

**Molekular- und zellbiologische Studien zur Evolution und
subzellulären Lokalisation humaner Parvulin-Proteine**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs

Biologie und Geografie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Daniel Keßler

aus Lüdenscheid

im Oktober 2007

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Zentrum für Medizinische Biotechnologie (ZMB), Arbeitsgruppe Strukturelle und Medizinische Biochemie an der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Bayer

2. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Hoffmann

3. Gutachter:

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Bernd Sures

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2007

Where blind belief and science meet we're defending Darwin's throne!

(Heaven Shall Burn, *Biogenesis*)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	12
1.1 Peptidyl-Prolyl <i>cis/trans</i> Isomerasen	12
1.2 Die Parvuline	14
1.3 Mitochondrien: Import von Proteinen und das mitochondriale Proteom	18
1.4 Primaten: Systematik und Evolution	19
1.5 Zielsetzung der Arbeit	21
2. Material und Methoden	22
2.1 <i>In silico</i> Analyse des Parvulin-Gens und seiner Promotorregion	22
2.1.1 Vergleich der Genstrukturen	22
2.1.2 Analyse der Promotorregionen	23
2.2 Phylogenetische Analyse zum Auftreten eines offenen Leserahmens für Par17 innerhalb der Ordnung der Primaten	24
2.3 Subzelluläre Lokalisation der Parvuline	27
2.3.1 Vorhersage der Lokalisation von Par14 und Par17 mit verschiedenen Algorithmen	27
2.3.2 Nachweis von endogenem Parvulin in HeLa-Zellen durch Zellfraktionierung und Western Blotting	27
2.3.3 Lokalisationsbestimmung mit überexprimierten Parvulin-EGFP-Fusionsproteinen	30
2.4 Funktionelle Studien: DNA-Bindung durch Par17	35

3. Ergebnisse	38
3.1 <i>In silico</i> Analyse des Parvulin-Gens und seiner Promotorregion	38
3.1.1 Vergleich der Genstrukturen	38
3.1.2 Analyse der Promotorregionen	40
3.2 Phylogenetische Analyse zum Auftreten eines offenen Leserahmens für Par17 innerhalb der Ordnung der Primaten	42
3.3 Subzelluläre Lokalisation der Parvuline	49
3.3.1 Vorhersage der Lokalisation der Parvuline mit verschiedenen Algorithmen	49
3.3.2 Nachweis von endogenem Parvulin in HeLa-Zellen durch Zellfraktionierung und Western Blotting	50
3.3.3 Lokalisationsbestimmung mit überexprimierten Parvulin-EGFP-Fusionsproteinen	51
3.4 Funktionelle Studien: DNA-Bindungseigenschaften von Par17	55
4. Diskussion	57
4.1 Struktur und Evolution des Parvulin-Gens: Bioinformatik und phylogenetische Studien	57
4.2 Subzelluläre Lokalisation der humanen Parvuline	59
4.3 Die Regulation der Expression von Par14 und Par17	63
4.4 Die Funktion der Parvuline Par14 und Par17 in der Zelle	63
4.5 Die Rolle von Par17 in der Primatenevolution	67

5. Zusammenfassung	70
6. Literatur	72
Danksagung	81
Lebenslauf	82
Publikationsliste	84
Erklärungen	85

Abkürzungen

3D	dreidimensional
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cDNA	<i>complementary DNA</i>
COX	Cytochrom C Oxidase
D-MEM	<i>Dulbecco´s modified Eagle´s Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiotreitol
E _A	Aktivierungsenergie
ECACC	European Cell Culture Collection
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
g	Gramm
x g	Fallbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HDAC	Histon-Deacetylierungskomplex
HMG	<i>High mobility group protein</i>
FKBP	<i>FK506 binding protein</i>
Inr	Initiator (Konsensus-Sequenz)
l	Liter
kDa	Kilodalton
kJ	Kilojoule
LB	Luria-Bertani (Medium)
m	milli
mA	Milliampere
MEM	<i>Minimum essential medium</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

ml	Milliliter
mM	millimolar (mmol/l)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mtDNA	mitochondriale DNA
nt	Nukleotide
ORF	<i>Open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PPIase	Peptidyl-Prolyl <i>cis/trans</i> Isomerase
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TIM	<i>Translocase of the inner membrane</i>
TOM	<i>Translocase of the outer membrane</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymaktivität)
V	Volt
VDAC	<i>Voltage dependent anion channel</i>
ZMB	Zentrum für Medizinische Biotechnologie, Universität Duisburg-Essen

Für chemische Elemente, Aminosäuren sowie Nukleinsäuren und deren Bestandteile wurden die gängigen IUPAC-Codes verwendet (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/>).

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 <i>cis</i> / <i>trans</i> Isomerisierung durch PPIasen am Beispiel einer Serin-Prolin Bindung	13
Abb. 2 A&B A Schematische Darstellung der Expression von Par14 und Par17 vom Parvulin-Gen B Die Präsequenz des Par17 bildet eine Helix	17
Abb. 3 Schematische Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaft aller in dieser Arbeit untersuchten Anthropoiden	20
Abb. 4 A&B A Schematische Darstellung aller Parvulin-EGFP-Konstrukte und der zur Amplifizierung benutzten Primer B Sequenzen der Primer	31
Abb. 5 Exon-Intron-Struktur des Parvulin-Genes in den acht untersuchten Wirbeltieren, deren Sequenz über die ENSEMBL-Datenbank erhältlich war	39
Abb. 6 Alignment der über den ENSEMBL Genome Browser erhältlichen Sequenzen des Exon 1 des Parvulin-Genes von Mensch, Rhesusaffe und Rind	40
Abb. 7 Auftrennung der PCR-Produkte für die phylogenetische Analyse auf Agarose-Gelen	44
Abb. 8 A&B Alignments der analysierten Abschnitte der Exons 1 (Teil B) und 3 (Teil A) des Parvulin-Genes	46
Abb. 9 Schematische Darstellung der Entwicklung der Prä-Sequenz des Par17 innerhalb der Anthropoiden	48

Abb. 10 Nachweis von endogenem Par17 in HeLa Zell-Fractionen	51
Abb. 11 A & B Expression von Parvulin-EGFP-Fusionsproteinen in HeLa-Zellen	53
Abb. 12 Schematische Darstellung der Parvulin-EGFP-Konstrukte, die in HeLa Zellen exprimiert wurden, mit den entsprechenden Kolokalisierungswerten	54
Abb. 13 Bindung von Par14 und Par17 an DNA-Cellulose	56
Abb. 14 A&B Ergebnisse der <i>In vitro</i> Import Experimente mit isolierten Mitochondrien	61

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Über die ENSEMBL Datenbank bezogene Sequenzen des Parvulin-Gens	22
Tab. 2 Von der ECACC bezogene genomische Primaten DNA	24
Tab. 3 Primer für die Amplifizierung der Exons 1 und 3 des Parvulin-Gens	25
Tab. 4 a&b Pipettierschema und Programm der PCR zur Amplifizierung der Parvulin-Genabschnitte für die phylogenetischen Analyse	26
Tab. 5 Zur Vorhersage der Lokalisation der Parvuline verwendete Algorithmen	27
Tab. 6 Zur Charakterisierung der Zell-Fractionen verwendete primäre Antikörper	30
Tab. 7 a&b Pipettierschema und Programm der PCR für die Parvulin-EGFP-Konstrukte	32
Tab. 8 GC-Gehalt und CpG-Rate der Promotorregion sowie der 3'-Region des Parvulin-Gens in allen untersuchten Wirbeltieren	41
Tab. 9 <i>Accession Numbers</i> der Datenbankeinträge, unter denen die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen der Exons 1 und 3 des Parvulin-Gens in der EMBL <i>Nucleotide Sequence Database</i> zu finden sind	47
Tab. 10 Wahrscheinlichkeiten für eine mitochondriale Lokalisation von Par14, Par17-QR und Par17-RS berechnet mit fünf verschiedenen Vorhersage-Algorithmen	49

1. Einleitung

1.1 Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen

Die Funktion eines Proteins wird maßgeblich durch seine dreidimensionale Struktur bestimmt. Definierte Bereiche eines Proteins interagieren mit Substraten, weiteren Proteinen oder Nukleinsäuren. Konformationsänderungen können regulatorisch wirken, indem Proteine von der inaktiven in eine aktive Form überführt werden. Für die biologische Aktivität eines Proteins ist eine korrekte räumliche Struktur seiner Domänen also unerlässlich. Abweichungen von der nativen Konformation können durch Austausch von Aminosäuren oder Fehler bei der Faltung der Polypeptidkette entstehen und führen fast immer zu Einschränkung oder völligem Verlust der Proteinfunktion.

Der größte Teil der Peptidbindungen innerhalb einer Peptidkette liegt in der *trans*-Konformation vor und die Faltung ist ein sehr schneller Prozess, der innerhalb von Sekunden oder sogar Millisekunden abläuft (Goethel & Marahiel 1999). Peptidyl-Prolyl-Bindungen, also Peptidbindungen mit einem C-terminalen Prolin, liegen in nativen Proteinen zu etwa 10% in der *cis*-Konformation vor. Die Energieniveaus beider Zustände unterscheiden sich nur geringfügig, die Aktivierungsenergie, die beim Übergang vom *trans*- zum *cis*-Zustand überwunden werden muss, ist jedoch mit ca. 85 kJ/mol sehr hoch (s. Abb. 1). Daher stellt diese Isomerisierung den limitierenden Schritt bei der Proteinfaltung dar (Brandts *et al.* 1975). Die Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen (PPlasen) beschleunigen diese Reaktion und spielen dadurch eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung. PPlasen sind nicht nur an der Protein-*de novo*-Synthese und der Rückfaltung denaturierter Proteine beteiligt, sondern auch an der Regulation grundlegender zellulärer Prozesse wie der Transkription und des Zellzyklus (Shaw 2002).

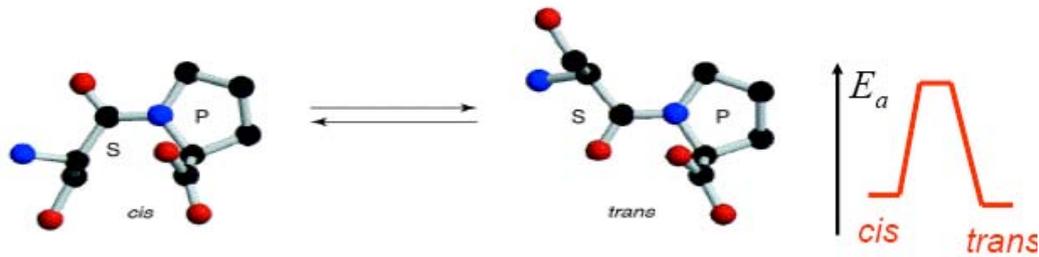


Abb. 1 *cis* / *trans* Isomerisierung durch PPIasen am Beispiel einer Serin-Prolin Bindung. In nativen Proteinen liegen etwa 10% der Peptidbindungen mit C-terminalem Prolin in der *cis*-Konformation vor. Die Aktivierungsenergie E_a , die beim Übergang von der *trans*- zur *cis*-Konformation überwunden werden muss, beträgt etwa 85 kJ/mol.

Die katalytische PPIase-Aktivität wurde 1984 von Fischer *et al.* erstmals beschrieben. Seitdem wurden zahlreiche pro- und eukaryontische PPIasen identifiziert. Nach der klassischen Definition werden drei Familien von PPIasen unterschieden: Die Cyclophiline, die FK506 bindenden Proteine (FKBPs) und die Parvuline (Shaw 2002). Diese drei Gruppen zeigen keine Sequenzhomologie zueinander und unterscheiden sich bezüglich der Hemmung durch spezifische Inhibitoren. Die ersten beiden Gruppen werden durch Immunsuppressiva gehemmt, die Cyclophiline durch Cyclosporin A, die FKBPs durch FK506 und Rapamycin (Göthel & Marahiel 1999). Die Parvuline hingegen werden durch diese Substanzen nicht beeinflusst, jedoch wurde für einige Parvuline eine irreversible Hemmung durch Juglon (5-Hydroxy-1,4-Naphtochinon) nachgewiesen (Hennig *et al.* 1998).

In menschlichen Zellen wurden bislang 17 Cyclophiline, die hauptsächlich im Zellkern und im Cytoplasma lokalisiert sind, und 13 FKBPs, die vor allem im Cytoplasma und im endoplasmatischen Reticulum zu finden sind, beschrieben (Fanghaenel & Fischer 2004, Pemberton & Kay 2005). Aus der Gruppe der Parvuline, die vornehmlich im Zellkern sowie im Cytoplasma lokalisiert sind (Pemberton & Kay 2005), waren bislang zwei Vertreter in menschlichen Zellen bekannt, ein drittes menschliches Parvulin wurde kürzlich identifiziert. Der folgende Abschnitt widmet sich der Beschreibung dieser drei Proteine.

1.2 Die Parvuline

Das für die gesamte Familie namens gebende Parvulin wurde aus *E. coli* isoliert und aufgrund seiner molaren Masse von 10 kDa Parvulin 10 (Par10) genannt (Rahfeld *et al.* 1994). Der Name leitet sich vom lateinischen Wort „parvulus“ für „klein“ ab. In einigen Arbeiten der letzten Jahre wurden auch verschiedene andere Bezeichnungen für bestimmte Parvulin-Proteine verwendet, wie zum Beispiel EPHV (*Eukaryotic Parvulin Homologue*) in Rulten *et al.* 1999 oder auch die in vielen Datenbanken zu findende Bezeichnung PIN4 für das menschliche Par14. Bei den in dieser Arbeit untersuchten und beschriebenen Parvulinen soll jedoch die oben genannte Nomenklatur der Parvuline beibehalten werden.

Neben dem *E. coli* Par10 wurden zahlreiche pro- und eukaryontische Parvuline identifiziert, z.B. das periplasmatische SurA aus *E. coli* (Tormo *et al.* 1990, Lazar & Kolter 1996), ESS1 aus *Saccharomyces cerevisiae* (Hani *et al.* 1995), PIN1 aus *Arabidopsis thaliana* (AtPIN1) (Landrieu *et al.* 2000) und PIN1 aus der Maus *Mus musculus* (MmPIN1) (Fujimori *et al.* 2001). Kürzlich wurde auch das erste Parvulin in Archaeen, das CsPIN aus *Cenarchaeum symbiosum*, beschrieben (Maruyama *et al.* 2004).

Bis vor kurzem waren nur zwei Parvuline in menschlichen Zellen bekannt, PIN1 und Parvulin 14 (Par14). PIN1 ist funktional und strukturell gut untersucht. Es besteht aus einer N-terminalen WW-Domäne, deren Name sich von zwei Tryptophan-Resten herleitet (Bayer *et al.* 2003) sowie der PPlase-Domäne. Diese ist für die katalytische Aktivität des PIN1 verantwortlich und bindet mit hoher Affinität Sequenzen mit phosphorylierten Aminosäuren N-terminal zum isomerisierten Prolin, wobei insbesondere Sequenzen des Typs phosphoSer-Pro und phosphoThr-Pro als bevorzugte Substrate des PIN1 beschrieben wurden (Ranganathan *et al.* 1997).

Die Funktion des PIN1 liegt in der Regulation des Zellzyklus. Es wurde eine Interaktion von PIN1 mit den phosphorylierten Formen von Cdc25 (*cell division cycle*) und Plx1 (*polo-like kinase*) nachgewiesen, wichtigen Regulatoren von Cdc2, welches für den Eintritt der Zelle in die Mitose verantwortlich ist (Crenshaw *et al.* 1998). Ferner konnte gezeigt werden, dass PIN1 mit Histon-Deacetylierungskomplexen (HDAC) interagiert (Wu *et al.* 2000, Arévalo-Rodríguez *et al.* 2000). Die Deacetylierung von Histonen ist für die Chromatin-Remodellierung verantwortlich, wodurch die Transkription von an der Mitose beteiligten Genen reguliert wird (Brehm

et al. 1998). PIN1 hemmt die HDAC Aktivität, ein *knock out* von PIN1 führt zu erhöhter HDAC Aktivität und damit zu einer Repression von Genen des Zellzyklus, wodurch es zum Stillstand des Zellzyklus in der G2 Phase kommt (Wu *et al.* 2000, Arévalo-Rodríguez *et al.* 2000). Außerdem wurde eine für die Zellen essentielle Assoziation von ESS1, dem PIN1 Homologen aus *Saccharomyces cerevisiae*, mit der RNA Polymerase II und somit eine Rolle bei der Transkriptions-Regulation nachgewiesen (Wu *et al.* 2000).

In verschiedenen Tumorgeweben wurde eine Überexpression von PIN1 beobachtet (Lu 2003, Wulf *et al.* 2004). Daher stellt das PIN1 ein viel versprechendes Zielmolekül für die Diagnostik und Therapie von Tumorerkrankungen dar ("One of the hottest targets for medicinal chemistry", Landrieu *et al.* 2006) und verschiedene Studien haben sich in den letzten Jahren mit der Identifizierung von Inhibitoren des PIN1 beschäftigt (Hennig *et al.* 1998, Uchida *et al.* 2003, Bayer *et al.* 2005).

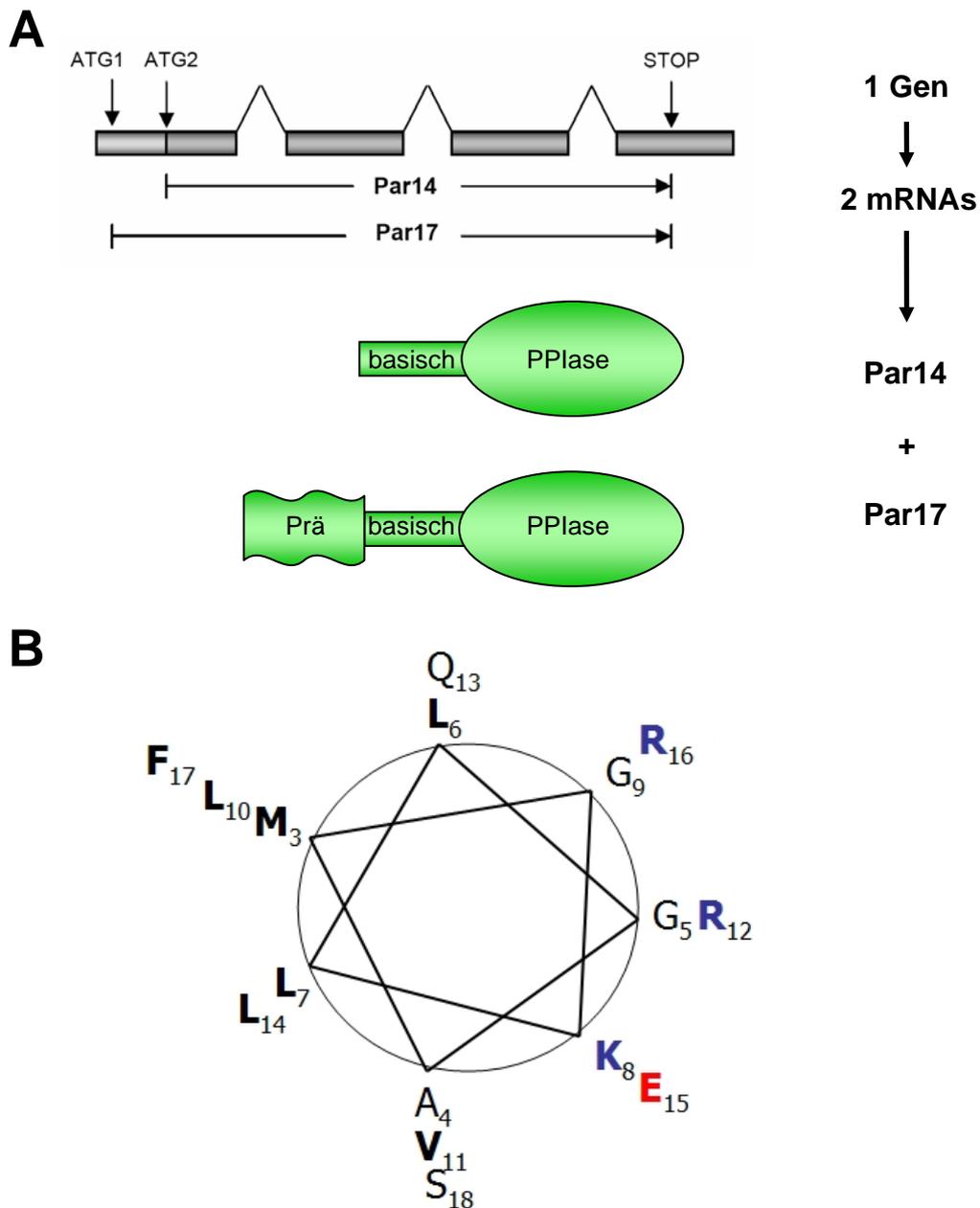
Das humane Par14 weist in der PPlase-Domäne eine ähnliche Struktur wie PIN1 auf, verfügt aber statt der WW-Domäne über eine basische Domäne. Diese ist unstrukturiert und trägt vermutlich ein Kernlokalisierungssignal (Reimer *et al.* 2003). Außerdem ist die basische Domäne für die DNA-Bindungseigenschaften verantwortlich: Par14 bindet unter physiologischen Salzkonzentrationen mit hoher Affinität an AT-reiche gebogene DNA Abschnitte (Surmacz *et al.* 2002). Solche AT-reichen Sequenzen spielen eine Rolle bei der Positionierung der Nukleosomen (Segal *et al.* 2006) und der Transkriptionsinitiation (z. B. TATA-Box). Uchida *et al.* vermuteten 2003, dass PIN1-*knock outs* in Metazoen im Gegensatz zu Hefen nicht letal sind (Fujimori *et al.* 1999), weil diese Organismen fehlendes PIN1 durch Par14 oder Homologe ersetzen können. Jedoch kann Ess1, das einzige Parvulin Homologe der Hefe, durch PIN1 komplementiert werden (Lu *et al.* 1996), nicht aber durch Par14 (Metzner *et al.* 2001). Das sind Hinweise darauf, dass die zelluläre Funktion von Par14 und PIN1 ähnlich, aber nicht gleich ist.

Kürzlich wurde ein drittes humanes Parvulin in menschlichen Zellen identifiziert, welches eine N-terminal um 25 Aminosäuren verlängerte Variante des Par14 darstellt (Mueller *et al.* 2006). Als erster Hinweis auf die Existenz dieses Proteins wurde ein entsprechender *Expressed Sequence Tag* (EST) bei Datenbankrecherchen entdeckt. Später wurde mittels *real time* PCR die Expression der verlängerten mRNA in verschiedenen menschlichen Geweben bestätigt, wobei der Anteil des verlängerten Proteins am gesamten Parvulin (Par14 und verlängerte Form) in den cDNAs

verschiedener Gewebe zwischen 0,2 % und 2,6 % liegt (Mueller *et al.* 2006). Da die molare Masse des Proteins etwa 17 kDa beträgt, wurde es in Analogie zur oben beschriebenen Nomenklatur der Parvuline Par17 genannt (Mueller *et al.* 2006).

Durch das Auftreten eines gekoppelten zweifachen *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) kommt es zu zwei Isoformen des Par17. Diese unterscheiden sich durch den Austausch von zwei Aminosäuren innerhalb des Prä-Peptids an den Positionen 16 und 18. Die zwei möglichen Isoformen sind Q16/R18 (Aminosäure 16 = Glutamin, 18 = Arginin) und R16/S18 (Aminosäure 16 = Arginin, 18 = Serin). Wenn in den folgenden Kapiteln explizit zwischen beiden Isoformen des Par17 unterschieden werden soll, so werden diese als Par17-QR und Par17-RS bezeichnet.

