

Attractin
-
Biochemische und Funktionelle Charakterisierung

Dissertation

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

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von
Herrn Daniel Friedrich
geboren am 03. Juli 1973 in Dresden

Gutachter:

1. Prof. Dr. M. T. Stubbs
2. Prof. Dr. M. Hildebrandt
3. Prof. Dr. H.-U. Demuth

Verteidigung: Halle (Saale), den 16.12.2010

Publikationsliste:

- Schilling, S., Appl, T., Hoffmann, T., Cynis, H., Schulz, K., Jagla, W., Friedrich, D., Wermann, M., Buchholz, M., Heiser, U., von Horsten, S., and Demuth, H. U. (2008)**
Inhibition of glutaminyl cyclase prevents pGlu-Abeta formation after intracortical/hippocampal microinjection in vivo/in situ.
J. Neurochem. 106, 1225-1236.
- Friedrich, D., Hoffmann, T., Bar, J., Wermann, M., Manhart, S., Heiser, U., and Demuth, H.-U. (2007)**
Attractin and DP4 activity.
Tumor biology; The 35th Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, ISOBM 2007; September 15–19, 2007, Prague, Czech Republic; Oral and poster presentation
- Friedrich, D., Hoffmann, T., Bar, J., Wermann, M., Manhart, S., Heiser, U., and Demuth, H.-U. (2007)**
Does human attractin have DP4 activity?
Biol. Chem. 388, 155-162.
- Wrenger, S., Faust, J., Friedrich, D., Hoffmann, T., Hartig, R., Lendeckel, U., Kahne, T., Thielitz, A., Neubert, K., and Reinhold, D. (2006b)**
Attractin, a dipeptidyl peptidase IV/CD26-like enzyme, is expressed on human peripheral blood monocytes and potentially influences monocyte function.
J. Leukoc. Biol. 80, 621-629.
- Wrenger, S., Guth, B., Schultze, B., Hoffmann, T., Friedrich, D., Kahne, T., Faust, J., Neubert, K., and Reinhold, D. (2006a)**
Expression of dipeptidyl peptidase IV-like enzymes in human peripheral blood mononuclear cells.
Adv. Exp. Med. Biol. 575, 87-91.
- Friedrich, D., Rudolph, T., Rahfeld, J.-U., Hoffmann, T., Demuth, H.-U. (2004)**
Identification of potential interaction partners of the mahogany gene product.
International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders
- Friedrich, D., Kuhn-Wache, K., Hoffmann, T., and Demuth, H. U. (2003)**
Isolation and characterization of attractin-2.
Adv. Exp. Med. Biol. 524, 109-113.

If geologists, therefore, have misinterpreted the signs of a succession of events, so as to conclude that centuries were implied where the characters imported thousands of years, and thousands of years where the language of nature signified millions, they could not, if they reasoned logically from such false premises, come to any other conclusion, than that the system of the natural world had undergone a complete revolution.

aus

“PRINCIPLES OF GEOLOGY” BY CHARLES LYELL (VOL. I., CHAPTER V)

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die <i>lethal yellow</i> -Mutation: Letalität und Pigmentierung.....	3
1.2 Das Melanocortinsystem.....	3
1.2.1 Melanocortine und deren Rezeptoren.....	3
1.2.2 Pigmentbildung	5
1.3 Die <i>lethal yellow</i> -Mutation: Metabolismus.....	9
1.3.1 Zentrale Regulation der Nahrungsaufnahme	9
1.3.2 Einfluss von Agouti auf die periphere Regulation der Nahrungsaufnahme	12
1.4 Attractin und die <i>mahogany</i> -Mutation	13
1.5 Prolylpeptidasen und die DASH-Protein-Familie.....	17
1.5.1 Dipeptidylpeptidase 4.....	18
1.5.2 Attractin.....	19
1.5.3 Andere DP4 verwandte Proteine	21
1.6 Aufgabenstellung	24
2 METHODEN	25
2.1 Analytische biochemische Methoden.....	25
2.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	25
2.1.2 Analytische elektrophoretische Methoden	25
Diskontinuierliche SDS-PAGE	25
Diskontinuierliche PAGE unter nativen Bedingungen	25
Analytische IEF.....	26
2.1.3 Proteinfärbung nach analytischen elektrophoretischen Methoden	26
Färbung von Proteingelen mittels Coomassie Brilliantblau	26
Silberfärbung von Proteingelen	26
Proteinfärbung nach analytischer IEF mittels Coomassie Blue.....	27
2.1.4 Elektroblob und Kapillarblotting.....	27
Elektroblob nach PAGE	27
Kapillarblotting nach analytischer IEF.....	28
2.1.5 Immunodetektion immobilisierter Proteine (Western Blot)	28
2.1.6 Detektion von Enzymen mit DP4-ähnlicher Aktivität.....	29
2.1.7 Umpufferung und Konzentrierung von Proteinlösungen.....	30
Umpufferung von Proteinlösungen mit Dialyse oder Gelfiltration	30
Konzentrierung von Proteinlösungen	30
2.1.8 Deglykosylierung mit PNGase F.....	30
2.1.9 Bestimmung enzymatischer Aktivitäten.....	31
Bestimmung enzymkinetischer Konstanten.....	32
Aktivität der Triosephosphat-Isomerase.....	32

2.1.10	Molekülmassenbestimmung mittels MALDI-TOF MS.....	34
2.1.11	Untersuchung des Substratabbaus mittels MALDI-TOF MS.....	34
2.1.12	Interaktionsanalysen zwischen Attractin und DP4	35
	Immunopräzipitation	35
	Oberflächenplasmonresonanz.....	35
2.2	Präparative biochemische Methoden.....	37
2.2.1	Unspezifische fraktionierte Präzipitationen.....	37
	Ammoniumsulfatfällung.....	37
	Ethanol-fällung nach Kohn.....	38
	Polyethylenglykol (PEG)-Fällung	38
2.2.2	Chromatographische Methoden.....	39
	„Cibracon Blue“-Affinitätschromatographie (Blue-Sepharose).....	39
	Kationenaustauschchromatographie an Sp-Sepharose	39
	Anionenaustauschchromatographie an UnoQ6	40
	Adenosindeaminase-Affinitätschromatographie	40
	Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine mit His-Fusion	41
	Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine mit GST-Fusion	41
2.2.3	Präparative elektrophoretische Methoden	42
	Präparative isoelektrische Fokussierung.....	42
	Präparative native Polyacrylamidgelelektrophorese.....	42
2.3	Molekulabiologische Methoden.....	43
2.3.1	Präparation von Gesamt-RNA aus Primärzellen	43
2.3.2	cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA mittels RT-PCR.....	44
2.3.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	44
2.3.4	Endotoxinfreie Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	44
2.3.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> (2-Hybrid-System).....	44
2.3.6	Polymerasekettenreaktion (PCR), spezielle PCR	45
2.3.7	Reinigung von DNA-Fragmenten aus Lösungen.....	46
2.3.8	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	46
2.3.9	Enzymatischer Restriktionsverdau von DNA.....	46
2.3.10	Ligation von DNA.....	46
2.3.11	Agarosegelelektrophorese	46
2.3.12	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	47
2.4	Mikrobiologische Methoden	47
2.4.1	Methoden der Kultivierung von <i>E. coli</i>	47
	Transformation von <i>E. coli</i>	47
	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> und Zellaufschluss.....	48
2.4.2	Methoden der Kultivierung von <i>P. pastoris</i>	48
	Transformation von Plasmid-DNA / Expression rekombinanter Proteine in <i>P. pastoris</i>	49
	Aufarbeitung von <i>P. pastoris</i> - und 293HEK-Kulturüberständen	49
2.4.3	Kultivierung von Säugerzelllinien.....	50
	Herstellung rekombinanter Proteine in Säugerzelllinien	50

3.6.2	Charakterisierung von Expression und Aktivität des <i>bait</i> -Fusionsproteins	87
3.6.3	Transfomation der <i>prey</i> -Vektoren und Interaktionsselektion einer cDNA-Bibliothek	88
3.6.4	Triosephosphat-Isomerase (EC 5.3.1.1)	92
3.6.5	Die E2-Ubiquitin-Konjugasen UBE2G1 und UBE2R2	93
3.6.6	Fusionsprotein aus dem zytosolischen Teil von Attractin und GST	94
3.6.7	Interaktionsstudien mittels GST-Atrn _{cyt} -Fusionsprotein	95
4	DISKUSSION	96
4.1	Attractin und die DASH-Proteinfamilie	96
4.1.1	Präparation aus humanem Plasma	96
4.1.2	DP4-Aktivität	97
	Humanes Plasma-Attractin ist kein DP4-ähnliches Enzym	99
	Identifizierung der humanen Serum-DP4	100
	Rekombinante humane Attractin-Isoformen sind enzymatisch nicht aktiv	101
4.2	Attractin, Adhäsionsprotein oder Rezeptor	102
4.2.1	Rezeptorfunktion	103
4.2.2	Interaktionsselektion in Hefen	104
4.2.3	Zellmodell	107
4.2.4	Attractin: Perspektiven	108
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	116
6	ANHANG	118
6.1	Material	121
	Geräte	121
	Labor- und Verbrauchsmaterialien	122
	Chemikalien und Biochemikalien	122
	Chromatographie / Säulenmaterialien / Immunopräzipitation	124
	Enzyme	124
	Substrate / Peptide	125
	Inhibitoren	125
	Kulturmedien und Puffer	126
	Antikörper	128
	Kommerzielle Kulturmedien und Zusätze	128
	Kommerzielle Reaktionssysteme	128
	Mikroorganismen und Zellkulturen	129
	Plasmide, Vektoren und Selektionsantibiotika	129
	Oligonukleotide	130
7	LITERATURVERZEICHNIS	131

Abkürzungsverzeichnis

2-S-CD	2-S-Cysteinyl-dopa		<i>transcript</i>
5-S-CD	5-S-Cysteinyl-dopa	CBP	<i>CREB-binding protein</i>
α - β - γ -MSH	α - β - γ -Melanozyten-stimulierendes Hormon	CCK	Cholecystokinin
β -END	β -Endorphin	cDNA	<i>complementary DNA</i>
β -, γ -LPH	β -, γ -Lipotrophin	CLIP	<i>corticotropin-like intermediate lobe peptide</i>
β -MNA	4-Methoxy- β -Naphthylamid	CPE	Carboxypeptidase E
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon, Corticotropin	<i>Cpe^{fat}, fat</i>	Funktionsverlustmutation der Carboxypeptidase E
Acy	Zytosolischer Rest der Isoform 1 des humanen Attractin	CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
ADA	Adenosindeaminase	CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
ADH	Alkoholdehydrogenase	CUB	Clr/Cls= <i>Complement subcomponent</i> Uegf= <i>embryonic sea urchin, protein</i> Bmp1= <i>Bone morphogenetic protein 1</i>
Agrp	Agouti-related Protein	CV	<i>column volume</i> , Säulenvolumen
Amp	Ampicillin	DA- α MSH	deacetyliertes α -MSH
AOX1	Alkoholoxidase-Promotors	Dct	<i>Dopachrome tautomerase</i> = TRP2
AP	Alkalische Phosphatase	DEPC	Diethylpyrocarbonat
APS	Ammoniumpersulfat	DFP	Diisopropylfluorophosphat
ARC	<i>Nucleus arcuatus</i>	DHI	5,6-Dihydroxyindol
Atrn	Attractin	DHICA	5,6-Dihydroxyindolcarboxylsäure
<i>Atrn^{bt}, bt</i>	<i>mahogany</i> -Mutation; Funktionsverlustmutation von Attractin (Hamster)	D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (auch DMEM); ein Zellkulturmedium siehe Anhang
Atrn _{cyt} (Acy)	Zytosolischer Rest der Isoform 1 des humanen Attractin	DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>Atrn^{mg}, mg</i>	<i>mahogany</i> -Mutation; Funktionsverlustmutation von Attractin (Maus)	dNTP	Desoxynucleotide
<i>Atrn^{mv}, mv</i>	<i>mahogany</i> -Mutation; Funktionsverlustmutation von Attractin (Ratte)	DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanin
<i>Atrn^{zi}, zi</i>	<i>mahogany</i> -Mutation; Funktionsverlustmutation von Attractin (Ratte)	DP	Dipeptidylpeptidase
<i>A^Y</i>	<i>lethal-yellow</i> -Mutation; ubiquitäre Überexpression von Agouti	DP4 ₁₁	DP4-spezifischer Inhibitor
BCIP	5-Bromo-4-chloro-indolylphosphat	DP8/9 ₁₁	DP8/9-spezifischer Inhibitor
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>	DQ	Dopaquinone (Dopachinon)
BiP	<i>Binding Protein</i>	EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
BMGY, BMMY	Medien für die Kultivierung von <i>Pichia Pastoris</i>	ERK	Extrazellulär signalregulierte Kinase
BSA	Bovines Serumalbumin	<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat: und andere)
BSS	<i>Balanced salt solution</i>	Fa.	Firma
[Ca ²⁺] _i	(freie) intrazelluläre Konzentration der Kalziumionen	FAP α	Fibroblast-Activation-Protein alpha
CaMKIV	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase IV	FBS	Fetales Kälberserum
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	g	Erdbeschleunigung, Gramm
CART	<i>cocaine- and amphetamine-regulated</i>	GAP	Glyceraldehyd-3-Phosphat
		Gal	Galaktose (Bezeichnung im 2-Hybrid-System)
		GI	gastrointestinal
		GIP	<i>Glucose-dependent insulinotropic peptide</i>
		Glu	Glukose (Bezeichnung im 2-Hybrid-System)

Gshr	Ghrelinrezeptor	NAALADase	N-acetylated α -linked acidic dipeptidase
GST	Glutathion-S-Transferase	MSH	Melanocortin-stimulierendes Hormon
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonic acid</i>	NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduziert
HEK	Humane embryonale Nierenzelllinie	NBT	para-Nitrotetrazoliumblauschwarz
HIS3	Histidin-Gen	NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
hnRNP	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C</i>	N-POC	N-terminales POMC-Fragment
hpDP4	DP4, gereinigt aus humaner Plazenta	NPY	Neuropeptid Y
hr	human, rekombinant; immer in Verbindung mit dem entsprechenden Protein; z.B. hrDP4	NTS	<i>Nucleus tractus solitarius</i>
HSA	humanes Serumalbumin	Opti-MEM I	Ein Zellkulturmedium (siehe Anhang)
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine	OD	Optische Dichte (evtl. Angabe der Wellenlänge)
IC ₅₀	Halbmaximale Hemmkonzentration	Raff	Raffinose (Bezeichnung im 2-Hybrid-System)
IEF	Isoelektrische Fokussierung	PBS	Phosphate buffered saline
INF	<i>Nucleus infundibularis</i>	PC1, PC2	Prohormonconvertasen 1 und 2
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid	PC12	Phäochromozyten aus Rattenniere
JP	<i>Joining peptide</i>	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
k	Geschwindigkeitskonstante	pEG202	Vektor zur Expression des <i>bait</i> -Fusionsproteins
LacZ	β -Galaktosidase (Gen)	PEP	Prolylendopeptidase
LB	Luria-Bertani	PHA	Phytohämagglutinin, Lectin
LEU2	Leucin-Gen	pI	isoelektrischer Punkt
Lepr	Leptinrezeptor	PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
<i>Lepr^{db}</i>	<i>Diabetes</i> -Mutation; Funktionsverlustmutation des Leptinrezeptors	pJG4-5	Vektor zur Expression des <i>prey</i> -Fusionsproteins
<i>Lep^{ob}</i>	<i>Obese</i> -Mutation; Funktionsverlustmutation des Leptinrezeptors	PKA	Proteinkinase A
LHA	lateraler Hypothalamus	PKC	Proteinkinase C
LiOAc	Lihitum Acetat	pNA	4-Nitroanilin
LPH	Lipotrophin	PFA	<i>perifornical area</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein (MAP) kinase</i>	POMC	Proopiomelanocortin
MCS	<i>multiple cloning site</i>	pSH18-34	Reporterplasmid
MCR	Melanocortinrezeptor	PVN	<i>Nucleus paraventricularis</i>
MC1R-MC5R	Melanocortinrezeptoren 1 bis 5	RACK1	Rezeptor der aktivierten Proteinkinase C
<i>MC1R^e, E</i>	Funktionsverlustmutation des MC1R, <i>extension</i>	RANTES	<i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (CLL5)</i>
Mgrn1	<i>Mahogunin</i> -Protein	RNA	Ribonukleinsäure
<i>Mgrn1^{md}, md</i>	<i>mahoganoid</i> -Mutation, Funktionsverlustmutation von <i>Mahogunin</i>	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
<i>Mgrn1^{md-nc}</i>	<i>mahoganoid nonagouti-curly</i>	RSK-1	<i>90 kDa ribosomal S6 kinase</i>
MITF	<i>microphthalmia associated transcription factor</i>	RT	Raumtemperatur
mk	monoklonal	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
mRNA	messenger RNA	pI	Isoelektrischer Punkt
MSH	Siehe: α - β - γ -MSH	pk	polyklonal
NAAG	N-acetyl-aspartyl-glutamate	SCI	<i>Spinal cord injury</i> ; Rückenmarksverletzung
		SDS	Natriumdodecylsulfat

snDP4	DP4, gereinigt aus Schweinenieren
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N', - Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TPI	Triosephosphat-Isomerase
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)Aminomethan
TRP-1	Tyrosinase-related Protein 1, DHICA Oxidase
TRP1	Tryptophan-Gen (2-Hybrid-System)
TRP-2	Tyrosinase-related Protein 2, Dopachromtautomerase
<i>tub</i>	<i>tubby</i> -Mutation
U	Units
UBE2R2, UBE2G1	Ubiquitin-Konjugasen
UN	Über Nacht (z.B. Kultur)
U/min	Umdrehungen pro Minute
URA3	Uracil-Gen
WHO	Weltgesundheitsorganisation
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
Xaa	variable Aminosäure
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-beta-D- galactopyranosid
Y1r	NPY Rezeptor 1
YPD, YPDS	Medien zur Kultivierung von <i>Pichia Pastoris</i>
<i>zi</i>	<i>zitter</i> -Mutation, Mutation von Attractin bei Ratten
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

„Sie nahmen Jahrhunderte an, wo Jahrtausende angezeigt sind, und Jahrtausende, wo die Sprache der Natur auf Jahrmillionen hindeutet. So konnten sie, wenn sie logisch von solchen falschen Voraussetzungen weitergingen, zu keinem anderen Schluss gelangen, als dass mit der Weltordnung eine völlige Revolution vor sich gegangen sei.“

Diese (frei übersetzten) Worte schrieb Charles Lyell in seinem ersten Band *„Principles of Geology“* (1830) über die Befürworter der Katastrophentheorie, denen er entgegentrat.

Die Erstauflage dieses Werkes von Lyell, des Reformators der Geologie, begleiteten Charles Darwin ein Jahr später auf seiner legendären fünfjährigen Reise mit der „Beagle“, die ihn unter anderem zur Küste des südamerikanischen Festlands und den Galapagos-Inseln führte. Die über lange erdgeschichtliche Zeiträume stetig wirkenden Gesetze bringen demnach nur langsam Veränderungen zu Tage. Darwins Beobachtungen des allmählichen Wechsels von Merkmalen ähnlicher Arten in verschiedenen Gebieten der Erde mündeten schließlich in sein erstes großes Werk *„Über die Entstehung der Arten durch natürliche Selektion“* (1859) dem viele Arbeiten folgten. Dennoch wies Darwins Theorie Lücken auf. Sie beruhten auf mangelndem Verständnis der Vererbungsmechanismen, die vom Augustinermönch Gregor Mendel geschlossen wurden. Dieser erarbeitete die Prinzipien der Vererbung durch künstliche Befruchtung und Beobachtungen des äußerlichen Erscheinungsbildes von Pflanzen, wie Blütenfarbe und -form, bei *„Versuchen über Pflanzenhybriden“* (1865) und leitete daraus Gesetzmäßigkeiten ab, die heute die Grundlage der experimentellen Genetik bilden. Die Mendelschen Regeln gerieten allerdings in Vergessenheit und wurden erst 1900 von den drei Botanikern C. E. Correns, H. de Vries und E. v. Tschermak unabhängig voneinander wiederentdeckt.

Dem französischen Biologen Lucien Cuénot war es vorbehalten, sie zwei Jahre später auch erstmals erfolgreich auf Tiere anzuwenden. Experimentell stellte er fest, dass die Fellfärbung von Mäusen durch zwei Pigmente (gelb und schwarz) realisiert wird. Er war es auch, der bereits einen Vorläufer der *„Ein-Gen Ein-Enzym Hypothese“* vorschlug (1903), für die Beadle und Tatum 1958 den Nobelpreis erhielten. Im Jahr 1905 beschrieb Cuénot eine adipöse gelbe (*lethal yellow; A^Y*) Maus, die bereits zu Beginn des 19. Jahrhunderts von europäischen Mausliebhabern hervorgebracht, und seit dem erhalten worden war. Cuénots Bericht war sowohl der erste über eine letale Mutation, als auch der erste über eine spontane fettleibige Maus. Er setzte damit eine Entwicklung in Gang, die zur Erforschung weiterer Modelle von Adipositas und Pigmentation sowie zur Entdeckung des Melanocortinsystems

fürte. Auch dieses wurde durch fortwährende biologische Evolution hervorgebracht und obwohl es gut konserviert ist, erfährt es über Jahrmillionen Erweiterungen. Welche Auswirkungen aber interindividuelle Veränderung einzelner Komponenten konservierter Elemente auf einen Organismus haben können und warum nicht jede Mutation einen Selektionsvorteil bedeutet, wird am Beispiel des Melanocortinsystems deutlich.

Weitere Merkmale von *lethal yellow*-Mäusen sind gesteigertes Längenwachstum, Hyper-



Abbildung 1-1:

Im Jahre 1905 erstmals von L. Cuénot beschriebene adipöse gelbe Maus (A^Y/a , *lethal yellow*)

phagie, Typ-2-Diabetes, Hyperleptinämie, Hyperinsulinämie, Hyperglykämie, verminderte Thermogenese, Defekte des Immunsystems und eine gesteigerte Anfälligkeit für Tumorbildung. Funktionsverlustmutationen von *Attractin*¹, die vor allem die Expression dieses Proteins verringern, heben den *lethal yellow*-Phänotyp nahezu komplett auf oder verkehren phänotypische Merkmale von A^Y ins Gegenteil. Daraus ließen sich Verflechtungen von *Attractin* mit dem Melanocortinsystem ableiten, obwohl es wahrscheinlich auch autonom von diesem System agiert. Ansätze zur Funktionsaufklärung von *Attractin* stammen hauptsächlich aus Tiermodellstudien. Tiere, die von einem Funktionsverlust von *Attractin* betroffen sind, offenbaren eine spongiforme Neurodegeneration, Tremor und Lähmungen, sie weisen Veränderungen der Pigmentierung und des Immunsystems auf. Obwohl die Tiere von einer Hyperphagie betroffen sind, ist ihr Körpergewicht und ihre Körperfettmasse gesenkt, die basale Metabolismusrate ist gesteigert und sie sind hyperaktiv. Dies sind einige der weitreichenden Folgen die durch den Verlust dieses Proteins hervorgerufen werden, die Funktion von *Attractin* selbst ist kaum geklärt. Allerdings wird dem Protein eine enzymatische Aktivität ähnlich der Dipeptidylpeptidase 4 (DP4) zugeschrieben. Die folgenden Abschnitte sollen sowohl verschiedene von *Attractin* beeinflusste physiologische Zusammenhänge als auch die sogenannten „DP4-ähnlichen“ Enzyme vorstellen.

¹ Eine Übersicht der hier benannten Mutationen findet sich im Anhang auf Seite 118.

1.1 Die *lethal yellow*-Mutation: Letalität und Pigmentierung

Lethal yellow (A^Y) ist eine dominante Mutation bei Mäusen, die bei Homozygoten bereits vor bzw. kurz nach dem Einnisten der Blastocyste ins Endometrium zum Absterben des Keims führt (Duhl *et al.*, 1994). Heterozygote Tiere entwickeln ein uniformes gelbes Fell über den gesamten Körper. Die Ursache der A^Y -Mutation ist die permanente ubiquitäre Überexpression von Agouti, eines aus 131 Aminosäuren bestehenden Proteins, das bei Nagetieren normalerweise zeitlich begrenzt und hauptsächlich während eines bestimmten Abschnittes des Haarwachstums in der Haut produziert wird (Lu *et al.*, 1994; Voisey *et al.*, 2002).

Eine Deletion im *Raly*-Gen von 170 kb (Michaud *et al.*, 1994) bzw. 120 kb (Duhl *et al.*, 1994) entfernt *Raly*, abgesehen vom Promotor und dem ersten (nicht kodierenden) Exon fast vollständig. *Raly* kodiert für hnRNP (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C*), das ubiquitär exprimiert wird und dessen Deletion und fehlende Expression der Grund für die letale Wirkung von A^Y bereits im Blastocystenstadium ist (Duhl *et al.*, 1994). Eine weitere Auswirkung dieser Mutation ist die Fusion des *Raly*-Promotors mit dem Agouti-Gen und der folgenden Änderung des Expressionsmusters von Agouti. Wie später noch im Detail beschrieben, hat dies vielfältige Konsequenzen, wie z.B. die gelbe Fellfarbe der A^Y -Mutanten.

1.2 Das Melanocortinsystem

1.2.1 Melanocortine und deren Rezeptoren

Der Melanocortinrezeptor 1 ist einer von 5 bekannten Subtypen (MC1R-MC5R) einer Gruppe aus der Superfamilie der 7-Helix-Rezeptoren. Ihnen ist die Generierung von cAMP über stimulatorische G-Proteine (G_S) und die Adenylylcyclase gemeinsam.

Natürliche Agonisten dieser Rezeptorgruppe sind die Melanocortine, die neben anderen biologisch aktiven Peptiden, wie den Lipotropinen oder β -Endorphin, aus dem Prohormon Proopiomelanocortin (POMC) freigesetzt werden. Zu den Melanocortinen zählen das α -, β - und das γ -melanozytenstimulierende Hormon (MSH) sowie das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH, Adrenocorticotropin).

POMC wird in der Hypophyse und anderen Hirnregionen wie dem Hypothalamus sowie in peripheren Organen und Geweben z.B. im Magen-Darm-Trakt, der Plazenta, den Gonaden und in der Haut exprimiert. Die Melanocortine besitzen ein einheitliches Pharmacophor (His-Phe-Arg-Trp), das für die biologische Aktivität der Peptide notwendig ist. Die Prozessierung aus POMC erfolgt durch die Prohormonconvertasen PC1 und PC2, die Carboxypeptidase E (CPE) sowie Aminopeptidasen und weiteren enzymatischen Modifikationen (N-Acetylierung und C-terminale Amidierung). Ein Funktionsverlust eines oder mehrerer an der Prozessierung

beteiligter Enzyme verursacht Dysregulationen metabolischer Aktivitäten und kann, wie z.B. bei der *Cpe^{fat}*-Mutation bei Mäusen, in deren Folge zu Adipositas führen (Varlamov *et al.*, 1996).

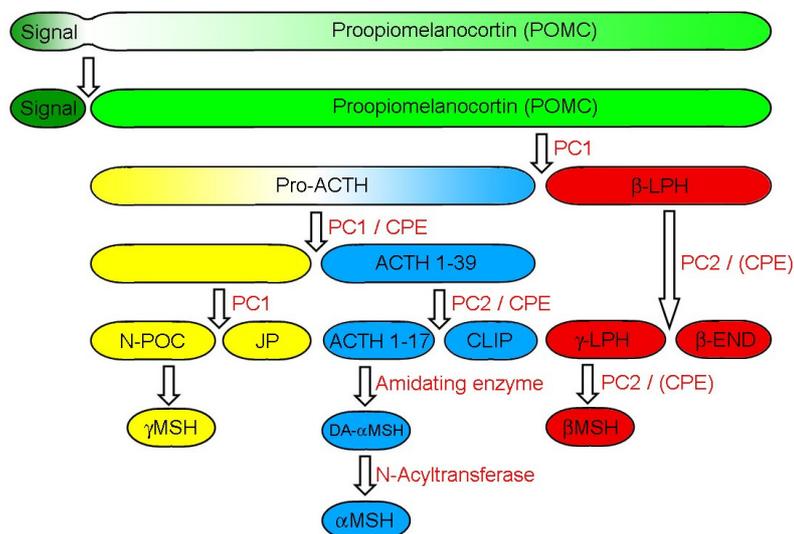


Abbildung 1-2: POMC-Prozessierung; modifiziert nach (Pritchard *et al.*, 2002; Tanaka 2003) Abkürzungen: **LPH:** Lipotrophin, **MSH:** melanozytenstimulierendes Hormon, **β-END:** β-Endorphin, **ACTH:** Adrenocorticotropin, **CLIP:** corticotropin-like intermediate lobe peptide, **CPE:** Carboxypeptidase E, **DA-αMSH:** deacetyliertes α-MSH, **JP:** Joining peptide, **N-POC:** N-terminales POMC-Fragment, **PC:** Prohormonkonvertase 1, **Signal:** Signalpeptid

Tabelle 1-1: Übersicht über die Melanocortinrezeptoren; Verteilung, Agonisten und inverse Agonisten; in Klammern sind Gewebe und Organe mit geringer MCR-Konzentration dargestellt (Boston *et al.*, 1996; Moussa *et al.*, 1999; Schaffer *et al.*, 2001; Gantz *et al.*, 2003)

MCR	Verteilung	Potenz der Agonisten	Inverse Agonisten
MC1R	Melanozyten, (Milz, Makrophagen, Adipozyten, Keratinozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Antigen-präsentierende Zellen, Hirnanhangdrüse, Lunge)	α-MSH=ACTH>β-MSH>γ-MSH	Agouti
MC2R	Nebennierenrinde, (Adipozyten)	ACTH	Agouti
MC3R	Gehirn, (Darm, Plazenta, Pankreas)	α-MSH=β-MSH=γ-MSH=ACTH	Agouti, *Agrp
MC4R	Gehirn, (Muskel)	α-MSH=ACTH>β-MSH>γ-MSH	Agouti, *Agrp
MC5R	Periphere Gewebe, (Adipozyten, Talgdrüsen, annähernd ubiquitär)	α-MSH>ACTH>β-MSH>γ-MSH	?

*Agrp: Agouti related protein

Die Hauptfunktion des MC1R ist die Regulation der Pigmentierung. Ein Funktionsverlust des Rezeptors, wie z.B. bei der *extension*-Mutation bei Mäusen, verursacht eine komplett gelbe Fellfärbung. Beim Menschen sind Variationen durch Aminosäureaustausch im MC1R die

häufigste Ursache für sehr helle Hautpigmentierung und rote Haare. ACTH stimuliert durch Bindung am MC2R (vergl. Tabelle 1-1) die Nebennierenrinde zur Cortisolsekreterung. Die hauptsächlich im zentralen Nervensystem lokalisierten MC3R und MC4R sind wesentlich an der Regulation der Energiehomöostase beteiligt. Funktionsverlust-Mutationen des POMC-Gens sind daher mit Folgen wie Hypercortisolismus, rotem Haar, heller Haut und früh einsetzender extremer Fettleibigkeit verbunden (Clark *et al.*, 1998; Krude *et al.*, 1998; Cone 2000; Schaffer *et al.*, 2001; MacNeil *et al.*, 2002).

Die Melanocortine und ihre Rezeptoren sind zwei gut charakterisierte Komponenten des Melanocortinsystems. An Beispielen aus den Bereichen der Regulation von Pigmentierung und Nahrungsaufnahme soll im Folgenden der dritte Bestandteil dieses Systems erläutert werden. Es handelt sich dabei um zwei endogene inverse Agonisten der Melanocortinrezeptoren, das Protein Agouti und das *Agouti related protein* (Agrp).

1.2.2 Pigmentbildung

Die Pigmentierung dient Organismen zur Werbung, Tarnung, Abschreckung oder der Abwehr gefährdender Strahlung, in jedem Fall also erfüllt sie Schutzfunktionen. Die für die Pigmentierung der Säugetiere entscheidenden Pigmente sind biologische Polymere, die Melanine. Sie werden in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt: Die schwarzen bis braunen Eumelanine und die gelben bis roten Phäomelanine, die zusammen zahlreiche Schattierungen hervorbringen.

Der als *pigment type switching* bezeichnete Prozess, der die zeitlich begrenzte Signalwandlung am MC1R durch Melanocortine (vgl. Tabelle 1-1) bzw. inversen Agonismus von Agouti und die damit verbundene Bildung von Eu- bzw. Phäomelanin beschreibt, bringt das für viele Säugetiere (z.B. Mäuse und Ratten) typische Agouti-Haar hervor (Lu *et al.*, 1994). Benannt wurde es nach einem Südamerikanischen Nagetier (*Dasyprocta aguti*), bei dem diese Zeichnung besonders deutlich zu erkennen ist. Demnach ist das einzelne Haar, das von Ferne braun erscheinenden Fells, schwarz und wird durch ein schmales gelbes Band unterbrochen.

Melanozyten sind zur Pigmentbildung spezialisierte Zellen, deren Vorläuferzellen (die Melanoblasten) ebenso wie z.B. die Neuronen aus der Neuralleiste stammen (Schnorr, 1996). Die Melanoblasten wandern während der Embryonalentwicklung z.B. ins *Stratum basale* der Epidermis oder in die Haarfollikel und differenzieren zu reifen Melanozyten.

Die Biosynthese des Melanins findet in speziellen zytosolischen Organellen, den bei Säugern als Melanosomen bezeichneten Pigmentgranula der Melanozyten, statt. Sie werden nach dem Typ des Melanins, das in ihnen synthetisiert wird, als Eumelanosomen oder

Phäomelanosomen bezeichnet. Reife Melanosomen werden über die Dendriten der Melanozyten in umliegende Zellen per Exocytose abgeben.

Den Ausgangspunkt der Melanogenese stellt die Bindung von α -MSH oder ACTH am $G_{\alpha s}$ gekoppelten MC1R dar (Abbildung 1-3). Die folgende Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration via Adenylylcyclase löst eine ganze Reihe von Signalwegen aus. Einer davon ist die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) (Lalli *et al.*, 1994) und des *cAMP response element binding protein* (CREB) durch Phosphorylierung am Ser 113. Dies ermöglicht eine Bindung von CREB mit *CREB binding protein* (CBP) sowie eine Aktivierung des Transkriptionskomplexes. Das Resultat ist ein starker Anstieg des Transkriptionsfaktors MITF (*microphthalmia associated transcription factor*), der ca. 4 h anhält und anschließend wieder abklingt (Bertolotto *et al.*, 1998a).

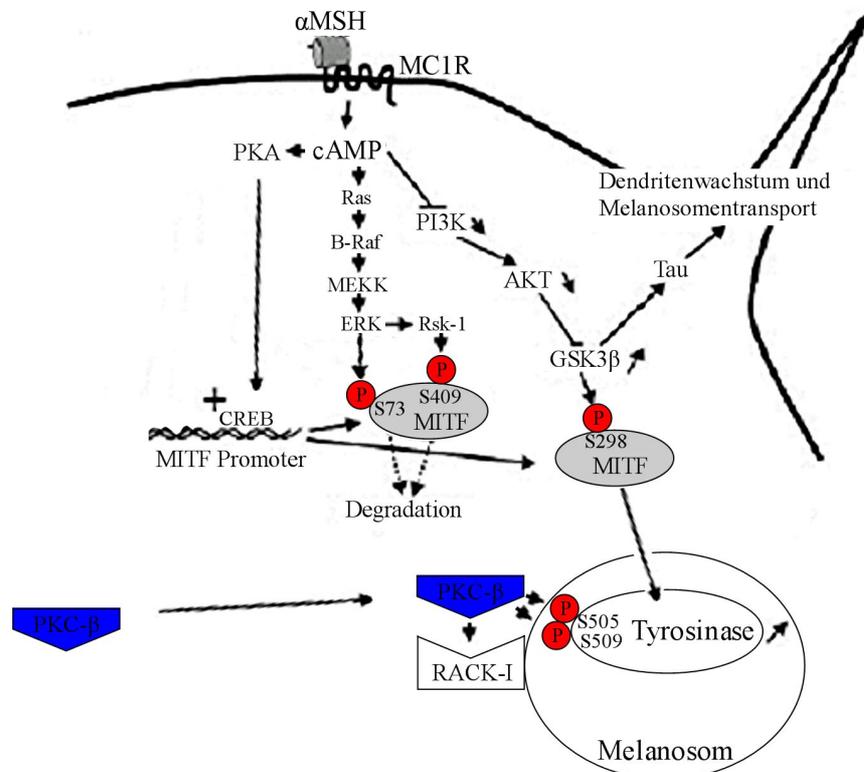


Abbildung 1-3: Model der Signalwege zur Tyrosinaseexpression (Melanogenese). Die Bindung von α -MSH am G_s -Protein gekoppelten MC1R führt zur Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Die daraus resultierende Aktivierung der PKA stimuliert die Transkription von MITF und damit die Stimulation der Expression der Tyrosinase. Unabhängig von PKA aktiviert cAMP auch die Ras, B-Raf, MEKK, ERK sowie die Rsk-1 Kaskade. Die Phosphorylierungen von MITF durch ERK und Rsk-1 führen zu einem Abbau von MITF und schützen vor zu starker Melaninsynthese, die durch eine Phosphorylierung von MITF durch GSK3 β noch weiter stimuliert wird. GSK3 β phosphoryliert MITF und erhöht damit dessen Bindung an der M-Box des Tyrosinasepromotors. Durch Colokalisation von RACK-1, PKC- β und Tyrosinase an der Melanosomenmembran, erhöht PKC- β durch Phosphorylierung der Tyrosinase deren Aktivität (erweitert nach Khaled *et al.*, 2002 und Park *et al.*, 2004)

MITF bindet am sogenannten „M-Box“-Bereich der Promotoren von Tyrosinase und *Tyrosinase-related protein 1* (TRP1 oder *DHICA oxidase*) und aktiviert deren Expression.

Auch ein drittes Protein der Melanogenese, *Tyrosinase-related protein 2* (TRP2 oder Dopachromtautomerase), wird wahrscheinlich auf diesem Weg gebildet. Hier gibt es aber widersprüchliche Aussagen (Lowings *et al.*, 1992; Yasumoto *et al.*, 1997; Bertolotto *et al.*, 1998b).

Anders als in vielen anderen Zelltypen wird in Melanozyten und PC12-Zellen (Phäochromozyten aus Rattenniere), die den Melanozyten sehr ähnlich sind und ebenfalls aus dem Neuralrohr stammen, durch cAMP auch der MAP-Kinase-Signalweg aktiviert. Dies steht in engem Zusammenhang mit der Aktivierung der B-Raf Kinase, einer Raf Isoform die in Geweben neuralen Ursprungs hoch exprimiert wird (Englaro *et al.*, 1995). Diese Signalkaskade führt zur Phosphorylierung von MITF durch die extrazellulär signalregulierten Kinasen 1 und 2 (ERKs) und RSK-1 (*90 kDa ribosomal S6 kinase*), die durch ERK1/2 aktiviert wird. Dadurch wird das Signal zum proteasomalen Abbau von MITF und zur Hemmung der Melanogenese ausgelöst (Hemesath *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2000).

Nicht nur die Tyrosinaseexpression durch Aktivierung der PKA ist eine wichtige Folge der cAMP Erhöhung. Die cAMP-Bildung führt auch zu einer Differenzierung der Melanozyten durch Reorganisation des Actinzytoskeletts (Busca *et al.*, 1998). Busca *et al.* zeigten in B16 Melanoma-Zellen, dass durch Steigerung der cAMP-Konzentration nicht nur die Melanogenese und das Dendritenwachstum stark stimuliert, sondern ebenfalls die PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) gehemmt wird. Durch einen Inhibitor der PI3K konnten sie die gleichen Effekte auslösen (Busca *et al.*, 1996). Die Reduktion der Aktivität der PI3K bewirkt eine Hemmung der GTPasen Rho und Rac und die Stimulation des Dendritenwachstums durch Reorganisation des Actinzytoskeletts. Die PI3K-Hemmung führt ebenfalls zur Inaktivierung der Serin/Threonin Kinase AKT und damit zur Dephosphorylierung und Aktivierung der GSK3 β . Die daraus resultierende Phosphorylierung von MITF durch GSK3 β an Ser298 steigert die MITF-Bindung an der M-Box des Tyrosinase-Promotors und die Tyrosinaseexpression. Zu den Substraten der GSK3 β gehören unter anderem mikrotubulin-assoziierte Protein Tau, dass für Dendritenwachstum und Melanosomentransport eine Rolle spielen könnte (Khaled *et al.*, 2002).

Ein anderer wichtiger Signaltransduktionsweg ist die Regulation der Melanogenese durch PKC- β . Es konnte gezeigt werden, dass sich der „Rezeptor der aktivierten C-Kinase-I“ (RACK-I) auf Melanosomen befindet. RACK-I bindet selektiv PKC- β und ermöglicht damit die Colokalisation von PKC- β und der in der Melanosomenmembran gebundenen Tyrosinase. (Park *et al.*, 2004). Die Kinase phosphoryliert die Tyrosinase an ihrer zytoplasmatischen Domäne (Serin 505 und 509) und induziert so deren Aktivierung (Park *et al.*, 1999a).

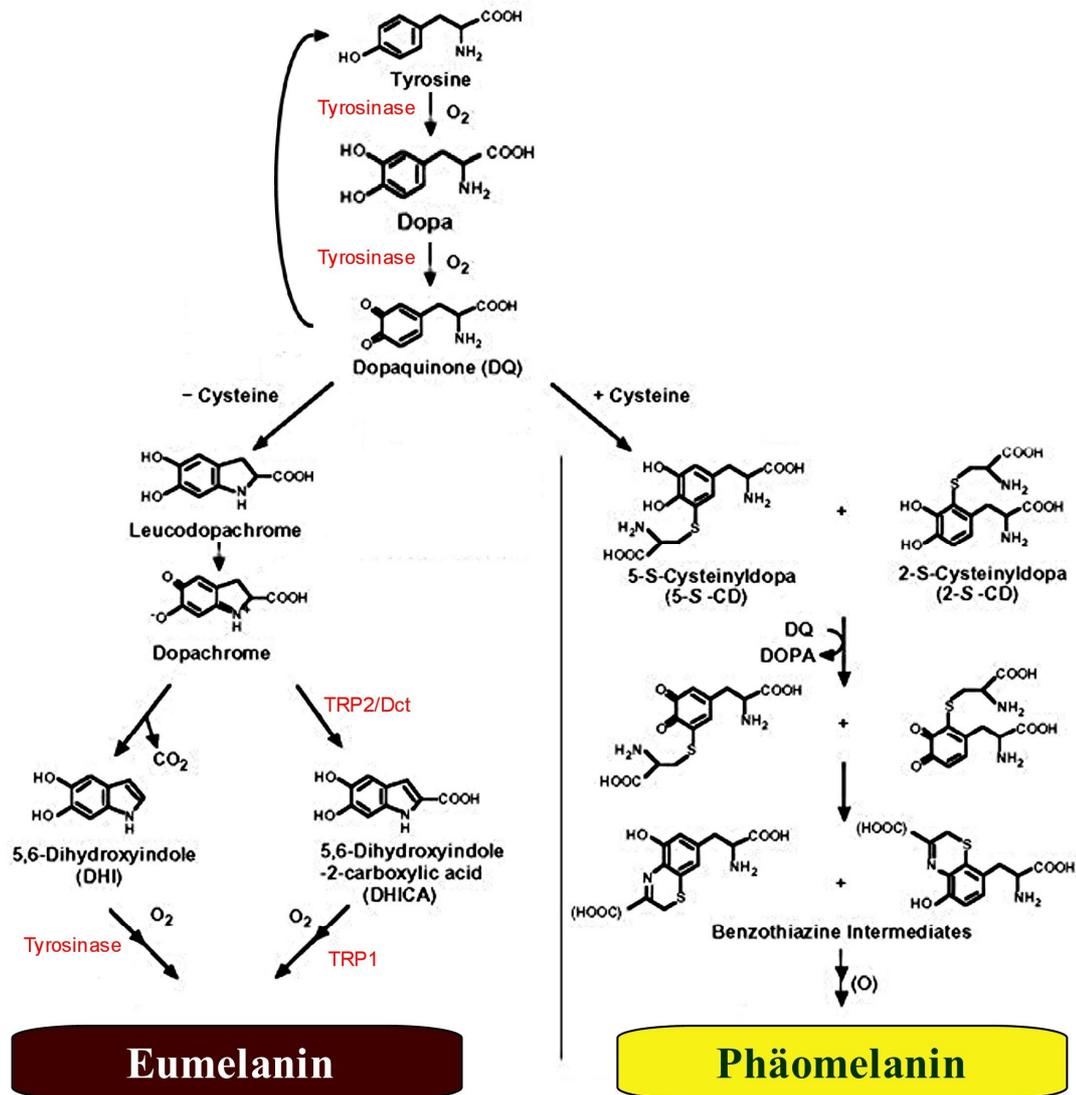


Abbildung 1-4: Biologische Synthese von Eu- und Phäomelanin; Abkürzungen: **DOPA:** (3,4-Dihydroxyphenylalanin), **DQ:** Dopachinon, Dopaquinone), **TRP1:** (*Tyrosinase-related protein 1*), **TRP2/Dct:** (*Tyrosinase-related protein 2* oder *Dopachrome tautomerase*), Quellen: modifiziert nach Hearing *et al.* (1991); del Marmol *et al.* (1996); Lamoreux *et al.* (2001)

Die Melanogenese startet mit zwei Tyrosinase-katalysierten Reaktionen, der Hydroxylierung der essentiellen Aminosäure Tyrosin zu 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) und der Oxidation von DOPA zu Dopachinon (Dopaquinone, DQ), das die gemeinsame Vorstufe der beiden Melanine Eumelanin und Phäomelanin bildet (Abbildung 1-4). Die Synthese von Phäomelanin wird durch nichtenzymatische Interaktionen von Dopachinon mit der Aminosäure Cystein eingeleitet, ein im Vergleich zur Zyklisierung von Dopachinon zur Eumelaninvorstufe Leucodopachrom schneller Schritt. Daher ist die CysteinKonzentration ein entscheidender Faktor der Melaninsynthese. Auch der weitere (oxidative) Weg der Biosynthese von Phäomelanin scheint ohne die Wirkung von Enzymen zu verlaufen. Bei der Synthese von Eumelanin hingegen finden neben nichtenzymatischen, weitere Reaktionen

statt, die durch Tyrosinase, TRP1 und TRP2 katalysiert werden (Hearing *et al.*, 1991; del Marmol *et al.*, 1996; Lamoreux *et al.*, 2001).

1.3 Die *lethal yellow*-Mutation: Metabolismus

Neben dem Pigmentierungsphänotyp und der Letalität im heterozygoten Genotyp verursacht A^Y weitere Effekte wie vergrößertes somatisches Wachstum, erhöhte Tumoranfälligkeit, Immundefekte sowie verminderte Fertilität, da die Implantation der Eizelle verhindert wird. Darüber hinaus hat die Mutation tiefgreifende Auswirkungen auf den Metabolismus. Dies äußert sich in Hyperphagie, Hyperinsulinämie, Insulinresistenz, Hyperglykämie, Hyperleptinämie und schwerer Adipositas im Adultstadium (Michaud *et al.*, 1997; Mynatt *et al.*, 1997; Miltenberger *et al.*, 1997; Dinulescu *et al.*, 1998; Gunn *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 1999).

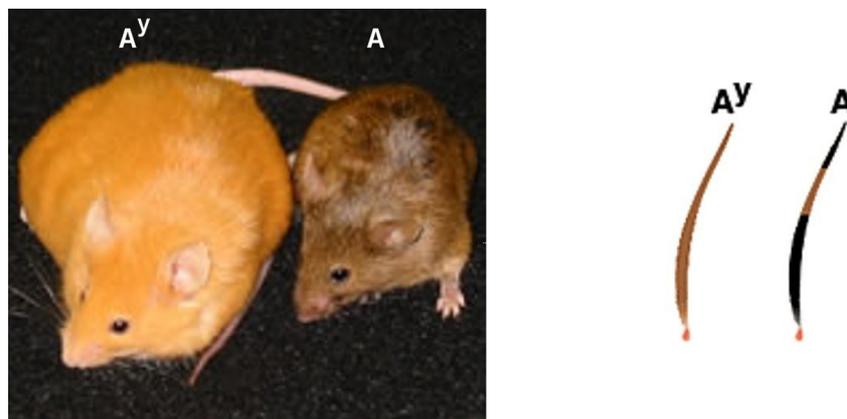


Abbildung 1-5: Links: A^Y -Mutante (ubiquitäre Überexpression von Agouti) im Vergleich zu einer Wildtypmaus und deren sichtbare phänotypische Merkmale: uniformes gelbes Fell, Fettleibigkeit, gesteigertes Längenwachstum; Rechts: Haarfärbungsmuster von A^Y - im Vergleich zu Wildtypmäusen (A)

Es ist natürlich sehr schwer abzuschätzen, welche Merkmale durch die ubiquitäre Überexpression von Agouti oder den Funktionsverlust von *Raly* direkt ausgelöst werden und welche „nur“ indirekte Folgen darstellen. Neben der Unterscheidung zwischen Ursache und Folge ist auch die Unterscheidung zwischen peripher und zentral vermittelten Effekten kaum eindeutig zu treffen. Zweifelsfrei ist die Hyperphagie eine direkte Folge der ektopischen Agoutiexpression und der damit verbundenen invers-agonistische Wirkung von Agouti am hypothalamischen MC4R (vergl. Tabelle 1-1).

1.3.1 Zentrale Regulation der Nahrungsaufnahme

Signale aus der Peripherie über den momentanen Energiestatus werden im Hypothalamus an neurale Rezeptoren weitergeleitet und verursachen eine entsprechende Gegenregulation. Zu

diesen Signalen gehört das Peptidhormon Ghrelin, dessen Synthese hauptsächlich im Magen stattfindet. Die Ghrelin-Plasmakonzentration steigt vor einer Nahrungsaufnahme sehr stark an. Cholecystokin (CCK) ist ein Hormon, das in der Schleimhaut des Duodenums in Antwort auf eine Mahlzeit gebildet wird. Es bindet an Rezeptoren des Vagusnervs und ist damit ein Signal, das zur Beendigung einer Mahlzeit beiträgt.

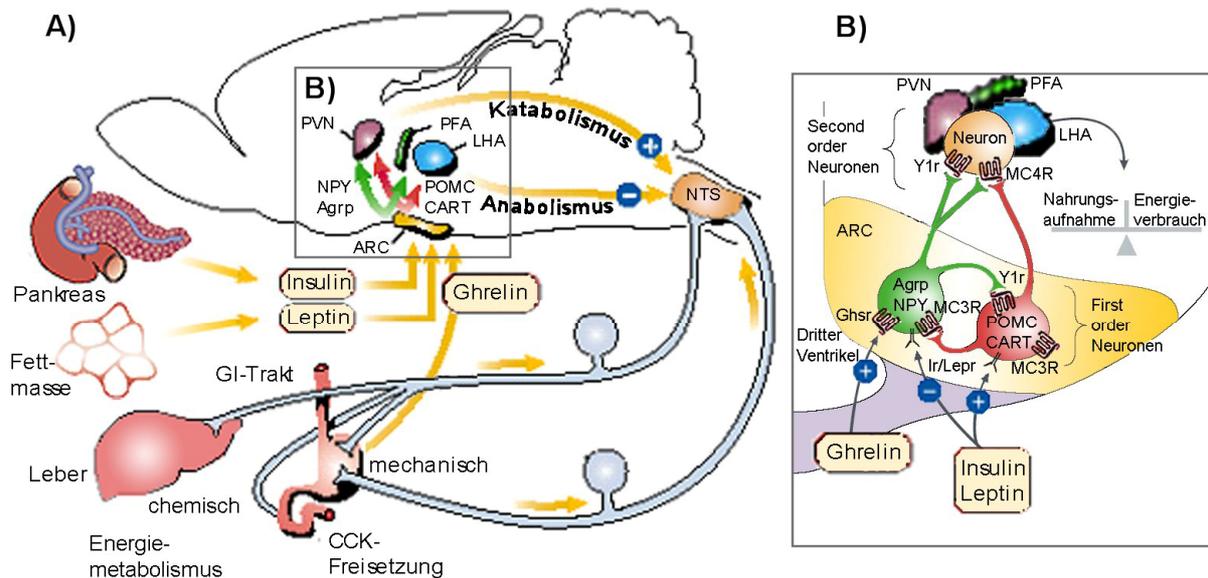


Abbildung 1-6: A): Neuroanatomisches Modell (Rattengehirn) der Signale zum Energiestatus, die in einer Region des Hirnstammes (NTS) verglichen werden und über Beginn bzw. Ende einer Mahlzeit entscheiden; Leptin und Insulin stimulieren katabole Wege und inhibieren anabole Wege B): aus A) vergrößert; Signaltransduktion zirkulierender Peptide in eine neuronale Reaktion; ARC: Nucleus Arcuatus; AGRP: Agouti related protein; CART: Cocaine- and amphetamine-regulated transcript; CCK: Cholecystokin; GI: gastrointestinal; Gshr: Ghrelinrezeptor; Ir: Insulinrezeptor; Lepr: Leptinrezeptor; LHA: lateraler Hypothalamus; NPY: Neuropeptide Y; NTS: Nucleus tractus solitarius; PFA: perifornical area; POMC: Proopiomelanocortin; PVN: Nucleus paraventricularis; Y1r: NPY Rezeptor 1; Quelle: modifiziert nach Schwartz *et al.* 2000

Intracerebroventrikuläre Applikation des *Agouti-related-protein* (Agrp), des inversen Agonisten der Melanocortinrezeptoren 3 und 4, der im Hypothalamus exprimiert wird, erhöht die Aufnahme von vorwiegend fettreicher Nahrung für über eine Woche. Ein anderes sehr potentes orexigenes Signal (orexis: griech. für Appetit) ist Neuropeptid Y (NPY). Dieses stimuliert die Zufuhr von Kohlenhydraten über Stunden (Inui 1999; Schwartz *et al.*, 2000). Beide Peptide werden von denselben Neuronen des *Nucleus arcuatus* (ARC) der Ratte bzw. *Nucleus infundibularis* des Menschen, einer Hypothalamusregion bestehend aus einer langgezogenen Ansammlung neuronaler Zellkörper mit einer hochspezialisierten Rolle in der Energiehomöostase, coexprimiert. In direkter Nachbarschaft befinden sich katabole Neuronen, die zur Bildung und Sezernierung von POMC und CART (*cocaine- and amphetamine-regulated transcript*) fähig sind. Diese beiden Neuronentypen stellen *First-*

order-Neuronen dar, da sie direkt auf Signale aus der Peripherie reagieren (Schwartz *et al.*, 2000). Das Adipocytenhormon Leptin und das Pankreashormon Insulin stellen zwei Signale über den momentanen Energiestatus dar. Eine Erhöhung der Körperfettmasse geht mit einer Steigerung der Plasmakonzentrationen beider Hormone einher, für eine Verringerung gilt entsprechend das Gegenteil. Beide Hormone gelangen über aktiven Transport ins ZNS und binden an Leptin- bzw. Insulinrezeptoren, die sowohl von Agrp/NPY- und POMC/CART-Neuronen exprimiert werden. Durch hohe Konzentrationen der beiden Hormone werden die katabolen Neuronen stimuliert, die anabolen gehemmt. Entsprechend umgekehrt ist der Effekt bei niedrigen Hormonkonzentrationen. Durch Stimulation der Neuronen entsprechend dem Energiestatus werden die Informationen über Expression, Sezernierung und Prozessierung der verschiedenen Neuropeptide von den Nervenenden in umliegende Hypothalamusstrukturen weitergeleitet. Agrp und die POMC-Derivate konkurrieren um die Bindung an MC4R-positiven *Second-order*-Neuronen in verschiedenen Hirnregionen, wie z.B. dem *Nucleus paraventricularis* (PVN) und dem lateralen Hypothalamus (LHA), die eine wesentliche Rolle in der Energiehomöostase spielen. Im *Nucleus tractus solitarius* (NTS), einer Region des Hirnstammes, laufen neben den Signalen über die Energiereserven auch sensorische Reize während der Mahlzeit (mechanische Signale aus dem Magen, chemische Signale aus der Leber und Geschmacksinformationen aus der Mundhöhle) zusammen. Die Verarbeitung dieser Informationen bestimmt über den zeitlichen Abstand, die Größe und die Art von Mahlzeiten (Inui 1999; Cone 1999; Schwartz *et al.*, 2000).

Die mutationsbedingte Überexpression von Agouti bei *lethal yellow*-Mäusen im ZNS, wo das Peptid normalerweise nicht vorkommt, und die folgende Bindung am MC4R verursacht ein starkes orexigenes Signal, da es die Funktion von Agrp nachahmt. Die Sequenzähnlichkeit zu Agouti lag der Entdeckung von Agrp zugrunde (Ollmann *et al.*, 1997; Shutter *et al.*, 1997). Die permanente Bindung des inversen Agonisten Agouti am MC4R wird als erheblicher Energiemangel interpretiert, dessen Folge die beschriebene Hyperphagie, Fettleibigkeit und alle weiteren Faktoren und Konsequenzen eines metabolischen Syndroms sind. Unterstützt wird dieses Modell dadurch, dass sowohl der Funktionsverlust des MC4R als auch Überexpression von Agrp Fettleibigkeit bei Mäusen verursacht. Dies offenbarte die Wichtigkeit des Melanocortinsystems in der Regulation der Nahrungsaufnahme, da Mutationen des MC4R die häufigste monogene Ursache der Adipositas beim Menschen sind (Cone 2000).

1.3.2 Einfluss von Agouti auf die periphere Regulation der Nahrungsaufnahme

Lässt sich der A^Y -Adipositas-Phänotyp allein durch die zentrale Blockade des MC4R erklären? Ein Anstieg der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) besetzt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von Insulinresistenz, Adipositas, Hypertonie und den damit verbundenen Folgeerkrankungen (Draznin *et al.*, 1987a; Draznin *et al.*, 1987b; Byyny *et al.*, 1992). So wiesen Byyny *et al.* auch einen erhöhten basalen $[Ca^{2+}]_i$ in fettleibigen Patienten nach. Es wurde gezeigt, dass Agouti in einer ganzen Reihe von Zelltypen, einschließlich der Adipocyten, den Einstrom von Ca^{2+} stimuliert und die $[Ca^{2+}]_i$ steigert. Dies geschieht unabhängig vom inversen Agonismus an Melanocortinrezeptoren (Kim *et al.*, 1997). Über diesen Mechanismus stimuliert Agouti sowohl in murinen als auch in humanen Adipocyten die Fettsäuresynthese (FAS), Triglyceridakkumulation und damit die Lipogenese (Jones *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1996). Auch Insulin steigert die FAS-Gentranskription, zudem zeigen Agouti und Insulin einen additiven Effekt, der über unabhängige Transkriptionsfaktoren und DNA-Elemente im FAS-Promotor vermittelt wird (Claycombe *et al.*, 2000a). Außerdem hemmt Agouti die ACTH-induzierte Lipolyse (Tebar *et al.*, 1996). Dies geschieht ohne Antagonismus am ACTH-Rezeptor MC2R (Xue *et al.*, 1998).

Agouti wird beim Menschen darüber hinaus in den β -Zellen des Pankreas exprimiert und ist in der Lage, den Einstrom von Ca^{2+} , den $[Ca^{2+}]_i$ und die Insulinfreisetzung aus den β -Zellen des Pankreas zu stimulieren. Dies verursacht auch Hyperinsulinämie, Insulinresistenz und Hyperglykämie bei Mäusen mit ektopischer Agoutiüberexpression (Xue *et al.*, 1999).

Der Hauptexpressionsort von Agouti beim Menschen ist jedoch das Fettgewebe (Kwon *et al.*, 1994). Transgene Mäuse die Agouti unter Kontrolle des adipozytenspezifischen Promoters aP2 exprimieren, sind hyperglykämisch und zeigen außer einer gesteigerten Leptinexpression und einem erhöhten Leptinspiegel im Plasma keine sonstigen phänotypischen Änderungen. Werden diese Tiere aber zusätzlich mit Insulin behandelt, werden sie adipös. Diesen Effekt zeigen nicht transgene Vergleichstiere nicht (Mynatt *et al.*, 1997; Claycombe *et al.*, 2000b).

Das bedeutet, dass die ubiquitäre Überexpression von Agouti bei A^Y Hyperglykämie, Hyperinsulinämie, Hyperleptinämie, Adipositas über kalziumabhängige/MCR-unabhängige Mechanismen, aber auch Hyperphagie durch Rezeptordesensibilisierung über periphere Effekte hervorzurufen scheint.

Wie groß der Einfluss der Agouti-vermittelten Ca^{2+} -Regulation im Vergleich zum inversen Agonismus an MCR ist und über welchen Mechanismus dies erfolgt, ist nicht geklärt. Die cysteinreichen C-terminalen Domänen von Agouti und Agrp, enthalten 10 hochkonservierte Cysteine, die durch Disulfidbindungen verbrückt sind (Abbildung 1-7). Sie bilden einen sogenannten inhibitorischen Cysteinknoten. Solche Strukturen sind bisher nur aus Toxinen

von Invertebraten bekannt (McNulty 2001; Jackson PJ, McNulty JC, 2002). Die dazu zählenden Conotoxine wirken häufig gegen Ionenkanäle und blockieren u.a. Ca^{2+} -Kanäle, Na^+ -Kanäle oder auch den Acetylcholinrezeptor. Jeder Austausch eines dieser Cysteine von Agouti gegen Serin verursacht eine schwarze Fellfärbung und trotz Überexpression ein normales Körpergewicht. Genauso wichtig für die Funktionalität sind die N-terminale Glykosylierung und die Signalsequenz (Perry WL 1996). In Assays zur MCR-Bindung von Agouti wurde festgestellt, dass die antagonistische Wirkung der C-terminalen Domäne ebenso potent ist wie die des Gesamtproteins. Im Unterschied zu Agrp besitzt Agouti eine zentrale basische Domäne. Ubiquitäre Überexpression von Agouti in dem diese basische Domäne ausgetauscht wurde, führt zwar zur bekannten gelben Fellfärbung, die Mäuse nehmen aber nicht an Gewicht zu (Miltenberger 1999).

