

**Untersuchungen an drei Vertretern der
vertebrate-type Ferredoxine aus
Arabidopsis thaliana (L.) HEYNH.
und
Digitalis lanata EHRH.**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Stefan Strauss
geb. am 29.05.1972 in Heiligenstadt

Gutachter:

1. Prof. Dr. Martin Luckner
2. Prof. Dr. Birgit Dräger
3. Prof. Dr. Wolfgang Kreis

Halle (Saale), 5. März 2004

urn:nbn:de:gbv:3-000006623

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006623>]

TLP 7
L. W.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Seitenkettenspaltung bei Sterolen in <i>Digitalis</i>	2
1.2	Das seitenkettenspaltende Enzym im tierischen System	4
1.3	Ferredoxine	5
1.3.1	Ferredoxine, Elektronenüberträger mit vielfältigen Variationen	6
1.3.2	Adrenodoxin, das Ferredoxin der Nebennierenrinde	8
1.4	Das Hefe-Two-Hybrid-System	11
1.5	Aufgabenstellungen	13
2	Materialien und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1	Pflanzenmaterial	14
2.1.2	cDNA-Banken und Sequenzmaterial	14
2.1.3	Bakterien- und Hefestämme	15
2.1.4	Häufig verwendete Lösungen und Puffer	15
2.1.4.1	Wasser	15
2.1.4.2	Nährmedien	16
2.1.4.3	Puffer	17
2.1.4.4	Lösungen	19
2.1.5	Plasmide	19
2.1.5.1	Leerplasmide	19
2.1.5.2	Sonstige Plasmide	19
2.1.6	Primer	21
2.1.7	Chemikalien, Enzyme etc.	23
2.1.7.1	Feinchemikalien	23
2.1.7.2	Enzyme	23
2.1.7.3	Kits	24
2.1.7.4	Verbrauchsmaterial	24
2.1.8	Geräte	24
2.2	Molekularbiologische Methoden	26
2.2.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	26
2.2.1.1	Photometrische Bestimmung	26

2.2.1.2	Ethidiumbromid-Plate-Assay	26
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion	27
2.2.2.1	Standard-PCR	27
2.2.2.2	RT-PCR	27
2.2.2.3	Colony-PCR	28
2.2.2.4	Mutagenese	28
2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	28
2.2.3.1	Elektrophorese von DNA	28
2.2.3.2	Elektrophorese von RNA	29
2.2.4	Northern Blot	29
2.2.4.1	Blotten und Fixieren	29
2.2.4.2	Herstellung der Sonde	30
2.2.4.3	Hybridisierung und Nachweis	30
2.2.5	Gelextraktion	30
2.2.6	Präparation von Plasmid-DNA	31
2.2.6.1	Mini-Präparation	31
2.2.6.2	Midi-Präparation	31
2.2.7	Sequenzierung von DNA	31
2.2.8	Restriktionsverdau der Plasmide	31
2.2.9	Klonierung von DNA-Fragmenten	31
2.2.9.1	TOPO TA Cloning [®] -Kit	31
2.2.9.2	PCR-Script [™] Amp Cloning Kit	32
2.2.9.3	Klonierung in Expressionsplasmide	32
2.2.10	Transformation von Bakterien und Hefe	32
2.2.10.1	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	32
2.2.10.2	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
2.2.11	Herstellung kompetenter Zellen	34
2.2.11.1	Kompetente <i>Escherichia-coli</i> -Zellen	34
2.2.11.2	Kompetente <i>Saccharomyces-cerevisiae</i> -Zellen	34
2.2.12	RNA-Extraktion	35
2.2.12.1	Extraktion der Gesamt-RNA	35
2.2.12.2	Aufreinigung der mRNA	36
2.2.13	Synthese der HybriZAP [®] -2.1 Two-Hybrid-cDNA-Bank	36
2.2.13.1	cDNA-Synthese	36

2.2.13.2	Ligation der cDNA in den HybriZAP [®] -2.1 Vektor und Verpackung der Phagenpartikel	36
2.2.13.3	Amplifikation der cDNA-Bank	37
2.2.14	Exzision von λ -Banken	37
2.2.14.1	Massenexzision	37
2.2.14.2	Exzision einzelner Phagen	38
2.2.15	Titerbestimmung von cDNA-Banken	38
2.2.15.1	Titerbestimmung der λ -Banken	38
2.2.15.2	Titerbestimmung der exzidierten Bank	38
2.2.16	Two-Hybrid-Screening der cDNA-Bank	39
2.2.16.1	Überprüfung von pBD-Adx128 auf Transaktivierung	39
2.2.17	Radioaktives Screening der cDNA-Bank (WERLE 1995)	40
2.2.17.1	Ausplattieren der Bank	40
2.2.17.2	Transfer der Klone auf die Filter	40
2.2.17.3	Templates zur Herstellung der Sonden	41
2.2.17.4	Markierung der Sonden	41
2.2.17.5	Hybridisierung und Detektion der Signale	41
2.2.17.6	Sekundärscreening	42
2.3	Proteinbiochemische Methoden	42
2.3.1	Proteinexpression	42
2.3.2	Proteinreinigung	43
2.3.2.1	Aufschluß der Zellen	43
2.3.2.2	Säulenchromatographische Reinigung	43
2.3.3	Proteingele und Western Blotting	45
2.3.3.1	SDS-PAGE	45
2.3.3.2	Western Blot	46
2.3.3.3	Isoelektrische Fokussierung	47
2.3.4	Bestimmung des Redoxpotentials	47
2.3.5	SCC-Test	47
2.4	Spektroskopische Methoden	48
2.4.1	UV-Vis-Spektroskopie	48
2.4.2	CD-Spektroskopie und Thermische Denaturierung	48
2.4.3	Elektronenspinresonanz -Spektroskopie	49
2.5	Analysen <i>in silico</i>	49
2.5.1	Homologiesuche	49

2.5.2	Homologievergleich	49
2.5.3	Berechnung von Proteinmassen und isoelektrischen Punkten	49
2.5.4	Überprüfung auf Signal- und Targeting-Peptide	50
2.5.5	Modellberechnungen	50
2.5.6	Evaluierung des Modells	51
3	Ergebnisse	52
3.1	Two-Hybrid-Screening	52
3.1.1	Synthese der HybriZAP [®] -2.1 Two-Hybrid-cDNA-Bank	52
3.1.1.1	RNA-Extraktion und mRNA-Reinigung	52
3.1.1.2	cDNA-Synthese	52
3.1.1.3	Herstellung der Primärbank und Bestimmung des Titers	52
3.1.1.4	Amplifikation der HybriZAP [®] -2.1-Bank	53
3.1.1.5	Massenexzision der gesamten cDNA-Bank	53
3.1.2	Konstruktion des <i>bait</i> -Vektors	53
3.1.2.1	Amplifikation von Adx128 und Adx108	53
3.1.2.2	Klonierung der Fragmente in den <i>bait</i> -Vektor pBD-GAL4 Cam	53
3.1.3	Durchführung des Screens	54
3.1.3.1	Transformation der Hefe mit dem <i>bait</i> -Vektor	54
3.1.3.2	Filter-Lift-Assay	54
3.1.4	Überprüfung der HybriZAP [®] -2.1 Two-Hybrid-cDNA-Bank durch PCR	54
3.2	Screening der Blatt-cDNA-Bank aus <i>Digitalis lanata</i>	55
3.2.1	Ausplattieren der Bank	55
3.2.2	cDNA-Sequenz von CYP11A1 aus <i>Bos taurus</i> als Sonde	55
3.2.3	cpd als Sonde	56
3.3	Untersuchung der <i>vertebrate-type</i> Ferredoxine aus <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Digitalis lanata</i>	56
3.3.1	Die Sequenzen der <i>vertebrate-type</i> Ferredoxine aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	56
3.3.1.1	PCR-Amplifikation aus einer cDNA-Bank	56
3.3.2	Screening einer cDNA-Bank nach Sequenzen von <i>vertebrate-type</i> Ferredoxinen aus <i>Digitalis lanata</i>	57
3.3.2.1	Gewinnung der Sonde	57
3.3.2.2	Screening der cDNA-Bank (WERLE 1995)	57
3.3.2.3	Sequenz des <i>vertebrate-type</i> Ferredoxins aus <i>Digitalis lanata</i>	57

3.3.2.4	Organspezifische Expression des Adrenodoxin homologen aus <i>Digitalis lanata</i>	59
3.3.3	Mutagenese	59
3.3.4	Konstruktion von Expressionsvektoren der pflanzlichen <i>vertebrate-type</i> Ferredoxine	60
3.3.4.1	Klonierung der Sequenzen in verschiedene Vektoren	60
3.3.5	Expression der Ferredoxine	60
3.3.6	Reinigung der Ferredoxine	61
3.3.7	Charakterisierung von ADXHOM1ATH und ADXHOM2ATH	61
3.3.7.1	SDS-PAGE und isoelektrische Fokussierung	61
3.3.7.2	UV-Vis-Spektren	62
3.3.7.3	CD-Spektren	64
3.3.7.4	Thermische Denaturierung	65
3.3.7.5	EPR-Spektren	67
3.3.7.6	Redoxpotential	67
3.3.7.7	SCC-Assay	68
3.4	Analysen <i>in silico</i>	68
3.4.1	Vergleich der Sequenzen mit bovinem Adx	68
3.4.2	Einordnung der Sequenzen in verwandtschaftliche Verhältnisse	71
3.4.3	Proteinmassen und isoelektrische Punkte	72
3.4.4	Überprüfung auf Signal- und Targeting-Peptide	72
3.4.5	Evaluierung des Modells von ADXHOMDLA	73
3.4.5.1	Procheck	73
3.4.5.2	Prosa II	75
3.4.5.3	WHAT IF	75
3.4.6	Ergebnisse der Modellberechnungen	77
3.4.6.1	Modell des Adrenodoxin homologen aus <i>Digitalis lanata</i>	77
3.4.6.2	Elektrostatisches Potential auf der Oberfläche	78
3.4.6.3	Hydrophobizität der Oberfläche	79
3.4.6.4	Ausgewählte Wechselwirkungen	80
4	Diskussion	81
4.1	Two-Hybrid-Screening	81
4.2	Radioaktives Screening	84
4.3	Die pflanzlichen <i>vertebrate-type</i> Ferredoxine	84

4.3.1	Expression der pflanzlichen <i>vertebrate-type</i> Ferredoxine	85
4.3.2	Biochemische und biophysikalische Eigenschaften	86
4.3.2.1	SDS-PAGE und IEF	86
4.3.2.2	Spektren der Proteine	87
4.3.2.3	Redoxpotential	88
4.3.2.4	SCC-Assay	88
4.4	Analysen <i>in silico</i>	88
4.4.1	Untersuchung der Primärstruktur	88
4.4.2	Homologievergleich	91
4.4.3	Berechnungen aus der Primärstruktur	93
4.4.4	Signal- und Targeting-Peptide	93
4.4.5	Modellberechnungen	93
4.4.5.1	Validierung des Modells	94
4.4.6	Untersuchung der Tertiärstruktur	95
4.4.6.1	Unterschiede der Tertiärstruktur	95
4.5	Weiterführende Arbeiten	96
5	Zusammenfassung	98
6	Literaturverzeichnis	100

Abkürzungen

AdR	Adrenodoxin-Reduktase
Adx	Adrenodoxin
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTPs	Desoxyribonucleosidtriphosphate
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (reduziert)
NYHA	New York Heart Association
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
rRNA	ribosomale RNA
SCCE	<i>side-chain cleaving enzyme</i> , Seitenkettenspaltendes Enzym
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i> , Natriumlaurylsulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid

1 Einleitung

Heilwirkungen der verschiedenen *Digitalis*-Arten sind seit langer Zeit bekannt und beschrieben. Von den vielfältigen zugeschriebenen Wirkungen (zu dieser Thematik vgl. OVERHAMM 1976), wie unter anderem bei der äußerlichen Anwendung zur Wundheilung (FUCHS 1543) oder ihrer (indirekten) diuretischen Wirkung (WITHERING 1785), spielen heutzutage nur noch der Einsatz der enthaltenen herzwirksamen Glykoside bei chronischer Herzinsuffizienz und bei Tachyarrhythmien des Vorhofs durch Ischämie eine Rolle (LÖWE 1993). Die medikamentöse Therapie mit herzwirksamen Glykosiden ist abhängig vom Stadium der Herzinsuffizienz nach der revidierten Klassifikation der New York Heart Association (NYHA-Stadien). Im Stadium I sind Cardenolide nur bei tachysystolischem Vorhofflimmern bzw. -flattern indiziert. Die gleiche Indikation trifft für Stadium II zu, zusätzlich besteht eine Indikation bei persistierenden Symptomen unter Therapie mit ACE-Hemmern und Diuretica. Die ergänzende Gabe von herzwirksamen Glykosiden ist ebenfalls in den NYHA-Stadien III und IV angezeigt (Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung, <http://www.awmf-online.de/>). Die Mortalität ist unter Therapie mit Digoxin nicht signifikant reduziert, allerdings sinkt die Zahl der herzinsuffizienzbedingten Krankenhauseinweisungen (THE DIGITALIS INVESTIGATION GROUP 1997).

Auch wenn die Bedeutung der Cardenolide durch Einführung anderer Substanzgruppen in die Therapie eingeschränkt wurde, sind sie, insbesondere in Kombination mit diesen, wertvolle Bestandteile des Arzneischatzes. Zur Gewinnung der herzwirksamen Glykoside wird *Digitalis lanata* nach wie vor angebaut, da deren chemische Synthese aufgrund der komplizierten Struktur unwirtschaftlich ist. Totalsynthesen erfordern eine Vielzahl von Zwischenstufen und haben lediglich wissenschaftliche Bedeutung (vgl. LUCKNER & WICHTL 2000).

Die Untersuchung der frühen Enzyme der Cardenolidbiosynthese bietet die Möglichkeit, diese mit den entsprechenden Enzymen tierischer Herkunft zu vergleichen und damit unter anderem Hinweise auf die Phylogenie zu erhalten.

1.1 Seitenkettenspaltung bei Sterolen in *Digitalis*

Der erste Schritt der Synthese der herzwirksamen Glykoside ist die Abspaltung der Seitenkette des als Substrat dienenden Sterols. Die Umsetzung der entsprechenden Pregnenolonglucoside zu Cardenoliden wurde schon 1964 nachgewiesen (TSCHESCHE & LILIENWEISS 1964). 1966 konnte dann durch Fütterungsversuche mit radioaktiv markiertem Cholesterol gezeigt werden, daß *Digitalis purpurea* in der Lage ist, die Seitenkette dieses Sterols abzuspalten (CASPI et al. 1966). Bereits Sämlinge sind zu dieser Reaktion befähigt (PILGRIM 1972). Spätere Versuche ergaben, daß auch Campesterol, Sitosterol und Stigmasterol durch das seitenkettenspaltende Enzym (SCCE) verschiedener *Digitalis*-Arten umgesetzt werden können (BENNETT et al. 1969, LINDEMANN & LUCKNER 1997). Auch hydroxylierte Derivate wie (20*S*)-20-Hydroxycholesterol und (22*S*)-22-Hydroxycholesterol werden in Pregnenolon umgewandelt (siehe Abb. 1). Daraus wird geschlossen, daß die gleichen Intermediate wie beim tierischen Enzym auftreten (LINDEMANN & LUCKNER 1997).

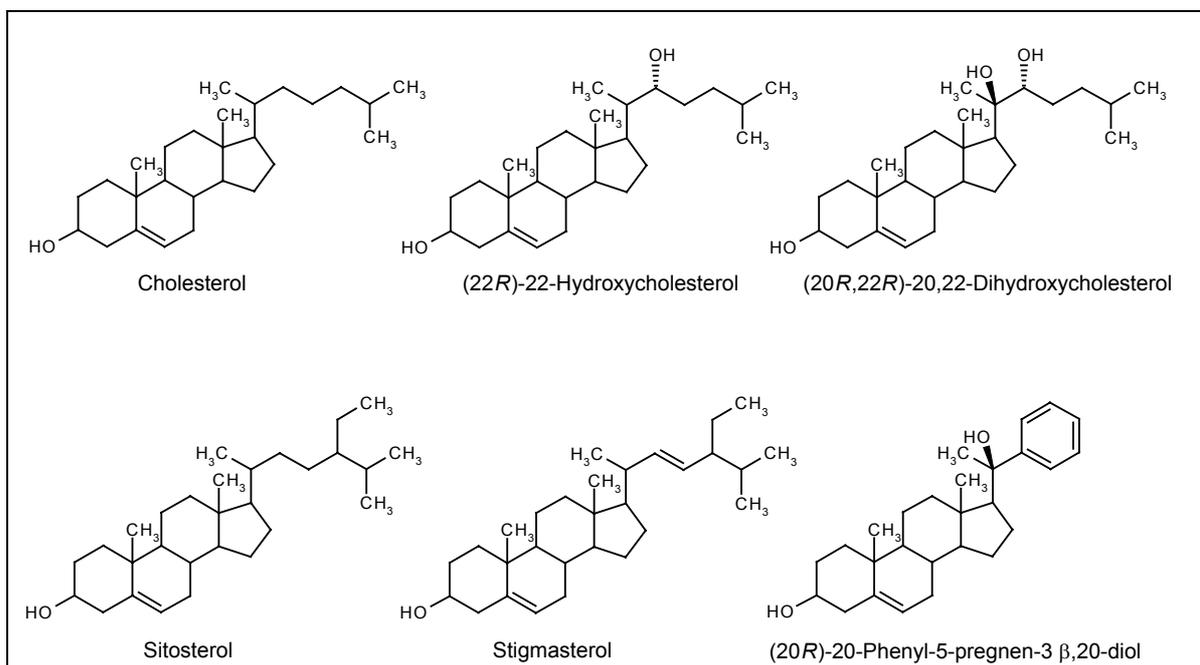


Abb. 1 — Auswahl von Substraten und Intermediaten des SCCE.

In höheren grünen Pflanzen stellt im Allgemeinen Sitosterol das vorherrschende Sterol dar (THIELE 1979). Die Untersuchung des Sterolspektrums in Sämlingen von *Digitalis purpurea* zeigte, daß bis zum 25. Tag Sitosterol dominiert, in älteren Pflanzen dagegen Stigmasterol diese Rolle übernimmt (JACOBSON & FREY 1968). In Sproßspitzenkulturen

von *Digitalis lanata* wurde Stigmasterol als Hauptsterol gefunden, Sitosterol stellte hingegen den größten Anteil in cardenolidfreien Suspensionszellkulturen (MILEK et al. 1997). Cholesterol kam nur bis zu einem Anteil von höchstens 10 % des Gesamtsterolgehaltes vor. Es darf vermutet werden, daß die in höheren Konzentrationen vorkommenden Phytosterole und nicht Cholesterol das natürliche Substrat für das seitenkettenspaltende Enzym in *Digitalis lanata* darstellen, wie Experimente mit einem spezifischen Hemmer der 24-Alkylsterolbiosynthese belegen (MILEK et al. 1997). Dies wird durch den Befund gestützt, daß die relative spezifische Aktivität des SCCE bei somatischen Embryonen und in Blättern von *Digitalis lanata* für Sitosterol etwa doppelt so hoch ist wie für Cholesterol (LINDEMANN & LUCKNER 1997).

Das Steroidgrundgerüst wird, wie Fütterungsversuche mit radioaktiv markierter Mevalonsäure zeigten, auf dem gewöhnlichen Weg über Squalen aufgebaut (RAMSTADT & BEAL 1960, KREIS et al. 1998). Der Lactonring entsteht dagegen nicht, wie zunächst angenommen, aus der Seitenkette des Steroids, sondern wird aus zwei Molekülen Acetat synthetisiert (GREGORY & LEETE 1960, WICKRAMASINGHE et al. 1969, KREIS et al. 1998). Es scheint unwahrscheinlich, daß die Seitenkettenspaltung durch Verwendung eines abweichenden Biosyntheseweges umgangen werden kann. Bislang ist es jedoch nicht gelungen, SCCE aus *Digitalis lanata* oder einer anderen Pflanze zu reinigen oder seine Sequenz festzustellen. Eine weitere offene Frage ist, ob es sich wie beim tierischen Enzym um ein mitochondriales Cytochrom P450 handelt. Bislang existiert kein Nachweis eines pflanzlichen Cytochroms P450 in Mitochondrien. Behandlung von Kalluskulturen von *Digitalis purpurea* mit Phenobarbital führte zu einer Steigerung der SCCE-Aktivität (PALAZÓN et al. 1995) wobei der Volumenanteil der Mitochondrien zunahm (BONFILL et al. 1996). In der Regel werden pflanzliche Cytochrome P450 aber in mikrosomalen Membranpräparationen gefunden. Ausnahmen sind Allenoxidsynthase (CYP74A) und Fettsäurehydroperoxydlyase (CYP74B), die im Chloroplasten lokalisiert sind (VICK & ZIMMERMAN 1987, BLÉE & JOYARD 1996, FROELICH et al. 2001). CYP86B1 stellt ferner die erste Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenase dar, deren Lokalisation in Chloroplasten nachgewiesen wurde (WATSON et al. 2001).

Im Stoffwechsel der Brassinosteroide existieren Enzyme, die Hydroxylierungen von Steroiden in der Seitenkette vornehmen, auch in Positionen, die für das SCCE postuliert werden (SZEKERES et al. 1996, CHOE et al. 1998, KIM et al. 1998). Es erscheint möglich, daß diese Enzyme Verwandtschaft mit SCCE aufweisen. Noch fehlen aber

Untersuchungen, die überprüfen, ob z. B. *Arabidopsis thaliana* in der Lage ist, ebenfalls die Seitenkette von Sterolen abzuspalten.

1.2 Das seitenkettenspaltende Enzym im tierischen System

Die Abspaltung der Seitenkette von Cholesterol als erster Schritt der Synthese von Glucocorticoiden, Mineralocorticoiden und Androgenen ist aufgrund der enormen Wichtigkeit dieser Hormone und der Schlüsselstellung, die das seitenkettenspaltende Enzym (P450_{sc}, CYP11A1, EC 1.14.15.6) dabei einnimmt, ein recht gut untersuchter Vorgang. Drei Reaktionen sind beteiligt: die Hydroxylierungen in den Positionen 22 und 20 sowie die Spaltung der Bindung zwischen den Atomen 20 und 22. Bei jedem dieser Schritte wird ein Molekül NADPH als Elektronendonator und ein Molekül O₂ benötigt. Elektronen werden einzeln über Adrenodoxinreduktase (AdR) und Adrenodoxin (Adx) auf das seitenkettenspaltende Enzym übertragen (Abb. 2). Zunächst entsteht (22R)-22-Hydroxycholesterol, gefolgt von (20R,22R)-20,22-Dihydroxycholesterol, nach der Seitenkettenspaltung dann Pregnenolon (BURSTEIN & GUT 1976, TUCKEY & CAMERON 1993, SUGANO et al. 1996). (20S)-20-Hydroxycholesterol, dessen Konformation am C-20 die gleiche ist wie im (20R,22R)-20,22-Dihydroxycholesterol, wird ebenfalls als Substrat akzeptiert, kommt jedoch nicht als nachweisbares Umsetzungsprodukt von Cholesterol durch CYP11A1 vor (BURSTEIN & GUT 1976).

Es wurde gezeigt, daß (20R)-20-Phenyl-5-pregnen-3 β ,20-diol (siehe Abb. 1) wie auch einige andere Analoge von 20-Hydroxycholesterol zu Pregnenolon umgesetzt werden können (HOCHBERG et al. 1976). Das dem C-22 von Cholesterol entsprechende Kohlenstoffatom ist aufgrund der kompletten Substitution einer Hydroxylierung nicht zugänglich, so daß auf einen anderen, möglicherweise radikalischen Mechanismus der Seitenkettenspaltung geschlossen wird. Diese Ansichten widersprechen allerdings den weithin akzeptierten Annahmen zur Steroidbiosynthese (vgl. LIEBERMAN & PRASAD 1990).

Die Natur der bei der Elektronenübertragung auftretenden Komplexe ist bislang noch nicht letztgültig geklärt. Diskutiert werden die Bildung eines ternären oder eines quaternären Komplexes sowie ein *shuttle*-Modell (BERNHARDT 1998). Die Beobachtung, daß die Reduktase-Bindungsstelle und die Cytochrom-P450-Bindungsstelle zu großen Teilen überlappen (COGHLAN & VICKERY 1991), stellen das ternäre Modell allerdings

ebenso wie kinetische Messungen (HANUKOGLU & JEFCOATE 1980) in Frage. Sowohl das quaternäre als auch das *shuttle*-Modell würden mit dieser Beobachtung nicht im Widerspruch stehen.

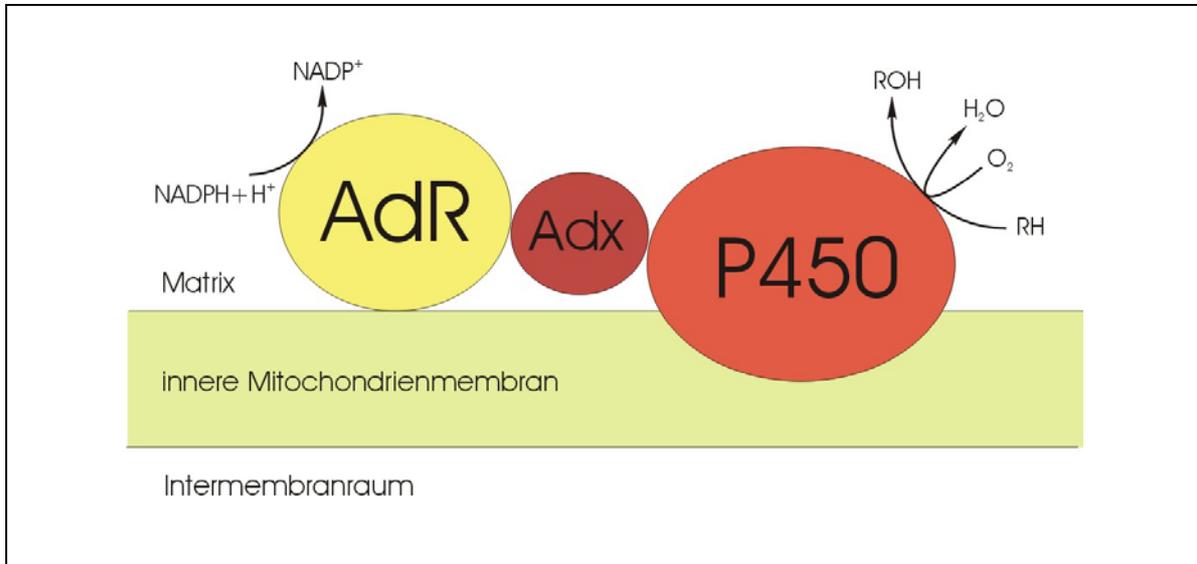


Abb. 2 — Schema der Elektronenübertragung bei den mitochondrialen Cytochromen P450.

Weiterhin gibt es Hinweise darauf, daß Adx ein funktionelles Dimer darstellt (BEILKE et al. 2002). Auch die Röntgenstrukturanalyse des vollständigen Adx und Lichtstreuungsmessungen deuten auf ein solches Verhalten (PIKULEVA et al. 2000). Bei der Untersuchung von Adx, das mittels Fusion mit dem Autotransporter AIDA-I in der äußeren Membran von *Escherichia coli* exprimiert wurde (JOSE et al. 2001), wurden bei Western Blots Banden festgestellt, die mit Dimeren korrelierten. Daraufhin durchgeführte Größenausschlußchromatographie von Adx läßt ebenfalls auf Dimerbildung schließen (JOSE et al. 2002).

1.3 Ferredoxine

Ferredoxine gehören zu den einfachen Eisen-Schwefel-Proteinen, deren einzige prosthetische Gruppe ein oder mehrere Eisen-Schwefel-Cluster sind. Weitere Vertreter dieser Proteingruppe sind Rubredoxine, Rieske-Proteine und die sogenannten HiPIPs (*high-potential iron-sulfur proteins*). Ebenfalls einfache Eisen-Schwefel-Proteine, aber mit katalytischer Aktivität, sind einige Nitrogenasen, Hydrogenasen und CO-Oxidoreduktasen. Daneben existieren komplexe Eisen-Schwefel-Proteine, die außer dem Eisen-Schwefel-

Cluster noch andere prosthetische Gruppen tragen und Enzymaktivität zeigen. Dazu zählen Fumaratreduktase, Succinatdehydrogenase und Ferredoxin-Glutamat-Synthase (CAMMACK 1992, MATSUBARA & SAEKI 1992).

Kennzeichnendes Merkmal der Ferredoxine ist das Vorkommen von Eisen-Schwefel-Clustern. Bei Zugabe von Säure zu den Proteinen wird (mit Ausnahme der Rubredoxine, vgl. BRUSCHI & LE GALL 1972) H_2S freigesetzt. Dieses ungewöhnliche Verhalten in Kombination mit dem Vorhandensein von nicht-Häm-Eisen wurde schon früh entdeckt und führte dazu, daß solche Proteine mit labilem Sulfid eingehenderen Untersuchungen unterzogen wurden (SHETHNA et al. 1964, DERVARTANIAN et al. 1967).

1.3.1 Ferredoxine, Elektronenüberträger mit vielfältigen Variationen

Der Begriff Ferredoxin wurde durch WHARTON geprägt und damit ein nicht-Häm-Eisen-Protein aus *Clostridium pasteurianum* bezeichnet (MORTENSON et al. 1962, VALENTINE 1964). Es stellte sich heraus, daß Ferredoxine bereits mit anderen Funktionsbezeichnungen wie „Methämoglobin-reduzierender Faktor“ (DAVENPORT et al. 1952), „Triphosphopyridinnukleotid-reduzierender Faktor“ (ARNON et al. 1957), „photosynthetische Pyridinnukleotid-Reduktase“ (SAN PIETRO & LANG 1958) und „Häm-reduzierender Faktor“ (DAVENPORT & HILL 1960) isoliert worden waren. Auch das sogenannte „rote Ferment“, das in WARBURGS Laboratorium aus *Chlorella pyrenoidosa* gewonnen wurde (GEWITZ & VÖLKER 1962), ist ein Ferredoxin.

Außer den Ferredoxinen im engeren Sinn existieren verwandte Proteine mit ähnlicher Struktur und Funktion. Der einfachste Vertreter ist das Rubredoxin. Es existiert kein Eisen-Schwefel-Cluster mit labilem Sulfid im eigentlichen Sinn, statt dessen wird ein einzelnes Eisenatom von vier Cysteinylgruppen umgeben. Rubredoxin dient als Elektronenüberträger bei der ω -Oxidation von Fettsäuren. Rieske-Proteine, die sich durch ein höheres Redoxpotential von anderen Ferredoxinen unterscheiden, besitzen einen [2Fe-2S]-Cluster, wobei ein Eisenatom mit zwei Histidin-Stickstoffatomen koordiniert ist. Weiterhin existieren Ferredoxine mit [4Fe-4S]- und mit [3Fe-4S]-Clustern (CAMMACK 1992, MATSUBARA & SAEKI 1992, vgl. Abb. 3).

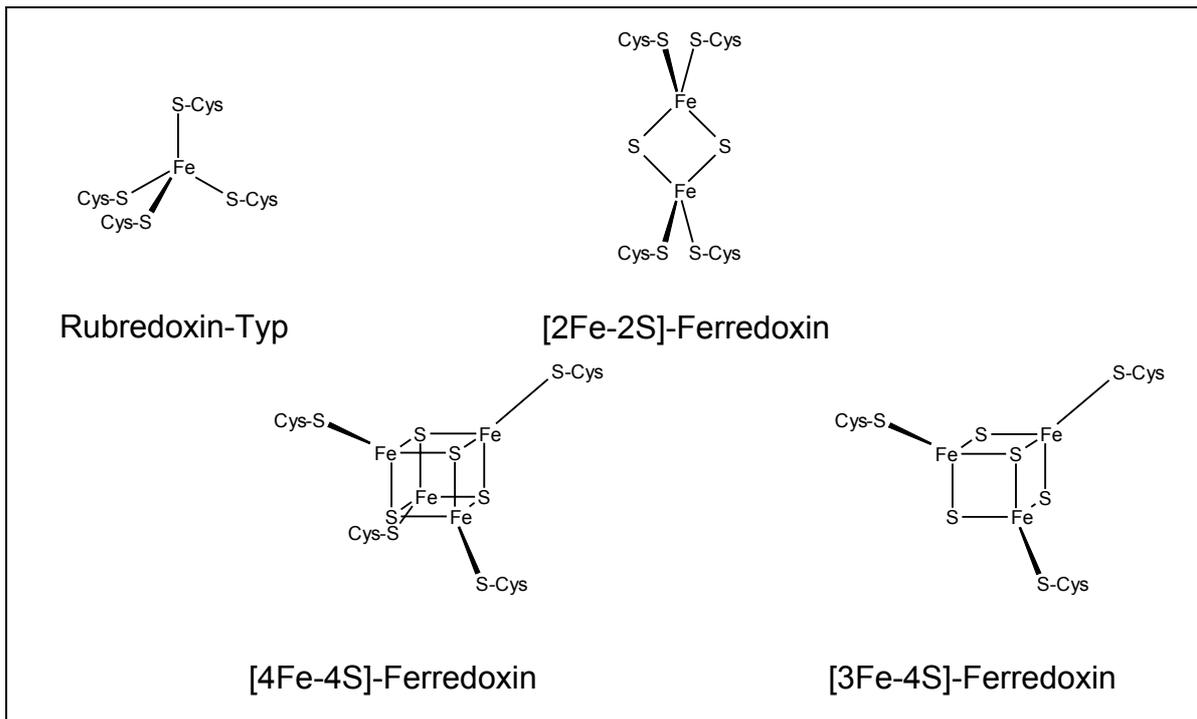


Abb. 3 — Schematische Struktur der häufigsten Eisen-Schwefel-Cluster.

In vielen Ferredoxinen kommen mehrere, auch unterschiedliche Eisen-Schwefel-Cluster vor. Eine ungewöhnliche Variante stellen die Polyferredoxine dar. Der erste Vertreter dieser Proteine wurde aus der Nukleinsäuresequenz von *Methanobacterium thermoautotrophicum* abgeleitet (REEVE et al. 1989). Auch aus dem hyperthermophilen Archaeobacterium *Methanothermus fervidus* ist ein putatives Polyferredoxin bekannt (STEIGERWALD et al. 1990). Es wird vorhergesagt, daß in diesen Proteinen 12 [4Fe-4S]-Cluster enthalten sind.

[2Fe-2S]-Ferredoxine werden in *plant-type* und *vertebrate-type* Ferredoxine eingeteilt. *Plant-type* Ferredoxine sind beteiligt an Elektronentransferreaktionen in Chloroplasten (ARNON 1965), außerdem dienen sie als Elektronendonatoren in verschiedenen Stoffwechselwegen (MATSUBARA & SAEKI 1992). Durch Photosystem I reduziert überträgt das Ferredoxin vegetativer Zellen aus *Anabaena* Elektronen auf eine Ferredoxinreduktase, die wiederum NADP reduziert (KNAFF & HIRASAWA 1991). Im Gegensatz dazu überträgt Adrenodoxin als Vertreter der *vertebrate-type* Ferredoxine Elektronen von einer Adrenodoxinreduktase auf mitochondriale Cytochrome P450 (KIMURA & SUZUKI 1967). Sowohl *plant-type* als auch *vertebrate-type* Ferredoxine übertragen jeweils ein Elektron (ORME-JOHNSON & BEINERT 1969). Die Redoxpotentiale der *plant-type* Ferredoxine liegen

zwischen -310 und -455 mV (CAMMACK et al. 1977). Mit Redoxpotentialen von -235 bis -273 mV (GRINBERG et al. 2000) liegen die *vertebrate-type* Ferredoxine deutlich darüber.

1.3.2 Adrenodoxin, das Ferredoxin der Nebennierenrinde

Adx gehört zu den [2Fe-2S]-Ferredoxinen. Es wurde 1965 bei der Suche nach der Reduktase der mitochondrialen Cytochrome P450 in der Nebenniere entdeckt (OMURA et al. 1965, SUZUKI & KIMURA 1965, KIMURA & SUZUKI 1965, OMURA et al. 1966). Das Redoxpotential des bovinen Adx beträgt -273 mV (GRINBERG et al. 2000). Adx überträgt jeweils ein Elektron auf die mitochondrialen Cytochrome P450: seitenkettenspaltendes Enzym (CYP11A1), 11β -Hydroxylase (CYP11B1) und Aldosteronsynthase (CYP11B2). Adx wurde als Mitglied des Elektronentransfersystems der mitochondrialen Steroidhydroxylierung intensiv untersucht (ESTABROOK et al. 1973, BERNHARDT 1998). Vergleich von Adrenodoxinen verschiedener Wirbeltiere zeigt die hohe Verwandtschaft dieser Proteine (siehe auch Abb. 5).

Bovines Adx wird als Präprotein (186 Aminosäuren) synthetisiert und nach Transport in die Mitochondrien prozessiert. Dabei wird die N-terminale amphiphile Präsequenz (58 AS) abgespalten. Das reife Protein besteht aus 128 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 14,4 kDa (GRINBERG et al. 2000). Es existieren zwei Isoformen des bovinen Adx, die sich allerdings nur unwesentlich unterscheiden (vgl. Abb. 5). Das Protein besteht aus einer Kerndomäne, die den Eisen-Schwefel-Cluster enthält, sowie aus einer Interaktionsdomäne (Abb. 4).

Der Loop, der den Eisen-Schwefel-Cluster umgibt, wurde als weitere Interaktionsregion erkannt (HANNEMANN et al. 2001). Mutanten, deren Interaktionsdomäne deletiert wurde, waren weiterhin zur Interaktion mit AdR, nicht aber mit CYP11A1 in der Lage (HEINZ et al. 2002). Bei *vertebrate-type* Ferredoxinen besteht der Loop aus 5 Aminosäuren, bei *plant-type* Ferredoxinen sind dagegen nur 4 Aminosäuren zu finden. Deletion jeder der 5 Aminosäuren des Loops zwischen Cystein 46 und Cystein 52 resultiert in dramatischen Veränderungen der Eigenschaften und Funktion von Adx (ZÖLLNER et al. 2002).

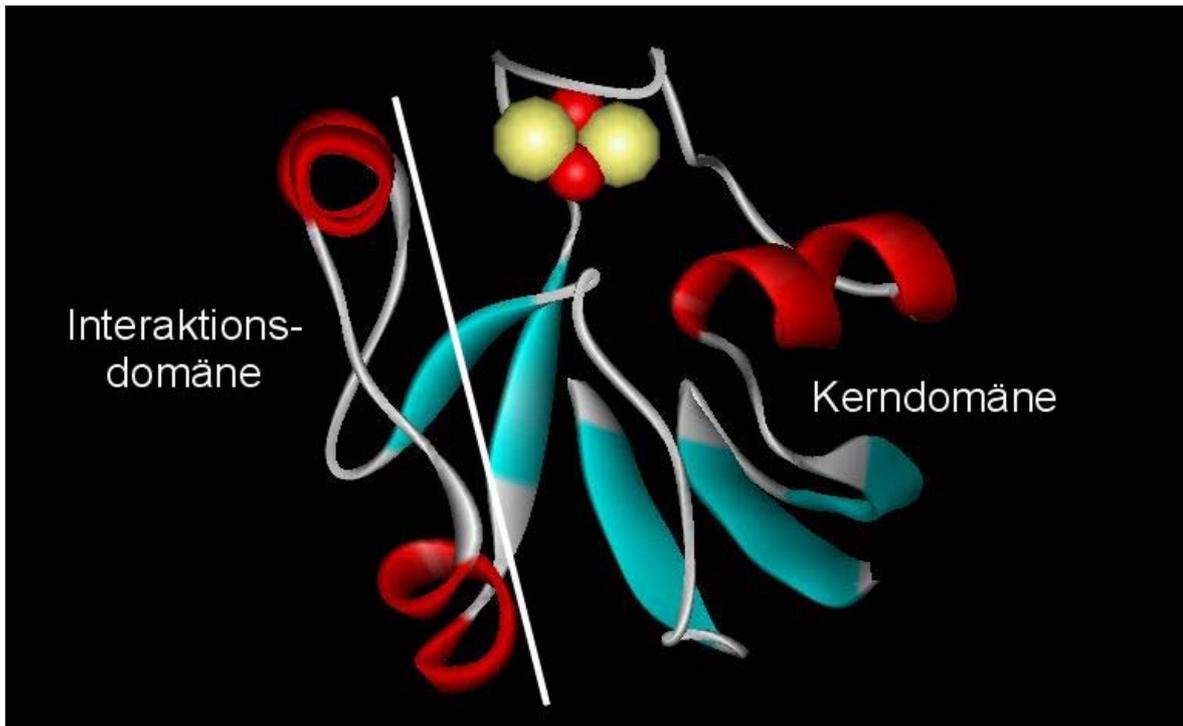


Abb. 4 — *ribbon*-Modell der verkürzten Form von Adx (MÜLLER et al. 1998). Links ist die Interaktionsdomäne zu sehen, rechts die Kerndomäne mit dem Eisen-Schwefel-Cluster (Eisenatome rot, Schwefelatome gelb).

