

# ACBP-Isoformen in *Digitalis lanata* EHRH.

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

> von Frau Birgit Gruner geb. am 03.11.1971 in Lauchhammer

Gutachter: 1. Prof. B. Diettrich, Halle

- 2. Prof. M. Luckner, Halle
- 3. Prof. W. Kreis, Erlangen

verteidigt: Halle / Saale, den 11. Februar 2003

#### urn:nbn:de:gbv:3-000004679

[http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004679]

## **Inhaltsverzeichnis**

Abkürzungen	V
Materialien und Geräte	VII

#### A. Einleitung

1. A	ACBP – das Protein mit den vielen Namen	1
1.1.	Physikalische Charakterisierung	1
1.2.	Bindung von Fettsäure-CoA-Estern	2
1.2.1.	ACBP-Primärstruktur	2
1.2.2.	ACBP-Sekundär- bzw. Tertiärstruktur und Bindungsdomänen	3
1.2.3.	Ligandenstruktur	4
1.2.4.	ACBP-Ligandenbindung	4
1.2.5.	Bedeutung des ACBP-Acyl-CoA-Komplexes	5
1.3.	Weitere intrazelluläre Funktionen	6
1.4.	Extrazelluläre Funktionen	7
1.4.1.	ACBP als Neurotransmitter und -modulator	8
1.4.2.	ACBP als Inhibitor Glucose-induzierter Insulinsekretion	8
1.4.3.	ACBP als Regulator der Zellproliferation	9
1.4.4.	ACBP als Cholecystokinin-releasing Peptid	9
1.4.5.	ACBP als Immunmodulator.	9
2. 0	Genomische Organisation der ACBP-Proteinfamilie	10
2.1.	Isoformen und Pseudogene in der ACBP-Proteinfamilie	10
2.2.	ACBPs in Pflanzen	10
2.3.	Lokalisierung und Regulation der Expression der ACBP-Isoformen	11
2.3.1.	Distribution des Proteins.	11
2.3.2.	Genomische Organisation und Promotorstrukturen	12
2.3.3.	Transkriptionelle Regulation	13
2.4.	Weitere Proteine mit Acyl-CoA-bindenden Domänen und membranständige ACBPs	13
<u>3.</u> F	ettsäurestoffwechsel	14
3.1.	Acyl-CoAs und ihre Einbindung in den Zellstoffwechsel	14
3.1.1.	Physikalische Interaktionen der Acyl-CoAs mit Membranen	14
3.1.2.	Rolle der Acyl-CoAs in Membranfusion und Vesikeltransport	15
3.1.3.	Rolle der Acyl-CoAs im Energiemetabolismus	15
3.1.4.	Rolle der Acyl-CoAs in der Lipidsynthese	16
3.1.5.	Rolle der Acyl-CoAs in der zellulären Signaltransduktion/Genexpression	16
3.1.6.	Rolle der Acyl-CoAs in der Regulation von Ionenkanälen	17
3.2.	Weitere Lipid-bindende Proteine	17
3.3.	Proteinacylierung	18
3.3.1.	Mechanismus der Proteinacylierung	19
3.3.2.	Signalfunktionen acylierter Proteine	19
<u>4.                                     </u>	Der Biosensor-Test	20
4.1.	Bisherige Methoden zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten (kp)	20
4.2.	Das Biosensor-Protein	21
4.3.	in vitro-Bindungstest	22
5. Z	Lielstellung der Arbeit	23

#### **B.** Methoden

1. Au	1. Auffindung von cDNA-Sequenzen	
1.1.	Präparation der Sonde	
1.1.1.	Midiprep zur Gewinnung von Plasmid-DNA	
1.1.2.	Restriktion und Gel-Elution des PCR-Fragments	
1.1.3.	Markierung der Sonde	
1.2.	Präparation der cDNA-Bank	
1.2.1.	Phagen-kompetente XL-Blue-Zellen	
1.2.2.	Titerbestimmung	
1.2.3.	Ausplattieren der Bank	
1.3.	Primärscreening	
1.3.1.	Blotten der ausplattierten cDNA-Bank	

1.3.2.	Hybridisierung	26
1.3.3.	Detektion positiver Primärklone	27
1.3.4.	Verifizierung der detektierten Plaques	27
1.4.	Sekundär- und Tertiärscreening	27
1.5.	in vivo-Excision und Sequenzierung positiver Einzelplaques	28
2. Exp	oressionsanalyse der mRNAs acbp3 und acbp4	28
2.1.	Pflanzenmaterial zur Gewinnung von Gesamt-RNA	28
2.1.1.	Frischpflanzenmaterial	28
2.1.2.	Kultivierung Proembryogener Massen	28
2.1.3.	Somatische Embryogenese	29
2.2.	Einfluß verschiedener Stressoren auf die Expression von acbp3 und acbp4	29
2.3.	Präparation von Gesamt-RNA	30
2.3.1.	Gesamt-RNA-Gewinnung mit dem RNeasy Plant Mini Kit	30
2.3.2.	Gesamt-RNA-Gewinnung mit der Phenol/Chloroform-Methode	30
2.4.	Präparation der Sonden	30
2.4.1.	Sonde zur Detektion des ACBP-Gesamttranskriptionslevels	30
2.4.2.	Spezifische Sonden zur Detektion der Einzeltranskriptionslevel von acbp3 und acbp4	31
2.5.	Northern Analyse	31
2.5.1.	Auftrennung der RNA im denaturierenden Agarose-Gel	31
2.5.2.	Northern Blot-Transfer	32
2.5.3.	Hybridisierung des Northern Blots	32
2.5.4.	Detektion und Auswertung des Northern Blots	33
2.6.	Kontrollhybridisierung	33
2.6.1.	Vorbereitung des Blots	33
2.6.2.	Vorbereitung der 18 S-Sonde	
2.6.3.	Kontrollhybridisierung und Detektion	33
<u>3. Uni</u>	tersuchung der genomischen Organisation der achp-Gentamilie	
<b>3.1.</b>	Genomische Southern Biot-Analyse	دد دد
3.1.1. 2.1.2	Phanzenmaterial zur Gewinnung genomischer DNA	دد دد
5.1.2. 2.1.2	Isolielung genomischer DNA	21
3.1.5.	Flaktronhoretische Auftrennung der partialverdauten genomischen DNA	
315	Southern Blot.Transfer	
316	Hybridisierung des Southern Blots	35
37	Screening einer genomischen DNA-Bank von Digitalis lanata FHRH	36
3 2 1	Pränaration von Sonde und genomischer Bank	36
322	Durchführung des genomischen Screenings	36
323	Gewinnung von $\lambda$ -DNA	
324	Restriktion und Southern-Blot-Analyse	37
3.2.5.	Zwischenklonierung der $\lambda$ -DNA-Fragmente	
3.2.6.	Transformation der pUC18-Konstrukte und Sequenzanalyse	
4. Übe	erexpression von acbp3 und acbp4	
4.1.	Klonierung in den Expressionsvektor pET3a	
4.1.1.	Ableitung von Oligonukleotid-Primern	38
4.1.2.	PCR und Zwischenklonierung in den TOPO/TA-Vektor	38
4.1.3.	Klonierung in den pET3a-Vektor	38
4.2.	Überexpression der rekombinanten Proteine	39
4.2.1.	Induktion der Expressionskulturen	39
4.2.2.	Probenaufarbeitung	39
4.3.	Chromatographische Reinigung der rekombinanten Proteine	39
4.3.1.	FPLC-Reinigung über eine Anionentauscher-Säule	39
4.3.2.	Reversed Phase-FPLC	40
4.3.3.	Identitätsüberprüfung	40
4.4.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	40
4.4.1.	Elektrophoretische Auftrennung im SDS-Polyacrylamid-Gel	40
4.4.2.	Coomassie-Färbung	40
4.4.3.	Silberfärbung	41
4.5.	Qualitativer Ligandenbindungstest.	41
<u>5. Gei</u>	richtete Mutagenese der Aminosauren 19 und 23 in ACBP3 und ACBP4	42
<b>5.1.</b>	Ablaitung von Oligonuklaatiderimaen zur aarialtan Mutatian ain-algan Amina Z	42
J.1.1.	Autentung von Ongonukteonuprimern zur geziehten Mutation einzeiner Aminosauren	42

5.1.2.	PCR zur Einführung von Einzel- und Doppelmutationen	42
5.1.3.	Modifikation der mutierten PCR-Produkte	43
5.1.4.	Transformation der mutierten pET3-Konstrukte	44
5.1.5.	Kompetente BL21(DE3)-pLyS-Zellen	44
5.1.6.	CEQ-Sequenzierung der mutierten Konstrukte	45
5.2.	Überexpression der Einzel- und Doppelmutanten	45
5.3.	Reinigung der rekombinanten ACBP-Mutanten und Isoformen	46
5.3.1.	Zellaufschluß	
5.3.2.	Gelfiltration	46
5.3.3.	Anionenaustauschchromatographie (FPLC)	
5.3.4.	Entsalzen der Proteinproben	47
5.3.5.	Reversed Phase-HPLC	47
<u>6.</u> in	vitro-Liganden-Bindungstest	
6.1.	Der Biosensor-Test	48
6.2.	Mathematische Grundlagen zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten	49
6.2.1.	Allgemeine Grundlagen zur mathematischen Beschreibung der Ligandenbindung	49
6.2.2.	Grundlagen zur Bestimmung der Biosensor-k <sub>D</sub>	49
6.2.3.	Grundlagen zur Bestimmung der ACBP-k <sub>D</sub> im Biosensor-Test	50
6.3.	Präparation der Testkomponenten	51
6.3.1.	Präparation des in vitro-Biosensors	51
6.3.2.	Präparation der Acyl-CoA-Ester	51
6.3.3.	Präparation der zu bestimmenden ACBPs	53
6.4.	Durchführung des Biosensor-Testes	53
6.4.1.	Bestimmung der Biosensor-k <sub>D</sub> für die zu verwendenden Liganden	53
6.4.2.	Bestimmung der ACBP-Dissoziationskonstanten.	54
6.4.3.	Bestimmung des Ligandenverlustes durch unspezifische Bindung an die	
	Mikrotiterplatten	54

#### C. Ergebnisse

1. Scr	eening zur Auffindung von cDNA-Sequenzen	55
1.1.	Charakterisierung der Sonde zum Screening der cDNA-Bank	55
1.2.	Charakterisierung der verwendeten cDNA-Banken	55
1.3.	Isolierung von acbp3 aus der cDNA-Bank aus PEMs von D. lanata EHRH.	55
1.4.	Isolierung von acbp4 aus der cDNA-Bank aus Blättern einjähriger D. lanata EHRH	
	Pflanzen	57
1.5.	Vergleich der beiden cDNAs acbp3 und acbp4 und ihrer abgeleiteten Proteinsequenze	en. 58
2. Erg	ebnisse der Expressionsanalysen	60
2.1.	Allgemeine und spezifische Sonden	60
2.1.1.	Allgemeine Sonde zur Detektion der ACBP-Gesamttranskription	60
2.1.2.	Spezifische Sonden zur Detektion der acbp3- bzw. acbp4-Transkripte	60
2.2.	ACBP-Gesamttranskription in verschiedenen Pflanzenteilen von Digitalis lanata EHR	<b>RH</b> 61
2.3.	ACBP-Gesamttranskription während der somatischen Embryogenese	62
2.4.	ACBP-Gesamttranskription unter Einfluß verschiedener Stressoren	63
2.5.	Transkription einzelner ACBP-Isoformen	65
<u>3. Unt</u>	ersuchung der genomischen Organisation der acbp-Genfamilie	65
3.1.	Isolierung und Partialverdau genomischer DNA von D. lanata EHRH	65
3.2.	Genomische Southern Blot-Analyse	66
3.3.	Screening der gDNA-Bank	67
<u>4. Übe</u>	rexpression von acbp3 und acbp4	68
4.1.	Ableitung von Oligonukleotid-Primern	68
4.2.	Induktion und heterologe Überexpression der pET3-Konstrukte	68
4.3.	Chromatographische Reinigung der rekombinanten Proteine ACBP3 und ACBP4	69
4.3.1.	Bestimmung des optimalen pH-Wertes für die Anionenaustausch-FPLC	69
4.3.2.	Reinigung über die Anionentauschersäule ResourceQ	70
4.3.3.	Reinigung über die Reversed Phase-Poros-Säule	70
4.4.	Ligandenbindungstest für die rekombinanten Proteine	72
<u>5. Ger</u>	ichtete Mutagenese der Aminosäuren 19 und 23 in ACBP3 und ACBP4	73
5.1.	Einführung von Mutationen in den Aminosäurepositionen 19 und 23	73
5.1.1.	Oligonukleotid-Primer zur gerichteten Mutagenese	73
5.1.2.	PCR zur gerichteten Mutagenese	73

5.1.3.	Modifikation und Transformation der mutierten PCR-Produkte	74
5.2.	Überexpression der Mutanten	74
5.3.	Chromatographische Reinigung der rekombinanten Proteine	75
6. Bes	timmung von Dissoziationskonstanten im Biosensor-Test	75
6.1.	Ermittlung der Biosensor-k <sub>D</sub> für verschiedene Liganden	76
6.1.1.	Bestimmung des Ligandenverlustes durch Bindung an die Mikrotiterplatte	76
6.1.2.	Meßwerte für die k <sub>D</sub> -Bestimmung verschiedener Liganden	76
6.1.3.	Graphische Auswertung der Meßdaten	77
6.2.	Ermittlung der Dissoziationskonstanten für die ACBP-Isoformen und -Mutanten	80
6.2.1.	Coenzym A	80
6.2.2.	Butyryl-CoA	81
6.2.3.	Lauryl-CoA	81
6.2.4.	Dissoziationskonstanten für alle ACBP-Wildtypen und Doppelmutanten	83
6.2.5.	Dissoziationskonstanten für die Einzelmutanten	83
6.3.	Auswertung des Biosensor-Testes	84
6.3.1.	Auswertung des Biosensor-Tests geordnet nach Liganden	84
6.3.2.	Auswertung des Biosensors geordnet nach Wildtyp-Proteinen	85
6.3.3.	Auswertung des Biosensor-Tests für die Einzelmutanten	

#### D. Diskussion

<b>1.</b> <i>I</i>	Allgemeine Strategie	
2. ]	Die cDNA-Sequenzen acbp3 und acbp4	90
2.1.	Charakterisierung von acbp3	
2.2.	Charakterisierung von acbp4	
2.3.	Überexpression und Funktionstest	
2.4.	Sequenzvergleiche	91
3. 1	Expressionsanalyse für ACBP-Transkripte	
3.1.	ACBP-Gesamtexpression	95
3.1.1.	ACBP-Gesamtexpression in Pflanzenteilen von Digitalis lanata EHRH	
3.1.2.	ACBP-Gesamtexpression während der somatischen Embryogenese	96
3.1.3.	ACBP-Gesamtexpression unter Einfluß ausgewählter Stressoren	97
3.2.	Detektion spezifischer Transkripte	97
3.2.1.	acbp3-Transkription	
3.2.2.	acbp4-Transkription	
4. (	Genomische Organisation der ACBP-Familie	
4.1.	Genomische Southern-Analyse	99
4.2.	Screening einer gDNA-Bank	
<u>5. </u> 2	Site-directed Mutagenesis	
<u>6.</u> ]	Biosensor-Test aller Wildtypen und Mutanten	
6.1.	Bestimmung der Biosensor-Dissoziationskonstanten	
6.2.	Bestimmung der Dissoziationskonstanten für ACBP-Wildtypen und -Mutanten	
6.2.1.	Relevanz der untersuchten Liganden	104
6.2.2.	Durchführung der Messungen	
6.2.3.	Der Scatchard-Plot	
6.3.	Einfluß der Aminosäurepositionen 19 und 23 auf die Ligandenbindung	
<u>7.</u> '	Weiterführende Arbeiten	
Е.	Zusammenfassung	111
<b>F.</b>	Literatur	114
<b>G.</b>	<u>Anhang</u>	

## <u>Abkürzungen</u>

ААРН	2.2'-Azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ACBP	Acvl-CoA-bindendes Protein (Acvl-CoA-binding Protein)
Acvl-	Fettsäurerest
ADP	Adenosindiphosphat
Ala	Alanin
ANT	Adeninnukleotidtranslokase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
CCK	Cholecystokinin
CCK-RP	Cholecystokinin-releasing Peptide
cDNA	Komplementäre DNA ( <i>copv</i> -DNA)
CoA	Coenzym A
cpm	Zerfälle pro Minute ( <i>counts per minute</i> )
СТАВ	Cetyltrimethylammoniumbromid
Cvs	Cystein
DBI	Diazepam-Bindungsinhibitor ( <i>Diazepam-binding inhibitor</i> )
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1 4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	Europäisches Molekularbiologisches Laboratorium
FABP	Fettsäure-bindendes Protein ( <i>Fatty-Acid-binding Protein</i> )
FPLC	schnelle Protein-Flüssigkeits-Chromatographie ( <i>Fast Protein</i> )
	Liquid Chromatography)
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure ( $\gamma$ -Aminobutvric Acid)
σDNA	Genomische DNA
GST	Glutathion S-Transferase
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie ( <i>High</i>
III LO	Performance Liquid Chromatography)
IP	Isoelektrischer Punkt
IPTG	Isopropyl-B-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen (1000 Basenpaare)
kp	Dissoziationskonstante
LAT	Acyl-CoA-Lysophospholipid-Acyltransferase
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
Leu	Lencin
LTP	Lipid-Transferprotein
Lvs	Lysin
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorption-Ionisations-Flugzeit
	Massen-Spektrometrie ( <i>Matrix-Assisted-Laser-Desorption-</i>
	Ionisation Time-of-Flight Mass-Spectrometry)
Met	Methionin
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure

mRNA	Boten-RNA (messenger-RNA)
NMR-Spektroskopie	Kernspin-Resonanz-Spektroskopie (Nuclear Magnetic
	Resonance Spectroscopy)
NTPs	äquimolare Mischung aller vier Nukleosidtriphosphate
ODN	Octadecaneuropeptid (ACBP(33-50))
PBR	Peripherer Benzodiazepinrezeptor (Peripheral-type
	Benzodiazepine Receptor)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PEMs	Proembryogene Massen
pfu	Plaque-formende Einheiten (plaque forming units)
pp	Seiten (pages)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species)
RP-Säule	Umkehrphasensäule (Reversed Phase-Säule)
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
St.abw.	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminoethan
TTN	Triacontatetraneuropeptid (ACBP(17-50))
Tyr	Tyrosin
U	Einheit ( <i>unit</i> )
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Brom-4-chlor-indolyl-ß-D-galactopyranosid
ZNS	Zentralnervensystem

## Materialien und Geräte

Amersham, Braunschweig:	Hybond N+ - Nylonmembran
Beckman/Coulter, Unter- schleissheim :	CEQ-2000 Sequencing System, Ultrazentrifuge LE-80 K
Biometra, Göttingen:	Cellophan-Folie
Biotec-Fischer, Reiskirchen:	Minikammer PHERO-minivert
Boehringer-Mannheim:	λ-HindIII-Marker, Ampicillin, BSA, Chloramphenicol, dNTPs, High Prime DNA-Labelling Kit, Kanamycin, Magnesiumchlorid, PCR-Puffer, SDS
Difco, Augsburg:	Agar und Agarose zur E. coli-Kultivierung
Eppendorf, Hamburg:	Mastercycler 5330 plus, Thermomixer 5437
GFL, Burgwedel:	Brutschrank und Schüttler zur PEMs-Kultivierung
GibcoBRL, Karlsruhe:	IPTG, X-Gal
Glass Col, USA:	Potter-Homogenisator
Heraeus Instruments, Hanau	Biofuge fresco
ICN, Eschwege:	Glycin, Tris-Base
IKA, Staufen:	Rundschüttler KS 501 D
Invitrogen, Groningen, NL:	TOPO/TA Cloning Kit und Vektor
Merck, Darmstadt:	Benzonase
NEB, Boston, USA:	Restriktionsenzyme und deren Puffer, modifizierende Enzyme (DpnI), T4-DNA Ligase, T4-Polynukleotid- Kinase
NEN, Köln:	$[\alpha \text{-}^{32}\text{P}]\text{-}\text{dATP}$ 3000 Ci/mmol, Röntgenfilm NEF585 X-Omat Blue
Novagen, Madison, USA:	pET3a-Vektorsystem
Oakdale Engineering, USA:	Datafit 7-Data-Evaluation-Software
pEQ-Lab, Erlangen:	Klenow-Fragment, Taq-Polymerase
Perkin-Elmer , Boston, USA	:Wallac Victor <sup>2</sup> V-Multilabel Counter
PerSeptive Biosystems, Wies	sbaden: Poros 20 RC, 1 ml FPLC-Säule

Pharmacia Biotech, Freiburg:100 bp- und 1 kb-Leiter-DNA-Größenmarker, CIAP (Alkalische Phosphatase), ÄKTA-FPLC-System, ALFexpress AutoRead Sequencing Kit, Gene Quant II, One-Phor-All *PLUS*-Puffer, PhastGel IEF 3-9 Gel, PhastGel 20 %, PhastGel-System, QSepharose Fast Flow 20 ml, Resource<sup>TM</sup> Q, 1 ml, Sephadex G-25 Superfine Desalt-Säule 25 ml, Sephadex-G50 (superfine) 300 ml

Phenomenex, Macclesfield, UK: Jupiter C18-Säule

- Polaroid, Offenbach: Sofortbildkamera Polaroid MP 4
- Qiagen, Hilden: λ-DNA-Midi Kit, Plasmid Midi Prep, Qiabrane-Nylonmembran, Qiaex II Gelelutionskit, QiaQuick Nucleotide Removal Kit, RNeasy Plant Mini Kit
- Roth, Karlsruhe: Acetonitril (HPLC-grade), Dextransulfat, Formamid, Fettsäuren und Coenzym A, Phenol
- Savant, Farmingdale, USA: Speed-Vac DNA 110
- Serva, Heidelberg: Agarose zur DNA-Gelelektrophorese, Calciumchlorid, Coomassie-Farbstoffe, CTAB, DEPC, Dichlormethan, DTT, EDTA, Ethylenchloroformiat HEPES-Puffersubstanz, Kaliumhydrogensulfat, Lithiumchlorid, Low Weight Protein Marker, MOPS, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, RNase A, RNase T, TCA, tert-Butanol, TFA, Trypton
- Sigma, Osterrode: Laborzentrifuge 3K18
- Spectronics, UK: Transilluminator TC-312 A/F
- Stratagene, Heidelberg: pUC18-Vektor, Turbo-Pfu-Polymerase, UV-Crosslinker, ZAP-cDNA Synthesis Kit,

### **Genetisches** Material

- cDNA-Bank gewonnen aus Proembryogenen Massen Stamm VIII von *Digitalis lanata* EHRH. kloniert in den pBlueScript(SK(+/-))-Vektor (Scholze et al. 1999)
- cDNA-Bank gewonnen aus Blättern einjähriger Exemplare von *Digitalis lanata* EHRH. kloniert in den pBlueScript(SK(+/-))-Vektor sowie:
- genomische Bank gewonnen aus einjährigen Exemplaren von *Digitalis lanata* EHRH. kloniert in das Lambda FIX<sup>®</sup>II-Phagemid (beide freundlicherweise von Dr. Peterson, Biozentrum Halle, zur Verfügung gestellt)
- genomische DNA gewonnen aus jungen Blättern einjähriger Exemplare von *Digitalis lanata* EHRH.

- Gesamt-RNA zur Durchführung der Northern-Analysen gewonnen aus den entsprechenden Pflanzenteilen ein- und zweijähriger Exemplare von *Digitalis lanata* EHRH. sowie aus Embryogenesestadien und gestreßten PEMs-Zellkulturen des Stammes VIII (Reinbothe et al. 1990, Thomar et al. 1998)
- Das Biosensor-Protein zur Durchführung des *in vitro*-Ligandenbindungstests wurde freundlicherweise von Prof. Knudsen vom Molekularbiologischen Institut der Universität Odense, Dänemark, zur Verfügung gestellt.

#### **Bakterienstämme**

- BL21(DE3)-Zellen: E. coli B F<sup>-</sup> dcm ompT hsdS (rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) gal (DE3) (Stratagene)
- BL21(DE3)pLysS: E. coli B F<sup>-</sup> dcm ompT hsdS (rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) gal (DE3) [pLysS Camr]a (Stratagene)
- TOP10: F- mcrA D (mrr-hsdRMS-mcrBC) F80lacZD M15 DlacX74recA1 deoR araD139 D(araleu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG (Invitrogen)
- P2-Zellen: XL1-Blue MRA (P2) strain: Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMRmrr)173endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1Lac (P2 lysogen) (Stratagene)
- SOLR-Zellen: e14-(mcrA), (mcrCB-hsdSMR-mrr)171, sbcC, recB, recJ, umuC:Tn5(Kan<sup>r</sup>),uvrC, lac, gyrA96, relA1, thi-1, endA1, (R, [F', proAB, lacIqZ(M15], Su- (nonsuppressing) (Stratagene)
- XL1-Blue MRF': (mcrA)183, (mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1,recA1,gyrA96, relA1, lac [F', proAB, lacIqZ(M15, Tn10, (Tetr)] (Stratagene)

#### **Oligonukleotide** (Primer)

- Vektorspezifische Primer (zur Sequenzierung, Cy5-markiert):

т7:	ATT	AAC	CCT	CAC	TAA	AG
т3:	TAA	TAC	GAC	TCA	CTA	TAG

- Sondenspezifische Primer (zur Kontroll-PCR, siehe B.1.3.4.ff):

DIR:	GAA	GAA	TTC	GAG	GAA	CAT	GCT	G
REV:	TTC	CAT	GCA	TCC	CAC	TTT	GCC	

 Primer zur Amplifizierung untranslatierter Bereiche von acbp3/acbp4 (B.2.4.2., C.2.1.2.)

AC3-5'DIR: ACG AGG TGG TTT GAG CGA TTG AC3-5'REV: CCA TCT GTT CTT CTT CT AC4-3'DIR: GTT GAT CAC CTG AAT TAC AAC AC4-3'REV: GAA TAA CAC TTG CAC ATA TAA ATG - Primer zur Einführung von NdeI- und BamHI-Schnittstellen (B.4.1.1., C.4.1.)

AC3NDEDIR: CAT ATG GGT TTG AAG GAA GAA TTC GAA G AC3BAMREV: CGG ATC CTC AAC AGG AAG CAG CAG C AC4NDEDIR: CAT ATG GCT TTG AAG GAT GAA TTT GAG AC4BAMREV: GGA TCC TCA ACT CGA TGC AGT AGC TG

- Primer zur gerichteten Mutagenese (B.5.1.1., C.5.1.1.)

Mut23Edir: AGC AAT GAG AAC AAG CTT ATC Mut23Adir: TCC AAC GCG AAC AAG CTC Mut19Srev: AGT ACT CTC AGG TAA GGT CTT C Mut19Nrev: GGT GTT CTC TGG CAA TGT C

#### <u>Häufig verwendete Lösungen</u>

-	0,1xTE:	1 mM Tris pH 8, 0,1 mM EDTA pH 8
-	10 % CTAB-Lsg: 10xMOPS:	400 mM MOPS / NaOH pH 7, 100 mM Natriumacetat,
		10 mM EDTA
-	20xSSC:	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat x 2H <sub>2</sub> O pH 7
-	2xCTAB-Puffer:	2 %Cetylmethylammoniumbromid, 100 mM Tris pH 8,
		20 mM EDTA pH 8, 1,4 M NaCl, 1 % Polyvinylpyrrolidon
		$M_r = 40000$
-	50xTAE-Puffer:	242 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA, Wasser zu 11
-	5xStop-Puffer:	1 mg Bromphenolblau, 1 ml 50xTAE, 14 ml Glycerol, Wasser zu 20 ml
-	Church-Puffer:	500 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 7 % SDS, 1 % BSA, 1 mM EDTA
-	CTAB-Fällungspuff	fer: 1 % CTAB, 50 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA pH 8
-	DEPC-Wasser:	pyrogenfreie sterilisierte 0,1 %ige DEPC-Lösung für 1 h
		inkubiert und danach autoklaviert
-	HEPES-Puffer:	2 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 8
-	Heringssperma:	Fisch-DNA und Wasser wurden 30 min im Ultraschallbad
		inkubiert und anschließend 30 min gekocht. Bei -20°C
		aufbewahrte Aliquots wurden vor Gebrauch 10 min gekocht
		und anschließend 2 min in Eis inkubiert.
-	High salt-TE:	10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8, 1 M NaCl
-	Laemmli-Puffer:	50% (v/v) Glycerol, $5%$ (v/v) 2-Mercaptoethanol, $2%$ (w/v)
		SDS, 1 % (v/v) Bromphenolblau (1 % ethanolische Lösung),
		125 mM Tris-HCl pH 6.8)
-	LB-Agar:	15 g Agar nobilis, 10 g Irypton, 5 g Hereextrakt, 10 g NaCl,
	ID AMD Chi A and	Wasser zu I I, pH /, autoklaviert
-	LB-AMP-Chi-Agar	LB-Agar + 100 µg/mi Ampicinin + 40µg/mi Chioramphenicoi
-	LD-Topagar.	10 g Trupton 5 g Hefeevtrekt 10 g NeCl Wesser zu 11
-	LD-IVIEUIUIII.	nH 7 autoklaviert
_	I B-Chl-Medium	I B-Medium + 40 µg/ml Chloramphenicol
_	LiCl-Lsg	4 M LiCl 20 mM Natriumacetat nH 5 2
_	Nährmedien <sup>.</sup>	für PEMs-Erhaltungskultur sowie somatische Embryogenese
	i vanimeaten.	nach REINBOTHE et al 1990
-	NTES:	0,1 M NaCl,10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 % SDS

-	Rich Media:	20 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, 15 g Ammoniumsulfat, 2,5 g Kaliumhydrogenphosphat, 10 g Glucose, 10 mg Thiamin,
		Wasser zu 11, autoklaviert (Zugabe von 100 µg/ml Amp,
		40 µg/ml Chloramphenicol sterilfiltriert)
-	RNase-Lsg:	1 mg/ml RNase A, 100 U/ml RNase T, 10 min 95°C, -20°C
-	SM-Puffer:	10 mM Tris/HCl, pH 7, 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 0,01 % Gelatine
-	SOC-Medium:	20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, Wasser zu 1 l,
		autoklaviert, vor Gebrauch Zugabe von 10 ml 1 M MgCl <sub>2</sub> ,
		10 ml 1 M MgSO <sub>4</sub> und 20 ml 20 % Glucose (sterilfiltriert)
-	TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8
-	TFB1-Puffer:	100 mM Rubidiumchlorid, 50 mM MnCl <sub>2</sub> , 30 mM Kalium-
		acetat, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 15 % Glucose, pH 5,8; sterilfiltriert
-	TFB2-Puffer:	10 mM MOPS, 10 mM Rubidiumchlorid, 75 mM CaCl <sub>2</sub> , 15 %
		Glycerol, pH 6,8 sterilfiltriert
-	Topagarose:	LB-Medium mit 6 g Agarose je 1 l Medium autoklaviert
-	Tris-gesätt. Phenol:	gesättigt mit 100 mM Tris/HCl, pH 8.0, unter Zusatz von
		0.1 % 8-Hydroxychinolin
-	Wasser:	deionisiert und pyrogenfrei, für molekularbiologische Zwecke
		zusätzlich sterilisiert, für Arbeiten mit RNA zusätzlich mit
		RNase-Inhibitor DEPC behandelt
-	X-Gal-Stammlsg.:	40 mg/ml X-Gal gelöst in Dimethylformamid

#### A. Einleitung

#### 1. ACBP – das Protein mit den vielen Namen

Kaum eine andere Proteinfamilie wurde unter so vielen verschiedenen Namen publiziert wie die hier untersuchte Familie der Acyl-CoA-bindenden Proteine (ACBPs). Unabhängig voneinander wurde das Protein sowohl auf Grund seiner Fähigkeit, Diazepam von der Benzodiazepin-Bindungsstelle des GABA-Rezeptors zu verdrängen, als Diazepin-Bindungsinhibitor (DBI bzw. Endozepin) beschrieben (GUIDOTTI et al. 1983, SHOYAB et al. 1986) als auch durch seine hochspezifische Affinität zu langkettigen Fettsäure-Coenzym A-Estern als Acyl-CoA-bindendes Protein (ACBP) identifiziert (MOGENSEN et al. 1987). Des weiteren wurde es über seine Fähigkeit zur Unterdrückung Glucose-induzierter Insulinsekretion isoliert und publiziert (CHEN et al. 1988) und ebenfalls unabhängig davon sein Einfluß auf die Stimulierung der Pregnenolon-Synthese bovinen im System beschrieben (YANAGIBASHI et al. 1988, BESMAN et al. 1989). Erst später wurde die Identität der bis dahin getrennt voneinander behandelten Proteinfamilien festgestellt (KNUDSEN et al. 1989).

Die Auflistung dieser potentiellen Funktionen zeigt die Einbindung dieser Proteinfamilie in elementare Grundstoffwechselvorgänge wie den Fettsäurestoffwechsel ebenso wie in hochspezialisierte und streng regulierte Prozesse wie die Insulinsekretion. Es wird ebenso deutlich, daß für dieses Protein – zumindest belegt für das tierische System – sowohl intra- als auch extrazelluläre Funktionen diskutiert werden. Es ist also offensichtlich sowohl im Cytosol als auch als sekretorisches Protein im Einsatz. Die Auflistung zeigt allerdings auch, daß die Proteinfamilie, wie die beschriebenen Funktionen im Insulinstoffwechsel und im GABA-Neurotransmittersystem ahnen lassen, vor allem im tierischen bzw. menschlichen System untersucht wurde, obwohl sie ubiquitär in allen untersuchten Eukaryoten sowie eukaryotischer Hefe nachgewiesen wurde.

In dieser Arbeit wurde dieses multifunktionelle Protein speziell im pflanzlichen System (*Digitalis lanata* EHRH.) und dabei ausschließlich in seiner Eigenschaft als Acyl-CoA-bindendes Protein untersucht. Dennoch soll im folgenden kurz auf andere dem Protein zugeschriebene Funktionen eingegangen werden.

#### 1.1. Physikalische Charakterisierung

Die hier untersuchte Familie der Acyl-CoA-bindenden Proteine stellt eine Klasse von hochkonservierten, ubiquitär eukaryotischen relativ kleinen. im System vorkommenden Proteinen dar (GOSSETT et al. 1996). Es handelt sich dabei um sehr stabile und "langlebige", lösliche, im Cytosol lokalisierte Proteine von ca. 10 kDa (86 bis 103 Aminosäuren) Größe (BROWN et al. 1992, BUUS et al. 1994). Neben dieser als basic ACBPs bezeichneten Gruppe wurden noch weitere ACBP-ähnliche Proteine identifiziert, die neben der Acyl-CoA-Bindungsdomäne weitere Strukturelemente aufwiesen. So wurde in Arabidopsis thaliana ein membranassoziiertes ACBP sowohl auf Protein- als auch auf DNA-Ebene nachgewiesen (CHYE 1998, CHYE et al. 1999). Eine funktionelle Acyl-CoA-bindende Domäne wurde auch in anderen Proteinen aufgefunden, so z.B. in der Sequenz des Transkriptionsfaktors FadR in Escherichia

Während in den meisten Arbeiten die Funktionen dieser Proteinfamilie betreffend von einer Involvierung des Monomers ausgegangen wurde, konnte bei der Identifizierung des ACBPs als m-Calpain-Aktivator im Skelettmuskel der Ratte die Beteiligung des Homodimers nachgewiesen werden (MELLONI et al. 2000).

#### 1.2. Bindung von Fettsäure-CoA-Estern

Das Acyl-CoA-bindende Protein wurde erstmals aus Rinderleber isoliert und über seine Fähigkeit, mittellange Fettsäure-CoA-Ester zu binden und deren Synthese durch die Fettsäuresynthetase zu induzieren, identifiziert (MOGENSEN et al. 1987) und sequenziert (MIKKELSEN et al. 1987). Bei der Untersuchung nativer und rekombinanter ACBPs verschiedener Organismen und Gewebe konnte durchgehend festgestellt werden, daß diese Proteine mittellange (8-14 C-Atome), besonders jedoch langkettige (mehr als 14 C-Atome in der aliphatischen Seitenkette) Fettsäure-Coenzym A-Thioester mit sehr hoher Affinität binden (MIKKELSEN und KNUDSEN 1987, RASMUSSEN et al. 1990). Die dabei berechneten Dissoziationskonstanten lagen im ein- bis zweistelligen nanomolaren Bereich, was eine hochspezifische Protein-Liganden-Bindung nahelegte (FÆRGEMAN und KNUDSEN 1997, ROSENDAL et al. 1993, FULCERI et al. 1997).

Im folgenden soll etwas näher auf diese hochspezifische Ligandenbindung eingegangen werden.

#### 1.2.1. ACBP-Primärstruktur

Bei der Proteinfamilie der ACBPs handelt es sich, wie bereits festgestellt, um relativ kleine (Molekulargewicht von rund 10 kDa), jedoch hoch konservierte Proteine. Zur Demonstration des Konservierungsgrades der Primärsequenz unterschiedlichster Spezies ist in Abb. A.1. exemplarisch ein Vergleich der Proteinsequenzen der ACBPs aus Mensch, Rind, Fruchtfliege, Hefe, Arabidopsis und Baumwolle dargestellt. Dabei wird deutlich, daß besonders im Bereich der  $\alpha$ -Helices A2 und A3, in denen die meisten bindungsrelevanten Aminosäuren liegen, ein hoher Grad an Homologie über alle Spezies hinweg herrscht, während der C-Terminus eine größere Varianz aufweist.

	Tyr28 Tyr31	
	Ala9 Leu25   Lys32	
ACBP BOVIN	SQAEFDKA <b>A</b> EEVKHLKTKPADEEM <b>L</b> FI <b>Y</b> SH <b>YK</b> QATVGDINTERPGMLD 48	3
ACBP HUMAN	SQAEFEKA <b>A</b> EEVRHLKTKPSDEEMLFIYGHYKQATVGDINTERPGMLD 48	3
ACBP DROME	-MVSEQFNAA <b>A</b> EKVKSLTKRPSDDEF <b>L</b> QLYALF <b>K</b> QASVGDNDTAKPGLLD 49	9
ACBP_YEAST	VSQLFEEK <b>A</b> KAVNELPTKPSTDEL <b>L</b> ELYALYKQATVGDNDKEKPGIFN 48	3
ACBP ARATH	MGLKEEFEEH <b>A</b> EKVNTLTELPSNEDLLILYGLYKQAKFGPVDTSRPGMFS 50	C
ACBP_GOSHI	MGLKEEFEEH <b>A</b> EKVKTLPAAPSNDDM <b>L</b> IL <b>Y</b> GL <b>YK</b> QATVGPVNTSRPGMFN 5(	C
_	· *: <b>*:</b> *. * <b>*: :::* :*</b> . <b>:*</b> ** <b>:</b> . <b>:</b> **::.	
	[ Helix A1 ] [ Helix A2 ]	
	Lys54 Tyr73	
ACBP_BOVIN	FKGKA <b>K</b> WDAWNELKGTSKEDAMKAYIDKVEELKKKYGI 86	
ACBP_HUMAN	FTGKA <b>K</b> WDAWNELKGTSKEDAMKAYINKVEELKKKYGI 86	
ACBP_DROME	LKGKA <b>K</b> WEAWNKQKGKSSEAAQQE <b>Y</b> ITFVEGLVAKYA 86	
ACBP_YEAST	MKDRY <b>K</b> WEAWENLKGKSQE <mark>DAEKEY</mark> IALVDQLIAKYSS 86	
ACBP ARATH	mkera <b>k</b> wdawkavegksse <mark>e</mark> amnd <b>y</b> itkvkQllevaaskast 92	
ACBP_GOSHI	MREKY <b>K</b> WDAWKAVEGKSKEEAMGD <b>Y</b> ITKVKQLFEAAGSS 89	
—	· · **:**: · · * · · · · · ·	
	[ Helix A3 ] [ Helix A4 ]	

Abb. A.1.: Exemplarischer Sequenzvergleich der ACBP-Primärstrukturen für Rind, Mensch, Fruchtfliege, Hefe, Arabidopsis und Baumwolle. (Grau unterlegte Bereiche kennzeichnen Regionen mit hoher Homologie, die Bereiche der 4 α-Helices sind unterhalb der Sequenzen angegeben.) Die durch Fettdruck hervorgehobenen und durch Angabe der AS-Position gekennzeichneten Aminosäuren entsprechen den für das bovine ACBP ermittelten hochkonservierten, maßgeblich für die Ligandenbindung verantwortlichen Aminosäuren (siehe A.1.2.4.). SWISSPROT-Einträge und Zugangsnummern: ACBP\_BOVIN (*Bos taurus*) P07107; ACBP\_HUMAN (*Homo sapiens*) P07108; ACBP\_DROME (*Drosophila melanogaster*) P42281; ACBP\_YEAST (*Saccharomyces cerevisiae*) P31787; ACBP\_ARATH (*Arabidopsis thaliana*) P57752; ACBP\_GOSHI (*Gossypium hirsutum*) Q39779

#### 1.2.2. ACBP-Sekundär- bzw. Tertiärstruktur und Bindungsdomänen

Die Proteinstruktur der ACBP-Familie wurde vor allem im Carlsberg Laboratorium Valby, Dänemark, sowie in der ACBP-Arbeitsgruppe in Odense, Dänemark, NMR-spektroskopische Analysen wurde dabei untersucht. Durch die dreidimensionale Struktur des bovinen ACBP ermittelt (ANDERSEN et al. 1991, ANDERSEN und POULSEN 1992) und deren Auswertung später noch verfeinert (ANDERSEN und POULSEN 1993). Dabei sind im bovinen ACBP vier  $\alpha$ -Helices in der relativ ungewöhnlichen Ausrichtung up-down-down-up und einem Loop zwischen den Helices A2 und A3 angeordnet. Das Protein unterscheidet sich von anderen 4-ahelix-gefalteten Proteinen durch eine leicht irreguläre Ausrichtung der Helix A3, was die spezifische Präsentation der Bindungsdomäne ermöglicht. Die modellierten Proteinstrukturen für apo- sowie holo-Protein nach Bindung eines Liganden sind ausführlich im Review von Kragelund dargestellt (KRAGELUND et al. 1999a).

Die zentralen Aminosäuren der so festgestellten Helices sind mit nur einer Ausnahme (Ser19) alle hochkonserviert, das heißt sie wurden übereinstimmend in mindestens 18 von 21 ACBP-Sequenzen verschiedener Organismen gefunden (KRAGELUND et al. 1999a). Dies suggerierte die Annahme, daß die 4- $\alpha$ -Helix-Struktur zumindest für die relativ kleinen *basic* ACBPs über alle bisher aufgefundenen Sequenzen

unterschiedlichster Spezies hinweg konserviert ist. Diese hohe Homologie ermöglicht eine Modellierung der Tertiärstruktur neu aufgefundener ACBPs an Hand der NMR-Analyse für das bovine ACBP.

Eine leicht abweichende Tertiärstruktur und damit auch eine von der bovinen ACBP-Bindungsdomäne geringfügig unterschiedliche Ausbildung der Ligandenbindungsstelle wurde durch NMR-Analyse für das ACBP aus *Plasmodium falciparum* ermittelt. Diese Strukturunterschiede ließen sich auch in einer unterschiedlichen Affinität des Proteins zu seinen Liganden wiederfinden (VAN AALTEN et al. 2001).

#### 1.2.3. Ligandenstruktur

Bei den in dieser Arbeit hauptsächlich betrachteten Liganden des ACBP handelt es sich um langkettige gesättigte und ungesättigte aliphatische Fettsäure-Coenzym A-Thioester, also Acyl-CoA-Ester mit 14 oder mehr Kohlenstoffatomen in der aliphatischen Seitenkette. Diese aktivierten Ester stellen amphiphatische Moleküle dar, wobei der Coenzym A-Rest eine hydrophile Kopfgruppe bildet, die dem hydrophoben Fettsäurerest gegenübersteht. Als Beispiel für die chemische Struktur dieser Liganden ist in der folgenden Abbildung Palmitoyl-CoA dargestellt.



Abb. A.2.: Strukturformel für Palmitoyl-CoA unter Angabe der für die Bindung und Funktion des Liganden wichtigen Teilstrukturen (Ade (1) = Adeninrest, Pyr (2) = Pyrophosphatrest, Pan (3) = Pantheteinrest, Cyn (4) = Cysteamin, Pal (5) = Palmitoylrest (hier nur Beginn der aliphatischen Seitenkette dargestellt)) (nach KRAGELUND et al. 1993)

Auf die Eigenschaften und Funktionen dieser Liganden wird in A.3.1. näher eingegangen.

#### 1.2.4. ACBP-Ligandenbindung

Die im folgenden erwähnten in die Ligandenbindung involvierten Aminosäuren sind in Abb. A.1. bzw. Ligandenstrukturen in Abb. A.2. dargestellt.

Die mit hoher Affinität erfolgende Bindung eines langkettigen Fettsäure-CoA-Esters an das ACBP in der Bindungsstöchiometrie 1:1 wurde unter Verwendung von Palmitoyl-CoA und rekombinantem bovinen ACBP einer NMR-Analyse unterworfen. Dabei konnte festgestellt werden, daß sich die Abstände der einzelnen zentralen Aminosäuren im holo-Protein nicht signifikant von denen des apo-Proteins unterschieden, die Bindung eines Liganden jedoch die Tertiärstruktur des Proteins zu einer kompakteren, eher geschlossenen Konformation zu beeinflussen und so den Liganden vor Lösungsmitteleinflüssen abzuschirmen schien (KRAGELUND et al. 1993).

Ein entscheidender Unterschied, der auch zum Nachweis der erfolgten Ligandenbindung herangezogen werden kann, bestand jedoch in einem veränderten Isoelektrischen Punkt nach Bindung des Liganden. Der IP des Proteins wurde dabei nach Bindung eines Acyl-CoAs in den sauren Bereich verschoben (KNUDSEN et al. 1994), wodurch der Bindungszustand des jeweiligen ACBPs relativ einfach in einem Isoelektrofokussierungsgel zu überprüfen ist.

Die konservierten Aminosäuren, die über elektrostatische bzw. hydrophobe Wechselwirkungen zur Ligandenbindung beitragen, wurden durch gerichtete Mutation und die isotherme Titration der jeweiligen Mutanten mit Lauryl-CoA untersucht (KRAGELUND et al. 1999b). Bei der Bindung und Ausrichtung des Liganden in der Bindungstasche des Proteins waren Aminosäuren aus allen vier Helices beteiligt (KRAGELUND et al. 1999a). Es ließen sich hier drei distinkte Bindungsregionen unterscheiden, die jeweils für die Bindung des Adeninringes, des 3'-Phosphates bzw. des Fettsäurerestes zuständig sind. Dabei war der Adeninring in eine hydrophobe "Tasche" eingebettet und über elektrostatische Wechselwirkungen mit den Tyrosinresten Tyr31 und Tyr73 sowie dem Alaninrest Ala9 gebunden. Durch Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäuren Tyr28, Lys32 und Lys54 trug die 3'-Phosphatgruppe des Liganden zu ca. 40 % zur Gesamtbindungsenergie bei, während die Pyrophosphatgruppe keinen erkennbaren Beitrag zur Ligandenbindung -Ende des Fettsäurerestes bestimmte die Präferenz hinsichtlich leistete. Das langkettiger Liganden, da nur die C-Atome 12 bis 16 der Acylkette entscheidend zur Bindung beitrugen. Dies beruhte auf einer hydrophoben Wechselwirkung mit den Aminosäuren Met24, Leu25 und Ala 53. Kurzkettigere Acyl-CoAs binden nur mit wesentlich geringerer Affinität, während freie Fettsäuren gar nicht und freies Coenzym A zwei bis drei Zehnerpotenzen schlechter als die CoA-Ester gebunden wurden (ROBINSON et al. 1996).

#### 1.2.5. Bedeutung des ACBP-Acyl-CoA-Komplexes

Durch die Orientierung des Liganden in der Bindungstasche des ACBP wird der relativ hydrophobe Ligand sowohl von Einflüssen eines polaren Lösungsmittels (Wasser im Cytosol) als auch vor Abbau der energiereichen Thioesterbindung durch unspezifische hydrolysierende Enzyme geschützt. Des weiteren wird eine gerichtete Freigabe des Liganden an Acyl-CoA-abhängige Enzyme diskutiert. Ein Nachweis dieser Fähigkeit, zumindest im *in vitro*-Test an immobilisierten Mitochondrien und Mikrosomen, konnte durch die gerichtete Abgabe von Acyl-CoA-Estern an Enzyme der  $\beta$ -Oxidation bzw. der Glycolipidsynthese erbracht werden (RASMUSSEN et al. 1994). Dabei wurde festgestellt, daß die  $\beta$ -Oxidationsrate selbst bei steigender Konzentration an freiem Acyl-CoA sich nicht erhöhte, solange die Konzentration an ACBP-gebundenem Acyl-CoA konstant blieb. Dieses Modell der gerichteten Ligandenfreisetzung wurde durch spätere Experimente bestätigt, wobei festgestellt werden konnte, daß nur ACBP-gebundenes Acyl-CoA, nicht jedoch freies cytosolisches Acyl-CoA das bevorzugte Substrat der Acyl-CoA-Lysophospholipid-Acyltransferase (LAT) in den roten Blutkörperchen des Menschen war (FYRST et al. 1995). Des weiteren konnte gezeigt werden, daß ACBP seine Liganden auch gezielt an regulatorische Prozesse freigeben kann. So aktivierten Acyl-CoAs erfolgreich den Ryanodinrezeptor/Ca<sup>2+</sup>-release-Kanal selbst bei Anwesenheit eines erheblichen Überschusses an ACBP, der die freie Konzentration an Acyl-CoAs auf ein Minimum reduzierte (FULCERI et al. 1997).

Dieser Poolbildner- und Transporterfunktion des Acyl-CoA-bindenden Proteins für langkettige Fettsäure-Coenzym A-Thioester wird auf Grund der vielfältigen Funktionen dieser Stoffklasse (siehe A.3.1.) große Bedeutung innerhalb des Zellstoffwechsels beigemessen. So kann die intrazelluläre Konzentration an langkettigen Acyl-CoA-Estern 20 µM (Cytosol) oder sogar bis zu 250 µM (Mitochondrien) betragen (ROSENDAL und KNUDSEN 1993, RASMUSSEN et al. 1993), während die Konzentration an freiem Acyl-CoA unter physiologischen Bedingungen 5 nM kaum überschreiten dürfte (FÆRGEMAN und KNUDSEN 1997). Diese sehr geringe Konzentration an freiem Acyl-CoA wird sowohl von der Bindung des Liganden an äquimolar vorhandenes ACBP als auch durch den Abbau an ungebundenem Liganden durch die Acetyl-CoA-Carboxylase bestimmt. Dadurch ist sichergestellt, daß die Signalfunktionen dieser Stoffklasse nicht durch unkontrolliert hohe Konzentrationen des Messengers in der Zelle beeinträchtigt werden. Auf diese Funktionen der Fettsäure-CoA-Ester soll in A.3.1. näher eingegangen werden.

#### **1.3.** Weitere intrazelluläre Funktionen

Neben der in dieser Arbeit betrachteten Funktion des ACBP als Bindungs- und Transportprotein für den intrazellulären Pool an Fettsäure-Coenzym A-Estern wurden dieser Proteinfamilie weitere intrazelluläre Funktionen zugeschrieben.

Unabhängig von seiner Eigenschaft als Acyl-CoA-Bindungsprotein wurde das Protein über seine Fähigkeit, die mitochondriale Pregnenolonsynthese zu stimulieren, identifiziert (YANAGIBASHI et al. 1988, BESMAN et al. 1989) und später die Übereinstimmung mit dem bereits aufgereinigten und sequenzierten ACBP festgestellt. Dieser Einfluß auf die Steroidsynthese in den Mitochondrien wurde auf eine Interaktion des Proteins mit dem Peripheren Benzodiazepinrezeptor (PBR), der in den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Cholesteroltransportes von äußerer zu innerer Mitochondrienmembran involviert ist, zurückgeführt (PAPADOPOULOS und BROWN 1995).

Das in seiner Eigenschaft als möglicher endogener PBR-Ligand **DBI** (Diazepam-Bindungsinhibitor) genannte Protein wurde auf Grund seiner Fähigkeit zur Verdrängung von Diazepam von dessen Bindungsstelle am Benzodiazepinrezeptor im ZNS identifiziert (GUIDOTTI et al. 1983, SHOYAB et al. 1986). Daß ACBP/DBI auch am Peripheren Benzodiazepinrezeptor bindet, konnte durch die Verdrängung radioaktiv markierter Benzodiazepine vom PBR gezeigt werden (BOVOLIN et al. 1990, GARNIER et al. 1993), wobei der stimulierende Effekt des ACBP/DBI auf die Steroidbiosynthese durch den spezifischen PBR-Inhibitor Flunitrazepam geblockt werden konnte (PAPADOPOULOS et al. 1991). Die Interaktion von DBI und PBR, zumindest jedoch ihre räumliche Nähe, konnte experimentell durch ein *Cross Linking* des Rezeptors mit radioaktivem DBI und immunochemischer Erkennung des Komplexes aufgezeigt werden (GARNIER et al. 1994). Diese Fähigkeit konnte auf einen bestimmten Bereich der DBI-Proteinsequenz zurückgeführt werden. Das

Teilpeptid des ACBP/DBI von Aminosäureposition 17 bis 50, Triacontatetraneuropeptid (TTN) benannt, wurde für die Stimulierung der Steroidbiosynthese verantwortlich gemacht (PAPADOPOULOS et al. 1991). Dieses TTN konnte gemeinsam mit weiteren Prozessierungsprodukten des ACBP/DBI in Extrakten steroidproduzierender Gewebe nachgewiesen werden. Durch DBI-Antisense-Oligonukleotide konnte die Steroidproduktion in dem untersuchten R2C-Leydig-Zellstamm komplett unterdrückt werden (BOUJRAD et al. 1993). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, daß die Steroidsynthesestimulation durch ein Prozessierungsprodukt des DBI unabhängig von einer Interaktion mit dem PBR direkt an der inneren Mitochondrienmembran denkbar ist. Dieser Effekt konnte in einem in vitro-System an der möglichen Interaktion des DBI mit dem Cytochrome P450-Seitenkettenspaltenden Enzym (CYP11A1), dem ersten Enzym der Pregnenolonsynthese, festgemacht werden (BROWN und HALL 1991, BOUJRAD et al. 1994). Somit war ein weiteres Modell der Regulation der mitochondrialen Steroidbiosynthese entwickelt worden. Diese Erkenntnisse wurden natürlich im tierischen/menschlichen System und bei in vitro-Versuchen gewonnen, ähnliche Erkenntnisse über diese Zusammenhänge im pflanzlichen System stehen daher noch aus.

Es bestehen jedoch einige Zweifel an der Rolle des ACBP/DBI in dieser intrazellulären Funktion als PBR-Ligand. So konnte noch kein direkter Zusammenhang zwischen der gut untersuchten Funktion des ACBP als Acyl-CoA-Transporter und -Poolformer und seiner Involvierung in die Regulation des Steroidstoffwechsels aufgezeigt werden. Ein indirekter Zusammenhang mit der Steroidsyntheseregulation könnte in der Bindung von Acyl-CoAs, die aus ihrer Cholesterolbindung freigesetzten und an Coenzym A gebundenen Fettsäuren stammen, liegen. Die Balance zwischen so mobilisiertem Cholesterol und dem "Sättigungszustand" der ACBP-Ligandenbindungsstellen könnte einen Einfluß auf die Steroidsyntheserate haben (KNUDSEN 1996). Für den vom PBR kontrollierten Cholesterol-Uptake in die Mitochondrien sind vom ACBP/DBI unabhängige Modelle erstellt worden.

#### 1.4. Extrazelluläre Funktionen

Neben den oben dargestellten intrazellulären Funktionen wurden dem ACBP bzw. seinen Prozessierungsprodukten noch weitere sekretorische, also extrazelluläre Funktionen zugeschrieben. Da diese in keinem direkten Zusammenhang zu den in dieser Arbeit vorliegenden Untersuchungen stehen, soll hier nur kurz auf die jeweiligen Referenzen verwiesen werden.

Zu all diesen potentiellen sekretorischen Funktionen muß gesagt werden, daß bisher eine direkte Interaktion des ACBP mit Rezeptoren an der Zelloberfläche, wie sie für extrazellulär aktive Moleküle zu erwarten wäre, nicht nachgewiesen werden konnte. Des weiteren sind alle regulatorischen Funktionen, die dem Protein zugeordnet wurden, mit der Frage verknüpft, wie ein so ubiquitär exprimiertes und in größeren Mengen im Cytosol der Zellen fast aller untersuchter Gewebe vorliegendes *housekeeping*-Protein regulatorische Funktionen übernehmen kann. Eine mögliche Antwort dazu liegt in seiner Funktion als effektives Bindungsprotein für Acyl-CoAs, die ihrerseits regulatorische Funktionen innehaben. Darüber hinaus sind verschiedene Effekte des ACBP an bestimmten Teilstrukturen der Sequenz festgemacht worden. Wenn also die biologische Funktion speziellen Prozessierungs- und Spaltprodukten des Gesamtproteins zugeordnet werden kann, bekommt die spezifische Prozessierung eines "unspezifischen" Proteins Bedeutung für dessen regulatorische Aktivität.

#### 1.4.1. ACBP als Neurotransmitter und -modulator

Die am besten untersuchte und am längsten diskutierte "alternative" ACBP-Funktion ist die eines Neurotransmitters im ZNS. In dieser Funktion wurde es erstmals aus dem Gehirn von Mensch und Rind isoliert und auf Grund seiner Fähigkeit, Diazepam von dessen Bindungsstelle am GABA-Rezeptor zu verdrängen, Diazepam-Bindungsinhibitor oder **Endozepin** benannt (GUIDOTTI et al. 1983, SHOYAB et al. 1986). Studien haben gezeigt, daß ACBP in der Lage ist, über seine Interaktion mit dem postsynaptischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptor den Chlorid-Influx in kultivierten Neuronen zu regulieren (BORMANN et al. 1985, BORMANN 1991). Es wurde dabei eine direkte Interaktion des ACBP mit der extrazellulären Benzodiazepin-Erkennungsstelle des Rezeptors postuliert, die jedoch *in vivo* bisher nicht gezeigt werden konnte.

Eine Vielzahl von Publikationen widmete sich diesem neuen Neuropeptid und seinen Funktionen und Wirkungen, jedoch wurde die Definition des ACBP als endogenes Benzodiazepin-Analogon immer wieder in Frage gestellt. Ein Argument gegen diese Theorie ist z.B. die für die Wirkung am GABA-Rezeptor nötige Konzentration, die im mikromolaren Bereich liegt, für einen Neurotransmitter um Größenordnungen zu unspezifisch (im Vergleich dazu liegt die Dissoziationskonstante des ACBP für Acyl-CoAs im nanomolaren Bereich, die Bindung ist also bis zu drei Zehnerpotenzen spezifischer) (KNUDSEN et al. 1993). Des weiteren ließen sich die oben erwähnten Diazepam-Verdrängungsversuche nicht mit hochreinem Ratten-ACBP wiederholen (KNUDSEN und NIELSEN 1990). Der Theorie vom Neuropeptid widerspricht auch, daß sich das ACBP-Transkript nicht in den Neuronen der Ratte nachweisen ließ (TONG et al. 1991) und das Protein selbst nur in nicht-neuronalen Zellen und Tumoren des Gehirns aufgefunden wurde (ALHO et al. 1995).

#### 1.4.2. ACBP als Inhibitor Glucose-induzierter Insulinsekretion

Das ACBP des Schweins wurde an isolierten Pankreas- bzw isolierten Inselzell-Kulturen als effektiver Hemmer der Glucose-induzierten Insulinsekretion identifiziert. Die dabei nötige Konzentration lag im nanomolaren Bereich, was eine hochspezifische Interaktion suggerierte (CHEN et al. 1988, ÖSTENSON et al. 1990). Ähnliche Resultate konnten später für das Ratten-ACBP und sein Teilpeptid ACBP(33-50) (Octadecaneuropeptid, **ODN**) ermittelt werden (ÖSTENSON et al. 1991). Die intravenöse Gabe des Ratten-ACBP senkte dabei den Insulinspiegel bei gleichzeitiger Glucosegabe um ein Viertel, bei höheren ACBP-Konzentrationen um fast die Hälfte (ÖSTENSON et al. 1994). Der Mechanismus dieser Hemmung ist unklar, eine direkte Interaktion mit den  $\beta$ -Zellen der Pankreas erscheint jedoch nicht wahrscheinlich. Für das ODN-Teilpeptid wurde eine Interaktion über die Modulation des intrazellulären Calciumspiegels diskutiert (DE STEFANIS et al. 1995). ODN soll dabei durch Interaktion mit einem Phospholipase-gekoppelten Rezeptor intrazelluläre Calciumpools mobilisieren (PATTE et al. 1995, LAMACZ et al. 1996).