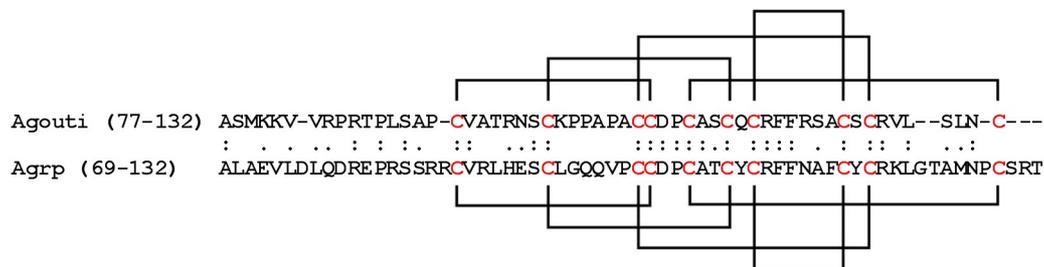


Abbildung 1-7: Alignment und Ausbildung von Disulfidbrücken (rot) im inhibitorischen Cysteinoknoten in den C-terminalen, cysteinreichen Domänen von humanem Agouti und Agrp

1.4 Attractin und die *mahogany*-Mutation

Lane *et al.* beschrieben 1960 erstmals die beiden spontanen autosomal rezessiven Fellfarben-Mutationen *mahogany* (*mg*) und *mahoganoïd* (*md*) bei Mäusen (vgl. Tabelle 6-1 Seite 118) (Lane 1960; Lane *et al.*, 1960). Das Gen, das von *mg* betroffen ist, wurde vor einigen Jahren in ATRN umbenannt, die *mg*-Mutation entsprechend in *Atrn^{mg}*. Bei der *Atrn^{mg}*-Mutation führt eine retrovirale Insertion in Intron 26 von etwa 5 kb zu einer stark verringerten Expression des von ATRN kodierten Proteins Attractin (Gunn *et al.*, 1999). Zwei weitere Allele sind *Atrn^{mg-L}* (retrovirale Insertion von 5 kb in Intron 27) und *Atrn^{mg-3J}*. Eine Deletion von 5 bp nahe dem Ende von Exon 16 führt bei *Atrn^{mg-3J}* zu einer Verschiebung es offenen Leserahmens und zum Einfügen eines Stoppcodons. Infolge dieser schwersten Form der *mahogany*-Mutation sind Transkripte kaum mehr detektierbar (Nagle *et al.*, 1999). Die damit einhergehenden Verminderungen der Konzentration von Attractin (Atrn), einem Protein, das normalerweise weitverbreitet ist und z.B. in der Haut, Herz, Niere, Leber, Lunge, Muskel und in hohem Maß auch im zentralen Nervensystem exprimiert wird, hat weitreichende Konsequenzen (Duke-Cohan *et al.*, 1998; Nagle *et al.*, 1999; Gunn *et al.*, 1999).

So wird beispielsweise die Bildung von Eumelanin in den Haarfollikeln von *Atrn^{mg}*-Mäusen stark induziert, bzw. wird die Agouti induzierte Phäomelaninsynthese unterdrückt. Dies führt

zur Ausbildung einer sehr dunklen Fellfarbe (Abbildung 1-8). Darüber hinaus zeigen *mg*-Mutanten Hyperphagie und weisen dennoch eine Verringerung sowohl des Körpergewichts (10-15%) als auch des Körperfettgehaltes (20-40%) auf. Zusätzlich sind die motorische Aktivität und die basale Metabolismusrate der betroffenen Tiere erhöht (Dinulescu *et al.*, 1998; Gunn *et al.*, 2001). Eventuell ist dies der Grund, warum die stark erhöhte Nahrungsaufnahme nicht zu einer Körpergewichtszunahme führt. *Atrn^{mg}* ist ebenfalls mit einer Resistenz gegen die sogenannte Diät-induzierte Fettleibigkeit verbunden. Bei dieser Art der Diät erfolgt eine Zufuhr sehr fetthaltiger Nahrung (trotz gleichbleibender Kalorienzufuhr), bei der Wildtyp-Mäuse sehr schnell eine Übergewichtigkeit zeigen.

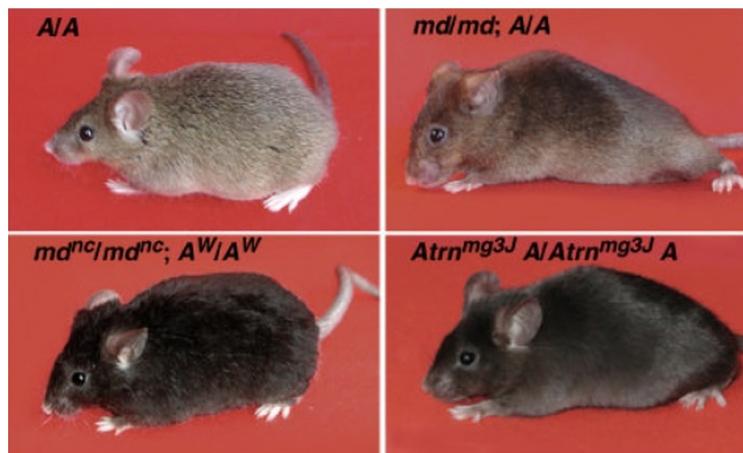


Abbildung 1-8: Vergleich der Fellfarbe einer Wildtyp-Maus (links oben) mit einem schwach ausgeprägten *mahoganoid*-Allel (*md*, oben rechts), einem stark ausgeprägten *mahoganoid*-Allel (*md^{nc}*, unten links) und einem stark ausgeprägten *mahogany*-Allel (*Atrn^{mg-3J}*, unten rechts) (He *et al.*, 2003b)

Eine sehr interessante Situation ergibt sich aus Kreuzungen zwischen *mg*- und *A^Y*- Mutanten. Durch *A^Y/Atrn^{mg}* (*Atrn^{mg} A^Y/Atrn^{mg} A*) Doppelmutanten schließt sich scheinbar der Kreis aus Melanocortinsystem, Agouti und Attractin, auch wenn der Mechanismus noch unklar ist. Die gelbe Fellfärbung und der Adipositas- und Diabetesphänotyp durch Überexpression von Agouti bei *A^Y*-Mäusen wird in nahezu allen Punkten durch den zusätzlichen Mangel an Attractin aufgehoben. Nur die den beiden Mutationen typische Hyperphagie bleibt erhalten. Hieraus entstand die Vermutung, dass Attractin direkt die Wirkung von Agouti moduliert, da andere Fettleibigkeits- oder Pigmentierungsphänotypen, wie sie durch *MCRI^e*, *tub*, *Cpe^{fat}*, *Lep^{r^{ob}}*, *Lep^{r^{db}}*, *MC4R^{-/-}* (vergl. Tabelle Seite 118) oder einer transgenen Überexpression von *Agrp* verursacht werden, von *Atrn^{mg}* nicht beeinflusst sind (Dinulescu *et al.*, 1998; Nagle *et al.*, 1999). Weiter gestützt ist diese Vermutung dadurch, dass eine niedrigaffine Bindung zwischen Attractin und Agouti nachgewiesen wurde (He *et al.*, 2001).

Die Unterdrückung der Wirkung der *A^Y*-induzierten Agouti-Überexpression durch die *Atrn^{mg}*-Mutation schließt auch die oben beschriebenen peripheren Wirkungen von Agouti ein. Dies

könnte für die Fettleibigkeit und das metabolische Syndrom beim Menschen von besonderer Bedeutung sein, da Attractin ein weit verbreitetes Protein ist und die Agouti-Expression beim Menschen nicht auf die Haut beschränkt, sondern, wie bereits beschrieben, speziell im Pankreas und im Fettgewebe an der Regulation von Insulin und Leptin beteiligt ist.

Das Erkennen weiterer phänotypischer Merkmale der *mg*-Mutation (Maus), wie z.B. ein Körpertremor und dessen vermutliche Ursache, bedurften der vorherigen Entdeckung von Funktionsverlust-Mutationen von Attractin in anderen Spezies. Sogenannte *zitter*- (*zi*)-Ratten bilden ab einem Alter von etwa 15 Tagen einen spontanen Körpertremor und eine mit zunehmendem Alter fortschreitende Parese speziell der hinteren Gliedmaßen aus (Rehm *et al.*, 1982). Im zentralen Nervensystem breitet sich stetig eine Abnahme der Dichte der Myelinfibrillen, der Anzahl der Myelinlamellen, eine Verformung der Myelinscheiden und eine Synapsen-Degradation aus. Diese Hypomyelinisierung ist begleitet von einer Vakuolenbildung. Vakuolen finden sich in Myelinscheiden und Zellkörpern. Allgemein kann von einer spongiformen Neurodegeneration oder Enzephalopathie gesprochen werden (Gomi *et al.*, 1990; Kuramoto *et al.*, 1998; Kuramoto *et al.*, 2001).

Erst ein im Januar 2001 veröffentlichter Bericht zeigte, dass eine Deletion von 8 bp in der *splice donor site* von Intron 12 des Ratten-Attractingens zu einem instabilen Transkript und einer verringerten Expression von Attractin bei *zi*-Ratten führt (Kuramoto *et al.*, 2001). *Zitter* stellt eine autosomal rezessive Mutation des Attractin-Gens in dieser Spezies dar. Sie ist auch mit der typischen *mahogany*-Fellfärbung und allen anderen phänotypischen Merkmalen der *Atrn^{mg}*-Mutation verbunden. In derselben Veröffentlichung wurden auch Untersuchungen zur Überprüfung dieser neuen Erkenntnisse an *Atrn^{mg-3J}*-Mäusen beschrieben, die sowohl die spongiforme Neurodegeneration als auch einen Tremor als Folge der *Atrn^{mg}*-Mutation bei Mäusen offenbarte. Diese neuropathologischen Befunde wurden im Juli und August 2001 von zwei weiteren Berichten bestätigt (Gunn *et al.*, 2001; Bronson *et al.*, 2001).

In einer weiteren Studie wurde die zeitliche Regulation von Gen-Clustern nach SCI (*spinal cord injury*, Rückenmarksverletzung) untersucht, die in Verbindung mit der Neuritogenese, der axonalen Plastizität und der Myelinogenese stehen. Ein dafür bekanntes Gen, Neuritin, wurde als Referenz verwendet. Mit diesem wurden im gleichen Expressionsmuster die Transkripte *microtubule-associated protein 1a* (Map1a), *myelin oligodendrocyte protein* (MOG) und Attractin reguliert. Durch Überexpressionsexperimente wurde anschließend gezeigt, dass aus einer Coexpression von Neuritin, Attractin, Map1a und MOG in DRG-Neuronen (Hinterwurzelganglienzellen) eine erhebliche Steigerung des Neuritenwachstums resultiert (Di Giovanni *et al.*, 2005).

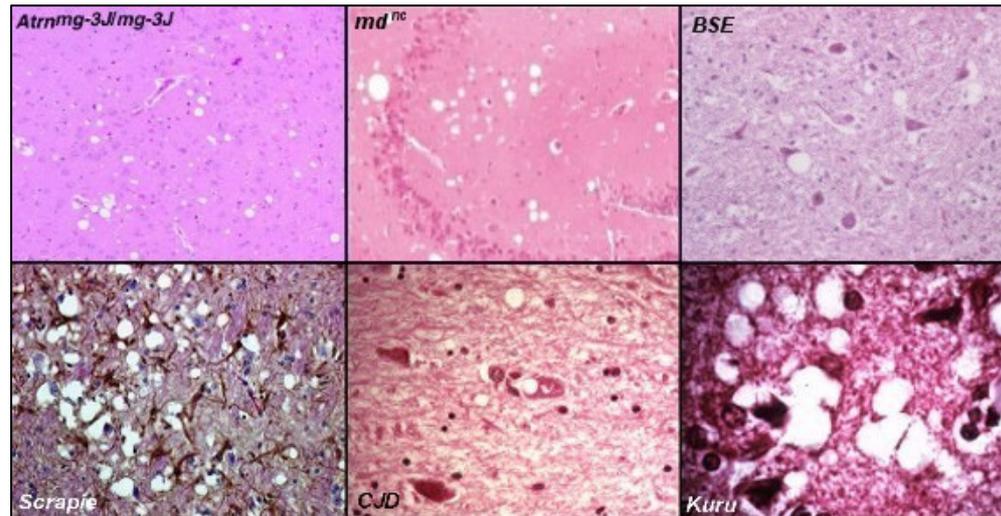


Abbildung 1-9: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Vakuolenbildung im zentralen Nervensystem; von links nach rechts, oben: *Mahogany*, *Atrn^{mg-3J}*-Allel mit besonders stark ausgeprägtem Phänotyp; *Mahoganoide md^{nc}*; BSE (Rind); unten: *Scrapie* (Schaf); Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJD, Mensch); Kuru-Kuru (Mensch, Prioneninfektion mit fortschreitender Degeneration, kuru=papuan.: Zittern)

Die andere von Lane *et al.* beschriebene autosomal rezessive Fellfarbenmutation *Mgrn1^{md}* betrifft das für das *mahogunin*-Protein (Mgrn1) kodierende *mahoganoide*-Gen. Sie wird durch eine retrovirale Insertion von 5 kb zwischen Exon 11 und 12 verursacht und hat eine 10-20 fach verringerte Expression von Mgrn1 zur Folge (Phan *et al.*, 2002). Darüber hinaus sind noch weitere *md*-Allele bekannt. Die sehr ähnliche Benennung von *mahogany* (*mg*) und *mahoganoide* (*md*) liegt in dem fast identischen Phänotyp begründet, den diese beiden Mutationen hervorrufen. Wie *Atrn^{mg}* verursacht auch *Mgrn1^{md}* eine starke Eumelaninbildung und eine Unterdrückung des Phänotyps von *A^Y*-Mäusen. Eine neurologische Degeneration wie sie von *Atrn^{mg}*-Mutanten bekannt ist, konnte in diesen Mäusen bis zum Alter von 5 Monaten zwar nicht festgestellt werden (Phan *et al.*, 2002), aber in einer Studie von He *et al.* (He *et al.*, 2003b) wurde gezeigt, dass ein anderes *mahoganoide* Allel (*md^{nc}*, auch bekannt als *nonagouti curly*) eine von *Atrn^{mg}* kaum zu unterscheidende spongiforme Neurodegeneration verursacht. Sie betrifft die gleichen Neuronen in den gleichen Hirnregionen. In Abbildung 1-9 (oben, Mitte) ist diese im Alter von 13 Monaten bereits fortgeschrittene neuronale Degeneration (Hippocampusregion) abgebildet.

Das aus 494 Aminosäuren bestehende Mgrn1-Protein ist eine Ubiquitin E3 Ligase. Es enthält eine evolutionär konservierte *RING finger*-Domäne (C3HC4), die für eine ganze Reihe dieser Proteine charakteristisch ist (He *et al.*, 2003b). Attractin und Mgrn1 zeigen ein sehr ähnliches Expressionsmuster. Beide Mutationen (*mg* bzw. *md*) beeinflussen die Expression des jeweils anderen Proteins (Attractin bzw. Mgrn1) nicht. He *et al.* fanden heraus, dass Mgrn1 genetisch

downstream von der Atrn-Wirkung liegt und leiteten ein mögliches Modell für die Funktion ab. Demnach aktiviert Attractin die durch Mgrn1 katalysierte Ubiquitinierung eines bisher nicht identifizierten Substrates, welches anschließend zytosolisch durch das Proteasom abgebaut wird. Ein Funktionsverlust von Attractin oder Mgrn1 würde zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration dieses unbekanntes Substrates führen.

Der durch *mahoganoid*, *mahogany* (oder andere Funktionsverlust-Mutation von Attractin) hervorgerufene neurodegenerative Phänotyp ist sehr ähnlich dem anderer spongiformer Enzephalopatienten wie BSE beim Rind, Scrapie beim Schaf, Creutzfeld-Jakob-Krankheit oder Kuru-Kuru beim Menschen (siehe Abbildung 1-9). Die Akkumulation proteaseresistenter Prionen-Proteine wurde anders als bei diesen Prionenerkrankungen nicht gefunden. In *zitter*-Ratten ist eine normale Proteasesensitivität der Prionen-Proteine belegt (Gomi *et al.*, 1994a).

Die durch Attractin-Mangel verursachten Degenerationen teilen aber auch Merkmale wie Tremor, Defekten im Proteinmetabolismus und dem Ubiquitin-Signalweg mit anderen bekannten neurodegenerativen Erkrankungen wie Huntington oder Parkinson. Ubiquitinierungsdefekte wurden aber nicht im Zusammenhang mit spongiformen Enzephalopatienten beschrieben. Allerdings ist auch Parkin, dessen Mutationen autosomal-rezessiven M. Parkinson mit frühem Krankheitsbeginn verursachen, eine E3 Ubiquitin-Ligase.

Attractin, ein Protein dessen Funktionsverlust spongiforme Neurodegeneration, Tremor und Lähmungen auslöst, die A^Y -Mutation aufhebt, Zusammenhänge zwischen Pigmentierung, Immunsystem, Metabolismus und Erhaltung der neuronalen Architektur offenbart, wurde erst vor ca. 10 Jahren entdeckt. Zu diesem Zeitpunkt, war das für dieses Protein kodierende Gen noch nicht identifiziert. Die erste Klonierung und die vollständige Erfassung der Aminosäuresequenz erfolgte 1998 (Duke-Cohan *et al.*, 1998). Der Zusammenhang zu *mahogany* wurde durch die Identifizierung des murinen *mahogany*-Gens 1999 offenkundig, da Attractin zu 93% identisch zur Ectodomäne des von diesem Gen kodierten Proteins ist (Nagle *et al.*, 1999; Gunn *et al.*, 1999). Eine ganze Reihe zum Teil dramatischer Folgen von Funktionsverlustmutationen von Attractin wurde publiziert. Die zugrundeliegenden Mechanismen allerdings sind unklar, da eine Funktion von Attractin nicht bekannt ist – mit einer Ausnahme: Attractin wurde eine DP4-ähnliche Proteaseaktivität zugeschrieben.

1.5 Prolylpeptidasen und die DASH-Protein-Familie

Duke-Cohan *et al.* isolierten Attractin 1995 als zirkulierendes Protein aus humanem Blutserum. Aufgrund der enzymatischen Aktivität beschrieben sie dieses Protein als „eine neue Form der Dipeptidylpeptidase 4“ („DPPT-L“; Duke-Cohan *et al.*, 1995). Zwar wurde bereits

vorher über lösliche Formen der DP4 im Serum berichtet, dies wurde allerdings lediglich anhand der Aktivität in diesem Medium definiert, aber nicht durch eine Präparation belegt.

In der sogenannten DASH-Familie fassten Sedo und Malik Proteine, die eine Ähnlichkeit in der Aktivität oder der Struktur zur DP4 aufweisen, in einer Gruppe zusammen (DASH = "DPP4 activity- and/or structure-homologues") (Sedo & Malik, 2001). Der bekannteste und am besten untersuchte Vertreter gab dieser Gruppe den Namen. Im Folgenden sollen die Mitglieder der Gruppe, die eine DP4-(ähnliche) Aktivität aufweisen, kurz beschrieben werden.

1.5.1 Dipeptidylpeptidase 4

Die Dipeptidylpeptidase 4 (DP4, CD26, EC 3.4.14.5) ist eine prolinspezifische Exopeptidase, die 1966 erstmals von Hopsu-Havu und Glenner beschrieben wurde (Hopsu-Havu *et al.*, 1966). Jede Untereinheit des homodimeren Typ II-Transmembranproteins besteht aus 766 extrazellulären, 22 transmembranen und 6 zytoplasmatischen Aminosäuren. Sie besitzen je 9 N-Glykosylierungen, 5 Disulfidbrücken und haben ein Molekulargewicht von je 105 bis 110 kDa.

DP4 katalysiert die Abspaltung von Dipeptiden vom N-Terminus eines Oligo- oder Polypeptides, wenn sich in P₁-Position¹ ein Prolyl- oder Alanylrest befindet. Mit abnehmender Effizienz akzeptiert die Serinprotease auch Substrate mit Serin, Valin, Glycin, Leucin oder Threonin an vorletzter Stelle (Bongers *et al.*, 1992). In P₂-Position können alle proteinogenen Aminosäuren stehen. Substrate mit Prolin oder Hydroxyprolin an P₁'-Position werden nicht hydrolysiert. Eine freie protonierte Aminogruppe am N-Terminus des Peptides ist Voraussetzung für die Substraterkennung durch DP4 (Demuth & Heins, 1995).

Durch die katalysierte limitierte Proteolyse ist die DP4 ein wichtiger Modulator der Aktivität einer ganzen Reihe von Polypeptiden. So beeinflusst das Enzym z.B. die biologische Wirkung von Peptidhormonen (z.B. GIP und GLP-1), Chemokinen (z.B. RANTES) und Neuropeptiden (z.B. NPY) (Mentlein 1999). In Säugetieren wurde das Enzym in verschiedenen Geweben, wie Niere und Placenta gefunden (Akrawi *et al.*, 1976; Puschel *et al.*, 1982). Es wurde als Leukocytenantigen CD26 identifiziert und ist auf T-Zellen sowie aktivierten B- und *Natural-killer*-Zellen lokalisiert (DeMeester *et al.*, 1999).

Eine besondere Eigenschaft von DP4 spiegelt sich in dem alternativen Namen des Enzyms, Adenosindeaminase bindendes Protein (*ADAbp*) wider.

¹ Die Bezeichnung der Aminosäuren um die hydrolysierte Peptidbindung folgt der Nomenklatur nach Schlechter & Berger (1967). Demnach werden die Aminosäuren in N-terminaler Richtung der hydrolysierten Bindung mit P₁, P₂, P₃, ..., P_n bezeichnet, während die Aminosäuren in C-terminaler Richtung mit P₁['], P₂['], P₃['], ..., P_n['] beschrieben werden.

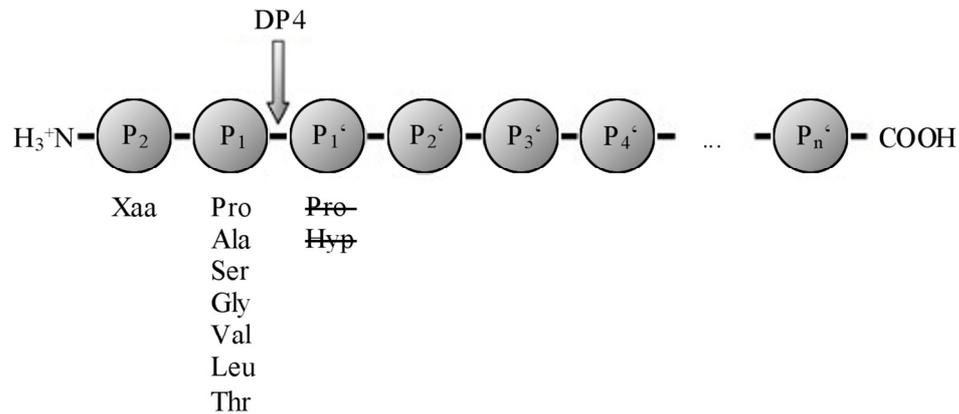


Abbildung 1-10: Schematische Darstellung der Substratspezifität der DP4; Das Enzym katalysiert die Hydrolyse N-terminaler Dipeptide bevorzugt mit Prolin in P_1 -Position. Substrate mit Prolin oder Hydroxyprolin in P_1' -Position werden nicht akzeptiert.

Lange Zeit wurde die Fähigkeit, die Abspaltung N-terminaler Dipeptide mit Prolin in P_1 -Position zu katalysieren, für eine exklusive Eigenschaft der DP4 gehalten. Später wurde allerdings eine immer größer werdende Zahl an Enzymen entdeckt, die ebenfalls diese Fähigkeit besitzen. Da es sich in vielen Fällen lediglich um eine Überschneidung der Substratspezifität handelt, wird gemeinhin von einer "DP4-ähnlichen" Aktivität gesprochen.

1.5.2 Attractin

In der bisher einzigen Veröffentlichung einer Reinigung von Attractin beschreiben Duke-Cohan *et al.* den Versuch, die lösliche Form der DP4 aus humanem Serum zu isolieren (Duke-Cohan *et al.*, 1995). Alternativ gespleißte lösliche Isoformen der DP4 existieren nicht und wie es zu einer Freisetzung der Membranform kommt, ist bis heute spekulativ.

Die von Duke-Cohan *et al.* entdeckte Serinprotease (zunächst als DPPT-L bezeichnet) im humanen Serum besitzt sehr ähnliche Substrat- und Inhibitorspezifität im Vergleich zu DP4. Alle getesteten monoklonalen Antikörper gegen insgesamt 5 Epitope der DP4 binden mit etwas geringerer Affinität auch an dieses monomere, stark glykosylierte Protein mit einem Molekulargewicht von 175 kDa. Später wurde gezeigt, dass die lösliche Form des Enzyms bei der Formierung immunregulatorischer Zellcluster zwischen Monozyten und T-Zellen durch direkte Vermittlung einer Interaktion oder durch Induktion der Freisetzung bzw. Regulation der Konzentration chemotaktischer Zytokine hilft. Hierin liegt auch die Bezeichnung „Attractin“ begründet (Duke-Cohan *et al.*, 1998).

Im Gegensatz zu DP4 bindet Attractin kein ADA. Die Bestimmung der Primärstruktur ergab einen weiteren wesentlichen Unterschied. Es besteht keine Sequenzhomologie zwischen beiden Proteinen. Attractin weist aber zum Teil übereinstimmende Sequenzen zum aktiven Zentrum anderer Serinproteasen, wie Prolylendopeptidase (PEP) oder Trypsin auf (Duke-Cohan *et al.*, 1998). Darüber hinaus ist die Primärstruktur von Attractin bis zu

D. melanogaster und *C. elegans* konserviert, so dass die Multidomänenstruktur des Proteins erhalten blieb (Abbildung 1-11).

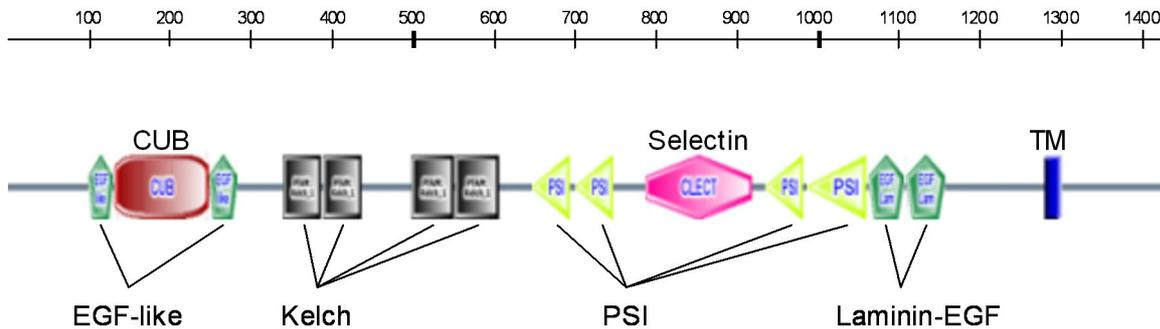


Abbildung 1-11: Domänenstruktur des humanen Attractin; Der Attractin-Precursor (Isoform 1) ist ein Typ I Transmembranprotein. Neben 26 potentiellen Glykosylierungsstellen umfasst das Protein 13 Disulfidbrücken und eine Multidomänenstruktur. Abkürzungen: **EGF**: epidermal growth factor; **CUB**: complement subcomponents C1r/C1s, **Uegf** and **bone** morphogenic protein-1; **PSI**: Plexin/Semaphorin/Integrin-Domäne; **TM**: Transmembrandomäne; Skala: Anzahl der Aminosäuren

Das humane ATRN-Gen enthält 30 Exons, die für 1429 Aminosäuren des unprozessierten membranständigen Precursors Atrn1 (Isoform 1 des humanen Attractin) codieren. Dieser ist unterteilt in eine extrazelluläre (1279 AA), eine transmembrane (21 AA) und eine zytoplasmatische Domäne (129 AA). Letztere ist der am stärksten konservierte Teil des Proteins, der bei Säugern absolut identisch ist. Attractin besitzt potentiell 26 N-Glykosylierungen und 13 Disulfidbrücken. Das Serin 26 im N-terminalen Teil von Attractin wurde von Duke-Cohan *et al.* aufgrund der oben genannten Ähnlichkeit mit dem aktiven Zentrum anderer Serinproteasen als aktives Serin postuliert. Neben dem Precursor sind noch vier andere Isoformen möglich (Abbildung 1-12), die durch alternatives Spleißen entstehen (Tang *et al.*, 2000). An dieser Stelle soll bemerkt werden, dass die Isoformen 4 und 5 nicht durch experimentelle Daten gestützt sind (Datenbank „swiss prot“).

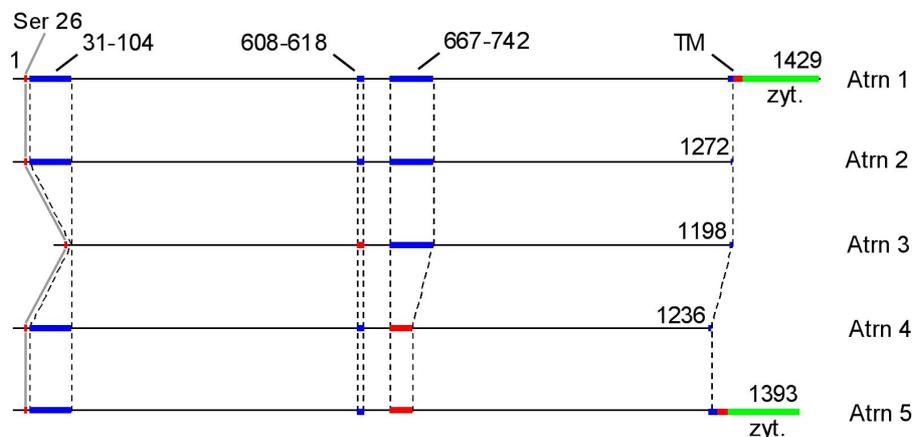


Abbildung 1-12: Spleißformen des humanen Attractin; Abkürzungen: **Ser 26**: potentielles aktives Serin an Position 26; **TM**: Transmembrandomäne, **zyt.** (grün): zytoplasmatischer Teil der membranständigen Isoformen 1 und 5; Variationen zum Precursor sind farbig hervorgehoben

Attractin ist ein weit verbreitetes Protein, das z.B. in Pankreas, Lunge, Dickdarm, Niere, Leber, Haut, Herz, Lunge und im ZNS exprimiert wird. Auf ruhenden T-Zellen kommt das Protein nur spärlich vor, nach Aktivierung der Zellen wird die Expression aber sehr stark gesteigert und erreicht nach 48-72 h ein Maximum. Lösliches Attractin ist wahrscheinlich in intrazellulären Vesikeln gelagert, die nach Aktivierung der T-Zellen ihren Inhalt ins Serum freisetzen (Duke-Cohan *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 2000). Im ZNS ist die Konzentration von Attractin sehr hoch. Das Protein wird in vielen Arealen gebildet und spielt zusätzlich zum Einfluss auf die Energiehomöostase, aufgrund hoher Konzentrationen in Gebieten des limbischen Systems und des Hippocampus, scheinbar eine Rolle im komplexen Verhalten einschließlich dem Lernen, dem Gedächtnis und der Regulation von Angst, Aggression und Stress (Lu *et al.*, 1999). Die Expression löslichen Attractins konnte im ZNS nicht nachgewiesen werden. Durch Zugabe dieser Form zu kultivierten Neuronen, die Membran-Attractin auf der Oberfläche exprimieren, wird die Neuritenformation dieser Zellen zerstört. (Tang *et al.*, 2002).

Die von der Bostoner Arbeitsgruppe um J. S. Duke-Cohan verfassten Berichte sowohl zu gereinigtem natürlichem als auch rekombinantem Attractin enthalten die einzigen Hinweise zum Protein selbst. Sie erarbeiteten mit dem Nachweis der Dipeptidylpeptidase-Aktivität ähnlich zu DP4 einen der wenigen belegten Anhaltspunkte zur Funktionalität von Attractin. Eine Funktion die später von immer mehr Arbeitsgruppen aufgegriffen wurde.

1.5.3 Andere DP4 verwandte Proteine

Eine weitere prolinspezifische Dipeptidylpeptidase ist **DP2** (EC 3.4.14.2) (DP7, *Quiescent cell proline dipeptidase*, QPP (Chiravuri *et al.*, 1999)). Das Enzym hat ein monomeres Molekulargewicht von 58-60 kDa, ist N-glykosyliert und besitzt Disulfidbrücken. Sowohl Fukasawa *et al.* als auch Araki *et al.* deuteten 2001 nach Klonierung bzw. Reinigung der DP2 aus Rattenniere an, dass DP2 und DP7 identisch sein könnten. Dieser Verdacht wurde 2003 durch Leiting *et al.* durch vergleichende Analysen von humaner rekombinanter DP4, humaner rekombinanter DP7 und humaner gereinigter DP2 weiter erhärtet. Inzwischen werden DP2, DP7 und QPP einheitlich als DP2 bezeichnet. DP2 wurde erstmals in den Jahren 1966 bzw. 1968 in Extrakten der Rinderhypophyse beschrieben (McDonald *et al.*, 1966; McDonald *et al.*, 1968). Ein wesentlicher Unterschied zu DP4 besteht im pH-Profil des Substratumsatzes. Während DP2 ein saures pH-Optimum zwischen pH 5,5 und pH 6,0 aufweist, liegt dieses für DP4 im leicht basischen Bereich zwischen pH 8,0 und pH 8,5 (Leiting *et al.*, 2003). Für Routineuntersuchungen werden bei leicht saurem pH chromo- oder

fluorogene Lys-Ala-Substrate zur Detektion der DP2 eingesetzt. Das Protein bildet im nativen Zustand ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von 120 kDa. Die Dimerisierung scheint für die enzymatische Aktivität erforderlich zu sein. DP2 ist sowohl lysosomal als auch in nicht lysosomalen Vesikeln lokalisiert und kann auch sezerniert werden. So wurde das Protein aus Seminalplasma gereinigt. (Chiravuri *et al.*, 2000; Maes *et al.*, 2005).

Ein weiterer Vertreter der Familie ist **Fibroblast activation protein α** (FAP α oder Seprase). FAP α wird transient in normalen fetalen mesenchymalen Geweben exprimiert. Dagegen sind normale adulte Zellen FAP α -negativ. Das Enzym gilt aber als Tumormarker, da es im Stroma vieler Typen von Krebs zu finden ist.

Die Primärstruktur dieses Typ II Transmembranproteins ist zu 52% identisch zu DP4. Berichten zufolge existieren auch höher molekulare Komplexe von FAP α sowie Heterodimere mit DP4 (Rettig *et al.*, 1994; Scanlan *et al.*, 1994; Ghersi *et al.*, 2002). FAP α unterscheidet sich sowohl im Expressionsmuster als auch in der Substrat- und Inhibitorspezifität von DP4. So besitzt das Enzym neben der DP4-ähnlichen Aktivität eine Kollagen Typ-I spezifische Gelatinaseaktivität (Rettig *et al.*, 1994; Levy *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999b; Sun *et al.*, 2002). Wie bei DP4 und DP2 ist die Aktivität abhängig von der Dimerisierung (Scanlan *et al.*, 1994). Als Homodimer wurde FAP α auch aus humanem und Rinderserum gereinigt (Collins *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004).

Dipeptidylpeptidase 4- β (DP4- β) ist eine 1996 von Jacotot *et al.* erstmals beschriebene, glykosylierte monomere Serinprotease, mit einem Molekulargewicht von 82 kDa. Die Substrat- und Inhibitorspezifität dieses Enzyms ist im Vergleich zu DP4 annähernd identisch. Es besteht jedoch noch ein wesentlicher Unterschied zwischen DP4- β und DP4. Die ADA-Bindung ist eine spezifische Eigenschaft der DP4 (Jacotot *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1998). Seit dieser zuletzt zitierten Veröffentlichung wurde das Protein allerdings nicht mehr beschrieben. Bisher sind keine Sequenzdaten für DP4- β bekannt.

Mit **DP8** und **DP9** wurden im Jahr 2000 die bisher letzten DP4-ähnlichen Proteine identifiziert. Beides sind lösliche, monomere, ubiquitär exprimierte Proteine, die im Zytoplasma lokalisiert sind. Sie besitzen eine DP4-ähnliche Aktivität, allerdings sind natürliche Substrate noch nicht bekannt (Abbott *et al.*, 2000; Ajami *et al.*, 2004).

Die Aminosäuresequenz von DP8 ist zu 26% identisch zu DP4. Das Enzym ist nicht glykosyliert und hat ein Molekulargewicht von 100 kDa (Abbott *et al.*, 2000; Ajami *et al.*, 2004). DP9 ist der DP8 sehr ähnlich, aber im Gegensatz zu DP8 aber an zwei Stellen potentiell N-glykosyliert. Es existieren 2 Formen der DP9 mit „offenen Leserahmen“ von 2589 bp bzw. 2913 bp. Das Molekulargewicht liegt entsprechend bei etwa 95 und 110 kDa,

wobei die längere Form eine Spleißvariante darstellt (Abbott *et al.*, 2000; Ajami *et al.*, 2004). Ein Beweis für eine Sezernierung der Proteine existiert bisher nicht.

Die **NAALADase** (N-acetylated- α -linked acidic dipeptidase I, GCP II) ist eine Metalloprotease, die auch als Prostataspezifisches Membranantigen (PSMA) bekannt ist. Das Typ-II Transmembranprotein spaltet Glutamat vom Neuropeptid NAAG (N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamat) im synaptischen Spalt (Robinson *et al.*, 1987). Zu DP4 besteht keine Sequenzhomologie, dennoch wurde über eine DP4-ähnliche Aktivität von NAALADase berichtet (Shneider *et al.*, 1997). Dies wurde für 3 verschiedene Formen der NAALADase (L, I und II) durch Pangalos *et al.* später bestätigt, die eine Steigerung des Umsatzes des DP4-Substrates Gly-Pro-AMC in Homogenaten NAALADase-transfizierter COS-Zellen beobachteten (Pangalos *et al.*, 1999). Barinka *et al.* zeigten aber, dass das homogen gereinigte Enzym nicht zu einer Dipeptidylpeptidase 4-ähnlichen Spaltung von Substraten in der Lage ist (Barinka *et al.*, 2002).

Zu den DP4-ähnlichen Proteinen zählen auch **DP6 und DP10**. Sie sind strukturell eng mit DP4 verwandt, besitzen aber keine enzymatische Aktivität. Der Grund dafür ist der Austausch des aktiven Serins (bei DP4 an Position 630) gegen Glycin bei DP10 (Position 651) bzw. Aspartat bei DP6 (Position 712).

1.6 Aufgabenstellung

Die vorangegangenen Abschnitte sollten die Wirkungen von Funktionsverlustmutationen von Attractin verdeutlichen. Ein Verlust des Proteins (der bisher nur bei Nagern bekannt ist) geht mit immunologischen und neurologischen Veränderungen einher. Zudem sind Pigmentierung und Energiehomöostase der Tiere stark beeinflusst. Im Zusammenhang mit diesen vielfältigen Effekten werden für Attractin sowohl vom Melanocortinsystem abhängige als auch unabhängige Funktionen diskutiert. Zweifellos spielt Attractin essentielle Rollen. Es handelt sich bei *mahogany*- und verwandten Mutationen um den Funktionsverlust eines Proteins, dessen molekulare Funktion man ironischerweise nicht kennt. Der einzige fortgeschrittene Ansatz zur Funktionsaufklärung von Attractin ist eine Peptidaseaktivität mit Ähnlichkeit zur DP4. Diese Aktivität wurde sowohl durch Isolierung von nativem Attractin als auch durch Herstellung rekombinanten Attractins belegt, so dass verschiedene Autoren von dieser Aktivität ausgehen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte humanes lösliches Attractin aus Plasma isoliert werden. Ziel war es, eine Prozedur zu entwickeln, die es ermöglicht, Attractin reproduzierbar und in ausreichender Menge zur Verfügung zu stellen. Nach Präparation nativen, humanen Attractins sollten die biochemischen Eigenschaften, speziell aber die DP4-ähnliche Aktivität des Enzyms untersucht werden. Differenzierende biochemische und enzymologische Parameter zu DP4-ähnlichen Enzymen sollten erarbeitet werden. Durch rekombinante Expression verschiedener alternativ gespleißter Isoformen von Attractin sollte die enzymatischen Eigenschaften bestätigt und im Detail untersucht werden. Es galt weiterhin die Frage zu beantworten, ob und wie eine durch Attractin katalysierte limitierte Proteolyse die Folgen von Funktionsverlustmutationen von Attractin erklären kann.

Attractin wird als Enzym (DASH) beschrieben, kann aber aufgrund seiner Multidomänenstruktur auch als Rezeptor, Corezeptor oder Adhäsionsmolekül diskutiert werden. Die Struktur und speziell der zytosolische Teil, sind hoch konserviert. Wechselwirkungspartner sind bisher, abgesehen von einer niedrigen Affinität zwischen dem extrazellulären Teil von Attractin und Agouti, nicht bekannt. Mit Hilfe einer 2-Hybrid-Interaktionsselektion sollten potentielle interagierende Partner des zytosolischen Rests von Attractin identifiziert werden. *In-vitro*-Assays sollten Aufschluss darüber geben, ob diese Interaktionen mit Hilfe rekombinant hergestellter Proteine nachzuvollziehen sind.

Wie beschrieben, ergeben sich durch Attractin-Mutationen immense, teils katastrophale Auswirkungen auf den Gesamtorganismus. Durch die Etablierung eines zellbasierenden funktionalen Assays sollte die Voraussetzung geschaffen werden, Wirkungen der Attractin-Peptidaseaktivität, intra-/extrazellulären Proteinwechselwirkung, Rezeptoraktivität und Attractin-Mutation bzw. –Funktionsverlust zu untersuchen.

2 Methoden

2.1 Analytische biochemische Methoden

2.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Methode der Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Änderung der Absorption von Coomassie-Brillantblau bei 595 nm in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (Bradford 1976).

Hierzu wurden 25 µl Probe (wässrig) mit 750 µl Bradfordreagenz (Sigma, Taufkirchen) gemischt, 10 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Absorption am Spektralphotometer U2000 (Hitachi, Darmstadt) gegen einen Leerwert gemessen. Die Proteinkonzentrationen wurden anhand einer Standardgeraden berechnet, die mit bekannten Konzentrationen von Rinderserumalbumin zwischen 25 und 1000 µg/ml aufgenommen wurde.

2.1.2 Analytische elektrophoretische Methoden

Diskontinuierliche SDS-PAGE

Zur Reinheitskontrolle der Proteinchargen sowie zur Abschätzung des Molekulargewichts wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Die Proteinauftrennung erfolgte dabei modifiziert nach Laemmli (Laemmli 1970). Die Proben wurden mit Probenpuffer (S. 126) gemischt, 7 min gekocht und bei konstant 200 V und einer auf 64 mA begrenzten Stromstärke in SDS-Polyacrylamidgelen (verschiedener Konzentration) aufgetrennt. Die analytische PAGE wurde am Vertikalelektrophoresesystem Mini Protean II (BioRad) durchgeführt (Elektrodenpuffer s. S. 126). Die verwendeten Proteinstandards sind in den entsprechenden Abbildungen im Ergebnisteil gekennzeichnet.

Diskontinuierliche PAGE unter nativen Bedingungen

Im Gegensatz zur SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen wurden bei der nativen Gelelektrophorese Bedingungen gewählt, die es gewährleisten, die native Struktur der Proteine zu erhalten. Dies ermöglicht unter anderem den Nachweis der enzymatischen Aktivität von Proteinen. Die native PAGE wurde analog zur oben beschriebenen SDS-PAGE durchgeführt, allerdings wurde sowohl auf den Einsatz von SDS und reduzierenden Agentien als auch auf Hitzedenaturierung der Proben verzichtet.

Analytische IEF

Zur Bestimmung von isoelektrischen Punkten (pI) von Proteinen wurden mittels Ampholyten in Agarosegelen kontinuierliche pH-Gradienten erzeugt. Nach dem Lösen von 0,8% (w/v) Agarose (Pharmacia, Freiburg) und 10% (w/v) Sorbitol (Sigma, Taufkirchen) bei 70°C in Aqua tridest, wurden bei 65°C 4% (w/v) Ampholyten (Serva, Heidelberg) des gewählten pH-Bereiches hinzugegeben. Die Ausbildung der Gelstruktur erfolgte auf einem Polyesterfilm (GelBond, Pharmacia, Freiburg) bei Abkühlung auf Raumtemperatur. Die 0,5 mm dicken Agarosegele wurden bei 4°C über Nacht gelagert.

Die Fokussierung erfolgte auf einer Flachbettapparatur (Multiphor II, Pharmacia), auf deren Kühlplatte zur effizienten Temperaturverteilung ein dünner Kerosinfilmm (Serva, Heidelberg) luftblasenfrei aufgetragen und das Gel folienseitig aufgelegt wurde. Das elektrische Feld wurde mittels Power Pac 3000 (BioRad, München) erzeugt und über in Elektrodenpuffer getränkte Papierelektroden (Anode: 0,05 M H₂SO₄, Kathode: 0,25 M NaOH) angelegt. Die Kühlplatte wurde mit einem Thermostat (Fa. Julabo) auf 5°C temperiert. Die Fokussierung erfolgte in folgenden Schritten:

1. Präfokussierung zur Ausbildung des pH-Gradienten
 - für 30 min bei 1400 V (konstant), 30 mA (begrenzt) und 8 W (begrenzt)
2. Auftragen der Proben und Standardproteine
 - etwa in der Mitte des Gels, senkrecht zum pH-Gradienten
3. Fokussierung in zwei Schritten:
 - für 60 min bei 1400 V (konstant), 35 mA (begrenzt) und 8 W (begrenzt)
 - für 30 min bei 2000 V (konstant), 30 mA (begrenzt) und 35 W (begrenzt)

2.1.3 Proteinfärbung nach analytischen elektrophoretischen Methoden

Färbung von Proteingelen mittels Coomassie Brilliantblau

Die Polyacrylamidgele wurden nach der Elektrophorese für 15 min unter Schütteln in einer Färbelösung (Anhang S. 126) inkubiert und anschließend der Hintergrund in 10% Essigsäure entfärbt.

Silberfärbung von Proteingelen

Bei der Silberfärbung nach Blum *et al.* (Blum *et al.*, 1987) wurde das Elektrophoresegel zunächst 1 h lang in einer Lösung aus 50% (v/v) Methanol, 12% (v/v) Essigsäure und 0,05% (v/v) von 37%igem (v/v) Formaldehyd fixiert, danach 3× 20 min in 50% (v/v) Ethanol

gewaschen und 1 min mit einer 500-fachen Verdünnung der Stammlösung 1¹ vorbehandelt. Nach dreimaligem Spülen des Geles für je 20 s mit *Aqua tridest* wurde es 20 min mit einer Lösung von 0,1 g AgNO₃ und 70 µl Formaldehyd in 100 ml H₂O imprägniert. Nach Wiederholung des Spülschrittes wurde das Gel für maximal 10 min in einer Lösung aus 3 g Na₂CO₃, 50 µl Formaldehyd und 4 µl von Stammlösung 1 in 100 ml H₂O entwickelt. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Behandlung des Geles für mindestens 5 min mit einer 0,1 M EDTA-Lösung.

Außer der Fixier-, Wasch- und Stopplösung wurden die Lösungen stets frisch hergestellt.

Proteinfärbung nach analytischer IEF mittels Coomassie Blue

Um die bei der IEF getrennten Proteine zu detektieren, wurde das Agarosegel zunächst für 30 min in 20% (w/v) Trichloressigsäure fixiert und anschließend zweimal 15 min mit je 200 ml einer Waschlösung aus 10% (v/v) Essigsäure und 25% (v/v) Methanol gewaschen. Nach Trocknung des Gels wurden die Proteine für 10 min mit 0,5% (w/v) Coomassie Blue in 10% (v/v) Essigsäure und 25% (v/v) Methanol angefärbt. Mit der Waschlösung erfolgte die Entfärbung des Hintergrundes. Die anschließend erneut getrockneten Gele sind über mehrere Monate haltbar.

2.1.4 Elektroblot und Kapillarblotting

Elektroblot nach PAGE

Die Übertragung von Proteinen nach der Gelelektrophorese aus dem Polyacrylamidgel auf eine andere Trägeroberfläche wie Nitrocellulose oder PVDF-Membranen erfolgte anhand eines diskontinuierlichen Puffersystems nach Kyhse-Andersen (1984) unter Verwendung einer *semi-dry*-Blottapparatur (BioRad, München). Nach Zuschneiden der verschiedenen Lagen auf Gelgröße und Equilibrieren im jeweiligen Lösungsmittel wurde der horizontale Blot aufgebaut:

1. 4× Filterpapier (Schleicher & Schuell) in Anodenpuffer I (Seite 126)
2. 2× Filterpapier (Schleicher & Schuell) in Anodenpuffer II
3. Trägermembran - Nitrocellulose in destilliertem Wasser
 - PVDF-Membran in Methanol
4. Elektrophoresegel
5. 4× Filterpapier (Schleicher & Schuell) in Kathodenpuffer

¹ Stammlösung 1: 0,01% (w/v) Na₂S₂O₃ × H₂O

Die Übertragung wurde bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche über eine Zeitspanne von 1,5 h bis 2 h durchgeführt. Mittels vorgefärbtem Proteinstandard (Dual Color, Fa. Biorad) konnte der Proteintransfer überprüft werden.

Kapillarblotting nach analytischer IEF

Entsprechend den auf den folgenden Seiten beschriebenen Prozeduren kann auch nach der analytischen IEF der Enzymnachweis mittels Gly-Pro- β -MNA oder Immunodetektion erfolgen. Aufgrund der Porengröße der Agarosegele konnte für den dafür nötigen Proteintransfer auf Nitrocellulose auf das Elektrobloßten verzichtet werden. Stattdessen wurde hierfür der Kapillareffekt ausgenutzt.

Tabelle 2-1: Kapillarblotting von Agarosegelen

- | | |
|---|--|
| 1. Agarosegel auf fester Unterlage (Glasplatte) | 4. Pressen des Blots für 10 min mit Gewicht von 1 kg |
| 2. mit Aqua tridest befeuchtete Nitrocellulose | 5. Wechsel des Filterpapiers |
| 3. mehrere Lagen Filterpapier | 6. für weitere 10 min mit Gewicht von 5 kg pressen |

2.1.5 Immunodetektion immobilisierter Proteine (Western Blot)

Die Proteine wurden zur Western Blot-Analyse nach Auftrennung durch PAGE oder IEF auf Nitrocellulose übertragen und die Trägermembranen anschließend in Abhängigkeit von der Art und der Spezifität der Primärantikörper folgendermaßen weiterbehandelt:

Tabelle 2-2: Western Blot-Detektion in Abhängigkeit von der Art und der Spezifität des eingesetzten Antikörpers; Abkürzungen: BP: Blockierungspuffer, PBS: *Phosphate buffered solution*, TBS: *Tris buffered solution*, TBSTT: TBS/Tween/Triton; (Zusammensetzung der Puffer siehe Anhang)

	Polyklonale Antikörper und monoklonaler Anti-LexA-Antikörper	Monoklonaler Anti-His-Epitop-Antikörper	Monoklonale Anti-myc-Epitop- und Anti-Attractin-Antikörper
waschen	---	2 × 10 min TBS	---
blocken	120 min BP1	60 min BP2	60 min BP3
waschen	3 × 20 min PBS/Tween	2 × 10 min TBSTT	2 × 5 min TBS/Tween
waschen	---	10 min TBS	---
primärer Antikörper	180 min BP1	60 min in BP2	90 min in BP3
waschen	3 × 20 min PBS/Tween	2 × 10 min TBSTT	2 × 5 min TBS/Tween
waschen	---	10 min TBS	---
sekundärer Antikörper	60 min BP1	60 min in BP2	60 min BP3
waschen	4 × 15 min PBS/Tween	4 × 10 min TBSTT	2 × 5 min TBS/Tween

Der Antigennachweis erfolgte entsprechend der eingesetzten Enzym-konjugierten Sekundärantikörper durch eine alkalische Phosphatase (a) bzw. Meerrettichperoxidase (b) katalysierte Reaktion:

a) Färbung Alkalische Phosphatase-konjugierter Antikörper

Die Nitrocellulose-Membran wurde einmal kurz mit AP-Puffer gespült und anschließend mit folgender Lösung inkubiert:

- 300 µl NBT (50 mg/ml)
- 500 µl BCIP (12,5 mg/ml)
- auf 50 ml mit AP-Puffer auffüllen

Durch die katalytische Aktivität der alkalischen Phosphatase wird BCIP dephosphoryliert und NBT reduziert. Beide Farbstoffe bilden gemeinsam ein blau-violettes Präzipitat, das die Membran an der Stelle der Sekundärantikörperbindung färbt. Die Reaktion erfolgt ohne Schütteln der Lösung und wird mit Wasser abgestoppt.

b) Färbung Meerrettichperoxidase-konjugierter Antikörper

Die Detektion mittels Chemilumineszenzsubstrat wurde mit dem SuperSignal[®]-System (Pierce, Rockford, USA) durchgeführt. Zur Abbildung der lumineszierenden Signale wurden CL-X Posure[™]-Röntgenfilme (Pierce, Rockford, USA) verwendet. Die Filme wurden nach Belichtungszeiten zwischen 20 s und 5 min entwickelt. Fixier- und Entwicklerlösungen wurden von der Firma Tetenal (Norderstedt) bezogen. Alle Arbeitsschritte erfolgten nach den Anleitungen der jeweiligen Hersteller.

2.1.6 Detektion von Enzymen mit DP4-ähnlicher Aktivität

Die Aufrechterhaltung nativer Bedingungen bei Gelelektrophorese bzw. isoelektrischer Fokussierung ermöglichten nach dem Transfer der Proteine auf Nitrocellulose den direkten Nachweis von Enzymen mit DP4-ähnlicher Aktivität durch Verwendung eines DP4-Substrates. Die Nitrocellulose wurde dazu in PBS equilibriert und mit folgender Substratlösung inkubiert:

- 4 mg Gly-Pro- β -Methoxynaphtylamid (Substrat) auf 400 µl DMF
- 2 mg Fast blue B auf 200 µl DMF
- beides zusammen in 7 ml PBS

Nach Abspaltung des Dipeptides Glycyl-Prolin durch die spezifische Proteaseaktivität reagiert das freie β -Methoxynaphtylamin mit dem Azokuppler Fast Blue B zu einem rot-violetten Azofarbstoff, der als schwerlösliches Produkt am Ort der Spaltung nachweisbar ist. Zur Intensivierung der Färbung kann die Inkubation bei 37°C durchgeführt werden. Die Reaktion wird mit Wasser abgestoppt.

2.1.7 Umpufferung und Konzentrierung von Proteinlösungen

Umpufferung von Proteinlösungen mit Dialyse oder Gelfiltration

Die Dialyse erfolgte unter stetigem Rühren gegen das mindestens 100fache Probenvolumen (und evtl. mehrmaligem Pufferwechsel) bei 5°C für 8 bis 16 h. Es wurden Dialyseschläuche (Fa. Roth) mit einem Ausschlussvolumen von 14 kDa verwendet.

Eine andere genutzte Methode des Pufferwechsels war Gelfiltration mittels Sephadex G25 (Fa. Amersham Biosciences Biotec AB, d = 2,6 cm, l = 10 cm) Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumen (CV) des Puffers, auf den die Lösung umgestellt werden soll, equilibriert und anschließend maximal 16 ml Probe aufgetragen. Durch Waschen der Säule mit dem Equilibrierungspuffer eluieren die aufgetragen Proteine bereits nach etwa 2 min.

Konzentrierung von Proteinlösungen

In Abhängigkeit vom Umfang der jeweiligen Probe kamen 3 unterschiedliche Methoden zur Anwendung. Die Konzentrierung von Proteinlösungen von 25 µl bis 20 ml erfolgte unter Ausnutzung der Zentrifugalkraft. Hierfür kamen verschiedene Produkte (s. S. 122) der Firma Vivascience zum Einsatz. Die Durchführung erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers.

Probenvolumen zwischen 20 und 180 ml wurden mit dem Amicon-System (Fa. Amicon) bei Überdruck (1 bis 3 bar) sowie stetigem Rühren konzentriert. Es wurden Filtrationsmembranen mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa bzw. 30 kDa verwendet. Die verhältnismäßig langwierige Prozedur erfolgte bei 5°C.

Die Konzentrierung sehr großer Probenvolumen, wie sie beispielsweise nach der Elution von Attractin-Proben bei der Blue-Sepharose auftraten, erfolgten mit dem Tangentialfluss-Modul „Vivaflow 200“ (Vivascience) mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa. Durch Verwendung einer Schlauchpumpe (Masterflex, Fa. Cole-Parmer) wurde eine kontinuierliche Zirkulation der Proteinlösung über die Filtrationsmembran (Maximaldruck 3 bar) erreicht und so der Probe stetig Puffer entzogen.

2.1.8 Deglykosylierung mit PNGase F

Attractin besitzt 26 potentielle Glykosylierungsstellen. Darunter befinden sich ausschließlich N-Glykane. Durch PNGase F werden annähernd alle N-Glykan-Typen von Glykoproteinen am innersten GlcNac hydrolysiert. Daher wurde das Enzym zur Deglykosylierung von Attractin eingesetzt. Es wurde nach Herstellerangaben (New England Biolabs) verwendet.

2.1.9 Bestimmung enzymatischer Aktivitäten

Zur Bestimmung DP4-(ähnlicher) Aktivität mit chromogenen Substraten kam die in Tabelle 2-3, Spalte A dargestellte und für die DP4 hinsichtlich des pH-Wertes und der Ionenstärke optimierte, photometrische Meßmethode zum Einsatz. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet.

Bei diesem Test wird die Zunahme der Absorption bei enzymatischer Freisetzung von para-Nitroanilin (pNA) (wenn nicht anders angegeben über 5 min und einer Substratkonzentration von 400 μM) bei einer Wellenlänge von $\lambda=390\text{ nm}$ detektiert. Diese spektralphotometrischen Messungen wurden bei 37°C am Spektralphotometer U2000 durchgeführt.

Die Differenz der molaren Absorptionskoeffizienten ($\Delta\epsilon$) von pNA und Gly-Pro-pNA bei 390 nm beträgt $11,4\text{ l}\times\text{mmol}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$. Die Schichtdicke (d) der eingesetzten Küvetten sind von den entsprechenden Herstellern angegeben. Für eine Änderung der Konzentration (c) über die Zeit und unter Berücksichtigung des Gesamtvolumens (V_G), des Probevolumens (V_P) sowie eines evtl. Verdünnungsfaktors (f) ergibt sich aus der Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes (1) die Gleichung (2) zur Berechnung der Enzymaktivität (A):

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d \rightarrow c = \frac{E}{\epsilon \cdot d} \left[\frac{\text{mol}}{\text{l}} \right] \quad (1) \quad A \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \times \text{ml}} \right] = \frac{\Delta E_{390\text{nm}}}{\Delta t} \times \frac{V_G}{11,4 \times V_P} f \quad (2).$$

Tabelle 2-3: Ansätze zur Bestimmung DP4-ähnlicher Enzymaktivitäten mittels chromogenen bzw. fluorogenen Substraten

	A) Chromogene Substrate (pNA)	B) Fluorogene Substrate (AMC)
	Ansatz in μl	
HEPES (0,102 M, pH 7,6, I=0,319)	250	50
Aqua tridest / evtl. Inhibitor	212	27,5
Substrat	125	25
Probe	50	25
Gesamtvolumen	637	127,5

Bei Verwendung fluorogener Substrate (Fluorophor: 7-Amino-4-methylcoumarin, AMC) wurde der in Tabelle 2-3 (Spalte B) gezeigte Ansatz verwendet. Die Messungen erfolgten in 96-well-Platten (Fa. nunc bzw. μclear , Fa. Greiner) am Plattenreader "Novostar" (BMG Laboratories). Für Standardmessungen betrug die Substratkonzentration 144 μM . Die sich aus der Produktbildung ergebende Freisetzung von AMC wurde als relative Fluoreszenzänderung (Extinktion/Emmission = 380 nm/460 nm) erfasst und anhand einer AMC-Standardkurve die Änderung der Produktkonzentration ermittelt.

Bestimmung enzymkinetischer Konstanten

Zur Ermittlung der kinetischen Konstanten K_m und V_{max} nach Michaelis-Menten wurden 8 verschiedene Substratkonzentrationen (S_0) zwischen 1 und 1000 μM variiert. Die Umsatzgeschwindigkeiten ($v_{initial}$) wurden gegen S_0 aufgetragen und K_m bzw. V_{max} durch nichtlineare Regression der Messwerte an die Michaelis-Menten-Gleichung (4) berechnet. Die Wechselzahl k_{cat} ergibt sich dann aus dem Verhältnis des ermittelten V_{max} zur eingesetzten Enzymkonzentration (5).

Der Wert der Konstante IC_{50} gibt die Inhibitorkonzentration an, die für eine 50%ige Hemmung des Substratumsatzes eines Enzyms unter definierten Bedingungen nötig ist. Zur Bestimmung wurde der Substratumsatz (Tabelle 2-3) ohne Inhibitor bzw. bei 11 bis 14 verschiedenen Inhibitorkonzentrationen zwischen 1×10^{-4} und 1×10^{-9} M ermittelt.

Die Ermittlung des K_i -Wertes erfolgte nach kompetitivem Mechanismus durch nichtlineare Regression. Sieben verschiedene Inhibitorkonzentrationen wurden dazu gegen vier Substratkonzentrationen (Gly-Pro-AMC) (Tabelle 2-3) variiert und die daraus resultierende Initialgeschwindigkeit des Substratumsatzes bestimmt.