Untersuchungen verschiedener Adx-Mutanten gewähren einen Einblick in den Mechanismus der Bindung von Adx mit AdR bzw. mit den mitochondrialen Cytochromen P450 sowie der Elektronenübertragung (vgl. GRINBERG et al. 2000).

Die vier hochkonservierten Cysteinreste (C46, C52, C55 und C92), die den Eisen-Schwefel-Cluster binden, sind in Adx nicht durch andere Reste zu ersetzen, ohne dadurch die Inkorporation des Clusters zu verhindern (UHLMANN et al. 1992). Prolin 108 spielt eine wichtige Rolle für die korrekte Faltung des gesamten Proteins. Deletion des C-Terminus ab dieser Position führt zum Verlust der Funktionalität (UHLMANN et al. 1994). In direkter Umgebung des Eisen-Schwefel-Clusters sorgt Threonin 54 durch eine Wasserstoffbrückenbindung zu Cystein 52 für die Stabilität des Loops. Elimination der Wasserstoffbrückenbindung (Mutante T54A) destabilisiert das Protein erheblich (UHLMANN & BERNHARDT 1995). Threonin 54 kann durch Serin ersetzt werden, wobei es zu einem deutlichen Absinken des Redoxpotentials kommt. Die spektroskopischen Merkmale entsprechen weitgehend denen des Wildtyps, was darauf schließen läßt, daß die Geometrie des Clusters wenig verändert wird (UHLMANN & BERNHARDT 1995). Substitution von Threonin 49 durch Serin, das in Terpredoxin und Putidaredoxin an dieser Stelle gefunden wird, ändert die Eigenschaften des Proteins kaum (HANNEMANN et al. 2001). Die Substitution von Tyrosin 82 durch Phenylalanin führt zu keinen relevanten

die aufgrund höherer Affinität zu CYP11A1 eine bis zu hundertfach erhöhte Effizienz bei der Umwandlung von Cholesterol zu Pregnenolon aufweisen, wurden generiert (Mutante S112W, SCHIFFLER et al. 2001).

Schon früh gelang es, Kristalle des Proteins herzustellen (SUHARA et al. 1972), allerdings war die Qualität für eine Röntgenstrukturanalyse nicht ausreichend. Erst 1998 wurde die Röntgenstruktur einer verkürzten Form von Adx aufgeklärt (MÜLLER et al. 1998), etwas später die des vollständigen Proteins (PIKULEVA et al. 2000). Inzwischen liegt auch die Struktur des *cross-link*-Komplexes mit AdR vor (MÜLLER et al. 2001).

1.4 Das Hefe-Two-Hybrid-System

Das Hefe-Two-Hybrid-System basiert auf der Tatsache, daß der Transkriptionsaktivator GAL4 in *Saccharomyces cerevisiae* aus funktionell getrennten Domänen zur DNA-Bindung und zur Aktivierung der Transkription besteht (Abb. 6, A). Eine N-terminale Domäne (BD) bindet an spezifische DNA-Sequenzen (UAS_G), während eine C-terminale Domäne (AD) die Transkription aktiviert (MA & PTASHNE 1987).

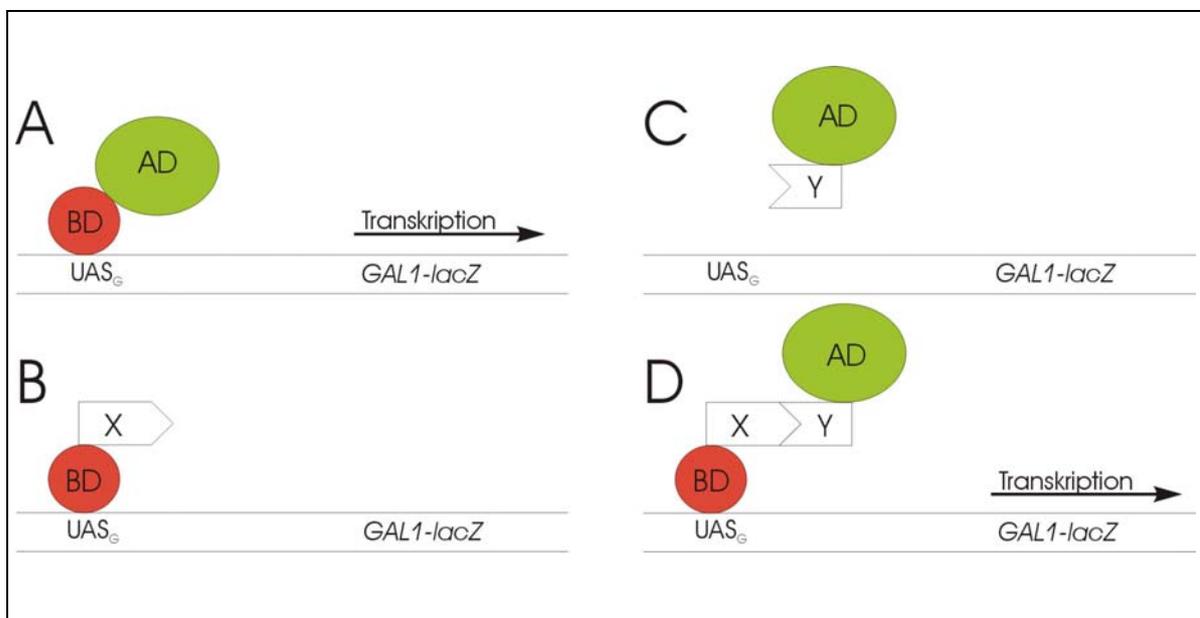


Abb. 6 — Schema der Transkriptionsaktivierung im Two-Hybrid-System.

Es konnte gezeigt werden, daß diese Domänen des GAL4-Proteins als getrennte Proteine nicht in der Lage sind, die Transkription des Reportergens $GAL1-lacZ$ zu aktivieren (Abb. 6, B und C). Hybride der DNA-bindenden Domäne mit SNF1 (einer

Serin-Threonin-spezifischen Proteinkinase, X in Abb. 6) und der Aktivierungsdomäne mit SNF4 (einem mit SNF1 interagierendem Protein, das für dessen maximale Aktivität erforderlich ist, Y in Abb. 6) wurden generiert und in *Saccharomyces cerevisiae* koexprimiert. Expression beider Hybride führte zur Rekonstitution der GAL4-Aktivität mit dem Ergebnis, daß β -Galactosidase produziert wurde (Abb. 6, D). Dieses Enzym wurde durch Reaktion mit 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid (X-Gal) und dadurch resultierender Blaufärbung der Hefekolonien nachgewiesen (FIELDS & SONG 1989).

Ursprünglich dazu verwendet, die Interaktion zweier bestimmter Proteine nachzuweisen, wurde es später adaptiert, um damit cDNA-Banken auf Interaktionspartner eines gegebenen Proteins zu durchsuchen (CHIEN et al. 1991). Dabei wird ein Plasmid generiert, das zur Expression eines Proteins X, das als *bait* bezeichnet wird, als Hybrid-Protein mit der DNA-bindenden Domäne des Hefe-Transkriptionsaktivators GAL4 führt. Eine cDNA-Bank wird in Vektoren kloniert, die die jeweiligen Proteine Y, die *prey*-Proteine, als Hybride mit der Aktivierungsdomäne exprimieren. Nach Transformation eines Hefestamms, der bereits den *bait*-Vektor enthält, mit der cDNA-Bank kann mit Hilfe eines Assays auf interagierende Proteine gescreent werden.

Ein Problem bei der Verwendung des Two-Hybrid-Systems stellen die falsch positiven Signale dar. Dabei handelt es sich beispielsweise um Proteine, die zwar im Test interagieren, durch ihre Kompartimentierung oder Expression zu unterschiedlichen Zeiten *in vivo* jedoch nicht miteinander in Kontakt kommen können. Andere Proteine sind dafür bekannt, daß sie mit einer Vielzahl unterschiedlicher *baits* falsch-positive Resultate erzeugen. Dazu zählen Hitzeschockproteine, ribosomale Proteine und Proteosom-Untereinheiten (BRENT & FINLEY 1997).

Ausgehend vom Two-Hybrid-System wurden nachfolgend weitere Methoden zur Identifizierung von Wechselwirkungen von Proteinen und anderen Molekülen entwickelt. Mit Hilfe des Three-Hybrid-Systems werden beispielsweise Interaktionen von Proteinen und RNA nachgewiesen (vgl. BRENT & FINLEY 1997). Auch reverse Methoden wurden geschaffen, um den Zusammenbruch bestimmter Protein-Protein- bzw. DNA-Protein-Wechselwirkungen (z. B. durch Mutationen) zu untersuchen (VIDAL et al. 1996).

1.5 Aufgabenstellungen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte unter Verwendung von bovinem Adx als *bait* versucht werden, Interaktionspartner aus *Digitalis lanata* mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems aufzufinden. Die dafür benötigte cDNA-Bank sollte hergestellt werden.

Es sollte eine Homologiesuche des Genoms von *Arabidopsis thaliana* auf Homologe von Adx durchgeführt werden. Dabei gewonnene Sequenzen von *vertebrate-type* Ferredoxinen sollten kloniert werden.

Mit Hilfe dieser Sequenzen sollte eine *Digitalis-lanata*-cDNA-Bank auf das Vorkommen solcher Homologen untersucht werden.

Die pflanzlichen Adrenodoxinhomologen sollten exprimiert und anschließend mit der biochemischen und biophysikalischen Charakterisierung begonnen werden.

In die Arbeit sollten auch Untersuchungen mittels verschiedener Computerprogramme einbezogen werden. Insbesondere sollte versucht werden, ein Modell eines pflanzlichen *vertebrate-type* Ferredoxins zu erstellen, um es mit bovinem Adx vergleichen zu können. Das gewonnene Modell sollte auf seine Qualität hinsichtlich der Struktur der Peptidkette, der Faltung und der sterischen Hinderung der Seitenketten überprüft werden.

Bestimmte biochemische und biophysikalische Parameter sollten berechnet und mit den gemessenen Werten verglichen werden.

Durch Vergleich mit bekannten Sequenzen von Ferredoxinen sollte die verwandtschaftliche Einordnung der neuen Proteine untersucht werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenmaterial

Zur Herstellung der cDNA für die Two-Hybrid-Bank wurde RNA aus 6-8 Wochen alten Jungpflanzen von *Digitalis lanata* EHRH. der Sorte 'Dresdener' isoliert. RNA für die Northern-Blot-Analyse wurde aus *Digitalis-lanata*-Pflanzen des ersten Jahres sowie aus blühenden Pflanzen des zweiten Jahres gewonnen.

2.1.2 cDNA-Banken und Sequenzmaterial

Eine am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Halle hergestellte cDNA-Bank aus Blättern von *Digitalis lanata* (WERLE 1995) diente zur Untersuchung mittels verschiedener radioaktiv markierter Sonden. Sie wurde freundlicherweise von A. PETERSON zur Verfügung gestellt.

Für die Gewinnung der Sequenzen der Adrenodoxin homologen aus *Arabidopsis thaliana* durch PCR wurde die cDNA-Bank λ ACT 2-hybrid library CD 4-22 (KIM et al. 1997) in ihrer Plasmidform als Template verwendet. Sie wurde von der Arbeitsgruppe GRIMM aus dem IPK Gatersleben zur Verfügung gestellt.

Zur Konstruktion der *bait*-Plasmide für das Two-Hybrid-Screening wurden Plasmide mit vollständigen (pAS-Adx128) und verkürzten (pAS-Adx108) cDNA-Sequenzen des reifen Adx aus *Bos taurus* von der Arbeitsgruppe BERNHARDT verwendet.

Für ein Screening der oben erwähnten cDNA-Bank aus Blättern von *Digitalis lanata* wurde durch WATERMAN ein Plasmid mit der Sequenz des bovinen CYP11A1 (pTrc99A BSCCMc) zur Verfügung gestellt (WADA et al. 1991).

Als Kontrollplasmid bei der Northern-Blot-Analyse diente pBD18 (DOBROWOLSKI et al. 1989), das eine Teilsequenz des 18S-rRNA-Genes aus *Lycopersicon esculentum* enthält.

Die EST-Klone GBGe71 (CPD, CYP90A1, SZEKERES et al. 1996) und G10G3T7 (ROT3, CYP90C1, KIM et al. 1998) wurden vom Arabidopsis Biological Resource Center geliefert.

2.1.3 Bakterien- und Hefestämme

Escherichia coli:

XL1-Blue MRF'	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI}^q\Delta M15 \text{ Tn10 (Tet}^r\text{)]}$ (Stratagene, Heidelberg)
XL0LR	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mrcCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI}^q\Delta M15 \text{ Tn10 (Tet}^r\text{)] Su}^- \lambda^R$ (Stratagene, Heidelberg)
TOP10	$F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 \text{ recA1 deoR araD139 } \Delta(ara-leu)7697 \text{ galU galK rpsL (Str}^R\text{) endA1 nupG}$ (Invitrogen, Groningen, Niederlande)
TOP10F'	$F' \{lacI}^q \text{ Tn10 (Tet}^R\text{)}\} mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mrcBC) \Phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 \text{ recA1 deoR araD139 } \Delta(ara-leu)7697 \text{ galU galK rpsL (Str}^R\text{) endA1 nupG}$ (Invitrogen, Groningen, Niederlande)
BL21	<i>E. coli</i> B F^- , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r_B^- , m_B^-), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)
BL21-CodonPlus(DE3)-RP	<i>E. coli</i> B F^- <i>ompT hsdS</i> (r_B^- m_B^-) <i>dcm</i> ⁺ <i>Tet</i> ^r <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA Hte [argU proL Cam</i> ^r <i>]</i> (Stratagene, Heidelberg)

Saccharomyces cerevisiae:

YRG-2	<i>Mata ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 trp1-901 leu2-3 112 gal4-542 gal80-588 LYS2::UAS_{GAL1}-TATA_{GAL1}-HIS3 URA3::UAS_{GAL4} 17mers(x3)-TATA_{CYC1}-lacZ</i> (Stratagene, Heidelberg)
-------	--

2.1.4 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

2.1.4.1 Wasser

Im Allgemeinen wurde durch Umkehrosiose gereinigtes Wasser verwendet (Osmostil Rol, Christ, Stuttgart). Für molekularbiologische Arbeiten kam Wasser zum Einsatz, das

durch einen mehrstufigen Ionenaustauscher (MODULAB[®] Analytical Research Grade UF/Polishing System, Continental[®] Water Systems Corporation, San Antonio, USA) gereinigt wurde und das anschließend durch einen Membranfilter (Capsule Filter 0,2 µm, U. S. Filter, Warrendale, USA) filtriert wurde. Dieses Wasser wurde vor Gebrauch zusätzlich autoklaviert. Für Arbeiten mit RNA wurde Ionenaustauscher-gereinigtem Wasser 0,1 % DEPC zugegeben und mindestens 2 h inkubiert. Anschließend wurde autoklaviert.

2.1.4.2 Nährmedien

Luria-Bertani Broth (LB-Medium)

Hefeextrakt	0,5 %
Trypton	1 %
NaCl	1 %

Der pH-Wert wurde vor dem Sterilisieren auf 7,5 eingestellt. LB-Agar enthielt zusätzlich 1,5 % Agar, LB-Top-Agar 0,7 % Agarose.

Terrific Broth (TB-Medium)

Lösung I (je 900 mL)	
Hefeextrakt	24 g
Trypton	12 g
Glycerol	4 mL
Lösung II	
Kaliumphosphatpuffer pH 7,5	1 mol·L ⁻¹

900 mL steriler Lösung I wurden vor Gebrauch mit 100 mL steriler Lösung II gemischt.

Nährbouillon I (NB-Medium)

Hefeextrakt	0,3 %
Pankreatisches Pepton (Casein)	0,7 %
Pankreatisches Pepton (Fleisch)	0,5 %
Pankreatisches Pepton (Gelatine)	0,5 %
NaCl	0,5 %

Der pH-Wert wurde vor dem Sterilisieren auf 7,2 eingestellt.

NZY-Broth

Hefeextrakt	0,5 %
NZ amine (Casein-Hydrolysat)	1,0 %
NaCl	0,5 %
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 %

Der pH-Wert wurde vor dem Sterilisieren auf 7,5 eingestellt. NZY-Agar enthielt 1,5 % Agar, NZY-Top-Agar 0,7 % Agarose.

YPAD-Broth

Hefeextrakt	1,0 %
Pepton	2,0 %
Adeninsulfat	40 ppm
Glucose	2 %

Der pH-Wert wurde vor der Zugabe von Adeninsulfat auf 5,8 eingestellt. Die Glucose wurde in Form einer 50 %igen Lösung filtersterilisiert und der separat sterilisierten Lösung hinzugefügt. YPAD-Agar enthielt 1,5 % Agar.

SOC-Medium

Hefeextrakt	0,5 %
Trypton	2,0 %
NaCl	10 mmol·L ⁻¹
KCl	2,5 mmol·L ⁻¹
MgSO ₄	10 mmol·L ⁻¹
Glucose	20 mmol·L ⁻¹

Der pH-Wert wurde vor dem Sterilisieren auf 7,0 eingestellt.

2.1.4.3 Puffer

10×DNA-Probenpuffer

Glycerol	50 %
EDTA, pH 7,5	200 mmol·L ⁻¹
Bromphenolblau	0,01 %

10×TAE

Tris	0,4 mol·L ⁻¹
Essigsäure	0,2 mol·L ⁻¹
EDTA	10 mmol·L ⁻¹

20×TTE

Tris	1,8 mol·L ⁻¹
Taurin	0,6 mol·L ⁻¹
EDTA	20 mmol·L ⁻¹

10×MOPS-Puffer (pH 7,0)

MOPS	0,2 mol·L ⁻¹
Natriumacetat	50 mmol·L ⁻¹
EDTA	10 mmol·L ⁻¹

RNA-Probenpuffer

Formamid (entionisiert)	66,7 %
Formaldehyd	24,0 %
14,3×MOPS	9,3 %

RNA-Stoppuffer (pH 8,0)

Bromphenolblau	0,25 %
Xylencyanol FF	0,25 %
Glycerol	50 %
EDTA	1 mmol·L ⁻¹

SM-Puffer

Tris	50 mmol·L ⁻¹
NaCl	100 mmol·L ⁻¹
MgSO ₄	10 mmol·L ⁻¹
Gelatine	0,1 %

Der pH-Wert wurde vor dem Sterilisieren auf 7,5 eingestellt.

TE-Puffer (pH 7,5)

Tris	10 mmol·L ⁻¹
EDTA	1 mmol·L ⁻¹

20×SSC-Puffer (pH 7,0)

NaCl	3 mol·L ⁻¹
Natriumcitrat	0,3 mol·L ⁻¹

2.1.4.4 Lösungen

Heringssperma-DNA-Lösung:

100 mg Heringssperma-DNA wurden in 10 mL TE-Puffer aufgelöst und bei 95 °C 30 min im Ultraschallwasserbad inkubiert. Die Lösung wurde aliquotiert bei -20 °C aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde sie 10 min aufgekocht, um die DNA zu denaturieren und anschließend unverzüglich auf Eis gestellt.

Phenol:

Phenol wurde mit Puffer (100 mmol·L⁻¹ Tris, 0,1 % 8-Hydroxychinolin, pH 8,0) bis zur Sättigung gerührt.

RNase-A-Lösung:

10 mg RNase A wurde in 1 mL TE-Puffer gelöst und zur Inaktivierung von DNase-Verunreinigungen 30 min im kochenden Wasserbad inkubiert.

2.1.5 Plasmide

2.1.5.1 Leerplasmide

pQE-30	Qiagen, Hilden, (STÜBER et al. 1990a und b)
pGEX 4T-1	Amersham Pharmacia Biotech, (SMITH & JOHNSON 1988)
pTrc99A	Amersham Pharmacia Biotech, (AMANN et al. 1988)
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	Invitrogen, Groningen, (SHUMAN 1994)
pPCR-Script [™] Amp SK(+)	Stratagene, Heidelberg
pBD GAL4 Cam	Stratagene, Heidelberg

2.1.5.2 Sonstige Plasmide

pBD18	DOBROWOLSKI et al. 1989
pUC 18	NORRANDER et al. 1983
pGAL4, p53	Stratagene, Heidelberg
pAS-Adx108, pAS-Adx128	Arbeitsgruppe BERNHARDT, Saarbrücken
pTrc99A BSCCMc	WADA et al. 1991

Name	Beschreibung	Insert
pCR-Adx108	PCR-Produkt aus pAS-Adx108 mit EcoRIAdx108 und Adx108PstI in pCR [®] 2.1-TOPO [®]	adx108
pCR-Adx128	PCR-Produkt aus pAS-Adx128 mit EcoRIAdx128 und Adx128PstI in pCR [®] 2.1-TOPO [®]	adx128
pBD-Adx128	Insert aus pCR-Adx128 nach <i>EcoR I/Pst I</i> -Verdau subkloniert in pBD GAL4 Cam	adx128
pCR-adxhom	PCR-Produkt aus cDNA-Bank CD 4-22 mit adxhom-fwd und adxhom-rev in pCR [®] 2.1-TOPO [®]	padxhom1ath
pPCR-adxhom	PCR-Produkt aus cDNA-Bank CD 4-22 mit adxhom-fwd und adxhom-rev in pPCR-Script [™] Amp SK(+)	padxhom1ath
pCR-ath1	PCR-Produkt aus cDNA-Bank CD 4-22 mit bamath1 und ath1sal in pCR [®] 2.1-TOPO [®]	padxhom1ath
pCR-ath2	PCR-Produkt aus cDNA-Bank CD 4-22 mit bamath2 und ath2sal in pCR [®] 2.1-TOPO [®]	padxhom2ath
pCR-dla	PCR-Produkt aus pBlue-adxhomdla mit bamdla und dlasal in pCR [®] 2.1-TOPO [®]	padxhomdla
pCR-ath1abr	PCR-Produkt aus pCR-ath1 mit bamath1abr und ath1sal in pCR [®] 2.1-TOPO [®]	adxhom1ath
pCR-ath2abr	PCR-Produkt aus pCR-ath2 mit bamath2abr und ath2sal in pCR [®] 2.1-TOPO [®]	adxhom2ath
pCR-dlaabr	PCR-Produkt aus pCR-dla mit bamdlaabr und dlasal in pCR [®] 2.1-TOPO [®]	adxhomdla
pCR-ath1mut	SOE-PCR-Produkt aus pCR-ath1abr (siehe Kap. 2.2.2.4) in pCR [®] 2.1-TOPO [®]	S53Δ-Mutante von adxhom1ath
pCR-dlamut	SOE-PCR-Produkt aus pCR-dlaabr (siehe Kap. 2.2.2.4) in pCR [®] 2.1-TOPO [®]	S53Δ-Mutante von adxhomdla
pBlue-adxhomdla	cDNA für ADXHOMDLA in pBluescript SK (+) mit den 3'- und 5'-untranslatierten Bereichen	padxhomdla
pTrc-ath1abr	Insert aus pCR-ath1abr nach <i>BamH I/Sal I</i> -Verdau subkloniert in pTrc99A	adxhom1ath
pTrc-ath2abr	Insert aus pCR-ath2abr nach <i>BamH I/Sal I</i> -Verdau subkloniert in pTrc99A	adxhom2ath
pTrc-dlaabr	Insert aus pCR-dlaabr nach <i>BamH I/Sal I</i> -Verdau subkloniert in pTrc99A	adxhomdla
pTrc-ath1mut	Insert aus pCR-ath1mut nach <i>BamH I/Sal I</i> -Verdau subkloniert in pTrc99A	S53Δ-Mutante von adxhom1ath
pTrc-dlamut	Insert aus pCR-dlamut nach <i>BamH I/Sal I</i> -Verdau subkloniert in pTrc99A	S53Δ-Mutante von adxhomdla

Tab. 1 — Die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Plasmide.

2.1.6 Primer

Die Primer pAS2-1seqpr, EcoRIAdx108, Adx108PstI, EcoRIAdx128, Adx128PstI, SCC1dir und SCC4rev wurden von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) synthetisiert. Alle anderen Primer stammten von der MWG-Biotech AG (Ebersberg).

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Bemerkungen
EcoRIAdx108	<u>gaatt</u> catggaagataaaataacag	<i>EcoR</i> I
Adx108PstI	ctgcagaggtactcgaacagtc	<i>Pst</i> I
EcoRIAdx128	<u>gaatt</u> catgggcagctcag	<i>EcoR</i> I
Adx128PstI	ctgcagttattctatccttgaggag	<i>Pst</i> I
SCC1dir	agatccccctcyctggtg	
SCC4rev	tgatggactcaaaggcaaag	
cpd-fwd	<u>gcatg</u> catggccttcaccgcttttc	<i>Sph</i> I
cpd-rev	<u>gtcgact</u> caagtagcaaaatcacggcg	<i>Sal</i> I
rot3-fwd	<u>gcatg</u> catgcaacctccggc	<i>Sph</i> I
rot3-rev	<u>gctgact</u> taatgatcttcaagtgagatcgg	<i>Sal</i> I
dwf4-fwd	<u>gcatg</u> catgttcgaaacagagcatc	<i>Sph</i> I
dwf4-rev	<u>gtcgact</u> ttacagaatacagaaaacc	<i>Sal</i> I
adxhom-fwd	<u>gcatg</u> catgctgcaaaggcaaactag	<i>Sph</i> I
adxhom-rev	<u>gtcgac</u> cttagtgaggttttggaacaaac	<i>Sal</i> I
bamath1	<u>ggatc</u> catgctgcaaaggcaaactag	<i>BamH</i> I
bamath1abr	<u>ggatc</u> catgactacctctgagaaaggtggc	<i>BamH</i> I
ath1sal	<u>gtcgac</u> cttagtgaggttttggaacaaac	<i>Sal</i> I
bamath2	<u>ggatc</u> catgatcgggtcataggatctcaag	<i>BamH</i> I
bamath2abr	<u>ggatc</u> catgacttctctgagaatgggtgatg	<i>BamH</i> I
ath2sal	<u>gtcgac</u> ctaataagggttttggaacaaacc	<i>Sal</i> I
bamdla	<u>ggatc</u> catgttcataatccagggtttacc	<i>BamH</i> I
bamdlaabr	<u>ggatc</u> catgctcgaatcagaagacggaag	<i>BamH</i> I
dlasal	<u>gtcgact</u> caatgaggttttggcttatgc	<i>Sal</i> I
ath1mutfwd	ctcgaaggggcatgtgaagggctagcgtgttcaacctgcc	<i>Nhe</i> I
ath1mutrev	ggcaggttgaacacgctagcccttcacatgccccttcagag	<i>Nhe</i> I
dlamutfwd	cttgaaggggcatgtgaagggctagccttgttccacttgtcatg	<i>Nhe</i> I
dlamutrev	catgacaagtggaacaagctagcccttcacatgccccttcaag	<i>Nhe</i> I

Tab. 2 — Die in dieser Arbeit verwendeten Primer. Unterstrichene Nukleotide geben die Restriktionsschnittstellen an. y=c+t.

Zur Überprüfung der hergestellten Plasmide wurden diese mit den folgenden Primern sequenziert. pAS2-1seqpr, adxintdla und 5trc wurden eigens synthetisiert (MWG-Biotech AG, Ebersberg), die übrigen standen im Biozentrum Halle zur Verfügung.

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Bemerkungen
pAS2-1seqpr	?tcatcgggaagagagtag	Sequenzierprimer (ALF)
adxintdla	ccttgcttggttccacttgatg	Sequenzierprimer (ABI)
5trc	?atgtgtggaattgtgagcgg	Sequenzierprimer (ALF)
T3	?attaaccctcactaaag	Sequenzierprimer (ALF)
T7	?taatacgaactcactatag	Sequenzierprimer (ALF)
Uni	?cgacgcttgtaaaacgacggccagt	Sequenzierprimer (ALF)
Reverse	?caggaaacagtatgac	Sequenzierprimer (ALF)
pQE(3/4)uni	?cggataacaatttcacacag	Sequenzierprimer (ALF)
pQERreverse	?gttctgaggtcattaactgg	Sequenzierprimer (ALF)

Tab. 3 — Die Sequenzierprimer. Fluoreszenzmarkierte Primer (Cy5) sind mit ? gekennzeichnet.

Folgende Primer wurden von Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Biologie der Universität Halle zur Verfügung gestellt.

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Bemerkungen
3βHSDfwd	<u>gcatgcatg</u> tcgtcaaagccaagggttg	<i>Sph</i> I, TEUBER 2002
3βHSDrev	<u>aagcttct</u> taacgcacgcagcgggtgaagc	<i>Hind</i> III, TEUBER 2002
AC1-5-DIR	gtgggttgagcagattgtc	B. GRUNER
AC1-5-REV	acccatgtgtcctttctttcttc	B. GRUNER
MM03/00	<u>gaattcatg</u> tcacatcggagaagggtt	<i>Eco</i> R I, M. METZNER
MM04/00	<u>ctcga</u> gctatcctgttctctttgat	<i>Xho</i> I, M. METZNER
P3	caagghtaytctggcatyagatttga	C. THOERINGER
P5	tgcttcaayttrrtgtgtcaaattrrtcagt	C. THOERINGER

Tab. 4 — Zur Verfügung gestellte Primer. Unterstrichene Nukleotide geben Restriktionsschnittstellen an. h=a+c+t, r=a+g, y=c+t.

2.1.7 Chemikalien, Enzyme etc.

2.1.7.1 Feinchemikalien

Biomol Feinchemikalien, Hamburg	Glycin, IPTG, Tris
Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe	Roti [®] -blue Kolloidale Coomassie-Färbung, X-Gal
Difco, Detroit, USA	Agar noble, Bacto [®] Peptone, Bacto [®] Trypton, Bacto [®] Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids
PerkinElmer Life sciences, Inc., Boston, USA	Easytides [α - ³² P] dATP
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Serva, Heidelberg	Agarose, Glycerol, Hefeextrakt, MOPS, Taurin, Triton X-100, Tween 20
Sigma, Deisenhofen	Adeninsulfat, BSA (Fraktion V), Deoxycholsäure, DEPC, DMF, DMSO, EDC, Gelatine, SDS

Hier nicht genannte Chemikalien wurden in analytischer Qualität von verschiedenen Händlern bezogen.

2.1.7.2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Inc., Beverly, USA bzw. Boehringer, Mannheim
Taq-Polymerase	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen bzw. Appligene-Oncor, Heidelberg
Pfu-Polymerase	Stratagene, Heidelberg bzw. Promega Corp., Madison, USA
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Inc., Beverly, USA bzw. peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

2.1.7.3 Kits

Invitrogen, Groningen, Niederlande	TOPO TA Cloning [®] -Kit
Pharmacia LKB, Piscataway, USA	mRNA Purification Kit
Qiagen GmbH, Hilden	QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick Nucleotide Removal Kit, QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN Plasmid Midi Kit, QIAGEN II Gel Extraction Kit
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	High Prime DNA Labeling Kit
Stratagene, La Jolla, USA	HybriZAP [®] -2.1 Two-Hybrid cDNA Synthesis Kit, PCR-Script [™] Amp Cloning Kit

2.1.7.4 Verbrauchsmaterial

Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, England	Hybond-N+ Nylonmembrane
Becton Dickinson Labware, Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, USA	FALCON [®] 14 mL Polystyrene Round-Bottom Tube 352057
Corning Inc., Corning, USA	50 mL Centrifuge Tubes 430829, 15 mL Centrifuge Tubes 430791
Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg	Safe-Lock 1,5 mL Reaktionsgefäße, Safe-Lock 2,0 mL Reaktionsgefäße, Safe-Lock 0,5 mL Reaktionsgefäße
Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich	Petrischalen 94/16, Petrischalen 145/20
Millipore Corp., Bedford, USA	Centrifugal Filter Device, 30 kDa
Pall Europe Limited, Portsmouth, England	Biodyne A Transfer Membrane 8,2 bzw. 13,2 cm Durchmesser

2.1.8 Geräte

Bio-imaging Analyzer System BAS-1500	Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokyo, Japan
Bruker ESP 300 Spectrometer	Bruker BioSpin Corp., Billerica, USA
Brutschrank B 6060	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
CCD Video Camera Module N50	Mitsubishi Electric Corporation, Kyoto, Japan
Centrifuge 5415 C Eppendorf	Gerätebau Eppendorf GmbH, Engelsdorf
DNA-Speed-Vac DNA 110	Savant Instruments, Farmingdale, USA
EasyCount QC 2000	Bioscan Inc., Washington DC, USA

Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Elektrophoresis Powersupply PHERO-stab 300	Biotech Fischer, Reiskirchen
Filmentwicklungsmaschine CURIX 60	AGFA medical, Mortsel, Belgien
Gene Quant II	Pharmacia Biotech, Freiburg
Heizplatte/Rührer RCT basic	IKA Labortechnik, Staufen
Herafreeze HFU586STD-V14	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Hitachi Preparative Ultracentrifuge himac CP 75β (Rotor P45AT)	Hitachi Koki Co., Ltd., Tokyo, Japan
Jasco 715 Spectropolarimeter	Jasco Inc., Easton, USA
innova 4230 (Schüttelinkubator)	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Kühlzelle	Viessmann, Hof
Kühlzentrifuge EBA 12 R	Hettich, Tuttlingen
Labormixer VF 2	IKA Labortechnik, Staufen
Laborwaage KERN 822-25	Gottlieb Kern & Sohn, Albstadt
Laborzentrifugen 3K10 und 3K12	Sigma, Osterode (Harz)
LaminAir [®] HB2472	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Laminar-flow-box NU-201-430E	Nuaire, Plymouth, USA
Mikrozentrifuge	Qualitron, Korea
Mini-Blot Modul EC140	Life Sciences International GmbH, Frankfurt
Mini-Hybridisierungsöfen OV1/OV2	Biometra, Göttingen
Mini-Vertical Gel System EC120	Life Sciences International GmbH, Frankfurt
MODULAB [®] Analytical Research Grade UF/Polishing System	Continental [®] Water Systems Corporation, San Antonio, USA
Monitor MP-40 H	Vilber Lourmat, Marne-La-Vallee Cedex 1, Frankreich
Osmostil Rol (Umkehrosmoseanlage)	Christ, Stuttgart
PHERO-sub 1, 2 und 3	Biotech Fischer, Reiskirchen
pH 537 pH-Meter	WTW, Weilheim
Rundschüttler KS 501 D	IKA Labortechnik, Staufen
Sartorius Basic	Sartorius, Göttingen
Schüttelinkubator 3032	GFL, Burgwedel
Schüttelwasserbad WB 22/SV 1422	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Sorvall [®] Combi Plus	DuPont Instruments, Bad Homburg
Sorvall [®] RC-5B	DuPont Instruments, Bad Homburg

T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermomixer 5436 und 5437	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Transilluminator Spectroline TC-312 A/F	Spectronics Corporation, Westbury, USA
Ultraschallbad Sonorex Super RK 103 K	Bandelin Electronic, Berlin
USD 30 Ultrasonic Disintegrator	Emich Ultraschall, Berlin
UV Stratalinker [®] 2400	Stratagene, Heidelberg
UV/Vis spectrophotometer Unicam 8625	ATI Unicam, England
UV-Vis Scanning Spectrophotometer UV2101PC	Shimadzu Corp., Kyoto, Japan
UV-Visible Recording Spectrophotometer UV-160A	Shimadzu Corp., Kyoto, Japan
Varioklav [®]	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Video Copy Processor P91E	Mitsubishi Electric Corporation, Kyoto, Japan
Wasserbad GFL 1083	GFL, Burgwedel

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.2.1.1 Photometrische Bestimmung

Die photometrischen Bestimmungen von Nukleinsäuren wurden am GENE QUANT II (Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Eine Extinktion von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm wurde einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ für DNA bzw. 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ für RNA gleichgesetzt. Als Qualitätsmerkmal diente der Proteinindex ($P_i = E_{260}/E_{280}$).

2.2.1.2 Ethidiumbromid-Plate-Assay

Hierbei wurde auf Agarosegel (0,8 %) in Petrischalen, das 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ethidiumbromid enthielt, je 0,5 μL einer Verdünnungsreihe von DNA bekannter Konzentration pipettiert. Zum Vergleich wurden 0,5 μL der DNA-Probe dazupipettiert. Nach 10-15 Minuten wurde auf dem Transilluminator ausgewertet. Die Intensität der Flecken erlaubte eine Abschätzung der DNA-Konzentration auch kleiner Volumina Nukleinsäurelösung.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, SAIKI et al. 1985, MULLIS & FALOONA 1987, SAIKI et al. 1988) wurde in verschiedenen Varianten zur Amplifikation von Nukleinsäuresequenzen genutzt.

2.2.2.1 Standard-PCR

Es kam ein Standardprotokoll zum Einsatz, das je nach konkreter Aufgabenstellung angepaßt wurde. Im Allgemeinen wurde *Taq*-DNA-Polymerase verwendet. Ein 20 µL-Ansatz enthielt 0,5 µL Polymerase ($2 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 2 µL Puffer, je 0,5 µL der beiden Primer ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 1 µL dNTP-Lösung (jeweils $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), das Template und steriles Wasser. Die verwendeten Primer waren häufig mit Restriktionsschnittstellen versehen, um die Amplifikate nach Zwischenklonierung in Expressionsplasmide klonieren zu können.

	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
35 Zyklen: Denaturierung	95 °C	45 s
Annealing	52 °C	45 s
Elongation	72 °C	1 min
Finale Elongation	72 °C	5 min
	4 °C	∞

Bei Verwendung von *Pfu*-Polymerase wurde aufgrund der geringeren Prozessivität die Elongationszeit verlängert (innerhalb der Zyklen auf 3 min, finale Elongation 10 min).

2.2.2.2 RT-PCR

Bei der RT-PCR wurde vor der Durchführung der PCR RNA mittels reverser Transkriptase in cDNA umgewandelt, die dann als Template zum Einsatz kam. Dabei wurde mRNA aus *Digitalis lanata* mit dem HybriZAP[®]-2.1 Two-Hybrid cDNA Synthesis Kit in cDNA umgewandelt. Diese cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.2.3 Colony-PCR

Bei der Colony-PCR dienten Kolonien von *E. coli* als Template. Da jeweils eine größere Anzahl von Kolonien überprüft wurden, konnte ein Master-Mix verwendet werden. Die Menge an Polymerase, Primer und dNTP-Lösung wurde reduziert. Die initiale Denaturierung wurde auf 10 min verlängert, wodurch die Bakterienzellen besser aufgeschlossen werden sollten. Alternativ wurden die in Wasser suspendierten Zellen je dreimal mit flüssigem Stickstoff und kochendem Wasser im Wechsel behandelt.

2.2.2.4 Mutagenese

Zur Generierung der Loop-Deletionsmutanten diente eine Variante des „*Splicing by Overlap Extension*“ (SOE, HO et al. 1989, HORTON et al. 1989).

Aus der Sequenz im Bereich der zu mutierenden Basen wurden zwei Primer so abgeleitet, daß sie die Mutation in der Mitte trugen und miteinander hybridisieren konnten. In einem ersten Schritt wurden durch die Kombination eines Mutationsprimers mit einem Primer aus der Anfangs- bzw. Endsequenz Teilamplifikate erzeugt. Nach Reinigung der Produkte durch elektrophoretische Trennung und Gelextraktion wurden diese mit den Anfangs- und Endprimern aber ohne Template einer weiteren PCR unterworfen. Die resultierende Sequenz wurde in den pCR-Vektor kloniert. Die Primer trugen außer der beabsichtigten Deletion von drei Basen zusätzlich eine stumme Mutation, die eine *Nhe* I-Schnittstelle schuf. Durch diese Schnittstelle konnten die Klone rationell auf Vorliegen der Mutation gescreent werden.

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

2.2.3.1 Elektrophorese von DNA

Die Größenauftrennung der DNA erfolgte in 0,8-2,0 %igen Agarosegelen. Die Agarosekonzentration wurde dabei den jeweiligen Fragmentgrößen angepaßt. Für Standardanwendungen wurden 1,25 %ige Agarosegele eingesetzt. Die Agarose wurde im jeweiligen Elektrophoresepuffer aufgeschmolzen, der etwas abgekühlten Lösung wurde Ethidiumbromid ($0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Endkonzentration im Gel) hinzugefügt und das Gel gegossen.

Die DNA-Proben wurden mit 10×Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 50 V bei Verwendung von TAE-Puffer und von 80-100 V bei Verwendung von TTE-Puffer. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde am UV-Tisch (Transilluminator TC-312 A/F, Spectroline) ausgewertet und das Ergebnis gegebenenfalls dokumentiert (CCD Video Camera Module N50 und Video Copy Processor P91E).

2.2.3.2 Elektrophorese von RNA

Die RNA-Proben wurden durch denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt. 3,6 g Agarose, 30 mL 10×MOPS-Puffer und 216 mL DEPC-Wasser wurden bis zur vollständigen Auflösung der Agarose erhitzt. Nach Abkühlung wurden 56 mL Formaldehyd zugegeben und das Gel gegossen.