#### 1.4.3. ACBP als Regulator der Zellproliferation

Bei der Untersuchung des Einflusses von ACBP auf die Proliferation isolierter Leydig-Zellen konnte festgestellt werden, daß ACBP in nanomolaren Konzentrationen mitogen wirkt, während bei mikromolaren Proteinkonzentrationen die Zellproliferation gehemmt wurde. Dieser Effekt wurde auf eine para- bzw. autokrine Interaktion des ACBP mit dem extrazellulären Abschnitt des PBR zurückgeführt (GARNIER et al. 1993). Dabei kann das ACBP offensichtlich von kultivierten Testiszellen sezerniert werden und konnte auch im Interstitium der Testis nachgewiesen werden. Die ACBP-Wirkung auf Leydig-Zellen ist jedoch nicht spezifisch, da in ähnlichen Experimenten ein solcher Einfluß auch auf Fibroblasten zu registrieren war (GARNIER et al. 1993).

#### 1.4.4. ACBP als Cholecystokinin-releasing Peptid

ACBP wurde aus der Mucosa des Schweinedarms auf Grund seiner Involvierung in die Feedback-Regulation der Pankreas-Enzymsekretion isoliert (HERZIG et al. 1996). Cholecystokinin (CKK) stimuliert die Pankreassekretion und ist seinerseits durch pankreatische Proteasen in seiner Sekretion gehemmt (negativer Feedback). ACBP als *Cholecystokinin-releasing* Peptid (**CCK-RP**) stimuliert die Ausschüttung von CCK und damit die gesamte Pankreassekretion bereits in nanomolaren Konzentrationen. Wie bei den zuvor beschriebenen "Alternativfunktionen" ist auch hier der genaue Mechanismus und die direkte Interaktion mit einem Rezeptor noch nicht aufgeklärt worden (HERZIG et al. 1998).

#### 1.4.5. ACBP als Immunmodulator

Den bereits unter A.1.3. bzw. A.1.4.2. besprochenen ACBP-Teilpeptiden TTN und ODN wurden immunmodulierende Effekte im nano- und sogar picomolaren Konzentrationsbereich attestiert. So erhöhte ODN signifikant die Sekretion von Interleukin-1 $\beta$  und weiteren Interleukinen sowie Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TAUPIN et al. 1991). Ähnliche Resultate mit etwas verändertem Spektrum an induzierten Interleukinen konnten später auch für TTN nachgewiesen werden (TAUPIN et al. 1993). Auch hier wurde eine Interaktion mit dem PBR als möglicher Mechanismus postuliert. Interessanterweise wurden für das menschliche TTN Übereinstimmungen im Wirkmechanismus mit Cyclooxygenase-Inhibitoren (hier Indometacin) festgestellt, wobei TTN signifikant die Prostaglandin E<sub>2</sub>-Synthese hemmte. Die für die ACBP-Spaltprodukte gewonnenen Ergebnisse ließen sich nicht oder nur unvollständig auf für das intakte Protein zu erwartende Ergebnisse übertragen, was die spezifische Wirkung des Teilpeptids eines unspezifischen multifunktionalen Gesamtproteins nahelegte.

Zusätzlich zu den bisher erwähnten Effekten konnte für das ACBP-Teilpeptid ACBP(32-86) eine antibakterielle Wirkung gegen das gram-positive Bakterium *Bacillus megaterium* aufgezeigt werden (AGERBERTH et al. 1993). Da keine weiteren antibakteriellen Wirkungen des Teilproteins gegen andere Keime gefunden werden konnte und das Gesamtprotein nahezu wirkungslos ist, bleibt diese potentielle Funktion weiter unklar.

#### 2. Genomische Organisation der ACBP-Proteinfamilie

#### 2.1. Isoformen und Pseudogene in der ACBP-Proteinfamilie

Obwohl im menschlichen System nur ein klassisches funktionelles ACBP-Genprodukt nachgewiesen werden konnte, suggerierte die genomische Southern-Analyse das Vorhandensein einer ganzen Gruppe ACBP-ähnlicher Sequenzen im Genom (GERSUK et al. 1995). Dies bestätigte die Ergebnisse der Untersuchungen im Rattengenom, wo ebenfalls ein funktionelles Gen und vier Pseudogene nachgewiesen werden konnten (MANDRUP et al. 1992). Für die meisten der untersuchten Organismen konnte jeweils ein funktionelles, für ein *basic* ACBP kodierendes Gen postuliert werden, während für einige Spezies noch zusätzliche gewebespezifische Isoformen aufgefunden werden konnten (KRAGELUND et al. 1999a). So wurde unter anderem für Rind, Ratte und Maus eine Testis-spezifische (PUSCH et al. 1999) sowie für Frosch und Ente eine Gehirn-spezifische Isoform identifiziert (ROSE et al. 1994) (siehe auch A.2.4.). Der Verwandtschaftsgrad dieser Isoformen bzw. Pseudogene ist außerordentlich hoch, wobei die an der Ligandenbindung beteiligten Aminosäuren über alle untersuchten Spezies hinweg hochkonserviert waren (KRAGELUND et al. 1999a).

#### 2.2. ACBPs in Pflanzen

Ähnlich den im tierischen/menschlichen System gefundenen Genstrukturen konnten auch für Pflanzen jeweils mindestens ein funktionelles Gen sowie eine Vielfalt weiterer genomischer Strukturen ermittelt werden. Insgesamt ließ sich feststellen, daß die genomische Organisation dieser Proteinfamilie in Pflanzen komplizierter und weiter verzweigt ist als im tierischen System. Für *Arabidopsis* konnte neben dem herkömmlichen *basic* ACBP noch ein weiteres funktionelles Gen bestätigt werden, das für ein wesentlich größeres membranständiges Protein kodiert (ENGESETH et al. 1996, CHYE 1998), während im Genom weitere ACBP-ähnliche, wahrscheinlich nicht funktionelle Pseudogene sequenziert wurden.

Neben den Untersuchungen am "klassischen" pflanzlichen Organismus *Arabidopsis* wurden ACBPs in weiteren Pflanzen auf Protein- bzw. Genebene identifiziert. So wurde die ACBP-cDNA aus *Brassica napus* L. isoliert und das Genprodukt überexprimiert (HILLS et al. 1994, BROWN et al. 1998). Das Protein konnte im Westernblot in allen untersuchten Geweben (mit Ausnahme von getrocknetem Samen) nachgewiesen werden, wobei allerdings keine starke Korrelation zwischen der ACBP-Proteinmenge und Geweben oder Entwicklungsstadien mit verstärktem Lipidmetabolismus festgestellt werden konnte. Im Genom von *Brassica napus* L. konnten durch Southern-Analyse 6 verschiedene Gene nachgewiesen werden, die sich im Isoelektrischen Punkt ihrer Genprodukte unterschieden und für die eine eventuell unterschiedliche differentielle Expression diskutiert wurde.

Auch in dem in dieser Arbeit näher untersuchten pflanzlichen System *Digitalis lanata* EHRH. wurden bereits Erkenntnisse zu Vorkommen und Proteinsequenz der ACBP-Familie gewonnen. So konnten am Institut aus einer Zellkultur proembryogener Zellen zwei native Proteine isoliert und aufgereinigt werden, die sich als Isoformen der ACBP-Proteinfamilie mit leicht unterschiedlichen Massen (9,926 kDa bzw. 9,997 kDa) herausstellten (METZNER et al. 2000, SWISSPROT-Zugangsnummern

P81624 und P81625). Die Funktionalität beider Proteine konnte durch den Nachweis der erfolgreichen Bindung von Palmitoyl-CoA an die jeweiligen Isoformen erbracht werden. Die Sequenzanalyse der analysierten Teilpeptide erbrachte ausgesprochen hohe Homologien zu anderen pflanzlichen ACBPs und selbst zu ACBPs weiter entfernt verwandter Spezies.

Zusätzlich zu den oben erwähnten pflanzlichen Sequenzen stehen nun auch weitere genomische bzw. für ACBPs kodierende cDNA-Sequenzen, so z.B. für Baumwolle, Mais, Reis, Ricinus und Ginseng, zur Verfügung.

Über die spezielle Rolle der ACBPs in Pflanzen ist im Gegensatz zum ausgiebig untersuchten tierischen System wenig bekannt, obwohl das Protein in relativ hohen Konzentrationen (0,1-0,2 % des Gesamtproteins) in pflanzlichen Geweben vorliegt. Die Fettsäuresynthese in den Plastiden ist zwar gut untersucht, der Mechanismus des Fettsäuretransportes vom Plastiden ins Cytosol und die Derivatisierung zu den jeweiligen Coenzym A-Estern jedoch ist weiterhin relativ unklar (OHLROGGE und BROWSE 1995). Langkettige Acyl-CoA-Ester werden bei der Synthese von Speicherlipiden bzw. Phospholipiden schrittweise an Glycerol-3-Phosphat gebunden (*Kennedy pathway*: Ohlrogge und Browse 1995). Es konnte durch Bindungsstudien gezeigt werden, daß ACBP offensichtlich in der Lage ist, Acyl-CoA-Ester gezielt der Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase, dem ersten Enzym im *Kennedy pathway*, zur Verfügung zu stellen (BROWN et al. 1998) sowie die Thioester vor Abbau durch die Thioesterase zu schützen (ENGESETH et al. 1996).

#### 2.3. Lokalisierung und Regulation der Expression der ACBP-Isoformen

#### 2.3.1. Distribution des Proteins

ACBP wurde als ubiquitär vorkommendes Protein in allen bisher untersuchten Eukaryoten sowie eukaryotischer Hefe nachgewiesen (KRAGELUND et al. 1996). Im tierischen/menschlichen Organismus wurde es in einer Vielfalt von Organen und Geweben aufgefunden. Ursprünglich wurde das Protein aus der Leber gewonnen, wo es auch in der höchsten intrazellulären Konzentration vorkommt (BOVOLIN et al. 1990). Des weiteren wurde es durch immunohistochemische Methoden in hohen Konzentrationen im ZNS in spezialisierten Gehirnzellen sowie verschiedenen Tumoren nachgewiesen. Peripher war es vor allem in steroidproduzierenden Zellen der Nebennierenrinde bzw. der Geschlechtsorgane nachweisbar (ALHO et al. 1991). In Drosophila melanogaster wurde die ACBP-Expression vor allem in Geweben mit hohem Energieumsatz oder Fettsäuremetabolismus nachgewiesen (KOLMER et al. 1994). In Pflanzen stellt die ACBP-Familie offensichtlich eine in fast allen untersuchten Geweben ubiquitär exprimierte Proteinfamilie dar, wobei differentiell exprimierte Isoformen nicht auszuschließen sind. Ein Zusammenhang der ACBP-Expression mit gewebespezifisch erhöhtem Lipidstoffwechsel konnte zumindest für Brassica napus L. nicht nachgewiesen werden (BROWN et al. 1998).

Obwohl das ACBP ebenso wie auch der Hauptanteil der Acyl-CoAs (ca. 80 %) im Cytosol vorliegt, konnten sowohl das Bindungsprotein als auch seine Liganden, die Acyl-CoAs, immunohistochemisch bzw. durch fraktionierte Zellaufarbeitung im Nukleus von Leberzellen der Ratte nachgewiesen werden, was eine Bedeutung des Proteins für regulatorische Prozesse im Zellkern nahelegte (ELHOLM et al. 2000).

#### 2.3.2. Genomische Organisation und Promotorstrukturen

Das ubiquitäre Vorkommen und der hohe Konservierungsgrad der ACBP-Proteinfamilie über alle untersuchten eukaryotischen Organismen hinweg legten die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um housekeeping proteins handelt. Dies wurde durch genomische Untersuchungen der ACBP-Gene und Pseudogene der Ratte bestätigt (MANDRUP et al. 1992). Dabei konnte für dieses von vier Introns strukturierte Gen die für housekeeping genes typische Abwesenheit einer klassischen TATA-Box im Promotor (DYNAN 1986) ebenso wie das Vorhandensein einer CpG-Insel im 5'-untranslatierten Bereich des Gens festgestellt werden. Diese Regionen mit abnorm hohem Anteil an C und G wurden in allen bisher untersuchten housekeeping genes und einigen gewebespezifischen Genen aufgefunden, während die Kombination aus fehlender TATA-Box und vorhandenen CpG-Inseln auf housekeeping genes beschränkt zu sein scheint (GARDINER-GARDEN und FROMMER 1987). Diese Ergebnisse wurden durch die Untersuchung des entsprechenden menschlichen Gens bestätigt. Auch hier konnte das Fehlen der klassischen TATA-Box sowie das Vorhandensein einer CpG-Insel im 5'-Promotorbereich des Gens festgestellt werden (SWINNEN et al. 1996).

Während die Untersuchungen des ACBP-Gens im Genom der Ratte und des Menschen also die klassischen Merkmale eines *housekeeping genes* sowie potentielle Bindungsstellen für den Peroxisomenproliferator (*peroxisome proliferator responsive element* (PPRE)) sowie ein Sterol-regulatorisches Element (*sterol regulatory element* (SRE)) als mögliche Transkriptionsregulatoren ergaben (ELHOLM et al. 1996, SWINNEN et al. 1998), konnte im Promotor des *Drosophila melanogaster*-Gens keine CpG-Insel identifiziert werden, was auf eine eher gewebespezifische Expression hindeutete (KOLMER et al. 1994). Die Sequenzierung möglicher *cis-acting elements* im Promotor des Ratten-ACBP-Gens wies jedoch schon bei diesem Organismus auf eine mögliche zusätzliche gewebespezifische Regulation der Expression hin (MANDRUP et al. 1993).

Die Analyse des ACBP-Gens in Hefe ergab einige Ausnahmen, durch die sich dieses Gen von denen anderer bisher untersuchter Spezies unterschied. Es konnten z.B. keine Introns festgestellt werden. Der Promotor des Gens wies spezifische Elemente auf ( $\beta$ -Oxidationsbox, Inositolcholin-regulatorische Elemente), die eine Co-Regulation mit Enzymen des Fettsäurestoffwechsels vermuten lassen (ROSE et al. 1992). Der größte Unterschied zu anderen ACBP-Promotoren bestand jedoch im Vorhandensein von sowohl TATA-Box als auch CCAAT-Box, zwei Transkriptionselementen, die in anderen ACBP-Promotoren nicht vorhanden waren.

Die Promotoranalyse des für das membranständige ACBP aus *Arabidopsis thaliana* kodierenden Gens erbrachte hingegen die typischen Merkmale eines *housekeeping genes*, wie die Abwesenheit einer klassischen TATA-Box. Es konnten allerdings keine CpG-Inseln identifiziert werden. Ebensowenig konnten  $\beta$ -Oxidationsbox oder Inositolcholin-regulatorische Elemente aufgefunden werden, die wie z.B. in Hefe eine Co-Regulation des Gens mit Fettsäuresynthese bzw.  $\beta$ -Oxidation nahegelegt hätten (CHYE et al. 1999).

#### 2.3.3. Transkriptionelle Regulation

Als *housekeeping genes* werden ACBP-Gene erwartungsgemäß konstitutionell exprimiert. Vor allem in pflanzlichen Geweben konnte eine ubiquitäre Expression in fast allen untersuchten Geweben festgestellt werden. Trotzdem ließ sich für bestimmte ACBP-Isoformen eine differentielle bzw. streßregulierte Expression nachweisen. Die festgestellten Veränderungen im Transkript- oder Proteinlevel waren jedoch nur quantitativer Natur, also nur graduelle Verschiebungen im Transkriptionsmuster, nicht jedoch qualitativ eine komplette *up*- oder *down*-Regulation, da meist ein gewisses ständiges Grundlevel an ACBP unter allen gewählten Ausgangsbedingungen nachweisbar war.

So konnte für die Gesamt-ACBP-Expression in *Brassica napus* L. keine Gewebespezifität und kein Zusammenhang von Expression und erhöhtem Fettsäurestoffwechsel in den jeweiligen Geweben detektiert werden. Nach Aufschlüsselung der Gesamtexpression nach Isoformen konnte jedoch festgestellt werden, daß die Hauptform in fast allen Geweben, nicht jedoch in älteren Blättern vorkommt, während die anderen Isoformen in geringerem Maße in Embryo und Keimling nachgewiesen werden konnten (BROWN et al. 1998). Auch in der Embryonalentwicklung wurden nur geringfügige Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Embryonalstadien festgestellt. So konnte ein leichter Anstieg der ACBP-Gesamtexpression durch die gesamte Embryogenese hindurch detektiert werden, während die Expression im reifen, trockenen Samen kaum nachweisbar war. Dies war durch die in diesem Reifezustand ebenfalls zum Erliegen gekommene Speicherlipidsynthese erklärlich.

## 2.4. Weitere Proteine mit Acyl-CoA-bindenden Domänen und membranständige ACBPs

Durch Sequenzvergleich der bisher bekannten ACBPs läßt sich diese Proteinfamilie in mindestens vier Gruppen einteilen. Neben den bisher besprochenen *basic ACBPs* mit 86 bis 92 Aminosäuren, deren erster Vertreter **I-ACBP** aus Rinderleber isoliert wurde und die meist keine Cysteinreste in ihrer Sequenz aufweisen, gibt es weitere gewebespezifische Isoformen. (KRAGELUND et al. 1999a). Die Testis-spezifische Isoform **t-ACBP** bzw. *Endozepine-like* Protein (**ELP**) enthält im Gegensatz zu den *basic ACBPs* drei Cysteinreste in der Sequenz und wurde z.B. für die Organismen Maus, Ratte und Rind identifiziert (PUSCH et al. 1999). Diese Isoform ließ sich als weitverbreitet im tierischen System nachweisen, existiert jedoch offensichtlich nicht in Primaten bzw. im menschlichen Organismus (IVELL und BALVERS 2001). Eine dritte mögliche Gruppe ist eine gehirnspezifische ACBP-Isoform, **b-ACBP**, deren Vertreter nur einen Cysteinrest aufweisen. Diese b-ACBPs wurden z.B. für Frosch und Ente identifiziert (ROSE et al. 1994).

Bei der vierten Gruppierung der Einteilung nach Kragelund handelt es sich um weitaus längere Sequenzen von bis zu 530 Aminosäuren, die neben ihrer Acyl-CoAbindenden Domäne noch weitere Merkmale aufweisen, die sie als membranständige Proteine identifizieren. Diese **m-ACBPs** weisen meist mehrere Cysteinreste in ihrer Struktur auf und sind daher empfindlicher gegenüber oxidativen Kopplungen und kovalenten Bindungen über diese Cys-Reste. Sie wurden unter anderem für die Organismen Rind, Karpfen und Arabidopsis identifiziert (GRACEY et al. 1997, PUSCH et al. 1996, CHYE 1998).

Mit dem Transkriptionsfaktor FadR aus *Escherichia coli* wurde ein weiteres Protein gefunden, in dessen Sequenz eine Acyl-CoA-bindende Domäne festgestellt werden konnte (DIRUSSO et al. 1992) (siehe auch A.3.1.5.). So verhinderten die durch diese Domäne gebundenen Acyl-CoAs die Bindung des Transkriptionsfaktors an die jeweiligen Target-Promotoren und regulierten so die Expression bestimmter in den Fettsäurestoffwechsel involvierter Enzyme.

Da eine gezielte Freisetzung der Acyl-CoAs durch das Bindungsprotein ACBP an den jeweiligen Reaktionspartner bzw. Stoffwechselweg diskutiert wird, steht die Auffindung weiterer Proteine mit Acyl-CoA-bindenden Domänen, die als "Abnehmer" des ACBP-Transporters fungieren, zu erwarten.

#### 3. Fettsäurestoffwechsel

Um die Bedeutung und Funktion des ACBP zu verstehen, muß betrachtet werden, welche Rolle die Liganden dieses Proteins im Zellstoffwechsel spielen. Im folgenden soll auf Eigenschaften und Funktionen dieser Stoffklasse eingegangen werden und ihre Einbindung in Fettsäurestoffwechsel, Membranintegrität und Signaltransduktion in der Zelle näher erläutert werden. Die Gesamtheit des Grundstoffwechsels der Fettsäuren, von der Fettsäuresynthese bis zur  $\beta$ -Oxidation kann hier natürlich nur fragmentarisch gestreift werden.

#### 3.1. Acyl-CoAs und ihre Einbindung in den Zellstoffwechsel

Die Coenzym A-Thioester langkettiger aliphatischer Fettsäuren, im folgenden Acyl-CoAs genannt, stellen wichtige Intermediate sowohl in der Fettsäuresynthese als auch im Fettsäureabbau dar. Sie sind jedoch nicht nur passives Produkt oder Ausgangsstoff dieser Grundstoffwechselprozesse, sie übernehmen auch wichtige regulatorische Funktionen in Lipidmetabolismus und Genexpression. So wurden sie schon frühzeitig als die Schlüsselmoleküle in der Regulation der Fettsäuresynthese beschrieben. Unter anderem wurde ihre Interaktion mit Ionenkanälen, Ionenpumpen, transmembranären Transportsystemen und verschiedenen Enzymen nachgewiesen und ihr Einfluß auf Membranfusionen und Genexpression untersucht (FÆRGEMAN und KNUDSEN 1997).

#### 3.1.1. Physikalische Interaktionen der Acyl-CoAs mit Membranen

Wie bereits in A.1.2.3. dargestellt, handelt es sich bei den Acyl-CoAs um amphiphatische Moleküle mit dem Coenzym A-Rest als hydrophober Kopfgruppe einerseits und der aliphatischen Fettsäurekette als hydrophobem Gegenpol andererseits. Als oberflächenaktive Moleküle liegen sie nur in niedrigen Konzentrationen in echter Lösung vor, bei steigender Konzentration setzt Mizellbildung ein, wobei die Konzentration an freiem, in echter Lösung vorliegendem Acyl-CoA nach Erreichen dieser kritischen Mizellbildungskonzentration konstant bleibt. Diese kritische Mizellbildungskonzentration wurde mit physikalischen Methoden im Bereich von 30 bis 60  $\mu$ M bestimmt (POWELL et al. 1981), wobei unter physiologischen Bedingungen durchaus 70 bis 80  $\mu$ M erreicht werden können. Die intrazelluläre Konzentration an Acyl-CoAs lag jedoch bei bis zu 100  $\mu$ M (Leberzell-Cytosol) bzw. unter extremen Fütterungsbedingungen sogar 250  $\mu$ M (Leberzell-Mitochondrien), wobei unter normalen Bedingungen bis zu 80 % des Pools im Cytosol vorliegen (FÆRGEMAN und KNUDSEN 1997). Wie bereits zuvor dargestellt, dürfte die Konzentration an freiem Acyl-CoA jedoch kaum größer als 5 nM sein und somit Mizellbildung unter physiologischen Bedingungen im Cytosol nicht erfolgen (siehe A.1.2.5.).

Auf Grund ihrer Struktur können sich Acyl-CoAs in Phospholipid-Bilayer-Strukturen, also Biomembranen, einlagern. Ihre Partitionskonstante betrug dabei z.B. für Palmitoyl-CoA (16 C-Atome in der Seitenkette) 1,5 bis 5x10<sup>5</sup> l/mol (REQUERO et al. 1995b). Dieser Wert war fast ausschließlich von der Kettenlänge des Fettsäurerestes, weniger jedoch von der Struktur der hydrophilen Kopfgruppe abhängig, was die Orientierung des Moleküls mit der Fettsäure ins Innere des Bilayers und der Kopfgruppe an der Oberfläche der Membran nahelegte. Diese Einlagerung in Bilayer-Strukturen beeinflußte die Membranintegrität beträchtlich (BANHEGYI et al. 1996). So beschleunigte die Einlagerung von Palmitoyl-CoA die Degradation der untersuchten Membranen und erhöhte ihre Durchlässigkeit. Die Acyl-CoA-Ester stellten sich im Vergleich zu Fettsäuren und Lysophospholipiden als der stärkste Störeinfluß auf die Membranintegrität heraus (BOYLAN et al. 1994), später wurde diese Eigenschaft jedoch den Acylcarnitinen zugeordnet (REQUERO et al. 1995a). Die Einlagerung der Acyl-CoAs sowie ihr Transport zu den jeweiligen Membranen wurde durch Verwendung von fluoreszierenden Acyl-CoAs untersucht. Dabei wurde eine Involvierung der Fettsäuresynthetase postuliert, einem Enzym der Fettsäuresynthese, das seinerseits durch Acyl-CoAs reguliert wird.

Obwohl langkettige Acyl-CoAs auf Grund ihrer physikalischen Eigenschaften frei in mikrosomale Membranen diffundieren können, dürfte dieser Vorgang unter *in vivo*-Bedingungen kaum eine Rolle spielen, da die unspezifische und enzymatische Hydrolysierung dieser energiereichen Thioester zu schnell und effektiv verläuft. So waren mehr als die Hälfte aller eingelagerten Acyl-CoAs bereits während der ersten 50 min in der Membran hydrolysiert (JUGUELIN et al. 1991).

#### 3.1.2. Rolle der Acyl-CoAs in Membranfusion und Vesikeltransport

Membranfusion spielt eine zentrale Rolle in verschiedenen Zellfunktionen wie Endocytose, Zellteilung, vesikulärem Transport innerhalb der Zelle und Sekretion außerhalb der Zelle. Dabei sind Acyl-CoAs ein essentieller Bestandteil der Regulation des vesikulären Transportes sekretorischer Proteine vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat, wobei als Mechanismus Proteinacylierung postuliert wurde (PFANNER et al. 1990) (siehe A.3.4.).

#### 3.1.3. Rolle der Acyl-CoAs im Energiemetabolismus

Sowohl in intakten Mitochondrien als auch in mitochondrialen Partikeln konnte gezeigt werden, daß Acyl-CoAs spezifisch den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Energiemetabolismus – den Transport von ADP und ATP über die innere Mitochondrienmembran – hemmen. Das Ausmaß dieser Hemmung ist abhängig von der Kettenlänge des Acylrestes und wurde auf die Hemmung der mitochondrialen Adeninnukleotidtranslokase (ANT) zurückgeführt, wobei die Inhibitionskonzentration bei 1  $\mu$ M lag (SHUG et al. 1971, SHRAGO et al. 1995). Diese spezifische Interaktion

konnte durch Verwendung radioaktiv markierter Acyl-CoAs und boviner mitochondrialer ANT nachgewiesen werden (RUOHO et al. 1989).

Für die Glucokinase der Ratte konnte eine Hemmung durch Palmitoyl-CoA im mikromolaren Bereich aufgezeigt werden. Diese Interaktion war ebenfalls spezifisch für die Coenzym A-Ester langkettiger Fettsäuren, und weder freie Fettsäuren noch kurzkettige Acyl-CoAs lieferten einen ähnlichen Effekt (TIPPETT und NEET 1982). Der Gegenspieler der Glucokinase, die Glucose-6-Phosphatase, wurde ebenso von Acyl-CoAs reguliert und inhibiert wie die Pyruvatdehydrogenase (FULCERI et al. 1995, MOORE et al. 1992). Die physiologische Bedeutung der Regulation dieser beiden zentralen Enzyme durch langkettige Acyl-CoA-Ester ist noch nicht aufgeklärt, es wird jedoch hier ein Zusammenhang zwischen Acyl-CoA-Level und Glucoseaufnahme und -verwertung als Balance zwischen Kohlehydrat- und Fettsäurestoffwechsel postuliert. In Pflanzen, hier in *Brassica napus*, konnte ebenfalls eine Inhibierung des Glucose-6-Phosphat-Transporters und damit eine Reduktion der gesamten Fettsäuresynthese durch Acyl-CoAs festgestellt werden (Fox et al. 2000).

Im tierischen Organismus ist die Verwertung von Fettsäuren zu Acetyl-CoA durch  $\beta$ -Oxidation in den Mitochondrien die Hauptenergiequelle, wobei Intermediate dieser Reaktion eine Rolle in der Feedback-Regulation der  $\beta$ -Oxidation spielen. Kumulierte oxidierte Acyl-CoA-Intermediate inhibieren dabei den ersten enzymatischen Schritt dieses Stoffwechselweges durch Hemmung der Acyl-CoA-Dehydrogenase bereits im nanomolaren Bereich (POWELL et al. 1987).

3.1.4. Rolle der Acyl-CoAs in der Lipidsynthese

Langkettige Acyl-CoA-Ester inhibieren die Acetyl-CoA-Carboxylase, erstes Schlüsselenzym der Lipidbiosynthese, bereits im einstelligen nanomolaren Konzentrationsbereich, wobei eine Kettenlänge von 16 bis 20 C-Atomen die effektivste Hemmung ermöglicht (NIKAWA et al. 1979). Dies erfolgt sowohl durch direkte Interaktion mit dem Enzym als auch durch Aktivierung einer Kinase-Kaskade durch Acyl-CoAs, die dann ihrerseits die Acetyl-CoA-Carboxylase hemmt (CARLING et al. 1987).

Die Regulation des Lipidhaushaltes durch Acyl-CoAs ist auch noch auf anderen Ebenen denkbar. So wurde ein Einfluß auf die Syntheserate durch Hemmung verschiedener Transportersysteme, die Acetyl-CoA bzw. NADPH bereitstellen, postuliert (HALPERIN et al. 1972).

#### 3.1.5. Rolle der Acyl-CoAs in der zellulären Signaltransduktion/Genexpression

Für *Escherichia coli* wurde die *fad*-Genfamilie aufgeklärt, deren Translationsprodukte in den Fettsäuremetabolismus involviert sind. *fadR* kodiert dabei für den Transkriptionsfaktor FadR, der die Expression dieser Genfamilie koordiniert und seinerseits durch Acyl-CoAs reguliert wird. So wird die Bindung des Transkriptionsfaktors an die jeweiligen Promotor-Strukturen der *fad*-Gene spezifisch durch langkettige Acyl-CoAs, nicht jedoch durch kurzkettige Ester oder freie Fettsäuren, inhibiert (DIRUSSO et al. 1992). Diese Inhibition erfolgt für C16- bzw. C18-Acyl-CoAs bereits im einstelligen nanomolaren Konzentrationsbereich, ist also hochspezifisch. Die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor FadR wurde später auf dessen Acyl-CoA-bindende Domäne, die hohe Homologien mit den zuvor sequenzierten ACBPs aufwies, zurückgeführt (RAMAN und DIRUSSO 1995).

Eine Involvierung der Acyl-CoAs in die Expression bestimmter Gene des Lipidstoffwechsels wurde auch für Hefe nachgewiesen. Die Repression des *OLE1*-Gens, das für eine  $\Delta^9$ -Fettsäuredesaturase kodiert, ließ sich dabei auf die Anwesenheit oder Neusynthese von Acyl-CoAs zurückführen (MCDONOUGH et al. 1992). Dabei erwies sich die Anwesenheit von ACBP als essentiell für die Regulation dieses Gens, was die Schlußfolgerung nahelegte, daß die jeweiligen Coenzym A-Ester, nicht jedoch die freien Fettsäuren in diese Regulation einbezogen waren (CHOI et al. 1996).

Auch im tierischen System (hier: Ratte) wurde eine solche Interaktion von Acyl-CoAs und Genexpression festgestellt. So inhibierten langkettige Acyl-CoAs hochspezifisch die Bindung von Trijodthyronin an seinen Rezeptor im Zellkern (mit einer wirksamen Konzentration im nanomolaren Bereich) und unterbrachen so dessen Transkriptionsinduzierenden Effekt auf Gene, die für lipogene Enzyme und generell in die Lipidsynthese involvierte Proteine kodieren (LI et al. 1990, CLARKE und JUMP 1993). Eine Zusammenfassung aller bisher aufgefundener Interaktionen von Acyl-CoAs und spezifischer Genexpression wurde von Black et al. auf den neuesten Stand gebracht (BLACK et al. 2000b).

3.1.6. Rolle der Acyl-CoAs in der Regulation von Ionenkanälen

Die Glucose-induzierte Insulinsekretion wurde auf einen Influx von  $Ca^{2+}$  in die  $\beta$ -Zellen des Pankreas zurückgeführt. Der hemmende Einfluß des ACBP auf diese Insulinsekretion (siehe A.1.4.2.) könnte auf einer Regulation des  $Ca^{2+}$ -Haushaltes durch Acyl-CoAs beruhen. So wurde deren Fähigkeit, im nanomolaren Konzentrationsbereich den  $Ca^{2+}$ -Uptake zu erhöhen, ihn jedoch bei höheren Konzentrationen zu senken, an isolierten Muskelzellen festgestellt (RYS-SIKORA et al. 1994), während ihr Einfluß auf  $\beta$ -Zellen des Pankreas generell in einer Senkung des  $Ca^{2+}$ -Spiegels zu sehen ist (DEENEY et al. 1992). Eine weitere Ursache der Hemmung der Insulinsekretion durch Acyl-CoAs wurde in der durch Acyl-CoAs hervorgerufenen Daueröffnung von K<sup>+</sup>-Kanälen der  $\beta$ -Zellen gesehen, wodurch diese insensitiv gegenüber Glucose wurden. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die durch eine langfristig erhöhte Fettaufnahme hervorgerufene Störung des Insulinstoffwechsels (LARSSON et al. 1996).

Neben der Involvierung in den Insulinstoffwechsel wurde die Involvierung der Acyl-CoAs auch beim Ca<sup>2+</sup>-Release durch den Ryanodin-sensitiven Ca<sup>2+</sup>-Kanal des Skelettmuskels der Ratte aufgezeigt (FULCERI et al. 1997), wobei eine direkte Interaktion der Ester mit dem Ionenkanal postuliert wurde.

#### **3.2.** Weitere Lipid-bindende Proteine

Die Tatsache, daß ACBP ursprünglich als Verunreinigung einer Aufarbeitung des bovinen Fettsäure-bindenden Proteins (FABP) aufgefunden wurde (MOGENSEN et al. 1987), zeigt bereits, daß es noch weitere Proteine zur Bindung lipider Zellbestandteile gibt. Da ACBP ein hochspezifisches Bindungsprotein für Acyl-CoA-Thioester darstellt, welches andere, nicht-aliphatische CoA-Ester sowie freie Fettsäuren nur in unbedeutendem Maße bindet, ist die Existenz von weiteren Bindungsproteinen für diese Stoffklassen erklärlich. So wurden in verschiedenen höheren Pflanzen Lipid-Transferproteine (LTPs) identifiziert, die den Transport von Lipiden zwischen den intrazellulären Membranen übernehmen (YAMADA 1992). Die unspezifischen LTPs sind innerhalb des Pflanzenreiches relativ hochkonserviert und sind wie die ACBPs kleine cytosolische Proteine von ca. 10 kDa Größe (TAKISHIMA et al. 1988). Durch eine flexible Bindungsdomäne sind sie in der Lage, sowohl Phospholipide und Glycolipide als auch Fettsäuren und Fettsäure-CoA-Ester zu binden. Dabei liegt die Dissoziationskonstante des unspezifischen LTPs aus Gerste für z.B. Palmitoyl-CoA bei ca. 1  $\mu$ M und für die entsprechende freie Fettsäuren bei 100  $\mu$ M (LERCHE et al. 1997). Die Bindungsaffinität des LTPs zu Acyl-CoAs ist also um einige Zehnerpotenzen geringer als die des ACBPs mit Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich.

Als spezifischeres Bindungsprotein für Fettsäuren weist das cytosolische Fettsäurebindende Protein (FABP) eine ungefähre Dissoziationskonstante von 1 µM zu verschiedenen langkettigen Fettsäuren auf, ist also wesentlich spezifischer als die oben erwähnten LTPs (RICHIERI et al. 1992). Dieser Proteinfamilie wurde eine ähnliche regulatorische Funktion im Fettsäure-Haushalt der Zelle wie den ACBPs bei der Regulation der Acyl-CoA-Konzentrationen zugeschrieben, obwohl die relativ Dissoziationskonstante keine effektive hohe von 1 µM Pufferung der Fettsäurekonzentrationen vermuten läßt. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Bindung von Acyl-CoAs an FABP gefunden, wobei die Dissoziationskonstante wiederum um 3 bis 4 Zehnerpotenzen über der des ACBPs lag (FÆRGEMAN und KNUDSEN 1997).

Für die Glutathion S-Transferase (GST), ein multifunktionelles Entgiftungsenzym, das Glutathion auf Xenobiotika überträgt, wurden Dissoziationskonstanten für verschiedene Coenzym A-Ester im Bereich von 0,2 bis 5  $\mu$ M festgestellt. Diese Proteinklasse ist auch zur eher unspezifischen Bindung anderer lipider Zellbestandteile befähigt (SILVA et al. 1999). Selbstverständlich haben alle Enzyme, die CoA-Ester oder Fettsäuren modifizieren oder übertragen bzw. durch sie reguliert werden, Bindungsstellen für diese Moleküle. So wurde z.B. eine effektive Fettsäure-Bindungsstelle in der Sequenz der Fettsäure-CoA-Synthetase identifiziert (BLACK et al. 2000a), während die für die Carnitin-Palmitoyl-Transferase festgestellte Acyl-CoA-Bindungsstelle Dissoziationskonstanten im Bereich von 2-20  $\mu$ M für langkettige Fettsäure-CoA-Ester aufwies (ABO-HASHEMA et al. 2001). Im tierischen bzw. menschlichen System stellt das Albumin den Haupttransporter für Fettsäuren und ihre Ester im Serum dar.

#### 3.3. Proteinacylierung

Da Signalpeptide und Rezeptoren häufig durch Lipidmodifikationen spezifisch in der Zellmembran verankert werden, um dort ihre Funktion zu erfüllen, kommt der Proteinacylierung eine wichtige Rolle in der Regulation dieser Proteine und der von ihnen gesteuerten Prozesse zu. Es soll hier nur kurz auf Mechanismus und Bedeutung dieser Modifikation, die von der Übertragung von Acyl-CoAs auf spezifische Aminosäuren der zu acylierenden Proteine abhängig ist, eingegangen werden. Die gesamte Bandbreite an Erkenntnissen dazu ist im Review von Dunphy und Linder zusammengefaßt (DUNPHY und LINDER 1998).

#### 3.3.1. Mechanismus der Proteinacylierung

Die kovalente Kopplung von hydrophoben Molekülen an Proteine ist eine im eukaryotischen System weitverbreitete Modifikation, wobei meist Fettsäuren oder Isoprenoide übertragen werden. Die so modifizierten Peptide können über diese hydrophobe Seitenkette in Zellmembranen integriert werden, mit dem Cytoskelett assoziieren oder mit dem Zellkern interagieren. Die kovalente Bindung von Fettsäuren an Proteine erfolgt entweder über eine Amidbindung (N-Acylierung) durch die N-Myristoyltransferase oder aber über eine Thioesterbindung (S-Acylierung). Erstere erfaßt ausschließlich den Amino-terminalen Glycinrest des Proteins und ist hochspezifisch für Myristyl- (C14:0) und Lauryl-Reste (C12:0) sowie deren ungesättigte Derivate (JOHNSON et al 1994) (zur Nomenklatur der Fettsäuren siehe B.6.3.2.). Die S-Acylierung hingegen ist für Cysteinreste über die gesamte Sequenz hinweg möglich, wobei meist ein Palmitoyl-Rest (C16:0) übertragen wird. Weitere Modifikationen, die über diese Thioesterbindung möglich sind, bestehen in der Übertragung weiterer Fettsäurereste (Myristinsäure (C14:0), Stearinsäure (C18:0), Arachidonsäure (C20:3)) sowie Isoprenoiden wie Farnesyl- oder Geranylresten (VANCOTT et al. 1997, ZHANG und CASEY 1996). Die S-Acylierung ist reversibel und dient der Regulation der hier modifizierten Proteine, die meist transmembranäre oder an der inneren Membranoberfläche verankerte Membranproteine darstellen, während N-acylierte Proteine fast ausschließlich entweder konstant an der inneren Oberfläche von Membranen verankert sind oder cytosolisch vorliegen.

Eine einzelne Myristylgruppe stellt die vorübergehende Einbindung des Proteins in Liposomen sicher, während Proteine mit zusätzlichen Myristyl- oder Farnesylgruppen leicht zwischen Lipidvesikeln bewegt und ausgetauscht werden können. Eine Palmitoylgruppe hingegen vermittelt eine stabilere Einbindung in Membranstrukturen und stellt im Zusammenwirken mit einer Myristylgruppe sogar die permanente Verankerung des Proteins in der Membran sicher (PEITZSCH und MCLAUGHLIN 1993).

#### 3.3.2. Signalfunktionen acylierter Proteine

Die Palmitoylierung (S-Acylierung) eines Proteins bestimmt die Membranständigkeit eines ansonsten cytoplasmatischen Proteins und somit seine Funktion innerhalb des Membrankomplexes. Die so verankerten Proteine sind oft in Signalkaskaden involviert und können an der Membran selbst als Signalüberträger oder aber als Bindungsprotein für cytoplasmatische Signalmoleküle dienen. So sind die meisten  $\alpha$ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteinfamilie S-acyliert (MUMBY 1997). Als weitere in Signalkaskaden involvierte acylierte Proteine sind sowohl Vertreter der Familie der Tyrosinkinasen als auch Ras-Proteine,  $\alpha$ -Kinase-Ankerproteine und verschiedene neuronale Signalproteine identifiziert worden (RESH 1996).

Die Regulation der Funktion acylierter Membranproteine wurde im *kinetic membrane trapping*-Modell untersucht (SHAHINIAN und SILVIUS 1995). Dabei wurde festgestellt, daß ein einfach myristyliertes Peptid noch ausreichend hydrophil war, um durch das Cytosol zur Membran zu gelangen, wo es durch Übertragung eines Palmitoylrestes durch eine membranständige Acyltransferase permanent in die Membran integriert werden konnte. Wurden durch Mutationen entweder die Myristylierungsposition oder die Palmitoylierungssequenz verändert, war das Protein wirkungslos. Dies konnte sowohl für Ras-Proteine als auch für verschiedene Tyrosinkinasen verifiziert werden. Im Gegensatz zu anderen Lipidmodifikationen ist besonders die Palmitoylierung unter dem regulierenden Einfluß von ACBP zu sehen. ACBP stellt offensichtlich gezielt Palmitoyl-CoA für die membranständige Acyltransferase zur Verfügung. Es inhibiert auch die unspezifische nicht-enzymatische Acylierung von Proteinen in einem Ausmaß, das diese unter *in vivo*-Bedingungen keine Rolle zu spielen scheint (LEVENTIS et al. 1997). ACBP spielt damit eine Schlüsselrolle in der Proteinpalmitoylierung, die ihrerseits entscheidenden Einfluß auf Funktion und Lokalisierung von Signalpeptiden in der Zelle hat. Es konnte festgestellt werden, daß die enzymatische Proteinacylierung durch die Protein-S-Acyltransferase trotz Bindung des vorhandenen Palmitoyl-CoAs an ACBP fast unbeeinflußt verlief, während die unspezifische, nicht-enzymatische Acylierung durch die Anwesenheit von ACBP vollständig unterdrückt wurde (DUNPHY et al. 2000).

#### 4. Der Biosensor-Test

Der in dieser Arbeit vorgestellte und in der Arbeitsgruppe Prof. Knudsens, Universität Odense, entwickelte Biosensor-Test dient der Bestimmung von Dissoziationskonstanten verschiedener ACBP-Isoformen gegenüber einem weiten Spektrum an möglichen Liganden bekannter Konzentration. Natürlich läßt sich der Test auch zur Bestimmung von Ligandenkonzentrationen anwenden, sobald die Dissoziationskonstanten des Biosensor-Proteins diesen Liganden gegenüber bekannt ist. Im folgenden soll der Test hinsichtlich der Bestimmung von Dissoziationskonstanten vorgestellt werden.

#### 4.1. Bisherige Methoden zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten (k D)

Die Ligandenbindung verschiedener ACBP-Spezies konnte bisher durch folgende Methoden untersucht werden:

- Lipidex 1000 *competition assay*: Hierbei konkurrieren verschiedene putative Liganden mit radioaktivem Acyl-CoA bekannter Konzentration um die Bindungsstelle des ACBP, wonach ungebundener markierter Ligand durch Bindung an die Lipidex 1000-Matrix entfernt und vermessen wird. Es ist dabei nur eine semiquantitative bzw. sogar nur qualitative Aussage möglich, wobei die mögliche Affinität potentieller Liganden zum Lipidex 1000 selbst ein zusätzliches Problem darstellt (ROSENDAL et al. 1993).
- Isotherme Mikrokalorimetrie: Titrationsmethode, bei der das ACBP mit einer Ligandenlösung bekannter Konzentration bei konstanter Temperatur titriert wird. Dabei wird eine Isotherme der Reaktion aufgenommen und nach Integration der Werte eine Titrationskurve ähnlich einer pH-Titration erstellt (WISEMAN et al. 1989). Damit konnten Bindungs- bzw. Dissoziationskonstanten relativ genau bestimmt werden. Nachteil der Methode war ihre relativ hohe Störanfälligkeit und Materialaufwand. So wurde Titration ACBP ihr hoher pro im Konzentrationsbereich von 20-30 µM benötigt. Des weiteren sind nur Dissoziationskonstanten innerhalb gewisser Grenzwerte bestimmbar. Wird die Affinität des Proteins zum Liganden zu groß, die Dissoziationskonstante also zu klein, lassen sich keine verläßlichen Werte mehr reproduzieren. Es muß dann wie z.B. bei der Titration von Palmitoyl-CoA eine indirekte Titration durchgeführt werden (RASMUSSEN et al. 1994, FÆRGEMAN et al. 1996).

Steady-State Fluoreszenzspektroskopie: Titrationsmethode, bei der das ACBP mit einer Lösung fluoreszierender Acyl-CoA-Derivate titriert wird. Diese in wäßriger Lösung kaum fluoreszierenden Derivate erreichen in der hydrophoben Bindungsregion maximale des Proteins ihre Emission. wobei die Fluoreszenzintensität als Maß für den Bindungszustand des Proteins bei jeweiliger Ligandenkonzentration genutzt wird. Vorteil der Methode ist ein weitaus geringerer Materialaufwand pro Titration (nur 1-10% der für die Mikrokaloriemetrie benötigten Proteinmenge) (SCHROEDER et al. 1995, FROLOV und SCHROEDER 1998). Der Nachteil besteht in der Verwendung chemisch Acyl-CoA-Derivate, die nicht unbedingt den modifizierter natürlich vorkommenden Strukturen entsprechen. Obwohl die chemische Struktur der Derivate zum Beispiel der des Stearyl-CoAs ähnelte, muß doch von gewissen Abweichungen im Bindungsverhalten ausgegangen werden. Weiterhin ist das Spektrum an möglichen Liganden, die mit dieser Methode untersucht werden können, sehr begrenzt, da die Methode auf fluoreszierende Liganden angewiesen ist.

Die Auflistung dieser Methoden zeigt die Probleme bei der Bestimmung von ACBP-Acyl-CoA-Dissoziationskonstanten auf. Einerseits sind durch Verwendung fluoreszierender Acyl-CoA-Derivate sehr genaue  $k_D$ -Werte bestimmbar, die Methode ist jedoch auf fluoreszierende Liganden angewiesen und kann nicht allgemein für die  $k_D$ -Bestimmung unterschiedlichster Liganden genutzt werden. Die Mikrokalorimetrie erlaubt die Untersuchung unterschiedlichster Liganden, jedoch nur bis zu einer bestimmten Kettenlänge. Wird die Affinität des Liganden zum Protein zu groß (ab ca. 16 C-Atomen in der Seitenkette), ergibt diese Methode keine direkt auswertbaren Ergebnisse mehr.

Da die  $k_D$ -Werte für längerkettige Liganden durchaus im einstelligen nanomolaren Bereich liegen können, mußte für ihre Bestimmung eine sowohl sehr versatile und für verschiedenste Liganden anwendbare als auch bei sehr geringen  $k_D$ -Werten noch immer hinreichend genaue Methode gefunden werden. Für diese Aufgabenstellung wurde in der Arbeitsgruppe Prof. Knudsens in Odense, Dänemark, der Biosensor-Test entwickelt, der im folgenden vorgestellt werden soll. Vorläufige Erkenntnisse zu diesem Test wurden vor kurzem veröffentlicht (WADUM et al. 2002), die folgenden Angaben beziehen sich jedoch meist auf persönliche Kommunikation mit Prof. Knudsen und seinen Mitarbeitern. Das Biosensor-Protein ist patentrechtlich geschützt.

#### 4.2. Das Biosensor-Protein

Bei dem hier verwendeten Biosensor handelte es sich um ein modifiziertes rekombinantes bovines ACBP, das in der Arbeitsgruppe Prof. Knudsens, Universität Odense, entwickelt wurde. Dabei wurde durch gerichtete Mutagenese die Aminosäure in Position 24 (Methionin) gegen ein Cystein ausgetauscht, welches über die freie SH-Gruppe mit einem fluoreszierenden Agens kovalent gekoppelt wurde. Das so generierte mutierte Protein war nach wie vor zur Bindung von Acyl-CoA-Estern befähigt, zeigte jedoch eine verstärkte Fluoreszenz nach Bindung eines Liganden. Dies beruhte auf einer geringfügigen Konformationsänderung des Proteins nach Bindung eines Liganden, wodurch das zuvor geschützt im Inneren der Proteinstruktur gelegene fluoreszierende Agens an der Proteinoberfläche exponiert wurde und durch den Kontakt mit dem Lösungsmittel zur Fluoreszenz angeregt wurde. Nach Anregung

des fluoreszierenden Proteins bei 390 nm konnte die gemessene Emissionsintensität bei 460 nm als ein Maß für das Verhältnis aus freiem und gebundenem Biosensor ausgewertet werden.

#### 4.3. in vitro-Bindungstest

Der Biosensor-Test zur Ermittlung von ACBP-Dissoziationskonstanten bestand in einer Gleichgewichtsreaktion, bei der die Bindungsstellen des Biosensor-Proteins und die des zu bestimmenden ACBPs um die Bindung der in Lösung befindlichen Liganden konkurrierten. Die gemessene Fluoreszenzintensität war dabei von der Konzentration an freiem Ligand in Lösung abhängig, welche ihrerseits von der Affinität des zu untersuchenden ACBPs zu diesem Liganden abhing. Die Durchführung dieses Testes ist in B.6.1. näher erläutert.

Durch Ermittlung der Dissoziationskonstanten für das Biosensor-Protein selbst kann die semiquantitative Aussage des Testes in eine vollständige quantitative Analyse überführt werden. Die mathematischen Grundlagen dazu sind in B.6.2. dargestellt.

Dieser Test ist für alle Liganden unabhängig von ihrer Struktur anwendbar, solange sie eine meßbare Affinität zum Biosensor haben. Da es sich bei diesem Biosensor selbst um ein ACBP handelt, wird damit das gesamte Spektrum an möglichen Liganden abgedeckt. Dieser Test ist jedoch nicht nur für die Ermittlung von k<sub>D</sub>-Werten von ACBP-Isoformen anwendbar, er ermöglicht auch die Bestimmung von Acyl-CoA-Konzentrationen in Lösung. Dies könnte auch einen Lösungsansatz für das bisher nur ungenügend geklärte Problem der *in vitro*-Konzentrationsbestimmung von Acyl-CoA-Thioestern in Zell-Lysaten und anderen biologischen Materialien darstellen. Bisher wurden diese Ester entweder über eine enzymatische Bestimmung des Coenzym A-Anteils oder über eine HPLC-Aufreinigung der Proben und Messung der einzelnen Komponenten bestimmt. Während die HPLC-Bestimmung einen sehr hohen Material- und Zeitaufwand bedeutete, lieferte die enzymatische Methode nur ungenaue Ergebnisse. Untersuchungen ergaben, daß mit dieser Methode die Konzentration an Acyl-CoAs um ca. das Doppelte überhöht bestimmt wurde (BÆKDAL et al. 1996).

Der Biosensor-Test sollte nun erstmals auf seine Eignung zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten für ACBP-Isoformen überprüft werden. Die hier vorgestellten ersten grundlegenden Untersuchungen sollten Aufschluß darüber geben, inwieweit dieser Test herkömmliche Verfahren ersetzen kann. Eine genaue Beschreibung der Vorgehensweise ist im Methodenteil angefügt.

Da der Test sich noch immer in der Entwicklungsphase befindet, also ständig optimiert und den neuesten Erkenntnissen angepaßt wird, können die hier vorgestellten Vorgehensweisen und Ergebnisse nur vorläufigen Charakter haben.

#### 5. Zielstellung der Arbeit

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, einen genaueren Einblick in die genomische Organisation, Regulation und Substratspezifität der ACBP-Familie im pflanzlichen System zu gewinnen, da dies im Gegensatz zum gut untersuchten menschlichen bzw. tierischen System noch kaum untersucht war. Als zu untersuchender Organismus sollte dabei *Digitalis lanata* dienen.

Ausgehend von der nativen Isolierung zweier leicht unterschiedlicher ACBP-Proteine aus PEMs von *Digitalis lanata* durch Dr. Martin Metzner sollte untersucht werden, wie sich die Varianz in der ACBP-Familie in diesem System auf cDNA-Ebene darstellte.

Dazu sollten cDNA-Sequenzen eventuell differentiell exprimierter Isoformen aufgefunden und deren Expressionsmuster unter sowohl physiologischen als auch Streßbedingungen untersucht werden.

Um Erkenntnisse zur genomischen Organisation der ACBP-Genfamilie in *Digitalis lanata* zu gewinnen, sollte durch verschiedene Methoden sowohl die Anzahl ACBPhomologer Kopien im Genom ermittelt werden als auch eventuelle regulatorische Elemente der entsprechenden Gene aufgefunden werden.

Neben der Aufklärung dieser Gen-Familie auf DNA- bzw. RNA-Ebene sollte vor allem auf die Ligandenbindung der korrespondierenden Proteine eingegangen werden. Mit der Entwicklung eines effizienten *in vitro*-Bindungstestes in der Arbeitsgruppe um Prof. Knudsen (Universität Odense, Dänemark) stand erstmals eine Methode zur Verfügung, mit geringem Aufwand an rekombinantem Protein und Bindungspartner Dissoziationskonstanten verschiedenster ACBP-Wildtypen und -Mutanten mit einem weiten Spektrum an Liganden zu ermitteln und so Rückschlüsse auf die Substratspezifität der jeweiligen Proteine zu erhalten. In Zusammenarbeit mit dieser Arbeitsgruppe sollte dieser Biosensor-Test erstmals zur Ermittlung von Dissoziationskonstanten eingesetzt werden.

Auf Grund von Voruntersuchungen, die am Molekularbiologischen Institut der Universität Odense durchgeführt wurden, war zu vermuten, daß sich eventuelle Isoformen der ACBP-Familie in *Digitalis lanata* durch ihre unterschiedliche Bindungsspezifität zu gesättigten und ungesättigten Liganden unterscheiden (KNUDSEN, persönliche Kommunikation). Es sollte daher durch gerichtete Mutation der Wildtyp-Proteine der Einfluß bestimmter Aminosäurepositionen auf die Bindungsspezifität der ACBPs untersucht werden.

Da die hier untersuchte Proteinfamilie der ACBPs sowohl in grundlegende Zellfunktionen wie dem Fettsäurestoffwechsel als auch in spezifische, streng regulierte Prozesse wie der gerichteten Proteinacylation und Regulation bestimmter Transkriptionsfaktoren involviert ist, kann eine weitere Einsicht in die Funktion und Spezifität dieser Proteine zum besseren Verständnis des Fettsäure- und Steroidstoffwechsels in *Digitalis lanata* EHRH. dienen.

#### **B.** Methoden

#### 1. Auffindung von cDNA-Sequenzen

Ausgangspunkt dieser Arbeit war ein PCR-Fragment, das einen Teil der kodierenden Sequenz eines putativen ACBP-Genes aus *Digitalis lanata* darstellte. Dieses PCR-Fragment von 170 bp Größe, das von Dr. Martin Metzner generiert und sequenziert wurde (METZNER, persönliche Kommunikation), sollte nun als Sonde verwendet werden, um in einer cDNA-Bank von *Digitalis lanata* nach der vollständigen kodierenden Sequenz des Genes (und eventuellen Isoformen) zu suchen. Im folgenden werden die Schritte zur Auffindung dieser vollständigen cDNA-Sequenzen dargestellt.

#### **1.1. Präparation der Sonde**

#### 1.1.1. Midiprep zur Gewinnung von Plasmid-DNA

Das verwendete PCR-Fragment lag hier als Insert im pCR2.1-Vektor (Invitrogen) vor, der in ebenfalls von Invitrogen bereitgestellten One shot TOP10-*E. Coli*-Zellen vermehrt wurde. Dazu wurde eine Kolonie der dieses Konstrukt enthaltenden Zellen in 50 ml LB-Medium (50  $\mu$ l/ml Ampicillin) über Nacht bei 37°C und 140 U/min inkubiert. Die Zellsuspension wurde entsprechend der Vorschrift zum Plasmid Midi Prep (Qiagen) prozessiert. Die nach der Säulenreinigung und erfolgter Isopropanol-Fällung erhaltene DNA wurde vakuumgetrocknet (Speed vac, Servant), in 100  $\mu$ l <sup>1</sup>/<sub>2</sub> TE-Puffer aufgenommen und bei 260 nm spektrophotometrisch vermessen (Gene Quant II, Pharmacia). Der Konzentrationsbestimmung wurde ein Extinktionskoeffizient für doppelsträngige DNA von 50  $\mu$ g/ $\mu$ l<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> zugrunde gelegt.

#### 1.1.2. Restriktion und Gel-Elution des PCR-Fragments

Der hier verwendete pCR2.1-Vektor der Firma Invitrogen bot in seiner *multi cloning* site eine Auswahl an Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme, die zum Ausschneiden des einklonierten Inserts verwendet werden konnten. In dieser Arbeit wurde die Kombination der Restriktionsenzyme KpnI und XbaI verwendet, da beide relativ dicht an der Klonierungsstelle schneiden und somit nur wenig Vektor-DNA am Insert belassen. Voraussetzung zur Auswahl der Enzyme war die Abwesenheit von möglichen Schnittstellen dieser Enzyme im Insert selbst. Der für die Restriktion verwendete Ansatz entsprach ca. 2 µg Plasmid-DNA und jeweils 1 U der Restriktionsenzyme und ihrer vom Hersteller empfohlenen Puffer (allgemeine Vorschrift nach SAMBROOK et al. 1989). Nach einer Inkubation bei 37°C für eine Stunde wurde der Ansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde eine einprozentige Agarose-Lösung (in TAE-Puffer) mit 0,5 µg/mg Ethidiumbromid versetzt und in die Gelapparatur ausgegossen. Den aufzutrennenden Proben wurde 2 µl Stoppuffer (200 mM EDTA, 0,2 % Bromphenolblau, 50 % Glycerol) zugesetzt, um den Auftrennungsprozess optisch verfolgen zu können. Zur Abschätzung der Bandengröße wurde parallel dazu ein 100 bp-Marker (Pharmacia) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 60 V, bis die Bromphenol-Bande, die einer Basenpaar-Größe von ca. 300 bp entspricht, <sup>3</sup>/<sub>4</sub> der Laufstrecke zurückgelegt hatte. Die erhaltenen Banden wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht bei 312 nm (Transilluminator TC-312 A/F, Spectronics) detektiert, zur Dokumentation fotografiert (Sofortbildkamera
Polaroid MP4, Polaroid) und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Elution aus dem Gel erfolgte nach der Vorschrift des Qiaex II-Kits (Qiagen). Die gereinigte DNA wurde in 20  $\mu$ l Wasser aufgenommen und stand danach weiteren Anwendungen zur Verfügung.

# 1.1.3. Markierung der Sonde

Die radioaktive Markierung der Sonde durch Einbau von  $[\alpha^{-32}P]$ -dATP erfolgte entsprechend der Vorschrift des High Prime DNA-Labelling Kits (Boehringer-Mannheim). Dazu wurden 4 µl eluiertes Insert (siehe B.1.1.2.) mit 5 µl  $[\alpha^{-32}P]$ -dATP 3000 Ci/mmol (NEN) und dem Reaktionsmix des Labelling Kits versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Die nicht eingebauten Nukleotid-Monomere wurden mit Hilfe des QiaQuick Nucleotide Removal Kits (Qiagen) säulenchromatographisch abgetrennt. Die so gereinigte und aufkonzentrierte markierte Sonde konnte direkt nach ihrer Denaturierung der Hybridisierungslösung zugesetzt oder bei +4°C kurzfristig aufbewahrt werden. Die Effizienz der Markierung wurde überprüft, wobei eine Aktivität von 2,5 x 10<sup>6</sup> cpm als ausreichend für die Detektion einer hochexprimierten cDNA erachtet wurde, während für geringer exprimierte Transkripte ein doppelter Markierungsansatz erforderlich war.

#### 1.2. Präparation der cDNA-Bank

Zur Auffindung von cDNA-Sequenzen standen zwei verschiedene Banken zur Verfügung (Dr. A. PETERSON, persönliche Kommunikation sowie SCHOLZE et al. 1999). Da in der zunächst verwendeten cDNA-Bank, die aus der PEM-Suspensionszellkultur des Stammes VII von *D. lanata EHRH*. gewonnen wurde, nicht alle Isoformen aufgefunden werden konnten, wurde in Ergänzung dazu eine cDNA-Bank aus Blättern einjähriger *D. lanata* EHRH-Pflanzen eingesetzt. Die im folgenden dargestellten Methoden folgten der Vorschrift des ZAP-cDNA Synthesis Kits (Stratagene) und galten analog für beide Banken.

#### 1.2.1. Phagen-kompetente XL-Blue-Zellen

Ein 50 ml LB-Kolben wurde mit einer Kolonie XL-Blue-Zellen angeimpft und über Nacht bei 37°C und 140 U/min inkubiert. Davon wurden 500  $\mu$ l auf einen frischen 50 ml LB-Kolben überimpft und bis zum Erreichen einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> = 1 weiter inkubiert. Die Zellsuspension wurde bei 2000 U/min 5 min abzentrifugiert und das Pellet in 10 mM MgSO<sub>4</sub> bis zu einer optischen Dichte von OD<sub>600</sub> = 0,6 aufgeschlämmt. Die so vorbereiteten Zellen waren für einen Zeitraum von bis zu 3 Tagen ausreichend kompetent, um einen zufriedenstellenden Phagentiter zu gewährleisten. Die sofortige Verwendung war der Aufbewahrung bei +4°C jedoch vorzuziehen.