Nichtlineare Regressionen und die Berechnung der bezeichneten Konstanten wurden mit dem Softwareprogramm „GraFit“ (Fa. Erithacus Software Limited) durchgeführt.

v:	Umsatzgeschwindigkeit	$v = \frac{V_{max} \times [S_0]}{[S_0] + K_m}$	(4)
----	-----------------------	--	-----

V_{max} :	maximale Umsatzgeschwindigkeit		
S_0 :	Substratkonzentration bei $t = 0$		
K_m :	Michaelis-Menten-Konstante	$k_{cat} \left[\frac{1}{s} \right] = \frac{V_{max}}{[E_0]}$	(5)

E_0 :	Enzymkonzentration		
k_{cat} :	Wechselzahl	$v = \frac{V_{max} \times [S_0]}{[S_0] + K_m \left(1 + \frac{[I_0]}{K_i} \right)}$	(6)

Aktivität der Triosephosphat-Isomerase

Bei der Glykolyse entsteht über mehrere Schritte als Zwischenprodukt Fructose-1,6-bisphosphat, welches durch die Aldolase in Glyceral-3-phosphat (GAP) und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) gespalten wird. Die Triosephosphat-Isomerase (TPI oder TIM) führt diese ineinander über:

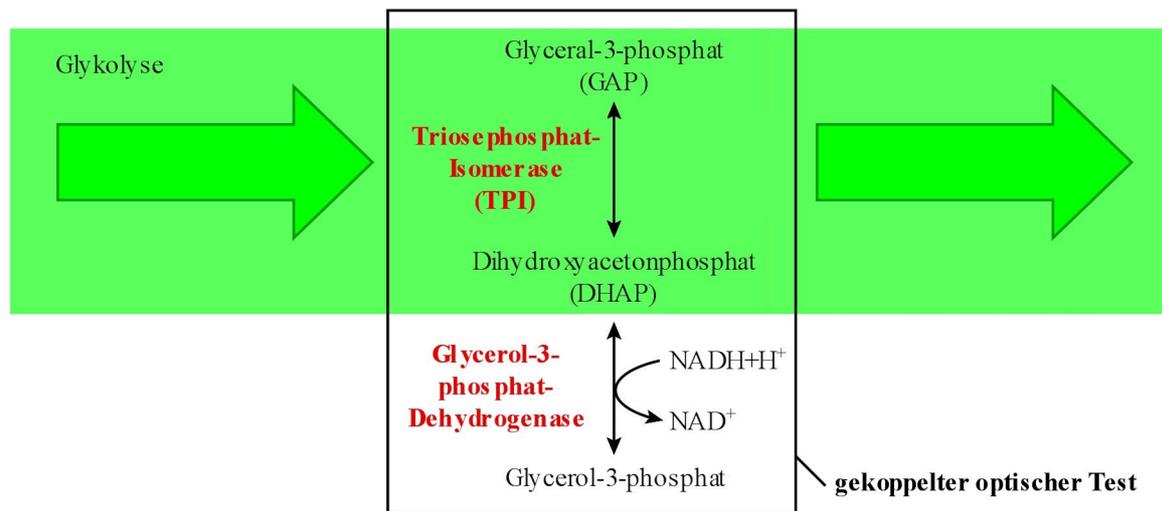


Abbildung 2-1: Schema zur Triosephosphat-Isomerase (TPI) katalysierten Reaktion in der Glykolyse und dem gekoppelten optischen Test durch die Reduktion des Reaktionsproduktes der TPI Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) zu Glycerol-3-phosphat unter Verbrauch von NADH+H⁺

Diese Umwandlung ist sehr effizient, daher sind die Konzentrationen beider Metabolite ständig im Gleichgewicht, wobei die Konzentration von DHAP (im Gleichgewicht) mit ca. 96% sehr viel größer ist als die von GAP. Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der TPI fand ein gekoppelter optischer Test Verwendung. Dieser nutzt den Umstand aus, dass DHAP unter Verbrauch von NADH+H⁺ durch die Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase zu Glycerol-3-phosphat reduziert wird. Am Plattenabsorptionsmessgerät „Sunrise“ (Fa. Tecan) und unter Verwendung von 96-well-Platten (µclear, Fa. Greiner) wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda=340$ nm die lineare Abnahme an NADH+H⁺ über 5 min bei 25°C aufgezeichnet. Der millimolare Extinktionskoeffizient von β -NADH bei 340 nm beträgt 6,22 pro cm. Der gewählte Ansatz ist in Tabelle 2-4 dargestellt. Verdünnungen der Probe wurden in 15 mM Tris-HCl (pH 7,2) mit einem Anteil von 0,02% (w/v) BSA hergestellt. Die Messungen erfolgten gegen einen Leerwert ohne Enzym.

Tabelle 2-4: Ansatz zur Messung der Aktivität der Triosephosphat-Isomerase; Temperatur: 25°C

	Bemerkung	Ansatz [μ l]
DL-Glycerol-3-phosphat	294 mM	5
β -Nicotinamadeninucleotid, red. Form	0,141 mM in TEA*	280
α -Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase	80 U/ml in Aqua tridest.	5
Probe		10
Gesamtvolumen		300

*TEA= 300 mM Triethanolamine, pH 7,6

2.1.10 Molekülmassenbestimmung mittels MALDI-TOF MS

Bei der MALDI-TOF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight Mass Spectrometry*) wird die zu untersuchende Probe in eine Matrix eingebettet und unter Vakuum auf einem Probenhalter kristallisiert. Aufgrund der Absorption des Lichtes eines Laserimpulses durch die Matrix werden die Moleküle herausgelöst und via Protonenanlagerung ionisiert. Nach Beschleunigung der Ionen im elektrischen Feld legen sie, ohne dabei fragmentiert zu werden, einen definierten Weg durch ein Flugrohr zurück. Anhand der Flugzeit und der Kalibrierung mit Standardproteinen- bzw. Peptiden kann auf das Verhältnis Masse/Ladung (m/z) geschlossen werden. Für eine genauere Erklärung des Prinzips der MALDI-TOF Massenspektrometrie sei auf die Literatur verwiesen (Karas *et al.*, 1988; Pauly *et al.*, 1996). Die genaue Molekulargewichtsbestimmung gereinigten Proteins erfolgte am LD-TOF-System G2025 (Hewlett Packard, Waldbronn). Ein Aliquot der salz- und detergentfreien Proteinlösung (2 μ l, Proteinkonzentration 35 μ g/ml) wurde im Verhältnis 1:1 mit Matrix (Sinapinsäure, HP G2055A Sinapinic Acid Matrix Solution, 100mM, Hewlett Packard, Waldbronn) gemischt und massenspektrometrisch untersucht.

2.1.11 Untersuchung des Substratabbaus mittels MALDI-TOF MS

In einer speziellen Anwendung bietet dieses Verfahren eine Möglichkeit, das Verhalten von Enzymen gegenüber (potentiellen) Substraten zu untersuchen, wenn sich aus der Enzymaktivität eine Änderung der Masse des Substrates ergibt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierfür folgender Inkubationsansatz verwendet:

- 20 μ l Enzymlösung
- 40 μ l Tris/HCl (pH 7,6, 40 mM im Ansatz)
- 40 μ l Substrat (25 μ M im Ansatz)
- gegebenenfalls kann ein Inhibitor dem o.g. Tris/HCl zugesetzt werden (10 μ M im Ansatz)

Der Ansatz wurde bei 37°C unter konstantem Schütteln inkubiert. In zeitlich definierten Abständen wurden dem Ansatz Proben entnommen und die Reaktion mit TFA abgestoppt. Für die Probenentnahme wurden ZipTips™ der Firma Millipore verwendet. Diese enthalten ein C_{18} -*Reversed-Phase*-Medium mit dem störende Ionen entfernt, Proteine abgetrennt und die Peptide gegebenenfalls aufkonzentriert werden können. Die Prozedur erfolgte nach dem Protokoll der Firma Millipore, das Konditionierungs-, Wasch- und Elutionsschritte einschließt, wobei die Elution mit der MALDI-Matrix erfolgte. Als Matrix wurde DHAP/DAHC (30 mg DHAP, 44 mg DAHC in 1 ml ACN/0,1% TFA) im Verhältnis 1:1 zum

Probevolumen genutzt. Zweimal 1 µl dieses Eluates wurde auf den Probeneller aufgetragen, kristallisiert und im Anschluß als Doppelbestimmung massenspektrometrisch analysiert.

Mit Hilfe der MALDI-TOF-MS wurden die relativen Verhältnisse von Substrat [S] und Produkt während der irreversiblen enzymkatalysierten Substrathydrolyse ermittelt. Dieser Prozess folgt unter der Annahme, dass $[S] < K_m$ ist, mit genügender Näherung einem Zeitgesetz 1. Ordnung. Die Substratkonzentration zum Zeitpunkt t $[S_t]$ errechnet sich aus der Anfangskonzentration $[S_0]$ und der Geschwindigkeitskonstanten k folgendermaßen:

$$[S_t] = [S_0]e^{-kt}.$$

Durch nichtlineare Regression an die Messwerte wurde die Geschwindigkeitskonstante mit Hilfe des Computerprogramms Origin (Version 6.0, Microcal Software Inc.) durchgeführt.

2.1.12 Interaktionsanalysen zwischen Attractin und DP4

Immunopräzipitation

Neben dem His₆-tag enthielten alle exprimierten Attractin-Isoformen ein C-terminales c-myc-Epitop, das zur Detektion oder Präzipitation der entsprechenden Proteine verwendet werden kann. Es stand ein Agarose-immobilisierter polyklonaler c-myc-Antikörper zur Verfügung (Fa. Sigma-Aldrich). Das Verfahren wurde zu Versuchen der Coimmunopräzipitation von rhAttractin und rhDP4 verwendet. Beide Proteine wurden in PBS / 0,5% (v/v) Triton X-100 verdünnt. In dreifacher Bestimmung zu je 100 µl folgte eine Inkubation für 4 h bei 4°C unter Schütteln:

Vol.	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Coimmunopräzipitation
50 µl	15 µg rhDP4 in PBS/Triton	PBS/Triton	15 µg rhDP4 in PBS/Triton
50 µl	PBS/Triton	2,5 µg rhAtrn2 in PBS/Triton	2,5 µg rhAtrn2 in PBS/Triton

Es folgte die Zugabe von 400 µl PBS / 0,5% (v/v) Triton / 6,25% (v/v) anti-c-myc Agarose zu den Ansätzen. In einem Überkopffrotierer wurde die Inkubation bei 4°C für 90 min fortgesetzt. Nach fünffacher Waschprozedur mit PBS / Triton und Abtrennen der Agarose durch Zentrifugation, erfolgte die Auswertung sowohl durch Messung der Aktivität der DP4 als auch durch anti-His₆-tag Western Blot. Letzteres ist möglich, da beide mit einem His₆-tag fusioniert sind.

Oberflächenplasmonresonanz

Die Oberflächenplasmonresonanz (SPR) ist eine Methode zur Analyse molekularer Wechselwirkungen in Echtzeit. Entsprechende Interaktionen können kinetisch ausgewertet

werden. Die Goldoberfläche eines Sensorchips (hier CM5) ist mit carboxymethyliertem Dextran beschichtet, an das wiederum einer der zu untersuchenden Bindungspartner kovalent gebunden wird. Der zweite Interaktionspartner wird (gelöst in einer mobilen Phase) über den gebundenen Partner gegeben. Durch Änderung der Masse am Chip ändert sich bei Bindung der Brechungsindex an der Goldoberfläche, wodurch sich die Bindungskinetik, k_{on} , k_{off} und K_D darstellen lässt. Weitere Vorteile der Methode sind die geringen notwendigen Probenvolumen und -konzentrationen und die Erfassungen von Bindungen niedriger Affinitäten. Die Änderung des Brechungsindex ist direkt proportional zur Änderung der Masse des Analyten, der mit der Sensorchipoberfläche interagiert. Diese wird in Resonanzeinheiten (RU) gemessen.

A) Immobilisierung der Proteine

Für die Messungen wurde das BIACORE 3000 (Fa. BIACORE, Uppsala, Schweden) verwendet. Zur Immobilisierung des jeweiligen Proteins am Sensorchip CM5 (Fa. BIACORE, Uppsala, Schweden) wurden die Proteine in 10 mM Natriumacetat mit sauren pH-Werten vorgelegt (pH 3,7, pH 4,0, pH 4,5). Die erhaltene positive Ladung konzentriert die Proteine auf der Chipoberfläche. Zur Immobilisierung wurde das Dextran mit 200 mM 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimid (EDC) / 50 mM N-Hydroxysuccinimid (NHS) (beide Fa. BIACORE, Uppsala, Schweden) aktiviert. Die sich dadurch bildenden aktiven Ester reagieren mit den Aminogruppen des zu immobilisierenden Proteins. Die ungesättigten Ester wurden im Anschluss für 2 min mit 1 M Ethanolamin, pH 8,5 (Fa. BIACORE, Uppsala, Schweden) deaktiviert. Zur Ablösung nicht-kovalent gebundenen Materials wurde die Flusszelle mit 20 μ l 10 mM Glycin-HCl (pH 1,5) gewaschen und anschließend mit HBS-P Puffer (Fa. BIACORE, Uppsala, Schweden; 10 mM HEPES, pH 7,4 / 0,15 M NaCl / 3 mM EDTA / 0,005% P20) equilibriert. Der zur Messung von Wechselwirkungen zwischen Attractin und DP4 eingesetzte Sensorchip wurde entsprechend Tabelle 2-5 präpariert.

Tabelle 2-5: Immobilisierung von Proteinen auf dem SPR-Sensorchip CM5; FZ: Flusszelle; **FZ1:** Kontrolle unspezifischer Wechselwirkungen; **FZ2:** hochreines Attractin (Abschnitt 3.3), **FZ3:** pk Kaninchen anti-Maus-Fc-Antikörper (Fa. BIACORE, Uppsala, Schweden) als Referenzprotein vergleichbaren Molekulargewichts (160 kDa); **hrDP4:** humane rekombinante DP4

FZ	Protein (10 μ g/ml)	Molekulargewicht	Anreicherungspuffer	Resonanz (RU)	Δ RU	mol/mm ²
1	aktiviert/deaktiviert	-	10 mM Natriumacetat pH 4,5	179,0	-	-
2	Attractin (hochrein)	180 kDa	10 mM Natriumacetat pH 4,5	8610,0	8431,0	$4,68 \times 10^{-14}$
3	Kaninchen anti-Maus-Fc	160 kDa	10 mM Natriumacetat pH 4,5	7510,8	7331,8	$4,58 \times 10^{-14}$
4	hrDP4	110 kDa	10 mM Natriumacetat pH 4,0	5793,2	5614,2	$5,10 \times 10^{-14}$

Die gesamte Prozedur wurde bei einer Flussrate von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ und einer Temperatur von konstant 25°C durchgeführt. Alle zur Immobilisierung und der folgenden Untersuchung der Interaktionen eingesetzten Lösungen wurden filtriert und entgast.

B) Interaktionsmessungen

Die Überprüfung der Fähigkeit zur Assoziation verschiedener Proteine an die am Sensorchip immobilisierten Proteine erfolgte im Vergleich (Subtraktion) zum Signal der unbeladenen Referenzzelle (FZ1). Es wurden folgende Proteine eingesetzt:

Protein	Verwendung
humanes hochreines Plasma-Attractin	DP4 - Bindung
humane rekombinante DP4 (hrDP4)	Atrn - Bindung
Kaninchen anti-Maus-Fc-Antikörper	Kontrollprotein vergleichbaren Molekulargewichts (Übersicht oben)
polyklonaler Attractin Antikörper	Kontrolle Atrn -Bindung
polyklonaler DP4 Antikörper	Kontrolle DP4-Bindung
monoklonaler Attractinantikörper	Kontrolle Kaninchen Anti-Maus-FC Antikörper- bzw. Atrn -Bindung

Die Messungen wurden unter verschiedenen Pufferbedingungen durchgeführt. Sowohl der pH-Wert (10 mM Natriumacetat pH 5,0; PBS pH 7,4; Tris pH 8,5) als auch der Salzgehalt (0 bzw. 0,9% (w/v)) wurden variiert. Die genannten Puffer wurden als mobile Phase verwendet und die entsprechenden Proteine in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in diesem Puffer vorgelegt.

2.2 Präparative biochemische Methoden

2.2.1 Unspezifische fraktionierte Präzipitationen

Ammoniumsulfatfällung

Für Präzipitationsmethoden gilt allgemein, dass das Fällungsmittel homogen über das Medium verteilt sein muss. Die Zugabe des Fällungsmittels findet daher langsam und unter ständigem Rühren statt.

Dem vorbereiteten Plasma wurde bei Raumtemperatur (20°C) langsam und unter Rühren feinkristallin gemörsertes Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 50% zugesetzt und 60 min gerührt. Das Pellet der anschließenden Zentrifugation (30 min, 10000 \times g, 4°C) wurde verworfen und dem Überstand Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 70% zugegeben. Die Suspension wurde über 60 min gerührt und danach erneut unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in Natriumacetatpuffer (25 mM, pH 4,7) gelöst und über Nacht gegen 5 l desselben Puffers dialysiert.

Ethanolfällung nach Kohn

Da Proteinfällungen mit organischen Lösungsmitteln eine partielle Entfaltung der Proteine durch Beeinträchtigung stabilisierender intramolekularer hydrophober Wechselwirkungen verursachen kann, sollte das Lösungsmittel nur tropfenweise und unter Rühren zugeführt und die Lösungswärme möglichst effektiv abgeführt werden. Im Gegensatz zu festem Ammoniumsulfat, dessen Zugabe zu einer Lösung aufgrund der geringen Lösungsenthalpie nur zu einer geringen Erwärmung führt, ist die entstehende Lösungswärme bei Zugabe organischer Lösungsmittel und somit die Gefahr irreversibler Hitzedenaturierung hoch. Die Temperatur wurde daher während der Ethanolpräzipitation mit einem Kälte-Umwälzthermostat (F30-HC/8, Fa. Julabo) reguliert. Die Kontrolle der Temperatur in der Lösung erfolgte zusätzlich mittels separatem Thermometer. Das Blutplasma (4°C) wurde vorgelegt und auf -5°C abgekühlt. Bei Erreichen von 0°C wurde begonnen, das im Eisbad gekühlte Ethanol tropfenweise und unter Rühren zuzugeben. Nach Erreichen von 50% (v/v) Ethanol wurde die auf -5°C abgekühlte Lösung zur Einstellung des Gleichgewichts 10 min belassen und anschließend zentrifugiert (15 min, 10000× g, -5°C). Das Sediment wurde verworfen und dem Überstand Ethanol bis zu einem Anteil von 60% (v/v) zugeführt. Die Bedingungen des ersten Fraktionierungsschrittes wurden hierbei beibehalten. Der abzentrifugierte Niederschlag wurde in 25 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,7) gelöst.

Polyethylenglykol (PEG)-Fällung

Bei der vergleichsweise schonenden Polyethylenglykolfällung nach Ingham (Ingham, 1990) wird das ungeladene, hydrophile Polymer Polyethylenglykol (PEG) zur Präzipitation von Proteinen aus wässrigen Lösungen eingesetzt.

Um eine schnelle homogene Verteilung des Polyethylenglykols im Plasma zu erreichen, wurde eine Lösung in einer Konzentration von 60% (w/v) PEG 6000 in 25 mM Natriumacetat (pH 4,7) hergestellt. Sie wurde dem Plasma bis zu einer Endkonzentration von 15% (w/v) zugegeben und die Suspension anschließend für 1 h inkubiert. Das präzipitierte Protein wurde durch zehnminütige Zentrifugation bei 5000× g aus der Lösung entfernt. Durch Erhöhung der PEG-Konzentration im verbleibenden Überstand auf 20% (w/v), die folgende Inkubation für 1 h und anschließender Zentrifugation der Lösung (10000× g, 10 min) verblieben ca. 10% des Gesamtplasmaproteins im Pellet. Dieses wurde in 25 mM Natriumacetat (pH 4,7) gelöst. Die gesamte Prozedur erfolgte bei Raumtemperatur. In Abhängigkeit von der Folgemethode kann zur Abtrennung des Polymers aus der viskösen Lösung über Nacht eine Dialyse (Dialysierschlauch Visking, CO 14000) angeschlossen werden.

2.2.2 Chromatographische Methoden

„Cibracron Blue“-Affinitätschromatographie (Blue-Sepharose)

Die Blue Sepharose ist ein gruppenspezifisches Affinitätsmaterial, bei der ein Triazin-farbstoff (hier Cibracron Blue 3G) kovalent an Sepharose gekoppelt ist. Dieses Adsorbent bindet bevorzugt, aber nicht zwingend, Proteine, die mit Nucleotiden in Interaktion treten. Es eignet sich unter anderem zur Reinigung von Albumin und Interferon und zeichnet sich durch eine hohe chemische und mechanische Stabilität und hohe Bindungskapazität aus. Unter Austestung verschiedener Pufferkombinationen wurde ein Prozess entwickelt, der es ermöglicht, die gesuchte Aktivität niedrigaffin an die Matrix zu binden und das gesamte adsorbierte Protein durch verschiedene Elutionstufen differenziert zu lösen. Die Probe wurde gegen den Laufpuffer (25 mM Natriumacetat, pH 4,7) dialysiert. Das anschließende chromatographische Verfahren, das in beliebig vielen Zyklen wiederholt werden konnte, unterteilte sich in folgende Schritte:

Schritt	CV	Puffer
Equilibrierung	3,1	25 mM Natriumacetat, pH 4,7
Auftragen der Probe	-	
Waschen	2,6	25 mM Natriumacetat, pH 4,7
Elution 1	3,8	25 mM Natriumacetat, pH 4,7 + 500 mM NaCl
Elution 2	2,6	50 mM KH ₂ PO ₄ , pH 8,0 + 2,7 M NaCl
Elution 3	1,0	100 mM NaOH

Das aufgetragene Probevolumen richtete sich nach dem Proteingehalt der Probe. Dabei wurden 70% der vom Hersteller mit 18 mg/ml (1 CV = 57,4 ml) angegebenen Bindungskapazität des Säulenmaterials nicht überschritten. Das gesamte durch Elution 1 aufgefangene Volumen mehrerer Zyklen wurde vereinigt und mittels Tangentialfluss-Konzentrator (Vivaflow 200, Abschnitt 2.1.7) konzentriert.

Kationenaustauschchromatographie an Sp-Sepharose

Die sp-Sepharose ist ein starker Kationenaustauscher (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden). Vor der Durchführung der Chromatographie an diesem Säulenmaterial wurde die Proteinlösung, nach Dialyse über Nacht gegen die mobile Phase (25 mM Natriumacetat, pH 4,7), bei 30000× g für 20 min zentrifugiert und anschließend mit einem Spritzenfilter (4,5 µm) filtriert. Die vorbereitete Proteinsuspension wurde mit einer Flussrate von 5 ml/min auf die equilibrierte sp-Sepharose-Säule (l=210 mm, d=25 mm) appliziert. Nach dem Waschen mit 2 CV wurde das gebundene Protein eluiert. Diese Prozedur erfolgte mittels

5 Stufen zu je 0,5 CV auf 100 mM, 200 mM, 400 mM, 800 mM und 1000 mM NaCl bei Reinigung A bzw. einem linear steigenden NaCl-Gradienten von 0 auf 400 mM über 1 CV und einer anschließenden Stufe auf 1 M NaCl bei Reinigung B.

Anionenaustauschchromatographie an UnoQ6

Die Proben wurden über Nacht gegen 5 l Laufpuffer (20 mM Tris, pH 8,0) dialysiert und anschließend zentrifugiert (30000× g, 20 min, 4°C). Zusätzlich folgte eine Filtration mittels Spritzenfilter (4,5 µm). Die Proben wurden in der mobilen Phase bei einer Flussrate von 5 ml/min auf die Säule (UnoQ6 Fa. Biorad, 1CV = 6 ml) aufgetragen und mit 5 CV des Puffers gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte über 20 CV durch einen linear steigenden NaCl-Gradienten (50-400 mM).

Adenosindeaminase-Affinitätschromatographie

Vor der Durchführung der Adenosindeaminase (ADA)-Affinitätschromatographie wurde ADA (Fluka) an NHS-aktivierte Sepharose (Amersham Biosciences) immobilisiert. Nach Gelfiltrationschromatographie (G-25) wurde die ADA in Puffer 1 (siehe Tabelle 2-6) vorgelegt und die Ligandenlösung anschließend mittels Ultrafiltration (Centricon, Ausschlussgröße 5000 Da) auf eine Konzentration von 2,5 mg/ml eingestellt. Die Equilibrierung der Säule (Säulenvolumen 1 ml) erfolgte mit 6 CV Puffer 1. Nach Zugabe von 1 ml Ligandenlösung in Puffer 1 wurde die Säule verschlossen und für 30 min bei 25°C inkubiert. Bei einer Flussrate von 1 ml/min folgte eine intensive Waschprozedur:

- | | | | |
|----|--------------------------|----|--------------------------|
| 1. | 6 ml Puffer 2 | 5. | 6 ml Puffer 3 |
| 2. | 6 ml Puffer 3 | 6. | 6 ml Puffer 2 |
| 3. | 6 ml Puffer 2 | 7. | 6 ml Puffer 3 |
| 4. | 30 min Inkubation bei RT | | Puffer siehe Tabelle 2-6 |

Eine auf 1,9 ml konzentrierte Attractinfraktion (Präparation C) aus humanem Plasma wurde bei mehrmaligem Pufferwechsel gegen 200 ml Puffer 4 dialysiert und anschließend 1:10 mit demselben Puffer verdünnt. Nach Equilibrierung der Säule mit 3 CV Puffer 4 wurde sie mit der vorbereiteten Probe beladen. Beide Schritte erfolgten bei einer Flussrate von 0,35 ml/min, um eine Bindung der Liganden zu ermöglichen. Bei 1 ml/min wurde die Säule in zwei Schritten mit 10 CV Puffer 4 bzw. 10 CV Puffer 5 gewaschen. Bei der anschließenden Elution mit Puffer 6 wurde sowohl die Flussrate (0,35 ml/min) als auch die Salzkonzentration reduziert.

Tabelle 2-6: Puffer zur Immobilisierung von ADA an NHS-aktivierte Sepharose und Durchführung der Affinitätschromatographie

Schritt		Puffer
Kopplung	Puffer 1	200 mM NaHCO ₃ , pH 8,3; 500 mM NaCl
Waschschritt	Puffer 2	500 mM Ethanolamin, pH 8,3; 500 mM NaCl
Waschschritt	Puffer 3	100 mM Natriumacetat, pH 4,0; 500 mM NaCl
Equilibrierung	Puffer 4	50 mM Tris (HCl), pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) Triton X-100
Waschschritt	Puffer 5	50 mM Tris (HCl), pH 8,0; 500 mM NaCl; 0,1% (v/v) Triton X-100
Elution	Puffer 6	2 mM Tris (HCl), pH 8,0; 0,1% (v/v) Triton X-100

Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine mit His-Fusion

Die bewährte Technik der Ni-Chelatchromatographie wurde genutzt, um His₆-tag fusionierte rekombinante Proteine durch Affinitätschromatographie zu reinigen. Nach dem Equilibrieren der Ni-Sepharose (Amersham) mit der mobilen Phase (s. unten) wurde die klare Proteinlösung nach Zellaufschluss bzw. Vorbereitung des Zellüberstandes (s. Abschnitte 2.4.1 bis 2.4.3) bei einer Flussrate von 5 ml/min auf die Säule appliziert. Nach dem Waschen mit 5 CV (1 CV = 23 ml) Laufpuffer folgte die Elution des gebundenen Proteins:

rekombinantes Protein	verwendetes Zellsystem	mobile Phase:	Elution
UBE*	<i>P. pastoris</i>	20 mM Na ₂ HPO ₄ , pH7,2 0,5 M NaCl	+25 mM Imidazol linearer Gradient auf 500 mM Imidazol in 6 CV
TPI*	<i>E. coli</i>		
Atrn	293HEK		+50 mM Imidazol Stufe auf 500 mM Imidazol

* UBE: Ubiquitin-Konjugasen (UBE2R2, UBE2G1); TPI: Triosephosphat Isomerase

Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine mit GST-Fusion

Um über Reinigungs- und Copräzipitationsmethoden möglichst hoher Spezifität und Affinität zu verfügen, wurde der zytosolische Teil von Attractin (Acy) mit der Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert. Als Negativkontrolle diente die unfusionierte GST, die mit den gleichen Methoden exprimiert und gereinigt wurde.

Nach der Expression der beiden Proteine in je einer 100 ml Schüttelkolbenkultur wurden die Zellen des verwendeten *E. coli*-Stammes BL21 direkt im Bindungspuffer aufgeschlossen und unlösliche Bestandteile entfernt (s. Abschnitt 2.4.1). Den gelösten Proteinen 1% (v/v) wurde außerdem Triton X-100 zugegeben. Die Glutathion-Agarose wurde nach Herstellerangaben (Fa. Sigma) vorbereitet und die Reinigung der Glutathion-S-Transferase (GST) bzw. des GST-Acy Fusionsproteins mittels Glutathion-Agarose im Batch-Betrieb durchgeführt. Dazu

wurden auf 7 ml Expressionsüberstand 2 ml Glutathion-Agarose in 2 ml NaH_2PO_4 / 150 mM NaCl / 1% (v/v) Triton X-100 (PBS-Triton) zugegeben und 2 h im Überkopfröter bei 4°C inkubiert. Die Agarose wurde anschließend durch vorsichtige Zentrifugation (10 s, 300× g) pelletiert und der Überstand verworfen. In dreifacher Wiederholung wurde die Agarose durch Zugabe von 10 ml PBS-Triton und Zentrifugation (10 s, 300× g) gewaschen. Die Elution der gebundenen GST bzw. des GST-Acy Fusionsproteins erfolgte ähnlich dem Waschschrift durch dreifache Zugabe von je 3 ml 10 mM reduziertem Glutathion (Fa. Sigma) in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0. Die Analyse des eluierten Proteins erfolgte mittels SDS-PAGE.

2.2.3 Präparative elektrophoretische Methoden

Präparative isoelektrische Fokussierung

Zur Realisierung einer trägerfreien präparativen IEF wurde das Rotofor-System (Fa. BioRad) verwendet. Die horizontale zylindrische Fokussierungskammer (mit Membrankern zur Unterteilung in 20 Fraktionen) wurde während der Fokussierung mittels Keramik Kühlkern und einem angeschlossenen Kälteumwälzthermostaten (Fa. Julabo) auf konstant 4°C temperiert. Als Elektrolytlösungen für die hier beschriebenen Arbeiten dienten 0,5 M Essigsäure (Anodenkammer) und 0,5 M Ethanolamin (Kathodenkammer). Ionenaustauschermembranen wurden in diesen Lösungen equilibriert. Nach der Dialyse der Probe gegen 25 mM Natriumacetat (pH 4,7) erfolgte die Zugabe der aufgeführten Lösungen:

2% (w/v) Ampholyte im pH Bereich 3-10 (Fa. Serva)

0,5% (v/v) Triton X-100

10% (v/v) Glycerol

Die Separation erfolgt nach Zentrifugation (30000× g, 25 min, 4°C) der Suspension und dem luftblasenfreien Befüllen der Fokussierungskammer durch Anlegen einer konstanten Leistung von 15 W, wobei das Ende der Prozedur durch ein deutliches Abflachen des steigenden Spannungsverlaufes gekennzeichnet ist. Die Elution erfolgt durch die Erzeugung eines Druckgefälles aus der Fokussierungskammer in 20 separate Einzelfraktionen der Elutionskammer. Für eine Refokussierung werden die in Frage kommenden Fraktionen der IEF vereinigt und evtl. präzipitiert Proteine mittels Zentrifugation abgetrennt. Nach Zugabe des Puffers, Triton X-100 und Glycerol (siehe oben, ohne weiteren Zusatz von Ampholyten) erfolgt die Wiederholung der Fokussierung.

Präparative native Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Umsetzung der PAGE im präparativen Maßstab wurde das PrepCell-System (Fa. BioRad) verwendet. Im Gegensatz zur annähernd zweidimensionalen Gelstruktur der

analytischen PAGE ist diese bei der präparativen PAGE ausgeprägt dreidimensional. Das vertikal ausgerichtete System mit einer gewählten Polyacrylamid-Kreisringfläche von $8,2 \text{ cm}^2$ ist durch eine variable Betthöhe beliebig dimensionierbar. Es wurde ein 6%iges Trenngel mit einer Höhe von 6 cm und ein 4%iges Sammelgel mit einer Höhe von 0,5 cm gewählt. Die zu trennende Probe wurde konzentriert, so dass inklusive 5-fachem nativen Probenpuffer (siehe Anhang) eine Probenhöhe von 2 mm nicht überschritten wurde.

Zu schnelle Polymerisation führt aufgrund der freigesetzten Wärme insbesondere bei ungleichmäßiger Abkühlung zu einer Inhomogenität des Polyacrylamidgels. Zur Kühlung befindet sich im Zentrum des Gels ein Kühlkern und um das Gel ein Kühlpufferreservoir, die auf 4°C temperiert werden. Außerdem wird die Konzentration der Katalysatoren für das Trenngel im Vergleich zu analytischen Gelen stark verringert. Die langsame Polymerisation fand nach senkrechter Ausrichtung der Elektrophorese-Apparatur über Nacht unter Kühlung statt. Die Polyacrylamidelektrophorese wurde nach dem diskontinuierlichen System nach Ornstein-Davis durchgeführt.

Tabelle 2-7: Bestandteile der verwendeten Polyacrylamidgele der präparativen nativen PAGE

	%T	Aqua dest.	Gelpuffer	Acrylamid / Bis Lösung 30% (37,5:1)	10% APS	TEMED
Sammelgel	4	6,15 ml	2,5 ml*	1,33 ml	50 μl	10 μl
Trenngel	6	5,55 ml	2,5 ml*	2 ml	25 μl	2,5 μl

*siehe S. 126

Auch die Elektrophorese wurde durch Temperierung eines 2 L Pufferreservoirs im Kälteumwälzthermostat (Fa. Julabo) bei Kühlung auf 4°C durchgeführt. Durch Anlegen einer konstanten Leistung von 12 W wurde die Probe elektrophoretisch getrennt. Mittels UV-Detektor (Model EM-1 Econo UV Monitor) wurde die Elution nach Austritt des Pufferstromes aus dem Gel aufgezeichnet und in Fraktionen zu je 12 ml gesammelt.

Für Informationen zum genauen Aufbau der verwendeten Elektrophoreseapparatur „Model 491 Prep Cell“ sei hier auf die Literatur des Herstellers (BioRad) verwiesen.

2.3 Molekulabiologische Methoden

2.3.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Primärzellen

Nach der Isolation und Kultivierung von Lymphozyten aus humanem Blut (s. S. 51) erfolgte die Isolation der Gesamt-RNA nach dem Protokoll des Herstellers des eingesetzten Trizol-Reagenz (Fa. Invitrogen). Nach Beendigung der Prozedur wurde das erhaltene RNA-Pellet in DEPC-behandeltem Wasser gelöst und die Konzentration der RNA durch Messung der

Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$ (Smart Spec 3000, Fa. BioRad, München) bestimmt.

2.3.2 cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA mittels RT-PCR

Die cDNA-Synthese aus gereinigter Gesamt-RNA isolierter Lymphozyten erfolgte unter Benutzung des "ThermoScript RT-PCR System" (Fa. Invitrogen) mittels Oligo(dT)-Primern nach Herstellerangaben. Das notwendige Temperatur/Zeit -Programm wurde mittels Thermocycler generiert.

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

Für die Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden 5 ml LB-Medium (siehe Anhang), dem das entsprechende Selektionsantibiotikum zugeben war, mit einer Bakterienkolonie beimpft und bei 37°C über Nacht unter waagerechter Rotation inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde nach dem Protokoll „QIAprep Miniprep“ (Fa. Qiagen) isoliert und die erhaltene Konzentration spektrometrisch bestimmt.

2.3.4 Endotoxinfreie Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Endotoxine (Lipopolysaccharide) kommen in der Zellwand gramnegativer Bakterien (z.B. *E. coli*) vor, werden bei der Lyse dieser Einzeller freigesetzt und sind äußerst hitzestabil. Sie können in der Zellkultur die unterschiedlichsten Auswirkungen auf Wachstum und Differenzierung der Zellen sowie die Proteinproduktion haben. Auch die Apoptose ist eine mögliche Folge. Daher müssen Plasmide aus *E. coli* vor der Transfektion von z.B. Säugerzellkulturen endotoxinfrei sein.

Zur Gewinnung endotoxinfreier Plasmid-DNA wurden 100 ml einer Bakterienkultur, die über Nacht bei 37°C in LB-Medium mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum inkubiert wurde, unter Benutzung des „EndoFree Plasmid Maxi Kit“ (Fa. Qiagen) nach den Angaben des Herstellers weiterverarbeitet. Diese Methode gewährleistet auch die Bereitstellung größerer Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli*.

2.3.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* (2-Hybrid-System)

Je eine 5 ml Glukose/CM W⁻-Schüttelkultur wurde mit einer einzelnen Hefekolonie beimpft, über Nacht bei 30°C inkubiert und anschließend durch zehnminütige Zentrifugation bei 1500× g geerntet. Das Pellet wurde in 500 µl S1-Puffer (s. S. 126) resuspendiert. Nach der Überführung in 1,5 ml Reaktionsgefäße wurde durch Zugabe von 20 µl S2-Puffer der einstündige Zellaufschluss bei 37°C gestartet. Die Lösung wurde danach 1 min bei 6000× g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 500 µl S3-Puffer und 50 µl 10%igem

SDS gelöst. Nach anschließender Inkubation bei 65°C für 30 min wurden 200 µl 5 M Kaliumacetat zugegeben und die Suspension für 1 h auf Eis belassen. Der sich aus der folgenden Zentrifugation (5 min, 12000× g) ergebende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol und Zentrifugation (10 s, 12000× g) erfolgte die DNA-Präzipitation. Mit 70%igem Ethanol wurde das DNA-Pellet gewaschen, anschließend getrocknet und in 40 µl TE-Puffer (siehe Anhang) aufgenommen. Die DNA konnte nun entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert werden.

2.3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR), spezielle PCR

Während dieser Arbeit wurden die zwei rekombinanten DNA Polymerasen „Platinum Taq“ und „Platinum Pfx“ der Fa. Invitrogen für die PCR eingesetzt. Primer wurden (wenn nicht anders angegeben) von der Fa. Metabion synthetisiert. In Tabelle 2-8 sind Endkonzentrationen der eingesetzten Lösungen abgebildet.

Tabelle 2-8: Endkonzentrationen der PCR Ansätze für Platinum Taq DNA Polymerase und Platinum Pfx DNA Polymerase

	Platinum Taq	Platinum Pfx
PCR-Puffer	einfach	einfach
dNTP-Mischung	0,2 mM	0,3 mM
MgCl ₂	1,5 mM	-
MgSO ₄	-	1 mM
5'-Primer	0,2 µM	0,3 µM
3'-Primer	0,2 µM	0,3 µM
DNA-Template	Konzentration variabel	
DNA Polymerase	20-50 U/ml	
steriles, dest. Wasser	Volumen variabel	

Polymerase-Kettenreaktionen wurden unter Benutzung der Thermocycler „Mastercycler gradient“ (Fa. Eppendorf) bzw. „PCR Sprint“ (Fa. HYBAID, Needham Heights, USA) durchgeführt. Die Temperatur-Zeit Parameter sind in Tabelle 2-9 aufgeführt.

Tabelle 2-9: Variables Temperatur-Zeit Programm der Polymerase-Kettenreaktion

Zyklen		Zeit	Platinum Taq	Platinum Pfx
1	Denaturierung	2 min	94°C	
25-35	Denaturierung	30 s	94°C	
	<i>Annealing</i>	30 s	um 55°C*	
1	<i>Extension</i>	1 min/kb	72°C	68°C
1	<i>Final Extension</i>	10 min	72°C	68°C

* abhängig von der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer

2.3.7 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Lösungen

Für die Reinigung von amplifizierten PCR Produkten wurde der „StrataPrep PCR Purification Kit“ (Fa. Stratagene) nach Herstellerangaben eingesetzt.

2.3.8 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach verschiedenen Verfahren, wie z.B. einem enzymatischen Restriktionsverdau, können mehrere DNA-Fragmente vorhanden sein. In solchen Fällen wurde das gesuchte Fragment, nach Auftrennung mittels Agarosegelelektrophorese, unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mittels "JETquick Gel Extraktion" (Fa. Genomed) nach Vorschrift extrahiert.

2.3.9 Enzymatischer Restriktionsverdau von DNA

Der enzymatische Restriktionsverdau erfolgte nach der Vorschrift der Fa. New England Biolabs, von der sämtliche Restriktionsenzyme sowie die entsprechenden Puffer bezogen wurden. Die Aktivität der Restriktionsendonukleasen wurde auf 0,5 U/ μ l je Enzym eingestellt. Die Inkubationszeit des Ansatzes variierte in Abhängigkeit von der Temperatur zwischen 1 bis 2 h bei 37°C und 16 h über Nacht bei RT.

2.3.10 Ligation von DNA

Für die Ligation von geschnittener DNA wurde die T4-DNA-Ligase (Fa. New England Biolabs) eingesetzt. Durch dieses Enzym wird unter ATP-Verbrauch die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen katalysiert. Für die Ligation zweier DNA-Stücke wurde zunächst ein äquimolares Verhältnis für die Reaktion eingestellt. Die Effizienz kann durch Verschiebung dieses Verhältnisses (vor allem zu Gunsten eines Inserts gegenüber einem linearisierten Plasmid) gesteigert werden. Die Reaktion wurde nach dem variablen Protokoll des Herstellers (Fa. New England Biolabs) durchgeführt.

2.3.11 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA in Agarosegelen wurden horizontale Flachbettapparaturen (Fa. AGS, Heidelberg) verwendet, an die eine elektrische Spannung von 95 V angelegt wurde. Die Konzentration der Agarose (Fa. peqlab, Erlangen) wurde in Abhängigkeit der Größe der zu trennenden DNA von 0,8 bis 2% (w/v) in TBE-Puffer (siehe S. 126) variiert. Die Agaroselösung wurde in einem Mikrowellenherd aufgekocht, nach leichter Abkühlung 0,3 μ g/ml Ethidiumbromid zugegeben und in eine Gelkammer gegossen. Nach vollständiger Abkühlung der Agaroselösung wurde die mit 6-fachem Probenpuffer (Fa. peqlab, Erlangen)

versetzte DNA in die vorgefertigten Geltaschen gegeben und die Elektrophorese gestartet. Nach dem Erreichen der gewünschten Auflösung erfolgte die Dokumentation der Ergebnisse unter UV-Licht (Fa. UVP bzw. Intas).

2.3.12 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Messung der Konzentration von Nukleinsäuren wurde die Absorption bei 260 nm am Smart Spec 3000 Spektrometer (Fa. BioRad, München) bestimmt. Mit sterilem Aqua bidest. wurden 70 µl Lösung auf A_{260} unter 1,0 eingestellt.

Umrechnungsfaktoren: dsDNA $A_{260} = 1,0 = 50,0 \mu\text{g/ml}$
RNA $A_{260} = 1,0 = 40,0 \mu\text{g/ml}$
ssDNA $A_{260} = 1,0 = 37,0 \mu\text{g/ml}$

2.4 Mikrobiologische Methoden

Die Methodik der Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* ist im Abschnitt „Interaktionsselektion in Hefen“ beschrieben.

2.4.1 Methoden der Kultivierung von *E. coli*

E. coli-Stämme wurden zu Zwecken der Klonierung und Vermehrung von Genen, Genfragmenten und Vektoren (DH5 α , XL10) sowie zur Expression der in dieser Arbeit beschriebenen rekombinanten humanen Trisosephosphat Isomerase und dem Fusionsprotein aus dem zytosolischen Teil von Attractin und der Glutathion-S-Transferase verwendet (BL21). Die Anzucht von *E. coli*-Kulturen erfolgte im Wesentlichen nach Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1998). Die Zusammensetzung von LB-Medium bzw. –Agar sowie verwendete Antibiotika sind im Anhang verzeichnet. Für Langzeitlagerung wurde 1 ml einer Übernachtskultur mit 8% (v/v) Glycerol vermischt und bei -80°C eingefroren.

Transformation von *E. coli*

Ein 40 µl Aliquot einer Glycerol-Dauerkultur kompetenter *E. coli* wurde auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 2 bis 10 µl Ligationsansatz bzw. gereinigten Plasmids wurde die Zellsuspension gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden bei 42°C für 30 s einem Hitzeschock unterzogen und anschließend erneut für 2 min auf Eis gekühlt. Nachdem den Zellen auf 42°C vorgeheiztes LB-Medium zugesetzt wurde, folgte eine 60-minütige Inkubation bei 37°C und unter Schütteln bei 250 rpm. Anschließend wurden 100 µl der Suspension auf LB-Agarplatten (mit dem Selektionsantibiotikum der Plasmidresistenz; s. Anhang) ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* und Zellaufschluss

Die kodierenden Sequenzen des zytosolischen Teils von Attractin bzw. des kompletten TPI1-Gens wurde mittels PCR aus der cDNA von isolierten humanen T-Lymphozyten amplifiziert. Zur besseren Übersicht sind verschiedene, sich unterscheidende Details, wie verwendete Expressionsvektoren, Oligonukleotide und Restriktionsenzyme in Tabelle 2-10 zusammengefasst. Klionierte Expressionsvektoren wurden anschließend, wie oben gezeigt, in den *E. coli*-Stamm BL21 transformiert und nach Vermehrung durch Sequenzierung überprüft (Fa. SeqLab, Göttingen).

Tabelle 2-10: Übersicht sich unterscheidender Arbeitsschritte bei der Expression der beiden mittels *E. coli* hergestellten rekombinanten Proteine Triosephosphat-Isomerase (TPI) und dem Atrn_{cyt}-GST-Fusionsprotein

Protein	GST-Atrn _{cyt}	GST	TPI
Expressionsvektor	pGEX-4T-1		pET28a
Oligonukleotide	PD131 / PD27	-	PD100 / PD101
Restriktionsenzyme	<i>EcoRI</i> / <i>NotI</i>	-	<i>BamHI</i> / <i>NotI</i>
Maßstab der Expression	100 ml		750 ml
Induktion der Expression	0,4 mM IPTG		1 mM IPTG
Inkubationstemperatur	30°C		37°C
Aufschlusspuffer	25 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 8,0, 150 mM NaCl		20 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,2, 500 mM NaCl, 25 mM Imidazol
1. Reinigungsschritt	Glutathionagarose		Ni-Sepharose

Aus einer Über-Nacht- (ÜN-) Kultur wurden die entsprechenden Volumen LB-Medium mit dem transformierten BL21-Klon auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 30 bzw 37°C und unter Schütteln bei 250 rpm inkubiert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7 wurde die Expression der rekombinanten Proteine mit IPTG induziert und die Inkubation für 4 h fortgesetzt.

Die *E. coli*-Zellen wurden nach Beendigung der Expression für 15 min bei 5000× g (4°C) zentrifugiert und das Zellpellet in gekühltem Lauf- oder Bindungspuffer (siehe Tabelle 2-10) des folgenden Reinigungsschrittes aufgenommen. Es folgte in beiden Fällen der Aufschluss mittels *French press* (Fa. Spectronic Instruments, Rochester, USA) sowie Ultraschallhomogenisator (Sonopuls HD2070, Fa. Bandelin electronic, Berlin) für 10 s im Eisbad. Die Suspension wurde bei 38000× g für 30 min (4°C) zentrifugiert und danach mit einem Spritzenfilter (0,2 µm, Fa. Nalgene, USA) filtriert.

2.4.2 Methoden der Kultivierung von *P. pastoris*

Pichia pastoris ist ein methylotropher Hefestamm. Unter Abwesenheit von Glukose benutzt dieser Methanol als Kohlenstoffquelle. Er wurde in dieser Arbeit zur rekombinanten

Expression der beiden Ubiquitin-konjugierenden Enzyme UBE2R2 und UBE2G1 mit Hilfe des Vektors pPICZ α A eingesetzt. Auf diesem ist das Zeocin-Resistenzgen kodiert. Die Expression des klonierten Gens steht unter der Kontrolle des Alkoholoxidase-Promotors AOX1. Da die Alkoholoxidase den ersten Schritt des Methanol-Metabolismus katalysiert, kann AOX1 zur starken Expression rekombinanter Proteine herangezogen werden. Dem zu exprimierenden Gen vorgeschaltet ist die α -Faktor Sequenz als Signal zur Sezernierung des Proteins ins Medium, es wird bei diesem Prozess abgespalten.

Transformation von Plasmid-DNA / Expression rekombinanter Proteine in *P. pastoris*

Die kodierenden Sequenzen von UBE2G1 und UBE2R2 wurden mit den Oligonukleotiden PD3/PD4 bzw. PD5/PD6 unter Benutzung der cDNA aus humanen Lymphozyten amplifiziert. Die Integration in den Expressionsvektor pPICZ α A erfolgte nach Restriktion mit *EcoRI* und *XbaI* und Reinigung der Produkte. Die Vektoren wurden im *E. coli*-Stamm DH5 α vermehrt, anschließend gereinigt und die korrekte Klonierung mittels Sequenzierung überprüft (Fa. Seqlab, Göttingen).

Zur Transformation von *P. pastoris* wurde der Expressionsvektor mit dem Restriktionsenzym PmeI im AOX1-Locus linearisiert, um das zu transformierende Gen in der AOX1-Region des Wirtsgenoms zu integrieren. Mittels Elektroporation (Elektroporator Fa. Biorad) wurden 40 μ l von X33 (*P. pastoris*) Glycerolkonserven mit 5 μ g Plasmid-DNA transformiert und auf YPDS / 25 μ g/ml Zeocin Agarplatten für 3 Tage bei 30°C inkubiert.

Je 15 Kolonien wurden in 3 ml Übernachtkulturen BMGY / 100 μ g/ml Kanamycin bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 1500 \times g) wurden die pelletierten Hefezellen in BMMY aufgenommen, auf eine OD₆₀₀ von 1,0 eingestellt und die Inkubation für 72 h fortgesetzt. Alle 24 h erfolgte die Zugabe von 0,5% (v/v) Methanol. Der Erfolg der Expression von UBE2G1 und UBE2R2 wurde per anti-His₆-tag Western Blot geprüft. Je eine geeignete Kolonie wurde zur Expression im 500 ml-Maßstab ausgewählt.

Bei Arbeiten mit dem *P. pastoris*-Stamm X33 sowie bei der Zusammensetzung der Medien wurden die Protokolle des Herstellers (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) befolgt.

Aufarbeitung von *P. pastoris*- und 293HEK-Kulturüberständen

Nach rekombinanter Herstellung von Proteinen mit Hilfe der Expressionsvektoren pPICZ α A in *P. pastoris* bzw. pSecTag2B in 293HEK (Sezernierung) wurde der Kulturüberstand nach einer ersten Zentrifugation (15 min, 3000 \times g für *P. pastoris* bzw. 293HEK 5 min, 500 \times g) entnommen und danach erneut zentrifugiert (30 min, 48000 \times g, 4°C). Die Lösung wurde mit 8-fachem Laufpuffer der folgenden Ni-Sepharosechromatographie (siehe Tabelle 2-11)

versetzt, anschließend filtriert (Flaschenaufsatzfilter, 0,45 µm, Dr. I. Schubert, Leipzig) und, bei sehr großen Volumen, konzentriert.

Tabelle 2-11: Laufpuffer für Affinitätsreinigung nach Expression rekombinanter Proteine in verschiedenen Expressionssystemen

1× mobile Phase	Expressionssystem
20 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4, 500 mM NaCl	+ 50 mM Imidazol für 293HEK
	+ 25 mM Imidazol für <i>P. pastoris</i>

2.4.3 Kultivierung von Säugerzelllinien

Für die Herstellung rekombinanter Proteine in Säugerzellen wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK, 293 Zellen) verwendet. Diese wurden in kollagenbeschichteten Gewebekulturflaschen (25, 75 bzw. 175 cm² oder 6-Kavitäten-Platten; Fa. Greiner) bei 37°C in Brutschränken unter 5% CO₂ in D-MEM/10% (v/v) FBS mit 54 µg/ml Gentamycin kultiviert. In einem Rhythmus von 2 bis 3 Tagen wurde das verbrauchte Medium ersetzt bzw. die Zellen alle 3 bis 4 Tage (nach Erreichen einer 70 bis 80%igen Konfluenz) passagiert.

Zur Ernte wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und der Monolayer der nur schwach adhärenen 293HEK-Zellen durch Abklopfen von der Oberfläche der Gewebekulturflaschen gelöst. Die stark adhärenen B16-Melanomazellen wurden nach waschen mit PBS mit einer 0,05 %igen Trypsinlösung (3 ml, 3 min) abgelöst. Nach Überführung in 50 ml Reaktionsgefäße wurden die Zellen durch Zentrifugation (500× g, 5 min, RT) sedimentiert und das Pellet sorgfältig in PBS resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde das „Cell Analyzer System“ (Fa. Schärfe System) verwendet.

Herstellung rekombinanter Proteine in Säugerzelllinien

Transiente Transfektion

In eine kollagenbeschichtete 6-Kavitäten-Platte wurden 1×10⁶ Zellen pro Kavität (10 cm²) in 2 ml eingesät und wie oben angegeben inkubiert. Nach Erreichen einer Konfluenz von 90 bis 95% erfolgte die Transfektion mit Lipofectamin 2000 (Fa. Invitrogen). Es wurden 4 µg Plasmid-DNA bzw. 10 µl Lipofectamin mit je 250 ml Opti-MEM I für 5 min bei RT inkubiert, anschließend zusammengegeben und für weitere 20 min bei RT inkubiert. Das Medium wurde von den Zellen abgenommen und anschließend 2 ml Opti-MEM pro Kavität sowie der DNA / Lipofectamin-Komplex zugegeben. Die Zellen wurden für die Dauer der Transfektion von 5 h im Brutschrank inkubiert, der DNA / Lipofectamin-Komplex danach abgenommen und D-MEM / 10% (v/v) FBS / 54 µg/ml Gentamycin zugegeben. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet (s. oben) bzw. passagiert und in Kulturmedium mit

entsprechendem Selektionsantibiotikum (s. Anhang) eingesät. Zu Zwecken der Reinigung und Analyse DP4-ähnlicher Aktivität wurde die Expression rekombinanter Proteine unter Selektionsdruck auf einen Maßstab von $10 \times 175\text{cm}^2$ vergrößert.

Aufschluss von 293HEK

Die Zellen wurden zweimal mit PBS waschen. Der Aufschluss der Zellen startete danach mit dem Lösen des Pellets im Laufpuffer der Ni-Sepharose (Tabelle 2-11) dem zur Zelllyse 0,2% (v/v) Triton X-100 zugesetzt wurde. Die Lösung inkubierte anschließend für 30 min bei 4°C unter Schütteln im Überkopffrotierer. Die Behandlung mit einem Ultraschallhomogenisator (Einstellungen: Pulszyklus: 9; Power: 75%; 30 s) unter Eiskühlung vervollständigte die Lyse. Die Suspension wurde für 30 min bei $38000 \times g$ und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert sowie, um ein Zusetzen der Säule restlos auszuschließen, mit einem 1,2 μm Spritzenfilter filtriert.

Die Methodik der Aufarbeitung von Kulturüberständen zur Gewinnung von rekombinantem Atrn3 (pSecTag2B findet sich auf Seite 49 f.

2.4.4 Präparation und Kultivierung von Lymphozyten aus humanem Vollblut

In sterile 15 ml Reaktionsgefäße wurden je 3 ml Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) gegeben und dieses anschließend sehr vorsichtig mit einem Gemisch aus 2 ml Vollblut und 2 ml „balanced salt solution“ (BSS) überschichtet. Nach vierzigminütiger Phasenseparation durch Zentrifugation bei $400 \times g$ und 20°C, wurde die oberste Schicht (Plasma) vorsichtig entnommen und die darauf folgende Lymphozytenphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch vorsichtiges Vermischen mit 3 Volumen BSS und zehnminütiger Zentrifugation ($800 \times g$, 20°C), wurden die Zellen gewaschen und abschließend in 15 ml D-MEM/10% FBS (v/v)/54 $\mu\text{g/ml}$ Gentamycin aufgenommen. Sie wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Stimulation der Lymphozyten

Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und 1×10^6 Lymphozyten/ml in oben genanntes Medium in zwei Ansätzen eingesät. Zur Stimulation wurde den Lymphozyten eines Ansatzes 1 $\mu\text{g/ml}$ Phytohämagglutinin (PHA) zugegeben. Zu den Zeitpunkten 0, 2, 24, 48, 72 h wurden beiden Kulturen je 4 ml Proben entnommen und mit einem 100 μl Aliquot die Zellzahl bestimmt. Durch Zentrifugation ($700 \times g$, 15 min, RT) wurden die Zellen sedimentiert, der Überstand abgenommen und nach mehrfachem Waschen mit PBS das Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Aus den gelagerten Zellen wurde später die gesamte RNA isoliert und cDNA generiert (s. S. 43 f).

2.5 Interaktionsselektion in Hefen

2.5.1 Das allgemeine Prinzip

Um unbekannte Interaktionspartner eines Proteins zu identifizieren, kann die als *two-hybrid-system* (2-Hybrid-System oder auch *interaction trap*) bezeichnete Methode verwendet werden (Fields *et al.*, 1989; Gyuris *et al.*, 1993). Sie bietet den Vorteil des Nachweises von Interaktoren in intakten Zellen auf genetischer Grundlage und umgeht zunächst viele Nachteile der biochemischen *in vitro*-Detektion. Die Interaktion zweier Proteine, die als *bait*- bzw. *prey*-Fusionsprotein bezeichnet werden, vermittelt in diesem System die transkriptionelle Aktivierung von Reporter genen. Es basiert auf der Wirkungsweise einiger eukaryontischer Transkriptionsfaktoren (wie z.B. GAL4), die aus zwei wesentlichen funktionalen Elementen aufgebaut sind. Sie bestehen zum einen aus einer DNA-Bindungsdomäne, die den Transkriptionsfaktor an einer spezifischen *upstream*-Aktivatorsequenz positioniert und zum anderen aus einer Aktivierungsdomäne aus überdurchschnittlich vielen sauren Aminosäuren, welche die Transkription eines Struktur gens auslöst. Diese Modularität von Transkriptionsfaktoren wird beim 2-Hybrid-System ausgenutzt. Die Trennung beider Module macht eine direkte Aktivierung der Transkription unmöglich, da die Aktivierungsdomäne allein nicht an der Aktivatorsequenz lokalisiert wird und die DNA-Bindungsdomäne kein Aktivierungspotential besitzt. Durch Fusion der beiden getrennten Module mit je einem von zwei Interaktionspartnern (2-Hybrid) werden durch die Wechselwirkung dieser beiden Partner beide Domänen indirekt wieder gekoppelt. In Abhängigkeit von der Interaktion wird daher die Aktivität des Transkriptionsfaktors wiederhergestellt.

2.5.2 Die Elemente des 2-Hybrid-Systems

Beim verwendeten 2-Hybrid-System werden die beiden funktionellen Domänen eines artifiziellen Transkriptionsfaktors erzeugt. Das bakterielle LexA-Protein dient als DNA-bindende Domäne und die Domäne B42 wirkt transkriptionsaktivierend. Als Reportergene werden LacZ und LEU2 eingesetzt.

Ein wichtiges Element des 2-Hybrid-Systems ist der uracil-, tryptophan-, histidin- und leucinauxotrophe *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm EGY 48, der bereits das Reporterplasmid pSH18-34 (siehe unten) trägt. Da das Uracil-Gen auf dem Reporterplasmid pSH18-34 kodiert ist, wird EGY 48/pSH18-34 unter Uracil-Restriktion (U⁻) selektiert. Desweiteren enthält das Reporterplasmid das für β -Galaktosidase kodierende LacZ-Gen, dessen Aktivierung zur Expression des Enzyms führt. Dieses setzt den Indikator X-Gal zu einem blauen

Indigofarbstoff um. In der Promotorregion des LacZ-Gens befinden sich LexA-Operatoren, die als Erkennungssequenz für die DNA-Bindungsdomäne LexA dienen.

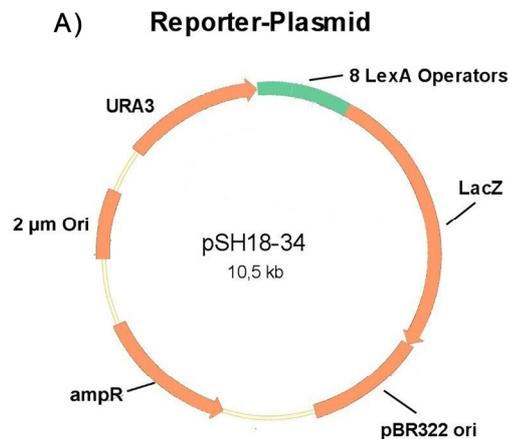


Abbildung 2-2A: Plasmide des 2-Hybrid-Systems in Hefen; **A)** pSH18-34 Reporterplasmid; **LexA-Operatoren:** Positionierung der DNA-bindenden Domäne LexA vor dem LacZ-Gen; **URA3:** Uracil-Gen

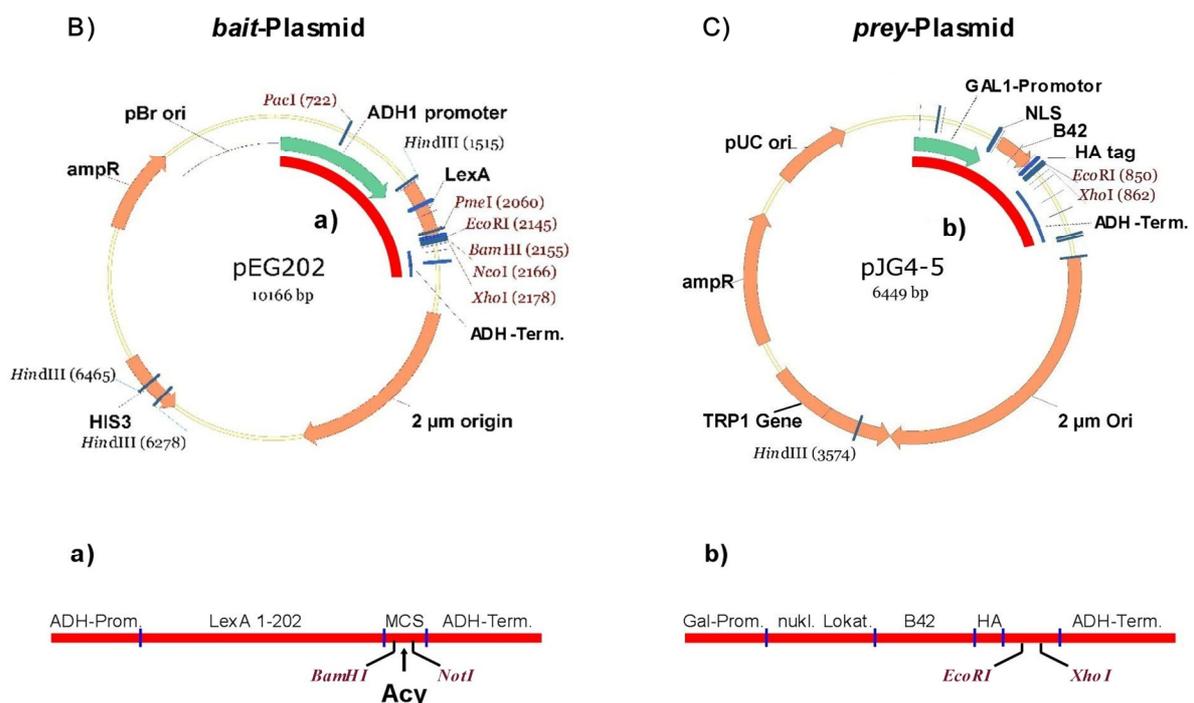


Abbildung 2-2B: Plasmide des 2-Hybrid-Systems in Hefen; **B)** pEG202 zur Expression des *bait*-Fusionsproteins **a)** aus B) vergrößerter Abschnitt; **Acy:** zytosolischer Teil von Attractin kloniert zwischen *BamHI* und *NotI* **C)** pJG4-5 zur Expression des *prey*-Fusionsproteins, cDNA-Bibliothek zwischen *EcoRI* und *XhoI* kloniert **b)** aus C) vergrößerter Abschnitt; **HIS3:** Histidin-Gen; **TRP1:** Tryptophan-Gen; **ADH:** Alkoholdehydrogenase; **Gal:** Galaktose; **NLS:** nukleare Lokalisation

Das *bait*-Plasmid

Zur Interaktionssuche wird ein Hybrid (*bait*) aus dem LexA-Protein und einem bekannten Protein erzeugt, für das Bindungspartner identifiziert werden sollen. Für die Expression dieses

bait-Proteins wurde der Vektor pEG202 verwendet. Dieser enthält die kodierende Sequenz für die DNA-bindende LexA-Domäne (siehe oben), der eine multiple Klonierungsstelle (MCS) zur Insertion der cDNA des Proteins folgt. Die Expression des *bait*-Proteins steht unter Kontrolle des konstitutiven ADH-Promotors von *S. cerevisiae*. Als Terminationssignal dient die entsprechende Sequenz aus demselben Gen dieses Organismus. PEG202-positive EGY 48 können auf histidinfreiem Medium selektiert werden, da das HIS3-Gen auf diesem Expressionsplasmid kodiert ist.