Die RNA-Proben wurden mit dem dreifachen Volumen RNA-Probenpuffer und 0,4 Volumen 10×RNA-Stoppuffer versetzt und 15 min bei 65 °C denaturiert. Nach Abkühlung auf Eis wurden je 2 µL Ethidiumbromidlösung (0,1 mg·mL⁻¹) zugegeben und die Proben auf das Gel aufgetragen. Die angelegte Spannung betrug 100 V, der Puffer (1×MOPS) wurde mittels Pumpe umgewälzt.

2.2.4 Northern Blot

2.2.4.1 Blotten und Fixieren

Zur Untersuchung der organspezifischen Expression des *vertebrate-type* Ferredoxins in *Digitalis lanata* wurden RNA-Präparationen aus Blättern des ersten und zweiten Jahres, Kelch, Krone, Stengel und Wurzel gelelektrophoretisch getrennt und mit Hochsalzpuffer (20×SSC) auf eine Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, England) transferiert (SAMBROOK et al. 1989). Die an die Membran gebundene RNA wurde durch *cross-linking* kovalent gebunden. Dazu wurde die leicht getrocknete Membran zweimal mit 120 mJ im UV Stratalinker[®] 2400 (Stratagene, Heidelberg) behandelt.

2.2.4.2 Herstellung der Sonde

Als Sonde wurde die vollständige Sequenz des *vertebrate-type* Ferredoxins aus *Digitalis lanata* (vgl. Kap. 3.3.2.3) verwendet. Mit dem Plasmid pCR-dla als Template und den Primern bamdla und dlasal wurde ein PCR-Produkt erzeugt, das nach einer gelelektrophoretischen Trennung und Gelextraktion mit dem High Prime DNA Labeling Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) radioaktiv markiert wurde. Die Sonde wurde mit dem Nucleotide Removal Kit (Qiagen GmbH, Hilden) von nicht eingebauten Nucleotiden getrennt und anschließend zur Hybridisierung genutzt. Zur Herstellung einer Kontrollsonde wurde mit dem Plasmid pBD18 (DOBROWOLSKI et al. 1989) entsprechend verfahren.

2.2.4.3 Hybridisierung und Nachweis

Die Membran wurde zunächst bei 63 °C für 4 h in Church-Puffer (1 % BSA, 100 µg·mL⁻¹ denaturierte Heringssperma-DNA) vorhybridisiert. Danach wurde die durch Kochen denaturierte Sonde nach kurzer Inkubation auf Eis dazugegeben und über Nacht hybridisiert. Die Membran wurde gewaschen, bis die meßbare Radioaktivität nahezu konstant war (2×5 min, 2×SSC, 0,1 % SDS, Raumtemperatur; 2×15 min, 1×SSC, 0,1 % SDS, 55 °C; 1×15 min, 0,1×SSC, 0,1 % SDS, 55 °C). Dann wurde die Membran eingeschweißt und auf einem Screen exponiert. Nach 48 h wurde der Screen im PhosphorImagerTM (Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokyo, Japan) ausgewertet.

2.2.5 Gelextraktion

Zur Extraktion von Nucleinsäurebanden aus Agarosegelen dienen das QIAquick Gel Extraction Kit, das auf Adsorption der DNA an Silicagelmembranen beruht, sowie alternativ das QIAGEN II Gel Extraction Kit, das die Bindung der DNA an Glasmilch ausnutzt (beide Kits: Qiagen, Hilden).

2.2.6 Präparation von Plasmid-DNA

2.2.6.1 Mini-Präparation

Zur Gewinnung geringer Mengen Plasmid-DNA wurde die Methode der Alkalischen Lyse eingesetzt (BIRNBOIM & DOLY 1979, SAMBROOK et al. 1989).

2.2.6.2 Midi-Präparation

Hochreine Plasmid-DNA, die zur Sequenzierung eingesetzt werden sollte, wurde mit dem QIAGEN Plasmid Midi Kit präpariert, das die Methode der Alkalischen Lyse mit einem chromatographischen Schritt (Anionenaustauscher) kombiniert.

2.2.7 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmiden wurde durch A. PETERSON im Biozentrum Halle durchgeführt. Es kamen ein ALFexpress™ DNA Sequencer (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) bzw. ein ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt) zum Einsatz.

2.2.8 Restriktionsverdau der Plasmide

Der Restriktionsverdau erfolgte entsprechend der Herstellerangaben unter Verwendung der mitgelieferten Puffer. Bei gleichzeitigem Verdau mit zwei Restriktionsenzymen wurden zusätzlich die Hinweise des NEB-Kataloges (2000•01 Catalog & Technical Reference, S. 204) herangezogen.

2.2.9 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.2.9.1 TOPO TA Cloning®-Kit

Mit Hilfe des TOPO TA Cloning®-Kits wurden PCR-Produkte, die mit *Taq*-DNA-Polymerase amplifiziert worden waren, kloniert. War das PCR-Fragment durch *Pfu*-Polymerase generiert worden, wurde durch zehnmünütige Inkubation des Fragments mit

Taq-Polymerase bei 72 °C ein A-Überhang erzeugt. Erst dann konnte die Klonierung mit dem TOPO TA Cloning[®]-Kit erfolgen.

2.2.9.2 PCR-Script[™] Amp Cloning Kit

Zur direkten Klonierung von PCR-Fragmenten mit glatten Enden (bei Verwendung von *Pfu*-Polymerase) diene alternativ zum eben beschriebenen Verfahren die „*cut-ligation*“ (LIU & SCHWARTZ 1992, MÜLHARDT 2000). Bei dieser Methode wird eine im Vektor befindliche *Srf* I-Schnittstelle zur Ligation genutzt, gleichzeitig aber während der Ligation auch mit *Srf* I verdaut. Vektoren, in die das Fragment erfolgreich einligiert wurde, können nicht mehr geschnitten werden, da die Erkennungssequenz zerstört ist. Mit sich selbst ligierter Vektor wird hingegen wieder geschnitten, so daß der Anteil an Insert-tragenden Plasmiden steigt. *Srf* I ist eine Typ-II-Restriktionsendonuklease, die die Oktanukleotidsequenz 5'-GCCC↓GGGC-3' erkennt. Sie erzeugt glatte Enden (SIMCOX et al. 1991).

2.2.9.3 Klonierung in Expressionsplasmide

DNA-Fragmente, die durch Restriktionsverdau aus den entsprechenden Ausgangsplasmiden gewonnen wurden, konnten mit Hilfe der T4 DNA-Ligase in die ebenfalls verdauten Expressionsvektoren ligiert werden. Dabei wurden Insert und Vektor jeweils im Stoffmengenverhältnis von 10:1 kombiniert. Die Ligation wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, in der Regel bei 16 °C über Nacht, in Einzelfällen auch bis zu einer Woche bei 4 °C.

2.2.10 Transformation von Bakterien und Hefe

2.2.10.1 Transformation von *Escherichia coli*

Die Transformation von *Escherichia coli* erfolgte mit chemisch kompetenten Zellen durch Hitzeschock nach Standardmethoden (SAMBROOK et al. 1989).

2.2.10.2 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Zu 1 mL kompetenter *Saccharomyces-cerevisiae*-Zellen wurden jeweils 100 ng der Plasmide bzw. der entsprechenden Plasmidkombinationen gegeben. Anschließend wurde für 30 min bei 30 °C inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C für 8 min, dann wurde weitere 8 min auf Eis inkubiert und noch einmal für 8 min bei 42 °C gehalten. Die transformierten Zellen wurden in 50-mL-Falcon-Reaktionsgefäße überführt und mit 10 mL SD-Medium (incl. der entsprechenden 10×Dropout-Solution, siehe Tab. 5) eine Stunde lang bei 30 °C geschüttelt. Nach Zentrifugation (10 min, 4000 g, Raumtemperatur) wurde das Pellet in 500 µL SD-Medium aufgenommen und auf SD-Agar ausplattiert. Die Platten wurden bei 30 °C bis zum Erscheinen von Kolonien inkubiert.

SD-Medium

Difco yeast nitrogen base	0,67 %
Glucose	2,0 %
10×Dropout-Solution	10 %
D-Sorbitol	1 mol·L ⁻¹

Der pH-Wert wurde auf 5,8 eingestellt. Die Glucose wurde als filtersterilisierte 50 %ige Lösung zugegeben. Die jeweilige 10×Dropout-Solution wurde ebenfalls erst nach separater Sterilisierung zugegeben. SD-Agar enthielt 1,5 % Agar.

10×Dropout-Solution

Aminosäuren	Konzentration	pGAL4	p53	bait
L-Isoleucin	0,3 ‰			
L-Valin	1,5 ‰			
L-Adeninsulfat	0,2 ‰			
L-Arginin·HCl	0,2 ‰			
L-Histidin·HCl·H ₂ O	0,2 ‰			
L-Leucin	1,0 ‰	×		
L-Lysin	0,3 ‰			
L-Methionin	0,2 ‰			
L-Phenylalanin	0,5 ‰			
L-Threonin	2,0 ‰			
L-Tryptophan	0,2 ‰		×	×
L-Tyrosin	0,3 ‰			
L-Uracil	0,2 ‰			
L-Glutaminsäure	1,0 ‰			
L-Asparaginsäure	1,0 ‰			
L-Serin	4,0 ‰			

Tab. 5 — Zusammensetzung der jeweiligen 10×Dropout-Solution. Die gekennzeichneten Aminosäuren fehlten bei Ausplattierung von Hefen, die mit den angegebenen Plasmiden transformiert wurden, zu Selektionszwecken.

2.2.11 Herstellung kompetenter Zellen

2.2.11.1 Kompetente *Escherichia-coli*-Zellen

100 mL LB-Medium (15 mg·L⁻¹ Tetracyclin) wurden mit einer Kolonie frisch ausgestrichener XL1-Blue-MRF⁷-Zellen angeimpft. Bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde bei 37 °C im Brutschrank geschüttelt, danach 5 min auf Eis abgekühlt und 5 min bei 4 °C und 4000 g zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 30 mL eiskaltem Puffer TFB 1 resuspendiert und 90 min auf Eis inkubiert. Nach nochmaligem Zentrifugieren (5 min, 4000 g, 4 °C) wurde das Pellet in 4 mL eiskaltem Puffer TFB 2 aufgenommen, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die Kompetenz der hergestellten Zellen wurde durch Transformation mit pUC 18 überprüft.

TFB 1

RbCl	100 mmol·L ⁻¹
MnCl ₂	50 mmol·L ⁻¹
KCH ₃ COO	30 mmol·L ⁻¹
CaCl ₂	10 mmol·L ⁻¹
Glycerol	15 %

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 5,8 eingestellt und die Lösung sterilfiltriert.

TFB 2

MOPS	10 mmol·L ⁻¹
RbCl	10 mmol·L ⁻¹
CaCl ₂	75 mmol·L ⁻¹
Glycerol	15 %

Der pH-Wert der Lösung wurde mit KOH auf 6,8 eingestellt und sterilfiltriert.

2.2.11.2 Kompetente *Saccharomyces-cerevisiae*-Zellen

500 mL YPAD-Medium wurden mit einer Übernachtskultur von YRG-2-Zellen angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 4000 g, Raumtemperatur) wurden die Zellen mit 100 mL sterilem

Wasser gewaschen und abermals zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 mL LiSORB aufgenommen und für 30 min bei 30 °C in einem Wasserbad inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 2600 g, Raumtemperatur) wurden die Hefezellen in 250 µL LiSORB resuspendiert und mit LiSORB auf 1 mL aufgefüllt. 200 µL Heringssperma-DNA (20 mg·mL⁻¹) wurden für 5 min gekocht, um sie zu denaturieren und mit 800 µL LiSORB gemischt. Die auf Raumtemperatur abgekühlte Lösung wurde zu den Hefezellen gegeben und gut gemischt. Zu der erhaltenen Suspension wurden 9 mL der PEG-Lösung hinzugefügt und zu je 1 mL aliquotiert.

LiSORB

LiCH ₃ COO	100 mmol·L ⁻¹
Tris	10 mmol·L ⁻¹
EDTA	1 mmol·L ⁻¹
Sorbitol	1 mol·L ⁻¹

Der pH-Wert wurde vor dem Sterilisieren auf 8,0 eingestellt.

PEG-Lösung

LiCH ₃ COO	100 mmol·L ⁻¹
Tris	10 mmol·L ⁻¹
EDTA	1 mmol·L ⁻¹
PEG 3350	40 %

Der pH-Wert der Lösung wurde auf 7,5 eingestellt, anschließend wurde filtersterilisiert.

2.2.12 RNA-Extraktion

2.2.12.1 Extraktion der Gesamt-RNA

Die frischen Pflanzen wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, im Mörser zu Pulver zerrieben und unverzüglich der RNA-Extraktion unterworfen.

Die Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte nach einer durch DUMKE-LEHMANN modifizierten Standardmethode (SAMBROOK et al. 1989, DUMKE-LEHMANN 1993).

2.2.12.2 Aufreinigung der mRNA

Zur Anreicherung der polyadenylierten RNA diente das mRNA Purification Kit (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, USA). Es wurde nach den beigefügten Instruktionen verfahren, um nach zweistufiger Reinigung eine zu ca. 90 % aus mRNA bestehende Präparation zu erhalten.

2.2.13 Synthese der HybriZAP[®]-2.1 Two-Hybrid-cDNA-Bank

Die Herstellung der Two-Hybrid-cDNA-Bank folgte im Wesentlichen dem Instruction Manual (Manual #235612-12, Stratagene, La Jolla, USA). Auf die radioaktive Kontrolle wurde verzichtet.

2.2.13.1 cDNA-Synthese

10 µL der nach Kapitel 2.2.12.2 erhaltenen mRNA wurden zur Erststrangsynthese mittels *Moloney Murine Leukemia Virus* Reverse Transkriptase (MMLV-RT) eingesetzt. Der verwendete Linker-Primer enthielt eine *Xho* I-Schnittstelle. Der Komplex aus Erststrang und RNA wurde mit RNase H behandelt, danach mit DNA-Polymerase I der Zweitstrang synthetisiert. Anschließend wurden durch *Pfu*-Polymerase glatte Enden erzeugt. An diese Enden wurden nach einem Phenol-Chloroform-Reinigungsschritt und Fällung der cDNA *EcoR* I-Adapter ligiert und diese phosphoryliert. Nach Verdau mit *Xho* I wurde eine Größentrennung mit CL-4B Sepharose durchgeführt.

2.2.13.2 Ligation der cDNA in den HybriZAP-2.1 Vektor und Verpackung der Phagenpartikel

1 µL der cDNA wurde in den HybriZAP-2.1 Vektor ligiert. Das Reaktionsgemisch wurde bei 12 °C über Nacht inkubiert. Für die Verpackungsreaktion wurden 2 µL dieser Ligationsreaktion eingesetzt. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 500 µL SM-Puffer und 20 µL Chloroform hinzugefügt. Damit war die Primärbank bereit zur Bestimmung des Titors und zur Amplifikation. Sie wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.13.3 Amplifikation der cDNA-Bank

Frisch präparierte XL1-Blue MRF[']-Zellen wurden in 10 mmol·L⁻¹ MgSO₄ auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt. 600 µL dieser Suspension wurden mit 25 µL der Primärbank für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden dann mit 6,5 ml NZY-Top-Agar auf 150-mm-NZY-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden 8 Stunden bei 37 °C inkubiert, bis die Plaques sich gerade berührten. Zur Amplifikation der Primärbank wurden 20 Platten verwendet.

Jede Platte wurde mit 10 mL SM-Puffer überschichtet und bei 4 °C über Nacht leicht geschüttelt. Nach Abpipettieren des Puffers wurde noch einmal mit 2,5 mL SM-Puffer gespült. Die vereinigten Phageneluate wurden mit 25 % Chloroform versetzt und zentrifugiert. Die obere Phase wurde mit 0,3 % Chloroform und 7 % DMSO gemischt und Aliquots bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.14 Exzision von λ-Banken

Zur Transformation der Hefe mit der cDNA-Bank ist es erforderlich, die Phagen-DNA der ursprünglich hergestellten Bank in ihre jeweiligen Plasmide zu überführen. Auch die positiven Phagen des radioaktiven Screenings wurden vor ihrer Analyse in Plasmide umgewandelt.

2.2.14.1 Massenexzision

Um die gesamte cDNA-Bank zu exzidieren, wurden 1·10⁷ pfu der Bank mit 1·10⁸ XL1-Blue MRF[']-Zellen und 1·10⁹ pfu des ExAssist Helferphagen kombiniert. Diese Mischung wurde 15 min bei 37 °C inkubiert, anschließend wurden 20 mL LB-Medium zugegeben und weitere 3 h bei 37 °C geschüttelt. Die Kultur wurde für 20 min auf 70 °C erwärmt, um die Phagen und XL1-Blue MRF[']-Zellen zu lysieren. Nach Zentrifugation (10 min, 500 g) wurde der Überstand gewonnen und bei 4 °C aufbewahrt. Der Titer der exzidierten Phagemide wurde bestimmt (siehe Kap. 2.2.15.2).

2.2.14.2 Exzision einzelner Phagen

Ein isolierter Plaque wurde ausgestochen und mit 500 μL SM-Puffer und 20 μL Chloroform versetzt. Nach kurzem Schütteln wurde für 8 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Phagenlösung wurde bei 4 $^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. 200 μL der XL1-Blue MRF[']-Zellen ($\text{OD}_{600}=1,0$) wurden mit 500 μL der Phagenlösung und 1 μL des ExAssist Helferphagen versetzt. Nach 15minütiger Inkubation bei 37 $^{\circ}\text{C}$ wurden 5 mL LB-Medium hinzugefügt und über Nacht weiter geschüttelt. Lyse der Phagen und Bakterien erfolgte wie bei der Massenexzision.

2.2.15 Titerbestimmung von cDNA-Banken

2.2.15.1 Titerbestimmung der λ -Banken

Je 1 μL einer Reihe von Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) der cDNA-Bank in SM-Puffer wurde mit 200 μL XL1-Blue MRF[']-Zellen ($\text{OD}_{600}=0,5$) versetzt und 15 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach Zugabe von 3 mL NZY-Top-Agar wurde auf NZY-Agarplatten ausplattiert. Nach 8 h Inkubation bei 37 $^{\circ}\text{C}$ wurde die Anzahl der Plaques gezählt und daraus der Titer berechnet.

2.2.15.2 Titerbestimmung der exzidierten Bank

Dekadische Verdünnungen der Phagemidlösungen in TE-Puffer wurden mit 200 μL XL0LR-Zellen ($\text{OD}_{600}=1,0$) kombiniert und 15 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde auf LB-Agarplatten (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ampicillin) ausplattiert. Am nächsten Tag wurde die Anzahl der Ampicillin-resistenten Kolonien und damit der Titer der Phagemid-Präparation bestimmt.

2.2.16 Two-Hybrid-Screening der cDNA-Bank

2.2.16.1 Überprüfung von pBD-Adx128 auf Transaktivierung

Kompetente Hefezellen wurden jeweils mit den Kontrollplasmiden pGAL4 (Positivkontrolle), p53 (Negativkontrolle) und mit dem *bait*-Plasmid pBD-Adx128 transformiert.

Auf eine SD-Agarplatte (10×Dropout-Solution unter Zusatz aller Aminosäuren) wurden Kolonien aller drei Transformationsansätze ausgestrichen, die auf dem jeweiligen Selektivmedium gewachsen waren. Nach dreitägigem Wachstum bei 30 °C wurde der Filter-Lift-Assay durchgeführt. In eine sterile Petrischale wurden 1,8 mL Z-Puffer+X und ein steriles Filterpapier gegeben. Ein ebenfalls steriles Filterpapier wurde auf die SD-Agarplatte gelegt und mit einem Drigalskispatel angedrückt. Nach 2 min wurde der Filter abgezogen, nachdem die Position eindeutig markiert worden war. Das Filterpapier wurde 10 s in flüssigen Stickstoff getaucht, um die Hefezellen zu permeabilisieren. Mit den anhaftenden Kolonien nach oben wurde der Filter auf ein Filterpapier zum Tauen gelegt. Anschließend wurde er auf den mit Z-Puffer+X getränkten Filter plaziert und die Entwicklung der Blaufärbung beobachtet.

Z-Puffer+X

Z-Puffer	98 %
β-Mercaptoethanol	0,33 %
X-Gal-Stammlösung	1,67 %

Der Puffer wurde vor Gebrauch frisch hergestellt.

Z-Puffer

Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	60 mmol·L ⁻¹
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	40 mmol·L ⁻¹
KCl	10 mmol·L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 mmol·L ⁻¹

Vor dem Sterilisieren wurde der pH-Wert überprüft und gegebenenfalls auf 7,0 eingestellt. Der Puffer wurde bei 4 °C aufbewahrt.

X-Gal-Stammlösung

X-Gal in DMF	20 mg·mL ⁻¹
--------------	------------------------

Die Stammlösung wurde bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.17 Radioaktives Screening der Blatt-cDNA-Bank (WERLE 1995)

2.2.17.1 Ausplattieren der Bank

Es wurden 2 µL einer 1:70-Verdünnung (entsprechend $5 \cdot 10^4$ pfu) der Blatt-cDNA-Bank (WERLE 1995) für jede der Petrischalen ausplattiert. Die weitere Vorgehensweise entsprach dem in Kap. 2.2.15.1 beschriebenen Verfahren.

Für das Screening mit einem cDNA-Sequenzfragment von CYP11A1 aus *Bos taurus* als Sonde wurden 5 Platten verwendet, für die cpd-Sonde 2 Platten und für die Sonde padxhom1ath 4 Platten.

2.2.17.2 Transfer der Klone auf die Filter

Nachdem die Plaques zu einer ausreichenden Größe herangewachsen waren, wurden die Agar-Platten zunächst mindestens 2 h kaltgestellt. Danach wurden je 2 Filter von jeder Platte gezogen. Der erste Filter wurde 1 min, der zweite 3 min aufgelegt. Durch Einstechen einer in Tusche getauchten Kanüle wurde die Lage der Filter auf den Platten markiert. Die Filter wurden 5 min denaturiert, 5 min neutralisiert und dann mit 2×SSC äquilibriert. Dazwischen wurde jeweils kurz auf Filterpapier getrocknet. Anschließend wurde die DNA durch *cross-linking* (UV Stratalinker[®] 2400, Stratagene, Heidelberg) auf der Membran gebunden. Die Filter wurden bis zur weiteren Verwendung kühl gelagert.

Denaturierungslösung

NaOH	0,5 mol·L ⁻¹
NaCl	1,5 mol·L ⁻¹

Neutralisierungslösung pH 7,4

Tris	0,5 mol·L ⁻¹
NaCl	1,5 mol·L ⁻¹

2×SSC

NaCl	0,3 mol·L ⁻¹
Natriumcitrat	30 mmol·L ⁻¹

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

2.2.17.3 Templates zur Herstellung der Sonden

Aus dem Plasmid pTrc99A BSCCMc (CYP11A1, WADA et al. 1991) wurde mit den Primern SCC1fwd und SCC4rev ein 483 bp großes PCR-Fragment erzeugt, das als Sonde verwendet wurde.

Der EST-Klon GBGe71 (CPD, CYP90A1, SZEKERES et al. 1996) wurde mit *Apa* I und *EcoR* I verdaut und das ca. 750 bp große Fragment aus dem Gel extrahiert und anschließend radioaktiv markiert.

Die Sonde zum Screening nach *vertebrate-type* Ferredoxinen wurde mit Plasmid pCR-ath1 als Template und den Primern adxhom-fwd und adxhom-rev hergestellt. Sie ergaben ein PCR-Fragment mit einer Länge von 477 bp.

2.2.17.4 Markierung der Sonden

Jeweils ca. 50 ng der Template-DNA wurde zur Markierung mit dem High Prime DNA Labeling Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) eingesetzt. Die radioaktiv markierte Sonde wurde von den nicht eingebauten Desoxyribonucleosid-Triphosphaten mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen GmbH, Hilden) abgetrennt. Anschließend wurde die Sonde in 200 µL TE-Puffer eluiert und 1 µL der Lösung mit dem EasyCount QC 2000 (Bioscan Inc., Washington DC, USA) vermessen.

2.2.17.5 Hybridisierung und Detektion der Signale

Die Filter wurden ca. 4 h in Church-Puffer (1 % BSA, 100 µg·mL denaturierte Heringssperma-DNA) bei 63 °C vorhybridisiert. Die denaturierte Sonde wurde hinzugefügt und über Nacht hybridisiert. Die Filter wurden gewaschen (2×5 min, 2×SSC, 0,1 % SDS, Raumtemperatur; 2×15 min, 1×SSC, 0,1 % SDS, 55 °C; 1×15 min, 0,1×SSC, 0,1 % SDS, 55 °C). Nach dem Trocknen wurden die Filter 3 Tage lang auf Röntgenfilm exponiert. Durch Vergleich der Signale der Filterduplikate wurden positive Klone identifiziert. Deren

korrespondierende Plaques wurden ausgestochen und in SM-Puffer eluiert. Verdünnungen dieser Phagensuspension wurden einem Sekundärscreening unterzogen.

Church-Puffer (pH 7,2)

NaH ₂ PO ₄	0,5 mol·L ⁻¹
EDTA	1 mmol·L ⁻¹
SDS	7 %

2.2.17.6 Sekundärscreening

Die Phagensuspension wurde 1:10, 1:100 und 1:1000 mit SM-Puffer verdünnt und mit 3,5 mL Top-Agar auf kleine Petrischalen ausplattiert. Das weitere Vorgehen entsprach dem Primärscreening. Positive Einzelphagen wurden ausgestochen und exzidiert (siehe Kap. 2.2.14.2).

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Proteinexpression

Die Expression der Adrenodoxin homologen wurde leicht modifiziert nach der Methode für die Expression von Adx durchgeführt (UHLMANN et al. 1992). Dabei wurde der gesamte Transformationsansatz (vgl. Kap. 2.2.10.1) zum Animpfen einer Übernachtskultur (NB-Medium, 100 µg·mL⁻¹ Ampicillin) eingesetzt, die am folgenden Tag zum Ansetzen der Expressionskulturen genutzt wurde. 1 L NB-Medium (50 µg·mL⁻¹ Ampicillin) wurde mit 10 mL der Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-1,0 bei 37 °C geschüttelt. Zur Überprüfung der Expression wurde 1 mL der Kultur entnommen. Dann wurde mit IPTG (1 µmol·L⁻¹) induziert und bei 30 °C über Nacht exprimiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1 h, 5000 g, 4 °C) geerntet.

2.3.2 Proteinreinigung

2.3.2.1 Aufschluß der Zellen

Die Expressionszellen wurden entweder durch Ultraschall oder durch Lysozymverdau aufgeschlossen. Zum Aufschluß mit Ultraschall wurden die Zellen in der dreifachen Menge Lysispuffer suspendiert, mit 500 μL PMSF-Lösung ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ in Isopropanol) versetzt und 30 min lang im Eisbad beschallt (USD 30 Ultrasonic Disintegrator, Emich Ultraschall, Berlin, Programm 8). Nach 15 min Beschallung wurden nochmals 500 μL PMSF-Lösung zugegeben.

Der Aufschluß mittels Lysozym folgte dem Standardprotokoll (SAMBROOK et al. 1989).

Lysispuffer

Tris	$50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
EDTA	$1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

Der Puffer wurde vor dem Sterilisieren auf pH 8,5 eingestellt.

Programm 8

Sonotrodentyp 1, max. Amplitude 50, Zeit 30 min, Puls 10 s, Ratio 1 (Puls/Kühlung)

2.3.2.2 Säulenchromatographische Reinigung

Die lysierten Zellen wurden 20 min bei ca. 70500 g zentrifugiert (Hitachi Preparative Ultracentrifuge himac CP 75 β , Hitachi Koki Co., Ltd., Tokyo, Japan).

Vorversuche hatten ergeben, daß die pflanzlichen Proteine weniger stabil gegenüber der Ammoniumsulfatfällung waren. Daher wurde diese bei Adx verwendete Reinigungsstufe und im Zusammenhang damit auch die Hydrophobe Interaktionschromatographie unterlassen. Daher wurde das Zentrifugat verdünnt und direkt auf eine DEAE-Fractogel-Säule (16 mm Durchmesser, 15 cm Länge) aufgetragen. Die Säule wurde anschließend mit Puffer A gespült. Die gebundenen Proteine wurden durch ansteigende Salzkonzentrationen eluiert.

Puffer A (pH 7,5)

Tris	$20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
------	-------------------------------------

Puffer B (pH 7,5)

Tris	20 mmol·L ⁻¹
KCl	0,5 mol·L ⁻¹

Elutionsprogramm 0

0 mL →	0 % B	Fraktionen sammeln (4 mL)
300 mL →	100 % B	dto.
360 mL →	100 % B	dto.
360,1 mL →	0 % B	keine Fraktionen sammeln
500 mL →	0 % B	dto.

Die Flußrate betrug 2 mL·min⁻¹, entsprechend einem linearen Fluß von 1,0 cm·min⁻¹.

Die eluierten Fraktionen wurden spektrophotometrisch vermessen und der Q-Wert ($Q=E_{414}/E_{276}$) bestimmt. Die besten Fraktionen wurden vereinigt, verdünnt und nochmals auf eine DEAE-Fractogelsäule (9 mm Durchmesser, 10 cm Länge) aufgetragen. Anschließend wurde in ähnlicher Weise wie bei der ersten Säule mit Puffer A gespült und mittels ansteigender Salzkonzentration eluiert.

Elutionsprogramm 1

0 mL →	0 % B	Fraktionen sammeln (3 mL)
180 mL →	100 % B	dto.
240 mL →	100 % B	dto.
240,1 mL →	0 % B	keine Fraktionen sammeln
300 mL →	0 % B	dto.

Die Flußrate betrug 1 mL·min⁻¹, entsprechend einem linearen Fluß von 1,5 cm·min⁻¹.

Die nun gewonnenen Fraktionen wurden durch Ultrafiltration eingeeengt, mit etwas Glycerin versetzt und einer Größenausschlußchromatographie unterworfen (Sephadex G 50 fine, 16 mm Durchmesser, 60 cm Länge). Alternativ wurde die konzentrierte Lösung in die Probenschleife des GradiFrac[™] Systems gespritzt und auf eine HiLoad[™] 26/60 Sephacryl[®] S-200 High Resolution-Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) aufgetragen. Puffer A der Größenausschlußchromatographie entsprach 10 mmol·L⁻¹ Kaliumhydrogenphosphatpuffer pH 7,4.

Elutionsprogramm 2

0 mL →	0 % B	keine Fraktionen sammeln
100 mL →	0 % B	Fraktionen sammeln (4 mL)
300 mL →	0 % B	keine Fraktionen sammeln
400 mL →	0 % B	dto.

Die Flußrate betrug $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, entsprechend einem linearen Fluß von $0,2 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$.

Die Fraktionen mit den besten Q-Werten wurden vereinigt, konzentriert und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

2.3.3 Proteingele und Western Blotting

2.3.3.1 SDS-PAGE

Die Polyacrylamidgelelektrophoresen wurden nach der Vorschrift von LAEMMLI (1970) in leicht modifizierter Form durchgeführt (SAMBROOK et al., 1989). Es wurden Trenngele mit 15 % Acrylamid (pH 8,8) in Kombination mit 4 %igen Sammelgelen (pH 6,8) verwendet. Als Größenmarker kam der Prestained Protein Marker, Broad Range (New England Biolabs, Inc., Beverly, USA) zum Einsatz. Als Elektrophoreseapparatur wurde das Mini-Vertical Gel System EC120 (Life Sciences International GmbH, Frankfurt) verwendet.

Die gegossenen Trenngele wurden nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erzielen. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel gegossen.

Die Proben wurden mit Probenpuffer (LAEMMLI-Puffer) versetzt und vor dem Auftragen kurz aufgeköcht. Die Elektrophorese erfolgte bei Zimmertemperatur (200 V, 100 mA), die Trennung wurde beendet, wenn das Bromphenolblau den Rand des Gels erreicht hatte. Anschließend wurde mit Coomassie gefärbt. Die Gele wurden hierbei zunächst ca. 1 h in der Färbelösung geschüttelt und anschließend mit Entfärbelösung behandelt. In seltenen Fällen wurde eine Silberfärbung durchgeführt (BLUM et al. 1987). Zur Aufbewahrung wurden die Gele mindestens 30 min leicht in Trocknungslösung bewegt, in Cellophan eingespannt und getrocknet.

Verschiedene Ferredoxinproben wurden vor der Elektrophorese mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) behandelt ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h, $25 \text{ }^\circ\text{C}$).

Laemmli-Puffer

Glycerin	20 %
SDS	3 %
Mercaptoethanol	3 %
Bromphenolblau	0,05 %
Tris (pH 6,8)	0,0625 mol·L ⁻¹

10×Elektrophoresepuffer

Glycin	144 g·L ⁻¹
Tris	30 g·L ⁻¹
SDS	10 g·L ⁻¹

Coomassie-Färbelösung

Coomassie Brilliant Blau R 250	2,0 %
Coomassie Brilliant Blau G 250	0,5 %
Ethanol	42,5 %
Methanol	5,0 %
Essigsäure	10,0 %

Entfärbelösung

Methanol	45,0 %
Essigsäure	10,0 %

Trocknungslösung

Glycerol	6 %
Methanol	40 %
Essigsäure	10 %
Wasser	44 %

2.3.3.2 Western Blot

Die zur immunologischen Färbung bestimmten Gele wurden mit dem Mini-Blot Modul EC140 (Life Sciences International GmbH, Frankfurt) auf Immobilon PVDF Membranen (Millipore, Eschborn) übertragen. Die Gele wurden über Nacht geblottet (30 V, 15 mA), die Kammer wurde dabei im Eisbad gekühlt. Nach Blockieren der Membran mit unspezifischem Protein (Magermilchpulver) wurde der Blot mit dem Primärantikörper (1:1000) behandelt, nach Waschen mit dem Sekundärantikörper (1:10000). Die Detektion der mit dem Primärantikörper reagierenden Banden erfolgte durch eine Farbreaktion. Die mit dem Sekundärantikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase reagiert mit Nitroblau

Tetrazoliumchlorid (NBT) und 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (p-Toluidinsalz, BCIP) und erzeugt so einen blau-violetten Farbstoff.

2.3.3.3 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung wurde mit der Multiphor II Kammer (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Als Gel wurden Servalyt Precotes 3-10 verwendet. Als Marker kam der IEF Marker SERVA liquid zum Einsatz.

Die gesamte elektrophoretische Trennung wurde bei 8 °C durchgeführt. Nach Präfokussierung (1 h, 500 V) wurden die Proben aufgetragen und weitere 2 h fokussiert (800 V). Nach Fixierung in 20 % Trichloressigsäure wurde mit Coomassie gefärbt (siehe Kap. 2.3.3.1). Die isoelektrische Fokussierung wurde freundlicherweise von Susanne Böhmer (Universität des Saarlandes, Saarbrücken) durchgeführt.

2.3.4 Bestimmung des Redoxpotentials

Das Redoxpotential wurde spektrophotometrisch bestimmt (SLIGAR & GUNSALUS 1974). Dabei diente Safranin T als Photoreduktans und Farbindikator. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur unter weitgehendem Sauerstoffausschluß durchgeführt. Zur Entfernung von Resten an Sauerstoff diente ein System aus Katalase, Glucose und Glucoseoxidase. In einer Küvette (10 mm Pfad) wurde die Reaktionsmischung jeweils kurzzeitig Licht ausgesetzt und nach 2 min Äquilibration im Dunkeln das Spektrum aufgenommen. Die Photoreduktion wurde so oft wiederholt, bis die Spektren keine weitere Änderung zeigten (BECKERT et al. 1994).

Aus den Meßwerten bei 415 und 520 nm wurde das Redoxpotential berechnet (SLIGAR & GUNSALUS 1976).

2.3.5 SCC-Test

Die Fähigkeit der Ferredoxine, Elektronen auf CYP11A1 zu übertragen, wurde in einem Rekonstitutionssystem überprüft. Zum Vergleich wurde Adx der gleichen Reaktion unterworfen. Dazu wurden in Kaliumphosphatpuffer (20 mmol·L⁻¹, pH 7,4) AdR (0,5 µmol·L⁻¹), CYP11A1 (0,4 µmol·L⁻¹) und das jeweilige Ferredoxin (12 µmol·L⁻¹) mit Cholesterol (400 µmol·L⁻¹) kombiniert. Als NADPH-Regenerationssystem dienten

Glucose-6-phosphat ($5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (1 U) und MgCl_2 ($1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 nmol NADPH gestartet. Nach Inkubation für 30 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde die Reaktion durch 2 min Kochen gestoppt. Durch Behandlung mit Cholesteroxidase ($50 \text{ }\mu\text{g}$, 10 min, $37 \text{ }^\circ\text{C}$) wurden die Steroide in ihre jeweilige 4-en-3-on-Form überführt. Die Steroide wurden durch zweimalige Extraktion mit je $500 \text{ }\mu\text{L}$ Chloroform gewonnen und nach Abdampfen des Lösungsmittels in $200 \text{ }\mu\text{L}$ Acetonitril gelöst. $50 \text{ }\mu\text{L}$ dieser Lösung wurden mit Hilfe der HPLC untersucht. Es kam eine Nukleosil-C-18-Säule ($4\times 250 \text{ mm}$) zum Einsatz. Als Fließmittel diente ein Gemisch aus Acetonitril und 2-Propanol (15:1). Diese Messungen wurden jeweils dreimal durchgeführt. Die Elektronenübertragung im Rekonstitutionssystem wurde durch Dr. Frank Hannemann (Universität des Saarlandes, Saarbrücken) bestimmt.

2.4 Spektroskopische Methoden

2.4.1 UV-Vis-Spektroskopie

Die Spektren der Proteine im UV- und sichtbaren Bereich wurden bei Raumtemperatur an einem Shimadzu Doppelstrahl-Spectrophotometer UV2101PC (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) aufgenommen.

2.4.2 CD-Spektroskopie und Thermische Denaturierung

Zirkulardichroismus (*Circular Dichroism*, CD) beruht auf der unterschiedlichen Absorption von links- und rechtszirkular polarisiertem Licht. Da CD-Spektren von Makromolekülen wie z. B. Proteinen von deren Konformation abhängen, lassen sich mit ihrer Hilfe strukturelle Veränderungen verfolgen (GREENFIELD 1999).

Die CD-Spektren wurden an einem Jasco 715 Spectropolarimeter gemessen. Es wurden jeweils 3 Spektren akkumuliert. Die temperaturabhängigen Messungen des Zirkulardichroismus wurden bei einer Heizrate von $50 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{h}^{-1}$ in einem Bereich von $20 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $70 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Dabei wurde die Abnahme des CD-Signals bei 440 nm (oxidierte Form) bzw. 370 nm (reduzierte Form) aufgezeichnet.

2.4.3 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Elektronenspinresonanz (ESR) bzw. *Electron Paramagnetic Resonance* (EPR) wird zur Untersuchung paramagnetischer Substanzen eingesetzt. Voraussetzung dafür sind ungepaarte Elektronen (ROWLANDS & MURPHY 1999). Die im Eisen-Schwefel-Cluster enthaltenen Eisenatome machen es möglich, Adx mit Hilfe dieser Methode zu untersuchen.

Die EPR-Messungen wurden unter folgenden Bedingungen an einem Bruker ESP 300 Spectrometer bestimmt: Mikrowellenenergie 5-10 mW, Modulationsamplitude 0,4-1 mT, Scanrate 6,25 mT·min⁻¹, Zeitkonstante 0,3 s, Temperatur -196 °C. Die Proben wurden zuvor mit Dithionit reduziert. Die Messungen wurden freundlicherweise durch Dr. Frank Hannemann (Universität des Saarlandes, Saarbrücken) durchgeführt.

2.5 Analysen *in silico*

2.5.1 Homologiesuche

Die *Arabidopsis*-Datenbank wurde mit Hilfe von BLAST (ALTSCHUL et al. 1990) auf homologe Sequenzen des bovinen Adx untersucht. Das Sequence Retrieval System (<http://srs.ebi.ac.uk/>) diente ebenfalls der Suche nach entsprechenden Informationen.

2.5.2 Homologievergleich

Alignments wurden mit Hilfe der *Neighbour-Joining*-Methode (SAITOU & NEI 1987) durch ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>, THOMPSON et al. 1994) durchgeführt. Außerdem wurde die Fähigkeit des Programms genutzt, phylogenetische Diagramme zu erstellen.

2.5.3 Berechnung von Proteinmassen und isoelektrischen Punkten

Zur Berechnung der Proteinmassen und der isoelektrischen Punkte wurde das Programm Compute pI/Mw (http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html, BJELLQVIST et al. 1993) verwendet.

2.5.4 Überprüfung auf Signal- und Targeting-Peptide

Die Überprüfung der drei pflanzlichen Sequenzen der *vertebrate-type* Ferredoxine erfolgte mit Hilfe folgender Programme:

PSORT <http://psort.nibb.ac.jp/>

(NAKAI & KANEHISA 1992, HORTON & NAKAI 1996)

iPSORT <http://psort.nibb.ac.jp/>

(BANNAI et al. 2002)

MitoProt II 1.0a4 <http://www.mips.biochem.mpg.de/cgi-bin/proj/medgen/mitofilter>

(CLAROS & VINCENS 1996)

TargetP v1.01 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>

(NIELSEN et al. 1997, EMANUELSSON et al. 2000)

Predotar 0.5 <http://www.inra.fr/predotar/>

(PEETERS & SMALL 2001)

Zum Vergleich wurden auch beide Adx-Isoformen aus *Bos taurus* mit diesen Programmen untersucht, anstelle von PSORT wurde dabei PSORT II verwendet, welches speziell für Proteinsequenzen tierischer Herkunft entwickelt wurde.

