leavage <u>f</u> actor 1“
CF2	„ <u>c</u> leavage <u>f</u> actor 2“
CGN	<u>c</u> is- <u>G</u> olgi- <u>N</u> etzwerk
COPI	„ <u>c</u> oating protein complex 1“
COPII	„ <u>c</u> oating protein complex 2“
CPSF	„ <u>c</u> leavage and <u>p</u> olyadenylation <u>s</u> timulation <u>f</u> actor“
CstF	„ <u>c</u> leavage <u>s</u> timulation <u>f</u> actor“
CMA	<u>C</u> arboxymethylaspartat
cv	„ <u>c</u> olumn <u>v</u> olume“
ddNTP	2', 3'- <u>D</u> idesoxy <u>n</u> ukleotid-5'- <u>T</u> riphosphat

dNTP	2'- <u>D</u> esoxynukleotid-5'- <u>T</u> riphosphat
ECL	„ <u>e</u> nhanced <u>c</u> hemiluminescence“
ECM	extrazelluläre <u>M</u> atrix
ER	endoplasmatisches <u>R</u> etikulum
ERAD	<u>ER</u> -assoziierte- <u>D</u> egradation
EST	„ <u>e</u> xpressed <u>s</u> equences <u>t</u> ags“
FPLC	„ <u>f</u> ast <u>p</u> rotein <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography“
GRP94	<u>G</u> lukose-reguliertes <u>P</u> rotein 94 kD
GST	<u>G</u> lutathion- <u>S</u> - <u>T</u> ransferase
HCII	<u>H</u> eparinkofaktor II
HIS ₆	Markierung mit 6 <u>H</u> istidinresten
HRP	„ <u>h</u> orse <u>r</u> adish <u>p</u> eroxidase“
HSP47	<u>H</u> itzeschockprotein 47 kD
MALDI-TOF-MS	„ <u>m</u> atrix <u>a</u> ssisted <u>l</u> aser <u>d</u> esorption / <u>i</u> onization - <u>t</u> ime of <u>f</u> light“
MASP	<u>M</u> annose-bindende Lektin-assoziierte <u>S</u> erinprotease
MCS	„ <u>m</u> ultiple <u>c</u> loning <u>s</u> ite“
NEI	Monozyten / <u>n</u> eutrophiler <u>E</u> lastaseinhibitor
NIa	„ <u>n</u> uclear <u>i</u> nclusion <u>a</u> “-Protein von TEV
NTA	„ <u>n</u> itrilotriacetic acid“
OD _{xxx}	optische <u>D</u> ichte bei xxx nm
ORF	„ <u>o</u> pen <u>r</u> eadin <u>f</u> rame“
PAI1	<u>P</u> lasminogenaktivator- <u>I</u> nhibitor-1
PAI2	<u>P</u> lasminogenaktivator- <u>I</u> nhibitor-2
PAP	<u>P</u> oly(<u>A</u>)- <u>P</u> olymerase
PABPI	<u>P</u> oly(<u>A</u>)-bindendes <u>P</u> rotein I
PC	<u>P</u> rohormon- / <u>P</u> roproteinkonvertase
PCI	<u>P</u> rotein <u>C</u> - <u>I</u> nhibitor
PDI	<u>P</u> rotein- <u>D</u> isulfid- <u>I</u> somerase
PEDF	„ <u>p</u> igment <u>e</u> pithelium- <u>d</u> erived <u>f</u> actor“
Pol II-CTD	<u>C</u> -terminale <u>D</u> omäne der großen Untereinheit der RNA- <u>P</u> olymerase II
QC	<u>Q</u> ualitäts <u>k</u> ontrolle
RCL	„ <u>r</u> eactive <u>c</u> enter <u>l</u> oop“
RLM-RACE	„ <u>R</u> NA <u>l</u> igase- <u>m</u> ediated <u>r</u> apid <u>a</u> mplification of 5' and 3' <u>c</u> DNA <u>e</u> nds“
SCCA1	„ <u>s</u> quamous <u>c</u> ell <u>c</u> arcinoma <u>a</u> ntigen 1“
SCCA2	„ <u>s</u> quamous <u>c</u> ell <u>c</u> arcinoma <u>a</u> ntigen 2“
SRP	„ <u>s</u> ignal <u>r</u> ecognition <u>p</u> article“
TAP	„ <u>t</u> obacco <u>a</u> cid <u>p</u> rophosphatase“
TBG	<u>T</u> hyroxin-bindendes <u>G</u> lobulin
TEV	„ <u>t</u> obacco <u>e</u> tch <u>v</u> irus“, Tabakäzvirus
TGN	<i>trans</i> - <u>G</u> olgi- <u>N</u> etzwerk
TRITC	<u>T</u> etramethylrhodamin- <u>I</u> sothiocyant (rot fluoreszierender Farbstoff)
UTR	„ <u>u</u> ntranslated <u>r</u> egion“
VTC	vesikuläre tubuläre <u>C</u> luster