In der vorliegenden Arbeit sollten Interaktionspartner für den zytosolischen Teil von Attractin indentifiziert werden. Unter Benutzung der Oligonukleotide PD27 und PD29 gelang die Amplifikation des gesuchten Genabschnittes unter Benutzung der cDNA aus stimulierten humanen Lymphozyten. Das *blind end*-PCR-Produkt wurde in einer Zwischenstufe zunächst in den „pPCR-Script Cam SK(+) Vektor“ integriert und nach Vervielfältigung im *E. coli*-Stamm XL10 aus den Zellen gereinigt. Sowohl pEG202 als auch der zuvor klonierte pPCR-Script Cam SK(+)/Atrn_{cyt} wurden mit den beiden Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Not*I verdaut. Die entsprechenden Fragmente von pEG202 und zytoplasmatischen Teil von Attractin wurden nach Auftrennung und Analyse aus dem Agarosegel extrahiert und die cDNA von Atrn_{cyt} mit T4-DNA-Ligase *in frame* mit LexA in das *bait*-Plasmid integriert.

cDNA-Bibliothek und *prey*-Plasmid

Das zweite im 2-Hybrid-System verwendete Hybridprotein ist das *prey*-Protein. Zur Herstellung dieses Fusionsproteins kann die cDNA eines bekannten Proteins oder - wie hier durchgeführt - eine cDNA-Bibliothek (hier Hela-cDNA-Bibliothek) zur Suche unbekannter Interaktionspartner eingesetzt werden. Das dafür benutzte Expressionsplasmid pJG4-5 (siehe oben) enthält als metabolischen Marker das TRP1-Gen. Die Expression des *prey*-Proteins steht unter der Kontrolle des GAL1-Promotors. Die Terminationssequenz des ADH-Gens schließt auch hier die Transkription ab. Zusätzlich enthält das Fusionsprotein ein Hämagglutinin (HA)-Epitop zur biochemischen Detektion und eine NLS-Sequenz als Signal zur Kernlokalisation. Beide Funktionen werden beim oben beschriebenen *bait*-Protein von LexA übernommen. Die cDNA-Bibliothek wird mittels der Restriktionsschnittstellen EcoRI und XhoI am C-Terminus des HA-Epitops in den Vektor integriert.

Lithiumacetattransformation von *S. cerevisiae*

Aus einer Glyzerinkultur des Hefestammes EGY48/pSH18-34 wurde eine 20 ml Schüttelkolbenkultur mit Glu/U⁻-Medium (s. Anhang) angeimpft und in einem Inkubationsschüttler (250 U/min) bei 30°C kultiviert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 1,0

wurde aus dieser Kultur eine 300 ml Suspension desselben Mediums mit einer OD₆₀₀ von 0,1 hergestellt und bis zu einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,5 erneut bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 1500× g) geerntet, zweimal in je 30 ml sterilem Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Dem Lösen des Zellpellets in 1,5 ml sterilfiltriertem TE-Puffer/0,1 M LiOAc folgte die Zugabe von 50 µg Heringsspermien-DNA (*carrier*-DNA, zuvor 5 min bei 95°C, danach auf Eis abgeschreckt, Fa. Clontech) sowie 1 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA (pEG202 (pbait)) zu jeweils 50 µl der Zellsuspension. Nach vorsichtigem Mischen schloss sich eine Inkubation für 30 min bei 30°C in 1,5 ml Reaktionsgefäßen unter leichtem Schütteln an. Die Zellen wurden mit 40 µl DMSO versetzt, für 10 min einem Hitzeschock durch Inkubation auf einem Heizblock unterzogen und direkt folgend auf Glu/UH⁻-Agarplatten mit sterilen Glaskugeln ausplattiert. Durch Inkubation der Platten bei 30°C waren die Hefekolonien nach 2-3 Tagen sichtbar. Einige Einzelkolonien wurden ausgewählt und auf frischen Glu/UH⁻-Agarplatten ausgestrichen.

Anti-LexA-Western Blot

Zur Kontrolle der Expression eines intakten Köderfusionsproteins erfolgte ein Anti-LexA-Western Blot. Ausgewählte EGY48/pSH18-34/pEG202-Kulturen wurden dazu in je 2 ml UH⁻-Minimalmedium für 8 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Sie dienten anschließend zum Animpfen je einer 10 ml Schüttelkolbenkultur (UH⁻-Minimalmedium), die über Nacht bei 30°C im Hefeschüttler inkubiert wurde. Die Ernte erfolgte durch zehnmünütige Zentrifugation bei 1500× g. Das erhaltene Pellet wurde in 40 µl SDS-Probenpuffer (s. Anhang) resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend für 10 min hitzedenaturiert. In Vorbereitung des Western Blots folgten eine 10%ige SDS-PAGE sowie ein Elektrobplot zur Übertragung der getrennten Proteine auf Nitrocellulose. Der Nachweis des LexA-Fusionsproteins wurde unter Benutzung eines monoklonalen LexA-Antikörpers und eines Alkalische Phosphatase-konjugierten Sekundärantikörpers durchgeführt (s. Abschnitt 2.1.5).

Mit einer der ausgestrichenen EGY48/pSH18-34/pEG202 Einzelkolonien erfolgte im Anschluss durch Wiederholung der oben beschriebenen Prozedur die Transformation der pJG4-5 Plasmide. Durch Verzicht auf die Zugabe der Aminosäure Tryptophan wurden die Zellen nach der Transformation auch auf dieses Plasmid durch Ausstreichen auf 26× 142 mm Agarplatten für 3 Tage bei 30°C selektiert.

S. cerevisiae-Glyzerinkulturen

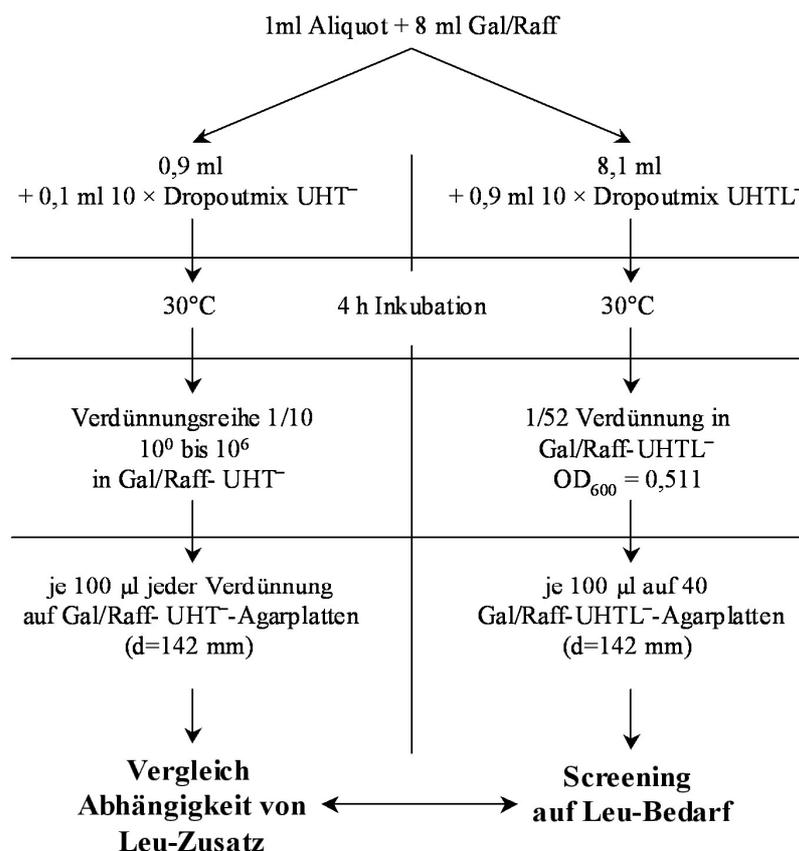
Die nach der Inkubation bewachsenen Agarplatten (EGY48/pSH18-34/pEG202) wurden für einige Stunden bei 4°C zur Verfestigung des Agars gekühlt, mit etwas (1 bis 3 ml) sterilem Wasser benetzt und die Hefen mittels sterilen Objektträgern unter einer Sterilwerkbank von der Oberfläche abgeschabt. Die gesammelten Zellen wurden zweimal mit sterilem Wasser gewaschen und jeweils mittels Zentrifugation (10 min, 1500× g) pelletiert.

Hefezellen, die so geerntet oder in Lösung kultiviert wurden, können durch resuspendieren in 1 Volumen Glyzerinlösung (s. Anhang, S. 126) und tiefrieren (-80°C) von 1 ml Aliquots für mehrere Monate haltbar gemacht werden.

2.5.3 Interaktionssuche

1. Selektionsschritt – Leucinabhängigkeit der Proliferation

Ein 1 ml Aliquot der tiefgefrorenen und komplett transformierten Zellen wurde aufgetaut und mit 8 ml Gal-Medium verdünnt. Mit dieser Suspension wurde, wie in folgendem Schema gezeigt, weiterverfahren:



Es folgte eine Inkubation der Agarplatten bei 30°C über 4 Tage. Hefekolonien, die in dieser Zeit auf Gal-UHWT⁻-Agarplatten anwachsen, wurden auf neue Agarplatten (je 52 Kolonien) ausgestrichen.

2. Selektionsschritt – β -Galaktosidase Plattenassay

Zur Reduktion falsch-positiver Klone folgte ein 2. Selektionsschritt. Dazu wurden die auf Gal-UHWL⁻ selektierten Kolonien sowohl auf X/Glu-UHW⁻- als auch auf X/Gal-UHW⁻-Agarplatten replattiert. Dem *prey*-Fusionsprotein ist der GAL1-Promotor vorgeschaltet. Daher entsteht in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle (Glukose oder Galaktose) eine Aktivierung der Expression des *prey*-Fusionsproteins, seine Interaktion mit dem *bait*-Fusionsprotein und eine Aktivierung der β -Galaktosidase ausschließlich auf galaktosehaltigem Medium.

Nach der Verringerung des Hintergrundes im Anschluss an den eigentlichen Selektionsschritt wurden die Plasmide der positiven Hefeklone isoliert (s. S. 44) und mittels Hitzeschock in den *E. coli*-Stamm DH5 α transformiert (s. S. 47). Durch Ausplattieren von DH5 α auf LB-Agarplatten (X-Gal / IPTG / Amp) wurde auf Ampicillinresistenz sowie blau / weiß-Färbung selektiert. Dies ermöglichte die anschließende Präparation von *prey*-Plasmiden aus *E. coli* (s. S. 44). Die Auswahl zur Sequenzierung geeigneter *prey*-Plasmidisolate erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese.

Zur Sequenzierung wurde eine PCR mit nur einem Oligonukleotid sowie fluoreszenzmarkierten 2',3'-Dideoxynukleotiden (ddNTPs) durchgeführt (Terminationsverfahren). Plasmid-DNA wurde wie folgt zur Sequenzierung vorbereitet:

- 7 μ l gereinigte Plasmid-DNA
- 1 μ l (4 pmol) Primer "target 1" (Fa. MWG Biotech GmbH)
- 2 μ l ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Fa. Perkin Elmer)

Nach erfolgter PCR wurden der Ansatz mit 10 μ l H₂O, 2 μ l Natriumacetat (3 M, pH4,5) und 60 μ l Ethanol versetzt. Die Suspension wurde zentrifugiert (20 min, 20 000 \times g), das Pellet in 200 μ l 70% igem Ethanol gewaschen, erneut 5 min zentrifugiert und das Lösungsmittel (einschließlich eines Trocknungsschrittes bei RT) komplett entfernt. Die so formulierte DNA wurde im „Institut f. Genetik“ der Martin-Luther-Universität sequenziert.

Für den letzten Selektionsschritt wurden ein EGY 48/pSH18-34/pEG202_{Acy} und ein EGY 48/pSH18-34/pRFHM1 Klon generiert. Das pRFHM1 Plasmid kodiert für ein Protein, das LexA mit der Homeodomäne des Bicoid aus *Drosophila melanogaster* fusioniert. Es wird als Negativkontrolle für den nachfolgenden Interaktionsassay verwendet. Anschließend wurden auch die selektierten und isolierten cDNA-Bibliothek-Plasmide einzeln in diese Klone transformiert und der 2. Selektionsschritt mit diesen Kolonien wiederholt. Mit Hilfe dieser Methode wurde die ermittelte Wechselwirkung ein 2. Mal getestet sowie deren Spezifität im Vergleich zum Negativkontroll-Hefestamm bestimmt.

3 Ergebnisse

Das Molekulargewicht und die postulierte DP4-ähnliche Aktivität der im Blutplasma vorkommenden alternativ gespleißten Isoform 3 waren drei der wenigen bislang bekannten Eigenschaften des humanen Attractin. Es wurden zunächst zahlreiche Methoden (z.B. Ammoniumsulfatfällung, Gelfiltration, Concanavalin A-Affinitätschromatographie, Anionenaustauschchromatographie, Hydrobe Interaktionschromatographie, Metall-Chelat-Affinitätschromatographie) in Testansätzen mit dem Ziel der Anreicherung der DP4-ähnlichen Aktivität aus humanem Blutplasma untersucht. Dabei war es bisher erst in einem Fall möglich gewesen, eine homogene Fraktion von Attractin (ca. 100 µg) zu präparieren, es zu identifizieren und erste Charakterisierungen vorzunehmen.

3.1 Etablierung einer reproduzierbaren Reinigungsprozedur für Attractin aus humanem Plasma

3.1.1 Präparation auf Basis einer nativen 2-D-Elektrophorese (Präparation A)

Die geringe Menge des erhaltenen Attractins konnte nun zur Feststellung einiger grundlegender proteinbiochemischer Parameter verwendet werden. Diese Erkenntnisse wurden der Entwicklung einer ergiebigen und reproduzierbaren Präparationsmethode zugrunde gelegt.

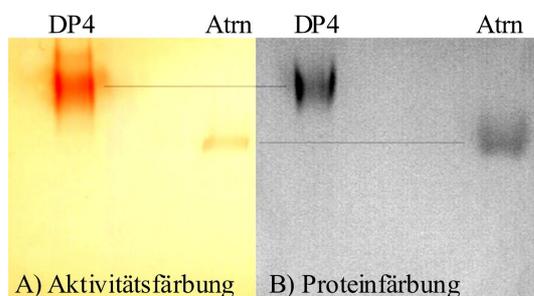


Abbildung 3-1: Abbildung der Ergebnisse einer 7,5%igen nativen PAGE; Puffer siehe Anhang **A**: Nachweis der enzymatischen Aktivität (Spaltung von Gly-Pro-β-MNA); **B**: Proteinfärbung (Coomassie Blue)

Wie aus dem Vergleich der Protein- und Aktivitätsfärbung einer PAGE unter nativen Bedingungen hervorgeht (Abbildung 3-1), entspricht die elektrophoretische Mobilität des humanen Attractin der in dieser Proteinfraction enthaltenen Aktivität. Sie unterscheidet sich außerdem deutlich von snDP4 (gereinigt aus Schweineniere). Die analytische IEF in Abbildung 3-2 zeigt, dass sich auch hinsichtlich des isoelektrischen Punktes (pI) klare Unterschiede zwischen beiden Proteinen ergeben. Attractin fokussiert in einem pH-Bereich zwischen pH 3,5 und pH 4,2 und besitzt damit einen sehr sauren pI. Die pI-Bereiche beider

hier dargestellten DP4-Formen aus humaner Plazenta (hpDP4; pH 4,8-6,0) und Schweineiere (pH 4,7-6,2) sind im Vergleich zur DP4-ähnlichen Aktivität aus humanem Plasma deutlich in Richtung des basischen pH-Bereiches verschoben.

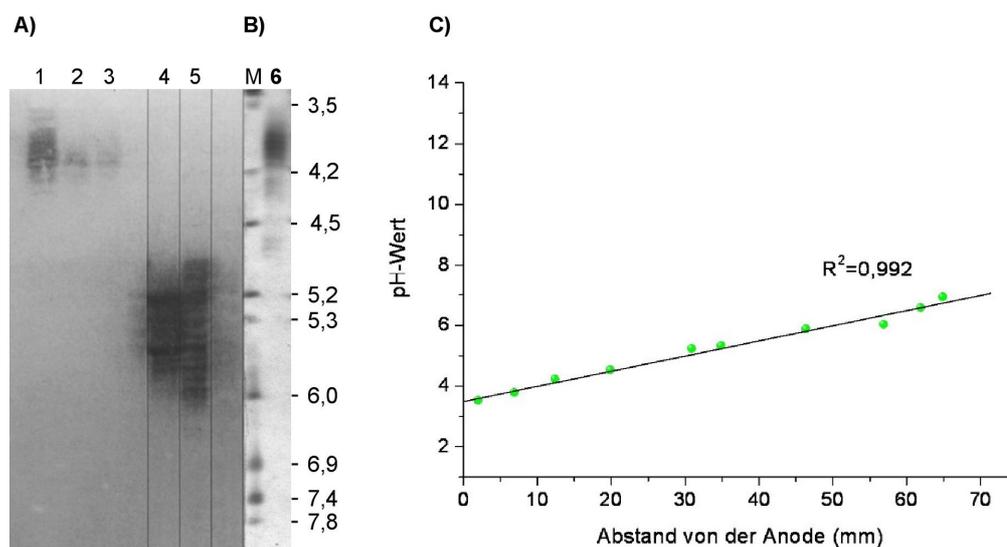


Abbildung 3-2: Darstellung der Ergebnisse einer analytischen Isoelektrischen Fokussierung im pH-Bereich von pH 3 bis pH 10 **A)** Aktivitätsfärbung mittels Gly-Pro-β-MNA; **B)** Proteinfärbung mit Coomassie Blue; **Bahnen 1-3 und 6:** Attractinfraktionen; **Bahn 4:** snDP4, **Bahn 5:** humane plazentale DP4 (hpDP4); **M:** IEF Marker 3-10 (Serva); **C)** Verlauf des pH-Gradienten

Attractin ist ein monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 175 kDa und unterscheidet sich im Laufverhalten in der nativen PAGE von DP4. Wie oben gezeigt besitzt es einen pI kleiner pH 4,2. Betrachtet man den entsprechenden Abschnitt in der Abbildung einer analytischen 2-D-Elektrophorese von humanem Plasma (Abbildung 3-3), wird deutlich, dass im Bereich mit einem Molekulargewicht größer 100 kDa (175 kDa) und pH-Werten kleiner pH 4,5 (pH 3,5 – pH 4,2) kaum Proteine sichtbar sind.

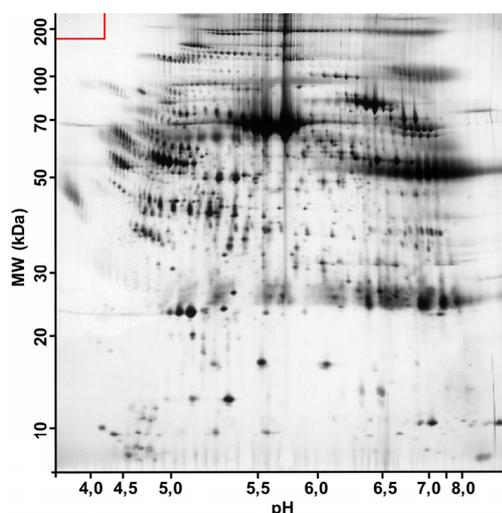


Abbildung 3-3: Ergebnis einer analytischen zweidimensionalen Elektrophorese von humanem Plasma; **Rot:** proteinarmer Bereich in dem sich Attractin befinden sollte (Molekulargewicht (ca. 175 kDa) und pI zwischen pH 3,5 bis pH 4,2); Quelle der Abbildung: www.expasy.ch

Diese Eigenschaften von Attractin dienten als Basis für die Entwicklung einer Präparationsstrategie. Die präparative IEF spielte hierbei eine zentrale Rolle. Es sollten größere Volumina humanen Plasmas aufgearbeitet werden, welche zunächst durch die Kapazität der präparativen IEF (Rotofor), limitiert wurden. Daher wurden zunächst initiale Methoden zur Plasmaproteinabtrennung in Vorbereitung zur präparativen 2D-Elektrophorese benötigt.

Fällung und Chromatographie

Als initiale Schritte wurden sowohl Präzipitations- als auch Chromatographiemethoden getestet. Wie aus Tabelle 3-1 zu entnehmen ist, stellen chromatographische Techniken im Vergleich zu Präzipitationstechniken die schonenderen Methoden zur Proteinreinigung dar. Unter Verwendung von Blue-Sepharose (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB) konnte gleichzeitig der größte Reinigungsfortschritt erzielt werden. Daher sollte in diesem Reinigungsversuch vorerst auf Fällungen verzichtet und mit Hilfe dieser Affinitätschromatographie vor allem das Albumin der Probe abgetrennt werden.

Tabelle 3-1: Vergleich initialer Reinigungsschritte der Präparation löslichen Attractins aus humanem Plasma

	Ausbeute	Reinigungs- faktor
Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung, 50-70% Sättigung	44,3%	3,2
Fraktionierte Ethanol-fällung, 50-60% (v/v)	44,3%	3,2
Fraktionierte PEG-Fällung, 15-20% (w/v)	48,4%	4,2
Sp-Sepharose	62,1%	2,4
Blue Sepharose	60,5%	7,0
Blue Sepharose + Sp-Sepharose	52,4%	24,1

Die Bindungskapazität des Säulenmaterials limitiert den Probenumfang bei einer Chromatographie und damit in diesem Fall der gesamten Präparation erheblich. In einem Beispielversuch sollten 770 ml dialysiertes humanes Plasma mit einem Gesamtproteingehalt von ca. 39 g im ersten Schritt mittels Blue-Sepharose-Affinitätschromatographie aufgearbeitet werden. Die Säulenkapazität erforderte 50 separate Einzelläufe, die unter Abschnitt 2.2.2, S. 39 beschrieben und in Abbildung 3-4 beispielhaft für einen Lauf abgebildet ist. Das sich aus dieser Methode ergebende Trennprofil ist gekennzeichnet durch einen großen Teil ungebundenen Proteins und die folgende Elution durch eine schrittweise Anhebung der NaCl-Konzentration. Durch eine weitere Steigerung des NaCl-Gehaltes bei gleichzeitiger Änderung des pH-Wertes aus dem sauren in den leicht basischen Bereich und einer anschließenden basischen Reinigungsstufe wird sämtliches Protein, das sich noch auf der Säule befindet, komplett eluiert. Nach dem Equilibrieren der Sepharose wird erneut Probe aufgetragen.

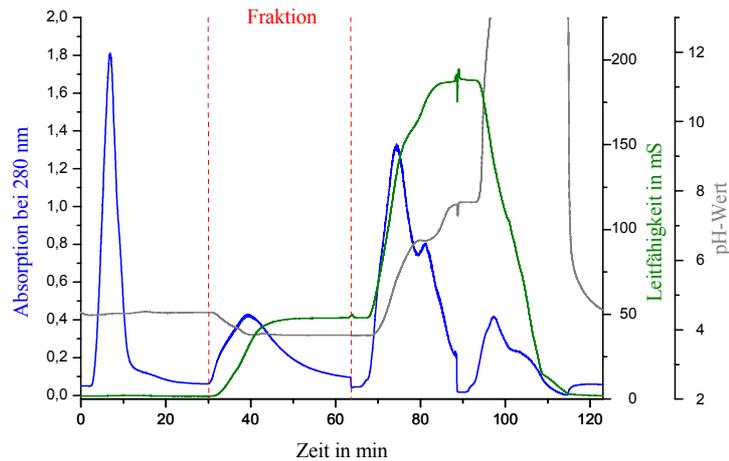


Abbildung 3-4: Trennprofil der Blue-Sepharose; **Blau:** Absorption bei 280 nm, **Grün:** Leitfähigkeit in mS; **Grau:** pH-Wert, **Rot:** Fraktion mit DP4-ähnlicher Aktivität

Es konnten 93,4% des Proteins abgetrennt werden, das heißt, es verblieben 3,4 g. Da die Kapazität der verwendeten Apparatur zur Durchführung der präparativen IEF (Rotofor) nur max. 1 g zu verarbeitendes Protein zulässt, folgte eine Chromatographie am starken Kationenaustauscher sp-Sepharose Fast Flow (Abbildung 3-5). Unter den gewählten Pufferbedingungen (pH 4,7) wurden Enzyme mit DP4-ähnlicher Aktivität mit geringer Affinität am Kationenaustauscher gebunden und eluierten bereits zu Beginn des steigenden NaCl-Gradienten.

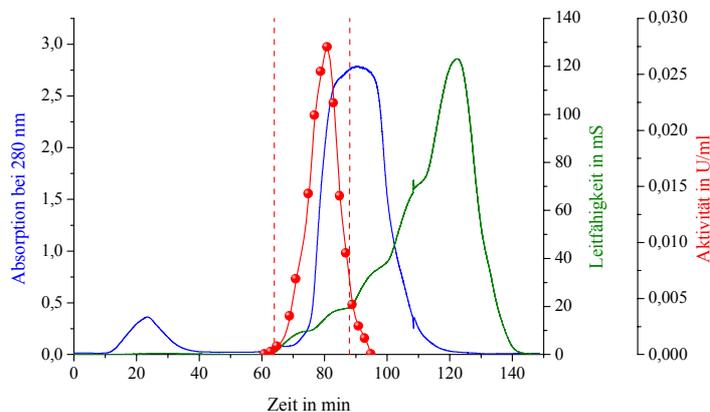


Abbildung 3-5: Trennprofil der Kationenaustauschchromatographie (sp-Sepharose); **Blau:** Absorption bei 280 nm; **Grün:** Leitfähigkeit in mS; **Rot:** DP4-ähnliche Aktivität in U/ml

Präparative IEF

Die so vorbereitete Probe enthielt nun 850 mg Protein (2,2%) bei noch über 50% der Ausgangsaktivität. Sie wurde mit Ampholyten versetzt und einer trägerfreien isoelektrischen Fokussierung unterzogen. Die verwendete Apparatur (Rotofor, BioRad) erfordert standardisierte Probenvolumina von 18 bzw. 58 ml. Um eine starke Verdünnung der Probe

während der Fokussierung zu vermeiden, wurde ein Gradient zwischen pH 3 und 10 gewählt. Nach Beendigung der Prozedur wurden 20 etwa gleich große Fraktionen entlang des pH-Gradienten erhalten. Diese wurden anschließend hinsichtlich ihres pH-Wertes, der enthaltenen DP4-ähnlichen Aktivität und der Proteinkonzentration untersucht.

Wie aus Abbildung 3-6 A hervorgeht, erstreckt sich der lineare Bereich des pH-Gradienten von pH 1 bis pH 9. Das Maximum der DP4-ähnlichen Aktivität fokussierte bei pH 4,0. Allerdings ist auch eine starke Verbreiterung des Peaks durch das Erreichen des oberen Kapazitätslimits der Rotofor zu verzeichnen. Auffallend ist auch die Übereinstimmung der Aktivität mit der deutlich sichtbaren Attractinbande in der SDS-PAGE bei 178 kDa (Abbildung 3-6 C). Mit den Fraktionen 6-9 (pH 4,46 bis pH 5,67; 22% der Gesamtaktivität) erfolgte im Anschluss eine Refokussierung (Abbildung 3-6 B) ohne Zugabe weiterer Ampholyte. Die Aktivität verschiebt sich dadurch in den für Attractin typischen Bereich (pH 3,0 bis pH 4,2).

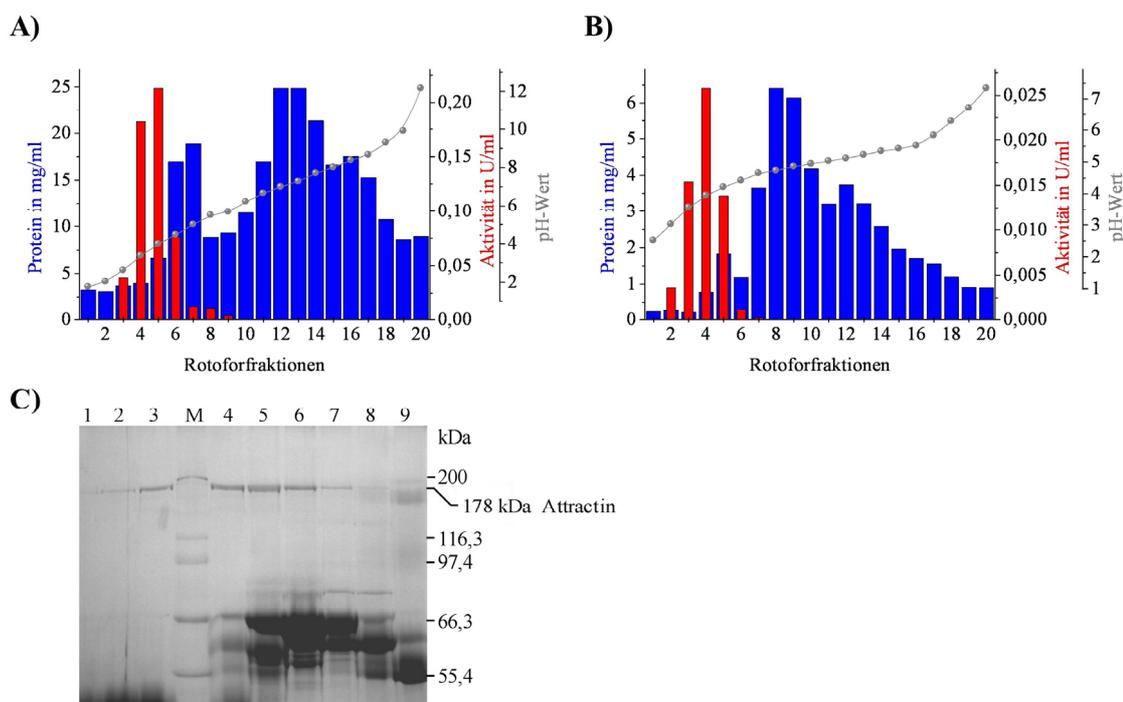


Abbildung 3-6: **Oben:** Trennprofile der präparativen IEF; **A:** im pH-Bereich zwischen 3 und 10; **B:** Refokussierung der Fraktionen 6-9 aus A; **Rote Balken:** DP4-ähnliche Aktivität in U/ml; **Blaue Balken:** Proteingehalt mg/ml; **Linie:** pH-Gradient; **C)** Gelelektropherogramm (SDS-PAGE) der Rotoforfraktionen 1 bis 9 von IEF A, M: Proteinstandard (Mark 12, Invitrogen)

Die Fraktionen mit den höchsten spezifischen Aktivitäten beider Fokussierungen (Fraktionen 3 bis 5 bei Fokussierung A und Fraktionen 2 bis 4 bei Fokussierung B (Refokussierung) wurden vereinigt. Zur Überprüfung, ob mit einer anschließenden präparativen nativen Elektrophorese ein Reinigungsfortschritt erzielt werden kann, wurden analytische, native

Polyacrylamidgelelektrophoresen mit verschiedenen Konzentrationen an Polyacrylamid durchgeführt. Die beste Auflösung gelang mit einem 6%igem Trenngel:

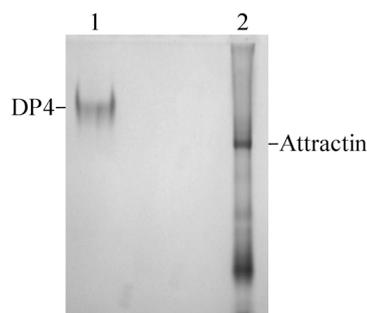


Abbildung 3-7: Gelelektropherogramm von DP4 und einer teilgereinigten Attractin-Fraktion nach einer 6%igen analytischen PAGE unter nativen Bedingungen; **Bahn 1:** snDP4, **Bahn 2:** vereinigte Proteinfraktion nach präparativer IEF

Präparative Elektrophorese und Anionenaustauschchromatographie

Die Probe wurde nach der isoelektrischen Fokussierung aufkonzentriert und mit 5-fach konzentriertem Probenpuffer versetzt. Die native elektrophoretische Trennung erfolgte nach den auf Seite 42 angegebenen Bedingungen. Zur vollen Ausschöpfung der Kapazität der präparativen PAGE wurde die Probe in einem ersten Lauf zunächst grob fraktioniert (Abbildung 3-8 A). Die Fraktionen 7-12 wurden vereinigt, konzentriert, mit 5-fachem nativem Probenpuffer versetzt und erneut auf die PrepCell-Apparatur mit einem frisch hergestellten Gelbett appliziert (Abbildung 3-8 B).

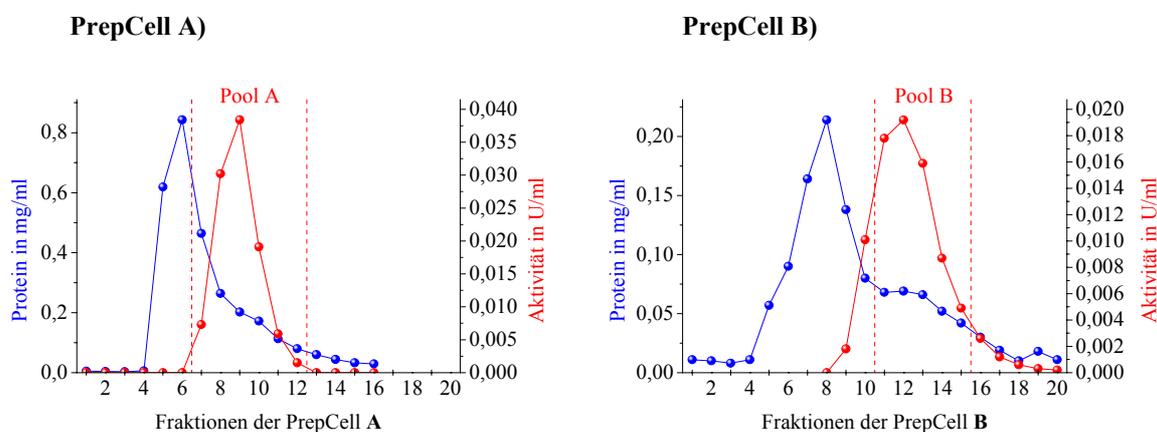


Abbildung 3-8: Fraktionen der nativen, präparativen Elektrophoresen; **Blau:** Proteinkonzentration in mg/ml; **Rot:** Aktivität in U/ml; **senkrechte rote Linien:** Vereinigte Fraktionen

Die anschließende Analyse durch eine SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen (Abbildung 3-9) zeigte bereits einen hohen Reinheitsgrad von Attractin. Die Abtrennung der geringfügigen, noch enthaltenen Verunreinigungen wurde durch eine Anionenaustauschchromatographie (UnoQ6) erreicht.

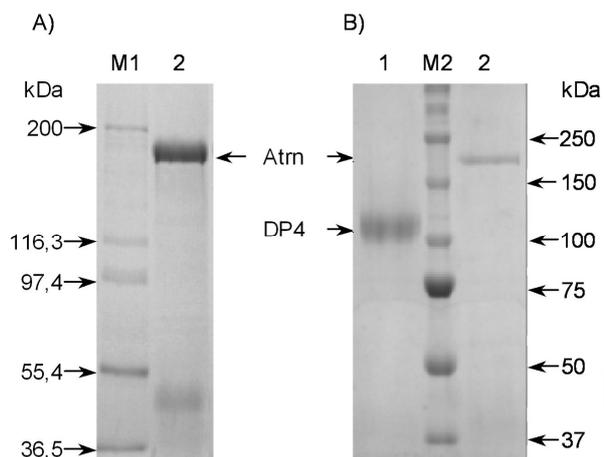


Abbildung 3-9: Elektropherogramme (7,5%ige SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen) nach verschiedenen Präparationsschritten **A:** nach nativer, präparativer Elektrophorese und **B:** anschließender Anionenaustauschchromatographie an UnoQ6; **Bahn M1:** Proteinstandard (Mark 12; Invitrogen); **Bahn M2:** Proteinstandard: (Dual Color; Biorad); **Bahn 1:** snDP4; **Bahn 2:** aus humanem Plasma aufgereinigte Attractin-Fraktion

Mittels MALDI-TOF-Analyse wurde das Molekulargewicht von Attractin auf 178,5 kDa bestimmt (Abbildung 3-10 A). Nach Deglykosylierung mit PNGase reduzierte es sich von auch mit SDS-Gelelektrophorese ermittelten 178 kDa auf 132 kDa (Abbildung 3-10 B) und entspricht damit etwa dem theoretischen Molekulargewicht von 132,5 kDa (Aminosäuren 84 bis 1272).

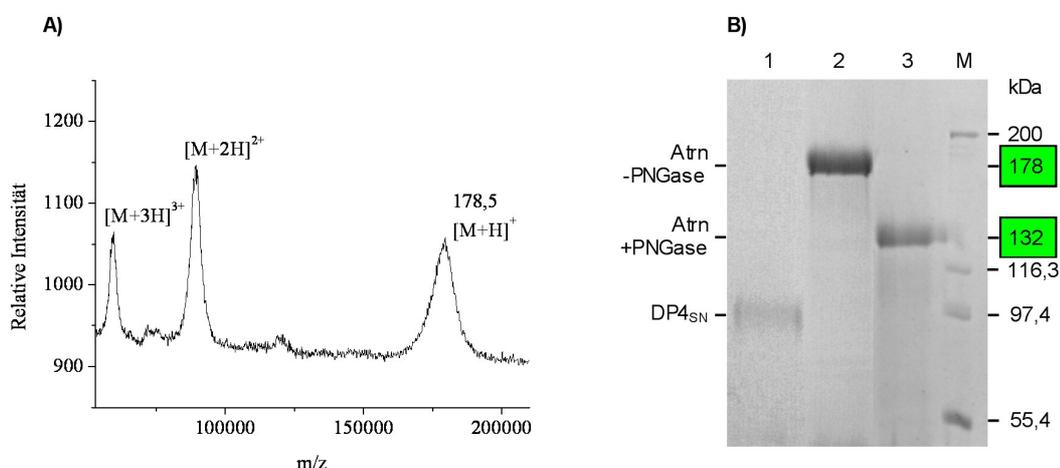


Abbildung 3-10: Bestimmung des Molekulargewichts der glykosylierten und deglykosylierten Attractin (Isoform 2) aus humanem Plasma; **A)** MALDI-TOF-Analyse des glykosylierten Proteins; **B)** Elektropherogramm nach SDS-PAGE (7,5%) **Bahn 1:** glykosylierte snDP4; **Bahn 2:** glykosyliertes Attractin; **Bahn 3:** mittels PNGase deglykosyliertes Attractin; **M:** Proteinstandard (Mark 12; Invitrogen)

Die N-terminale Sequenzierung ergab, dass es sich bei dem gereinigten Protein um die alternativ gespleißte lösliche 2. Isoform von Attractin (Atrn2) handelt. Diese ist N-terminal degradiert und startet mit Alanin an Position 84 nach einer Signalpeptidasespaltstelle.

```

01          11          21          31          41          51
MVA AAAAATEA RLRRRTAATA ALAGRSGGPH WDWDVTRAGR PGLGAGLRLE RLSPPLRPR
61          71          81          91          101        111
LLLLLLLLLSP PLLLLLLPCE AEAAAAAAV SGSAAAEAKE CDRPCVNGGR CNPPTGQCVC

```

Abbildung 3-11: Ergebnis der N-terminalen Sequenzierung nach Präparation A (abgebildet sind die N-terminalen 120 Aminosäuren von Attractin); Es wurde die N-terminal an einer Signalpeptidasespaltstelle degradierte Isoform 2, beginnend mit Alanin in Position 84, des humanen Attractins ermittelt. **Unterstrichen:** Diese Sequenz ist bei der anderen löslichen Isoform, Attractin 3, deletiert. **Rot, fett:** sequenzierte Aminosäuren

Bei Präparation A konnten ca. 2 mg humanes Attractin-2 aus Blutplasma isoliert werden. In Tabelle 3-2 ist das Reinigungsschema abgebildet. Die spezifische Aktivität betrug 0,32 U/mg. Da der einzige vorhandene Vergleichswert in der Literatur mit 1,78 U/mg (Duke-Cohan *et al.*, 1995) über dem hier erreichten lag, sollte die Präparation durch weitere Modifikationen verbessert werden.

Tabelle 3-2: Reinigungsschema der Präparation A von Attractin aus humanem Blutplasma

Schritt	Volumen		Aktivität		Proteingehalt		spezifische Aktivität [U/mg]	Reinigungs- faktor
	[ml]	[U]	[%]	[mg]	[%]			
Plasma	755	8,305	100,0	39066,0	100,0	0,00021	1,0	
Dialyse	770	8,162	98,3	35962,1	92,1	0,00023	1,1	
Blue-Sepharose	95	5,026	60,5	3365,6	8,6	0,00149	7,0	
Sp-Sepharose	261	4,354	52,4	850,5	2,2	0,00512	24,1	
Rotofor gesamt	10,8	1,609	19,4	69,42	0,18	0,02318	109,0	
PrepCell	23,1	0,979	11,8	6,774	0,017	0,144	687,9	
UnoQ6	11,0	0,664	8,0	2,101	0,0054	0,316	1505,9	

3.1.2 Modifikation der Reinigungsmethode (Präparation B)

PEG-Fällung und Chromatographie mittels Blue-Sepharose

Wie im vorherigen Abschnitt geschildert, war die Blue-Sepharose als initialer Schritt ein erfolgreicher, aber aufwendiger und langwieriger Prozess. Es bedurfte bei der eingesetzten Plasmamenge 50 Wiederholungen des Chromatographieschrittes. Aufgetautes Plasma und das sehr große Eluatvolumen mussten über einen langen Zeitraum gelagert und gekühlt werden. Daher wurde die fraktionierte Polyethylenglykolfällung mit der Blue-Sepharose kombiniert. Da durch die vorgeschaltete fraktionierte PEG-Fällung bereits 89% des Proteins abgetrennt wurden, konnte auch die Effektivität der Blue-Sepharose-Chromatographie gesteigert werden. Die nun auf 10 separate Läufe beschränkte Prozedur erreichte einen Reinigungsfaktor von 10,3 und ermöglichte den direkt folgenden Einsatz der präparativen IEF.

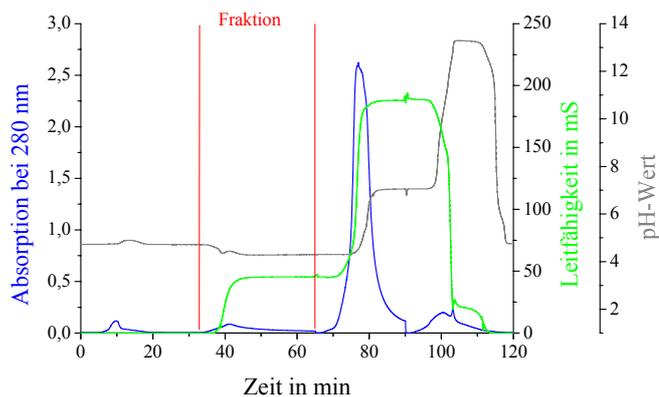


Abbildung 3-12: Trennprofil der Blue-Sepharose; **Blau:** Absorption bei 280 nm; **Grün:** Leitfähigkeit in mS; **Grau:** pH-Wert, **Rot:** separierte Fraktion

Präparative isoelektrische Fokussierung

Die Änderung der Prozedur machte sich vor allem durch ein verbessertes Trennverhalten der präparativen IEF bemerkbar. Durch die Senkung der Proteinmenge auf nur 1/4 der Gesamtkapazität der Rotofor ergab sich eine deutlich verbesserte Auflösung der Fokussierungsbereiche von enzymatischer Aktivität und Hauptproteinanteil (Abbildung 3-13). Auf eine Refokussierung konnte so verzichtet werden.

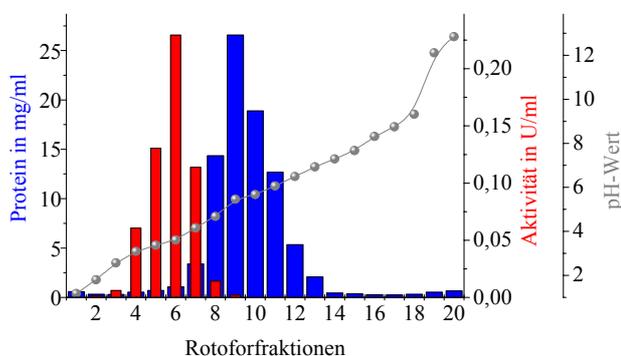


Abbildung 3-13: Trennprofil der präparativen IEF im pH-Bereich zwischen 3 und 10; **Rote Balken:** DP4-ähnliche Aktivität in U/ml; **Blaue Balken:** Proteingehalt mg/ml; **Graue Linie:** pH-Gradient

Anionenaustauschchromatographie mittels UnoQ6

Die Rotoforfraktionen 4 bis 6 wurden vereinigt, über Nacht gegen 20 mM Tris (pH 8,0) dialysiert und anschließend auf eine UnoQ6 appliziert. Unter den gewählten Bedingungen kann der größte Teil des in der Probe enthaltenen Proteins die Säule ungehindert passieren (s. Abbildung 3-14; Achsenunterbrechung). Die Elution des gebundenen Materials erfolgte durch eine schrittweise Anhebung der NaCl-Konzentration auf 50 mM und einen anschließenden linearen Gradienten von 50 mM auf 400 mM NaCl.

Im Unterschied zur oben beschriebenen Präparation A ergaben sich hier in der analytischen nativen PAGE (nicht gezeigt) sehr eng mit Attractin benachbarte Proteinbanden als

verbleibende Verunreinigung. Die präparative native Elektrophorese konnte daher nicht verwendet werden. Nach dem Zusammenfassen der Fraktionen 3 bis 5 wurde die Probe einer Kationenaustauschchromatographie an sp-Sepharose unterzogen.

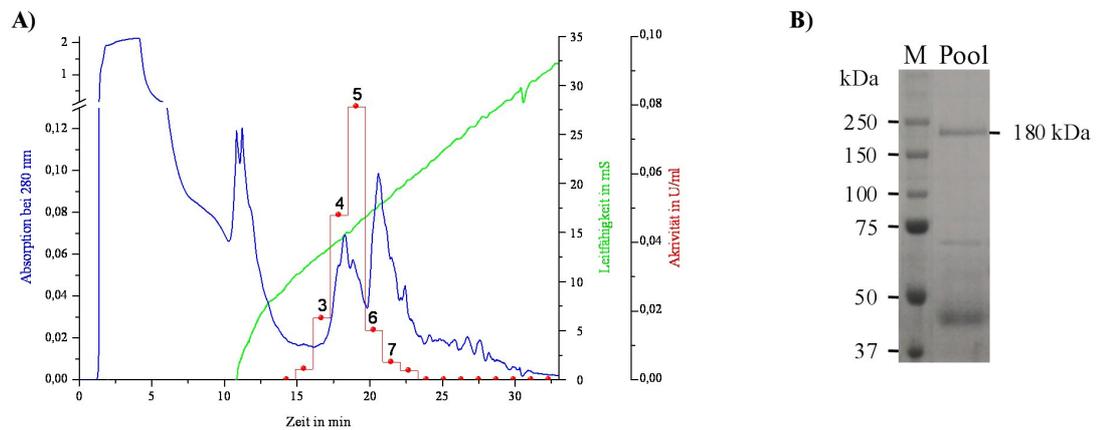


Abbildung 3-14: Ergebnis einer Anionenaustauschchromatographie mittels UnoQ6; **A)** Trennprofil; **Blau:** Absorption bei 280 nm, **Grün:** Leitfähigkeit in mS, **Rot:** DP4-Aktivität in U/ml; **B)** Elektropherogramm nach 7,5%iger SDS-PAGE (unter reduzierenden Bedingungen); **Pool:** (Fraktionen 3 bis 5) nach UnoQ6, Coomassie-Blue-Färbung; **M:** Marker „Dual Color“

Kationenaustauschchromatographie mittels sp-Sepharose

Diese abschließende Prozedur war bereits durch eine sehr niedrige Absorption bei 280 nm gekennzeichnet. Die enzymatische Aktivität eluierte in einem deckungsgleichen Proteinpeak bereits bei geringen NaCl-Konzentrationen (Abbildung 3-15).

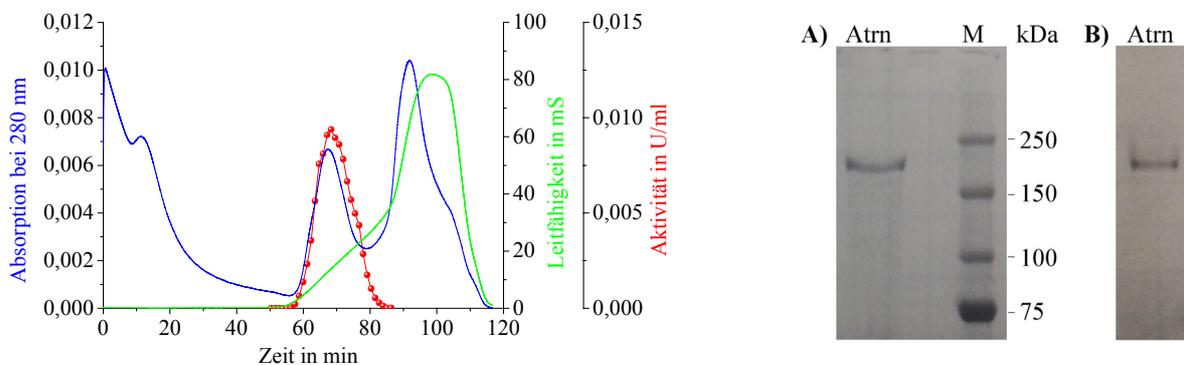


Abbildung 3-15: links: Trennprofil der Kationenaustauschchromatographie mittels sp-Sepharose; **Blau:** Absorption bei 280 nm; **Grün:** Leitfähigkeit in mS; **Rot:** Aktivität in U/ml; **rechts:** Elektropherogramme der erhaltenen Attractin-Fraktion nach Präparation B; Proteinfärbung mit Coomassie-Blue; **A)** 7,5%ige SDS-PAGE, **B)** 7,5%ige native PAGE; **Atrn:** präparierte Serumfraktion, **M:** Proteinstandard „Dual Colour“

Bei dieser Präparation konnte eine spezifische Aktivität von 4,1 U/mg (Gly-Pro-pNA als Substrat) erreicht werden. Bezogen auf die Ausgangsaktivität im humanen Plasma entspricht dies einer ca. 14500-fachen Aufreinigung (siehe Tabelle 3-3) und übertrifft unsere bisherigen und auch die von Duke-Cohan beschriebenen Ergebnisse. Außerdem ist das Resultat vergleichbar mit homogenen DP4-Reinigungen aus humanem Plasma (Iwaki-Egawa *et al.*, 1998). Dennoch konnte keine DP4 in diesen Proben nachgewiesen werden. Um der DP4-

ähnlichen Aktivität auf den Grund zu gehen wurden im Folgenden verschiedene Charakterisierungen und weitere Präparationen durchgeführt.

Tabelle 3-3: Reinigungsschema der Präparation B von Attractin aus humanem Blutplasma

Schritt	Volumen	Aktivität		Proteingehalt		spezifische Aktivität	Reinigungsfaktor
	[ml]	[U]	[%]	[mg]	[%]	[U/mg]	
Plasma	750	9,075	100,0	34560,0	100,0	0,00029	1,0
PEG-Fällung	122	4,392	48,4	3799,4	11,0	0,00119	4,2
Blue-Sepharose	46,0	3,280	36,1	266,3	0,771	0,01231	43,0
Rotofor	8,9	1,178	13,0	12,22	0,035	0,09636	336,4
UnoQ6	7,0	0,651	7,2	1,344	0,0039	0,48438	1690,9
Sp-Sepharose	7,0	0,609	6,7	0,147	0,00043	4,14286	14462,3

3.2 Enzymatische Charakterisierung von Plasma-Attractin

Attractin wurde aufgrund seiner enzymatischen Ähnlichkeit zu DP4 bereits in die Gruppe der DASH eingeordnet. Dennoch sollte zunächst eine grobe Klassifizierung des Enzyms erfolgen. Dass es sich hierbei um eine DP4-ähnliche Aktivität handelt war dabei vorrausgesetzt, da dies bereits Grundlage der Präparationen war.

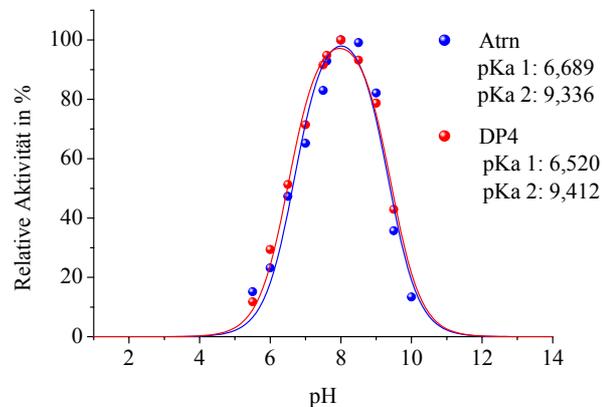


Abbildung 3-16: pH-Profile der Aktivitäten von snDP4 and Attractin; Messbedingungen: 400 μ M Gly-Pro-pNA, 37°C, Ionenstärke = 0.125; Blaue Punkte: Attractin, Rote Punkte: snDP4; Blaue Linie: Regression an die Messwerte von Attractin; Rote Linie: Regression an die Messwerte von snDP4; Software zur Berechnung: GraFit, Version 5.0.11, Erithacus Software Limited

Zunächst wurden pH- und Ionenstärkeoptimum des Umsatzes von Gly-Pro-pNA für Attractin bestimmt. Sowohl für DP4 als auch für Attractin wurde ein pH-Optimum von 8,0 ermittelt (Abbildung 3-16). Ein pH-Aktivitätsbereich zwischen pH 5 und pH 9 ist typisch für die meisten Enzyme. Zudem wurde festgestellt, dass beide Enzyme auch eine fast identische Abhängigkeit von der Ionenstärke, mit einem Optimum zwischen $I=0,113$ und $I=0,131$ aufweisen.

Ausschluss bekannter DP4-ähnlicher Aktivitäten

Für DP2 ist ein pH-Optimum im leicht sauren Bereich zwischen pH 5,5 und pH 6,0 charakteristisch (Leiting *et al.*, 2003). Sowohl DP4 als auch die DP4-ähnliche Aktivität von Attractin unterscheiden sich in diesem Punkt deutlich. DP2 kann somit als Quelle der DP4-ähnlichen Aktivität des präparierten Attractins ausgeschlossen werden.

Metallionen sind für eine große Gruppe von Enzymen von großer struktureller bzw. als Cofaktoren von katalytischer Bedeutung. Aus diesem Grund wurde der Einfluss des Chelators EDTA und einiger divalenter Metallionen auf die Katalyse untersucht. Die eingesetzten Ionen hemmen die Aktivität beider Enzyme mit sehr ähnlichem Profil ($Zn^{2+} > Cu^{2+} > Co^{2+} > Ca^{2+}$). Zink ist als potenter Inhibitor der DP4 bekannt. Der IC_{50} der Hemmung durch Zn^{2+} beträgt für humane rekombinante DP4 (hrDP4) $4,54 \times 10^{-6}$ M und für Attractin $3,04 \times 10^{-6}$ M. EDTA ist im Konzentrationsbereich von 1×10^{-6} M bis 1×10^{-2} M nicht in der Lage die Aktivität von Attractin oder DP4 zu beeinflussen. Eine Metalloproteaseaktivität des präparierten Attractin kann somit ebenfalls ausgeschlossen werden.

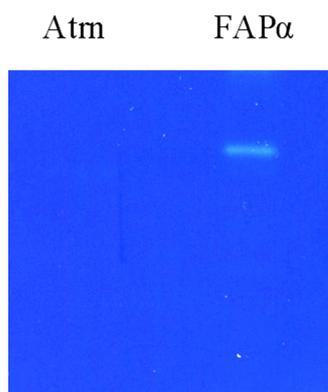


Abbildung 3-17: Analyse der Gelatinaseaktivität von gereinigtem Attractin aus humanem Plasma und hrFAP α mittels Gelatinase-Gel-Zymographie; Es wurden Proteinmengen mit gleichen totalen Aktivitäten gegenüber dem Substrat Gly-Pro-AMC aufgetragen.

Da das sehr eng mit DP4 verwandte Enzym FAP α neben der Dipeptidylpeptidase- auch eine Kollagenase- und Gelatinase-Aktivität besitzt, sollte überprüft werden, ob dies auch für Attractin zutrifft. Außerdem ist auch eine Verunreinigung der Attractin-Proben durch FAP α möglich, da dieses Enzym bereits aus Serum präpariert wurde (Collins *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004). In einer dazu durchgeführten Gelatinase-Gel-Zymographie wurde im Unterschied zu rekombinantem FAP α für die eingesetzte Attractinfraktion keine Gelatinaseaktivität nachgewiesen (Abbildung 3-17). Dabei wurden gleiche totale Aktivitäten (bezüglich Gly-Pro-pNA) aufgetragen. Außerdem sollte nach (Aoyama *et al.*, 2001) die Aktivität von FAP α durch EDTA gesteigert werden, dies trifft aber für die aus dem Plasma präparierte Aktivität nicht zu.

3.2.2 Untersuchungen zur Substratspezifität von Attractin

Niedermolekulare fluorogene Substrate

Zur Untersuchung der Substratspezifität der von Attractin katalysierten Peptidhydrolyse wurden fluorogene Substrate im Vergleich zu DP4 vermessen. DP4 ist eine prolinspezifische Peptidase und bevorzugt Prolin in der P₁-Position. Einige andere Aminosäuren werden von dem Enzym ebenfalls in P₁-Position akzeptiert (siehe Einleitung). Die Messungen für Attractin und DP4 sind in Tabelle 3-4 als relative spezifische Aktivitäten im Vergleich zur Hydrolyse von Gly-Pro-AMC gegenübergestellt. Dazu wurde zuvor sichergestellt, dass Attractin und DP4 für dieses Substrat einen vergleichbaren K_m-Wert aufweisen (Tabelle 3-5). Für weitere der untersuchten Substrate wurde anschließend ebenfalls der K_m-Wert bestimmt.