2.5.5 Modellberechnungen

Ein Modell des Adrenodoxin homologen aus *Digitalis lanata* wurde unter Zuhilfenahme der Loop Search Engine der SYBYL 6.7 Subroutine BIOPOLYMER erstellt (Silicon Graphics Workstation O2, IRIX 6.5). Als Template wurde die Röntgenstruktur von Adx aus dem Komplex mit AdR (Protein Data Base: 1E6E) verwendet (MÜLLER et al. 2001). Dieses Template umfaßt die Aminosäuren von Asparaginsäure 5 bis Serin 117. Zwei Loops, aus einer GMP-Synthetase (1GPM, TESMER et al. 1996) und aus Cytochrom P450_{CAM} (2CP4, RAAG et al. 1991), wurden eingefügt. Nachfolgend wurde mit 1000 Wassermolekülen solvatisiert und 300 Schritte zur Energieminimierung angeschlossen. Dazu wurden der Conjugate Gradients-Algorithmus und das Tripos Force Field (SYBYL 6.5, Tripos Inc., 1699 South Henley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA) genutzt.

Die Informationen für das Template und die Loops des Proteins wurden der Protein Data Bank (BERMAN et al. 2000) entnommen.

Das Modell wurde in Zusammenarbeit mit Michael Lisurek (Universität des Saarlandes, Saarbrücken) erstellt.

2.5.6 Evaluierung des Modells

Das erhaltene Modell wurde mit verschiedenen Programmen auf seine Qualität überprüft. Dadurch sollten unterschiedliche Kriterien zur Bewertung der Güte des Modells herangezogen werden. Grundsätzlich wurde auch die Röntgenstruktur von Adx diesen Prüfungen unterzogen, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen.

Mit Hilfe von Procheck (LASKOWSKI et al. 1993) wurden die Winkel Φ und Ψ des Proteinmodells analysiert und ein Ramachandran-Plot erstellt. Durch die Energieminimierung, die nach der Generierung des Modells notwendig wird, können diese Winkel weniger favorisierte Werte annehmen.

Die Faltung des Proteins wurde mit Prosa II untersucht (SIPPL 1993a und b). Prosa II berechnet für das untersuchte Protein unter anderem einen *z-score*, der für native Proteine in einem charakteristischen Bereich liegt. Differenzen deuten daher auf strukturelle Probleme des Modells hin. Weiterhin wird durch das Programm ein Energiegraph erstellt.

Durch WHAT_CHECK (HOOFT et al. 1996), einem Teilprogramm von WHAT IF (www.cmbi.kun.nl/whatif/, VRIEND 1990, VRIEND & SANDER 1993, RODRIGUEZ et al. 1998), wurden die Seitenketten des Modells auf gegenseitige sterische Hinderung hin untersucht. Dies ist notwendig, da der Ersatz von Aminosäureseitenketten des Templates durch die entsprechenden Reste der Modellsequenz zu räumlicher Beeinflussung führen wird.

3 Ergebnisse

3.1 Two-Hybrid-Screening

3.1.1 Synthese der HybriZAP[®]-2.1 Two-Hybrid-cDNA-Bank

3.1.1.1 RNA-Extraktion und mRNA-Reinigung

Die RNA-Extraktion junger Blätter von *Digitalis lanata* ergab RNA in hoher Qualität ($P_i=1,956$ bzw. $1,768$) und ausreichender Menge, um eine mRNA-Reinigung durchführen zu können. Die Qualität wurde durch ein denaturierendes Formaldehyd-Gel bestätigt. Auf diesem Gel war keine nennenswerte Degradation der RNA feststellbar.

Nach der mRNA-Reinigung von $1,25$ mg Gesamt-RNA verblieben $41,5$ μg RNA, die laut Herstellerangaben zu ca. 90 % aus polyadenylierter RNA besteht.

3.1.1.2 cDNA-Synthese

Nach der Größenauftrennung der synthetisierten cDNA wurde die Konzentration der gewonnenen Fraktionen mit Hilfe des Ethidiumbromid-Plate-Assays (siehe Kap. 2.2.1.2) abgeschätzt, da die Fraktionsgröße für eine spektroskopische Bestimmung nicht ausreichte. Die Konzentration betrug ca. 100 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$.

3.1.1.3 Herstellung der Primärbank und Bestimmung des Titers

Nach Ligation und Verpackung des entstandenen λ -Vektors (der Primärbank), wurde der Titer dieser Bank zu ca. 2000 $\text{pfu}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ bestimmt. Der Anteil der Hintergrundplaques (Plaques, deren korrespondierende Phagen kein Insert tragen und die sich daher auf X-Gal-haltigem Nährmedium blau färben) betrug nicht mehr als etwa 1 %. Die Primärbank bestand aus ca. $1\cdot 10^6$ unabhängigen Klonen.

3.1.1.4 Amplifikation der HybriZAP[®]-2.1-Bank

Die ca. 200 mL der amplifizierten Bank wurden zum Teil aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt. Der Titer der HybriZAP[®]-2.1 Two-Hybrid-Bank wurde wiederum bestimmt und betrug ca. $2,5 \cdot 10^9$ pfu \cdot mL⁻¹.

3.1.1.5 Massenexzision der gesamten cDNA-Bank

Die cDNA-Bank wurde wie beschrieben (siehe Kap. 2.2.14.1) exzidiert und ihr Titer bestimmt. Dieser betrug ca. $1,5 \cdot 10^7$ cfu \cdot mL⁻¹.

3.1.2 Konstruktion des *bait*-Vektors

3.1.2.1 Amplifikation von Adx128 und Adx108

Durch Kombination der Primer EcoRIAdx108 und Adx108PstI mit pAS-Adx108 als Template und der Primer EcoRIAdx128 und Adx128PstI mit pAS-Adx128 als Template gelang es, die entsprechenden Fragmente gemeinsam mit den ausgewählten Schnittstellen zu amplifizieren und zu klonieren. Die Richtigkeit der Amplifikate wurde durch Sequenzierung untersucht. Im Fall von pCR-Adx128 wurde eine Punktmutation der Base 507 (entsprechend Valin 111 von Adx) festgestellt, was jedoch ohne Einfluß auf die Aminosäuresequenz blieb. Daher wurde darauf verzichtet, dieses Plasmid noch einmal zu generieren.

3.1.2.2 Klonierung der Fragmente in den *bait*-Vektor pBD-GAL4 Cam

Die Subklonierung der Fragmente in den Vektor pBD-GAL4 Cam verlief zunächst erfolgreich. Nur unter Verwendung kompetenter TOP10 F'-Zellen konnten Kolonien erhalten werden. Ausgewählte Kolonien wurden einer Colony-PCR unterzogen und positive Klone zur Plasmidpräparation verwendet. Da es bei den zu exprimierenden Fusionsproteinen besonders auf den korrekten Übergang von der DNA-bindenden Domäne auf das *bait*-Protein ankam, wurden die Vektoren wieder durch Sequenzierung überprüft. Nur für pBD-Adx128 ergab sich dabei ein brauchbarer Klon, bei pBD-Adx108 zeigten alle untersuchten Klone Verschiebungen im Leserahmen.

3.1.3 Durchführung des Screens

3.1.3.1 Transformation der Hefe mit dem *bait*-Vektor

Kompetente Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* wurden mit dem *bait*-Plasmid pBD-Adx128 und zu Kontrollzwecken mit pGAL4 und p53 transformiert. Expression des *bait*-Plasmids produziert ein Hybridprotein aus DNA-bindender Domäne von GAL 4 und dem reifen bovinen Adx. Das Plasmid pGAL4 codiert für den vollständigen Transkriptionsaktivator GAL4 und diente als Positivkontrolle. Plasmid p53 diente als Negativkontrolle. Es exprimiert die DNA-bindende Domäne von GAL4 als Hybrid mit den Aminosäuren 72-390 des Tumorantigens p53 der Maus. Die ausplattierten Zellen wuchsen auf dem jeweiligen Selektivmedium (siehe Kap. 2.2.10.2, Tab. 5).

3.1.3.2 Filter-Lift-Assay

Da das Two-Hybrid-System anfällig für falsch positive Ergebnisse ist, sollten alle Einzelkomponenten auf das Vorhandensein von Fehlerquellen überprüft werden. Daher wurde der *bait*-Vektor pBD-Adx128 separat durch Filter-Lift-Assay getestet.

Die Hefezellen, die mit pBD-Adx128 transformiert worden waren, zeigten im Filter-Lift-Assay eine Blaufärbung, die innerhalb des durch die Positiv- und Negativkontrollen begrenzten Zeitfensters erschien.

3.1.4 Überprüfung der HybriZAP[®]-2.1 Two-Hybrid-cDNA-Bank durch PCR

Die Kombination der cDNA-Bank mit verschiedenen Primerpaaren führte zur erfolgreichen Amplifikation von cDNA-Sequenzen des Adrenodoxin homologen (Präprotein 558 bp und reifes Protein 405 bp), der Δ^5 -3 β -Hydroxysteroid-dehydrogenase (3 β -HSD, 792 bp), des Parvulins 12.8 (Parv12.8, 369 bp) und von Sequenzfragmenten der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL, 428 bp) und des AcylCoA-bindenden Proteins 3 (ACBP 3, 111 bp).

Alle amplifizierten Fragmente zeigten eine Größe, wie sie theoretisch zu erwarten war. Keine Amplifikate ergaben sich für die ebenfalls getesteten Primerkombinationen von ACBP 4, Lanatosid-15'-O-acetylerase (LAE) und Cardenolid-16'-O-glucohydrolase I (CGH I).

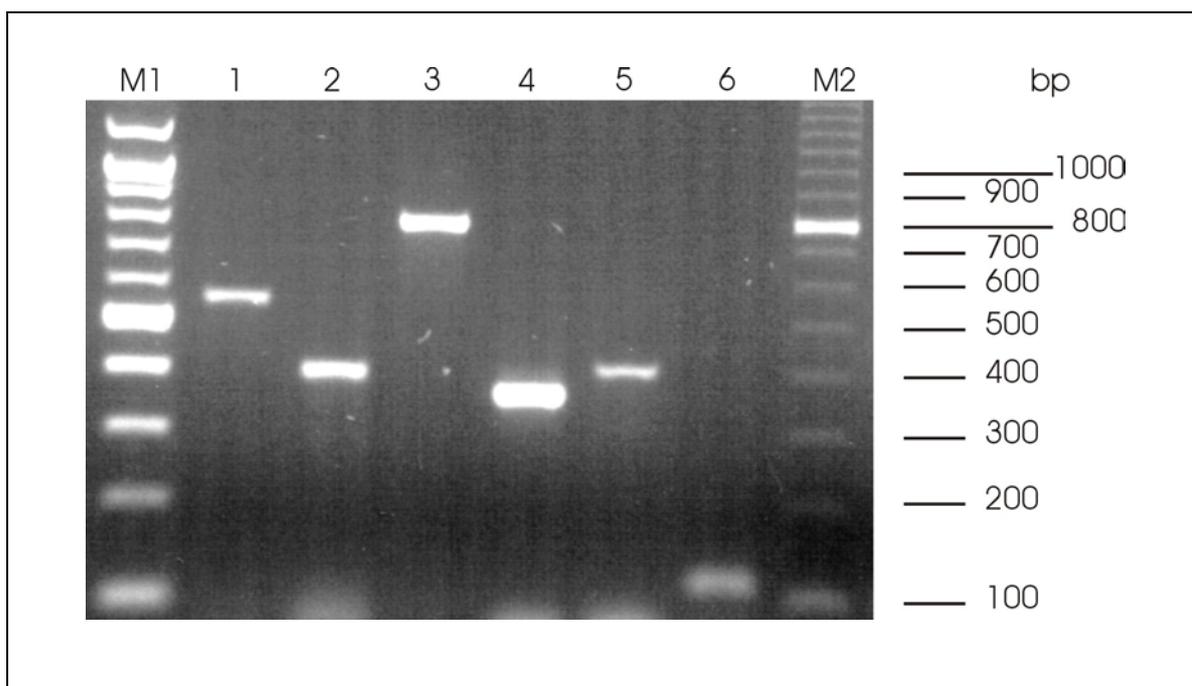


Abb. 7 — Agarosegel der PCR der HybriZAP[®]-2.1 Two-Hybrid-cDNA-Bank mit verschiedenen Primern (gefärbt mit Ethidiumbromid). 1 - padxhomdla, 2 - adxhomdla, 3 - 3 β -hsd, 4 - parv12.8, 5 - pal, 6 - acbp 3, M1 - 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs, Beverly, USA), M2 - 100 Base-Pair Ladder (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, England).

3.2 Screening der Blatt-cDNA-Bank aus *Digitalis lanata*

3.2.1 Ausplattieren der Bank

Der Titer der verwendeten cDNA-Bank aus Blättern von *Digitalis lanata* (WERLE 1995) betrug $1,8 \cdot 10^9$ pfu \cdot mL⁻¹. Die Ausplattierung von 2 μ L einer 1:70-Verdünnung ergab für jede Platte eine Anzahl von etwa 50000 Plaques.

3.2.2 cDNA-Sequenz von CYP11A1 aus *Bos taurus* als Sonde

Es wurden Filter von 5 Agarplatten gezogen, um sie auf das Vorkommen von Klonen mit Homologie zum bovinen CYP11A1 zu untersuchen.

Die Markierungseffizienz der verwendeten Sonde wurde durch Vermessung von 1 μ L der markierten Sonde überprüft. Es ergaben sich ca. 27000 cts \cdot min⁻¹, für das Gesamtvolumen von 200 μ L $5,4 \cdot 10^6$ cts \cdot min⁻¹.

Die Autoradiogramme der Filter ergaben keine Signale.

3.2.3 cpd als Sonde

Durch Verdau mit *Apa* I und *EcoR* I wurde ein ca. 750 bp großes Fragment aus dem EST-Klon GBGe71 erzeugt, das radioaktiv markiert wurde. Die Markierungseffizienz der gesamten Sonde wurde auf $12,1 \cdot 10^6$ cts·min⁻¹ bestimmt.

Da die Sonde die Nukleotidsequenz der Häm-Eisen-Ligandensignatur enthielt und daher eine hohe Anzahl positiver Signale zu erwarten war, wurden lediglich 2 Petrischalen mit ausplattierter Blatt-Bank (WERLE 1995) verwendet, um Filter zu ziehen. Es wurden 16 Plaques ausgestochen, die starken Signalen entsprachen, ebenso 16 Plaques, die schwachen Signalen zuzuordnen waren. In einer zweiten Screeningrunde wurden Verdünnungen der Phageneluate (1:10, 1:100, 1:1000) auf 80-mm-Petrischalen ausplattiert und mit der Sonde inkubiert. Die Plaques des Sekundärscreenings waren bereits so weit verteilt, daß Einzelplaques ausgestochen werden konnten. Durch *in-vivo*-Exzision wurden Plasmide erhalten, die nach Plasmidpräparation sequenziert wurden. Keiner der erhaltenen Sequenzen konnte eine Homologie zu cpd oder zu einem anderen Cytochrom P450 zugeordnet werden.

3.3 Untersuchung der *vertebrate-type* Ferredoxine aus *Arabidopsis thaliana* und *Digitalis lanata*

3.3.1 Die Sequenzen der *vertebrate-type* Ferredoxine aus *Arabidopsis thaliana*

Die vollständige Sequenzierung des Genoms von *Arabidopsis thaliana* (THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE 2000) bot die Grundlage für eine Suche nach Homologen des bovinen Adx. Das Genom von *Arabidopsis thaliana* enthält neben sechs Isoformen von *plant-type* Ferredoxinen auch zwei Isoformen von *vertebrate-type* Ferredoxinen. Diese dienen zur Ableitung von Primern, um die betreffenden Sequenzen mittels PCR amplifizieren zu können.

3.3.1.1 PCR-Amplifikation aus einer cDNA-Bank

Unter Verwendung der cDNA-Bank λ ACT 2-hybrid library (CD 4-22, KIM et al. 1997) als Template und der Primer adxhom-fwd und adxhom-rev gelang es, sowohl mit *Taq*- als

auch mit *Pfu*-Polymerase, PCR-Produkte von padxhom1ath zu erzeugen. Diese wurden erfolgreich in pCR[®]2.1-TOPO[®] (*Taq*-Polymerase) bzw. mit Hilfe des PCR-Script[™] Amp Cloning Kit in den pPCR-Script[™] Amp SK(+) Vektor (*Pfu*-Polymerase) kloniert (pCR-adxhom bzw. pPCR-adxhom).

In gleicher Weise diente die cDNA-Bank λ ACT 2-hybrid library CD 4-22 (KIM et al. 1997) als Template, um mit Hilfe der Primer bamath2, bamath2abr und ath2sal die Sequenzen des zweiten Adrenodoxin homologen (prä-Protein und reifes Protein) aus *Arabidopsis thaliana* zu amplifizieren und ebenfalls in pCR[®]2.1-TOPO[®] zu klonieren (pCR-ath2 bzw. pCR-ath2abr).

Sequenzierungen bestätigten die Identität der Amplifikate mit den bekannten Sequenzen.

3.3.2 Screening einer cDNA-Bank nach Sequenzen von *vertebrate-type* Ferredoxinen aus *Digitalis lanata*

3.3.2.1 Gewinnung der Sonde

Mit dem Plasmid pCR-adxhom als Template und der Primer adxhom-fwd und adxhom-rev wurde ein PCR-Fragment erzeugt, das markiert und als Sonde verwendet wurde. Das Ergebnis der Markierung betrug $15,1 \cdot 10^6$ cts \cdot min⁻¹.

3.3.2.2 Screening der cDNA-Bank (WERLE 1995)

Auf den Filtern, die von 4 Platten abgenommen wurden, erschienen zwei Signale. Beide wurden ausgestochen und für eine zweite Screeningrunde verwendet. Jeweils drei Verdünnungen (1:10, 1:100 und 1:1000) wurden auf 80-mm-Petrischalen ausplattiert. Das Ergebnis der Markierung der Sonde betrug diesmal $23,8 \cdot 10^6$ cts \cdot min⁻¹. Es konnten 20 gut separierte Plaques ausgestochen werden. Diese wurden mittels *in-vivo*-Exzision in Plasmide umgewandelt. Nach Plasmidpräparation wurden ausgewählte Klone sequenziert.

3.3.2.3 Sequenz des *vertebrate-type* Ferredoxins aus *Digitalis lanata*

Ein Klon des Bankscreenings wies Homologien zum bovinen Adx auf. Dieser Klon wurde mehrfach (von beiden Seiten und intern) sequenziert, um die Sequenz abzusichern.

Jede Base wurde mindestens dreimal bestätigt. Die Länge des Klons innerhalb der Adaptersequenzen betrug 1058 bp. Davon entfielen auf den codierenden Bereich 546 bp, 61 bp gehörten zum 5'-untranslatierten Bereich, 451 bp zum 3'-untranslatierten Bereich einschließlich der poly-(A)-Sequenz.

- <u>tcgatcttgcttgcgtaggaagtaggcagcctcggcgcttgctgattccagaccgaaggac</u> -	60
- <u>tatggtcatatccagggttaccgcccaaggaacttatacaatcaagaatttggtaaaagc</u> -	120
- M F I S R V Y R Q G T Y T I K N L V K A -	20
- caagtcttttgcacctagaacatcaatcttctctgtggttcgcaatcaacatttaccagt -	180
- K S F A P R T S I F S V V R N Q H L P V -	40
- cctgagaaatgaacattttagcagtagacaacagctaaactcgaatcagaagacggaagtga -	240
- L R N E H F S S T T A K L E S E D G S E -	60
- agaaactcagaaaataaatacaacatttgttgacaaggatggagaagagacgcatgttag -	300
- E T Q K I N T T F V D K D G E E T H V R -	80
- ggtcccagttggaatgtcaatgctagaagctgcacatgaaaatgacatagatcttgaagg -	360
- V P V G M S M L E A A H E N D I D L E G -	100
- ggcattggaagggctcccttgcttgttccacttgtcatgtcatagtgatggatgtcaacca -	420
- A C E G S L A C S T C H V I V M D V N Q -	120
- gtatacaaatttagcagatccaactgatgaggaaaatgacatgtagatcttgcatttgg -	480
- Y N K L A D P T D E E N D M L D L A F G -	140
- cctcacgaaacgtctcgttttgggctgtcaaataattgcaaagcctgaacttgatgggct -	540
- L T E T S R L G C Q I I A K P E L D G L -	160
- ccgtttagcacttcttctgctacacgaaattttgcgttgatgggcataagccaaaacc -	600
- R L A L P S A T R N F A V D G H K P K P -	180
- <u>tcattg</u> aaatcaacctcacagaagaaaatgaaaatagaagccttccggtgcagattgatt -	660
- H * -	181
- gtgaagaaactgaaatcatttttataatgtatgcaagcaaaggaagttccgaatcctgga -	720
- acgttgatcgaagagcgtatggcgattattcttcacgtaatcgagtcaatttttgtgccg -	780
- attaataaattcttgtagaggggcacgtgacatgatgccacatctactgttcctaat -	840
- cgcatttcgtttcatcaatgattattataagttgaattcttcaatccatctgagaaagag -	900
- acaaatgggtgtagctcaagatttgggttacattcatgttaaaccatggtgtctctgttac -	960
- ccggttgaatatattaactgtccaacatcatttgaatttggccttgaattatacatata -	1020
- aagatgataattctatcccttaaaaaaaaaaaaaaaaaa -	1058

Abb. 8 — Die Sequenz des cDNA-Klones des *vertebrate-type* Ferredoxins aus *Digitalis lanata*. Start- und Stopcodon sind unterstrichen, das Startmethionin fett gedruckt.

3.3.2.4 Organspezifische Expression des Adrenodoxinhomologen aus *Digitalis lanata*

Der Northern Blot läßt eine starke Expression des *vertebrate-type* Ferredoxins aus *Digitalis lanata* in den Kronblättern erkennen.

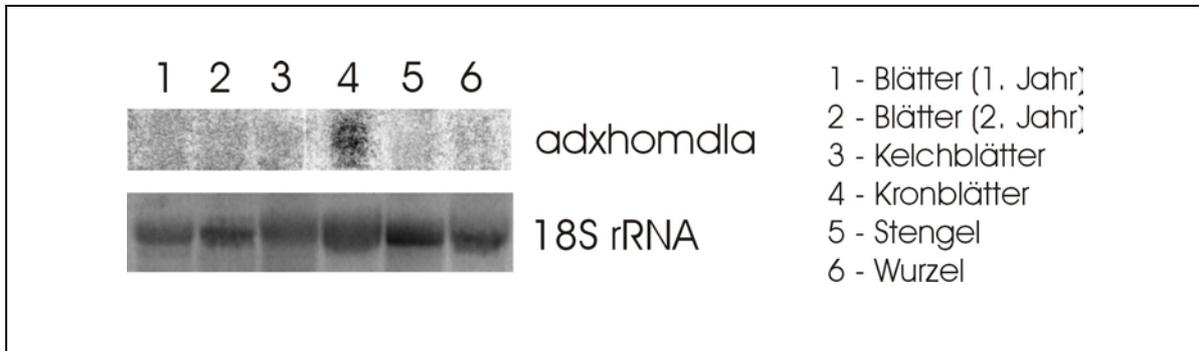


Abb. 9 — Northern Blot verschiedener Pflanzenteile von *Digitalis lanata*.

3.3.3 Mutagenese

Der Verdau der Plasmide mit *Nhe* I und die Sequenzierung zeigte, daß die Mutagenese erfolgreich verlief. Die Deletion von Ser 53 und Einfügung der *Nhe* I-Schnittstelle erfolgten plangemäß.

Die Abbildung zeigt die Teilamplifikate und die im zweiten PCR-Schritt gewonnenen, mutierten Fragmente, die anschließend erfolgreich ligiert und transformiert werden konnten. Die resultierenden Plasmide wurden als pCR-ath1mut und pCR-dlamut bezeichnet.

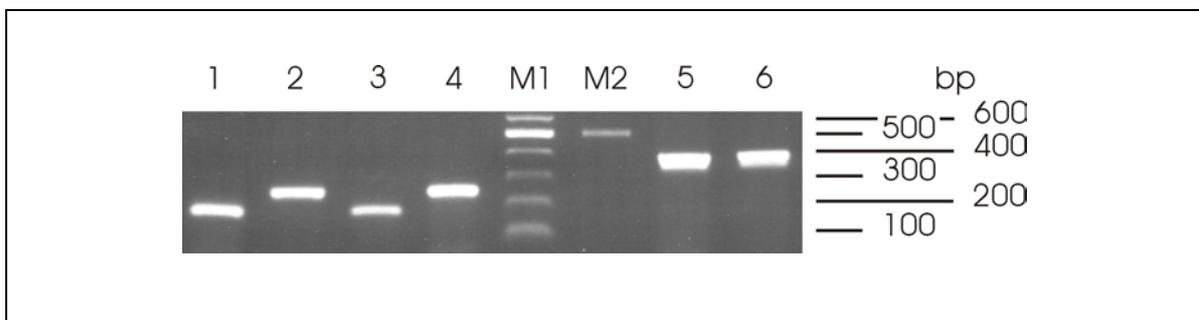


Abb. 10 — Agarosegel der SOE-PCR (gefärbt mit Ethidiumbromid). 1 - 3'-Fragment der Mutation von *adxhomlath*, 2 - 5'-Fragment der Mutation von *adxhomlath*, 3 - 3'-Fragment der Mutation von *adxhomdla*, 4 - 5'-Fragment der Mutation von *adxhomdla*, 5 - *adxhomlathmut*, 6 - *adxhomdlamut*, M1 - 2-Log DNA Ladder, M2 - 1 kb DNA Ladder (beide Marker New England Biolabs, Beverly, USA).

3.3.4 Konstruktion von Expressionsvektoren der pflanzlichen *vertebrate-type* Ferredoxine

Es wurden Expressionsvektoren der prä-Proteine und der reifen Proteine sowie der Mutanten generiert.

Aus pCR-*adxhom* wurden mit *bamath1*, *bamath1abr* und *ath1sal* PCR-Fragmente erzeugt, die zunächst in pCR[®] 2.1-TOPO[®] kloniert wurden (pCR-*ath1*, pCR-*ath1abr*). Auf die Generierung der Plasmide pCR-*ath2* und pCR-*ath2abr* wurde bereits eingegangen (siehe Kap. 3.3.1.1). Mit *bamdla*, *bamdlaabr* und *dlsal* wurden aus pBlue-*adxhomdla* die entsprechenden Amplifikate erzeugt und kloniert (pCR-*dla*, pCR-*dlaabr*). Nach Verdau der jeweiligen Plasmide mit *Bam*H I und *Sal* I wurden die Inserts erfolgreich in pTrc99A, pGEX 4T-1 und pQE-30 subkloniert.

3.3.4.1 Klonierung der Sequenzen in verschiedene Vektoren

Die Kombination der drei Expressionsplasmide (pTrc99A, pGEX 4T-1, pQE-30) mit acht Sequenzen für unterschiedliche Proteine (3 prä-Proteine, 3 reife Proteine und 2 Mutanten) ergab 24 verschiedene Vektoren. Von diesen wurden die Kombinationen mit pTrc99A vollständig und die Kombinationen der reifen Proteine sowie der Mutanten mit pGEX 4T-1 durch Sequenzierung überprüft und bestätigt.

3.3.5 Expression der Ferredoxine

Die Bakterienpellets der pflanzlichen Adrenodoxin homologen waren im Gegensatz zu den entsprechenden Pellets von Adx nicht rotbraun gefärbt. Sie zeigten die grünliche Färbung des Apo-Proteins. Die Bakterienpellets wurden daraufhin in Kaliumphosphatpuffer (10 mmol·L⁻¹, pH 8,0) resuspendiert und Dithioerythritol (DTE) bzw. Dithiothreitol (DTT) bis zu einer Endkonzentration von 2 µmol·L⁻¹ zugegeben. Nach mehrstündiger Inkubation auf Eis wurde wiederum zentrifugiert und das Pellet über Nacht bei -20 °C eingefroren. Durch diese Behandlung konnte eine deutliche Braunfärbung der Pellets erreicht werden.

3.3.6 Reinigung der Ferredoxine

Die *vertebrate-type* Ferredoxine aus *Arabidopsis thaliana* konnten in ausreichender Menge gereinigt werden. Die Q-Werte betragen 0,64 für ADXHOM1ATH bzw. 0,72 für ADXHOM2ATH. Die Ausbeute im Vergleich zur Expression des bovinen Adx betrug bis zu 10 %. Das Ferredoxin aus *Digitalis lanata* wurde im Gegensatz dazu ebenso wie die Deletionsmutanten nicht zufriedenstellend exprimiert. Auch durch die oben beschriebene Behandlung mit DTE bzw. DTT konnte keine Verbesserung erreicht werden. Da Erfahrungen mit dem prä-Protein des bovinen Adx zeigten, daß sich dieses schlechter als reifes Protein exprimieren läßt (Bildung von *inclusion bodies*, GODER et al. 1998), wurde auf die Expression der prä-Proteine der pflanzlichen *vertebrate-type* Ferredoxine verzichtet.

3.3.7 Charakterisierung von ADXHOM1ATH und ADXHOM2ATH

3.3.7.1 SDS-PAGE und isoelektrische Fokussierung

Die SDS-Gele der Adrenodoxin homologen (Abb. 11) zeigen im Fall von ADXHOM2ATH eine Bande in einer Größe, die auf Dimerbildung schließen läßt.

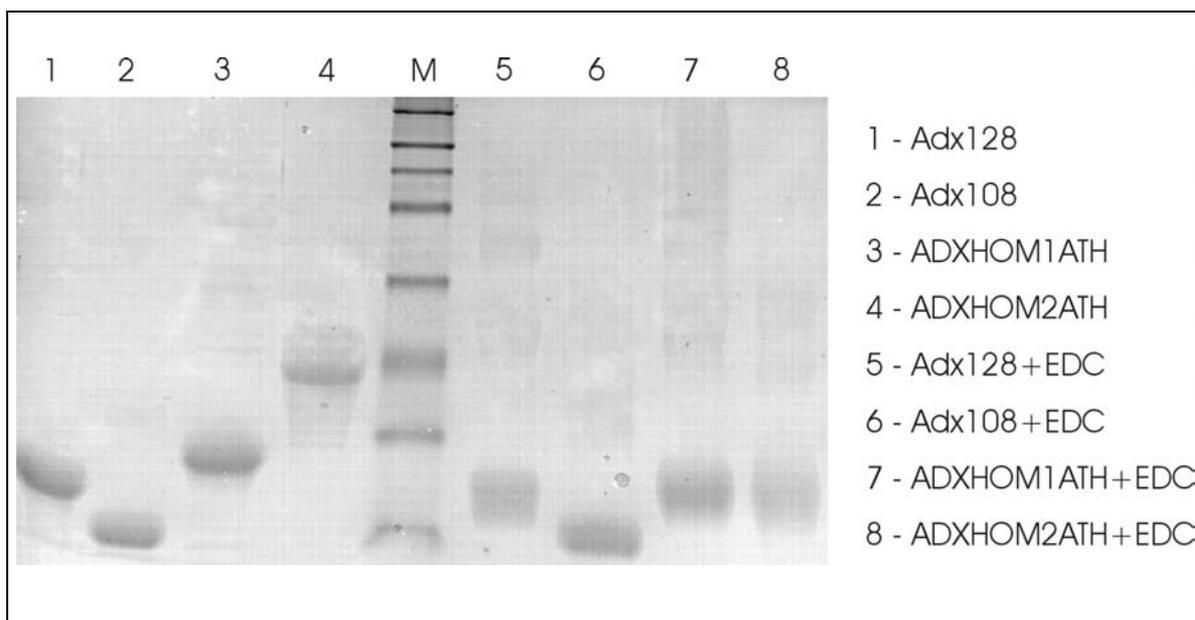


Abb. 11 — SDS-Gel der Ferredoxine (Coomassie-gefärbt). M - Prestained Protein Marker, Broad Range (New England Biolabs, Beverly, USA). Markerproteine: MBP- β -Galactosidase (175 kDa), MBP-Paramyosin (83 kDa), Glutamindehydrogenase (62 kDa), Aldolase (47,5 kDa), Triosephosphatisomerase (32,5 kDa), β -Lactoglobulin A (25 kDa), Lysozym (16,5 kDa), Aprotinin (6,5 kDa).

Bei Zugabe von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) erscheinen die Banden an der Stelle, die für das Monomer zu erwarten sind. Die beiden Proteine aus *Arabidopsis thaliana* laufen nach EDC-Behandlung in einer Höhe mit dem bovinen Adx.

Das Gel der isoelektrischen Fokussierung zeigt die Banden von Adx, ADXHOM1ATH und ADXHOM2ATH im pH-Bereich um 4,2 (Abb. 12). Das gesamte Gel, von dem nur ein Ausschnitt gezeigt ist, umfaßte den Bereich von pH 3 bis pH 10. Außer den Banden der Ferredoxine, die in der Abbildung gezeigt sind, waren keine weiteren zu detektieren.

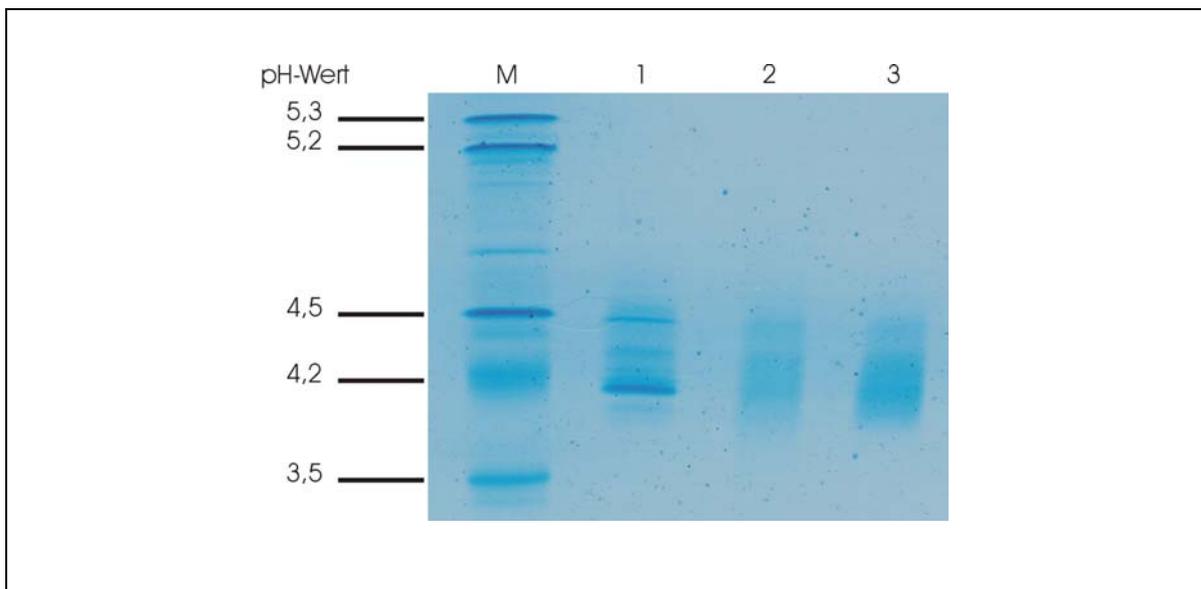


Abb. 12 — Isoelektrische Fokussierung von Adx und der *vertebrate-type* Ferredoxine aus *Arabidopsis thaliana*. 1 - Adx, 2 - ADXHOM1ATH, 3 - ADXHOM2ATH, M - IEF Marker SERVA liquid.

3.3.7.2 UV-Vis-Spektren

Die UV-Vis-Spektren von ADXHOM1ATH und ADXHOM2ATH zeigen die typischen Merkmale eines [2Fe-2S]-Ferredoxins. Im Vergleich zu Adx sind die beiden Maxima bei 414 und 454 nm minimal zu längeren Wellenlängen verschoben. Auch der Doppelpack zwischen 290 und 370 nm zeigt Veränderungen, Maximum und Schulter sind im Vergleich zu Adx vertauscht.

Bei 276 nm zeigen sich deutlich höhere Werte bei den Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* als bei bovinem Adx. Das schlägt sich in den geringeren Q-Werten nieder, die für die pflanzlichen Ferredoxine zu erzielen waren.

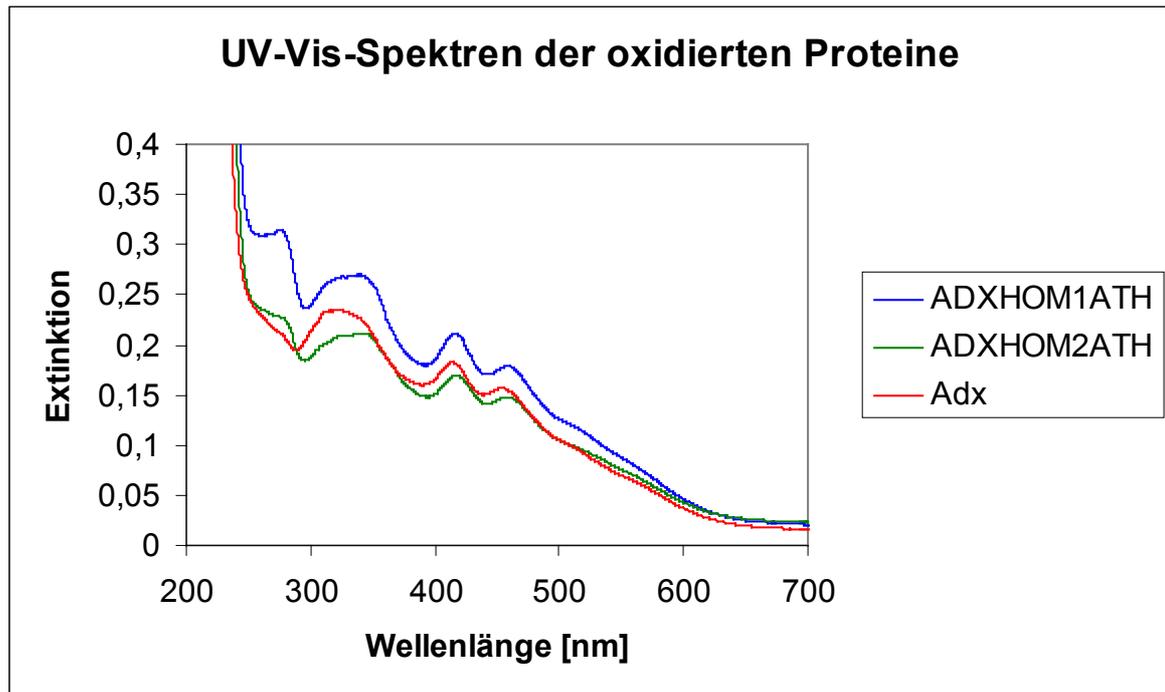


Abb. 13 — Die UV-Vis-Spektren der *vertebrate-type* Ferredoxine aus *Arabidopsis thaliana* und *Bos taurus*.

Im reduzierten Zustand zeigen die Spektren ebenfalls hohe Ähnlichkeit. Auch hier stehen geringen individuellen Unterschieden der einzelnen Proteine Übereinstimmungen im Ganzen gegenüber.

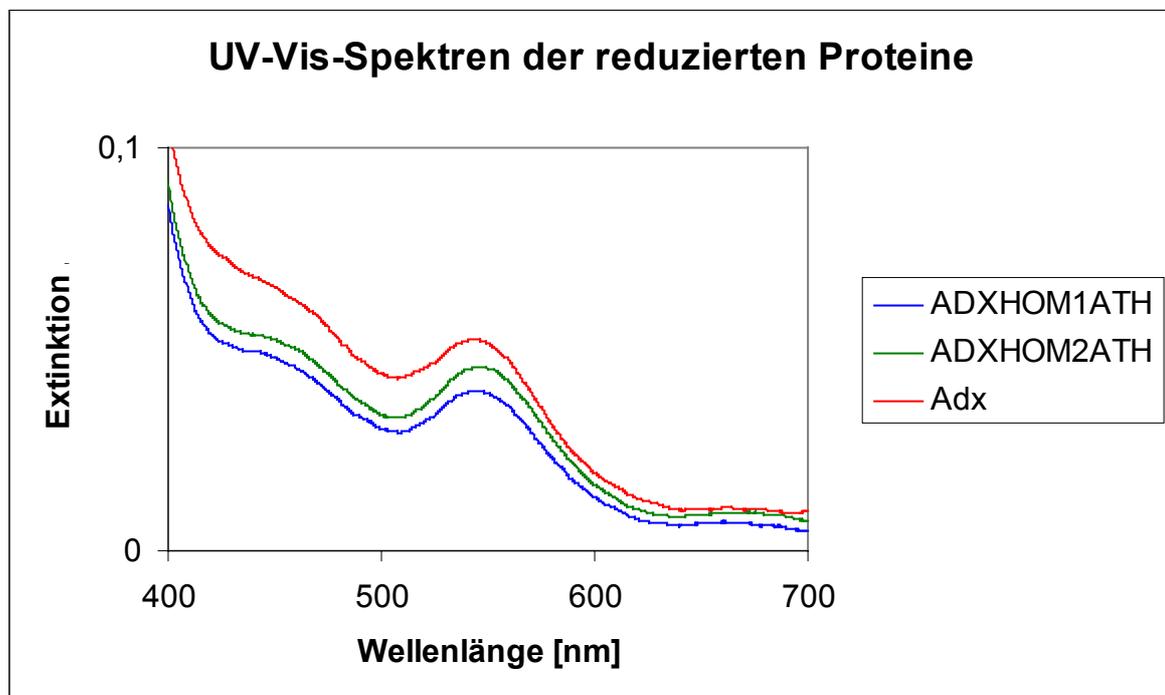


Abb. 14 — UV-Vis-Spektren der *vertebrate-type* Ferredoxine aus *Arabidopsis thaliana* und *Bos taurus*, durch Natriumdithionit reduziert.