#### 1.2.2. Titerbestimmung

Zur Titerbestimmung wurde der jeweiligen cDNA-Bank ein Aliquot entnommen und mit SM-Puffer eine Verdünnungsreihe im Bereich 1:100 bis 1:100000 erstellt. Jeweils 5  $\mu$ l dieser Verdünnungen und 250  $\mu$ l der kompetenten XL-Blue-Zellen (B.1.2.1.) wurden bei 37°C und 150 U/min für 15 min inkubiert, danach 3 ml flüssiger Top-Agar (mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,1 % Maltose) bei 54°C zugegeben und auf 80 mm-

LB-Agarplatten ausgegossen. Nach ausreichender Inkubation bei 37°C (ca. 7 h) konnten die Plaques ausgezählt werden. Der Titer der Bank wurde in pfu/µl bezogen auf Aliquots der unverdünnten Bank ermittelt.

# 1.2.3. Ausplattieren der Bank

Ein 30000 pfu repräsentierendes Aliquot der cDNA-Bank wurde mit 500 µl der phagenkompetenten Zellen (B.1.2.1.) für 15 min bei 37°C und 150 U/min inkubiert, mit 7 ml flüssigem Top-Agar (10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,1 % Maltose) bei 54°C vermengt und auf einer vorgewärmten 130 mm-LB-Agarplatten ausplattiert. Der Vorgang wurde für weitere 5 Agarplatten wiederholt, um einen repräsentativen Ausstrich der Bank zu erhalten und somit auch die Detektion unterrepräsentierter, gering exprimierter cDNAs zu gewährleisten. Die Inkubation der Platten bei 37°C wurde bis zur Entwicklung distinkter, nicht konfluenter Plaques fortgeführt (ca. 7-8 h). Die Platten wurden über Nacht, mindestens jedoch für 3 h bei +4°C aufbewahrt.

# 1.3. Primärscreening

#### 1.3.1. Blotten der ausplattierten cDNA-Bank

Die wie in B.1.2.3. beschrieben vorbereiteten Agarplatten wurden durch Auflegen von jeweils zwei 130 mm-Qiabrane Nylonmembranen (Qiagen) übertragen, wobei die erste Kopie für 1 min, die zweite Kopie für 3 min auf der auf Eis gehaltenen Platte belassen wurde. Die exakte Lage der Membranen wurde durch asymmetrische Tintenmarkierungen auf Membran und Agarplatte festgehalten. Nach der Inkubation wurden die Membranen vorsichtig abgezogen und für 10 min luftgetrocknet. Die so vorgetrockneten Membranen wurden dann nacheinander für jeweils 5 min auf puffergetränktem Filterpapier denaturiert (Denaturierungspuffer 0,2 M NaOH, 5 M NaCl), neutralisiert (Neutralisierungspuffer 0,4 M Tris/HCl pH 7,6 in 2xSSC) und gewaschen (2xSSC). Die so denaturierte Phagen-DNA wurde durch Bestrahlung der Membranoberseite mit UV-Licht (120 mJ) irreversibel auf der Membran fixiert (UV Crosslinker, Stratagene). Bis zur Fixierung der DNA durch UV-Licht wurden die Membranen stets separat und mit der Phagenseite nach oben gelagert, danach konnten sie bei Raumtemperatur trocken bis zur Hybridisierung gelagert werden.

#### 1.3.2. Hybridisierung

Die Hybridisierung der Nylonmembranen mit der nach B.1.1.3. vorbereiteten Sonde erfolgte in Anlehnung an die von Sambrook beschriebene Standardmethode (SAMBROOK et al. 1989). Dabei wurden die 12 Membranen mit ca. 80 ml vorgewärmter Hybridisierungslösung (Church-Puffer (500 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7 % SDS, 1 % BSA, 1 mM EDTA) bei 65°C) bedeckt und nach Zugabe von 100 µg/ml denaturiertem Heringssperma für 4 h bei 65°C im Schüttelwasserbad vorhybridisiert. Die durch Erhitzen auf 95°C für 10 min denaturierte und auf Eis abgekühlte radioaktiv markierte Sonde wurde nach Ablauf der Vorhybridisierung hinzugegeben und über Nacht bei 65°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Membranen wurden danach bei Raumtemperatur zweimal mit ausreichend niedrigstringentem Waschpuffer (40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 % SDS, 0,5 % BSA, 1 mM EDTA) gespült, zweifach mit diesem Puffer bei 60°C (bzw. 55°C im Falle der Blätter-cDNA-Bank) für 10 min gewaschen und je nach Bedarf mit hochstringentem Waschpuffer (40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 % SDS,

1 mM EDTA) bei 60°C (bzw. 55°C im Falle der Blätter-cDNA-Bank) gewaschen. Die so behandelten Membranen wurden für 15 min luftgetrocknet und danach eingeschweißt.

#### 1.3.3. Detektion positiver Primärklone

Die eingeschweißten Membranen wurden in Autoradiographiekassetten mit Röntgenfilm (NEF585 X-Omat Blue Film, NEN) eingelegt und für ca. 5-7 Tage entsprechend ihrer Restaktivität exponiert. Nach Entwicklung des Röntgenfilms wurden die Markierungen der Membranen auf den Film übertragen und mit den Plattenmarkierungen in Übereinstimmung gebracht. Die auf beiden Parallelmembranen einer Platte gleichwertig positiv detektierten Plaques wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in 1 ml SM-Puffer und 40 µl Chloroform aufbewahrt.

#### 1.3.4. Verifizierung der detektierten Plaques

Zur Verifizierung der abgenommenen Primärplaques wurde eine Kontroll-PCR durchgeführt, um falschpositive Signale auszuschließen. Dazu wurden 10 µl der Phagensuspension einem dreifachen Frier-Tau-Zyklus von 1 min in flüssigem Stickstoff und 3 min im 100°C-Wasserbad unterworfen. 5 µl der so behandelten Phagen wurden in einem Standard-PCR-Ansatz (SAMBROOK et al. 1989) unter Einsatz sondenspezifischer Primer nach folgendem PCR-Regime prozessiert: 95°C 5 min, 30 x (95°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1 min), 72°C 5 min. Nur Klone, die die erwartete Bande von ca. 170 bp Größe zeigten, wurden dem folgenden Sekundärscreening unterworfen. Da die erwarteten Klone unter Umständen von der Sequenz des zum Screening verwendeten PCR-Fragments abweichen konnten, wurde die Annealing-Temperatur mit 50°C relativ niedrig und damit unspezifisch gehalten. Die Detektion falschpositiver Signale wurde damit zwar in Kauf genommen, jedoch gleichzeitig die Toleranz gegenüber möglichen Isoformen erhöht.

#### 1.4. Sekundär- und Tertiärscreening

Die nach dem Primärscreening erhaltenen positiven und verifizierten Plaques wurden für mindestens 4 h bei Raumtemperatur (alternativ über Nacht bei +4°C) geschüttelt. Für diese Phagensuspensionen wurde jeweils eine individuelle Titerbestimmung analog zu B.1.2.2. durchgeführt. Ein entsprechendes Aliquot dieser Suspensionen (500-600 pfu) wurde mit 250 µl phagenkompetenten XL Blue-Zellen inkubiert und mit 3 ml Top-Agar (mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,1 % Maltose) wie oben beschrieben auf 80 mm LB-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C inkubiert, bis distinkte, nicht konfluente Plaques detektiert werden konnten. Das Blotten, Hybridisieren und Detektieren positiver Sekundärplaques erfolgte analog dem Primärscreening. Die ausgeschnittenen positiven Plaques wurden in 0,5 ml SM-Puffer, 20 µl Chloroform aufgenommen, durch eine Kontroll-PCR verifiziert und einem Tertiärscreening unterworfen. Bei diesem abschließenden Screening wurde die Phagendichte beim Ausplattieren so gewählt, daß positiv detektierte Einzelphagen ohne Kontamination eventueller Nachbarplaques abgenommen werden konnten (ca. 60-80 pfu je 80 mm-Platte). Diese Einzelphagen wurden in 300 µl SM-Puffer, 20 µl Chloroform aufgenommen und für 4 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Diese Phagensuspensionen waren bei Lagerung bei +4°C für mindestens 1 Jahr stabil und standen weiteren Analysen zur Verfügung.

# 1.5. in vivo-Excision und Sequenzierung positiver Einzelplaques

Die in den  $\lambda$ -ZAP-Phagen enthaltene Phagemid-DNA wurde entsprechend dem in vivo-Excision-Protokoll (ZAP-cDNA Synthesis Kit, Stratagene) in Plasmid-DNA überführt und in kompetenten SOLR-Zellen (Stratagene) vermehrt. Die Einzelkolonien wurden durch eine Kontroll-PCR verifiziert. Die cDNA, die nun im pBlueScript(SK(+/-)-Vektor (Stratagene) vorlag, konnte durch die vom Hersteller angegebenen Restriktionsenzyme aus dem Vektor ausgeschnitten und durch gelelektrophoretische Auftrennung überprüft werden. Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte wie in B.1.1.1. beschrieben. Zur Sequenzierung wurden Klone unterschiedlicher Länge oder mit unterschiedlichem Restriktionsmuster ausgewählt, um eine möglichst vollständige Detektierung aller Isoformen zu ermöglichen. Die Sequenzierung erfolgte nach der von Sanger (SANGER et al. 1977) beschriebenen Methode unter Verwendung von vektorspezifischen, Cy5-markierten Primern und des ALFexpress AutoRead Sequencing Kits (Pharmacia). Die Sequenzierungen wurden freundlicherweise von Dr. A. Peterson (Biozentrum Halle) auf dem ALFexpress (Pharmacia) durchgeführt. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit Hilfe verschiedener Online-Programme. Ein Sequenzvergleich erfolgte mit dem ClustalW-Programm (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/), die durch mehrere Parallelsequenzierungen verifizierten Gesamtsequenzen wurden mit dem Blastn-Programm mit den online zur Verfügung stehenden Datenbanken verglichen (http://www.ebi.ac.uk/blastall/). Eine Übersetzung der erhaltenen cDNA-Sequenzen in die entsprechenden Proteinsequenzen erfolgte mit Hilfe des Expasy-Translation-Programms (http://www.expasy.ch/tools/dna.html), die theoretischen Eigenschaften Proteinsequenzen der SO erhaltenen wurden mit Protparam bestimmt (http://www.expasy.org/tools/protparam.html).

# 2. Expressionsanalyse der mRNAs acbp3 und acbp4

#### 2.1. Pflanzenmaterial zur Gewinnung von Gesamt-RNA

#### 2.1.1. Frischpflanzenmaterial

Zur Gewinnung von Gesamt-RNA wurden ein- und zweijährige Exemplare von *Digitalis lanata* EHRH. aufgearbeitet. Dazu wurden verschiedene Organe und Gewebe getrennt bearbeitet. In dieser Arbeit wurden Blätter und Wurzeln (jeweils von ein- und zweijährigen Pflanzen), Keimlinge sowie Sproß, Knospen, Fruchtknoten, Kronen-, Staub- und Kelchblätter der zweijährigen Pflanze verwendet.

#### 2.1.2. Kultivierung Proembryogener Massen

Die somatische Suspensionszellkultur des Stammes VIII, der aus Embryonalstadien des embryogenen Stammes VII von *Digitalis lanata* EHRH. gewonnen wurde (TEWES et al. 1982, THOMAR et al. 1998), wurde unter folgenden Bedingungen kultiviert: 125 ml Nährmedium I wurden mit 25 ml Zellsuspension in einem 500 ml Rundkolben angeimpft und bei 23°C und 130 U/min auf einem Rundschüttler inkubiert. Nach einer Woche wurden jeweils 25 ml dieser Suspension in frisches Nährmedium I überführt und entsprechend inkubiert. Zur Gewinnung von Gesamt-RNA wurde die Zellsuspension abfiltriert und die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das

Material konnte bei -80°C aufbewahrt werden, wurde jedoch wenn möglich frisch weiterbearbeitet.

#### 2.1.3. Somatische Embryogenese

Die in B.2.1.2. beschriebenen Suspensionszellen wurden durch einen Mediumswechsel zur somatischen Embryogenese veranlaßt. Dabei wurde nach dem unter anderem von Liebau beschriebenen Schema vorgegangen (LIEBAU, Dissertation 1995). 25 ml der Erhaltungskultur wurden auf 125 ml Nährmedium II überführt und dort bei wöchentlichem Überimpfen auf frisches Nährmedium II für 4 Wochen unter den in B.2.1.2. beschriebenen Bedingungen kultiviert. Die unter diesen Bedingungen gebildeten Stage I-Globuli wurden von der 5. bis zur 16. Woche jeweils wöchentlich auf 125 ml frisches Nährmedium III überimpft, wobei durch den Entzug der Saccharose und den Einfluß der Auxine über die Stage II-Globuli und die herz- und torpedoförmigen Globulistadien hinweg die Bildung von somatischen Embryos erfolgte. Sowohl zur Isolierung von mRNA als auch zur Sicherstellung steriler Kultivierungsbedingungen wurden jeweils beim wöchentlichen Überimpfen der Zellkulturen Proben entnommen und analysiert. Der Verlauf der somatischen Embryogenese sowie das mikro- und makroskopische Bild dieser Entwicklung sind unter anderem ausführlich in der Dissertation von Scholze beschrieben (SCHOLZE, Dissertation 1999). Das Zellmaterial wurde zur RNA-Gewinnung abfiltriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Aufarbeitung aufbewahrt.

#### 2.2. Einfluß verschiedener Stressoren auf die Expression von acbp3 und acbp4

Um den Einfluß verschiedener Stressoren auf die Expression der beiden ACBP-Transkripte zu untersuchen, wurden PEMs wie in B.2.1.2. beschrieben auf Nährmedium I kultiviert. Diesem Nährmedium wurden Stressoren zugesetzt, die durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies einen oxidativen Streß auf die Erhaltungskultur der PEMs ausüben sollten. Ausgewählt wurden dazu verschiedene Konzentrationen von Wasserstoffperoxid. Die Zugabe von 2,2'-Azobis(2amidinopropan)dihydrochlorid (AAPH) (OHLSSON et al. 1995) hingegen sollte durch die Bildung freier Radikale und somit forcierter Lipidoxidation eine weitere Untersuchung der möglichen Streßregulation beider Transkripte durch oxidierte Liganden erlauben. Als hormoneller Stressor, der in viele streßund entwicklungsbedingte Expressionsregulationen involviert ist und der für die PEMs-Suspensionskultur bereits untersucht wurde (LIEBAU, Dissertation 1995), wurde das pflanzliche Hormon Abscisinsäure (ABA) eingesetzt. Die Stressoren wurden nach dem in Tab. B.1. dargestellten Schema in 125 ml Nährmedium I gelöst, jeweils 25 ml der Erhaltungskultur auf die so vorbereiteten 500 ml Kolben überführt und für die angegebenen Zeiträume unter Standardbedingungen inkubiert. Das Zellmaterial wurde abfiltriert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Stressor	Konzentration	Inkubationszeitraum			
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20 µM	4 h 12 h			
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200 µM			4 h	12 h
AAPH	1 mM	30 min	1 h	6 h	12 h
ABA	100 µM		1 h	6 h	12 h

**Tab. B.1.** Konzentration und Inkubationszeitraum verschiedener Stressoren, gelöst in Nährmedium I

# 2.3. Präparation von Gesamt-RNA

### 2.3.1. Gesamt-RNA-Gewinnung mit dem RNeasy Plant Mini Kit

Die für die Expressionsanalyse benötigte Gesamt-RNA wurde aus dem bei -80°C zwischengelagerten Zellmaterial gewonnen. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet. Als Standardmethode kam eine nach Dumke-Lehmann modifizierte Chloroform-Phenol-Reinigung (siehe B.2.3.2.) mit Lithiumchlorid-Fällung zur Anwendung. Diese Methode erbrachte relativ hohe Erträge an Gesamt-RNA ausreichender Reinheit. Sie benötigte jedoch bis zu 3 g Probenmaterial pro Aufarbeitung, mindestens jedoch 1 g, war also relativ materialintensiv. Da bei Applikation der Stressoren und Probenentnahme nach dem in B.2.2. angegebenen Schema nur eine geringe Probenmenge zur Verfügung stand, wurde hier zur Aufarbeitung das RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) verwendet. Die Aufarbeitung von ca. 100 mg Probenmaterial erfolgte entsprechend der Vorschrift des Herstellers. Die erhaltene RNA wurde in  $60 \,\mu$ l DEPC-Wasser aufgenommen und spektrophotometrisch vermessen.

#### 2.3.2. Gesamt-RNA-Gewinnung mit der Phenol/Chloroform-Methode

Bei Anwendung der Standardmethode (modifiziert nach DUMKE-LEHMANN 1993) wurden ca. 3 g Zell- oder Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert, in 6 ml NTES-Puffer aufgenommen und mit jeweils 3 ml Tris-gesättigtem Phenol und Chloroform versetzt. Nach 5 min intensivem Schütteln und 10 min Zentrifugation bei 5000 U/min wurde die wäßrige Phase erneut mit der 1:1 Phenol/Chloroform-Mischung versetzt und die Behandlung wiederholt, bis kein Niederschlag in der Interphase mehr zu detektieren war. Die wäßrige Phase wurde, um Phenolspuren zu beseitigen, mit reinem Chloroform ausgeschüttelt, nach erneutem Abzentrifugieren mit 0,1 V 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 3 V reinem Ethanol versetzt und über Nacht bei -20°C aufbewahrt. Die präzipitierten Nukleinsäuren wurden für 30 min bei 5000 U/min abzentrifugiert und in 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet luftgetrocknet, in ausreichend (ca. 3-5 ml) DEPC-Wasser aufgenommen und mit dem gleichen Volumen 4 M Lithiumchlorid versetzt, um durch diese fraktionierte Fällung RNA von DNA zu trennen. Nach Inkubation auf Eis bei +4°C über Nacht wurde die ausgefällte RNA für 30 min bei 5000 U/min abzentrifugiert, in ausreichend DEPC-Wasser aufgenommen und spektrophotometrisch vermessen. Bei der Vermessung bei 260 nm wurde ein Extinktionskoeffizient von  $E = 40 \ \mu g/\mu l^{-1} \text{ cm}^{-1}$  für RNA zugrundegelegt. Das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm und bei 280 nm gab den Grad der Verunreinigung mit Proteinen an. Werte um 2 wurden als ideal betrachtet, bei chlorophyllhaltigen Pflanzenteilen lag der Wert jedoch weitaus niedriger. Ein Wert von 1,3 wurde als Minimum für eine ausreichende Reinheit erachtet. Die so gewonnene RNA wurde in RNase-freien Reaktionsgefäßen in Aliquots bei -80°C aufbewahrt.

#### 2.4. Präparation der Sonden

2.4.1. Sonde zur Detektion des ACBP-Gesamttranskriptionslevels

Zur Detektion der Transkripte in den Gesamt-RNA-Populationen wurde der gesamte Bereich der acbp3-cDNA eingesetzt. Auf Grund der hohen Übereinstimmung der beiden cDNA-Sequenzen im kodierenden Bereich wurden dabei natürlich immer auch die acbp4-Transkripte mitdetektiert. In diesem Fall wurde im folgenden die Formulierung "ACBP-Gesamttranskriptionslevel" verwendet. Die Sonde wurde wie bereits in B.1.1. beschrieben durch die Restriktionsenzyme KpnI und XbaI aus dem pBlueSkript-Vektor ausgeschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt, gelgereinigt und  $[\alpha$ -<sup>32</sup>P]-markiert.

2.4.2. Spezifische Sonden zur Detektion der Einzeltranskriptionslevel von acbp3 und acbp4

Es wurden für den untranslatierten 5'-Bereich des vollständigen acbp3-Klons die beiden Primer AC3-5'DIR und AC3-5'REV abgeleitet, um die 129 bp des nichtkodierenden 5'-Bereiches als spezifische Sonde für die acbp3-Transkripte amplifizieren zu können. Parallel dazu wurden für den 3'-untranslatierten Bereich des vollständigen acbp4-Klons die Primer AC4-3'DIR und AC4-3'REV abgeleitet und die so amplifizierbaren 205 bp des nicht-kodierenden 3'-Bereiches als spezifische Sonde für das acbp4-Transkript genutzt. Dabei kam folgende Vorschrift zur Anwendung:

95°C 5 min, 30 x (95°C 45 sec, 50°C 45 sec, 72°C 45 sec), 72°C 5 min

Beide PCR-Produkte wurden unter Nutzung des TOPO/TA Cloning Kits (Invitrogen) entsprechend der Vorschrift des Herstellers im pCR2.1-Vektor zwischenkloniert und zur Verifizierung der Sequenz mit vektorspezifischen Primern sequenziert. Sie konnten dann wie in B.1.1. beschrieben bis zur Markierung als Sonde weiterbearbeitet werden.

#### 2.5. Northern Analyse

#### 2.5.1. Auftrennung der RNA im denaturierenden Agarose-Gel

Die nach B.2.3. gewonnene Gesamt-RNA wurde im denaturierenden Agarose-Gel aufgetrennt. Dazu wurde ein 1,2 % iges Agarose-Gel mit 1xMOPS als Puffersubstanz und Formaldehyd als denaturierendem Agens hergestellt. Die Agarose wurde mit 0,1 V 10xMOPS und der entsprechenden Menge Wasser aufgeschmolzen und auf 60°C abgekühlt. Nach Zugabe von Formaldehyd und 0,5  $\mu$ g/mg Ethidiumbromid wurde das Gel in die Gelapparatur ausgegossen und 30 min bei Raumtemperatur und weitere 15 min bei +4°C belassen. Als Laufpuffer für die elektrophoretische Auftrennung kam 1xMOPS zur Anwendung, wobei die Auftrennung bei 10 V pro 1 cm Laufstrecke unter Verwendung einer Umwälzpumpe erfolgte.

20  $\mu$ g (bzw. 10  $\mu$ g bei Verwendung der durch RNeasy Plant Mini Kit gereinigten RNA) der in DEPC-Wasser aufgenommenen RNA-Proben wurden 15 min bei 65°C inkubiert. Nach Abkühlung auf Eis wurden die Proben in die Geltaschen des 1,2 %igen denaturierenden Agarosegels aufgetragen und wie oben beschrieben bei 10 V/cm unter einem Abzug elektrophoretisch aufgetrennt.

Das Gel wurde nach erfolgter Auftrennung unter UV-Licht-Bestrahlung fotografiert, um einen Anhaltspunkt hinsichtlich der Auftragung gleicher RNA-Mengen in allen Proben sowie der Qualität und Reinheit der verwendeten RNA zu erhalten. RNA-Proben, die die beginnende enzymatische Zersetzung der beiden ribosomalen Banden erkennen ließen oder wesentlich von der berechneten Konzentration abwichen, wurden nicht zur Expressionsanalyse verwendet.

Das Gel wurde zur Entfernung verbliebener Formaldehydreste für 2x15 min in 1xSSC-Puffer gewaschen.

# 2.5.2. Northern Blot-Transfer

Das gewaschene Gel wurde auf mit 20xSSC-Puffer getränktem und zugeschnittenem Whatman-Papier positioniert und mit der ebenfalls genau zugeschnittenen Nylonmembran bedeckt, wobei die Lage der Geltaschen und der Bromphenolblau-Bande auf der Rückseite der Membran markiert wurden. Die Nylonmembran wurde mit zwei Lagen getränktem Whatman-Papier und ca. 10 cm trockenen, saugfähigen Papiertüchern überschichtet und mit ca. 1 kg Gewicht beschwert. Als Transferpuffer wurde 20xSSC-Puffer verwendet, der über Filterpapierbrücken mit dem untersten Whatman-Papier verbunden war. Als Nylonmembranen wurden sowohl die ungeladene Qiabrane-Membran (Qiagen) als auch die mit einer positiven Oberflächenladung versehene Hybond N+-Membran (Amersham) verwendet. Obwohl die positiv geladene Membran eine höhere Effizienz bei der Bindung der Nukleinsäuren versprach, konnten hier keine relevanten Unterschiede bei der Durchführung der Northern Blots festgestellt werden. Die Qiabrane-Membran wurde daher als Standardmembran verwendet.

Nach dem über Nacht erfolgten Transfer wurde die Nylonmembran vom Gel abgezogen und die RNA irreversibel unter UV-Licht (120 mJ) im UV Crosslinker (Stratagene) auf der Membran verankert. Der so behandelte Blot wurde 10 min in 1xSSC gewaschen und stand weiteren Analysen zur Verfügung. Konnte die Hybridisierung des Blots nicht unmittelbar erfolgen, wurde die Membran eingeschweißt und bei -20°C aufbewahrt.

#### 2.5.3. Hybridisierung des Northern Blots

Die hier angewendete Hybridisierungsmethode wich leicht von der in B.1.3.2. für das Plaquescreening beschriebenen Methode ab. Als Hybridisierungspuffer wurde eine Lösung von 10 % Dextransulfat, 1 % SDS und 1 M NaCl verwendet, die auf die Hybridisierungstemperatur von 65°C vorgewärmt wurde. Der Blot wurde mit ausreichend Hybridisierungspuffer bedeckt und nach Zugabe von 100  $\mu$ g/ml denaturiertem Heringssperma für mindestens 3 h im Schüttelwasserbad bei 65°C vorhybridisiert. Die nach B.2.4. vorbereitete Sonde wurde für 10 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und nach Ablauf der Vorhybridisierung der Hybridisierungslösung zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C. Der Blot wurde danach bei Raumtemperatur mit 2xSSC gespült, für 30 min bei 58°C im Schüttelwasserbad mit 2xSSC / 0,1 % SDS und für weitere 30 min bei 58°C mit 1xSSC / 0,1 % SDS gewaschen. Der letzte Waschschritt erfolgte mit dem stringentesten Puffer 0,1xSSC / 0,1 % SDS bei 58°C für mindestens 20 min. Der Blot wurde nach Lufttrocknung eingeschweißt und in eine Radiographiekassette eingelegt.

# 2.5.4. Detektion und Auswertung des Northern Blots

Je nach Intensität der nach dem letzten Waschschritt verbliebenen Reststrahlung wurde der Blot mit Röntgenfilm oder einem Phosphoimager-Screen in eine Autoradiographiekassette eingelegt. Die Verwendung des Phosphoimager-Screens erlaubte eine schnellere Detektion schwächerer Signale, während die Detektion auf Röntgenfilm eine bessere graphische Auflösung erbrachte.

# 2.6. Kontrollhybridisierung

# 2.6.1. Vorbereitung des Blots

Nachdem die genspezifischen Sonden zum Nachweis bestimmter Transkripte auf dem Blot detektiert waren, wurde mit kochender 0,1 %iger SDS-Lösung mehrfach gewaschen, bis sämtliche Restaktivität vom Blot entfernt wurde.

# 2.6.2. Vorbereitung der 18 S-Sonde

Zur Dokumentation gleicher Gesamt-RNA-Mengen in allen geblotteten Proben wurden die wie in 2.6.1. beschrieben gewaschenen Blots mit einer 18 S-ribosomalen RNA-Sonde (DOBROWOLSKI et al., 1989) hybridisiert. Die Reinigung und Markierung der 18 S-Sonde erfolgte analog den für die genspezifischen Sonden beschriebenen Methoden.

#### 2.6.3. Kontrollhybridisierung und Detektion

Die Hybridisierung der gewaschenen Northern-Membranen mit der  $[\alpha^{-3^2}P]$ markierten 18 S-Sonde erfolgte entsprechend den in B.2.5.3. dargestellten Bedingungen. Da die Markierungseffizienz für die ribosomale Sonde weitaus höher als bei den genspezifischen Sonden lag, mußten die Waschbedingungen wesentlich stringenter gehalten werden, wobei die Membran bei 62°C mit dem stringentesten Waschpuffer (0,1xSSC, 0,1 % SDS) behandelt wurde. Die Detektion des eingeschweißten Blots erfolgte durch Röntgenfilm in Autoradiographiekassetten.

#### 3. Untersuchung der genomischen Organisation der acbp-Genfamilie

#### 3.1. Genomische Southern Blot-Analyse

3.1.1. Pflanzenmaterial zur Gewinnung genomischer DNA

Zur Durchführung einer genomischen Southern-Analyse wurde Gesamt-DNA aus Blättern einjähriger Pflanzen von *Digitalis lanata* EHRH. isoliert. Grundsätzlich war natürlich jedes Gewebe zur genomischen Analyse geeignet, Blätter junger Pflanzen wurden jedoch auf Grund ihrer Verfügbarkeit, ihrer einfacheren Aufarbeitung im Vergleich zu älteren Geweben oder Organen sowie des geringeren Methylierungsgrades gegenüber PEMs ausgewählt.

#### 3.1.2. Isolierung genomischer DNA

Die Gewinnung von Gesamt-DNA aus frischem Pflanzenmaterial wurde nach einer Methode von Rogers und Bendich durchgeführt (ROGERS und BENDICH 1994). Dabei

wurden 3 g Blattmaterial in Trockeneis gemörsert und bis zur Sublimation des Trockeneises bei -20°C aufbewahrt. Dieser Probe wurden 5 ml des auf 65°C vorgewärmten 2xCTAB-Puffers zugegeben. Nach Zugabe von 5 ml Chloroform-Isoamylalkohol (24:1 Mischung) und kräftigem Mischen bis zur Emulsionsbildung wurde die Probe für 10 min bei 5000 U/min abzentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde mit 0,1 V 10% CTAB-Lösung versetzt und mit weiteren 5 ml Chloroform-Isoamylalkohol ausgeschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die genomische DNA in der wäßrigen Phase durch die Zugabe von 1 V CTAB-Fällungspuffer und 30 min Inkubation auf Eis ausgefällt. Nach 1 min Zentrifugation bei 5000 U/min wurde der Überstand abgegossen und das Präzipitat in genügend High salt-TE-Puffer bis zur vollständigen Lösung aufgenommen. Eventuelle unlösliche Rückstände wurden abzentrifugiert und die verbleibende Lösung mit 2 V kaltem (-20°C) 96 % Ethanol versetzt. Nach 30 min Inkubation bei -20°C wurde die genomische DNA für 15 min bei 5000 U/min abzentrifugiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Präzipitat luftgetrocknet und in ausreichend 0,1xTE-Puffer aufgenommen. Die ebenfalls ausgefällte RNA wurde durch eine einstündige Behandlung mit 0,1 V RNase-Lösung bei 37°C entfernt. Die so erhaltene genomische DNA wurde in einem 0,8 % igen Agarosegel auf ihre Qualität und Molekulargröße untersucht. Zur weiteren Analyse wurden nur DNA-Proben verwendet, die keine enzymatische Zersetzung oder mechanische Zerstörung erkennen ließen. Die genomische DNA wurde nach der spektrophotometrischen Vermessung (siehe B.1.1.1.) bei +4°C aufbewahrt, um ein Ausfällen durch wiederholte Frier-Tau-Schritte zu vermeiden. Vor dem enzymatischen Verdau wurde die Oualität der jeweiligen Proben im Agarosegel überprüft.

#### 3.1.3. Partieller Verdau der genomischen DNA

Die genomische DNA wurde vor der Auftrennung im Agarosegel partiell enzymatisch verdaut. Da bei der Verwendung von genomischer DNA die möglichen Schnittstellen in der Umgebung der für die verschiedenen ACBPs kodierenden Bereiche oder innerhalb eventuell vorhandener Introns nicht bekannt sind, wurden möglichst viele Restriktionsenzyme und ihre jeweiligen Kombinationen getestet. Dabei kamen hochkonzentrierte Enzyme (40 bis 100 U/µl) zum Einsatz, um eine ausreichende Konzentration im Reaktionsansatz zu erreichen. Für den Partialverdau standen hier folgende hochkonzentrierte Enzyme zur Verfügung: BamHI, BglII, EcoRI, HindIII, KpnI, PstI, Sau3A, SalI, XhoI. Die Restriktion wurde nach folgendem allgemeinem Schema durchgeführt: 20 µg genomische DNA wurden mit 100 U der jeweiligen Restriktionsenzyme und 20 µl des jeweiligen 10xPuffers in einem 200 µl-Ansatz (Wasser ad 200 ul) bei 37°C über Nacht, mindestens jedoch für 6 h inkubiert. Zum Auftragen auf das Agarosegel mußte das Volumen der Proben reduziert werden. Dafür wurde der Ansatz nach Zugabe von 20 µl 3 M Natriumacetat pH 7,2 und 500 µl 96 % Ethanol für 1 h bei -70°C bzw. über Nacht bei -20°C inkubiert. Die so ausgefällten DNA-Fragmente wurden für 15 min bei 13000 U/min abzentrifugiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und nach Lufttrocknung in 30 µl TE-Puffer und 8 µl 5xStop-Puffer aufgenommen, um danach umgehend elektrophoretisch aufgetrennt werden zu können.

#### 3.1.4. Elektrophoretische Auftrennung der partialverdauten genomischen DNA

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurde ein 0,8 %iges Agarosegel mit 0,5 µg/mg Ethidiumbromid und 1xTAE als Gel- und Laufpuffer in die Gelapparatur gegossen. Die nach B.3.1.3. vorbereiteten Proben wurden bei 1 V/cm Laufstrecke über Nacht aufgetrennt, wobei die Laufstrecke mindestens 15 cm betrug. Die verhältnismäßig langsame Elektrophorese ermöglichte eine schärfere Auftrennung der verschiedenen Fragmente besonders im höhermolekularen Bereich. Als Größenmarker wurde mit HindIII verdaute  $\lambda$ -DNA genutzt ( $\lambda$ -HindIII-Marker, Boehringer). Nach erfolgter Auftrennung wurde das Gel zur Abschätzung des Restriktionsgrades und der Molekulargrößenverteilung der erhaltenen Fragmente unter UV-Licht fotografiert. Zur endgültigen Durchführung des Southern Blots wurden die Enzyme oder Enzymkombinationen ausgewählt, die eine möglichst gleichmäßige Größenverteilung hoch- und niedrigmolekularer Fragmente sowie einen möglichst geringen Anteil nichtverdauter genomischer DNA ergaben. Nach erfolgter Elektrophorese und Kontrolle unter UV-Licht wurde das Gel für 15 min in 0,25 M HCl gewaschen. Dies diente der unspezifischen Zerkleinerung verbliebener höhermolekularer Fragmente und sollte deren späteren Transfer und ihre sterische Zugänglichkeit für die Hybridisierungsreaktion ermöglichen. Die Denaturierung der DNA-Fragmente im Gel erfolgte für 2x15 min in 0,5 M NaOH / 1,5 M NaCl, wonach das Gel für 15 min in 0,5 M Tris-HCl pH 8 / 1,5 M NaCl neutralisiert und 5 min in 2xSSC gewaschen wurde.

#### 3.1.5. Southern Blot-Transfer

Der Transfer der denaturierten DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran erfolgte analog der in B.2.5.2. für den Northern Blot beschriebenen Methode. Es wurde ebenfalls unter Verwendung von 20xSSC als Transferpuffer über Nacht auf eine Qiabrane-Membran (Qiagen) geblottet. Um einen ausreichenden Denaturierungsgrad auch der hochmolekularen DNA-Fragmente sicherzustellen, wurde der Blot wie in B.2.5.2. ausgeführt denaturiert, neutralisiert und gewaschen, bevor die DNA irreversibel auf der Membran fixiert wurde.

#### 3.1.6. Hybridisierung des Southern Blots

Zur Detektion acbp-ähnlicher Sequenzen und Fragmente wurde die gesamte acbp3cDNA genutzt. Die Sonde wurde wie bereits in B.2.4.1. beschrieben vorbereitet. Da bei der genomischen Southern-Analyse sehr schwache Signale zu erwarten waren, wurde die doppelte Menge an Sonden-DNA zur  $[\alpha-^{32}P]$ -Markierung und Hybridisierung eingesetzt.

Der nach B.3.1.5. vorbereitete Blot wurde in 30 ml Church-Puffer unter Zugabe von 100  $\mu$ g/ml denaturiertem Heringssperma für 4 h bei 65°C vorhybridisiert. Die markierte acbp3-cDNA wurde 5 min bei 95°C denaturiert und nach Ablauf der Vorhybridisierung zugegeben. Nach über Nacht bei 65°C erfolgter Hybridisierung wurde der Blot bei Raumtemperatur mit 2xSSC / 0,1 % SDS gespült und für 15 min bei 50°C mit 1xSSC / 0,1 % SDS gewaschen. Um das zu erwartende schwache Signal nicht unter das Detektionslimit abzuschwächen, wurde kein stringenterer Waschpuffer eingesetzt und ein höheres Hintergrundsignal in Kauf genommen. Der gewaschene

Blot wurde eingeschweißt und mit einem Phosphoimager-Screen in einer Autoradiographiekassette detektiert.

# 3.2. Screening einer genomischen DNA-Bank von Digitalis lanata EHRH

# 3.2.1. Präparation von Sonde und genomischer Bank

Zum Screening der genomischen Bank wurde wie zuvor bei der Durchführung des genomischen Southern Blots die gesamte acbp3-cDNA eingesetzt. Die Vorbereitung der Sonde erfolgte analog der in B.2.4.1. beschriebenen Methode. Beim Primärscreening wurde die doppelte cDNA-Menge verwendet, Sekundär- und Tertiärscreening konnten mit einer Einfachmarkierung wie in B.2.4.1. beschrieben durchgeführt werden.

Zur Auffindung genomischer Sequenzen konnte eine Bank partialverdauter genomischer DNA aus *Digitalis lanata* EHRH. genutzt werden, die freundlicherweise von Dr. A. Peterson zur Verfügung gestellt wurde. Die Titerbestimmung und generelle Vorbereitung der ausplattierten Bank erfolgte entsprechend den in B.1.2. dargestellten Methoden. Im folgenden soll nur auf die Unterschiede zu der für das cDNA-Bank-Screening beschriebenen Vorgehensweise eingegangen werden. Die DNA-Fragmente lagen hier als XhoI-Fragmente in einem Lambda FIX<sup>®</sup> II Phagemid (Stratagene) vor. Im Gegensatz zu den für das ZAP-cDNA-System benötigten XL-Blue-Zellen wurden für die Transformation der genomischen Bank phagenkompetente P2-*E. coli*-Zellen (Stratagene) verwendet. Die Inkubationszeiten zur Gewinnung kompetenter Zellen und bei der Entwicklung von Phagenplaques mußten auf Grund des langsameren Wachstums dieses Stammes geringfügig verlängert werden.

#### 3.2.2. Durchführung des genomischen Screenings

Bei der Suche nach genomischen Sequenzen in Verbindung mit der acbp-Genfamilie wurden 6 Agarplatten mit jeweils 50000 Plaques auf Qiabrane-Membranen (Qiagen) geblottet und mit der  $[\alpha$ -<sup>32</sup>P]-markierten acbp3-cDNA hybridisiert. Blotting, Denaturierung und Fixierung der DNA sowie Hybridisierung und Detektion positiver Signale erfolgten analog der für die cDNA-Bank beschriebenen Methode. Dies galt ebenso für die Durchführung der verschiedenen Screening-Runden. Positive Signale wurden bis zur Detektion einzelner positiver Plaques bearbeitet. Diese Plaques wurden aus dem Topagar ausgeschnitten und in 500 µl SM-Puffer / 40 µl Chloroform aufbewahrt, um zur Gewinnung von Phagen-DNA genutzt werden zu können.

#### 3.2.3. Gewinnung von $\lambda$ -DNA

Zur Gewinnung von  $\lambda$ -DNA eines bestimmten positiv detektierten Einzelphagen wurden 60 µl der in 500 µl SM / 40 µl Chloroform aufgenommenen Plaques mit 600 µl phagenkompetenter P2-Zellen für 15 min bei 37°C geschüttelt und mit 7 ml auf 54°C abgekühlter flüssiger Top-Agarose auf einer vorgewärmten 130 mm-LB-Agarplatte ausplattiert. Die Verwendung von Top-Agarose sollte mineralische Verunreinigungen im Agar, die die spätere Weiterbearbeitung der  $\lambda$ -DNA erschweren können, vermeiden. Die Platte wurde bis zur Entwicklung eines konfluenten Plaquerasens bei 37°C inkubiert. Nach Überschichtung der Top-Agaroseschicht mit 10 ml SM-Puffer wurde die Platte über Nacht bei +4°C geschüttelt. Das Phagenlysat wurde danach abgenommen und die Platte mit weiteren 2 ml SM-Puffer gespült. Die Aufarbeitung der  $\lambda$ -Phagen-DNA erfolgte unter Verwendung des  $\lambda$ -DNA Midi Kits (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Phagen-DNA wurde dabei nach dem Verdau verbliebener bakterieller DNA und Lyse der Phagen über Säulen aufgereinigt, mit Isopropanol gefällt und in  $\frac{1}{2}$  TE-Puffer aufgenommen.

# 3.2.4. Restriktion und Southern-Blot-Analyse

Die nach B.3.2.3. vorbereitete  $\lambda$ -DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen und Enzymkombinationen geschnitten, um die optimale Fragmentgröße zur weiteren Zwischenklonierung zu erreichen. Die Fragmente wurden im Agarosegel aufgetrennt, unter UV-Licht fotografiert und wie für den genomischen Southern beschrieben geblottet und mit markierter acbp3-cDNA hybridisiert. Die im Southern Blot detektierten Signale wurden den im Gelfoto sichtbaren Banden zugeordnet und aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution aus dem Gel erfolgte unter Verwendung des Qiaex II-Kits (Qiagen).

# 3.2.5. Zwischenklonierung der $\lambda$ -DNA-Fragmente

Zur Zwischenklonierung der Fragmente in einen bakteriellen Vektor mußte dieser Vektor linearisiert und dephosphoryliert werden, um eine Re-Ligation zu vermeiden. Dazu wurden 10 µg pUC18-Vektor (Stratagene) mit 10 U Blunt-End-Restriktionsenzym SmaI in 1x One-Phor-All *PLUS*-Puffer (Pharmacia Biotech) in einem 50 µl-Ansatz für 4 h bei 25°C inkubiert. Das Restriktionsenzym wurde für 10 min bei 95°C inaktiviert, der Ansatz mit 0,1 U Alkalischer Phosphatase (CIAP, Pharmacia Biotech) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach konnte der linearisierte und dephosphorylierte Vektor im Agarosegel aufgetrennt und eluiert werden.

Da die aus dem Agarosegel eluierten positiv detektierten  $\lambda$ -DNA-Fragmente mit unterschiedlichen, Blunt-End- sowie Overhang-Enzymen generiert worden waren, mußten eventuelle Überhänge vor der Blunt-End-Klonierung aufgefüllt werden. Dazu wurden die eluierten Fragmente mit 1 µl 100 mM NTP sowie 2 µl Klenow-Fragment (pEQ-Lab) in 30 µl 1xKlenow-Puffer für 30 min bei 30°C inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide und Protein wurden durch Auftrennung und Eluierung aus dem Agarosegel entfernt.

Dephosphorylierter und linearisierter pUC18-Vektor und die aufgefüllten  $\lambda$ -DNA-Fragmente wurden im Verhältnis 1:4 mit 1-3 U T4-Ligase (Biolabs) und 10 nmol rATP in 20 µl 1xLigase-Puffer bei 16°C über Nacht inkubiert und nach Hitzeinaktivierung der Ligase bei -20°C aufbewahrt.

#### 3.2.6. Transformation der pUC18-Konstrukte und Sequenzanalyse

Kompetente XL-Blue-Zellen zur Transformation der pUC18-Konstrukte wurden nach folgender Vorschrift (QIAexpressionist, Qiagen) vorbereitet: eine Kolonie XL-Blue-Zellen wurde über Nacht in einer 5 ml LB-Flüssigkultur vermehrt, auf eine 50 ml LB-Flüssigkultur überimpft und bis zu einer optischen Dichte  $A_{600} = 0,5$  inkubiert. Die Zellen wurden bei 500 g abzentrifugiert und auf Eis aufbewahrt. Nach Zugabe von 15 ml kaltem TFB1-Puffer (100 mM RbCl2, 50 mM MnCl2, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl2, 15 % Glycerol, pH 5,8 sterilfiltriert) und 90 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut bei 500 g abzentrifugiert und mit 2 ml kaltem TFB2-Puffer

(10 mM MOPS, 10 mM RbCl2, 75 mM CaCl2, 15 % Glycerol, pH 6,8 sterilfiltriert) versetzt. Die Zellen wurden aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

10 µl des Ligationsansatzes wurden mit 100 µl kompetenten XL-Blue-Zellen für 30 min auf Eis aufbewahrt, 45 s bei 42°C hitzegeschockt und nach Zugabe von 200 µl SOC-Medium für 1 h bei 37°C geschüttelt. Der Transformationsansatz wurde auf einer LB-Ampicillin-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Kolonien wurden nach einer Plasmid-Midipräparation (siehe B.1.1.1.) durch Restriktionsanalyse verifiziert und sequenziert.

# 4. Überexpression von acbp3 und acbp4

# 4.1. Klonierung in den Expressionsvektor pET3a

# 4.1.1. Ableitung von Oligonukleotid-Primern

Zur Klonierung in den Expressionsvektor pET3a (Novagen) mußten die kodierenden Bereiche von acbp3 und acbp4 mit flankierenden Schnittstellen entsprechend der *multi cloning site* des pET3a-Vektors versehen werden. Dazu wurden direkte und reverse Primer aus 5'- und 3'-Ende der kodierenden Sequenzen einschließlich des jeweiligen Start- und Stopkodons abgeleitet und mit einer 6-Basen-Extension versehen. Diese Extension entsprach einer NdeI-Schnittstelle für die 5'-direkten und einer BamHI-Schnittstelle für die 3'-reversen Primer.

# 4.1.2. PCR und Zwischenklonierung in den TOPO/TA-Vektor

Als Template für die PCR-Reaktion wurden jeweils die cDNA-Bank-Klone acbp3 bzw. acbp4 genutzt. 100 ng Plasmid-DNA wurden in einem Standard-PCR-Ansatz mit jeweils 50 pmol Primer, jeweils 10 nmol der NTPs, 2,5 U Taq-Polymerase (Peqlab), 0,1 V 10xPCR-Puffer (Peqlab, entsprach 20 mM MgCl<sub>2</sub>) und Wasser zu 50 µl in einem Thermocycler (Mastercycler 5330 plus, Eppendorf) nach folgendem Schema inkubiert: 5 min 95°C, 30 x (45 sec 95°C, 45 sec 58°C, 45 sec 72°C), 5 min 72°C. Die PCR-Ansätze wurden im Agarosegel aufgetrennt, die Einzelbanden aus dem Gel eluiert und im TOPO/TA-Vektor (Invitrogen) zwischenkloniert. Die Konstrukte wurden durch Sequenzierung auf Identität überprüft.

#### 4.1.3. Klonierung in den pET3a-Vektor

Die verifizierten TOPO/TA-Konstrukte sowie der Leervektor pET3a (Novagen) wurden mit den Restriktionsenzymen NdeI und BamHI in 1xBamHI-Puffer für 2 h bei 37°C inkubiert und die Ansätze im Agarosegel aufgetrennt. Die jeweiligen Banden wurden aus dem Gel eluiert und bei -20°C aufbewahrt. Die Ligation wurde in einem Vektor-Insert-Verhältnis von 1:3 in 0,1 V Ligase-Puffer, 10 nmol rATP, 0,4 U T4-DNA-Ligase (Biolabs) und Wasser zu 20 µl über Nacht bei 16°C durchgeführt. 5 µl dieser Ligationsansätze wurden in 100 µl kompetente BL21(DE3)-Zellen (Stratagene) wie in B.3.2.6. beschrieben transformiert. Nach Ausplattierung der Transformationsansätze auf LB-Ampicillin-Agarplatten und Inkubation bei 37°C über Nacht wurden die Kolonien durch eine Kontroll-PCR verifiziert und durch Sequenzierung auf Identität und korrekten Leserahmen überprüft.

# 4.2. Überexpression der rekombinanten Proteine

# 4.2.1. Induktion der Expressionskulturen

Zur Überexpression der pET3-Konstrukte in *E. coli* wurde eine nach B.4.1.3. verifizierte Kolonie in 500 ml LB-Amp-Medium bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von  $A_{600} = 0,6$  im Rundschüttler bei 300 U/min inkubiert. Die Zellen wurden nach Erreichen dieser optischen Dichte durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert und über Nacht weiter kultiviert. Es wurde jeweils eine 2 ml-Probe vor und 3 h nach der Induktion entnommen, um die Überexpression zu dokumentieren. Die 500 ml-Kultur wurde abzentrifugiert, die Zellen in 20 ml HEPES-Puffer (2 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 8) gewaschen, erneut abzentrifugiert und bis zur Aufarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

#### 4.2.2. Probenaufarbeitung

Die Lyse der Zellen zur Freisetzung des Proteins erfolgte nach Zugabe von 10 ml HEPES-Puffer in einem Homogenisator (Potter, Glass Col) bei 1000 U/min für 3x2 min. Zwischen den Behandlungen im Homogenisator wurde die Zellsuspension für jeweils 2 min im Ultraschallbad behandelt. Die Proben wurden für 1 h bei 50000 g abzentrifugiert und der Überstand auf Eis aufbewahrt.

Die 2 ml-Kontrollproben, die vor und 3 h nach der Induktion entnommen worden waren, wurden abzentrifugiert, mit 80  $\mu$ l Laemmli-Puffer versetzt und in einer 3x1 min Vortex / 3 min Ultraschallbad-Behandlung aufgeschlossen. Nach Denaturierung für 10 min bei 95°C wurden 8  $\mu$ l davon in einer SDS-PAGE-Analyse (siehe B.4.4.2.) überprüft.

#### 4.3. Chromatographische Reinigung der rekombinanten Proteine

Die Proteingemische der aufgearbeiteten Induktionskulturen sollten chromatographisch aufgetrennt werden. Dazu wurde das ÄKTA-FPLC-System (Pharmacia) genutzt, wobei Anionentauscher- und *Reversed Phase*-Säulen zum Einsatz kamen. Alle Puffer wurden vor der Verwendung filtriert (1,2  $\mu$ m Porengröße) und entgast. Die Detektion der Proteine erfolgte spektrophotometrisch bei 260 nm und parallel dazu bei 215 nm.

#### 4.3.1. FPLC-Reinigung über eine Anionentauscher-Säule

Als Anionentauscher wurde eine 1 ml-ResourceQ-Säule (Resource<sup>TM</sup> Q, 1 ml, Pharmacia Biotech) verwendet, die als starker Anionentauscher auf quarternären Ammoniumgruppen als Oberflächenbeschichtung der Matrix basierte. Jeweils 2 ml der nach B.4.2.2. aufgearbeiteten Proben wurde in den 2 ml-Loop der ÄKTA-FPLC-Probenauftragung gegeben und über die ResourceQ-Säule aufgetrennt. Dabei wurde mit 30 mM Tris als Laufpuffer und 2 M NaCl als Gradientenpuffer bei einer Flußrate von 4 ml/min eluiert. Die Elution erfolgte über 10 min von 0 % bis 50 % des Gradientenpuffers. Diese Auftrennung wurde jeweils mit verschiedenen pH-Werten des Laufpuffers (von pH 5 bis pH 9) durchgeführt, um die optimalen Auftrennungsbedingungen zu ermitteln. Die gesammelten 1,5 ml-Fraktionen wurden bei -20°C aufbewahrt. Jeweils 20  $\mu$ l der Fraktionen wurden zur SDS-PAGE-Analyse verwendet (B.4.4.3.).

#### 4.3.2. Reversed Phase-FPLC

Die auf der ResourceQ-Säule vorgereinigten Fraktionen wurden im SDS-Gel überprüft und die ACBP-haltigen Fraktionen vereinigt. 10 ml der vereinigten Fraktionen wurden mit dem 10 ml-Loop der ÄKTA-FPLC-Probenauftragung appliziert und in 12 mM HCl-Lösung als Laufpuffer mit einem Gradienten von 45 % bis 90 % Gradientenpuffer (Ethanolische 12 mM HCl-Lösung) über 6 min bei einer Flußrate von 3 ml/min eluiert. Zur Auftrennung stand hier mit der 1 ml-Poros 20 RC-Säule (PerSeptive Biosystems, Wiesbaden) eine RP-Säule sehr hoher Effizienz und Trennleistung zur Verfügung. Die gesammelten Fraktionen wurden ebenfalls im SDS-Gel auf Reinheit und Molekulargröße überprüft (B.4.4.3.), die ACBP-haltigen homogenen Fraktionen vereinigt, im Vakuum (Speed-Vac, Savant) getrocknet, in 1 mM DTT aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

#### 4.3.3. Identitätsüberprüfung

Die Identität der gereinigten rekombinanten Enzyme wurde durch eine Molekularmassenbestimmung mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie sowie einer Proteinsequenzierung des N-Terminus (Dr. A. SCHIERHORN, Dr. P. RÜCKNAGEL, Max-Planck-Arbeitsgruppe 'Enzymologie der Proteinfaltung') bestätigt.

#### 4.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

#### 4.4.1. Elektrophoretische Auftrennung im SDS-Polyacrylamid-Gel

Für die Proteinauftrennung wurde eine vertikale diskontinuierliche SDS-PAGE-Analyse nach Laemmli (LAEMMLI 1970) durchgeführt. Dazu wurde ein 17,5 %iges Trenngel (17,5 % Acrylamid; 400 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1 % SDS; 0,05 % Ammoniumpersulfat; 0,005 % TEMED) in eine PHERO-Minivert-Kammer (Biotech-Fischer) gegossen. Dies wurde mit einem 4 %igen Sammelgel (4 % Acrylamid; 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1 %SDS; 0,05 % Ammoniumpersulfat; 0,005 % TEMED) überschichtet. Die Proben wurden mit 2-3 V Laemmli-Puffer versetzt und 10 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und aufgetragen. Als Größenmarker wurde eine Mischung folgender Proteine verwendet: Trypsin-Inhibitor 6.5 kDa, Cytochrom C 12.5 kDa, Trypsin-Inhibitor 21.0 kDa, Carboanhydrase 29 kDa, Ei-Albumin 45.0 kDa, BSA 67.0 kDa und Phosphorylase B 92.5 kDa. Die Auftrennung erfolgte bei 30 V im Sammelgel und 60 V im Trenngel.

#### 4.4.2. Coomassie-Färbung

Die Kontrollproben, die vor und 3 h nach der Zugabe von 1 mM IPTG entnommen und nach B.4.2.2. aufgearbeitet worden waren, wurden im SDS-Gel aufgetrennt. Hierbei waren die aufgetragenen Proteinmengen ausreichend für eine Coomassie-Färbung. Dazu wurde das Gel nach erfolgter Auftrennung mindestens 30 min in Coomassie-Färbelösung (42,5 % Ethanol, 10 % Essigsäure, 5 % Methanol, 2 % Coomassie-Brilliantblau R-250, 0,5 % Coomassie-Brilliantblau G-250) eingelegt und bis zur gewünschten Farbintensität mit Entfärber (45 % Methanol, 10 % Essigsäure) gewaschen. Zur Konservierung wurden die Gele 30 min mit einer Trocknungslösung (40 % Methanol, 10 % Essigsäure, 6 % Glycerol) behandelt, in Cellophan-Folie (Biometra) eingespannt und luftgetrocknet.

#### 4.4.3. Silberfärbung

Zum Nachweis geringerer Proteinmengen oder von Verunreinigungen in höher konzentrierten Proteinproben wurden die SDS-Gele durch Silberfärbung detektiert, was die Empfindlichkeit entscheidend erhöhte. Dies war bei der Kontrolle der Fraktionen nach Auftrennung über Anionentauscher- bzw. RP-Säulen und bei der Überprüfung von Molekulargröße und Reinheit der gereinigten rekombinanten Proteine der Fall. Dazu wurden die SDS-Gele entsprechend der von Heukeshoven (HEUKESHOVEN und DERNICK, 1985) beschriebenen Methode 1 h in eine Fixierungslösung (50 % Methanol, 12 % Essigsäure, 0,02 % Formaldehyd) eingelegt, 3x20 min in 50 % Ethanol gewaschen und für 1 min mit 0,02 % Natriumthiosulfat behandelt. Nach mehrmaligem Spülen mit Wasser wurde das Gel 20 min imprägniert (0,2 % Silbernitrat, 0,025 % Formaldehyd) und erneut mit Wasser gespült. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit einer Entwicklerlösung (6 % Natriumcarbonat, 0.5 % Natriumthiosulfat, 0,002 % Formaldehyd), wobei die Reaktion nach Erreichen der gewünschten Intensität mit 50 % Methanol / 12 % Essigsäure abgestoppt wurde. Die Konservierung der Gele erfolgte analog der für die Coomassie-Färbung beschriebenen Methode (B.4.4.2.).

#### 4.5. Qualitativer Ligandenbindungstest

Zur Überprüfung der Funktionalität der rekombinanten Proteine ACBP3 und ACBP4 sollte ihre Fähigkeit zur Bindung des Liganden Palmitoyl-CoA getestet werden. Ausgenutzt wurde dabei eine Änderung des Isoelektrischen Punktes, wobei das Holo-Protein nach Bindung des Liganden einen IP-Shift von ursprünglich pH 5,4 in den stark sauren Bereich hin zu ca. pH 3,5 erfährt. Dieser Shift läßt sich bei der Isoelektrofokussierung im Acrylamidgel detektieren.

Dazu wurden die Proteinproben nach der RP-FPLC-Reinigung und Trocknung in 1 mM DTT aufgenommen und bei 280 nm spektrophotometrisch vermessen. Zur annähernden Konzentrationsbestimmung wurde ein mit dem *Protparam*-Programm berechneter Extinktionskoeffizient von  $E_{280nm} = 15220 \text{ mol/l}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  zugrunde gelegt.

Zur Bestimmung des IP vor und nach der Bindung eines Liganden wurden je Protein 2 Proben getestet. Dabei wurden jeweils 1,5  $\mu$ g Protein mit 10  $\mu$ l 10 mM KHPO<sub>4</sub> pH 7 versetzt und im Vakuum getrocknet. Der Positiv-Probe wurden 5  $\mu$ l 100  $\mu$ M Palmitoyl-CoA, der Negativ-Probe 5  $\mu$ l Wasser zugesetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem Isoelektrofokussierungsgel im Bereich pH 3 bis pH 9 unter Verwendung des PHAST-Gel-Systems (Pharmacia). Dabei wurde das PhastGel IEF 3-9 Gel in der Apparatur auf 15°C vorgekühlt und 4  $\mu$ l der mit Wasser bzw. Palmitoyl-CoA inkubierten Proteinproben aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 10 mA bis zum Erreichen von 900 AVh. Das PHAST-Gel wurde entsprechend B.4.4.2. gefärbt und detektiert.

#### 5. Gerichtete Mutagenese der Aminosäuren 19 und 23 in ACBP3 und ACBP4

#### 5.1. Site-directed Mutagenesis

# 5.1.1. Ableitung von Oligonukleotidprimern zur gezielten Mutation einzelner Aminosäuren

Aus dem Sequenzvergleich der cDNA-Sequenzen acbp3 und acbp4 sowie ihrer korrespondierenden Proteine ACBP3 und ACBP4 (Abb. C.6. und C.7.) wurden Oligonukleotidprimer so abgeleitet, daß durch ihre Anlagerung die jeweilige cDNA-Sequenz gezielt verändert wurde, um damit je Primer jeweils eine Aminosäure im resultierenden Protein zu mutieren. Die einzigen signifikanten Sequenzunterschiede zwischen den beiden Isoformen abgesehen vom C-Terminus liegen dabei, wie in den oben genannten Abbildungen dargestellt, in den Aminosäurepositionen 19 und 23. Das Protein ACBP3 weist in Position 19 ein N (Asparagin) sowie in Position 23 ein A (Alanin) auf. Diese Aminosäuren sollten sukzessive in die entsprechenden Aminosäuren des Proteins ACBP4 überführt werden, wobei in Position 19 ein S (Serin), in Position 23 hingegen ein E (Glutaminsäure) eingeführt wurde. Umgekehrt dazu sollten die Aminosäuren 19 und 23 des Proteins ACBP4 in die jeweilig entsprechenden ACBP3-Aminosäuren mutiert werden. Durch Kombination der jeweiligen mutierten bzw. unveränderten Primer ließen sich die Einzelmutanten ACBP3-N19S, ACBP3-A23E, ACBP4-S19N und ACBP4-E23A sowie die Doppelmutanten ACBP3-N19S,A23E und ACBP4-S19N,E23A generieren und auf ihre Spezifität bei der Ligandenbindung untersuchen.

Die abgeleiteten Primer wurden so gewählt, daß die jeweiligen Primerpaare lückenlos aneinandergrenzende Sequenzabschnitte erfaßten, wobei das erste Oligonukleotid als reverser Primer und das angrenzende Oligonukleotid als direkter Primer fungierte. Somit erfolgte die Amplifikation des Plasmids ausgehend vom hinteren direkten Primer das gesamte Plasmid umlaufend zum vorderen reversen Primer und lieferte ein offenkettiges doppelsträngiges Produkt, das durch Ligation wieder in das zirkuläre Plasmid überführt werden konnte. Dieses Plasmid entsprach damit vollständig dem als Matrix verwendeten Originalplasmid bis auf die durch die mutierte Primersequenz eingefügten Veränderungen. Bei Verwendung eines mutierten und eines der originalen Sequenz entsprechenden Primers konnten Einzelmutationen generiert werden, während die Verwendung zweier mutierter Primer Doppelmutanten ergab.