Tabelle 3-4: Vergleich der relativen spezifischen Aktivität von DP4 und Attractin gegenüber niedermolekularen fluorogenen Substraten (Substratkonzentration 144 µM)

Substrat	Aktivität in % Gly-Pro-AMC-Umsatz	
	Attractin	hr DP4
Gly-Pro-AMC	100,00	100,00
Ala-Pro-AMC	88,60 ± 2,63	89,36 ± 2,47
Lys-Pro-AMC	132,00 ± 1,71	122,00 ± 0,79
His-Pro-AMC	46,85 ± 2,02	39,15 ± 1,83
Lys-Ala-AMC	9,40 ± 0,13	9,56 ± 0,32
His-Ala-AMC	3,96 ± 0,19	2,24 ± 0,15
Gly-Ala-AMC	0,50 ± 0,08	0,64 ± 0,16
Gly-Ser-AMC	kein Umsatz	kein Umsatz
His-Gly-AMC	kein Umsatz	kein Umsatz
Gly-Gly-AMC	kein Umsatz	kein Umsatz
His-Thr-AMC	0,29 ± 0,09	0,40 ± 0,05
Gly-Phe-AMC	kein Umsatz	kein Umsatz
Gly-Arg-AMC	kein Umsatz	kein Umsatz
Gly-Pro-Pro-AMC	18,80 ± 0,35	18,44 ± 0,63
Pro-AMC	kein Umsatz	kein Umsatz
Arg-AMC	kein Umsatz	kein Umsatz

Tabelle 3-5: Vergleich von K_m- und k_{cat}-Werten des Umsatzes fluorogener Dipeptid-Derivate durch DP4 und Attractin; (mind 3-fach Bestimmung und Angabe der Standardabweichung)

Substrat	Attractin		hr DP4	
	K _m -Wert [M]	k _{cat} [s ⁻¹]	K _m -Wert [M]	k _{cat} [s ⁻¹]
Ala-Pro-AMC	(1,14 ± 0,08) × 10 ⁻⁵	1,07 ± 0,02	(1,31 ± 0,03) × 10 ⁻⁵	60,45 ± 0,87
His-Pro-AMC	(1,05 ± 0,12) × 10 ⁻⁵	0,41 ± 0,03	(1,45 ± 0,09) × 10 ⁻⁵	23,94 ± 0,32
Lys-Pro-AMC	(3,07 ± 0,14) × 10 ⁻⁵	1,49 ± 0,01	(3,19 ± 0,03) × 10 ⁻⁵	82,72 ± 1,35
Gly-Pro-AMC	(5,89 ± 0,07) × 10 ⁻⁵	1,20 ± 0,03	(6,29 ± 0,01) × 10 ⁻⁵	72,41 ± 0,11
His-Ala-AMC	(1,02 ± 0,25) × 10 ⁻⁴	0,14 ± 0,01	(1,10 ± 0,14) × 10 ⁻⁴	7,56 ± 0,08
Lys-Ala-AMC	(5,67 ± 0,55) × 10 ⁻⁴	0,44 ± 0,03	(5,34 ± 0,31) × 10 ⁻⁴	21,83 ± 1,10

Aus den Tabellen geht hervor, dass Attractin eine Dipeptidylpeptidase-Aktivität besitzt. Der Umsatz des Substrates ist sehr stark von der Aminosäure in P₁-Position bestimmt, wobei Prolin bevorzugt wird. Auch Alanin wird in P₁-Position akzeptiert, die Spaltung erfolgt aber mit geringerer Effizienz. Substrate mit Serin oder Threonin werden nur sehr schlecht oder gar nicht umgesetzt. Der Einfluss der Aminosäure in P₂-Position auf die Hydrolyse ist bedeutend geringer. Insgesamt ist zu bemerken, dass die Substratspezifität für beide Enzyme auffällig ähnlich ist.

Potentielle physiologische Substrate

GIP (*Glucose-dependent insulinotropic polypeptide*) gehört zur Gruppe der Inkretine. Es bindet in seiner GIP₁₋₄₂-Form an den G-Protein gekoppelten GIP-Rezeptor. So unterstützt das Peptid z.B. zusätzlich zur Glukose die Insulinseznernierung aus den β -Zellen des Pankreas. Darüber hinaus hat es einen wichtigen Einfluss auf die Körpergewichtsregulation. DP4 katalysiert die Abspaltung des N-terminalen Tyr-Ala. Das N-terminal verkürzte GIP ist inaktiv (Kieffer *et al.*, 1995; Pauly *et al.*, 1996). Nach Generierung von GIP₃₋₄₂ ist, nach der in der Einleitung angegebenen Substratspezifität der DP4, auch die Abspaltung des 2. Dipeptides Glu-Gly möglich. Laut Tabelle 3-4 ist aber höchstens eine sehr geringe Effizienz der Spaltung nach Glycin zu erwarten.

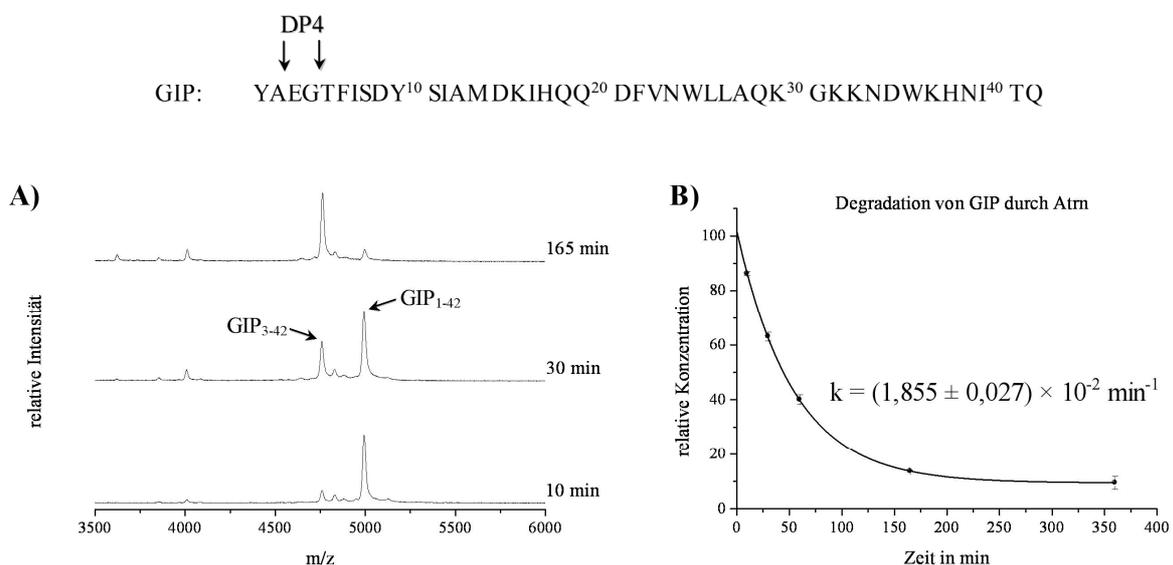


Abbildung 3-18: Massenspektrometrische Analyse der Hydrolyse von GIP während der Inkubation von 25 μM GIP mit Attractin (0,35 mU/Ansatz) in 40 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,6) bei 37°C; A) Degradation von GIP zu GIP₃₋₄₂; B) Zeitabhängige prozentuale Abnahme von GIP₁₋₄₂ (Summe aus GIP₁₋₄₂ und GIP₃₋₄₂ ergibt 100%)

Auch durch die aus Plasma gereinigte Attractin-Probe wird die Abspaltung von Tyr-Ala katalysiert (Abbildung 3-18). Die Bildung von GIP₅₋₄₂ wurde im Versuchszeitraum von 360 min jedoch nicht beobachtet.

Neuropeptid Y (NPY): Man kennt derzeit 6 verschiedene Y-Rezeptorsubtypen (Y1-Y6, fünf beim Menschen), deren Spezifität noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Wie in der Einleitung gezeigt, ist das Neuropeptid Y an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt. Dies geschieht durch die Stimulation der NPY-Rezeptoren Y1 und Y5 (Inui 1999). Y1 vermittelt zudem anxiolytische und sedative Effekte (Heilig, 1993). Während NPY₁₋₃₆ mit K_D-Werten im unteren nanomolaren Bereich an alle Rezeptoren bindet, wird durch eine N-terminale Degradation die Spezifität geändert. NPY₃₋₃₆, wie es durch DP4 generiert wird, bindet nicht an Y1, aber an Y2 (Grandt *et al.*, 1996), der an der Modulation (Hemmung) von zentralen und peripheren Neurotransmittern wie Glutamat, Noradrenalin und Adrenalin beteiligt ist.

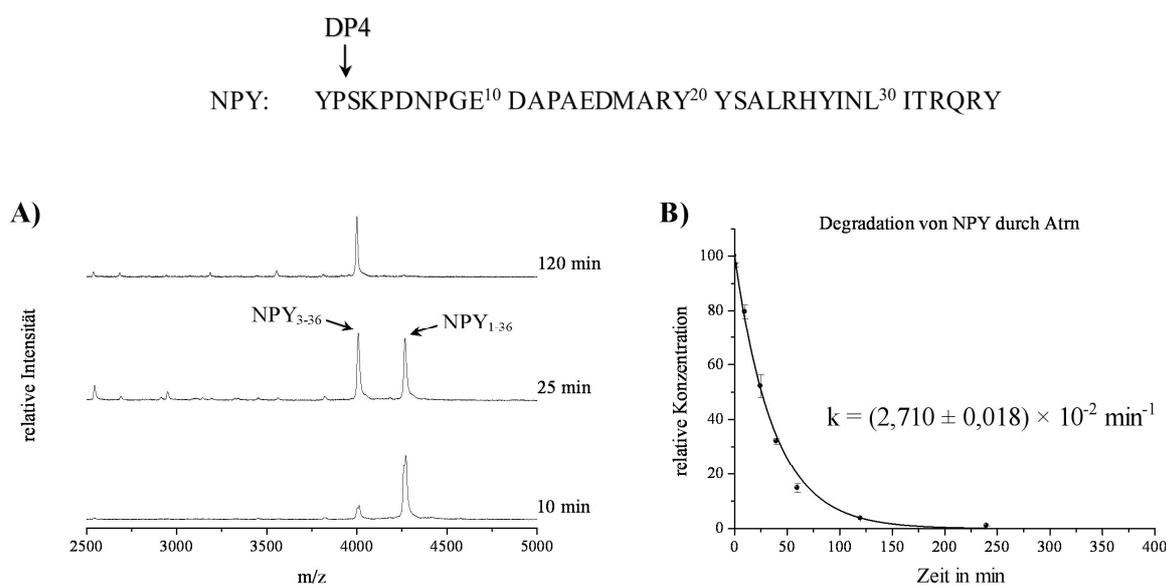
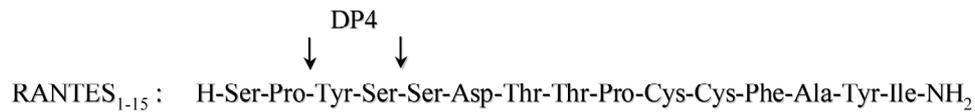


Abbildung 3-19: Massenspektrometrische Analyse der Hydrolyse von NPY während der Inkubation von 25 μM NPY mit Attractin (0,35 mU/Ansatz) in 40 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,6) bei 37°C; **A)** Degradation von NPY₁₋₃₆ zu NPY₃₋₃₆ **B)** Zeitabhängige prozentuale Abnahme von NPY₁₋₃₆ (Summe aus NPY₁₋₃₆ und NPY₃₋₃₆ ergibt 100%)

Attractin akzeptiert ebenfalls NPY als Substrat und setzt es mit einer zur GIP-Degradation vergleichbaren Geschwindigkeitskonstanten zu NPY₃₋₃₆ um (Abbildung 3-19). Ähnlich der Spezifität von DP4, die Substrate mit Prolin in P₁'-Position nicht akzeptiert, wird auch hier das Dipeptid Ser-Lys nicht abgespalten.

Das Chemokin **RANTES** (*regulated on activation, normal T cell expresses and secreted*, auch CCL5) ist ein aus 68 Aminosäuren bestehendes Protein, dessen Rezeptor (CCR5) auch eine wichtige Rolle bei der HIV-Infektion spielt.

Beim Vergleich des Abbaus von RANTES, einem physiologischen Substrat der DP4, durch Attractin und DP4, wurde von Duke-Cohan (Duke-Cohan *et al.*, 2000) ein wesentlicher Unterschied festgestellt. Die Substratspezifität der DP4 ermöglicht demnach sowohl die Abspaltung des ersten (Ser-Pro) als auch des zweiten Dipeptides (Tyr-Ser):



Nach Duke-Cohan wird im Unterschied zu DP4 durch Attractin nur die erste (Ser-Pro) nicht aber die zweite (Tyr-Ser) Abspaltung katalysiert. Dies wurde als ein wichtiger Punkt für den Beweis einer eigenständigen Peptidaseaktivität von Attractin herangezogen, da dies eine differenzierte Substratspezifität belegt. Durch uns konnte dies klar widerlegt werden (Abbildung 3-20).

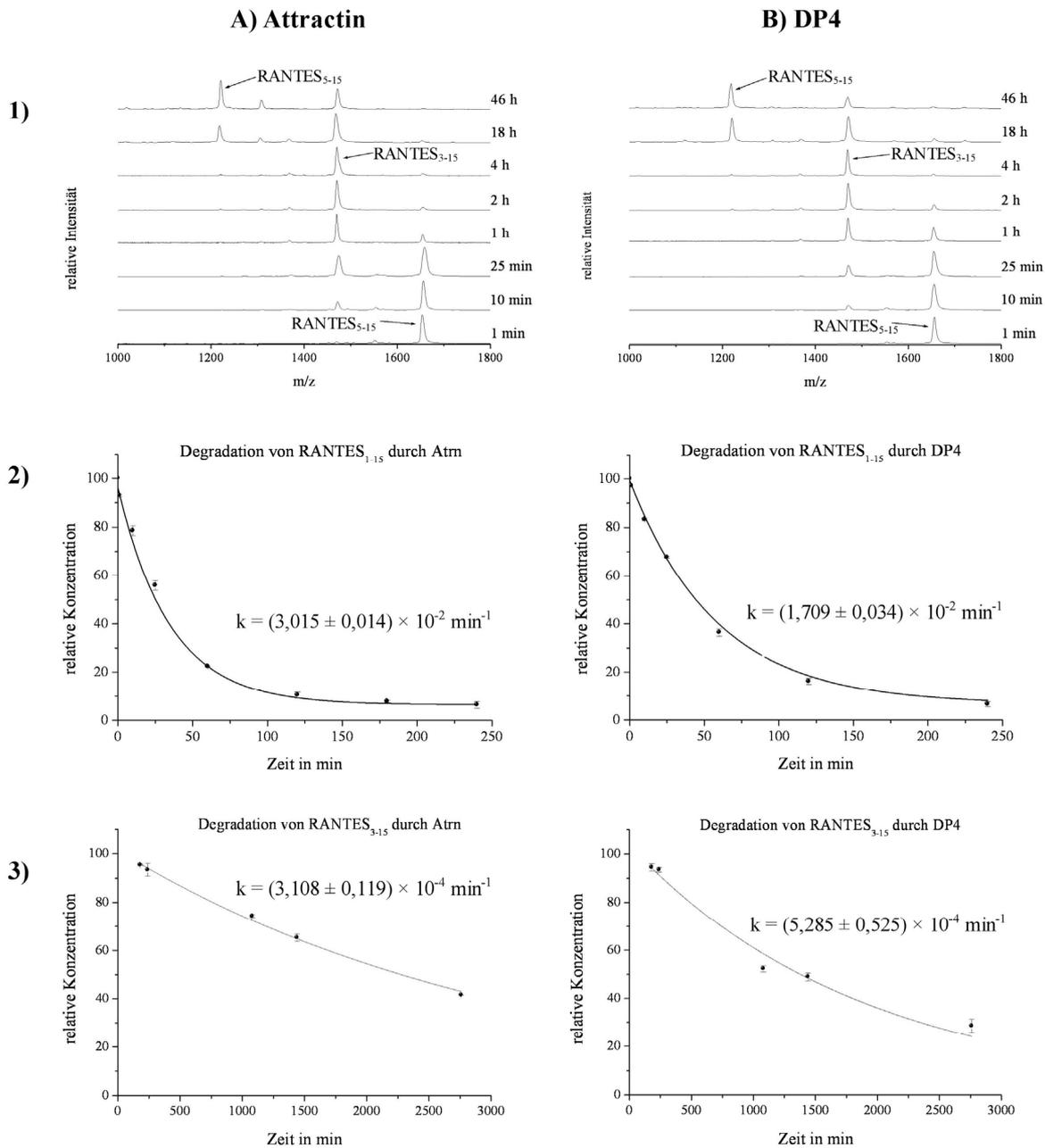


Abbildung 3-20: MS-Analyse der Hydrolyse von RANTES₁₋₁₅ zu RANTES₃₋₁₅ bzw. RANTES₅₋₁₅ während der Inkubation von 25 μM RANTES₁₋₁₅ mit **A)** (0,35 mU/Ansatz) Attractin bzw. **B)** (0,35 mU/Ansatz) DP4 in 40 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,6) bei 37°C; **1)** Massenspektren von RANTES₁₋₁₅; **2)** Degradation von RANTES₁₋₁₅ zu RANTES₃₋₁₅; **3)** Degradation von RANTES₃₋₁₅ zu RANTES₅₋₁₅

Sowohl DP4 als auch Attractin wurden auf eine Aktivität von 0,35 mU (bezogen auf Gly-Pro-pNA) im Ansatz eingestellt. Wie DP4 ist auch Attractin zur Abspaltung des Dipeptides Tyr-Ser in der Lage. Allerdings wird erst durch diesen genauen Vergleich deutlich, dass dieser Schritt in beiden Fällen mit sehr geringer Effizienz verläuft.

Insgesamt zeigt sich, wie auch bei der Untersuchung von Dipeptidderivaten, eine klare Spezifität der in Attractin-Isolaten enthaltenen DP4-ähnlichen Aktivität für die Katalyse von Substraten mit Prolin und schwächer auch Alanin in P₁-Position.

Verschiedene mögliche Quellen der Verunreinigung der Attractin-Proben durch andere DP4-ähnliche Aktivitäten konnte anhand dieser Untersuchungen bereits ausgeschlossen werden. Die aus verschiedenen Veröffentlichungen bekannte, als sehr ähnliche beschriebene Substratspezifität von Attractin und DP4 konnte bestätigt werden, obwohl der hohe Grad der Übereinstimmung auffällig ist. Zudem wurden durch unsere Analysen auch Unterschiede zu den aus der Literatur bekannten Daten gefunden. Eine Differenzierung in der Substratspezifität von Attractin und DP4 konnte nicht nachvollzogen werden.

3.2.3 Untersuchungen zur Inhibitorspezifität von Attractin

Zur weiteren Charakterisierung der präparierten Plasma-DP4-Aktivität wurden IC₅₀-Werte sowie die Inhibierungskonstante K_i für verschiedene reversible Inhibitoren vergleichend zur hrDP4 bestimmt. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 3-6 zusammengestellt.

Tabelle 3-6: Vergleich von IC₅₀ und K_i-Werten für ausgewählte Inhibitoren zwischen präpariertem Attractin und hrDP4; (mind 3-fach Bestimmung und Angabe der Standardabweichung)

Inhibitor	IC ₅₀ [M]		K _i [M]	
	Attractin	hrDP4	Attractin	hrDP4
SC224	$(1,18 \pm 0,01) \times 10^{-5}$	$(1,82 \pm 4,91) \times 10^{-6}$	$(1,66 \pm 0,09) \times 10^{-6}$	$(1,14 \pm 0,07) \times 10^{-6}$
SC225	$(1,54 \pm 0,04) \times 10^{-5}$	$(2,41 \pm 0,42) \times 10^{-6}$	$(1,68 \pm 0,10) \times 10^{-6}$	$(1,44 \pm 0,11) \times 10^{-6}$
SC228	$(3,26 \pm 0,08) \times 10^{-6}$	$(1,84 \pm 0,24) \times 10^{-6}$	$(6,40 \pm 0,32) \times 10^{-7}$	$(6,87 \pm 0,67) \times 10^{-7}$
SC229	$(1,14 \pm 0,10) \times 10^{-6}$	$(1,97 \pm 0,40) \times 10^{-6}$	$(9,33 \pm 0,46) \times 10^{-7}$	$(7,47 \pm 0,41) \times 10^{-7}$
SC231	$(2,17 \pm 0,20) \times 10^{-6}$	$(4,13 \pm 1,56) \times 10^{-6}$	$(1,68 \pm 0,09) \times 10^{-6}$	$(8,69 \pm 0,26) \times 10^{-7}$
SC261	$(6,42 \pm 0,12) \times 10^{-5}$	$(9,37 \pm 0,67) \times 10^{-5}$	$(1,48 \pm 0,11) \times 10^{-5}$	n.b.
SC273	$(1,85 \pm 0,10) \times 10^{-5}$	$(1,58 \pm 0,14) \times 10^{-5}$	$(4,80 \pm 0,08) \times 10^{-6}$	n.b.
SC277	$(1,09 \pm 0,09) \times 10^{-5}$	$(1,10 \pm 0,04) \times 10^{-5}$	$(5,41 \pm 0,09) \times 10^{-6}$	n.b.
SC278	$(6,95 \pm 0,73) \times 10^{-5}$	$(1,27 \pm 0,03) \times 10^{-5}$	$(3,89 \pm 0,06) \times 10^{-5}$	n.b.
Lys(NO ₂)-thia	$(2,72 \pm 0,17) \times 10^{-7}$	$(2,22 \pm 0,04) \times 10^{-7}$	$(3,68 \pm 0,25) \times 10^{-7}$	$(4,77 \pm 0,26) \times 10^{-7}$
Lys(NO ₂)-pyrr	$(7,47 \pm 0,15) \times 10^{-7}$	$(6,15 \pm 0,20) \times 10^{-7}$	$(3,21 \pm 0,08) \times 10^{-7}$	$(1,51 \pm 0,09) \times 10^{-7}$
Gln-Thia	$(1,76 \pm 0,04) \times 10^{-6}$	$(1,53 \pm 0,05) \times 10^{-5}$	$(5,06 \pm 0,13) \times 10^{-7}$	$(4,89 \pm 0,18) \times 10^{-7}$

n.b.: nicht bestimmt

Die beiden weiterhin zur Charakterisierung eingesetzten Inhibitoren DP4I1 (DP4-Inhibitor) und DP8/9I1 (DP8/9-Inhibitor) zeichnen sich durch eine sehr hohe Spezifität gegenüber allen

anderen in der Literatur getesteten DP4-ähnlichen Enzymen aus (Lankas *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005). Dies kann durch die hier getesteten Enzyme bestätigt und erweitert werden (Tabelle 3-7 und Abbildung 3-21). DP4I1 bewirkt gegenüber Enzymen, die strukturell eng mit DP4 verwandt sind und zum Teil sehr ähnliche Substrat- und Inhibitorspezifitäten besitzen, kaum eine Hemmung. Im Gegensatz dazu inhibiert DP4I1 beide DP4-Formen und auch Attractin sehr potent. Die ermittelten Konstanten sind annähernd identisch.

Tabelle 3-7: IC₅₀ und K_i-Werte für den DP4-spezifischen Inhibitor DP4I1 und den DP8/9-spezifischen Inhibitor DP8/9I1 für einige prolinspezifische Peptidasen; (mind 3-fach Bestimmung und Angabe der Standardabweichung)

	IC ₅₀ [M]		K _i [M]	
	DP4I1	DP8/9I1	DP4I1	DP8/9I1
Atrn	$(3,25 \pm 0,98) \times 10^{-8}$	$(1,82 \pm 0,29) \times 10^{-5}$	$(5,94 \pm 0,71) \times 10^{-9}$	$(3,67 \pm 0,32) \times 10^{-6}$
hrDP4	$(3,35 \pm 1,10) \times 10^{-8}$	$(1,25 \pm 0,07) \times 10^{-5}$	$(7,36 \pm 1,41) \times 10^{-9}$	$(3,38 \pm 0,78) \times 10^{-6}$
snDP4	$(3,89 \pm 0,42) \times 10^{-8}$	$(3,02 \pm 0,42) \times 10^{-6}$	$(1,51 \pm 0,83) \times 10^{-8}$	$(8,12 \pm 0,64) \times 10^{-7}$
DP8	$(3,72 \pm 1,09) \times 10^{-5}$	$(3,44 \pm 0,37) \times 10^{-8}$	$(2,41 \pm 0,23) \times 10^{-5}$	$(6,48 \pm 0,45) \times 10^{-9}$
DP9	$(1,13 \pm 0,15) \times 10^{-4}$	$(2,81 \pm 0,26) \times 10^{-8}$	n. b.	$(6,47 \pm 0,08) \times 10^{-9}$
DP2	$(1,85 \pm 0,85) \times 10^{-4}$	$(2,93 \pm 0,08) \times 10^{-5}$	n. b.	$(5,76 \pm 0,51) \times 10^{-6}$
PEP	$(1,11 \pm 0,10) \times 10^{-4}$	$(9,88 \pm 0,13) \times 10^{-5}$	n. b.	n. b.
FAP α	* $>1,00 \times 10^{-4}$	** $>1,00 \times 10^{-4}$	-	-
APP	* $>1,00 \times 10^{-4}$	** $>1,00 \times 10^{-4}$	-	-

*(Kim *et al.*, 2005); **(Lankas *et al.*, 2005)

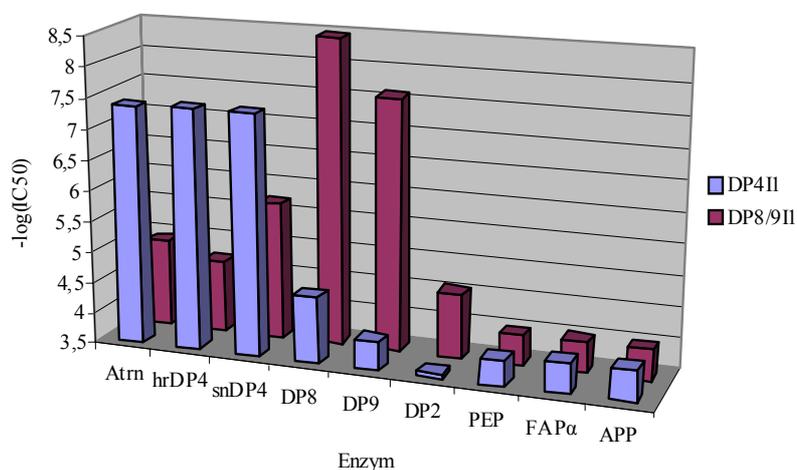


Abbildung 3-21: Vergleich der Spezifität des DP4 Inhibitors DP4I1 und des DP8/9-spezifischen Inhibitors DP8/9I1 für einige prolinspezifische Peptidasen; angegeben ist hier der negative dekadische Logarithmus des IC₅₀ (die Werte für FAP α und APP stellen Literaturdaten dar (Lankas *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005))

Die in gereinigten Attractinfraktionen enthaltene DP4-ähnliche Aktivität lässt sich durch die vorangegangenen und auch durch diesen Charakterisierungsschritt klar von allen anderen DASH und von PEP unterscheiden. Allerdings ist eine Verunreinigung der Fraktionen durch

DP4 nicht nur nicht auszuschließen, sondern scheint aufgrund der hohen Ähnlichkeit in der Substrat- und Inhibitorspezifität zu humaner rekombinanter DP4 sehr wahrscheinlich.

Ein weiterer Punkt war die Untersuchung irreversibler Inhibitoren der DP4. Die Inhibierung von Attractin durch Verbindungen wie PMSF und DFP, wies das Protein als Serinprotease aus. Der Versuch des Labelns des aktiven Serins mit ^3H -DFP, wie es von Duke-Cohan als Beweis herangezogen wurde, wurde hier verworfen, da eine potentielle Verunreinigung der Probe durch sehr gering konzentrierte DP4 nicht detektiert werden kann. Unspezifische Bindung von DFP an stark konzentriertes Attractin machte dies unmöglich.

3.3 Adenosindeaminase-Affinität des humanen Attractin

In einem wesentlichen Kriterium, der Affinität zur Adenosindeaminase (ADA, EC 3.5.4.4), unterscheiden sich humane DP4 und Attractin. Die Bindung an ADA ist eine spezifische Eigenschaft von DP4, zu der Attractin nicht befähigt ist. Zur Untersuchung dieses Parameters, wurde ADA an NHS-aktivierter Sepharose immobilisiert. Eine Verunreinigung von Attractin durch DP4 ist nicht auszuschließen, da enzymatische Charakterisierungen fast identische Resultate für hrDP4 und die DP4-ähnliche Aktivität aus Plasma-Attractin Proben lieferten. Um die Gesamtaktivität in Attractin-Proben zu erhöhen, wurde der Maßstab der Reinigung von Attractin auf ein Ausgangsvolumen von 1560 ml humanem Plasma erhöht. Nach einer Reinigungsprozedur analog zur beispielhaften Präparation B war auch in diesem Fall das Ergebnis der Präparation eine einzelne Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 180 kDa nach SDS-PAGE (Abbildung 3-22 A). Aufgrund der Maßstabsvergrößerung war es allerdings in diesem Fall erstmals möglich, auch eine DP4-Bande durch Western Blot Analyse in der Attractinfaktion zu detektieren (Abbildung 3-22 B). Die Fraktionen mit DP4-Aktivität wurden dazu vereinigt und sehr stark aufkonzentriert.

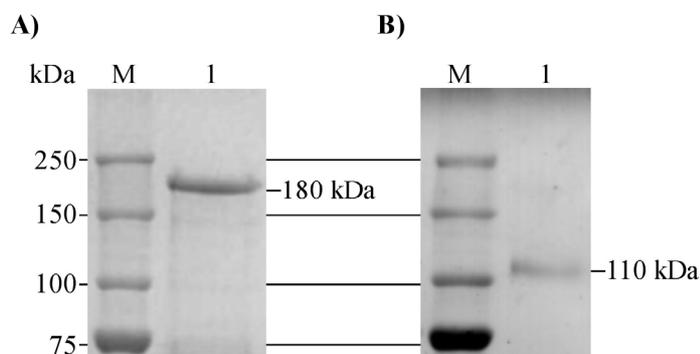


Abbildung 3-22: Analyse der Attractin-Probe nach Präparation C (Maßstabsvergrößerung) vor ADA-Affinitätschromatographie mittels SDS-PAGE; **A)** SDS-PAGE und Coomassie-Blue-Färbung; **B)** Anti-DP4 Western Blot mittels polyklonalem DP4-Antikörper; **Bahn M)** Proteinstandard Dual Colour; **Bahn I)** Attractin-Probe vor ADA-Affinitätschromatographie

Eine Probe mit einer Gesamtaktivität von 0,53 U wurde 10-fach (auf ein Gesamtvolumen von 19 ml) in Equilibrierungspuffer verdünnt und mit einer Flussrate von 0,35 ml/min auf die zuvor hergestellte ADA-Affinitätssäule appliziert. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte durch Unterdrückung von Wechselwirkungen unpolarer Gruppen mittels salzfreiem 2 mM Tris-Puffer. Insgesamt 99,7% der aufgetragenen Ausgangsaktivität wurden anschließend im Eluat nachgewiesen. Das bedeutet, dass die entsprechenden Enzyme (DP4-Aktivität) an der Säule gebunden und eluiert wurden. Attractin zeigte keine Affinität zur ADA und wurde in einem stabilen, löslichen, aber enzymatisch inaktiven Zustand im Durchlauf der Chromatographie aufgefangen.

Aus Abbildung 3-23 und Abbildung 3-24 geht hervor, dass die aus humanem Plasma präparierte Attractin-Probe eine DP4-ähnliche Aktivität beinhaltet, die eindeutig eine ADA-Affinität aufweist. Darüber hinaus besitzt das darin enthaltene Protein ein monomeres Molekulargewicht von 110 kDa und konnte mittels Anti-DP4-Western Blot identifiziert werden. Die vergleichende enzymatische Charakterisierung von hrDP4 und Attractin und die daraus weitgehend als identisch ermittelten Daten sind ebenfalls ein deutlicher Hinweis auf die DP4 als Ursache der gesuchten enzymatischen Aktivität. Das wichtigste durch Anwendung dieser Methode ermittelte Ergebnis ist allerdings die Abtrennung der DP4-ähnlichen Aktivität von humanem Attractin unter Erhalt der Aktivität selbst, da ein nichtdenaturierendes Verfahren gewählt wurde.

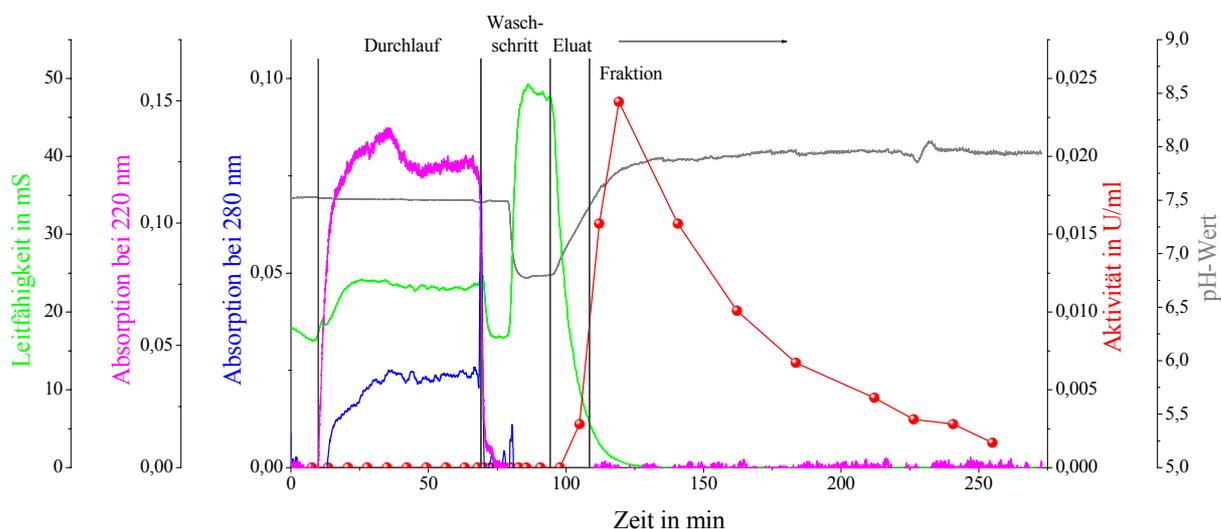


Abbildung 3-23: Trennprofil der Adenosindeaminase-Affinitätschromatographie; **Grün:** Leitfähigkeit in mS; **Magenta:** Absorption bei 220 nm; **Blau:** Absorption bei 280 nm; **Rot:** Aktivität in U/ml; **Grau:** pH-Wert

Gemeinsam mit den Ergebnissen der enzymatischen Charakterisierung konnte somit erstmals bewiesen werden, dass lösliches humanes Attractin keine DP4-ähnliche Aktivität besitzt.

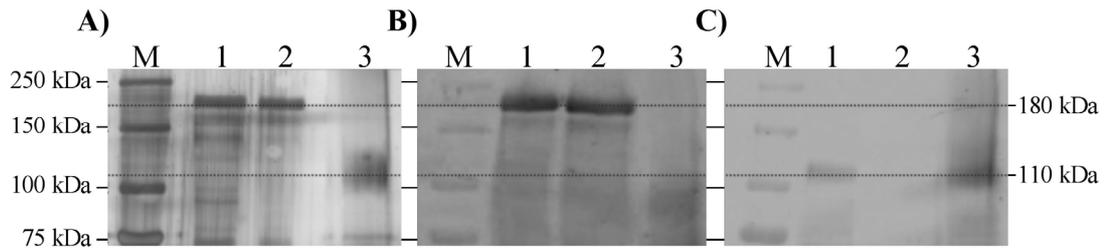


Abbildung 3-24: Analyse der Plasma-Attractin-Probe vor und nach ADA-Affinitätschromatographie mittels 7,5%iger SDS-PAGE und verschiedenen Detektionsmethoden; **A)** Silberfärbung; **B)** Anti-Attractin Western Blot mittels polyklonalem Anti-Attractin Antikörper; **C)** Anti-DP4 Western Blot mittels polyklonalem Anti-DP4 Antikörper; **Bahn M)** Proteinstandard „Dual Colour“; **Bahn 1)** Plasma-Attractin-Probe vor ADA-Affinitätschromatographie; **Bahn 2)** Durchlauf ADA-Affinitätschromatographie **Bahn 3)** Eluat ADA-Affinitätschromatographie

3.4 Expression von rekombinalem humanen Attractin

Zur Bestätigung, dass Attractin keine DP4-ähnliche enzymatische Aktivität besitzt, sollte das Protein rekombinant hergestellt werden. Dies wurde zunächst mit dem *P. pastoris* Expressionssystem versucht. Nach Klonierung der Isoform 2 des humanen Atrn in den Hefeexpressionsvektor pPICZαA und Sequenzierung folgte die Elektroporation des Vektors in die Hefen. Expressionsversuche blieben allerdings erfolglos.

Zur Realisierung einer Expression mit Hilfe einer humanen Zelllinie konnten 3 Expressionsvektoren für Säugerzellen verwendet werden, die bereits die kodierenden Sequenzen der 1. bzw. 3. Isoform des humanen Attractin enthielten. Sie wurden uns freundlicherweise von J. S. Duke-Cohan (Department of Cancer Immunology and AIDS, Dana-Farber Cancer Institute and Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA) zur Verfügung gestellt (pcDNA3.1/Myc-His B+/Atrn1, pcDNA3.1/Myc-His B+/Atrn3, pSecTag2B/Atrn3). Der Vektor zur Expression der Isoform 2 des humanen Attractin sollte aufgrund der vorher erhaltenen Ergebnisse zusätzlich hergestellt werden.

3.4.1 Klonierung der Isoform 2 des humanen Attractin

Zur Klonierung von Attractin 2 wurden die Ähnlichkeiten zwischen den Isoformen ausgenutzt. Da sich Attractin 1 und 2 N-terminal und die löslichen Isoformen C-terminal nicht unterscheiden, konnte eine natürlich vorkommende XbaI-Schnittstelle im Exon 18 (nach 3144 von insgesamt 4290 bp bei Atrn1 bzw. 2922 von 3597bp bei Atrn3) verwendet werden, um die für den C-Terminus kodierenden Exons des membranständigen Proteins gegen die des löslichen zu ersetzen. Die Klonierungsstrategie von Attractin 2 ist in Abbildung 3-25 dargestellt.

Das erhaltene Konstrukt wurde zur Vermehrung und Lagerung in DH5α-Zellen transformiert. Die Kontrolle erfolgte nach Plasmidpräparation sowohl durch Sequenzierung (Fa. SeqLab,

Göttingen) als auch mittels analytischem Restriktionsverdau unter Benutzung der Enzyme HindIII, PmlI, XbaI und PmeI (vergl. Abbildung 3-25 und Abbildung 3-26). Die Resultate beider Analysen bestätigten die erfolgreiche Klonierung von Attractin 2 in pcDNA3.1/Myc-His B+.

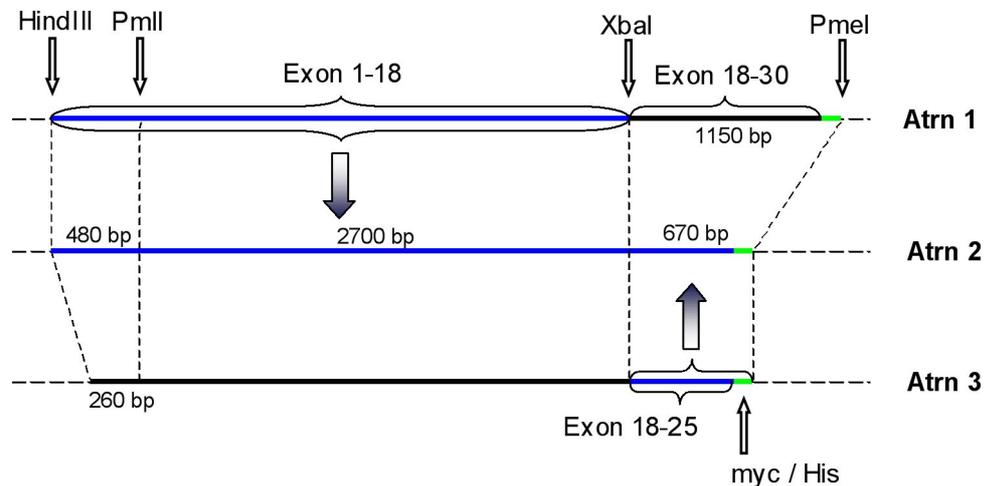


Abbildung 3-25: Klonierungsstrategie der Isoform 2 des humanen Attractin in pcDNA3.1/Myc-His B+; PmlI und XbaI sind natürliche, in allen Isoformen vorkommende Restriktionsschnittstellen. PmeI und HindIII befinden sich im Vektor pcDNA3.1/Myc-His B+. Zur Klonierung von Atrn2 (Mitte) wurde das XbaI-PmeI Restriktionsprodukt von Atrn1 gegen das von Atrn3 ersetzt.

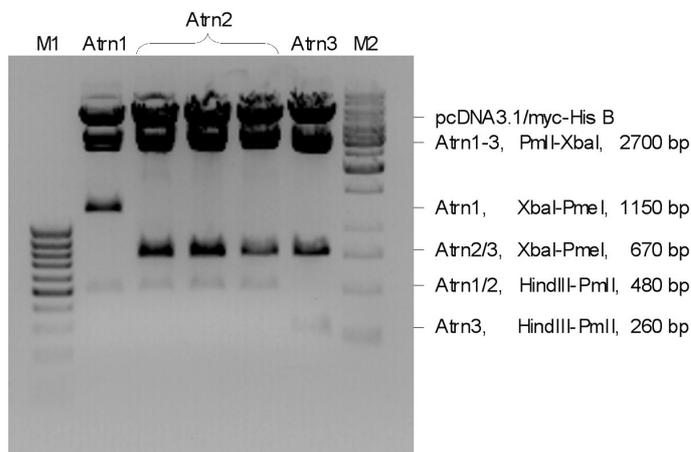


Abbildung 3-26: Ergebnis der Auftrennung mittels Agarosegelelektrophorese nach analytischem Restriktionsverdau der klonierten Attractin-Expressionsvektoren mit verschiedenen Restriktionsenzymen;

M1: Standard, peqlab (100 bp); **Atrn1:** pcDNA3.1/myc-His B/Atrn1; **Atrn2:** pcDNA3.1/myc-His B/Atrn2; **Atrn3:** pcDNA3.1/myc-His B/Atrn3; **M2:** Standard, peqlab (1 kb)

3.4.2 Rekombinante Expression von Isoformen des humanen Attractin

Humane embryonale Nierenzellen (293HEK) wurden mit je einem der 4 humanen Expressionsvektoren pcDNA3.1/Myc-His B/Atrn1, pcDNA3.1/Myc-His B/Atrn2, pcDNA3.1/Myc-His B/Atrn3 und pSecTag2B/Atrn3 unter Benutzung der Lipofectamin-

Methode transfiziert. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet und lysiert. Drei der vier rekombinanten Proteine konnten exprimiert und sowohl mit einem Anti-myc-Epitop- als auch mit einem Anti-His-Tag-Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden. Die Expression von Attractin-3 war nur mit Hilfe des pSecTag2B möglich. Bei diesem ist dem rekombinanten Protein eine *Ig κ-chain leader sequence* vorgeschaltet. Sie ist mit einer Spaltstelle versehen, die das Abspalten der Signalsequenz ermöglicht. Die Isoform 3 enthält die in dieser Arbeit ermittelte natürliche Signalpeptidasespaltstelle aufgrund einer Deletion nicht, und ist ohne eine artifizielle Signalsequenz (wie bei pcDNA3.1/Myc-His B+) nicht exprimierbar gewesen (vgl. Abbildung 3-27 A und B).

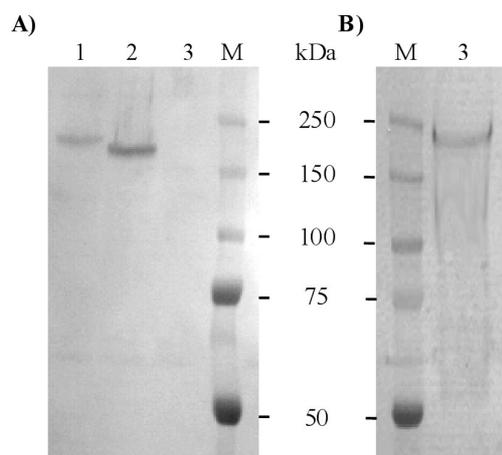


Abbildung 3-27: Western-Blot Analyse mit Anti-c-myc-Epitop Antikörper nach 7,5%iger SDS-PAGE; Nachweis der Expression rekombinant exprimierter humaner Attractin-Isoformen in Lysaten von HEK-Zellen; **A)** Expressionsvektor pcDNA3.1/Myc-His B+ **B)** Expressionsvektor pSecTag2B **Bahn 1:** rhAtrn 1, **Bahn 2:** Atrn2, **Bahn 3:** Atrn3, **M:** Proteinmarker „Dual Color“; die Expression von Atrn3 war im Unterschied zu pcDNA3.1/Myc-His B+ mit Hilfe des Expressionsvektors pSecTag2B möglich.

In der Folge wurden die Zellen unter Selektionsdruck über mehrere Wochen kultiviert und die Kultivierungsoberfläche der adhärenen Kultur auf $10 \times 175 \text{ cm}^2$ vergrößert. Zum Vergleich wurden auch transiente Expressionen frisch transfizierter Zellen im gleichen Maßstab durchgeführt. Die Aktivitätsmessung in Lysaten transfizierter HEK-Zellen ergab eine intrinsische DP4-ähnliche Aktivität, die sich von Wildtyp-Zellen nicht unterscheidet. Nach der Präparation des Zellextraktes wurde die Probe auf die Ni-Sepharose appliziert. In Abbildung 3-28 A ist die chromatographische Trennung am Beispiel von rekombinantem Attractin 2 gezeigt. Im Eluat der Ni-Sepharose waren noch 0,45% des Gesamtproteins enthalten. Wie aus Abbildung 3-28 B eines Anti-myc-Epitop-Western Blot hervorgeht, wurde das gesamte rekombinante Attractin an der Ni-Sepharose gebunden und eluiert. Erste von uns durchgeführte Affinitätsreinigungen von rekombinantem Attractin enthielten ebenfalls die von Duke-Cohan *et al.* (1998) beschriebene DP4-ähnliche Aktivität im Eluat, woraus sich eine Aktivität von rhAttractin andeutete. Durch exakte Einstellung des Imidazolgehaltes in

Probe, Wasch- und Elutionspuffer der Ni-Sepharose-Chromatographie war es möglich, die im Zellhomogenat vorhandene DP4-ähnliche Aktivität komplett vom rekombinanten Attractin abzutrennen. Die entsprechenden Enzyme passierten unter den gewählten Bedingungen die Säule ungehindert. Die rekombinante Isoform 3 von Attractin wurde nach Expression mit Hilfe des pSecTag2B-Vektors aus dem Medium der HEK-Zellen gereinigt.

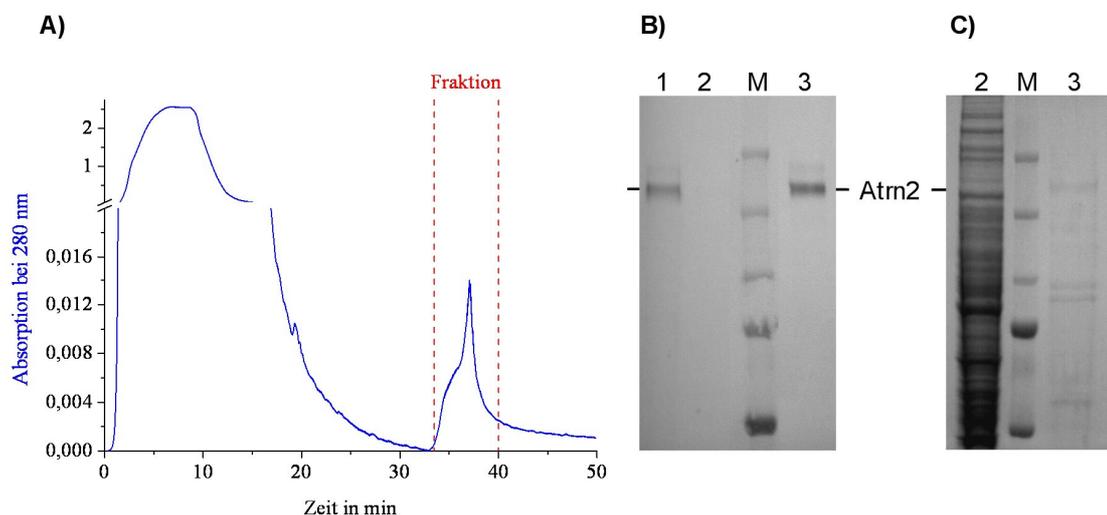


Abbildung 3-28 A) Trennprofil der Ni-Sepharose am Beispiel des rekombinanten Atrn2, Elution mittels schrittweiser Anhebung der Imidazolkonzentration von 50 auf 500 mM; **Blau:** Absorption bei 280 nm; **Rot:** eluierte Fraktion; **B) und C)** Analyse der chromatographischen Trennung durch Ni-Sepharose mittels SDS-PAGE **B)** Western Blot mittels Anti-c-myc-Epitop-Antikörper; **Bahn 1:** Probe vor Ni-Sepharose; **C)** Coomassie-Färbung; Für **B) und C)** gilt: **Bahn 2:** Ungebundener Proteinanteil; **Bahn 3:** Eluat Ni-Sepharose

Eine zusammenfassende Charakterisierung von Zelllysaten hrAttractin-exprimierender HEK-Zellen im Vergleich zu gebundenem und ungebundenem Proteinanteil der Ni-Sepharose unter Zuhilfenahme sowohl eines DP4-spezifischen Inhibitors (DP4I1) als auch eines DP8/DP9 spezifischen Inhibitors (DP8/9I1) findet sich in Tabelle 3-8 und Abbildung 3-29.

Tabelle 3-8: Charakterisierung der Aktivität in Zelllysaten hrAtrn exprimierender HEK-Zellen, der Fraktionen nach Reinigung mittels Ni-Sepharose und Vergleich zu präpariertem Serum-Attractin und hrDP4; Inhibitorkonzentration: 1×10^{-6} M, Substrat: Gly-Pro-AMC

		Angaben in % Aktivität		
		Kontrolle	DP4I1	DP8/9I1
Lysate transfizierter HEK-Zellen bzw. wt-Kontrolle	wt	100,0	95,8	4,8
	hrAtrn1	100,0	89,8	2,9
	hrAtrn2	100,0	93,9	2,4
	hrAtrn3	100,0	96,3	3,3
Chromatographie an Ni-Sepharose	ungebundenen Protein	100,0	92,1	3,7
	Eluat	0,0	0,0	0,0
	Attractin-Fraktion aus humanem Plasma	100,0	0,0	87,2
	hrDP4	100,0	0,0	92,9

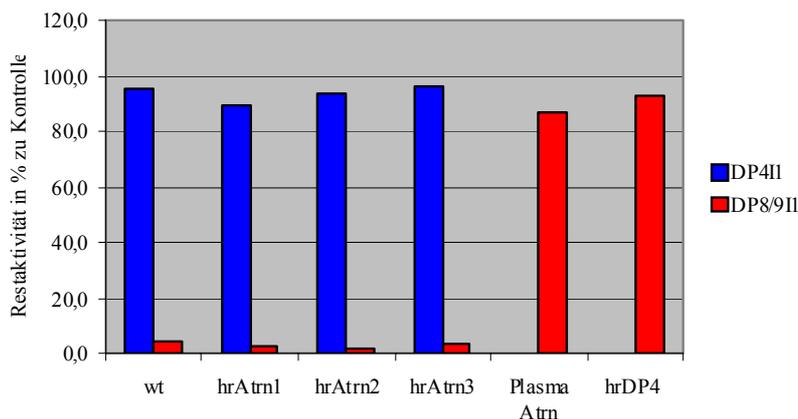


Abbildung 3-29: Vergleich der Inhibitorspezifität von hrDP4, Plasma Atrn (präpariertes Plasma Attractin (vor DP4 Abtrennung)) und ungereinigten Lysaten Attractin-transfizierter HEK-Zellen (hrAtrn1-3) bzw. wt-Kontrolle; Angaben in % DP4-Aktivität (Gly-Pro-AMC) zur Kontrolle ohne Inhibitor

Wie DP4 wird auch die aus dem humanen Serum gereinigte Aktivität komplett vom DP4-spezifischen Inhibitor DP4I1 gehemmt. Der DP 8/DP 9 spezifische Inhibitor DP8/9I1 zeigt hier nur eine geringe Wirkung. Ein komplett umgekehrtes Bild zeigt sich im Fall der Zelllysate von HEK/wt, HEK/pcDNA3.1/Myc-His B(+)/Atrn1, pcDNA3.1/Myc-His B(+)/Atrn2, pSecTag2B/Atrn3 und des ungebundenen Proteinanteils nach Ni-Sepharose, das kein rekombinantes Attractin enthält. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die gesuchte enzymatische Aktivität im Fall einer rekombinanten Expression in HEK-Zellen von DP8 oder DP9 ausgeht, da diese Inhibitoren auch eine hervorragende Spezifität gegenüber anderen Peptidasen besitzen. Per Western Blot Analyse konnten beide Isoformen von DP9 in Lysaten transfizierter und nicht transfizierter HEK-Zellen identifiziert werden (Abbildung 3-30). Die wichtigste Erkenntnis ist aber die Bestätigung der Ergebnisse der Reinigung und Charakterisierungen des humanen Serum-Attractin. Es konnte damit erstmals gezeigt werden, dass keine der rekombinanten Attractin-Isoformen eine DP4-ähnliche Aktivität besitzt.

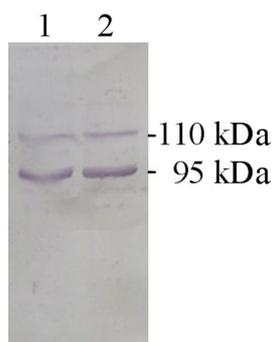


Abbildung 3-30: Anti-DP9-Western Blot nach SDS-PAGE von HEK-Zelllysaten, Detektion der beiden Isoformen von DP9 mittels polyklonalem Antikörper; **Bahn 1:** HEK-Wildtyp, **Bahn 2:** HEK transfiziert mit Atrn2

3.5 Interaktionsstudien zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen DP4 und Attractin

3.5.1 Coimmunopräzipitation

Nach vierstündiger Inkubation von rhAtrn2 und rhDP4 bzw. verschiedenen Kontrollen wurde das c-myc-Epitop fusionierte Attractin mit anti-c-myc Agarose ausgefällt. Zur Kontrolle einer Bindung von DP4 an Attractin bzw. an das Agarosekonjugat (falsch-positiv), wurden die Präzipitationsergebnisse mittels anti-His₆-tag Western Blot (Abbildung 3-31) und Aktivitätsmessung untersucht.

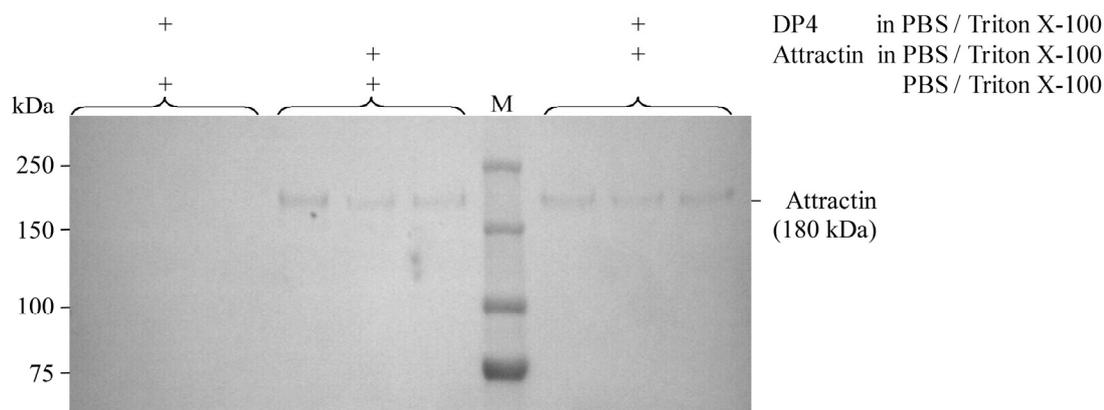


Abbildung 3-31: SDS-PAGE und Anti-His₆-tag Western Blot nach anti-c-myc Immunopräzipitation von rhAtrn2 und vorheriger Inkubation mit rhDP4; M: Proteinstandard „Dual Color“

Das Ergebnis des Western Blots zeigt, dass zwar rhAtrn2, aber nicht die ebenfalls anti-His₆-tag fusionierte rhDP4 im Präzipitat nachweisbar ist. Die Aktivitätsmessung der DP4 bestätigte diese Ergebnisse. Die gesamte Aktivität befand sich im Waschpuffer der Präzipitation, lag aber nicht Agarose- bzw. Attractin-gebunden vor.

3.5.2 Oberflächenplasmonresonanz

Auf dem Sensorchip CM5 wurden (je eine Flusszelle) gleiche molare Mengen von humanem hochreinem Plasma-Attractin ($4,7 \times 10^{-14}$ mol/mm²), humaner rekombinanter DP4 ($5,1 \times 10^{-14}$ mol/mm²) und einem Kaninchen anti-Maus-Fc Antikörper als Referenzprotein ($4,6 \times 10^{-14}$ mol/mm²) immobilisiert. Die Messung der Resonanzeinheiten (RU) der unbeladenen Referenzflusszelle (FZ1) diente zum Nachweis unspezifischer Wechselwirkungen an der dextranbeschichteten Goldoberfläche und wurde vom RU-Wert der proteinbeladenen Flusszellen (FZ2 bis FZ4) abgezogen (Δ RU). Es wurden zunächst Positivkontrollen zur Überprüfung der Funktionalität des Versuchsaufbaus durchgeführt. Eine geeignete Kontrolle in Form eines Attractin-Antikörpers (mit ausreichender Spezifität) ist kommerziell nicht erhältlich. Eine der gereinigten Attractin-Chargen wurde zur Herstellung eines polyklonalen

Kaninchen-Antikörpers verschickt (Fa. Eurogentec). Der erhaltene Antikörper wurde nach Titration der optimalen Konzentrationen bereits erfolgreich im Western Blot gegen Attractin getestet. Er konnte jetzt als Positivkontrolle verwendet werden (pk Atrn-Ak). Bei der Injektion des pk Atrn-Ak ergibt sich eine deutliche Zunahme der Oberflächenproteinkonzentration an immobilisiertem Attractin infolge einer Assoziation mit dem Protein (Abbildung 3-32). Zwar zeigt auch DP4 eine schwache Affinität zu diesem Antikörper, aber aufgrund der sehr schnellen Dissoziation ist die Basislinie bereits wenige Sekunden nach Beendigung der Injektion erreicht. Außerdem wurde als weitere Kontrolle die Bindung des Alkalische Phosphatase-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen Antikörpers (ZAK) getestet. Er wurde vor bzw. nach Bindung des Attractin-Antikörpers auf die Flusszellen gegeben. Es wird deutlich, dass dieser Sekundärantikörper ausschließlich zu den Kaninchenantikörpern eine Affinität zeigt.

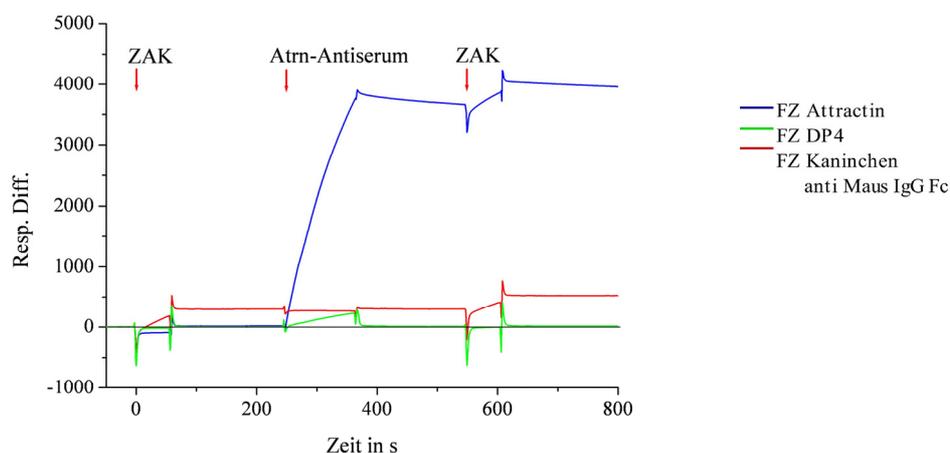


Abbildung 3-32: SPR-Sensogramm, Positivkontrolle Plasma-Attractin, Bindung des pk anti-human Attractin-Antiserums; **Flusszellen:** **Blau:** immobilisiertes Attractin, **Grün:** immobilisierte DP4, **Rot:** immobilierter pk Kaninchen-anti-Maus-Fc Antikörper; **Pfeile:** Injektionszeitpunkte; Abkürzungen: **ZAK:** pk Ziege-anti-Kaninchen Antikörper; **Resp. Diff.:** Δ RU (Differenz der Resonanzeinheiten der proteinbeladenen Flusszellen zur Referenzzelle)

Entsprechend wurde sowohl die korrekten Immobilisierungen von DP4 (mit einem polyklonalen anti-human DP4 Antikörper aus Kaninchen) bzw. des Kaninchen anti-Maus-Fc Antikörpers (mit einem moloklonalen Maus-Antikörper) bestätigt.

Zur Identifizierung einer möglichen Affinität zwischen den humanen Formen von Attractin und DP4, wurden die Bedingungen der vorherigen Kontrollmessungen beibehalten. Es wurden stets verschiedene Bedingungen getestet und sowohl der pH-Wert (pH 5,0; pH 7,4; pH 8,5) als auch der Salzgehalt (0 bzw. 0,9% (w/v) NaCl) in 6 verschiedenen Bindungspuffern variiert. Die hier gezeigten Sensogramme entsprechen der Messung in 10 mM PBS / 0,9% (w/v) NaCl. Wie in Abbildung 3-33 gezeigt, konnte keinerlei Affinität zwischen Attractin und DP4 mit dieser Methode nachgewiesen werden, da im Vergleich zu

Attractin und DP4 sowohl die internen Kontrollen als auch die Injektion des Kontrollproteins eine gleichwertig geringfügige Resonanz aufwiesen.