3.3.7.3 CD-Spektren

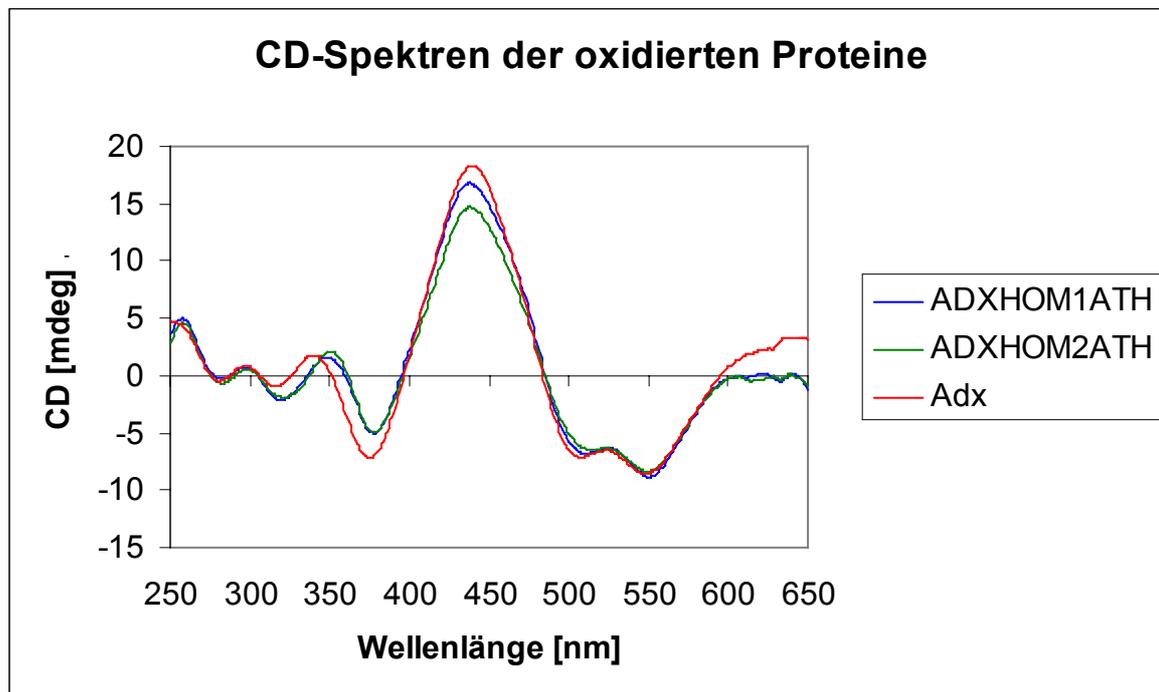


Abb. 15 — CD-Spektren der *vertebrate-type* Ferredoxine aus *Arabidopsis thaliana* und *Bos taurus*. Die Proteine wurden im oxidierten Zustand vermessen.

Die CD-Spektren der Ferredoxine aus *Arabidopsis thaliana* weisen untereinander höhere Ähnlichkeit auf als mit Adx. Die Veränderungen beschränken sich im Wesentlichen auf die deutliche Verschiebung des Nebenmaximums bei 339 nm nach 348 nm (bei ADXHOM1ATH) bzw. 351 nm (bei ADXHOM2ATH) mit schwächeren Änderungen der benachbarten lokalen Minima.

Die durch Natriumdithionit reduzierten Ferredoxine zeigen wiederum individuelle Unterschiede, die sich stärker ausprägen als im oxidierten Zustand (siehe Abb. 16). Dennoch werden die Gemeinsamkeiten deutlich.

Auf Grund der starken Absorption des Natriumdithionits unterhalb von 350 nm sind die Spektren nur im Bereich von 350 nm bis 650 nm gezeigt.

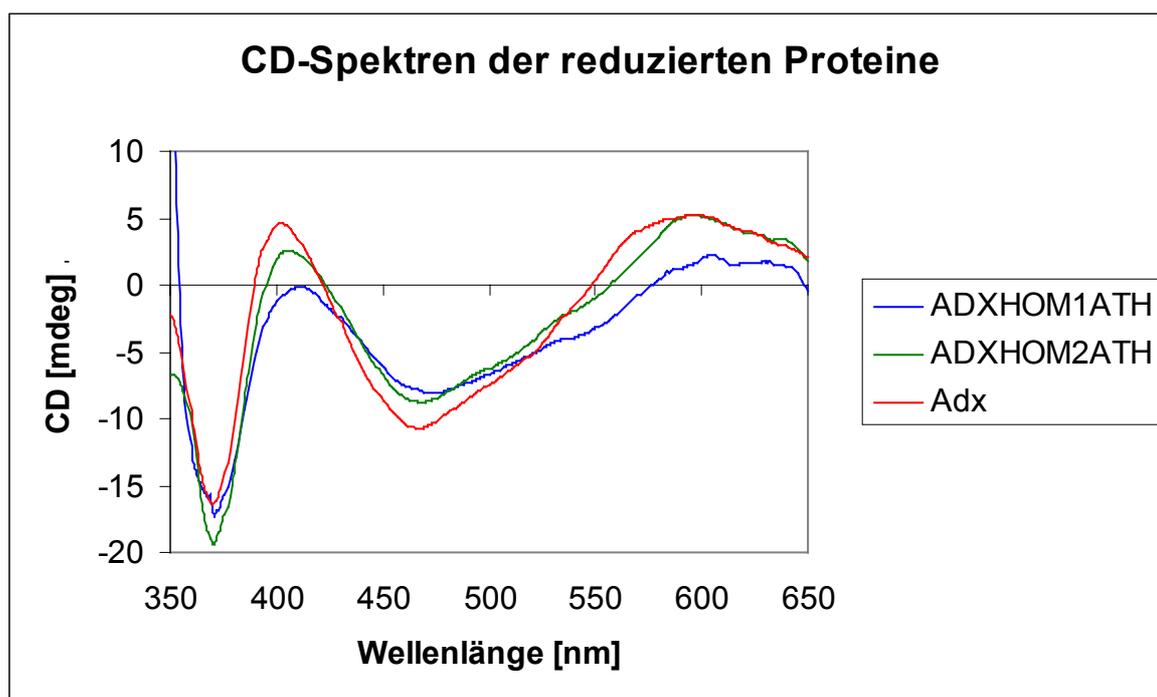


Abb. 16 — CD-Spektren der *vertebrate-type* Ferredoxine aus *Arabidopsis thaliana* und *Bos taurus*, durch Natriumdithionit reduziert.

3.3.7.4 Thermische Denaturierung

Da das lokale Maximum von ADXHOM1ATH bei 411 nm leicht im negativen Bereich lag (vgl. Abb. 16), mußte bei der thermischen Denaturierung der reduzierten Proteine auf das Minimum bei 370 nm zurückgegriffen werden.

Bei allen drei Proteinen nimmt die Stabilität im reduzierten Zustand gegenüber der oxidierten Form ab (Abb. 17 und 18, Tab. 6). Die oxidierten Ferredoxine aus *Arabidopsis thaliana* sind stabiler als das bovine Adx. Im reduzierten Zustand sind die Denaturierungskurven von Adx und ADXHOM2ATH nahezu deckungsgleich. Reduziertes ADXHOM1ATH ist instabiler als die beiden anderen Proteine.

	oxidiert	reduziert	ΔT
Adx	320,7 K (47,6 °C)	316,9 K (43,8 °C)	3,8 K
ADXHOM1ATH	328,9 K (55,8 °C)	313,2 K (40,1 °C)	15,7 K
ADXHOM2ATH	330,1 K (57,0 °C)	317,0 K (43,9 °C)	13,1 K

Tab. 6 — Übergangstemperaturen der thermischen Entfaltung der Ferredoxine.

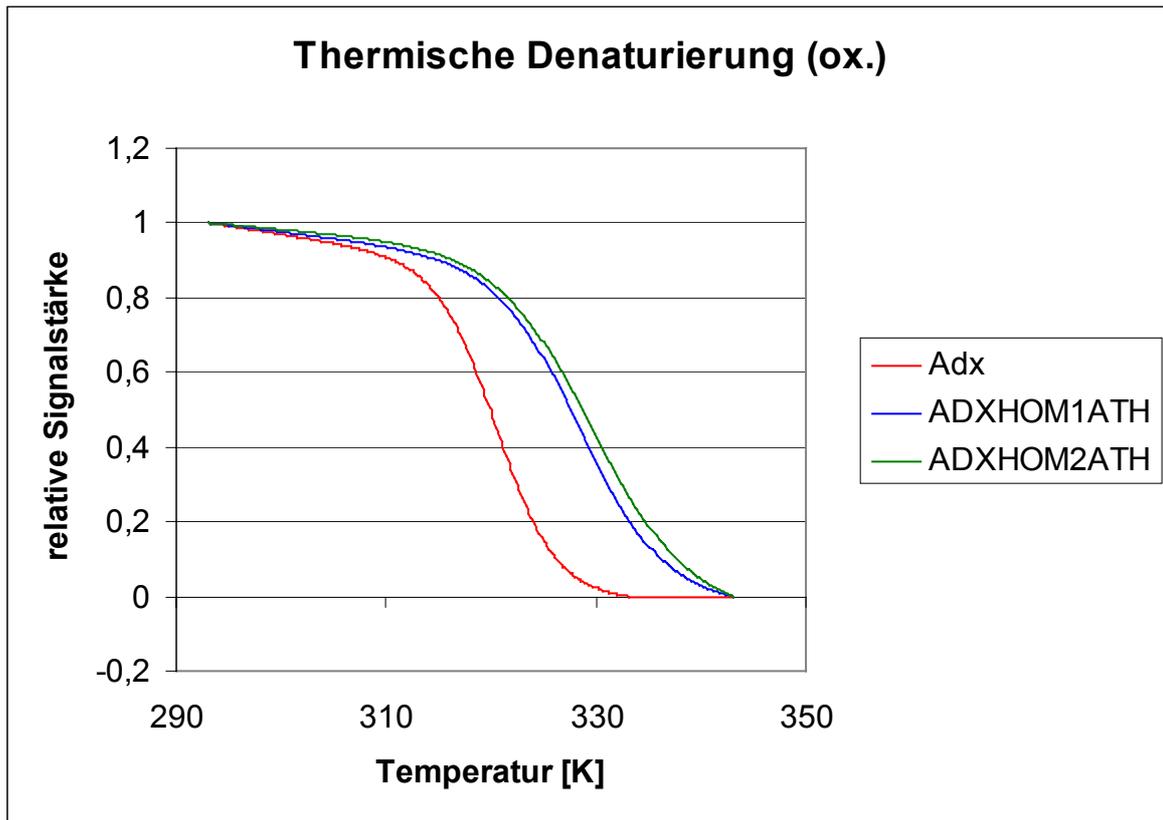


Abb. 17 — Denaturierungskurven der oxidierten Ferredoxine.

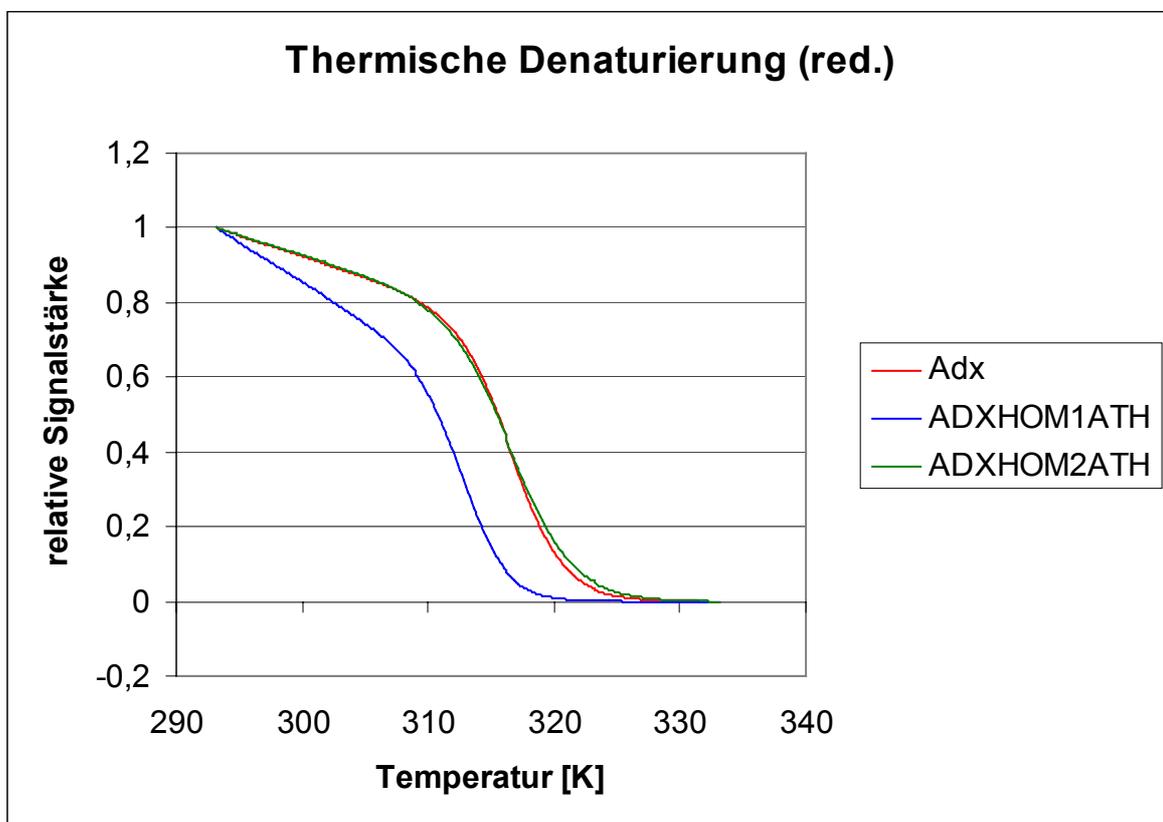


Abb. 18 — Denaturierungskurven der reduzierten Ferredoxine.

3.3.7.5 EPR-Spektren

Die EPR-Spektren der untersuchten Ferredoxine sind nahezu identisch. Die g-Werte von 1,94 und 2,03 bestätigen für die pflanzlichen Adrenodoxinhomologen die korrekte Geometrie des Clusters. Diese Signale sind charakteristisch für den intakten Eisen-Schwefel-Cluster vom Typ [2Fe-2S].

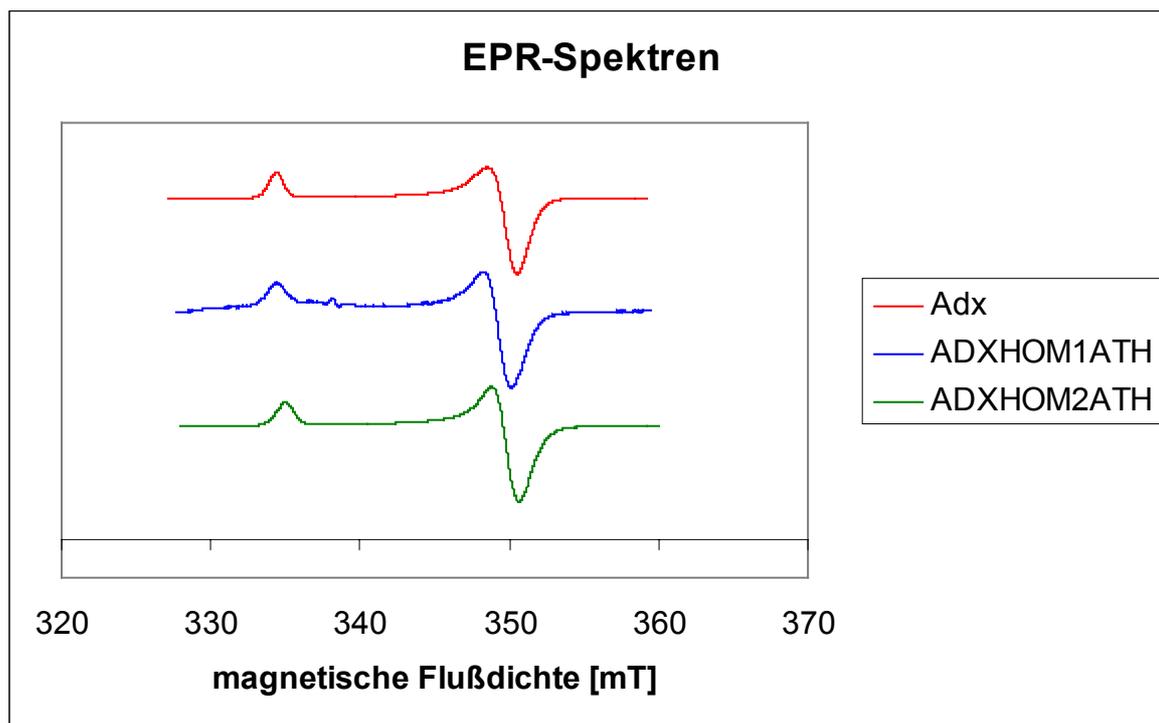


Abb. 19 — EPR-Spektren der Ferredoxine aus *Arabidopsis thaliana* und *Bos taurus*.

3.3.7.6 Redoxpotential

Die Bestimmung des Redoxpotentials mit der Photoreduktionsmethode mit Safranin T führte aufgrund des unerwartet niedrigen Potentials der Adrenodoxinhomologen aus *Arabidopsis thaliana* zu keinem eindeutigen Ergebnis. Es kann daher lediglich festgehalten werden, daß die Redoxpotentiale kleiner als etwa -360 mV sein müssen. Dieser Wert stellt die Bestimmungsgrenze dieses Systems dar.

3.3.7.7 SCC-Assay

Die Fähigkeit der Adrenodoxinhomologen aus *Arabidopsis thaliana*, als Elektronenüberträger zwischen AdR und CYP11A1 (beides aus *Bos taurus*) zu fungieren, wurde im Rekonstitutionssystem bestätigt.

Ferredoxin	Umsatzrate [min^{-1}]	Umsatz bezogen auf Adx [%]
Adx	0,12	100
ADXHOM1ATH	0,07	58
ADXHOM2ATH	0,10	83

Tab. 7 — Vergleich der Umsätze der Rekonstitutionssysteme mit verschiedenen Ferredoxinen.

Der Umsatz reichte erwartungsgemäß nicht an die Werte für Adx heran, da mit leichten Veränderungen der Interaktion mit AdR und CYP11A1 zu rechnen war.

3.4 Analysen *in silico*

3.4.1 Vergleich der Sequenzen mit bovinem Adx

Ein Vergleich der abgeleiteten prä-Proteinsequenzen der *vertebrate-type* Ferredoxine mit der Sequenz von bovinem prä-Adx zeigt bemerkenswerte Übereinstimmungen in dem Bereich, in dem die reife Form dieser Proteine gesucht werden muß. Der Vergleich der pflanzlichen Proteine mit Adx diente als Anhaltspunkt, um eine theoretische prä-Sequenz festzulegen. So wurden die Aminosäuren an Position 69 von ADXHOM1ATH und ADXHOM2ATH und Position 53 von ADXHOMDLA als erste Aminosäure des jeweiligen reifen Proteins angenommen. Damit sind die reifen Formen der drei pflanzlichen Proteine sämtlich 129 Aminosäuren lang (siehe Abb. 20).

	adx2bta	adxmmu	adxhsa	adxhom1ath	adxhom2ath	adxhomdla	fdx1sol	fdx2sol	fdx1ath	fdx2ath
adx1bta	98/98	85/95	87/96	40/75	43/77	42/75	12/49	13/53	16/47	17/54
adx2bta	—	84/94	85/95	40/74	42/75	43/76	13/50	12/53	16/47	17/54
adxmmu	—	—	90/99	44/73	47/74	44/71	14/50	13/58	17/56	16/54
adxhsa	—	—	—	43/74	44/75	44/72	14/51	13/56	17/53	18/56
adxhom1ath	—	—	—	—	87/98	81/95	17/50	19/53	16/54	17/52
adxhom2ath	—	—	—	—	—	81/94	17/50	19/53	19/51	20/51
adxhomdla	—	—	—	—	—	—	16/50	16/50	19/52	19/52
fdx1sol	—	—	—	—	—	—	—	74/95	73/95	69/93
fdx2sol	—	—	—	—	—	—	—	—	73/92	72/92
fdx1ath	—	—	—	—	—	—	—	—	—	88/98

Tab. 8 — Identitäts- und Homologiegrad verschiedener [2Fe-2S]-Ferredoxine untereinander. Die erste Zahl gibt die Identität, die zweite die Homologie an. Die Werte sind in Prozent gegeben. adx1bta - Adrenodoxin I aus Rind (OKAMURA et al. 1985), adx2bta - Adrenodoxin II aus Rind (OKAMURA et al. 1987), adxmmu - Adrenodoxin aus Maus (STROMSTEDT & WATERMAN 1995, ITOH et al. 1995), adxhsa - Adrenodoxin aus Mensch (PICADO-LEONARD et al. 1988), adxhom1ath und adxhom2ath - Adrenodoxinhomologe I und II aus *Arabidopsis thaliana* (THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE 2000), adxhomdla - Adrenodoxinhomologes aus *Digitalis lanata*, fdx1sol - Ferredoxin I aus *Spinacia oleracea* (WEDEL et al. 1988), fdx2sol - Ferredoxin II aus *Spinacia oleracea* (TAKAHASHI et al. 1983), fdx1ath - Ferredoxin I aus *Arabidopsis thaliana* (VORST et al. 1990, SOMERS et al. 1990), fdx2ath - Ferredoxin II aus *Arabidopsis thaliana* (THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE 2000).

3.4.2 Einordnung der Sequenzen in verwandschaftliche Verhältnisse

Beim Vergleich von 19 Sequenzen von [2Fe-2S]-Ferredoxinen können deutlich zwei große Gruppen unterschieden werden (siehe Abb. 21). Diese entsprechen den *vertebrate-type* Ferredoxinen einerseits und den *plant-type* Ferredoxinen andererseits. Die Sequenzen der drei pflanzlichen Adrenodoxinhomologen werden in die Gruppe der *vertebrate-type* Ferredoxine gestellt. Sie werden mit dem Ferredoxin aus *Saccharomyces cerevisiae* und der Ferredoxindomäne des Elektronentransportproteins aus *Schizosaccharomyces pombe* zusammengefaßt und in die nähere Verwandtschaft der Adrenodoxine aus Mensch, Rind und Maus eingeordnet.

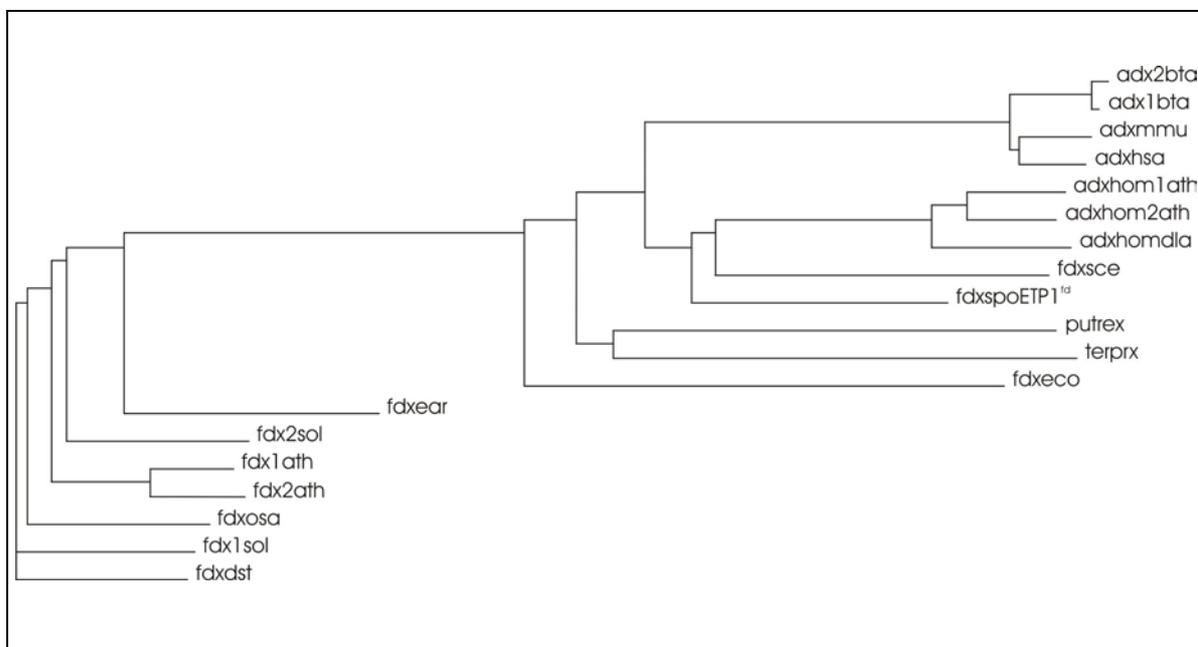


Abb. 21 — Phylogenetisches Diagramm von 19 [2Fe-2S]-Ferredoxinen (ClustalW, Matrix: gonnet 250, GONNET et al. 1992). adx1bta - Adrenodoxin I aus Rind (OKAMURA et al. 1985), adx2bta - Adrenodoxin II aus Rind (OKAMURA et al. 1987), adxmmu - Adrenodoxin aus Maus (STROMSTEDT & WATERMAN 1995, ITOH et al. 1995), adxhsa - Adrenodoxin aus Mensch (PICADO-LEONARD et al. 1988), adxhom1ath und adxhom2ath - Adrenodoxinhomologe I und II aus *Arabidopsis thaliana* (THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE 2000), adxhomdla - Adrenodoxinhomologes aus *Digitalis lanata*, fdxsce - Ferredoxin aus *Saccharomyces cerevisiae* (BUSSEY et al. 1997), fdxspoETP1^{fd} - Ferredoxindomäne des Elektronentransportproteins aus *Schizosaccharomyces pombe* (BUREIK et al. 2002), putrex - Putidaredoxin aus *Pseudomonas putida* (PETERSON et al. 1990), terprx - Terpredoxin aus *Pseudomonas* sp. (PETERSON et al. 1992), fdxeco - Ferredoxin aus *Escherichia coli* (TA & VICKERY 1992), fdxear - Ferredoxin aus *Equisetum arvense* (HASE et al. 1977), fdx1sol - Ferredoxin I aus *Spinacia oleracea* (WEDEL et al. 1988), fdx2sol - Ferredoxin II aus *Spinacia oleracea* (TAKAHASHI et al. 1983), fdx1ath - Ferredoxin I aus *Arabidopsis thaliana* (VORST et al. 1990, SOMERS et al. 1990), fdx2ath - Ferredoxin II aus *Arabidopsis thaliana* (THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE 2000), fdxosa - Ferredoxin aus *Oryza sativa* (OHMORI et al. 1996), fdxdst - Ferredoxin aus *Datura stramonium* (MINO et al. 1993).

3.4.3 Proteinmassen und isoelektrische Punkte

Die berechneten Molekularmassen und pI-Werte der drei pflanzlichen Proteine gibt die folgende Tabelle wieder. Zum Vergleich sind auch die berechneten Daten der beiden Adrenodoxine aus *Bos taurus* beigefügt.

Protein	prä-Protein		reifes Protein	
	Größe in kDa	pI	Größe in kDa	pI
ADXHOM1ATH	22,1	6,39	14,2	4,61
ADXHOM2ATH	21,8	5,06	14,2	4,17
ADXHOMDLA	20,1	5,34	14,2	4,41
ADX1BTA	19,8	5,44	14,0	4,42
ADX2BTA	20,4	5,25	14,1	4,49

Tab. 9 — Berechnete Molekularmassen und isoelektrische Punkte der Ferredoxine und ihrer prä-Proteine.

3.4.4 Überprüfung auf Signal- und Targeting-Peptide

	TargetP	MitoProt	PSORT	iPSORT	Predotar
ADXHOM1ATH (68 AS)	M2 74 AS	0,8344 –	MMS 0,484 50 AS	kein mTP –	mito. 0,989
ADXHOM2ATH (68 AS)	M2 35 AS	0,8176 –	MMS 0,473 50 AS	cTP –	mito. 0,505
ADXHOMDLA (52 AS)	M2 43 AS	0,9871 –	MMS 0,487 50 AS	mTP –	mito. 0,968
ADX1BTA 58 AS	M2 51 AS	0,9915 58 AS	mito. 65,2 % 14 AS	mTP –	mito. 0,735
ADX2BTA 58 AS	M1 45 AS	0,9930 30 AS	mito. 78,3 % 41 AS	mTP –	mito. 0,900

Tab. 10 — Vorhersagen verschiedener Programme für die pflanzlichen und bovinen Ferredoxine zur intrazellulären Lokalisation und zu prä-Sequenzen. TargetP: (M1-M5) M1 hohe Wahrscheinlichkeit, M5 geringe Wahrscheinlichkeit mitochondrialer Lokalisation. MitoProt: Wahrscheinlichkeit mitochondrialer Lokalisation: 0 (gering) bis 1 (hoch). PSORT: Wahrscheinlichkeit für Lokalisation im mitochondrialen Matrixraum (MMS). Weitere, geringere Wahrscheinlichkeiten (nicht aufgeführt) für innere und äußere Mitochondrienmembran. PSORT II (für die Adx-Isoformen aus *Bos taurus*): Gesamtwahrscheinlichkeit für mitochondriale Lokalisation. iPSORT: mTP - mitochondriales Targetingpeptid, cTP - chloroplastidäres Transitpeptid. Predotar: Wahrscheinlichkeit mitochondrialer Lokalisation: 0 (gering) bis 1 (hoch).

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der Untersuchung der drei pflanzlichen Adrenodoxin homologen sowie der beiden Adrenodoxine aus *Bos taurus* durch verschiedene Vorhersageprogramme zusammengestellt. Bei den Programmen, die prä-Sequenzen detektieren, ist die Anzahl der Aminosäuren (AS) dieser Sequenzen angegeben.

3.4.5 Evaluierung des Modells von ADXHOMDLA

3.4.5.1 Procheck

Mit Hilfe des Programms Procheck wurden die Winkel Φ und Ψ des Modells analysiert. Aus diesen Daten wurde ein Ramachandran-Plot erstellt (Abb. 23). 95,9 % der Aminosäuren liegen innerhalb der bevorzugten sowie der zusätzlich erlaubten Regionen. Keine Aminosäure liegt in den nicht erlaubten Bereichen (Tab. 11).

Die Analyse der Winkel Φ und Ψ des Templates ergibt ein ganz ähnliches Bild (Abb. 22). Hierbei liegen 99,0 % innerhalb der bevorzugten und der zusätzlich erlaubten Regionen. In den nicht erlaubten Bereichen liegt ebenfalls keine Aminosäure (Tab. 11).

In diese Berechnung wurden die erste und letzte Aminosäure des Modells wie auch die Glycine und Proline nicht einbezogen. In beiden Proteinen ist ein Glycin im verbotenen Bereich zu finden. Es handelt sich dabei um Glycin 16 von Adx ($\Phi = 73,2^\circ$, $\Psi = -40,6^\circ$) und Glycin 22 des Adrenodoxin homologen aus *Digitalis lanata* ($\Phi = 91,3^\circ$, $\Psi = -44,3^\circ$).

	Template (Adx)		Modell (ADXHOMDLA)	
	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil
bevorzugter Bereich	80	78,4 %	73	74,5 %
zusätzlich erlaubter Bereich	21	20,6 %	21	21,4 %
großzügig erlaubter Bereich	1	1,0 %	4	4,1 %
verbotener Bereich	0	0,0 %	0	0,0 %
Summe	102		98	
N- und C-terminale AS	2		2	
Glycine	8		7	
Proline	1		4	
Gesamtsumme	113		111	

Tab. 11 — Statistik des Ramachandran-Plots. Der bevorzugte Bereich umfaßt A, B und L, der zusätzlich erlaubte Bereich a, b, l, und p, der großzügig erlaubte Bereich ~a, ~b, ~l und ~p. Der verbotene Bereich wird durch die übrigen Flächen gebildet.

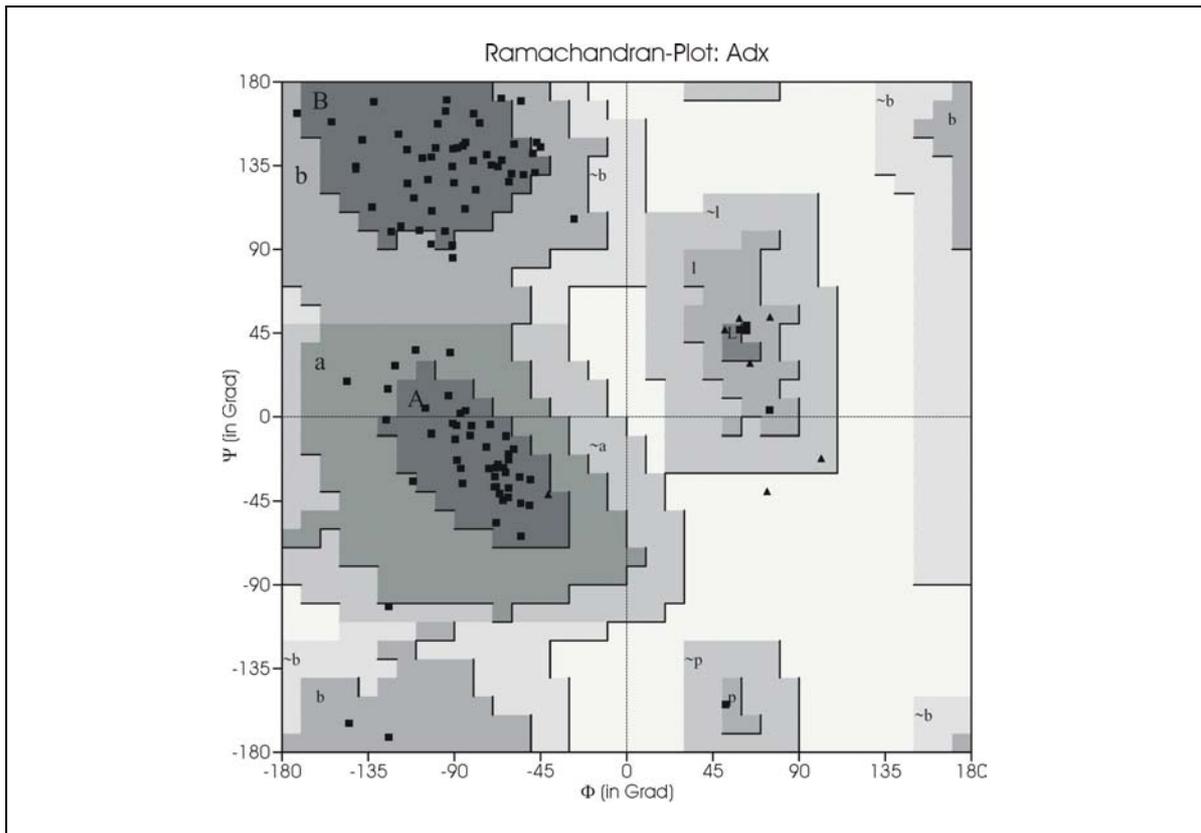


Abb. 22 — Ramachandran-Plot des Templates (Adx). Glycine sind mit \blacktriangle bezeichnet.

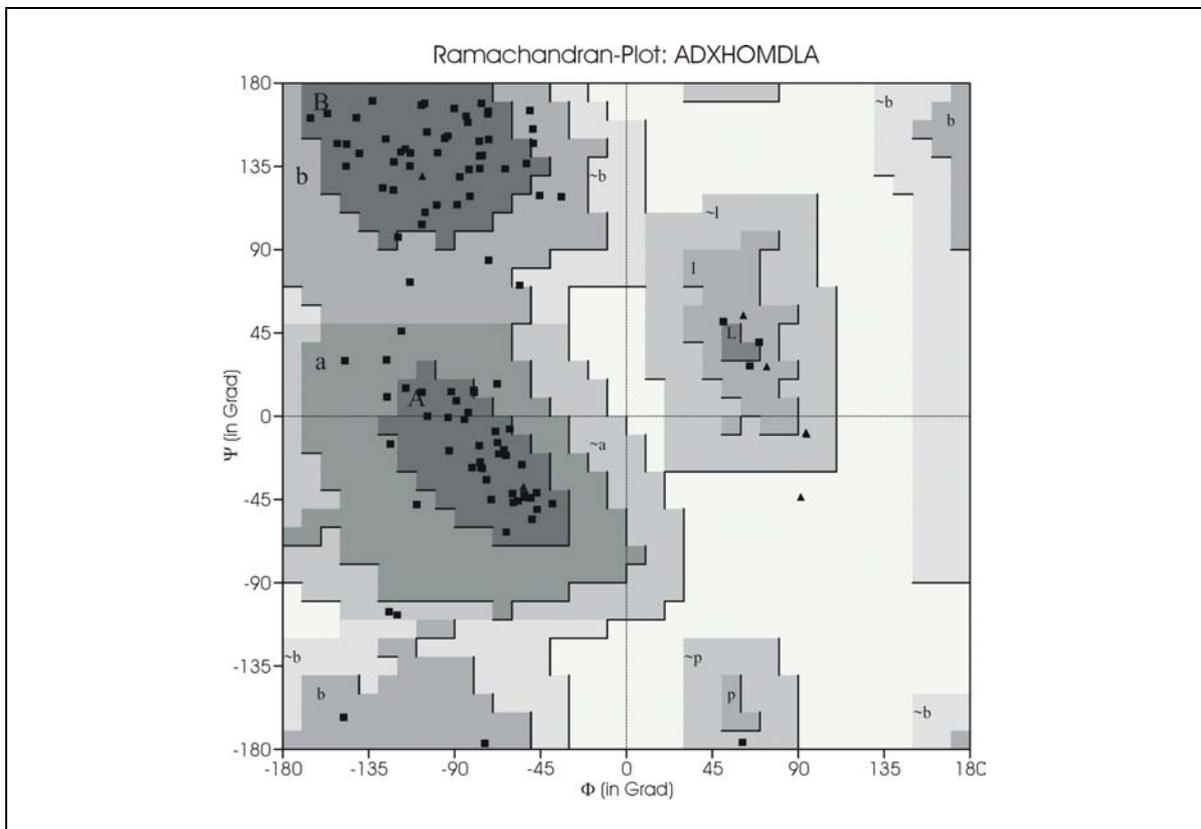


Abb. 23 — Ramachandran-Plot des Modells (ADXHOMDLA). Glycine sind mit \blacktriangle bezeichnet.

3.4.5.2 Prosa II

Prosa II wurde genutzt, um die dreidimensionale Struktur des Modells zu überprüfen. Der Energiograph des Modells wurde mit dem des Templates verglichen. Beide Graphen liegen durchgängig im negativen Bereich, der Graph für das Modell liegt sogar über weite Strecken unterhalb des Template-Graphen. Der *z-score* beträgt $-6,33$ für das Template Adx und $-6,83$ für das Modell.