5.1.2. PCR zur Einführung von Einzel- und Doppelmutationen

Die Durchführung der gerichteten Mutagenese erfolgte in Anlehnung an die von Fisher beschriebene Vorgehensweise (FISHER und PEI 1997).

Als Matrix für die PCR zur Einführung gerichteter Mutationen wurden die jeweiligen pET3-Konstrukte der beiden Isoformen acbp3 und acbp4 genutzt (Konstrukte siehe B.4.1.). Dadurch war gewährleistet, daß die Mutanten nach erfolgter Mutagenese sofort im Expressionsvektor vorlagen. Zur Mutagenese-PCR wurde im Gegensatz zur Routine-PCR eine Turbo-Pfu-Polymerase (Stratagene) eingesetzt, die bei einer wesentlich geringeren Lesegeschwindigkeit eine ebenfalls wesentlich geringere Fehlerquote aufweist und im Vergleich zur Taq-Polymerase bedeutend längere DNA-Abschnitte amplifizieren kann. Ein weiterer Vorteil bestand in der Eigenschaft der Pfu-Polymerase, keine 3'A-Überhänge sondern glatte Enden zu generieren, was die

spätere Re-Ligation der Enden vereinfachte. Folgender Ansatz kam bei der Mutagenese-PCR zur Anwendung:

25 ng	Plasmid (pET3-acbp3 bzw. pET3-acbp4)
je 1 µM	direkter und reverser Primer
250 μΜ	dNTP (Boehringer)
4 mM	MgCl <sub>2</sub>
1 x	Turbo-Pfu-Puffer (Stratagene)
2 U	Turbo-Pfu (Stratagene)
Wasser zu 50	ul

Auf Grund der langsameren Lesegeschwindigkeit der Pfu-DNA-Polymerase gegenüber der routinemäßig angewendeten Taq-Polymerase mußte eine längere Elongationszeit im PCR-Zyklus berücksichtigt werden. Da die mutierten Primer von der Matrixsequenz abwichen und damit nicht mit höchster Effektivität binden konnten, mußte die Primeranlagerungstemperatur relativ niedrig gewählt werden. Um trotz der Größe des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes (ca. 5 kb), der niedrigen Anlagerungstemperatur und der erhöhten MgCl<sub>2</sub>-Konzentration die Fehlerrate relativ gering zu halten, wurden nur 16 Zyklen durchgeführt. Die Mutagenese-PCR wurde daher nach folgendem Schema durchgeführt:

5 min 94°C; 16 x (1 min 94°C; 1,5 min 46°C; 15 min 72°C); 5 min 72°C

Der PCR-Ansatz wurde durch Auftrennung von 5  $\mu$ l des Ansatzes im Agarosegel überprüft. Bei nachweislicher Amplifikation mußten die im Ansatz verbliebenen Proteine entfernt werden. Dazu wurde die Proben zunächst mit 20  $\mu$ l einer 1:1 Phenol/Chloroform-Mischung ausgeschüttelt und abzentrifugiert, verbliebene Phenolspuren durch erneute Extraktion mit 30  $\mu$ l reinem Chloroform entfernt und danach die Nukleinsäuren mit 700  $\mu$ l reinem Ethanol ausgefällt. Nach 15 min Inkubation bei -20°C wurden die PCR-Produkte für 10 min bei 13000 U/min abzentrifugiert, im Vakuum getrocknet und in 20  $\mu$ l Wasser aufgenommen.

#### 5.1.3. Modifikation der mutierten PCR-Produkte

Die offenkettigen PCR-Produkte mußten vor der Transformation in *E. coli*-Zellen wieder in zirkuläre Plasmide überführt werden. Die dafür erforderliche Ligation benötigte PCR-Produkte mit 3'-phosphorylierten Enden. Die von der Pfu-DNA-Polymerase generierten Produkte mußten daher durch Inkubation mit T4-Polynukleotid-Kinase und ATP phosphoryliert werden.

Der nach B.5.1.2. gereinigte PCR-Ansatz wurde dazu mit 1 U der T4-Polynukleotid-Kinase (NEB) und 2  $\mu$ l 10xT4-Ligasepuffer (Biolabs) (entsprach einer Endkonzentration von 1 mM ATP) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Diesem Ansatz wurden dann 3 U T4-DNA-Ligase (Biolabs) zugefügt, die in einer Über-Nacht-Inkubation bei 16°C die Re-Ligation der mutierten PCR-Produkte ermöglichte.

Da der so behandelte PCR-Ansatz natürlich auch noch die 25 ng der originalen, nicht mutierten Matrix-Plasmide enthielt, mußten diese entfernt werden, um eine irrtümliche Transformation nicht mutierter Sequenzen zu vermeiden. Dazu wurde die Eigenschaft des Restriktionsenzyms DpnI genutzt, selektiv nur methylierte DNA zu schneiden. Da nur *in vivo*, in diesem Falle in *E. coli*, vermehrte DNA methyliert ist,

nicht jedoch die durch PCR *in vitro* amplifizierten mutierten Produkte, konnten durch den Einsatz von DpnI selektiv die ursprünglichen aus *E. coli* gewonnenen Matrix-Plasmide verdaut werden. Dazu wurde der Ligationsansatz für 15 min bei 80°C hitzeinaktiviert, um eine spätere Religation der DpnI-Fragmente durch verbliebene Ligaseaktivität zu verhindern.

Nach Zugabe von 40 U DpnI (NEB) und Inkubation bei 37°C für mindestens 2 h konnte der Ansatz in hochkompetente One Shot TOP10-Zellen (Invitrogen) transformiert werden.

### 5.1.4. Transformation der mutierten pET3-Konstrukte

Die One Shot TOP10-Zellen (Invitrogen) dienten hier nur als Zwischenwirt, da sie sich zwar auf Grund ihrer hohen Kompetenz zur Transformation auch geringer Mengen rekombinanter mutierter PCR-Produkte eigneten, jedoch nicht zur Expression der pET3-Konstrukte befähigt waren.

Dazu wurden 50 µl hochkompetenter One Shot TOP10-Zellen mit 5 µl der nach B.5.1.3. modifizierten PCR-Produkte versetzt und 30 min auf Eis aufbewahrt. Nach 1,5 min Hitzeschock bei 42°C und 1,5 min Abkühlung auf Eis wurden 400 µl LB-Medium zugesetzt und der Ansatz 1 h bei 37°C geschüttelt. 300 µl davon konnten dann auf LB-Amp-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert werden. Die erhaltenen Kolonien wurden durch eine Kontroll-PCR verifiziert und für eine DNA-Midiprep kultiviert (siehe B.1.1.1.).

Nach Verifizierung der erfolgreichen gerichteten Mutagenese durch Sequenzierung der Konstrukte (B.5.1.6.) mußten die Plasmide zur Überexpression der Mutanten in BL21(DE3)-pLyS-Zellen (Stratagene) überführt werden. Dazu wurde 1  $\mu$ l der verifizierten Midiprep mit 100  $\mu$ l kompetenter BL21(DE3)-pLyS-Zellen (siehe B.5.1.5.) inkubiert und wie oben für die One Shot TOP10-Zellen beschrieben prozessiert. Zum Ausplattieren der Kulturen wurden hier jedoch LB-Ampicillin-Chloramphenicol-Agarplatten verwendet, da die BL21(DE3)-pLyS-Zellen eine zusätzliche Chloramphenicol-Resistenz aufwiesen.

#### 5.1.5. Kompetente BL21(DE3)-pLyS-Zellen

Die zur Expression der mutierten pET3-Konstrukte benötigten BL21(DE3)-pLyS-Zellen wurden wie folgt für die Transformation von Plasmid-DNA vorbereitet. Eine Kolonie der entsprechenden Zellen wurde über Nacht in 5 ml LB-Chloramphenicol-Medium bei 37°C geschüttelt. 200  $\mu$ l davon wurden auf 30 ml frisches Medium überimpft und bis zu einer optischen Dichte von A<sub>600</sub> = 0,5 kultiviert. Diese Kultur wurde 10 min auf Eis abgekühlt und für 7 min bei 1100 g abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 15 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> gewaschen, für weitere 30 min auf Eis aufbewahrt und erneut bei 1100 g abzentrifugiert. Die Zellen konnten dann in 1 ml CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und nach 30 min Inkubation auf Eis aliquotiert werden. Die Aliquots konnten bis zur Transformation der Konstrukte für 1-2 Tage bei +4°C aufbewahrt werden, wurden jedoch vorzugsweise sofort verwendet, um eine höhere Effizienz der Transformationen zu gewährleisten.

#### 5.1.6. CEQ-Sequenzierung der mutierten Konstrukte

Die Sequenzierung der Mutanten erfolgte in der Universität Odense unter Verwendung des CEQ-Systems (Beckman/Coulter). Entsprechend dem Protokoll des CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing-Kits wurden ca. 400 ng der Plasmide mit 3,2 pmol T7-Sequenzierprimer versetzt und nach Zugabe der CEQ-Dye Terminator-Reagenzien nach folgendem PCR-Schema amplifiziert:

#### 30 Zyklen: 95°C 20 sec, 50°C 20 sec, 60°C 4 min

Nach Vorschrift des Herstellers wurden die Sequenzierreaktionen abgestoppt und nach Zugabe von 1 mg/ml Glycogen mit reinem Ethanol ausgefällt. Nach Waschen der Nukleinsäuren mit 70 % Ethanol und Trocknung im Vakuum wurden die Proben in 40  $\mu$ l deionisiertem Formamid aufgenommen und standen damit für die Auftrennung auf dem CEQ2000-Reader zur Verfügung. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit den in B.1.5. angegebenen Programmen.

#### 5.2. Überexpression der Einzel- und Doppelmutanten

Die Überexpression und spätere Reinigung aller generierten Mutanten sowie der ursprünglichen rekombinanten Proteine ACBP3 und ACBP4 erfolgte im Molekularbiologischen Institut der Universität Odense in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. J. Knudsens. Da sich die hierbei angewendeten Methoden von der in B.4.2. dargestellten Vorgehensweise unterschieden, soll hier noch einmal auf diese Methoden eingegangen werden.

Zur Expression der jeweiligen rekombinanten Proteine wurde eine Kolonie der das pET3-Konstrukt enthaltenden BL21(DE3)-pLyS-Zellen in einem 5 l-Standkolben mit 11 *Rich Media* (100 µg/ml Ampicillin, 40 µg/ml Chloramphenicol) bei 37°C und 220 U/min bis zu einer optischen Dichte von  $A_{600} = 0,6$  inkubiert. Die Überexpression wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert und die Inkubation über Nacht, mindestens jedoch 6 h, fortgeführt. Die Induktionskultur wurde bei 3000 U/min abzentrifugiert, in 50 ml 30 mM Tris pH 9 aufgenommen und bei -20°C bis zur Aufarbeitung gelagert.

Zur Überprüfung der Expression wurden 1 ml der Kultur direkt vor sowie 5 h nach der Induktion entnommen, bei 600 nm spektrophotometrisch vermessen und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde entsprechend den Herstellerangaben in 1xPHAST-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C denaturiert. Dabei wurde das Pellet von 1 ml einer Zellsuspension mit einer optischen Dichte von  $A_{600} = 1,5$  in 50 µl dieses Puffers resuspendiert. Bei Vorliegen anderer Volumina oder Zelldichten wurde die Puffermenge entsprechend angepaßt.

4 μl der so vorbereiteten Proben wurden auf ein kontinuierliches 20 %iges PHAST-Gel aufgetragen und bei 10 mA und Kühlung auf 15°C aufgetrennt. Als Größenmarker stand der Low Weight Proteinmarker (Serva) mit Banden bei 6,5 kDa, 12,2 kDa, 17 kDa, 29 kDa sowie 43 kDa zur Verfügung. Als Vergleichsprobe wurde rekombinantes bovines ACBP verwendet. Die Coomassie-Färbung erfolgte wie in B.4.4.2. beschrieben.

# 5.3. Reinigung der rekombinanten ACBP-Mutanten und Isoformen

# 5.3.1. Zellaufschluß

Die bei -20°C gelagerten induzierten Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Da die hier verwendeten BL21(DE3)-pLyS-Zellen sehr fragil sind, war schon dieser Frier-Tau-Schritt für eine weitgehende Lyse der Zellen ausreichend. Die dabei freigesetzte genomische DNA der *E. coli*-Zellen konnte eine weitere Proteinaufarbeitung erschweren und wurde daher durch Zusatz von 7  $\mu$ l Benzonase-Lösung (250 U/ $\mu$ l, Merck) und Inkubation für 30 min bei 37°C verdaut. Für einen vollständigen Zellaufschluß wurden die Proben mit 5x30 sec Ultraschallimpulsen auf Eis behandelt.

Der Hauptanteil an Fremdprotein wurde durch eine Essigsäure-Fällung abgetrennt. Dabei wurde den Ultraschall-behandelten Proben Eisessig bis zu einer Endkonzentration von 1 mM Essigsäure zugesetzt. Zur Stabilisierung der Proteine wurden reduzierende Bedingungen durch Zugabe von 1 mM DTT geschaffen. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur unter Einsatz eines Magnetrührers bei 400 U/min wurden die Proben 30 min bei 15000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 10 M NaOH auf einen pH-Wert von 7 eingestellt und erneut 30 min bei 15000 U/min abzentrifugiert. Das Zentrifugat stand danach der weiteren chromatographischen Auftrennung zur Verfügung.

# 5.3.2. Gelfiltration

Zur Durchführung einer Gelfiltration wurden die nach B.5.3.1. vorgereinigten Proben über Nacht auf einer Sephadex-G50-Säule aufgetrennt (Sephadex-G50 (superfine) 300 ml, Pharmacia). Als Laufpuffer kam 10 mM Tris pH 7,2 bei einer Flußrate von 72 ml/h und einer Temperatur von +4°C zum Einsatz. Es wurden Fraktionen von 12 ml aufgefangen, im 20 %igen PHAST-Gel aufgetrennt und detektiert (siehe B.5.2.).

Die ACBP-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und durch eine Trichloressigsäure-Fällung eingeengt, da das nach der Gelfiltration erhaltene Volumen für eine weitere Auftrennung über FPLC-Säulen zu groß war. Dazu wurde den vereinigten Fraktionen frisch hergestellte 50 %ige TCA-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 5 % TCA unter ständigem Rühren zugesetzt. Nach 30 min intensiven Rührens wurden die Proben 20 min bei 13000 U/min abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit 50 ml kalter 5 %iger TCA-Lösung gespült und erneut abzentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde unter Verwendung von 50 ml kalter 10 mM TCA-Lösung wiederholt. Das so behandelte Präzipitat konnte danach in 30 mM Tris aufgenommen werden, bis der pH-Wert 7,2 betrug. Nach Zugabe von DTT bis zu einer Endkonzentration von 100 mM wurde der Ansatz erneut bei 13000 U/min abzentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen, wonach die Proben für eine FPLC-Auftrennung zugänglich waren.

#### 5.3.3. Anionenaustauschchromatographie (FPLC)

Für eine weitere Aufreinigung der Proteinproben wurde als starker Anionenaustauscher eine QSepharose-Säule genutzt (QSepharose Fast Flow 20 ml, Pharmacia). Dabei wurde 10 mM Tris pH 7,2 als Laufpuffer bei einer Flußrate von 4 ml/min bei Raumtemperatur eingesetzt und die an die Säule gebundenen Proteine mit einem Gradientenpuffer von 50 mM Tris / 400 mM NaCl pH 7,2 nach folgendem Programm eluiert:

15 min	0 % Gradientenpuffer
10 min	0-10 % Gradientenpuffer
40 min	10-40 % Gradientenpuffer
10 min	40-100 % Gradientenpuffer
10 min	100 % Gradientenpuffer
10 min	100-0 % Gradientenpuffer

Es wurden Fraktionen von 4 ml aufgefangen, den aufgezeichneten Peaks der Proteinabsorption bei 280 nm zugeordnet und im 20 %igen PHAST-Gel getestet. Aliquots der gesammelten Fraktionen der jeweiligen Absorptionspeaks wurden zur Verifizierung der Molekularmassen durch RP-HPLC aufgearbeitet (B.5.3.5.). Die als intakte, den theoretischen Massen entsprechende homogene Proteine identifizierten Fraktionen mußten vor der weiteren Verwendung entsalzt werden.

#### 5.3.4. Entsalzen der Proteinproben

Die vereinigten Fraktionen der durch Massenspektrometrie identifizierten Proteinaufarbeitungen wurden über eine Desalt-Säule (Sephadex G-25 Superfine 25 ml, Pharmacia) entsalzt. Dabei wurden die Proben mit einer Flußrate von 5 ml/min aufgetragen und mit Wasser eluiert. Die so zur Homogenität gereinigten Proteinproben wurden durch Gefriertrocknung zur Trockne eingeengt und in 1 mM DTT-Lösung aufgenommen. Die Konzentration dieser Proben wurde durch spektrophotometrische Vermessung bei 280 nm bestimmt, wobei ein Extinktions-koeffizient von 15220 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> zugrunde gelegt wurde.

#### 5.3.5. *Reversed Phase*-HPLC

Aliquots der nach der Anionenaustauschchromatographie aufgefangenen Fraktionen wurden durch die RP-HPLC für eine massenspektrometrische Analyse vorbereitet. Dazu wurden sie über eine C18-Säule (Jupiter C18, Phenomenex) unter Verwendung von 10 % Acetonitril/0,05 % Trifluoressigsäure als Laufpuffer und einem Gradienten von 90 % Acetonitril/0,05 % Trifluoressigsäure bei einer Flußrate von 1 ml/min nach folgendem Programm aufgetrennt:

10 min	5 % Gradientenpuffer
30 min	5-50 % Gradientenpuffer
5 min	50-80 % Gradientenpuffer
2 min	80 % Gradientenpuffer
1 min	80-5 % Gradientenpuffer
10 min	5 % Gradientenpuffer

Die bei der Absorptionsaufzeichnung bei 215 nm detektierten Peaks wurden aufgefangen, durch Gefriertrocknung zur Trockne eingeengt und einer massenspektrometrischen Analyse unterworfen. Die Bestimmung der Molekulargewichte durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurde freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Prof. Peter Højrup, Universität Odense, durchgeführt.

#### 6. in vitro-Liganden-Bindungstest

Durch den *in vitro*-Bindungstest sollten für verschiedene ACBP-Isoformen und Mutanten die Dissoziationskonstanten für bestimmte Liganden festgestellt werden. Dabei sollte besonders auf die Rolle der Aminosäuren in Position 19 und 23 und deren Bedeutung für die Spezifität des Proteins gegenüber gesättigten bzw. ungesättigten Fettsäure-CoA-Estern eingegangen werden.

#### 6.1. Der Biosensor-Test

Bisher wurde die Bestimmung der Dissoziationskonstanten von ACBP und seinen Liganden vor allem durch Mikrokalorimetrie, einer sehr zeitund materialaufwendigen Titrationsmethode, durchgeführt. Dabei waren jedoch nur Rezeptor-Liganden-Beziehungen innerhalb eines gewissen Bereichs bestimmbar (siehe A.4.1.). War die Affinität des untersuchten Proteins zu seinen Liganden zu groß, d.h. die Dissoziationskonstante zu klein, lieferte diese Methode keine auswertbaren Resultate mehr. In der Arbeitsgruppe Prof. Knudsens, Universität Odense, wurde nun eine neue Methode entwickelt, die in dieser Arbeit erstmalig zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten von ACBPs etabliert wurde (KNUDSEN, persönliche Mitteilung).

Hierbei wurde die Konkurrenz zweier ACBPs bekannter Konzentration um den jeweiligen Liganden mit ebenfalls genau bestimmter Konzentration ausgenutzt. Das eine ACBP war dabei die zu untersuchende Isoform bzw. Mutante, während es sich bei dem zweiten Protein um den eigentlichen "Biosensor" handelte.

Durch chemische Modifikation wurde rekombinantes bovines ACBP in ein bei 390 nm absorbierendes fluoreszierendes Protein umgewandelt, welches nach Bindung eines Fettsäure-CoA-Esters verstärkt bei einer Wellenlänge von 460 nm emittierte. Aus dem Verhältnis der Emissionen zum einen bei Abwesenheit eines Liganden und zum anderen bei vollständiger Sättigung des Biosensors durch einen Überschuß an Liganden ließen sich die für die Berechnung der Dissoziationskonstante des Biosensors nötigen Werte ermitteln (siehe B.6.2.).

Nach Ermittlung der Dissoziationskonstante des Biosensors für den jeweiligen Liganden konnte der Biosensor zur Bestimmung der Konzentration an freiem Acyl-CoA genutzt werden, ein Wert, der bei Anwesenheit eines weiteren ACBPs im Überschuß maßgeblich von dessen Affinität zum Liganden abhing. Ist also die Affinität des zu untersuchenden ACBPs zum Liganden sehr hoch, wird weniger freies Acyl-CoA im Reaktionsansatz verbleiben und die Emission des Biosensors ebenfalls geringer sein, während bei geringerer Affinität, also höherer Dissoziationskonstante, des ACBPs zum Liganden mehr freies Acyl-CoA verfügbar ist und der Biosensor weitaus stärker bei 460 nm emittieren wird.

Der Biosensor-Test ist also eine Gleichgewichtsreaktion, wobei zwei Proteine, der Biosensor mit bekannter Dissoziationskonstante und das zu bestimmende ACBP mit unbekannter  $k_D$ , um die Ligandenbindung konkurrieren. Die nach Anregung bei 390 nm im Fluorometer gemessene Emissionsintensität bei 460 nm spiegelt dabei den Bindungszustand des Biosensors wider. Hohe Intensitäten zeigen einen hohen Grad an Liganden-gebundenem Biosensor an, die Affinität des zu untersuchenden ACBPs zum Liganden war also gering. Geringere Fluoreszenz bei 460 nm hingegen ist ein Indikator für eine niedrigere Konzentration an freiem Acyl-CoA, das zu untersuchende ACBP hatte also eine höhere Affinität zum Liganden. Erste Untersuchungen zu diesem Test wurden für die Messung von Acyl-CoA-Konzentrationen veröffentlicht (WADUM et al. 2002).

Der Test sollte auf seine Eignung zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten hin untersucht werden. Die dabei zur Anwendung gekommenen mathematischen Grundlagen werden im folgenden näher erläutert.

#### 6.2. Mathematische Grundlagen zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten

# 6.2.1. Allgemeine Grundlagen zur mathematischen Beschreibung der Ligandenbindung

Die mathematische Ermittlung der Dissoziationskonstanten im Biosensor-Test erfolgte in Anlehnung an die von der Arbeitsgruppe um Prof. Kleinfeld, La Jolla, USA, abgeleiteten Zusammenhänge. So wurde in den Arbeiten dieser Gruppe ein fluoreszenzmarkiertes FABP (ADIFAB) analog der hier für das Biosensor-ACBP beschriebenen Vorgehensweise generiert (RICHIERI et al. 1992). ADIFAB wurde dabei zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten verschiedener FABPs zu einer Reihe von freien Fettsäuren genutzt (RICHIERI et al. 1994). Dieser Test beruhte auf den gleichen Grundlagen wie der hier vorgestellte Biosensor-ACBP-Test, der einzige relevante Unterschied bestand in der Tatsache, daß ADIFAB nach Bindung eines Liganden in einer unterschiedlichen Wellenlänge emittiert und die Berechnung so die Emissionen bei zwei verschiedenen Wellenlängen berücksichtigen mußte, während der Biosensor nach Ligandenbindung nur verstärkt bei derselben Wellenlänge wie im ungebundenen Zustand emittierte. Die Berechnung vereinfachte sich dadurch, folgte ansonsten jedoch den für ADIFAB entwickelten Formeln (RICHIERI et al. 1994).

#### 6.2.2. Grundlagen zur Bestimmung der Biosensor-k<sub>D</sub>

Bei der Ligandenbindung an das Biosensor-Protein handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion, die durch die Gleichung [1] beschrieben werden kann, wobei [Bio<sub>frei</sub>] die Konzentration an freiem Biosensor, [CoA<sub>frei</sub>] die an freiem Acyl-CoA und [Bio<sub>geb</sub>] die an ligandengebundenem Biosensor darstellt. Es wird dabei von einer Bindungsstöchiometrie von 1:1 ausgegangen.

[1]  $[Bio_{frei}] + [CoA_{frei}] \Rightarrow [Bio_{geb}]$ 

Die Dissoziationskonstante ist dabei durch folgende Gesetzmäßigkeit gekennzeichnet:

$$[2] k_{D Bio} = ([Bio_{frei}] * [CoA_{frei}]) / [Bio_{geb}]$$

Die Werte für [CoA<sub>frei</sub>] und [Bio<sub>geb</sub>] konnten nach der von Grynkiewicz etablierten Methode wie folgt ermittelt werden (GRYNKIEWICZ et al. 1985, WADUM et al. 2002):

- [3]  $[CoA_{frei}] = k_{D Bio} * (F F_{min}) / (F_{max} F)$
- [4]  $[Bio_{geb}] = [Bio_{tot}] * (F F_{min}) / (F_{max} F_{min})$

Dabei stellt F die für die jeweilige Ligandenkonzentration gemessene Fluoreszenzintensität dar, wobei  $F_{min}$  die Fluoreszenz des Biosensors in Abwesenheit

jeglicher Liganden (Leerwert) und  $F_{max}$  die bei Ligandenüberschuß (Sättigungswert) angeben. [Bio<sub>tot</sub>] steht dabei für die Gesamtkonzentration an eingesetztem Biosensor.

Die Konzentration an freiem Biosensor ist wie folgt zu ermitteln:

$$[5] \qquad [Bio_{frei}] = [Bio_{tot}] - [Bio_{geb}]$$

Damit sind alle für die Ermittlung der  $k_D$  des Biosensors nötigen Werte (siehe [2]) durch Fluoreszenzmessung ermittelbar oder durch exakte Konzentrationsbestimmung der Testkomponenten zugänglich, während die  $k_{D Bio}$  für die Kurvenberechnung einer *best fit*-Kurve simuliert wurde (Datafit 7, Oakdale Engineering). Die für diese Simulation nötige Grundgleichung wurde von Wadum et al. hergeleitet (Gleichung (4) in WADUM et al. 2002).

Nach der Durchführung von mindestens zwei Testreihen pro Ligand wurden die Meßwerte gemittelt und auf Grundlage der oben dargestellten mathematischen Grundlagen eine nicht-lineare Regression durchgeführt. Dazu wurde das Datafit 7-Programm (Oakdale Engineering, Oakdale, USA) genutzt, mit dessen Hilfe die  $k_{D Bio}$  für die Titrationskurve mit der geringsten Standardabweichung berechnet werden konnte. Diese Software ermöglichte auch die Ermittlung eines Korrekturfaktors für die tatsächlichen Gesamtkonzentrationen an Biosensor und Ligand, die durchaus von der theoretischen abweichen konnten.

Nachdem die Dissoziationskonstanten für das Biosensor-Protein und die jeweiligen Liganden bestimmt worden waren, konnten diese Werte im eigentlichen Biosensor-Test für die Bestimmung der generierten rekombinanten ACBP-Isoformen und deren Mutanten genutzt werden.

#### 6.2.3. Grundlagen zur Bestimmung der ACBP-k<sub>D</sub> im Biosensor-Test

Die Dissoziationskonstanten verschiedener ACBP-Mutanten mit einer Auswahl unterschiedlicher Liganden sollte durch Transformation der Daten in einem Scatchard-Plot ermittelt werden. Der Scatchard-Plot bietet die Möglichkeit, eine nicht-lineare Bindungskurve zu linearisieren. Dabei wird die Konzentration an gebundenem Liganden auf der Abszisse und dieselbe Konzentration geteilt durch die Konzentration an freiem Liganden auf der Ordinate aufgetragen.. Dabei stellt der negative reziproke Anstieg dieser linearen Funktion die Dissoziationskonstante dar. Werden die Werte beider Achsen durch die Proteingesamtkonzentration geteilt, gibt der Schnittpunkt der Funktion mit der x-Achse die Bindungsstöchiometrie an, die in dem hier vorliegenden Fall 1:1 betragen sollte (MOTULSKY 1995). Zur Erstellung eines Scatchard-Plots mußten also die Konzentrationen an freiem und gebundenem Liganden für die einzelnen Meßreihen ermittelt werden.

Da beim eigentlichen Biosensor-Test zwei Proteine um die Ligandenbindung konkurrieren, stellt sich die Gleichgewichtsreaktion unter Berücksichtigung des zu untersuchenden ACBPs wie folgt dar:

 $[6] \qquad [Bio_{frei}] + [ACBP_{frei}] + [CoA_{frei}] \Rightarrow [Bio_{geb}] + [ACBP_{geb}]$ 

Die Konzentration an ACBP-gebundenem Liganden (x-Werte) ist wie folgt zu ermitteln:

[7] 
$$[ACBP_{geb}] = [CoA_{tot}] - [Bio_{geb}] - [CoA_{frei}],$$

wobei für [Bio<sub>geb</sub>] Gleichung [4] gilt und für [CoA<sub>frei</sub>] Gleichung [3] zur Anwendung kommt. Damit sind alle für die Scatchard-Darstellung nötigen Werte zugänglich.

Die Auftragung von  $[ACBP_{geb}] / [Prot_{tot}]$  gegen  $[ACBP_{geb}] / [Prot_{tot}] / [CoA_{frei}]$  sollte im Idealfall eine Gerade mit negativem Anstieg und einem Schnittpunkt mit der x-Achse bei x=1 ergeben, wobei der negative reziproke Anstieg die Dissoziationskonstante der ACBP-Mutante zum untersuchten Liganden darstellte.

#### 6.3. Präparation der Testkomponenten

#### 6.3.1. Präparation des in vitro-Biosensors

Auf die Eigenschaften des Biosensors wurde schon unter A.4.2. eingegangen. Im folgenden soll die Vorbereitung des fluoreszierenden ACBP-Derivats und sein Einsatz im Biosensortest beschrieben werden.

Das in Position 24 mutierte bovine ACBP wurde überexprimiert und chromatographisch zur Homogenität gereinigt. Nach chemischer Kopplung mit dem fluoreszierenden Agens wurde das erfolgreich modifizierte Protein über eine HPLC-Reinigung von unerwünschten Nebenprodukten befreit, zur Trockne eingeengt und in 200 mM Tris pH 7,2 aufgenommen (Methode und Protein patentgeschützt).

Die Endkonzentration des Biosensors im Testansatz betrug 0,5  $\mu$ M/l und war damit um eine Zehnerpotenz geringer als die des zu bestimmenden ACBPs. Durch diesen Überschuß an ACBP war gewährleistet, daß die Konzentration an freiem Acyl-CoA, die vom Biosensor bestimmt werden sollte, ausschließlich von der Affinität des ACBPs zum Liganden abhing.

#### 6.3.2. Präparation der Acyl-CoA-Ester

Zur Bestimmung der Spezifität der Ligandenbindung verschiedener ACBP-Isoformen und Mutanten wurde eine Vielzahl von Acyl-CoA-Estern generiert, um sowohl den Einfluß der Kettenlänge als auch den des Sättigungsgrades in der Alkylkette der Fettsäure-Coenzym A-Thioester auf die Affinität zu bestimmten ACBP-Isoformen zu untersuchen. Alle verwendeten ungesättigten Fettsäuren waren cis-konfiguriert. Zur Synthese der Ester standen folgende Fettsäuren zur Kopplung an Coenzym A zur Verfügung:

zur CoA-Kopplung verwendete Fettsäure	Trivialbezeichnung des Produkts	Kurzname	
-	Coenzym A	СоА	
Butansäure	Butyryl-CoA	C04:0-CoA	
Dodecansäure	Lauryl-CoA	C12:0-CoA	
Tetradecansäure	Myristyl-CoA	C14:0-CoA	
cis 9-Tetradecensäure	Myristenyl-CoA	C14:1-CoA	
Hexadecansäure	Palmityl-CoA	C16:0-CoA	
cis 9-Hexadecensäure	Palmitoleyl-CoA	C16:1-CoA	
Octadecansäure	Stearyl-CoA	C18:0-CoA	
cis 9-Octadecensäure	Oleyl-CoA	C18:1-CoA	
cis 9,12-Octadecandiensäure	Linoleyl-CoA	C18:2-CoA	

Tab. B.2.: Für den in vitro-Bindungstest generierte Liganden

Die kurzkettigen Produkte wurden zum Nachweis der intakten Funktionalität der rekombinanten ACBPs benötigt. Es sollte nachgewiesen werden, daß diese Proteine *in vitro* ebenso wie die ursprünglichen Isoformen *in vivo* selektiv mit langkettigen CoA-Estern interagieren und kurzkettige Produkte nur ineffektiv und unspezifisch gebunden werden.

Die Synthese der Acyl-CoA-Ester wurde wie folgt durchgeführt (nach RASMUSSEN et al. 1990):

- 100 μMol der Fettsäure wurden in 1 ml Dichlormethan unter Zusatz von 100 μMol Triethylamin 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde auf Eis mit 100 μMol Ethylenchloroformiat versetzt und 1 h auf Eis aufbewahrt. Das Lösungsmittel wurde unter Stickstoff-Begasung entfernt und der Rückstand in 1,5 ml *tert*-Butanol aufgenommen.
- 30 μMol Coenzym A wurden mit 1 ml 0,4 M KHCO<sub>3</sub> pH 8,4 und 0,5 ml Wasser versetzt und bei Raumtemperatur gehalten.
- Beide Lösungen, die aktivierte Fettsäure in *tert*-Butanol und das Coenzym A in KHCO<sub>3</sub>-Puffer, wurden bei Raumtemperatur vereinigt. Der Fortschritt der Reaktion wurde durch einen Nitroprussid-Natrium-Test auf freie SH-Gruppen ständig überprüft. Ließen sich keine freien SH-Gruppen mehr nachweisen (nach ca. 8-15 min), wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 M HCl bis zu einem pH-Wert von 3,5 abgestoppt.
- Der Reaktionsansatz wurde bis zur HPLC-Reinigung der jeweiligen Reaktionsprodukte bei -20°C aufbewahrt.

Die so generierten Thioester wurden einer HPLC-Reinigung unterworfen. Dazu wurde eine ODS Nucleosilsäule (10  $\mu$ M Partikelgröße, 4,6x250 mm) eingesetzt und die Ansätze unter Verwendung des Laufpuffers (20 % Acetonitril, 80 % 25 mM Ammoniumacetat pH 5,3) und des Gradientenpuffers (70 % Acetonitril, 30 % 25 mM Ammoniumacetat pH 5,3) nach folgendem Gradienten bei einer Flußrate von 1 ml/min aufgetrennt:

- 15 min 20 % Gradientenpuffer
- 25 min 20-80 % Gradientenpuffer
- 15 min 80 % Gradientenpuffer

Die Acyl-CoA-Ester wurden nach der HPLC-Reinigung im Vakuum eingeengt, um verbliebene Spuren des Laufmittels Acetonitril zu entfernen, in Wasser aufgenommen und unter Stickstoff bei -20°C aufbewahrt. Die Konzentration der Liganden wurde photospektrometrisch in einer Dreifachmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, wobei ein Extinktionskoeffizient von 14,7 mmol/l<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> zugrunde gelegt wurde.

# 6.3.3. Präparation der zu bestimmenden ACBPs

Die zu untersuchenden ACBP-Isoformen ACBP3 und ACBP4 sowie ihre jeweiligen Einzel- und Doppelmutanten wurden wie in B.5.3. beschrieben aufgereinigt und lagen in wäßriger Lösung vor. Aus den in B.6.3.1. genannten Gründen war die Endkonzentration an ACBP im Biosensor-Test mit 5  $\mu$ M zehnfach höher als die des Biosensors selbst. Die Konzentration an Liganden variierte dabei von 0-12  $\mu$ M, um die Extremwerte der Emissionsintensität des Biosensors bei Abwesenheit jeglicher Liganden sowie bei vollständiger Sättigung durch einen Überschuß an Liganden zu ermitteln.

#### 6.4. Durchführung des Biosensor-Testes

Zur Bestimmung der Ligandenspezifität standen folgende ACBP-Isoformen und Mutanten zur Verfügung (in Klammern ist jeweils der in den folgenden Abbildungen und Tabellen genutzte Kurzname des Proteins angegeben, der aus der Kurzbezeichnung für das ursprüngliche Wildtyp-Protein und der Angabe der durch Mutation eingeführten Aminosäure besteht):

ACBP3	D. lan. Wildtyp	(AC3-WT)
ACBP3-N19S	Einzelmutante	(AC3-S)
ACBP3-A23E	Einzelmutante	(AC3-E)
ACBP3-N19S,A23E	Doppelmutante	(AC3-SE)
ACBP4	D. lan. Wildtyp	(AC4-WT)
ACBP4-S19N	Einzelmutante	(AC4-N)
ACBP4-E23A	Einzelmutante	(AC4-A)
ACDDA SION E22A	D 1 / /	(LOLDIN)

Diese Proteine wurden jeweils mit den in Tab. B.2. aufgeführten Liganden getestet.

6.4.1. Bestimmung der Biosensor-k<sub>D</sub> für die zu verwendenden Liganden

Für jede getestete Acyl-CoA-Konzentration jedes einzelnen Liganden wurde eine Doppelbestimmung in zwei 200  $\mu$ l Ansätzen durchgeführt. Die Komponenten wurden in die Mikrotiterplatten pipettiert und mit einem einminütigen Standardschüttelprogramm im Fluorometer (Wallac Victor<sup>2</sup>V-Multilabel Counter, Perkin-Elmer) durchmischt. Danach erfolgte nach Anregung bei 390 nm die Messung der Fluoreszenzintensität bei 460 nm in 1 sec-Intervallen. Die Werte der parallelen Testreihen wurden gemittelt und zur Erstellung eines Konzentrations-Intensitäts-Diagramms genutzt. Die Ermittlung der  $k_D$  aus den gemessenen Intensitäten ist in B.6.2.2. erläutert.

Die Endkonzentrationen der einzelnen Komponenten zur Bestimmung der Biosensor- $k_D$  im 200 µl Ansatz waren:

Biosensor	0,5 µM
Puffer Tris pH 7,2	100 mM
Acyl-CoA	0-1,2 μM

6.4.2. Bestimmung der ACBP-Dissoziationskonstanten

Nachdem die Dissoziationskonstanten des Biosensors für jeden einzelnen Liganden bestimmt waren, konnte der Biosensor zur Vermessung der verschiedenen ACBP-Spezies verwendet werden. Dazu wurde ebenfalls für jede einzelne Ligandenkonzentration jedes einzelnen Liganden mit jedem der 8 zu testenden Proteine eine Doppelbestimmung in zwei 200 µl Ansätzen durchgeführt. Die Endkonzentrationen im Ansatz waren dabei:

Biosensor	0,5 µM
ACBP	5,0 µM
Puffer Tris pH 7,2	100 mM
Acyl-CoA	0-12 μM

Zur Erreichung des Sättigungszustandes mußte hierbei die zehnfache Menge an Acyl-CoA aufgewendet werden, da durch den Überschuß an ACBP auch die zehnfache Menge an Protein abzusättigen war. Bei einer theoretischen Bindungsstöchiometrie von 1:1 sollten dabei 5,5  $\mu$ M Acyl-CoA ausreichend sein. Es wurde jedoch mit einem weiteren Überschuß an Liganden gearbeitet, um das tatsächliche Erreichen des Sättigungszustandes sicherzustellen.

Die Durchführung der Messung entsprach den in B.6.4.1. dargestellten Bedingungen. Die mathematischen Grundlagen zur Berechnung der  $k_D$  aus den Meßwerten sind in B.6.2.3. dargestellt.

6.4.3. Bestimmung des Ligandenverlustes durch unspezifische Bindung an die Mikrotiterplatten

Da es sich bei den hier untersuchten Liganden hauptsächlich um langkettige und somit hydrophobe Fettsäureester handelt, mußte der Verlust an Ligand durch hydrophobe Gefäßwände und Pipettenspitzen unspezifische Bindung an berücksichtigt werden. Dazu wurde eine dreifache Versuchsreihe in einer Mikrotiterplatte für 15 min (die ungefähre Dauer einer Messung) inkubiert. Die erste Versuchsreihe wurde in eine frische Mikrotiterplatte überführt und vermessen, während die verbleibenden Reihen in der ursprünglichen Mikrotiterplatte weiter vermessen wurde. Dieser Versuch wurde wiederholt, wobei nun die erste und zweite Reihe in eine neue Mikrotiterplatte überführt wurden und die dritte Reihe im selben Gefäß verblieb. Aus den gemittelten Ergebnissen konnte der prozentuale Verlust sowohl durch Bindung an die Gefäßwand als auch durch wiederholte Messung ermittelt werden.

# C. Ergebnisse

#### 1. Screening zur Auffindung von cDNA-Sequenzen

Im folgenden sollen die Ergebnisse des cDNA-Bank-Screenings dargestellt werden. Die dabei erhaltenen Sequenzen sollen charakterisiert und später im Vergleich bereits bekannter analoger Sequenzen aus anderen Organismen betrachtet werden.

#### 1.1. Charakterisierung der Sonde zum Screening der cDNA-Bank

Als Sonde zum Screening zweier cDNA-Banken aus Proembryogenen Massen bzw. Blättern von *Digitalis lanata* EHRH. wurde ein von Dr. Martin Metzner generiertes PCR-Produkt mit hohen Homologien zu bereits bekannten ACBPs anderer Spezies verwendet (METZNER, persönliche Kommunikation). Die Sequenz ist in der folgenden Abbildung unter Vorbehalt angegeben, da einige Basenpaarungen nur ungenügend durch die Sequenzierungen aufgeklärt worden waren.

GAAGAATTCG AGGAACATGC TGAGAAAGCC AAGACCTTAC CTGAGAACAC TAGCAATGCG 60 AACAAGCTTA TCTTATATGG ACTTTACAAG CAAGCAACGG TTGGAAATGT CAACACAAGC 120 CGTCCAGGTG TGTTTAACAT GAGAGACAGG GCAAAGTGGG ATGCATGGAA 170

Abb. C.1.: Sequenz der 170 bp-Sonde zum Auffinden vollständiger ACBP-cDNA-Sequenzen für *Digitalis lanata* EHRH.

#### 1.2. Charakterisierung der verwendeten cDNA-Banken

Die zur Verfügung stehenden cDNA-Banken aus D. lanata EHRH. wurden entsprechend der in B.1.2. dargestellten Methoden charakterisiert. Dabei wurde für die aus PEMs gewonnene Bank ein Titer von  $1,48 \times 10^6$  pfu/µl ermittelt. Damit waren pro verwendeter 130 mm-LB-Agarplatte 20 µl einer 1:1000 Verdünnung der Originalbank erforderlich für eine ausreichende Plaquedichte. Die aus den Blättern einjähriger Digitalispflanzen erstellte cDNA-Bank hatte einen Titer von  $1.2 \times 10^{6} \text{ pfu/ul.}$ Um eine höhere Plaquedichte und damit eine höhere Wahrscheinlichkeit der Anwesenheit unterrepräsentierter cDNAs zu erreichen, wurden hier 40 µl einer 1:1000 Verdünnung eingesetzt.

#### 1.3. Isolierung von acbp3 aus der cDNA-Bank aus PEMs von D. lanata EHRH.

Die im Methodenteil B.1.1 bis B.1.5. beschriebene Vorgehensweise führte bei Verwendung des oben beschriebenen PCR-Fragments als Sonde und der cDNA-Bank aus PEMs von *D. lanata* EHRH. als zu durchsuchende Quelle zur Detektion von 9 positiven Primärsignalen, die durch eine Kontroll-PCR verifiziert und über Sekundärund Tertiärscreening bis zur entsprechenden Plasmid-DNA prozessiert wurden. Von diesen 9 positiv detektierten Klonen erwiesen sich 8 übereinstimmend als Sequenzen mit sehr hoher Homologie zu bekannten ACBP-cDNAs anderer Organismen und mit vollständiger Übereinstimmung zur Sequenz der verwendeten Sonde. Ein falsch positives Signal wurde nach Sequenzierung und Vergleich mit der EMBL-cDNA-Datenbank (*Blastn*) als putative ATP-Synthase-Untereinheit 9 erkannt. Die 8 putativen ACBP-Sequenzen wurden mit Hilfe des *ClustalW*-Programms miteinander verglichen und ihre Übereinstimmung festgestellt. Sie unterschieden sich nur in der Vollständigkeit und Länge der 3'- und 5'- untranslatierten Bereiche.

Da die abgeleitete Aminosäuresequenz dieser 8 Klone zwar vollständig mit der der verwendeten Sonde, nicht jedoch mit den von Martin Metzner gereinigten und nativen ACBP-Proteinfragmenten ACB1 DIGLA ansequenzierten und ACB2 DIGLA (METZNER et al. 2000) übereinstimmte, wurde die Sequenz unter dem Namen acbp3 und der Zugangsnummer DLA249833 in die EMBL-Datenbank eingetragen. In Abb. C.2. ist die vollständige cDNA-Sequenz mit ihrer abgeleiteten Aminosäuresequenz dargestellt. Mit Hilfe des Protparam-Programms wurden die theoretischen Eigenschaften des translatierten Proteins ACBP3 bestimmt. Dabei hat die vollständige cDNA-Sequenz acbp3 eine Länge von 528 bp, wovon 276 bp auf den kodierenden Bereich entfielen. Das korrespondierende Protein ACBP3 hatte damit eine Größe von 92 AS und ein theoretisches Molekulargewicht von 10,2 kDa (einschließlich des Start-Methionins). Der Isoelektrische Punkt wurde mit pI = 5.84berechnet (nach BJELLQVIST et al. 1993), was diesem Protein erstaunlich saure Eigenschaften prognostizierte, eine Eigenschaft, die auch schon bei der nativen Reinigung von ACBPs aus PEMs von Digitalis lanata EHRH. aufgefallen war (METZNER et al. 2000).

```
gcacgaggtggtttgagcgattgtcatcccaattttttatgaaattttaaaactattagaa-
                                            61
gcagatcacaaatccctagctgttacgaaagaaatcgaagaagaagaagaacagatgggtttg - 121
                                    M G L
aaggaagaattcgaagagcatgctgagaaagccaagaccttacctgagaacactagcaat - 181
K E E F E E H A E K A K T L P E N T S N
A N K L I L Y G L Y K Q A T V G N V N T
agccgtccaggtgtgtttaacatgagagacagggcaaagtgggatgcatggaaggctgtt - 301
S R P G V F N M R D R A K W D A W K A V
gaaggaaaatcccaggaggaagccatggctgattatatcacaaaagtgaagcagttgctg - 361
E G K S Q E E A M A D Y I T K V K Q L L
gaggaagctgctgctgcttgcttcctgttgattattattactttaattaaaatgcaattat - 421
E E A A A A A S C -
527
```

**Abb. C.2.:** Vollständige Sequenz des cDNA-Klons acbp3 und die Sequenz des korrespondierenden Proteins ACBP3. Startkodon und Stopkodon sind durch Fettdruck gekennzeichnet.

In Abb. C.3. ist der Vergleich der korrespondierenden Proteinsequenz ACBP3 mit dem von Martin Metzner N-terminal ansequenzierten nativen Protein ACB2\_DIGLA dargestellt.

ACB2 DIGLA	-ALKEEFEEHAEKAKTLPENTSSENKLTLYGLYKQATVGNV	40
ACBP3	MGLKEEFEEHAEKAKTLPENTSNANKLILYGLYKQATVGNVNTSRPGVFN	50

**Abb. C.3.:** Vergleich der Sequenzen des nativen Proteinfragmentes ACB2\_DIGLA (METZNER et al. 2000) und der korrespondierenden Aminosäuresequenz ACBP3 (durch ! werden Abweichungen in der AS-Sequenz beider Proteine angezeigt)

Wie in Abb. C.3. dargestellt wichen die Sequenzen des nativ gereinigten Proteins ACB2\_DIGLA und des neu aufgefundenen korrespondierenden Proteins ACBP3 in 4 von 40 sequenzierten Aminosäuren voneinander ab. Da unter den relativ stringenten Bedingungen des cDNA-Bank-Screenings wie oben beschrieben (Waschen der Membranen bei 5°C unter Hybridisierungstemperatur) keine weiteren Isoformen in der cDNA-Bank aus PEMs von *Digitalis lanata* EHRH. zu detektieren waren, wurde

eine weitere cDNA-Bank zur Suche herangezogen. Eine weniger stringente Screeningmethode unter Verwendung der PEMs-Bank erbrachte zu viele falsch positive Signale und wurde daher verworfen.

# 1.4. Isolierung von acbp4 aus der cDNA-Bank aus Blättern einjähriger *D. lanata* EHRH.-Pflanzen

Zur Auffindung weiterer ACBP-Sequenzen wurde nach den in B.1.1.-B.1.5. beschriebenen Methoden vorgegangen. Sie wurden jedoch dahingehend modifiziert, daß die Hybridisierungsbedingungen weniger stringent waren. Die Waschtemperatur lag dabei 10°C unter der Hybridisierungstemperatur (55°C statt der zuvor angewendeten 60°C), und es wurde ausschließlich mit dem weniger stringenten Puffer gewaschen. Zur Durchsuchung der hier verwendeten cDNA-Bank aus Blättern einjähriger D. lanata-Pflanzen wurde der kodierende Bereich der im ersten Screening gefundenen cDNA-Sequenz acbp3 als Sonde eingesetzt. Im Primärscreening konnten 29 positive Signale detektiert werden. Diese Signale wurden über Sekundär- und Tertiärscreening hinweg bis zum Erhalt der jeweiligen Plasmid-DNA prozessiert und sequenziert. Dabei erwiesen sich 25 dieser Klone übereinstimmend als die bereits zuvor detektierte acbp3-cDNA, während 3 falschpositive Klone für die im ersten Screening bereits als falschpositives Signal detektierte ATP-Synthase kodierten. Der verbleibende Klon wurde ebenfalls als ACBP sequenziert, seine Sequenz wich jedoch von der des acbp3-Klons ab. Damit war eine zweite Isoform von ACBP-cDNAs in Digitalis lanata gefunden. Da auch hier die korrespondierende Proteinsequenz von den nativen Proteinfragmenten abwich (Abb. C.4.), wurde dieser Klon mit acbp4 benannt und unter der Nummer DLA249833 in die EMBL-Datenbank eingestellt. Allerdings wurde in der abgeleiteten Proteinsequenz nur eine einzige Abweichung zur Sequenz des ansequenzierten nativen Proteins ACB1 DIGLA festgestellt. Das entsprach einer Abweichung von 3,3 % bei 30 ansequenzierten Aminosäuren. In der Abb. C.5. ist die vollständige cDNA-Sequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz dargestellt.

ACB1\_DIGLA -ALKDEFEEHAEKAKTLPENTSNENKLILYG------ 30 ACBP4 MALKDEFEEHAEKAKTLPESTSNENKLILYGLYKQATVGNVNTSRPGIFN---- 50 !

**Abb. C.4.:** Vergleich der Sequenzen des nativen Proteinfragmentes ACB1\_DIGLA (METZNER et al. 2000) und der von acbp4 abgeleiteten Aminosäuresequenz ACBP4 (durch ! werden Abweichungen in der AS-Sequenz beider Proteine angezeigt)

```
gcacgagcacaaatcgaaacacaaaagatggctttgaaggatgaatttgaggagcatgca -
                                                   60
                      MALKDEFEEHA
gagaaagccaagacattgccagagagtacctccaacgagaacaagctcattctctatgga - 120
E K A K T L P E S T S N E N K L I L Y G
ctatacaaacaagctacagttggaaatgtcaacaagccgtcctggtatattcaacatg - 180
L Y K Q A T V G N V N T S R P G I F N M
aaagacagggcaaagtgggatgcttggaaagctgtcgaaggaaaatcccaggaagaagcc - 240
K D R A K W D A W K A V E G K S Q E E A
atgggtgaatatatcacaaaggtgaagcaattgtgtgaagcagctactgcatcgagttga - 300
M G E Y I T K V K Q L C E A A T A S S
tcacctgaattacaacacaaattctgaaatattatggtgtttaaactttatcctccaatg - 360
ggaaataaattgtgtaaaaggctaacagcttaataacatttatatgtgcaagtgttattc - 480
tcttaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
                                                 - 502
```

**Abb. C.5.:** Vollständige Sequenz des cDNA-Klons acbp4 und die Sequenz des korrespondierenden Proteins ACBP4. Startkodon und Stopkodon sind durch Fettdruck gekennzeichnet.

Die Analyse der acbp4-Sequenz ergab eine Gesamtgröße von 502 bp, wovon 270 bp auf den kodierenden Bereich entfielen. Das korrespondierende Protein hatte damit eine Größe von 90 AS und ein theoretisches Molekulargewicht von 10 kDa (einschließlich des Start-Methionins). Der Isoelektrische Punkt wurde wie auch für das ACBP3-Protein prognostiziert mit pI = 5,84 berechnet. Es waren damit ähnliche Eigenschaften im Verlauf einer Proteinreinigung zu erwarten.

# 1.5. Vergleich der beiden cDNAs acbp3 und acbp4 und ihrer abgeleiteten Proteinsequenzen

Ein Vergleich der beiden putativen ACBP-Isoformen zeigt, wie ähnlich sie sich auf DNA- und Proteinebene sind. In Abb. C.6. ist ein mit *ClustalW* durchgeführter Vergleich beider cDNAs dargestellt. Übereinstimmungen in der Basensequenz sind mit \* gekennzeichnet, Stop- und Startkodon sind jeweils durch Fettdruck gekennzeichnet. Dabei wird deutlich, daß sich die Übereinstimmung vor allem auf den kodierenden Bereich bezieht, während sich die nicht-kodierenden Bereiche deutlich in Länge und Sequenz unterscheiden.

Der hohe Grad an Übereinstimmung der kodierenden Sequenzen (82 % Identität im offenen Leserahmen gegenüber 66 % bezogen auf die gesamte Sequenz) war einerseits die Grundlage zur Auffindung der zweiten cDNA unter Benutzung der ersten als Sonde, insofern also positiv, er stellte aber auch ein Problem hinsichtlich der Unterscheidbarkeit beider Transkripte dar. Die enge Verwandtschaft beider Sequenzen ist noch deutlicher erkennbar, wenn der Vergleich auf Proteinebene erfolgt. Im folgenden ist ein Vergleich der Aminosäuresequenzen dargestellt, der eine Identität der beiden abgeleiteten Proteine ACBP3 und ACBP4 von 84 % ergibt, wobei die Ähnlichkeit beider Proteine, die den Austausch homologer Aminosäuren berücksichtigt, sogar 92 % beträgt. Das Alignment beider Proteine ist in Abb. C.7. dargestellt. Dabei fällt auf, daß die einzigen nicht-homologen Abweichungen zwischen den beiden Proteinen im C-Terminus sowie den AS-Positionen 19 und 23 liegen.

acbp3 acbp4	GCACGAGGTGGTTTGAGCGATTGTCATCCCAATTTTTATGAAATTTTAAAACTATTAGA	60
acbp3 acbp4	AGCAGATCACAAATCCCTAGCTGTTACGAAAGAAATCGAAGAAGAAGAAGAACAG <b>ATG</b> GGTTT GCACGAGCACAAATCGAAACACAAAAG <b>ATG</b> GCTTT * * ******* * ** *******	120 35
acbp3 acbp4	GAAGGAAGAATTCGAAGAGCATGCTGAGAAAGCCAAGACCTTACCTGAGAACACTAGCAA GAAGGATGAATTTGAGGAGCATGCAGAGAAAGCCAAGACATTGCCAGAGAGTACCTCCAA ***** **** ** ****** ** ***********	180 95
acbp3 acbp4	TGCGAACAAGCTTATCTTATATGGACTTTACAAGCAAGCA	240 155
acbp3 acbp4	AAGCCGTCCAGGTGTGTTTAACATGAGAGACAGGGCAAAGTGGGATGCATGGAAGGCTGT AAGCCGTCCTGGTATATTCAACATGAAAGACAGGGCAAAGTGGGATGCTTGGAAAGCTGT ********* *** * ** ******* **********	300 215
acbp3 acbp4	TGAAGGAAAATCCCAGGAGGAAGCCATGGCTGATTATATCACAAAAGTGAAGCAGTTGCT CGAAGGAAAATCCCAGGAAGAAGCCATGGGTGAATATATCACAAAGGTGAAGCAATTG-T **********************************	360 274
acbp3 acbp4	GGAGGAAGCTGCTGCTGCTGCTTCCTGT <b>TGA</b> TTATTATTACTTTAATTAAAATGCAATTA GTGAAGCAGCTACTGCATCGAGT <b>TGA</b> TCACCTGAATTACAACACAAATT * ******* *** ** **** ** ***** ** *****	420 323
acbp3 acbp4	TTGCAAATGGTACTGAATTATGCTTTCTATTTCAAATGGTCT- CTGAAATATTATGGTGTTTAAACTTTATCCTCCAATGCGATTATGCTAAAACTTGATCTA ** ** ***** *** *** *** *** *** *** **	462 383
acbp3 acbp4	GAACTAAATTAAGTA CTATCATGCTATTTATTCTCTTTTTTCTGGTGCATTTGGAAATAAAT	496 443
acbp3 acbp4	TCTAATTTGGGCCCAAAAAAAAAAAAAAA	527 502

**Abb. C.6.:** Vergleich der beiden cDNA-Sequenzen acbp3 und acbp4. Übereinstimmende Sequenzen wurden mit \* gekennzeichnet, während Start- und Stopkodon durch Fettdruck markiert sind.

	1	10	20	30	40	50	60
	I		1		I		
ACBP3	(M)GLKEE	EFEEHAEKAKI	rlpe <b>n</b> tsn <b>a</b> n	IKLILYGLYKQA	TVGNVNTSR	PGVFNMRDRA	KWDAWK
ACBP4	(M)ALKDE	EFEEHAEKAKI	[LPE <b>S</b> TSN <b>E</b> 1	IKLILYGLYKQA	TVGNVNTSR	PGIFNMKDRA	KWDAWK
	* .**:7	*********	**** *** *	* * * * * * * * * * * *	* * * * * * * * * *	**:***:***	*****
		70	80	90			
			I				
ACBP3	AVEGI	KSQEEAMADYI	TKVKQLLEI	EAAAAASC			
ACBP4	AVEGI	KSQEEAMGEYI	TKVKQLCE	AATASS			
	* * * * *	******	******	* • * • •			

**Abb. C.7.:** Vergleich der Proteinsequenzen ACBP3 und ACBP4. Identische Aminosäuren sind mit \*, homologe Aminosäuren mit : gekennzeichnet, wobei AS von geringerer Ähnlichkeit mit . markiert wurden. Die nicht homologen Aminosäurepositionen 19 und 23 sind durch Fettdruck hervorgehoben.

ACBP3

ACBP4

Eine vergleichende Darstellung beider cDNAs und der theoretischen Eigenschaften der korrespondierenden Proteine ist in folgender Tabelle zusammengestellt.

	Gesamtlänge	cds	Nicht- kodierender 5'- Bereich	Nicht- kodierender 3'- Bereich
acbp3	527 bp	276 bp	112 bp	139 bp
acbp4	502 bp	270 bp	27 bp	205 bp
	Gesamtlänge (einschließlich Start-Methionin)	Theoretisches Molekulargewicht mit / ohne Start-Methionin	Extinktions- koeffizient (280nm)	Isoelektrischer Punkt mit / ohne Start-Methionin

10235,5

Da

10056.3

Da

**Tab. C.1.:** Gegenüberstellung der Eigenschaften von acbp3 und acbp4 sowie der jeweiligen korrespondierenden Proteine ACBP3 und ACBP4

10104,3

Da

9925,1

Da

15220 mol/l<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>

15220 mol/l<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>

5,84

5,84

5,86

5,87

#### 2. Ergebnisse der Expressionsanalysen

92 AS

90 AS

#### 2.1. Allgemeine und spezifische Sonden

2.1.1. Allgemeine Sonde zur Detektion der ACBP-Gesamttranskription

In der Abbildung C.6. ist der Sequenzvergleich der beiden cDNAs acbp3 und acbp4 dargestellt. Als Sonde zur Detektion des ACBP-Gesamttranskriptionslevels wurde der vollständige cDNA-Klon acbp3 verwendet. Auf Grund der hohen Übereinstimmung beider Transkripte im kodierenden Bereich wurde durch Einsatz dieser Sonde stets auch das Transkript von acbp4 mitdetektiert. Diese Sonde gab daher einen Anhaltspunkt der gesamten ACBP-Transkriptpopulation in den untersuchten Proben.