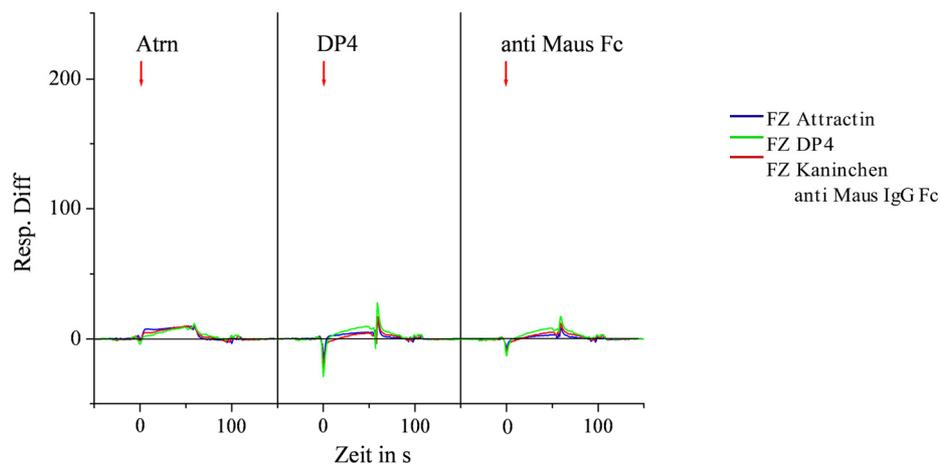


Abbildung 3-33: SPR-Sensogramme, Injektion von Plasma-Attractin, DP4 bzw. des pk Kaninchen-anti-Maus-Fc Antikörper; **Flusszellen: Blau:** immobilisiertes Attractin, **Grün:** immobilisierte DP4, **Rot:** immobilierter pk Kaninchen-anti-Maus-Fc Antikörper; **Pfeile:** Injektionszeitpunkte; **Resp. Diff.:** Δ RU (Differenz der Resonanzeinheiten der proteinbeladenen Flusszellen zur Referenzzelle)

3.6 Protein-Protein-Interaktionsselektion in *S. cerevisiae*

Aufgrund der in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Ergebnisse kann nicht mehr davon ausgegangen werden, dass die metabolischen, neuronalen, immunologischen und pigmentären Anomalien der *mahogany*-Mutation auf den Verlust der Proteaseaktivität von Attractin zurückzuführen sind. Bei Betrachtung der Domänenstruktur könnte aber, durch Aufstellung einer zweiten Hypothese, von einer Funktion als Adhäsionsprotein, eigenständigem Rezeptor oder von der Beeinflussung einer Signalkaskade ausgegangen werden. Es besteht die Möglichkeit, dass Attractin Protein-Protein-Wechselwirkungen eingeht. Das Membran-Attractin der Säuger besteht zu 90% aus einem extrazellulären und zu 9% aus einem zytoplasmatischen Teil. Die Existenz von alternativ gespleißten löslichen Isoformen, d.h. ohne transmembran- und zytoplasmischer Domäne, scheint primatenspezifisch zu sein. Von evolutionär größerer Bedeutung ist daher wahrscheinlich die Membranform. Der am stärksten konservierte Teil des Proteins ist die zytoplasmatische Domäne von Attractin (Atrn_{cyt}). Sie ist innerhalb der Säuger absolut identisch und auch *C. elegans* oder andere Spezies zeigen einen hohen Ähnlichkeitsgrad in ihren entsprechenden Homologen (Abbildung 3-34). Die zytoplasmatische Domäne des humanen Attractins wurde für eine Interaktionssuche ausgewählt. Als Verfahren kam das 2-Hybrid-System zur Anwendung. Mit dieser Methode ist es möglich, die Interaktion mit unbekanntem Proteinen zu identifizieren.

Die Auswahl eines bestimmten Teilbereichs von Attractin war für diese Methode notwendig, da große Proteine zur selbstständigen Aktivierung von Reporter genen neigen. Der extrazelluläre Teil von Attractin erschien insofern als ungeeignet für eine 2-Hybrid Interaktionsselektion, da zahlreiche posttranslationale Modifikationen, z.B. durchschnittlich aller 50 Aminosäuren eine der insgesamt 26 potentiellen Glykosylierungen, zu erwarten sind. Strukturelle und funktionelle Auswirkungen auf Interaktionen sind nicht abzusehen, da die Fusionsproteine in der Hefe exprimiert werden und solche Modifikationen verschieden zu anderen eukaryontischen Zellen sein können. Der zytosolische Rest des Proteins ist im Gegensatz dazu ein in sich geschlossener Teil. Er ist mit 129 Aminosäuren (14 kDa) vergleichsweise kurz und posttranslationale Modifikationen sind unwahrscheinlich.

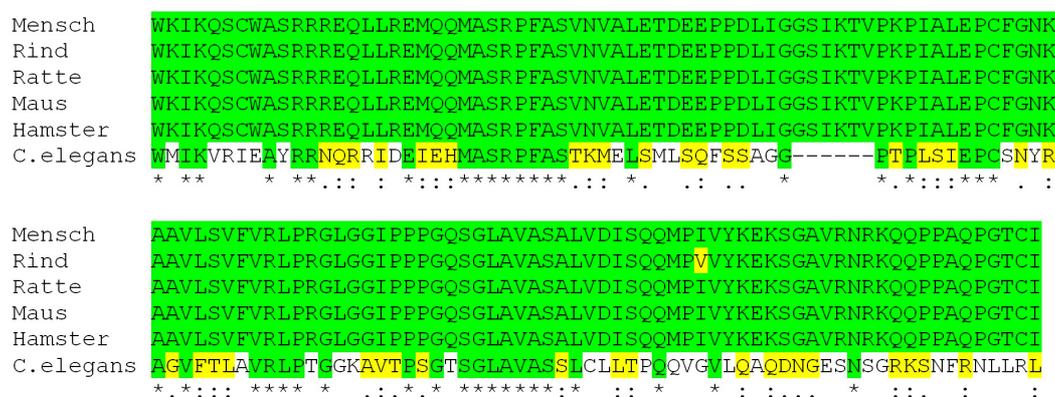


Abbildung 3-34: Alignment des zytosomatischen Teils (Atrn_{cyt}) von humanem Attractin im Vergleich zu Atrn_{cyt} verschiedener Säugerspezies sowie *C. elegans*; **Grün:** identische Aminosäuren; **Gelb:** ähnliche Aminosäuren

3.6.1 Präparation und Stimulation humaner Lymphozyten

Nach Berichten von Duke-Cohan *et al.* wird die membrangebundene Form von Attractin auf T-Lymphozyten gebildet. Durch die Stimulation dieser Zellen steigt die Expression noch weiter an und erreicht die höchste Konzentration nach 48-72 h (Duke-Cohan *et al.*, 1995). Aus diesem Grund wurden Lymphozyten aus 24 ml humanem Vollblut isoliert (s. S. 51). Es konnten $42,8 \times 10^6$ lebende Lymphozyten gewonnen werden. Nach Stimulation der Zellen mit PHA ergab sich nach 24 h eine beginnende Zellcluster-Bildung im Vergleich zur Kontrollprobe, ein deutliches Signal der Aktivierung. Während die Anzahl der Einzelzellen (Durchmesser der Zellen ca. 6 - 7 μm) über die gesamte Stimulationsphase etwa unverändert blieb, stieg die Anzahl und die Größe der Zell-Cluster (Durchmesser von 9,2 – 40 μm) rapide an (Abbildung 3-35). Um ein *template* für die Amplifikation des Genabschnittes des zytosolischen Attractin zu erhalten, wurde aus den stimulierten Lymphozyten, wie auf Seite 43 beschrieben, die Gesamt-RNA präpariert und anschließend mittels RT-PCR cDNA synthetisiert.

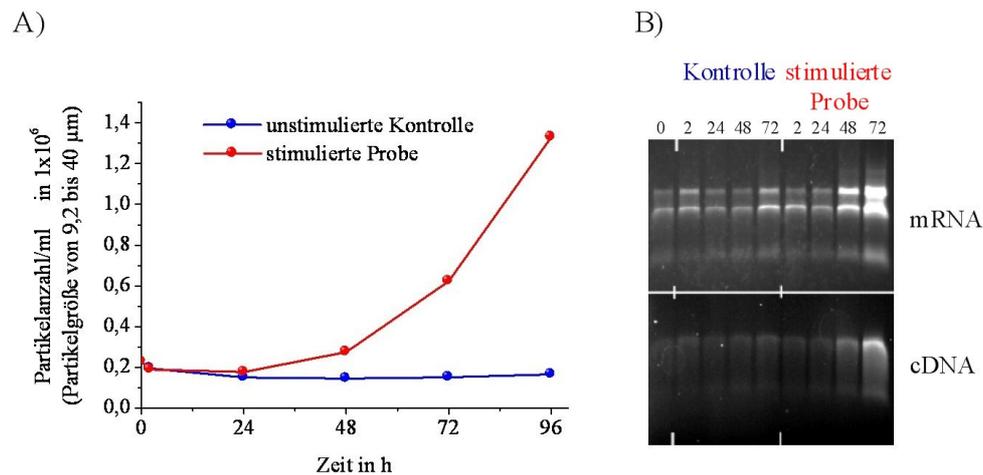


Abbildung 3-35: Stimulation gereinigter Lymphozyten aus humanem Blut; **A)** zunehmende Clusterbildung durch Stimulation von Lymphozyten mit PHA (rot) im Vergleich zu unstimulierter Kontrolle (blau); Zeitpunkte der Probennahme: 0, 2, 24, 48 und 72 h; **B) oben:** isolierte Lymphozyten-mRNA ebenfalls mit bzw. ohne PHA-Stimulation zu genannten Zeiten; **unten:** aus isolierter Lymphozyten-mRNA erzeugte cDNA entsprechend mit bzw. ohne Stimulation

3.6.2 Charakterisierung von Expression und Aktivität des *bait*-Fusionsproteins

Durch Amplifikation der cDNA des zytoplasmatischen Teils von Attractin und dessen Integration in pEG202, wurde das *bait*-Plasmid pEG202/Atr_{cyt} zur konstitutiven Expression des LexA/ Atr_{cyt}-Fusionsproteins generiert. Sowohl analytischer Restriktionsverdau als auch Sequenzierung (Fa. Seqlab, Göttingen) bestätigten die erfolgreiche Klonierung des fehlerfreien Genabschnittes.

Nach Transformation des konstruierten *bait*-Plasmids pEG202/Acy unter Benutzung der Lithiumacetat-Methode in den kompetenten *Saccharomyces cerevisiae* Stamm EGY48/pSH18-34, wurden die Zellen unter Ausnutzung der Auxotrophien für Histidin sowie Uracil selektiert. Anschließend wurde die Aktivität des *bait*-Fusionsproteins LexA/Atr_{cyt} getestet, dessen Expression unter Kontrolle des konstitutiv aktiven ADH-Promotors steht. Durch Western-Blot-Analyse mit einem monoklonalen Anti-LexA-Antikörper konnte die Expression des intakten *bait*-Fusionsproteins bestätigt (Abbildung 3-36 A) werden, dessen Molekulargewicht von 39 kDa sich aus der Summe der Molekulargewichte von Atr_{cyt} (14 kDa) und LexA (25 kDa) ergibt. Eine Abschätzung der transkriptionalen Aktivität erfolgte durch LacZ-Genaktivierung mittels β -Galaktosidase-Plattenassay (Abbildung 3-36 B). Als Positivkontrolle für die Aktivierung der β -Galaktosidase-Expression wurde der Hefestamm EGY48/pSH18-34 mit dem Plasmid pSH17-4 transfiziert. Dieses kodiert für ein direkt fusioniertes LexA/GAL4- Protein, das zu einer sehr starken Aktivierung in der Lage ist, ohne dass dafür eine Proteininteraktion notwendig ist. Als Negativkontrolle diente der Hefestamm EGY48, welcher nur das Reporterplasmid pSH18-34 trägt. Das auf diesem Plasmid kodierte β -Galaktosidase-Gen darf allein nicht aktiviert werden. Zudem konnte eine Positivkontrolle

für eine Interaktion eingesetzt werden. Diese wurde vom Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität zur Verfügung gestellt.

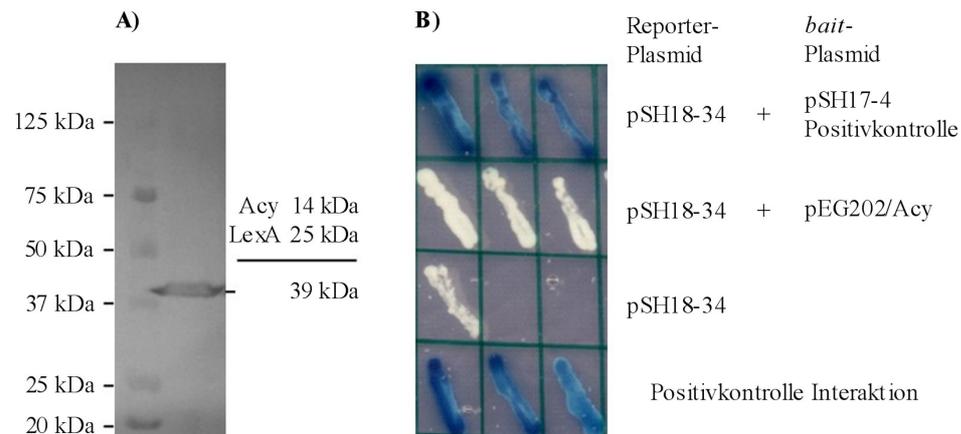


Abbildung 3-36: Charakterisierung von Expression und transkriptionaler Aktivität des LexA/Atrn_{cyt}-Fusionsproteins **A)**: Kontrolle der Expression des LexA-Fusionsproteins LexA/Acy in transformierten *S. cerevisiae* nach Selektion in Glukose/UH⁻-Medium durch Western Blot Analyse mit monoklonalem Anti-LexA Antikörper; **B)**: Charakterisierung der transkriptionalen Aktivität des Köderproteins durch β -Galaktosidase-Assay; Weder das Reporterplasmid allein, noch dessen Kombination mit dem konstitutiv exprimierten *bait*-Fusionsprotein (LexA/Atrn_{cyt}), darf die Aktivierung des Reporters auslösen. pSH17-4 ist eine Positivkontrolle für transkriptionale Aktivierung, da es für ein LexA/GAL4-Fusionsprotein kodiert. LexA positioniert die GAL4-Aktivierungsdomäne am LexA-Operator und ermöglicht die direkte Transkription des Reportergens ohne Rekrutierung eines Interaktionspartners. Die Positivkontrolle für eine Interaktion wurde vom Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität zur Verfügung gestellt.

Wie aus Abbildung 3-36 hervorgeht, ist die Funktionalität des Assays gegeben. Die Positivkontrollen entwickeln eine β -Galaktosidase-Aktivität aufgrund der Aktivierung des LacZ-Gens. Zu dieser Aktivierung ist das *bait*-Fusionsprotein LexA/Atrn_{cyt} dessen konstitutive Expression zuvor bestätigt wurde (Abbildung 3-36 A), nicht in der Lage. Dies ist zwingende Voraussetzung, da eine selbsttätige Aktivierung des Reportergens durch Atrn_{cyt} den Einsatz des Proteins im 2-Hybrid-System unmöglich machen würde. Erst die Möglichkeit von LexA/Atrn_{cyt} zur Rekrutierung eines *prey*-Fusionsproteins würde die Aktivierung der Reportergene ermöglichen.

3.6.3 Transformation der *prey*-Vektoren und Interaktionsselektion einer cDNA-Bibliothek

Da nun die Voraussetzungen einer Interaktionssuche in Hefen gegeben waren, wurde durch Transformation einer Hela-cDNA-Bibliothek im sogenannten *prey*-Vektor auch die letzte Komponente des Systems hinzugefügt. Die Expression dieser Fusionsproteine steht unter Kontrolle des Galaktose induzierbaren GAL1-Promotors.

Die transformierten Zellen wurden im nächsten Schritt auf ihre Fähigkeit zur Proliferation selektiert und gleichzeitig die Leucin-Abhängigkeit des Wachstums untersucht. Die

Proliferation setzt sowohl die Expression des *prey*-Fusionsproteins als auch dessen Rekrutierung eines Bindungspartners durch das *bait*-Fusionsprotein voraus, wodurch die *prey*-fusionierte B42-Domäne das chromosomal lokalisierte Leucigen aktiviert, da dieser Versuch unter Leucin-Restriktion erfolgte (Galaktose/UHWL⁻). Unter diesen Bedingungen konnten 1225 Hefe-Kolonien gewonnen werden. Im Vergleich dazu wurde ein Aliquot desselben Hefeklon-Pools auf leucinhaltigem Medium (Galaktose/UHW⁻) plattiert und die wachsenden Kolonien durch Verdünnungstests auf ein zählbares Maß reduziert. Dies ergab eine Koloniezahl von ca. 14 Millionen ohne Leucin-Restriktion. Dieser erste Schritt des Screening erbrachte somit eine Reduktion um den Faktor 10000 (Tabelle 3-9). Um den Hintergrund durch mutierte Klone der Population, die auch unter Leucin-Entzug und ohne Interaktion wachsen (falsch-positiv), zu eliminieren, wurde ein zweiter Selektionsschritt angeschlossen. UHWL⁻-positive Klone wurden unter Uracil-, Histidin- und Tryptophan-Entzug auf X-Gal-haltige Agarplatten übertragen. Als Wechselwirkungsreporter diente in diesem Fall die Expression der auf dem Plasmid pSH18-34 kodierten β -Galaktosidase. Zum Vergleich der Abhängigkeit der Interaktion von der Kohlenstoffquelle, wurden die Klone sowohl auf Glukose als auch auf Galaktose replattiert. Ein Beispiel einer solchen Gegenüberstellung der Abhängigkeit der β -Galaktosidaseaktivierung von der Kohlenstoffquelle ist in Abbildung 3-37 dargestellt. Eine Blaufärbung der Zellen darf ausschließlich durch die galaktoseinduzierte Expression des *prey*-Fusionsproteins, dessen Interaktion mit dem *bait*-Fusionsprotein, der Positionierung des Doppelhybrids am LexA-Operator des Reporterplasmids und der dadurch ausgelösten β -Galaktosidaseexpression stattfinden. Durch diesen Schritt konnte die Zahl der positiven Kolonien auf 55 reduziert werden.

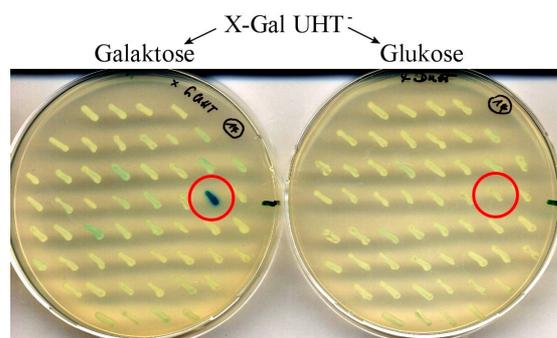


Abbildung 3-37: Selektionen auf β -Galaktosidase-Induzierbarkeit in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle; In diesem Beispiel sind 52 der 1225 Kolonien gezeigt, die zum Vergleich sowohl auf glukose- als auch auf galaktosehaltigen X-Gal/UHW⁻-Agarplatten inkubiert wurden. Da dem LacZ-Gen auf dem Reporterplasmid LexA-Operatoren vorgeschaltet sind, wird das *bait*-Fusionsprotein an dieser Stelle positioniert. Eine Blaufärbung tritt bei einer echten Interaktion zwischen *bait*- und *prey*-Hybridprotein nur auf Galaktose auf, da die Expression des *prey*-Fusionsproteins unter Kontrolle des GAL1-Promotors steht.

Die selektierten Kolonien wurden sowohl in Glycerol-Dauerkulturen konserviert als auch auf Glukose/W⁻-Agarplatten übertragen. Der Selektionsdruck wird durch Plattierung auf Glukose/W⁻ nur für das *prey*-Plasmid aufrechterhalten. Da die Zellen dazu neigen, alle unnötigen Plasmide zu entfernen, erleichtert dieser Schritt die folgende Isolierung der *prey*-Plasmide der 55 positiven *S. cerevisiae*-Kolonien (Abschnitt 2.3.5). Nach Präparation der 55 Vektoren aus den Hefen, Vermehrung in DH5 α und anschließender Reinigung, wurden sie im „Institut für Genetik“ der Martin-Luther-Universität sequenziert. Mittels BLAST-Identifizierung (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov) erfolgte die Zuordnung der ermittelten Nukleotidsequenzen (soweit bereits bekannt) zu den von ihnen kodierten Proteinen bzw. Proteinfragmenten. Zudem wurden die korrekten Leserahmen und Orientierungen überprüft (Tabelle 3-9).

Tabelle 3-9: Übersicht der Interaktionsselektion in Hefen; Abkürzungen: **HSP90**: 90 kDa Hitzeschockprotein; **PSMA5**: *Proteasome subunit, alpha type 5*; **TERF2IP**: Telomeric repeat binding factor 2 interacting protein 1, **HSPA5** = GRP78 = BiP (70 kDa Hitzeschockprotein 5, 78 kDa *Glucose-regulated protein*)

		Klone		Proteine
		gesamt	unabhängige	
Glu-UHW ⁻	(ohne Interaktionszwang)	>14 000 000		
Gal-UHWL ⁻	(Selektion auf Proliferation, 1. Reporter)	1225		
X / Gal-UHW ⁻	(Selektion auf Farbreaktion, 2. Reporter)	55	31	20
Rück- transformation	(Selektion auf Spezifität der Interaktion)	29	13	7
als typisch falsch positive eingeordnet		14	6	3
HSPA5 (GRP78)		4	4	
HSP90		5	1	
PSMA5		5	1	
als kernlokalisierte Proteine eingeordnet		3	1	1
TERF2IP		3	1	
als potentiell positive Interakteure		12	6	3
Aminosäuren				Aminosäuren
Trioisosphat Isomerase		250	9	1× 46-250 4× 51-250 2× 61-250 2× 81-250
E2-Ubiquitin-Konjugase R2 ¹		238	2	1
E2-Ubiquitin-Konjugase G1 ²		170	1	1

¹ E2-Ubiquitin-Konjugase R2 = UBC3B; ² E2-Ubiquitin-Konjugase G1 = UBC7

Abschließend wurde in einem Schritt, der als Rücktransformation bezeichnet werden kann, die Spezifität der Wechselwirkung untersucht. Dazu wurde die Fähigkeit jedes der 55 selektierten Interaktionskandidaten zur Wechselwirkung mit der Homeodomäne des Bicoid

aus *Drosophila melanogaster* getestet. Diese ist auf dem Expressionsvektor pRFHM1 als LexA-Fusionsprotein kodiert und wird in dieser Form im Hefe-2-Hybrid-System als Negativkontrolle eingesetzt. Alle 55 isolierten *prey*-Plasmide wurden einzeln sowohl in EGY 48/pSH18-34/pEG202_{Acv} als auch in EGY 48/pSH18-34/pRFHM1 transformiert und alle Paarungen in einem X-Gal-Plattenassay verglichen. Die Zahl der positiven unabhängigen Klone konnte dadurch auf 13 reduziert werden. Sie kodierten für 7 Proteine (Tabelle 3-9).

Nach Abschluss aller Selektionsschritte wurden die potentiell in Frage kommenden Interaktionspartner in 3 Klassen unterteilt. Eine Gruppe von cDNA-Klonen kodiert für Proteine, die in einer Vielzahl verschiedener 2-Hybrid Versuchen mit den unterschiedlichsten Köderproteinen immer wieder isoliert wurden (eine Auflistung klassischer falsch positiver *prey*-Proteine unter: www.fccc.edu). Zu diesen zählen sowohl die beiden Hitzeschockproteine HSP90 und HSPA5 (GRP78) als auch Proteasomuntereinheiten PSMA5 (*Proteasome subunit alpha type 5*). Eine tatsächliche Interaktion der zytosolischen Domäne von Attractin mit diesen Proteinen wird daher als unwahrscheinlich eingestuft. Selbiges gilt auch für eine andere Gruppe von Proteinen, der nur eine kodierende cDNA zugeordnet wurde. Aufgrund der ausschließlichen Kernlokalisierung des *Telomeric repeat binding factor 2 interacting protein 1* (TERF2IP) sollte diesem Testergebnis keine reale Bedeutung beigemessen werden. Einschließlich dieser Klone wurden alle nach Selektion auf LacZ-Reporteraktivierung erhaltenen Klone als Glyzerolkonserve verwahrt.

Die dritte Gruppe umfasst Proteine, die potentielle Interaktionspartner des zytosolischen Attractin darstellen. Sie sind zytosolisch lokalisiert und haben alle Tests der Interaktionsselektion in Hefen bestanden.

Funktionsverlust-Mutationen sowohl von Attractin (Mäuse besitzen nur das membranständige Attractin) als auch von Mahogunin, einer Ubiquitinligase, bringen quasi identische Phänotypen hervor. Eine E2-Ubiquitin-Konjugase könnte ein Verbindungsglied zwischen beiden Mutationen sein. Im durchgeführten 2-Hybrid Versuch konnten zwei cDNA-Klone selektiert werden, die beinahe die gesamte kodierende Sequenz von zwei unterschiedlichen E2-Ubiquitin-Konjugasen umfassen. Insgesamt 9 selektierte cDNA-Klone stellen die Triosephosphat-Isomerase als attraktivsten Interaktionskandidaten heraus. Zudem können zufällige Mutationen der Hefen als Ursache für eine falsch positive Interaktionsselektion ausgeschlossen werden, da 4 voneinander unabhängige Klone isoliert wurden. Sowohl die Triosephosphat-Isomerase als auch die beiden E2-Ubiquitin-Konjugasen wurden für weitere Untersuchungen ausgewählt, die kodierenden Sequenzen aus der cDNA der gereinigten und stimulierten Lymphozyten gewonnen und die Proteine rekombinant hergestellt. Zur eindeutigen Identifizierung wurden sie mit einem His₆-tag fusioniert.

3.6.4 Triosephosphat-Isomerase (EC 5.3.1.1)

Als *template* zur Amplifikation der kodierenden Sequenzen zur Herstellung von rekombinanten Proteinen, wurde die cDNA aus isolierten und stimulierten humanen Lymphozyten verwendet.

Durch Sequenzierung (Fa. SeqLab) wurde die einwandfreie Klonierung des mutationsfreien N-terminal His₆ fusionierten TPI-Gens ins Leseraster des Vektors bestätigt und das Konstrukt in den Bakterienstamm BL21 transformiert. Nach Auswahl einer geeigneten pET-28a/TPI-transformierten Bakterienkolonie, erfolgte die Expression der humanen Triosephosphat-Isomerase im 750 ml-Maßstab. Vor der Reinigung des überexprimierten Enzyms wurden die Bakterien mittels *french press* aufgeschlossen. Die Isolierung der TPI aus der löslichen Fraktion des Bakterienlysates mittels Ni-Sepharose ist im Chromatogramm in Abbildung 3-38 A dargestellt.

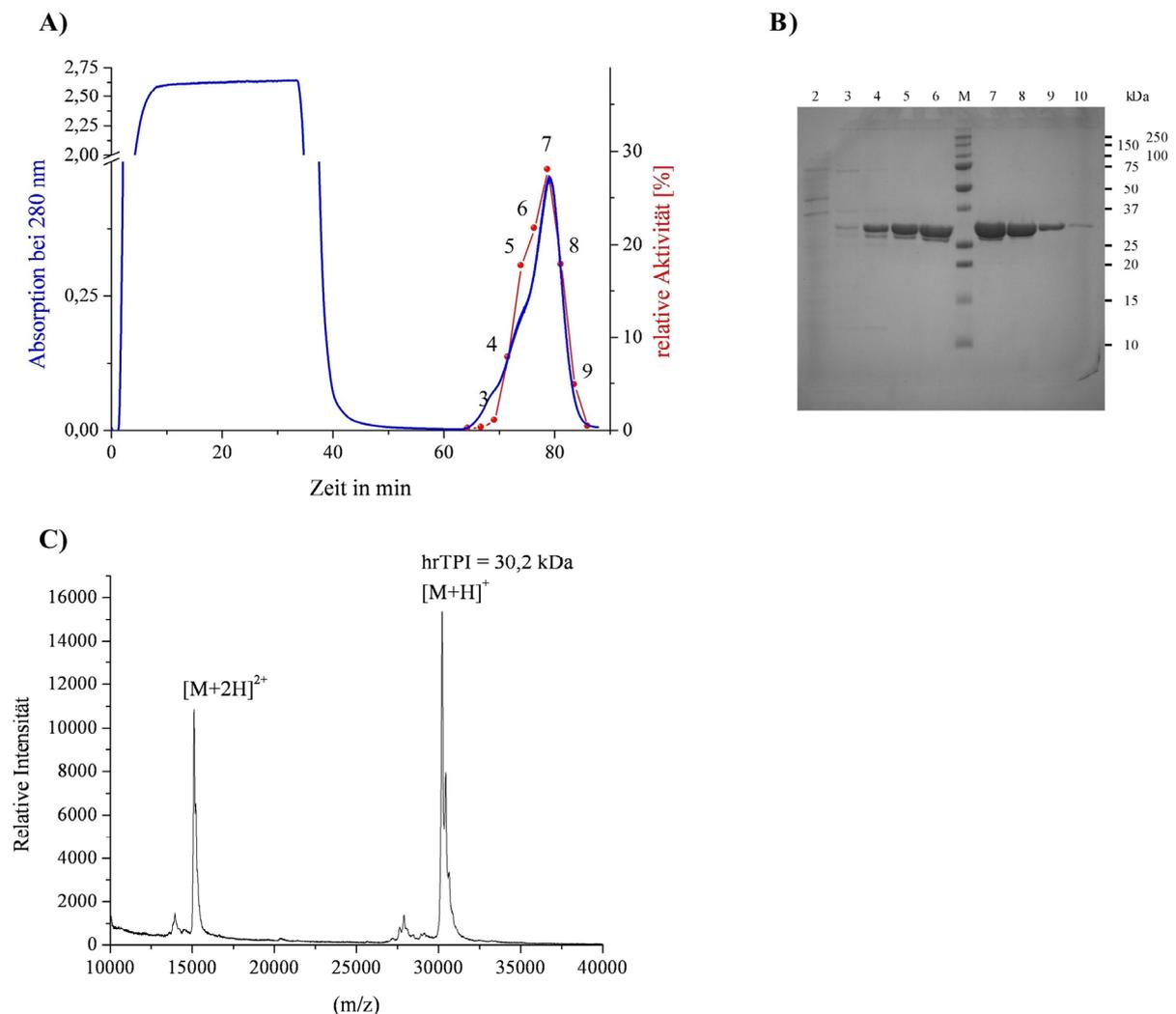


Abbildung 3-38: Reinigung der rekombinanten humanen Triosephosphat-Isomerase aus *E. coli*; **A)** Trennprofil der Ni-Sepharose, Elution mit Imidazol; **Blau:** Absorption bei 280 nm, **Rot:** Aktivität in % der aufgetragenen Gesamtaktivität; **B)** Elektropherogramm nach 7,5%iger SDS-PAGE der Fraktionen nach Ni-Sepharose; **C)** MALDI-TOF Massenspektrum der hrTPI

Durch einen linear steigenden Imidazolgradienten von 25 mM auf 500 mM eluierten Protein und Aktivität nahezu deckungsgleich. Die Fraktionen 5 bis 8 wurden vereinigt. Sie enthielten zusammen 18,7 mg Protein. Die TPI-Aktivität in diesen Fraktionen konnte erst nach einer zehntausendfachen Verdünnung gemessen werden und betrug insgesamt 23389 U. Das Molekulargewicht des Proteins wurde mittels SDS-PAGE auf ca. 30 kDa geschätzt und durch MALDI-TOF-Analyse bestätigt (Abbildung 3-38 B und C).

3.6.5 Die E2-Ubiquitin-Konjugasen UBE2G1 und UBE2R2

Für die rekombinante Expression der humanen E2-Ubiquitin-Konjugasen UBE2R2 und UBE2G1 wurde das *Pichia pastoris*-System ausgewählt, da die Expression dieser Enzyme in *Escherichia coli* nicht möglich gewesen war. Nach Herstellung beider Proteine im 500 ml-Maßstab, wurden sie mittels Ni-Sepharose aus dem Kulturüberstand gereinigt (Abbildung 3-39). Dieser Reinigungsschritt ist auch aufgrund der starken Überexpression der Proteine ausreichend.

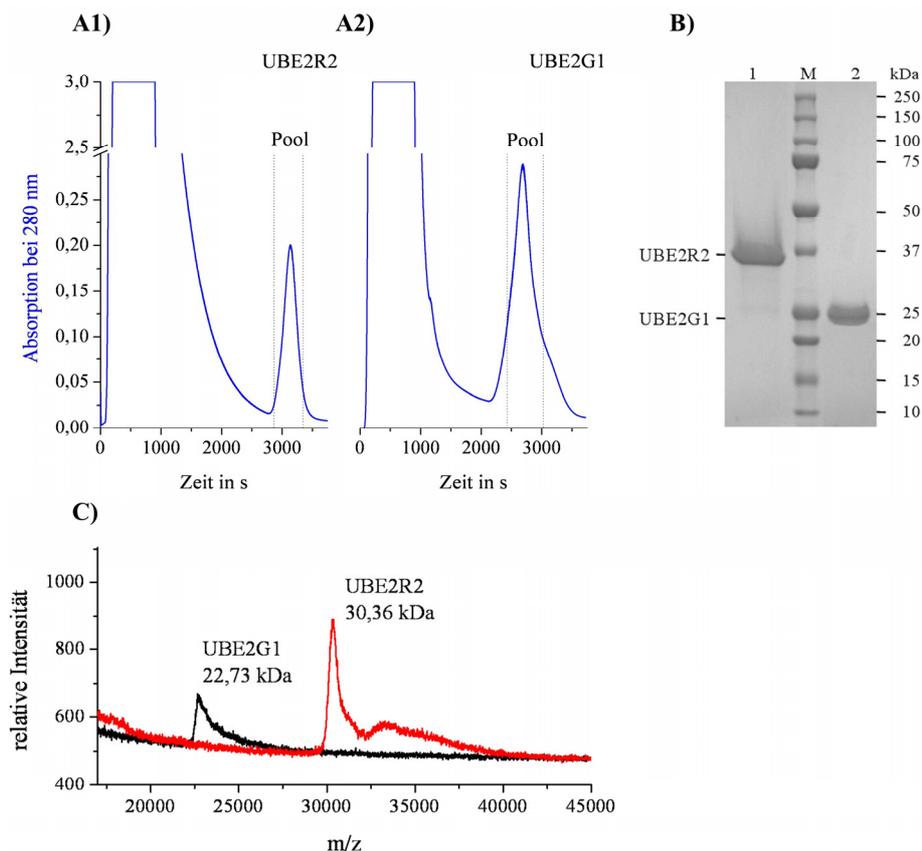


Abbildung 3-39: Präparation und Analyse der rekombinanten humanen Ubiquitinkonjugasen UBE2R2 und UBE2G1 nach Expression im *P. pastoris*-Stamm X33, Reinigung mittels Ni-Sepharose; **A)** Chromatogramme der Reinigung der rekombinanten Ubiquitinkonjugasen UBE2R2 (A1) und UBE2G1 (A2) mittels Ni-Sepharose; **B)** Elektropherogramm nach SDS-PAGE (10-20% Gradientengel) und anschließender Coomassie-Blue-Färbung, Bahn 1: UBE2R2; Bahn M: Proteinstandard Dual Color; Bahn 2: UBE2G1; **C)** MALDI-TOF Massenspektren der rekombinanten humanen UBE2R2 und UBE2G1

Die rekombinanten Proteine wurden modifiziert. C-terminal ist ein His₆-tag und N-terminal die α -Faktor Signalsequenz zum Transport durch den sekretorischen Weg angefügt. Letztere wird an Kex2- und STE13-Spaltstellen während der Sezernierung fast vollständig abgetrennt. Die Molekulargewichte der so modifizierten rekombinanten Proteine wurden mittels MALDI-TOF-Analyse ermittelt und betragen 30,36 kDa für UBE2R2 bzw. 22,73 kDa für UBE2G1.

3.6.6 Fusionsprotein aus dem zytosolischen Teil von Attractin und GST

Für die Expression des zytosolischen Teils von Attractin (Atrn_{cyt}) wurden zwei Strategien verfolgt. Das Protein sollte zunächst als separates lösliches Protein exprimiert werden. Dazu wurde die amplifizierte cDNA in pET-28a kloniert. Auch unter vielfacher Variation der Expressionsbedingungen (Temperatur, IPTG-Konzentration, Expressionsdauer, *E. coli*-Stamm) war es nicht möglich, die Bildung von *inclusion bodies* zu verhindern. In löslicher Form war Atrn_{cyt} nicht exprimierbar. Rückfaltungsversuche wurden ausgeschlossen, da weder für die Funktion, noch für die Struktur eine Vergleichsmöglichkeit zur Verfügung stand und die Funktionalität selbst untersucht werden sollte. Auch unter Benutzung des Vektors pPICZ α A und des *P. pastoris*-Systems konnte keine Expression nachgewiesen werden.

Für den Nachweis von Wechselwirkungen in Affinitätsanalysen wurde Atrn_{cyt} mit der Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert (GST/Atrn_{cyt}). Nach der Klonierung von Atrn_{cyt} in den Vektor pGEX-4T-1 konnte GST/Atrn_{cyt} im *E. coli*-Stamm BL21 exprimiert werden. Das Fusionsprotein sowie die unfusionierte GST wurden im 100 ml-Maßstab exprimiert und mittels Glutathion-Agarose gereinigt. Das Molekulargewicht des löslichen Fusionsproteins ergibt sich aus der Addition der Molekulargewichte von Atrn_{cyt} und GST zu 40 kDa (Abbildung 3-40).

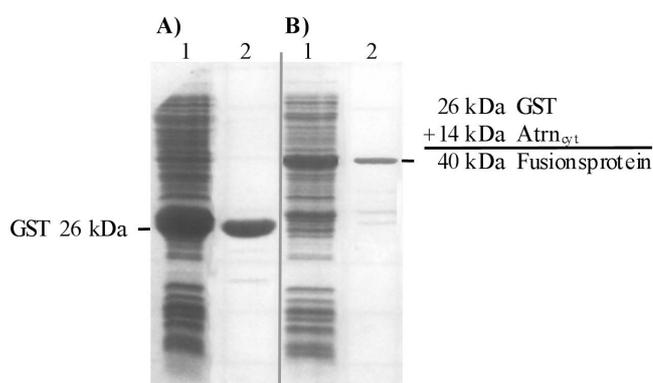


Abbildung 3-40: Elektropherogramm (15%ige SDS-PAGE) nach der Reinigung der Glutathion-S-Transferase (GST) sowie des Fusionsproteins (GST-Atrn_{cyt}) aus GST und dem zytosolischen Teil von Attractin (Atrn_{cyt}) mittels Glutathion-Agarose; **A)** GST; **B)** GST-Atrn_{cyt}; **Bahn 1)** *E. coli*-Lysat vor Reinigung; **Bahn 2)** eluiertes Protein nach der Reinigung

Zwischen der N-terminalen GST und dem C-terminalen Atrn_{cyt} befindet sich eine Thrombinschnittstelle. Diese ist bereits auf dem pGEX-4T-1 Expressionsvektor kodiert, aber in keinem der beiden Teilproteine vorhanden. Das Fusionsprotein wurde zur weiteren Kontrolle erfolgreich mittels Trombin (Fa. Sigma) in seine beiden Domänen gespalten (nicht gezeigt).

3.6.7 Interaktionsstudien mittels GST-Atrn_{cyt}-Fusionsprotein

Drei der in der Interaktionsselektion ermittelten potentiellen Wechselwirkungspartner von Atrn_{cyt} wurden rekombinant hergestellt. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob diese Interaktionen mit Atrn_{cyt} auch *in vitro* nachzuweisen sind. Dazu wurden rhTPI, rhUBE2G1 bzw. rhUBE2R2 mit dem Fusionsprotein GST/Atrn_{cyt} inkubiert. Als Negativkontrolle wurde die unfusionierte GST eingesetzt. Mit dem sogenannten *pull down assay* sollten interagierende Proteine mit dem GST-Atrn_{cyt}-Fusionsprotein copräzipitiert werden. Als Mittel zur Fällung des Proteins wurde Glutathion-Agarose eingesetzt. In einer anderen Anwendung ermöglicht diese Agarose nach dem Herstellen einer 1 ml-Säule ebenfalls die Bindung von GST bzw. Fusionsproteinen und deren Wechselwirkungspartnern. Diese Methode wurde unter *gravity flow*-Bedingungen durchgeführt.

Durch Anwendung dieser beiden Methoden konnte zwar die Bindung der GST-Negativkontrolle nachgewiesen werden, allerdings bereitete dies im Fall des Fusionsproteins GST-Atrn_{cyt} bereits deutliche Schwierigkeiten. Inkubationszeiten und -temperaturen wurden variiert. Dennoch konnte bisher keine Wechselwirkung des zytosolischen Attractin mit den rekombinanten Interaktionskandidaten *in vitro* bestätigt werden.

Die weitere Überprüfung dieser potentiellen Interaktionen, Interaktionen des großen extrazellulären Teils von Attractin, das in der Diskussion erwähnte und ebenfalls hier etablierte Melanozyten-Zellmodell sowie *in vivo* Untersuchungen anhand von Maus- oder Rattenmodellen können der Ausgangspunkt für folgende Arbeiten an Attractin sein.

4 Diskussion

Erst 40 Jahre nach der ersten Beschreibung der *mahogany*-Mutation durch Lane und Green (1960), wurde das ATRN-Gen (*mg*-Gen) identifiziert (Nagle *et al.*, 1999; Gunn *et al.*, 1999). Mutationen im ATRN-Gen, die zur Veränderung der Expression des Proteins führen, sind die primäre Ursache teilweise schwerwiegender Veränderungen des Phänotyps. Solche Mutationen wirken sich auf den Metabolismus, die Pigmentierung, das Immunsystem sowie die neuronale Architektur aus und spielen wahrscheinlich auch eine Rolle bei kanzerogenen Prozessen bzw. Differenzierung von Zellen.

Das vom humanen Ortholog des *mg*-Gens kodierte Protein war bereits 4 Jahre zuvor entdeckt und diesem eine DP4-ähnliche proteolytische Aktivität zugeordnet worden (Duke-Cohan *et al.*, 1995). Kann der Verlust dieser Funktion zumindest zum Teil den *mahogany*-Phänotyp erklären? Dies ist vorstellbar, da zahlreiche Substrate der DP4 existieren und diese zu verschiedenen Klassen zählen, wie den Chemokinen, Neuropeptiden und Peptidhormonen. Spekulationen darüber sind ohne ein genaues Substratprofil von Attractin schwierig. Dennoch wurden Vermutungen geäußert, Attractin könnte durch die Interaktion mit Peptidhormonen sowohl Immunsystem, Pigmentierung als auch den Energiemetabolismus (Jackson 1999) beeinflussen und dies nicht zuletzt durch eine Aktivität ähnlich der DP4. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob Attractin eine spezifische DP4-ähnliche Aktivität besitzt, die sich von anderen DP4-(ähnlichen) Proteinen unterscheidet, und die Folgen der *mahogany*-Mutation zumindest zum Teil erklärt.

4.1 Attractin und die DASH-Proteinfamilie

4.1.1 Präparation aus humanem Plasma

Das Ziel der Reinigung von Attractin war die Beantwortung der Frage nach dessen DP4-ähnlicher Aktivität. Da kaum Eigenschaften oder Funktionen dieses Proteins bekannt waren, wurde die Aktivität selbst als wichtigstes Präparationskriterium festgelegt. Chromatographie-, Präzipitations- und elektrophoretische Methoden wurden systematisch auf die Eignung zur Anreicherung der DP4-Aktivität geprüft. Die präparative IEF wurde als zentrale Methode verankert, da gezeigt werden konnte, dass Attractin mit einer DP4-ähnlichen Aktivität assoziiert ist und beide mit großer Übereinstimmung im Bereich von pH 3,5 - 4,2 fokussieren. Die schonende Abreicherung von verunreinigenden Proteinen in Vorbereitung auf die IEF konnte durch Kombination von Polyethylenglykolpräzipitation und Blue-Sepharose-Chromatographie erreicht werden. Nach der IEF konnte bei einer relativ hohen Wiederfindung durch den Einsatz von Ionenaustauschern sehr schnell homogenes Attractin

gereinigt werden. Unter Anwendung dieser Methode sind Präparationen von Attractin aus humanem Plasma sehr gut reproduzierbar. Obwohl eine neue Prozedur entwickelt wurde, konnten zunächst (abgesehen von wenigen Ausnahmen, die im Folgenden noch diskutiert werden) die in der Literatur angegebenen Daten, vor allem aber die Aussage zur DP4-ähnlichen Aktivität von Attractin, bestätigt werden (Friedrich *et al.*, 2003). Die aus humanem Plasma präparierten Attractin-Proben enthielten anfangs eine DP4-ähnliche Aktivität. Erste Schritte der enzymatischen Charakterisierung der DP4-ähnlichen Aktivität aus humanem Plasma nach der Präparation waren die Bestimmung von Basisparametern und der Ausschluss verschiedener möglicher Quellen als Ursache der Proteolyse, wie z.B. Verunreinigungen durch Aminopeptidasen oder DP4-ähnlichen Enzymen.

4.1.2 DP4-Aktivität

Die Verunreinigung der Attractin-Proben durch DP2 wurde bereits durch die Festlegung der optimalen Bedingungen zur Messung der DP4-ähnlichen Aktivität unwahrscheinlich. Sowohl die in Attractin-Proben enthaltene Aktivität als auch hrDP4 wiesen ein pH-Optimum um pH 8,0 auf. Bei diesem pH-Wert ist DP2 nahezu inaktiv. Das Enzym zeigt einen optimalen Substratumsatz zwischen pH 5,5 und 6,0 (Leiting *et al.*, 2003). Eine Kontamination durch FAP α wurde nicht festgestellt. Dazu durchgeführte Gelatinase-Zymographien erzielten negative Resultate. Die dimere Protease FAP α würde bei dieser Methode eine Bande von 180 bis 190 kDa (Levy *et al.*, 1999) aufweisen. Zudem sollte das Protein in gesunden adulten Geweben nicht vorkommen.

Die Charakterisierung des Umsatzes niedermolekularer fluorogener Substrate offenbarte eine mit DP4 vergleichbare, bevorzugte Hydrolyse von Xaa-Pro-AMC Substraten. Im Gegensatz dazu wird z.B. Pro-AMC nicht umgesetzt. Das schließt die Beteiligung von Aminopeptidasen am Substratumsatz aus. Die aus dem Plasma präparierte Aktivität konnte als prolinspezifische Dipeptidylpeptidase klassifiziert werden, die durch klassische Serinproteaseinhibitoren, wie DFP oder PMSF, hemmbar ist. Dies war insofern nicht verwunderlich, da bereits zuvor in anderen Studien ähnliche Ergebnisse erzielt wurden (Duke-Cohan *et al.*, 1995; Duke-Cohan *et al.*, 1996; Duke-Cohan *et al.*, 1998). Anhand dieser Daten wurde Attractin in die Gruppe der sogenannten DASH eingeordnet (Sedo *et al.*, 2001). Nach Reinigung und ersten Charakterisierungen hielten auch wir Attractin, in Übereinstimmung mit anderen Arbeitsgruppen, für ein eigenständiges DP4-ähnliches Protein. In den gewonnenen Attractin-Proben konnte zunächst keine Verunreinigungen mit anderen Proteinen (speziell DP4) festgestellt werden. Vergleichende Charakterisierung von Attractin und DP4 offenbarten unterschiedliche proteinbiochemische Parameter. In der analytischen und der präparativen

IEF ergab sich durch Gegenüberstellung von Protein- und Aktivitätsfärbung die übereinstimmende Fokussierung von Attractin als auch DP4-ähnlicher Aktivität in einem pH-Bereich von pH 3,5 - 4,2. Neben dieser Hauptaktivität konnte in einigen Fällen auch eine zweite DP4-ähnliche Aktivität im Plasma festgestellt werden, deren Anteil an der Gesamtaktivität nur sehr gering ist. Diese wurde für elektrophoretische Untersuchungen stark konzentriert und ein pI im Bereich von pH 4,7 bis 5,3 bestimmt (Abbildung 4-1). Als Vergleichsproben wurden sowohl die DP4 aus Schweineiere (M. Wermann, probiodrug AG), als auch die DP4 aus humaner Plazenta herangezogen. Der pI dieses zweiten Enzyms mit DP4-ähnlicher Aktivität aus humanem Plasma (*minor form*) ist annähernd identisch mit dem der humanen plazentalen DP4 (pH 4,9 - 5,5). Sie unterscheiden sich aber von Attractin und der in diesen Fraktionen enthaltenen Aktivität. Ein Unterschied, der auch durch die native PAGE verdeutlicht wird (siehe Abbildung 3-1, Seite 58). Auch dort zeigen die Hauptaktivität und die Proteinfärbung von Attractin ein identisches Laufverhalten, unterscheiden sich aber deutlich von bekannten DP4-Formen. Es konnte angenommen werden, dass neben Attractin auch DP4 im humanen Plasma vorhanden ist, sich aber die Plasma-DP4 von anderen humanen DP4-Formen kaum unterscheidet und nur einen geringen Teil der Aktivität verursacht.

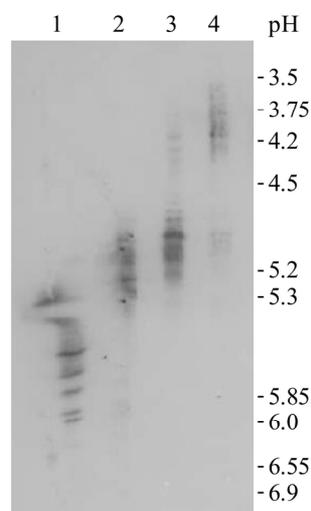


Abbildung 4-1:

Elektropherogramm nach analytischer isoelektrischer Fokussierung und Aktivitätsfärbung mittels Gly-Pro- β -MNA;
Bahn 1: snDP4; **Bahn 2:** humane plazentale DP4; **Bahn 3:** Fraktion mit DP4-ähnlicher Aktivität aus humanem Plasma (*minor form*); **Bahn 4:** Attractin-Fraktion aus humanem Plasma mit DP4-Aktivität

Durch späteren Nachweis und die Separierung von DP4 und Attractin, konnten erstmals die pI-Werte dieser beiden Plasma-Proteine eindeutig zugeordnet werden. Sie besitzen beide den beschriebenen sauren pI, mit dem auch die Hauptaktivität im humanen Plasma verbunden ist. Auch in anderen Untersuchungen wurden DP4-ähnliche Aktivitäten in diesen beiden Bereichen nachgewiesen. Die Enzyme, die diese Aktivitäten im Plasma verursachen, wurden nicht identifiziert (Krepela *et al.*, 1983). Vermutlich stellt der breite pI-Bereich die Mikroheterogenität von Isoformen der DP4 dar. Diese kann durch posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen, Phosphorylierungen, Sulfatierungen oder

Acetylierungen verursacht sein. Möglicherweise entstammen sie auch unterschiedlichen Expressionsorten (Ursprungsgeweben). Mit einer Ausnahme enthalten alle von Kähne *et al.* (1996) untersuchten Organhomogenate und Zelltypen DP4 mit pI-Werten im Bereich von ca. 4,6 - 5,3. Einzig die Lysate PHA-aktivierter Lymphozyten enthalten Gly-Pro- β -MNA-spaltende Aktivitäten, die in exakt den beiden pI-Bereichen fokussieren, die von uns im Plasma bestimmt wurden. Die saure Form ist Neuramidase-sensitiv (Kahne *et al.*, 1996). Wahrscheinlich wird der Hauptanteil der DP4-Aktivität im humanen Plasma von DP4 verursacht, die von aktivierten Lymphozyten freigesetzt wird.

Humanes Plasma-Attractin ist kein DP4-ähnliches Enzym

Die enzymatische Aktivität von Attractin wurde zuvor keinesfalls als DP4-identisch beschrieben. Allerdings konnte von uns weder die Hemmung der DP4-ähnlichen Aktivität in Attractin-Proben durch EDTA (Duke-Cohan *et al.*, 1996), noch die spezifische Detektion von Attractin durch [³H]DFP (Duke-Cohan *et al.*, 1995) bestätigt werden. Die DP4-Konzentration in Attractin-Proben ist sehr gering. Daher bindet [³H]DFP trotz intensiver Dialyse unspezifisch an das hoch konzentrierte Attractin. Dies wurde durch eine inaktive S630A-Variante der rekombinanten DP4 bestätigt (nicht gezeigt). Auch die differenzierte Hydrolyse des Chemokines RANTES durch Attractin und rhDP4 (Duke-Cohan *et al.*, 2000) wurde von uns widerlegt, da die sukzessive Abspaltung der ersten beiden Dipeptide von RANTES sowohl durch rhDP4 als auch durch die später identifizierte humane Plasma-DP4 nachgewiesen werden konnte. Die ermittelte Zeitkonstante der Freisetzung von Tyr₃-Ser₄ ist um ca. zwei Größenordnungen geringer als die Abspaltung von Ser₁-Pro₂. Ob die Bildung von RANTES (5-68) eine physiologische Bedeutung hat, ist offen.

Speziell die zur Charakterisierung eingesetzten enzymspezifischen Inhibitoren (DP4I1 und DP8/9I1) verdeutlichen, dass sich die isolierte Plasmaaktivität von allen DP4-ähnlichen Enzymen, jedoch nicht von DP4 unterscheidet. Dabei besitzt Attractin keinerlei strukturelle Ähnlichkeit zu DP4. Selbst eng mit DP4 verwandte humane Proteine und Orthologe des Enzyms zeigen charakteristische Unterschiede. Sowohl der reversible Inhibitor DP8/9I1 als auch der irreversible Inhibitor Ala-Pro(OPh-4-Cl)₂ (nicht gezeigt) können zur Differenzierung von DP4_{Schwein} und DP4_{Mensch} eingesetzt werden. Auch in ihrer Fähigkeit Proteininteraktionen einzugehen unterscheiden sich DP4-Paraloga. Die DP4-Formen von Ratten und Mäusen sind, im Gegenteil zu denen von Mensch, Rind oder Kaninchen, nicht zur ADA-Bindung fähig (Dinjens *et al.*, 1989; Schrader *et al.*, 1990; IwakiEgawa *et al.*, 1997).

Mit der X-Pro-Dipeptidylpeptidase (EC 3.4.14.11) aus *Lactococcus lactis* (Chich *et al.*, 1992) existiert aber auch ein Beispiel für ein Enzym mit DP4-ähnlicher Aktivität ohne eine

Verwandtschaft zu DP4. Wie Attractin weist das Protein nur eine etwa zu 15% identische Aminosäuresequenz zu DP4 auf. Die Sequenz um das aktive Serin (G-X-S-Y-X-G) entspricht jedoch dem Motiv anderer Serinproteasen wie DP4, DP2 oder PEP.

Im Unterschied zur X-Pro-Dipeptidylpeptidase aus *Lactococcus lactis* besitzt das von Duke-Cohan *et al.* (1998) postulierte aktive Zentrum des humanen Attractin nur geringe Ähnlichkeit zu denen von typischen Vertretern der DP4-Klasse (Attractin: G-R-S-G-G). Wie im Anhang auf S. 120 dargestellt, ist der N-Terminus des ansonsten hoch konservierten Proteins im Vergleich zum Attractin verschiedener Säugerspezies sehr variabel. Der Serinrest an Position 26 (in der Sequenz G-R-S-G-G) ist ausschließlich beim menschlichen Protein vorhanden. Zudem wurde Attractin von uns erstmals N-terminal sequenziert. Das prozessierte, zirkulierende Attractin beginnt an Position 84. Dies wurde durch alle folgenden Sequenzierungen gereinigten Plasma-Attractins bestätigt. Vermutlich wird das Signalpeptid an dieser Stelle abgespalten. Das postulierte aktive Zentrum ist demnach am zirkulierenden Protein nicht vorhanden, sondern Bestandteil einer langen Signalsequenz. Auch die Vorhersage der Signalpeptidasespaltstelle (Programm: SignalP) ermittelte für Attractin eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit der Spaltung an dieser Stelle. Die Aminosäuren um die Spaltstelle sind konserviert, so dass sie für alle Säugerspezies in Frage kommt. Nach Abspaltung dieses inhomogenen N-Terminus sind alle bekannten Attractin-Sequenzen von Säugern annähernd identisch. Der Anteil identischer Aminosäuren beträgt im Vergleich zum Menschen mindestens 95% (Beispiele s. S. 120).

Atrn3 beinhaltet eine Deletion im N-terminalen Bereich, in der sich auch die oben genannte Signalpeptidasespaltstelle befindet. Wie aus verschiedenen Veröffentlichungen hervorgeht, handelt es sich bei dem von Duke-Cohan *et al.* beschriebenen löslichen Attractin aus humanem Serum um diese Isoform 3. Wie diese sollte auch das rekombinante Atrn3 proteolytisch aktiv sein (Duke-Cohan *et al.*, 1995; Duke-Cohan *et al.*, 1998; Gunn *et al.*, 1999). Atrn3 konnte allerdings bei keiner unserer Präparationen identifiziert werden.

Identifizierung der humanen Serum-DP4

In Übereinstimmung mit Duke-Cohan *et al.* (1995) konnten wir zunächst keine Verunreinigungen durch DP4 feststellen. Obwohl inzwischen eine Reihe von Autoren von einer DP4-ähnlichen Aktivität von Attractin ausgeht (Duke-Cohan *et al.*, 1996; Duke-Cohan *et al.*, 1998; Duke-Cohan *et al.*, 2000; Malik *et al.*, 2001; Sedo *et al.*, 2003; Busek *et al.*, 2004; Sedo *et al.*, 2005; Wrenger *et al.*, 2006a und b), waren wir nach Charakterisierung der "Attractin-Aktivität" der Überzeugung, dass nur Spuren der Dipeptidylpeptidase 4 die Ursache dieser Aktivität sein können. Für den nötigen Nachweis war der hohe Grad der

Reproduzierbarkeit der Attractin-Reinigung Voraussetzung. Im Unterschied zu DP4, sollten Attractin und auch DP4- β keine ADA-Affinität besitzen (Kameoka *et al.*, 1993; Morrison *et al.*, 1993; Duke-Cohan *et al.*, 1995; Jacotot *et al.*, 1996; Dong *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1998). Mittels ADA-Affinitätschromatographie konnte aus gereinigten, stark konzentrierten Attractin-Proben ein Enzym isoliert werden. Die Aktivität dieses Enzyms wurde zuvor deutlich als DP4-identisch charakterisiert. Es besitzt ADA-Affinität, ein monomeres Molekulargewicht von 110 kDa und ist DP4 immunoreaktiv. Attractin ist nicht in der Lage an ADA zu binden. Die so getrennte Attractin-Fraktion enthält annähernd die Gesamtproteinmenge der Ausgangsprobe jedoch keine Aktivität. Mindestens 99,7% der in Attractin-Proben enthaltenen Aktivität sind daher der Plasmaform der Dipeptidylpeptidase 4 zuzuordnen, da sie in der Attractin-freien, DP4-immunoreaktiven Fraktion aufgefangen wurden. Damit wurde erstmals der Beweis erbracht, dass Attractin aus humanem Plasma keine DP4-ähnliche Aktivität besitzt.

Rekombinante humane Attractin-Isoformen sind enzymatisch nicht aktiv

Die Trennung der beiden nativen Formen von Attractin und DP4 aus einer gemeinsamen Ausgangsprobe war entscheidend für die Entkräftung der postulierten DP4-ähnlichen Aktivität von humanem Plasma-Attractin. Wie aber ist die publizierte DP4-ähnliche Aktivität von rekombinantem Attractin zu erklären (Duke-Cohan *et al.*, 1998)? Auch die Beantwortung dieser Frage ist von zentraler Bedeutung gewesen.

Aus Gründen, die vermutlich im stark GC-haltigen N-terminalen Bereich begründet liegen, waren die Amplifikationen der kompletten kodierenden Sequenzen der Isoformen 1 und 2 nur im analytischen Maßstab möglich. Atrn2 wurde daher mit Hilfe überlappender Sequenzabschnitte in den Expressionsvektor pPICZ α A integriert. Da die Expression von rhAtrn2 im Hefesystem nicht nachgewiesen werden konnte, wurde das Säugerzellsystem bevorzugt. Für die Expression in Säugerzellen konnten Vektoren verwendet werden (pcDNA3.1/Myc-His B/Atrn1, pcDNA3.1/Myc-His B/Atrn3 und pSecTag2B/Atrn3), die freundlicherweise von Duke-Cohan zur Verfügung gestellt und von uns durch Sequenzierung überprüft wurden. Zudem wurde Atrn2 von uns kloniert (pcDNA3.1/Myc-His B) und in die Experimente einbezogen. Die Lysate aller transfizierten 293HEK-Zellen enthielten eine DP4-ähnliche Aktivität. Diese unterscheidet sich nicht von der intrinsischen Aktivität untransfizierter Kontrollen und konnte durch chromatographische Methoden von den rekombinanten Attractin-Isoformen separiert werden. Der Einsatz des Inhibitors DP8/911 reduzierte die Substrathydrolyse in HEK-Zelllysaten auf unter 5%. Dies lässt vermuten, dass die Aktivität zu einem großen Teil von DP8 und/oder DP9 verursacht wird. Die Expression

der beiden Isoformen von DP9 in den verwendeten Zellen wurde per Western Blot bestätigt. Alle exprimierten rekombinanten humanen Isoformen von Attractin sind enzymatisch inaktiv. Fünf Isoformen des humanen Attractin waren zu Beginn dieser Arbeit in Datenbanken verzeichnet. Trotz Verwendung spezifischer Primerkombinationen zur Erkennung aller Isoformen, gelang nur die Amplifikation differenzierender Abschnitte von Atrn1 und Atrn2. Die anderen Isoformen konnten nicht nachgewiesen werden. Unsere Ergebnisse wurden inzwischen bestätigt. Atrn4 und 5 wurden nach der Deklaration „nicht auf experimentellen Daten beruhend“ aus allen Datenbanken entfernt (expasy.org, NCBI). Obwohl Atrn1 und 2 rekombinant mit Hilfe des Vektors pcDNA3.1/Myc-His B hergestellt werden konnten, war dies für Atrn3 nicht möglich. Erst nach N-terminaler Fusion einer artifiziellen *leader sequence* (pSecTag2B), die eine zusätzliche Signalpeptidasespaltstelle enthält, konnte das Protein exprimiert werden. Vermutlich war die vorhergesagte N-terminale Deletion der Grund für die Expressionsprobleme. Atrn3 wurde kürzlich aufgrund von Klonierungsartefakten vom Antragsteller selbst zurückgezogen (NCBI, NM012070, AF034957). Daher ist davon auszugehen, dass beim Menschen neben dem Precursor Atrn1 nur die lösliche Form Atrn2 existiert. Die Bestimmung der DP4-ähnlichen Aktivität von rhAtrn3 (Duke-Cohan *et al.*, 1998) erfolgte daher anhand eines nativ nicht existenten Proteins.

Im ersten Teil dieser Arbeit gelang erstmalig eine homogene Präparation von Attractin. Durch enzymologische Charakterisierung dieses humanen Proteins aus Blutplasma wurde die „Attractin-Aktivität“ der humanen löslichen Form der Dipeptidylpeptidase 4 zugeordnet und anschließend durch Separierung der Plasma-DP4 belegt. Der dabei erreichte Reinigungsfaktor zur Präparation von DP4 aus humanem Plasma war größer als 100 000. Diese Ergebnisse wurden durch rekombinante Expression und Reinigung aller bekannten Isoformen des humanen Attractins bestätigt. Auch diese rekombinanten Isoformen wurden erstmals bis zur Homogenität präpariert. Der am weitesten entwickelte Ansatz der Funktionsaufklärung von Attractin, die DP4-ähnliche Aktivität, konnte erstmals widerlegt werden. Der *mahogany*-Phänotyp muss daher andere primäre Ursachen haben, als den Verlust einer Proteaseaktivität.