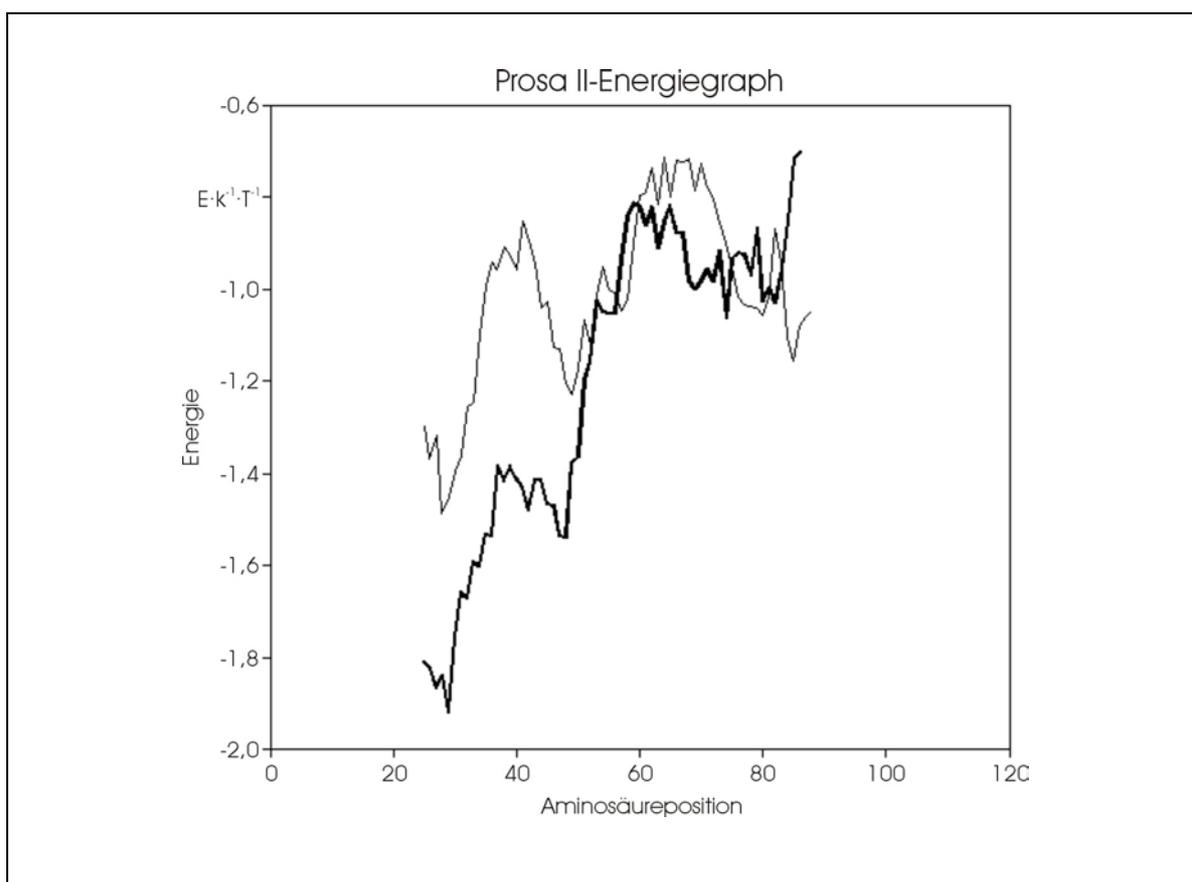


Abb. 24 — Prosa II-Energiograph des Templates Adx (dünne Linie) und des Modells von ADXHOMDLA (fette Linie). Die Kurve wurde durch übergreifende Mittel von je 50 Werten geglättet.

3.4.5.3 WHAT IF

WHAT IF vergleicht die Packung der Aminosäuren mit Durchschnittswerten gleicher Reste aus Strukturen der Protein Data Bank. Einzelwerte sollten nicht unter $-2,5\sigma$ liegen. Ein solcher Wert deutet auf schlechte Qualität der Packung hin; oder es handelt sich um Aminosäuren, die Cofaktoren binden bzw. Teil des aktiven Zentrums sind. Aussagekräftig ist insbesondere der Vergleich der Werte von Template und Modell.

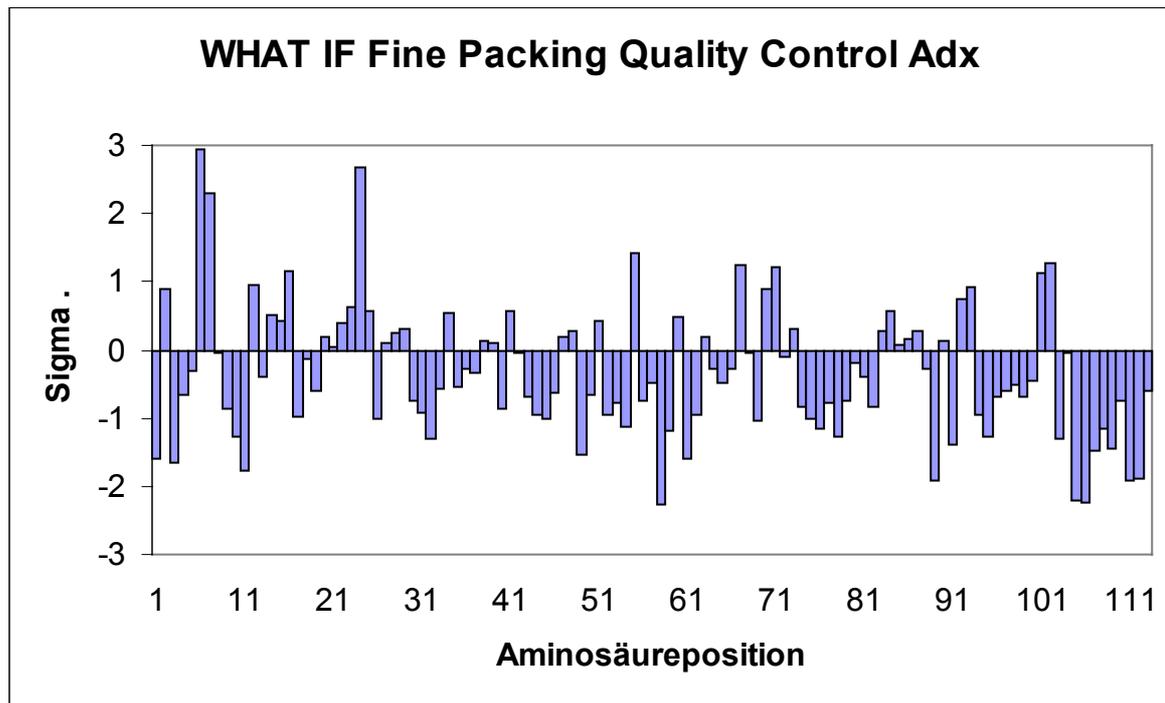


Abb. 25 — Bewertung der Packungsumgebung der einzelnen Aminosäuren von Adx durch WHAT IF.

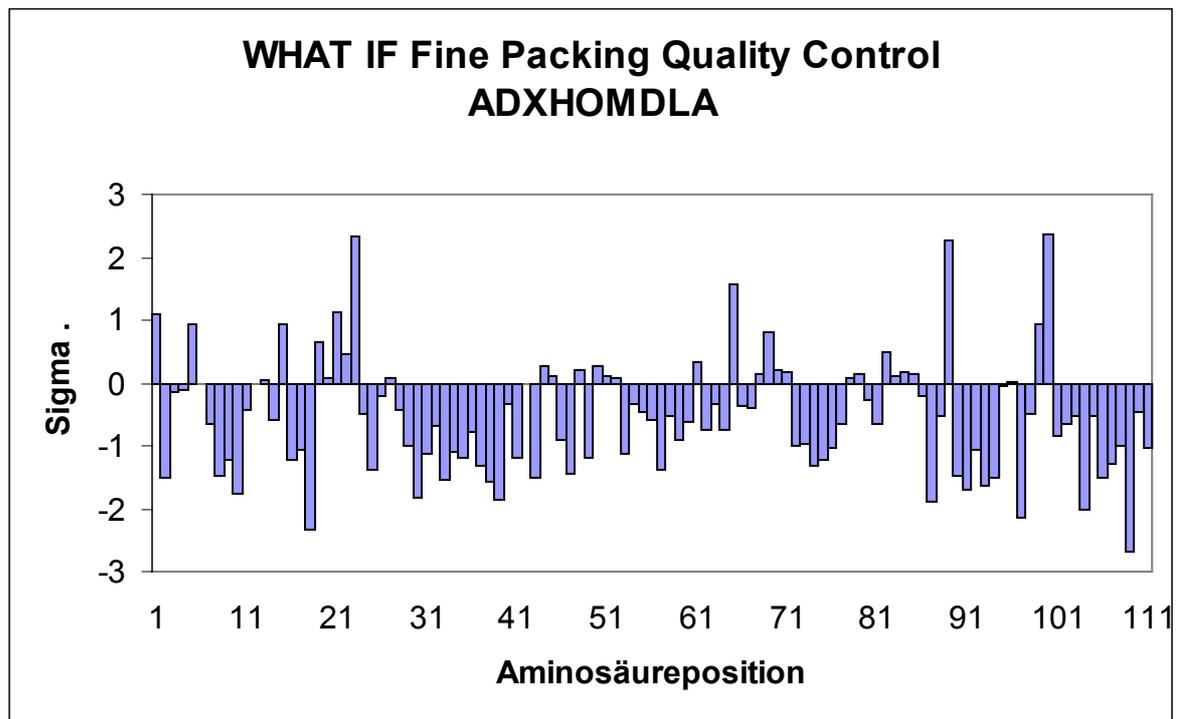


Abb. 26 — Bewertung der Packungsumgebung der einzelnen Aminosäuren von ADXHOMDLA durch WHAT IF.

Auch die Überprüfung mit WHAT_CHECK bestätigt die gute Qualität des Modells des *vertebrate-type* Ferredoxins aus *Digitalis lanata*.

3.4.6 Ergebnisse der Modellberechnungen

3.4.6.1 Modell des Adrenodoxinhomologen aus *Digitalis lanata*

Der Vergleich des Templates mit dem Modell zeigt die hohe Ähnlichkeit beider Proteine. Die Einfügung der Loops (vgl. Kap. 2.5.5) und die Energieminimierung verursacht nur geringfügige Verschiebungen des Proteinrückgrats.

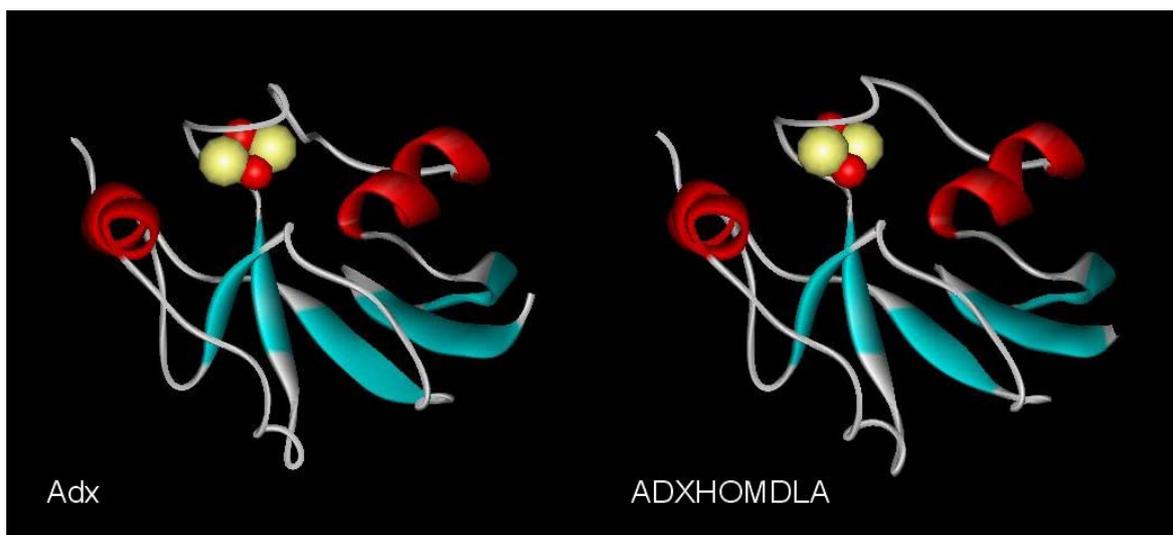


Abb. 27 — Vergleich der Proteinstruktur von Adx mit dem berechneten Modell von ADXHOMDLA.

Deutlichere Veränderungen betreffen die Anordnung des Clusters relativ zum umgebenden Loop sowie die Struktur dieser Loopregion.

3.4.6.2 Elektrostatisches Potential auf der Oberfläche

Das elektrostatische Potential wurde durch SYBYL 6.7 für die lösungsmittelzugängliche Oberfläche (Connolly-Oberfläche) berechnet. Es verteilt sich in gleicher Weise im bovinen Adx wie auch im Modell des Ferredoxins aus *Digitalis lanata*. Blaue Färbung entspricht einem negativen, rote Färbung einem positiven Potential. Die farbigen Skalen ermöglichen die Zuordnung von Zwischenwerten.

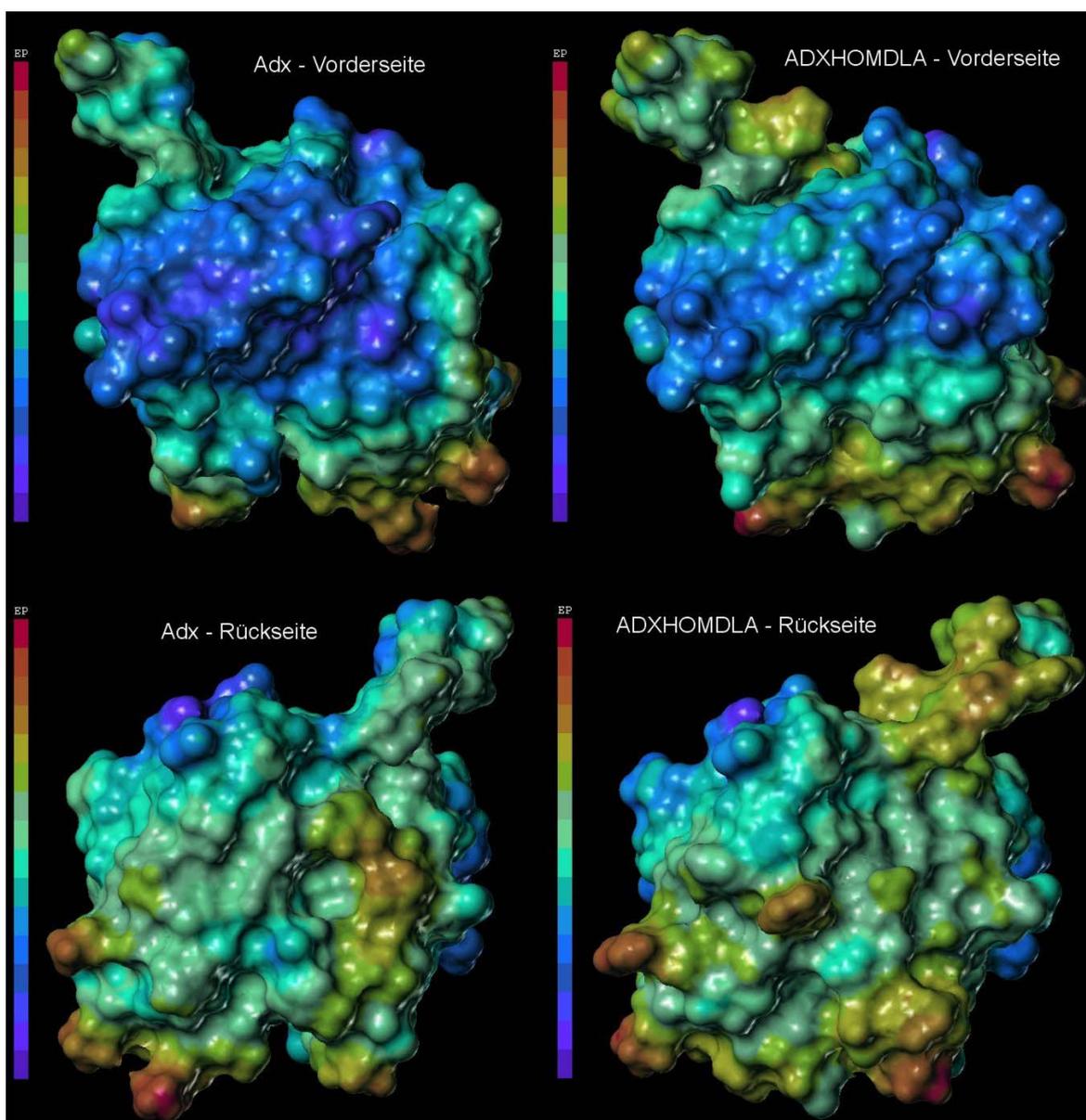


Abb. 28 — Elektrostatisches Potential auf der Connolly-Oberfläche.

3.4.6.3 Hydrophobizität der Oberfläche

Ebenfalls hohe Ähnlichkeit zeigt das Verhältnis von Hydrophilie und Lipophilie auf der Connolly-Oberfläche der Proteine. Die lipophilsten Bereiche der Oberfläche sind braun gefärbt, die hydrophilsten Bereiche blau. Zwischenstufen sind an Hand der beigefügten Skalen zuzuordnen.

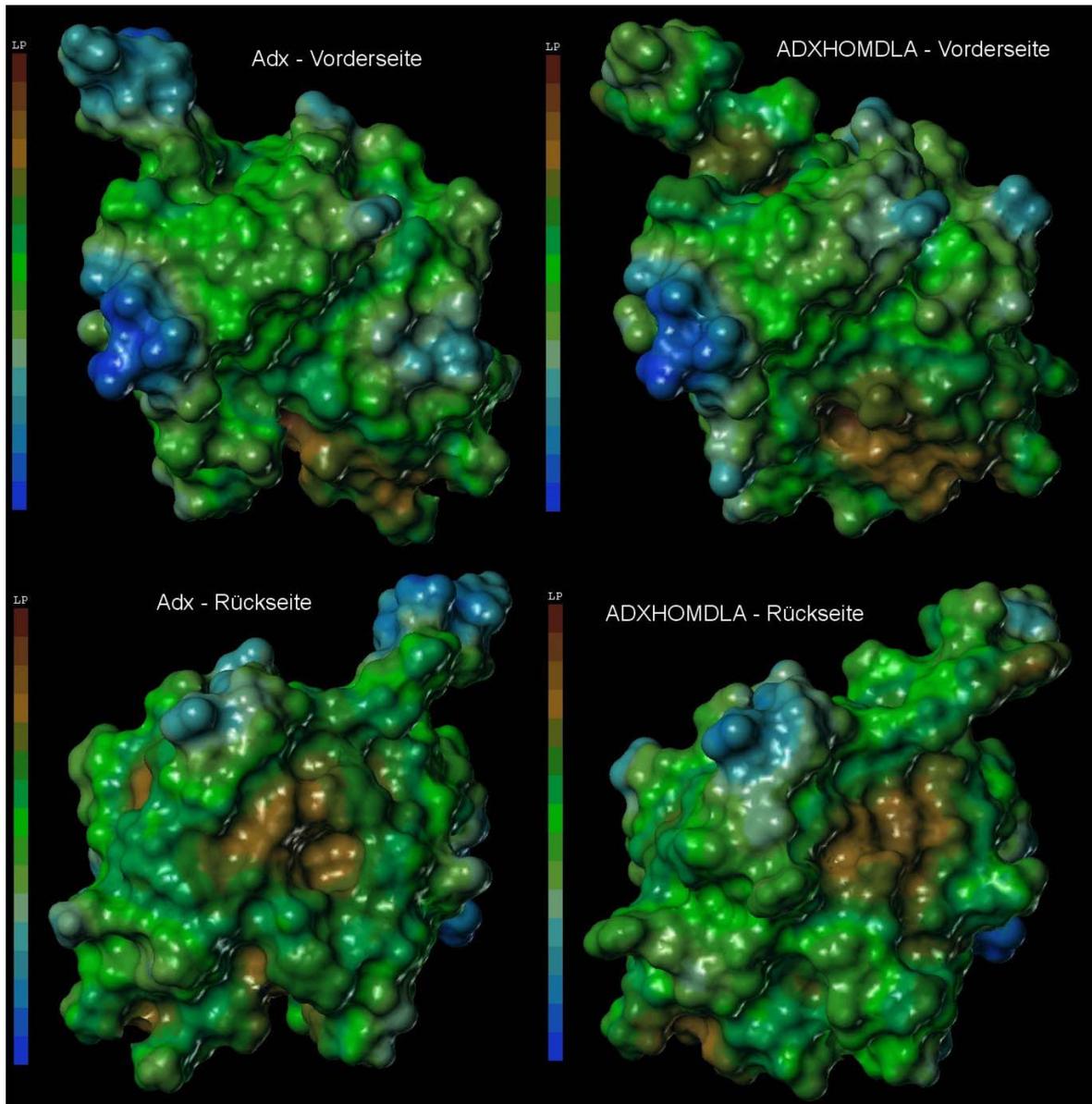


Abb. 29 — Hydrophobizität der Proteinoberflächen.

3.4.6.4 Ausgewählte Wechselwirkungen

In der Einleitung wurde auf einige Wechselwirkungen, hauptsächlich Wasserstoffbrückenbindungen, dazu eine interne Salzbrücke, eingegangen, die Adx als Protein stabilisieren (siehe Kap. 1.3.2). Im Modell des Adrenodoxinhomologen wurden einige dieser Aminosäurepaare untersucht. Dazu wurden die Seitenketten der betreffenden Aminosäuren dem *ribbon*-modell hinzugefügt. Es handelt sich hierbei um die korrespondierenden Aminosäurepaare zu Arginin 14 und Prolin 108 (zu Abb. 30 A), Cystein 52 und Threonin 54 (zu Abb. 30 B), Histidin 56 und Serin 88 (zu Abb. 30 C) sowie Glutaminsäure 74 und Arginin 89 (zu Abb. 30 D) des bovinen Adx.

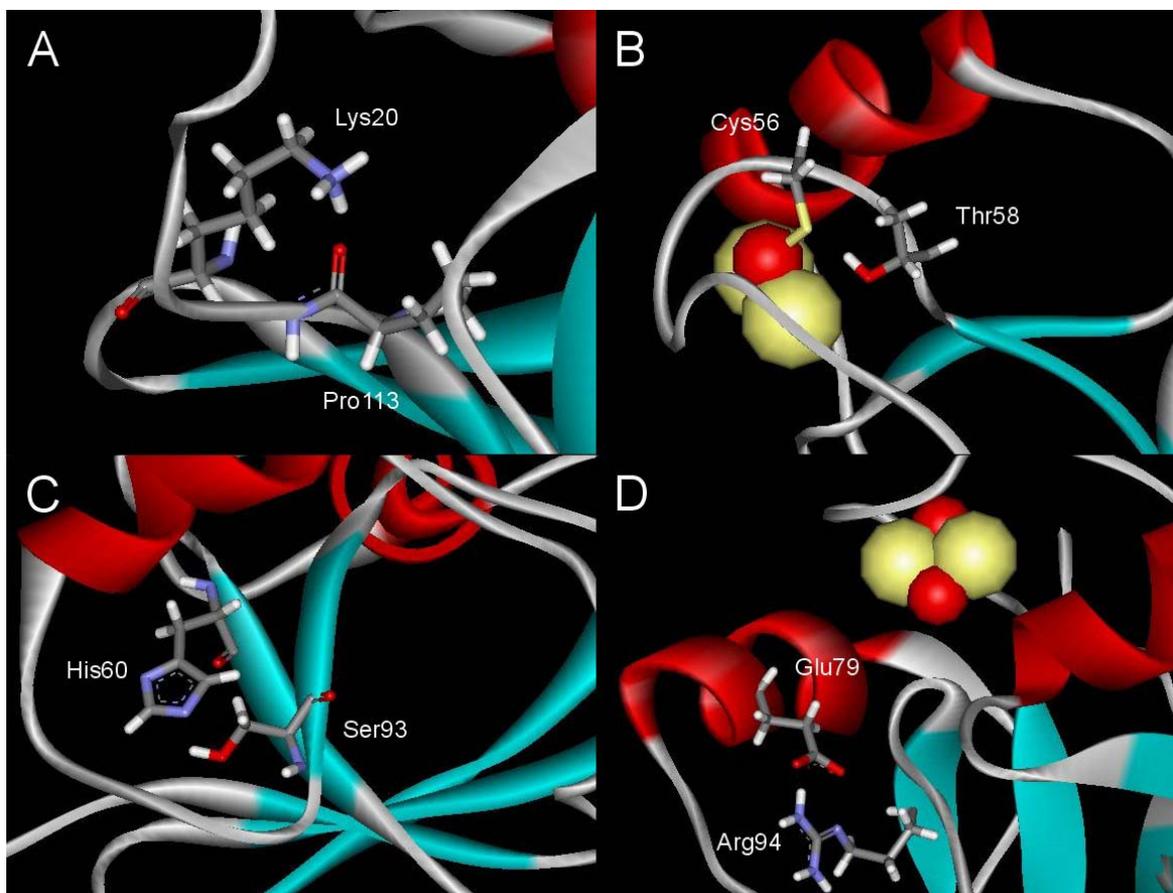


Abb. 30 — A, B und C - Wasserstoffbrücken zwischen ausgewählten Aminosäurepaaren des Modells von ADXHOMDLA, D - die Salzbrücke zwischen Interaktions- und Kerndomäne des Modells.

Wichtige Wasserstoffbrückenbindungen werden nach Auswertung des Modells auch in ADXHOMDLA ausgebildet, auch wenn teilweise homologe Aminosäuren die Funktion der Reste in Adx wahrnehmen (Abb. 30, A).

4 Diskussion

4.1 Two-Hybrid-Screening

Es sind schon verschiedene Anstrengungen unternommen worden, das seitenkettenspaltende Enzym aus *Digitalis lanata* zu isolieren. Eine Schwierigkeit besteht dabei darin, einen reproduzierbaren Enzymtest zu entwickeln, da die gemessenen Aktivitäten nahe der Bestimmungsgrenze lagen (vgl. FINSTERBUSCH 1995, LÜDDE 1996). Daher erschien es sinnvoll, mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems die entsprechende Nukleinsäuresequenz aufzuklären.

Die Synthese der HybriZAP[®]-2.1 Two-Hybrid-cDNA-Bank wurde erfolgreich durchgeführt. Der Anteil der Hintergrundplaques der Primärbank entsprach mit ca. 1 % den Herstellerangaben (1-10 %). Die Zahl der unabhängigen Klone betrug etwa $1,0 \cdot 10^6$, wie es von einer die unterschiedlichen cDNAs gut repräsentierenden Bank gefordert wird. Die Bestimmung des Phagentiters nach der anschließenden Amplifikation ergab mit $2,5 \cdot 10^9$ pfu·mL⁻¹ ebenfalls ein gutes Ergebnis. Damit entsprach die Bank den üblichen Werten (10^8 bis 10^{11} pfu·mL⁻¹). Zwei vergleichbare Banken aus globulären Embryonen bzw. Blattmaterial von *Digitalis lanata* hatten Titer von $1,8 \cdot 10^9$ bzw. $1,7 \cdot 10^9$ pfu·mL⁻¹ (WERLE 1995). Die hergestellte Bank ließ sich effizient exzidieren.

Die Überprüfung der HybriZAP[®]-2.1 Two-Hybrid-cDNA-Bank mit verschiedenen Primerkombinationen zeigte, daß die Sequenzen für das Adrenodoxinohomologe aus *Digitalis lanata* (prä-Protein und reifes Protein), die $\Delta 5$ -3 β -Hydroxysteroid-dehydrogenase (3 β -HSD), Acyl-CoA-bindendes Protein (ACBP) 3, Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) und Parvulin 12.8 erfolgreich amplifiziert werden konnten. Außer bei PAL und ACBP 3, für die keine entsprechenden Primer zur Verfügung standen, wurden vollständige Amplifikate erzeugt. Das läßt auf eine hohe Qualität der Inserts der cDNA-Bank hinsichtlich ihrer Vollständigkeit schließen.

Die Sequenzen von ACBP 4, der Lanatosid-15'-O-acetylerase (LAE) und der Cardenolid-16'-O-glucohydrolase (CGH) I waren mittels einfacher Standard-PCR nicht zu amplifizieren. Obwohl die betreffenden Klone aus einer Blatt-cDNA-Bank von *Digitalis lanata* (WERLE 1995) gewonnen wurden, muß die Anzahl der Kopien in einem Aliquot der

cDNA-Bank nicht für eine erfolgreiche Amplifikation ausreichen. Für eine erfolgreiche PCR braucht man minimal ca. 10000 Template-Moleküle (MÜLHARDT 2000) im PCR-Ansatz.

ACBP 4 ist gegenüber ACBP 3 stark unterrepräsentiert. Nur ein Klon von 26 untersuchten Phagen erwies sich als diese Isoform (GRUNER 2003).

Das Screening der Blatt-Bank nach cDNA-Sequenzen der LAE resultierte in 10 positiven Primärklonen bei $2,5 \cdot 10^5$ ausplattierten Plaques. Hochgerechnet auf eine Anzahl von $1 \cdot 10^6$ unabhängigen Klonen der Primärbank ergibt sich eine Anzahl von 40 Template-Molekülen, für eine erfolgreiche PCR nicht ausreichen. Versuche von Kandzia, im Vorfeld des radioaktiven Screenings der cDNA-Bank eine PCR-Amplifikation zu erreichen, blieben erfolglos. Mit den gleichen Primern waren mittels RT-PCR aus cDNA einer *Digitalis-lanata*-Zellkulturlinie Amplifikate zu erhalten (KANDZIA 1999).

Bei der Untersuchung der cDNA-Bank auf Sequenzen der CGH I ergab das Primärscreening von $2,5 \cdot 10^5$ ausplattierten Plaques 30 positive Signale (FRAMM 2002). Das ergibt 120 Template-Moleküle für die PCR. Auch diese Anzahl macht eine Amplifikation unwahrscheinlich.

Durch *nested* PCR könnten die geringen Templatemengen von ACBP 4, LAE und CGH I nachzuweisen sein.

Der Two-Hybrid-Screen unter Verwendung von Adx als *bait* muß als Fehlschlag angesehen werden. Das Fusionsprotein aus DNA-bindender Domäne und Adx führt auch ohne Anwesenheit eines *prey*-Vektors zur Induktion der Reportergene. Aufgrund dieser Tatsache wurden keine weitergehenden Experimente durchgeführt.

Dieses Verhalten von Adx kann durch die besonderen Eigenschaften dieses Proteins einerseits und die Eigenschaften der Aktivierungsdomäne von GAL4 andererseits erklärt werden. Die Funktion der Aktivierungsdomäne des Hefe-Transkriptionsaktivators GAL4 ist abhängig von ihrem isoelektrischen Punkt. Deletionsanalyse von GAL4 zeigte, daß zwei saure Bereiche im Protein für die Aktivierung verantwortlich sind (MA & PTASHNE 1987a). Weitere Untersuchungen zeigten, daß diese Bereiche funktionell durch Peptide ersetzt werden können, die durch Fragmente des Genoms von *Escherichia coli* codiert werden (MA & PTASHNE 1987b). Alle diese Peptide mit Aktivierungsfunktion zeigen überwiegend saure Aminosäuren. Die Sequenz ist offensichtlich unbedeutend. Durch Insertion einer sauren Sequenz konnte ein Transkriptionsinhibitor, GAL80, in einen Transkriptionsaktivator umgewandelt werden (MA & PTASHNE 1988). Adx selbst ist ein

stark saures Protein mit einem pI von ca. 4,5. Insbesondere die Interaktionsdomäne trägt viele saure Aminosäuren. So verwundert es nicht, daß Adx selbst als Aktivierungsdomäne in GAL4 fungieren kann. Deletion der Interaktionsdomäne führt zu einem Protein, das dennoch einen pI von 4,8 aufweist. Auch dieses Protein dürfte also die Transkription aktivieren. Untersuchungen an Adx-Mutanten mit deletierter Interaktionsdomäne haben im übrigen gezeigt, daß eine Interaktion mit CYP11A1 dann nicht mehr stattfindet (HEINZ et al. 2002).

Die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) bietet eine neue Möglichkeit der Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen (HU et al. 2002). Dabei werden Hybridproteine von interagierenden Proteinen mit N- bzw. C-terminalen Fragmenten des Gelb Fluoreszierenden Proteins (YFP) generiert. Diese Fragmente sind nicht zur Fluoreszenz befähigt. Bei Interaktion der zu untersuchenden Proteine assoziieren die YFP-Fragmente in einem zweiten Schritt und es kommt zur Fluoreszenz. Als Partner eines gegebenen Hybridproteins sind auch Hybridproteine vorstellbar, die aus einer cDNA-Bank hervorgegangen sind. Damit könnten in effizienter Weise neue Protein-Protein-Interaktionen aufgeklärt werden. Dabei ist von Bedeutung, daß mit Komplikationen wie der Transkriptionsaktivierung im Two-Hybrid-Screen durch Adx als *bait* nicht in so hohem Maße gerechnet werden muß. Ein Protein, das ohne Assoziation der YFP-Fragmente zu einer Fluoreszenz führt, müßte immerhin die β -barrel-Struktur imitieren können. Nur Interaktionen von sogenannten „klebrigen“ Proteinen sind ebenso wie im Two-Hybrid-System nicht auszuschließen. Als *bait*-Protein kommt nunmehr natürlich in erster Linie das Adrenodoxinohomologe aus *Digitalis lanata* selbst in Frage. Die Interaktion mit den Redoxpartnern dürfte mit den arteigenen Proteinen besser funktionieren als mit denen aus anderen Pflanzen oder gar Tieren.

Eine weitere Möglichkeit, Interaktionspartner von bovinem Adx oder der neugefundenen pflanzlichen *vertebrate-type* Ferredoxine aufzufinden, bietet die Ausnutzung der Affinitätschromatographie an Adx-Sepharose-Säulen (SUGIYAMA & YAMANO 1975). Diese Methode wird zur Reinigung der Adrenodoxinreduktase und von CYP11A1 präparativ eingesetzt (SUGIYAMA & YAMANO 1975, SAGARA et al. 1993, LAPKO & RUCKPAUL 1998). Insbesondere die Chromatographie von mitochondrialen Membranpräparationen könnte möglicherweise den ersten Nachweis von Cytochromen P450 in Mitochondrien von Pflanzen erbringen.

Die Konstruktion der ersten Two-Hybrid-cDNA-Bank für *Digitalis lanata* bietet erstmals die Möglichkeit, mit anderen, besser geeigneten Sequenzen für *bait*-Proteine, Proteininteraktionen in dieser Pflanze zu untersuchen. Auch als Grundlage für das gewöhnliche radioaktive Screening steht sie zur Verfügung.

4.2 Radioaktives Screening

Bei der Untersuchung der cDNA-Bank aus Blättern von *Digitalis lanata* mit bovinem CYP11A1 als Sonde wurde ein Fragment ausgewählt, das nicht die Sequenz der Cystein-Häm-Eisen-Ligandensignatur enthielt. Damit sollte die Detektion einer Vielzahl beliebiger Cytochrome P450 verhindert werden. Es konnten keine positiven Klone detektiert werden. Das verwundert nicht, da Cytochrome P450 im Allgemeinen keine sehr hohe Homologie untereinander zeigen. Dazu kommt die Tatsache, daß die Verwandtschaft beider Organismen denkbar gering ist.

Im Gegensatz dazu ergab die Verwendung eines Sequenzfragments von CPD, einem am Brassinosteroidstoffwechsel beteiligten Cytochrom P450, eine hohe Anzahl positiver Signale. In diesem Fall war die Sequenz der Cystein-Häm-Eisen-Ligandensignatur präsent und, wie nicht anders zu erwarten, reagierten viele Cytochrome P450 mit dieser Sequenz. Die ansequenzierten cDNA-Klone konnten keinem bekannten Cytochrom P450, auch nicht der Sequenz von *cpd*, zugeordnet werden.

4.3 Die pflanzlichen *vertebrate-type* Ferredoxine

Die cDNA-Sequenzen der beiden Adrenodoxin homologen aus *Arabidopsis thaliana* konnten erfolgreich durch PCR aus einer cDNA-Bank (KIM et al. 1997) amplifiziert und nachfolgend kloniert werden. Die Sequenzierung der Klone bestätigte die Identität mit den bekannten Sequenzen ohne Abweichung.

Die Verwendung der Sequenz des Adrenodoxin homologen I aus *Arabidopsis thaliana* als Sonde beim Screening einer Blatt-cDNA-Bank von *Digitalis lanata* (WERLE 1995) führte zur Detektion eines cDNA-Klones mit Homologien zu Adx, der 1058 bp umfaßte.

Der codierende Bereich bestand aus 546 bp. Der nicht translatierte Bereich wurde auf weitere informative Sequenzen hin untersucht.

Eukaryotische mRNAs enthalten keine so hoch konservierte Sequenz, wie sie der Shine-Dalgarno-Sequenz der Prokaryoten entspricht (SHINE & DALGARNO 1975). Dennoch findet sich zwei Basen vom Startmethionin entfernt die Sequenz aagga, die komplementär zu einem Teil des 3'-Endes accuccuua der rRNA ist. Selbstverständlich kann es sich hierbei auch lediglich um einen Zufall handeln.

Im Abstand von 19 bp von der Poly-(A)-Sequenz findet sich ein mögliches Polyadenylierungssignal tataaa. Diese Sequenz stimmt nicht vollständig mit der erwarteten Sequenz aataaa überein.

Der offene Leserahmen des cDNA-Klons aus *Digitalis lanata* codiert für ein Protein mit 181 Aminosäuren. Die Sequenz dieses Proteins wies es als *vertebrate-type* Ferredoxin aus, ebenfalls mit hoher Homologie zum Adx.

Der Untersuchung der organspezifischen Expression des Adrenodoxin homologen aus *Digitalis lanata* zufolge wird das Gen in den Kronblättern exprimiert (siehe Abb. 9). Dies steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen der Northern-Blot-Untersuchung von *Arabidopsis thaliana* (MATSUBARA et al. 2002). Hier wurde ebenfalls die höchste Expression der *vertebrate-type* Ferredoxine in Blüten gefunden. In den übrigen Pflanzenteilen ist die Expression zu gering, um Aussagen über ihre Expression treffen zu können. Die Tatsache, daß die Sequenz des *vertebrate-type* Ferredoxins aus *Digitalis lanata* in einer cDNA-Bank von Blättern gefunden wurde, spricht jedoch für eine, wenn auch möglicherweise geringfügige, Expression in Blättern.

4.3.1 Expression der pflanzlichen *vertebrate-type* Ferredoxine

Die Expression der *vertebrate-type* Ferredoxine aus *Arabidopsis thaliana* lieferte ca. 10 % der Ausbeute, die für das bovine Adx erreicht werden kann. Da die verkürzte Form (Aminosäuren 4-108) noch besser exprimiert wird, könnte es sinnvoll sein, auch die pflanzlichen Proteine auf die Aminosäuren 4 bis 113 zu verkürzen. Im bovinen Adx wird durch die freie Carboxylgruppe am Prolin 108 eine Stabilisierung erreicht.

4.3.2 Biochemische und biophysikalische Eigenschaften

4.3.2.1 SDS-PAGE und IEF

Die *vertebrate-type* Ferredoxine aus *Arabidopsis thaliana* zeigen im SDS-Gel ein Laufverhalten, das höhere Molekularmassen vortäuscht, als aus der Aminosäuresequenz abgeleitet werden können (siehe Abb. 11). Dabei wird angenommen, daß es sich um Dimere handelt. Obwohl das bei SDS-Gelen ungewöhnlich ist, gibt es Belege, daß auch andere Ferredoxine dieses Verhalten zeigen (BÖHME & SCHRAUTEMEIER 1987, PUEYO et al. 1992). Außer der Dimerisation werden auch Interaktionen mit der Gelmatrix zur Erklärung dieses Phänomens angeführt. Es scheint allerdings unwahrscheinlich, daß diese Interaktion in größerem Umfang zur scheinbaren Massezunahme beiträgt, da ADXHOM1ATH und ADXHOM2ATH bei einer Identität von 87 % dennoch unterschiedliches Laufverhalten zeigen.

Untersuchungen, die mit Adx durchgeführt wurden, deuten auf Dimerbildung in wässriger Lösung hin. Dazu gehören Ergebnisse der Gelfiltration (JOSE et al. 2002) sowie von Lichtstreuungsmessungen (PIKULEVA et al. 2000). Bei der Aufreinigung sowohl von Adx wie auch der Adrenodoxin homologen aus *Arabidopsis thaliana* im Rahmen dieser Arbeit wurden Konzentratoren mit einer Grenzgröße von 30 kDa verwendet. Durch die starke Eigenfärbung der Ferredoxine konnte sicher festgestellt werden, daß sie trotz eines Molekulargewichtes von nur ca. 14 kDa die intakte Membran nicht durchdringen konnten. Auch dieses Verhalten läßt sich zwanglos durch die Annahme von Oligomeren erklären.

Nach EDC-Behandlung laufen beide Ferredoxine aus *Arabidopsis thaliana* auf gleicher Höhe mit Adx.

Das Gel der isoelektrischen Fokussierung zeigt die Banden von Adx, ADXHOM1ATH und ADXHOM2ATH im Bereich von pH 4,2-4,5 (siehe Abb. 12). Das stimmt recht gut mit den berechneten isoelektrischen Punkten (siehe Tab. 9) überein.

Ein Versuch, die beiden Adrenodoxin homologen aus *Arabidopsis thaliana* mit dem Antikörper gegen bovines Adx nachzuweisen, schlug fehl. Auf dem Blot, der gleiche Mengen der drei Ferredoxine aufwies, konnte nur Adx detektiert werden. Um später Untersuchungen der Proteine in verschiedenen Organen von *Arabidopsis thaliana* oder auch *Digitalis lanata* durchführen zu können, müßte demnach ein spezifischer Antikörper

gegen die *vertebrate-type* Ferredoxine aus *Arabidopsis thaliana* bzw. *Digitalis lanata* erzeugt werden.