Da Par14 und Par17 in der basischen und der PPIase-Domäne eine identische Aminosäuresequenz aufweisen und das menschliche Genom nur über einen Parvulin-Locus verfügt, wurde vermutet, dass beide Parvuline durch dieses Gen codiert werden. Das Auftreten verschieden langer mRNAs kann durch alternative Transkriptionsinitiation erklärt werden. Abbildung 2A zeigt eine schematische Darstellung der Expression von Par14 und Par17. Die N-terminale Verlängerung des Par17 bildet laut Vorhersage eine amphipatische Helix (s. Abb. 2B). Solche Helices können Signal-Sequenzen zum Transport des Proteins in die Mitochondrien darstellen (von Heijne 1986). Es war daher interessant, den Einfluss der Prä-Sequenz auf die Verteilung der Parvuline innerhalb der Zelle genauer zu untersuchen.

**Abb. 2 A&B**

A) Schematische Darstellung der Expression von Par14 und Par17 vom Parvulin-Gen. Durch Nutzung alternativer Transkriptionsstartpunkte kommt es zur Bildung verschiedener mRNAs.

B) Die Präsequenz des Par17 bildet eine Helix. In der Darstellung der Prä-Sequenz als *helical wheel* wird deutlich, dass es sich um eine amphipatische Helix mit einer hydrophoben und einer positiv geladenen Seite handelt.

1.3 Mitochondrien: Import von Proteinen und das mitochondriale Proteom

Die Mitochondrien sind vor ca. zwei Milliarden Jahren aus bakteriellen Endosymbionten, vermutlich aus der Gruppe der Alpha-Proteobakterien, entstanden (Gray *et al.* 1999). Im Verlauf der Evolution hat sich die Zusammensetzung des Proteinbestandes der Mitochondrien jedoch grundlegend verändert. Aufgrund der endosymbiontischen Lebensweise wurde eine Vielzahl funktioneller Gruppen von Genen nicht mehr benötigt. Einige der ursprünglichen bakteriellen Prozesse konnten durch die Wirtszelle ersetzt werden (z.B. die Aminosäure-Synthese), andere Funktionen wurden für die Zelle überflüssig (z.B. die anaerobe Glykolyse) (Gray *et al.* 1999). Mittlerweile sind nur noch etwa 15% des mitochondrialen Proteoms bakteriellen Ursprungs (Gabaldón & Huynen 2004).

Der größte Teil des heutigen Proteinrepertoires der Mitochondrien ist nukleär codiert, wird im Cytoplasma synthetisiert und in die Mitochondrien importiert. Um die im Cytosol synthetisierten Proteine als mitochondrial zu kennzeichnen, sind sie mit Targeting-Sequenzen versehen, die den gezielten Transport dieser Proteine in die Mitochondrien gewährleisten. Diese Targeting-Sequenzen werden oftmals durch Rekombination, Duplikation oder andere Ereignisse zwischen verschiedenen Genen ausgetauscht, so dass theoretisch jedes beliebige nukleär codierte Protein im Verlauf der Evolution in die Mitochondrien rekrutiert werden kann (Kadowaka *et al.* 1996, Gabaldón & Huynen 2004).

Die Synthese der mitochondrialen Proteine im Cytosol macht eine Importmaschinerie zum Transport der Proteine in die Mitochondrien nötig. Beim Transport von Proteinen in den Intermembranraum muss die äußere Membran passiert werden, beim Transport in die Matrix auch die innere Membran. Es gibt zwei Arten von Targeting-Signalen, mit denen Proteine als mitochondrial markiert werden können: N-terminale Prä-Peptide, die eine amphipatische Helix bilden, und interne Signal-Sequenzen, von denen oftmals mehrere in einem Protein enthalten sind. Die positiv geladene amphipatische Helix stellt zwar das klassische N-terminale Targeting-Signal dar (von Heijne 1986), jedoch wurden mittlerweile auch eine oder mehrere negative Ladungen innerhalb einer solchen helicalen Targeting-Sequenz beschrieben (Mukhopadhyay *et al.* 2003). Proteine mit N-terminalen Targeting-Signalen werden bis in die Matrix transportiert, die Prä-Peptide werden meist nach dem Import abgespalten. Proteine

mit internen Signalen werden in die innere oder äußere Membran der Mitochondrien eingelagert oder bleiben im Intermembranraum, die Signal-Sequenzen verbleiben im Protein. Für den Transport durch die Membranen sind Multienzymkomplexe verantwortlich. In der äußeren Membran ist das der *translocase of the outer membrane* (TOM) Komplex, welcher Komponenten zur Erkennung von N-terminalen und integralen Targeting-Signalen enthält. Der Transport über die innere Membran geschieht über die beiden *translocase of the inner membrane* (TIM) Komplexe. Der TIM23 Komplex transportiert Proteine mit N-terminaler Targeting-Sequenz in die Matrix, der TIM22 Komplex transportiert und inseriert integrale Proteine der inneren Membran mit internen Targeting-Sequenzen (Prinz *et al.* 2002, Herrmann & Hell 2005, Milenkovic *et al.* 2007, Neupert & Herrmann 2007).

1.4 Primaten: Systematik und Evolution

Die Systematik der Primaten wurde in den letzten Jahren nicht immer einheitlich beschrieben, verschiedene Autoren kommen zu unterschiedlichen Ansichten der verwandtschaftlichen Verhältnisse. Die in dieser Arbeit verwendete und im Folgenden dargestellte Phylogenie der Primaten orientiert sich an Storch & Welsch (1997), Goodman *et al.* (2005) und Glazko & Nei (2003). Demnach bilden Mensch, Schimpanse, Gorilla und Orang-Utan die Gruppe der Großen Menschenaffen oder *Hominidae*. Mensch und Schimpanse weisen einen gemeinsamen Vorfahren auf und sind somit innerhalb der Hominiden am engsten miteinander verwandt. Der Orang-Utan hat sich als erster vom Zweig der drei übrigen Hominiden abgespalten und ist somit phylogenetisch am weitesten von diesen entfernt. Gemeinsam mit den Gibbons (*Hylobatidae*) bilden die *Hominidae* die Gruppe der Menschenaffen oder *Hominoidea*. Die Auftrennung der Menschenaffen in diese zwei Gruppen fand vor etwa 16 Millionen Jahren statt. Vor etwa 23 Millionen Jahren trennte sich der Ast der Menschenaffen von dem der Altweltaffen, zu denen u.a. der Pavian und der Rhesusaffe gehören. Menschenaffen und Altweltaffen gemeinsam werden auch als *Catarrhini* bezeichnet. Zusammen mit den Neuweltaffen (*Platyrrhini*) stellen die *Catarrhini* im Stammbaum der Primaten den Ast der Anthropoiden oder *Simiae* dar. Den zweiten großen Ast im Stammbaum der Primaten bilden die so genannten Halbaffen oder *Prosimiae*. In diese Gruppe gehören zum Beispiel die auf

Madagaskar endemisch vorkommenden Lemuren. Abbildung 3 zeigt einen schematischen Stammbaum der Anthropoiden, in dem die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse aller in dieser Arbeit vorkommenden Arten dargestellt sind.

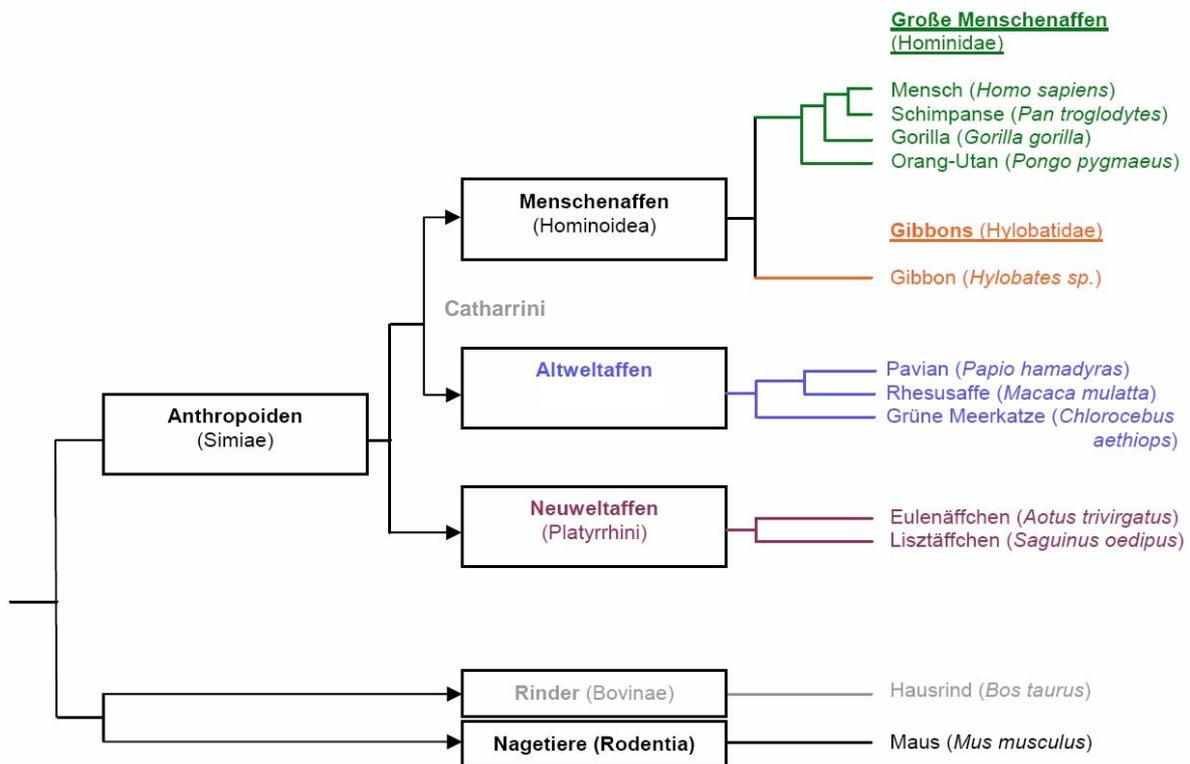


Abb. 3 Schematische Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaft aller in dieser Arbeit untersuchten Anthropoiden. Maus und Rind dienten als Referenzorganismen.

Ein wichtiges Element innerhalb der Anthropoidenevolution ist die Entwicklung des Gehirns, welches sich in Richtung der Menschenaffen zunehmend vergrößert hat. Verschiedene Studien haben sich in den letzten Jahren mit den molekularen Grundlagen der Evolution dieses Organs beschäftigt. Dabei scheinen vor allem solche Gene, die am Energiemetabolismus der Zelle beteiligt sind, einen maßgeblichen Beitrag geleistet zu haben, da durch eine Steigerung der Effizienz der Energiegewinnung in den Mitochondrien der erhöhte Energiebedarf des leistungsfähigeren Gehirns gedeckt werden konnte (Goodman *et al.* 2005, Grossman *et al.* 2004).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die menschlichen Parvuline Par14 und Par17 werden vermutlich durch dasselbe Gen codiert und durch alternative Transkriptionsinitiation exprimiert. Durch die Erweiterung des Leserahmens trägt Par17 ein zusätzliches N-terminales Prä-Peptid. In der vorliegenden Arbeit sollte die Struktur des Parvulin-Gens und seiner Promotorregion untersucht werden, um so einen Einblick in die Expression und Entwicklung des erweiterten Leserahmens zu erhalten. Es sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Erweiterung des Parvulin-Gens, und damit die Fähigkeit zur Expression von Par17, auch in anderen Organismen als dem Menschen zu finden ist. Insbesondere sollte dabei die Entwicklung des Parvulin-Gens innerhalb der Anthropoiden nachvollzogen werden.

Da das N-terminale Prä-Peptid des Par17 eine positiv geladene amphipatische Helix ausbildet, könnte es eine Funktion als mitochondriales Targeting-Signal erfüllen. Daher sollte die Verteilung der beiden Parvuline in der Zelle untersucht und verglichen werden, um den Einfluss des Prä-Peptids auf die subzelluläre Lokalisation von Par17 aufzuklären.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die für Par14 beschriebenen DNA-Bindungseigenschaften durch die N-terminale Verlängerung in Par17 eingeschränkt bzw. verändert werden oder ob Par17 ebenso wie Par14 mit hoher Affinität an AT-reiche doppelsträngige DNA-Abschnitte bindet.

2. Material und Methoden

Alle in dieser Arbeit verwendeten Puffer, Medien sowie Agarose- und SDS-PAGE-Gele wurden (sofern im folgenden Kapitel nicht anders beschrieben) nach den Standardvorschriften aus Sambrook & Russel ("Molecular Cloning – A laboratory manual", 2002) hergestellt.

2.1 *In silico* Analyse des Parvulin-Gens und seiner Promotorregion

2.1.1 Vergleich der Genstrukturen

Über die ENSEMBL Genom-Datenbank (www.ensembl.org) wurden genomische Sequenzen des Parvulin-Locus von 14 Spezies bezogen (s. Tab. 1).

Tab. 1 Über die ENSEMBL Datenbank bezogene Sequenzen des Parvulin-Gens

Organismus	ENSEMBL Gene ID
Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	ENSG00000102309
Schimpanse (<i>Pan troglodytes</i>)	ENSPTRG00000022022
Rhesusaffe (<i>Macaca mulatta</i>)	ENSMMUT00000018166
Hausmaus (<i>Mus musculus</i>)	ENSMUSG00000034102
Hausrind (<i>Bos taurus</i>)	ENSBTAT00000026796
Hund (<i>Canis familiaris</i>)	ENSCAFP00000008331
Haushuhn (<i>Gallus gallus</i>)	ENSGALG00000003878
Grüner Kugelfisch (<i>Tetraodon nigroviridis</i>)	GSTENG00010206001
Kugelfisch (<i>Fugu rubripes</i>)	SINFRUG00000154166
Krallenfrosch (<i>Xenopus tropicalis</i>)	ENSXETG00000022578
Fadenwurm (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	Y48C3A.16
Taufliege (<i>Drosophila melanogaster</i>)	CG11858
Zebrafisch (<i>Danio rerio</i>)	ENSDARG00000004527
Malariamücke (<i>Anopheles gambiae</i>)	ENSANGG00000008079

Die Sequenzen wurden mit Hilfe der BioEdit-Software (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) abgeglichen und ausgewertet. Die Strukturen der Gene wurden hinsichtlich der Größe und Anzahl von Exons und Introns untersucht und verglichen. Die Grenzen der Exons und Introns wurden dabei der ENSEMBL Datenbank entnommen. Der Datenbankeintrag des Schimpansen wies größere Lücken auf und war an den entscheidenden Stellen (Exon 1) unvollständig, bei den Sequenzen von Hund und Huhn handelte es sich offenbar um Pseudogene, so dass diese drei Organismen in die weiteren Analysen nicht mit einbezogen werden konnten.

2.1.2 Analyse der Promotorregionen

Die Promotorregionen der in dieser Studie untersuchten Wirbeltiere (Mensch, Rhesusaffe, Rind, Maus, Zebrafisch, Kugelfisch, Grüner Kugelfisch und Krallenfrosch) wurden hinsichtlich ihres GC-Gehalts und des Auftretens von Dinukleotiden des Typs CpG analysiert, um zu überprüfen, ob die jeweilige Promotorregion innerhalb einer CpG-Insel liegt. Solche CpG-Inseln sind laut Gardiner-Garden & Frommer (1987) definiert als DNA-Abschnitt von mehr als 200 nt Länge mit einer CpG-Rate von >0,6 und einem GC-Gehalt von >50%. Die Bereiche, die ausgewertet wurden, waren immer der Abschnitt 300 nt *upstream* und 200 nt *downstream* des ATG (Start) Codons des Par14 sowie, als Referenz, 500 nt *downstream* des TAA (Stop) Codons. Es wurde die Gesamtzahl der G- und C-Nukleotide sowie der CpG-Dinukleotide ausgezählt. GC-Gehalt und CpG-Rate wurden dann wie folgt berechnet:

$$GC - \text{Gehalt} = \frac{\text{Gesamtzahl}(G + C - \text{Nukleotide})}{\text{Gesamtzahl}(\text{Nukleotide})} \times 100\%$$

$$CpG - \text{Rate} = \frac{\text{Anzahl}(CpG - \text{Dinukleotide})_{\text{beobachtet}}}{\text{Anzahl}(CpG - \text{Dinukleotide})_{\text{erwartet}}}$$

Die Anzahl der erwarteten Dinukleotide beträgt 1/16 aller Dinukleotide, da es 16 verschiedene Möglichkeiten gibt, aus den vier Basen der DNA ein Dinukleotid zu

bilden. Zusätzlich wurden alle Sequenzen auf das Auftreten einer TATA-Box (Konsensus-Sequenz 5'-TATAAA-3') überprüft.

Des Weiteren wurde die EST Datenbank der GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>) nach weiteren Sequenzen durchsucht, die wie der zuerst identifizierte EST (AU098526), den erweiterten Leserahmen des Par17 enthalten. Dabei wurden nur die ESTs analysiert, die in 5'-Richtung sequenziert wurden, zu mindestens 50 Nukleotiden mit dem ersten cDNA-Datenbankeintrag zu Par14 (AB009690) von Uchida *et al.* (1999) überlappten und keine intronischen Sequenzen mehr enthielten.

2.2 Phylogenetische Analyse zum Auftreten eines offenen Leserahmens für Par17 innerhalb der Ordnung der Primaten

Es wurden zwei verschiedene Abschnitte des Parvulin-Gens analysiert: Um das Auftreten und die phylogenetische Entwicklung der Präsequenz zu untersuchen, wurde das Exon 1 amplifiziert. Das in allen Organismen dieser Studie enthaltene Exon 3 diente als Kontrolle für das Vorhandensein des Parvulin-Gens.

Aus Zellkulturen isolierte genomische DNA von neun Primaten wurde von der European Cell Culture Collection (ECACC, www.ecacc.org.uk) bezogen (s. Tab. 2).

Tab. 2 Von der ECACC bezogene genomische Primaten-DNA

Spezies	ECACC Zell-Linie
Schimpanse (<i>Pan troglodytes</i>)	89072704
Gorilla (<i>Gorilla gorilla</i>)	89072703
Orang-Utan (<i>Pongo pygmaeus</i>)	89072705
Gibbon (<i>Hylobates sp.</i>)	86102901
Pavian (<i>Papio hamadryas</i>)	89072101
Rhesusaffe (<i>Macaca mulatta</i>)	90071809
Grüne Meerkatze (<i>Chlorocebus aethiops</i>)	85102918
Eulenäffchen (<i>Aotus trivirgatus</i>)	90110510
Lisztäffchen (<i>Saguinus oedipus</i>)	85011419

Als Positivkontrolle für das Auftreten eines durchgehenden Par17-Leserahmens wurde menschliche genomische DNA aus HeLa-Zellen verwendet. Diese wurde nach Sambrook und Russel, „Molecular Cloning“, Chapter 6.22 Protocol A isoliert. Als Kontrolle für das Auftreten des Par14 Gens (Exon 3) und das Fehlen einer Verlängerung des ersten Exons wurde genomische DNA aus C57 BL6/J Mäusen verwendet, die von Dr. Manuela Wülling (ZMB, Entwicklungsbiologie) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde.

Die Abbildung 3 zeigt einen schematischen Überblick über die Phylogenie aller analysierten Organismen.

Alle genomischen DNAs wurden zunächst mit dem Repli-G Whole Genome Amplification Kit (Qiagen, Hilden) amplifiziert, um ausreichend Ausgangsmaterial für die PCRs zu erhalten. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.

Für die Amplifizierung von Exon 1 wurden zwei verschiedene Primerkombinationen eingesetzt: Der *forward* Primer 251f bindet vor dem Par17 Start-Codon der humanen Sequenz in einem bis zur Maus konservierten Bereich, der zweite *forward* Primer 246f bindet genau auf dem Par17 Start Codon. Als *reverse* Primer wurde in beiden Fällen 481r verwendet. Exon 3 wurde mit den Primern 453f und 482r amplifiziert. Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tab. 3 Primer für die Amplifizierung der Exons 1 und 3 des Parvulin-Gens

Primer	Sequenz (5'- 3' Richtung)
251f	CGG CTT TCA GGC ATT TGT TTA G
246f	ATG CCC ATG GCG GGG CTT CTA AAG
481r	TTT CCC CGC TTT TCC AGA ACC ACT
453f	GTC AGA CAC ATT CTA TGT GAA AAA C
482r	CCC TTG CCT GGC TTT ATC TTC ACT

Die PCRs wurden in einem T3000 Thermocycler (Biometra, Göttingen) mit dem in Tabelle 4 a&b gezeigten Ansatz und Programm durchgeführt.

Tab. 4 a&b Pipettierschema und Programm der PCR zur Amplifizierung der Parvulin-Genabschnitte für die phylogenetischen Analyse**a**

	pro Ansatz	End-Konzentration
TAQ-Puffer (NEB)	5 µl	1x
Primer 1	2 µl	20 pmol / Ansatz
Primer 2	2 µl	20 pmol / Ansatz
dNTPs (Eppendorf)	1 µl	jeweils 0,2mM
H2O	38.5 µl	
Taq-Polymerase (NEB)	0.5 µl	2,5 U / Ansatz
Template	1 µl	
gesamt	50 µl	

b

Temperatur (°C)	Zeit (Min.)	Zyklen
94	5	1x
94	1	30x
60	1	
72	2	
72	7	1x
8	hold	

Die PCR-Produkte wurden auf 2% Agarose-Gelen aufgetrennt, die Banden ausgeschnitten und aufgereinigt (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden). Die Fragmente wurden dann in den pCR2.1 TOPO Vektor kloniert (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Karlsruhe; Durchführung laut Angaben des Herstellers) und sequenziert (GATC Biotech, Konstanz).

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe der BioEdit Software (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) verglichen und ausgewertet. Da die entsprechenden Sequenzabschnitte von Mensch, Rhesusaffe, Rind, Maus und Schimpanse (nur Exon 3) bekannt waren (s. Abschnitt 2.1), konnten diese Organismen als Referenzsequenzen beim *Alignment* sowie zur Beurteilung der Qualität der Sequenzierungsergebnisse genutzt werden.

2.3 Subzelluläre Lokalisation der Parvuline

2.3.1 Vorhersage der Lokalisation von Par14 und Par17 mit verschiedenen Algorithmen

Zur Vorhersage der subzellulären Lokalisation von Par14, Par17-RS und Par17-QR wurden die in Tabelle 5 dargestellten Algorithmen verwendet. Es wurde jeweils die komplette Aminosäuresequenz zur Analyse eingegeben.

Tab. 5 Zur Vorhersage der Lokalisation der Parvuline verwendete Algorithmen

Programm	Adresse	Referenz
Mitopred	http://bioinformatics.albany.edu/~mitopred/	Guda <i>et al.</i> 2004
Mitoprot	http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html	Claros 1995
Predotar	http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html	Small <i>et al.</i> 2004
PSortII	http://psort.nibb.ac.jp/form2.html	Nakai & Horton 1999
TargetP	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/	Emanuelsson <i>et al.</i> 2003

2.3.2 Nachweis von endogenem Parvulin in HeLa-Zellen durch Zellfraktionierung und Western Blotting

Zellkultur

HeLa-Zellen (DSMZ, Braunschweig) wurden in Cellstar 250 ml Kulturflaschen (Greiner, Frickenhausen) in HeLa-Medium (D-MEM, 1x MEM, 10% Fötale Kälberserum, alles Gibco, Deutschland) bei 37°C und 5% CO₂ angezüchtet, bis der Boden der Kulturflaschen zu ca. 80% mit Zellen bedeckt war. Die Zellen wurden dann für 10 Minuten mit 1 ml Tryple Express (Gibco, Deutschland) pro Flasche trypsiniert, in jeweils 10 ml D-MEM (Gibco, Deutschland) aufgenommen, in 15 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner, Frickenhausen) überführt, bei 100 x g für 5 Minuten

zentrifugiert und die Zellpellets in je 2 ml D-MEM resuspendiert. Die Zellzahlen der Suspensionen wurden mit Hilfe einer Neubauer-Kammer bestimmt. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Das Deckgläschen wurde so auf die Kammer aufgelegt, dass an den Auflageflächen „Newtonringe“ zu erkennen waren und somit ein korrekter Abstand zwischen Deckgläschen und Kammer gewährleistet war. Von der zu zählenden Zellsuspension wurden 20 µl unter das Gläschen gesogen, wobei darauf geachtet wurde, dass sich die Suspension gleichmäßig in der Kammer verteilte und keine Luftblasen zu erkennen waren. Unter dem Mikroskop (Olympus CK2, 10x Vergrößerung, Olympus, Hamburg) wurden dann die Zellen in jedem der vier großen Quadrate der Kammer ausgezählt. Aus den vier erhaltenen Werten wurde ein Mittelwert gebildet und dieser mit 10^4 multipliziert. Das Ergebnis gibt die Zellzahl pro ml an.

Für die folgende Fraktionierung wurden je 6×10^6 Zellen in zwei parallelen Ansätzen eingesetzt.

Fraktionierung

Die Zellen wurden mit Hilfe des Qiagen Mitochondria Isolation Kits (Qiagen, Hilden) in die Fraktionen Kerne, Cytosol, Mitochondrien und eine weitere, nicht genauer charakterisierte Fraktion, die im Protokoll des Kits als microsomale oder Membran-Fraktion bezeichnet wird und in der sich Membranen, Zelltrümmer etc. ansammeln, aufgetrennt. Die Zellkerne wurden in 1ml 100 mM Tris-Cl (pH 8.8) aufgenommen, alle anderen Fraktionen in den entsprechenden im Kit enthaltenen Puffern. Die Fraktionierung wurde den Angaben des Herstellers entsprechend durchgeführt. Der letzte Zentrifugationsschritt, bei dem die Mitochondrien von der Membran-Fraktion getrennt werden, wurde auf 20 Minuten ausgedehnt.

SDS-PAGE und Western Blotting

Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Fraktionen wurden mittels Bradford-Assay in einem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Für die Gel-Elektrophorese sollten pro Gel von jeder Fraktion 30 µg Protein eingesetzt werden. Da die Proteinkonzentrationen zu niedrig waren, um in einem Volumen von 30 µl (= maximales Volumen einer Tasche des Gels) 30 µg Protein auftragen zu können, mussten die einzelnen Fraktionen gefällt werden.

Dazu wurde von jeder Fraktion das Volumen, was einer Proteinmenge von 30 µg entsprach, mit je 400 µl Methanol und 100 µl Chloroform gemischt und zentrifugiert (5 Minuten, 4°C, 14500 rpm / 14000 x g, MiniSpin plus Zentrifuge, Eppendorf, Hamburg). Die obere Phase wurde verworfen, es wurden 400 µl Methanol zugegeben, gemischt und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet an der Luft getrocknet. Die Pellets wurden in 30 µl Gel-Ladepuffer (10% Glycerin, 2% SDS (w/v), 2% β-Mercaptoethanol, 50 mM Tris-Puffer (pH 6,8), 3 g/l Bromphenolblau) resuspendiert, bei 95°C für 5 Minuten inkubiert und dann auf 15% SDS-PAGE Gele aufgetragen.

Als Positivkontrolle wurde Par17 aus einem pET-41 Vektor (Novagen, Darmstadt) in *E. coli* BL21 exprimiert (Klon BC 580.6.1 aus der Klonsammlung der AG Biochemie, ZMB). Die Bakterien wurden durch Ultraschallbehandlung (10 Minuten, auf Eis) lysiert, es wurden 5 µl des Lysats auf jedes Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 2 Stunden bei 125 V und 35 mA in einer Novex MiniCell Kammer (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Anschließend wurden die Gele in einem Semi-Dry Blotter (Biometra, Göttingen) auf Nitrocellulose Membranen (Invitrogen, Karlsruhe) geblottet (100 mA, 35 Minuten). Die Membranen wurden für 30 Minuten in TBS-T 150 (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween20) + 2% (w/v) Milchpulver (Bio-Magermilch-Pulver, Heirler, Reformhaus) geblockt und über Nacht bei 4°C mit einem Par17-Antikörper (4113AF, aus Kaninchen, entspr. Ab-EXT aus Mueller *et al.* 2006, 1:200); oder einem der in Tabelle 6 aufgelisteten Marker-Antikörper (alle in TBS-T 150 + 2% Milch) inkubiert.

Die Blots wurden gewaschen (1x mit TBS-T 500 [wie TBS-T 150 aber mit 500 mM NaCl], 2x mit TBS-T 150), um überschüssigen unspezifisch gebundenen ersten Antikörper zu entfernen und für 2 Stunden bei 4°C mit dem entsprechenden HRP-konjugierten sekundären Antikörper (ECL Anti-Mouse oder Anti-Rabbit IgG Horseradish Peroxidase linked, 1:2000, beide Amersham, Freiburg) inkubiert. Anschließend erfolgte die Entwicklung der Blots mit Hilfe eines ECL Kits (Amersham, Freiburg), CL-XPosure Filmen (Pierce, Bonn) und eines AGFA Curix Entwicklers (AGFA, Köln).

Tab. 6 Zur Charakterisierung der Zell-Fractionen verwendete primäre Antikörper

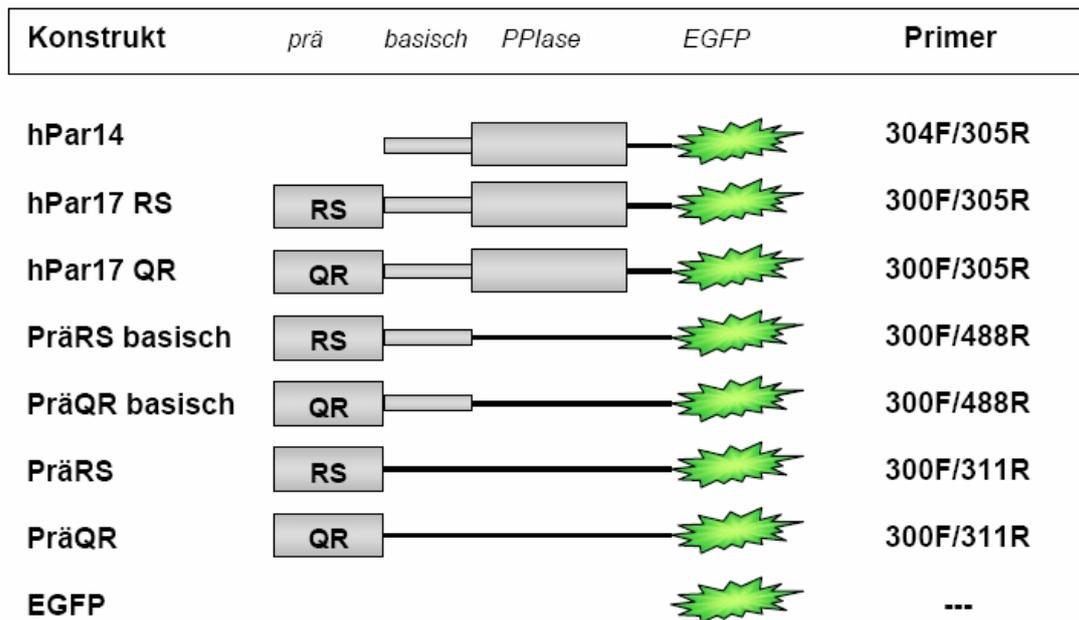
Antikörper	Marker für (Organell)	Spezifische Bande bei	Hersteller	Verdünnung
Cytochrom C (Mouse), monoclonal [7H8.2C12] (ab13575)	Mitochondrien	15 kDa	Abcam, Cambridge, UK	1:200
GAPDH (Rabbit) HRP-konjugiert (ab9385)	Cytosol	35 kDa	Abcam, Cambridge, UK	1:500
Golgin97 (Mouse) monoclonal CDF4	Golgi-Apparat	97 kDa	Molecular Probes Europe, Leiden, NL	1:200
p84 (Mouse), Kernmatrix-Protein (ab487)	Zellkern	84 kDa	Abcam, Cambridge, UK	1:500
panCadherin (Rabbit) (ab6529)	Plasmamembran	145 kDa	Abcam, Cambridge, UK	1:200

2.3.3 Lokalisationsbestimmung mit Hilfe von überexprimierten Parvulin-EGFP Fusionsproteinen

Erstellung der Konstrukte

Es wurden *full length* Konstrukte von Par14 und Par17 sowie Deletionskonstrukte, die nur die Prä-Sequenz bzw. die Prä-Sequenz und die basische Domäne des Par17 (jeweils in beiden Isoformen Q16/R18 und R16/S18) enthielten, C-terminal mit EGFP fusioniert. Als *template* zur Amplifizierung der unterschiedlichen Parvuline bzw. Parvulin-Fragmente mittels PCR dienten die Produkte der in Mueller *et al.* 2006 beschriebenen RT-PCRs für Par17-RS und -QR, die jeweils den gesamten Leserahmen enthielten. Die verwendeten *forward* Primer enthalten eine Kozak-Sequenz, die der Translationsinitiation dient (Kozak 1999), sowie eine EcoRI Schnittstelle, die *reverse* Primer eine BamHI Schnittstelle. Die Abbildung 4 gibt einen Überblick über die verschiedenen Konstrukte sowie die zur Amplifizierung verwendeten Primer, Tabelle 7 zeigt die Zusammensetzung des Ansatzes und das PCR-Programm. Die PCRs wurden in einem T3000 Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

A



B

Sequenzen der Primer (5' → 3'):	
300F	aaaaaa gaattc <u>gccacc</u> atg ccc atg gcg ggg ctt cta aag
304F	aaaaaa gaattc <u>gccacc</u> atg ccg ccc aaa gga aaa agt ggt
305R	aaaaaa ggatcc tt tct tcc ttc gac cat aat aat atg
311R	atatat ggatcc tt gga agc ttg ttg ttg aac gct g
488R	atatat ggatcc tt gga acc ttg agc ctt ctt gtc a
Restriktionsschnittstellen: gaattc → EcoRI ggatcc → BamHI	
Kozak-Sequenz: <u>gccacc</u>	

Abb. 4 A&B

A Schematische Darstellung aller Parvulin-EGFP-Konstrukte und der zur Amplifizierung benutzten Primer.

B Sequenzen der Primer. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme (fett) sowie die Kozak-Sequenz (kursiv, unterstrichen) sind gekennzeichnet.

Tab. 7 a&b Pipettierschema und Programm der PCR für die Parvulin-EGFP-Konstrukte**a**

	pro Ansatz	Konzentration
TAQ-Puffer (NEB)	5 µl	1x
Primer 1	2 µl	20 pmol / Ansatz
Primer 2	2 µl	20 pmol / Ansatz
dNTPs (Eppendorf)	1 µl	jeweils 0,2mM
H ₂ O	38.5 µl	
Taq-Polymerase (NEB)	0.5 µl	2,5 U / Ansatz
Template	1 µl	
gesamt	50 µl	

b

Temperatur (°C)	Zeit (Min.)	Zyklen
94	5	1x
94	1	30x
65	1	
72	2	
7	7	1x
8	hold	

Die PCR-Produkte wurden auf 2% Agarose-Gelen aufgetrennt, die Banden ausgeschnitten und aufgereinigt (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden). Die gereinigte DNA wurde in 30 µl *Elution-Buffer* (1:10 verdünnt) aufgenommen und mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI (New England Biolabs, Frankfurt) verdaut. Es wurde die gesamte gereinigte DNA eingesetzt, hinzu kamen 5 µl EcoRI-Puffer (New England Biolabs, Frankfurt), 1 µl BSA (10 mg / ml, New England Biolabs, Frankfurt) und 10 U von jedem der beiden Restriktionsenzyme. Jeder Ansatz wurde dann mit ddH₂O auf 50 µl aufgefüllt. Mit den Ansätzen für den Verdau des Vektors pEGFP_N1 (Clontech, Heidelberg) wurde ebenso verfahren, allerdings wurden hier 1 µg DNA und 20 U von jedem Enzym eingesetzt. Alle Restriktionsansätze wurden 4 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend aufgereinigt. Die geschnittenen PCR-Produkte wurden mit Hilfe eines QIAquick Gel Extraction Kits (Protokoll „Cleanup from enzymatic Reactions“, Qiagen, Hilden) gereinigt und in 30 µl *Elution-Buffer* (1:10 verdünnt) resuspendiert. Der verdaute Vektor wurde zunächst auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt, um den geschnittenen Vektor von ungeschnittener Vektor-DNA sowie den ausgeschnittenen Fragmenten zu trennen. Die Bande des mit beiden Enzymen geschnittenen Vektors stellte dabei auf dem Gel die stärkste Bande da, etwas unterhalb der Bande des einfach geschnittenen Vektors und oberhalb der Bande des ungeschnittenen Vektors. Diese Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit einem QIAquick Gel Extraction Kit gereinigt.

Für die Ligation der unterschiedlichen PCR-Produkte mit dem pEGFP_N1 Vektor wurden 1-10 µl der doppelt geschnittenen Vektor-DNA (je nach Stärke der Bande bei der vorhergegangenen Gel-Aufreinigung) mit 0,5 µl T4 Ligase (2 U/µl, New England Biolabs, Frankfurt) sowie 2 µl T4 Puffer (New England Biolabs, Frankfurt) angesetzt und mit Insert-DNA (= je eines der PCR-Produkte) auf 20 µl aufgefüllt. Als Religationskontrolle (Negativkontrolle) wurde einer der Ansätze statt mit Insert mit ddH₂O aufgefüllt. Die Ligations-Ansätze wurden über Nacht bei 16°C inkubiert. Die ligierten Konstrukte wurden dann in chemisch kompetente *E. coli* NEB 5-α (New England Biolabs, Frankfurt) transformiert indem 50 µl Zellen mit 2,5 µl DNA auf Eis gemischt, für 45 Sekunden bei 42°C inkubiert und auf Eis wieder abgekühlt wurden. Nach Zugabe von 200 µl vorgewärmtem LB-Medium wurden die Zellen für 1 Stunde bei 37°C inkubiert, anschließend auf Kanamycin-haltigen LB-Agar-Platten (50 µg / ml Kanamycin, Roth) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden von jeder Platte 5 Kolonien einzeln abgenommen und in je 5 ml LB-Medium (+ Kanamycin, 50 µg / ml, Roth) über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde aus jeder Bakterienkultur das entsprechende Plasmid mit einem Qiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden) extrahiert. Jeder Vektor wurde sequenziert (MWG Biotech, Martinsried), um die Richtigkeit der Konstrukte zu überprüfen. Von jedem Konstrukt wurde eine Glycerinkultur eines Klons mit korrekter Sequenz angelegt, indem eine in LB-Medium (+ Kanamycin) logarithmisch wachsende Flüssigkultur des Klons mit 20% Glycerin vermischt und bei -80°C eingefroren wurde.

Expression der Konstrukte in HeLa-Zellen

Alle Transfektionen wurden in 12-Loch-Platten (Greiner, Frickenhausen) durchgeführt. In jedes Loch wurde ein Deckgläschen, welches zuvor in Ethanol eingelegt und durch Abflammen sterilisiert wurde, gelegt, auf dem die Zellen anwachsen konnten. Auf eine Beschichtung der Deckgläschen mit poly-L-Lysin wurde verzichtet, da die Zellen auch ohne die Beschichtung gut auf den Gläschen anwachsen. HeLa-Zellen wurden mit einer Dichte von etwa 2×10^5 Zellen pro well in HeLa-Medium (s. 2.3.1) ausgesät und bei 37°C und 7,5% CO₂ für 24 Stunden inkubiert. Um die Plasmide für die Transfektion vorzubereiten wurden aus den Glycerinkulturen der Bakterienklone Übernachtskulturen in je 5 ml LB-Medium angeimpft. Aus diesen Flüssigkulturen wurden dann mit Hilfe eines Qiagen Plasmid Mini Kits die verschiedenen Plasmide extrahiert und deren Konzentration mit einem

Eppendorf Biophotometer bestimmt. Das Reagenz zur Transfektion von 3 Löchern einer 12-Loch-Platte wurde dann wie folgt angesetzt: 120 µl Opti-MEM (Gibco, Deutschland) wurden mit 3,6 µl FuGene6 (Roche, Mannheim) vermischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 1,2 µg Plasmid-DNA dazu gegeben und weitere 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Pro Loch wurden dann 41 µl dieses Ansatzes mit dem Medium vermischt. Die Platten wurden für 40 Stunden bei 37°C und 7,5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit frischem Medium gewaschen und die Mitochondrien mit MitoTracker™ orange (Molecular Probes, Karlsruhe) gefärbt. Von 50 µg lyophilisiertem Farbstoff wurde durch Zugabe von 100 µl DMSO (Roth, Karlsruhe) eine 1 mM Stammlösung hergestellt. Diese Stammlösung wurde mit vorgewärmtem HeLa-Medium 1:10000 verdünnt, auf die Zellen gegeben und 30 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden dann dreimal mit PBS (pH 7,4) gewaschen, in 3% p-Formaldehyd + 0,2% Triton X-100 (Fluka, München) in PBS für 10 Minuten fixiert und anschließend nochmals in PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden aus den Löchern der Platte genommen, an der Luft getrocknet und dann in Mowiol (Polyvinylalkohol 4-88, Fluka, München) auf Objektträgern eingebettet. Die Präparate wurden über Nacht getrocknet, dann mit Nagellack versiegelt und bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Auswertung der Präparate erfolgte mit Hilfe eines Olympus BX61 Fluoreszenzmikroskops mit einer F-View II Kamera und der dazugehörigen cell[^]P Software (Mikroskop und alle Komponenten von Olympus, Hamburg, Kamera und Software von Soft Imaging Systems (SIS), Münster). Es wurde ein UPlanSApo 100x Objektiv sowie die Filterwürfel U-M41002b (Anregung 545 +/- 30 nm, Emission 610 +/- 35 nm) für MitoTracker bzw. U-M41020 (Anregung 480 +/- 10 nm, Emission 520 +/- 20 nm) für EGFP benutzt. Es wurden von jedem Präparat mindestens 20 Z-Stapel mit jeweils etwa 25 Scheiben aufgenommen, der Abstand zwischen den Scheiben betrug etwa 0,2 µm. Die Belichtungszeiten lagen bei 50 – 60 ms für MitoTracker bzw. 500 – 600 ms für EGFP. Um Autofluoreszenz- oder sonstige unspezifische Signale, die als grüne EGFP-Signale gewertet werden könnten, ausschließen zu können, wurden nur Bildausschnitte aufgenommen, auf denen sowohl eindeutig transfizierte (grüne EGFP- und orange MitoTracker-Signale) als auch nicht-transfizierte Zellen (nur MitoTracker, keine grünen Signale) zu erkennen waren. Die Z-Stapel wurden mit

dem *Nearest Neighbor* Algorithmus dekonvuliert. Dadurch wurde störendes Streulicht aus anderen Schärfenebenen rechnerisch entfernt und die Bilder geschärft. Bei der Darstellung der Bilder wurden die untersten ca. 10% der Signale nicht berücksichtigt, so dass der Hintergrund zwischen den Zellen vollkommen schwarz und frei von unspezifischen Hintergrundsignalen war. Für die Berechnung der Kolo-kalisierung (also dem Anteil an grünem EGFP-Signal, der mit dem MitoTracker-Signal überlagert) wurde jeweils ein Bild aus der Schärfenebene in der Mitte eines Stapels ausgewählt. Mit Hilfe der Kolo-kalisierungsfunktion innerhalb der Cell[^]P Software wurden beide Kanäle des Bildes binarisiert, so dass sie nur noch aus grünen bzw. orangen und schwarze Pixeln bestanden. Die Schwellenwerte für die Binarisierung der Bilder wurden so gesetzt, dass auch die schwächsten Signale noch erkannt werden konnten, aber der Zwischenraum zwischen Zellen schwarz und frei von unspezifischen Signalen war. Dann wurde der Anteil aller EGFP-Signale, die mit dem MitoTracker kolo-kalisieren, in Prozent berechnet. Für jedes Konstrukt wurden mindestens zehn Bilder ausgewertet und aus den erhaltenen Kolo-kalisierungsraten ein Mittelwert sowie die Standardabweichung errechnet.

2.4 Funktionelle Studien: DNA-Bindung durch Par17

Präparation der Zell-Lysate

HeLa-Zellen (DSMZ, Braunschweig) wurden in Petrischalen (Greiner Cellstar, Frickenhausen) angezogen, mit den Par14-, Par17 RS- und Par17 QR- EGFP Konstrukten wie oben beschrieben transfiziert und für 40 Stunden bei 37°C und 7,5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden mit HeLa Medium gewaschen, mit 1 ml Lysepuffer pro Schale (50mM KPO₄, 1mM EDTA, 0.1% Triton X, 1 mM Pefablock (Roth, Karlsruhe), pH 7.0) überschichtet und mit einem sterilen Spatel abgekratzt. Die Zellen wurden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner, Frickenhausen) überführt und mit *Dilution*-Puffer (20 mM Tris pH 7.5, 10% Glycerin, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.1% Triton X, 37.5 mM (NH₄)₂SO₄) auf ein Gesamtvolumen von 4 ml aufgefüllt. Die Lysate wurden drei Mal für 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt und dann zentrifugiert (20 Minuten, 4°C, 4000 rpm / 3220 x g, Eppendorf Zentrifuge 5810R).

Vorbereitung der DNA-Cellulose

Für jedes der vier Zell-Lysate wurden 0,25 g DNA-Cellulose (4,8 mg Kalbsthymus-DNA / g, Sigma, München) in 3 ml Bindungspuffer (20mM Tris pH 7.5, 10% Glycerin, 100 mM KCl, 1mM EDTA, 10mM NaF und 0.1% Triton X) suspendiert und unter ständiger Rotation bei 4°C über Nacht inkubiert.

Bindungs-Assay

Für jedes Lysat wurden 850 µl der Cellulose Suspension in ein 2 ml Mikrozentrifugen-Gefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt und drei Mal zentrifugiert (10 Minuten, 4°C, 2000 rpm). Zwischen den Zentrifugationsschritten wurde das Pellet mit frischem Bindungspuffer gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und 850 µl Zell-Lysat zu der Cellulose gegeben. Die Suspension wurde unter ständiger Rotation für eine Stunde bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (10 Minuten, 4°C, 2000 rpm / 400 x g, Eppendorf Zentrifuge 5415R). Der Überstand wurde bei 4°C aufbewahrt. Die Cellulose wurde dann in mehreren Schritten mit Bindungspuffer mit aufsteigender Salzkonzentration (0, 50, 100, 200 & 500 mM KCl) gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde die Suspension inkubiert und zentrifugiert wie oben beschrieben. Alle Überstände wurden bei 4°C gelagert.

Fällung der Überstände

Alle Überstände mussten gefällt werden. Dazu wurden 400 µl jedes Überstandes mit je 400 µl Methanol und 100 µl Chloroform gemischt und zentrifugiert (5 Minuten, 4°C, 14500 rpm / 14000 x g, MiniSpin plus Zentrifuge, Eppendorf, Hamburg). Die obere Phase wurde verworfen, es wurden 400 µl Methanol zugegeben, gemischt und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet an der Luft getrocknet und in 20 µl Gel-Ladepuffer (s.o.) resuspendiert.

Gele und Blots

Die gefällten Überstände wurden auf 12,5% SDS-PAGE Gelen getrennt, auf Nitrocellulose Membranen geblottet und entwickelt wie oben beschrieben. Es wurde ein EGFP-Antikörper (JL-8 Monoclonal Mouse Antibody, Clontech, Heidelberg, 1:500) verwendet.

Kontroll-Experiment

Um auszuschließen, dass die Proteine an die Cellulose und nicht an die gekoppelte DNA binden, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt, bei dem die DNA-Cellulose vor der Zugabe der Zell-Lysate mit Benzonase (30 U, 60 Minuten, 37°C; Sigma, München) behandelt und dadurch die DNA von den Cellulose-Beads entfernt wurde. Das Experiment wurde dann noch einmal wie oben beschrieben durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 *In silico* Analyse des Parvulin-Gens und seiner Promotorregion

Die beiden menschlichen Parvuline Par14 und Par17 unterscheiden sich nur durch ein Prä-Peptid von 25 Aminosäuren Länge, welches dem Par17 N-terminal voran gestellt ist. Beide Proteine werden durch das gleiche Gen codiert, die Nutzung unterschiedlicher Transkriptionsstartpunkte führt zur Bildung verschieden langer mRNAs. Um das Auftauchen der Erweiterung des Leserahmens in verschiedenen Organismen genauer zu untersuchen, wurden in Datenbanken verfügbare Sequenzen des Parvulin-Gens aus unterschiedlichen Spezies miteinander verglichen und hinsichtlich ihrer Struktur und der Promotorregion analysiert.

3.1.1 Vergleich der Genstrukturen

Der Vergleich der Strukturen des Parvulin-Gens zeigt, dass alle untersuchten Wirbeltiere die gleiche Struktur des Gens aufweisen. Sowohl beim Menschen als auch beim Rhesusaffen, Rind, Maus, Krallenfrosch, Zebrafisch, Kugelfisch und grünen Kugelfisch besteht das Parvulin-Gen aus vier Exons und drei Introns. (s. Abb. 5) Die Exons weisen bei allen Organismen eine etwa gleiche Größe auf: Exon 1 (ab Par14 ATG Start Codon) 36-42 bp, Exon 2 68-74 bp, Exon 3 120 und Exon 4 (bis TAA Stop Codon) 159-171 bp. Bei den verfügbaren Sequenzen von Haushuhn und Hund handelte es sich offenbar um Pseudogene, die nur aus einem einzigen Exon bestanden und nicht weiter analysiert wurden. Auch im Genom des Menschen wurden zwei Pseudogene identifiziert, auf Chromosom 1 und 15. Diese sind aber nicht mit der codierenden Sequenz des Par14 identisch (Chromosom 1 zu 87%, Chromosom 15 zu 97%), enthalten keine Verlängerung für das Par17 und können daher nicht für die Expression von Par14 und Par17 verantwortlich sein. Sowohl Par14 als auch Par17 werden also durch das Parvulin-Gen auf Chromosom Xq13 codiert. Der Datenbankeintrag des Schimpansen war nur im Bereich der Exons 3 und 4 komplett, wo die Sequenz fast vollständig mit der menschlichen übereinstimmt, im Bereich der ersten beiden Exons wies sie jedoch größere Lücken auf und konnte aufgrund dessen nicht komplett mit den anderen Sequenzen abgeglichen werden. Die Abbildung 5 gibt einen Überblick über die Parvulin-Genstruktur in den acht

untersuchten Wirbeltieren mit vollständig verfügbarer Sequenz. Bei den übrigen analysierten Organismen besteht das Parvulin-Gen nur aus zwei oder drei Exons.

	Exon I (ab ATG) Par17 // Par14	Intron I	Exon II	Intron II	Exon III	Intron III	Exon IV bis STOP (TAA)
Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	117 // 42	4632	74	10250	120	463	159
Rhesusaffe (<i>Macacca mulatta</i>)	--- // 42	1893	74	10283	120	475	159
Rind (<i>Bos taurus</i>)	--- // 42	2166	74	5604	120	652	159
Maus (<i>Mus musculus</i>)	--- // 42	2103	74	5275	120	356	159
Krallenfrosch (<i>Xenopus tropicalis</i>)	--- // 36	681	68	1684	120	1156	159
Zebrafisch (<i>Danio rerio</i>)	--- // 36	378	71	1466	120	1804	171
Kugelfisch (<i>Fugu rubripes</i>)	--- // 36	210	74	217	120	186	159
Grüner Kugelfisch (<i>Tetraodon nigroviridis</i>)	--- // 36	188	74	169	120	195	159

Abb. 5 Exon-Intron-Struktur des Parvulin-Gens in den acht untersuchten Wirbeltieren, deren Sequenz über die ENSEMBL-Datenbank erhältlich war. Alle untersuchten Organismen weisen vier Exons etwa gleicher Größe (in bp) auf, nur beim Menschen liegt eine Erweiterung des ersten Exons und somit ein *open reading frame* für die Expression von Par17 vor.

Ein zusätzliches Start-Codon für die Expression von Par17 und somit eine Erweiterung des ersten Exons konnte in den in Datenbanken verfügbaren Sequenzen nur beim Menschen nachgewiesen werden. Ein erweiterter Leserahmen wurde weder beim Rind noch in der Maus identifiziert. Da der Datenbankeintrag des Schimpansen unvollständig war, stellte der Rhesusaffe den nächsten Verwandten des Menschen mit verfügbarer Sequenz dar.

Die Prä-Sequenz ist beim Rhesusaffen bereits gewissermaßen vorgeformt, auch ein zusätzliches Start-Codon ist vorhanden. Durch eine Lücke innerhalb der Sequenz

(relativ zur menschlichen Sequenz) ist dieses Start-Codon jedoch nicht *in-frame* mit dem Start-Codon des Par14 (s. Abb. 6). Da die verfügbare Sequenz des Schimpansen genau in diesem Bereich unvollständig war, war eine genauere Aussage nicht möglich und es ergab sich die Notwendigkeit, weitere Spezies aus der Ordnung der Primaten zu sequenzieren, um der interessanten Frage der Entwicklung der Prä-Sequenz nachzugehen und den Zeitpunkt des ersten Auftretens der Erweiterung von Par14 zu Par17 genauer bestimmen zu können.



Abb. 6 Alignment der über den ENSEMBL Genome Browser erhältlichen Sequenzen des Exon 1 des Parvulin-Gens von Mensch, Rhesusaffe und Rind. In dem dargestellten Abschnitt sind die beiden ATG-Start-Codons für Par14 und Par17 zu erkennen. Ein durchgehender Leserahmen zur Expression von Par17 ist nur im Menschen vorhanden. Beim Rhesusaffen ist dieser zwar vorgeformt, jedoch ist das Par17 Start-ATG nicht *in-frame* mit dem Par14-Startpunkt. Die Sequenz des Rindes lässt noch deutlich weniger Übereinstimmungen erkennen.

3.1.2 Analyse der Promotorregionen

Bei allen untersuchten Säugetieren (Mensch, Rhesusaffe, Rind und Maus) konnte im Bereich um das Par14-Start-Codon (300 Nukleotide *upstream* und 200 Nukleotide *downstream*) eindeutig eine CpG-Insel identifiziert werden, die der Definition von Gardiner-Garden & Frommer (1987) entspricht (GC-Gehalt über 50% und CpG-Rate >0,6). Der Bereich, der sich unmittelbar an die codierende Sequenz anschließt (500 Nukleotide *downstream* vom STOP-Codon TAA) wurde als Referenz ausgewertet, hier sind diese Werte deutlich niedriger. Bei den übrigen Wirbeltieren sind die Werte für die CpG-Rate zwar auch im Bereich um das START-Codon deutlich höher als im Anschluß an das STOP-Codon, jedoch liegen sie unter dem Wert von 0,6. Die Tabelle 8 gibt einen Überblick über alle ermittelten Werte.

Tab. 8 GC-Gehalt und CpG-Rate der Promotorregion sowie der 3'-Region des Parvulin-Gens in allen untersuchten Wirbeltieren

	-300nt ATG +200nt		TAA +500nt	
	GC-Gehalt (%)	CpG-Rate	GC-Gehalt (%)	CpG-Rate
Mensch	51,6	0,864	36,2	0,03
Rhesusaffe	58,4	0,992	38,2	0,128
Rind	58,8	0,608	41,8	0,192
Maus	54,6	0,608	39	0,096
Zebrafisch	37	0,32	37,4	0,16
Kugelfisch	36,2	0,448	31,8	0,064
Grüner Kugelfisch	38,4	0,576	33	0,128
Krallenfrosch	46	0,64	41,6	0,096

Es konnten jedoch in den Sequenzen der analysierten Wirbeltiere keine Tata-Boxen oder anderen Promotor-Konsensus-Sequenzen identifiziert werden. Lediglich eine Sequenz, die der Initiator (Inr) -Konsensus Sequenz (Py-Py(C)-A+1-N-T/A-Py-Py, Butler & Kadonaga 2002) ähnlich ist, konnte identifiziert werden. Die Sequenz lautet 5'-tcAATTG-3' und weicht nur in der letzten Base von der Konsensus Sequenz ab. Sie liegt im Bereich des Transkriptionsstartpunkts für die verlängerte menschliche mRNA, für die es zunächst lediglich einen einzigen EST (AU098526) als Hinweis auf ihre Existenz gab, deren Expression dann in verschiedenen menschlichen Geweben nachgewiesen werden konnte (Mueller *et al.* 2006). Das erste Adenin in dieser Sequenz entspricht dem „A+1“, also dem Transkriptionsstart, in der Inr-Konsensus Sequenz. Die Sequenz wurde auch beim Rhesusaffen und beim Rind gefunden, bei der Maus weicht sie von den anderen Organismen ab, das „A+1“ ist hier durch ein Guanin ersetzt.

Bei der Suche nach ESTs, die Abschnitte des Parvulin-Gens enthalten, wurden 70 Sequenzen gefunden, die in 5'-Richtung sequenziert wurden, keine intronischen Sequenzabschnitte enthielten und eine Überschneidung mit dem original cDNA Eintrag (AB009690 von Uchida *et al.* (1999)) von mindestens 50 Nukleotiden aufwiesen. Nur ein EST, der bereits genannte AU098526, enthielt die komplette Verlängerung zum Leserahmen für Par17. Das entspricht einem Anteil von etwa 1,5% aller Sequenzen und stimmt somit gut mit dem in Mueller *et al.* (2006) beschriebenen Anteil von Par17 am gesamten Parvulin überein. Die übrigen ESTs

enthielten zwar nicht die komplette 5'-Erweiterung, wiesen aber eine Vielzahl verschiedener Startpunkte auf. Das ist ein weiterer Beleg für die Initiation der Transkription von verschiedenen schwachen Startpunkten aus.

All das sind typische Eigenschaften der Promotoren von Housekeeping-Genen, die in einer CpG-Insel liegen und mehrere schwache statt eines starken Promotorelements besitzen (Knippers 1997), was zu verschiedenen Transkriptionsstartpunkten führen kann. Das Auftreten verschieden langer mRNA-Isoformen des Parvulins beruht also offenbar auf unterschiedlichen Transkriptionsinitiationspunkten auf einem Gen und kommt nicht durch die Expression verschiedener Gene oder durch Splicing zustande. In einer phylogenetischen Analyse sollte nun das Auftreten des erweiterten Leserahmens innerhalb der Anthropoiden näher untersucht werden.

3.2 Phylogenetische Analyse zum Auftreten eines offenen Leserahmens für Par17 innerhalb der Ordnung der Primaten

Wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben weisen weder das Rind noch die Maus in ihrem Genom eine Erweiterung des Parvulin-Gens auf. Auch im Datenbankeintrag des Rhesusaffen konnte kein ORF für Par17 identifiziert werden. Daher muss sich die Prä-Sequenz in der Evolution der Anthropoiden nach der Auftrennung der Altwelt- und Menschenaffen entwickelt haben. Die Sequenz des Schimpansen war jedoch unvollständig, so dass eine genauere Aussage nicht möglich war. Um das Auftreten der Verlängerung des Parvulin-Gens innerhalb der Säugetierordnung der Primaten weiter zu analysieren, wurden Abschnitte des Parvulin-Gens von insgesamt 10 verschiedenen Primaten mittels PCR amplifiziert, sequenziert und miteinander verglichen.

Die PCR auf das Exon 3 und somit der Nachweis eines Parvulin-Gens fiel bei allen getesteten Organismen positiv aus (s. Abb. 7). Dieser Bereich des Parvulin-Gens scheint also hoch konserviert zu sein.

Die PCR auf das Exon 1, die mit dem Primerpaar 251f / 481r durchgeführt wurde, lieferte bei allen Primaten ein Produkt der richtigen Größe (142 bp), nicht jedoch bei der Maus (s. Abb 7). Die konservierte Sequenz *upstream* des Par17 Start-Codons ist also offenbar bei allen getesteten Primaten in ähnlicher Form vorhanden. Diese

PCR-Produkte konnten für eine Sequenzierung und genaue Analyse dieses Abschnitts des Parvulin-Gens verwendet werden.

Bei der PCR mit dem Primerpaar 246f / 481r wurden nur bei Mensch, Schimpanse, Orang-Utan, Gorilla und Gibbon, also den Menschenaffen, Produkte einer Größe von etwa 117 bp erhalten. Die Sequenz im Bereich des Par17 Start-Codons, wo der Primer 246f bindet, scheint somit bei den anderen Organismen so weit von der menschlichen Sequenz abzuweichen, dass eine korrekte Bindung des Primers nicht mehr möglich ist. Die Sequenz, an der der *forward* Primer bindet, muss also bei allen getesteten Menschenaffen sehr ähnlich sein und einen etwa gleichen Abstand zur Bindungssequenz des *reverse* Primers aufweisen. Daher besteht die Möglichkeit, dass hier ein durchgehender Leserahmen für Par17 vorliegt. Abbildung 7 zeigt Agarose-Gele, auf denen die Produkte der drei unterschiedlichen PCRs aufgetragen wurden.

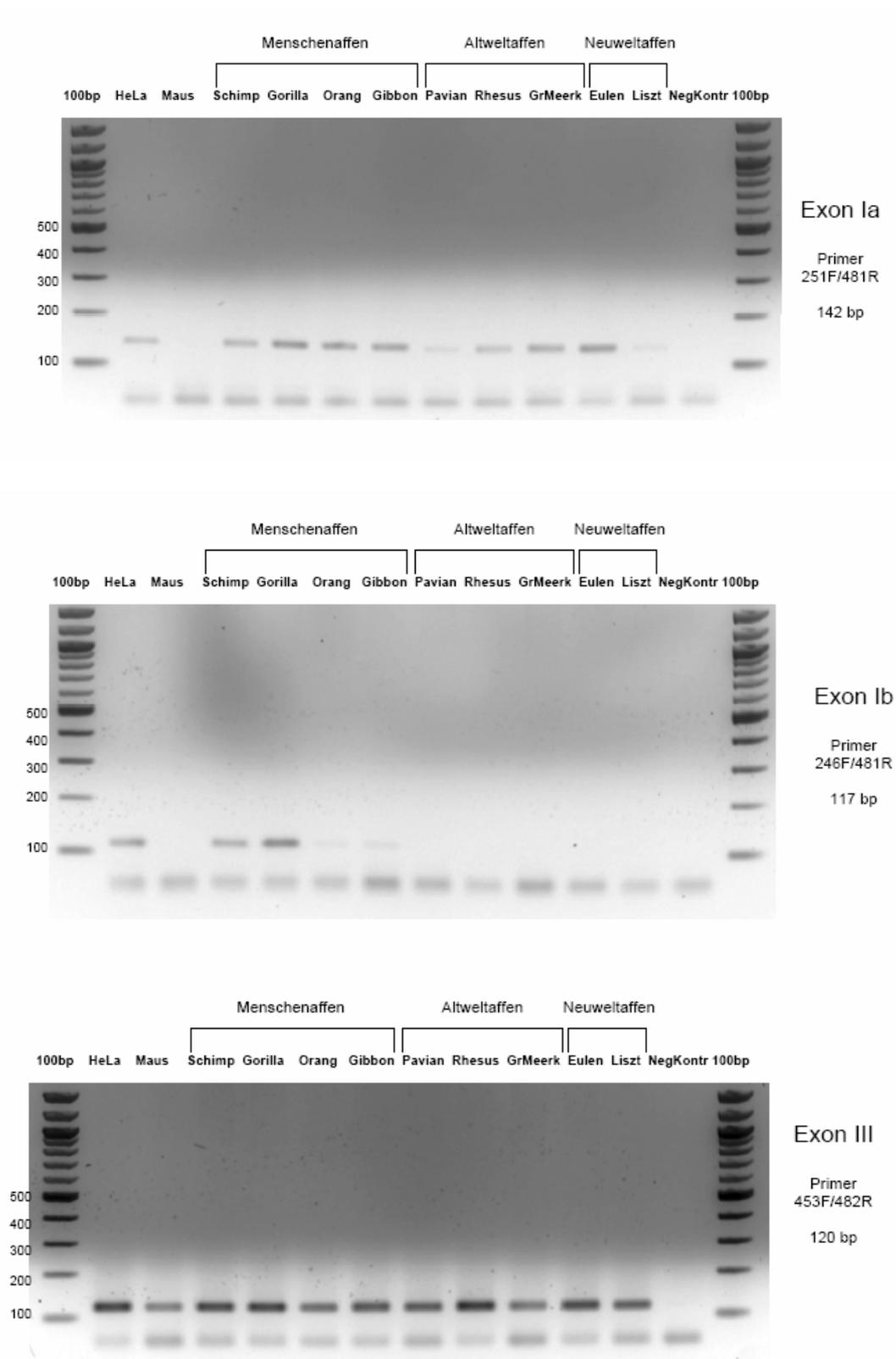


Abb. 7 Auftrennung der PCR-Produkte für die phylogenetische Analyse auf Agarose-Gelen. Exon 1 und Exon 3 des Parvulin-Gens verschiedener Primaten sowie der Maus als Kontrolle wurden mittels PCR amplifiziert und auf Agarose-Gelen aufgetrennt. Der entsprechende Abschnitt des Parvulin-Gens sowie die benutzten Primer und die zu erwartende Fragment-Länge sind jeweils rechts neben den Gelen vermerkt.

Der Vergleich der Sequenzier-Ergebnisse von Exon 1 und Exon 3 mit den bereits bekannten Sequenzen von Mensch, Schimpanse (nur Exon 3), Rhesusaffe, Rind und Maus zeigt, dass die Qualität der erhaltenen Sequenzen sehr gut ist und sie mit den Datenbanksequenzen übereinstimmen. Die neu erhaltenen Sequenzen der anderen Organismen und der bislang unbekannt Bereiche sind daher verlässlich.

Alle Organismen zeigen im Exon 3 kaum Abweichungen von der menschlichen Sequenz, es tauchen maximal zwei Austausche auf Aminosäureebene auf (s. Abb. 8 A). Der hohe Grad der Konservierung in diesem Bereich des Parvulin-Gens konnte somit bestätigt werden.

Die Sequenzen des Exon 1 zeigen bei allen Primaten eine Art vorgeformter Par17 Prä-Sequenz: Das zusätzliche ATG-Codon, das in der menschlichen Sequenz den Translationsstartpunkt für Par17 darstellt, kann in den Sequenzen aller getesteter Primaten, außer in der des Lisztäffchens, identifiziert werden. Betrachtet man ausgehend vom Par14-Start-Codon die potentielle Aminosäuresequenz, die sich beim Vorliegen eines ORF *upstream* in Richtung des Par17-Start-Codons ergeben würde, so unterscheidet sich diese zwischen den verschiedenen Spezies in maximal zwei Aminosäuren.

Allerdings sind die beiden Start-Codons nur bei den Menschenaffen (Mensch, Schimpanse, Gorilla, Orang-Utan und Gibbon) *in frame* zueinander. Beim Gibbon ist diese Sequenz jedoch durch ein *in frame* Stop-Codon (TAA) unterbrochen, wodurch ein durchgehender *open reading frame* für Par17 verhindert wird. Um die Richtigkeit der Sequenzen zu gewährleisten wurden alle PCRs zur Amplifizierung des ersten Exons mehrfach durchgeführt, die Produkte aus jeder PCR kloniert und jeweils mehrere Klone sequenziert. Daher können Fehler bei der PCR oder der Sequenzierung ausgeschlossen und das Auftreten dieses Stop-Codons innerhalb der Gibbon-Sequenz als gesichert angesehen werden. Die Altweltaffen (Pavian, Rhesusaffe und Grüne Meerkatze) weisen, bezogen auf die menschliche Sequenz, zwischen den beiden Start-Codons eine Lücke von vier Nukleotiden auf, bei den Neuweltaffen (Eulenäffchen und Lisztäffchen) sind es fünf fehlende Nukleotide. Rind und Maus zeigen kaum Übereinstimmungen mit der vorgeformten Prä-Sequenz. Abbildung 8 A&B zeigt ein Alignment der erhaltenen Sequenzen von Exon 3 und Exon 1.

A

Mensch <i>(Homo sapiens)</i>	AACATGGCAAATCATGGAAGCCATGGAAAAGTTAAAGTCTGGGATGAGATTCAATGAAGTGGCCGCACAGTATAGT H G K I M E A M E K L K S G M R F N E V A A Q Y S
Schimpanse <i>(Pan troglodytes)</i>	AACATGGCAAATCATGGAAGCCATGGAAAAGTTAAAGTCTGGGATGAGATTCAATGAAGTGGCCGCACAGTATAGT H G K I M E A M E K L K S G M R F N E V A I Q Y S
Gorilla <i>(Gorilla gorilla)</i>	...ATGGCAAATCATGGAAGCCATGGAAAAGTTAAAGTCTGGGATGAGATTCAATGGAGTGGCCGCACAAATAT... G K I M E A M E K L K S G M R F N C V A I Q Y
Orang-Utan <i>(Pongo pygmaeus)</i>	...ATGGCAAATCATGGAAGCCATGGAAAAGTTAAAGTCTGGGATGAGATTCAATGAAGTGGCCGCACAGTAT... G K I M E A M E K L K S G M R F N E V A I Q Y
Gibbon <i>(Hylobates sp)</i>	...ATGGCAAATCATGGAAGCCATGGAAAAGTTAAAGTCTGGGATGAGATTCAATGAAGTGGCCGCACAAATAT... G K I M E A M E K L K S G M R F N E V A A Q Y
Pavian <i>(Papio hamadryas)</i>	...ATGGCAAATCATGGAAGCCATGGAAAAGTTAAAGTCTGGGATGAGATTCAATGAAGTGGCTCAGAGTAT... G K I M E A M E K L K S G M R F N E V A S Q Y
Rhesusaffe <i>(Macaca mulatta)</i>	AACATGGCAAATCATGGAAGCCATGGAAAAGTTAAAGTCTGGGATGAGATTCAATGAAGTGGCTCAGAGTATAGT H G K I M E A M E K L K S G M R F N E V A S Q Y S
Grüne Meerkatze <i>(Chlorocebus aethiops)</i>	...ATGGCAAATCATGGAAGCCATGGAAAAGTTAAAGTCTGGGATGAGATTCAATGAAGTGGCTCAGAGTAT... G K I M E A M E K L K S G M R F N E V A S Q Y
Eulenäffchen <i>(Aotus trivirgatus)</i>	...ATGGCAAATCATAGAAGCCATGGAAAAGTTAAAGTCTGGGATGAGATTCAATGAAGTGGCTGCACAATAT... G K I I E A M E K L K S G M R F N E V A A Q Y
Lisztäffchen <i>(Saguinus oedipus)</i>	...ATGGCAAATCATGGAAGCCATGGAAAAGTTAAAGTCTGGGATGAGATTCAATGAAGTGGCTGCACAATAT... G K I M E A M E K L K S G M R F N E V A A Q Y
Rind <i>(Bos Taurus)</i>	AACATGGAAAATCTTGGAGCCATGGAAAAGTTAAAGTCTGGAATGAATCAATGAAGTGGCTGCACAATATAGT H G K I L E A M E K L K S G M N F N E V A A Q Y S
Maus <i>(Mus musculus)</i>	AACATGGAAAATCATGGAAGCCATGGAAAAGTTAAAGTCTGGGATGAGATTCAATGAAGTGGCCGCACAAATATAGT H G K I M E A M E K L K S G M R F S E V A I Q Y S

B

	Par17		Par14
	↓		↓
Mensch <i>(Homo sapiens)</i>	TAGGAC ATG CC ATG CGGGGCTTCTAAAGGGCTTGTACGGCAACTGGAGCAGTT CAG AGTTCAACAACAAGCTTCCAAG ATC CGGCCAAAGGAAAA Stp D M P M A G L L K G L V R Q L E Q F R V Q Q Q A S K M P P K G K		
Schimpanse <i>(Pan troglodytes)</i>	...GAC ATG CC ATG CGGGGCTTCTAAAGGGCTTGTACGGCAACTGGAGCAGTT CAG AGTTCAACAACAAGCTTCCAAG ATC CGGCCAAAGGAAAA D M P M A G L L K G L V R Q L E Q F R V Q Q Q A S K M P P K G K		
Gorilla <i>(Gorilla gorilla)</i>	...GAC ATG CC ATG CGGGGCTTCTAAAGGGCTTGTACGGCAACTGGAGCAGTT CAG AGTTGAACAACAAGCTTCCAAG ATC CGGCCAAAGGAAAA D M P M A G L L K G L V R Q L E Q F R V E Q Q A S K M P P K G K		
Orang-Utan <i>(Pongo pygmaeus)</i>	...GAC ATG CC ATG GAAGGGTCTAAAGGGCTTGTACGGCAACTGGAGCAGTT CAG AGTTCAACAACAAGCTTCCAAG ATC CGGCCAAAGGAAAA D M P M E G V L K G L V R Q L E Q F R V Q Q Q A S E M P P K G K		
Gibbon <i>(Hylobates sp)</i>	...GAC ATG CC ATG GTTGGGGTCTAAAGGGCTTGTACGGCAACTGGAGCAGTT CAG AGTTCAACAACAAGCTTCCAAG ATC CGGCCAAAGGAAAA D M P M V G V L K G L V R Stp L E Q F R V Q Q Q A S K M P P K G K		
Pavian <i>(Papio hamadryas)</i>	...GAC ATG CC ATG CGGG...TGTAAGGGGCTTGAACGGCAACTGGAGCAGTT CAG AGTTCAACAACAAGCTTCCAAG ATC CGGCCAAAGGAAAA H A H G G V R G L E R Q L E Q F R V Q Q Q A S K M P P K G K D M P M A V Stp G G L N G N W S S S E F N N K L P R C R P K E		
Rhesusaffe <i>(Macaca mulatta)</i>	TAGGAC ATG CC ATG CGGG...TGTAAGGGGCTTGAACGGCAACTGGAGCAGTT CAG AGTTCAACAACAAGCTTCCAAG ATC CGGCCAAAGGAAAA G H A H G G V R G L E R Q L E Q F R V Q Q Q A S K M P P K G K Stp D M P M A V Stp G G L N G N W S S S E F N N K L P R C R P K E		
Grüne Meerkatze <i>(Chlorocebus aethiops)</i>	...GAC ATG CC ATG CGGG...TGTAAGGGGCTTGAACAGCAACTGGAGCAGTT CAG AGTTCAACAACAAGCTTCCAAG ATC CGGCCAAAGGAAAA H A H G G V R G L E Q Q L E Q F R V Q Q Q A S K M P P K G K D M P M A V Stp G G L N S N W S S S E F N N K L P R C R P K G		
Eulenäffchen <i>(Aotus trivirgatus)</i>	...GG ATG CC ATG CGGG...TCTAAAGGGCTTGAACGGCAACTGGAGCAGTT CAG AGTTCAACAGCAGTTTCCAAG ATC CGGCCAAAGGAAAA A C P C G L K G L V R Q L E Q F R V Q Q Q V S K M P P K G K G M P M W S K G A C K A T G A V Q S S T A G F Q D A A Q R K		
Lisztäffchen <i>(Saguinus oedipus)</i>	...GGCATTCC ATG CGGG...TCTAAAGGGCTTGAACGGCAACTGGAGCAGTT CAG AGTTCAACAGCAGTTTCCAAG ATC CGGCCAAAGGAAAA A F P C G L K G L V R Q L E Q F R V Q Q Q V S K M P P K G K G I P M W S K G A C K A T G A V Q S S T A G F Q D A A Q R K		
Rind <i>(Bos Taurus)</i>	TAGGACACACCACTGGGGCTGAGGGCTCTTTTGTAGCACCGGAACAGTTGCCGGAGAGTTTATCCGCCAGCTTAAAG ATC CGGCCAAAGGAAAA G H T S G A Stp R G F V R Q P K Q L R V Q R Q T L E M P P K G K		
Maus <i>(Mus musculus)</i>	GAGGACATACCTGTGGGGCTGAGGGCTCTTTTGTAGCACCGGAACAGTTGCCGGAGAGTTTATCCGCCAGCTTAAAG ATC CGGCCAAAGGAAAA E D I P V G P E G S F C Stp H R N S C R R V H P P A Stp E M P P K G K		

Abb. 8 A&B Alignments der analysierten Abschnitte der Exons 1 (Teil **B**) und 3 (Teil **A**) des Parvulin-Gens. (Erklärung siehe nächste Seite)

Abb. 8 A&B Alignments der analysierten Abschnitte der Exons 1 (Teil **B**) und 3 (Teil **A**) des Parvulin-Gens (siehe vorherige Seite). Unter den Nukleotidsequenzen sind jeweils die entsprechenden Aminosäuresequenzen angegeben (in schwarz) bzw. die Aminosäuren, welche sich vom ATG-Start-Codon des Par14 in *upstream* Richtung ergäben, wenn der Leserahmen zwischen Par17 und Par14 Start-ATG durchgehend wäre (in grau). Exon 3 ist in allen Organismen (auch Maus und Rind) hoch konserviert, es kommen maximal zwei Austausche auf Aminosäureebene vor, welche in Teil **A** der Abbildung schwarz unterlegt sind. In Teil **B** der Abbildung ist zu erkennen, dass die Erweiterung des Leserahmens in allen Primaten vorgeformt ist, das zusätzliche ATG-Codon, welches den Translationsstart für Par17 darstellt, ist mit Ausnahme des Lisztäffchens bei allen Primaten vorhanden. Nur bei Mensch, Schimpanse, Gorilla und Orang-Utan ist der Leserahmen durchgehend, beim Gibbon ist er durch ein *in frame* STOP-Codon (TAA) unterbrochen. In der menschlichen Sequenz sind die beiden SNPs, die zum Auftreten der beiden Isoformen –QR und –RS der Prä-Sequenz führen, grau unterlegt.

Die in Abbildung 8 dargestellten Sequenzen der Exons 1 und 3 des Parvulin-Gens aller untersuchter Primaten wurden auch in der EMBL *Nucleotide Sequence Database* (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) hinterlegt und können dort eingesehen werden. Die entsprechenden *Accession Numbers* dieser Datenbankeinträge sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tab. 9 *Accession Numbers* der Datenbankeinträge, unter denen die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen der Exons 1 und 3 des Parvulin-Gens in der EMBL *Nucleotide Sequence Database* zu finden sind.

Spezies	EMBL <i>Accession Number</i>
Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	AM420633
Schimpanse (<i>Pan troglodytes</i>)	AM420634
Gorilla (<i>Gorilla gorilla</i>)	AM420635
Orang-Utan (<i>Pongo pygmaeus</i>)	AM420636
Gibbon (<i>Hylobates sp.</i>)	AM420637
Pavian (<i>Papio hamadryas</i>)	AM420638
Rhesusaffe (<i>Macaca mulatta</i>)	AM420639
Grüne Meerkatze (<i>Chlorocebus aethiops</i>)	AM420640
Eulenäffchen (<i>Aotus trivirgatus</i>)	AM420641
Lisztäffchen (<i>Saguinus oedipus</i>)	AM420642

Bei der Betrachtung der Sequenzen des Exon 1 fällt auf, dass nur in der Sequenz des Menschen die beiden SNPs auftauchen, die zum Auftreten der beiden Isoformen QR und RS des Par17 führen. In den Sequenzen aller getesteter Primaten sowie in der des Rindes ist nur die QR Form codiert, auch wenn dort kein durchgehender Leserahmen vorliegt. Das bedeutet aber nicht zwangsläufig, dass die RS-Form in anderen Organismen nicht vorkommt, da sie im Menschen auch nur in bestimmten cDNAs identifiziert wurde (Mueller et al 2006).

Ein durchgehender offener Leserahmen und somit die Möglichkeit zur Expression von Par17 konnte also nur bei den Großen Menschenaffen (Hominidae) nachgewiesen werden. Die Entwicklung der Sequenz folgt dabei der Evolution der Primaten. Abbildung 9 zeigt eine schematische Darstellung der Phylogenie der Anthropoiden und der Entwicklung der Prä-Sequenz des Par17.

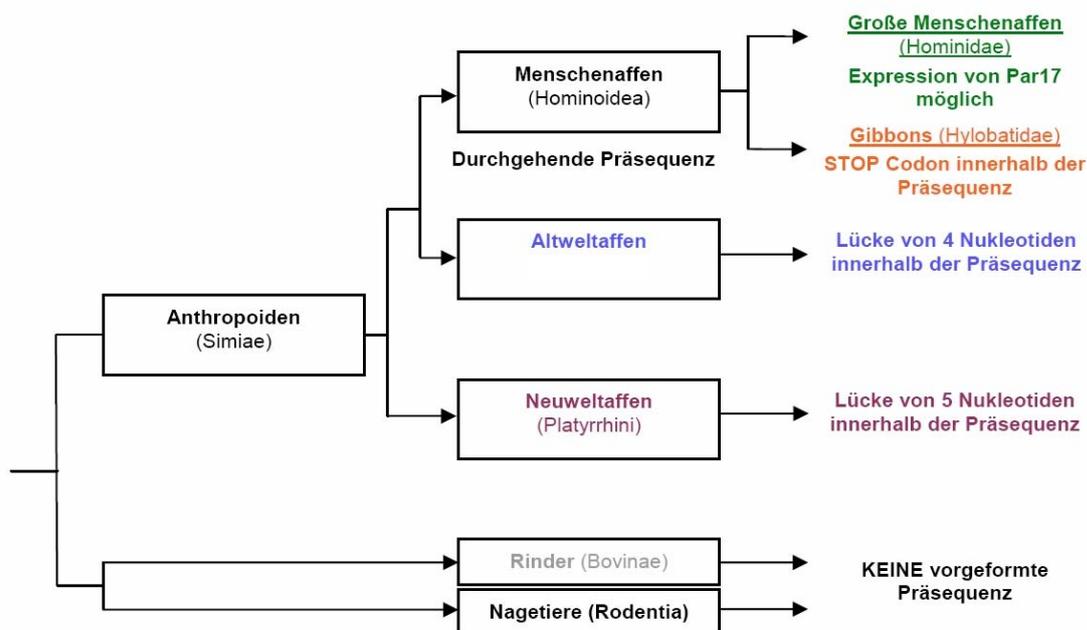


Abb. 9 Schematische Darstellung der Entwicklung der Prä-Sequenz des Par17 innerhalb der Anthropoiden. Die Evolution der Prä-Sequenz folgt der Phylogenie der Anthropoiden.

Nach dieser phylogenetischen Analyse der Entwicklung der Sequenz sollte nun die Funktion des Prä-Peptids und sein Einfluss auf die Verteilung der Parvuline in der Zelle untersucht werden.

3.3 Subzelluläre Lokalisation der Parvuline

Die Expression einer verlängerten Parvulin-mRNA wurde in verschiedenen menschlichen Geweben nachgewiesen (Mueller *et al.* 2006). Die N-terminale Prä-Sequenz, durch die sich Par14 und Par17 unterscheiden, bildet eine positiv geladene amphipatische Helix, die als mitochondriales Targeting-Signal fungieren könnte (Prinz *et al.* 2002). Daher wurden die beiden Parvuline auf Unterschiede in ihrer subzellulären Lokalisation untersucht.

3.3.1 Vorhersage der Lokalisation der Parvuline mit verschiedenen Vorhersage-Algorithmen

Von Par14 ist bekannt, dass es größtenteils im Zellkern angereichert sowie zu einem kleineren Teil gleichmäßig im Cytosol verteilt ist (Surmacz *et al.* 2002). Nun sollte der Einfluss der Prä-Sequenz des Par17 auf die Verteilung des Proteins innerhalb der Zelle aufgeklärt werden. Die Vorhersage der subzellulären Lokalisation von Par14 und Par17 mit Hilfe verschiedener Vorhersage Algorithmen fiel jedoch nicht eindeutig aus. Die Programme Predotar und Mitoprot erkannten Par17 als mitochondriales Protein, PSORTII aber nicht. TargetP gab für die beiden Isoformen von Par17 an, mit einer Wahrscheinlichkeit von je etwa 50% mitochondrial lokalisiert zu sein, Mitopred schließlich bezeichnete sowohl Par14 als auch Par17 als mitochondrial. Tabelle 10 zeigt eine genaue Übersicht über die von den fünf Programmen berechneten Wahrscheinlichkeiten der mitochondrialen Lokalisation von Par14, Par17-QR und Par17-RS.

Tab. 10 Wahrscheinlichkeiten für eine mitochondriale Lokalisation von Par14, Par17-QR und Par17-RS, berechnet mit fünf verschiedenen Vorhersage-Algorithmen. Die Wahrscheinlichkeiten können zwischen 0 und 1 liegen, wobei ein Wert von 1 bedeutet, dass für das entsprechende Protein vorhergesagt wird, mit einer Wahrscheinlichkeit von 100% in den Mitochondrien lokalisiert zu sein.

Programm	Par14	Par17QR	Par17RS
Mitopred	0.846	0.99	0.99
Mitoprot	0.0454	0.4088	0.9242
Predotar	0.02	0.39	0.56
PSortII	0.174	0.130	0.087
TargetP	0.126	0.403	0.494

3.3.2 Nachweis von endogenem Parvulin in menschlichen Zellen durch Zellfraktionierung und Western Blotting

Da die Vorhersage der Lokalisation der Parvuline mit Hilfe verschiedener Algorithmen nicht eindeutig ausfiel, wurden experimentelle Ansätze zum Nachweis der Verteilung von Par14 und Par17 in der Zelle gewählt. Um nachzuweisen, in welchen Kompartimenten das endogene Par17 lokalisiert ist, wurden HeLa Zellen in vier verschiedene Fraktionen aufgetrennt: Das Cytosol, die Zellkerne, die Mitochondrien sowie eine Membran-Fraktion, die Membranen und sonstige Zelltrümmer enthält. Die in den Fraktionen enthaltenen Proteine wurden auf SDS-PAGE-Gelen aufgetrennt, geblottet und mit verschiedenen Antikörpern charakterisiert. Zum Nachweis von Par17 wurde der in Mueller *et al.* 2006 beschriebene Antikörper Anti-EXT (4113AF) verwendet, der an die Prä-Sequenz von Par17 bindet und somit nur Par17, nicht aber Par14 erkennt. Um die Reinheit der Fraktionen zu überprüfen, wurden Antikörper gegen spezifische Marker-Proteine, deren Lokalisation innerhalb der Zelle bekannt ist, eingesetzt.

Der Nachweis der Marker-Proteine GAPDH und Cytochrom C in den Fraktionen fiel eindeutig aus: GAPDH konnte im Cytosol, Cytochrom C in den Mitochondrien nachgewiesen werden. Allerdings konnten weder für Golgin97, noch für panCadherin oder p84 spezifische Banden identifiziert werden, wodurch insbesondere die Zusammensetzung der Membran-Fraktion nicht eindeutig definiert werden konnte. Der Vergleich mit dem SDS-PAGE-Gel zeigt außerdem, dass die Spuren aller vier Fraktionen gleichmäßig mit Protein (30 µg pro Spur) beladen wurden (s. Abb. 10).

Das Par17 konnte in der Mitochondrien-Fraktion sowie in der Membran-Fraktion nachgewiesen werden. Durch den Vergleich mit dem als Positivkontrolle eingesetzten, in *E. coli* exprimierten Par17, konnte das Par17 auf den Blots eindeutig identifiziert werden. Im Zellkern sowie im Cytosol, wo das Par14 lokalisiert ist (Surmacz *et al.* 2002), wurde kein Par17 detektiert.

In Abbildung 10 sind die Ergebnisse der Western Blots dargestellt.

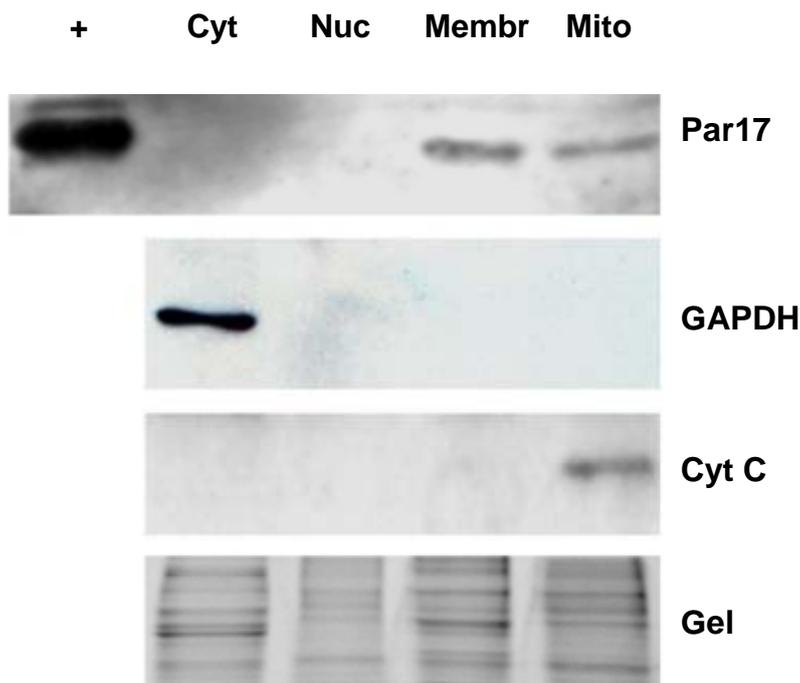


Abb. 10 Nachweis von endogenem Par17 in HeLa Zell-Fractionen. Fractionen von HeLa Zellen wurden auf einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern gegen GAPDH und Cytochrom C charakterisiert. Par17 kann in der Membran-Fraktion und in den Mitochondrien nachgewiesen werden.
 + = Positivkontrolle (in *E. coli* exprimiertes Par17), Cyt = Cytosol, Nuc = Zellkerne, Membr = Membran-Fraktion, Mito = Mitochondrien.

3.3.3 Lokalisationsbestimmung mit überexprimierten Parvulin-EGFP Fusionsproteinen

Um den Einfluss der Prä-Sequenz des Par17 auf die subzelluläre Lokalisation in menschlichen Zellen genauer zu untersuchen, wurden Fusionsproteine mit EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) hergestellt und in HeLa Zellen exprimiert. Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ist zu erkennen, dass Par14 wie zuvor beschrieben (Surmacz *et al.* 2002) größtenteils im Zellkern angereichert sowie unstrukturiert im Cytoplasma verteilt ist. Die beiden Isoformen von Par17 (QR und RS) hingegen sind fast vollständig an bzw. in den Mitochondrien lokalisiert. Das als Kontrolle exprimierte, nicht-fusionierte EGFP befindet sich fast vollständig im Zellkern (Abb. 11 A). Um den Einfluss der Prä-Sequenz auf die mitochondriale Lokalisation genauer zu untersuchen, wurden Deletionskonstrukte hergestellt. Auch die Deletionskonstrukte von Par17, also die beiden Isoformen des Präpeptids mit und

ohne basische Domäne mit EGFP fusioniert, scheinen größtenteils an bzw. in den Mitochondrien lokalisiert zu sein (Abb. 11 B), allerdings sind auch zwischen den Mitochondrien sowie im Bereich des Zellkerns schwache Hintergrundsignale zu erkennen. Die Deletionskonstrukte scheinen also zu einem etwas geringeren Anteil als die *full length* Proteine mitochondrial lokalisiert zu sein.

Die Berechnung der genauen Werte der Kolo­kalisierung mit Hilfe der entsprechenden Funktion der Cell[^]P Software bestätigte den optischen Eindruck der subzellulären Lokalisation der verschiedenen Fusions-Proteine. Während Par14-EGFP nur zu etwa 11% mit den Signalen des mitochondrienspezifischen Farbstoffs MitoTracker orange überlagert, liegen die entsprechenden Werte der beiden Isoformen von Par17 bei 77% (RS) bzw. 63% (QR). Auch die Deletionskonstrukte, die die Par17 Prä-Sequenz, jedoch nicht die PPlase Domäne enthalten, zeigen deutlich höhere Kolo­kalisationswerte als das Par14. Die Konstrukte aus Prä-Sequenz und basischer Domäne sind zu 49% (RS) bzw. 42% (QR) mitochondrial lokalisiert, die beiden Isoformen der Prä-Sequenz alleine mit EGFP fusioniert zu 29% (RS) bzw. 34% (QR). Im Vergleich zu diesen Werten kolo­kalisiert nicht-fusioniertes EGFP nur zu etwa 4% mit den mitochondrialen Signalen. Die Abbildung 12 gibt einen genauen Überblick über alle getesteten Fusionsproteine und die entsprechenden Kolo­kalisierungswerte. Alle Konstrukte, die die Prä-Sequenz des Par17 enthalten, sind also zu einem deutlich höheren Anteil mitochondrial lokalisiert als das Par14. Die Kolo­kalisierungswerte werden jedoch niedriger, je kürzer das Protein ist.

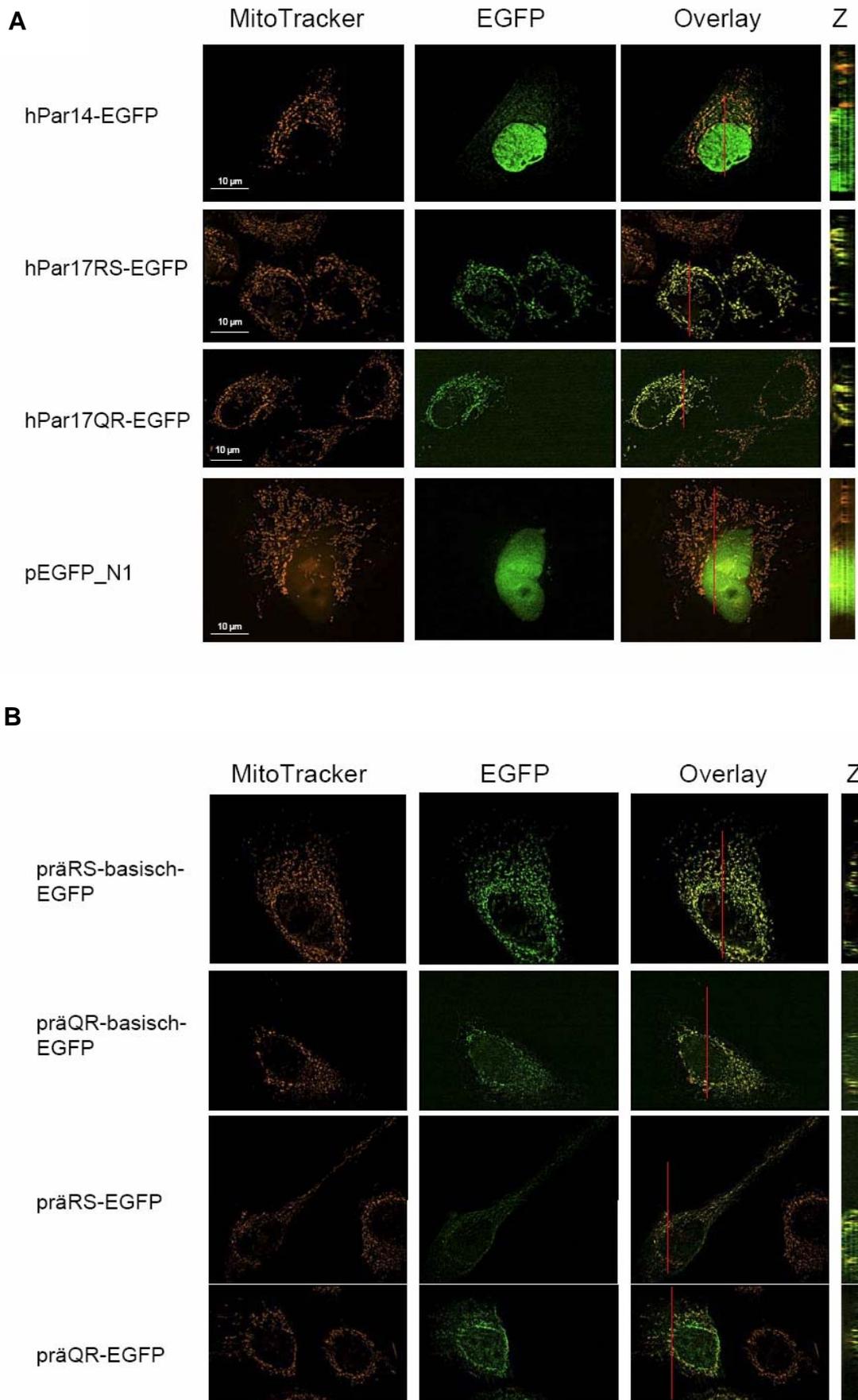


Abb. 11 A & B Expression von Parvulin-EGFP-Fusionsproteinen in HeLa-Zellen. (Erklärung siehe nächste Seite)

Abb. 11 A & B Expression von Parvulin-EGFP-Fusionsproteinen in HeLa-Zellen (siehe vorherige Seite). Alle Konstrukte wurden C-terminal mit EGFP fusioniert. Es wurden *full length* Konstrukte von Par14, Par17 (-QR und -RS) (Teil **A**) sowie Deletionskonstrukte, die zwar die Prä-Sequenz enthielten, aber C-terminal um die PPIase- bzw. PPIase- und basische Domäne verkürzt waren (Teil **B**), in HeLa Zellen exprimiert. Unfusioniertes EGFP (aus dem Vektor pEGFP_N1) wurde als Kontrolle exprimiert. Die Mitochondrien wurden mit Mitotracker orange angefärbt. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der Präparate wurden Mitotracker- und EGFP-Signale getrennt voneinander aufgenommen und die entsprechenden Bilder dann übereinander gelegt (Overlay). Da keine Einzelbilder, sondern Stapel von je etwa 25 Bildern mit einem Abstand von etwa 2 μm aufgenommen wurde, konnte eine 3D Rekonstruktion erfolgen und Schnitte durch die Zelle angefertigt werden (Z). Die roten Linien in den Bildern zeigen an, an welcher Stelle im Bild der entsprechende Z-Schnitt vorgenommen wurde. Anhand der Bilder ist deutlich zu erkennen, dass alle Konstrukte, die die Prä-Sequenz des Par17 tragen, größtenteils mitochondrial lokalisiert sind, wohingegen Par14 wie zuvor beschrieben im Zellkern und zu einem kleineren Teil im Cytoplasma zu finden ist. Unfusioniertes EGFP wird fast vollständig im Zellkern detektiert.

Konstrukt	prä	basisch	PPIase	EGFP	Kolokalisierung [%]
hPar14					11 \pm 6
hPar17 RS					77 \pm 5
hPar17 QR					63 \pm 9
PräRS basisch					49 \pm 8
PräQR basisch					42 \pm 11
PräRS					29 \pm 15
PräQR					34 \pm 13
EGFP					4 \pm 1

Abb. 12 Schematische Darstellung der Parvulin-EGFP-Konstrukte, die in HeLa Zellen exprimiert wurden, mit den entsprechenden Kolokalisierungswerten. Diese Werte geben an, wieviel Prozent der EGFP-Signale des jeweiligen Konstrukts mit den Signalen des MitoTracker überlagern. Zusätzlich die Standardabweichung angegeben. Der Kolokalisierungswert ist also ein Maß für die mitochondriale Lokalisation der einzelnen Konstrukte.

Nachdem in diesen Lokalisationsstudien gezeigt wurde, dass Par14 und Par17 aufgrund des N-terminalen Prä-Peptids eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation aufweisen, sollte nun geklärt werden, ob das Prä-Peptid in Par17 einen Einfluss auf die für Par14 beschriebenen DNA-Bindungseigenschaften (Surmacz *et al.* 2002) hat oder ob Par17 wie Par14 gut an doppelsträngige DNA bindet.

3.4 Funktionelle Studien: DNA-Bindungseigenschaften von Par17

Über Par14 ist bekannt, dass es an doppelsträngige DNA bindet (Surmacz *et al.* 2002). Um zu überprüfen, ob Par17 die gleichen DNA-Bindungseigenschaften wie Par14 aufweist oder ob diese durch die N-terminale Verlängerung des Proteins beeinflusst werden, wurde ein DNA-Bindungsassay durchgeführt.

Es wurden EGFP-Fusionsproteine von Par14, Par17-RS und Par17-QR (s. Abschnitt 2.3.2), sowie unfusioniertes EGFP als Negativkontrolle, in HeLa-Zellen überexprimiert, die Zellen lysiert und die Lysate mit DNA-Cellulose inkubiert. Die Cellulose-Beads wurde dann in mehreren Schritten mit Puffer mit aufsteigender Salzkonzentration (0, 50, 100, 200 & 500 mM KCl) gewaschen, die einzelnen Eluate gesammelt, auf SDS-Page Gelen aufgetrennt und geblottet wie oben beschrieben. Mit einem anti-EGFP Antikörper konnten dann die Fraktionen identifiziert werden, in denen die verschiedenen Proteine von der DNA-Cellulose abgelöst wurden. Je höher die Salzkonzentration, bei der das Protein abgewaschen wurde, desto stärker war die Bindung an die DNA-Cellulose.

Da die Detektion der Banden auf den Blots mit Hilfe des Antikörpers nicht ausreichend sensitiv war, wurden die Experimente in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Rassow (Ruhr-Universität Bochum) wiederholt. Dabei wurden ³⁵S-Methionin markiertes Par14 und Par17 eingesetzt und die Gele autoradiographisch ausgewertet (s. Abb. 13). Eine genaue Beschreibung der Durchführung findet sich in Kessler *et al.* (2007).

Beide Isoformen des Par17 zeigen gleiche Bindungseigenschaften wie Par14, die Proteine werden erst bei hohen Salzkonzentrationen eluiert. Während freies EGFP bereits bei 50 mM KCL abgewaschen wird, werden Par14 und Par17 größtenteils bei 100 und 200, zum Teil auch noch bei 500 mM KCl von der DNA gelöst (s. Abb. 13).

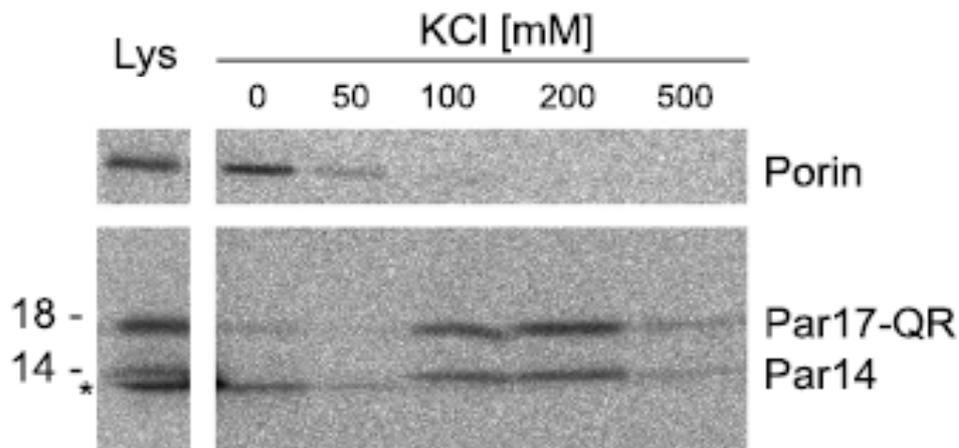


Abb. 13 Bindung von Par14 und Par17 an DNA-Cellulose. Radioaktiv markiertes Par14 und Par17 sowie Porin als Kontrolle wurden mit DNA-Cellulose-Beads inkubiert und mit Puffer mit aufsteigender Salzkonzentration gewaschen (0-500 mM KCl). Die einzelnen Eluate sowie das unbehandelte Lysat (nicht mit DNA-Cellulose-Beads inkubiert) wurden auf einem Gel aufgetrennt und die Banden der radioaktiv markierten Proteine autoradiographisch auf einem Foto-Film sichtbar gemacht. Während Porin auch mit Waschpuffer ohne Salz von den Beads gelöst wird, binden sowohl Par14 als auch Par17 an die DNA-Cellulose und können erst bei Salzkonzentrationen ab 100 mM KCl abgewaschen werden.

(Abbildung aus Kessler *et al.* (2007); Experiment durchgeführt von Dr. Panagiotis Papatheodorou und Elke A. Dian (Ruhr-Universität Bochum))

Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle durchgeführt, bei der die DNA-Cellulose zuvor mit Benzonase behandelt wurde, um die DNA von den Cellulose-Beads zu entfernen und eine unspezifische Anlagerung der Proteine an die Beads ausschließen zu können. Der Blot der Eluate dieses Experiments zeigt, dass auch hier Protein in den Fraktionen, die mit 100 und 200 mM KCl eluiert wurden, enthalten ist. Zwar sind die Banden bei der Negativkontrolle deutlich schwächer als im eigentlichen Experiment, jedoch befinden sich immer noch eindeutig Par14 und Par17 in den Fraktionen (ohne Abb.). Das beruht vermutlich auf einem unvollständigen Verdau der DNA durch die Benzonase, so dass sich immer noch DNA an der Cellulose befand, an die die Proteine binden konnten. Eine Bindung der Parvuline an DNA konnte also belegt werden, da der Anteil an gebundenem Protein abnimmt, wenn die DNA entfernt wurde. Unspezifische Wechselwirkungen zwischen den Parvulinen und der Cellulose können jedoch aufgrund dieses Experiments nicht vollständig ausgeschlossen werden.

4. Diskussion

4.1 Struktur und Evolution des Parvulin-Gens: Bioinformatik und phylogenetische Studien

Das erst kürzlich beschriebene menschliche Parvulin-Protein Par17 unterscheidet sich von dem bereits gut charakterisierten Par14 nur durch eine N-terminale Prä-Sequenz von 25 Aminosäuren. In einer *in silico* Analyse konnte gezeigt werden, dass beide Proteine durch dasselbe Gen auf Chromosom Xq13.1 codiert werden. Durch Nutzung alternativer Transkriptionsstartpunkte kann eine mRNA gebildet werden, die einen erweiterten Leserahmen sowie ein zusätzliches ATG-Start-Codon trägt und die Grundlage für die Expression der unterschiedlichen Proteine bildet. Es konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsstart von Par14 und Par17 inmitten einer CpG-Insel liegt, die der Definition von Gardiner-Garden & Frommer (1987) entspricht. Es konnte keine TATA-Box oder eine andere klassische Promotor-Sequenz identifiziert werden.

Dieses sind typische Eigenschaften der Promotoren von *Housekeeping*-Genen, welche für die grundlegenden Funktionen der Zelle verantwortlich sind (Eisenberg & Levanon 2003). Diese Promotoren liegen oftmals innerhalb einer CpG-Insel und weisen an Stelle eines einzelnen starken eine Vielzahl an schwachen Promotorelementen auf (Knippers 1997). Somit kann die Struktur des Parvulin-Promotors, die der von klassischen *Housekeeping*-Genen ähnelt, als Hinweis auf eine essentielle Funktion des Parvulins in der Zelle gewertet werden, da es sich vermutlich um ein *Housekeeping*-Gen handelt.

Das für die Expression von Par17 benötigte Start-Codon, welches 75 Nukleotide *upstream* vom Startpunkt des Par14 liegt, konnte anhand der in Datenbanken zugänglichen Sequenzen nur beim Menschen identifiziert werden. Andere Säugetiere wie das Rind, die Ratte und die Maus weisen diese Erweiterung des Leserahmens und damit die Möglichkeit zur Expression von Par17 nicht auf, was bereits in Mueller *et al.* (2006) beschrieben wurde. Kurz nach der Veröffentlichung dieses Artikels stand dann das Genom des Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) zur Verfügung. Der Rhesusaffe zeigt zwar in seiner Sequenz ein zusätzliches ATG-Start-

Codon, jedoch ist dieses durch eine Lücke innerhalb der Sequenz relativ zur menschlichen Sequenz nicht *in frame* mit dem Start-Codon des Par14, so dass auch hier kein durchgehender Leserahmen vorliegt.

Da der Datenbankeintrag des Schimpansen an den entscheidenden Stellen (Exon 1) unvollständig war, stellte das Genom des Rhesusaffen den phylogenetisch nächsten Verwandten des Menschen dar, dessen Sequenz zur Analyse zugänglich war. Es ergab sich also die interessante Frage, an welchem Punkt innerhalb der Evolution der Anthropoiden das Par17 zum ersten Mal auftaucht.

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine phylogenetische Analyse des Parvulin-Locus von verschiedenen Anthropoiden durchgeführt. Die Analyse zeigte, dass außer dem Menschen nur der Schimpanse, der Gorilla und der Orang-Utan einen durchgehenden *open reading frame* für die Expression von Par17 aufweisen. Diese Arten bilden zusammen die Gruppe der Großen Menschenaffen oder Hominidae.

Weder bei den Altwelt- noch bei den Neuweltaffen konnte ein durchgehender *open reading frame* zur Par17 Expression identifiziert werden, obgleich die Sequenz bereits hohe Ähnlichkeit mit der codierenden Sequenz in den Hominiden aufweist und bei fast allen Organismen auch das zusätzliche ATG-Codon bereits zu finden ist. Die Evolution der Prä-Sequenz folgt der Evolution der Primaten, es ist kein plötzliches Auftreten der Sequenz im Verlauf der Primatenevolution zu erkennen. Die Lücke in der Sequenz, die einen durchgehenden ORF für Par17 verhindert, wird durch Einfügen von Nukleotiden kleiner. Während die Neuweltaffen eine Lücke von 5 Nukleotiden aufweisen, sind es bei den Altweltaffen nur noch 4 Nukleotide, bei den Menschenaffen schließlich ist die Sequenz durchgehend und das zusätzliche ATG Codon *in frame* mit dem des Par14. Ein durchgehender ORF für Par17 durch Umstrukturierung der Sequenz ist demnach erst nach der Auftrennung von Menschenaffen (Hominoidea), wozu die Hominidae und die Gibbons gehören, und Altweltaffen entstanden. Diese Aufspaltung fand vor etwa 23 Millionen Jahren statt (Glazko & Nei 2003, Goodman *et al.* 2005). Das Stop-Codon, welches beim Gibbon den ORF unterbricht, wurde vermutlich erst nachträglich, nach der Aufspaltung der Menschenaffen in Hominidae und Gibbons vor etwa 16 Millionen Jahren, ausgebildet (Glazko & Nei 2003, Goodman *et al.* 2005).

Das Auftreten des erweiterten Leserahmens, der die Expression des Par17 ermöglicht, konnte also auf die Großen Menschenaffen beschränkt werden. Somit scheint es sich bei Par17 um ein Hominiden-spezifisches Protein zu handeln. Die Funktion der Prä-Sequenz auf die subzelluläre Lokalisation und Funktion des Par17 sowie der mögliche Einfluss von Par17 auf die Evolution der Menschenaffen werden in den folgenden Abschnitten ausführlich diskutiert.

4.2 Subzelluläre Lokalisation der humanen Parvuline

Die N-terminale Verlängerung des Par17 bildet eine positiv geladene amphipatische Helix aus (s. Abb. 2B). Solche Helices fungieren oftmals als mitochondriale Targeting Signale (Prinz *et al.* 2002). Der Versuch, die Lokalisation mit verschiedenen *Prediction Tools* vorherzusagen, fiel jedoch nicht eindeutig aus: Drei von fünf Programmen (Mitoprot, Predotar und TargetP) bezeichneten die beiden Isoformen von Par17 (QR und RS) als mitochondrial oder wahrscheinlich mitochondrial, Mitopred gab sowohl für Par14 als auch Par17 eine Lokalisation in den Mitochondrien an, wohingegen PSORTII keines der Parvuline als mitochondrial erkannte. Deswegen waren experimentelle Ansätze notwendig, um die Lokalisation der Parvuline in der Zelle eindeutig zu bestimmen. Endogenes Par17 wurde in Fraktionen von HeLa Zellen (Zellkerne, Cytosol, Membran-Fraktion und Mitochondrien) mittels Western Blotting detektiert. Das Par17 konnte hierbei in den Mitochondrien sowie in der Membran-Fraktion, in der sich Zelltrümmer und Membranen ansammeln, mit einem spezifisch gegen die Prä-Sequenz gerichteten Antikörper nachgewiesen werden.

Um die Bedeutung der Prä-Sequenz des Par17 auf die subzelluläre Lokalisation des Proteins genauer zu untersuchen wurden Fusionsproteine aller drei Formen des Parvulins (Par14, Par17-RS und Par17-QR) sowie Deletionskonstrukte, die nur die Prä-Sequenz bzw. die Prä-Sequenz und die basische Domäne enthielten, hergestellt, die C-terminal mit dem ***Enhanced Green Fluorescent Protein*** (EGFP) verknüpft waren. Die Fusionsproteine wurden in HeLa Zellen exprimiert und die Fluoreszenzsignale des EGFP in den unterschiedlichen Kompartimenten der Zellen fluoreszenzmikroskopisch detektiert. Die Mitochondrien wurden mit Hilfe des spezifischen Farbstoffs MitoTracker orange sichtbar gemacht, eine Färbung des

Zellkerns war nicht nötig, da die Mitochondrien den Kern ringförmig umschließen und dieser daher nach MitoTracker-Färbung eindeutig zu identifizieren war. Die Par14-EGFP-Fusionsproteine lokalisierten größtenteils im Zellkern sowie gleichmäßig verteilt im Cytoplasma. Die zuvor beschriebene Verteilung von Par14 in der Zelle (Surmacz *et al.* 2002) konnte also bestätigt werden. Die *full length* Par17-EGFP Konstrukte überlagerten fast vollständig mit den Signalen der Mitochondrien. Auch die C-terminal um PPlase- oder PPlase- und basische Domäne verkürzten Konstrukte waren größtenteils mitochondrial. Zwar nahm der Anteil des Proteins, der mit den Mitochondrien kolokalisierte, ab, je kürzer das auf die Prä-Sequenz folgende Protein war, die Werte waren jedoch immer noch deutlich höher als bei Konstrukten ohne Prä-Sequenz. Die Prä-Sequenz des Par17 stellt also ein Signal zum mitochondrialen Targeting dar. Allerdings scheinen auch basische und PPlase-Domäne einen Einfluß auf die Lokalisation zu haben.

***In vitro* Import Experimente**

Die Ergebnisse konnten in Kooperation mit Dr. Panagiotis Papatheodorou und Prof. Dr. Joachim Rassow (Ruhr-Universität Bochum) bestätigt werden. In *in vitro* Import Experimenten mit isolierten Mitochondrien konnte eine Anlagerung von Par17 und Par14 an die Oberfläche der Mitochondrien gezeigt werden. Hierzu wurden radioaktiv markiertes Par14 und Par17 mit menschlichen (Jurkat), Ratten- und Hefe-Mitochondrien inkubiert, abzentrifugiert, die Pellets auf Gelen aufgetrennt und autoradiographisch ausgewertet. Durch Proteinase K (PK) Behandlung wurde an der äußeren Mitochondrien-Membran haftendes Protein entfernt. Auf den Gelen ist zu erkennen, dass sowohl Par14 als auch Par17 mit den Mitochondrien assoziiert sind. Nach Verdau der von außen an den Mitochondrien haftenden Proteinen verschwindet die Bande des Par14 und nur die Bande des Par17 ist noch zu sehen. Par17 befindet sich also offenbar zu einem Teil innerhalb der Mitochondrien, wo es vor dem Abbau durch Proteinase K geschützt ist (s. Abb. 14 A). Durch diesen Nachweis der Assoziation beider Parvuline mit der Membran der Mitochondrien lässt sich auch das in den Zell-Fraktionierungen beobachtete Par17 in der Membran-Fraktion erklären (s. Abschnitt 3.3.2).

Ferner konnte belegt werden, dass Par17 in die mitochondriale Matrix transportiert wird. Par17, welches mit Rattenleber-Mitochondrien inkubiert wurde, ist auch dann

noch auf dem Gel zu erkennen, wenn die äußere Membran durch Schwellen zerstört und freie Proteine durch Proteinase K verdaut wurden. Erst nach Behandlung mit Digitonin, welches die Auflösung der inneren Membran bewirkt, verschwindet die Bande des Par17. Das als Kontrolle verwendete Protein VDAC (*Voltage dependent anion channel*), ein Porin der äußeren Mitochondrien-Membran (Mueller *et al.* 2000), wird bereits nach dem Schwellen von der Proteinase K abgedaut (s. Abb. 14 B). Par17 befindet sich also offenbar innerhalb der mitochondrialen Matrix, da es erst nach der Zerstörung der inneren Membran für den Verdau zugänglich wird. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Transport von Par17 in die Matrix abhängig von einem intakten mitochondrialen Membran-Potenzial ist und die Importeffizienz im Lauf der Zeit steigt. Eine genaue Beschreibung der Durchführung und Ergebnisse aller Import-Experimente findet sich in Kessler *et al.* (2007).

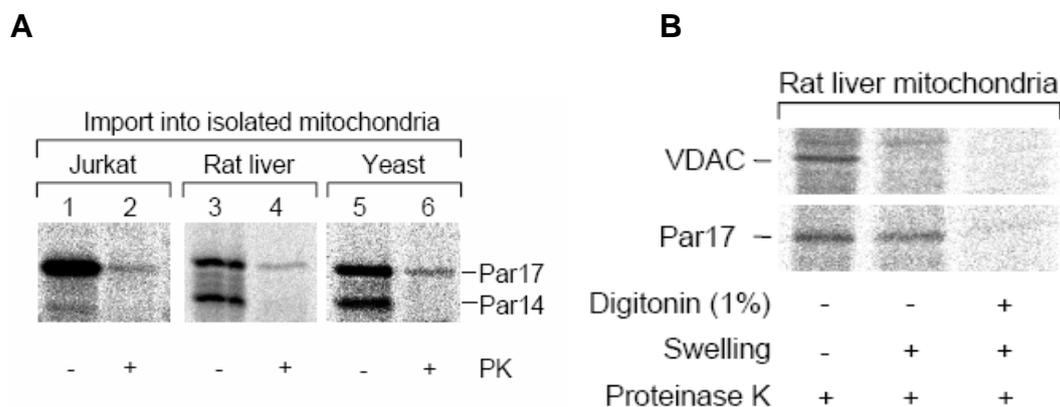


Abb. 14 A&B Ergebnisse der *in vitro* Import-Experimente mit isolierten Mitochondrien

A Anlagerung von Par14 und Par17 an Mitochondrien. Sowohl Par14 als auch Par17 sind mit der Membran assoziiert, aber nur Par17 kann nicht durch Proteinase K (PK) verdaut werden und muss sich demnach im Inneren der Mitochondrien befinden.

B Par17 wird in die mitochondriale Matrix transportiert. Mit Rattenleber-Mitochondrien inkubiertes Par17 kann auch nach der Entfernung der äußeren Membran durch Schwellen noch detektiert werden. Erst nach Zerstörung der inneren Membran durch Digitonin wird Par17 durch Proteinase K verdaut. VDAC bezeichnet das Porin, welches in der äußeren Mitochondrien-Membran lokalisiert ist und als Kontroll-Protein diente.

(Abbildungen aus: Kessler *et al.* 2007)

Sowohl in den Zellfraktionen als auch in den Import Experimenten wurde deutlich, dass Par17 nach Erreichen der mitochondrialen Matrix noch in seiner vollen Länge vorliegt und als Bande von 17 kDa Größe detektiert wird. Somit wird die Prä-Sequenz nach dem Import offenbar nicht vom Rest des Proteins abgetrennt. Das ist zwar ungewöhnlich, da der größte Teil der klassischen Targeting-Sequenzen nach dem Import abgespalten wird (Prinz *et al.* 2002). Es sind jedoch einige Signal-Peptide beschrieben, die nicht prozessiert werden, wie zum Beispiel die 3-Oxoacyl-CoA Thiolase, ein Enzym der β -Oxidation (Amaya *et al.* 1988), oder das mitochondriale Chaperon cpn10 (Rospert *et al.* 1993).

Die Bedeutung der Prä-Sequenz des Par17 als mitochondriales Targeting-Signal

Die Funktion der Prä-Sequenz des Par17 als mitochondriales Targeting-Signal konnte eindeutig bewiesen werden. Allerdings nimmt die Importeffizienz ab, wenn die PPlase-Domäne oder PPlase- und basische Domäne fehlen. Die Prä-Sequenz wird demnach für das mitochondriale Targeting unbedingt benötigt, doch auch die basische und die PPlase Domäne scheinen eine Rolle zu spielen. Eventuell sind diese beiden Domänen hilfreich bei der Anlagerung des Proteins an die Membran der Mitochondrien. Diese These wird durch die in den *in vitro* Import-Experimenten beobachtete Anlagerung beider Parvuline an die Mitochondrien bestätigt und erklärt den Anteil von Par17 in der Membran-Fraktion, da sich in dieser Fraktion die Trümmer von Mitochondrien und Zellmembran sammeln.

Rulten *et al.* beschrieben 1999 eine Lokalisation von Par14 im Zellkern, im Cytoplasma und in mitochondrialen Fraktionen von menschlichen HEK293 Zellen (Rulten *et al.* 1999). Es wurden mittels einer Immunogoldfärbung und elektronenmikroskopischer Auswertung Signale innerhalb der mitochondrialen Matrix detektiert, welche dem Par14 zugeschrieben wurden. Der eingesetzte Antikörper war jedoch gegen die PPlase-Domäne gerichtet, so dass es sich bei dem detektierten Protein offenbar um Par17 und nicht um Par14 handelte, da beide Proteine die gleiche PPlase-Domäne besitzen, aber nur Par17, wie nun nachgewiesen, das mitochondriale Targeting-Signal aufweist. Bei dem von Rulten *et al.* in Zellfraktionen detektierten 14 kDa großen Protein in der Mitochondrien-Fraktion handelt es sich vermutlich wirklich um Par14, welches aber nicht in der Matrix lokalisiert, sondern,

aufgrund der oben beschriebenen Affinität von Par14 zur mitochondrialen Oberfläche, nur mit der äußeren Membran assoziiert ist.

4.3 Die Regulation der Expression von Par14 und Par17

Der Mechanismus, dass aus einem Gen durch alternative Transkriptionsinitiation mehrere Proteine mit unterschiedlichen Targeting-Signalen hervorgehen können, ist bereits seit längerem bekannt und vielfach beschrieben (Danpure 1995). Ein ähnliches Präpeptid wie das des Par17, das eine amphipatische Helix bildet, kann der Serin-Pyruvat Aminotransferase (= Alanin-Glyoxylat Aminotransferase, AGT) als mitochondriales Targeting-Signal durch Nutzung eines alternativen Transkriptionsstartpunkts voran gestellt werden (Oda *et al.* 1990, Oatey *et al.* 1996). Die Verwendung alternativer Transkriptionsstartpunkte, um Transkripte mit unterschiedlicher Lokalisation zu generieren, ist in Zellen von Säugetieren eher selten, in Hefen aber sind viele Beispiele bekannt (Oatey *et al.* 1996).

Verschiedene Regulationsmechanismen der Expression der unterschiedlichen Formen sind identifiziert worden. In Hefen und einigen höheren Organismen ist die Expression verschiedener Isoformen eines Proteins häufig von metabolischen Zuständen und vom Nährstoffangebot abhängig (Elgersma *et al.* 1995, Danpure 1995). In Metazoen werden unterschiedlich lokalisierte Isoformen eines Proteins oftmals zell- bzw. gewebespezifisch exprimiert (Danpure 1995). Das ist allerdings beim Par17 offenbar nicht der Fall, da die gleichzeitige Expression beider Parvuline in einer Vielzahl menschlicher Gewebe gezeigt wurde (Mueller *et al.* 2006).

4.4 Die Funktion der Parvuline Par14 und Par17 in der Zelle

Obwohl die Bedeutung von Par14 und Par17 in der Zelle bislang nicht vollständig aufgeklärt werden konnte, lassen sich doch aufgrund dieser Arbeit sowie vorhergegangener Studien einige sinnvolle Rückschlüsse auf mögliche Funktionen der Parvuline ziehen.

Die DNA-Bindungsexperimente zeigen, dass Par17 die gleichen DNA-Bindungseigenschaften aufweist wie für Par14 zuvor beschrieben (Surmacz *et al.*

2002) und bei physiologischen Salzkonzentrationen an doppelsträngige DNA bindet. Da sich beide Proteine nur durch das mitochondriale Targeting-Signal des Par17 unterscheiden, welches für die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation verantwortlich ist, erfüllen sie vermutlich in ihrem jeweiligen Kompartiment eine ähnliche Funktion. Dafür spricht, dass die Mitochondrien und der Zellkern die beiden DNA-haltigen Kompartimente der Zelle darstellen. Beide Parvuline verfügen über die basische Domäne, welche für die Bindung an doppelsträngige AT-reiche DNA-Abschnitte größtenteils verantwortlich ist, und die PPlase-Domäne, die mit anderen Proteinen interagieren und diese isomerisieren könnte. Denkbar wäre daher eine Funktion im Bereich der Regulation von Genexpression oder Zellzyklus. Die Parvuline erkennen und binden AT-reiche gebogene DNA-Sequenzen und könnten somit über eine Bindung anderer Proteine diese an der DNA positionieren und/oder durch Konformationsänderung aktivieren. Bereits 2002 wurde von Surmacz *et al.* vermutet, dass das Par14 aufgrund seiner Affinität zu AT-reichen, gebogenen DNA-Abschnitten eine Funktion bei der Remodellierung von Chromatin einnehmen könnte. Nicht nur die Fähigkeit des Par14, DNA zu binden, wurde beschrieben (Surmacz *et al.* 2002). Es wurde eine Assoziation von Par14 mit prä-ribosomalen Ribonucleoprotein-Komplexen nachgewiesen (Fujiyama *et al.* 2002). In diesen Komplexen bindet Par14 vermutlich an rRNA. Aufgrund der Funktion der anderen an den Komplexen beteiligten Proteine wurde eine mögliche Funktion von Par14 bei der Ribosomen-Biogenese oder der Bildung von Nukleoli im Rahmen der Mitose vermutet (Fujiyama *et al.* 2002).

Parvulin und PIN

Wichtige Rückschlüsse auf eine solche Funktion von Par14 und Par17 liefert das dritte menschliche Parvulin, das PIN1, welches gut charakterisiert ist. Dem PIN1 wurde eine essentielle Funktion bei der Regulation der Mitose zugeschrieben (Lu *et al.* 1996), die auf der Interaktion des PIN1 mit Histon-Deacetylierungskomplexen beruht (Wu *et al.* 2000, Arévalo-Rodríguez *et al.* 2000). Ein *knock out* von PIN1 führt sowohl in menschlichen Zellen als auch in Hefen zu einer Blockade des Zellzyklus innerhalb der G2 Phase (Lu *et al.* 1996). Das macht PIN1 zu einem interessanten Zielmolekül bei der Entwicklung von Krebstherapeutika (Lu 2003). Par14 weist nicht nur in der PPlase-Domäne eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zum PIN1 auf, es konnte auch gezeigt werden, dass *knock outs* von PIN1 in Metazoen im Gegensatz

zur Hefe nicht letal sind (Fujimori *et al.* 1999). Diese Organismen verfügen noch über verwandte Gene wie eben das Par14, welche eventuell fehlendes PIN1 ersetzen können (Wu *et al.* 2000, Uchida *et al.* 2003). Das einzige PIN1 Homologe in der Hefe, das ESS1, ist für die Hefe essentiell und kann durch menschliches PIN1 oder auch DoDo aus *Drosophila melanogaster* komplementiert werden (Lu *et al.* 1996, Maleszka *et al.* 1996), nicht jedoch durch menschliches Par14 (Metzner *et al.* 2001). Das lässt darauf schließen, dass PIN1 und Par14 zwar eventuell ähnliche, aber nicht identische Funktionen in der Zelle ausüben.

Parvulin und HMG-Proteine

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten der einzelnen Domänen des Par14 zu verschiedenen Klassen der Chromatin-assoziierten HMG-Proteine, den HMGN- (basische Domäne) und HMGB-Proteinen (PPlase-Domäne), ist bereits eine Beteiligung von Par14 an der Organisation des Chromatins und damit an der Regulation des Zellzyklus und der Transkription vermutet worden (Surmacz *et al.* 2002). Dement *et al.* beschrieben 2005 ein HMG-Protein, das wie Par17 in den Mitochondrien lokalisiert ist. Das HMGA1 befindet sich normalerweise im Zellkern und gilt als wichtiger Marker für Krebserkrankungen, ein erhöhter HMGA1-Gehalt korreliert mit der Malignität (Reeves 2001). Kürzlich wurde HMGA1 auch in Mitochondrien und im Cytoplasma nachgewiesen (Dement *et al.* 2005). Der genaue Mechanismus der subzellulären Verteilung des HMGA1 ist noch unklar, vermutlich ist sie abhängig vom Zellzyklus. HMGA1 behält aber in den Mitochondrien seine DNA-Bindungseigenschaften. Es bindet an AT-reiche Sequenzen und ist mit dem D-Loop assoziiert, einem wichtigen regulatorischen Element im Genom der Mitochondrien. Die Überexpression von HMGA1 bewirkt verschiedene Veränderungen an den Mitochondrien, wie die Abnahme der mitochondrialen Masse und des DNA-Gehalts, die Zunahme von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS), eine Erhöhung des Membran-Potenzials sowie verstärkte Transkription verschiedener mitochondrialer Gene. Diese Veränderungen stehen im Verdacht, für die Beteiligung von HMGA1 bei der Tumorentstehung verantwortlich zu sein (Dement *et al.* 2006). Daher wäre es interessant, den Einfluss einer Überexpression von Par17 auf mitochondriale Parameter genauer zu untersuchen.

Mitochondriale PPlasen

Vertreter der beiden weiteren Klassen von PPlasen, den Cyclophilinen und FKBP, wurden bereits in Mitochondrien nachgewiesen. Das Cyclophilin D ist Bestandteil der *mitochondrial membrane permeability transition pore* (mPT) (Schneider 2005). Die mPT ist ein Multienzymkomplex, der die innere und die äußere Mitochondrien-Membran durchspannt und als Kanal für Moleküle von bis zu 1.5 kDa dient. Die Induktion der mPT führt zur Öffnung des Kanals und dadurch zum Anschwellen der Mitochondrien und zur Einleitung der Apoptose (Zoratti *et al.* 2005). Das FKBP-38 ist ebenfalls an apoptotischen Prozessen beteiligt, indem es Bcl-2, einen wichtigen Regulator der Apoptose, bindet und an der äußeren Mitochondrienmembran positioniert (Kang *et al.* 2005). Allerdings bindet keine dieser PPlasen an DNA, wie es Par14/17 und die HMG-Proteine tun.

Par17 könnte auch eine Rolle bei der Teilung der Mitochondrien spielen. Eine Vielzahl der Proteine, die an der Mitochondrienteilung beteiligt sind, liegen in der Zelle sumoyliert vor (Harder *et al.* 2004, Dohmen 2004). Auch für Par17 wurde eine Modifikation beschrieben, bei der es sich um eine Sumoylierung handeln könnte (Mueller *et al.* 2006). Zusammen mit der für Par14 postulierten Funktion bei der Regulation des Zellzyklus (Surmacz *et al.* 2002) würde das die oben genannte Vermutung stützen, dass Par14 und Par17 ähnliche Funktionen in unterschiedlichen Kompartimenten erfüllen.

Phage Display zur Identifizierung von Bindungspartnern von Par14/17

Um die Funktion der Parvuline weiter zu untersuchen, müssten peptidische Bindungspartner der PPlase-Domäne bekannt sein, um mögliche interagierende Proteine zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurde parallel zu der hier vorliegenden Doktorarbeit eine Staatsexamensarbeit angefertigt, welche vom Autor dieser Dissertation betreut wurde. Im Rahmen der Staatsexamensarbeit wurde ein *Phage Display* durchgeführt, um potentielle peptidische Bindungspartner des Par14/Par17 zu identifizieren (Schulz 2007). Es sollten aus einer Phagenbibliothek (PhD 12 library, New England Biolabs, Frankfurt) Peptide von 12 Aminosäuren Länge selektiert werden, die eine gut an die PPlase-Domäne bindende Konsensus-Sequenz aufweisen. Dazu wurde rekombinant exprimierte PPlase-Domäne des Par14/17 in Petrischalen immobilisiert und mit der Phagenbibliothek inkubiert. Ungebundene Phagen wurden abgewaschen, die Phagenklone, die mit Hilfe des von

ihnen präsentierten Peptids an die PPlase-Domäne gebunden hatten, wurden eluiert, amplifiziert und wieder mit der PPlase-Domäne inkubiert. Nach drei dieser Selektionsrunden wurden mittels eines *Plaque Assays* einzelne Phagenklone isoliert, deren DNA sequenziert und anhand der erhaltenen DNA-Sequenzen die entsprechenden Aminosäuresequenzen der bindenden Peptide ermittelt. Durch einen Datenbankabgleich sollten Proteine identifiziert werden, die diese Konsensus-Sequenz enthalten und somit potentielle Interaktionspartner der Parvuline in der Zelle darstellen. Die statistische Auswertung der 53 erhaltenen Sequenzen zeigte eine leichte Anreicherung von Alanin-Prolin, Serin-Prolin und Prolin-Prolin Dipeptiden. Es konnten aber keine längeren Konsensus-Sequenzen identifiziert werden, die selektierten Peptide waren aufgrund des gewählten Versuchsaufbaus nicht spezifisch genug, um eindeutige Aussagen über mögliche Bindungssequenzen machen zu können.

Weiterführende experimentelle Arbeiten zur Spezifizierung der Sequenzen sind in der AG Biochemie (ZMB) derzeit in Planung, die zu erwartenden Ergebnisse könnten wichtige Aufschlüsse über potenzielle Interaktionspartner und somit über die Funktion der Parvuline liefern.

4.5 Die Rolle von Par17 in der Primatenevolution

Par17 stellt einen hominidenspezifischen Bestandteil des mitochondrialen Proteoms dar. Das mitochondriale Proteom hat seit der Entstehung dieses Organells durch bakterielle Endosymbiose vor etwa 2 Milliarden Jahren eine massive Umgestaltung erfahren. Ein großer Teil der bakteriellen Proteine wurde aufgrund der endosymbiontischen Lebensweise nicht mehr benötigt. Über 80% der Proteine bakteriellen Ursprungs wurden deletiert und durch nukleär codierte Proteine der Wirtszellen ersetzt, indem diese mit mitochondrialen Targeting-Signalen versehen wurden. Ein plötzliches Auftauchen der Signal-Sequenz ist für eine Vielzahl von Targeting-Peptiden beschrieben, wobei durch Rekombination oder ähnliche Ereignisse bereits vorhandene Targeting-Signale auf andere Gene übertragen wurden (Kadowaki *et al.* 1996, Gabaldón & Huynen 2004). Die Evolution der Prä-Sequenz des Par17 jedoch folgt der Evolution der Primaten, von einer noch durch Lücken unterbrochenen Sequenz zu einer funktionalen Form, es ist kein plötzliches

Auftreten der Sequenz im Verlauf der Primatenevolution zu erkennen. Die Par17 Prä-Sequenz ist in ihrer jetzigen funktionalen Form erst nach der Auftrennung von Altwelt- und Menschenaffen vor 23 Millionen Jahren entstanden und stellt somit eines der phylogenetisch jüngsten mitochondrialen Targeting-Signale dar.

Evolution des Primatengehirns

Im Verlauf der Hominidenevolution haben vor allem Gene, die im Zusammenhang mit der Funktion des Gehirns stehen, eine beschleunigte Entwicklung im Vergleich zu anderen Primaten erfahren (Goodman *et al.* 2005). Darunter befinden sich auch einige Gene für mitochondriale Proteine, die eine Funktion im Rahmen der Elektronentransportkette erfüllen. Zum Beispiel zeigen 9 der 13 Untereinheiten der Cytochrom C Oxidase (Komplex IV, COX) eine erhöhte Rate von Veränderungen innerhalb der Anthropoiden, aber eine relativ langsame Evolution in den nicht-anthropoiden Primaten (Goodman *et al.* 2005, Grossman *et al.* 2004, Goldberg *et al.* 2003). Es wird vermutet, dass der erhöhte Energiebedarf des sich schnell entwickelnden Gehirns durch Optimierung der Maschinerie zur Energiegewinnung gedeckt werden musste. Von den Komponenten der COX sind 10 im Kern codiert, nur drei durch mitochondriale DNA (mtDNA) (Goldberg *et al.* 2003). Solch eine Coevolution von Genen des Zellkerns und der Mitochondrien, die an gemeinsamen zellulären Prozessen beteiligt sind, wurde für verschiedene Proteinkomplexe im Rahmen der Hominidenevolution untersucht. Ein weiteres Beispiel für das Zusammenwirken nukleärer und mitochondrialer Gene und deren beschleunigte Entwicklung im Verlauf der Hominidenevolution ist die ATP-Synthetase, ebenfalls ein Proteinkomplex der Atmungskette. Es konnte gezeigt werden, dass menschliche Zellen normale oxidative Phosphorylierung aufweisen, wenn ihre mitochondriale DNA durch die von Schimpansen oder Gorillas ersetzt wurde, nicht aber mit mtDNA aus Orang-Utans oder anderen Säugetieren (Kenyon & Moraes 1997, Grossman *et al.* 2004, Bayona-Bafaluy *et al.* 2005).

Neben Veränderungen der Struktur bestimmter Gene wird auch der Einfluss unterschiedlicher Expressionslevels von Genen einer Vielzahl funktioneller Klassen im Gehirn von Primaten auf die Entwicklung dieses Organs diskutiert (Goodman *et al.* 2005). Es gibt Hinweise darauf, dass verschiedene Gene im Gehirn von Menschen im Vergleich zu anderen Anthropoiden deutliche Abweichungen in ihren Expressionsmustern aufweisen (Cáceres *et al.* 2003). Da der Vergleich von

Expressionslevels zwischen verschiedenen Organismen und Geweben abhängig von der gewählten Methodik schwierig ist, kommen die aktuellen Studien zum Teil zu widersprüchlichen Aussagen bezüglich der *Up-* oder *Downregulation* bestimmter Gene (Cáceres *et al.* 2003, Khaitovich *et al.* 2006). Dennoch ist diese Diskussion über den Einfluss von Expressionslevels auf die Entwicklung des Gehirns und den Verlauf der Anthropoidenevolution äußerst interessant im Hinblick auf Par14 und Par17, da deren Funktion in eben diesem Bereich der Genregulation liegen könnte. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit mit dem Par17 ein hominidenspezifischer Bestandteil des mitochondrialen Proteoms identifiziert werden, dessen Funktion vermutlich im Bereich der Genregulation liegt. Das macht das Par17 interessant für weitere Studien, die Aufschluss über die molekularen Grundlagen der Hominidenevolution und neurodegenerativer Erkrankungen liefern könnten.

5. Zusammenfassung

Die beiden menschlichen Parvuline Par14 und Par17 werden durch das gleiche Gen codiert. Durch alternative Transkriptionsinitiation kommt es zur Bildung unterschiedlich langer mRNAs und zur Expression eines 25 Aminosäuren langen N-terminalen Prä-Peptids, durch welches sich Par17 von Par14 unterscheidet. In einer phylogenetischen Analyse des Parvulin-Gens konnte diese Erweiterung des Leserahmens nur in den Genomen von Großen Menschenaffen (Mensch, Schimpanse, Gorilla und Orang-Utan) nachgewiesen werden. Die Entwicklung dieses Leserahmens lässt sich anhand der Phylogenie der Anthropoiden nachvollziehen, von einer vorgeformten, jedoch nicht codierenden Sequenz in den Neuweltaffen bis hin zu seiner funktionalen Form in den Hominiden.

Es konnte gezeigt werden, dass Par17 in den Mitochondrien lokalisiert ist, im Gegensatz zu Par14, welches hauptsächlich im Zellkern und zu einem kleineren Teil im Cytoplasma zu finden ist. Das Prä-Peptid des Par17 wurde dabei als mitochondriales Targeting-Signal identifiziert, welches für den Transport in die Mitochondrien unbedingt benötigt wird. Da sich das Prä-Peptid erst nach der Auftrennung der Menschenaffen und Altweltaffen vor etwa 23 Millionen Jahren entwickelt hat, stellt es phylogenetisch eines der jüngsten Targeting-Peptide dar. Mit dem Par17 konnte somit ein hominiden-spezifischer Bestandteil des mitochondrialen Proteoms identifiziert werden.

Für Par17 konnten die gleichen DNA-Bindungseigenschaften nachgewiesen werden, wie zuvor für Par14 beschrieben. Beide Parvuline binden mit hoher Affinität an AT-reiche, gebogene, doppelsträngige DNA Abschnitte. Aufgrund dieser Eigenschaften sowie der strukturellen Ähnlichkeit zu anderen Proteinen (PIN1, HMG-Proteine) wird eine Funktion von Par14 und Par17 im Bereich der Regulation des Zellzyklus und der Chromatin-Remodellierung vermutet. Offenbar erfüllen Par14 und Par17 eine gleiche oder ähnliche Funktion, jedoch in verschiedenen Kompartimenten der Zelle.

Die vorliegende Arbeit liefert somit eine Grundlage für weiterführende Arbeiten zu Par14 und Par17. Diese sollten sich mit dem Einfluss von *knock outs* oder Überexpression von Par14 und Par17 auf verschiedene Parameter (zum Beispiel auf die Vitalität der Zellen, die Morphologie der Mitochondrien oder das mitochondriale Membranpotenzial), sowie der Identifizierung von Proteinen, die mit Par14/Par17 interagieren, beschäftigen. Diese Arbeiten könnten weiter zur Klärung der Funktion

der Parvuline beitragen und somit wichtige Erkenntnisse über zelluläre Prozesse wie die Regulation des Zellzyklus oder die Mitochondrien-Teilung liefern, sowie interessante Einblicke in die molekularen Grundlagen der Hominiden-Evolution bieten.

6. Literatur

Amaya Y, Arakawa H., Takiguchi M, Ebina Y, Yokota S, Mori M. (1988). "A noncleavable signal for mitochondrial import of 3-oxoacyl-CoA thiolase." *J Biol Chem* 263(28): 14463-70.

Arévalo-Rodríguez M, Cardenas ME., Wu X, Hanes SD, Heitman J (2000). "Cyclophilin A and Ess1 interact with and regulate silencing by the Sin3-Rpd3 histone deacetylase." *EMBO J.* 19(14): 3739-49.

Bayer E, Goetsch S., Mueller JW, Griewel B, Guiberman E, Mayr LM, Bayer P. (2003). "Structural analysis of the mitotic regulator hPin1 in solution: insights into domain architecture and substrate binding." *J Biol Chem* 278(28): 26183-93.

Bayer E, Thutewohl M, Christner C, Tradler T, Osterkamp F, Waldmann H, Bayer P. (2005). "Identification of hPin1 inhibitors that induce apoptosis in a mammalian Ras transformed cell line." *Chem Commun (Camb)*(4): 516-8.

Bayona-Bafaluy MP, Mueller S., Moraes CT (2005). "Fast adaptive coevolution of nuclear and mitochondrial subunits of ATP synthetase in orangutan." *Mol Biol Evol* 22(3): 716-24.

Brandts JF, Halvorson HR, Brennan M (1975). "Consideration of the Possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues." *Biochemistry* 14(22): 4953-63.

Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T (1998). "Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription." *Nature* 391(6667): 597-601.

Butler JE, Kadonaga JT (2002). "The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression." *Genes Dev* 16(20): 2583-92.

Cáceres M, Lachuer J, Zapala MA, Redmond JC, Kudo L, Geschwind DH, Lockhart DJ, Preuss TM, Barlow C (2003). "Elevated gene expression levels distinguish human from non-human primate brains." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(22): 13030-5.

Claros MG (1995). "MitoProt, a Macintosh application for studying mitochondrial proteins." *Comput Appl Biosci* 11(4): 441-7.

Crenshaw DG, Yang J., Means AR, Kornbluth S (1998). "The mitotic peptidyl-prolyl isomerase, Pin1, interacts with Cdc25 and Plx1." *EMBO J* 17(5): 1315-27.

Danpure CJ (1995). "How can the products of a single gene be localized to more than one intracellular compartment?" *Trends Cell Biol* 5(6): 230-8.

Dement GA, Treff NR, Magnuson NS, Franceschi V, Reeves R (2005). "Dynamic mitochondrial localization of nuclear transcription factor HMGA1." *Exp Cell Res* 307(2): 388-401.

Dement GA, Maloney SC, Reeves R (2007). "Nuclear HMGA1 nonhistone chromatin proteins directly influence mitochondrial transcription, maintenance, and function." *Exp Cell Res* 313(1): 77-87.

Dohmen RJ (2004). "SUMO protein modification." *Biochim Biophys Acta* 1695(1-3): 113-31.

Eisenberg E, Levanon EY (2003). "Human housekeeping genes are compact." *Trends Genet* 19(7): 362-5.

Elgersma Y, van Roermund CW, Wanders RJ, Tabak HF (1995). "Peroxisomal and mitochondrial carnitine acetyltransferases of *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by a single gene." *EMBO J* 14(14): 3472-9.

Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000). "Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence." *J Mol Biol* 300(4): 1005-16.

Fanghänel J, Fischer G (2004). "Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl cis/trans isomerases." *Front Biosci* 1(9): 3453-78.

Fischer G, Bang H., Mech C (1984). "Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides." *Biomed Biochim Acta* 43(10): 1101-11.

Fujimori F, Takahashi K, Uchida C, Uchida T (1999). "Mice lacking Pin1 develop normally, but are defective in entering cell cycle from G(0) arrest." *Biochem Biophys Res Commun* 265(3): 658-63.

Fujimori F, Gunji W, Kikuchi J, Mogi T, Ohashi Y, Makino T, Oyama A, Okuhara K, Uchida T, Murakami Y (2001). "Crosstalk of prolyl isomerases, Pin1/Ess1, and cyclophilin A." *Biochem Biophys Res Commun* 289(1): 181-90.

Fujiyama S, Yanagida M, Hayano T, Miura Y, Isobe T, Fujimori F, Uchida T, Takahashi N (2002). "Isolation and proteomic characterization of human Parvulin-associated preribosomal ribonucleoprotein complexes." *J Biol Chem* 277(26): 23773-80.

Gabaldón T, Huynen MA (2004). "Shaping the mitochondrial proteome." *Biochim Biophys Acta* 1659(2-3): 212-20.

Gardiner-Garden M, Frommer M (1987). "CpG islands in vertebrate genomes." *J Mol Biol* 196(2): 261-82.

Glazko GV, Nei M (2003). "Estimation of divergence times for major lineages of primate species." *Mol Biol Evol* 20(3): 424-34.

Goldberg A, Wildman DE, Schmidt TR, Huttemann M, Goodman M, Weiss ML, Grossman LI (2003). "Adaptive evolution of cytochrome c oxidase subunit VIII in anthropoid primates." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(10): 5873-8.

Goodman M, Grossman LI, Wildman DE (2005). "Moving primate genomics beyond the chimpanzee genome." *Trends Genet* 21(9): 511-7.

Goethel SF, Marahiel MA (1999). "Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts." *Cell Mol Life Sci* 55(3): 423-36.

Gray MW, Burger G, Lang BF (1999). "Mitochondrial evolution." *Science* 283(5407): 1476-81.

Grossman LI, Wildman DE, Schmidt TR, Goodman M (2004). "Accelerated evolution of the electron transport chain in anthropoid primates." *Trends Genet* 20(11): 578-85.

Guda C, Guda P, Fahy E, Subramaniam S (2004). "MITOPRED: a web server for the prediction of mitochondrial proteins." *Nucleic Acids Res* 32 (Web Server Issue): W372-4.

Hani J, Stumpf G, Domdey H (1995). "PTF1 encodes an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae*, which shows strong homology with a new putative family of PPlases." *FEBS Lett* 365(2-3): 198-202.

Harder Z, Zunino R, McBride H (2004). "Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission." *Curr Biol* 14(4): 340-5.

Hennig L, Christner C, Kipping M, Schelbert B, Rücknagel KP, Grabley S, Küllertz G, Fischer G (1998). "Selective inactivation of parvulin-like peptidyl-prolyl cis/trans isomerases by juglone." *Biochemistry* 37(17): 5953-60.

Herrmann JM, Hell K. (2005). "Chopped, trapped or tacked-protein translocation into the IMS of mitochondria." *Trends Biochem Sci* 30(4): 205-11

Kadowaki K, Kubo N, Ozawa K, Hirai A (1996). "Targeting presequence acquisition after mitochondrial gene transfer to the nucleus occurs by duplication of existing targeting signals." *EMBO J* 15(23): 6652-61.

Kang CB, Feng L, Chia J, Yoon HS (2005). "Molecular characterization of FK-506 binding protein 38 and its potential regulatory role on the anti-apoptotic protein Bcl-2." *Biochem Biophys Res Commun* 337(1): 30-8.

Kenyon L, Moraes CT (1997). "Expanding the functional human mitochondrial DNA database by the establishment of primate xenomitochondrial cybrids." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24): 9131-5.

Kessler D, Papatheodorou P, Stratmann T, Dian EA, Rassow J, Hartmann-Fatu C, Bayer P, Mueller JW (2007). "The DNA Binding Parvulin Par17 is Targeted to the Mitochondrial Matrix by a Recently Evolved Prepeptide Uniquely Present in Hominidae." *BMC Biology* 5(37)

Khaitovich P, Enard W, Lachmann M, Pääbo S (2006). "Evolution of primate gene expression." *Nat Rev Genet* 7(9): 693-702.

Knippers R (1997). *Molekulare Genetik*, 7. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart.

Kozak M (1999). "Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes." *Gene* 234(2): 187-208.

Landrieu I, De Veylder L, Fruchart JS, Odaert B, Casteels P, Portetelle D, Van Montagu M, Inzé D, Lippens G (2000). "The *Arabidopsis thaliana* PIN1At gene encodes a single-domain phosphorylation-dependent peptidyl prolyl cis/trans isomerase." *J Biol Chem* 275(14): 10577-81.

Landrieu I, Smet C, Wieruszeski JM, Sambo AV, Wintjens R, Buee L, Lippens G (2006). "Exploring the molecular function of PIN1 by nuclear magnetic resonance." *Curr Protein Pept Sci.* 7(3):179-94.

Lazar SW, Kolter R (1996). "SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins." *J Bacteriol* 178(6): 1770-3.

Lu KP (2003). "Prolyl isomerase Pin1 as a molecular target for cancer diagnostics and therapeutics." *Cancer Cell* 4(3): 175-80.

Lu KP, Hanes SD, Hunter T (1996). "A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis." *Nature* 380(6574): 544-7.

Maleszka R, Hanes SD, Hackett RL, de Couet HG, Miklos GL (1996). "The *Drosophila melanogaster* dodo (dod) gene, conserved in humans, is functionally interchangeable with the ESS1 cell division gene of *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(1): 447-51.

Maruyama TS, Suzuki R, Furutani M (2004). "Archaeal peptidyl prolyl cis-trans isomerases (PPLases) update 2004." *Front Biosci* 9: 1680-720.

Metzner M, Stoller G, Rücknagel KP, Lu KP, Fischer G, Luckner M, Küllertz G (2001). "Functional replacement of the essential ESS1 in yeast by the plant parvulin DIPar13." *J Biol Chem* 276(17): 13524-9.

Milenkovic D, Mueller J., Stojanovski D, Pfanner N, Chacinska A (2007). "Diverse mechanisms and machineries for import of mitochondrial proteins." *Biol Chem* 388(9): 891-897

Mueller A, Guenther D., Brinkmann V, Hurwitz R, Meyer TF, Rudel T (2000). "Targeting of the pro-apoptotic VDAC-like porin (PorB) of *Neisseria gonorrhoeae* to mitochondria of infected cells." *EMBO J* 19(20): 5332-43.

Mueller JW, Kessler D, Neumann D, Stratmann T, Papatheodorou P, Hartmann-Fatu C, Bayer P (2006). "Characterization of novel elongated Parvulin isoforms that are ubiquitously expressed in human tissues and originate from alternative transcription initiation." *BMC Mol Biol* 7(9).

Mukhopadhyay A, Heard T., Wen X, Hammen PK, Weiner H (2003). "Location of the actual signal in the negatively charged leader sequence involved in the import into the mitochondrial matrix space." *J Biol Chem* 278: 13712-13718.

Nakai K, Horton P (1999). "PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization." *Trends Biochem Sci* 24(1): 34-6.

Neupert W, Herrmann J. (2007). "Translocation of proteins into mitochondria." *Annu Rev Biochem* 76: 723-49

Oatey PB, Lumb MJ, Danpure CJ (1996). "Molecular basis of the variable mitochondrial and peroxisomal localisation of alanine-glyoxylate aminotransferase." *Eur J Biochem* 241(2): 374-85.

Oda T, Funai T, Ichiyama A (1990). "Generation from a single gene of two mRNAs that encode the mitochondrial and peroxisomal serine:pyruvate aminotransferase of rat liver." *J Biol Chem* 265(13): 7513-9.

Pemberton TJ, Kay JE (2005). "Identification and comparative analysis of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase repertoires of *H. sapiens*, *D. melanogaster*, *C. elegans*, *S. cerevisiae* and *Sz. pombe*." *Comp Funct Genom* 6: 277-300.

Prinz T, Pfanner N, Truscott KN (2002). "Translocation of Proteins into Mitochondria." In: *Protein Targeting, Transport & Translocation. Edited by Von Heijne G & Dalbey RE*, Academic Press, Amsterdam.

Rahfeld JU, Schierhorn A, Mann K, Fischer G (1994). "A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Escherichia coli*." *FEBS Lett* 343(1): 65-9.

Ranganathan R, Lu KP, Hunter T, Noel JP (1997). "Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent." *Cell* 89(6): 875-86.

Reeves R (2001). "Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function." *Gene* 277(1-2): 63-81.

Reimer T, Weiwad M, Schierhorn A, Ruecknagel PK, Rahfeld JU, Bayer P, Fischer G (2003). "Phosphorylation of the N-terminal domain regulates subcellular localization and DNA binding properties of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase hPar14." *J Mol Biol* 330(5): 955-66.

Rospert S, Glick BS, Jenö P, Schatz G, Todd MJ, Lorimer GH, Viitanen PV (1993). "Identification and functional analysis of chaperonin 10, the groES homolog from yeast mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(23): 10967-71.

Rulten S, Thorpe J, Kay J (1999). "Identification of eukaryotic parvulin homologues: a new subfamily of peptidylprolyl cis-trans isomerases." *Biochem Biophys Res Commun* 259(3): 557-62.

Sambrook J, Russell DW (2002). "Molecular Cloning - A Laboratory Manual." Third Edition, CSHL Press.

Schneider M (2005). "Cyclophilin D: knocking on death's door." *Sci STKE* 2005(287) (pe26).

Schulz A (2007). "Phage Display Versuche mit humanem Parvulin." Examensarbeit, Arbeitsgruppe Strukturelle und Medizinische Biochemie, Zentrum für Medizinische Biotechnologie (ZMB), Universität Duisburg-Essen.

Segal E, Fondufe-Mittendorf Y, Chen L, Thåström A, Field Y, Moore IK, Wang JP, Widom J (2006). "A genomic code for nucleosome positioning." *Nature* 442(7104): 772-8.

Shaw P (2002). "Peptidyl-prolyl isomerases: a new twist to transcription." *EMBO rep* 3(6): 521-6.

Small I, Peeters N, Legeai F, Lurin C (2004). "Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences." *Proteomics* 4(6): 1581-90.

Surmacz TA, Bayer E, Rahfeld JU, Fischer G, Bayer P (2002). "The N-terminal basic domain of human parvulin hPar14 is responsible for the entry to the nucleus and high-affinity DNA-binding." *J Mol Biol* 321(2): 235-47.

Storch V, Welsch U. (1997). "Systematische Zoologie", 5. Auflage, Gustav Fischer Verlag.

Tormo A, Almirón M, Kolter R (1990). "surA, an Escherichia coli gene essential for survival in stationary phase." *J Bacteriol* 172(8): 4339-47.

Uchida T, Takamiya M, Takahashi M, Miyashita H, Ikeda H, Terada T, Matsuo Y, Shirouzu M, Yokoyama S, Fujimori F, Hunter T (2003). "Pin1 and Par14 peptidyl prolyl isomerase inhibitors block cell proliferation." *Chem Biol* 10(1): 15-24.

von Heijne G (1986). "Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices." *EMBO J* 5(6): 1335-42.

Wu X, Wilcox CB, Devasahayam G, Hackett RL, Arévalo-Rodríguez M, Cardenas ME, Heitman J, Hanes SD (2000). "The Ess1 prolyl isomerase is linked to chromatin remodeling complexes and the general transcription machinery." *EMBO J* 19(14): 3727-38.

Wulf G, Garg P, Liou YC, Iglehart D, Lu KP. (2004). "Modeling breast cancer in vivo and ex vivo reveals an essential role of Pin1 in tumorigenesis." *EMBO J* 23(16): 3397-407.

Zoratti M, Szabò I, De Marchi U (2005). "Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house?" *Biochim Biophys Acta* 1706(1-2): 40-52.

Danksagung

Mein Dank gilt an dieser Stelle all den Menschen, die ihren (kleinen oder großen) Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben...

...Prof. Dr. Peter Bayer für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Bereitstellung des Themas sowie die Möglichkeit, Kreativität und eigene Ideen zu entwickeln...

...Dr. Jonathan W. Müller, für hervorragende Vor-, exzellente Betreuungs- und erfreuliche Zusammenarbeit, konstruktive Reibereien und fruchtbare Diskussionen sowie eine Einführung in die Kunst des wissenschaftlichen Denkens...

...Tina Stratmann und Nina M. Link (die ebenso gut in der letzten Gruppe der bedankten Personen stehen könnten), Simone Bischof und Alexandra Schulz sowie allen MitarbeiterInnen der AG Bayer. Es war mir eine Freude, mit Euch zu arbeiten...

...Prof. Dr. Joachim Rassow und Dr. Panagiotis Papatheodorou für eine angenehme und erfolgreiche Zusammenarbeit...

...meiner Frau Miriam, meinen Eltern Barbara und Werner, meiner Schwester Judith, auch meiner Oma Anna (wherever you are today...I carry you with me) sowie meiner ganzen Familie...my family looks out for me like friends!

...meinen Freunden, Simone, Muddi, Malte, Christian, Heike und allen, die zu nennen hier der Platz fehlt...my friends look out for me like family!

Lebenslauf

Daniel Keßler, Diplom-Biologe
 geboren am 12.01.1977 in Lüdenscheid
 verheiratet

Mühlenweg 33b
 45289 Essen
 0201-4360833 oder 0177-6008186
 daniel.kessler@uni-due.de

Schule

1983 – 1989	Grundschule Schöneck, Lüdenscheid
1989 – 1996	Bergstadt Gymnasium Lüdenscheid
Mai 1996	Abitur, Gesamtnote: gut

Studium

1996-1998	Humanmedizin, Ruhr-Universität-Bochum
1998-2000	Grundstudium Biologie, Ruhr-Universität-Bochum
Sept. 2000	Vordiplom Biologie, Gesamtnote: gut
2000-2003	Hauptstudium Biologie, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg Hauptfächer: Mikrobiologie, Biochemie, Pflanzenphysiologie Diplomarbeit im Fach Mikrobiologie, Thema: "Mikro- und molekularebiologische Untersuchungen zum Sekundärstoffwechsel bei Bakterien der <i>Roseobacter</i> -Gruppe"
April 2003	Diplom Biologie, Gesamtnote: sehr gut

Praktische Tätigkeiten

- März 2001 Praktikum im „Labor für Mikrobiologie und Hygiene“, Altena
- Juli & Aug. 2001 Praktikum bei Prof. Curtis Suttle, University of British Columbia, Departments of Earth & Ocean Sciences, Botany and Microbiology & Immunology, Vancouver, Canada;
Fachgebiet: Marine Mikrobiologie & Virologie; Molekular- und mikrobiologische Arbeiten mit Bakterien und Phagen
- 2001-2003 Insgesamt mehrere Monate Tätigkeit als studentische Hilfskraft am Forschungszentrum Terramare, Wilhelmshaven und am Institut für Chemie und Biologie des Meeres der Universität Oldenburg (ICBM); Mikro- und molekularbiologische Arbeiten
- April 2003 bis Wissenschaftlicher Angestellter am ICBM, Arbeitsgruppe
November 2004 Mikrobiologie geologischer Prozesse, Leitung Prof. Dr. Meinhard Simon; Molekular- und mikrobiologische Arbeiten mit Bakterien und Phagen
- Seit Dez. 2004 Wissenschaftlicher Angestellter/Doktorand am Zentrum für Medizinische Biotechnologie der Universität Duisburg-Essen, Arbeitsgruppe Strukturelle und Medizinische Biochemie, Leitung Prof. Dr. Peter Bayer; Molekular- und zellbiologische Arbeiten; Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit.

Essen, 02.10.2007

Daniel Keßler

Publikationsliste

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

“Characterization of novel elongated Parvulin isoforms that are ubiquitously expressed in human tissues and originate from alternative transcription initiation” Jonathan W Mueller, Daniel Kessler, Daniel Neumann, Tina Stratmann, Panagiotis Papatheodorou, Cristina Hartmann-Fatu, Peter Bayer (2006), BMC Molecular Biology 7: 9

“Bacteria of the Roseobacter Clade Show Potential for Secondary Metabolite Production.” Torben Martens, Daniel Kessler, Lone Gram, Hans-Peter Grossart, Meinhard Simon, Thorsten Brinkhoff (2007) Microbial Ecology, 54(1):31-42.

“The DNA Binding Parvulin Par17 is Targeted to the Mitochondrial Matrix by a Recently Evolved Prepeptide Uniquely Present in Hominidae” Daniel Kessler, Panagiotis Papatheodorou, Tina Stratmann, Elke Andrea Dian, Cristina Hartmann-Fatu, Joachim Rassow, Peter Bayer, Jonathan Wolf Mueller (2007), BMC Biology 5(37)

Tagungsbeiträge 2007

“Differential subcellular localization of human Parvulin Proteins is accomplished by a Great-Apes-specific mitochondrial targeting peptide” Kessler, Daniel; Bayer, Peter; Mueller, Jonathan W.; **Poster und Abstract**, 58. Mosbacher Kolloquium der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM), März 2007, Mosbach [DOI:10.1240/sav_gbm_2007_m_001648]

“A mitochondrial targeting peptide specific to Great Apes is responsible for the differential subcellular localization of human Parvulins” Kessler, Daniel; Bayer, Peter; Mueller, Jonathan W; **Vortrag, Poster und Abstract**, “Molecular Life Sciences” Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM), September 2007, Hamburg [DOI:10.1240/sav_gbm_2007_h_001889]

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-
Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das
Thema „*Molekular- und zellbiologische Studien zur Evolution und subzellulären
Lokalisation humaner Parvulin-Proteine*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre
vertrete und den Antrag von Daniel Keßler befürworte.

Essen, den _____

Prof. Dr. Peter Bayer

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-
Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation
selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel
bedient habe.

Essen, den _____

Daniel Keßler

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-
Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen
bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese
Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Daniel Keßler