#### 2.1.2. Spezifische Sonden zur Detektion der acbp3- bzw. acbp4-Transkripte

Um eine Detektion des einen Transkripts durch die Sonde des jeweilig anderen zu vermeiden, mußten spezifische Sonden, die jeweils nur eines der beiden Transkripte erkennen, generiert werden. Aus dem Sequenzvergleich von acbp3 und acbp4 in Abb. C.6. wird deutlich, daß die einzigen signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Sequenzen im untranslatierten Bereich liegen. Es wurden daher Primer aus dem 5'-untranslatierten Bereich von acbp3 bzw. dem 3'-untranslatierten Bereich von acbp4 abgeleitet. Die Bindungsstellen und die Leserichtung für die von den jeweiligen nicht-kodierenden Bereichen abgeleiteten Primer sind durch Pfeile gekennzeichnet. Der Bereich zwischen den Primerbindungsstellen wurde durch PCR amplifiziert und als spezifische Sonde für das jeweilige Transkript genutzt (siehe Abb. C.8.).
Folgende Primersequenzen kamen bei der Amplifizierung spezifischer Sonden zum Einsatz:

AC3-5'DIR 5' ACG AGG TGG TTT GAG CGA TTG 3' AC3-5'REV 5' CCA TCT GTT CTT CTT CG 3'

zur Amplifizierung des 112 bp 5'-Bereiches von acbp3, im folgenden AC3-5' genannt, sowie:

AC4-3'DIR 5' GTT GAT CAC CTG AAT TAC AAC 3' AC4-3'REV 5' GAA TAA CAC TTG CAC ATA TAA ATG 3'

zur Amplifizierung des 205 bp 3'-Bereiches von acbp4, im folgenden AC4-3' genannt.

a) 5'-untranslatierter Bereich

AC3-5'DIR  $\rightarrow$ acbp3 GCACGAGGTGGTTTGAGCGATTGTCATCCCAATTTTTTATGAAATTTTAAAACTATTAGA 60 acbp4 -----← AC3-5'REV acbp3 AGCAGATCACAAATCCCTAGCTGTTACGAAAGAAATCGAAGAAGAAGAAGAACAGATGGGTTT 120 acbp4 -----AGATGGCTTT 35 \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*\***\*\*\***\* \*\*\* b) 3'-untranslatierter Bereich acbp3 GGAGGAAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGT**TGA**TTATTATTACTTTAATTAAAATGCAATTA 420 acbp4 G--TGAAGCAGCTACTGCA---TCGAGTTGAT----CACCTGAATTACAACACACAATT 323 AC4-3'DIR → acbp3 TTGCAA----ATGGTACTGAA---TTATGCTTT----CTATTTCAAA---TGGTCT- 462 acbp4 CTGAAATATTATGGTGTTTTAAACTTTATCCTCCAATGCGATTATGCTAAAACTTGATCTA 383 \*\* \*\* \*\*\*\* \* \*\* \*\*\*\* \* \* \* \* \* \* \*\* \*\*\* acbp3 -----TGTGATTTATT-TCTACTTT-----GAACTAAATTAAGTA----- 496 \*\*\*\*\*\* \*\*\* \*\*\* \*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\* \* \* ← AC4-3'REV

**Abb. C.8.:** Sequenzvergleich der untranslatierten Bereiche von acbp3 und acbp4. Bindungsstellen der abgeleiteten Primer sind durch Kursivdruck gekennzeichnet, ihre Leserichtung ist durch Pfeile angegeben. Stop- und Startkodons sind durch Fettdruck markiert

# 2.2. ACBP-Gesamttranskription in verschiedenen Pflanzenteilen von Digitalis lanata EHRH.

Das Pflanzenmaterial wurde wie in B.2.3.2. beschrieben aufgearbeitet, wobei sich besonders die Wurzeln und Blätter zweijähriger Pflanzen durch ihren hohen Gehalt an phenolischen Sekundärstoffen als problematisch erwiesen. Für die Northern Analyse wurden nur Proben mit einem  $A_{260nm}/A_{280nm}$ -Verhältnis von mindestens 1,3

verwendet. Es wurden jeweils 20 µg Gesamt-RNA pro Probe elektrophoretisch aufgetrennt, auf Qiabrane-Membran geblottet und mit dem vollständigen acbp3cDNA-Klon als Sonde detektiert. Zum Nachweis gleicher RNA-Mengen in allen geblotteten Proben wurde danach eine Kontrollhybridisierung mit 18 S-ribosomaler RNA durchgeführt.



Abb. C.9.: Northern Analyse: obere Abb.: Gesamt-RNA verschiedener Pflanzenteile von *Digitalis lanata* EHRH. hybridisiert mit  $[\alpha$ -<sup>32</sup>P]-markierter acbp3-cDNA (1-2 = Blätter einjähriger/zweijähriger Pflanzen, 3 = Sproß, 4-5 = Wurzeln einjähriger/zweijähriger Pflanzen, 6 = Blüte/Kelch, 7 = Keimlinge ) untere Abb.: Kontrollhybridisierung mit 18 S-ribosomaler Sonde

Die Northern Analyse in Abb. C.9. umfaßt das ACBP-Gesamttranskriptionslevel aller mit der acbp3-Sonde detektierbaren möglichen Isoformen. In sämtlichen untersuchten Geweben und Pflanzenorganen ließen sich ACBP-Transkripte nachweisen, wobei die Blätter und im besonderen Maße die Blätter der zweijährigen Pflanzen einen hohen Gehalt an ACBP-mRNA aufwiesen.

## 2.3. ACBP-Gesamttranskription während der somatischen Embryogenese

Die Erhaltungskultur der PEMs wurde wie in B.2.1.3. beschrieben durch den Nährmedienwechsel zur somatischen Embryogenese angeregt. Die Proben wurden nach der 1., 2., 3. und 4. Woche während der Entwicklung von Stage I-Globuli auf Nährmedium II sowie nach der 5., 6., 8., 10., 12., 14. und 16. Woche auf Nährmedium III während der Entwicklung von Stage II-Globuli, den herz- und torpedoförmigen Zwischenstadien bis zum Embryo entnommen. Als Kontrolle wurden nicht-induzierte PEMs der Erhaltungskultur aufgearbeitet. Die Kontrollhybridisierung mit der 18 Sribosomalen Sonde im unteren Bild stellt die gleichmäßige RNA-Menge in allen geblotteten Proben sicher.



**Abb. C.10.:** Northern Analyse: **obere Abb**.: Gesamt-RNA verschiedener Embryogenesestadien von *Digitalis lanata* EHRH. hybridisiert mit  $[\alpha^{-32}P]$ -markierter acbp3cDNA (**K** = Kontrolle, nicht-induzierte PEMs, **1,2,3,4** = Wochen (auf Nährmedium II); **5,6,8,10,12,14,16** = Wochen (auf Nährmedium III)), **untere Abb**.: Kontrollhybridisierung mit 18S-ribosomaler Sonde

Die Expressionsanalyse zeigt eine sehr hohe und zunehmende ACBP-Gesamttranskription in den frühen Embryogenesestadien, die im späteren Verlauf der somatischen Embryogenese noch einmal einen transienten Anstieg der Transkription verzeichnet, insgesamt jedoch unter dem für die Erhaltungskultur detektierten mRNA-Level bleibt.

## 2.4. ACBP-Gesamttranskription unter Einfluß verschiedener Stressoren

Zur Untersuchung der ACBP-Gesamttranskription unter dem Einfluß verschiedener Stressoren wurden die Proembryogenen Massen wie in B.2.2. beschrieben behandelt. Die von diesen Proben isolierte Gesamt-RNA wurde mit der acbp3-cDNA als Sonde hybridisiert. Da der ausgeübte mechanische Streß beim Umsetzen der PEMs auf ein neues Medium auch Einfluß auf die Transkription haben könnte, wurde die nichtinduzierte Kontrolle ebenfalls auf neues Nährmedium I umgesetzt und analysiert. In den folgenden Abbildungen sind die so detektierten Transkriptlevel dargestellt.

• Einfluß von Wasserstoffperoxid



**Abb. C.11.:** Northern Analyse: **obere Abb**.: Gesamt-RNA aus mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten PEMs von *Digitalis lanata* EHRH. hybridisiert mit  $[\alpha^{-32}P]$ -markierter acbp3cDNA (**K** = Kontrolle, nicht-induzierte PEMs, **1** = 200  $\mu$ M 4 h, **2** = 200  $\mu$ M 12 h, **3** = 20  $\mu$ M 4 h, **4** = 20  $\mu$ M 12 h), **untere Abb**.: Kontrollhybridisierung mit 18 Sribosomaler Sonde

Unter dem Einfluß von 20  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ließen sich zu den untersuchten Zeitpunkten 4 und 12 Stunden nach der Applikation kaum Änderungen im Transkriptlevel feststellen, da die marginale Abnahme an ACBP-Transkript nicht als signifikant

anzusehen ist. Die Behandlung mit 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, die einen relativ starken oxidativen Streß darstellte, verringerte hingegen die ACBP-Transkription beträchtlich.

• Einfluß von AAPH



**Abb. C.12.:** Northern Analyse: **obere Abb**.: Gesamt-RNA aus mit 1 mM AAPH behandelten PEMs von *Digitalis lanata* EHRH. hybridisiert mit  $[\alpha$ -<sup>32</sup>P]-markierter acbp3-cDNA (**K** = Kontrolle, nicht-induzierte PEMs, **1** = 30 min, **2** = 1 h, **3** = 6 h, **4** = 12 h), **untere Abb**.: Kontrollhybridisierung mit 18 S-ribosomaler Sonde

Die Applikation von 1 mM AAPH, das nachweislich zur Bildung freier Radikale befähigt ist, hatte keinen offensichtlichen Einfluß auf die ACBP-Transkription unter den untersuchten Bedingungen .

• Einfluß von ABA



**Abb. C.13.:** Northern Analyse: **obere Abb**.: Gesamt-RNA aus mit 100  $\mu$ M ABA behandelten PEMs von *Digitalis lanata* EHRH. hybridisiert mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-markierter acbp3-cDNA (K = Kontrolle, nicht-induzierte PEMs, 1 = 1 h, 2 = 6 h, 3 = 12 h), **untere Abb**.: Kontrollhybridisierung mit 18 S-ribosomaler Sonde

Unter den angegebenen Bedingungen konnte ein leichter transienter Anstieg der ACBP-Transkription mit einem Maximum nach 6 h unter dem Einfluß von 100  $\mu$ M Abscisinsäure detektiert werden. Diese Veränderung im Transkriptionslevel ist allerdings nur eine quantitative, nicht jedoch eine qualitative *up*-Regulation, da schon unter Ausgangsbedingungen ein relativ hohes ACBP-Level vorlag.

## 2.5. Transkription einzelner ACBP-Isoformen

Zur Detektion der einzelnen Isoformen in Pflanzenteilen von *Digitalis lanata* wurden die nach B.2.4.2. generierten spezifischen Sonden eingesetzt. Während für die 3'- spezifische Sonde für acbp4 keine Signale detektierbar waren, ergab die 5'- spezifische Sonde für acbp3 ein distinktes Expressionsmuster.



Abb. C.14.: Northern Analyse: obere Abb.: Gesamt-RNA verschiedener Pflanzenteile von *Digitalis lanata* EHRH. hybridisiert mit der spezifischen acbp3-5'-Sonde (W-1j/2j = Wurzeln einjähriger/zweijähriger Pflanzen, Bl-1j/2j = Blätter einjähriger/zweijähriger Pflanzen, Bl-verw. = verwundete Blätter, Spr = Sproß, Kn = Knospe, Kel = Kelchblätter, Kr = Kronblätter, Frkn = Fruchtknoten, Stbl = Staubblätter, Fr = Frucht) untere Abb.: Kontrollhybridisierung mit 18 S-ribosomaler Sonde

In der Northern-Analyse ließ sich eine verstärkte acbp3-Transkription vor allem in den Wurzeln und Blättern (besonders der zweijährigen Pflanze) erkennen. Des weiteren war das Transkript auch im Fruchtknoten und in der reifenden Frucht nachweisbar, während die anderen untersuchten Blütenteile nur eine marginale Transkription für acbp3 aufwiesen. Damit unterschied sich das Expressionsmuster von acbp3 durchaus von dem in Abb. C.9. dargestellten Gesamttranskriptionslevel, was Raum für weitere eventuell gewebespezifische Isoformen ließ.

Eine wiederholte Hybridisierung der in Abb. C.11. bis C.13. dargestellten Northern Blots gestreßter PEMs-Kulturen mit der acbp3-spezifischen Sonde ließ keine Unterschiede zur Analyse der ACBP-Gesamttranskription erkennen (Daten nicht gezeigt). Somit konnte zumindest unter den gegebenen Bedingungen in PEMs von einer konstitutiven, nicht streßregulierten Expression von acbp3 ausgegangen werden.

# 3. Untersuchung der genomischen Organisation der acbp-Genfamilie

## 3.1. Isolierung und Partialverdau genomischer DNA von D. lanata EHRH

Die Isolierung genomischer DNA unter Verwendung von Blättern einjähriger Digitalispflanzen erwies sich als relativ problematisch. Mit keiner der getesteten Methoden ließen sich die verbliebenen phenolischen Sekundärstoffe in befriedigendem Maße abtrennen. Die in B.3.1.2. beschriebene Methode (ROGERS und BENDICH 1994) erwies sich als verhältnismäßig unkompliziert und ertragreich und wurde daher für die gDNA-Isolierung ausgewählt. Die so gewonnene DNA war dem Partialverdau zugänglich und wurde im Agarosegel zufriedenstellend aufgetrennt, die ausreichende Denaturierung und sterische Zugänglichkeit bei der Hybridisierung der Fragmente stellte sich jedoch wie bei allen anderen getesteten Methoden als problematisch dar. In Abb. C.15. ist der Partialverdau der genomischen DNA aus Digitalisblättern unter Verwendung verschiedener hochkonzentrierter Restriktionsenzyme dargestellt.



Abb. C.15.: Partialverdau genomischer DNA (jeweils 20  $\mu$ g) unter Verwendung hochkonzentrierter Restriktionsenzyme (1 = BamHI; 2,7 = BgIII; 3 = EcoRI; 4,9 = KpnI; 5 = PstI; 6,10 = SaII; 8 = HindIII; 11 = XhoI), wobei die Bahnen 1-6 dem Einsatz von 100 U Enzym und die Bahnen 7-11 von 200 U Enzym entsprechen. Als Größenmarker wurde mit HindIII verdaute  $\lambda$ -DNA genutzt.

Von den untersuchten Restriktionsenzymen erwiesen sich BamHI, BgIII und KpnI als besonders geeignet, da bei ihrer Anwendung eine gleichmäßige Größenverteilung der genomischen Fragmente erreicht wurde und keine Schnittstellen innerhalb der bekannten ACBP-Sequenzen bekannt waren. EcoRI und HindIII erreichten ebenfalls einen ausreichenden Partialverdau, ließen jedoch Restriktion innerhalb der Gensequenzen erwarten. Die restlichen Enzyme PstI, SalI und XhoI waren für den Verdau von Digitalis-DNA nicht geeignet, da hier die hochmolekularen Fragmente überwogen, während bei der Verwendung von Sau3A (keine Abbildung) die Größenverteilung zu Gunsten sehr kleiner Fragmente verschoben war.

#### 3.2. Genomische Southern Blot-Analyse

Die Durchführung der Southern-Analyse erwies sich aus den in C.3.1. genannten Gründen als schwierig. Die genomische DNA war wie in Abb. C.15. zu sehen ausreichend partialverdaut und auch nachweislich auf die verwendete Qiabrane-Membran geblottet worden. Trotz erhöhter Mengen an markierter acbp3-Sonde und Vermeidung stringenter Hybridisierungs- und Waschbedingungen ließen sich nur in wenigen Proben Signale detektieren. Dabei ergaben nur die Enzyme BamHI und KpnI detektierbare Signale im niedermolekularen Bereich. In Abb. C.16. sind die mit acbp3-cDNA detektierbaren Signale in BamHI- bzw. KpnI-verdauter genomischer DNA von *Digitalis lanata* EHRH dargestellt. Sie lassen 2 distinkte Banden im niedermolekularen Bereich zwischen 2000 bp und 4500 bp und eventuell eine weitere

hochmolekulare Bande in der BamHI-Restriktion sowie 4 Banden zwischen 2000 bp und 10000 bp in der KpnI-Restriktion erkennen, was das Vorhandensein von mindestens 3, möglicherweise 4 detektierbaren Kopien suggerierte.



**Abb. C.16.:** Mit 100 U BamHI bzw. KpnI partialverdaute genomische DNA (jeweils 20 µg) hybridisiert mit acbp3-cDNA-Sonde

#### 3.3. Screening der gDNA-Bank

Das Primärscreening der genomischen Bank erbrachte 19 positive Klone, von denen sich 12 in den weiteren Screeningrunden bestätigen ließen. Nach Präparation der jeweiligen  $\lambda$ -DNA und Restriktionsanalyse konnten diese positiven Klone jeweils einem von zwei verschiedenen Restriktionsmustern zugeordnet werden. In Abb. C.17. ist das Restriktionsmuster der Klone  $\lambda$ -312 und  $\lambda$ -511 stellvertretend für diese beiden Klon-Gruppen und die jeweils positiv detektierten Banden dargestellt. Die Banden wurden isoliert und nach Auffüllung der Restriktionsüberhänge in den linearisierten, dephosphorylierten pUC18-Vektor kloniert.



Abb. C.17.: Restriktions- und Southernanalyse der  $\lambda$ -Klone 312 (1-3) und 511 (4-6); jeweils verdaut mit Sau3A (1,4), SacI (2,5) bzw. SmaI / SacI (3,6). In Teil A ist die Auftrennung der Fragmente im Agarosegel, in Teil B ihre Detektierung mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-acbp3-cDNA im Southern-Blot dargestellt.

Auf Grund der Größe der Fragmente erwies sich die Blunt-End-Klonierung als ineffektiv. Keine der zur Verfügung stehenden Enzymkombinationen ermöglichte es, detektierbare Banden unter 1500 bp Größe zu generieren. Ebenso war keine der Enzymkombinationen, die relativ kleine detektierbare Fragmente erbrachte, in den *multi cloning sites* der zur Verfügung stehenden Vektoren vertreten, was eine effektivere *sticky end*-Klonierung ermöglicht hätte. Die nach der Ligation in den pUC18-Vektor und Transformation in XL-Blue-Zellen erhaltenen Konstrukte erwiesen sich nach Midipräparation und Sequenzierung als Fragmente der originalen  $\lambda$ -Phagen-DNA bzw. als genomische Digitalis-DNA unbekannter Funktion und ohne Überlappung mit bekannten kodierenden ACBP-Sequenzen.

## 4. Überexpression von acbp3 und acbp4

#### 4.1. Ableitung von Oligonukleotid-Primern

Aus den Sequenzen der cDNA-Klone acbp3 und acbp4 (siehe Abb. C.6.) wurden Oligonukleotid-Primer abgeleitet, um die gewünschten Schnittstellen im erforderlichen Leserahmen für die Klonierung in den Expressionsvektor pET3a einzufügen. Für acbp3 kamen folgende Primer zum Einsatz:

AC3NDEDIR:5'*CAT ATG* GGT TTG AAG GAA GAA TTC GAA G 3' AC3BAMREV:5'C*GG ATC C***TC A**AC AGG AAG CAG CAG C 3'

Der acbp4-Klon wurde mit folgenden Primern amplifiziert:

AC4NDEDIR:5' <u>CAT</u> **ATG** GCT TTG AAG GAT GAA TTT GAG 3' AC4BAMREV:5' <u>GGA TCC</u> **TCA** ACT CGA TGC AGT AGC TG 3'

In den Primersequenzen sind Start- und Stopkodons jeweils in Fettdruck hervorgehoben, während die Schnittstellen für NdeI bzw. BamHI kursiv unterstrichen dargestellt sind.

Entsprechend den in B.4.1. beschriebenen Methoden wurde die PCR mit den oben dargestellten Primerkombinationen und dem jeweiligen cDNA-Klon als Template durchgeführt. Die PCR ergab die erwarteten Banden von ca. 280 bp Größe, die im TOPO/TA-System zwischenkloniert und durch Sequenzierung bestätigt wurden. Durch Ndel/BamHI-Restriktion wurden der pET3-Vektor und die TOPO/TA-Konstrukte auf die Ligation vorbereitet. Die Transformation nach der Ligation der pET3-Konstrukte in kompetente BL21(DE3)–Zellen (Stratagene) ergab eine Vielzahl von positiven Kolonien, was für eine hohe Effizienz der Ligation sprach.

#### 4.2. Induktion und heterologe Überexpression der pET3-Konstrukte

Die 500 ml LB-Amp-Kulturen, die von den jeweils in BL21(DE3)-Zellen transformierten pET3-Konstrukten angeimpft worden waren, wurden entsprechend den in B.4.2. beschriebenen Methoden kultiviert, induziert und geerntet. Die Proben, die vor und 3 h nach der Induktion durch 1 mM IPTG entnommen worden waren, wurden wie beschrieben aufgearbeitet, im SDS-Acrylamidgel aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung detektiert. In Abb. C.18. ist das so prozessierte SDS-Gel dargestellt, wobei eine sehr deutliche Induktion einer Bande bei ca. 6,5 kDa zu erkennen ist. Dies entspricht dem Laufverhalten eines ACBPs, da für diese

Proteinfamilie wie bereits von Mogensen dokumentiert ein atypisches Verhalten in der SDS-PAGE-Analyse bekannt ist (MOGENSEN et al. 1987). Trotz des theoretischen Molekulargewichtes von 9-10 kDa werden diese Proteine gemeinsam mit der 6,5 kDa Bande des Proteinmarkers aufgetrennt und haben somit ein virtuelles Molekulargewicht von 6-7 kDa unter den hier beschriebenen Trennbedingungen.



Abb. C.18.: SDS-PAGE-Gel (17,5%, Coomassie-Färbung) (1,2 = pET3-acbp3 mit/ohne 1 mM IPTG, 3 = leerer pET3-Vektor mit 1 M IPTG, 4,5 = pET3-acbp4 ohne/mit 1 mM IPTG) Die induzierten Banden für rACBP3 und rACBP4 sind durch \* gekennzeichnet.

Die Zellkulturen mit nachweislich induzierbarer Überexpression wurden für die Produktion und Aufreinigung der rekombinanten Proteine verwendet.

# 4.3. Chromatographische Reinigung der rekombinanten Proteine ACBP3 und ACBP4

## 4.3.1. Bestimmung des optimalen pH-Wertes für die Anionenaustausch-FPLC

Der erste FPLC-Reinigungsschritt bestand in einer Aufreinigung über eine Anionentauschersäule. Für die optimale Bindung eines Proteins an eine solche Säule ist sein Ladungszustand im Laufpuffer ausschlaggebend. Der pH-Wert des Puffers mußte daher so gewählt werden, daß der Hauptanteil des gewünschten Proteins als Anion vorliegt, ohne dabei jedoch zu viele andere Protein in den anionischen Zustand zu überführen. Er sollte mindestens zwei pH-Einheiten über dem IP des aufzureinigenden Proteins liegen. Für ein so saures Protein wie dem ACBP (theoretischer IP z.B. für ACBP3 = 5,4) sollte also ein Laufpuffer mit einem pH-Wert von 7-8 ausreichend sein. Da aber unter Trennbedingungen und im Proteingemisch tatsächlich wirksame IP des entsprechenden Proteins. der also seine Oberflächenladung im jeweiligen Laufpuffer, durchaus vom berechneten Wert abweichen kann, mußten die optimalen Trennbedingungen durch Variation des pH-Wertes im Laufpuffer gefunden werden. Die Aufreinigung über die ResourceQ-Säule (Pharmacia Biotech) bei verschiedenen pH-Werten und anschließender SDS-PAGE-Analyse der Fraktionen erbrachte eine optimale Auftrennung bei einem pH-Wert von

9 in 30 mM Tris-Puffer mit einem kontinuierlichen Gradienten von 0-50 % 2 M NaCl. Diese Trennbedingungen wurden als Standardbedingungen für die Aufreinigung mit Hilfe der ResourceQ-Säule gewählt.

#### 4.3.2. Reinigung über die Anionentauschersäule ResourceQ

Nachdem der optimale pH-Wert für die Reinigung über die ResourceQ-Säule (Pharmacia Biotech) bestimmt war, wurde die so etablierte Methode zur mengenmäßigen Aufreinigung der beiden ACBP-Isoformen genutzt. Die Abb. C.19. zeigt das Chromatogramm der ACBP3-Aufarbeitung. Das Trennverhalten für die Aufreinigung von ACBP4 war analog dazu. Die Fraktionen mit hohem ACBP-Gehalt wurden durch SDS-PAGE-Analyse identifiziert, vereinigt und über eine RP-FPLC-Auftrennung weiter aufgereinigt.



**Abb. C.19.:** Auftrennung der ACBP3-Proben über die ResourceQ-Anionentauschersäule bei pH 9 (grün = NaCl-Gradient, rot = Proteinabsorption bei 280nm, schraffierte Fraktionen wurden zur weiteren Aufreinigung vereinigt)

#### 4.3.3. Reinigung über die Reversed Phase-Poros-Säule

Die vorgereinigten Fraktionen wurden über die Poros 20 RC-Säule (PerSeptive Biosystems, Wiesbaden) zur Homogenität gereinigt. In Abb. C.20. ist der bei 215 nm detektierte Verlauf der Aufreinigung von ACBP3 dokumentiert, wobei die Reinigung von ACBP4 analog dazu verlief. Die schraffiert hervorgehobenen Fraktionen wurden als homogen erachtet, zur Trockne eingeengt, in 1 mM DTT aufgenommen und spektrophotometrisch vermessen.



**Abb. C.20.:** Auftrennung der vorgereinigten ACBP3-Fraktionen über die Poros-RP-Säule (grün = HCl-Gradient, rot = Proteinabsorption bei 215nm, schraffiert dargestellte Fraktionen wurden im SDS-PAGE-Gel als homogen identifiziert)

Die in Abb. C.21. dargestellten zur Homogenität gereinigten Proteine ACBP3 und ACBP4 ließen selbst bei einer Überladung des SDS-PAGE-Geles keine Fremdproteine erkennen. Bei Auftragung großer Proteinmengen sind jedoch weitere Banden detektierbar, die in ihrer Molekülgröße den homologen Di- und Trimeren entsprechen. Diese durch die Aufarbeitung und Aufbewahrung des Proteins selbst unter mild reduzierenden Bedingungen (1 mM DTT) entstehenden Artefakte wurden bereits für das bovine ACBP beschrieben (MIKKELSEN und KNUDSEN, 1987). Da der Anteil dieser Di- und Trimere als sehr gering eingestuft werden konnte und auch nach chromatographischer Abtrennung erneut auftrat, wurde diese Verunreinigung für die weitere Bearbeitung der Proteine als vernachlässigbar betrachtet.



**Abb. C.21.:** SDS-PAGE-Gel (17,5 %, silbergefärbt) der gereinigten rekombinanten Proteine ACBP3 und ACBP4 (1 µg je Protein)

Die Identität der Proteine wurde durch eine Ansequenzierung des N-Terminus bestätigt, bei der die ersten 7 bzw. 8 Aminosäuren der N-terminalen Sequenz bestimmt und ihre Übereinstimmung mit den abgeleiteten Proteinen ACBP3 und ACBP4 festgestellt wurden. Bei der MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurden Molekülmassen von 10105 Da bzw. 9927 Da ermittelt. Dies entspricht den theoretischen Massen von ACBP3 und ACBP4 ohne die jeweiligen Start-Methionins, die bei der heterologen Expression in *E. coli* von den Wirtszellen prozessiert und abgespalten wurden (BROWN et al. 1998).

#### 4.4. Ligandenbindungstest für die rekombinanten Proteine

Durch die Verschiebung des Isoelektrischen Punktes der ACBPs in den stärker sauren Bereich sollte die erfolgreiche Bindung des Liganden Palmitoyl-CoA und damit die Funktionalität der rekombinanten Proteine nachgewiesen werden. Nach der in B.4.5. beschriebenen Methode wurden die Proteine mit dem Liganden inkubiert und im Vergleich mit den freien Proteinen auf einem Isoelektrofokussierungsgel aufgetrennt. In Abb. C.22. ist das Coomassie-gefärbte PhastGel IEF 3-9 (Pharmacia) dargestellt, wobei jeweils 1,5  $\mu$ g Protein mit und ohne Ligandeninkubation aufgetragen wurden. Als Vergleich wurden 1,5  $\mu$ g bovines ACBP ebenfalls mit dem Liganden inkubiert und aufgetragen.



Abb. C.22.: Isoelektrofokussierung der rekombinanten Proteine vor und nach der Ligandenbindung. Jeweils 1,5 μg Protein wurden mit jeweils 5 μl 100 μM Palmitoyl-CoA (+ Proben) bzw. Wasser (- Proben) inkubiert und auf einem PhastGel IEF 3-9 bei 10 mA aufgetrennt (1 = bovines ACBP + Palmitoyl-CoA, 2 = ACBP3 + Wasser, 3 = ACBP3 + Palmitoyl-CoA, 4 = ACBP4 + Wasser, 5 = ACBP4 + Palmitoyl-CoA).

In dieser Abbildung ist eine deutliche Verschiebung des Isoelektrischen Punktes von ca. 5,5 der freien (- Proben) hin zu ca. 3,6 der ligandengebundenen (+ Proben) Form der heterolog exprimierten Proteine ACBP3 und ACBP4 zu erkennen. Dies entspricht einer Änderung des IP von 2 Größeneinheiten, was für eine erfolgreiche und effektive Bindung des Liganden durch die jeweiligen Proteine entspricht.

#### 5. Gerichtete Mutagenese der Aminosäuren 19 und 23 in ACBP3 und ACBP4

#### 5.1. Einführung von Mutationen in den Aminosäurepositionen 19 und 23

5.1.1. Oligonukleotid-Primer zur gerichteten Mutagenese

Für die Mutation einer bzw. zweier Aminosäuren in den Positionen 19 und 23 der ACBP-Isoformen ACBP3 und ACBP4 wurden folgende Primer abgeleitet:

Mut23Edir5' AGC AAT GAG AAC AAG CTT ATC 3'Mut23Adir5' TCC AAC GCG AAC AAG CTC 3'Mut19Srev5' AGT ACT CTC AGG TAA GGT CTT C 3'Mut19Nrev5' GGT GTT CTC TGG CAA TGT C 3'

In der folgenden Abbildung sind Positionierung und Ausrichtung der Primer im Verhältnis zu den jeweiligen Isoformen ACBP3 und ACBP4 dargestellt.



**Abb. C.23.:** Positionierung der mutierten Primer zur gerichteten Mutagenese der Isoformen ACBP3 und ACBP4 (Zu mutierende Aminosäuren 19 und 23 jeweils durch Fettdruck gekennzeichnet).

5.1.2. PCR zur gerichteten Mutagenese

Die Mutagenese-PCR wurde nach dem in B.5.1.2. angegebenen Programm durchgeführt. Dabei kamen folgende Matrix/Primer-Kombinationen zum Einsatz:

a) pET3-acbp3 mit Mut19Srev + Mut23Adir → Einzelmutante: ACBP3-N19S
b) pET3-acbp3 mit Mut19Nrev + Mut23Edir → Einzelmutante: ACBP3-A23E
c) pET3-acbp3 mit Mut19Srev + Mut23Edir → Doppelmutante: ACBP3-N19S,A23E
d) pET3-acbp4 mit Mut19Nrev + Mut23Edir → Einzelmutante: ACBP4-S19N

e) pET3-acbp4 mit Mut19Srev + Mut23Adir → Einzelmutante: ACBP4-E23A f) pET3-acbp4 mit Mut19Nrev + Mut23Adir → Doppelmutante: ACBP4-S19N,E23A

Die Doppelmutanten der Isoformen ACBP3 und ACBP4 (c + f) wurden durch die Verwendung von jeweils zwei mutierten Primern gewonnen. Dagegen wurden die für die Generierung von Einzelmutanten (a,b + d,e) nötigen nicht mutierten Primer der einen Isoform durch die Verwendung der mutierten Primer der jeweils anderen Isoform erstellt. So entsprach z.B. die korrespondierende Proteinsequenz des mutierten Primers Mut19Srev (mutiert für ACBP3) der originalen ACBP4-Sequenz, während hingegen der mutierte Primer Mut19Nrev (mutiert für ACBP4) der originalen ACBP3-Sequenz entsprach. Somit war mit nur 4 mutierten Primern die Generierung von 6 verschiedenen Mutanten möglich. Zusammen mit den ursprünglichen Isoformen standen damit insgesamt 8 Proteine zur Bestimmung ihrer Spezifität bei der Ligandenbindung zur Verfügung.

# 5.1.3. Modifikation und Transformation der mutierten PCR-Produkte

Die mutierten PCR-Produkte wurden nach Phosphorylierung, Ligation und DpnI-Verdau in One Shot TOP10-Zellen transformiert. Diese Transformation ergab durchschnittlich 20 Kolonien, von denen sich ca. 75 % als vollständige *full length*-Klone erwiesen. Durch die Kontroll-PCR konnten Kolonien mit durch Mispriming verkürzten oder anderweitig unvollständigen Inserten detektiert und ausgeschlossen werden. Durch Sequenzierung der Plasmid-DNA der jeweilig ausgewählten Kolonien wurde die korrekte Einführung der Mutation und der Leserahmen bestätigt. Diese verifizierten Konstrukte wurde dann in kompetente BL21(DE3)-pLyS-Zellen transformiert und zur Überexpression der Mutanten verwendet.

# 5.2. Überexpression der Mutanten

Es wurden je Protein zwei 11 Kulturen in *Rich Media* (100  $\mu$ g/ml Ampicillin, 40  $\mu$ g/ml Chloramphenicol) induziert (siehe B.5.2.) und aufgearbeitet. In Abb. C.24. ist als Beispiel für die Effektivität der Induktion ein Coomassie-gefärbtes 20 % iges PHAST-Gel dargestellt, wobei Proben vor und 5 h nach der Induktion der Expression von ACBP3-N19S,A23E aufgearbeitet wurden.



Abb. C.24.: Überexpression von ACBP3-N19S,A23E ,20 %-PHAST-Gel Coomassie-gefärbt (M = Low Weight Protein Marker, 1 = Rohextrakt vor der Induktion mit 1 mM IPTG, 2 = Rohextrakt 5 h nach Induktion mit 1 mM IPTG, 3 = Rohextrakt von mit Leervektor transformierten und induzierten BL21(DE3) pLyS-Zellen (aufgetragen wurden gleiche Mengen Gesamtprotein)). Die induzierte Bande für ACBP3-N19S,A23E ist mit \* gekennzeichnet.

Das bei der Überexpression verwendete hochkonzentrierte Medium erlaubte Zelldichten von bis zu  $A_{600} = 15$ , während in LB-Medium die Zellkulturen bereits bei 1,5 bis 2 in die stationäre Phase übergingen. Durch diese hohe Zelldichte war auch eine sehr hohe Ausbeute an rekombinantem Protein möglich. Die Aufarbeitung aus 1 l *Rich Media* ergab ca. 25 mg und war damit bedeutend höher als bei vergleichbaren LB-Kulturen, bei denen ca. 8 mg rekombinantes Protein je Liter Expressionskultur gewonnen werden konnten.

## 5.3. Chromatographische Reinigung der rekombinanten Proteine

Die Reinigung der Isoformen und mutierten Proteine erfolgte durch Fällungsschritte und chromatographische Auftrennung. Nach dem Aufschluß der Wirtszellen durch Frier-Tau-Schritte und Ultraschallbehandlung wurde der größte Anteil an Fremdprotein durch eine einfache Essigsäurefällung abgetrennt. Der Hauptanteil an rekombinantem ACBP blieb unter den gegebenen Bedingungen in Lösung, wobei der Anteil an ACBP, der unter diesen Bedingungen ausgefällt wurde, auf Grund der hohen Zelldichte und Expressionsrate der *Rich Media*-Kulturen vernachlässigt werden konnte. Durch diesen ersten Fällungsschritt konnte bereits eine grobe Vorreinigung erreicht und die Menge an Protein, die über die Gelfiltrationssäule aufgetrennt werden sollte, drastisch vermindert werden.

Die Reinigung über die Gelfiltrationssäule Sephadex-G50 (superfine) erbrachte weitgehend homogene Fraktionen an rekombinantem ACBP-Protein, die allerdings noch verschiedene von den Wirtszellen unterschiedlich prozessierte Translationsprodukte desselben ACBP-Proteins enthielt. Die Auftrennung dieser Produkte war durch Anionenaustauschehromatographie über eine QSepharose-Säule möglich.

Die so aufgefangenen Fraktionen der bei 280 nm detektierten Proteinpeaks wurden durch eine massenspektrometrische Analyse identifiziert und den Peaks zugeordnet. Dabei stellte sich im Beispiel der Aufreinigung von ACBP3-N19S,A23E der Hauptpeak mit einer Molekularmasse von 10136 Da als das korrekt translatierte und prozessierte mutierte Protein dar, während das Protein des bedeutendsten Nebenpeaks mit der Masse von 10267 Da noch das Startmethionin enthielt. Ein weiterer Nebenpeak wurde als ACBP-Protein mit einer unbekannten Modifikation von 70 Da Größe identifiziert, die in ähnlicher Größe in allen Aufarbeitungen zu finden war. Zur weiteren Bearbeitung wurden nur die Fraktionen des Hauptpeaks weiterverwendet.

Die durch die massenspektrometrische Analyse identifizierten und bestätigten Proben wurden entsalzt, durch Gefriertrocknung eingeengt und in 5 ml 1 mM DTT-Lösung aufgenommen. Diese Proben standen damit für die Ligandenbindungstests zur Verfügung.

## 6. Bestimmung von Dissoziationskonstanten im Biosensor-Test

Der Biosensor-Test sollte zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten verschiedener ACBP-Isoformen und Mutanten genutzt werden, um den Einfluß bestimmter Aminosäuren innerhalb der Bindungsregion auf die Bindungsspezifität zu untersuchen. Dabei konkurrieren das zu bestimmende ACBP und das fluoreszierende modifizierte bovine ACBP (Biosensor) um die Liganden. Diese Gleichgewichtsreaktion ist bestimmt durch die  $k_D$ -Werte für Biosensor und ACBP sowie durch die verfügbare Ligandenkonzentration.

# 6.1. Ermittlung der Biosensor-k<sub>D</sub> für verschiedene Liganden

# 6.1.1. Bestimmung des Ligandenverlustes durch Bindung an die Mikrotiterplatte

Da die langkettigen Acyl-CoA-Ester als Moleküle mit der hydrophoben aliphatischen Fettsäurekette an die Gefäßwand binden könnten und somit die Konzentration an tatsächlich vorhandenem gelösten Liganden verringert worden wäre, sollte in einer Vorstudie abgeklärt werden, ob dieser Vorgang entscheidenden Einfluß auf den Biosensor-Test hatte. Wie in B.6.4.3. beschrieben wurde eine Dreifach-Testreihe unter Verwendung von ACBP3-SE (5  $\mu$ M) und Biosensor (0,5  $\mu$ M) mit Palmitoleyl-CoA (C16:1-CoA) als Liganden in einer Mikrotiterplatte für 15 min inkubiert. Eine der Testreihen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dort wiederholt vermessen, während eine andere Testreihe zweifach in neue Gefäße überführt und die verbleibende Testreihe im Originalgefäß wiederholt vermessen wurde.

Die wiederholte Messung im gleichen Gefäß sollte den Einfluß der energiereichen Anregungsstrahlung im Fluoreszenzspektrometer untersuchen. Das Biosensor-Protein war als fluoreszierendes Molekül photosensitiv und wurde bis zur Anregung bei 390 nm abgedunkelt gehalten.

Der Fluoreszenzverlust durch Überführung des Ansatzes in eine frische Mikrotiterplatte betrug bei dieser Versuchsanordnung durchschnittlich 7,5 %, während sich eine wiederholte Messung mit einem Verlust von durchschnittlich 10,7 % auswirkte. Der Ligandenverlust wurde bei der Berechnung der tatsächlichen Ligandenkonzentrationen für die jeweiligen Ansätze berücksichtigt. Weiterhin wurde der eventuell verursachte systematische Fehler durch Ligandenverlust dadurch ausgeglichen, daß für alle Testreihen des jeweiligen Liganden gleiche Versuchsanordnungen für alle ACBPs und den Biosensor selbst gewählt wurden. Die Meßwerte und detaillierte Auswertung dieser Bestimmungen sind im Anhang dargestellt (siehe G.2.).

# 6.1.2. Meßwerte für die k<sub>D</sub>-Bestimmung verschiedener Liganden

Für die spätere Verwendung des fluoreszierenden Biosensor-Proteins zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten anderer ACBPs mußten zunächst die  $k_D$ -Werte für den Biosensor selbst ermittelt werden. Dazu wurde wie in B.6.4.1. dargestellt der Biosensor mit allen zur Verfügung stehenden Liganden getestet. Jeder der 10 Liganden wurde in verschiedenen Konzentrationen in einem 200 µl Ansatz mit 0,5 µM Biosensor in 100 mM Tris pH 7,2 versetzt und im Fluoreszenzspektrometer (Wallac Victor<sup>2</sup>V-Multilabel Counter, Perkin-Elmer) bei 390 nm angeregt und bei 460 nm vermessen. Diese Meßreihen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt.

Im folgenden sind als Beispiel die Meßwerte der Bestimmung von Lauryl-CoA unter Angabe der Ligandenkonzentration, Fluoreszenzintensitäten beider Paralleltests, deren Durchschnittswert und die Standardabweichung dafür dargestellt. Es wurden Aliquots der Liganden-Stammlösungen mit genau bekannter Konzentration pipettiert und die tatsächliche Endkonzentration an Liganden auf die pipettierte Menge korrigiert. Die Meßwerte der restlichen Liganden sind im Anhang dargestellt (siehe G.1.)

Ligandenkonz. in µM	1. Meßreihe	2. Meßreihe	Durchschnitt	Standardabweichung	
0	29119	27751	28435	967.3221	
0.0959	36973	37955	37464	694.3789	
0.1918	47968	47536	47752	305.4701	
0.2877	57304	59416	58360	1493.41	
0.33565	64768	62465	63616.5	1628.467	
0.43155	72404	69346	70875	2162.333	
0.4795	73915	73141	73528	547.3006	
0.5754	78211	78446	78328.5	166.1701	
0.6713	79724	80605	80164.5	622.9611	
0.7672	82107	81117	81612	700.0357	
1.918	81765	82912	82338.5	811.0515	

Tab. C.2.: Meßwerte der Titration von 0,5 µM Biosensor mit Lauryl-CoA

6.1.3. Graphische Auswertung der Meßdaten

Die Auswertung der Meßdaten erfolgte wie in B.6.2.2. angegeben mit Hilfe des Datafit 7-Programms (Oakdale Engineering, Oakdale, USA). Dabei wurde für die oben angegebenen Meßwerte eine nichtlineare Regression auf Grundlage der in B.6.2.2 erläuterten mathematischen Ableitungen durchgeführt. Das Datafit-Programm war dabei in der Lage, die Werte für Biosensor-Konzentration, Maximal- und Minimalwerte sowie die zu ermittelnde  $k_D$  als Variablen zu behandeln und eine *best fit*-Kurve für die jeweiligen Meßreihen zu ermitteln. Diese *best fit*-Kurve ergab dann einen korrigierten Wert für die Biosensor-Konzentration, der je nach verwendeter Stammlösung vom theoretischen Wert von 0,5  $\mu$ M abweichen konnte. Dieser korrigierte Wert wurde dann später zur Berechnung der ACBP-k<sub>D</sub>-Werte herangezogen. Durch die zusätzliche Einbeziehung der Standardabweichungen in die Berechnungen des Datafit-Programms wurde die Ermittlung der k<sub>D</sub>-Werte noch optimiert.

Im folgenden sollen die Datafit-Graphen der Meßreihen für Coenzym A, Butyryl-CoA sowie Lauryl-CoA als Beispiel für die Auswertung dienen. Der ermittelte Wert für die Dissoziationskonstanten, die Standardabweichung sowie der korrigierte Wert für die Biosensor-Konzentration der jeweils angewendeten Stammlösung sind hingegen für alle getesteten Liganden angegeben. a) Coenzym A

 $k_D = 10141,61 \text{ nM} \pm 358,0$ 



Abb. C.25.: Titrationskurve von 0,5 µM Biosensor mit Coenzym A

b) <u>Butyryl-CoA</u>  $k_D = 2860,59 \text{ nM} \pm 128,7$ 



Abb. C.26.: Titrationskurve von 0,5 µM Biosensor mit Butyryl-CoA

c) <u>Lauryl-CoA</u>  $k_D = 8,922 \text{ nM} \pm 3,61$ 



Abb. C.27.: Titrationskurve von 0,5 µM Biosensor mit Lauryl-CoA

Ligand	k <sub>D</sub> in nM	Standard- abweichung	Korrigierte Biosensor- Konzentration
СоА	10141,61	358,00	0,5 µM
C04:0-CoA	2860,59	128,70	0,5 µM
C12:0-CoA	8,92	3,61	0,517 μM
C14:0-CoA	21,17	1,21	0,390 µM
C14:1-CoA	18,75	3,92	0,503 µM
C16:0-CoA	10,92	0,53	0,481 µM
C16:1-CoA	8,07	2,06	0,519 µM
C18:0-CoA	5,26	2,65	0,711 μM
C18:1-CoA	3,09	2,59	0,681 µM
C18:2-CoA	9,68	2,75	0,552 μM

Tab. C.3.: Dissoziationskonstanten für das Biosensor-Protein und alle generierten Liganden

Die ermittelten Werte für die einzelnen Liganden zeigen eine Bevorzugung langkettiger Liganden gegenüber kurzkettigen gleichen Sättigungsgrades sowie eine höhere Affinität (geringere Dissoziationskonstante) zu ungesättigten Fettsäure-CoA-Estern gegenüber gesättigten gleicher Kettenlänge. Ausnahmen von dieser Regel sind die für C12:0-CoA und C18:2-CoA bestimmten Werte.

Letzteres war auf Grund der konjugierten Doppelbindungen generell extrem oxidationsempfindlich. HPLC-Studien zeigten, daß innerhalb weniger Stunden unter Einfluß von Raumtemperatur und Sauerstoff eine komplette Zersetzung in verschiedene Oxidationsprodukte zu verzeichnen war. Daher wurde dieser Ligand für jede Versuchsreihe, die durchaus mehrere Stunden in Anspruch nehmen konnte, neu generiert und durch eine HPLC-Untersuchung auf Unversehrtheit überprüft. Aliquots des Liganden wurden bis zur Anwendung bei -20°C unter Stickstoffathmosphäre aufbewahrt.

Die Tests zeigten, daß das Biosensor-Protein trotz chemischer Modifikation noch immer das typische Verhalten eines ACBPs aufwies. So wurden Coenzym A bzw. kurzkettige Fettsäure-CoA-Ester um Größenordnungen schlechter gebunden als die natürlichen langkettigen Liganden. Freie Fettsäuren und andere nicht-aliphatische CoA-Ester (z.B. mit Cholesterol verestertes CoA) hatten eine so geringe Affinität zum Biosensor, daß die Bindungskonstanten in diesem Test nicht zu ermitteln waren. Diese potentiellen Liganden hatten keinen meßbaren Einfluß auf die Biosensor-Fluoreszenz.

# 6.2. Ermittlung der Dissoziationskonstanten für die ACBP-Isoformen und -Mutanten

Im folgenden sollen die Ergebnisse des Biosensor-Testes für verschiedene ACBP-Isoformen bzw. -Mutanten dargestellt werden. Der Übersichtlichkeit halber wird dabei nur auf die Wildtyp-Proteine ACBP3 (AC3-WT) und ACBP4 (AC4-WT) sowie auf ihre in Position 19 und 24 veränderten Doppelmutanten ACBP3-N19S,A23E (AC3-SE) und ACBP4-S19N,E23A (AC4-NA) eingegangen.

Der Biosensor-Test mit den potentiellen Liganden Coenzym und Butyryl-CoA wurde nur mit den Wildtyp-Proteinen durchgeführt, da hier keine hohe Bindungsspezifität und damit auch keine entscheidenden Unterschiede zwischen den Isoformen zu erwarten waren. Diese Liganden dienten nur zur Demonstration der Funktionalität der überexprimierten rekombinanten Proteine, die als ACBPs kurzkettige Fettsäure-CoA-Ester um Größenordnungen schlechter als die eigentlichen Liganden, die langkettigen Fettsäure-CoA-Ester, binden sollten.

Zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten wurden wie in B.6.4.2. beschrieben parallele Meßreihen verschiedener Ligandenkonzentrationen mit 0,5  $\mu$ M Biosensor und 5  $\mu$ M ACBP durchgeführt. Aus den Meßwerten sowie den Werten für minimale und maximale Fluoreszenz, Biosensor-k<sub>D</sub>, Gesamtprotein- und Ligandenkonzentration konnten die Konzentrationen für gebundene und freie Liganden ermittelt werden. Durch Auftragung der gebundenen Ligandenkonzentration gegen gebundene geteilt durch freie Ligandenkonzentration (Scatchard-Plot) konnte die Bindungskurve in eine lineare Funktion überführt werden, deren negativer reziproker Anstieg die k<sub>D</sub> für das untersuchte ACBP ergab. (Mathematische Grundlagen dazu siehe B.6.2.3.)

6.2.1. Coenzym A

Auf Grund der sehr geringen Bindungsaffinität von Coenzym A an ACBP war die Bestimmung der Dissoziationskonstanten im Scatchard-Plot problematisch, da die hierfür benötigte Maximalfluoreszenz im Sättigungszustand nie erreicht wurde. Dennoch konnte an Hand der ermittelten Meßwerte extrapoliert werden. Da dieser Ligand nur zur Demonstration geringer Bindunsspezifität diente, wurde eine genauere Auswertung nicht vorgenommen.

Die graphische Auswertung der im Anhang aufgeführten Meßwerte (siehe G.3.a) ergab folgende Werte für die CoA-Bindung:

ACBP3-WT:  $k_D = 14224.8 \text{ nM} \pm 7478$ ACBP4-WT:  $k_D = 14124.3 \text{ nM} \pm 1858$ 

#### 6.2.2. Butyryl-CoA

Für die Auswertung der Butyryl-CoA-Meßreihen bestanden die gleichen Probleme wie für Coenzym A selbst, da auch hier die Bindungsspezifität zu gering zur Erreichung der Sättigungskonzentration war.

Die graphische Auswertung der im Anhang dargestellten Meßwerte (G.3.b) ergab folgende Werte für die CoA-Bindung:

ACBP3-WT:  $k_D = 6049,6 \text{ nM} \pm 562$ ACBP4-WT:  $k_D = 6006,0 \text{ nM} \pm 330.5$ 

#### 6.2.3. Lauryl-CoA

Die Auswertung an Hand des Scatchard-Plots soll ausführlich am Beispiel des Liganden Lauryl-CoA (C12:0-CoA) und dem Wildtyp-Protein ACBP3 (AC3-WT) dargestellt werden. Im folgenden sind die ermittelten Meßwerte und die aus ihnen ermittelten Folgewerte angegeben.

Ligand			Durch	Standard	Х	Y	
in	Serie 1	Serie 2	Sobnitt	abwei-	=Geb.Ligand/	=X/Freier	
μM			sciintt	chung	Gesamtprotein	Ligand	
0	20846	17586	19216	2305.17	/	/	$\rightarrow$ Minimalwert:
0.959	27316	26156	26736	820.244	0.16067282	113.102379	19216
1.918	35498	33656	34577	1302.49	0.32068008	92.1624294	
2.877	44994	43460	44227	1084.70	0.47723229	63.5984047	Biosensorkonz.:
3.356	49810	45621	47716	2962.07	0.55776687	57.579944	0,517 μM
3.836	54624	55210	54917	414.365	0.63106154	37.73743	Gesamtprot.konz .:
4.315	60812	62875	61844	1458.76	0.70344645	22.4193304	5,517 μM
4.795	63879	64929	64404	742.462	0.78401023	18.5918334	Biosensor-k <sub>D</sub> :
5.754	68746	69658	69202	644.881	0.94027433	10.0411669	8,922 nM
6.713	72227	73882	73055	1170.26	1.02879031	1.94902904	
7.672	75574	71551	73563	2844.69	1.07879399	0.89440866	
11.51	75435	72494	73965	2079.60	/	/	→ Maximalwert:
19.18	73456	72890	73173	400.222	/	/	73965

**Tab. C.4.:** Meßwerte für ACBP3-WT und Lauryl-CoA sowie die für den Scatchard-Plot berechneten Werte für gebundenen und gebundenen/freien Liganden jeweils geteilt durch die Gesamtproteinkonzentration.

In zwei parallelen Versuchsreihen wurden den 200  $\mu$ l-Ansätzen, die jeweils 0,5  $\mu$ M Biosensor und 5  $\mu$ M ACBP3-WT in 100 mM Tris pH 7,2 enthielten, Aliquots einer Lauryl-CoA-Stammlösung zugegeben. Die Endkonzentration des Liganden wurde an Hand der spektrophotometrisch bestimmten tatsächlichen Konzentration der Stammlösung korrigiert. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der parallelen Meßreihen Serie 1 und 2 (siehe Tab. C.4.) wurden gemittelt und unter Angabe der Standardabweichung in Abb. C.28.a) graphisch dargestellt.



- Abb. C.28.: a ) Graphische Darstellung der Mittelwerte der Meßreihen für Lauryl-CoA+ACBP3-WT
- b) Scatchard-Plot der linearisierten Bindungskurve aus a)

Aus den Meßwerten und den in Tab. C.4. angegebenen Konstanten sollten jeweils die Konzentrationen an freiem und gebundenem Liganden berechnet werden, um die Bindungskurve in einem Scatchard-Plot in eine lineare Funktion zu überführen, deren negativer reziproker Anstieg den Wert für die  $k_D$  dieser ACBP-Liganden-Kombination angab. Durch die Division sowohl der X- als auch der Y-Werte durch die Gesamtproteinkonzentration konnte zusätzlich die Bindungsstöchiometrie ermittelt werden. Der Schnittpunkt der Funktion mit der X-Achse gab dabei das Verhältnis von Ligand zu Bindungspartner an.

Die für den Scatchard-Plot benötigte <u>Konzentration an freiem Liganden</u> ergab sich aus dem Produkt der Biosensor- $k_D$  mit der Differenz von (Meßwert – Minimalwert) geteilt durch die Differenz von (Maximalwert – Meßwert).

Die vom <u>Biosensor gebundene Konzentration</u> an Liganden ergab sich aus dem Produkt der Biosensor-Konzentration mit der Differenz von (Meßwert – Minimalwert) geteilt durch die Differenz von (Maximalwert – Minimalwert).

Die Konzentration vom ans <u>ACBP gebundenen Liganden</u> war dann aus der Differenz von (Gesamtkonzentration an Liganden – freiem Liganden – Biosensor-gebundenem Liganden) zu ermitteln. (Mathematische Grundlagen siehe B.6.2.3.)

Die Datafit-Auswertung der Meßwerte für die Bindung von Lauryl-CoA an ACBP3-WT im Scatchard-Plot (siehe Abb. C.28.b) ergab einen Anstieg der Funktion von -125.81  $\pm$  10.45. Der negative Reziprokwert dieses Anstiegs war damit 0,007948  $\pm$  0,000627. Da bei der Berechnung verwendete Konzentrationen in  $\mu$ M angegeben waren, entsprach dieser Wert also einer  $k_D$  von 0,007948  $\mu$ M bzw. 7,948 nM  $\pm$  0,627. Da die Funktion die X-Achse im Wert 1 schneidet, konnte von einer 1:1 Bindungsstöchiometrie ausgegangen werden.

# 6.2.4. Dissoziationskonstanten für alle ACBP-Wildtypen und Doppelmutanten

Die oben erläuterte Vorgehensweise wurde nun auf alle Meßreihen der ACBP-Wildtypen und Doppelmutanten mit allen langkettigen Acyl-CoA-Estern angewendet. Im folgenden sind der besseren Übersichtlichkeit wegen nur die ermittelten Dissoziationskonstanten angegeben. Die ausführliche Auflistung aller gemessenen und berechneten Werte ist im Anhang beigefügt (siehe G.3.c-j).

Ligand	k <sub>D</sub> für AC3-WT	k <sub>D</sub> für AC3-SE	k <sub>D</sub> für AC4-WT	k <sub>D</sub> für AC4-NA
Liganu	in nM	in nM	in nM	in nM
C12:0-CoA	$7.948 \pm 0,627$	$4,504 \pm 0,492$	$10,924 \pm 1,488$	$13,158 \pm 1,232$
C14:0-CoA	$18,688 \pm 1,942$	$10,835 \pm 1,631$	$33,688 \pm 2,511$	$46,138 \pm 6,107$
C14:1-CoA	$12,845 \pm 0,695$	$17,323 \pm 1,889$	$24,992 \pm 3,208$	$19,586 \pm 2,793$
C16:0-CoA	$10,781 \pm 0,632$	$5,853 \pm 0,871$	$17,216 \pm 1,119$	$24,769 \pm 3,046$
C16:1-CoA	$4,568 \pm 0,625$	$9,309 \pm 0,779$	$13,410 \pm 1,516$	$9,679 \pm 1,370$
C18:0-CoA	$3,273 \pm 0,355$	$2,450 \pm 0,242$	$6,004 \pm 0,365$	$10,594 \pm 1,176$
C18:1-CoA	$2,161 \pm 0,315$	$3,670 \pm 0,159$	$4,965 \pm 0,966$	$2,351 \pm 0,371$
C18:2-CoA	$6,131 \pm 0,611$	$9,134 \pm 1,346$	$8,315 \pm 0,630$	$7,307 \pm 2,117$

- **Tab. C.5.:** Dissoziationskonstanten für alle ACBP-Isoformen und Doppelmutanten, ermittelt im Scatchard-Plot
- 6.2.5. Dissoziationskonstanten für die Einzelmutanten

Nachdem der gemeinsame Einfluß der beiden Aminosäuren in Position 19 und 23 auf die Ligandenbindungsspezifität untersucht worden war, sollte festgestellt werden, ob sich der beobachtete Effekt auf die Mutation einer der beiden Positionen zurückführen ließ, oder ob beide Aminosäuren gleichermaßen dazu beitrugen. Dazu wurden ausgewählte Liganden (Palmityl-, Stearyl- und Oleyl-CoA) mit den Einzelmutanten AC3-S, AC3-E, AC4-N und AC4-A im Biosensor-Test inkubiert und die ermittelten Dissoziationskonstanten mit denen der Wildtypen und Doppelmutanten verglichen. Da sich nach Untersuchung von 3 verschiedenen Liganden bereits durchgehend ein einheitliches Ergebnis für den Einfluß der einzelnen Aminosäuren ergab, wurden die restlichen Liganden nicht mehr mit allen Einzelmutanten inkubiert, um den Materialeinsatz geringer zu halten.

Im folgenden sind die für die Einzelmutanten und die ausgewählten Liganden erhaltenen Dissoziationskonstanten aufgelistet. Die ausführliche Darstellung der gemessenen und berechneten Werte erfolgt im Anhang (G.4.).

Ligand	k <sub>D</sub> für <b>AC3-S</b> in nM	k <sub>D</sub> für <b>AC3-E</b> in nM	k <sub>D</sub> für <b>AC4-N</b> in nM	k <sub>D</sub> für <b>AC4-A</b> in nM
C16:0-CoA	$8,623 \pm 1,262$	$8,777 \pm 0,727$	$19,897 \pm 3,046$	$19,542 \pm 2,727$
C18:0-CoA	$2,707 \pm 0,138$	$2,871 \pm 0,173$	$8,552 \pm 0,569$	$8,377 \pm 0,401$
C18:1-CoA	$2,757 \pm 0,148$	$2,575 \pm 0,165$	$3,628 \pm 0,375$	$3,844 \pm 0,335$

**Tab. C.6.:** Dissoziationskonstanten für alle ACBP-Einzelmutanten und ausgewählte Liganden, ermittelt im Scatchard-Plot

#### 6.3. Auswertung des Biosensor-Testes

Zur Veranschaulichung der Daten soll die Auswertung der im Scatchard-Plot ermittelten Dissoziationskonstanten zum einen aufgeschlüsselt nach Liganden und zum anderen nach ACBP-Isoformen und Doppelmutanten erfolgen.

6.3.1. Auswertung des Biosensor-Tests geordnet nach Liganden

Die ermittelten Werte für die Dissoziationskonstanten der ACBP-Isoformen und Doppelmutanten sind im folgenden geordnet nach Kettenlänge der Liganden graphisch dargestellt.



Abb. C.29.: Graphische Darstellung der ermittelten Dissoziationskonstanten und deren Standardabweichung für die ACBP-Isoformen ACBP3 (AC3-WT) und ACBP4 (AC4-WT) und ihre Doppelmutanten (AC3-SE und AC4-NA) für die Liganden Lauryl-CoA (oben links), Myristyl- und Myristenyl-CoA (oben rechts), Palmityl- und Palmitoleyl-CoA (unten links) sowie Stearyl-, Oleyl- und Linoleyl-CoA (unten rechts)

Bei der Gegenüberstellung der Dissoziationskonstanten für Liganden mit gleicher Kettenlänge, jedoch unterschiedlichem Sättigungsgrad ließen sich durchgehend regelmäßig wiederkehrende Verhaltensmuster erkennen.