4.3.2.2 Spektren der Proteine

Die UV-Vis-Spektren der pflanzlichen Adrenodoxin homologen (Abb. 13) weisen sie deutlich als [2Fe-2S]-Ferredoxine aus. Die spektralen Eigenschaften zeigen, daß der Eisen-Schwefel-Cluster in analoger Weise wie bei Adx im Protein inkorporiert ist. Auf Zugabe des Reduktionsmittels Natriumdithionit verlieren die Adrenodoxin homologen aus *Arabidopsis thaliana* ebenso wie Adx ihren Cluster und bleichen aus. Auch die resultierenden UV-Vis-Spektren der reduzierten Proteine sind ähnlich (Abb. 14).

Die CD-Spektren der *vertebrate-type* Ferredoxine aus *Arabidopsis thaliana* (Abb. 15 und 16) bestätigen, daß es sich um [2Fe-2S]-Ferredoxine handelt. Auch der korrekte Einbau des Eisen-Schwefel-Clusters kann aus den Spektren abgeleitet werden. Die geringfügigen Unterschiede im Spektrum deuten auf kleinere Veränderungen in der Umgebung des Clusters hin. Das Modell weist im Loop, der den Cluster umgibt, solche strukturellen Abweichungen auf (siehe Kap. 4.4.4.1).

Im oxidierten Zustand sind die Adrenodoxin homologen aus *Arabidopsis thaliana* stabiler als Adx, wie die Ergebnisse der thermischen Denaturierung zeigen (Abb. 17). Im reduzierten Zustand sind alle drei Proteine weniger stabil, diesmal sind jedoch Adx und ADXHOM2ATH stabiler als ADXHOM1ATH (Abb. 18). Der Unterschied der Übergangstemperaturen von Adx beträgt nur 3,8 K im Gegensatz zu 15,7 bzw. 13,1 K für ADXHOM1ATH und ADXHOM2ATH (vg. Tab. 6).

Deutlichster Beweis für eine nahezu unveränderte Cluster-Geometrie sind die EPR-Spektren der *Arabidopsis*-Ferredoxine. Die g-Werte entsprechen vollkommen denen, die für Adx bestimmt worden sind ($g_{\parallel}=2,03$ und $g_{\perp}=1,94$, UHLMANN et al. 1992). Das spricht für eine Inkorporation des Eisen-Schwefel-Clusters identisch zu der, die in bovinem Adx zu finden ist.

4.3.2.3 Redoxpotential

Die Messung des Redoxpotentials führte aufgrund der unerwartet niedrigen Werte zu keinen konkreten Ergebnissen. Diese Messungen müssen demnach mit anderen Methoden wiederholt werden. Geeignet wäre die Photoreduktionsmethode mit 5-Deazaflavin als Photoreduktans und Benzylviologen als Farbindikator (HUGO et al. 1998). Möglicherweise läßt sich das niedrige Redoxpotential durch Unterschiede in der Tertiärstruktur, insbesondere in der Umgebung des Eisen-Schwefel-Clusters, erklären (siehe Kap. 4.4.6.1).

4.3.2.4 SCC-Assay

Die Adrenodoxinohomologen aus *Arabidopsis thaliana* können Adx als Elektronenüberträger zwischen AdR und CYP11A1 funktionell ersetzen. Sie sind daher nicht nur aufgrund ihrer Sequenz als *vertebrate-type* Ferredoxine anzusprechen. Um Aussagen darüber treffen zu können, ob vergleichbare Werte für K_M und v_{max} der Rekonstitutionssysteme der pflanzlichen Adrenodoxinohomologen bzw. Adx erreicht werden können, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

4.4 Analysen *in silico*

4.4.1 Untersuchung der Primärstruktur

Vergleich der Aminosäuresequenzen der drei *vertebrate-type* Ferredoxine von *Arabidopsis thaliana* und *Digitalis lanata* mit den Adrenodoxinen aus Rind, Maus und Mensch führte zunächst zur Festlegung von Präsequenzen. Das war notwendig, um anschließend die Ferredoxine exprimieren zu können. Es muß betont werden, daß diese Festlegung nur auf Grund von Sequenzhomologien erfolgte. Der tatsächliche Beginn der reifen Proteine kann daher an einer anderen Aminosäureposition liegen, allerdings kaum mehr als einige Aminosäuren entfernt.

Eine neuere Untersuchung, die das Adrenodoxinohomologe I aus *Arabidopsis thaliana* als essentiellen Bestandteil der Biotinsynthese nachweist, legt die ersten 43 Aminosäuren als prä-Sequenz fest (PICCIOCCHI et al. 2003). Leider wird keine Erklärung für diese Entscheidung gegeben. Die Sequenzhomologien bieten keinen Anhaltspunkt, diese

Position zu favorisieren. Zwei nach Trypsinverdau sequenzierte Peptidfragmente liegen innerhalb der in dieser Arbeit angenommenen reifen Proteine (siehe Abb. 31, AS 11-20 bzw. AS 95-109). Es ist interessant, daß in den ersten Veröffentlichungen der Gensequenz das abgeleitete Protein mit Aminosäure 44 erst begann. Derzeit wird diese kürzere Version des prä-Proteins als alternative *splicing*-Variante geführt.

Die Untersuchung der C-terminalen Sequenzen der *vertebrate-type* Ferredoxine aus *Arabidopsis thaliana* und *Digitalis lanata* zeigte, daß alle drei Proteine zu einer Klasse von Ferredoxinen mit konserviertem C-Terminus gehören. Diese Typ II mitochondrialen Ferredoxine (Typ II mtFd) enthalten das sogenannte Pro-His-Motiv VDGxxpxPH (SEEBER 2002). Bei beiden Ferredoxinen aus *Arabidopsis thaliana* wird dieses Motiv durch VDGfVpKPH gebildet, das Ferredoxin aus *Digitalis lanata* zeigt die Sequenz VDGhKpKPH.

Adx gehört zu den Typ I mitochondrialen Ferredoxinen (Typ I mtFd) nach SEEBER (2002), deren C-Terminus in Länge und Sequenz variabel ist. Die Tatsache, daß einige Organismen ausschließlich über Typ II mtFd verfügen, zeigt jedoch, daß diese die Funktion der Typ I mtFd erfüllen können. Alle bislang in der Literatur beschriebenen funktionellen Studien an mitochondrialen Ferredoxinen wurden mit Typ I mtFd durchgeführt. Diese Arbeit beschreibt somit die ersten biochemischen und biophysikalischen Analysen der Typ II mtFd. Die Bestimmung von Bindungskonstanten und anderer Parameter in rekonstituierten Cytochrom-P450-Systemen sollte weitere Aufschlüsse über die Funktion dieser Proteine geben.

SEEBER diskutiert die Funktion des Pro-His-Motivs im Zusammenhang mit der Dimerisation der Ferredoxine (SEEBER 2002). Da allerdings von den beiden hoch homologen *vertebrate-type* Ferredoxinen aus *Arabidopsis thaliana* nur ADXHOM2ATH im SDS-Gel Dimer-Banden aufweist, scheint das zumindest nicht die Hauptfunktion zu sein. Möglicherweise spielt die Interaktion mit Proteinen der Eisen-Schwefel-Cluster-Assemblierungs-Maschinerie (vgl. LILL 2003) eine Rolle.

adxhom1ath	TTSEKGGKTEKINVTFVDKDGEEIHIKVPVGMNILEAAHENDIE	45
adxhom2ath	TSENGDEETEKITIIFVDKDGEEIPVKVPIGMSVLEAAHENDID	45
adxhomdla	LESEDGSEETQKINTTFVDKDGEEHVRVPVGMMSLEAAHENDID	45
	.*.*:*:*:. ***** : :*:*:**.*:*****:	
	▼ ▼ ▼	
adxhom1ath	LEGACEGSLACSTCHVIVMDTKYYNKLEEPTDEENDMLDLAFGLT	90
adxhom2ath	LEGACEASLACSTCHVIVMDTEYYNKLEEPTDEENDMLDLAFGLT	90
adxhomdla	LEGACEGSLACSTCHVIVMDVNQYNKLADPTDEENDMLDLAFGLT	90
	*****.*:*****:*****:**** :*****:*****:	
	▼ ◆	
adxhom1ath	ATSRLGCQVIAKPELDGVRLAIPSATRNFAVDGFVPKPH	129
adxhom2ath	ETSRLGCQVIARPELDGVRLAIPSATRNFAVDGFVPKPH	129
adxhomdla	ETSRLGCQIIAKPELDGLRLALPSATRNFAVDGHKPKPH	129
	*****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*.* ****	

Abb. 31 — Vergleich der reifen Formen der pflanzlichen *vertebrate-type* Ferredoxine. Die Cysteinliganden des Eisen-Schwefel-Clusters sind mit ▼ , Prolin 113 (entsprechend Prolin 108 von Adx) mit ◆ gekennzeichnet.

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der reifen Formen der pflanzlichen Ferredoxine zeigt die hohe Ähnlichkeit dieser Proteine. Außer den essentiellen Cysteinresten 50, 56, 59 und 97 und dem Prolin 113 (Abb. 31) gibt es weitere Übereinstimmungen mit wichtigen Aminosäuren des bovinen Adx (vgl. Abb. 30). Die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Histidin 56 und Serin 88 hat ihre Entsprechung in der Wasserstoffbrücke zwischen Histidin 60 und Serin 93 der pflanzlichen Ferredoxine. Die Bindung zwischen Cystein 52 und Threonin 54 in Adx entspricht der von Cystein 56 und Threonin 58 in den Adrenodoxinhomologen. Die für die Stabilität des Proteins wichtige Salzbrücke zwischen Arginin 89 und Glutaminsäure 74 in Adx findet sich wieder zwischen Arginin 94 und Glutaminsäure 79 der Homologen. Die Wasserstoffbrücke zwischen Arginin 14 und Prolin 108 in Adx wird in den pflanzlichen Adrenodoxinhomologen durch Lysin 20 und Prolin 113 gebildet. Threonin 49 und Tyrosin 82 werden in den Homologen durch Serin 53 und Phenylalanin 87 ersetzt. Wie Untersuchungen an den entsprechenden Adx-Mutanten zeigen, werden die Funktion und Eigenschaften der Proteine durch diese Veränderungen kaum berührt (HANNEMANN et al. 2001, BECKERT et al. 1994).

4.4.2 Homologievergleich

Die Suche nach Sequenzen pflanzlicher Proteine mit Homologie zu Adx brachte eine Fülle von Sequenzen. Die meisten dieser Proteine erwiesen sich als *plant-type* Ferredoxine. Aber auch Sequenzen mit Merkmalen der *vertebrate-type* Ferredoxine konnten gewonnen werden. Das Genom von *Arabidopsis thaliana* enthielt zwei Isoformen von Homologen des bovinen Adx. *Bos taurus* selbst verfügt über zwei Adx-Isoformen, auch *plant-type* Ferredoxine kommen häufig in zwei Formen vor. Von *Digitalis lanata* liegt bisher nur eine Sequenz vor, allerdings wurde nicht exzessiv nach weiteren Isoformen gesucht. Andere Enzyme und Proteine kommen in *Digitalis lanata* in mehreren Isoformen vor. Es besteht daher eine gewisse Wahrscheinlichkeit, daß ein weiteres Adrenodoxin homologes in *Digitalis lanata* existiert.

Eine Zusammenstellung von 19 Sequenzen von *plant-type* und *vertebrate-type* Ferredoxinen führte zu einem phylogenetischen Diagramm (siehe Abb. 21). Die Aufspaltung in zwei große Gruppen spiegelt die beiden Typen der [2Fe-2S]-Ferredoxine wieder. Innerhalb der *vertebrate-type* Ferredoxine wird die hohe Verwandtschaft der pflanzlichen Adrenodoxin homologen mit den Adrenodoxinen von Rind, Maus und Mensch deutlich. Abb. 32 zeigt das dem Diagramm zugrundeliegende Alignment der 19 Sequenzen. Die wichtigsten Merkmale, die von allen Vertretern der [2Fe-2S]-Ferredoxine geteilt werden, sind die vier Cysteine, die als Liganden des Eisen-Schwefel-Clusters dienen. Es wird deutlich, daß die Anzahl der Aminosäuren im Loop zwischen dem ersten und zweiten dieser Cysteine ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal zwischen den *plant-type* und *vertebrate-type* Ferredoxinen darstellt. Die bakteriellen Ferredoxine wurden daher den *vertebrate-type* Ferredoxinen zugerechnet.

fdx1sol	-----AAYKVTLVTPGTN-VEFQCPDDVYILDAAEEE-GIDLPI--SCRAG-SCSSCAGKL-	51
fdxdst	-----ATYKVKLVTPDGP-VEFNCPDDVYILDQAEIII-GHDLPI--SCRAG-SCSSCAGKV-	51
fdxosa	-----ATYKVKLVTPDGE-VELQVPPDDVYILDQAEIII-GIDLPI--SCRAG-SCSSCAGKV-	51
fdx1ath	-----ATYKVKFITPEGE-LEVECDVVYLDAAEEA-GIDLPI--SCRAG-SCSSCAGKV-	51
fdx2ath	-----ATYKVKFITPEGE-QEVECEEDVYLDAAEEA-GIDLPI--SCRAG-SCSSCAGKV-	51
fdx2sol	-----ATYKVTLVTPSGS-QVIECGDDEYILDAAEEK-GMDLPI--SCRAG-ACSSCAGKV-	51
fdxear	-----AYKTVLKTPSGE-FTLDVPEGTTILDAAEEA-GYDLPI--SCRAG-ACSSCLGKV-	50
adx2bta	-----LRSE--DKITVHFVFNDRGETLTTKKGKIGDSSLDDVVVQN-NLDIDGFGACEGTLACSTCHLIF-	59
adx1bta	-----SSSE--DKITVHFVFNDRGETLTTKKGKIGDSSLDDVVVQN-NLDIDGFGACEGTLACSTCHLIF-	59
adxmmu	-----SSSE--DKITVHFVFNDRGETLTTKKGKIGDSSLDDVVVQN-NLDIDGFGACEGTLACSTCHLIF-	59
adxhsa	-----SSSE--DKITVHFVFNDRGETLTTKKGKIGDSSLDDVVVQN-NLDIDGFGACEGTLACSTCHLIF-	59
adxhomath1	---TTSEKGGKTEKINVTFFVDKDGEEIHKVFPVGMNILEAAHEN-DIELEG--ACEGSLACSTCHVIM	64
adxhomath2	---TSENGDEETEKITIIFVDKDGEEIHKVFPVGMNILEAAHEN-DIDLEG--ACEGSLACSTCHVIM	64
adxhomdla	---LESEGDSEETQKINTTFVDKDGEEIHKVFPVGMNILEAAHEN-DIDLEG--ACEGSLACSTCHVIM	64
fdxsce	-----PGEE---LKITFLLKDGSKTYEVECEGETILDIQGH-NLDMEG--ACGGSCACSTCHVIV-	55
fdxspoETP1	PSFHSEIKKPLPGTGKIVFFVTPEGREIMIEGNEGDSILDLAHAN-NIDLEG--ACEGSLACSTCHVIV-	66
putrex	-----SKVVVYVSHDGRPEIIPKVPVIGVSLMVAASVNGIYDIVG--DCGGASACSTCHVIV-	52
terprx	-----PRVVFIDEQSGEYAVDAQDQGSQSLMEVATQNGVPGIVA--ECGGSCVACATCRIE-	52
fdxeco	-----PKIVILPHQDLCPDGAVALANSGETILDAALRN-GIEIEH--ACEKSCACTTCHCIV-	54
	. : : . : * * : *	
fdx1sol	-----KTGSLNQDDQSFLD--DDQIDEGWVLTCAAYPVS---DVTIETHKEEELTA-----	97
fdxdst	-----TAGTVDQSDGNYLD--DDQMDAGFVLTCAVYVQS---DVTIETHKEEELTG-----	97
fdxosa	-----VSGEIDQSDQSFLD--DDQVAAAGWVLTCHAYPKS---DIVIETHKQEDLI-----	96
fdx1ath	-----VSGSVDQSDQSFLD--DEQIGEGFVLTCAAYPTS---DVTIETHKEEDIV-----	96
fdx2ath	-----VSGSIDQSDQSFLD--DEQMSSEGYVLTCAVYPTS---DVVIETHKEEAIM-----	96
fdx2sol	-----TSGSVDQSDQSFLD--DGQMEEGWVLTCAIYPTG---DVTIETHKEEELTA-----	97
fdxear	-----VSGSVDESEGSFLD--DGQMEEGVLTCAIYPTG---DLVIETHKEEELF-----	95
adx2bta	EQHIFEKLEAITDEENDMLDLAYG-LTDRSRLGCQICLTKAMDNMTVRVPDAVSDARESIDMGMSKIE	128
adx1bta	EQHIFEKLEAITDEENDMLDLAYG-LTDRSRLGCQICLTKAMDNMTVRVPDAVSDARESIDMGMSKIE	128
adxmmu	EDHIYEKLDAITDEENDMLDLAYG-LTDRSRLGCQICLTKAMDNMTVRVPEAVADVRSVDMKNS----	124
adxhsa	EDHIYEKLDAITDEENDMLDLAYG-LTDRSRLGCQICLTKAMDNMTVRVPEAVADVRSVDMKNS----	124
adxhomath1	DTKYYNKLEEPTDEENDMLDLAYG-LTATSRLGCQVIKPELDGVRVLAIPSATRNFAVDGFPKPH----	129
adxhomath2	DTEYYNKLEEPTDEENDMLDLAYG-LTATSRLGCQVIKPELDGVRVLAIPSATRNFAVDGFPKPH----	129
adxhomdla	DVNQYNKLDPTDEENDMLDLAYG-LTATSRLGCQVIKPELDGVRVLAIPSATRNFAVDGFPKPH----	129
fdxsce	DPDYDALPEPEDDENMLDLAYG-LTATSRLGCQIKMSKIDGIRVALPQMTRNVNNDNFS-----	116
fdxspoETP1	DPEHYELLDPPEDEEDMLDLAYG-LBETSRLGCQVLLRKLDDGIRVRIPAQTRNIRLE--RPKA----	128
putrex	NEAFTDKVPAANEREIGMLECVTAEKLPNSRLCCQIIMTPELDGIVVDVDPDRQW-----	106
terprx	EDAWVEIVGEANPDENDLLQSTGEPMTAGTRLSQVFDPSMDGLIVRVPLPA-----	105
fdxeco	-REGFDSLPESEQEDDMLDKAWG-LEPESRLSCQARVTD--EDLVVEIPRYTINHAREH-----	110
	: . * : : * * : : :	

Abb. 32 — Alignment von 19 [2Fe-2S]-Ferredoxinen (ClustalW). fdx1sol - Ferredoxin I aus *Spinacia oleracea* (WEDEL et al. 1988), fdx2sol - Ferredoxin II aus *Spinacia oleracea* (TAKAHASHI et al. 1983), fdxdst - Ferredoxin aus *Datura stramonium* (MINO et al. 1993), fdxosa - Ferredoxin aus *Oryza sativa* (OHMORI et al. 1996), fdx1ath - Ferredoxin I aus *Arabidopsis thaliana* (VORST et al. 1990, SOMERS et al. 1990), fdx2ath - Ferredoxin II aus *Arabidopsis thaliana* (THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE 2000), fdxear - Ferredoxin aus *Equisetum arvense* (HASE et al. 1977), adx1bta - Adrenodoxin I aus Rind (OKAMURA et al. 1985), adx2bta - Adrenodoxin II aus Rind (OKAMURA et al. 1987), adxmmu - Adrenodoxin aus Maus (STROMSTEDT & WATERMAN 1995, ITOH et al. 1995), adxhsa - Adrenodoxin aus Mensch (PICADO-LEONARD et al. 1988), adxhom1ath und adxhom2ath - Adrenodoxinhomologe I und II aus *Arabidopsis thaliana* (THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE 2000), adxhomdla - Adrenodoxinhomologes aus *Digitalis lanata*, fdxsce - Ferredoxin aus *Saccharomyces cerevisiae* (BUSSEY et al. 1997), fdxspoETP1 - Ferredoxindomäne des Elektronentransportproteins aus *Schizosaccharomyces pombe* (BUREIK et al. 2002), putrex - Putidaredoxin aus *Pseudomonas putida* (PETERSON et al. 1990), terprx - Terpredoxin aus *Pseudomonas* sp. (PETERSON et al. 1992), fdxeco - Ferredoxin aus *Escherichia coli* (TA & VICKERY 1992).

Der Vergleich der abgeleiteten Proteinsequenzen der *vertebrate-type* Ferredoxine von *Arabidopsis thaliana* und *Digitalis lanata* führte zur theoretischen Festlegung von reifen Proteinen. Deren Authentizität muß selbstverständlich durch Untersuchung der nativen Proteine überprüft werden. Sollten sich die Ergebnisse der Northern-Blot-Analyse auf

Proteinebene bestätigen, wären Proteinextrakte aus Kronblättern von *Digitalis lanata* geeignetes Untersuchungsmaterial.

Die festgelegten Sequenzen der reifen Adrenodoxin homologen entsprechen hinsichtlich Größe und Eigenschaften den Adrenodoxinen aus Rind, Maus und Mensch.

4.4.3 Berechnungen aus der Primärstruktur

Die Größe der pflanzlichen Adrenodoxin homologen stimmt mit 14,2 kDa sehr gut mit Adx überein, die prä-Proteine liegen im Bereich von 20 kDa. Die isoelektrischen Punkte variieren etwas stärker (vgl. Tab. 9), bestätigen aber die typischen, stark sauren Eigenschaften von Ferredoxinen. Sie finden ihre experimentelle Bestätigung durch die isoelektrische Fokussierung (siehe Abb. 12).

4.4.4 Signal- und Targeting-Peptide

Die Überprüfung der Sequenzen der *vertebrate-type* Ferredoxine aus *Arabidopsis thaliana* und *Digitalis lanata* mit verschiedenen Vorhersageprogrammen führte zu keinem einheitlichen Ergebnis (siehe Tab. 10). Die meisten Programme bestätigen, daß es sich, wie man in Analogie zu Adx vermuten darf, um mitochondriale Proteine handelt. Ausnahmen gibt es lediglich bei iPSORT (BANNAI et al. 2002), das bei ADXHOM1ATH weder ein chloroplastidäres Transitpeptid noch ein mitochondriales Targetingpeptid detektiert und das ADXHOM2ATH ein chloroplastidäres Transitpeptid zuschreibt. Die Detektion der prä-Sequenz ist den Programmen teilweise nicht möglich oder führt zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Lediglich MitoProt sagt für ADX1BTA die richtige Länge voraus. Zur Festlegung der theoretischen prä-Sequenzen der pflanzlichen *vertebrate-type* Ferredoxine wurden die Vorhersagen der Programme daher nicht herangezogen.

Die vorhergesagte mitochondriale Lokalisierung wird durch Nachweis des Adrenodoxin homologen I aus *Arabidopsis thaliana* in Mitochondrienlysat bestätigt (PICCIOCCI et al. 2003).

4.4.5 Modellberechnungen

Die Berechnung eines Modells von ADXHOMDLA sollte die Möglichkeit bieten, die dreidimensionale Struktur eines pflanzlichen *vertebrate-type* Ferredoxins zu untersuchen.

4.4.5.1 Validierung des Modells

Die Validierung des Modells von ADXHOMDLA wurde mit verschiedenen Programmen durchgeführt, da nur die Kombination mehrerer Qualitätskriterien ein Bild von der Güte eines Modells vermitteln kann. Ein Modell, das nur in geringem Maß einer Energieminimierung unterworfen wurde, wird hervorragende Werte hinsichtlich der Winkel Φ und Ψ aufweisen. Dagegen dürfte die gegenseitige Behinderung der Seitenketten bedeutende Ausmaße annehmen. In einem stark energieminimierten Modell wird die Interaktion der Seitenketten kaum noch eine Rolle spielen, dafür wird der Ramachandran-Plot eine erheblich schlechtere Qualität aufweisen.

Der Vergleich der Ramachandran-Plots von Adx (Abb. 22) und ADXHOMDLA (Abb. 23) zeigt eine nur geringfügige Verschlechterung der Werte für das Modell des Ferredoxins aus *Digitalis lanata*.

Der Prosa-II-Energiegraph gibt für jede Aminosäureposition die gesamte Interaktionsenergie dieser Aminosäure mit allen anderen Aminosäuren an. Diese Energiefunktion sollte möglichst negativ sein. Falsch gewählte Templates verraten sich zumeist durch hohe Werte des Energiegraphen (vgl. SIPPL 1993b). Im Fall des Modells von ADXHOMDLA liegt der Graph erfreulicherweise sogar größtenteils unterhalb der Kurve des Templates (vgl. Abb. 24). Das läßt auf eine energetisch sehr günstige Faltung des Proteins schließen. Auch die *z-scores* stimmen gut überein.

Die gegenseitige sterische Hinderung der Proteinseitenketten übersteigt im Modell des Adrenodoxin homologen nicht wesentlich die Werte, wie sie für die Struktur von Adx zu bestimmen waren. Beide Diagramme der WHAT IF Qualitätskontrolle weisen hohe Ähnlichkeit auf (vgl. Abb 25 und 26).

Die Kombination der Ergebnisse der Überprüfung läßt den Schluß zu, daß es sich um ein verlässliches Modell des *vertebrate-type* Ferredoxins aus *Digitalis lanata* handelt. Erst die Aufklärung der Röntgenstruktur dieses Proteins läßt genauere Erkenntnisse erwarten.

4.4.6 Untersuchung der Tertiärstruktur

Die Berechnung des Modells des *vertebrate-type* Ferredoxins aus *Digitalis lanata* bietet die Möglichkeit, die dreidimensionale Struktur des Proteins zu untersuchen. Der Vergleich der *ribbon*-Strukturen von Adx und Modell zeigt nur geringfügige Abweichungen. Wichtiger, da im Wesentlichen von den Seitenketten der Aminosäuren abhängig, ist die Übereinstimmung bei den elektrostatischen Potentialen auf der Connolly-Oberfläche. In gleichem Maße von der Art der Seitenketten abhängig ist die Hydrophobizität der Oberfläche. In beiden Fällen besteht eine außerordentlich hohe Ähnlichkeit des Modells des *vertebrate-type* Ferredoxins aus *Digitalis lanata* mit dem bovinen Adx (vgl. Abb. 28 und 29).

4.4.6.1 Unterschiede der Tertiärstruktur

Wenn man die Überlagerung des Proteinrückgrats von Adx und dem Modell des Adrenodoxin homologen aus *Digitalis lanata* betrachtet, fallen drei Bereiche ins Auge, in denen deutliche Unterschiede bestehen (siehe Abb. 33).

Der erste Bereich umfaßt die Aminosäuren Leucin 38 bis Alanin 45 (Adx) bzw. Isoleucin 44 bis Alanin 49 (ADXHOMDLA). Im Adx schmiegt sich die Peptidkette stärker dem Eisen-Schwefel-Cluster an und schirmt ihn daher besser gegen äußere Einflüsse ab. Im Modell erlaubt die etwas aufgelockerte Struktur der Kette einen besseren Zugang zum Cluster. Möglicherweise ist das die Erklärung für das ungewöhnlich niedrige Redoxpotential. Vergleiche von *plant-type* und *vertebrate-type* Ferredoxinen ergaben, daß in *plant-type* Ferredoxinen ein lösungsmittelgefüllter Trichter existiert, der nahe am Eisen-Schwefel-Cluster vorbei in das Protein führt (MÜLLER et al. 1999).

Die zweite Abweichung bezieht sich auf die Aminosäuren Phenylalanin 59 bis Phenylalanin 64 (Adx) bzw. Valin 63 bis Tyrosin 69 (ADXHOMDLA). Dieser Bereich umfaßt eine helikale Struktur an der Verbindungsstelle zwischen Interaktions- und Kerndomäne. Vermutlich trägt diese Strukturänderung nicht wesentlich zu meßbaren Unterschieden in den Eigenschaften des Ferredoxins bei, da diese Region recht weit vom Eisen-Schwefel-Cluster entfernt ist.

Drittens ist der Eisen-Schwefel-Cluster selbst geringfügig in seiner Position verschoben. Die Veränderungen der CD-Spektren könnten hierauf zurückgehen.

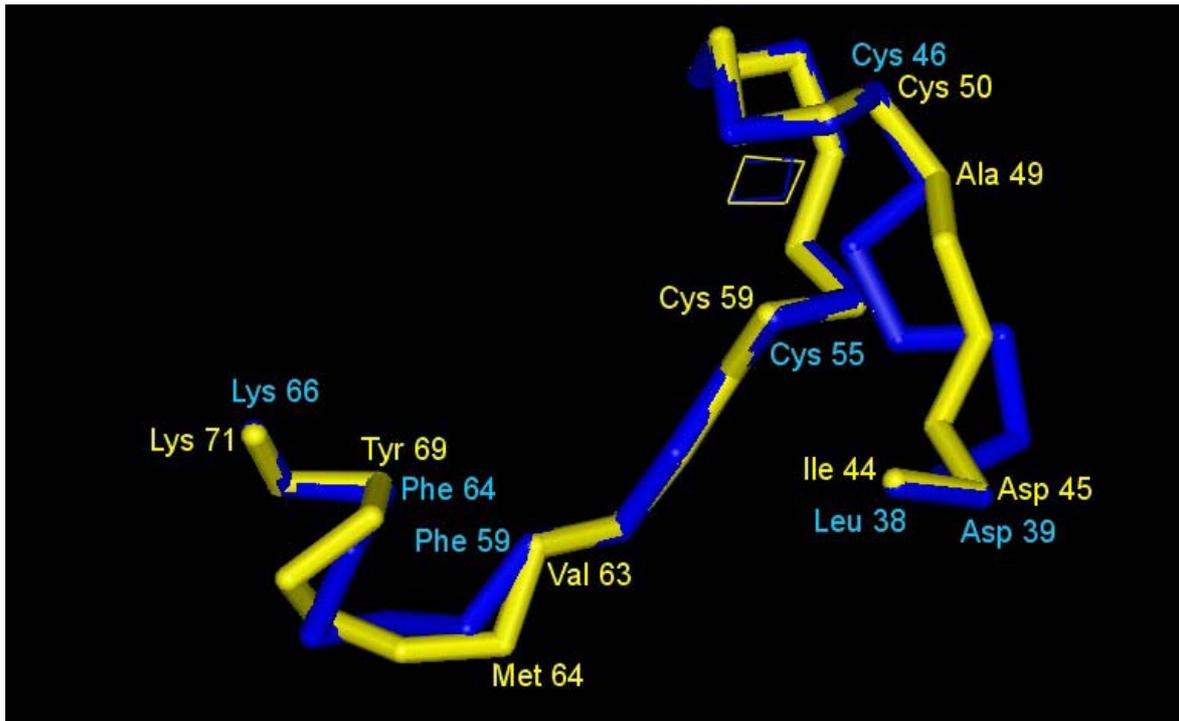


Abb. 33 — Überlagerung des Proteinrückgrats von Adx (blau) und ADXHOMDLA (gelb). Ausgewählte C_{α} sind bezeichnet. N- und C-terminale Aminosäuren sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt.

Inwieweit die Abweichungen, die zwischen Modell und Adx sichtbar werden, auch im nativen Protein auftreten, muß späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Eine Röntgenstrukturanalyse von rekombinantem Protein könnte diese Frage beantworten.

4.5 Weiterführende Arbeiten

Die Suche nach dem seitenkettenspaltendem Enzym in *Digitalis lanata* könnte mit Hilfe der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation durchgeführt werden. Dazu müsste zunächst eine cDNA-Bank in einem Plasmid oder λ -Phagen konstruiert werden, die die jeweiligen *Digitalis-lanata*-Proteine als Hybride mit einem Fragment des Gelb Fluoreszierenden Proteins (YFP) exprimieren kann. Die Überprüfung der Fluoreszenzkomplementation würde mit einem Plasmid erfolgen, das die genetische Information für ein Hybridprotein aus ADXHOMDLA und dem zweiten Fragment von YFP trägt.

Eine weitere, methodisch einfachere Möglichkeit, bietet die Affinitätschromatographie an Adx-Sepharose, wie sie zur Reinigung von AdR und CYP11A1 angewendet wird. An die Stelle von Adx könnte je nach Herkunft des zu überprüfenden Lysates das Homologe der betreffenden Pflanze treten. Außer Proteinextrakten von ganzen Pflanzen oder

Pflanzenorganen eignen sich selbstverständlich Mitochondrienlysate in besonderer Weise für eine solche Untersuchung.

Sowohl Adx als auch seine pflanzlichen Homologe kommen häufig in Isoformen vor. In *Digitalis lanata* ist das Vorhandensein mehrerer Versionen auch von anderen Proteinen bekannt, z. B. von den Acyl-CoA-bindenden Proteinen (METZNER et al. 2000, GRUNER 2003) und von den Cyclophilinen (LIEBAU 1995, SCHOLZE et al. 1999). Hinweise auf Isoenzyme gibt es weiterhin bei der Cardenolid-16'-O-Glucohydrolase (FRAMM 2002). Daher scheint es sinnvoll, nach Isoformen des Adrenodoxin homologen in *Digitalis lanata* zu suchen. Für diese Untersuchung könnte auch die im Rahmen dieser Arbeit erstellte cDNA-Bank genutzt werden.

Antikörper gegen die rekombinanten pflanzlichen Adrenodoxin homologen würden eine Vielzahl von Untersuchungen ermöglichen. Die Verteilung der Proteine in verschiedenen Pflanzenorganen könnte mit den Ergebnissen der Northern-Blot-Analyse verglichen werden. Weiterhin könnten sie hilfreich bei der Isolierung von nativem Protein sein, dessen Sequenzierung die endgültige Feststellung der prä-Sequenz ermöglichen würde.

Im Zusammenhang mit der Überexpression der rekombinanten Proteine bieten sich mehrere weitergehende Untersuchungen an. Mit einer ausreichenden Menge an Protein könnte die Bestimmung von K_M und v_{max} des Rekonstitutionssystems aus CYP11A1, AdR und dem jeweiligen *vertebrate-type* Ferredoxin erfolgen. Dies würde eine genauere Einschätzung der Funktionalität der Adrenodoxin homologen ermöglichen.

Sollten erfolgreich Kristalle der Adrenodoxin homologen gezüchtet werden können, die für eine Röntgenstrukturanalyse geeignet sind, könnten die durch das Modell von ADXHOMDLA gewonnenen Erkenntnisse überprüft werden. Eine besonders interessante Frage ist, inwieweit die pflanzlichen *vertebrate-type* Ferredoxine eine Zwischenstellung zu den *plant-type* Ferredoxinen einnehmen.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die erste Two-Hybrid-cDNA-Bank für *Digitalis lanata* hergestellt. Diese cDNA-Bank bietet die Möglichkeit, Protein-Protein-Interaktionen in dieser Pflanze zu studieren. Die Verwendung von Adx als *bait*-Protein blieb ergebnislos, da es auf Grund seines stark sauren pI-Wertes zur Transkriptionsaktivierung führt.

Ausgehend von der Sequenz eines Adrenodoxin homologen aus *Arabidopsis thaliana* gelang es, den cDNA-Klon eines *vertebrate-type* Ferredoxins aus einer cDNA-Bank von *Digitalis lanata* zu isolieren. Der cDNA-Klon umfaßt 1058 bp, davon gehören 546 bp zum codierenden Bereich. Das abgeleitete prä-Protein besteht aus 181 Aminosäuren. Aus dem prä-Protein wurde ebenso wie für die Ferredoxine aus *Arabidopsis thaliana* aufgrund von Sequenzvergleichen ein reifes Protein abgeleitet.

Die Sequenzen der zwei Adrenodoxin homologen aus *Arabidopsis thaliana* sowie des Adrenodoxin homologen aus *Digitalis lanata* wurden erfolgreich in Expressionsvektoren kloniert.

Die *vertebrate-type* Ferredoxine aus *Arabidopsis thaliana* konnten in ausreichender Menge exprimiert und gereinigt werden und standen für biochemische und biophysikalische Untersuchungen zur Verfügung. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Im SDS-Gel zeigt ADXHOM2ATH ein abweichendes Laufverhalten, das auf Dimerbildung schließen läßt. Durch Behandlung mit EDC wird die Dimerisation unterbunden und ADXHOM2ATH wie auch ADXHOM1ATH laufen in gleicher Höhe wie Adx.

2. Die isoelektrische Fokussierung bestätigt, daß es sich wie erwartet um stark saure Proteine handelt. Der isoelektrische Punkt liegt um pH 4,2.

3. Die UV-Vis-Spektren weisen die typischen Eigenschaften von [2Fe-2S]-Ferredoxinen auf. Nach Reduktion durch Natriumdithionit ergibt sich das typische Bild eines durch Verlust des Eisen-Schwefel-Clusters gebleichten Ferredoxins.

4. Die gemessenen CD-Spektren lassen auf eine ähnliche Umgebung des Eisen-Schwefel-Clusters der pflanzlichen Adrenodoxin homologen schließen, wie sie in Adx zu finden ist.

5. Die Kurven der thermischen Denaturierung zeigen, daß die oxidierten Proteine aus *Arabidopsis thaliana* stabiler sind als Adx. Im reduzierten Zustand sind die Denaturierungskurven von Adx und ADXHOM2ATH fast deckungsgleich. Weniger stabil ist ADXHOM1ATH.

6. Die Geometrie des Eisen-Schwefel-Clusters in den *vertebrate-type* Ferredoxinen ist gegenüber Adx nach Analyse der EPR-Spektren kaum verändert. Die übereinstimmenden g-Werte unterstreichen die Ähnlichkeit der Homologen mit Adx.

7. Das unerwartet niedrige Redoxpotential deutet auf eine Mittelstellung der pflanzlichen *vertebrate-type* Ferredoxine zwischen den Adrenodoxinen und den *plant-type* Ferredoxinen hin. Das Modell von ADXHOMDLA zeigt leichte strukturelle Veränderungen, die die Ursache hierfür sein könnten, aber erst die Aufklärung der Röntgenstruktur eines pflanzlichen *vertebrate-type* Ferredoxins dürfte eine endgültige Antwort liefern.

8. Im Rekonstitutionsassay sind ADXHOM1ATH zu 58 % und ADXHOM2ATH zu 83 % in der Lage, Adx als Elektronenüberträger zwischen AdR und CYP11A1 zu ersetzen.

Unter Zugrundelegung von Adx als Template wurde ein Modell der dreidimensionalen Struktur des Adrenodoxin homologen aus *Digitalis lanata* berechnet. Validierung der Struktur bestätigte, daß es sich um ein verlässliches Modell dieses Proteins handelt. Es konnte gezeigt werden, daß wichtige intramolekulare Interaktionen analog zu denen in Adx vorhanden sind. Weiterhin konnten durch die Unterschiede zu Adx mögliche Erklärungen für abweichende Eigenschaften der Adrenodoxin homologen gefunden werden.