4.2 Attractin, Adhäsionsprotein oder Rezeptor

Alle bisherigen Reinigungen des humanen Attractin belegen, dass das Protein mit einer DP4-Aktivität assoziiert ist (Duke-Cohan *et al.*, 1995; Friedrich *et al.*, 2003). Die einzige bisher gefundene Möglichkeit Attractin und die DP4-Aktivität zu trennen besteht darin, die DP4 hoch affin zu binden (Friedrich *et al.*, 2007). Dies könnte begründen, warum bei Präparationen von DP4 aus humanem Serum durch Durinx *et al.* (2000) und Shibuya-Saruta

et al. (1996), kein Attractin beschrieben wurde. Die entscheidenden Reinigungsfortschritte wurden dort durch den Einsatz von DP4-spezifischen Affinitätschromatographien (zu frühen Zeitpunkten der Isolierungen) erzielt (ADA- und/oder DP4-Antikörper).

Könnten Funktionen der löslichen Formen von Attractin und/oder DP4 an die Fähigkeit gekoppelt sein, Heteromere aus beiden Proteinen zu bilden? Eine Assoziation von Attractin und DP4 würde unter anderem die von uns nachgewiesene identische elektrophoretische Mobilität dieser Plasmaproteine in IEF und PAGE erklären. Die zur Beantwortung dieser Frage durchgeführten Untersuchungen mittels Oberflächenplasmonresonanz und Copräzipitation konnten keine Bindung von Attractin und DP4 nachweisen. Auch die isoelektrischen Punkte sowie die Mobilitäten in der nativen PAGE ändern sich für beide Proteine nicht, nachdem sie durch ADA-Affinitätschromatographie getrennt wurden (nicht gezeigt).

4.2.1 Rezeptorfunktion

Aus der Analyse von Mutationen, die weit über *mahogany* und verwandte Mutationen hinausgehen, wurden in der Literatur Modelle zur Funktion von Attractin abgeleitet. Sie liefern sehr wichtige Anhaltspunkte und Vergleichsmöglichkeiten. Funktionsverlust-Mutationen des MC1R (*MC1R^e*, *extension*) führen, wie die Überexpression von Agouti (*A^Y*), zu einer gelben Fellfärbung bei Mäusen. Mutationen, durch die ein konstitutiv aktiver MC1R gebildet wird (*E^{so}*, *E^{so-3J}*) (Robbins *et al.*, 1993), haben wie *mahogany* (*mg*) und *mahoganoid* (*md*) eine starke Zunahme der Eumelaninbildung und eine sehr dunkle Fellfarbe zu Folge. Die *A^Y*-Effekte wie Gelbfärbung und Fettleibigkeit werden von *mg* und *md* unterdrückt. *Mg* und *md* zeigen hingegen keine Auswirkung auf die Fellfärbung bei gleichzeitiger Ausprägung der *MC1R^e*-Mutation (Miller *et al.*, 1997). Aus diesen Untersuchungen wurden *upstream / downstream* Anordnungen zur Übertragung des melaninbildenden Signals in die entsprechende Zelle erarbeitet sowie verschiedene Modelle zur Funktion von Attractin entwickelt. Eines der prominentesten sieht Attractin als niedrigaffinen Corezeptor, der Agouti bindet und die Assoziation von Agouti an den MC1R erst ermöglicht bzw. verstärkt (Jackson 1999).

In einer Studie von He *et al.* (2001) wurde dieser Ansatz und die Frage, wie Attractin in den Prozess der Agouti-MC1R-Beziehung involviert ist, untersucht. Mittels *Surface Plasmon Resonance* wurde die Affinität zwischen humanem Attractin und murinen Agouti bzw. humanem Agrp untersucht. Es wurde festgestellt, dass Agouti niedrigaffin ($K_D = 0,7 \mu\text{M}$) an Attractin bindet. Zu dieser Interaktion ist Agrp nicht in der Lage. Dies würde nach Meinung der Autoren auch begründen, warum die durch Agrp-Überexpression verursachte

Fettleibigkeit durch *mahogany* nicht unterdrückt wird. Anhand synthetisch hergestellter Peptide wurde festgestellt, dass allein der N-Terminus von Agouti (His²³-Arg⁸⁵), nicht aber der C-Terminus (Ser⁷³-Cys¹³¹) für die Bindung verantwortlich ist. Der für die MC1R-Interaktion wichtige C-Terminus von Agouti bliebe demnach frei zugänglich.

Das humane Agrp hat einen theoretischen pI von 7,4 (www.expasy.org) und unterscheidet sich damit von murinem (und humanem) Agouti mit einem pI von 9,6. Der N-Terminus von Agouti (His²³-Arg⁸⁵) besitzt einen pI von 10,6. Darin ist die in Agrp nicht vorhandene basische Domäne (Maus-Agouti Lys⁵⁷-Arg⁸⁵) mit einem pI von 11,7 enthalten. Der von uns bestimmte isoelektrische Punkt von gereinigtem, posttranslational modifiziertem Attractin liegt im sehr sauren Bereich. Die Differenz der isoelektrischen Punkte von Agouti und Plasma-Attractin (das durch Kooperation mit Duke-Cohan auch bei der Untersuchung von He *et al.* verwendet wurde) würde eine elektrostatische Anziehung erklären. In diesem Zusammenhang ist aber die Verwendung eines salzfreien Bindungspuffers als kritisch anzusehen. Diese niedrigaffine Bindung zwischen Agouti und Attractin unter artifiziellen Bedingungen erscheint physiologisch kaum mehr relevant. Zudem wurde eine ähnliche Affinität auch zu anderen basischen Peptiden wie RANTES und SDF-1 α festgestellt (Duke-Cohan *et al.*, 2004). Dennoch sind extra- und/oder intrazelluläre Bindungen löslicher oder zellassoziierter Effektoren an Attractin wahrscheinlich.

4.2.2 Interaktionsselektion in Hefen

Der hohe Grad der Konservierung von Attractin wird besonders an der aus 129 Aminosäuren bestehenden zytosolischen Domäne deutlich. Sie ist bei Säugern quasi identisch. Durch einen einzelnen Basenaustausch ist lediglich ein Isoleucin (Mensch: Ile₁₄₀₅) beim Rind durch Valin ersetzt. Diese Domäne wurde für eine Interaktionsselektion gewählt, da zytosolische Protein-Protein-Wechselwirkungen einen mutmaßlichen funktionellen Mechanismus des membranständigen Attractin darstellen. Durch *screening* einer Hela-cDNA-Bibliothek konnten drei zytosolische Proteine selektiert werden. Drei weitere Proteine wurden als sehr unwahrscheinliche Kandidaten eingestuft, da sie sehr häufig bei dieser Methode selektiert werden.

Die große Anzahl der isolierten Kolonien hebt die Triosephosphat-Isomerase als auffälligsten Interaktionskandidaten hervor. Da die Kolonien von vier verschiedenen Klonen abstammen, können zufällige Mutationen der Hefen als Grund eines falsch-positiven Selektionsergebnisses ausgeschlossen werden. Die Interpretation des Resultates ist allerdings schwierig. Die TPI ist ein Schlüsselenzym der Glykolyse. Aber auch Attractin hat einen wesentlichen Einfluss auf den Metabolismus. Die *mg*-Mutation hebt den A^Y -

Adipositasphänotyp auf und wirkt Hyperleptinämie, Hyperglykämie, Hyperinsulinämie, Typ-2-Diabetes sowie gesenkter Thermogenese entgegen. *Mahogany* erhöht die motorische Aktivität sowie die Metabolismusrate. Zwar führen *Attractin*-Mutationen zu Neurodegeneration und Tremor, dennoch kann dies die metabolischen Auswirkungen (Unterdrückung von A^Y) nicht allein erklären, da andere Fettleibigkeitsphänotypen von *mg* nicht unterdrückt werden (siehe Einleitung). Interessanterweise ist eine verminderte Funktion der TPI mit neurologischen sowie immunologischen Veränderungen verbunden. Neben hämolytischer Anämie und Makrozytose verursacht ein TPI-Mangel neuromuskuläre Beeinträchtigungen, beginnend mit Hypotonie in den Beinen, motorischen Defekten, Amyotrophie, Dystonie und Dyskinesie mit schwerwiegendem Tremor sowie mentaler Retardierung. Durch anormale Immun- und Leukozytenfunktionen kommt es zudem sehr häufig zu Infektionen (Schneider 2000; Valentin *et al.*, 2000; Olah *et al.*, 2002). Ob TPI und *Atrn* tatsächlich in gegenseitig beeinflussende Mechanismen involviert sind, konnte bisher nicht geklärt werden.

Als weitere Ergebnisse der Interaktionsselektion wurden die E2-Ubiquitinkonjugasen UBE2R2 (UBC3B, ein Homolog von UBC3/CDC34) und UBE2G1 (UBC7) ermittelt. Funktionsverlustmutationen von *Attractin* und *Mgrn1*, einer E3-Ubiquitinligase, verursachen einen fast identischen Phänotyp. Die Konjugasen könnten direkt oder indirekt das Bindeglied zwischen den beiden Proteinen darstellen. Obwohl die Substratspezifität in den meisten Fällen durch E3 bestimmt wird, kann die E2 auch direkt mit dem Substrat interagieren (Glickman *et al.*, 2002). Auch die Übertragung von Ubiquitin kann in wenigen Fällen direkt von E2 auf das Substrat erfolgen (Schnell *et al.*, 2003). Daher kann *Attractin* selbst oder ein durch *Attractin* präsentiertes Substrat ubiquitinyliert werden. Auf die Markierung durch ein einzelnes Ubiquitin (Monoubiquitinierung) oder eine Ubiquitinkette können eine Reihe möglicher Mechanismen folgen. Neben der Degradation im Ubiquitin-Proteasom-System, ist auch eine limitierte Proteolyse denkbar. Ubiquitinylierungen können Protein-Protein-Interaktionen regulieren. Zudem kann eine Monoubiquitinylierung zum Beispiel die Endozytose eines Rezeptors in Antwort auf eine Ligandenbindung verursachen (Hicke 1997; Schnell *et al.*, 2003).

Auch Thomas *et al.*¹ favorisieren die Möglichkeit, dass das *Attractin*-Signal einer Konjugase-vermittelten Ubiquitinylierung an *Attractin* selbst oder nachgeschalteter Effektoren bedarf. Sie ermittelten als Interaktionspartner des C-Terminus von *Attractin* die murine UBC13, dessen *Drosophila melanogaster*-Homolog (*bendless*, *ben*) an nicht proteosomalen, nicht

¹ Leider liegt von dieser Arbeit nur die Zusammenfassung einer Posterpräsentation vor.

degradativen Mechanismen beteiligt ist. Bisher kann keine direkte Verbindung der selektierten Ubiquitinkonjugasen mit Mgrn1 hergestellt werden, da die Autoubiquitylierung dieser Ubiquitinligase nach He *et al.* (2003a) eine Spezifität für UBC5 (aber nicht für UBC3) besitzt. In einer anderen Veröffentlichung berichten DiGiovanni *et al.* (2005) von einer möglichen Interaktion von Atrn_{cyt} mit der leichten Kette (LC2) des Mikrotubuli-assoziierten Proteins 1a. Eine solche Interaktion könnte durch die nachgewiesene gemeinsame Genregulation (nach SCI = Rückenmarksverletzung; siehe Einleitung) induziert sein.

Obwohl an diesen Beispielen deutlich wird, dass auch andere Arbeitsgruppen Versuche zur Identifizierung von Wechselwirkungen des zytosolischen Attractin unternommen haben, blieb die Veröffentlichung bestätigter Interaktionen bisher aus. Die drei in der vorliegenden Arbeit selektierten Interaktionskandidaten sowie das Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase (GST/Atrn_{cyt}) und Atrn_{cyt} wurden in *P. pastoris* bzw. *E. coli* rekombinant hergestellt und gereinigt. Aber auch hier konnte bisher weder eine *in vitro*-Interaktion dieser Proteine zu GST/Atrn_{cyt}, eine Beeinflussung der Aktivität der TPI durch das rekombinante Fusionsprotein, noch eine Genregulation der Kandidaten nach Überexpression von Atrn1 auf 293HEK-Zellen nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Die physiologische Relevanz dieser Bindungen ist ungeklärt.

Daher sollte auch die Möglichkeit von falsch-positiven Ergebnissen diskutiert werden. Für diese Interaktionsselektion wurde der zytosolische Teil von Attractin willkürlich als separater Proteinbereich betrachtet. Dies wirft unweigerlich die Frage auf, ob sich eine bindungspotente Konformation nur in Fusion mit den N-terminalen Proteinbestandteilen oder bei Membranständigkeit ergibt. Aktivierende Strukturänderungen von Atrn_{cyt} können z.B. von extrazellulären Stimuli, wie einer Bindung hervorgerufen werden. Schließlich wurde auch die Bindung von Proteinkomplexen oder posttranslationale Modifikationen von *bait*- oder *prey*-Protein noch nicht berücksichtigt. Die zu erwartenden Interaktionen sollten im Zytoplasma höherer Eukaryonten stattfinden. Im Hefe-2-Hybrid-System wird diese Interaktion in den Zellkern eines niederen Eukaryonten transferiert. Es unterscheiden sich Milieu und Organismus, d.h. Faltung und Oberflächenstruktur können verschieden zu den realen Bedingungen sein. Es ist ebenfalls möglich, dass die Identifizierung realer Interaktionspartner von Atrn_{cyt} unter diesen artifiziellen Bedingungen nicht möglich ist (falsch negativ). Evtl. müssen zum Nachweis der Interaktion *in vivo*-Methoden verwendet werden. Eine andere Möglichkeit der falsch-positiven Identifizierung von Wechselwirkungen besteht in der Möglichkeit, dass die (humanen) *prey*- und *bait*-Konstrukte nicht direkt interagieren, sondern das Reportergen erst durch Rekrutierung eines Hefeproteins (also durch Vermittlung der Bindung) indirekt aktiviert wird.

essentielle Bindungsstellen darstellen, die Interaktionen beispielsweise mit den MCR eingehen. Kultivierte B16-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen dieser Peptide inkubiert. Die Applikation von 0,1 mM der Peptide hatte einen erstaunlichen Effekt. Obwohl die zytosolische Lokalisation beider Peptide (Acy01 und Acy01_{inv}) nachgewiesen werden konnte, ist nur Acy01 zu einer beträchtlichen (dosisabhängigen) Steigerung der Melaninbildung in der Lage (Abbildungen im Anhang). Dies könnte bedeuten, dass in diesem Punkt der Effekt der *mahogany*-Mutation durch Antagonismus des Peptides gegen die Wirkung von Atrn_{cyt} imitiert wurde. Spekulativ könnte Acy01 eine potente Bindungsstelle von Attractin durch die zytosolische Lokalisation blockieren und die Funktion des Proteins durch Antagonismus (zum Teil) zerstören. Eine Folge könnte die beobachtete Zunahme der Melaninbildung ähnlich dem *mahogany*-Phänotyp sein. Ursache der starken Pigmentbildung ist wahrscheinlich die ebenfalls durch das Peptid hervorgerufene dosisabhängigen cAMP-Stimulation (Abbildung siehe Anhang), also eines der primären melaninbildenden Signale. Ist es möglich, dass Attractin das cAMP-Signal unabhängig von Agouti, Agrp und α MSH beeinflusst und eine verringerte Attractin-Expression zu einer konstitutiven Erhöhung des cAMP-Spiegels führt? Eine solche cAMP-Überproduktion könnte zu einem akuten pathologischen Stressstatus führen.

An *C. elegans*-Modellen konnte gezeigt werden, dass die Expression von konstitutiv aktiven stimulierenden Formen von G-Proteinen (G α s) zu einer Hyperkontraktion der Muskulatur und Bewegungsdefekten sowie zur Vakuolisierung und Degeneration von Neuronen führt (Korswagen *et al.*, 1997). Vor allem Motoneuronen sind empfindlich gegenüber dieser Degeneration. Auch Berger *et al.* beobachten in einem solchen Modell einen neuronalen Zelltod, dem ein starkes Anschwellen der Zellen voraus geht (Berger *et al.*, 1998). Verschiedene Neuronenzelltypen variieren dabei stark in ihrer Empfänglichkeit. Die cAMP-Überexpression wurde als Grund der Degeneration bestimmt. Erklärungen des Anschwellens und Zelltodes von Neuronen werden unter anderem in der cAMP-gesteuerten Regulation der Ionenkanäle und -transporter gesucht. Permanente cAMP-Bildung könnte ebenfalls zu metabolischen Krisen führen. Ob auch bei *mahogany*- und verwandten Mutationen eine cAMP-Überproduktion vorliegt ist nicht bekannt. Die Art der neuronalen Degeneration, unkontrollierter Muskelkontraktionen, Anschwellen von Neuronen und Lähmungen erinnern an die oben genannten Phänotypen. Die schwarze Pigmentierung könnte ein Indiz sein.

4.2.4 Attractin: Perspektiven

Die DP4-ähnliche Aktivität von Attractin war bis Ende des Jahres 2006 Gegenstand von Forschung und intensiver Diskussion. Nach Abschluss der praktischen und schriftlichen

Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden die erarbeiteten Daten zur DP4-ähnlichen Aktivität von Attractin (Friedrich *et al.*) im Februar 2007 veröffentlicht. Seither folgten keine weiteren Publikationen zu diesem Thema.

Weiterhin sind bis heute keine bestätigten oder biologisch relevanten Interaktionen von Attractin bekannt. Der Zweifel (Abschnitt „Diskussion“) der Spezifität einer Bindung von Agouti (speziell der basischen Domäne) an Attractin wird inzwischen durch weitere Anhaltspunkte gestützt. Die extrazelluläre Domäne von Attractin interagiert mit basischen Resten einer Dodekamer-Peptidbibliothek ohne jegliche Sequenzspezifität (Azouz *et al.*, 2007). Die physiologische Relevanz einer Bindung von AtrnL1 an den MC4R ist ebenfalls unklar, da weder *knock out* noch Überexpression von AtrnL1 in der Maus zu phänotypischen Veränderungen führt (Walker *et al.*, 2007).

Wie diese basieren nahezu alle Veröffentlichungen seit 2007 zu Attractin (-verwandten) Themen auf Untersuchungen von Nagern mit Funktionsverlustmutationen (*in vivo*, *ex vivo*) von Attractin (*mahogany*, *myelin vacuolation*, *zitter*, *black tremor*), *Mgrn1* (*mahoganoid*) oder dem Attractin-like Protein. Zumeist werden bereits bekannte Fakten bestätigt oder erweitert, es wurden aber auch neue Faktoren beschrieben. Fokussiert werden die Untersuchungen nun zunehmend auf den Einfluss von Attractin (und dessen Verlust) auf die neuronale Architektur. Die Expression des weit verbreiteten Proteins ist vor allem im ZNS sehr hoch (Lu *et al.*, 1999; Nagle *et al.*, 1999; Gunn *et al.*, 1999). Der Grad der Expression scheint ursächlich mit der Regulation sowohl neuropathogener als auch neuroprotektiver Prozesse im Zusammenhang zu stehen. Bemerkenswert ist, dass lösliches Attractin im ZNS scheinbar nicht, bzw. nur in sehr geringen Mengen zu finden ist. In der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) ist es gänzlich abwesend (Khwaja *et al.*, 2006).

Humane kortikale Neuronen (HCN-1A-Zellen) exprimieren, im undifferenzierten und differenzierten Status, membranständiges Attractin. Nach der Induktion der Differenzierung beeinflussen sowohl lösliches Attractin als auch Attractin-Antikörper die Morphologie der Zellen. Die Neuriten so behandelter Zellen waren kurz, stumpf und wiesen viele Verzweigungen auf, während sie normalerweise lang und linear ausgebildet sind. Die gleiche Wirkung zeigte sich bei Applikation humanen Serums. Dagegen differenzierten Zellen, die mit Attractin-freiem Serum behandelt wurden, völlig normal (Tang *et al.*, 2002). Vermutlich stellt die lösliche Isoform einen Antagonisten zur Membranform dar, der um gleiche Bindungsstellen konkurriert. Das Resultat wäre eine Reduktion der effektiven Konzentration des membranständigen Attractin. Welche Auswirkungen hat diese Erkenntnis auf Erkrankungen, bei denen es zur Infiltration von Serum aus der Peripherie ins ZNS, wie z.B. bei der Multiplen Sklerose, oder zur Sezernierung des löslichen Attractin kommt? Von

Khwaja *et al.* wurde in der CSF von Patienten mit malignem Astrozytom eine hohe Konzentration von löslichem Attractin nachgewiesen. Die Menge nimmt dabei mit dem Grad des Tumors zu. Das Protein wird von den betroffenen Astrozytoma-Zellen produziert und sezerniert. Auch die stimulierte Migration von Glioma-Zellen scheint auf lösliches Attractin zurückzuführen zu sein (Khwaja *et al.*, 2006).

Bereits in der Einleitung wurde die Rolle der Regulation eines vier Gene umfassenden Gen-Clusters auf das Wachstum der Neuriten von Ganglienzellen beschrieben. Demnach steigert die Stimulation der Expression der von diesen Genen kodierten Proteine die Neuritogenese und die Plastizität (Di Giovanni *et al.*, 2005). Zu diesen regulierten Proteinen gehört auch Membran-Attractin. Das Protein spielt daher vermutlich eine Rolle bei der Herausbildung der funktionellen Konformation dieser Zellen.

Gleichzeitig ist ein Mangel an Membran-Attractin unter anderem mit Hypomyelinisierung verbunden, dies zeigen verschiedene Mutationsanalysen. Die Dichte der Myelinfibrillen und die Zahl der Myelinlamellen nehmen stetig ab. Myelinscheiden verformen sich, in ihnen finden sich myelinummantelte Vakuolen und die Synapsen sterben ab. Der Prozess der Myelinisierung erfordert die koordinierte Synthese verschiedener Strukturproteine und Enzyme, die initiale Axon-Glia-Interaktion, den Aufbau der Myelinscheide und die Langzeitinteraktion von Axonen mit myelinisierenden Glia-Zellen. Membranständiges Attractin könnte, mit seinen hoch konservierten extrazellulären Domänen, wie CUB, EGF, Selektin sowie dem zytosolischen Rest, eine Zelladhäsion oder Rezeptorfunktion vermitteln. Diese könnte in die Glia/Neuron-Differenzierung, Axon-Glia-Kontakt und/oder die Myelinisierung involviert sein. Auch die Wirkung der im ZNS nicht vorhandenen löslichen Isoform auf die Neuronenmorphologie stützt diese These.

Die Folgen eines Verlustes von Attractin für das zentrale Nervensystem von Nagern, wie Vakuolisierung, Hypomyelinierung, Anschwellen der Axone und der neuronale Zelltod betreffen, dem Expressionsmuster entsprechend, viele Regionen des Gehirns. Sie breiten sich mit zunehmendem Alter immer weiter im ZNS aus. In *zitter*-Mutanten wurde ein altersabhängiger starker Verlust dopaminergener Neuronen in der *Substantia nigra* festgestellt (Ueda *et al.*, 2005; Nakadate *et al.*, 2006). Attractin wird unter anderem auch in dieser Hirnregion (Lu *et al.*, 1999) und speziell von dopaminergen Neuronen exprimiert (Paz *et al.*, 2006). Paz *et al.* zeigten auch, dass Atrn altersabhängig im gesamten (gesunden) ZNS generell abnimmt, allein in der *Substantia nigra*-Region um 41%. Durch *knock down* von Atrn in der Neuroblastoma Zelllinie Cath.a steigt die Sensitivität der Zellen gegenüber Neurotoxinen, wie MPP+ (ein für dopaminerge Neuronen spezifischer Inhibitor des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette) und Lactacystin (ein Proteasom-Inhibitor)

stark an (Paz *et al.*, 2006), ein Effekt der sich mit der zunehmenden Sensitivität gegenüber diesen Toxinen mit zunehmendem Alter von gesunden Mäusen deckt (Gupta *et al.*, 1986). Im umgekehrten Fall, d.h. einer Überexpression von Attractin, werden die Zellen erstaunlicherweise unempfindlicher gegenüber den Neurotoxinen verglichen mit Wildtyp-Zellen.

Sun *et al.* stellen 2007 eine Proteomanalyse von Hirnen *Mahogunin*-defizienter Mäuse (*Mgrn1^{md-nc}*) vor. Aus diesem Proteinexpressionsprofil wurde eine hohe Wahrscheinlichkeit einer mitochondrialen Dysfunktion abgeleitet, da sehr viele Proteine des Energiemetabolismus und der mitochondrialen Respiration herunterreguliert sind. Zudem stellten sie eine generelle Reduktion ubiquitiniertes Proteine fest. Die Western Blot-Analyse der verschiedenen Komplexe der oxidativen Phosphorylierung offenbarte eine leichte Reduktion der Komplexe I und II sowie einen beinahe kompletten Verlust der Cytochrom c-Oxidase I Untereinheit (Komplex IV), die mit signifikanten Senkungen der Cytochrom c-Oxidase Aktivität und der ATP-Konzentration einhergehen. Eine direkte Folge mitochondrialer Schädigungen ist gesteigerter oxidativer Stress. Die Autoren wiesen mittels Oxyblot eine dramatische Steigerung oxidativer Zerstörung nach. Ein weiteres herunterreguliertes Protein ist der *Brain-derived neurotrophic factor precursor* (BDNF), während die Expression der CaMKIV (*Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV*) erhöht ist. Erstaunlich ist, dass Attractin-defiziente Mäuse in den untersuchten Punkten annähernd identische Eigenschaften aufweisen. Neben der generellen Ähnlichkeit der beiden Phänotypen, kommt es auch bei Funktionsverlust von Attractin zu einer mitochondrialen Dysfunktion, die unter anderem zu einer gesenkten Cytochrom c-Oxidase Aktivität, gesteigertem oxidativem Stress und verringerter BDNF-Expression führt. Letzteres bestätigt die von Muto *et al.* bereits 1999 veröffentlichten Daten. Auch die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im Gehirn von Attractin-defizienten Tieren ist lange bekannt. Sie wurde bereits von Muto & Sato (2003) beschrieben und vielfach bestätigt. Oxidativer Stress führt im Hirn von *zitter*-Ratten unter anderem zur Degeneration von serotonergen und dopaminergen Neuronen, die durch chronische Behandlung mit Radikalfängern wie Melatonin bzw. Vitamin E verringert werden können (Joyce *et al.*, 2004; Ueda *et al.*, 2000; Ueda *et al.*, 2005; Ueda *et al.*, 2008). Muto & Sato zeigten auch, dass isolierte Fibroblasten aus *zitter*-Ratten in Kultur zur ROS-Bildung neigen. Diese Tendenz zeigen weder Wildtyp-Fibroblasten, noch Attractin-transfizierte *zitter*-Fibroblasten. Eine zusätzliche Behandlung mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) führt zu sehr schnellem Absterben der *zitter*-Fibroblasten, das durch Attractin-Transfektion auf Wildtypniveau gesenkt wird. Durch zusätzliche Behandlung mit dem Radikalfänger α -Tocopherol (ein Vitamin E) wird das Absterben verhindert.

Ein weiterer Punkt der Betrachtungen waren die zelluläre Prozesse im Hirn von Attractin-defizienten Ratten (*Atrn^{mv}* (Izawa *et al.*, 2008) bzw. *Atrn^{zi}* (Sakakibara *et al.*, 2008)) im Hinblick auf Hypomyelinisierung und Vakuolenbildung. Übereinstimmend berichten Izawa *et al.* und Sakakibara *et al.* von einer sehr früh beginnenden Mikroglia-Aktivierung (nach Izawa *et al.* von einer vorausgehenden progressiven Astroglie) und Akkumulation proinflammatorischer Zytokine und Chemokine. In verschiedenen Punkten kommen die Autoren zu unterschiedlichen Interpretationen. Izawa *et al.* favorisieren eine direkte Funktion von Attractin in den Oligodendrozyten und für die Myelinisierung, unter anderem aufgrund der starken Expression von Attractin in diesen Zellen (mRNA). Sie halten dennoch die Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia für einen wesentlichen Bestandteil der Pathogenese. Im letzten Punkt stimmen sie mit Sakakibara *et al.* überein, die allerdings die mikrogliale Aktivierung für die Ursache einer gestörten Entwicklung der Oligodendrozyten sehen. Nur eine sehr kleine Oligodendrozyten-Population ist nach Ansicht dieser Autoren Attractin-positiv (Protein), zudem entwickeln sich *zi/zi*-Oligodendrozyten *ex vivo* vollkommen normal. Einig sind sich die Autoren, dass eine gestörte Oligodendrozyten-Funktion der Neuropathogenese zugrunde liegt, auf welchem Weg diese entsteht bleibt offen. Ein Diskussionspunkt sind Mikroglia als mögliche Quelle für ROS wie z.B. H₂O₂, die, wie oben erwähnt, einen sehr kritischen Faktor bei Attractin-Mutationen darstellen.

Normalerweise wird von Stimuli wie H₂O₂ (Stressantwort) der MAPK-Signalweg und damit ERK1/2 aktiviert. Ein Weg der unter anderem zur Aktivierung von CREB und zum Beispiel zur Expression von Neurotrophenen wie BDNF führt. Während *zitter*-Ratten eine normale Expression von ERK1/2 im Hirn aufweisen, sind die Phosphorylierung und damit die Aktivität von ERK1/2 bei *zitter*-Ratten stark verringert. Durch Behandlung mit Wasserstoffperoxid wird ERK1/2 in sowohl Wildtyp-Fibroblasten als auch in Attractin-transfizierten *zitter*-Fibroblasten aktiviert. Ohne Attractin verbleibt die ERK-Aktivität hingegen auf Basallevel, was im Hirn von *zitter*-Ratten unter anderem zu erwähntem BDNF-Mangel führt (Muto *et al.*, 1999; Muto *et al.*, 2003). Dass der oxidative Stress in Attractin-defizienten Tieren gesteigert ist, wird weiter durch die Tatsache belegt, dass die Superoxiddismutase Aktivität gesteigert ist. Bemerkenswert ist die gleichzeitige Senkung der Katalase-Aktivität, was wiederum die Akkumulation von H₂O₂ vermuten lässt (Gomi *et al.*, 1994b; Ookohchi *et al.*, 1997; Ueda *et al.*, 2000; Muto *et al.*, 2003)

Sowohl die Mikroglia-Aktivierung als auch Mitochondrienschädigung und oxidativer Stress beginnen vor dem Einsetzen der histopathologischen Veränderungen im Gehirn Attractin-defizienter Tiere und scheinen daher auslösende Faktoren zu sein (Sun *et al.*, 2007).

Eine weitere Folge des Verlustes von Attractin ist ein ebenfalls früh einsetzender progressiver Verlust von Zell-Cholesterol und *lipid rafts* (Azouz *et al.*, 2007). Obwohl die Autoren nicht bestimmen konnten, ob dies Ursache bzw. Konsequenz der Neurodegeneration ist oder eine Störung der Cholesterolbiosynthese vorliegt, ist es interessant, dass speziell für die Oligodendrozyten-vermittelte Myelinisierung cholesterolreiche *lipid rafts* essentiell sind und Störung der Cholesterolbiosynthese in Oligodendrozyten zu Hypomyelinierung und Tremor führen (Saher *et al.*, 2005).

Diese Zusammenstellung der publizierten Fakten widerspiegeln die Folgen einer monogenetischen Störung und deren Folgen. Dazu zählen eine sehr komplexe Neurodegeneration und zahlreiche periphere Effekte. Die Funktion(en) von Attractin sind bis heute absolut unbekannt und die Zusammenhänge ungeklärt. So ist es auch sehr schwierig zu bestimmen, welches physiologische Problem durch ein vorausgehendes bedingt wird.

Viele der angesprochenen biologisch aktiven Moleküle werden durch das Melanocortinsystem (Melanocortin→Melanocortin-Rezeptor→PKA/ERK1/2→CREB) reguliert. So wie die Pigmentierung (Tyrosinase, TRP-1 und 2) durch Aktivierung des MC1R reguliert wird, ist BDNF ein durch CREB vermitteltes *downstream*-Signal des MC4R. BDNF ist ein sehr wichtiger Faktor sowohl für Stimulation und Kontrolle der Neurogenese und der Myelinisierung als auch für die Erhaltung von Neuronen. Zudem wirkt BDNF stark anorexigen. Ein BDNF-Mangel führt zur Hyperphagie und ist mit vielen neurodegenerativen Erkrankungen verbunden. Auch Thyroidhormone werden durch MC4R und MC3R reguliert. So ist bekannt, dass Expression, Sezernierung und damit die zirkulierende Konzentrationen von TRH (*Thyrotropin-releasing hormone*) sowie den Thyroid-Hormonen T₃ und T₄ durch AGRP gehemmt und durch α -MSH gesteigert wird (Fekete *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2000). Schon in jungen *black tremor* (*Atrn^{bt}*) Hamstern, bei denen ebenfalls ein Funktionsverlust von Attractin vorliegt, sind die Konzentrationen von T₃ (2-fach) und T₄ (3-fach) im Serum erhöht (Kim *et al.*, 2003; Kuramoto *et al.*, 2002). Mit einem Hyperthyroidismus sind eine ganze Reihe klinisch auffälliger Parameter verbunden, so z.B. Hyperphagie, Hyperaktivität oder Gewichtsverlust. Letztlich wird auch die Cholesterolbiosynthese durch den ACTH-Rezeptor MC2R stimuliert. Ob es durch einen Funktionsverlust von Attractin zu einer generellen Dysregulation des Melanocortinsystems kommt oder ob die Folgen einer Attractin-Mutation von völlig anderen Faktoren vermittelt sind, ist unbekannt. Zumindest einige der phänotypischen Merkmale von *Atrn^{mg}* bzw. *Mgrn1^{md}* bedingen das Vorhandensein von MC-Rezeptoren. So führt der *knock out* des MC1R auch bei *Atrn^{mg}* zur gelben Pigmentierung. Gleiches gilt für die Fettleibigkeit bei MC4R *knock out*.

Im Melanoma-Zellmodell konnten wir zeigen, dass sowohl α -MSH als auch das aus dem cytosolischen Rest von Attractin abgeleitete Peptid Acy01 dosisabhängig die Bildung von cAMP und Melanin stimuliert. Gleichzeitige Stimulation mit α -MSH und Acy01 resultiert in einem additiven cAMP-Signal der Einzelinkubation. Da die agonistische Wirkung von α -MSH zur homologen Desensibilisierung des Melanocortinrezeptors führt, ist es interessant, dass die Vorstimulation sowohl mit α -MSH als auch Acy01 das spätere α -MSH oder Acy01 induzierte cAMP-Signal in allen 4 Kombinationen verringert. Dies könnte auf eine cytosolisch durch Acy01 ausgelöste MC1R-Stimulation und eine darauf folgende Desensibilisierung hindeuten. Bemerkenswert ist, dass unabhängig davon ob mit α -MSH oder Acy01 vorstimuliert wird, die folgende Stimulation mit Acy01 bedeutend potenter ist als die Stimulation mit α -MSH. Wenn, wie bereits diskutiert, der Einsatz von Acy01 einen Funktionsverlust von Attractin simuliert, so ist zu schlussfolgern, dass ein *knock out* von Attractin ebenfalls zu einer (evtl. MCR-spezifischen) Erhöhung der cAMP-Konzentration führt. Eine der Folgen wäre die Zunahme der basalen PKA-Aktivität. Durch *knock out* der regulatorischen PKA-Untereinheit RII β (Czyzyk *et al.*, 2008) wird ein Anstieg der basalen PKA-Aktivität generiert. Dies führt wie Attractin-Defizienz zur Unterdrückung phänotypischer Merkmale von A^Y . Dazu zählen die Senkung des Körpergewichts, der Fettmasse, der Körpergröße und des Leptin-Spiegel, die Steigerung von motorischer Aktivität und basaler Metabolismusrate sowie der Nahrungsaufnahme (Hyperphagie) im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen. Neben der Aktivierung der PKA sind auch die Regulation anderer Signalkaskaden durch MCR-Aktivierung wie der Phosphatidylinositolweg, die Aktivierung von Ionenkanälen oder Aktivierung der MAPK-Kaskade bekannt. Eine Beeinflussung der MAPK-Kaskade (ERK1/2) in *Atrn²ⁱ*-Ratten ist nachgewiesen (Muto und Sato, 2003). Daher wäre es zweifellos wertvoll die Aktivierung von Schlüsselenzymen verschiedener Signalkaskaden (z.B. PKA, PKC, CaMKIV, ERK1/2, speziell in ihrer Rolle bei der CREB-Phosphorylierung) oder *second messenger*-Konzentrationen in An- und Abwesenheit von Attractin bzw. die Wirkung von mutierten Attractin-Varianten in Zellmodellen detaillierter zu untersuchen und eventuelle Veränderungen schrittweise in Gewebeschnitten (*ex vivo*) und Tiermodellen (*in vivo*) auch in Abhängigkeit vom Alter der Tiere zu überprüfen.

Aber auch weiterreichende (konservierte) Mechanismen unabhängig vom Melanocortin-system sollten zwingend bei der Funktionsaufklärung in Betracht gezogen werden, dies gebietet allein die Konservierung von Attractin. Während die Hefe kein Attractin besitzt, finden sich Attractin-Orthologe scheinbar in allen *Bilateria* (*Deuterostomia* und *Protostomia*). Die sehr große Anzahl identischer Aminosäuren die in den *Vertebrata* (>74%¹) vorhanden ist,

nimmt mit evolutionärem Abstand von den Wirbeltieren (>93%¹) ab. Allerdings sind auch in entfernten *Bilateria* wie *Ciona* (54%¹) oder *Protostomia* wie Insekten (*D. melanogaster* (54%¹)) oder Nematoden (*C. elegans* (48%¹)) die Domänenstruktur und disulfidbrückenbildende Cysteinreste stark konserviert. Während also die Struktur von Attractin in den meisten höheren Eukaryoten konserviert ist, entstand das Melanocortinsystem (Agouti, Proopiomelanocortin, Melanocortinrezeptoren) erst während der Evolution der Wirbeltiere. Ein Zeitraum in dem auch eine Duplikation des Attractingens stattfand, da in vielen Wirbeltieren mindestens zwei Attractin-Paraloge vorhanden sind.

¹ Angabe der identischen Aminosäuren im Vergleich zum humanen Attractin nach Walker *et al.* (2007)

5 Zusammenfassung

Attractin ist ein konserviertes, domänenreiches TypI-Transmembranprotein, von dem bei Primaten auch alternativ gespleißte lösliche Formen postuliert wurden. Funktionsverlustmutationen von Attractin in Nagern, z.B. *mahogany*, sind durch Hyperphagie, eine erhöhte Metabolismusrate, erhöhte motorische Aktivität, dunkles Fell, eine progressive spongiforme Neurodegeneration, Tremor und Lähmungen gekennzeichnet. Darüber hinaus heben sie den Phänotyp von Mäusen mit der sogenannten *lethal yellow*-Mutation (A^Y) auf. Bei A^Y wird Agouti, ein inverser Agonist verschiedener Melanocortinrezeptoren, der bei Nagern normalerweise nur in der Haut exprimiert wird, ubiquitär überexprimiert. Diese ektopische Überexpression verursacht Hyperphagie, Hyperinsulinämie, Hyperglykämie, Hyperlepinämie, Adipositas, gelbes Fell und eine erhöhte Tumoranfälligkeit.

Attractin wurde 1995 als zirkulierendes Serumprotein beim Menschen entdeckt und vier Jahre später das für das Protein kodierende Gen identifiziert. Aufgrund des drastischen Phänotyps, der durch einen Verlust von Attractin verursacht wird, scheint das Protein essentielle Rollen zu erfüllen. Diese sind allerdings unbekannt gewesen, bis Attractin als Enzym mit einer Aktivität ähnlich zur Dipeptidylpeptidase 4 (DP4) charakterisiert wurde.

In dieser Arbeit wurde diese einzige bisher beschriebene molekulare Funktion, die DP4-ähnliche Aktivität von humanem Attractin, untersucht und eine Methode zur Präparation des Proteins aus humanem Plasma entwickelt. Die erarbeitete Prozedur weist eine sehr hohe Reproduzierbarkeit auf. Das isolierte Protein startet N-terminal stets mit Ala₈₄. Diese Position wurde als Signalpeptidasespaltstelle der alternativ gespleißten löslichen Variante Atrn2 identifiziert. Atrn2 unterscheidet sich von der einzigen zuvor identifizierten Isoform Atrn3, die an dieser Stelle deletiert ist (Duke-Cohan *et al.*). Das postulierte aktive Zentrum, des als Serinprotease bezeichneten Proteins, ist am hier isolierten nativen Attractin nicht vorhanden. Dennoch wurde eine DP4-ähnliche Aktivität nachgewiesen, deren elektrophoretischen und chromatographischen Eigenschaften identisch zu denen von Attractin sind.

Nach Charakterisierung und Ausschluss möglicher Verunreinigung durch DP4-ähnliche Enzyme oder Aminopeptidasen als Ursache der Hydrolyse von DP4-Substraten, wurden die enzymatischen Eigenschaften des Isolates als DP4-identisch eingestuft. Durch Anwendung nativer Separierungstechniken konnte die gesamte Aktivität (mindestens 99,7%) präparierter Attractin-Proben der DP4 zugeordnet werden. Die Klonierung, rekombinante Expression, Reinigung und Analyse aller Isoformen des humanen Attractin untermauerte die Erkenntnis, dass Attractin sowohl in seiner löslichen (Atrn2) als auch der Membranform (Atrn1) nicht zu einer Hydrolyse physiologischer Substrate der DP4 in der Lage sein kann. Damit konnte

Attractin in dieser Arbeit erstmals sowohl homogen in seiner nativen Form aus einem Organismus als auch in Form dreier rekombinanter humaner Isoformen präpariert werden. Die DP4-ähnliche Aktivität von Attractin wurde widerlegt. Trotz der identischen elektrophoretischen und chromatographischen Eigenschaften der Plasmaformen von Attractin und DP4, konnte keine Interaktion dieser beiden Proteine nachgewiesen werden. Copräzipitation und Plasmonoberflächenresonanz ergaben negative Resultate. Die identischen elektrophoretischen Mobilitäten bleiben auch nach der Separierung der Proteine erhalten. Aufgrund dieser Feststellungen kann Attractin nicht länger zu den Mitgliedern der DASH-Familie (Sedo *et al.*, 2001) gezählt werden. Auch aufgrund der hier erarbeiteten Resultate, wie der identifizierten (in Atrn3 fehlenden) Signalpeptidasespaltstelle sowie nicht auffindbarer Atrn3-spezifischer mRNA-Abschnitte, ist davon auszugehen, dass die Isoform 3 im menschlichen Organismus nicht existiert und darüber hinaus das postulierte aktive Zentrum kein Bestandteil des zirkulierenden Attractin ist.

Die mögliche Rolle von Attractin wird damit mehr denn je auf eine evolutionär konservierte Funktion als Adhäsionsprotein oder Rezeptor fokussiert. Grund zu dieser Hypothese gibt die hohe Konservierung sowohl der Multidomänenstruktur des extrazellulären als auch der Sequenz des intrazellulären Teils des membranständigen Attractin. Der zytosolischen Rest wurde als *bait*-Protein im 2-Hybrid-System zur Interaktionsselektion einer Hela-cDNA-Bibliothek in Hefen eingesetzt. Es wurden drei zytosolische Wechselwirkungskandidaten ermittelt, die beiden Ubiquitinkonjugasen UBE2G1 und UBE2R2 sowie die Triosephosphat-Isomerase (TPI). Letztere war von neun Kolonien und vier unterschiedlichen Klonen kodiert. Diese drei potentiellen Interaktionspartner, ein Fusionsprotein aus der Glutathion-S-Transferase und dem zytosolischen Rest von Attractin sowie die GST-Negativkontrolle wurden rekombinant in *P. pastoris* bzw. *E. coli* hergestellt und gereinigt. Bisher war es allerdings nicht möglich, die Interaktion *in vitro* zu bestätigen. Obwohl Wechselwirkungen dieses Proteins sehr wahrscheinlich sind, wurde bis heute keine einzige physiologisch relevante Interaktion nachgewiesen.

6 Anhang

Tabelle 6-1: Übersicht über in dieser Arbeit genannten Mutationen

Mutation	Name	Protein	Konsequenz (detaillierte Angaben im Text)
A^Y	<i>lethal yellow</i>	Agouti ; Ubiquitäre Überexpression	Adipositas, Hyperinsulinämie, Hyperglykämie, Hyperphagie, Diabetes, Hyperleptinämie, erhöhte Tumoranfälligkeit, vergrößertes somatisches Wachstum, gelbe Fellfarbe
<i>db</i> , <i>Lepr^{db}</i>	<i>diabetes</i>	Leptinrezeptor (Maus); Funktionsverlust	Hyperinsulinämie, Hyperglykämie, Adipositas
<i>fa</i>		Leptinrezeptor (Ratte); Funktionsverlust	Adipositas, Diabetes, Hyperleptinämie
<i>ob</i> ; <i>Lep^{ob}</i>	<i>obese</i>	Leptin ; Funktionsverlust	Hyperinsulinämie, Hyperglykämie, Adipositas
<i>e</i> ; <i>MC1R^e</i>	<i>extension</i>	MC1R ; Funktionsverlust	gelbe Fellfarbe
<i>MC4R^{-/-}</i>		MC4R , Funktionsverlust	Hyperphagie, Adipositas, vergrößertes somatisches Wachstum, abgesehen von der gelben felfärbung sehr ähnlich A^Y
E^{so} , E^{so-3J}	<i>sombre</i>	MC1R ; konstitutiv aktive	sehr dunkle Fellfarbe
<i>fat</i> ; <i>Cpe^{fat}</i>	<i>fat</i>	Carboxypeptidase E ; Funktionsverlust	Adipositas, defekte Prohormonprozessierung, Hyperleptinämie
<i>md</i> ; <i>Mgrn1^{md}</i>	<i>mahoganoid</i>	Mahogunin , Mgrn1; Funktionsverlust	sehr ähnlich dem (siehe) <i>mahogany</i> -Phänotyp
<i>md^{nc}</i> ; <i>Mgrn1^{md-nc}</i>	<i>nonagouti curly</i>	Mahogunin , Mgrn1; Funktionsverlust	am stärksten ausgeprägtes (siehe) <i>mahoganoid</i> -Allel
<i>mg</i> ; <i>Atrn^{mg}</i> <i>Atrn^{mg-3J}</i> <i>Atrn^{mg-6J}</i>	<i>mahogany</i>	Attractin (Maus); Funktionsverlust	Unterdrückung des A^Y -Phänotyps, Hyperphagie, schwarze Fellfarbe, spongiforme Neurodegeneration, Vakuolenbildung und Hypomyelinisierung im ZNS, Tremor, Lähmung der Gliedmaßen, gesteigerte Metabolismusrate, Hyperaktivität
<i>bt</i> ; <i>Atrn^{bt}</i>	<i>black tremor</i>	Attractin (Hamster); Funktionsverlust	siehe <i>mahogany</i> (<i>mg</i>)
<i>mv</i> ; <i>Atrn^{mv}</i>	<i>myelin vacuolation</i>	Attractin (Ratte); Funktionsverlust	
<i>zi</i> ; <i>Atrn^{zi}</i>	<i>zitter</i>	Attractin (Ratte); Funktionsverlust	
<i>tub</i>	<i>tubby</i>	nicht bekannt	Adipositas, Hyperleptinämie, Insulinresistenz, sensorische Defizite, retinale Degeneration, neurosensorischer Hörverlust

```

1301                                     1336
Homo sapiens      WKIKQSCWASRRREQLLREMQMASRPFASVNVALE
D. melanogaster   WKIKQKYDMFRRRQRLFFVEMEOMASRPFSQVLVDIE
Anopheles gambiae WKIKQHYDMFRRRQRLFFVEMEOMASRPFSQVLVEIE
C. elegans        WMIKVRTEAYRRNQRRIDEIEHMASRPFASTKMELS
*  * *          * * : : : * : : * * * * * : : : : :
                |                               |
Acy01           . . . . . RRREQLLREMQMASRPFA
    
```

Abbildung 6-1: Sequenzvergleich und Ableitung eines Peptides (Acy01) des zytosolischen Teils von Attractin

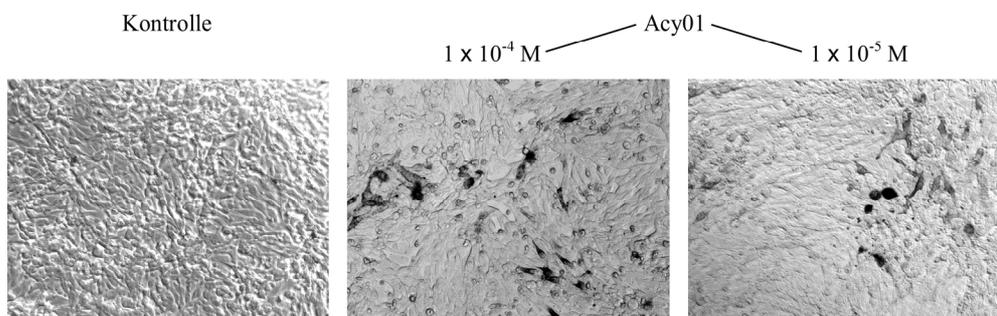


Abbildung 6-2: Melaninbildung in B16-Melanomazellen induziert durch verschiedene Konzentrationen des abgeleiteten Peptides (Acy01) des zytosolischen Teils von Attractin

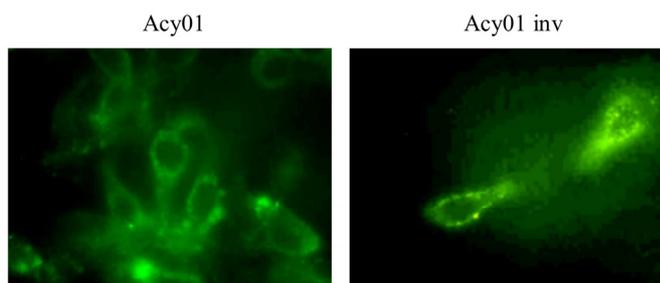


Abbildung 6-3: Zytosolische Lokalisation des abgeleiteten Peptides (Acy01) des zytosolischen Teils von Attractin bzw. dessen inverser Sequenz in B16-Melanomazellen; Peptide mit 5-FAM gelabelt, Extinktion: 494 nm, Emmision: 518 nm

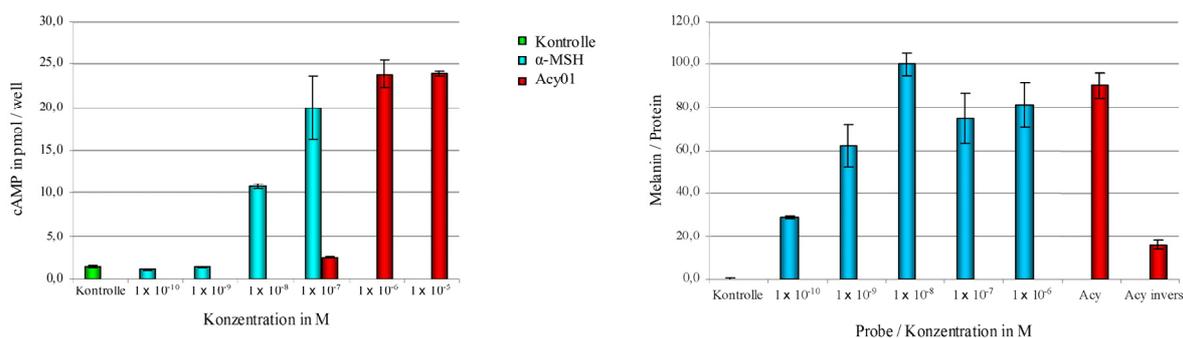


Abbildung 6-4: **Links:** Induktion der Bildung von cAMP durch α -MSH bzw. Acy01 in B16-Melanomazellen; **Rechts:** Induktion der Bildung von Melanin durch α -MSH, Acy01 und Acy01_{inv} in B16-Melanomazellen; Bemerkung: Die verwendeten Konzentrationen hatten keine Wirkungen auf die Zahl der lebenden oder toten Zellen. Bestimmung des Melaningehaltes nach (Jung *et al.*, 2001)

6.1 Material

Geräte

Gerät	Bemerkung	Hersteller
Agarosegelelektrophorese	Minigelsystem GE-B1A	AGS, Heidelberg
Analysenwaagen	LP3200D	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Varioklav	H+P Labortechnik
Elektroblot-Apparatur	Trans-Blot SD	BioRad, München
Bunsenbrenner	Gasprofil SCS	WLD-Tech
Elektroporator	MicroPulser	BioRad, München
Feinwaagen	AT261 Delta Range	Mettler Toledo, Giessen
Kühlplatte	MultiPhor II	Pharmacia
French-Press	FRENCH-Pressure cell press	Spectronic Instruments, Rochester, USA
Geldokumentation	UV-Systeme	INTAS, Göttingen
Geldokumentation	BioDoc-IT Imaging System	UVP, Upland, USA
Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Inkubator	B6 Function line	Heraeus, Hanau
Inkubator	MCO-17AI	Sanyo Electric Co., München
Inkubationsschüttler	TH30/SM30, TH15/SM15	Edmund Bühler GmbH, Tübingen
Kühlzentrifugen	Allegra 21 R, X-22R, Avanti J-20	Beckmann Coulter, München
Magnetrührer	MR3001K	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
MALDI-TOF-MS	LD-TOF-System 2025A	Hewlett Packard, Waldbronn
Mikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Jena
Mikroskop-Kamera	RT Slider,	Visitron Systems GmbH
Oberflächenplasmonresonanz	BiaCore 3000	BiaCore, Uppsala, Schweden
PAGE-System	Mini-Protean II	BioRad, München
Perfusionschromatographie	Biocad 700E	Applied Biosystems, Weiterstadt
pH-Meter	MP220	Mettler Toledo GmbH, Giessen
Pipetten	Pipetman	Gilson
Pipettierhilfen	Pitet-AidXP	Drummond
Plattenphotometer	Novostar	BMG Labtechnologies, Offenburg
Plattenphotometer	Sunrise	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Präparative PAGE	Model 491 Prep Cell	BioRad, München
Präparative IEF	Rotophor	BioRad, München
Schlauchpumpe	Masterflex	Cole-Parmer
Spannungsgeräte	Power PAC 3000, Power PAC 300	BioRad, München
Spannungsgeräte	Consort E143	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf
Spektrometer	U-2000	Hitachi, Darmstadt
Spektrometer	Smart Spec 3000	Biorad, München
Sterilbank	KR-125 SAFETY	Kojair, Vilpula, Finnland
Tangentialfluss-Modul	Vivaflow 200	Vivascience, Sartorius AG, Göttingen
Thermocycler	PCR Sprint	Hybaid, Needham Heights, USA
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Thermoschüttler	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus GmbH, Hanau
Überkopffrotierer	OVM-ROM	Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau (B)

Gerät	Bemerkung	Hersteller
Ultrafiltration		Amicon GmbH, Witten
Ultraschall-Homogenisator	Sonopuls HD2070	Bandelin electronic, Berlin
Umwälzthermostat	F30-HC/8	Julabo, Seelbach
UV Monitor	Model EM-1 Econo	BioRad, München
Vortexgerät	Vortex Genie	Scientific Industries
Wasserbad	Modell MP19, Modell MW4	Julabo, Seelbach
Zellzahlbestimmung	CASY, Modell DT	Schärfe System GmbH, Reutlingen

Labor- und Verbrauchsmaterialien

Name		Hersteller
96-Kavitäten-Platten		nunc
96-Kavitäten-Platten	µclear	Greiner
Dialyseschläuche		Roth, Karlsruhe
Einwegpipetten	versch. Größen	Greiner
Flaschenfilter	0,22 µm PES	Dr. I. Schubert, Laborfachhandel, Leipzig
Gewebekulturflaschen	T25 / T75 / T175	Greiner
humanes Blutplasma		Plasmazentrum Halle
Nitrocellulose-Membranen		Schleicher & Schuell, Dassel
Polyesterfilm GelBond, IEF		Pharmacia, Freiburg
Pipettenspitzen	mit /ohne Filter; versch. Größen	Greiner
PVDF-Membranen		Schleicher & Schuell, Dassel
Reaktionsgefäße	0,65 / 1,5 / 2,0 ml	Roth, Karlsruhe; Eppendorf, Hamburg
Sensorchip	CM5	Biacore, Uppsala, Schweden
Spritzenfilter	versch. Größen	Nalgene, USA
Zentrifugenkonzentratoren	Vivaspin 500, 20, 6	Vivascience, Satorius AG, Göttingen
Zentrifugenröhrchen	15 ml / 50 ml	Greiner
Zymographie-Gele (Gelatin)		Invitrogen, Karlsruhe

Chemikalien und Biochemikalien

Feinchemikalien (Chemikalien, Biochemikalien)	Hersteller
1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminoprpyl) Carbodiimid	Biacore, Uppsala (Schweden)
β-Nicotinamidenindinucleotid, reduziere Form	Fluka, Heidelberg
ε-Aminocaprinsäure	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose IEF	Pharmacia, Freiburg
Agarose	peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen
Aminosäuren	
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, München
Ammoniumsulfat	ICN, Eschwege
Ampholyte	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	MP Biomedicals, Heidelberg
BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat)	Bachem, Heidelberg

Feinchemikalien (Chemikalien, Biochemikalien)	Hersteller
Bradfordreagenzlösung	Sigma, Taufkirchen
Chloramphenicol	Sigma, Taufkirchen
Coomasie Blue G	Serva, Heidelberg
D-MEM	Invitrogen, Karlsruhe
D-Glukose (wasserfrei)	Sigma, Taufkirchen
Dimethylformamid (DMF)	Rathburn, Walkerburn (Schottland)
DAHC	Fluka, Heidelberg
DHAP	Merck-Schuchard, Hohenbrunn
DL-Glyceraldehyd-3-phosphat	Sigma, Taufkirchen
DNA-Größenstandard; 100 bp, 1 kb	Peqlab, Erlangen; New England Biolabs, Frankfurt
EDTA	Sigma, Taufkirchen
Essigsäure	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethanolamin	Fluka, Heidelberg
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fast Blue B	Fluka, Heidelberg
FBS	Invitrogen, Karlsruhe
Ficoll-Paque	Amersham Biosciences, Uppsala (Schweden)
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
G-418	Calbiochem; (Merck) Darmstadt
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HBS-P Puffer	Biacore, Uppsala (Schweden)
Hefeextrakt	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
HEPES	Merck KGaA, Darmstadt
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Kerosin	Serva, Heidelberg
IEF-Standard: Broad pI Calibration Kit	Pharmacia, Freiburg
IEF-Standard: Low pI Calibration Kit	Pharmacia, Freiburg
IEF Markers 3-10	Serva, Heidelberg
Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG)	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Kanamycin	Sigma, Taufkirchen
Kerosin	Serva, Heidelberg
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulphat Pentahydrat (Na ₂ S ₂ O ₃)	Lancaster, England
Natriumcarbonat Na ₂ CO ₃	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
N-Hydroxysuccinimid	Biacore, Uppsala (Schweden)
para-Nitrotetrazoliumblausulfat (NBT)	Roth, Karlsruhe
PBS (Zellkultur)	Invitrogen, Karlsruhe
Pepton	Duchefa Biochemie B.V, Harlem (Niederlande)
Polyethylenglykol (PEG) 6000	Fluka, Heidelberg
Phytohämagglutinin (PHA)	Sigma, Taufkirchen
Proteinstandard „PrecisionPlus Dual colour“	Biorad, München
Proteinstandard „Mark 12“	Invitrogen, Karlsruhe
Röntgenfilme (CL-X Posure™)	pierce, Rockford (USA)

Feinchemikalien (Chemikalien, Biochemikalien)	Hersteller
Sinapinsäure (HP G2055A)	Hewlett Pachard, Waldbronn
Serva Blue G	Serva, Heidelberg
Sodiumdodecyl sulphate (SDS)	ICN, Eschwege
Sorbitol	Sigma, Taufkirchen
TEMED	Pharmacia, Freiburg
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trockenmilchpulver	Roth, Karlsruhe
Tween-20	Roth, Karlsruhe
X-Gal	Roth, Karlsruhe
<i>yeast nitrogen base</i> (YNB)	Difco, Detroit, USA
Yeast Extrakt	Duchefa Biochemie B.V., Harlem (Niederlande)
Zeocin	Invitrogen, Karlsruhe

Alle sonstig verwendeten Chemikalien, die von verschiedenen Herstellern bezogen wurden, hatten ebenfalls analytischen Reinheitsgrad (p.a.).