Für alle gesättigten Liganden galt:

- Die Dissoziationskonstanten des Wildtyps ACBP3 (AC3-WT) lagen jeweils <u>höher</u> als die seiner Doppelmutante ACBP3-N19S,A23E (AC3-SE).
- Die Dissoziationskonstanten des Wildtyps ACBP4 (AC4-WT) waren jeweils <u>niedriger</u> als die seiner Doppelmutante ACBP4S19N,E23A (AC4-NA)

Für alle ungesättigten Liganden galt:

- Die Dissoziationskonstanten des Wildtyps ACBP3 (AC3-WT) lagen jeweils <u>niedriger</u> als die seiner Doppelmutante ACBP3-N19S,A23E (AC3-SE).
- Die Dissoziationskonstanten des Wildtyps ACBP4 (AC4-WT) waren jeweils höher als die seiner Doppelmutante ACBP4S19N,E23A (AC3-NA)

Somit war festzustellen:

- Proteine, die in den Positionen 19 ein Asparagin (N) und in 23 ein Alanin (A) aufweisen, bevorzugen <u>ungesättigte</u> Liganden → AC3-WT und AC4-NA
- Proteine, die in den Positionen 19 ein Serin (S) und in 23 einen Glutaminsäurerest
   (E) aufweisen, bevorzugen gesättigte Liganden → AC4-WT und AC3-SE

6.3.2. Auswertung des Biosensors geordnet nach Wildtyp-Proteinen

Um die in C.6.3.1. aufgezeigten Gesetzmäßigkeiten noch zu verdeutlichen, wurden die erhaltenen  $k_D$ -Werte getrennt für die jeweilige Wildtyp-Isoform und ihre Doppelmutante aufgetragen.

In der Abb. C.30. sind die Dissoziationskonstanten für ACBP3 und seine Doppelmutante AC3-SE gegenübergestellt. Dabei ließ sich generell feststellen, daß sich die Affinität zum Liganden mit dessen zunehmender Kettenlänge erhöhte. Ausnahmen von dieser Regel waren wiederum C12:0-CoA und C18:2-CoA. Auf diese Anomalien wurde bereits in C.6.1.3. eingegangen. Der direkte Vergleich der beiden hier untersuchten Proteine für die einzelnen Liganden zeigte jeweils eine gegenläufige Tendenz von Wildtyp und Doppelmutante. Während das ACBP3-Wildtyp-Protein jeweils den ungesättigten Liganden dem gesättigten gleicher Kettenlänge vorzog, zeigte das in den Aminosäuren 19 und 23 veränderte Protein AC3-SE an gleicher Stelle eine Bevorzugung des gesättigten Liganden (geringere  $k_D$ -Werte).



AC3-WT und AC3-SE

**Abb. C.30.:** Graphische Darstellung der Dissoziationskonstanten für ACBP3-Wildtyp (AC3-WT) und seine Doppelmutante ACBP3-N19S,A23E (AC3-SE) für alle getesteten langkettigen Acyl-CoAs

Die Gegenüberstellung der Dissoziationskonstanten für ACBP4-Wildtyp und seine Doppelmutante in Abb. C.31. stellte ein fast exaktes Spiegelbild der Verhältnisse für ACBP3 in der vorhergehenden Abbildung dar. Zwar nahm auch hier die Affinität zum Liganden mit dessen Kettenlänge zu, wobei die gleichen Ausnahmen wie oben erwähnt bei C12:0-CoA und C18:2-CoA zu beobachten waren. Der Vergleich von Wildtyp und Mutante für die jeweiligen Liganden zeigte jedoch nun eine gegenläufige Tendenz. Im Unterschied zur vorhergehenden Abbildung ließ sich hier eine Bevorzugung der gesättigten Liganden durch den Wildtyp ACBP4 erkennen, während bei den ungesättigten Liganden die Affinitäten genau entgegengesetzt zu Gunsten der Doppelmutante verschoben waren.

Die Tendenzen in beiden Abbildungen verliefen jeweils spiegelbildlich, wobei die Eigenschaften des einen Wildtyps denen der Doppelmutante des jeweils anderen entsprachen. Dabei ließ sich jedoch auch feststellen, daß die ermittelten  $k_D$ -Werte für ACBP4 und seine Doppelmutante AC4-NA generell höher waren als die vergleichbaren Werte für ACBP3 und AC3-SE (Ausnahme C18:2-CoA). ACBP4 schien also insgesamt eine niedrigere Affinität zu allen Liganden zu haben.



#### AC4-WT und AC4-NA

- **Abb. C.31.:** Graphische Darstellung der Dissoziationskonstanten für ACBP4-Wildtyp (AC4-WT) und seine Doppelmutante ACBP4-S19N,E23A (AC4-NA) für alle getesteten langkettigen Acyl-CoAs
- 6.3.3. Auswertung des Biosensor-Tests für die Einzelmutanten

Die in C.6.2.5. angegebenen Dissoziationskonstanten für den Biosensor-Test der Einzelmutanten mit ausgewählten Liganden sollten in einer graphischen Darstellung mit denen des jeweiligen Wildtyps und der Doppelmutante verglichen werden. Dabei war festzustellen, daß beide Einzelmutanten die Bindungsspezifität beeinflussen. Die Mutation in Position 19 (AC3-S und AC4-N) schien einen geringfügig größeren Einfluß zu haben – die  $k_D$ -Werte dieser Einzelmutanten lagen hier dichter an denen der Doppelmutanten als die der in Position 23 mutierten Proteine. Diese Unterschiede befanden sich jedoch im Bereich der Standardabweichungen und waren somit nicht signifikant.

AC3-WT

AC3-S

C18:1-CoA

AC3-E

AC3-SE







**Abb. C.32.:** Graphische Darstellung der Dissoziationskonstanten für Palmitoyl-CoA und allen auf ACBP3 basierenden Proteinen (oben links) bzw. allen ACBP4-Mutanten (oben rechts), desgleichen für Stearyl-CoA (mitte links und mitte rechts) sowie Oleyl-CoA (unten links und unten rechts).

AC4-WT

AC4-N

C18:1-CoA

AC4-A

AC4-NA

# **D.** Diskussion

# **<u>1. Allgemeine Strategie</u>**

Das Acyl-CoA-bindende Protein ist als ubiquitär vorkommendes Protein in Spezies des gesamten eukaryotischen Reiches nachgewiesen worden. Die genomische Organisation dieser Proteinfamilie ist vor allem im tierischen Organismus gut untersucht, wobei auch gewebespezifische Isoformen mit ihren jeweiligen spezifischen Strukturmerkmalen identifiziert wurden (siehe Kapitel A.). Über die entsprechenden Verhältnisse im pflanzlichen System sind hingegen weitaus weniger Daten verfügbar. Auf Grund der vielfältigen Funktionen, die dieser Proteinfamilie zugeschrieben werden, kann von einem komplexen, häufig extrazellulär regulierten Expressionsverhalten sowie einer weiten Bandbreite an regulatorischen Funktionen dieser Proteine im tierischen Gesamtorganismus ausgegangen werden. Da es für Pflanzen im allgemeinen und Digitalis lanata EHRH. im besonderen nur begrenzte Informationen über die Eigenschaften der ACBPs gibt, sollten in dieser Arbeit erste grundlegende Einsichten in die Funktion, genomische Organisation und Strukturmerkmale der ACBP-Familie in Digitalis lanata EHRH. gewonnen werden. Dabei sollte ausschließlich auf die Funktion dieser Proteine als Bindungsproteine für langkettige Fettsäure-Coenzym A-Ester eingegangen werden, wobei in vitro-Untersuchungen an rekombinanten Wildtyp- bzw. Mutanten-Proteinen zu einem besseren Verständnis der Ligandenbindung beitragen sollten.

a) Ausgangspunkt

Aus vorangegangenen Untersuchungen war bekannt, daß in den Proembryogenen Massen von *Digitalis lanata* EHRH. mindestens zwei Homologe der ACBP-Familie exprimiert werden (METZNER et al. 2000). Diese Proteine wurden nativ gereinigt und ansequenziert, wobei die hohe Homologie zu bereits bekannten ACBP-Sequenzen verschiedenster Organismen nahelegte, daß es sich bei diesen Proteinen um funktionelle Isoformen der ACBP-Familie handelte. Durch einen *in vitro*-Bindungstest mit Palmitoyl-CoA konnte diese Annahme bestätigt werden. Die aus diesen Proteinteilsequenzen abgeleiteten degenerierten Primer wurden zur Generierung eines PCR-Produkts verwendet (METZNER, persönliche Kommunikation), das den Ausgangspunkt dieser Arbeit darstellte.

b) Auffinden von cDNA-Sequenzen

Das PCR-Produkt sollte als Sonde für das Durchsuchen einer cDNA-Bank aus Proembryogenen Massen von *Digitalis lanata* EHRH. dienen, wobei die Isolierung von für verschiedene ACBP-Isoformen kodierenden cDNAs angestrebt wurde. Die Isoformen sollten auf ihre Funktionalität hin getestet werden, wobei die jeweiligen korrespondierenden rekombinanten Proteine in einem IP-Shift-Gelassay getestet werden sollten.

c) Transkriptionsanalyse

Durch Northern-Analyse sollte das Transkriptionsverhalten der ACBPs in verschiedenen Pflanzenorganen, Embryogenesestadien sowie unter dem Einfluß ausgewählter Stressoren untersucht werden. Dabei sollten sowohl das ACBP-Gesamt-transkriptionslevel als auch spezifische Signale einzelner Isoformen erfaßt werden.

## d) Genomische Analyse

Zur Aufklärung der genomischen Organisation sollte zum einen eine genomische Southern-Analyse durchgeführt werden, um die Anzahl detektierbarer Genkopien im *Digitalis*-Genom zu bestimmen. Zum anderen sollten durch das Durchsuchen einer Bank aus partialverdauter genomischer DNA aus *Digitalis lanata* EHRH. ACBPhomologe Sequenzen im Digitalis-Genom aufgefunden und sequenziert werden, um regulatorische Strukturen der Promotorregionen zu untersuchen.

e) Generierung von Punktmutationen

Die aufgefundenen cDNAs sollten dahingehend modifiziert werden, daß ihre korrespondierenden Proteine in jeweils 1-2 Aminosäurepositionen mutiert waren. Diese Mutanten sollten hinsichtlich ihrer Spezifität der Ligandenbindung untersucht und mit den Wildtyp-Proteinen verglichen werden. Eine modifizierte Variante der *Site-directed Mutagenesis* sollte hierbei zum Einsatz kommen, wonach die in pET3-Vektoren klonierten mutierten Sequenzen überexprimiert werden sollten.

f) in vitro-Test zur Ligandenbindungsspezifität

Mit dem in der Arbeitsgruppe Prof. Knudsens, Odense, entwickelten Biosensor-Test sollten erstmals Dissoziationskonstanten verschiedener ACBP-Isoformen und deren Mutanten mit einem weiten Spektrum an Liganden ermittelt werden. Dieser Test sollte als Alternative zu anderen zeit- und materialaufwendigeren Methoden auf seine Eignung und Zuverlässigkeit überprüft werden. Die Erkenntnisse über den Einfluß einzelner Aminosäuren auf die Bindungsspezifität der ACBPs sollte Rückschlüsse auf deren potentielle Funktion ermöglichen.

# 2. Die cDNA-Sequenzen acbp3 und acbp4

## 2.1. Charakterisierung von acbp3

Beim Durchsuchen einer cDNA-Bank aus PEMs von Digitalis lanata EHRH. konnten unter stringenten Hybridisierungsbedingungen 8 Klone identifiziert werden, die übereinstimmend für eine cDNA mit hohen Homologien zu bereits bekannten acbp-Sequenzen kodierten. Diese acbp3-cDNA bestand aus 527 bp, wovon 276 bp auf den kodierenden Bereich entfielen. Das korrespondierende Protein ACBP3 hatte mit 92 Aminosäuren Länge ein theoretisches Molekulargewicht von 10235,5 Da (inklusive Startmethionin). Das tatsächliche Molekulargewicht des überexprimierten rekombinanten Proteins wurde mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie mit 10105 Da bestimmt. Dies entspricht der theoretischen Molekülmasse ohne das Startmethionin, welches offensichtlich von den zur Expression genutzten E. coli-Zellen prozessiert und abgespalten wurde. Der theoretische Isoelektrische Punkt wurde mit pH 5,84 (mit Startmethionin) bzw. pH 5,86 (ohne Startmethionin) berechnet

## 2.2. Charakterisierung von acbp4

Unter den gegebenen Bedingungen waren keine weiteren Isoformen in der PEMscDNA-Bank detektierbar. Es wurde daher eine cDNA-Bank aus Blättern von *Digitalis lanata* EHRH. unter weitaus weniger stringenten Hybridisierungsbedingungen durchsucht. Dies führte zwar zu einer stark erhöhten Rate an falschpositiven Signalen, ermöglichte jedoch die Auffindung einer weiteren cDNA mit ebenfalls hohen Homologien zu bekannten acbp-Sequenzen. Diese acbp4-cDNA war, zumindest in der zur Erstellung der Bank genutzten mRNA-Population, im Verhältnis zu acbp3 stark unterrepräsentiert. So waren von 26 detektierten positiven Signalen 25 identisch mit dem bereits identifizierten acbp3, während nur ein einziger Klon für acbp4 kodierte. Dies sprach für eine wesentlich geringere Transkription dieser Isoform, zumindest in Blättern und PEMs von *Digitalis lanata* EHRH.

Die acbp4-cDNA bestand aus 502 bp mit einem kodierenden Bereich von 270 bp. Das korrespondierende Protein ACBP4 hatte mit 90 AS ein theoretisches Molekulargewicht von 10056,3 Da (inklusive Startmethionin). Auch hier wurde das Startmethionin durch die Wirtszellen abgespalten, so daß das tatsächliche Molekulargewicht mit 9927 Da bestimmt werden konnte. Der theoretische Isoelektrische Punkt wurde mit pH 5,84 (mit Startmethionin) bzw. pH 5,87 (ohne Startmethionin) berechnet.

## 2.3. Überexpression und Funktionstest

Die Funktionalität der Genprodukte von acbp3 und acbp4 sollte durch einen qualitativen Bindungstest aufgezeigt werden. Die hierfür im Expressionsvektor pET3a überexprimierten Proteine wurden nach ihrer Aufreinigung einem Gelshift-Assay unterzogen, wobei die Änderung des Isoelektrischen Punktes nach Bindung eines Liganden als Funktionstest diente.

Wie in C.4.4. dargestellt, wiesen sowohl ACBP3 als auch ACBP4 die erwartete Änderung ihres Isoelektrischen Punktes nach Bindung von Palmitoyl-CoA auf. Damit war die Funktionalität der beiden rekombinanten Proteine belegt. Dieser unter unphysiologischen Bedingungen durchgeführte *in vitro*-Test ließ natürlich keine Rückschlüsse auf die intrazelluläre Funktionalität und Bedeutung dieser Proteine zu, belegte jedoch deren mögliche Involvierung in den Transport und Metabolismus der langkettigen Acyl-CoA-Ester.

## 2.4. Sequenzvergleiche

## a) Vergleiche zwischen den ACBP-Isoformen aus Digitalis lanata EHRH.

Die Sequenzen sowohl der cDNAs acbp3 und acbp4 als auch der jeweiligen korrespondierenden Proteine ACBP3 und ACBP4 wurden einem Sequenzvergleich unterzogen. Die Gesamt-cDNAs zeigten dabei eine Übereinstimmung von 65,6 %, während die kodierende Sequenz sogar zu 81,9 % übereinstimmte. Auf Proteinebene wurde die Homologie der beiden Isoformen noch deutlicher. Hier konnte eine Identität von 83,7 % (identische Aminosäuren) bzw. eine Ähnlichkeit von 91,3 % (homologe Aminosäuren) festgestellt werden.

Beim Vergleich der beiden korrespondierenden Proteine ACBP3 und ACBP4 mit den nativ gereinigten und ansequenzierten Proteinen ACB1\_DIGLA und ACB2\_DIGLA konnte keine vollständige Übereinstimmung konstatiert werden. So wichen die 40 sequenzierten Aminosäuren der ACB2\_DIGLA-Sequenz in 4 Positionen von der ACBP3-Sequenz ab (siehe Abb. C.3.). Diese Abweichung von 10 % legte das Vorhandensein einer weiteren Isoform nahe.

Die Sequenzen des korrespondierenden Proteins ACBP4 und des ansequenzierten nativen Proteins ACB1\_DIGLA unterschieden sich hingegen nur in einer Position von 30 sequenzierten Aminosäuren (siehe Abb. C.4.). Auf DNA-Ebene zurückgeführt, entsprach dieser Unterschied dem Austausch einer einzelnen Base. So würde das für Serin kodierende Triplett **AGT** (in ACBP4) durch eine Punktmutation zu **AAT** für Asparaginsäure kodieren (in ACB1\_DIGLA).

Diese Abweichung ließe sich durch Sequenzierfehler sowohl auf DNA-Ebene als auch auf Proteinebene erklären. Dies erscheint jedoch unwahrscheinlich, da wiederholte Sequenzierungen diese Sequenzen bestätigten. Eine weitere Erklärung wäre ein Fehler bei der Transkription der ursprünglichen mRNA, die zur Herstellung der Blätter-cDNA-Bank verwendet wurde. Dabei kann eine solche Punktmutation sowohl auf Ebene der Reversen Transkriptase als auch bei der späteren Amplifizierung der Bank auftreten. Da nur ein einziger Klon für acbp4 detektierbar war, läßt sich die Möglichkeit, daß dieser fehlerhaft in der Bank amplifiziert wurde, nicht ausschließen. Des weiteren ist festzustellen, daß das ansequenzierte Protein ACB1 DIGLA aus PEMs isoliert wurde, während der acbp4-cDNA-Klon in einer cDNA-Bank aus Blättern von Digitalis lanata EHRH. detektiert wurde. Die Abweichung in einer Basenpaarung wäre also auch durch eine Punktmutation im Genom der Zellkulturen erklärbar, da diese undifferenzierten Kulturen eine weitaus höhere Zellteilungsrate und damit auch höhere Mutationsquote aufweisen. Dies erscheint als die wahrscheinlichste Erklärung des Phänomens, da schon zuvor Abweichungen zwischen aus PEMs isolierten Proteinen und den jeweiligen korrespondierenden Proteinen der zugehörigen cDNA-Klone festgestellt werden konnten (u.a. KANDZIA, Dissertation 1999; METZNER, Dissertation 2001).

Die Abweichung von ACBP4 und ACB1\_DIGLA in nur einer Aminosäureposition ist somit nicht signifikant genug, um sie als getrennte Isoformen zu behandeln. Ein weiterer Hinweis darauf, daß es sich bei ACB1\_DIGLA und ACBP4 nicht um unterschiedliche Isoformen handelt, liegt in der Übereinstimmung der Molekularmassen. Während das native Protein ACB1\_DIGLA mit einer Masse von 9926 Da bestimmt wurde (METZNER et al. 2000), konnte für das korrespondierende Protein ACBP4 eine Molekularmasse von 9925,1 Da berechnet werden.

Die Sequenzvergleiche aller bekannten ACBP-Sequenzen aus *Digitalis lanata* EHRH. verdeutlichte die ausgesprochen hohe Homologie der Isoformen sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene. Dabei konnte bei Abweichung in nur einer Aminosäureposition und identischen Molmassen eine mögliche Übereinstimmung von korrespondierendem Protein ACBP4 und nativ gereinigtem Protein ACB1\_DIGLA postuliert werden. Die Sequenzen von ACBP3 und ACB2\_DIGLA wichen hingegen stark genug voneinander ab, um das Vorhandensein einer dritten Isoform der ACBP-Familie zu suggerieren.

b) Vergleiche zu ACBPs anderer Spezies

Ein Vergleich der korrespondierenden Proteine ACBP3 und ACBP4 mit den in der SWISSPROT-Datenbank aufgeführten ACBPs anderer Spezies zeigt zum einen eine hohen Homologie dieser Sequenzen selbst zu nur entfernt verwandten Organismen wie Hefe oder *Drosophila melanogaster*. Zum anderen lassen sich jedoch auch signifikante Unterschiede feststellen, wobei pflanzenspezifische Motive hoch konserviert in allen pflanzlichen ACBPs, nicht jedoch im tierischen System bzw. Hefe aufzufinden waren.

Im folgenden wurden die Proteinsequenzen ACBP3 und ACBP4 mit dem *FastA*-Programm mit ACBPs anderer Spezies verglichen. Die Prozentangaben beziehen sich dabei auf identische Aminosäurepositionen, wobei homologe Aminosäuren nicht berücksichtigt wurden.

	ACBP3	ACBP4
Ricinus communis	90 %	82 %
Fritillaria agrestris	83 %	83 %
Gossypium hirsutum	79 %	78 %
Arabidopsis thaliana	77 %	72 %
Brassica napus	75 %	73 %
Saccharomyces cerevisiae	52 %	57 %
Homo sapiens	48 %	51 %
Bos taurus	46 %	49 %
Drosophila melanogaster	42 %	45 %

Zur Verdeutlichung konservierter Sequenzbereiche sowie pflanzenspezifischer Motive wurden ACBP-Sequenzen der SWISSPROT-Datenbank mit den beiden *Digitalis*-Isoformen im *ClustalW*-Programm verglichen. Konservierte Bereiche sind in der Abbildung grau unterlegt, wobei die in die Ligandenbindung involvierten Aminosäurepositionen mit \* gekennzeichnet sind (siehe A.1.2.4.).

		1 1	0	20	30	40
		I		I	I	
ACBP3	(M)	GLKEEFEEH	AEKAKTLI	PE <b>N</b> TSN <b>A</b> NK	KLILYGLYKÇ	QATVGNVN-TS
ACBP4	(M)	ALKDEFEEH	AEKAKTLI	PE <b>S</b> TSN <b>E</b> NK	KLILYGLYK(	QATVGNVN-TS
ACBP_ARATH	(M)	GLKEEFEEH	AEKVNTL	FELPSNEDI	LILYGLYK	QAKFGPVD-TS
ACBP BRANA	(M)	GLKEDFEEH	AEKVKKL	LASPSNEDI	LILYGLYKÇ	QATVGPVT-TS
ACBP FRIAG	(M)	ALKEEFEEH	AVKAKTLI	PESTSNENK	KLILYGLYKÇ	QSTVGPVD-TG
ACBP_RICCO	(M)	GLKEDFEEH	AEKAKTLI	PENTTNENK	KLILYGLYKÇ	QATVGPVN-TS
ACBP GOSHI	(M)	GLKEEFEEH	AEKVKTLI	PAAPSNDDM	ILILYGLYKÇ	QATVGPVN-TS
ACBP YEAST		-VSQLFEEK	AKAVNELI	PTKPSTDEI	LELYALYK	QATVGDND-KE
ACBP DROME	I	MVSEQFNAA	AEKVKSL	FKRPSDDEF	FLQLYALFKÇ	QASVGDND-TA
ACBP MANSE	M	SLQEQFDQA	ASNVRNL	KSLPSDNDI	LELYALFKÇ	QASAGDADPAN
ACBP CAEEL		-MTLSFDDA	AATVKTLI	KTSPSNDEI	LKLYALFKÇ	QGTVGDNT-TD
ACBP ANPL FQAHLLR	GTLTLSFF:	LHQADFDEA	AEEVKKLI	KTRPTDEEI	LKELYGFYKÇ	QATVGDIN-IE
ACBP RANRI		SPQADFDKA	AGDVKKLF	KTKPTDDEI	LKELYGLYKÇ	QSTVGDIN-IE
ACBP_MOUSE		-SQAEFDKA	AEEVKRLE	KTQPTDEEM	1LFIYSHFKQ	QATVGDVN-TD
ACBP_RAT		-SQADFDKA	AEEVKRLE	KTQPTDEEM	1LFIYSHFKQ	QATVGDVN-TD
ACBP CHICK		-SEAAFQKA	AEEVKELE	KSQPTDQEM	ILDVYSHYKÇ	QATVGDVN-TD
ACBP BOVIN		-SQAEFDKA	AEEVKHLE	KTKPADEEM	ILFIYSHYKÇ	QATVGDIN-TE
ACBP HUMAN		-SQAEFEKA	AEEVRHL	KTKPSDEEM	ILFIYGHYK	QATVGDIN-TE
ACBP CHAVI		-SQAEFDKA	AEEVKNLE	KTKPADDEM	ILFIYSHYKÇ	QATVGDIN-TE
ACBP PIG		-SQAEFEKA	AEEVKNLE	KTKPADDEM	Ilfiyshyko	QATVGDIN-TE
—			*		* * **	*
		[ Hel	ix Al ]	[	Helix A2	]
	50	6	0	70	80	90
	1		1		I	
ACBP3	RPGVFNM	rd <mark>rakwda</mark> w	KAVEGKS	QEEAMADYI	TKVKQLLE	EAAAAASC 91
ACBP4	RPGIFNM	KD <mark>RAKWDAW</mark>	KAVEGKS	QEEAMGEYI	TKVKQLCE	AATASS 89
ACBP_ARATH	RPGMFSM	KE <mark>RAKWDAW</mark>	KAVEGKS	SEEAMNDYI	TKVKQLLE	/AASKAST 91
ACBP_BRANA	RPGMFSM	KE <mark>RAKWDAW</mark>	KAVEGKS	[DEAMSDY]	TKVKQLLE	AEASSASA 91
ACBP_FRIAG	RPGMFSP	RE <mark>RAKWDAW</mark>	KAVEGKS	KEEAMGDY I	TKVKQLLE	ESA 86
ACBP RICCO	RPGMFNM	rd <mark>rakwda</mark> w	KAVEGKS	[EEAMSDY]	TKVKQLLG	EAAASA 89
ACBP GOSHI	RPGMFNM	REKYKWDAW	KAVEGKS	KEEAMGDYI	TKVKQLFE	AAGSS 88
ACBP YEAST	KPGIFNM	KDRYKWEAW	ENLKGKS	QEDAEKEYI	ALVDQLIA	KYSS 86
ACBP DROME	KPGLLDL	KGKAKWEAW	NKQKGKSS	SEAAQQEYI	TFVEGLVA	KYA 86
ACBP MANSE	RPGLLDL	KGKAKFDAW	HKKAGLSE	KEDAQKAYI	AKVESLIAS	SLGLQ 90
ACBP CAEEL	KPGMFDLI	KGKAKWSAW	DEKKGLAI	KDDAQKAYV	/ALVEELIA	KYGA 86
ACBP ANAPL	CPGMLDL	KGKAKWEAW	NLKKGISP	KEDAMNAYI	SKAKTMVE	KYGI103
ACBP RANRI	CPGMLDL	KGKAKWDAW	NLKKGLSI	KEDAMSAYV	/SKAHELIE	KYGL 87
ACBP MOUSE	RPGLLDL	KGKAKWDSW	NKLKGTSP	KESAMKTYV	VEKVDELKKE	KYGI 86
ACBP RAT	RPGLLDL	KGKAKWDSW	NKLKGTSP	KENAMKTYV	/ekveelkke	KYGI 86
ACBP CHICK	RPGMLDFI	KGKAKWDAW	NALKGMSI	KE DAMKAYV	/AKVEELKGE	KYGI 86
ACBP BOVIN	RPGMLDFI	KGKAKWDAW	NELKGTSE	KEDAMKAYI	DKVEELKKE	KYGI 86
ACBP HUMAN	RPGMLDF'	TGKAKWDAW	NELKGTSE	KEDAMKAYI	NKVEELKKE	KYGI 86
ACBP CHAVI	RPGMLDFI	KGKAKWDAW	NQLKGTSE	KEDAMKSYI	DKVEELKKE	KYGI 86
ACBP PIG	RPGILDL	KGKAKWDAW	NGLKGTSE	KEDAMKAYI	NKVEELKKE	KYGI 86
—		**		*		
		[ Helix	A3 ] [	Heli	x A4	]

Abb. D.1.: Sequenzvergleich der korrespondierenden Proteine ACBP3 und ACBP4 mit ACBP-Sequenzen der SWISSPROT-Datenbank (konservierte Aminosäuren grau unterlegt, \* kennzeichnet in die Ligandenbindung involvierte Aminosäuren); SWISSPROT-Einträge: ACBP\_ARATH (Arabidopsis thaliana): P57752, ACBP\_BRANA (Brassica napus): Q39315, ACBP\_FRIAG (Fritillaria agrestris): Q22643, ACBP\_RICCO (Ricinus communis): O04066, ACBP\_GOSHI (Gossypium hirsutum): Q39779, ACBP\_YEAST (Saccharomyces cerevisiae): P31787, ACBP\_DROME (Drosophila melanogaster): P42281, ACBP\_MANSE (Manduca sexta): P31824, ACBP\_CAEEL (Caenorhabditis elegans): O01805, ACBP\_ANAPL (Anas platyrhynchos): P45882, ACBP\_RANRI (Rana ridibunda): P45883, ACBP\_MOUSE (Mus musculus): P31786, ACBP\_RAT (Rattus norvegicus): P11030, ACBP\_CHICK (Gallus gallus): Q9PRL8, ACBP\_BOVIN (Bos taurus): P07107, ACBP\_HUMAN (Homo sapiens): P07108, ACBP\_CHAVI (Chaetophractus villosus): P82934, ACBP\_PIG (Sus scrofa): P12026

Der Vergleich dieser Proteine zeigt, daß sich die beiden Digitalis-Sequenzen ACBP3 und ACBP4 in das bisherige Bild der ACBP-Familie einordnen. Alle direkt in die Ligandenbindung involvierten Aminosäuren sind konserviert. Die nähere Verwandtschaft zu den pflanzlichen Sequenzen zeigt sich in der höheren prozentualen Übereinstimmung von ACBP3 und ACBP4 mit Pflanzen-ACBPs und vergleichsweise geringeren Homologien mit tierischen bzw. Hefe-Sequenzen. Des weiteren zeigt der Sequenzvergleich in Abb. D.1., daß beide Digitalis-Sequenzen übereinstimmend pflanzenspezifische Motive aufweisen. Diese Bereiche sind vor allem im Bereich der Helices A1 (AS 6-16) und A3 (AS 52-63) auffällig, wobei die Motive sowohl für tierische als auch für pflanzliche Sequenzen jeweils hochkonserviert sind, jedoch geringere Übereinstimmungen zwischen diesen beiden Organismengruppen aufweisen. Der C-Terminus der ACBP-Familie weist generell eine höhere Varianz wobei sich geringfügig Zusammenhänge von auf. nur Sequenz und Verwandtschaftsgrad der jeweiligen Organismen feststellen lassen.

Die hohen Sequenzhomologien zu cytosolischen *basic* ACBPs anderer Spezies sowie die Abwesenheit jeglicher N-terminaler Signalsequenzen in den *Digitalis*-Isoformen legten die Vermutung nahe, daß es sich bei ACBP3 und ACBP4 ebenfalls um cytosolische Proteine handelt. Beide *Digitalis*-Isoformen sind durch jeweils ein Cystein im C-Terminus gekennzeichnet, eine Eigenschaft, die zuvor bei den beiden gehirnspezifischen Sequenzen von Frosch und Ente (ACBP\_ANAPL und ACBP\_RANRI) festgestellt wurde. Im Gegensatz zu diesen Sequenzen, die das Cystein zwischen den Helixstrukturen A2 und A3 aufweisen, ist diese reaktive Aminosäure in ACBP3 und ACBP4 im C-Terminus exponiert. Diese Tatsache könnte die während der Aufarbeitung der rekombinanten Proteine beobachtete Bildung von Homodi- und -trimeren erklären.

# 3. Expressionsanalyse für ACBP-Transkripte

Auf Grund der oben dargestellten ausgesprochen hohen Homologien zwischen den Sequenzen acbp3 und acbp4 konnte bei Verwendung dieser cDNAs als Sonden im Northern Blot jeweils nur die Gesamtexpression aller detektierbaren ACBP-Isoformen erfaßt werden. Es waren somit keine Aussagen zur differentiellen Expression einzelner Isoformen möglich. Dennoch erlaubten diese Analysen einen Einblick in das Transkriptionsverhalten dieser Genfamilie unter dem Einfluß Entwicklungs- oder Streß-bedingter Stoffwechselvorgänge.

# 3.1. ACBP-Gesamtexpression

# 3.1.1. ACBP-Gesamtexpression in Pflanzenteilen von Digitalis lanata EHRH.

Die Northern-Analyse bestimmter Pflanzenteile von *Digitalis lanata* EHRH. unter Verwendung von acbp3-cDNA als Sonde wurde bereits in C.2.2. vorgestellt. Unter den gegebenen Bedingungen konnten in allen untersuchten pflanzlichen Geweben bzw. Organen ACBP-Transkripte detektiert werden. Die weitaus geringste Expression war dabei im Sproß der zweijährigen Pflanze festzustellen, während besonders hohe Transkriptlevel in den Blättern und hier besonders in den Blättern der zweijährigen Pflanze zu verzeichnen waren.

Somit war kein starker Zusammenhang von ACBP-Expression und erhöhter Lipidsyntheserate im untersuchten Gewebe gegeben. Solche syntheseintensiven Gewebe wie Blüten und junge Blätter hatten keine wesentlich höheren Transkriptionsraten als die jeweiligen älteren Gewebe aufzuweisen. ACBP wurde hingegen konstitutiv in allen Geweben exprimiert, wobei graduelle Unterschiede mit Ausnahme der Blätter zweijähriger Pflanzen nur geringfügigen Einfluß hatten. Diese Befunde wurden durch die Ergebnisse der ACBP-Expressionsanalysen in *Brassica napus* (BROWN et al. 1998) bestätigt. Auch hier wurde, allerdings auf Proteinebene, eine konstitutive Expression in allen untersuchten Geweben festgestellt, wobei die Gewebe mit erwartungsgemäß hoher Lipidsyntheserate keine auffällig hohen ACBP-Level zeigten. Eine eventuelle differentielle Expression bestimmter Isoformen ließ sich unter den gegebenen Bedingungen im *Digitalis*-System natürlich nicht erfassen.

# 3.1.2. ACBP-Gesamtexpression während der somatischen Embryogenese

Wie in C.2.3. dargestellt wurde die ACBP-Expression im Verlauf der somatischen Embryogenese verfolgt. Dabei konnten in allen untersuchten Stadien ACBP-Transkripte nachgewiesen werden. Nach Induktion der Embryogenese durch Hormonund Saccharoseentzug beim Umsetzen der Proembryogenen Massen auf das Nährmedium II konnte bei der Entwicklung von Stage I-Globuli ein Anstieg der ACBP-Transkription verzeichnet werden. Nach Umsetzen der Kulturen auf das Auxin-haltige Nährmedium III sank die ACBP-Gesamttranskription unter das Ausgangslevel. Dieses Phänomen konnte bereits zuvor bei der Untersuchung der Expression anderer Transkripte während der somatischen Embryogenese festgestellt werden, so z.B. für Catalase- sowie Cyclophilin-mRNAs (GRUNER et al. 2000 sowie SCHOLZE, Dissertation 1999). Dieser Effekt wäre durch die grundlegende Umstellung im Stoffwechsel der sich entwickelnden Embryonen beim Mediumswechsel zu erklären. Abgesehen von diesem Effekt war jedoch bei der ACBP-Gesamttranskription ein kontinuierlicher Anstieg der ACBP-Transkriptmengen während der weiteren Embryogenese zu erkennen, bis die Transkription dieser Genfamilie in den späten Embryogenesestadien der untersuchten Kulturen wieder unter Ausgangslevel sank.

Auch die hier für die somatische Embryogenese gefundenen Expressionsmuster konnten mit den für *Brassica napus* gefundenen Ergebnissen in Übereinstimmung gebracht werden (BROWN et al. 1998). BROWN et al. konnten dabei einen kontinuierlichen Anstieg der ACBP-Proteinmengen während der Samenentwicklung verzeichnen, wobei die ACBP-Level bei Erreichen der Samenreife jedoch wieder unter die Detektionsgrenze sanken. Die hier vorgestellten Untersuchungen der mRNA-Level unterschieden sich natürlich von den Befunden für die ACBP-Proteinmengen in *Brassica napus*, da hier durch den externen Eingriff in die Hormonversorgung ein weiterer Stressor die Expression der untersuchten Genfamilie beeinflussen konnte. Dies wird besonders beim Umsetzen auf das Nährmedium III deutlich, wobei die ACBP-Gesamtexpression gravierend abfiel und erst im weiteren Verlauf der Embryogenese wieder anstieg. Davon abgesehen war die ACBP-Gesamtexpression im Verlauf der somatischen Embryogenese von *Digitalis lanata* EHRH. jedoch dem für die Embryonalentwicklung von *Brassica napus* festgestellten Muster vergleichbar.
#### 3.1.3. ACBP-Gesamtexpression unter Einfluß ausgewählter Stressoren

Da es sich beim ACBP um ein konstitutiv in allen bisher untersuchten pflanzlichen Geweben und Embryogenesestadien exprimiertes Protein handelt, waren unter dem Einfluß von Stressoren keine gravierenden Änderungen im Gesamt-Transkriptlevel zu erwarten. Dementsprechend wurden nur wenige Stressoren exemplarisch für bestimmte Streßeinflüsse untersucht. Hierbei wurde Wasserstoffperoxid in verschiedenen Konzentrationen als Generator sauerstoffhaltiger Radikale (ROS) eingesetzt, während 2,2'-Azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid (AAPH) durch Bildung freier Radikale die Lipidoxidation beschleunigen sollte (OHLSSON et al. 1995). Abscisinsäure (ABA) wurde als Vertreter der pflanzlichen Hormone auf Grund seiner weitreichenden Einflüsse auf die Genregulation ausgewählt.

Nach Auswertung der in C.2.4. dargestellten Ergebnisse läßt sich feststellen, daß die ACBP-Gesamttranskription wie erwartet nicht entscheidend durch den Einfluß der ausgewählten Stressoren verändert wird. Hohe Konzentrationen an  $H_2O_2$  (200  $\mu$ M) vermindern zwar die ACBP-Transkription beträchtlich, dies dürfte jedoch auf eine generelle Umstellung im Stoffwechsel unter Einfluß eines so hoch konzentrierten potenten Stressors zurückzuführen sein. Moderate Konzentrationen des Stressors (20  $\mu$ M) hingegen verursachten keine signifikanten Änderungen im Transkriptlevel. Die Behandlung mit 1 mM AAPH hatte unter den gegebenen Bedingungen keinen detektierbaren Effekt auf die ACBP-Gesamttranskription, während sich die acbpmRNA-Mengen durch den Einfluß von 100  $\mu$ M ABA nur geringfügig erhöhten.

Es ließ sich also feststellen, daß die ACBP-Gesamttranskription kaum oder gar nicht von den untersuchten Stressoren beeinflußt wurde. Dies steht in Übereinstimmung mit der Annahme, daß es sich beim ACBP grundsätzlich um ein konstitutiv exprimiertes Protein handelt, wobei eine differentielle Regulation einzelner Isoformen wiederum nicht auszuschließen ist.

#### 3.2. Detektion spezifischer Transkripte

Um festzustellen, ob es sich bei den ACBP-Isoformen ACBP3 und ACBP4 um gewebespezifische oder anderweitig differentiell exprimierte Isoformen handelte, mußten spezifische Sonden generiert werden, um eine Kreuzreaktion beider Transkripte in der Northern-Analyse zu verhindern. Dazu wurden die untranslatierten Bereiche der beiden cDNAs genutzt, da diese sich signifikant voneinander unterschieden, während es bei Verwendung der kodierenden Bereiche durch deren hohe Homologie stets zu einer Kreuzreaktion kommen würde. Der Nachteil dieser Methode lag in der durch die Länge der untranslatierten Bereiche begrenzten Größe der Sonden. Mit 129 bp (acbp3-5'-untranslatierter Bereich) bzw. 205 bp (acbp4-3'-untranslatierter Bereich) waren diese DNA-Sonden wesentlich kleiner als die zuvor verwendete acbp3-Sonde (527 bp) und somit auch schlechter zu markieren und zu detektieren. Durch Herabsetzung der Hybridisierungstemperaturen und verringerte Stringenz beim Prozessieren der Northern Blots wurde daher ein höherer Hintergrund in Kauf genommen.

#### 3.2.1. acbp3-Transkription

Wie in C.2.5. dargestellt, ergab die spezifische acbp3-5'-Sonde ein distinktes Expressionsmuster in den untersuchten Pflanzenteilen von *Digitalis lanata*. Wie schon bei der Detektion des ACBP-Gesamttranskriptionslevels ließ sich für acbp3 eine hohe Transkriptionsrate in den Blättern, hier wiederum besonders in denen der zweijährigen Pflanzen, feststellen. Dies sprach dafür, daß es sich bei dem für diese Blätter detektierten ACBP-Gesamttranskriptionslevel hauptsächlich um acbp3-Transkripte handelte. Diese Schlußfolgerung steht in Übereinstimmung mit der hohen Anzahl an acbp3-cDNA-Klonen, die in der cDNA-Bank aus Blättern von *Digitalis lanata* aufgefunden werden konnten.

Die einjährigen Wurzeln wiesen ebenfalls ein überraschend hohes Transkriptlevel für acbp3 auf, das sich so nicht im Northern des ACBP-Gesamttranskriptionslevel wiederfinden ließ. Da es sich bei den beiden mRNA-Proben für einjährige Wurzeln in den Abbildungen Abb. C.9. und Abb. C.14. um unterschiedliche Aufarbeitungen verschiedener Exemplare von *Digitalis lanata* handelte, ließe sich die Abweichung in der Transkription mit individuellen Unterschieden in Umwelteinflüssen und Entwicklungszustand dieser beiden *Digitalis lanata*-Exemplare zurückführen.

Des weiteren war das acbp3-Transkript vor allem in Frucht und Fruchtknoten von *Digitalis lanata* nachweisbar, während die Transkriptlevel in Kron- und Staubblättern nahe der Nachweisgrenze lagen. Da sich in der Gesamtblüte jedoch beträchtliche Mengen an ACBP-Gesamttranskripten aufzeigen ließen, spricht die geringe acbp3-Konzentration hier für das Vorhandensein weiterer Isoformen in diesen Pflanzenteilen.

Bei der Wiederholung der in C.2.4. dargestellten Northern-Analysen verschiedener gestreßter Schüttelkulturen Proembryogener Massen von *Digitalis lanata* ließen sich nach Verwendung der acbp3-spezifischen Sonde keine signifikanten Unterschiede zur ACBP-Gesamttranskription feststellen. Somit war, zumindest in den undifferenzierten Zellen der PEMs keine Streßregulation der acbp3-Transkription erkennbar.

Aus der Northern-Analyse verschiedener Pflanzenteile von *Digitalis lanata* unter Verwendung der spezifischen acbp3-5'-Sonde ließ sich also eine vorrangige Expression dieser Isoform in den Blättern und in geringerem Maße in Frucht und Fruchtknoten ableiten, während acbp3 kaum in anderen Blütenbestandteilen nachweisbar war. Es wurde konstitutiv in den untersuchten PEMs exprimiert, wobei sich unter den gegebenen Bedingungen dabei keine streßbedingte Regulation erkennen ließ.

#### 3.2.2. acbp4-Transkription

Ähnlich wie für acbp3 wurde für die acbp4-Isoform eine spezifische Sonde, hier aus dem 3'-untranslatierten Bereich, abgeleitet. Diese Sonde ergab jedoch unter den gegebenen Bedingungen keinerlei detektierbare Signale. Eine mögliche Erklärung dafür wäre eine Unterrepräsentation der acbp4-Transkripte in den untersuchten mRNA-Populationen. Aus der Tatsache, daß acbp4-cDNA-Klone gar nicht (in PEMs-cDNA-Bank) bzw. nur in geringem Maße (1 von 26 detektierten ACBP-Klonen in der

Blätter-cDNA-Bank) in den verwendeten Banken auffindbar waren, ließ sich bereits eine geringere Transkriptionsrate dieser Isoform postulieren.

Eine weitere Erklärung für das Auffinden eines acbp4-cDNA-Klons ohne die Detektion der entsprechenden Transkripte in den untersuchten mRNA-Populationen könnte in der Verwendung einer 3'-spezifischen Sequenz als Sonde liegen. Da beim Herstellen einer cDNA-Bank nur Transkripte mit intakter Poly-A-Sequenz und somit intaktem 3'-untranslatierten Bereich amplifiziert werden, konnte hier ein vollständiger acbp4-Klon detektiert werden. Bei der Untersuchung frisch isolierter mRNA-Populationen liegen jedoch auch alle unvollständigen und im 3'-Bereich verkürzten Transkripte vor. Damit wäre die Anzahl und Konzentration an intakten Transkripten, die mit einer 3'-Sonde detektierbar sind, weiter verringert. Dies spielt besonders dann eine Rolle, wenn das entsprechende Transkript sowieso nur in geringem Maße exprimiert wurde. Die alternative Verwendung einer 5'-Sonde zur Detektion von acbp4-Transkripten kam auf Grund des sehr limitierten 5'-untranslatierten Bereiches von acbp4 (nur 27 bp) nicht in Frage. Eine mögliche Lösung des Problems läge in der Verwendung von mRNA-angereicherten Aufarbeitungen verschiedener Pflanzenteile für die Northern-Analyse, da bei der mRNA-Anreicherung ebenfalls nur 3'-intakte Transkripte mit vollständiger Poly-A-Sequenz amplifiziert werden.

Die Tatsache, daß das korrespondierende Protein ACBP4 nur in einer Aminosäureposition vom nativ gereinigten Protein ACB1\_DIGLA abwich, wobei diese Abweichung auf den Austausch einer einzigen Base zurückzuführen wäre, sprach dafür, daß es sich bei den beiden Proteinen um dieselbe ACBP-Isoform handelte, wobei der Basenaustausch beim Anlegen der cDNA-Bank oder durch eine Mutation im Genom der PEMs aufgetreten sein könnte. Damit würde es sich bei acbp4 um ein tatsächlich exprimiertes Gen und nicht um ein Artefakt des cDNA-Bank-Screenings handeln, wobei das Gentranskript auf Grund der geringen Transkriptionsrate in den untersuchten Geweben unter der Nachweisgrenze lag.

#### 4. Genomische Organisation der ACBP-Familie

Zur Aufklärung der genomischen Organisation der ACBP-Isoformen in *Digitalis lanata* EHRH. sollten zwei Strategien verfolgt werden. Zum einen sollte durch eine genomische Southern-Analyse die Anzahl ACBP-homologer Sequenzen im partialverdauten *Digitalis*-Genom bestimmt werden. Zum anderen wurde durch das Durchsuchen einer genomischen Bank aus *Digitalis lanata* EHRH. die Klonierung und Sequenzierung ACBP-homologer Sequenzen angestrebt, um Zugang zu regulatorischen Promotorsequenzen zu erlangen.

#### 4.1. Genomische Southern-Analyse

Generell stellte sich die Handhabung genomischer *Digitalis*-DNA als problematisch heraus. Durch den hohen Gehalt an Sekundärstoffen, und hier besonders an phenolischen Verbindungen, war die nach verschiedenen Methoden gereinigte genomische DNA meist mit einem hohen Anteil störender Sekundärstoffe behaftet. Wurde durch wiederholte oder radikalere Reinigungsschritte die gDNA von einem Großteil der Verunreinigungen befreit, konnte ebenfalls eine zunehmende unspezifische Degradierung der gDNA festgestellt werden. Diese Proben waren dann für einen Southern-Partialverdau nicht mehr geeignet. Die aus PEMs gewonnene gDNA war zwar weitaus weniger verunreinigt, jedoch war hier der Partialverdau durch bestimmte Restriktionsenzyme durch den ausgesprochen hohen Methylierungsgrad der gDNA beeinträchtigt (SCHOLZE, Dissertation 1999).

Nach Evaluierung verschiedener Methoden zur Gewinnung genomischer DNA sowie mehrerer Varianten zur Durchführung des Southern Blots wurden die in B.3.1. beschriebenen Methoden ausgewählt. Dabei erbrachten nur die Restriktionsenzyme BamHI und KpnI auswertbare Resultate. Eine Auswertung von nur zwei Restriktionen kann keinen definitiven Rückschluß auf die Anzahl ACBP-homologer Sequenzen im Genom geben. Dennoch gibt diese Analyse zumindest einen Hinweis auf die genomische Organisation. So wurden bei Restriktion mit BamHI 3 Banden (bei 2200 bp, 4200 bp sowie im hochmolekularen Bereich bei rund 15000 bp) detektiert. Die Restriktion mit KpnI ergab 4 detektierbare Banden (bei 2600 bp, 4200 bp, 9200 bp sowie 10000 bp). Dies ließ die Schlußfolgerung zu, daß im partialverdauten Genom von *Digitalis lanata* EHRH. mindestens drei, eventuell sogar vier ACBP-homologe Fragmente zu finden waren. Da eine genomische Southern-Analyse keinen Rückschluß auf die Funktionalität der detektierten genomischen Fragmente erlaubt, können hier auch repetitive oder inaktive Sequenzen erfaßt worden sein.

Die bisherigen Erkenntnisse aus der genomischen Southern-Analyse stehen also in Übereinstimmung mit der Annahme, daß mindestens drei verschiedene ACBP-Isoformen (ACBP3, ACBP4/ACB2\_DIGLA sowie ACB1\_DIGLA) in *Digitalis lanata* EHRH. aufzufinden sind.

#### 4.2. Screening einer gDNA-Bank

Zur Identifizierung ACBP-homologer Sequenzen wurde eine genomische Bank aus Digitalis lanata EHRH. durchsucht. Die detektierten positiven Klone konnten nach Restriktionsanalyse in zwei Gruppen eingeordnet werden, die jeweils unterschiedliche Restriktionsmuster aufwiesen. Im Southern-Blot der partialverdauten Phagen-DNA konnten die jeweiligen ACBP-homologen Fragmente nachgewiesen werden. Durch eine Auswahl verschiedener Restriktionsenzyme einzeln oder in Kombination sollte versucht werden, diese homologen Fragmente auf eine für die Zwischenklonierung handhabbare Größe zu reduzieren. Enzyme und Enzymkombinationen, die Fragmente kleiner als 400 bp bzw. größer als 4000 bp ergaben, wurden von der Analyse da diese Fragmentgrößen entweder keine weiterreichende ausgeschlossen, Sequenzinformation für regulatorische Sequenzen versprachen oder aber zu groß für weitere Klonierungsschritte waren. Für die Enzyme und Enzymkombinationen, die detektierbare Fragmente im gewünschten Größenbereich erbrachten, standen keine Vektoren mit dementsprechenden Schnittstellen für die Zwischenklonierung zur Verfügung. Es mußte daher auf eine blunt end-Klonierung zurückgegriffen werden, die weitaus weniger effektiv als die angestrebte sticky end-Klonierung war. Ein weiteres Problem bei der Klonierung von Fragmenten mit glatten Enden ist die geringere Fragmentgröße, die mit dieser Methode kloniert werden kann.

Für die beiden genomischen Klongruppen konnten Restriktionsbedingungen ermittelt werden, die ACBP-homologe Fragmente im Größenbereich von 2000 bis 3500 bp ergaben. Auf Grund der geringen DNA-Mengen, die bei einer  $\lambda$ -DNA-Isolation zur

Verfügung stehen, den für die *blunt end*-Klonierung nötigen Zwischenschritten, die die Fragmentkonzentration weiter verringerten, sowie die für diese *blunt end*-Klonierung ungünstige Fragmentgröße konnte keines dieser Fragmente erfolgreich kloniert werden. Es waren nur kleinere Fragmente klonierbar, die jedoch nicht mit den bekannten acbp-Sequenzen überlappten und somit nicht als die gesuchten regulatorischen Sequenzen der ACBP-Familie zu identifizieren waren.

Die Tatsache, daß nur zwei unterschiedliche genomische Klone aufgefunden werden konnten, steht nur scheinbar im Widerspruch zur postulierten Existenz von drei oder mehr ACBP-Isoformen im Digitalis-Genom. Zum einen ist es bei einer detektierten Fragmentgröße von 2000-3500 bp nach Restriktion der λ-DNA durchaus denkbar, daß sich bei einer ungefähren Länge der beiden bekannten acbp-Sequenzen von ca. 500 bp (ohne Introns) zwei verschiedene acbp-Sequenzen innerhalb desselben Fragments befinden. Eine wahrscheinlichere Erklärung, die auch vom Ergebnis des genomischen Southerns unterstützt wird, ist jedoch eine unvollständige Klonierung des Digitalis-Genoms in die  $\lambda$ -Vektoren der genomischen Bank. In beiden Restriktionen der genomischen Southern-Analyse waren jeweils Signale im hochmolekularen Bereich detektierbar, im Falle der BamHI-Restriktion lag die Fragmentgröße dabei bei über 15000 bp. Solche Fragmente sind nur mit wesentlich geringerer Effizienz beim Anlegen einer gDNA-Bank klonierbar und würden damit einem genomischen Screening nicht zugänglich sein. Dies würde besonders dann eine Rolle spielen, wenn wie für die genomische Digitalis-DNA beschrieben die Restriktion der gDNA zusätzlich durch störende Sekundärstoffe und den hohen Methylierungsgrad der DNA erschwert ist.

### 5. Site-directed Mutagenesis

Die Sequenzierung zweier so hoch homologer cDNA-Sequenzen wie acbp3 und acbp4 warf die Frage nach der Funktion dieser Isoformen auf. Zur Erklärung der Existenz zweier beinahe identischer Genprodukte ließen sich verschiedene Hypothesen aufstellen. So wäre eine differentielle Expression der beiden Isoformen denkbar, wobei sowohl eine gewebespezifische als auch eine streß- oder entwicklungsbedingte Regulation in Frage käme. Die Expressionsanalyse für acbp3 deutete dabei auf eine bevorzugte Expression in Blättern, Frucht und Fruchtknoten hin, während sich für dieses Transkript keine streßbedingte Veränderung feststellen ließ. Es wurde offensichtlich konstitutiv in den untersuchten undifferenzierten Kulturen exprimiert. Da die spezifische acbp4-3'-Sonde keine Signale ergab, ließen sich keine Rückschlüsse auf das Transkriptionsverhalten dieser Isoform ziehen.

Eine weitere Erklärung für die Existenz von Isoformen wäre ein unterschiedliches Ligandenspektrum für die jeweiligen korrespondierenden Proteine. Aus dem Vergleich der Sequenzen von ACBP3 und ACBP4 (Abb. C.7.) wird ersichtlich, daß neben dem C-Terminus, dem keine Bedeutung für die Ligandenbindung zugesprochen wird (KRAGELUND et al. 1999b), nur die Aminosäuren in Position 19 und 23 nicht homolog sind. Es sollte daher untersucht werden, welchen Einfluß diese Aminosäuren auf die Spezifität der Ligandenbindung haben. Dabei sollten die Aminosäuren 19 und 23 des einen Proteins gegen die des jeweilig anderen ausgetauscht werden. Zur Untersuchung des additiven Effekts dieser Mutationen wurden sowohl AS19- und AS23-Einzelmutanten als auch die entsprechenden Doppelmutanten generiert.

Die zur Einführung einer Punktmutation verwendete Variante der gerichteten Mutagenese wurde mit sehr hoher Effizienz optimiert. Die dabei verwendeten Primer waren so gewählt, daß ihre 5'-Enden bei Anlagerung an die Wildtyp-DNA jeweils lückenlos aneinandergrenzten und jeder Primer jeweils eine der für die zu mutierenden Aminosäuren kodierenden Sequenz abdeckte, wobei die vom 5'- zum 3'-Ende verlaufende PCR die gesamte Vektorsequenz einschließlich des einklonierten Inserts umlief. Der mutierte Primer der einen Isoform entsprach dabei der Wildtyp-Sequenz der jeweils anderen Isoform. Die Primer konnten somit sowohl als mutierte Primer zur Einführung einer Punktmutation als auch als Wildtyp-Primer zur Erhaltung der jeweiligen Sequenz eingesetzt werden. Damit waren mit der Kombination von nur vier Primern vier Einzelmutanten (jeweils ein mutierter und ein Wildtyp-Primer) und zwei Doppelmutanten (zwei mutierte Primer) zugänglich.

Das offenkettige mutierte PCR-Produkt stand nach Re-Ligation direkt der Überexpression zur Verfügung, da bei der Mutagenese der Expressionsvektor des Wildtyp-Klons nicht verändert wurde. Der hier verwendete pET3a-Expressionsvektor erlaubte eine hohe Überexpressionsrate, wobei die in B.5.3. beschriebene Vorgehensweise bei der Aufarbeitung der rekombinanten Proteine eine sehr hohe Ausbeute an reinem Protein erbrachte. Die durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie untersuchten Nebenprodukte der Überexpression stellten sich dabei als unvollständig prozessiertes genuines Protein (Start-Methionin nicht abgespalten) oder als von den Wirtszellen posttranslational modifiziertes Protein heraus. Diese Verunreinigungen konnten jedoch chromatographisch abgetrennt werden, so daß sie keine Rolle für die folgenden Bindungstests spielen konnten. Diese Aufarbeitungsmethode stellte sich als wesentlich ergiebiger als die zuvor für die überexprimierten Wildtyp-Proteine (siehe Kapitel B.4.) vorgestellte Variante heraus.

#### 6. Biosensor-Test aller Wildtypen und Mutanten

Durch den Biosensor-Test sollte untersucht werden, welchen Einfluß die Aminosäuren in Position 19 und 23 auf die Bindungsspezifität der ACBP-Isoformen in *Digitalis* haben. Als Arbeitshypothese wurde angenommen, daß sich die Existenz zweier fast identischer Isoformen durch deren unterschiedliches Ligandenspektrum begründen ließe. Nachdem die Funktionalität der beiden rekombinanten Wildtyp-Proteine im Gelshift-Assay qualitativ aufgezeigt werden konnte, sollte nun eine genauere quantitative Untersuchung der Ligandenbindung durch Bestimmung der jeweiligen Dissoziationskonstanten erfolgen.

#### 6.1. Bestimmung der Biosensor-Dissoziationskonstanten

Bevor der Biosensor-Test zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten anderer ACBPs genutzt werden konnte, mußten zunächst die k<sub>D</sub>-Werte für das Biosensor-Protein selbst für alle in Frage kommenden Liganden bestimmt werden. Dieses modifizierte bovine ACBP, das nach Bindung eines Liganden verstärkt bei einer Wellenlänge von 460 nm fluoreszierte, wurde dabei in einer Doppelbestimmung mit den verschiedenen Acyl-CoA-Estern bis zur Sättigung titriert. Durch nichtlineare Regression wurde für diese Titrationskurven im Datafit-Programm eine *best fit*-Kurve ermittelt, für die aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten, Biosensor- und Ligandenkonzentration jeweils die Dissoziationskonstanten ermittelt werden konnten. Bei der Erstellung der Titrationskurven konnte festgestellt werden, daß der Anstieg im linearen Bereich dieser Kurve, vor allem jedoch die Meßwerte im Bereich des Sättigungswertes maßgeblich den  $k_D$ -Wert beeinflußten. Die Berechnung der  $k_D$ -Werte reagierte dabei sehr empfindlich auf geringe Abweichungen in diesem Bereich. Im folgenden soll der Vergleich der *best fit*-Kurven für die Titration des Biosensors mit Myristyl-CoA sowohl für die tatsächlich bestimmte Dissoziationskonstante von 21 nM als auch für eine simulierte Konstante von 15 nM diese Probleme näher darstellen (Abb. D.2.). Durch Einbeziehung der Standardabweichung der Meßwerte in die Berechnung konnte diese Auswertungsmethode jedoch verbessert werden. Wie aus Abb. D.2. ersichtlich, sind die Unterschiede der beiden Kurven im Sättigungsbereich zwar gering jedoch signifikant, während der Anstieg der Kurve selbst nur geringen Einfluß auf die Dissoziationskonstante hat.

Obwohl die Bestimmung der absoluten Biosensor- $k_D$ -Werte also mit einer methodengegebenen Unsicherheit behaftet war, spielte dies für die spätere Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Mutanten keine wesentliche Rolle. Da für die Berechnung aller ACBP-Isoformen der gleiche Biosensor- $k_D$ -Wert zugrunde gelegt wurde, konnte zwar der absolute  $k_D$ -Wert der einzelnen Mutante nicht jedoch das Verhältnis der  $k_D$ -Werte aller Mutanten zueinander beeinflußt werden. Für die in dieser Arbeit angestrebten vergleichenden Untersuchungen war die Genauigkeit der Biosensor- $k_D$ -Bestimmung also ausreichend. Für eine Verwendung des Testes zur absoluten Bestimmung einer Dissoziationskonstante müßte der Test durch Mehrfachbestimmungen und durch Auswahl von mehr Meßpunkten im Bereich des Sättigungswertes statistisch abgesichert werden.





# 6.2. Bestimmung der Dissoziationskonstanten für ACBP-Wildtypen und -Mutanten

#### 6.2.1. Relevanz der untersuchten Liganden

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten verschiedener ACBP-Wildtypen und -Mutanten mußten geeignete Liganden ausgewählt werden. Dazu wurden die Coenzym A-Ester langkettiger gesättigter sowie mono- als auch poly-ungesättigter Fettsäuren synthetisiert, da diese die bevorzugten *in vivo*-Liganden dieser Proteinklasse darstellen. Die Bedeutung der hierfür verwendeten Fettsäuren im pflanzlichen System konnte wie folgt eingeschätzt werden:

- Laurinsäure (C12:0): eine der weitverbreitetsten Fettsäuren, vor allem in Lauraceen vorkommend, Anteil z.B. im Zimtöl bis zu 90 %, in Kokosfett bis zu 60 %
- Myristinsäure (C14:0): vor allem im Öl der Muskatnuß vorkommend (bis zu 70 %), in geringeren Mengen auch im Kokos- und Palmkernöl zu finden
- Myristoleinsäure (C14:1): ebenso wie die gesättigte Form in der Muskatnuß vorkommend (bis zu 30 % in Samen der Muskatnußgewächse), hauptsächlich jedoch in tierischen Fetten
- Palmitinsäure (C16:0): häufigst vorkommende gesättigte Fettsäure in pflanzlichen Lipiden, Anteil beträgt jedoch nur bis zu 10 % in Erdnuß-, Soja- und Kokosöl bzw. bis zu 40 % in Palmöl
- Palmitoleinsäure (C16:1): besonders in marinen tierischen Organismen vorkommend (Fisch- und Walfette), jedoch auch bis zu 3 % im Olivenöl
- Stearinsäure (C18:0): hauptsächlicher Bestandteil hydrogenierter Fette und Öle (bis zu 90 %), natürliche Resourcen vor allem in Shea- und Kakaobutter (bis zu 35 %)
- Ölsäure (C18:1): mengenmäßig wichtigste Fettsäure pflanzlicher Lipide, bis zu 80 % in Olivenöl, 70-80 % in verschiedenen Nußölen sowie Distelöl
- Linolsäure (C18:2): häufigst vorkommende mehrfach ungesättigte Fettsäure, als essentielle Fettsäure nur im pflanzlichen System *de novo* synthetisiert, dient als Vorläufer zur Synthese längerkettiger Fettsäuren dieser Reihe, Hauptbestandteil verschiedener Nußöle (z.B. bis zu 65 % in Walnußöl), Distelöl (80 %), sowie Samen von Sonnenblume (74 %) und Baumwolle (60 %) (nach FIEBIG 1999)

Längerkettige sowie höher ungesättigte Fettsäurederivate wurden in diesen ersten grundlegenden Untersuchungen nicht berücksichtigt, da sie entweder nicht als natürliche Liganden der ACBPs gelten (z.B. Ceramide), nur selten im pflanzlichen System vorkommen (z.B. Arachidonsäure) bzw. die jeweiligen Fettsäuren nicht zur Synthese der CoA-Ester zur Verfügung standen.