Abkürzungen für Chemikalien s. C.1.2

G.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Branchiostoma lanceolatum</i>	4
Abbildung 2: Schematischer Längs- und Querschnitt von <i>Branchiostoma lanceolatum</i>	4
Abbildung 3: Molekülstruktur eines Serpins.....	6
Abbildung 4: „Branched pathway“-Modell.....	8
Abbildung 5: Biologische Funktionen einiger humaner Serpine.....	10
Abbildung 6: Darstellung der an der Polyadenylierung beteiligten Faktoren.....	12
Abbildung 7: Modell zur Rückführung ER-residenter Proteine mit KDEL-Signal.....	17
Abbildung 8: Gelbild der DNA-Längenstandards.....	31
Abbildung 9: Schematische Darstellung einer reversen Transkription.....	37
Abbildung 10: Schema der FPLC-Anlage	60
Abbildung 11: Kontrolle der reversen Transkription durch Calmodulin 2-spezifische PCR...	69
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Primerpositionen zur Amplifikation des 3'-Bereichs der Serpin1-cDNA.....	70
Abbildung 13: PCR-Produkte von <i>Branchiostoma lanceolatum</i> -cDNA mit Serpin1- spezifischen Primern.....	71
Abbildung 14: Seminested PCR zur Produkt-Charakterisierung (Primerkombination BL2_f2 / GeneRacer3'nested).....	72
Abbildung 15: Schematische Darstellung der Plasmidinserts und die Zuordnung zu den Sequenzgruppen.....	74
Abbildung 16: Kontrolle der reversen Transkription mittels Amplifikation des 5'-Bereichs der Calmodulin 2-cDNA.....	76
Abbildung 17: Nested PCR mit der Primerkombination GeneRacer5'-nested / BL2_r2 zur Amplifikation des 5'-Bereichs der cDNA von Serpin1.....	77
Abbildung 18: PCR-Amplifikation des gesamten kodierenden Bereichs der cDNA von Serpin1 mit der Primerkombination BL2_b5'+ / BL2_b3'-.....	79
Abbildung 19: Ermittlung der optimalen Anlagerungstemperatur des Primers BL2_r3a.....	80
Abbildung 20: Sequenz der cDNA für Serpin1 von <i>Branchiostoma lanceolatum</i>	82
Abbildung 21: Aminosäuresequenzen der reaktiven Schleifen (Positionen P17 - P2') von humanem Antithrombin III und Serpin1 von <i>Branchiostoma lanceolatum</i>	84
Abbildung 22: 5'-Bereich der Serpin1-cDNA und die abgeleitete Proteinsequenz.....	86
Abbildung 23: Modell der Tertiärstruktur von Serpin1.....	88

Abbildung 24: Sekundärstrukturelemente des Serpin1-Proteinmodells.....	89
Abbildung 25: Alignment der kodierenden 3'-Bereiche der cDNA von Gruppe a und b	90
Abbildung 26: Alignment der nicht translatierten 3'-Bereiche der cDNA-Sequenzen der Gruppen a und b.....	93
Abbildung 27: Primer zur Konstruktion des GST / TEV / Serpin1-Konstrukts.....	96
Abbildung 28: Karte des Konstrukts pUT19.....	97
Abbildung 29: Wachstumskurven unter dem Einfluss von IPTG.....	99
Abbildung 30: Einfluss verschiedener IPTG-Konzentrationen auf die Proteinexpression.....	100
Abbildung 31: Einfluss verschiedener IPTG-Konzentrationen auf die Proteinexpression nach Normierung auf eine OD ₆₀₀ von 1,85.....	100
Abbildung 32: Elutionsprofil einer Fusionsprotein-Aufreinigung an Glutathion-Sepharose.	102
Abbildung 33: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Elutionsfraktionen einer Fusionsprotein-Aufreinigung an Glutathion-Sepharose.....	103
Abbildung 34: Spaltung des Fusionsproteins mit TEV-Protease.....	105
Abbildung 35: Versuch zur Entfernung der His ₆ -markierten GST und TEV-Protease.....	107
Abbildung 36: Darstellung der Teilergebnisse einer Serpin1-Aufreinigung.....	109
Abbildung 37: Bildung SDS-stabiler Komplexe zwischen Thrombin und Serpin1.....	111
Abbildung 38: Nachweis der Spezifität und Ermittlung der Nachweisgrenze von Serpin1 mittels der Antiseren von 3 Kaninchen.....	112
Abbildung 39: Nachweis von gereinigtem Serpin1 bzw. GST-Serpin1-Fusionsprotein und der Thrombinkomplexe mit dem Antiserum von Kaninchen 1.....	113
Abbildung 40: Nachweis von Serpin1 im Rohextrakt von <i>Branchiostoma lanceolatum</i>	114
Abbildung 41: Versuche zur immunhistologischen Lokalisation von Serpin1 in Querschnitten von <i>Branchiostoma lanceolatum</i>	116

G.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Größen der für den 3'-Bereich der Calmodulin 2-spezifischen PCR-Produkte.....	68
Tabelle 2: Abstände der Serpin1-spezifischen Plus-Strangprimer.....	70
Tabelle 3: Plasmidkonstrukte mit PCR-Produkten des 3'-Bereichs der cDNA von Serpin1....	73
Tabelle 4: Aufbau der Plasmidinserts mit den 3'-cDNA-Varianten von Serpin1.....	75
Tabelle 5: Größen der für den 5'-Bereich der Calmodulin 2-spezifischen PCR-Produkte.....	76
Tabelle 6: Nukleotidzusammensetzung und GC-Gehalt der cDNA von Serpin1.....	83
Tabelle 7: Merkmale der cDNA von Serpin1.....	83
Tabelle 8: Charakteristische Merkmale der abgeleiteten Proteinsequenz von Serpin1.....	87
Tabelle 9: Basensubstitutionen zwischen den Gruppen a und b.....	91
Tabelle 10: Positionen von Basensubstitutionen mit Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz und die Lokalisation im Strukturmodell von Serpin1.....	92
Tabelle 11: Substitutionen im nicht translatierten 3'-Bereich der Gruppen a und b.....	94
Tabelle 12: Postulierte Polyadenylierungssignale der verschiedenen cDNA-Varianten.....	95
Tabelle 13: Verlauf der OD ₆₀₀ unter dem Einfluss verschiedener IPTG-Konzentrationen.....	98
Tabelle 14: Vergleich der auf eine OD ₆₀₀ von 1,85 normierten Fusionsprotein-Banden.....	101
Tabelle 15: Konzentration des Fusionsproteins in den Fraktionen einer Glutathion- Sephrose-Aufreinigung.....	103
Tabelle 16: Relative Serpin1-Menge (% der Kontrolle K) im Überstand.....	107
Tabelle 17: Relative GST-Menge (% der Kontrolle K) im Überstand.....	107

G.6 Danksagung

Danken möchte ich Prof. Dr. H. Ragg für die Möglichkeit die Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen, für das gestellte Thema, die Unterstützung und die vielen literarischen Tipps.

Bei HD Dr. K. Niehaus, Fakultät für Biologie bedanke ich mich herzlich, dass er sich die Zeit zur Übernahme des Zweitgutachtens genommen hat.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. E. Pistorius, Fakultät für Biologie, für die Benutzung der Frenchpress-Anlage,
wie auch Dr. P. Heinmann und R. Piwek, Fakultät für Biologie, für die tatkräftige Unterstützung bei den immunhistologischen Experimenten.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei allen ehemaligen und aktiven Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Zelluläre Genetik“, insbesondere Mareke Oley und Dr. Olaf Krüger für die vielen, sicherlich anstrengenden Stunden beim Korrekturlesen der Arbeit, sowie Ralf Eckert für seine offenen Worte,
und nicht zu vergessen allen Mitgliedern der AG Zellkulturtechnik und von BiBiTec.

Olaf Brockmann-Gretza, Matthias Fricke und Dr. Sven Brand danke ich für die geregelten Kaffeepausen über inzwischen mehr als ein Jahrzehnt.

Anke Nodop danke ich dafür, dass Sie es trotz allem so lange mit mir ausgehalten hat und natürlich meiner Familie für die ausdauernde Unterstützung.

Im Grunde danke ich all jenen, die meine Launen ertragen mussten und mich dennoch mit großen und noch mehr kleinen Dingen unterstützt haben.