Chromatographie / Säulenmaterialien / Immunopräzipitation

Säulenmaterial		Säulenmaterial	
Blue Sepharose ¹	Affinität	Sephadex G25 ¹	Gelfiltration
Butyl-Sepharose ¹	HIC	Sp-Sepharose® Fast Flow ¹	Kationenaustauscher
ConA-Sepharose® ¹	Affinität	Superdex 200 ¹	Gelfiltration
Glutathion-Agarose ²	Affinität	UnoS6 ³	Kationenaustauscher
HiPrep®26/10 Desalting ¹	Gelfiltration	UnoTM Q6 ³	Anionenaustauscher
Metall-Chelat ¹	Affinität	NHS-aktivierte Sepharose ¹	
c-myc-Agarose ²	Affinität		

¹ Amersham Pharmacia Biotech AB (Schweden); ² Sigma-Aldrich Taufkirchen; ³ BioRad, München

Enzyme

Enzym	
α -Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase ¹	Pfu DNA Polymerase ⁴
Adenosindeaminase (ADA) ²	Platinum Pfx DNA Polymerase ⁵
DP2, rekombinant human ³	Platinum Taq DNA Polymerase ⁵
DP4, rekombinant human ³	PEP, human rekombinant ³
DP4, Schweineniere ³	PNGase F ⁶
DP8, rekombinant human ³	Restriktionsenzyme ⁶
DP9, rekombinant human ³	T4-DNA-Ligase ⁶
FAP α , rekombinant human ³	Zymolase

¹ Sigma-Aldrich, Taufkirchen; ² Fluka, Heidelberg; ³ Probiobdrug AG, Halle; ⁴ Promega; ⁵ Invitrogen, Karlsruhe;

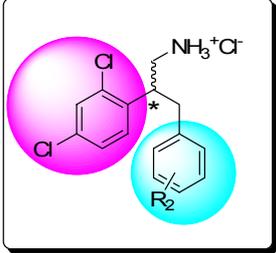
⁶ New England Biolabs

Substrate / Peptide

Substrat		
Ala-AMC ¹	Gly-Pro-β-MNA ³	His-Thr-AMC ²
Ala-Pro-AMC ²	Gly-Pro-AMC ²	His-Val-AMC ²
Arg-AMC ¹	Gly-Pro-pNA ²	Lys-Ala-AMC ¹
GIP ²	Gly-Pro-Pro-AMC ²	Lys-Pro-AMC ¹
Glucagon ²	Gly-Ser-AMC ¹	RANTES ₁₋₁₅ ²
Gly-Ala-AMC ¹	His-Ala-AMC ²	Neuropeptid Y ¹
Gly-Arg-AMC ¹	His-Gly-AMC ²	Pro-AMC ¹
Gly-Gly-AMC ¹	His-Pro-AMC ²	
Gly-Phe-AMC ¹	His-Ser-AMC ²	
Name		Sequenz
Acy01 / bzw. 5-FAM-Acy01 (5-Carboxyfluorescein-Acy01)		RRREQLREMQQMASRPFA ²
Acy01inv / bzw. 5-FAM-Acy01inv (5-Carboxyfluorescein-Acy01inv)		AFPRSAMQQMERLLQERRR ²
α-MSH ¹		

¹Bachem (Heidelberg), ²Dr. S.Manhardt, Probiodrug AG, Abt.Peptidchemie, ³Sigma (Taufkirchen)

Inhibitoren

Bezeichnung	Hersteller	
DP411	probiodrug AG, Halle	
DP8/911	probiodrug AG, Halle	
Lys(NO ₂)-thia	probiodrug AG, Halle	
Lys(NO ₂)-pyrr	probiodrug AG, Halle	
Gln-Thia	probiodrug AG, Halle	
Val-Pyrr	probiodrug AG, Halle	
Bezeichnung	(R ₂)	Hersteller
SC:	2,3 Diphenylpropylamine	S. Chambre, probiodrug AG, Halle
SC224	o-CH ₃	
SC225	o-Cl	
SC228	o-CF ₃	
SC229	m-CH ₃	
SC231	m-OCH ₃	
SC261	m,p,m'-OCH ₃	
SC273	m,p-Cl	
SC277		
SC278	o,m'-OCH ₃ ,p-CH ₂ Cl	

Kulturmedien und Puffer

Allgemeine Puffer		
BSS (<i>balanced salt solution</i>)	0,01 % (w/v) D-Glukose 5,0x10 ⁻⁶ M CaCl ₂ x 2 H ₂ O 9,8x10 ⁻⁵ M MgCl ₂ x 6 H ₂ O 5,4x10 ⁻⁴ M KCl	0,0145 M Tris 0,126 M NaCl pH=7,6
PBS (<i>Phosphate buffered saline</i>)	8 g/l NaCl 0,2 g/l KCl	1,45 g/l Na ₂ HPO ₄ × H ₂ O 0,4 g/l KH ₂ PO ₄
PBS-Tween:	0,05% (v/v) Tween 20 in PBS	
TBE:	890 mM Tris 890 mM Borsäure	20 mM EDTA
TE:	0,1 M Tris 0,01 M EDTA-Na ₂	pH=8,0
Western Blot (S. 28)		
AP-Puffer	12,1 g/l Tris (pH 9,5) 5,844 g/l NaCl	1,02 g/l MgCl ₂ × 6H ₂ O
Blockierungspuffer 1 (polyklon. Antikörper)	PBS-Tween 4% (w/v) Trockenmilchpulver	
Blockierungspuffer 2 (His-Fusion)	TBS 3% (w/v) BSA	
Blockierungspuffer 3 (myc-Fusion)	TBS-Tween	5% (w/v) Trockenmilchpulver
TBS	10 mM Tris-HCl (pH 7,5)	150 mM NaCl
TBS-Tween	TBS +0,05% Tween-20 (v/v)	
TBS-Tween-Triton	20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 500 mM NaCl	0,05% Tween 20 0,2% Triton
Elektroblot		
Anodenpuffer 1	0,3 M Tris (pH 10,4)	20% (v/v) Methanol
Anodenpuffer 2	25 mM Tris (pH 10,4)	20% (v/v) Methanol
Kathodenpuffer (Elektroblot)	25 mM Tris (pH 9,4) 5,25 g/l ε-Aminocaprinsäure	20% (v/v) Methanol
Analytische PAGE / Präparative PAGE		
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	
Laufpuffer (Native-PAGE):	25 mM Tris	192 mM Glycin
5× Probenpuffer (Native-PAGE)	1 ml 2,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 4 ml Glycerol	2 ml 0,5% Bromphenolblau mit Aqua dest. auf 8 ml
Laufpuffer (SDS-PAGE)	25 mM Tris 192 mM Glycin	0,1% (w/v) SDS
Probenpuffer (SDS-PAGE)	150 mM Tris-HCl (pH=6,8) 8 mM Harnstoff 0,5 % (w/v) Bromphenolblau	4 % (w/v) SDS 0,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol
Serva Blue G-Färbung	50% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure	0,025% (w/v) Serva Blue G
<i>Escherichia coli</i>		
LB-Medium bzw. Agar	0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) NaCl	
LB-Agar zusätzlich	1,5% (w/v) Agar	

<i>Pichia Pastoris</i>	
BMGY bzw. BMMY Medien	1% (w/v) Hefeextrakt 2% (w/v) Peptone 100 mM Sorbitol 1,34% (w/v) Hefe-Stickstoff-Basis 4 × 10 ⁻⁵ % (w/v) Biotin
BMGY zusätzlich	1% (v/v) Glycerol
BMMY zusätzlich	0,5% (v/v) Methanol
YPD und YPDS Medien bzw. Agar	1% (w/v) Hefeextrakt 2% (w/v) Peptone 2% (v/v) Dextrose
YPDS zusätzlich	18,2% (w/v) Sorbitol
Für Agarplatten	2% (w/v) Agar evtl. 100µg/ml Zeocin
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (2-Hybrid Interaktionsselektion)	
Aminosäuremischung 10-fache Stammlösung *Aminosäuren zur Selektion	0,4 mg/ml L-Adenin 0,2 mg/ml Arginin 1,0 mg/ml Asparagin 1,0 mg/ml Glutamin 0,3 mg/ml Lysin 0,2 mg/ml Methionin 0,5 mg/ml Phenylalanin 3,75 mg/ml Serin 2,0 mg/ml Threonin 0,3 mg/ml Tyrosin 1,5 mg/ml Valin *evtl. 0,2 mg/ml Histidin *evtl. 0,6 mg/ml Leucin *evtl. 4,0 mg/ml Tryptophan
Glukose bzw. Galaktose-Medien Für Agarplatten Nach dem Autoklavieren	Hefe-Stickstoff-Basis (1,5% (w/v) Agar select) 2% (w/v) Glukose bzw. 2% (w/v) Galaktose + 1% (w/v) Raffinose 10% (v/v) Aminosäuremischung Stammlösung
Glycerol-Lösung	25 mM Tris, pH 8,0 0,1 M MgSO ₄ 65% (v/v) Glycerol
S1-Puffer	1 M Sorbitol 0,1 M Na ₂ EDTA, pH 7,5
S2-Puffer	2,5 mg/ml Zymolase in S1-Puffer
S3-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH7,4 20 mM Na ₂ EDTA

Antikörper

Antigen	Klasse	Spezies	Hersteller
Agouti	polyklonal	Ziege	Santa Cruz Biotechnology,
Attractin, Säuger	monoklonal	Maus	BD Biosciences,
Attractin	polyklonal	Kaninchen	Chimicon,
Attractin, human	polyklonal	Kaninchen	Probiodrug AG / Eurogentec, Herstal, Belgien
Attractin	polyklonal	Ziege	Santa Cruz Biotechnology,
DP4 human	polyklonal	Kaninchen	Prof. Mentlein, Kiel
His	monoklonal	Maus	
LexA	monoklonal	Maus	
Maus Fc	polyklonal	Kaninchen	BiaCore, Uppsala, Schweden
c-myc-Epitop	monoklonal	Maus	Invitrogen, Karlsruhe
IgG Ziege	AP-konjugiert	Schwein	Santa Cruz Biotechnology,
IgG / IgM Maus	AP-konjugiert	Ziege	dianova, Hamburg
IgG Kaninchen	AP-konjugiert	Ziege	dianova, Hamburg
IgG Kaninchen	Peroxidase-konjugiert	Ziege	pierce, Rockford, USA

Kommerzielle Kulturmedien und Zusätze

Produkt	Hersteller
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM)	Invitrogen, Karlsruhe
Fötales Rinderserum (FBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Opti-MEM	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-Lösung mit 0,05 % (w/v) EDTA	Invitrogen, Karlsruhe

Kommerzielle Reaktionssysteme

Produkt	Hersteller
CatchPoint Cyclic-AMP Fluorescent Assay Kit	Molecular Devices GmbH, Ismaningen
CytoTox-ONE-Membrane Integrity Assay	Promega, Mannheim
EasySelect <i>Pichia</i> Expression Kit	Invitrogen, Karlsruhe
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Quiagen, Hilden
JETquick Gel Extraktion	Genomed GmbH, Bad Oeynhausen
PCR-Script Cam Cloning Kit	Stratagene, Cedar Creek, USA
QIAprep Spin Miniprep	Quiagen, Hilden
Strataprep PCR Purification Kit	Stratagene, Cedar Creek, USA
ThermoScript™RT-PCR System	Invitrogen, Karlsruhe

Mikroorganismen und Zellkulturen

Name	Organismus	Anbieter
DH5 α	<i>Escherichia coli</i>	
XL10	<i>Escherichia coli</i>	Stratagene, Cedar Creek, USA
BL21	<i>Escherichia coli</i>	Amersham Biosciences
X33	<i>Pichia pastoris</i>	Invitrogen, Karlsruhe
EGY48	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Clontech
B16	Melanoma, Maus	Cell Lines Service, Eppelheim; ATCC-Nummer: CRL-6323
293 (HEK)	Niere, human, embryonal	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

Plasmide, Vektoren und Selektionsantibiotika

	Verwendung / Hersteller	Selektion / Endkonzentration
pcDNA3.1/Myc-His B/Atrn1 bzw. Atrn3	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J. S. Duke-Cohan, Department of Cancer Immunology and AIDS, Dana-Farber Cancer Institute and Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA	Ampicillin 100 μ g/ml Neomycin (G418) 0,4 μ g/ml
pCR-Script		Chloramphenicol 300 μ g/ml
pEG202	Expression von LexA-Fusionsproteinen; Fa. Clontech	Ampicillin 100 μ g/ml HIS3 Restriktion
pET28a	Expression in <i>E. coli</i> Fa. Novagen	Kanamycin 100 μ g/ml
pGEX-4T-1	GST-Fusion	Ampicillin 100 μ g/ml
pJG4-5	GAL1-Promoter exprimiert Domäne für nukleare Lokalisation, HA-Epitop, MCS, Expression der cDNA-Bibliothek in Fusion mit transkriptionaler Aktivierungsdomäne B42; Fa. Clontech	Ampicillin 100 μ g/ml TRP1 Restriktion
pPICZ α A	Expression in <i>P. pastoris</i>	Zeocin 25 μ g/ml
pRFHM1	ADH-Promoter exprimiert LexA fusioniert mit Homeodomäne des Bicoid für Kontrolle einer nichtaktivierenden Fusion, Positivkontrolle Repressorassay, Negativkontrolle für Aktivierung und Interaktion; Fa. Clontech	Ampicillin 100 μ g/ml HIS3 Restriktion
pSecTag2 B	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J. S. Duke-Cohan, Department of Cancer Immunology and AIDS, Dana-Farber Cancer Institute and Department of Medicine, Harvard Medical school, Boston, Massachusetts, USA	Ampicillin 100 μ g/ml Zeo ^r 0,2 μ g/ml
pSH17-4	Positivkontrolle transkriptionale Aktivierung des Reportergens	Ampicillin 100 μ g/ml HIS3 Restriktion

	ADH Promoter exprimiert LexA fusioniert mit GAL4 Aktivierungsdomäne; Fa. Clontech		
pSH18-34	Reporterplasmid, beinhaltet 8 LexA-Operatoren zur Lokalisation von LexA zur Transkription des LacZ-Gens; Fa. Clontech	Ampicillin Ura3	100 µg/ml Restriktion
pSTBlue-1	Blau/weiß Selektion	Kanamycin	100 µg/ml

Oligonukleotide

Verwendung		Name	Sequenz
UBE2G1	Expression in <i>P. pastoris</i> ;	PD3	5'-AGCTGAATTCATGACGGAGCTGCAGTCGGC-3'
		PD4	5'-GTTCTAGAGACTCAAAGCAGTCTCTTGCT-3'
UBE2R2	pPICZαA	PD5	5'-AGCTGAATTCATGGCCCAGCAGCAGATGAC-3'
		PD6	5'-GTTCTAGAGACGACTCCTCATTCCCAGAATC-3'
Atrn _{cyt}	pET28a	PD99	5'-CGCGGATCCTGGAAGATCAAACAAAGTTGTTGG -3'
		PD27	5'-ATTAGCGGCCGCTCAGATGCAGGTCCCAGGCTG-3'
	pGEX-4T-1	PD131	5'-GCTGAATTCTGGAAGATCAAACAAAGTTGTTGG-3'
		PD27	5'-ATTAGCGGCCGCTCAGATGCAGGTCCCAGGCTG-3'
TPI	pET28a	PD100	5'-CGCGGATCCATGGCGCCCTCCAGGAAGT-3'
		PD101	5'-GTGCGGCCGCTCATTGTTTGGCATTTCATGAT-3'
Atrn2	pPICZαA		5'—3' 5'—3'
2-Hybrid System	Atrn _{cyt} für pEG202	PD29	5'-CATGGGATCCGGAAGATCAAACAAAGTTGTTGGCCTC-3'
		PD27	5'-ATTAGCGGCCGCTCAGATGCAGGTCCCAGGCTG-3'
Sequenzierprimer	bait-Plasmid	lex1	5'-CGTCAGCAGAGCTTCACCATTG-3'
	prey-Plasmid Atrn	target 1	5'-CTCCTACCCTTATGATGT-3'
Real-time-PCR			5'—3' 5'—3'

7 Literaturverzeichnis

- Abbott, C. A., Yu, D. M., Woollatt, E., Sutherland, G. R., McCaughan, G. W., and Gorrell, M. D. (2000) Cloning, expression and chromosomal localization of a novel human dipeptidyl peptidase (DPP) IV homolog, DPP8. *Eur. J. Biochem.* *267*, 6140-6150.
- Ajami, K., Abbott, C. A., McCaughan, G. W., and Gorrell, M. D. (2004) Dipeptidyl peptidase 9 has two forms, a broad tissue distribution, cytoplasmic localization and DPPIV-like peptidase activity. *Biochim. Biophys. Acta* *1679*, 18-28.
- Akrawi, A. F. and Bailey, G. S. (1976) Purification and specificity of prolyl dipeptidase from bovine kidney. *Biochim Biophys Acta* *422*, 170-178.
- Aoyama, A. and Chen, W.-T. (2001) A 170-kDa membrane-bound protease is associated with the expression of invasiveness by human malignant melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 8296-8300.
- Araki, H., Li, Y., Yamamoto, Y., Haneda, M., Nishi, K., Kikkawa, R., and Ohkubo, I. (2001) Purification, molecular cloning, and immunohistochemical localization of dipeptidyl peptidase II from the rat kidney and its identity with quiescent cell proline dipeptidase. *J. Biochem. (Tokyo)* *129*, 279-288.
- Azouz, A., Gunn, T. M., and Duke-Cohan, J. S. (2007) Juvenile-onset loss of lipid-raft domains in attractin-deficient mice. *Exp. Cell Res.* *313*, 761-771.
- Barinka, C., Rinnova, M., Sacha, P., Rojas, C., Majer, P., Slusher, B. S., and Konvalinka, J. (2002) Substrate specificity, inhibition and enzymological analysis of recombinant human glutamate carboxypeptidase II. *J. Neurochem.* *80*, 477-487.
- Berger, A. J., Hart, A. C., and Kaplan, J. M. (1998) G alphas-induced neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* *18*, 2871-2880.
- Bertolotto, C., Abbe, P., Hemesath, T. J., Bille, K., Fisher, D. E., Ortonne, J. P., and Ballotti, R. (1998a) Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J. Cell Biol.* *142*, 827-835.
- Bertolotto, C., Busca, R., Abbe, P., Bille, K., Aberdam, E., Ortonne, J. P., and Ballotti, R. (1998b) Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of microphthalmia. *Mol. Cell Biol.* *18*, 694-702.
- Blanco, J., Nguyen, C., Callebaut, C., Jacotot, E., Krust, B., Mazaleyrat, J. P., Wakselman, M., and Hovanessian, A. G. (1998) Dipeptidyl-peptidase IV-beta--further characterization and comparison to dipeptidyl-peptidase IV activity of CD26. *Eur J Biochem JID - 0107600* *256*, 369-378.
- Blum, H., Beier, H., and Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* *8*, 93-99.
- Bongers, J., Lambros, T., Ahmad, M., and Heimer, E. P. (1992) Kinetics of dipeptidyl peptidase IV proteolysis of growth hormone-releasing factor and analogs. *Biochim. Biophys. Acta* *1122*, 147-153.
- Boston, B. A. and Cone, R. D. (1996) Characterization of melanocortin receptor subtype expression in murine adipose tissues and in the 3T3-L1 cell line. *Endocrinology* *137*, 2043-2050.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* *72:248-54*, 248-254.
- Bronson, R. T., Donahue, L. R., Samples, R., Kim, J. H., and Naggert, J. K. (2001) Mice with mutations in the mahogany gene *Atrn* have cerebral spongiform changes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *60*, 724-730.
- Busca, R., Bertolotto, C., Abbe, P., Englaro, W., Ishizaki, T., Narumiya, S., Boquet, P., Ortonne, J. P., and Ballotti, R. (1998) Inhibition of Rho is required for cAMP-induced melanoma cell differentiation. *Mol. Biol. Cell* *9*, 1367-1378.
- Busca, R., Bertolotto, C., Ortonne, J. P., and Ballotti, R. (1996) Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/p70(S6)-kinase pathway induces B16 melanoma cell differentiation. *J. Biol. Chem.* *271*, 31824-31830.
- Busek, P., Malik, R., and Sedo, A. (2004) Dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologues (DASH) and their substrates in cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol* *36*, 408-421.
- Byyny, R. L., LoVerde, M., Lloyd, S., Mitchell, W., and Draznin, B. (1992) Cytosolic calcium and insulin resistance in elderly patients with essential hypertension. *Am. J. Hypertens.* *5*, 459-464.
- Chich, J.-F., Chapot-Chartier, M.-P., Ribadeau-Dumas, B., and Gripon, J.-C. (1992) Identification of the active site serine of the X-polyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis*. *FEBS* *314*, 139-142.

- Chiravuri, M., Lee, H., Hurta, S. L., and Huber, B. T. (2000) Homodimerization via a Leucine Zipper Motif is Required for Enzymatic Activity of Quiescent cell Proline Dipeptidase. *J Biol Chem.*
- Chiravuri, M., Schmitz, T., Yardley, K., Underwood, R., Dayal, Y., and Huber, B. T. (1999) A novel apoptotic pathway in quiescent lymphocytes identified by inhibition of a post-proline cleaving aminodipeptidase: a candidate target protease, quiescent cell proline dipeptidase. *J. Immunol.* *163*, 3092-3099.
- Clark, A. J. and Weber, A. (1998) Adrenocorticotropin insensitivity syndromes. *Endocr. Rev.* *19*, 828-843.
- Claycombe, K. J., Wang, Y., Jones, B. H., Kim, S., Wilkison, W. O., Zemel, M. B., Chun, J., and Moustaid-Moussa, N. (2000a) Transcriptional regulation of the adipocyte fatty acid synthase gene by agouti: interaction with insulin. *Physiol Genomics JID - 100894125* *3*, 157-162.
- Claycombe, K. J., Xue, B. Z., Mynatt, R. L., Zemel, M. B., and Moustaid-Moussa, N. (2000b) Regulation of leptin by agouti. *Physiol Genomics JID - 100894125* *2*, 101-105.
- Collins, P. J., McMahon, G., O'Brien, P., and O'Connor, B. (2004) Purification, identification and characterisation of seprase from bovine serum. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *36*, 2320-2333.
- Cone, R. D. (1999) The Central Melanocortin System and Energy Homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.* *10*, 211-216.
- Cone, R. D. (2000) Haploinsufficiency of the melanocortin-4 receptor: part of a thrifty genotype? *J. Clin. Invest* *106*, 185-187.
- Czyzyk, T. A., Sikorski, M. A., Yang, L., and McKnight, G. S. (2008) Disruption of the RIIbeta subunit of PKA reverses the obesity syndrome of Agouti lethal yellow mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *105*, 276-281.
- del Marmol, V. and Beermann, F. (1996) Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Lett.* *381*, 165-168.
- DeMeester, I., Korom, S., Van Damme, J., and Scharp, S. (1999) CD26, let it cut or cut it down [In Process Citation]. *Immunol Today* *20*, 367-375.
- Demuth, H.U. & Heins, J.: Catalytic Mechanism of Dipeptidylpeptidase IV. In: *Molecular Biology Intelligence Unit. Dipeptidyl Peptidase IV (CD 26) in Metabolism and the Immune Response*, Fleischer B., Hrsg.: Austin, USA, 1-35 (1995)
- Di Giovanni, S., Faden, A. I., Yakovlev, A., Duke-Cohan, J. S., Finn, T., Thouin, M., Knoblach, S., De Biase, A., Bregman, B. S., and Hoffman, E. P. (2005) Neuronal plasticity after spinal cord injury: identification of a gene cluster driving neurite outgrowth. *FASEB J.* *19*, 153-154.
- Dinjens, W. N., Ten Kate, J., Wijnen, J. T., Van der Linden, E. P., Beek, C. J., Lenders, M. H., Khan, P. M., and Bosman, F. T. (1989) Distribution of adenosine deaminase-complexing protein in murine tissues. *J. Biol Chem* *264*, 19215-19220.
- Dinulescu, D. M., Fan, W., Boston, B. A., McCall, K., Lamoreux, M. L., Moore, K. J., Montagno, J., and Cone, R. D. (1998) Mahogany (mg) stimulates feeding and increases basal metabolic rate independent of its suppression of agouti. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 12707-12712.
- Dong, R. P., Kameoka, J., Hegen, M., Tanaka, T., Xu, Y., Schlossman, S. F., and Morimoto, C. (1996) Characterization of adenosine deaminase binding to human CD26 on T cells and its biologic role in immune response. *J. Immunol.* *156*, 1349-1355.
- Draznin, B., Metz, S. A., Sussman, K. E., and Leitner, J. W. (1987a) Measurement of cytosolic free calcium concentration in relation to insulin release in normal rat pancreatic islets. *Diabetes Res. Clin. Pract.* *3*, 291-295.
- Draznin, B., Sussman, K., Kao, M., Lewis, D., and Sherman, N. (1987b) The existence of an optimal range of cytosolic free calcium for insulin-stimulated glucose transport in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* *262*, 14385-14388.
- Duhl, D. M., Stevens, M. E., Vrieling, H., Saxon, P. J., Miller, M. W., Epstein, C. J., and Barsh, G. S. (1994) Pleiotropic effects of the mouse lethal yellow (Ay) mutation explained by deletion of a maternally expressed gene and the simultaneous production of agouti fusion RNAs. *Development* *120*, 1695-1708.
- Duke-Cohan, J. S., Gu, J., McLaughlin, D. F., Xu, Y., Freeman, G. J., and Schlossman, S. F. (1998) Attractin (DPPT-L), a member of the CUB family of cell adhesion and guidance proteins, is secreted by activated human T lymphocytes and modulates immune cell interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 11336-11341.
- Duke-Cohan, J. S., Kim, J. H., and Azouz, A. (2004) Attractin: cautionary tales for therapeutic intervention in molecules with pleiotropic functionality. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* *23*, 1-11.

- Duke-Cohan, J. S., Morimoto, C., Rucker, J. A., and Schlossman, S. F. (1995) A novel form of dipeptidylpeptidase IV found in human serum. *J Biol Chem* 270, 14107-14114.
- Duke-Cohan, J. S., Morimoto, C., Rucker, J. A., and Schlossman, S. F. (1996) Serum high molecular weight dipeptidyl peptidase IV (CD26) is similar to a novel antigen DPPT-L released from activated T cells. *J Immunol* 156, 1714-1721.
- Duke-Cohan, J. S., Tang, W., and Schlossman, S. F. (2000) Attractin: a cub-family protease involved in T cell-monocyte/macrophage interactions [In Process Citation]. *Adv Exp Med Biol* 477, 173-185.
- Durinx, C., Lambeir, A. M., Bosmans, E., Falmagne, J. B., Berghmans, R., Haemers, A., Scharpe, S., and De, M., I (2000) Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. *Eur. J. Biochem.* 267, 5608-5613.
- Englaro, W., Rezzonico, R., Durand-Clement, M., Lallemand, D., Ortonne, J. P., and Ballotti, R. (1995) Mitogen-activated protein kinase pathway and AP-1 are activated during cAMP-induced melanogenesis in B-16 melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 270, 24315-24320.
- Fekete, C., Marks, D. L., Sarkar, S., Emerson, C. H., Rand, W. M., Cone, R. D., and Lechan, R. M. (2004) Effect of Agouti-related protein in regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the melanocortin 4 receptor knockout mouse. *Endocrinology* 145, 4816-4821.
- Fields, S. and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *NATURE* 340, 245-246.
- Friedrich, D., Kuhn-Wache, K., Hoffmann, T., and Demuth, H. U. (2003) Isolation and characterization of attractin-2. *Adv. Exp. Med. Biol.* 524, 109-113.
- Friedrich, D., Hoffmann, T., Bar, J., Wermann, M., Manhart, S., Heiser, U., and Demuth, H.-U. (2007) Does human attractin have DP4 activity? *Biol Chem* (in press) 388.
- Fukasawa, K. M., Fukasawa, K., Higaki, K., Shiina, N., Ohno, M., Ito, S., Ootogoto, J., and Ota, N. (2001) Cloning and functional expression of rat kidney dipeptidyl peptidase II. *Biochem. J.* 353, 283-290.
- Gantz, I. and Fong, T. M. (2003) The melanocortin system. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 284, E468-E474.
- Gherzi, G., Dong, H., Goldstein, L. A., Yeh, Y., Hakkinen, L., Larjava, H. S., and Chen, W. T. (2002) Regulation of fibroblast migration on collagenous matrix by a cell surface peptidase complex. *J. Biol. Chem.* 277, 29231-29241.
- Glickman, M. H. and Ciechanover, A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 82, 373-428.
- Gomi, H., Inui, K., Taniguchi, H., Yoshikawa, Y., and Yamanouchi, K. (1990) Edematous changes in the central nervous system of zitter rats with genetic spongiform encephalopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 49, 250-259.
- Gomi, H., Ikeda, T., Kunieda, T., Itohara, S., Prusiner, S. B., and Yamanouchi, K. (1994a) Prion protein (PrP) is not involved in the pathogenesis of spongiform encephalopathy in zitter rats. *Neurosci. Lett.* 166, 171-174.
- Gomi, H., Ueno, I., and Yamanouchi, K. (1994b) Antioxidant enzymes in the brain of zitter rats: abnormal metabolism of oxygen species and its relevance to pathogenic changes in the brain of zitter rats with genetic spongiform encephalopathy. *Brain Res.* 653, 66-72.
- Grandt, D., Schimiczek, M., Rascher, W., Feth, F., Shively, J., Lee, T. D., Davis, M. T., Reeve, J. R., Jr., and Michel, M. C. (1996) Neuropeptide Y 3-36 is an endogenous ligand selective for Y2 receptors. *Regul. Pept.* 67, 33-37.
- Gunn, T. M., Inui, T., Kitada, K., Ito, S., Wakamatsu, K., He, L., Bouley, D. M., Serikawa, T., and Barsh, G. S. (2001) Molecular and phenotypic analysis of Attractin mutant mice. *Genetics* 158, 1683-1695.
- Gunn, T. M., Miller, K. A., He, L., Hyman, R. W., Davis, R. W., Azarani, A., Schlossman, S. F., Duke-Cohan, J. S., and Barsh, G. S. (1999) The mouse mahogany locus encodes a transmembrane form of human attractin. *NATURE* 398, 152-156.
- Gupta, M., Gupta, B. K., Thomas, R., Bruemmer, V., Sladek, J. R., Jr., and Felten, D. L. (1986) Aged mice are more sensitive to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine treatment than young adults. *Neurosci. Lett.* 70, 326-331.
- Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H., and Brent, R. (1993) Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* 75, 791-803.

- Haqq, A. M., Rene, P., Kishi, T., Khong, K., Lee, C. E., Liu, H., Friedman, J. M., Elmquist, J. K., and Cone, R. D. (2003) Characterization of a novel binding partner of the melanocortin-4 receptor: attractin-like protein. *Biochem. J.* 376, 595-605.
- He, L., Gunn, T. M., Bouley, D. M., Lu, X. Y., Watson, S. J., Schlossman, S. F., Duke-Cohan, J. S., and Barsh, G. S. (2001) A biochemical function for attractin in agouti-induced pigmentation and obesity. *nature genetics* 27, 40-47.
- He, L., Eldridge, A. G., Jackson, P. K., Gunn, T. M., and Barsh, G. S. (2003a) Accessory proteins for melanocortin signaling: attractin and mahogunin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 994, 288-298.
- He, L., Lu, X. Y., Jolly, A. F., Eldridge, A. G., Watson, S. J., Jackson, P. K., Barsh, G. S., and Gunn, T. M. (2003b) Spongiform degeneration in mahoganoid mutant mice. *Science* 299, 710-712.
- Hearing, V. J. and Tsukamoto, K. (1991) Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* 5, 2902-2909.
- Hemesath, T. J., Price, E. R., Takemoto, C., Badalian, T., and Fisher, D. E. (1998) MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *NATURE* 391, 298-301.
- Hicke, L. (1997) Ubiquitin-dependent internalization and down-regulation of plasma membrane proteins. *FASEB J.* 11, 1215-1226.
- Hopsu-Havu, V. K. and Glenner, G. G. (1966) A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide. *Histochemie.* 7, 197-201.
- Inui, A. (1999) Neuropeptide Y: a key molecule in anorexia and cachexia in wasting disorders? [In Process Citation]. *Mol. Med Today* 5, 79-85.
- Iwaki-Egawa, S., Watanabe, Y., and Fujimoto, Y. (1997) CD26/dipeptidyl peptidase IV does not work as an adenosine deaminase-binding protein in rat cells. *Cellular Immunology* 178, 180-186.
- Iwaki-Egawa, S., Watanabe, Y., Kikuya, Y., and Fujimoto, Y. (1998) Dipeptidyl peptidase IV from human serum: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *J Biochem (Tokyo.)* 124, 428-433.
- Izawa, T., Takenaka, S., Ihara, H., Kotani, T., Yamate, J., Franklin, R. J., and Kuwamura, M. (2008) Cellular responses in the spinal cord during development of hypomyelination in the mv rat. *Brain Res.* 1195, 120-129.
- Jackson, I. J. (1999) The mahogany mouse mutation: further links between pigmentation, obesity and the immune system. *Trends Genet* 15, 429-431.
- Jacotot, E., Callebaut, C., Blanco, J., Krust, B., Neubert, K., and Barth, A. (1996) Dipeptidyl-peptidase IV- β , a novel cell-surface-expressed protein with dipeptidyl-peptidase IV activity. *Eur. J. Biochem.* 239, 248-258.
- Jones, B. H., Kim, J. H., Zemel, M. B., Woychik, R. P., Michaud, E. J., Wilkison, W. O., and Moustaid, N. (1996) Upregulation of adipocyte metabolism by agouti protein: possible paracrine actions in yellow mouse obesity. *Am. J. Physiol* 270, E192-E196.
- Joyce, J. N., Der, T. C., Renish, L., Osredkar, T., Hagner, D., Reploge, M., Sakakibara, S., and Ueda, S. (2004) Loss of D3 receptors in the zitter mutant rat is not reversed by L-dopa treatment. *Exp. Neurol.* 187, 178-189.
- Jung, G. D., Yang, J. Y., Song, E. S., and Par, J. W. (2001) Stimulation of melanogenesis by glycyrrhizin in B16 melanoma cells. *Exp. Mol. Med.* 33, 131-135.
- Kahne, T., Kroning, H., Thiel, U., Ulmer, A. J., Flad, H. D., and Ansorge, S. (1996) Alterations in structure and cellular localization of molecular forms of DP IV/CD26 during T cell activation. *Cell Immunol.* 170, 63-70.
- Kameoka, J., Tanaka, T., Nojima, Y., Schlossman, S. F., and Morimoto, C. (1993) Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science* 261, 466-469.
- Karas, M. and Hillenkamp, F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* 60, 2299-2301.
- Khaled, M., Larribere, L., Bille, K., Aberdam, E., Ortonne, J. P., Ballotti, R., and Bertolotto, C. (2002) Glycogen synthase kinase 3 β is activated by cAMP and plays an active role in the regulation of melanogenesis. *J. Biol. Chem.* 277, 33690-33697.
- Khwaja, F. W., Duke-Cohan, J. S., Brat, D. J., and Van Meir, E. G. (2006) Attractin Is Elevated in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Malignant Astrocytoma and Mediates Glioma Cell Migration. *Clin. Cancer Res.* 12, 6331-6336.

- Kieffer, T. J., McIntosh, C. H., and Pederson, R. A. (1995) Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology* *136*, 3585-3596.
- Kim, D., Wang, L., Beconi, M., Eiermann, G. J., Fisher, M. H., He, H., Hickey, G. J., Kowalchick, J. E., Leiting, B., Lyons, K., Marsilio, F., McCann, M. E., Patel, R. A., Petrov, A., Scapin, G., Patel, S. B., Roy, R. S., Wu, J. K., Wyvratt, M. J., Zhang, B. B., Zhu, L., Thornberry, N. A., and Weber, A. E. (2005) (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluoromethyl)-5,6-dihydro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrazin-7(8H)-yl]-1-(2,4,5-trifluorophenyl)butan-2-amine: a potent, orally active dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *J. Med. Chem.* *48*, 141-151.
- Kim, H. O., Kimura, T., Ochiai, K., Yazawa, H., Itakura, C., and Umemura, T. (2003) Sustained hypomyelination and high serum thyroid hormone in aged black tremor hamster. *Jpn. J. Vet. Res.* *51*, 113-120.
- Kim, J. H., Mynatt, R. L., Moore, J. W., Woychik, R. P., Moustaid, N., and Zemel, M. B. (1996) The effects of calcium channel blockade on agouti-induced obesity. *FASEB J.* *10*, 1646-1652.
- Kim, J. H., Kiefer, L. L., Woychik, R. P., Wilkison, W. O., Truesdale, A., Ittoop, O., Willard, D., Nichols, J., and Zemel, M. B. (1997) Agouti regulation of intracellular calcium: role of melanocortin receptors. *Am. J. Physiol* *272*, E379-E384.
- Kim, M. S., Small, C. J., Stanley, S. A., Morgan, D. G., Seal, L. J., Kong, W. M., Edwards, C. M., Abusnana, S., Sunter, D., Ghatei, M. A., and Bloom, S. R. (2000) The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. *J. Clin. Invest* *105*, 1005-1011.
- Korswagen, H. C., Park, J. H., Ohshima, Y., and Plasterk, R. H. (1997) An activating mutation in a *Caenorhabditis elegans* Gs protein induces neural degeneration. *Genes Dev.* *11*, 1493-1503.
- Krepela, E., Kraml, J., Vicar, J., Kadlecova, L., and Kasafirek, E. (1983) Demonstration of two molecular forms of dipeptidyl peptidase IV in normal human serum. *Physiol Bohemoslov JID - 0175317* *32*, 486-496.
- Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G., and Gruters, A. (1998) Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat. Genet.* *19*, 155-157.
- Kuramoto, T., Yamasaki, K., Kondo, A., Nakajima, K., Yamada, M., and Serikawa, T. (1998) Production of WTC.ZI-zi rat congenic strain and its pathological and genetic analyses. *Exp. Anim* *47*, 75-81.
- Kuramoto, T., Kitada, K., Inui, T., Sasaki, Y., Ito, K., Hase, T., Kawaguchi, S., Ogawa, Y., Nakao, K., Barsh, G. S., Nagao, M., Ushijima, T., and Serikawa, T. (2001) Attractin/mahogany/zitter plays a critical role in myelination of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A JID - 7505876* *98*, 559-564.
- Kuramoto, T., Nomoto, T., Fujiwara, A., Mizutani, M., Sugimura, T., and Ushijima, T. (2002) Insertional mutation of the Attractin gene in the black tremor hamster. *Mamm. Genome* *13*, 36-40.
- Kwon, H. Y., Bultman, S. J., Loffler, C., Chen, W. J., Furdon, P. J., Powell, J. G., Usala, A. L., Wilkison, W., Hansmann, I., and Woychik, R. P. (1994) Molecular structure and chromosomal mapping of the human homolog of the agouti gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 9760-9764.
- Kyhse-Andersen, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* *10*, 203-209.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *NATURE* *227*, 680-685.
- Lalli, E. and Sassone-Corsi, P. (1994) Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP. *J. Biol. Chem.* *269*, 17359-17362.
- Lamoreux, M. L., Wakamatsu, K., and Ito, S. (2001) Interaction of major coat color gene functions in mice as studied by chemical analysis of eumelanin and pheomelanin. *Pigment Cell Res.* *14*, 23-31.
- Lane, P. W. (1960). *Mouse News Lett.* *22* 35.
- Lane, P. W. and Green, M. C. (1960) Mahogany, a recessive color mutation in the linkage group V of the mouse. *J. Hered.* *51*, 228-230.
- Lankas, G. R., Leiting, B., Roy, R. S., Eiermann, G. J., Beconi, M. G., Biftu, T., Chan, C. C., Edmondson, S., Feeney, W. P., He, H., Ippolito, D. E., Kim, D., Lyons, K. A., Ok, H. O., Patel, R. A., Petrov, A. N., Pryor, K. A., Qian, X., Reigle, L., Woods, A., Wu, J. K., Zaller, D., Zhang, X., Zhu, L., Weber, A. E., and Thornberry, N. A. (2005) Dipeptidyl peptidase IV inhibition for the treatment of type 2 diabetes: potential importance of selectivity over dipeptidyl peptidases 8 and 9. *Diabetes* *54*, 2988-2994.

- Lee, K. N., Jackson, K. W., Christiansen, V. J., Chung, K. H., and McKee, P. A. (2004) A novel plasma proteinase potentiates alpha2-antiplasmin inhibition of fibrin digestion. *Blood* 103, 3783-3788.
- Leiting, B., Pryor, K. D., Wu, J. K., Marsilio, F., Patel, R. A., Craik, C. S., Ellman, J. A., Cummings, R. T., and Thornberry, N. A. (2003) Catalytic properties and inhibition of proline-specific dipeptidyl peptidases II, IV and VII. *Biochem. J.* 371, 525-532.
- Levy, M. T., McCaughan, G. W., Abbott, C. A., Park, J. E., Cunningham, A. M., Muller, E., Rettig, W. J., and Gorrell, M. D. (1999) Fibroblast activation protein: A cell surface dipeptidyl peptidase and gelatinase expressed by stellate cells at the tissue remodelling interface in human cirrhosis. *Hepatology* 29, 1768-1778.
- Lowings, P., Yavuzer, U., and Goding, C. R. (1992) Positive and negative elements regulate a melanocyte-specific promoter. *Mol. Cell Biol.* 12, 3653-3662.
- Lu, D., Willard, D., Patel, I. R., Kadwell, S., Overton, L., Kost, T., Luther, M., Chen, W., Woychik, R. P., Wilkison, W. O., and . (1994) Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *NATURE* 371, 799-802.
- Lu, X., Gunn, T. M., Shieh, K., Barsh, G. S., Akil, H., and Watson, S. J. (1999) Distribution of Mahogany/Attractin mRNA in the rat central nervous system. *FEBS Lett* 462, 101-107.
- MacNeil, D. J., Howard, A. D., Guan, X., Fong, T. M., Nargund, R. P., Bednarek, M. A., Goulet, M. T., Weinberg, D. H., Strack, A. M., Marsh, D. J., Chen, H. Y., Shen, C. P., Chen, A. S., Rosenblum, C. I., MacNeil, T., Tota, M., MacIntyre, E. D., and Van der Ploeg, L. H. (2002) The role of melanocortins in body weight regulation: opportunities for the treatment of obesity. *Eur. J. Pharmacol.* 450, 93-109.
- Maes, M. B., Lambeir, A. M., Gilany, K., Senten, K., Van, d., V, Leiting, B., Augustyns, K., Scharpe, S., and De, M., I (2005) Kinetic investigation of human dipeptidyl peptidase II (DPPII)-mediated hydrolysis of dipeptide derivatives and its identification as quiescent cell proline dipeptidase (QPP)/dipeptidyl peptidase 7 (DPP7). *Biochem. J.* 386, 315-324.
- Malik, R., Mares, V., Kleibl, Z., Pohlreich, P., Vlasticova, K., and Sedo, A. (2001) Expression of attractin and its differential enzyme activity in glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun JID - 0372516* 284, 289-294.
- McDonald, J. K., Ellis, S., and Reilly, T. J. (1966) Properties of dipeptidyl arylamidase I of the pituitary. Chloride and sulfhydryl activation of seryltyrosyl-beta-naphthylamide hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 241, 1494-1501.
- McDonald, J. K., Reilly, T. J., Zeitman, B. B., and Ellis, S. (1968) Dipeptidyl arylamidase II of the pituitary. Properties of lysylalanyl-beta-naphthylamide hydrolysis: inhibition by cations, distribution in tissues, and subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 243, 2028-2037.
- Mentlein, R. (1999) Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides [In Process Citation]. *Regul. Pept.* 85, 9-24.
- Michaud, E. J., Bultman, S. J., Klebig, M. L., van Vugt, M. J., Stubbs, L. J., Russell, L. B., and Woychik, R. P. (1994) A molecular model for the genetic and phenotypic characteristics of the mouse lethal yellow (Ay) mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 2562-2566.
- Michaud, E. J., Mynatt, R. L., Miltenberger, R. J., Klebig, M. L., Wilkinson, J. E., Zemel, M. B., Wilkison, W. O., and Woychik, R. P. (1997) Role of the agouti gene in obesity. *J Endocrinol JID - 0375363* 155, 207-209.
- Miller, K. A., Gunn, T. M., Carrasquillo, M. M., Lamoreux, M. L., Galbraith, D. B., and Barsh, G. S. (1997) Genetic studies of the mouse mutations mahogany and mahoganoid. *Genetics* 146, 1407-1415.
- Miltenberger, R. J., Mynatt, R. L., Wilkinson, J. E., and Woychik, R. P. (1997) The role of the agouti gene in the yellow obese syndrome. *J. Nutr.* 127, 1902S-1907S.
- Morrison, M. E., Vijayasardhi, S., Engelstein, D., Albino, A. P., and Houghton, A. N. (1993) A marker for neoplastic progression of human melanocytes is a cell surface ectopeptidase. *J. Exp. Med.* 177, 1135-1143.
- Moussa, N. M. and Claycombe, K. J. (1999) The yellow mouse obesity syndrome and mechanisms of agouti-induced obesity. *Obes Res* 7, 506-514.
- Muto, Y., Hayashi, T., Higashi, Y., Endo, T., Yamamoto, T., and Sato, K. (1999) Age-related decrease in brain-derived neurotrophic factor gene expression in the brain of the zitter rat with genetic spongiform encephalopathy. *Neurosci. Lett.* 271, 69-72.
- Muto, Y. and Sato, K. (2003) Pivotal role of attractin in cell survival under oxidative stress in the zitter rat brain with genetic spongiform encephalopathy. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 111, 111-122.

- Mynatt, R. L., Miltenberger, R. J., Klebig, M. L., Zemel, M. B., Wilkinson, J. E., Wilkinson, W. O., and Woychik, R. P. (1997) Combined effects of insulin treatment and adipose tissue-specific agouti expression on the development of obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 919-922.
- Nagle, D. L., McGrail, S. H., Vitale, J., Woolf, E. A., Dussault, B. J. J., DiRocco, L., Holmgren, L., Montagno, J., Bork, P., Huszar, D., Fairchild-Huntress, V., Ge, P., Keilty, J., Ebeling, C., Baldini, L., Gilchrist, J., Burn, P., Carlson, G. A., and Moore, K. J. (1999) The mahogany protein is a receptor involved in suppression of obesity. *NATURE* *398*, 148-152.
- Nakadate, K., Noda, T., Sakakibara, S., Kumamoto, K., Matsuura, T., Joyce, J. N., and Ueda, S. (2006) Progressive dopaminergic neurodegeneration of substantia nigra in the zitter mutant rat. *Acta Neuropathol. (Berl)* *112*, 64-73.
- Olah, J., Orosz, F., Keseru, G. M., Kovari, Z., Kovacs, J., Hollan, S., and Ovadi, J. (2002) Triosephosphate isomerase deficiency: a neurodegenerative misfolding disease. *Biochem. Soc. Trans.* *30*, 30-38.
- Ollmann, M. M., Wilson, B. D., Yang, Y. K., Kerns, J. A., Chen, Y., Gantz, I., and Barsh, G. S. (1997) Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* *278*, 135-138.
- Ookochi, T., Ito, H., Serikawa, T., and Sato, K. (1997) Detection of apoptosis in the brain of the zitter rat with genetic spongiform encephalopathy. *Biochem. Mol. Biol. Int.* *41*, 279-284.
- Pangalos, M. N., Neefs, J. M., Somers, M., Verhasselt, P., Bekkers, M., van der Helm, L., Fraiponts, E., Ashton, D., and Gordon, R. D. (1999) Isolation and expression of novel human glutamate carboxypeptidases with N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase and dipeptidyl peptidase IV activity. *J Biol Chem* *274*, 8470-8483.
- Park, H. Y., Perez, J. M., Laursen, R., Hara, M., and Gilchrist, B. A. (1999a) Protein kinase C-beta activates tyrosinase by phosphorylating serine residues in its cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* *274*, 16470-16478.
- Park, H. Y., Wu, H., Killoran, C. E., and Gilchrist, B. A. (2004) The receptor for activated C-kinase-I (RACK-I) anchors activated PKC-beta on melanosomes. *J. Cell Sci.* *117*, 3659-3668.
- Park, J. E., Lenter, M. C., Zimmermann, R. N., Garin-Chesa, P., Old, L. J., and Rettig, W. J. (1999b) Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *274*, 36505-36512.
- Pauly, R. P., Rosche, F., Wermann, M., McIntosh, C. H. S., Pederson, R. A., and Demuth, H. U. (1996) Investigation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide-(1-42) and glucagon-like peptide-1-(7-36) degradation in vitro by dipeptidyl peptidase IV using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry - A novel kinetic approach. *J Biol Chem* *271*, 23222-23229.
- Paz, J., Yao, H., Lim, H. S., Lu, X. Y., and Zhang, W. (2006) The neuroprotective role of attractin in neurodegeneration. *Neurobiol. Aging*.
- Peters, A. (2002) The effects of normal aging on myelin and nerve fibers: a review. *J. Neurocytol.* *31*, 581-593.
- Phan, L. K., Lin, F., LeDuc, C. A., Chung, W. K., and Leibel, R. L. (2002) The mouse mahogany coat color mutation disrupts a novel C3HC4 RING domain protein. *J. Clin. Invest* *110*, 1449-1459.
- Pritchard, L. E., Turnbull, A. V., and White, A. (2002) Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. *J. Endocrinol.* *172*, 411-421.
- Puschel, G., Mentlein, R., and Heymann, E. (1982) Isolation and characterization of dipeptidyl peptidase IV from human placenta. *Eur J Biochem* *126*, 359-365.
- Rehm, S., Mehraein, P., Anzil, A. P., and Deerberg, F. (1982) A new rat mutant with defective overhairs and spongy degeneration of the central nervous system: clinical and pathologic studies. *Lab Anim Sci.* *32*, 70-73.
- Rettig, W. J., Su, S. L., Fortunato, S. R., Scanlan, M. J., Raj, B. K., Garin-Chesa, P., Healey, J. H., and Old, L. J. (1994) Fibroblast activation protein: purification, epitope mapping and induction by growth factors. *Int. J. Cancer* *58*, 385-392.
- Robbins, L. S., Nadeau, J. H., Johnson, K. R., Kelly, M. A., Roselli-Rehffuss, L., Baack, E., Mountjoy, K. G., and Cone, R. D. (1993) Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* *72*, 827-834.
- Robinson, M. B., Blakely, R. D., Couto, R., and Coyle, J. T. (1987) Hydrolysis of the brain dipeptide N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate. Identification and characterization of a novel N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase activity from rat brain. *J. Biol. Chem.* *262*, 14498-14506.

- Saher, G., Brugger, B., Lappe-Siefke, C., Mobius, W., Tozawa, R., Wehr, M. C., Wieland, F., Ishibashi, S., and Nave, K. A. (2005) High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat. Neurosci.* *8*, 468-475.
- Sakakibara, S., Nakadate, K., Ookawara, S., and Ueda, S. (2008) Non-cell autonomous impairment of oligodendrocyte differentiation precedes CNS degeneration in the Zitter rat: implications of macrophage/microglial activation in the pathogenesis. *BMC. Neurosci.* *9*, 35.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 1998. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Cold Spring Harbor.
- Sandell, J. H. and Peters, A. (2003) Disrupted myelin and axon loss in the anterior commissure of the aged rhesus monkey. *J. Comp Neurol.* *466*, 14-30.
- Scanlan, M. J., Raj, B. K., Calvo, B., Garin-Chesa, P., Sanz-Moncasi, M. P., Healey, J. H., Old, L. J., and Rettig, W. J. (1994) Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 5657-5661.
- Schaffer, J. V. and Bolognia, J. L. (2001) The melanocortin-1 receptor: red hair and beyond. *Arch. Dermatol.* *137*, 1477-1485.
- Schechter, I. & Berger, A.: On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *27*, 157-162 (1967)
- Schneider, A. S. (2000) Triosephosphate isomerase deficiency: historical perspectives and molecular aspects. *Baillieres Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* *13*, 119-140.
- Schnell, J. D. and Hicke, L. (2003) Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J. Biol Chem* *278*, 35857-35860.
- Schrader, W. P., West, C. A., Miczek, A. D., and Norton, E. K. (1990) Characterization of the adenosine deaminase-adenosine deaminase complexing protein binding reaction. *J. Biol Chem* *265*, 19312-19318.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Jr., Seeley, R. J., and Baskin, D. G. (2000) Central nervous system control of food intake. *NATURE* *404*, 661-671.
- Sedo, A., Duke-Cohan, J. S., Balaziova, E., and Sedova, L. R. (2005) Dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologs: contributing factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis? *Arthritis Res. Ther.* *7*, 253-269.
- Sedo, A. and Malik, R. (2001) Dipeptidyl peptidase IV-like molecules: homologous proteins or homologous activities? *Biochim Biophys Acta JID - 0217513 1550*, 107-116.
- Sedo, A., Malik, R., Vicar, J., Simanek, V., and Ulrichova, J. (2003) Quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids as inhibitors of dipeptidyl peptidase IV-like activity baring enzymes in human blood plasma and glioma cell lines. *Physiol Res.* *52*, 367-372.
- Shibuya-Saruta, H., Kasahara, Y., and Hashimoto, Y. (1996) Human serum dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) and its unique properties. *J Clin Lab Anal JID - 8801384 10*, 435-440.
- Shneider, B. L., Thevananther, S., Moyer, M. S., Walters, H. C., Rinaldo, P., Devarajan, P., Sun, A. Q., Dawson, P. A., and Ananthanarayanan, M. (1997) Cloning and characterization of a novel peptidase from rat and human ileum. *J Biol Chem* *272*, 31006-31015.
- Shutter, J. R., Graham, M., Kinsey, A. C., Scully, S., Luthy, R., and Stark, K. L. (1997) Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes Dev.* *11*, 593-602.
- Sun, K., Johnson, B. S., and Gunn, T. M. (2007) Mitochondrial dysfunction precedes neurodegeneration in mahogunin (*Mgn1*) mutant mice. *Neurobiol. Aging* *28*, 1840-1852.
- Sun, S., Albright, C. F., Fish, B. H., George, H. J., Selling, B. H., Hollis, G. F., and Wynn, R. (2002) Expression, purification, and kinetic characterization of full-length human fibroblast activation protein. *Protein Expr. Purif.* *24*, 274-281.
- Tanaka, S. (2003) Comparative aspects of intracellular proteolytic processing of peptide hormone precursors: studies of proopiomelanocortin processing. *Zoolog. Sci.* *20*, 1183-1198.
- Tang, W. and Duke-Cohan, J. S. (2002) Human secreted attractin disrupts neurite formation in differentiating cortical neural cells in vitro. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *61*, 767-777.

- Tang, W., Gunn, T. M., McLaughlin, D. F., Barsh, G. S., Schlossman, S. F., and Duke-Cohan, J. S. (2000) Secreted and membrane attractin result from alternative splicing of the human ATRN gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 6025.
- Tebar, F., Soley, M., and Ramirez, I. (1996) The antilipolytic effects of insulin and epidermal growth factor in rat adipocytes are mediated by different mechanisms. *Endocrinology* 137, 4181-4188.
- Ueda, S., Aikawa, M., Ishizuya-Oka, A., Yamaoka, S., Koibuchi, N., and Yoshimoto, K. (2000) Age-related dopamine deficiency in the mesostriatal dopamine system of zitter mutant rats: regional fiber vulnerability in the striatum and the olfactory tubercle. *Neuroscience* 95, 389-398.
- Ueda, S., Sakakibara, S., Nakadate, K., Noda, T., Shinoda, M., and Joyce, J. N. (2005) Degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra of zitter mutant rat and protection by chronic intake of Vitamin E. *Neurosci. Lett.* 380, 252-256.
- Ueda, S., Sakakibara, S., Kadowaki, T., Naitoh, T., Hirata, K., and Yoshimoto, K. (2008) Chronic treatment with melatonin attenuates serotonergic degeneration in the striatum and olfactory tubercle of zitter mutant rats. *Neurosci. Lett.* 448, 212-216.
- Valentin, C., Pissard, S., Martin, J., Heron, D., Labrune, P., Livet, M. O., Mayer, M., Gelbart, T., Schneider, A., Max-Audit, I., and Cohen-Solal, M. (2000) Triose phosphate isomerase deficiency in 3 French families: two novel null alleles, a frameshift mutation (TPI Alfortville) and an alteration in the initiation codon (TPI Paris). *Blood* 96, 1130-1135.
- Varlamov, O., Leiter, E. H., and Fricker, L. (1996) Induced and spontaneous mutations at Ser202 of carboxypeptidase E. Effect on enzyme expression, activity, and intracellular routing. *J. Biol. Chem.* 271, 13981-13986.
- Voisey, J. and van Daal, A. (2002) Agouti: from mouse to man, from skin to fat. *Pigment Cell Res.* 15, 10-18.
- Walker, W. P., Aradhya, S., Hu, C. L., Shen, S., Zhang, W., Azarani, A., Lu, X., Barsh, G. S., and Gunn, T. M. (2007) Genetic analysis of attractin homologs. *Genesis*. 45, 744-756.
- Wilson, B. D., Ollmann, M. M., and Barsh, G. S. (1999) The role of agouti-related protein in regulating body weight. *Mol. Med. Today* 5, 250-256.
- Wrenger, S., Faust, J., Friedrich, D., Hoffmann, T., Hartig, R., Lendeckel, U., Kahne, T., Thielitz, A., Neubert, K., and Reinhold, D. (2006b) Attractin, a dipeptidyl peptidase IV/CD26-like enzyme, is expressed on human peripheral blood monocytes and potentially influences monocyte function. *J. Leukoc. Biol.*
- Wrenger, S., Guth, B., Schultze, B., Hoffmann, T., Friedrich, D., Kahne, T., Faust, J., Neubert, K., and Reinhold, D. (2006a) Expression of dipeptidyl peptidase IV-like enzymes in human peripheral blood mononuclear cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 575, 87-91.
- Wu, M., Hemesath, T. J., Takemoto, C. M., Horstmann, M. A., Wells, A. G., Price, E. R., Fisher, D. Z., and Fisher, D. E. (2000) c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. *Genes Dev.* 14, 301-312.
- Xue, B., Moustaid, N., Wilkison, W. O., and Zemel, M. B. (1998) The agouti gene product inhibits lipolysis in human adipocytes via a Ca²⁺-dependent mechanism. *FASEB J.* 12, 1391-1396.
- Xue, B. Z., Wilkison, W. O., Mynatt, R. L., Moustaid, N., Goldman, M., and Zemel, M. B. (1999) The agouti gene product stimulates pancreatic [beta]-cell Ca²⁺ signaling and insulin release. *Physiol Genomics* 1, 11-19.
- Yasumoto, K., Yokoyama, K., Takahashi, K., Tomita, Y., and Shibahara, S. (1997) Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes. *J. Biol. Chem.* 272, 503-509.

Danksagung

Den Herren Prof. Dr. H.-U. Demuth und PD Dr. K. Glund gilt mein besonderer Dank für die Überlassung dieses spannenden Themas, die Gewährung optimaler Arbeitsbedingungen und das mir geschenkte Vertrauen.

Prof. Dr. M. Stubbs danke ich außerordentlich für die Bereitschaft diese Arbeit an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg zu betreuen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. T. Hoffmann vor allem für sein außerordentliches Interesse an diesem Thema, seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine Ideen. Seine Hilfestellung hat entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke all meinen Kollegen der *probiodrug AG* für die Unterstützung bei der Erarbeitung zahlloser experimenteller Techniken und die Bereitschaft Materialien sowie Ideen und Informationen auszutauschen und weiterzugeben. Spezieller Dank gilt hierbei:

B. Stechmann, C. Simon und S. Lehmann für die Mitarbeit zur Thematik „Attractin“; M. Wermann und L. Wagner für die Unterstützung bei proteinbiochemischen Techniken; Dr. J. Bär für die Bereitstellung der rekombinanten humanen DP4; Dr. J.-U. Rahfeld und der Arbeitsgruppe Molekularbiologie für die Hilfestellung bei molekularbiologischen Methoden; Dr. F. Rosche der Arbeitsgruppe Analytik für die Hilfestellung bei Arbeiten am MALDI-TOF MS Gerät; Dr. S. Manhart und Dr. U. Heiser sowie der gesamten Arbeitsgruppe „Chemie“ für die Bereitstellung von Substraten und Inhibitoren; N. Schreier, I. Schulz und der Arbeitsgruppe Zellbiologie für die Unterstützung bei zellbiologischen Methoden.

Prof. Dr. Gunter Reuter und Dr. Thomas Rudolph sowie der gesamten Arbeitsgruppe Entwicklungsgenetik der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg gilt mein Dank für die Unterstützung beim *yeast two hybrid screen* genauso wie für die Möglichkeit einen Großteil diesbezüglicher Arbeiten in Ihren Laboratorien durchführen zu können.

Ein Dank gilt Jonathan Ph.D. S. Duke-Cohan vom Dana-Farber Cancer Institute, Department of Medical Oncology in Boston für die Bereitstellung der Attractin-Vektoren und den zahlreichen Interaktionen und Diskussionen auf verschiedenen Veranstaltungen und dem regen Informationsaustausch per E-Mail.

Mein größter Dank gilt meiner Familie – meinen Eltern Margitta und Wolfgang Friedrich ohne die dieser Weg nicht möglich gewesen wäre, meinen Söhnen Linus und Tristan und natürlich Nadine Schreier für Ihre Geduld, Ihr Verständnis und Ihre grenzenlose Liebe. Mein Dank gebührt auch Iris und Ulrich Schreier für Ihre Unterstützung speziell in schwierigen Situationen.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat bisher weder der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch an einer anderen Universität zur Prüfung vorgelegen – ich habe mich zuvor noch nie um den Doktorgrad beworben.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

- Name: Daniel Friedrich
- Adresse: Otto-Kilian-Str. 50; 06110 Halle
- Familienstand: ledig, 2 Kinder
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Alter: 35 Jahre
- Geburtstag und –ort: 03. Juli 1973 in Dresden

Ausbildung:

- | | |
|-------------------|--|
| 09/1980 – 08/1990 | Allgemeine Polytechnische Oberschule in Dresden |
| 09/1990 – 02/1994 | Berufsausbildung zum Werkzeugmechaniker in Dresden |
| 09/1994 – 06/1995 | Fachoberschule und Erlangung der Fachhochschulreife in Dresden |
| 07/1995 – 07/1996 | Ableistung des Zivildienstes in der Medizinischen Akademie Carl-Gustav-Carus der Technischen Universität Dresden |
| 09/1996 – 08/2001 | Studium der Medizintechnik im Studiengang Biotechnologie an der Fachhochschule Jena

Diplomarbeit zum Thema: „Reinigung und Charakterisierung von Attractin aus humanem Blutplasma“ unter Anleitung von Prof. Dr. Hans-Dieter Pohl und PD Dr. H.-U. Demuth in der Firma <i>probiodrug AG</i> |
| 07/2001 – 06/2004 | Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei der BioService Halle GmbH |
| Seit 04/2004 | Promotionsstudent an der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg; Betreuung durch Prof. Dr. M. T. Stubbs von der Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften), Institut für Biochemie und Biotechnologie |
| 07/2004 – 12/2006 | Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei der <i>probiodrug AG</i> ; Fortsetzung der experimentellen Arbeiten zur Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung der Funktion von Attractin als Protease sowie Rezeptor / Corezeptor“, unter Leitung von PD Dr. H.-U. Demuth |
| Seit 01/2007 | Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei der <i>probiodrug AG</i> in der Abteilung Präklinische Pharmakologie; Tierexperimentelle Arbeiten |