Buttersäure (C4:0) wurde nur zur Demonstration der schlechteren Bindung kurzkettiger CoA-Ester eingesetzt, gleiches galt für den Einsatz des freien Coenzym A.

#### 6.2.2. Durchführung der Messungen

Beim Biosensor-Test zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten verschiedener ACBP-Isoformen handelte es sich um eine Gleichgewichtsreaktion, bei der das fluoreszierende Biosensor-Protein und das zu bestimmende ACBP um die vorhandenen Liganden konkurrierten. Die ACBP-Isoform lag dabei in zehnfach höherer Konzentration als der Biosensor vor, so daß die Konzentration an freiem Liganden hauptsächlich von der Dissoziationskonstante dieser Isoform bestimmt wurde.

Die Untersuchungen wurden hauptsächlich an den Wildtyp-Proteinen und den jeweiligen Doppelmutanten durchgeführt, nachdem eine Bestimmung der  $k_D$ -Werte der Einzelmutanten für ausgewählte Liganden übereinstimmend einen additiven Effekt der fraglichen Aminosäurepositionen bestätigte (siehe C.6.3.3.). Dies diente der Begrenzung des Zeit- und Materialaufwandes, da die Titration von 8 verschiedenen ACBP-Formen mit jeweils 10 Liganden in Doppelbestimmungen den Bedarf an rekombinantem Protein stark erhöht hätte. Aus dem gleichen Grund waren vergleichende Bestimmungen der jeweiligen Mutanten und Liganden durch Mikrokalorimetrie nicht möglich, da hier der Materialaufwand noch weitaus höher lag. Untersuchungen am ACBP der Ratte haben jedoch beim Vergleich der fluorimetrischen Bestimmung der  $k_D$ -Werte mit den aus der mikrokalorimetrischen Titration desselben Proteins erhaltenen Konstanten gezeigt, daß diese fluorimetrischen Methode vergleichbare Ergebnisse unter wesentlich geringerem Aufwand erbrachte (ABO-HASHEMA et al. 2001). Somit wurde auf die vergleichende mikrokalorimetrischen Titration verzichtet.

#### 6.2.3. Der Scatchard-Plot

Die Auswertung der Titrationskurven erfolgte durch einen Scatchard-Plot. Bei dieser Darstellung wurde durch Achsentransformation eine nicht-lineare Bindungskurve in eine lineare Funktion überführt, deren negativer reziproker Anstieg die Dissoziationskonstante der untersuchten Isoform angab (siehe B.6.2.3. sowie C.6.2.3.). Dazu wurde die Konzentration an gebundenem Liganden gegen die an gebundenem geteilt durch freien Liganden aufgetragen. In die Berechnung dieser Werte, die den für das fluoreszierende FABP ADIFAB entwickelten mathematischen Grundlagen folgte (RICHIERI et al. 1992, RICHIERI et al. 1994), gingen die Dissoziationskonstante des Biosensors, die Gesamt-Ligandenkonzentrationen, die Gesamtproteinkonzentration und die gemessenen Fluoreszenzwerte für die jeweiligen Ligandenkonzentrationen ein. Die graphische Darstellung dieser linearen Funktion ermöglichte neben der Ermittlung der k<sub>D</sub>-Werte auch die Bestimmung der Bindungsstöchiometrie, die bei Division beider Achsenwerte durch die Gesamtproteinkonzentration einen Schnittpunkt der Funktion mit der x-Achse bei 1 ergab. Dies wies auf einen ACBP-Liganden-Komplex im Verhältnis von 1:1 hin.

Während die Auswertung der Meßdaten im Scatchard-Plot eine direkte Möglichkeit der graphischen Ermittlung der Dissoziationskonstanten darstellte, hatte diese Methode jedoch auch methodengegebene Nachteile. So hätten eventuelle Meßfehler unterschiedlicher Meßpunkte einen unterschiedlichen Einfluß auf den Verlauf der resultierenden linearen Funktion, da bei der Transformation der tatsächlich gemessenen Konzentrations- und Fluoreszenzdaten der Bindungskurve in die errechneten Werte für gebundenen und gebundenen/freien Liganden die Meßwerte umgerechnet werden mußten. Die Voraussetzungen für eine lineare Regression sind dabei theoretisch nicht mehr gegeben, da z.B. die Konzentration an gebundenem Liganden sowohl auf x- als auch auf y-Achse in den Scatchard-Plot eingeht, was durch eine unterschiedliche Wichtung der Meßfehler die resultierende Funktion verzerren kann (MOTULSKY 1995).

Unter Berücksichtigung der oben genannten Einschränkungen stellte der Scatchard-Plot dennoch eine geeignete Auswertungsmethode dar, die eine einfache und übersichtliche Auswertung der Gleichgewichtsreaktion zwischen ACBP-Isoform, Biosensor und Liganden möglich machte. Diese Darstellungsweise wurde bereits zur Auswertung der Bindungstests des fluoreszierenden FABP (ADIFAB) und seinen Fettsäure-Liganden etabliert und publiziert (RICHIERI et al. 1994). Auch bei der Titration von ACBP (FROLOV und SCHROEDER 1998) sowie von Glutathion-S-Acyltransferase (SILVA et al. 1999) mit fluoreszierenden Acyl-CoAs wurde die Scatchard-Analyse erfolgreich zur Determinierung von Dissoziationskonstanten angewendet.

#### 6.3. Einfluß der Aminosäurepositionen 19 und 23 auf die Ligandenbindung

Um den möglichen Einfluß der beiden fraglichen Aminosäurepositionen zu belegen, mußte zunächst ein unterschiedliches Ligandenspektrum für die beiden Wildtyp-Proteine ACBP3 und ACBP4 aufgezeigt werden. Dazu konnte ein in der Arbeitsgruppe Prof. Knudsens durchgeführter Vorversuch als Anhaltspunkt dienen. Dabei wurden beide Wildtyp-Proteine in *E. coli*-Wirtszellen überexprimiert, aufgereinigt und die von diesen Proteinen *in vivo* gebundenen Liganden massenspektrometrisch untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß das ACBP3 hauptsächlich Palmitoyl-CoA (C16:1-CoA) sowie Linoleyl-CoA (C18:2-CoA) gebunden hatte, während ACBP4 überwiegend gesättigte Liganden (C16:0-CoA und C18:0-CoA) aufzuweisen hatte (KNUDSEN, persönliche Mitteilung). Es lag daher die Vermutung nahe, daß diese ACBP-Isoformen eine unterschiedliche Bindungsspezifität abhängig vom Sättigungsgrad des Fettsäurerestes im Liganden hatten.

Bei einem Vergleich der in C.6.2.4. aufgeführten Dissoziationskonstanten für die Wildtyp-Proteine und verschiedene gesättigte und ungesättigte Liganden läßt sich feststellen, daß ACBP4 unabhängig vom Sättigungsgrad des Liganden stets eine größere Dissoziationskonstante, also eine geringere Affinität, für die untersuchten Liganden hatte. Der Unterschied zu den für ACBP3 berechneten Werten war jedoch jeweils größer für ungesättigte Liganden. Dies wurde besonders im Ligandenpaar C16:0-C16:1-CoA deutlich, wobei der  $k_D$ -Wert für C16:0-CoA und ACBP3 mit ca. 63 % des ACBP4-Wertes bestimmt wurde, während die  $k_D$  für C16:1-CoA und ACBP3 nur 34 % des ACBP4-Wertes betrug. Dies sprach für eine Bevorzugung ungesättigter Liganden durch ACBP3, während die Unterschiede in der Bindungsspezifität erwartungsgemäß auf Grund der hohen Sequenzhomologien beider Proteine nur gradueller, nicht absoluter Natur waren. Übereinstimmend ließ sich für beide Wildtypen feststellen, daß die Affinität zum Liganden mit dessen Kettenlänge zunahm, wobei Lauryl-CoA (C12:0-CoA) mit einer außergewöhnlich niedrigen  $k_D$  eine Ausnahme darstellte.

Da  $k_D$ -Werte bis in den einstelligen nanomolaren Bereich bestimmt wurden, waren die zu erwartenden Unterschiede zwischen den Mutanten und Wildtypen sehr gering. Dennoch erbrachte der Biosensor-Test reproduzierbare Ergebnisse, die signifikante Unterschiede in den Bindungsspezifitäten der untersuchten Proteine belegten. Dabei waren folgende Veränderungen in der Bindungsspezifität festzustellen:

- ACBP3 wies in Position 19 ein Asparagin und in 23 ein Alanin auf. Bei Liganden gleicher Kettenlänge waren die k<sub>D</sub>-Werte für **ungesättigte** Liganden jeweils geringer als für gesättigte.
- Bei Austausch des Asparagins gegen einen Serinrest bzw. bei Austausch des Alanins gegen Glutaminsäure nahm die k<sub>D</sub> für gesättigte Liganden ab und für ungesättigte jeweils zu.
- Die Einzelmutationen hatten einen additiven Effekt, wobei die Doppelmutante eine minimale  $k_D$  für ungesättigte und eine maximale für gesättigte Liganden aufwies, was einer Umkehr der Ligandenspezifität entsprach.
- ACBP4 wies in Position 19 ein Serin und in 23 einen Glutaminsäurerest auf. Bei Liganden gleicher Kettenlänge waren die k<sub>D</sub>-Werte für ungesättigte Liganden jeweils größer als für gesättigte.
- Bei Austausch des Serins gegen einen Asparaginrest bzw. bei Austausch der Glutaminsäure gegen Alanin nahm die  $k_D$  für gesättigte Liganden zu und für ungesättigte jeweils ab. Die Tendenz war somit gegenläufig zu den ACBP3-Mutanten.
- Auch hier hatten die Einzelmutationen einen additiven Effekt für die Doppelmutante, die im Gegensatz zum ACBP4-Wildtyp-Protein eine Präferenz für ungesättigte Liganden aufwies.

ACBP3 hatte eine Präferenz für ungesättigte Liganden, die sich durch Einführung beider Mutationen in eine Bevorzugung gesättigter CoA-Ester überführen ließ, während ACBP4 seine Selektivität für gesättigte Liganden durch Einführung der Mutationen in eine Bevorzugung ungesättigter Ester modifizierte. Wurden also Aminosäuren 19 und 23 des einen Proteins gegen die des jeweils anderen ausgetauscht, änderte sich damit auch die Präferenz hinsichtlich des Sättigungsgrades der Liganden. Alle ACBP4-abgeleiteten Proteine hatten dabei insgesamt jeweils höhere k<sub>D</sub>-Werte als die ACBP3-Mutanten, was eventuell auf einen Einfluß des C-Terminus zurückzuführen wäre. Während die AS19 und 23 eine Bevorzugung des Sättigungsgrades des Liganden zu determinieren scheint, wäre der C-Terminus damit als einzig verbleibender Unterschied zwischen den beiden Wildtyp-Proteinen verantwortlich für die allgemeine Affinität zu allen verfügbaren Liganden.

Diese Untersuchungsergebnisse zur Ligandenspezifität bestätigten die mit in den Expressionsvektor pET-3a klonierten cDNAs acbp3 und acbp4 durchgeführten Voruntersuchungen, wobei die pET3-acbp3- und pET3-acbp4-Konstrukte in *Escherichia coli* heterolog exprimiert und die rekombinanten Proteine isoliert wurden. Nach Analyse des Ligandenspektrum, das sie *in vivo* im *E. coli*-Organismus gebunden hatten, stellte sich bereits heraus, daß ACBP4 hauptsächlich gesättigte, ACBP3 hingegen hauptsächlich ungesättigte Fettsäure-CoA-Ester gebunden hatte (KNUDSEN, persönliche Mitteilung).

Die Abbildung D.3. zeigt, wie sich die Mutation der Aminosäuren 19 und 23 auf die Tertiärstruktur des Proteins auswirkt. Ein entscheidender Effekt besteht dabei in der leichten Änderung der Ausrichtung der Helices A2 und A3 zueinander. Damit wird die Orientierung der Bindungstasche leicht verändert, was den Unterschied im bevorzugten Ligandenspektrum erklären könnte. Da der Winkel zwischen A2 und A3 allerdings nur geringfügig beeinflußt wird, handelt es sich bei den Unterschieden in den Dissoziationskonstanten verschieden gesättigter Liganden ebenfalls nur um graduelle, jedoch signifikante Abweichungen. Die 3D-Ansicht der *Digitalis*-ACBPs wurde auf Grundlage des kristallinen bovinen ACBPs modelliert, wobei auf Grund der relativ hohen Sequenzhomologien zwischen bovinem und pflanzlichem ACBP (siehe D.2.4.b) von einem äquivalenten Faltungsverhalten ausgegangen werden konnte (KRAGELUND, Institut für Molekularbiologie, Universität Kopenhagen, persönliche Mitteilung).



Abb. D.3.: Dreidimensionale Modelle der *Digitalis*-ACBP-Tertiärstruktur. linke
Abb.: Proteinstruktur mit den Aminosäuren Asparagin in Position 19 und Alanin
in 23 (ACBP3-WT) rechte Abb.: Proteinstruktur mit den Aminosäuren Serin in
Position 19 und Glutaminsäure in 23 (ACBP3-SE). Mutierte Aminosäuren sind
grün dargestellt, die α-Helices A2 und A3 sind durch Pfeile gekennzeichnet (nach
KRAGELUND).

In der obigen Abbildung ist ausschließlich die Veränderung der Tertiärstruktur durch die Einführung der beiden Mutationen berücksichtigt, da es sich bei beiden Proteinen um ACBP3-Varianten handelt. So hat der ACBP3-Wildtyp (Abb. D.3. links) eine eher parallele, fast überlappende Anordnung der Helices A2 und A3, während die Achsen dieser beiden Helices in der Doppelmutante (Abb. D.3. rechts) stärker abgewinkelt zueinander verlaufen. Die daraus resultierende veränderte Konformation aller vier Helices zueinander könnte damit die Affinität der Bindungsregion zu bestimmten Ligandenstrukturen beeinflussen, da gesättigte und ungesättigte Liganden sich ebenfalls in ihrer Konformation unterscheiden (Abb. D.4.).

Alle verwendeten ungesättigten Fettsäurederivate lagen in der *cis*-Konformation vor, wobei der Fettsäurerest stark abgewinkelt war (Abb. D.4.b).



**Abb. D.4.:** Dreidimensionale Modelle zweier C18-Fettsäuren unterschiedlichen Sättigungsgrades. **Abb. a:** Stearinsäure (C18:0) **Abb. b:** Ölsäure (C18:1)

Daß der Austausch einzelner Aminosäuren einen entscheidenden Einfluß auf Proteinkonformation und Bindungsverhalten haben kann, konnte bereits am Beispiel des membranständigen ACBP2 aus *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden (CHYE et al. 2000). Während in jener Studie der Austausch konservierter Aminosäuren in der Bindungsregion zum vollständigen Verlust der Ligandenbindung führte, konnte in der hier vorgestellten Arbeit durch singulären Austausch zweier nicht-konservierter Positionen die Bindungsspezifität hingegen modifiziert werden.

#### 7. Weiterführende Arbeiten

Durch die hier vorliegenden Untersuchungen wurde die Existenz von mindestens drei ACBP-Isoformen in *Digitalis lanata* EHRH. nachgewiesen, von denen zwei als cDNAs acbp3 und acbp4 isoliert und charakterisiert werden konnten. Es wäre Aufgabe weiterführender Arbeiten, die kodierenden Sequenzen für das bisher nicht auf DNA-Ebene nachgewiesene Protein ACB2\_DIGLA sowie für weitere eventuell existierende Isoformen aufzufinden. Zur Determinierung der Anzahl ACBP-homologer Sequenzen im *Digitalis*-Genom wäre dazu eine genomische Southern-Analyse mit mindestens drei weiteren Restriktionsenzymen nötig, was auf Grund der bereits angesprochenen Schwierigkeiten beim Umgang mit genomischer *Digitalis*-DNA jedoch problematisch ist.

Während die Untersuchungen bisher keine streß- oder entwicklungsbedingte Regulation der acbp3-Transkription zeigten, ist das Transkriptionsmuster für acbp4 oder andere Isoformen weiterhin nicht aufgeklärt. Die Entwicklung einer quantitativen PCR-Methode zur Determinierung des acbp4-Transkriptlevels wäre hierbei eine Möglichkeit, die Verwendung einer 3'-spezifischen Northern-Sonde zu umgehen. Des weiteren wären regulatorische Sequenzen aus den Promotorregionen beider Gene hilfreich bei der Untersuchung der differentiellen Expression dieser Genfamilie. Die Sequenzierung der isolierten Klone aus der genomischen Bank von *Digitalis lanata* wäre dabei durch ein Mapping der  $\lambda$ -DNA möglich, um die problematische *blunt end*-Klonierung von Restriktionsfragmenten zu umgehen.

Da die ACBP-Proteinfamilie als Transporter und direkter Donor von Fettsäure-CoA-Estern innerhalb des Fettsäurestoffwechsels diskutiert wird, wäre eine Untersuchung direkter Interaktionspartner interessant, um die Reaktionen oder Stoffwechselwege aufzufinden, für die gezielt Acyl-CoAs bereitgestellt werden.

ACBPs wurden bisher zum einen als konstitutiv exprimierte *housekeeping*-Proteine identifiziert, gleichzeitig wurden jedoch auch, zumindest im tierischen System, vielfältige Regulationen der Expression und Funktion *in vivo* aufgezeigt. Da acbp3 offensichtlich die Kriterien eines *housekeeping*-Proteins erfüllt, wäre acbp4 ein wahrscheinlicher Kandidat für die Untersuchung einer solchen differentiellen Expression und Regulation im pflanzlichen System.

Der Biosensor-Test stellt einen vielversprechenden Ansatz dar, die Bindung von Fettsäure-CoA-Estern und ACBPs direkt *in vivo* messen zu können. Die hier vorgestellten Arbeiten sind erste Ergebnisse dieser Testversuche. Sie erlaubten eine Evaluierung dieser Methode. Auf Grund dieser Ergebnisse wird der Biosensor-Test weiterentwickelt werden, um nicht nur vergleichende Analysen sondern auch statistisch abgesicherte absolute  $k_D$ -Wert-Bestimmungen durchführen zu können. Veröffentlichungen zu diesen weiterführenden Untersuchungen sind dazu in Arbeit.

### E. Zusammenfassung

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Proteinen der ACBP-Familie handelte es sich um multifunktionelle, in allen bisher untersuchten eukaryotischen Spezies nachweisbare Proteine, denen, zumindest im tierischen System, vielfältige regulatorische, intra- und extrazelluläre Funktionen zugeschrieben wurden. In der hier vorliegenden Abhandlung sollte ausschließlich auf ihre Eigenschaft als hochspezifische Bindungsproteine für langkettige Fettsäure-Coenzym A-Thioester im pflanzlichen System eingegangen werden. Besonderes Augenmerk richtete sich dabei auf Unterschiede in Struktur und Funktion eventueller Isoformen, wobei als Modellorganismus *Digitalis lanata* EHRH. zur Verfügung stand.

Ausgangspunkt dieser Arbeit stellte ein PCR-Produkt dar, daß an Hand ansequenzierter Fragmente zweier nativ gereinigter putativer ACBP-Proteine aus PEMs von *Digitalis lanata* EHRH. generiert wurde.

- Das Screening einer cDNA-Bank aus Proembryogenen Massen von *Digitalis lanata* EHRH. unter Verwendung dieses PCR-Produktes als Sonde erbrachte einen vollständigen cDNA-Klon mit sehr hohen Homologien zu bereits bekannten ACBP-Sequenzen. Die korrespondierende Aminosäuresequenz dieses Klons wich von den beiden bisher bekannten ansequenzierten ACBP-Fragmenten ab. Die cDNA-Sequenz wurde daher als acbp3 bezeichnet. Intensives Screening der PEMs-cDNA-Bank erbrachte keine weiteren Isoformen.
- Nach Durchsuchen einer cDNA-Bank aus Blättern von *Digitalis lanata* EHRH., hier unter Verwendung der acbp3-cDNA als Sonde, konnte ein weiterer cDNA-Klon identifiziert werden, der in seiner Sequenz sowohl von acbp3 als auch in seiner korrespondierenden Aminosäuresequenz von den beiden native Fragmenten abwich. Die daher als acbp4 bezeichnete cDNA-Sequenz war in der untersuchten Bank im Verhältnis zu acbp3 stark unterrepräsentiert, wobei auf 25 identifizierte acbp3-Kopien nur ein acbp4-Klon entfiel. Die Abweichung des acbp4-Klons von einem der nativen Fragmente ließ sich auf den Austausch einer einzelnen Base zurückführen. Dieser singuläre Austausch war nicht hinreichend genug, das entsprechende nativ gereinigte Protein ACB1\_DIGLA und ACBP4 als verschiedene Isoformen zu behandeln. Nach erfolgtem cDNA-Bank-Screening konnte also vom Vorhandensein von zumindest 3 ACBP-Isoformen in *Digitalis lanata* EHRH. ausgegangen werden.
- Ein Sequenzvergleich beider ACBP-Klone erbrachte mit 81,9 % Übereinstimmung im kodierenden Bereich der cDNAs sowie 91,3 % Ähnlichkeit bezogen auf die korrespondierenden Aminosäuresequenzen ausgesprochen hohe Homologien, was zum einen die Frage nach Unterschieden in Funktion und Expression zweier so homologer Genprodukte aufwarf, zum anderen jedoch die Unterscheidbarkeit der beiden Transkripte erschwerte.
- Ein Vergleich der *Digitalis*-Sequenzen mit ACBPs anderer Spezies zeigte generell hohe Homologien selbst zu nur entfernt verwandten Organismen mit besonders hohen Übereinstimmungen zu anderen pflanzlichen ACBPs, wobei pflanzentypische Sequenzmotive wiedergefunden werden konnten. Durch diese hohen Homologien zu anderen cytosolischen ACBPs sowie die Abwesenheit von

eventuellen N-terminalen Signalsequenzen konnte für die *Digitalis*-ACBPs ebenfalls eine cytosolische Lokalisation postuliert werden. Als eine Besonderheit konnte jedoch im Unterschied zu bisher bekannten Pflanzensequenzen in beiden korrespondierenden Proteinen ACBP3 und ACBP4 ein Cystein-Rest im C-Terminus aufgezeigt werden, ein Strukturmerkmal, das bisher nur in gehirnspezifischen ACBPs gefunden wurde. Dieser Cystein-Rest war möglicherweise, da er im C-Terminus exponiert und nicht wie bei den gehirnspezifischen ACBPs zwischen den Helices A2 und A3 eingebettet war, für die Bildung von Homodi- und -trimeren der rekombinanten Proteine verantwortlich.

- Die Funktionalität der überexprimierten rekombinanten Proteine ACBP3 und ACBP4 wurde in einem Gelshift-Assay aufgezeigt, wobei eine Änderung des Isoelektrischen Punktes der Proteine nach Inkubation mit Palmitoyl-CoA die erfolgreiche Bindung des Liganden anzeigte.
- Die Expressionsanalyse erbrachte ein konstitutives Grundlevel an ACBP-• Transkripten in allen untersuchten Pflanzenteilen und Embryogenesestadien von Digitalis lanata EHRH. Die ACBP-Gesamtexpression war besonders in den Blättern zweijähriger Pflanzen erhöht, wobei auch die Blüten und in geringerem Maße die Wurzeln dieser zweijährigen Pflanzen relevante Mengen an ACBP-Transkripten aufwiesen. Die Transkription in lipidsyntheseintensiven Geweben wie Blüten und jungen Blättern war jedoch nicht auffällig genug erhöht, um einen Zusammenhang von Lipidsynthese und ACBP-Gesamtexpression zu suggerieren. Dies stand in Übereinstimmung mit dem für Brassica napus gefundenen Expressionsmuster. Durch differentielle Expression einzelner Isoformen könnte jedoch hier dennoch eine Co-Regulation bestehen. Eine solche differentielle Expression wurde durch die Analyse der spezifischen Expression der acbp3-Transkripte angedeutet. Die mRNAs dieser Isoform waren vor allem in Blättern. Fruchtknoten und Frucht, nicht jedoch in anderen Blütenbestandteilen nachweisbar. Somit wäre in diesen Pflanzenteilen die differentielle Expression anderer Isoformen denkbar, da die Analyse der ACBP-Gesamtexpression hier relevante Mengen an Transkripten dieser Genfamilie prognostizierte. Eine Analyse des Expressionsmusters für acbp4 war nicht möglich, da diese eventuell unterrepräsentierte Isoform nicht mit der für sie generierten spezifischen Sonde detektierbar war.
- Während der somatischen Embryogenese von *Digitalis lanata* EHRH. konnte zunächst ein Anstieg der ACBP-Gesamtexpression festgestellt werden. Durch den externen Streß beim Umsetzen auf ein neues Medium mit anderer Hormonzusammensetzung kam es zu einem radikalen Abfall der ACBP-Expression, es konnte jedoch im späteren Verlauf der Embryogenese noch einmal ein transienter Anstieg der Expression verzeichnet werden. Abgesehen vom starken Einfluß der externen Hormonbehandlung folgte die ACBP-Expression auch hier dem Muster, das bereits für *Brassica napus* festgestellt werden konnte.
- Durch die Behandlung Proembryogener Massen mit verschiedenen Stressoren konnte die ACBP-Gesamtexpression nicht entscheidend beeinflußt werden. Hohe Konzentrationen an Wasserstoffperoxid reduzierten zwar die Transkriptmengen, was jedoch auf einen eher unspezifischen Einfluß dieses starken oxidativen

Stresses auf den Gesamtmetabolismus der Zellkulturen zurückzuführen sein könnte. Geringere Mengen dieses Stressors hatten hingegen keinen Effekt. Auch die geringfügig erhöhte Transkription nach Behandlung mit Abscisinsäure war nicht als signifikant einzustufen. Eine Wiederholung dieser Analysen für die spezifische acbp3-Sonde zeigte auch hier keine signifikante Regulation unter den gewählten Bedingungen. acbp3 erfüllte somit die Kriterien für ein konstitutiv exprimiertes, nicht streßreguliertes Genprodukt, wie dies bereits für andere pflanzliche ACBPs postuliert worden war. Die Existenz weiterer Isoformen in *Digitalis lanata* EHRH. läßt jedoch das Vorhandensein differentiell regulierter ACBPs zu.

- Die genomische Southernanalyse erbrachte für die zwei erfolgreich eingesetzten Restriktionsenzyme 3 bzw. 4 detektierbare Signale, wovon die größeren Banden im hochmolekularen Bereich oberhalb 10000 bp lagen. Dies suggerierte das Vorliegen von mindestens drei, wahrscheinlich jedoch mehr ACBP-homologen Sequenzen im *Digitalis*-Genom, wobei in einem genomischen Southern Blot keine Unterscheidung zwischen inaktiven, repetetiven Sequenzen und tatsächlich exprimierten Isoformen möglich ist. Das Durchsuchen einer genomischen Bank für *Digitalis lanata* EHRH. erbrachte zwei genomische Klone, deren Restriktionsprodukte durch die acbp3-Sonde detektiert wurden, die jedoch auf Grund ihrer Größe nicht zur Sequenzierung zwischenkloniert werden konnten. Insgesamt stellte sich die Analyse der genomischen Organisation der ACBP-Genfamilie in *Digitalis lanata* EHRH. auf Grund des hohen Sekundärstoffgehaltes und des Methylierungsgrades der genomischen DNA als problematisch dar.
- Durch gerichtete Mutagenese der cDNA-Sequenzen acbp3 und acbp4 wurden die Aminosäuren in Position 19 und 23, die die einzigen nicht-homologen Unterschiede zwischen den korrespondierenden Proteinen ACBP3 und ACBP4 außerhalb des C-Terminus darstellten, gegen die der jeweils anderen Isoform ausgetauscht.
- Zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten dieser Mutanten mit verschiedenen Liganden wurde erstmals ein *in vitro*-Biosensortest eingesetzt, bei dem die ACBPs mit den jeweiligen Liganden gegen ein fluoreszierendes bovines ACBP titriert wurden. Die graphische Auswertung erlaubte die Ermittlung sowohl der Bindungsspezifitäten als auch der Bindungsstöchiometrie gegenüber gesättigten und ungesättigten Liganden.
- Die Analyse dieser Bindungsstudien erbrachte einen geringen, jedoch signifikanten Unterschied zwischen den beiden ACBP-Isoformen, wobei ACBP3 ungesättigte, ACBP4 hingegen gesättigte Liganden bevorzugte. Durch Austausch der Aminosäuren in Position 19 und 23 konnte diese Tendenz umgekehrt werden, wobei die ACBP3-Doppelmutante nun gesättigte und die ACBP4-Doppelmutante ungesättigte Liganden bevorzugte. Dies beruhte auf einem additiven Effekt beider Mutationen. Die Aminosäurepositionen 19 und 23 hatten somit einen Einfluß auf die Bindung von Liganden unterschiedlichen Sättigungsgrades, während Unterschiede im C-Terminus der ACBPs eventuelle Bedeutung für die generelle Affinität zu allen potentiellen Liganden hatten.

### F. Literatur

- 1. Abo-Hashema, K.A., Cake, M.H., Lukas, M.A. und Knudsen, J. (2001): The interaction of acyl-CoA with acyl-CoA binding protein and carnitine palmitoyltransferase I. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **33**, 807-815
- 2. Agerberth, B., Boman, A., Andersson, M., Jörnvall, H., Mutt, V. und Boman, H.G. (1993): Isolation of three antibacterial peptides from pig intestine: gastric inhibitory polypeptide (7-42), diazepam-binding inhibitor (32-86) and a novel factor, peptide 3910. *European Journal of Biochemistry* **216**, 623-629
- **3.** Alho, H., Harjuntausta, T., Schultz, R., Pelto-Huikko, M. und Bovolin P. (1991): Immunohistochemistry of diazepam binding inhibitor (DBI) in the central nervous system and peripheral organs: its possible role as an endogenous regulator of different types of benzodiazepine receptors. *Neuropharmacology* **30**, 1381-1386
- **4.** Alho, H., Kolmer, M., Harjuntausta, T. und Helen, P. (1995): Increased expression of diazepam binding inhibitor in human brain tumors. *Cell Growth & Differentiation* **6**, 309-314
- **5.** Andersen, K.V., Ludvigsen, S., Mandrup, S., Knudsen, J. und Poulsen, F.M. (1991): The secondary structure in solution of acyl-coenzyme A binding protein from bovine liver using 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 30, 10654-10663
- 6. Andersen, K.V. und Poulsen, F.M. (1992): Three-dimensional structure in solution of acyl-coenzyme A binding protein from bovine liver. *Journal of Molecular Biology* 226, 1131-1141
- 7. Andersen, K.V. und Poulsen, F.M. (1993): Refinement of the three-dimensional structure of acyl-coenzyme A binding protein using heteronuclear and three-dimensional NMR spectroscopy. *Journal Biomol NMR* 3, 271-284
- 8. Bækdal, T., Schjerling, C.K., Hansen, J.K. und Knudsen, J. (1996): Analysis of long-chain acyl-coenzyme A esters. (In) *Advances in Lipid Methology, vol. 3 (Christie, W.W., Ed.)* The Oily Press Ltd., Dundee, Scotland, pp 109-131
- 9. Banhegyi, G., Csala, M., Mandl, J., Burchell, A., Burchell, B., Marcolongo, P., Fulceri, R. und Benedetti, A. (1996): Fatty acyl-CoA esters and the permeability of rat liver microsomal vesicles. *Biochemical Journal* 320, 343-344
- 10. Besman, M.J., Yanagibashi, K., Lee, T.D., Kawamura, M., Hall, P.F. und Shively, J.E. (1989): Identification of des-(Gly-Ile)-endozepine as an effector of corticotropin-dependent adrenal steroidogenesis: Stimulation of cholesterol delivery is mediated by the peripheral benzodiazepine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 86, 4897-4901
- Bjellqvist, B., Hughes, G.J., Pasquali, C., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J.C., Frutiger, S. und Hochstrasser, D. (1993): The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* 14, 1023-31
- 12. Black, P.N., DiRusso, C.C., Sherin, D., MacColl, R., Knudsen, J. und Weimar, J.D. (2000a): Affinity Labeling Fatty Acyl-CoA Synthetase with 9-p-Azidophenoxy Nonanoic Acid and the Identification of the Fatty Acid-binding Site. *Journal of Biological Chemistry* 275, 38547-38553
- **13. Black, P.N., Færgeman, N.J. und DiRusso, C.C.** (2000b): Long-Chain Acyl-CoA–Dependent Regulation of Gene Expression in Bacteria, Yeast and Mammals. *The Journal of Nutrition* **130**, 305s-309s

- 14. Bormann, J., Ferrero, P., Guidotti, A. und Costa, E. (1985): Neuropeptide modulation of GABA receptor C1- channels. *Reg. Pept. Suppl.* 4, 33-38
- **15. Bormann, J.** (1991): Electrophysiological characterization of diazepam binding inhibitor (DBI) on GABAA receptors. *Neuropharmacology* **30**, 1387-1389
- 16. Boujrad, N., Hudson, J.R. und Papadopoulos, V. (1993): Inhibition of hormone-stimulated steroidogenesis in cultured Leydig tumor cells by a cholesterol-linked phosphorothioate oligodeoxynucleotide antisense to diazepam binding inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 90, 5728-5731
- 17. Boujrad, N., Hudson, J.R. und Papadopoulos, V. (1994): Mediation of the hormonal stimulation of steroidogenesis by the polypeptide diazepam binding inhibitor. (In) *Function of somatic cells of the testis (Bartke, A. Ed.)* New York, Springer-Verlag, pp 186-194
- Bovolin, P., Schlichting, J., Miyata, M., Ferrarese, C., Guidotti, A. und Alho, H. (1990): Distribution and characterization of diazepam binding inhibitor (DBI) in peripheral tissues of rat. *Regulatory Peptides* 29, 267-281
- **19. Brown, A.S. und Hall, P.F.** (1991): Stimulation by endozepine of the side-chain cleavage of cholesterol in a reconstituted enzyme system. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **180**, 609-614
- **20. Brown, A.S., Hall, P.F., Shoyab, M. und Papadopoulos, V.** (1992): Endozepine/diazepam binding inhibitor in adrenocortical and Leydig cell lines: absence of hormonal regulation. *Molecular and Cellular Endocrinology* **83**, 1-9
- **21. Brown, A.P., Johnson, P., Rawsthorne, S. und Hills, M.J.** (1998): Expression and properties of acyl-CoA binding protein from *Brassica napus*. *Plant Physiol. Biochem.* **36**, 629-635
- 22. Buus, C.L., Kristiansen, K. und Knudsen, J. (1994): Turnover of acyl-CoAbinding protein in four different cell lines measured by using two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochemical Journal* 297, 555-560
- 23. Carling, D., Zammit, V.A. und Hardie, D.G. (1987): A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Letters* 223, 217-222
- 24. Chen, Z.-W., Agerberth, B., Gell, K., Andersson, M., Mutt, V., Östenson, C.-G., Efendic, S., Barros-Söderling, J., Persson, B. und Jörnvall, H. (1988): Isolation and characterization of porcine diazepam-binding inhibitor, a polypeptide not only of cerebral occurrence but also common in intestinal tissues and with effects on regulation of insulin release. *European Journal of Biochemistry* 174(2), 239-245
- 25. Choi, J.-Y., Stukey, J., Hwang, S.-Y. und Martin, C.E. (1996): Regulatory Elements that control Transcription Activation and unsaturated Fatty Acidmediated Repression of the *Saccharomyces cerevisiae OLE1* Gene. *Journal of Biological Chemistry* 271, 3581-3589
- 26. Chye, M.-L. (1998): Arabidopsis cDNA encoding a membrane-associated protein with an acyl-CoA binding domain. *Plant Molecular Biology* 38, 827-838
- **27. Chye, M.-L., Huang, B.-Q. und Zee, S.Y.** (1999): Isolation of a gene encoding *Arabidopsis* membrane-associated acyl-CoA binding protein and immunolocalization of its gene product. *Plant Journal* **18**(2), 205-214
- 28. Chye, M.-L., Li, H.-Y. und Yung, M.-H. (2000): Single amino acid substitutions at the acyl-CoA-binding domain interrupt <sup>14</sup>[C]palmitoyl-CoA binding of ACBP2, an *Arabidopsis* acyl-CoA-binding protein with ankyrin repeats. *Plant Molecular Biology* 44, 711-721

- **29. Clarke, S.D. und Jump, D.B.** (1993): Regulation of gene transcription by polyunsaturated fatty acids. *Progress in Lipid Research* **32**, 139-149
- **30. Deeney, J.T., Tornheim, K., Korchak, H.M., Prentki, M. und Corkey, B.E.** (1992): Acyl-CoA esters modulate intracellular Ca<sup>2+</sup>-handling by permeabilized clonal pancreatic beta-cells. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 19840-19845
- **31. DiRusso, C.C., Heimert, T.L. und Metzger, A.K.** (1992): Characterization of FadR, a global transcriptional regulator of fatty acid metabolism in Escherichia coli. Interaction with the fadB promoter is prevented by long chain fatty acyl coenzyme A. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 8685-8691
- **32. Dobrowolski, B., Glund, K. und Metzlaff, M.** (1989): Cloning of tomato nuclear ribosomal DNA. Ribosomal DNA organization in leaves and suspension-cultured cells. *Plant Science* **60**, 206-207
- **33. Dumke-Lehmann, U.** (1993): Beiträge zur Isolation von Nukleinsäuren während verschiedener Entwicklungsstadien der Arzneipflanze *Digitalis lanata*. *Dissertation*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 34. Dunphy, J.T. und Linder, M.E. (1998): Signalling functions of protein palmitoylation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1436, 245-261
- 35. Dunphy, J.T., Schroeder, H., Leventis, R., Greentree, W.K., Knudsen, J., Silvius, J.R. und Linder, M.E. (2000): Differential effects of acyl-CoA binding protein on enzymatic and non-enzymatic thioacylation of protein and peptide substrates. *Biochimica et Biophysica Acta* 1485, 185-198
- **36. Dynan, W.S.** (1986): Promoters for housekeeping genes. *Trends Genet.* **2**, 196-197
- **37. Elholm, M., Bjerking, G., Knudsen, J., Kristiansen, K. und Mandrup, S.** (1996): Regulatory elements in the promoter region of the rat gene encoding the acyl-CoA-binding protein. *Gene* **173(2)**, 233-238
- **38. Elholm, M., Garras, A., Neve, S., Tornehave, D., Lund, T.B., Skorve, J., Flatmark, T., Kristiansen, K. und Berge, R.K.** (2000): Long-chain acyl-CoA esters and acyl-CoA binding protein are present in the nucleus of rat liver cells. *Journal of Lipid Research* **41**, 538-545
- **39. Engeseth, J. N., Pacovsky, S. R., Newman, T. und Ohlrogge B. J.** (1996): Characterization of an acyl-CoA-binding protein from *Arabidopsis thaliana*. *Arch. Bioch. Biophys.* **331**, 55-62
- 40. Færgeman, N.J., Sigurskjold, B.W., Kragelund, B.B., Andersen, K.V. und Knudsen, J. (1996): Thermodynamics of Ligand Binding to Acyl-Coenzyme A Binding Protein studied by Titration Calorimetry. *Biochemistry* 35, 14118-14126
- Færgeman, N.J. und Knudsen, J. (1997): Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochemical Journal* 323, 1-12
- 42. Fiebig, H.-J. (1999): Animal and vegetable fats and oils. *Fett/Lipid* 101, 310-311
- **43. Fisher, C.L, und Pei, G.K.** (1997): Modification of a PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Method. *BioTechniques* **23**, 570-574
- **44. Fox, S.R., Hill, L.M., Rawsthorne, S. und Hills, M.J.** (2000): Inhibition of the glucose-6-phosphate transporter in oilseed rape (*Brassica napus* L.) plastids by acyl-CoA thioesters reduces fatty acid synthesis. *Biochem. Journal* **352**, 525-532
- **45. Frolov, A. und Schroeder, F.** (1998): Acyl Coenzyme A Binding Protein conformational sensitivity to long chain fatty acyl-CoA. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 11049-11055
- 46. Fulceri, R., Gamberucci, A., Scott, H.M., Giunti, R., Burchell, A. und Benedetti, A. (1995): Fatty acyl-CoA esters inhibit glucose-6-phosphatase in rat liver microsomes. *Biochemical Journal* **307**, 391-397

- 47. Fulceri, R., Knudsen, J., Giunti, R., Volpe, P., Nori, A. und Benedetti, A. (1997): Fatty acyl-CoA acyl-CoA-binding protein complexes activate the Ca<sup>2+</sup>-release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochemical Journal* 325, 423-428
- **48.** Fyrst, H., Knudsen, J., Schott, M.A., Lubin, B.H. und Kuypers, F.A. (1995): Detection of acyl-CoA-binding protein in human red blood cells and investigation of its role in membrane phospholipid renewal. *Biochemical Journal* **306**, 793-799
- 49. Gardiner-Garden, M. und Frommer, M. (1987): CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of Molecular Biology* 196, 261-282
- 50. Garnier, M., Boujrad, N., Oke, B.O., Brown, A.S., Riond, J., Ferrara, P., Suarez-Quian, C.A. und Papadopoulos, V. (1993): Diazepam binding inhibitor is a paracrine/autocrine regulator of Leydig cell proliferation and steroidogenesis: Action via peripheral-type benzodiazepine receptor and independent mechanisms. *Endocrinology* 132, 444-458
- 51. Garnier, M., Boujrad, N., Ogwuegbu, S.O., Hudson, J.R. und Papadopoulos, V. (1994): The polypeptide diazepam binding inhibitor and a higher affinity peripheral-type benzodiazepine receptor sustain constitutive steroidogenesis in the R2C Leydig tumor cell line. *Journal of Biological Chemistry* 269, 22105-22112
- **52. Gersuk, V.H., Rose, T.M. und Todaro, G.J.** (1995): Molecular cloning and chromosomal localization of a pseudogene related to the human acyl-CoA binding protein/diazepam binding inhibitor. *Genomics* **25(2)**, 469-476
- 53. Gossett, R.E., Frolov, A.A., Roths, J.B., Behnke, W.D., Kier, A.B. und Schroeder, F. (1996): Acyl-CoA binding proteins: multiplicity and function. *Lipids* 31(9), 895-918
- 54. Gruner, B., Reva, V.A. und Müller-Uri, F. (2000): Stress-induction of Mndepending SOD and CAT in Digitalis lanata EHRH. during somatic embryogenesis. *Pharm. Pharm. Letters* 10, 47-50
- **55.** Grynkiewicz, G., Poenie, M. und Tsien, R.Y. (1985): A new generation of Ca<sup>2+</sup>-Indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 3440-3450
- **56.** Guidotti, A., Forchetti, C.M., Corda, M.G., Konkel, D., Bennett, C.D. und Costa, E. (1983): Isolation, characterization and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **80**, 3531-3535
- **57. Halperin, M.L., Robinson, B.H. und Fritz, I.B.** (1972): Effects or palmitoyl CoA on citrate and malate transport by rat liver mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **69**, 1003-1007
- 58. Herzig, K.-H., Schön, I., Tatemoto, K., Ohe, Y., Li, Y., Fölsch, U.R. und Owyang, C. (1996): Diazepam binding inhibitor is a potent cholecystokininreleasing peptide in the intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 93, 7927-7932
- **59. Herzig, K.H., Wilgus, C., Schön, I., Tatemoto, K. und Fölsch, U.R.** (1998): Regulation of the action of the novel cholecystokinin-releasing peptide diazepam binding inhibitor by inhibitory hormones and taurocholate. *Regulatory Peptides* **74**, 193-198
- **60. Heukeshoven, J. und Dernick, R.** (1985): Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* **6**, 103-112
- **61. Hills, M.J., Dann, R., Lydiate, D. und Sharpe, A.** (1994): Molecular cloning of a cDNA from *Brassica napus* L. for a homologue of acyl-CoA-binding protein. *Plant Molecular Biology* **25**, 917-920

- **62. Ivell, R. und Balvers, M.** (2001): The evolution of the endozepine-like peptide (elp) in the mammalian testis. *Reprod Domest Anim* **36**, 153-156
- 63. Johnson, D.R., Bhatnagar, R.S., Knoll, L.J. und Gordon, J.I. (1994): Genetic and biochemical studies of protein N-myristoylation. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 869-914
- **64. Juguelin, H., Bessoule, J.J. und Cassagne, C.** (1991): Interaction of amphiphilic substrates (acyl-CoAs) and their metabolites (free fatty acids) with microsomes from mouse sciatic nerves. *Biochimica et Biophysica Acta* **1068**, 41-51
- **65. Kandzia, R.** (1999): Reinigung und Klonierung der Lanatosid-15'-O-Acetylesterase aus Digitalis lanata EHRH.. *Dissertation*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- **66. Knudsen, J.** (1996): The role of Acyl-CoA binding protein (ACBP) and longchain Acyl-CoA-Esters in cell regulation and function. (In) *Frontiers in Bioactive Lipids (Vanderhoek, J.Y. Ed.)* Plenum Press, New York, pp 73-82
- **67.** Knudsen, J., Højrup, P., Hansen, H.O., Hansen, H.F. und Roepstorff, P. (1989): Acyl-CoA-binding protein in the rat. Purification, binding characteristics, tissue concentrations and amino acid sequence. *Biochemical Journal* **262**, 513-519
- **68.** Knudsen, J. und Nielsen, M. (1990): Diazepam-binding inhibitor: a neuropeptide and/or an acyl-CoA ester binding protein? *Biochemical Journal* **265**, 927-929
- 69. Knudsen, J., Mandrup, S., Rasmussen, J.T., Andreasen, P.H., Poulsen, F. und Kristiansen, K. (1993): The function of acyl-CoA-binding protein (ACBP)/diazepam binding inhibitor (DBI). *Molecular & Cellular Biochemistry* 123, 129-138
- 70. Knudsen, J., Færgeman, N.J., Skøtt, H., Hummel, R., Børsting, C., Rose, T.M., Andersen, J.S., Højrup, P., Roepstorff, P. und Kristiansen, K. (1994): Yeast acyl-CoA-binding protein: acyl-CoA-binding affinity and effect on intracellular acyl-CoA pool size. *Biochemical Journal* 302, 479-485
- **71. Kolmer, M., Roos, C., Tirronen, M., Myöhänen, S. und Alho, H.** (1994): Tissue-specific expression of the diazepam-binding inhibitor in Drosophila melanogaster: cloning, structure, and localization of the gene. *Molecular & Cellular Biology* **14**, 6983-6995
- 72. Kragelund, B.B., Andersen, K.V., Madsen, J.C., Knudsen, J. und Poulsen, F.M. (1993): Three-dimensional structure of the complex between acyl-coenzyme A binding protein and palmitoyl-coenzyme A. *Journal of Molecular Biology* 230, 1260-1277
- 73. Kragelund, B.B., Højrup, P., Jensen, M.S., Schjerling, C.K., Juul, E., Knudsen, J. und Poulsen, F.M. (1996): Fast and one-step folding of closely and distantly related homologous proteins of a four-helix bundle family. *Journal of Molecular Biology* 256, 187-200
- 74. Kragelund, B.B., Knudsen, J. und Poulsen, F.M. (1999a): Review: Acylcoenzyme A binding protein (ACBP). *Biochim et Biophys Acta* 1441, 150-161
- 75. Kragelund, B.B., Poulsen, K., Andersen, K.V., Baldursson, T., Krøll, J.B., Neergård, T.B., Jepsen, J., Roepstorff, P., Kristiansen, K. und Poulsen, F.M. (1999b): Conserved residues and their role in structure, function, and stability of acyl-coenzyme A binding protein. *Biochemistry* 38, 2386-2394
- **76. Laemmli, U.K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (259), 680-685
- 77. Lamacz, M., Tonon, M.C., Smith-Rouet, F., Patte, C., Gasque, P., Fontaine, M. und Vaudry, H. (1996): The endogenous benzodiazepine receptor ligand ODN increases cytosolic calcium in cultured rat astrocytes. *Mol. Brain. Res.* 37, 290-296

- 78. Larsson, O., Deeney, J.T., Bränström, R., Berggren, P.-O. und Corkey, B.E. (1996): Activation of the ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channel by long chain acyl-CoA. A role in modulation of pancreatic beta-cell glucose sensitivity. *Journal of Biological Chemistry* 271, 10623-10626
- **79. Lerche, M.H., Kragelund, B.B., Bech, L.M. und Poulsen, F.M.** (1997): Barley lipid-transfer protein complexed with palmitoyl CoA: the structure reveals a hydrophobic binding site that can expand to fit both large and small lipid-like ligands. *Structure* **5**, 291-306
- **80. Leventis, R., Juel, G., Knudsen, J. und Silvius, J.R.** (1997): Acyl-CoA Binding Proteins inhibit the nonenzymic S-Acylation of Cysteinyl-Containing Peptide Sequences by Long-Chain Acyl-CoAs. *Biochemistry* **36**, 5546-5553
- 81. Li, Q.L., Yamamoto, N., Inoue, A. und Morisawa, S. (1990): Fatty acyl-CoAs are potent inhibitors of the nuclear thyroid hormone receptor in vitro. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* 107, 699-702
- **82. Liebau, A.** (1995): Untersuchungen zur Cyclophilin-Expression unter Streßbedingungen bei *Digitalis lanata*. *Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 83. Mandrup, S., Hummel, R., Ravn, S., Jensen, G., Andreasen, P.H., Gregersen, N., Knudsen, J. und Kristiansen, K. (1992): Acyl-CoA-binding Protein/ Diazepam-binding inhibitor gene and pseudogenes. *Journal of Molecular Biology* 228, 1011-1022
- **84. Mandrup, S., Andreasen, P.H., Knudsen, J. und Kristiansen, K.** (1993): Genome organization and expression of the rat ACBP gene family. *Molecular & Cellular Biochemistry* **123**, 55-61
- 85. McDonough, V.M., Stukey, J.E. und Martin, C.E. (1992): Specificity of unsaturated fatty acid-regulated expression of the Saccharomyces cerevisiae OLE1 gene. *Journal of Biological Chemistry* 267, 5931-5936
- 86. Melloni, E., Averna, M., Salamino, F., Sparatore, B., Minafra, R. und Pontremoli, S. (2000): Acyl-CoA-binding Protein is a potent m-Calpain Activator. *Journal of Biological Chemistry* 275(1), 82-86
- **87. Metzner, M., Rücknagel, K.P., Knudsen, J. und Kuellertz, G.** (2000): Isolation and characterization of two acyl-CoA-binding proteins from proembryogenic masses of *Digitalis lanata* Ehrh. *Planta* **210**, 683-685
- **88. Metzner, M.** (2001): Reinigung, Klonierung und Charakterisierung einer phospho-spezifischen Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase aus Proembryogenen Massen (PEMs) von *Digitalis lanata* EHRH. *Dissertation*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- **89. Mikkelsen, J. und Knudsen J.** (1987): Acyl-CoA-binding protein from cow. *Biochemical Journal* **248**, 709-714
- **90.** Mikkelsen, J., Højrup, P., Nielsen, P.F., Roepstorff, P. und Knudsen, J. (1987): Amino acid sequence of acyl-CoA-binding protein from cow liver. *Biochemical Journal* **245**, 857-861
- **91.** Mogensen, I.B., Schulenberg, H., Hansen, H.O., Spener, F. und Knudsen, J. (1987): A novel acyl-CoA-binding protein from bovine liver. Effect on fatty acid synthesis. *Biochemical Journal* **241**, 189-192
- **92.** Moore, K.H., Dandurand, D.M. und Kiechle, F.L. (1992): Fasting induced alterations in mitochondrial palmitoyl-CoA metabolism may inhibit adipocyte pyruvate dehydrogenase activity. *International Journal of Biochemistry* **24**, 809-814
- **93.** Motulsky, H. (1995): (The GraphPad Guide to) Analyzing radioligand binding data. *GraphPad Software*, Inc. San Diego, USA

- 94. Mumby, S.M. (1997): Reversible palmitoylation of signaling proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9, 148-154
- **95.** Nikawa, J.-I., Tanabe, T., Ogiwara, H., Shiba, T. und Numa, S. (1979): Inhibitory effects of long-chain acyl coenzyme A analogues on rat liver acetyl coenzyme A carboxylase. *FEBS Letters* **102**, 223-226
- 96. Ohlrogge, J. und Browse, J. (1995): Lipid Biosynthesis. Plant Cell 7, 957-970
- **97.** Ohlsson, A.B., Berglund, T., Komlos, P. und Rydstrom, J. (1995): Plant defense metabolism is increased by the free radical-generating compound AAPH. *Free Radic. Biol. Med.* **19**, 319-327
- **98.** Östenson, C.-G., Ahrén, B., Karlsson, S., Sandberg, E. und Efendic, S. (1990): Effects of porcine diazepam-binding inhibitor on insulin and glucagon secretion in vitro from the rat endocrine pancreas. *Regulatory Peptides* **29**, 143-151
- **99.** Östenson, C.-G., Ahrén, B., Johansson, O., Karlsson, S., Hilliges, M. und Efendic, S. (1991): Diazepam binding inhibitor and the endocrine pancreas. *Neuropharmacology* **30**, 1391-1398
- 100.Östenson, C.-G., Ahrén, B., Karlsson, S., Knudsen, J. und Efendic, S. (1994): Inhibition by rat diazepam-binding inhibitor/acyl-CoA-binding protein of glucose-induced insulin secretion in the rat. *European Journal of Endocrinology* 131, 201-204
- 101. Papadopoulos, V., Berkovich, A., Krueger, K.E., Costa, E. und Guidotti, A. (1991): Diazepam binding inhibitor (DBI) and its processing products stimulate mitochondrial steroid biosynthesis via an interaction with mitochondrial benzodiazepine receptors. *Endocrinology* **129**, 1484-1488
- 102. Papadopoulos, V. und Brown, A.S. (1995): Role of the Peripheral-type Benzodiazepine Receptor and the Polypeptide Diazepam Binding Inhibitor in Steroidogenesis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 53, 103-110
- **103. Papadopoulos, V.** (1998): Structure and Function of the Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor in Steroidogenic Cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **217**, 130-142
- 104. Patte, C., Vaudry, H., Desrues, L., Gandolfo, P., Strijdveen, I., Lamacz, M. und Tonon, M.C. (1995): The endozepine ODN stimulates polyphosphoinositide metabolism in rat astrocytes. *FEBS Letters* 362, 106-110
- **105.Peitzsch, R.M. und McLaughlin, S.** (1993): Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry* **32**, 10436-10443
- 106.Pfanner, N., Glick, B.S., Arden, S.R. und Rothman, J.E. (1990): Fatty acylation promotes fusion of transport vesicles with Golgi cisternae. *Journal of Cell Biology* 110, 955-961
- 107. Powell, G., L, Grothusen, J.R., Zimmermann, J.K., Evans, C.A. und Fish, W.W. (1981): A re-examination of some properties of fatty acyl-CoA micelles. *Journal of Biological Chemistry* 256, 12740-12747
- **108.Powell, P.J., Lau, S.M, Killian, D. und Thorpe, C.** (1987): Interaction of acyl coenzyme A substrates and analogues with pig kidney medium-chain acyl-CoA dehydrogenase. *Biochemistry* **26**, 3704-3710
- **109.Pusch, W., Balvers, M., Hunt, N. und Ivell, R.** (1996): A novel endozepine-like peptide (ELP) is exclusively expressed in male germ cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* **122**, 69-80

- **110.Pusch, W., Jaehner, D., Spiess, A.N. und Ivell, R.** (1999): Rat endozepine-like peptide (ELP): cDNA cloning, genomic organization and tissue-specific expression. *Gene* **235**, 51-57
- 111.Raman, N. und DiRusso, C.C. (1995): Analysis of acyl-CoenzymeA binding to the transcription factor FadR and identification of amino acid residues in the carboxyl terminus required for ligand binding. *Journal of Biological Chemistry* 270, 1092-1097
- 112.Rasmussen, J.T., Börchers, T. und Knudsen, J. (1990): Comparison of the binding affinities of acyl-CoA-binding protein and fatty-acid-binding protein for long-chain acyl-CoA esters. *Biochemical Journal* 265, 849-855
- **113.Rasmussen, J.T., Rosendal, J. und Knudsen, J.** (1993): Interaction of acyl-CoA binding protein (ACBP) on processes for which acyl-CoA is a substrate, product or inhibitor. *Biochemical Journal* **292**, 907-913
- 114.Rasmussen, J.T., Færgeman, N.J., Kristiansen, K. und Knudsen, J. (1994): Acyl-CoA-binding protein (ACBP) can mediate intermembrane acyl-CoA transport and donate acyl-CoA for beta-oxidation and glycerolipid synthesis. *Biochemical Journal* 299, 165-170
- **115.Reinbothe, C., Diettrich, B. und Luckner, M** (1990): Regeneration of plants from somatic embryos of Digitalis lanata. *J. Plant Physiol.* 137, 224-228
- **116.Requero, M.A., Goni, F.M. und Alonso, A.** (1995a): The membrane-perturbing properties of palmitoyl-coenzyme A and palmitoylcarnitine. A comparative study. *Biochemistry* **34**, 10400-10405
- **117.Requero, M.A., Gonzales, M., Goni, F.M., Alonso, A. und Fidelio, G.** (1995b): Differential penetration of fatty acyl-coenzyme A and fatty acylcarnitines into phospholipid monolayers. *FEBS Letters* **357**, 75-78
- **118.Resh, M.D.** (1996): Regulation of cellular signalling by fatty acid acylation and prenylation of signal transduction proteins. *Cell Signal.* **8**, 403-412
- 119.Richieri, G.V., Ogata, R.T. und Kleinfeld, A.M. (1992): A fluorescently labeled intestinal Fatty Acid Binding Protein. *Journal of Biological Chemistry* 267, 23495-23501
- **120.Richieri, R.V., Ogata, R.T. und Kleinfeld, A.M.** (1994): Equilibrium constants for the binding of Fatty Acids with Fatty Acid-binding Protein from Adipocyte, Intestine, Heart, and Liver measured with the fluorescent probe ADIFAB. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 23918-23930
- 121.Robinson, C.V., Chung, E.W., Kragelund, B.B., Knudsen, J., Aplin, R.T., Poulsen, F.M. und Dobson, C.M. (1996): Probing the nature of non-covalent interactions by mass spectrometry. A study of protein-CoA ligand binding and assembly. *Journal of the American Chemical Society*. 118, 8646-8653
- **122.Rogers, S.O. und Bendich, A.J.** (1994): Extraction of total cellular DNA from plants algae and fungi. *Plant Molecular Biology Manual* **D1**, 1-8
- 123.Rose, T.M., Schultz, E.R. und Todaro, G.J. (1992): Molecular cloning of the gene for the yeast homolog (ACB) of diazepam binding inhibitor / endozepine / acyl-CoA-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* U.S.A. 89, 11287-11291
- **124.Rose, T.M., Schultz, E.R., Sasaki, G.C., Kolattukudy, P.E. und Shoyab, M.** (1994): Nucleotide sequence and genomic structure of duck acyl-CoA binding protein/diazepam-binding inhibitor: co-localization with S-acyl fatty acid synthase thioesterase. *DNA Cell Biol* **13(6)**, 669-678

- 125.Rosendal, J. und Knudsen, J. (1992): A fast and versatile method for extraction and quantitation of long-chain acyl-CoA esters from tissue: content of individual long-chain acyl-CoA esters in various tissues from fed rat. *Anal Biochem* 207, 63-67
- 126.Rosendal, J., Ertbjerg, P. und Knudsen, J. (1993): Characterization of ligand binding to acyl-CoA-binding protein. *Biochemical Journal* 290, 321-326
- 127.Ruoho, A.E., Woldegiorgis, G., Kobayashi, C. und Shrago, E. (1989): Specific labeling of beef heart mitochondrial ADP/ATP carrier with N-(3-iodo-4azidophenylpropionamido)cysteinyl- 5-(2'-thiopyridyl)cysteine-coenzyme A (ACT-CoA), a newly synthesized 125I-coenzyme A derivative photolabel. *Journal of Biological Chemistry* 264, 4168-4172
- **128.Rys-Sikora, K.E., Ghosh, T.K. und Gill, D.L.** (1994): Modification of GTP-activated calcium translocation by fatty acyl-CoA esters. Evidence for a GTP-induced prefusion event. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 31607-31613
- **129.Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989): Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor, New York
- **130.Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R.** (1977): DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74** (12), 5463-5467
- **131.Scholze, C.** (1999): Isolierung und Charakterisierung einer Cyclophilin-cDNA aus *Digitalis lanata* und Expression in *E. coli. Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 132.Scholze, C., Peterson, A., Diettrich, B. und Luckner, M. (1999): Cyclophilin isoforms from *Digitalis lanata*. Sequences and Expression during embryogenesis and stress. *Journal of Plant Physiology* 155 (2), 212-219
- **133.Schroeder, F., Myers-Payne, S.C., Billheimer, J.T. und Wood, W.G.** (1995): Probing the ligand binding sites of fatty acid and sterol carrier proteins: effect of ethanol. *Biochemistry* **34**, 11919-11927
- 134.Shahinian, S. und Silvius, J.R. (1995): Doubly-lipid-modified protein sequence motifs exhibit long-lived anchorage to lipid bilayer membranes. *Biochemistry* 34, 3813-3822
- **135.Shoyab, M., Gentry, L.E., Marquardt, H. und Todaro, G.J.** (1986): Isolation and characterization of a putative endogenous benzodiazepinoid (endozepine) from bovine and human brain. *Journal of Biolog. Chemistry* **261**, 11968-11973
- **136.Shrago, E., Woldegiorgis, A.E., Ruoho, A.E. und DiRusso, C.C.** (1995): Fatty acyl CoA esters as regulators of cell metabolism. *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids* **52**, 163-166
- 137.Shug, A.L., Lerner, E., Elson, C. und Shrago, E. (1971): The inhibition of adenine nucleotide translocase activity by oleoyl CoA and its reversal in rat liver mitochondria. *Biochem. & Biophysic. Research Communications* 43, 557-563
- 138.Silva, C., Loyola, G., Valenzuela, R., Garcia-Huidobro, T., Monasterio, O. und Bronfman, M. (1999): High-affinity binding of fatty acyl-CoAs and peroxisome proliferator-CoA esters to glutathione S-transferases Effect on enzymatic activity. *European Journal of Biochemistry* 266, 143-150
- 139.Swinnen, J.V., Esquenet, M., Rosseels, J., Claessens, F., Rombauts, W., Heyns, W. und Verhoeven, G. (1996): A human gene encoding diazepambinding inhibitor/acy1-CoA-binding protein: transcription and hormonal regulation in the androgen-sensitive human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. DNA Cell Biol 15(3),197-208

- 140.Swinnen, J.V., Alen, P., Heyns, W. und Verhoeven, G. (1998): Identification of Diazepam-binding Inhibitor/Acyl-CoA-binding Protein as a Sterol Regulatory Element-binding Protein-responsive Gene. *Journal of Biological Chemistry* 273, 19938-19944
- 141. Takishima, K., Watanabe, S., Yamada, M., Suga, T. und Mamiya, G. (1988): Amino acid sequences of two nonspecific lipid-transfer proteins from germinated castor bean. *European Journal of Biochemistry* 177, 241–249
- 142. Taupin, V., Herbelin, A., Descamps-Latscha, B. und Zavala, F. (1991): Endogenous anxiogenic peptide, ODN-diazepam-binding inhibitor, and benzodiazepines enhance the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human monocytes. *Lymphokine Cytokine Research* 10, 7-13
- 143. Taupin, V., Gogusev, J., Descamps-Latscha, B. und Zavala, F. (1993): Modulation of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor expression in human monocytes by an endogenous anxiogenic benzodiazepine ligand, triakontatetraneuropeptide: evidence for a role of prostaglandins. *Molecular Pharmacology* **43**, 64-69
- 144. Tewes, A., Wappler, A., Peschke, E. M., Garve, R., Nover, L. (1982): Morphogenesis and embryogenesis in long-term cultures of *Digitalis*. *Z. Pflanzenphysiol*. 106, 311-324
- 145. Tippett, P.S. und Neet, K.E. (1982): Specific inhibition of glucokinase by long chain acyl coenzymes A below the critical micelle concentration. *Journal of Biological Chemistry* 257, 12839-12845
- 146.Tong, Y., Toranzo, D. und Pelletier, G. (1991): Localization of diazepambinding inhibitor (DBI) mRNA in the rat brain by high resolution in situ hybridization. *Neuropeptides* 20, 33-40
- 147.van Aalten D.M., Milne K.G., Zou J.Y., Kleywegt G.J., Bergfors T., Ferguson M.A., Knudsen J. und Jones T.A. (2001): Binding site differences revealed by crystal structures of Plasmodium falciparum and bovine acyl-CoA binding protein. *Journal of Molecular Biology* **309**(1), 181-192
- 148.Van Cott, E.M., Muszbek, L. und Laposata, M. (1997): Fatty acid acylation of platelet proteins. *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids* 57, 33-37
- 149. Wadum, M. C., Villadsen, J.K., Feddersen, S., Møller, R.S., Neergard, T.B., Kragelund, B.B., Højrup, P., Færgeman, N.J. und Knudsen, J. (2002): Fluorescently labelled bovine acyl-CoA-binding protein acting as an acyl-CoA sensor: interaction with CoA and acyl-CoA esters and its use in measuring free acyl-CoA-esters and non-esterified fatty acids. *Biochemical Journal* 365, 165-172
- **150.Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F. und Lin, L.-N.** (1989): Rapid measurements of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Analytical Biochemistry* **179**, 131-137
- **151. Yamada, M.** (1992): Lipid transfer proteins in plants and microorganisms. *Plant Cell Physiology* **33**, 1–6
- **152. Yanagibashi, K., Ohno, Y., Kawamura, M. und Hall, P.F.** (1988): The regulation of intracellular transport of cholesterol in bovine adrenal cells: purification of a novel protein. *Endocrinology* **123**, 2075-2082
- 153.Zhang, F.L. und Casey, P.J. (1996): Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 241-269

SWISSPROT- und EMBL-Einträge:

- 148.acbp3-cDNA: DLA249833 (Gruner et al., submitted)
- 149.acbp4-cDNA: DLA249834 (Gruner et al., submitted)
- **150.**ACB1\_DIGLA: **P81624** (Metzner et al. 2000)
- 151.ACB2\_DIGLA: P81625 (Metzner et al. 2000)
- 152.ACBP\_ANAPL: P45882 (Rose et al. 1994)
- **153.** ACBP\_ARATH: **P57752** (Theologis, A. et al. (Arabidopsis Genome Project) (2000): Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 816-820)
- 154. ACBP\_BOVIN: P07107 (Webb, N.R., Rose, T.M., Malik, N., Marquardt, H., Shoyab, M., Todaro, G.J. und Lee, D.C. (1987): Bovine and human cDNA sequences encoding a putative benzodiazepine receptor ligand. DNA 6, 71-79)
- 155.ACBP\_BRANA: Q39315 (Hills et al 1994)
- 156.ACBP\_CAEEL: O01805 (Sammons, L. und Wohldmann, P. (1997) submitted)
- 157.ACBP\_CHAVI: P82934 (Cavagnari, B.M, Sterin-Speziale, N., Affanni, J.M., Knudsen, J. und Santome, J.A. (2001): Acyl-CoA-binding protein in the armadillo Harderian gland: its primary structure and possible role in lipid secretion. *Biochimica et Biophysica Acta* 1545, 314-325)
- 158.ACBP\_CHICK: Q9PRL8 (Kragelund et al. 1996)
- **159.**ACBP\_DROME: **P42281** (Kolmer et al. 1994)
- 160.ACBP\_FRIAG: O22643 (Prabhavalkar, D.S. und Baysdorfer, C. (1997) submitted)
- 161.ACBP\_GOSHI: Q39779 (Reddy, A.S., Ranganathan, B., Haisler, R.M. und Swize, M.A. (1998): A cDNA encoding acyl-CoA-binding protein from cotton. (In) *Plant Gene Register* PGR96-028)
- 162.ACBP\_HUMAN: P07108 (Webb, N.R., Rose, T.M., Malik, N., Marquardt, H., Shoyab, M., Todaro, G.J. und Lee, D.C. (1987): Bovine and human cDNA sequences encoding a putative benzodiazepine receptor ligand. DNA 6, 71-79)
- **163.** ACBP\_MANSE: **P31824** (**Snyder, M.J. und Feyereisen, R.** (1993): A diazepam binding inhibitor (DBI) homolog from the tobacco hornworm, Manduca sexta. *Mol. Cell. Endocrinology* **94**, 1-4
- 164. ACBP\_MOUSE: P31786 (Owens, G.P., Sinha, A.K., Sikela, J.M. und Hahn, W.E. (1989): Sequence and expression of the murine diazepam binding inhibitor. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 6, 101-108
- 165.ACBP\_PIG: P12026 (Chen et al. 1988)
- 166.ACBP\_RANRI: P45883 (Lihrmann, I., Plaquevent, J.-C., Tostivint, H., Raijmakers, R., Tonon, M.-C., Conlon, J.M. und Vaudry, H. (1994): Frog diazepam-binding inhibitor: peptide sequence, cDNA cloning, and expression in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 6899-6903
- 167.ACBP\_RAT: P11030 (Mandrup et al. 1992)
- **168.** ACBP\_RICCO: **004066** (**Erber, A., Horstmann, C. und Schobert, C.** (1998): A cDNA clone for acyl-CoA-binding protein from Castor bean. submitted)
- 169.ACBP\_YEAST: P31787 (Rose et al. 1992)

### G. Anhang

#### 1. Meßwerte zur Bestimmung der Biosensor-k D

Im folgenden sind die bei der Titration des Biosensors mit verschiedenen Acyl-CoA-Estern erhaltenen Meßwerte aufgeführt. Die Konzentrationsangaben für die Liganden erfolgten in  $\mu$ M, wobei die Biosensor-Konzentration 0,5  $\mu$ M betrug. Die aus diesen Werten ermittelten Dissoziationskonstanten für das Biosensor-Protein sind in Tab. C.3. in Kapitel C.6.1.3. dargestellt.

#### a) Coenzym A

Konz.	Reihe 1	Reihe 2	Ø	St.abw.
0	30595	27525	29060	2170.818
0.1782	30055	28963	29509	772.161
0.2673	30722	28993	29858	1222.588
0.5346	31308	30136	30722	828.729
0.6237	30986	30694	30840	206.475
0.891	32293	31807	32050	343.654
1.782	34753	35428	35091	477.297
4.455	37931	39174	38553	878.934
10.692	46546	47152	46849	428.507

#### b) Butyryl-CoA (C4:0-CoA)

Konz.	Reihe 1	Reihe 2	Ø	St.abw.
0	30220	27709	28965	1775.545
0.2095	32451	33971	33211	1074.802
0.419	34765	32751	33758	1424.113
0.6285	37396	35383	36390	1423.406
0.838	38350	36943	37647	994.8992
2.095	44152	44870	44511	507.7027
5.2375	50279	49310	49795	685.1865
12.57	57470	57649	57560	126.5721
20.95	61354	61816	61585	326.6833

### c) Lauryl-CoA (C12:0-CoA)

Konz.	Reihe 1	Reihe 2	Ø	St.abw.
0	29119	27751	28435	967.3221
0.0959	36973	37955	37464	694.3789
0.1918	47968	47536	47752	305.4701
0.2877	57304	59416	58360	1493.41
0.33565	64768	62465	63616.5	1628.467
0.43155	72404	69346	70875	2162.333
0.4795	73915	73141	73528	547.3006
0.5754	78211	78446	78328.5	166.1701
0.6713	79724	80605	80164.5	622.9611
0.7672	82107	81117	81612	700.0357
1.918	81765	82912	82338.5	811.0515

#### d) Myristyl-CoA (C14:0-CoA)

Konz.	Reihe 1	Reihe 2	Ø	St.abw.
0	22778	20122	21450	1878.076
0.0928	31240	31327	31283.5	61.51829
0.1857	40780	40774	40777	4.242641
0.2785	47648	48601	48124.5	673.8728
0.3714	55128	55422	55275	207.8894
0.4642	59225	60240	59732.5	717.7134
0.5571	62101	61639	61870	326.6833
0.6499	63555	62156	62855.5	989.2424
0.7428	63768	63320	63544	316.7838
0.9285	64410	64701	64555.5	205.7681
1.857	64648	65869	65258.5	863.3774

#### e) Myristenyl-CoA (C14:1-CoA)

Konz.	Reihe 1	Reihe 2	Ø	St.abw.
0	27012	26582	26797	304.0559
0.06565	34565	31867	33216	1907.774
0.1313	40314	42165	41239.5	1308.855
0.19695	48323	46526	47424.5	1270.671
0.32825	64658	56751	60704.5	5591.093
0.3939	68023	65333	66678	1902.117
0.45955	71706	69617	70661.5	1477.146
0.6565	77315	79669	78492	1664.529
1.313	83762	80237	81999.5	2492.551

#### f) Palmitoyl-CoA (C16:0-CoA)

Konz.	Reihe 1	Reihe 2	Ø	St.abw.
0	22341	20771	21556	1110.158
0.0871	33237	31110	32173.5	1504.016
0.1741	41019	44119	42569	2192.031
0.2612	51869	49976	50922.5	1338.553
0.3483	62691	61093	61892	1129.957
0.4354	67765	67318	67541.5	316.0767
0.5224	70915	73425	72170	1774.838
0.6095	74495	75024	74759.5	374.0595
0.8707	75781	76968	76374.5	839.3357
1.7415	77381	78409	77895	726.9058

1.238

#### Konz. Reihe 1 Reihe 2 Ø St.abw. 0 32228 29450 30839 1964.343 0.0619 37350 36941 289.2067 37146 0.1238 43506 44224 43865 507.7027 0.1857 51844 50300 53387 2182.839 0.2476 60215 57178 58697 2147.483 0.3714 70776 71832 1492.702 72887 0.4952 82119 82014 82067 74.24621 0.619 88903 82309 85606 4662.662

88934

90112

1665.944

g) Palmitoleyl-CoA (C16:1-CoA)

#### h) Stearyl-CoA (C18:0-CoA)

Konz.	Reihe 1	Reihe 2	Ø	St.abw.
0	28970	25867	27418.5	2194.152
0.0993	32429	35814	34121.5	2393.556
0.1986	41612	38388	40000	2279.712
0.2979	49237	50527	49882	912.1677
0.3972	57771	60113	58942	1656.044
0.4468	66102	61802	63952	3040.559
0.5461	73235	67750	70492.5	3878.481
0.5958	74680	75459	75069.5	550.8362
0.6951	80745	80773	80759	19.79899
0.7944	85344	83880	84612	1035.204
1.986	87111	83329	85220	2674.278

#### i) Oleyl-CoA (C18:1-CoA)

91290

j) Linoleyl-CoA (C18:2-CoA)

Konz.	Reihe 1	Reihe 2	Ø	St.abw.
0	25281	24109	24695	828.7291
0.09625	32119	29997	31058	1500.481
0.1925	41735	36204	38970	3911.008
0.28875	47758	45344	46551	1706.956
0.385	51718	60700	56209	4491
0.48125	63110	61634	62372	1043.69
0.5775	64625	76025	70325	4030.509
0.67375	79063	67949	73506	3929.392
0.77	73159	80523	76841	5207.134
0.9625	71094	84041	77568	4577.456
1.925	76552	80392	78472	2715.29

Konz.	Reihe 1	Reihe 2	Ø	St.abw.
0	24002	25870	24936	1320.875
0.1047	33394	29118	31256	3023.589
0.2095	36723	41451	39087	3343.201
0.3142	44725	45321	45023	421.4356
0.5237	53961	55985	54973	1431.184
0.6285	58450	59236	58843	555.7859
0.7332	61538	58655	60097	2038.589
0.838	60798	59514	60156	907.9251
1.0475	62587	58193	60390	3107.027
2.095	63787	58259	61023	3908.886

#### 2. Meßwerte zur Bestimmung des Ligandenverlustes

Zur Bestimmung des Verlustes an tatsächlich in Lösung befindlichem Liganden wurde eine Dreifach-Testreihe mit Palmitoleyl-CoA (C16:1) und ACBP3-SE als Testkomponenten durchgeführt.

Lizzadan		1.Messung			2. Messung		3. Messung		
konzen	kai	na Rawagu	Ing	keine eine		keine eine Bewegung		eine	zwei
tration	KCI	lie Dewegu	ing	Keine	enie bev	wegung	В	ewegungei	1
πη μινι	Reihe 1	Reihe 2	Reihe 3	Reihe 1	Reihe 2	Reihe 3	Reihe 1	Reihe 2	Reihe 3
0	11800	11564	11276	10707	10018	10244	9512	9085	8578
1.34	21321	22189	22326	19153	17467	17766	16944	15704	14865
2.68	35679	32983	31889	31791	29502	29881	28009	26300	24409
3.35	41122	37934	38937	36845	34202	33895	33051	30663	28078
4.02	45441	45090	43855	39996	36978	36579	35724	32543	30250
4.69	54230	51238	50189	48083	43525	44153	42693	39248	35663
5.36	55154	54887	53100	50022	46618	46137	45140	41986	36826
6.03	57789	57931	56024	51860	48467	47859	46373	42392	39076
6.7	60618	59581	59382	53765	50323	48991	48182	44018	40103
8.04	65055	62105	61392	56960	53028	52722	50820	47033	44111
9.38	65944	63957	62714	58453	54153	53915	52030	48145	45165
13.4	66777	64738	62863	60206	54370	54816	54558	49325	46481

Durchschnittlicher prozentualer Verlust an Fluoreszenzintensität

- zwischen 1. und 2. Messung von Reihe 1:	$10,71\% \pm 1,01$
- zwischen 2. und 3. Messung von Reihe 1:	$10,72\% \pm 0,71$
- zwischen 2. und 3. Messung von Reihe 2:	$10,76\% \pm 1,15$
Der durchschnittliche Verlust der Biosensoremissi	on durch wiederholte Messungen
lag daher bei 10,73 % $\pm$ 0,96.	C C

Durchschnittlicher prozentualer Verlust an Fluoreszenzintensität

- zwischen den Reihen 1 und 2 (2. Messung):  $7,53 \% \pm 1,16$ - zwischen den Reihen 1 und 3 (2. Messung):  $7,57 \% \pm 1,29$
- zwischen den Reihen 1 und 2 (3. Messung):  $7,57\% \pm 1,36$
- zwischen den Reihen 2 und 3 (3. Messung):  $7,49\% \pm 1,99$

Der durchschnittliche Verlust der Biosensoremission durch Überführung der Testreihen in ein neues Reaktionsgefäß lag daher bei 7,54  $\% \pm 1,45$ .

#### 3. Meßwerte zur Bestimmung der Wildtypen und Doppelmutanten

Die Durchführung der im folgenden aufgeführten Biosensor-Tests ist in B.6.4.2. näher beschrieben, während auf die Auswertung dieser Meßwerte in C.6.2. eingegangen wurde.

#### a) Coenzym A

ACBP3-WT							
CoA- Konz. in µM	Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung			
0	20894	19282	20088	1139.856			
1.782	22810	24070	23440	890.9545			
3.564	24140	23874	24007	188.0904			
5.346	28991	27533	28262	1030.962			
7.128	30113	27846	28980	1603.011			
10.692	31164	33777	32471	1847.67			
17.82	36040	36853	36447	574.8778			
35.64	41203	40911	41057	206.4752			

ACBP4-WT					
Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung		
20581	18207	19394	1678.671		
22913	22914	22914	0.707107		
27524	25961	26743	1105.208		
28580	28068	28324	362.0387		
30351	29580	29966	545.1793		
34285	32614	33450	1181.575		
38325	37332	37829	702.157		
40684	45122	42903	3138.14		

#### b) Butyryl-CoA (C4:0)

ACBP3-WT					
Liganden			Durch-	Standard-	
Konz. in	Serie 1	Serie 2	schnitt	abwei-	
μM			Semme	chung	
0	18356	20158	19257	1274.206	
2.095	28344	28122	28233	156.9777	
4.19	36537	35128	35833	996.3135	
6.285	39532	38957	39245	406.5864	
8.38	40603	40798	40701	137.8858	
10.475	45483	42036	43760	2437.397	
12.57	47895	46440	47168	1028.84	
20.95	50730	47167	48949	2519.421	
41.9	49477	52071	50774	1834.235	

ACBP4-WT

Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung
19400	18372	18886	726.9058
32879	31567	32223	927.7241
36376	36136	36256	169.7056
40290	41251	40771	679.5296
45247	42296	43772	2086.672
47381	44654	46018	1928.28
49307	47068	48188	1583.212
51005	47657	49331	2367.394
53069	50388	51729	1895.753

#### c) Lauryl-CoA (C12:0)

ACBP3-WT					
Liganden Konz. in µM	Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung	
0	20846	17586	19216	2305.168	
0.959	27316	26156	26736	820.2438	
1.918	35498	33656	34577	1302.490	
2.877	44994	43460	44227	1084.701	
3.3565	49810	45621	47716	2962.070	
3.836	54624	55210	54917	414.3645	
4.3155	60812	62875	61844	1458.761	
4.795	63879	64929	64404	742.4621	
5.754	68746	69658	69202	644.8813	
6.713	72227	73882	73055	1170.261	
7.672	75574	71551	73563	2844.690	
11.508	75435	72494	73965	2079.601	
19.18	73456	72890	73173	400.2224	

ACBP4-WT				
Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung	
18361	17705	18033	463.86204	
24676	26106	25391	1011.1626	
35536	34580	35058	675.99408	
43487	38910	41199	3236.4277	
46520	43026	44773	2470.6310	
46202	43437	44820	1955.1502	
51596	48775	50186	1994.7482	
54409	51720	53065	1901.4101	
60224	58734	59479	1053.5891	
65526	62163	63845	2378.0001	
66192	63869	65031	1642.6090	
73992	71192	72592	1979.8989	
73456	72890	73173	400.22243	

#### ACBP3-SE

Liganden Konz. in uM	Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung
0	21409	20321	20865	769.3321
0.959	24826	25897	25362	757.3113
1.918	32746	31473	32110	900.1469
2.877	38342	39340	38841	705.6925
3.836	52515	51432	51974	765.7966
4.795	60879	57849	59364	2142.533
5.2745	65232	59176	62204	4282.238
5.754	69557	64352	66955	3680.490
6.713	76118	75122	75620	704.2783
7.672	77531	76104	76818	1009.041
11.508	77976	76358	77167	1144.098
19.18	75546	75522	75534	16.97056

#### ACBP4-NA

Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung
18476	18116	18296	254.55844
28300	28238	28269	43.840620
36931	39063	37997	1507.5516
48940	47269	48105	1181.5754
53445	50978	52212	1744.4324
57482	53202	55342	3026.4170
63451	58765	61108	3313.5023
65154	64587	64871	400.92954
67240	66661	66951	409.41482
68311	66064	67188	1588.8689
67889	67025	67457	610.94025

#### d) Myristyl-CoA (C14:0)

#### ACBP3-WT

Liganden Konz. in µM	Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung
0	11433	11350	11392	58.68986
0.46425	13111	13376	13244	187.3832
0.9285	15448	14530	14989	649.1240
1.857	18412	19291	18852	621.5468
2.7855	23610	24265	23938	463.1549
3.714	30101	26283	28192	2699.733
4.6425	31924	30791	31358	801.1519
5.571	34749	33347	34048	991.3637
6.4995	36616	38985	37801	1675.135
7.428	35760	35958	35859	140.0071
11.142	35862	37187	36525	936.9164

ACBP4-WT Standard-Durch-Serie 1 Serie 2 abweischnitt chung 11572 11427 11500 102.53048 16239 16227 16233 8.4852813 20079 20775 20427 492.14631 29375 28418 28897 676.70118 37209 37496 405.17218 37782 42988 40537 41763 1733.1187 46365 48704 47535 1653.9227 50919 48157 49538 1953.0289 50386 53415 51901 2141.8264 52184 52453 52319 190.21172 53593 52134 52864 1031.6687

ACBP3-SE					
Liganden Konz. in µM	Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung	
0	10837	13351	12094	1777.666	
0.46425	12793	14226	13510	1013.284	
0.9285	15838	14210	15024	1151.169	
1.857	21479	18414	19947	2167.282	
2.7855	26117	25950	26034	118.0868	
3.714	34191	32098	33145	1479.974	
4.6425	37914	37473	37694	311.8340	
5.571	43829	44049	43939	155.5634	
6.4995	45378	48524	46951	2224.557	
7.428	48051	47872	47962	126.5721	
11.142	48167	49371	48769	851.3565	

ACBP4-NA

medi i iun				
Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung	
9395	9654	9525	183.14065	
14989	14414	14702	406.58639	
20058	18396	19227	1175.2114	
27161	25915	26538	881.05504	
33522	33689	33606	118.08683	
39618	38251	38935	966.61496	
43076	42256	42666	579.82756	
42559	43103	42831	384.66608	
44672	44026	44349	456.79098	
44799	46312	45556	1069.8525	
44947	43895	44421	743.87633	

### e) Myristenyl-CoA (C14:1)

ACBP3-WT					
Liganden Konz. in µM	Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung	
0	17334	19636	18485	1627.759	
0.6565	22727	24471	23599	1233.194	
1.313	30835	27567	29201	2310.824	
1.9695	34512	33926	34219	414.3645	
2.626	41503	42440	41971.5	662.5590	
3.2825	48996	51158	50077	1528.764	
3.939	53223	57319	55271	2896.309	
4.5955	64249	63363	63806	626.4966	
5.252	71070	68212	69641	2020.911	
7.878	74525	70665	72595	2729.432	
13.13	70720	70908	70814	132.9360	

ACBP4-WT				
Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung	
9347	10384	9865.5	733.26973	
17524	14998	16261	1786.1517 29	
22644	21766	22205	620.83975	
29940	30933	30436.5	702.15703	
34769	33971	34370	564.27121	
40324	33826	37075	4594.7798	
44483	40443	42463	2856.7113	
47088	45589	46338.5	1059.9530	
52986	52670	52828	223.44574	
57310	57738	57524	302.64170	
56033	57132	56582.5	777.11035	

#### ACBP3-SE

Liganden Konz. in µM	Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung
0	17172	16652	16912	367.6955
0.32575	19328	19308	19318	14.14213
0.6515	22160	21237	21698.5	652.6595
1.313	26136	26499	26317.5	256.6797
1.9545	32598	31331	31964.5	895.9042
2.606	38009	37169	37589	593.9696
3.2575	42223	38293	40258	2778.929
3.909	52701	48368	50534.5	3063.893
4.5605	52892	50471	51681.5	1711.905
5.212	55832	54666	55249	824.4865
7.818	63929	66068	64998.5	1512.501
13.13	63654	64234	63944	410.1219

#### ACBP4-NA

Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung
18245	16542	17393.5	1204.2028
24560	23111	23835.5	1024.5977
32611	30845	31728	1248.7505
41896	37961	39928.5	2782.4651
44855	43753	44304	779.23167
51958	47628	49793	3061.7723
60670	56172	58421	3180.5663
62519	59304	60911.5	2273.3483
64701	64236	64468.5	328.80465
64728	63820	64273.5	642.05295
64810	63781	64295.5	727.61287
64321	63810	64065.5	361.33156

### f) Palmitoyl-CoA (C16:0)

ACBP3-WT					
Liganden Konz. in µM	Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung	
0	13729	11991	12860	1228.951	
0.73129	17968	22110	20039	2928.836	
1.46258	26105	28119	27112	1424.113	
2.19387	33014	33529	33272	364.1599	
2.92516	44001	45309	44655	924.8956	
3.65645	54571	50051	52311	3196.122	
4.38774	61402	55220	58311	4371.334	
4.753385	62746	58046	60396	3323.401	
5.11903	62689	63404	63047	505.5813	
5.85032	66574	65630	66102	667.5088	
7.3129	70049	68686	69368	963.7865	
14.6258	62784	66185	64485	2404.870	

ACBP4-WT					
Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung		
11937	10122	11029.5	1283.3988		
17075	16135	16605	664.68037		
21118	21348	21233	162.63455		
33664	33467	33565.5	139.30003		
44016	42580	43298	1015.4053		
48228	48281	48254.5	37.476659		
55613	53510	54561.5	1487.0455		
56802	60570	58686	2664.3783		
62827	58741	60784	1444.6191		
61665	60754	61209.5	644.17427		
64254	58995	61624.5	1859.3372		
60448	61466	60957	719.83470		

ACDP3-SE
----------

Liganden			Durch	Standard-
Konz. in	Serie 1	Serie 2	ochnitt	abwei-
μΜ			sciintu	chung
0	12598	13564	13081	683.0651
0.43537	15404	14920	15162	342.2396
0.87075	18585	16396	17490.5	1547.856
1.7415	26740	24321	25530.5	1710.491
2.61225	35757	29682	32719.5	4295.673
3.483	41149	43626	42387.5	1751.503
4.35375	49519	43673	46596	4133.746
5.2245	55772	57026	56399	886.7119
6.09525	66742	63737	65239.5	2124.855
6.966	67190	63633	65411.5	2515.178
10.449	67521	66718	67119.5	567.8067
17.415	64980	67264	66122	1615.031

	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung
)2	11785	11793.5	12.020815
16	19846	19181	940.45201

ACBP4-NA

Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	abwei- chung
11802	11785	11793.5	12.020815
18516	19846	19181	940.45201
25253	25006	25129.5	174.65537
34180	37194	35687	2131.2198
43325	49449	46387	4330.3219
57256	53901	55578.5	2372.3432
60480	56102	58291	3095.7134
61059	58352	59705.5	1914.1380
65086	62389	63737.5	1907.0669
66257	63461	64859	1977.0705
64952	65913	65432.5	679.52961
61265	61312	61288.5	33.234018

## g) Palmitoleyl-CoA (C16:1)

### ACBP3-WT

Liganden Konz. in µM	Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung
0	21779	19023	20401	1948.786
0.61905	23506	26817	25162	2341.230
1.2381	31689	33545	32617	1312.390
1.85715	37993	40797	39395	1982.727
2.166675	44585	46593	45589	1419.870
2.4762	45523	49519	47521	2825.598
2.785725	53218	55421	54320	1557.756
3.09525	56221	57648	56935	1009.041
3.7143	65054	67813	66434	1950.907
4.33335	71915	73060	72488	809.6372
4.9524	78454	76064	77259	1689.985
7.4286	74360	75588	74974	868.3271
12.381	75568	76131	75850	398.1011

ACBP4-WT				
Liganden Konz. in µM	Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung
0	14782	16136	15459	957.4225
0.3095	16864	19170	18017	1630.588
0.619	20494	20380	20437	80.61017
1.238	25400	26037	25719	450.4270
1.857	32576	30278	31427	1624.931
2.476	35190	34593	34892	422.1427
3.095	39108	34871	36990	2996.011
3.714	40820	40691	40756	91.21677
4.333	43924	40741	42333	2250.720
4.952	49026	45695	47361	2355.372
7.428	53853	51763	52808	1477.853
12.38	52522	53899	53211	973.6860

	nebrii	111	
Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung
12945	12836	12891	77.074639
15237	15095	15166	100.40916
18552	18255	18404	210.01071
23334	21559	22447	1255.1145
27368	25127	26248	1584.6262
31432	29431	30432	1414.9206
38101	34725	36413	2387.1924
38276	38400	38338	87.681240
42561	38914	40738	2578.8184
43105	39939	41522	2238.7000
44647	44014	44331	447.59859
43561	44101	43831	381.83766

#### ACBP3-SE

Liganden Konz. in µM	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung
0	11800	11564	11276	11546.7	262.4296
1.34	21321	22189	22326	21945.3	545.0103
2.68	35679	32983	29489	32717	3103.561
3.35	41122	36934	37937	38664.3	2186.686
4.02	43149	40849	41459	41819	1191.511
4.69	54230	50238	47189	50552.3	3531.008
5.36	55154	54887	51100	53713.7	2267.435
6.03	57789	58931	53024	56581.3	3133.210
6.7	60618	58581	59382	59527	1026.211
8.04	65282	63590	62980	63950.7	1192.627
9.38	65954	63997	62764	64238.3	1608.634
13.4	66777	64738	61863	64459.3	2468.823

### h) Stearyl-CoA (C18:0)

#### ACBP3-WT

Liganden Konz. in µM	Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung	
0	14379	14796	14587.5	294.8635	
0.551	16406	18790	17598	1685.742	
1.102	23003	18871	20937	2921.765	
2.204	27729	26554	27141.5	830.8504	
3.306	35935	39144	37539.5	2269.105	
4.408	48797	49842	49319.5	738.9265	
5.51	58105	58704	58404.5	423.5569	
6.612	63336	64705	64020.5	968.0291	
7.714	66766	67915	67340.5	812.4656	
8.816	66210	68001	67105.5	1266.428	
13.224	65725	65279	65502	315.3696	
22.04	63617	67742	65679.5	2916.815	

ACBP4-WT

TTEBT 1 11 T					
Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung		
9803	9826	9814.5	16.263456		
13731	14435	14083	497.80317		
17680	18809	18244.5	798.32356		
27273	27812	27542.5	381.13056		
34127	37029	35578	2052.0239		
39576	44150	41863	3234.3064		
48473	49269	48871	562.857		
55874	56410	56142	379.00923		
55698	57413	56555.5	1212.6881		
57384	56242	56813	807.51594		
56125	56927	56526	567.09964		
55858	56721	56289.5	610.23315		

ACBP3-SE				
Liganden Konz. in µM	Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung
0	17299	16047	16673	885.2976
0.551	18179	19973	19076	1268.549
1.102	21182	22670	21926	1052.174
2.204	27611	30942	29276.5	2355.372
3.306	38683	39015	38849	234.7594
4.408	50083	52610	51346.5	1786.858
5.51	60835	62753	61794	1356.230
6.612	66780	68603	67691.5	1289.055
7.714	67924	68905	68414.5	693.6717
8.816	65868	68704	67286	2005.354
13.224	69066	67083	68074.5	1402.192
22.04	69483	70767	70125	907.9251

ACBP4-NA

$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	ACDI 4-INA					
0102951005610176168.99851.1192605523264246601973.5352.2383582240171379973075.2072.79754620243018446102251.4283.3575103347590493122434.5683.91655379351093524431909.1884.476563945553055962610.94025.0355588235790158362651.95245.5956201760556612871033.0836.714656816488065281566.39257.833666966610666401417.19313.428651276422964678634.9818	Liganden Konz. in µM	Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung	
1.1192605523264246601973.5352.2383582240171379973075.2072.79754620243018446102251.4283.3575103347590493122434.5683.91655379351093524431909.1884.476563945553055962610.94025.0355588235790158362651.95245.5956201760556612871033.0836.714656816488065281566.39257.833666966610666401417.19313.428651276422964678634.9818	0	10295	10056	10176	168.9985	
2.2383582240171379973075.2072.79754620243018446102251.4283.3575103347590493122434.5683.91655379351093524431909.1884.476563945553055962610.94025.0355588235790158362651.95245.5956201760556612871033.0836.714656816488065281566.39257.833666966610666401417.19313.428651276422964678634.9818	1.119	26055	23264	24660	1973.535	
2.79754620243018446102251.4283.3575103347590493122434.5683.91655379351093524431909.1884.476563945553055962610.94025.0355588235790158362651.95245.5956201760556612871033.0836.714656816488065281566.39257.833666966610666401417.19313.428651276422964678634.9818	2.238	35822	40171	37997	3075.207	
3.3575103347590493122434.5683.91655379351093524431909.1884.476563945553055962610.94025.0355588235790158362651.95245.5956201760556612871033.0836.714656816488065281566.39257.833666966610666401417.19313.428651276422964678634.9818	2.7975	46202	43018	44610	2251.428	
3.91655379351093524431909.1884.476563945553055962610.94025.0355588235790158362651.95245.5956201760556612871033.0836.714656816488065281566.39257.833666966610666401417.19313.428651276422964678634.9818	3.357	51033	47590	49312	2434.568	
4.476563945553055962610.94025.0355588235790158362651.95245.5956201760556612871033.0836.714656816488065281566.39257.833666966610666401417.19313.428651276422964678634.9818	3.9165	53793	51093	52443	1909.188	
5.0355588235790158362651.95245.5956201760556612871033.0836.714656816488065281566.39257.833666966610666401417.19313.428651276422964678634.9818	4.476	56394	55530	55962	610.9402	
5.5956201760556612871033.0836.714656816488065281566.39257.833666966610666401417.19313.428651276422964678634.9818	5.0355	58823	57901	58362	651.9524	
6.714656816488065281566.39257.833666966610666401417.19313.428651276422964678634.9818	5.595	62017	60556	61287	1033.083	
7.833666966610666401417.19313.428651276422964678634.9818	6.714	65681	64880	65281	566.3925	
13.428 65127 64229 64678 634.9818	7.833	66696	66106	66401	417.193	
	13.428	65127	64229	64678	634.9818	

### i) Oleyl-CoA (C18:1)

#### ACBP3-WT

Liganden Konz. in µM	Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung
0	17374	17120	17247	179.6051
0.48125	20035	20156	20095.5	85.55992
0.9625	24683	22966	23824.5	1214.102
1.925	28348	33865	31106.5	1950.554
2.8875	38216	34421	36318.5	2683.470
3.85	40304	47292	43798	2470.631
4.8125	61490	55671	58580.5	2057.327
5.775	68151	58857	63504	3285.925
6.7375	72780	71107	71943.5	1182.989
7.7	71027	69852	70439.5	830.8504
11.55	72350	69292	70821	2162.332
19.25	67981	66723	67352	889.5403

ACBP4-WT					
Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung		
17188	19354	18271	1531.5933		
24486	23635	24060.5	601.74787		
30475	27752	29113.5	1925.4518		
42326	32753	37539.5	3384.5666		
51265	53088	52176.5	1289.0557		
61846	59209	60527.5	932.32029		
68880	71776	70328	1023.8906		
73593	69993	71793	1272.7922		
71264	75114	73189	2722.3611		
74171	76067	75119	1340.6745		
77329	76331	76830	705.69257		
69976	74008	71992	2851.0545		

#### ACBP3-SE

	-			
Liganden Konz. in µM	Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung
0	18173	13649	15911	3198.951
0.48125	17325	21974	19649.5	3287.339
0.9625	24837	22185	23511	1875.247
1.925	28107	31751	29929	1288.348
2.8875	39094	35685	37389.5	2410.527
3.85	40572	47903	44237.5	2591.899
4.8125	50629	48093	49361	896.6114
5.775	57958	53824	55891	1461.589
6.7375	61096	63055	62075.5	1385.222
7.7	66364	71523	68943.5	3647.963
11.55	72309	71740	72024.5	402.3437
19.25	72659	70093	71376	1814.436

#### ACBP4-NA

Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung
14126	13142	13634	695.79307
15548	17205	16376.5	1171.6759
20454	19097	19775.5	959.5439
26925	28854	27889.5	682.00449
36812	35120	35966	1196.4247
42766	45895	44330.5	1106.2686
54891	50309	52600	1619.9816
62446	57236	59841	1842.0132
62358	60336	61347	1429.7699
64389	66912	65650.5	1784.0304
62370	63588	62979	861.25606
64009	61364	62686.5	1870.2974
## j) Linoleyl-CoA (18:2)

ACBP3-WT				ACBP4-WT					
Liganden Konz. in µM	Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung		Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung
0	20004	20351	20177.5	245.3660		18249	17856	18052.5	277.89297
1.3605	24491	24621	24556	91.92388		24037	24979	24508	666.09459
2.721	28429	29320	28874.5	630.0321		32119	30488	31303.5	1153.2912
3.2652	29909	31933	30921	715.5920		36259	34334	35296.5	680.59028
4.0815	34600	37914	36257	2343.351		38520	38062	38291	323.85491
4.8978	36667	39301	37984	931.2596		43398	41693	42545.5	602.80853
5.442	43565	41908	42736.5	585.8379		45500	52626	49063	2519.4215
6.8025	47267	51345	49306	1441.790		54341	55697	55019	479.4184
8.163	54668	51687	53177.5	2107.885		66933	66714	66823.5	154.85639
9.5235	62754	61273	62013.5	1047.225		65643	65889	65766	173.94827
10.884	62745	62825	62785	56.56854		65887	66780	66333.5	631.44636
16.326	61601	62125	61863	370.5239		65110	64018	64564	772.16061
	AC	BP3-SE					ACBP4-N	JA	
Liganden Konz. in µM	AC Serie 1	BP3-SE Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung		Serie 1	ACBP4-N Serie 2	JA Durch- schnitt	Standard- abwei- chung
Liganden Konz. in µM 0	AC Serie 1 17610	BP3-SE Serie 2 19662	Durch- schnitt 18636	Standard- abwei- chung 1450.983		Serie 1 16406	ACBP4-N Serie 2 16227	JA Durch- schnitt 16316.5	Standard- abwei- chung 126.57211
Liganden Konz. in µM 0 0.52375	AC Serie 1 17610 23872	BP3-SE Serie 2 19662 20294	Durch- schnitt 18636 22083	Standard- abwei- chung 1450.983 2530.028		Serie 1 16406 21381	ACBP4-N Serie 2 16227 22152	JA Durch- schnitt 16316.5 21766.5	Standard- abwei- chung 126.57211 545.17933
Liganden Konz. in µM 0.52375 1.0475	AC Serie 1 17610 23872 23139	BP3-SE Serie 2 19662 20294 27744	Durch- schnitt 18636 22083 25441.5	Standard- abwei- chung 1450.983 2530.028 3256.226		Serie 1 16406 21381 30097	ACBP4-N Serie 2 16227 22152 24032	Durch- schnitt 16316.5 21766.5 27064.5	Standard- abwei- chung 126.57211 545.17933 4288.6026
Liganden Konz. in µM 0 0.52375 1.0475 2.095	AC Serie 1 17610 23872 23139 35861	BP3-SE Serie 2 19662 20294 27744 34218	Durch- schnitt 18636 22083 25441.5 35039.5	Standard- abwei- chung 1450.983 2530.028 3256.226 580.8882		Serie 1 16406 21381 30097 38162	ACBP4-N Serie 2 16227 22152 24032 29717	JA Durch- schnitt 16316.5 21766.5 27064.5 33939.5	Standard- abwei- chung 126.57211 545.17933 4288.6026 2985.7584
Liganden Konz. in µM 0.52375 1.0475 2.095 3.1425	AC Serie 1 17610 23872 23139 35861 39343	BP3-SE Serie 2 19662 20294 27744 34218 41049	Durch- schnitt 18636 22083 25441.5 35039.5 40196	Standard- abwei- chung 1450.983 2530.028 3256.226 580.8882 1206.324		Serie 1 16406 21381 30097 38162 44906	ACBP4-N Serie 2 16227 22152 24032 29717 42632	Durch- schnitt 16316.5 21766.5 27064.5 33939.5 43769	Standard- abwei- chung 126.57211 545.17933 4288.6026 2985.7584 1607.9608
Liganden Konz. in µM 0.52375 1.0475 2.095 3.1425 4.19	AC Serie 1 17610 23872 23139 35861 39343 46711	BP3-SE Serie 2 19662 20294 27744 34218 41049 56476	Durch- schnitt 18636 22083 25441.5 35039.5 40196 51593.5	Standard- abwei- chung 1450.983 2530.028 3256.226 580.8882 1206.324 3452.448		Serie 1 16406 21381 30097 38162 44906 47955	ACBP4-N Serie 2 16227 22152 24032 29717 42632 46237	A Durch- schnitt 16316.5 21766.5 27064.5 33939.5 43769 47096	Standard- abwei- chung 126.57211 545.17933 4288.6026 2985.7584 1607.9608 607.40473
Liganden Konz. in µM 0 0.52375 1.0475 2.095 3.1425 4.19 5.2375	AC Serie 1 17610 23872 23139 35861 39343 46711 52858	BP3-SE Serie 2 19662 20294 27744 34218 41049 56476 57060	Durch- schnitt 18636 22083 25441.5 35039.5 40196 51593.5 54959	Standard- abwei- chung 1450.983 2530.028 3256.226 580.8882 1206.324 3452.448 1485.631		Serie 1 16406 21381 30097 38162 44906 47955 48583	ACBP4-N Serie 2 16227 22152 24032 29717 42632 46237 51267	A Durch- schnitt 16316.5 21766.5 27064.5 33939.5 43769 47096 49925	Standard- abwei- chung 126.57211 545.17933 4288.6026 2985.7584 1607.9608 607.40473 948.9373
Liganden Konz. in µM 0 0.52375 1.0475 2.095 3.1425 4.19 5.2375 6.285	AC Serie 1 17610 23872 23139 35861 39343 46711 52858 57710	BP3-SE Serie 2 19662 20294 27744 34218 41049 56476 57060 57033	Durch- schnitt 18636 22083 25441.5 35039.5 40196 51593.5 54959 57371.5	Standard- abwei- chung 1450.983 2530.028 3256.226 580.8882 1206.324 3452.448 1485.631 239.3556		Serie 1 16406 21381 30097 38162 44906 47955 48583 52960	ACBP4-N Serie 2 16227 22152 24032 29717 42632 46237 51267 55353	A Durch- schnitt 16316.5 21766.5 27064.5 33939.5 43769 47096 49925 54156.5	Standard- abwei- chung 126.57211 545.17933 4288.6026 2985.7584 1607.9608 607.40473 948.9373 846.05326
Liganden Konz. in µM 0.52375 1.0475 2.095 3.1425 4.19 5.2375 6.285 7.3325	AC Serie 1 17610 23872 23139 35861 39343 46711 52858 57710 56609	BP3-SE Serie 2 19662 20294 27744 34218 41049 56476 57060 57033 59664	Durch- schnitt 18636 22083 25441.5 35039.5 40196 51593.5 54959 57371.5 58136.5	Standard- abwei- chung 1450.983 2530.028 3256.226 580.8882 1206.324 3452.448 1485.631 239.3556 2160.211		Serie 1 16406 21381 30097 38162 44906 47955 48583 52960 53469	ACBP4-N Serie 2 16227 22152 24032 29717 42632 46237 51267 55353 53822	A Durch- schnitt 16316.5 21766.5 27064.5 33939.5 43769 47096 49925 54156.5 53645.5	Standard- abwei- chung 126.57211 545.17933 4288.6026 2985.7584 1607.9608 607.40473 948.9373 846.05326 249.60869
Liganden Konz. in µM 0.52375 1.0475 2.095 3.1425 4.19 5.2375 6.285 7.3325 8.38	AC Serie 1 17610 23872 23139 35861 39343 46711 52858 57710 56609 58412	BP3-SE Serie 2 19662 20294 27744 34218 41049 56476 57060 57033 59664 56429	Durch- schnitt 18636 22083 25441.5 35039.5 40196 51593.5 54959 57371.5 58136.5 57420.5	Standard- abwei- chung 1450.983 2530.028 3256.226 580.8882 1206.324 3452.448 1485.631 239.3556 2160.211 1402.192		Serie 1 16406 21381 30097 38162 44906 47955 48583 52960 53469 53469	ACBP4-N Serie 2 16227 22152 24032 29717 42632 46237 51267 55353 53822 49421	A Durch- schnitt 16316.5 21766.5 27064.5 33939.5 43769 47096 47096 49925 54156.5 53645.5 51445	Standard- abwei- chung 126.57211 545.17933 4288.6026 2985.7584 1607.9608 607.40473 948.9373 846.05326 249.60869 2862.3683
Liganden Konz. in µM 0 0.52375 1.0475 2.095 3.1425 4.19 5.2375 6.285 7.3325 8.38 12.57	AC Serie 1 17610 23872 23139 35861 39343 46711 52858 57710 56609 58412 57462	BP3-SE Serie 2 19662 20294 27744 34218 41049 56476 57060 57033 59664 56429 56934	Durch- schnitt 18636 22083 25441.5 35039.5 40196 51593.5 54959 57371.5 58136.5 57420.5 57198	Standard- abwei- chung 1450.983 2530.028 3256.226 580.8882 1206.324 3452.448 1485.631 239.3556 2160.211 1402.192 373.3523		Serie 1 16406 21381 30097 38162 44906 47955 48583 52960 53469 53469 51738	ACBP4-N Serie 2 16227 22152 24032 29717 42632 46237 51267 55353 53822 49421 54940	A Durch- schnitt 16316.5 21766.5 27064.5 33939.5 43769 47096 49925 54156.5 53645.5 53645.5 51445 53339	Standard- abwei- chung 126.57211 545.17933 4288.6026 2985.7584 1607.9608 607.40473 948.9373 846.05326 249.60869 2862.3683 2264.1559

### 4. Meßwerte zur Bestimmung der Einzelmutanten

Die aus diesen Meßwerten ermittelten  $k_D$ -Werte sind in C.6.1.5. Tab. C.6. aufgeführt.

### a) Palmitoyl-CoA (C16:0)

	лс	JI J-5			
Liganden Konz. in µM	Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung	
0	12751	11287	12019	1035.204	
0.43537	15803	14724	15264	762.9682	
0.87075	19240	17876	18558	964.4936	
1.7415	29293	25269	27281	2845.397	
2.61225	37901	38696	38299	562.1498	
3.483	47484	44651	46068	2003.233	
4.35375	56809	54343	55576	1743.725	
5.2245	61892	59410	60651	1755.039	
6.09525	60517	64704	62611	2960.656	

ACBP3-S	
ACDI J-5	

ACBP3-E						
Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung			
10221	12701	11461	1753.6248			
15125	14872	14999	178.89802			
17558	19260	18409	1203.4957			
27212	26986	27099	159.80613			
36916	35704	36310	857.01342			
40427	39888	40158	381.13056			
48501	49671	49086	827.31493			
60990	63883	62437	2045.6599			
64075	62444	63260	1153.2912			

	6.966	63368	65265	64317	1341.381
ĺ	10.449	65816	62105	63961	2624.073
ſ	17.415	63546	64762	64154	859.8418

64026	64461	64244	307.59145
60573	64936	62755	3085.1069
63331	58467	60899	3439.3674

ACBP4-N						
Liganden Konz. in µM	Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung		
0	10221	10884	10552.5	468.8118		
0.40136	12234	14278	13256	1445.326		
0.80272	15611	16015	15813	285.6711		
1.60544	21111	23518	22314.5	1702.006		
2.40816	23311	26031	24671	1923.330		
3.21088	28595	29442	29018.5	598.9194		
4.0136	29890	30147	30018.5	181.7264		
4.8163	32191	34633	33412	1726.754		
5.61905	33451	35174	34312.5	609.1724		
6.42177	33765	35859	34812	1480.681		
9.63265	34561	35641	35101	381.8376		

ACBP4-A					
Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung		
10938	9705	10321.5	871.86266		
12485	13208	12846.5	511.2382		
15262	15143	15202.5	84.145707		
19659	23404	21531.5	2648.1149		
24923	23236	24079.5	1192.8891		
28595	27769	28182	584.0702		
30050	29839	29944.5	149.19953		
31867	33694	32780.5	1291.8841		
34736	31822	33279	1030.2546		
32485	34461	33473	1397.243		
32839	35620	34229.5	983.23198		

## b) Stearyl-CoA (C18:0)

ACBP3-S						
Liganden Konz. in µM	Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung		
0	14498	13397	13947.5	778.5245		
0.551	16232	16592	16412	254.5584		
1.102	19012	18966	18989	32.52691		
2.204	23961	25933	24947	1394.414		
3.306	31911	35920	33915.5	2834.791		
4.408	41027	41650	41338.5	440.5275		
5.51	51701	52443	52072	524.6732		
6.612	63194	64032	63613	592.5554		
7.714	65626	66737	66181.5	785.5956		
8.816	63031	66481	64756	2439.518		
13.224	64137	64668	64402.5	375.4737		
22.04	65469	63646	64557.5	1289.055		

Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung
12785	12517	12651	189.50462
16098	14668	15383	1011.1627
18749	18363	18556	272.94322
28155	23810	25982.5	3072.379
33693	35659	34676	1390.1719
45358	45731	45544.5	263.75083
53088	57509	55298.5	3126.1191
66657	65176	65916.5	1047.2251
67346	67941	67643.5	420.72853
65850	65244	65547	428.50671
64101	60693	62397	2409.8199
64572	62381	63476.5	1549.271

#### ACBP4-N

Liganden			D 1	Standard-
Konz. in	Serie 1	Serie 2	Durch-	abwei-
μΜ			schnitt	chung
0	16159	16531	16345	263.0437
0.551	20786	24126	22456	2361.736
1.102	26908	30216	28562	2339.109
2.204	39089	40885	39987	1269.963
3.306	49119	50927	50023	1278.449
4.408	57837	58653	58245	576.9991
5.51	62710	63538	63124	585.4844
6.612	70824	68916	70824	1349.159
7.714	73081	74369	73725	910.7535
8.816	74531	73709	74531	581.2417
13.224	73762	74756	74259	702.8641
22.04	73803	74817	74310	717.0062

ACBP4-A			
Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung
17159	18556	17858	987.82817
24069	23646	23858	299.10617
28328	31557	29943	2283.2478
42797	40383	41590	1706.9558
50636	52773	51705	1511.0872
61527	57932	59730	2542.0489
65302	63949	64626	956.71547
71178	68987	70083	1549.271
74033	73534	73784	352.84628
74776	73518	74147	889.54033
74382	74136	74259	173.94827
74650	73970	74310	480.83261

# c) Oleyl-CoA (C18:1)

ACBP3-S				
Liganden Konz. in µM	Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung
0	15265	12844	14054.5	1711.905
0.48125	17524	18175	17849.5	460.3265
0.9625	21678	22067	21872.5	275.0645
1.925	28402	31700	30051	1166.019
2.8875	39844	37508	38676	1651.801
3.85	47372	48057	47714.5	242.1840
4.8125	58675	55108	56891.5	1261.124
5.775	58794	66342	62568	2668.621
6.7375	66970	68206	67588	873.9839
7.7	65712	63348	64530	1671.600
11.55	65306	63795	64550.5	1068.438
19.25	60586	63886	62236	2333.452

	ACBP3-E	3	
Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung
17185	18144	17664.5	678.1154
22468	19528	20998	2078.8939
25403	24603	25003	565.68542
33217	29425	31321	1340.6745
37382	38906	38144	1077.6307
48805	46165	47485	933.38095
58823	52292	55557.5	2309.0572
67650	61719	64684.5	2096.9252
73016	70397	71706.5	1851.9127
74537	71210	72873.5	2352.5443
66332	68630	67481	1624.9314
67241	68358	67799.5	789.83827

ACBP4-N

ACBP4-A

Liganden Konz. in µM	Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung
0	15098	16188	15643	770.7463
0.48125	21270	19578	20424	1196.424
0.9625	24860	24852	24856	5.656854
1.925	34992	36246	35619	443.3559
2.8875	41149	44593	42871	2435.275
3.85	54601	52745	53673	656.1950
4.8125	61877	58305	60091	1262.892
5.775	65266	64508	64887	267.9934
6.7375	70987	68538	69762.5	1731.704
7.7	67552	70400	68976	2013.840
11.55	67781	68003	67892	156.9777
19.25	67690	67394	67542	209 3036

Serie 1	Serie 2	Durch- schnitt	Standard- abwei- chung
15589	16511	16050	651.95245
22023	20443	21233	1117.2287
25860	25718	25789	100.40916
37242	35073	36157.5	766.8573
45049	42855	43952	1551.3923
58361	51285	54823	2501.7438
61383	62369	61876	348.60364
68731	63193	65962	1957.9787
71993	67670	69831.5	3056.8226
66909	72295	69602	3808.4771
65793	66837	66315	738.21948
66170	65204	65687	683.06515

#### Danksagung

Die in dieser Arbeit vorgestellten Arbeiten wurden hauptsächlich im Institut für Pharmazeutische Biologie, Fachbereich Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt, während die Untersuchungen zur Etablierung des Biosensor-Tests in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe *Prof. Knudsens* im Molekularbiologischen Institut der Universität Süddänemarks, Odense, stattfanden.

Mein Dank gilt daher allen Mitarbeitern beider Institute, die maßgeblichen Anteil am Zustandekommen dieser Arbeit hatten. *Prof. Dr. Beate Diettrich* und *Prof. Dr. Martin Luckner* danke ich dabei für die Überlassung des Themas und die guten Arbeitsbedingungen am Institut. Besonderer Dank gebührt ihnen für die Förderung und finanzielle Unterstützung meines Arbeitsaufenhaltes in Dänemark, wozu auch die Gesellschaft "*Freunde der Pharmazie*" dankenswerterweise beigetragen hat.

*Dr. Frieder Müller-Uri* gilt mein Dank für seine ständige Diskussionsbereitschaft, fachliche Unterstützung, Ideen und Anregungen und vor allem für seine unermüdlichen Bemühungen im "Kampf" um die ideale Laborausstattung sowie für seine konstruktive Kritik und das kritische Lesen der hier vorliegenden Arbeit.

*Dr. Bettina Rahfeld* möchte ich für ihre ideenreichen Anstrengungen danken, die die Durchführung und Betreuung der verschiedenen Praktika erleichterten und sie von ungeliebter Pflicht zu interessanter "Kür" werden ließen.

Des weiteren möchte ich besonders *Dr. Martin Metzner* für die vielen fachlichen Diskussionen und seine Erkenntnisse zu ACBPs in *Digitalis*, die den Ausgangspunkt dieser Arbeit darstellten, danken.

Mein Dank geht auch an *Dr. Angela Peterson* für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung zahlloser DNA-Sequenzierungen sowie die Bereitstellung von cDNAund genomischen Banken.

*Dr. Peter Rücknagel* von der Max-Planck-Arbeitsgruppe "Enzymologie der Proteinfaltung" danke ich für die Durchführung der Proteinsequenzierungen und der dazu nötigen HPLC-Läufe, wobei die zugehörigen Massenspektren dankenswerterweise von *Dr. Angelika Schierhorn* aufgenommen wurden.

Für die technische Unterstützung und die Hilfe bei tausend kleinen Dingen des Laboralltags möchte ich mich vor allem bei *Frau Beate Schöne* bedanken, während mein Dank für die Zusammenarbeit bei der Handhabung von PEMs-Kulturen und Embryogenesestadien des Stammes VIII von *Digitalis lanata* EHRH. an *Frau D. Watzka* und *Frau K. Ostrecha* geht.

Mein besonderer persönlicher Dank geht an *Stefan Strauss* für die Aufheiterung grauer Labortage sowie das kritische Lesen dieser Arbeit, des weiteren an *Carola Thöringer, Dr. Hannes Framm* und alle Mitarbeiter, die ich aus Versehen nicht erwähnt habe, für die großartige Arbeitsathmosphäre und gute Zusammenarbeit im Institut – in und auch außerhalb der Arbeitszeiten!

Im Zusammenhang mit meinem Arbeitsaufenthalt an der Universität Odense, Dänemark, möchte ich vor allem *Prof. Jens Knudsen* für die fruchtbare Zusammenarbeit bei der Ausarbeitung der Mutations-Untersuchungen und für die äußerst inspirierende Arbeit an der Etablierung des Biosensor-Tests danken.

Für die Unterstützung bei der Ausarbeitung der mathematischen Grundlagen sowie der praktischen Durchführung des Tests habe ich vor allem *Jens Villadsen* zu danken. Die MALDI-TOF-Untersuchungen der mutierten Proteine wurden freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von *Prof. Peter Højrup*, Universität Odense, durchgeführt. Auch allen anderen Mitarbeitern der Lipid-Arbeitsgruppe um *Prof. J. Knudsen* gilt mein Dank für die sehr freundliche Aufnahme und gute Zusammenarbeit, *mange tak*!!

Für die Erstellung der 3D-Modelle der *Digitalis*-ACBPs danke ich *Prof. Birthe Kragelund* vom Molekularbiologischen Institut der Universität Kopenhagen, Dänemark.

Nicht zuletzt möchte ich auch meinen Eltern für ihre Geduld und Unterstützung während meiner "Halleschen Jahre" danken!

# Lebenslauf

## Personenangaben:

Name:	Gruner		
Vorname:	Birgit		
Geburtsdatum:	03.11.1971		
Geburtsort:	Lauchhammer		
Familienstand:	ledig		
Schulische Ausbildung:			
1978 – 1988	Polytechnische Oberschule Schwarzheide (Brandenburg)		
1988 – 1990	Erweiterte Polytechnische Oberschule Senftenberg (Brandenburg), Abitur		
Berufliche Ausbildung:			
1990 – 1991	einjähriges Vorbereitungspraktikum in der Apotheke Annahütte sowie der Adler-Apotheke Senftenberg		
1991 – 1995	Pharmazie-Studium an der Martin-Luther-Universität Halle		
1995 – 1996	Diplom im Institut für Pharmazeutische Biologie, Martin-Luther-Universität Halle, Abschluß als Diplom- Pharmazeut		
1996	halbjähriges Praktikum im Rahmen des Praktischen Jahres in der Apotheke am Franckeplatz, Halle		
1996	Approbation als Apotheker		
1997 – 2000	Tätigkeit als Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Biologie der Martin-Luther- Universität Halle		
2001	halbjähriger Arbeitsaufenthalt am Biochemischen und Molekularbiologischen Institut der Universität Süddänemarks, Odense		
bis Mai 2002	zeitweilige Beschäftigung als freier Mitarbeiter am Marineinstitut Plymouth, Großbritannien		
seit Juni 2002	Beschäftigung in der Praxisapotheke Irnham Lodge, Minehead, Großbritannien		

### Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter der Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt habe, wobei die aus anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet wurden.

Halle / Saale, den 17. Oktober 2002

(Birgit Gruner)