6. Literaturverzeichnis

- ALTSCHUL, S. F., W. GISH, W. MILLER, E. W. MYERS, D. J. LIPMAN (1990):**
Basic local alignment search tool.
J. Mol. Biol. **215** (3): 403-410
- AMANN, E., B. OCHS, K.-J. ABEL (1988):**
Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*.
Gene **69** (2): 301-315
- ARNON, D. I., F. R. WHATLEY, M. B. ALLEN (1957):**
Triphosphopyridine nucleotide as a catalyst of photosynthetic phosphorylation.
Nature **180** (4578): 182-185, (4598): 1325 (Err.)
- ARNON, D. I. (1965):**
Ferredoxin and photosynthesis.
Science **149** (691): 1460-1470
- BANNAI, H., Y. TAMADA, O. MARUYAMA, K. NAKAI, S. MIYANO (2002):**
Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals.
Bioinformatics **18** (2): 298-305
- BECKERT, V., R. DETTMER, R. BERNHARDT (1994):**
Mutations of tyrosine 82 in bovine adrenodoxin that affect binding to cytochromes P45011A1 and P45011B1 but not electron transfer.
J. Biol. Chem. **269** (4): 2568-2573
- BECKERT, V., R. BERNHARDT (1997):**
Specific aspects of electron transfer from adrenodoxin to cytochromes P450_{scc} and P45011 β .
J. Biol. Chem. **272** (8): 4883-4888
- BEILKE, D., R. WEISS, F. LÖHR, P. PRISTOVŠEK, F. HANNEMANN, R. BERNHARDT, H. RÜTERJANS (2002):**
A new electron transport mechanism in mitochondrial steroid hydroxylase systems based on structural changes upon the reduction of adrenodoxin.
Biochemistry **41** (25): 7969-7978
- BENNETT, R. D., E. HEFTMANN, B. J. WINTER (1969):**
A function of sitosterol.
Phytochemistry **8**: 2325-2328
- BERMAN, H. M., J. WESTBROOK, Z. FENG, G. GILLILAND, T. N. BHAT, H. WEISSIG, I. N. SHINDYALOV, P. E. BOURNE (2000):**
The Protein Data Bank.
Nucl. Acids Res. **28** (1): 235-242
- BERNHARDT, R. (1998):**
Electron transfer in mitochondrial steroid hydroxylating cytochrome P450 systems: role of adrenodoxin.
in: **NICOLINI, C.** (Hrsg.):
Biophysics of electron transfer and molecular bioelectronics.
Plenum Press, New York, pp. 51-66
- BIRNBOIM, H. C., J. DOLY (1979):**
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Res. **7** (6): 1513-1523

- BJELLQVIST, B., G. J. HUGHES, C. PASQUALI, N. PAQUET, F. RAVIER, J.-C. SANCHEZ, S. FRUTIGER, D. HOCHSTRASSER (1993):**
The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences.
Electrophoresis **14** (10): 1023-1031
- BLÉE, E., J. JOYARD (1996):**
Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides.
Plant Physiol. **110** (2): 445-454
- BLUM, H., H. BEIER, H. J. GROSS (1987):**
Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels.
Electrophoresis **8**: 93-99
- BÖHME, H., B. SCHRAUTEMEIER (1987):**
Comparative characterization of ferredoxins from heterocysts and vegetative cells of *Anabaena variabilis*.
Biochim. Biophys. Acta **891** (1): 1-7
- BONFILL, M., J. PALAZÓN, R. M. CUSIDÓ, M. T. PIÑOL, C. MORALES (1996):**
Effect of auxin and phenobarbital on the ultrastructure and digitoxin content in *Digitalis purpurea* tissue culture.
Can. J. Bot. **74** (3): 378-382
- BRENT, R., R. L. FINLEY Jr. (1997):**
Understanding gene and allele function with two-hybrid methods.
Annu. Rev. Genet. **31**: 663-704
- BRUSCHI, M., J. LE GALL (1972):**
Purification et propriétés d'une rubrédoxine isolée à partir de *Desulfovibrio vulgaris* (souche NCIB 8303).
Biochim. Biophys. Acta **263** (2): 279-282
- BUREIK, M., B. SCHIFFLER, Y. HIRAOKA, F. VOGEL, R. BERNHARDT (2002):**
Functional expression of human mitochondrial CYP11B2 in fission yeast and identification of a new internal electron transfer protein, etp1.
Biochemistry **41** (7): 2311-2321
- BURSTEIN, S., M. GUT (1976):**
Intermediates in the conversion of cholesterol to pregnenolone: kinetics and mechanism.
Steroids **28** (1): 115-131
- BUSSEY, H., R. K. STORMS, A. AHMED, K. ALBERMANN, E. ALLEN, W. ANSORGE, R. ARAUJO, A. APARICIO, B. BARRELL, K. BADCOCK, V. BENES, D. BOTSTEIN, S. BOWMAN, M. BRÜCKNER, J. CARPENTER, J. M. CHERRY, E. CHUNG, C. CHURCHER, F. COSTER, K. DAVIS, R.W. DAVIS, F. S. DIETRICH, H. DELIUS, T. DIPAOLO, E. DUBOIS, A. DÜSTERHÖFT, M. DUNCAN, M. FLOETH, N. FORTIN, J. D. FRIESEN, C. FRITZ, A. GOFFEAU, J. HALL, U. HEBLING, K. HEUMANN, H. HILBERT, L. HILLIER and other members of the Genome Sequencing center, S. HUNICKE-SMITH, R. HYMAN, M. JOHNSTON, S. KALMAN, K. KLEINE, C. KOMP, O. KURDI, D. LASHKARI, H. LEW, A. LIN, E. J. LOUIS, R. MARATHE, F. MESSENGUY, H. W. MEWES, S. MIRTIPATI, D. MOESTL, S. MÜLLER-AUER, A. NAMATH, U. NENTWICH, P. OEFNER, D. PEARSON, F. X. PETEL, T. M. POHL, B. PURNELLE, M. A. RAJANDREAM, S. RECHMANN, M. RIEGER, L. RILES, D. ROBERTS, M. SCHÄFER, M. SCHARFE, B. SCHERENS, S. SCHRAMM, M. SCHRÖDER, A. M. SDICU, H. TETTELIN, L. A. URRESTARAZU, S. USHINSKY, F. VIERENDEELS, S. VISSERS, H. VOSS, S. V. WALSH, R. WAMBUTT, Y. WANG, E. WEDLER, E. WINNETT, W.-W. ZHONG, A. ZOLLNER, D. H. VO, J. HANI (1997):**
The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XVI.
Nature **387** (6632 Suppl.): 103-105

- CAMMACK, R., K. K. RAO, C. P. BARGERON, K. G. HUTSON, P. W. ANDREW, L. J. ROGERS (1977):**
Midpoint redox potentials of plant and algal ferredoxins.
Biochem. J. **168** (2): 205-209
- CAMMACK, R. (1992):**
Iron-sulfur clusters in enzymes: themes and variations.
Advances in Inorganic Chemistry **38**: 281-322
- CASPI, E., D. O. LEWIS, D. M. PIATAK, K. V. THIMANN, A. WINTER (1966):**
Biosynthesis of plant sterols. Conversion of cholesterol to pregnenolone in *Digitalis purpurea*.
Experientia **22** (8): 506-507
- CHIEN, C.-T., P. L. BARTEL, R. STERNGLANZ, S. FIELDS (1991):**
The two-hybrid system: a method to indentify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88** (21): 9578-9582
- CHOE, S., B. P. DILKES, S. FUJIOKA, S. TAKATSUTO, A. SAKURAI, K. A. FELDMANN (1998):**
The *DWF4* gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22 α -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis.
Plant Cell **10** (2): 231-243
- CLAROS, M. G., P. VINCENS (1996):**
Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences.
Eur. J. Biochem. **241** (3): 779-786
- COGHLAN, V. M., L. E. VICKERY (1991):**
Site-specific mutations in human ferredoxin that affect binding to ferredoxin reductase and cytochrome P450_{scd}.
J. Biol. Chem. **266** (28): 18606-18612
- DAVENPORT, H. E., R. HILL, F. R. WHATLEY (1952):**
A natural factor catalyzing reduction of methaemoglobin by isolated chloroplasts.
Proc. Roy. Soc. B **139**: 346-358
- DAVENPORT, H. E., R. HILL (1960):**
A protein from leaves catalysing the reduction of haem-protein compounds by illuminated chloroplasts.
Biochem. J. **74**: 493-501
- DERVARTANIAN, D. V., W. H. ORME-JOHNSON, R. E. HANSEN, H. BEINERT, R. L. TSAI, J. C. M. TSIBRIS, R. C. BARTHOLOMAUS, I. C. GUNSALUS (1967):**
Identification of sulfur as component of the EPR signal at g=1,94 by isotopic substitution.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **26** (5): 569-576
- DOBROWOLSKI, B., K. GLUND, M. METZLAFF (1989):**
Cloning of tomato nuclear ribosomal DNA. rDNA organization in leaves and suspension-cultured cells.
Plant Science **60** (2): 206-207
- DUMKE-LEHMANN, U. (1993):**
Beiträge zur Isolation von Nukleinsäuren während verschiedener Entwicklungsstadien der Arzneipflanze *Digitalis lanata*.
Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

- EMANUELSSON, O.**, H. NIELSEN, S. BRUNAK, G. VON HEIJNE (2000):
Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence.
J. Mol. Biol. **300** (4): 1005-1016
- ESTABROOK, R. W.**, K. SUZUKI, J. I. MASON, J. BARON, W.E. TAYLOR, E. R. SIMPSON, J. PURVIS, J. MCCARTHY (1973):
Adrenodoxin: an iron-sulfur protein of adrenal cortex mitochondria.
in: **LOVENBERG, W.** (Hrsg.):
Iron-sulfur proteins. Vol. I, Biological properties.
Academic Press, Inc., New York, pp. 193-223
- FIELDS, S.**, O. SONG (1989):
A novel genetic system to detect protein-protein interactions.
Nature **340** (6230): 245-246
- FINSTERBUSCH, A.** (1995):
Entwicklung eines *in vitro* Enzym Testes für das Cholesterol Side-Chain Cleaving Enzym in *Digitalis lanata* EHRH.
Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- FRAMM, J. J.** (2002):
Klonierung und Expression in *E. coli* der Cardenolid-16'-O-glucohydrolase von *Digitalis lanata* EHRH.
Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- FROELICH, J. E.**, A. ITOH, G. A. HOWE (2001):
Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope.
Plant Physiol. **125** (1): 306-317
- FUCHS, L.** (1543):
New Kreüterbüch / in welchem nit allein die gantz histori / das ist / namen / gestalt / statt und zeit der wachung ...
Michael Isingrin, Basel
- GEWITZ, H.-S.**, W. VÖLKER (1962):
Über die Atmungsfermente der *Chlorella*.
Z. Physiol. Chem. **330** (1-3): 124-131
- GODER, V.**, V. BECKERT, W. PFEIL, R. BERNHARDT (1998):
Impact of the presequence of a mitochondrion-targeted precursor, preadrenodoxin, on folding, catalytic activity, and stability of the protein *in vitro*.
Arch. Biochem. Biophys. **359** (1): 31-41
- GONNET, G. H.**, M. A. COHEN, S. A. BENNER (1992):
Exhaustive matching of the entire protein sequence database.
Science **256** (5062): 1443-1445
- GREENFIELD, N. J.** (1999):
Biomacromolecular applications of circular dichroism and ORD.
in: **LINDEN, J. C.**, G. E. TRAUTER, J. L. HOLMES (Hrsg.):
Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry.
Academic Press, London, pp. 117-130
- GREGORY, H.**, E. LEETE (1960):
Biogenesis of digitoxigenin.
Chem. and Ind.: 1242-1243

- GRINBERG, A. V., R. BERNHARDT (1998a):**
Structural and functional consequences of substitutions at the Pro108-Arg14 hydrogen bond in bovine adrenodoxin.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **249** (3): 933-937
- GRINBERG, A. V., R. BERNHARDT (1998b):**
Effect of replacing a conserved proline residue on the function and stability of bovine adrenodoxin.
Protein Eng. **11** (11): 1057-1064
- GRINBERG, A. V., F. HANNEMANN, B. SCHIFFLER, J. MÜLLER, U. HEINEMANN, R. BERNHARDT (2000):**
Adrenodoxin: structure, stability, and electron transfer properties.
Proteins **40** (4): 590-612
- GRINBERG, A. V., R. BERNHARDT (2001):**
Contribution of a salt bridge to the thermostability of adrenodoxin determined by site-directed mutagenesis.
Arch. Biochem. Biophys. **396** (1): 25-34
- GRUNER, B. (2003):**
ACBP-Isoformen in *Digitalis lanata* EHRH.
Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- HANNEMANN, F., M. ROTTMANN, B. SCHIFFLER, J. ZAPP, R. BERNHARDT (2001):**
The loop region covering the iron-sulfur cluster in bovine adrenodoxin comprises a new interaction site for redox partners.
J. Biol. Chem. **276** (2): 1369-1375
- HANUKOGLU, I., C. R. JEFCOATE (1980):**
Mitochondrial cytochrome P-450_{sc}. Mechanism of electron transport by adrenodoxin.
J. Biol. Chem. **255** (7): 3057-3061
- HASE, T., K. WADA, H. MATSUBARA (1977):**
Horsetail (*Equisetum arvense*) ferredoxins I and II. Amino acid sequences and gene duplication.
J. Biochem. **82** (1): 277-286
- HEINZ, A., F. HANNEMANN, R. BERNHARDT (2002):**
The interaction domain of adrenodoxin discriminates between cytochrome P450 and adrenodoxin reductase.
in: ČREŠNAR, B., V. DOLŽAN, D. ROZMAN (Hrsg.):
Cytochrome P450 systems: from structure to application. 2nd International FEBS Advanced Course. Book of abstracts.
Faculty of Medicine, University of Ljubljana
- HO, S. N., H. D. HUNT, R. M. HORTON, J. K. PULLEN, L. R. PEASE (1989):**
Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction.
Gene **77** (1): 51-59
- HOCHBERG, R. B., P. D. McDONALD, M. FELDMAN, S. LIEBERMAN (1976):**
Fragments formed by the side chain cleavage of a 20-aryl analog of 20 α -hydroxycholesterol by adrenal mitochondria.
J. Biol. Chem. **251** (7): 2087-2093
- HOOFT, R. W. W., G. VRIEND, C. SANDER, E. E. ABOLA (1996):**
Errors in protein structures.
Nature **381** (6580): 272

- HORTON, P., K. NAKAI** (1996):
A probabilistic classification system for predicting the cellular localization sites of proteins.
Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol. **4**: 109-115
- HORTON, R. M., H. D. HUNT, S. N. HO, J. K. PULLEN, L. R. PEASE** (1989):
Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension.
Gene **77** (1): 61-68
- HU, C.-D., Y. CHINENOV, T. K. KERPPOLA** (2002):
Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation.
Mol. Cell **9** (4): 789-798
- HUGO, N., J. ARMENGAUD, J. GAILLARD, K. N. TIMMIS, Y. JOUANNEAU** (1998):
A novel [2Fe-2S] ferredoxin from *Pseudomonas putida* mt2 promotes the reductive reactivation of catechol 2,3-dioxygenase.
J. Biol. Chem. **273** (16): 9622-9629
- ITOH, S., O. IEMURA, E. YAMADA, T. YOSHIMURA, K. TSUJIKAWA, Y. KOHAMA, T. MIMURA** (1995):
Mouse cytochrome P-450 linked ferredoxin: its cDNA cloning and inducibility by dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate and forskolin.
Biochim. Biophys. Acta **1263** (2): 173-175
- JACOBSON, G. M., M. J. FREY** (1968):
Sterol content and metabolism during early growth of *Digitalis purpurea*.
Arch. Biochem. Biophys. **127** (1): 655-660
- JOSE, J., R. BERNHARDT, F. HANNEMANN** (2001):
Functional display of active bovine adrenodoxin on the surface of *E. coli* by chemical incorporation of the [2Fe-2S] cluster.
Chembiochem. **2** (9): 695-701
- JOSE, J., R. BERNHARDT, F. HANNEMANN** (2002):
Cellular surface display of dimeric Adx and whole cell P450-mediated steroid synthesis on *E. coli*.
J. Biotechnol. **95** (3): 257-268
- KANDZIA, R.** (1999):
Reinigung und Klonierung der Lanatosid-15'-O-Acetylerase aus *Digitalis lanata* EHRH.
Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- KIM, G.-T., H. TSUKAYA, H. UCHIMIYA** (1998):
The *ROTUNDIFOLIA3* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a new member of the cytochrome P-450 family that is required for the regulated polar elongation of leaf cells.
Genes Dev. **12** (15): 2381-2391
- KIM, J., K. HARTER, A. THEOLOGIS** (1997):
Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94** (22): 11786-11791
- KIMURA, T., K. SUZUKI** (1965):
Enzymatic reduction of non-heme iron protein (adrenodoxin) by reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **20** (4): 373-379

- KIMURA, T., K. SUZUKI (1967):**
Components of the electron transport system in adrenal steroid hydroxylase. Isolation and properties of non-heme iron protein (adrenodoxin).
J. Biol. Chem. **242** (3): 485-491
- KNAFF, D. B., M. HIRASAWA (1991):**
Ferredoxin-dependent chloroplast enzymes.
Biochim. Biophys. Acta **1056** (2): 93-125
- KREIS, W., A. HENSEL, U. STUHLEMMER (1998):**
Cardenolide biosynthesis in foxglove.
Planta Medica **64** (6): 491-499
- LAEMMLI, U. K. (1970):**
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature **227** (259): 680-685
- LAPKO, A. G., K. RUCKPAUL (1998):**
Discrimination between conformational states of mitochondrial cytochrome P-450_{sc} by selective modification with pyridoxal 5-phosphate.
Biochemistry (Mosc.) **63** (5): 568-572
- LASKOWSKI, R. A., M. W. MACARTHUR, D. S. MOSS, J. M. THORNTON (1993):**
PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures.
J. Appl. Cryst. **26** (2): 283-291
- LIEBAU, A. (1995):**
Untersuchungen zur Cyclophilin-Expression unter Streßbedingungen bei *Digitalis lanata*.
Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- LIEBERMAN, S., V. V. K. PRASAD (1990):**
Heterodox notions on pathways of steroidogenesis.
Endocr. Rev. **11** (4): 469-493
- LILL, R. (2003):**
Die essentielle Funktion der Mitochondrien bei der Biogenese von Eisen-Schwefel-Proteinen.
Biospektrum **9** (2): 129-132
- LINDEMANN, P., M. LUCKNER (1997):**
Biosynthesis of pregnane derivatives in somatic embryos of *Digitalis lanata*.
Phytochemistry **46** (3): 507-513
- LIU, Z.-G., L. M. SCHWARTZ (1992):**
An efficient method for blunt-end ligation of PCR products.
Biotechniques **12** (1): 28-30
- LÖWE, H. (1993):**
Digitoxin, Digoxin: Wirkungen, Anwendungsgebiete.
in: **BRUCHHAUSEN, F. VON, S. EBEL, A. W. FRAHM, E. HACKENTHAL (Hrsg.):**
Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, 5. Auflage, Band 7, Stoffe A-D.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- LUCKNER, M., M. WICHTL (2000):**
Digitalis.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
- LÜDDE, C. (1996):**
Charakterisierung des Cholesterol-Seitenkettenspaltenden Enzyms während der somatischen Embryogenese von *Digitalis lanata* EHRH.
Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

- MA, J., M. PTASHNE (1987a):**
Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments.
Cell **48** (5): 847-853
- MA, J., M. PTASHNE (1987b):**
A new class of yeast transcriptional activators.
Cell **51** (1): 113-119
- MA, J., M. PTASHNE (1988):**
Converting a eucaryotic transcriptional inhibitor into an activator.
Cell **55** (3): 443-446
- MATSUBARA, H., K. SAEKI (1992):**
Structural and functional diversity of ferredoxins and related proteins.
Advances in Inorganic Chemistry **38**: 223-280
- MATSUBARA, S., S. TAKENAKA, D. OHTA (2002):**
Metabolic implications of multiple electron transfer components for plant P450s.
in: Sixth International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity With Emphasis on the Functional Biochemistry and Molecular Biology of P450s in Microorganisms, Plants, and Insects. Abstracts of Oral Presentations.
University of California, Los Angeles, USA : p. 14
- METZNER, M., K. P. RÜCKNAGEL, J. KNUDSEN, G. KÜLLERTZ (2000):**
Isolation and characterization of two acyl-CoA-binding proteins from proembryogenic masses of *Digitalis lanata* EHRH.
Planta **210** (4): 683-685
- MILEK, F., E. REINHARD, W. KREIS (1997):**
Influence of precursors and inhibitors of the sterol pathway on sterol and cardenolide metabolism in *Digitalis lanata* EHRH.
Plant Physiol. Biochem. **35** (2): 111-121
- MINO, Y., H. USAMI, S. INOUE, K. IKEDA, N. OTA (1993):**
Protein chemotaxonomy of genus *Datura*: identical amino acid sequence of ferredoxin from two varieties of *Datura stramonium*.
Phytochemistry **33** (3): 601-605
- MORTENSON, L. E., R. C. VALENTINE, J. E. CARNAHAN (1962):**
An electron transport factor from *Clostridium pasteurianum*.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **7** (6): 448-452
- MÜLHARDT, C. (2000):**
Der Experimentator: Molekularbiologie. 2. Auflage.
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- MÜLLER, A., J. J. MÜLLER, Y. A. MULLER, H. UHLMANN, R. BERNHARDT, U. HEINEMANN (1998):**
New aspects of electron transfer revealed by the crystal structure of a truncated bovine adrenodoxin, Adx(4-108).
Structure **6** (3): 269-280
- MÜLLER, J. J., A. MÜLLER, M. ROTTMANN, R. BERNHARDT, U. HEINEMANN (1999):**
Vertebrate-type and plant-type ferredoxins: crystal structure comparison and electron transfer pathway modelling.
J. Mol. Biol. **294** (2): 501-513
- MÜLLER, J. J., A. LAPKO, G. BOURENKOV, K. RUCKPAUL, U. HEINEMANN (2001):**
Adrenodoxin reductase-adrenodoxin complex structure suggests electron transfer path in steroid biosynthesis.
J. Biol. Chem. **276** (4): 2786-2789

- MULLIS, K. B.**, F. A. FALOONA (1987):
Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction.
Methods Enzymol. **155**: 335-350
- NAKAI, K.**, M. KANEHISA (1992):
A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells.
Genomics **14** (4): 897-911
- NIELSEN, H.**, J. ENGELBRECHT, S. BRUNAK, G. VON HEIJNE (1997):
Identification of procaryotic and eucaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites.
Protein Eng. **10** (1): 1-6
- NORRANDER, J.**, T. KEMPE, J. MESSING (1983):
Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis.
Gene **26** (1): 101-106
- OHMORI, K.**, N. DOYAMA, S. IDA (1996):
Molecular cloning of a rice leaf ferredoxin cDNA.
Plant Gene Register PGR96-025
Plant Physiol. **111** (1): 348
- OKAMURA, T.**, M. E. JOHN, M. X. ZUBER, E. R. SIMPSON, M. R. WATERMAN (1985):
Molecular cloning and amino acid sequence of the precursor form of bovine adrenodoxin: evidence for a previously unidentified COOH-terminal peptide.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82** (17): 5705-5709
- OKAMURA, T.**, M. KAGIMOTO, E. R. SIMPSON, M. R. WATERMAN (1987):
Multiple species of bovine adrenodoxin mRNA. Occurrence of two different mitochondrial precursor sequences associated with the same mature sequence.
J. Biol. Chem. **262** (21): 10335-10338
- OMURA, T.**, E. SANDERS, D. Y. COOPER, O. ROSENTHAL, R. W. ESTABROOK (1965):
Isolation of a non-heme iron protein of adrenal cortex functional as a TPNH-flavoprotein-cytochrome P₄₅₀ reductase for hydroxylation reactions.
in: **SAN PIETRO, A.** (Hrsg.):
Non-heme iron proteins: role in energy conversion.
The Antioch Press, Yellow Springs, Ohio, USA, pp. 401-412
- OMURA, T.**, E. SANDERS, R. W. ESTABROOK, D. Y. COOPER, O. ROSENTHAL (1966):
Isolation from adrenal cortex of a nonheme iron protein and a flavoprotein functional as a reduced triphosphopyridine nucleotide-cytochrome P-450 reductase.
Arch. Biochem. Biophys. **117**: 660-673
- ORME-JOHNSON, W. H.**, H. BEINERT (1969):
Reductive titrations of iron-sulfur proteins containing two to four iron atoms.
J. Biol. Chem. **244** (22): 6143-6148
- OVERHAMM, H.** (1976):
Zur Geschichte der *Digitalis* unter besonderer Berücksichtigung ihrer äußerlichen Anwendung.
in: **SCHMITZ, R.** (Hrsg.):
Quellen und Studien zur Geschichte der Pharmazie, **13**
jal-verlag, Würzburg
- PALAZÓN, J.**, M. BONFILL, R. M. CUSIDÓ, M. T. PIÑOL, C. MORALES (1995):
Effects of auxin and phenobarbital on morphogenesis and production of digitoxin in *Digitalis* callus.
Plant Cell Physiol. **36** (2): 247-252

- PEETERS, N., I. SMALL (2001):**
Dual targeting to mitochondria and chloroplasts.
Biochim. Biophys. Acta **1541** (1-2): 54-63
- PETERSON, J. A., M. C. LORENCE, B. AMARNEH (1990):**
Putidaredoxin reductase and putidaredoxin. Cloning, sequence determination, and heterologous expression of the proteins.
J. Biol. Chem. **265** (11): 6066-6073
- PETERSON, J. A., J.-Y. LU, J. GEISSELSODER, S. GRAHAM-LORENCE, C. CARMONA, F. WITNEY, M. C. LORENCE (1992):**
Cytochrome P-450_{terp}. Isolation and purification of the protein and cloning and sequencing of its operon.
J. Biol. Chem. **267** (20): 14193-14203
- PICADO-LEONARD, J., R. VOUTILAINEN, L.-C. KAO, B.-C. CHUNG, J. F. STRAUSS III., W. L. MILLER (1988):**
Human adrenodoxin: cloning of three cDNAs and cycloheximide enhancement in JEG-3 cells.
J. Biol. Chem. **263** (7): 3240-3244
- PICCIOCCHI, A., R. DOUCE, C. ALBAN (2003):**
The plant biotin synthase reaction. Identification and characterization of essential mitochondrial accessory protein components.
J. Biol. Chem. **278** (27): 24966-24975
- PIKULEVA, I. A., K. TESH, M. R. WATERMAN, Y. KIM (2000):**
The tertiary structure of full-length bovine adrenodoxin suggests functional dimers.
Arch. Biochem. Biophys. **373** (1): 44-55
- PILGRIM, H. (1972):**
'Cholesterol side-chain cleaving enzyme' Aktivität in Keimlingen und *in vitro* kultivierten Geweben von *Digitalis purpurea*.
Phytochemistry **11** (5): 1725-1728
- PUEYO, J. J., C. REVILLA, S. G. MAYHEW, C. GÓMEZ-MORENO (1992):**
Complex formation between ferredoxin and ferredoxin-NADP⁺ reductase from *Anabaena* PCC 7119: cross-linking studies.
Arch. Biochem. Biophys. **294** (2): 367-372
- RAAG, R., S. A. MARTINIS, S. G. SLIGAR, T. L. POULOS (1991):**
Crystal structure of the cytochrome P-450_{CAM} active site mutant Thr252Ala.
Biochemistry **30** (48): 11420-11429
- RAMSTAD, E., J. L. BEAL (1960):**
Mevalonic acid, precursor of digitoxigenin.
Chem. and Ind.: 177
- REEVE, J. N., G. S. BECKLER, D. S. CRAM, P. T. HAMILTON, J. W. BROWN, J. A. KRZYCKI, A. F. KOLODZIEJ, L. ALEX, W. H. ORME-JOHNSON, C. T. WALSH (1989):**
A hydrogenase-linked gene in *Methanobacterium thermoautotrophicum* strain ΔH encodes a polyferredoxin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86** (9): 3031-3035
- RODRIGUEZ, R., G. CHINEA, N. LOPEZ, T. PONS, G. FRIEND (1998):**
Homology modeling, model and software evaluation: three related resources.
Bioinformatics **14** (6): 523-528

- ROWLANDS, C. C., D. M. MURPHY (1999):**
EPR Spectroscopy, Theory.
in: **LINDEN, J. C., G. E. TRAUTER, J. L. HOLMES (Hrsg.):**
Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry.
Academic Press, London, pp. 445-456
- SAGARA, Y., A. WADA, Y. TAKATA, M. R. WATERMAN, K. SEKIMIZU, T. HORIUCHI (1993):**
Direkt expression of adrenodoxin reductase in *Escherichia coli* and the functional characterization.
Biol. Pharm. Bull. **16** (7): 627-630
- SAIKI, R. K., S. SCHARF, F. FALOONA, K. B. MULLIS, G. T. HORN, H. A. ERLICH, N. ARNHEIM (1985):**
Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.
Science **230** (4732): 1350-1354
- SAIKI, R. K., D. H. GELFAND, S. STOFFEL, S. J. SCHARF, R. HIGUCHI, G. T. HORN, K. B. MULLIS, H. A. ERLICH (1988):**
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
Science **239** (4839): 487-491
- SAITOU, N., M. NEI (1987):**
The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.
Mol. Biol. Evol. **4** (4): 406-425
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH, T. MANIATIS (1989):**
Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd Edition.
Cold Spring Harbour, New York
- SAN PIETRO, A., H. M. LANG (1958):**
Photosynthetic pyridine nucleotide reductase. I. Partial purification and properties of the enzyme from spinach.
J. Biol. Chem. **231**: 211-229
- SCHIFFLER, B., M. KIEFER, A. WILKEN, F. HANNEMANN, H. W. ADOLPH, R. BERNHARDT (2001):**
The interaction of bovine adrenodoxin with CYP11A1 (cytochrome P450_{scc}) and CYP11B1 (cytochrome P450_{11 β}). Acceleration of reduction and substrate conversion by site-directed mutagenesis of adrenodoxin.
J. Biol. Chem. **276** (39): 36225-36232
- SCHOLZE, C., A. PETERSON, B. DIETRICH, M. LUCKNER (1999):**
Cyclophilin isoforms from *Digitalis lanata*. Sequences and expression during embryogenesis and stress.
J. Plant Physiol. **155** (2): 212-219
- SEEBER, F. (2002):**
Eukaryotic genomes contain a [2Fe-2S] ferredoxin isoform with a conserved C-terminal sequence motif.
Trends Biochem. Sci. **27** (11): 545-547
- SHETHNA, Y. I., P. W. WILSON, R. E. HANSEN, H. BEINERT (1964):**
Identification by isotopic substitution of the EPR signal at $g=1,94$ in a non-heme iron protein from *Azotobacter*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **52** (5): 1263-1271

- SHINE, J., L. DALGARNO (1975):**
Growth-dependent changes in terminal heterogeneity involving 3'-adenylate of bacterial 16S ribosomal RNA.
Nature **256** (5514): 232-233
- SHUMAN, S. (1994):**
Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase.
J. Biol. Chem. **269** (51): 32678-32684
- SIMCOX, T. G., S. J. MARSH, E. A. GROSS, W. LERNHARDT, S. DAVIES, M. E. C. SIMCOX (1991):**
SrfI, a new type-II restriction endonuclease that recognizes the octanucleotide sequence, 5'-GCCC↓GGGC-3'.
Gene **109** (1): 121-123
- SIPPL, M. J. (1993a):**
Boltzmann's principle, knowledge-based mean fields and protein folding. An approach to the computational determination of protein structures.
J. Comput.-Aided Mol. Des. **7** (4): 473-501
- SIPPL, M. J. (1993b):**
Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins.
Proteins **17** (4): 355-362
- SLIGAR, S. G., I. C. GUNSALUS (1976):**
A thermodynamic model of regulation: modulation of redox equilibria in camphor monooxygenase.
Proc. Natl. Acad. Soc. USA **73** (4): 1078-1082
- SMITH, D. B., K. S. JOHNSON (1988):**
Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase.
Gene **67** (1): 31-40
- SOMERS, D. E., T. CASPAR, P. H. QUAIL (1990):**
Isolation and characterization of a ferredoxin gene from *Arabidopsis thaliana*.
Plant Physiol. **93** (2): 572-577
- STEIGERWALD, V. J., G. S. BECKLER, J. N. REEVE (1990):**
Conservation of hydrogenase and polyferredoxin structures in the hyperthermophilic archaebacterium *Methanothermus fervidus*.
J. Bacteriol. **172** (8): 4715-4718
- STROMSTEDT, M., M. R. WATERMAN (1995):**
A full-length cDNA encoding mouse adrenodoxin.
Biochim. Biophys. Acta **1261** (1): 126-128
- STÜBER, D., W. BANNWARTH, J. R. PINK, R. H. MELOEN, H. MATILE (1990a):**
New B cell epitopes in the *Plasmodium falciparum* malaria circumsporozoite protein.
Eur. J. Immunol. **20** (4): 819-824
- STÜBER, D., H. MATILE, G. GAROTTA (1990b):**
System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis.
in: LEFKOVITS, I., B. PERNIS (Hrsg.):
Immunological methods, Vol. IV.
Academic Press, New York, pp. 121-152

- SUGANO, S., R. MIURA, N. MORISHIMA (1996):**
Identification of intermediates in the conversion of cholesterol to pregnenolone with a reconstituted cytochrome P-450_{sc} system: accumulation of the intermediate modulated by the adrenodoxin level.
J. Biochem. **120** (4): 780-787
- SUGIYAMA, T., T. YAMANO (1975):**
Purification and crystallization of NADPH-adrenodoxin reductase from bovine adrenocortical mitochondria.
FEBS Lett. **52** (1): 145-148
- SUHARA, K., S. TAKEMORI, M. KATAGIRI (1972):**
Improved purification of bovine adrenal iron-sulfur protein.
Biochim. Biophys. Acta **263** (2): 272-278
- SUZUKI, K., T. KIMURA (1965):**
An iron protein as a component of steroid 11 β -hydroxylase complex.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **19** (3): 340-345
- SZEKERES, M., K. NÉMETH, Z. KONCZ-KÁLMÁN, J. MATHUR, A. KAUSCHMANN, T. ALTMANN, G. P. RÉDEI, F. NAGY, J. SCHELL, C. KONCZ (1996):**
Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*.
Cell **85** (2): 171-182
- TA, D. T., L. E. VICKERY (1992):**
Cloning, sequencing, and overexpression of a [2Fe-2S] ferredoxin gene from *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. **267** (16): 11120-11125
- TAKAHASHI, Y., T. HASE, K. WADA, H. MATSUBARA (1983):**
Ferredoxins in developing spinach cotyledons: the presence of two molecular species.
Plant Cell Physiol. **24** (2): 189-198
- TEUBER, M. (2002):**
Vervollständigung der DNA-Sequenz der $\Delta 5$ -3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase ($\Delta 5$ -3 β -HSD) aus *Digitalis lanata* EHRH. mittels RACE-PCR.
Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- TESMER, J. J., T. J. KLEM, M. L. DERAS, V. J. DAVISSON, J. L. SMITH (1996):**
The crystal structure of GMP synthetase reveals a novel catalytic triad and is a structural paradigm for two enzyme families.
Nat. Struct. Biol. **3** (1): 74-86
- THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE (2000):**
Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*.
Nature **408** (6814): 796-815
- THE DIGITALIS INVESTIGATION GROUP (1997):**
The effect of digoxin on mortality and morbidity in patients with heart failure.
N. Engl. J. Med. **336** (8): 525-533
- THIELE, O. W. (1979):**
Lipide, Isoprenoide mit Steroiden.
Thieme, Stuttgart
- THOMPSON, J. D., D. G. HIGGINS, T. J. GIBSON (1994):**
CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.
Nucleic Acids Res. **22** (22): 4673-4680

- TSCHESCHE, R., G. LILIENWEISS (1964):**
Cardenolid-Biosynthese aus Pregnenolonglucosid.
Z. Naturforschg. **19b** (3): 265-266
- TUCKEY, R. C., K. J. CAMERON (1993):**
Side-chain specificities of human and bovine cytochromes *P-450_{scc}*.
Eur. J. Biochem. **217** (1): 209-215
- UHLMANN, H., V. BECKERT, D. SCHWARZ, R. BERNHARDT (1992):**
Expression of bovine adrenodoxin in *E. coli* and site-directed mutagenesis of [2Fe-2S] cluster ligands.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **188** (3): 1131-1138
- UHLMANN, H., R. KRAFT, R. BERNHARDT (1994):**
C-terminal region of adrenodoxin affects its structural integrity and determines differences in its electron transfer function to cytochrome P-450.
J. Biol. Chem. **269** (36): 22557-22564
- UHLMANN, H., R. BERNHARDT (1995):**
The role of threonine 54 in adrenodoxin for the properties of its iron-sulfur cluster and its electron transfer function.
J. Biol. Chem. **270** (50): 29959-29966
- VALENTINE, R. C. (1964):**
Bacterial ferredoxin.
Bact. Rev. **28** (4): 497-517
- VICK, B. A., D. C. ZIMMERMAN (1987):**
Pathways of fatty acid hydroperoxide metabolism in spinach leaf chloroplasts.
Plant Physiol. **85** (4): 1073-1078
- VIDAL, M., R. K. BRACHMANN, A. FATTAEY, E. HARLOW, J. D. BOEKE (1996):**
Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93** (19): 10315-10320
- VORST, O., F. VAN DAM, R. OOSTERHOFF-TEERTSTRA, S. SMEEKENS, P. WEISBEEK (1990):**
Tissue-specific expression directed by an *Arabidopsis thaliana* pre-ferredoxin promoter in transgenic tobacco plants.
Plant Mol. Biol. **14** (4): 491-499
- VRIEND, G. (1990):**
WHAT IF: a molecular modeling and drug design program.
J. Mol. Graph. **8** (1): 52-56
- VRIEND, G., C. SANDER (1993):**
Quality control of protein models: directional atomic contact analysis.
J. Appl. Cryst. **26** (1): 47-60
- WADA, A., P. A. MATHEW, H. J. BARNES, D. SANDERS, R. W. ESTABROOK, M. R. WATERMAN (1991):**
Expression of functional bovine cholesterol side chain cleavage cytochrome P450 (*P450_{scc}*) in *Escherichia coli*.
Arch. Biochem. Biophys. **290** (2): 376-380
- WATSON, C. J. W., J. E. FROELICH, C. A. JOSEFSSON, C. CHAPPLE, F. DURST, I. BENVENISTE, R. C. COOLBAUGH (2001):**
Localization of CYP86B1 in the outer envelope of chloroplasts.
Plant Cell Physiol. **42** (8): 873-878

- WEDEL, N., D. BARTLING, R. G. HERRMANN (1988):**
Analysis of cDNA clones encoding the entire ferredoxin I precursor polypeptide from spinach.
Botanica Acta **101** (4): 295-300
- WERLE, D. (1995):**
Erstellung einer cDNA-Bank von globulären Embryonen und von Blattmaterial von Freilandpflanzen (Sorte 'Dresdener') von *Digitalis lanata* EHRH. sowie erste Versuche zum Auffinden embryogenesespezifisch exprimierter Gene.
Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- WICKRAMASINGHE, J. A. F., E. P. BURROWS, R. K. SHARMA, J. B. GREIG, E. CASPI (1969):**
The obligatory involvement of a C₂₁ intermediate in the biosynthesis of cardenolides from cholesterol.
Phytochemistry **8** (8): 1433-1440
- WITHERING, W. (1785):**
An account of the foxglove, and some of its medical uses: with practical remarks on dropsy, and other diseases.
M. Swinney, Birmingham, England
- ZÖLLNER, A., F. HANNEMANN, M. LISUREK, R. BERNHARDT (2002):**
Deletions in the loop surrounding the iron-sulfur cluster of adrenodoxin severely affect the interactions with its native redox partners adrenodoxin reductase and cytochrome P450_{scc} (CYP11A1).
J. Inorg. Biochem. **91** (4): 644-654

Danksagung

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die Unterstützung vieler Menschen, die mittelbar oder unmittelbar an ihr teilhaben. Dafür möchte ich mich herzlich bedanken.

Frau Prof. Diettrich und Herrn Prof. Luckner danke ich für die Gelegenheit, diese Arbeit am Institut für Pharmazeutische Biologie durchführen zu können, besonders auch für ihre Unterstützung des Forschungsaufenthalts in Saarbrücken.

Frau Prof. Bernhardt gilt mein Dank für die großzügig gewährte Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe in Saarbrücken die Proteine exprimieren und untersuchen zu können.

Herrn Dr. Lindemann sei gedankt für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit und für viele Anregungen.

Herrn Dr. Hannemann danke ich für die Betreuung und Anleitung bei der Arbeit in Saarbrücken, außerdem für die Messungen, die er für mich durchführte.

Frau Dr. Rahfeld gilt mein Dank, nicht nur für die angenehme Zusammenarbeit in den Praktika.

Hannes Framm, Romy Kandzia, Anja Finsterbusch, Antje Koch, Carola Thöringer, Birgit Gruner, Martin Metzner, Ronald Keiner, Grit Rothe, Yvonne Sichhart, Olaf Stenzel, Melanie Witt, Michael Teuber, Heike Kaiser und andere mehr haben dafür gesorgt, daß die Arbeit nie langweilig wurde, daß immer wieder neue Ideen auftauchten und daß es auch während Durststrecken nie an Aufmunterung fehlte. Vielen Dank für dies und mehr! Bei Michael bedanke ich mich noch besonders für die Unterstützung am Computer und am Drucker.

Susanne Böhmer sei gedankt für die Durchführung der isoelektrischen Fokussierung. Michael Lisurek gilt mein Dank für die Hilfe bei der Erstellung des Proteinmodells und viele weitere Hinweise und Unterstützung.

Dem Freundeskreis Pharmazie der Vereinigung der Freunde und Förderer der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg e. V. danke ich für die Bereitstellung finanzieller Mittel, als die Finanzierung des Forschungsaufenthalts in Saarbrücken ungeklärt war.

Lebenslauf

Name: Stefan Strauss
geboren am: 29.05.1972 in Heiligenstadt
Familienstand: ledig
Staatsbürgerschaft: deutsch

Schulbildung

1978-1988: POS „Otto Grotewohl“, Heiligenstadt
1988-1990: EOS „Wilhelm Pieck“, Heiligenstadt

Zivildienst

September 1990-August 1991: St. Vincenz-Krankenhaus, Heiligenstadt

Berufsausbildung

September 1991-Juni 1993: Ausbildung zum CTA, Chemieschule
Münden, Gemeinnützige Schulgesellschaft mbH

Studium

Oktober 1993-September 1997: Pharmaziestudium, Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
Oktober 1997-März 1998: Diplomarbeit, Institut für Pharmazeutische Biologie,
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
April 1998-September 1998: Praktikum, Lilien-Apotheke, Halle

Doktorarbeit

Oktober 1998-September 2002: wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für
Pharmazeutische Biologie, Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

Berufstätigkeit

Dezember 2002-März 2003: angestellter Apotheker, Ahorn-Apotheke, Halle
seit Januar 2004: angestellter Apotheker, Flora-Apotheke, Bitterfeld

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Die den von mir benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde ausschließlich der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt.