

Funktionelle Charakterisierung von humanen Methioninsulfoxidreduktasen vom Typ B

Dissertation

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

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Stephan Jung

geboren am 02.11.1973 in Wanne-Eickel, jetzt Herne

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

Jena, am 10.10.2004

Stephan Jung

Dissertation eingereicht am 14.10.2004

1. Gutachter: Prof. Dr. S.H.Heinemann
2. Gutachter: Prof. Dr. C. Liebmann
3. Gutachter: Prof. Dr. D. Barthels

Tag der mündlichen Prüfung: 06.01.2005

Tag der Verteidigung: 14.03.2005

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	8
1.1	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	8
1.1.1	Endogene Quellen und exogene Einflüsse von Reaktiven Sauerstoffspezies	10
1.1.1.1	Endogene ROS-Quellen	10
1.1.1.2	Exogene ROS Einflüsse	11
1.2	Antioxidanzien	12
1.2.1	Antioxidative Enzyme	12
1.2.2	Niedermolekulare Antioxidationsmittel	14
1.3	Oxidativer Stress	14
1.3.1	ROS induzierte DNA-Schäden	14
1.3.2	ROS induzierte Lipidschäden	15
1.3.3	ROS induzierte Proteinschäden	15
1.3.3.1	Oxidation von Methionin	16
1.4	Methioninsulfoxidreduktasen vom Typ A	18
1.4.1	Reaktionsmechanismus von MSRA Enzymen	18
1.4.2	Biologische Bedeutung der Methioninsulfoxidreduktasen	20
1.4.2.1	Reparatur von oxidativen Schäden	20
1.4.2.2	Radikalfänger	21
1.4.2.3	Regulation der Lebensspanne	21
1.4.3	Gewebsverteilung und intrazelluläre Lokalisation von Methioninsulfoxidreduktasen	21
2	<i>Problemstellung</i>	23
3	<i>Material und Methoden</i>	24
3.1	Geräte und Software	24
3.2	Molekularbiologische Methoden	24
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
3.2.1.1	Herstellung von DNA Primern für PCR	24
3.2.1.2	Amplifizierung von MSR „open-reading frames“	26
3.2.1.3	Mutagenese PCR	27
3.2.2	Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion von DNA-Fragmenten	27
3.2.3	DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen	27
3.2.4	Dephosphorylierung von DNA	27
3.2.5	Ligationen	28
3.2.5.1	Ligation mit dem pGEM [®] -T Vektor System	28
3.2.5.2	Ligationen in Expressionsvektoren	28
3.2.6	Sequenzierung von DNA	28
3.2.7	RNA-Synthese	28

3.2.7.1	Linearisierung des pGEM-HE-Plasmides für die RNA-Synthese	28
3.2.7.2	Herstellung von RNA für Expression in Oocyten	29
3.2.8	Bakterienkultivierung	29
3.2.8.1	Herstellung von TY-Agarplatten	29
3.2.8.2	Vorkulturen	30
3.2.8.3	Herstellung kompetenter Zellen von <i>E. coli</i>	30
3.2.8.4	Transformation von XL1-Z kompetenten Zellen	30
3.2.8.5	Transformation von M15-Zellen	31
3.2.9	Plasmidisolierung	31
3.2.9.1	Isolierung von Plasmid-DNA („Mini-Prep“)	31
3.2.9.2	Isolierung von Plasmid-DNA („Midi-Prep“)	31
3.2.9.3	Bestimmung der DNA-Konzentration	32
3.2.10	Rekombinante Proteine	32
3.2.10.1	Expression und Reinigung von rekombinanten Proteinen	32
3.2.10.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mit Coomassie	33
3.2.10.3	Bestimmung der Proteinkonzentration mit BCA	33
3.2.11	SDS-Polyacrylamid Elektrophorese	33
3.2.11.1	Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie R-250	34
3.3	Biochemische Methoden	34
3.3.1	Aktivitätsassays	34
3.3.1.1	Aktivitätsbestimmung von MSR-Enzymen mit DTT	34
3.3.1.2	Aktivitätsbestimmung von MSR-Enzymen mit Thioredoxin	34
3.3.1.3	Aktivitätsbestimmung von MSR-Enzymen mit freiem Methionin	35
3.3.2	Oxidation und Reduktion von Calmodulin	35
3.3.2.1	Oxidation von Calmodulin	35
3.3.2.2	Reduktion von Calmodulin	36
3.3.2.3	Bindungsmessung von hEAG-C und Calmodulin	36
3.4	Massenspektrometrische Methoden	36
3.4.1	MALDI-TOF-MS-Analyse der MSR-Proben	36
3.4.2	MALDI-TOF-MS-Analyse von Calmodulin	37
3.5	Elektrophysiologische Methoden	37
3.5.1	MSR Aktivitätsbestimmung in <i>Xenopus laevis</i> Froschoozyten (<i>in vivo</i>) mit ShakerC/B	37
3.5.2	Calmodulinbindung an hEAG Kanälen im Inside-out Patch von <i>Xenopus laevis</i> Froschoozyten	38
4	Ergebnisse	39
4.1	Identifikation von MSR-Varianten	39
4.2	Klonierung von MSR-Varianten	39
4.2.1	Klonierung von humanen MSRB-Genen	39
4.2.2	Erzeugung von MSRA/MSRB-Hybridproteinen	40

4.3	Expression von MSR-Proteinen	41
4.3.1	Expression der MSRA/MSRB-Hybridproteine	42
4.4	Aktivitätsmessung der MSR-Varianten	42
4.4.1	Aktivitätsmessung der MSR-Varianten mit MetO-haltigen Peptiden und DTT	42
4.4.2	Aktivitätsmessung der MSR-Varianten mit MetO-haltigen Peptiden und dem Thioredoxin-System	44
4.4.3	Aktivitätsmessung der MSR-Varianten mit freiem MetO und DTT	46
4.4.4	Nachweis der MSRB-Aktivität der identifizierten MSR-Varianten	46
4.4.5	Einfluss von Zink auf die MSR-Aktivität	47
4.4.6	Aktivitätsmessung der MSR-Fusionsproteine	48
4.5	Charakterisierung des Reaktionsmechanismus humaner MSRB-Enzyme	50
4.5.1	Identifizierung von essentiellen Stellen in humanen MSRB-Enzymen	50
4.6	Physiologische Funktion von MSR-Enzymen	53
4.6.1	Einfluss von MSR-Enzymen auf die Inaktivierungsrate des Shaker C/B-Kanals	53
4.6.2	Einfluss von Oxidation und MSR-Enzymen auf die Calmodulin-abhängige Inhibierung des hEAG-Kanal	54
4.6.2.1	Erzeugung von rekombinantem Calmodulin und Calmodulin-Mutanten	54
4.6.3	Oxidation von rekombinantem Calmodulin	54
4.6.4	Interaktion zwischen hEAG C-Terminus und Calmodulin (<i>in vitro</i>)	56
4.6.5	Inhibierung des hEAG-Kanals mit Calmodulin und Calmodulin-Mutanten (<i>in vivo</i>)	57
5	Diskussion	60
5.1	Expression humaner MSRBs	60
5.2	Aktivität humaner Methioninsulfoxidreduktasen	60
5.2.1	Aktivität humaner Methioninsulfoxidreduktasen mit DTT	60
5.2.2	Aktivität humaner Methioninsulfoxidreduktasen mit dem TRX-System	61
5.2.3	Aktivität humaner Methioninsulfoxidreduktasen mit freiem Methionin	61
5.2.4	Nachweis der MSRB-Aktivität der identifizierten Methioninsulfoxidreduktasen	62
5.2.5	Einfluss von Zink auf die MSRB-Aktivität	63
5.3	humane MSR-Fusionsproteine	64
5.3.1	Expression humaner MSR-Fusionsproteine	64
5.3.2	Aktivität der humanen MSR-Fusionsproteine	65
5.4	Reaktionsmechanismus humaner MSRBs	66
5.4.1	Katalytisch aktives Zentrum	67
5.4.2	CxxC als Zink-bindendes Motiv	68
5.4.3	Substratbindemotiv	69
5.4.4	Möglicher Reaktionsmechanismus für humane MSRB-Enzyme	70
5.5	Physiologische Funktion von MSR-Enzymen	72

5.5.1	Einfluss von MSR-Enzymen auf die Inaktivierungsrate des Shaker C/B-Kanals	72
5.5.2	Regulation des humanen EAG-Kanals durch Calmodulin und Methioninoxidation	73
5.5.2.1	Erzeugung von Calmodulin-Mutanten	73
5.5.2.2	Oxidation und Reduktion von rekombinantem Calmodulin	74
5.5.2.3	Interaktion zwischen hEAG C-Terminus und Calmodulin-Mutanten	75
5.5.3	Regulation des hEAG-Kanals mit Calmodulin und Calmodulin-Mutanten	76
6	<i>Zusammenfassung</i>	78
7	<i>Literatur</i>	80
8	<i>Anhang</i>	87

Abkürzungen

AOE	antioxidative Enzyme (“antioxidant enzyme“)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
CaM	Calmodulin
CAT	Katalase
DNFB	1-Fluoro 2, 4-dinitrobenzen („Sanger Reagenz“)
DTT	Dithiothreitol („Cleland´s Reagenz“)
g	Gravitationskonstante
h	Stunden
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
LMWA	niedermolekulare Antioxidationsmittel („low-molecular-weight antioxidants“)
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie („Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry“)
MetO	Methioninsulfoxid (oxidiertes Methionin)
Met-R-O	Methioninsulfoxid in R-Orientierung
Met-S-O	Methioninsulfoxid in S-Orientierung
min	Minute
MSRA	Methioninsulfoxidreduktase Typ A
MSRB	Methioninsulfoxidreduktase Typ B
MSRs	Methioninsulfoxidreduktasen
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
RE	Restriktionsenzym
RNS	reaktive Stickstoffspezies („reactive nitrogen species“)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“)
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (“Reversed-phase high performance/pressure liquid chromatography“)
rpm	Umdrehung pro Minute (“rounds per minute“)
RT	Raumtemperatur
SOD	Superoxid Dismutase
SPR	Oberflächen Plasmonen Resonanz („surface plasmon resonance“)

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TR	Thioredoxin Reduktase
TRX	Thioredoxin
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid

1 EINLEITUNG

Sauerstoff ist essentiell für aerob lebende Organismen, da er für viele Reaktionen wie z. B. Zitronensäurezyklus oder oxidativen Phosphorylierung benötigt wird. Jedoch können auch während der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien aus Sauerstoff extrem reaktive Sauerstoffradikale entstehen, welche durch Kettenreaktionen zu Schäden im Organismus führen. Aerobe Organismen mussten somit im Laufe der Evolution Mechanismen entwickeln, die es ihnen ermöglichen, sich gegenüber der unspezifischen Oxidation durch Sauerstoff zu schützen.

1.1 REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES (ROS)

Chemisch betrachtet ist jede Substanz, welche Elektronen aufnehmen kann - somit auch molekularer Sauerstoff (O_2) - ein Oxidationsmittel (Elektronenakzeptor). Im Gegensatz dazu werden Substanzen, die Elektronen abgeben, als Reduktionsmittel (Elektronendonator) bezeichnet. Im biologischen System agiert ein Reduktionsmittel über Elektronendonation, was im Allgemeinen durch Abgabe von Protonen oder durch Abtrennen von Sauerstoff geschieht (zur Übersicht s. Kohen und Nyska, 2002). Die zwei ungepaarten Elektronen des Sauerstoffs in den unterschiedlichen p-Orbitalen können leicht weitere Elektronen aufnehmen, wobei Sauerstoff reduziert wird (zur Übersicht s. Thannickal und Fanburg, 2000; Kohen und Nyska, 2002). Vom Sauerstoff abstammende reduzierte Substanzen werden als reaktive Sauerstoffspezies (ROS = „reactive oxygen species“) bezeichnet.

ROS werden in 2 Gruppen unterteilt. Eine Gruppe enthält Sauerstoffradikale, während die andere Gruppe die nicht-radikalischen ROS umfasst. Der Gruppe der Sauerstoffradikale werden Atome oder Moleküle zugeordnet, die unabhängig von anderen Stoffen existieren und ein oder mehrere ungepaarte Elektronen enthalten (Halliwell und Gutteridge, 1989). Die zweite Gruppe enthält eine Vielzahl von Substanzen, unter denen einige trotz ihrer nicht-radikalischen Natur sehr reaktiv sein können. Zu den physiologisch bedeutsamen Sauerstoffradikalen im Organismus zählen Superoxidanionen, Hydroxylradikale und Nitritoxide; zu den nicht-radikalischen ROS-Metaboliten zählen Wasserstoffperoxid und Peroxynitrit (siehe Tab.1.1). Sauerstoffradikale können mit Nichtradikalen reagieren und dabei ein so genanntes Sekundärradikal („secondary free radical“) erzeugen (Halliwell und Gutteridge, 1984; Moskovitz *et al.*, 2002).

ROS sind essenziell für die Existenz und Entwicklung von Zellen (Droge, 2002). So spielen ROS eine wichtige Rolle in der Aktivierung von Genen (Engelhardt, 1999; Kaltschmidt *et al.*, 1999), zellulärem Wachstum (Shackelford *et al.*, 2000) und der

Modulation von chemischen Reaktionen innerhalb der Zelle (Sen, 1998, 2000). Zudem sind ROS Hauptbestandteile bei der Abwehr von Bakterien und Viren (Gutteridge *et al.*, 1998) und agieren als Signalmoleküle innerhalb der einzelnen Zellen (Finkel, 2000; Thannickal und Fanburg, 2000; Forman und Torres, 2002; Benhar *et al.*, 2002). Im nachfolgenden Abschnitt werden die wichtigsten physiologischen ROS und ihre Entstehung beschrieben.

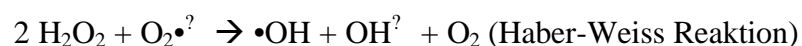
Tab 1.1: Radikalische und nicht-radikalische Metaboliten des Sauerstoffs (nach Kohen und Nyska, 2002)

radikalische ROS		nicht-radikalische ROS	
Sauerstoff (bit-radikal)	$O_2^{\cdot-}$	Wasserstoffperoxid	H_2O_2
Superoxidanion	$O_2^{\cdot-}$	Peroxyinitrit	$ONOO^-$
Hydroxylradikal	$\cdot OH$	singulärer Sauerstoff	1O_2
Hydroperoxylradikal	$HO_2\cdot$	Ozon	O_3
Nitritoxid	$NO\cdot$	Aldehyd	HCOR
Alkoxyradikal	$RO\cdot$	Hypochlorid	HOCl

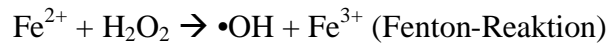
- **Superoxidanionen:** Die Reaktivität von Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) ist stark von dem umgebenden Milieu und dem pH-Wert abhängig. In einer hydrophilen Umgebung können sowohl $O_2^{\cdot-}$ als auch, bei geringem pH-Wert, Hydroperoxylradikale ($HO_2\cdot$) als reduzierende Substanzen agieren (Halliwell und Gutteridge, 1984; Bielske und Cabelli, 1995). Während der spontanen Dismutation von Superoxidanionen, in der 2 Superoxidanionen miteinander reagieren, wird Wasserstoffperoxid und Sauerstoff erzeugt (Halliwell und Gutteridge, 1984; 1989):



Zusätzlich entstehen in der Haber-Weiss-Reaktion durch Interaktion mit Wasserstoffperoxid reaktive Hydroxylradikale (Mello-Filho und Meneghini, 1984):

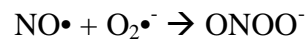


- **Wasserstoffperoxid:** Das Resultat der Dismutation von Superoxidanionen ist Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das für sich selbst betrachtet relativ unreaktiv ist. Jedoch diffundiert Wasserstoffperoxid in wässriger Lösung relativ schnell durch Membranen, was zu seiner Verbreitung innerhalb des Organismus führt. Wasserstoffperoxid und Eisen (Fe^{2+}) erzeugen in der Fenton-Reaktion Hydroxylradikale ($\cdot OH$) (Imley *et al.*, 1988; Dizdaroglu *et al.*, 1991; zur Übersicht Moskovitz *et al.*, 2002):



An Stelle des Fe^{2+} kann auch Kupfer (Cu^+) in der Fenton-Reaktion mit Wasserstoffperoxid reagieren (Halliwell und Gutteridge, 1986).

- Hydroxylradikale: Die in der Fenton- und Haber-Weiss-Reaktion entstehenden Hydroxylradikale ($\bullet\text{OH}$) sind aggressive reaktive Oxidantien (Halliwell und Gutteridge, 1989; Bielski und Cabelli, 1995; Skulachev, 1997). Hydroxylradikale gelten als die reaktivsten Radikale in biologischen Systemen und reagieren sofort mit Molekülen in ihrer unmittelbaren Umgebung.
- Nitritoxide / Peroxinitrite: Während der katalytischen Oxidation von Arginin durch die Nitritoxidsynthase entstehen das sehr reaktive Nitritoxid ($\text{NO}\bullet$) und Citrullin. Die erzeugten Nitritoxide reagieren dann mit Superoxidanionen, wobei Peroxynitrite (ONOO^-) entstehen, die ähnlich reaktiv wie Hydroxylradikale sind (Beckmann et al., 1990; Stadtman und Berlett, 1998):



1.1.1 Endogene Quellen und exogene Einflüsse von Reaktiven Sauerstoffspezies

Die verschiedenen ROS können entweder endogen (im Körper) oder exogen (außerhalb des Körpers) produziert werden (siehe Abb. 1.1). Zu den endogenen Quellen zählen z. B. die Mitochondrien, die Peroxisomen, das endoplasmatische Retikulum, sowie Wachstumsfaktoren und Cytokine. Als exogene Einflüsse werden z. B. Umweltgifte, ionisierende Strahlung/ UV-Strahlung und Entzündungen betrachtet.

1.1.1.1 Endogene ROS-Quellen

- Mitochondrien: Als wahrscheinlich wichtigste endogene Quelle für reaktive Sauerstoffspezies gelten bei den aeroben Eukaryoten die Mitochondrien. Die Produktion von ROS findet hauptsächlich während des Elektronentransfers im Komplex III (Ubichinon-Cytochrom C Reduktase) statt. Dabei wird ca. 1-4 % des Sauerstoffs in Superoxidanionen umgewandelt (Freeman und Crapo, 1982; Halliwell und Gutteridge, 1989; Papa *et al.*, 1997; Turrens, 1997; Finkel und Holbrook, 2000).
- Peroxisomen: Die Peroxisomen enthalten eine Vielzahl von Wasserstoffperoxid-erzeugenden Oxidaseen wie z. B. die Glykolatoxidase, die L-a-Hydroxysäure-Oxidase und die Acyl-CoA-Oxidase (Boveris et al., 1972).

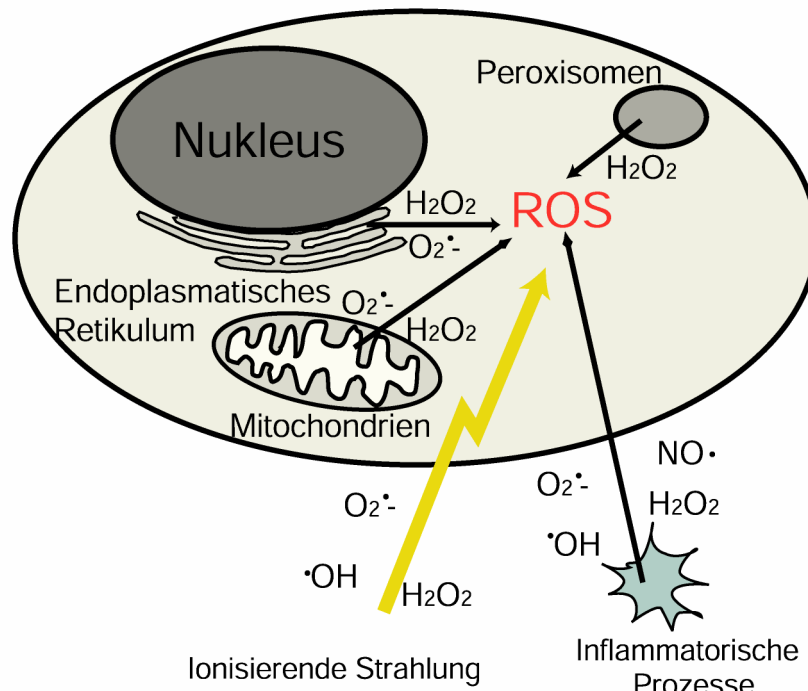


Abb. 1.1: Darstellung verschiedener endogener ROS-Quellen und exogener Einflüsse.

Endogen entstehen ROS im endoplasmatischen Retikulum, den Peroxisomen sowie den Mitochondrien. Als exogene Einflüsse werden inflammatorische Prozesse, die ionisierende Strahlung und ihre jeweiligen ROS-Produkte dargestellt.

- **Endoplasmatisches Retikulum:** Das glatte endoplasmatische Retikulum enthält Enzyme zur Katalyse und Detoxifizierung von schädlichen metabolischen Stoffen. Dazu gehören die Cytochrom P-450- und die Cytochrom b₅-Enzymfamilien. Diese Enzyme oxidieren ungesättigte Fettsäuren, wobei Sauerstoff reduziert wird und Wasserstoffperoxid und/oder Superoxidanionen erzeugt werden (Aust *et al.*, 1972; Capdevila *et al.*, 1981; Freeman und Crapo, 1982; Halliwell und Cross, 1994).
- **Wachstumsfaktoren und Cytokine:** Eine Vielzahl von Cytokinen und Wachstumsfaktoren erzeugen ROS in nicht-phagozytischen Zellen. So lösen Tumornekrosefaktor a (TNF-a), Interleukin 1 (IL-1), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) und Angiotensin II die Bildung von ROS wie Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid aus (zur Übersicht s. Thannickal und Fanburg, 2000; Finkel, 2000).

1.1.1.2 Exogene ROS Einflüsse

Neben den zahlreichen endogenen Quellen ist auch eine Vielzahl exogener Einflüsse für die Generierung von ROS verantwortlich. Nachfolgend sollen die wichtigsten Einflussmöglichkeiten und die daraus entstehenden ROS aufgezählt werden.

- Entzündungen: Das Immunsystem des Organismus setzt ROS zu Verteidigungszwecken gegenüber bakteriellen Angriffen ein. Bei diesen inflammatorischen Prozessen, vor allem chronische Entzündungen, können eine Vielzahl von ROS generiert werden. Phagozytierende Zellen wie z. B. aktivierte Makrophagen oder Neutrophile erzeugen bei diesem so genannten „respiratory burst“ Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen. Des Weiteren werden Nitritoxide, Hydroxylradikale und Hypochloride (HOCl) von Phagozyten gebildet (zur Übersicht s. Shackelford *et al.*, 2000).
- Umweltgifte: Eine Vielzahl von Umweltgiften kann zur ROS-Produktion in Organismen führen. Zu diesen Umweltgiften gehören z. B. Auto- und Industrieabgase, Zigarettenrauch, Ozon und Schwermetalle wie Kadmium, Blei, Quecksilber oder Arsen. Der Organismus nimmt diese Substanzen durch kontaminierte Luft, Wasser oder Nahrung auf (zur Übersicht s. Kohen und Nyska, 2002).
- ionisierende Strahlung / UV-Strahlung: Wasser ist Hauptbestandteil der Zellen. Durch ionisierende Strahlung bzw. UV-Strahlung werden Elektronen aus dem Wasser entzogen, wodurch Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale, singulärer Sauerstoff und Superoxidanionen entstehen (zur Übersicht Shackelford *et al.*, 2000).

1.2 ANTIOXIDANZIEN

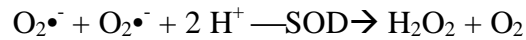
Der kontinuierliche Kontakt mit den verschiedenen ROS führte in den Zellen sowie im gesamten Organismus dazu, Verteidigungsmechanismen zum Schutz gegen die reaktiven Metaboliten zu entwickeln. Ein effizientes Verteidigungssystem des Körpers stellen antioxidative Enzyme und niedermolekulare Antioxidationsmittel dar, die oxidative Schäden an Makromolekülen verhindern oder reparieren können. Weil ROS beständig produziert werden, müssen diese Antioxidanzen an den verschiedenen ROS-Quellen in hohen Mengen präsent sein, um ihre Schutzfunktion ausüben zu können.

1.2.1 Antioxidative Enzyme

Die antioxidativen Enzyme (AOE=“antioxidant enzyme“) setzen sich aus Proteinen zusammen, welche direkt mit den ROS interagieren. Da ROS in unterschiedlichen Zellkompartimenten erzeugt werden, existieren verschiedene Isoformen der einzelnen AOE, die sich der jeweiligen Umgebung optimal angepasst haben. Zu den wichtigsten AOE zählen die Superoxiddismutasen, die Katalase, die Peroxidasen und das Thioredoxin-System.

- Superoxiddismutase: Die Familie der Superoxiddismutasen (SOD) variiert in der Struktur der einzelnen Mitglieder und ihren Kofaktoren. Die cytoplasmatisch lokalisierte

SOD (cSOD), die mitochondriale SOD (mSOD) und die extrazellulär lokalisierte SOD (EC-SOD) katalysieren die Dismutation von Superoxidionen zu Wasserstoffperoxid (McCord, 1979; Halliwell und Gutteridge, 1989):



Der Umsatz dieser Reaktion variiert abhängig vom pH-Wert der verschiedenen SOD. So beträgt der Umsatz bei der cytoplasmatischen CuZnSOD ca. $1,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

- Katalase: Das Endprodukt der Dismutation, das schnell diffundierende Wasserstoffperoxid, wird durch die in den Peroxisomen und Glyoxisomen (in Pflanzen) lokalisierte Katalase (CAT) zu Wasser und Sauerstoff umgesetzt:



Der K_M -Wert der CAT für ihr Substrat ist sehr hoch. Daher kann das Enzym nur das in hohen Konzentrationen vorhandene Wasserstoffperoxid effektiv entfernen (Chance *et al.*, 1979).

- Das Thioredoxin-System: Thioredoxin (TRX), Thioredoxinreduktase (TR) und NADPH werden als Thioredoxin-System bezeichnet. Das Thioredoxin-System ist ubiquitär verbreitet, es kommt in Bakterien, Pflanzen, Pilzen und Tieren (einschließlich des Menschen) vor. Das Thioredoxin-System ist dafür verantwortlich, dass Cysteine in Proteinen im Zellinnern im reduzierten Zustand vorliegen. Die am häufigsten auftretenden oxidierten Cysteine, Disulfide, werden durch TRX reduziert, welches wiederum durch Elektronentransfer von NADPH über TR reduziert wird (Holmgren, 1985, 1995; Arner und Holmgren, 2000). Sowohl bei TRX als auch bei TR konnte neben der cytoplasmatischen Form eine mitochondrial lokalisierte Isoform identifiziert werden (TRX: Spyrou *et al.*, 1997; TR: Miranda-Vizuete *et al.*, 1999).

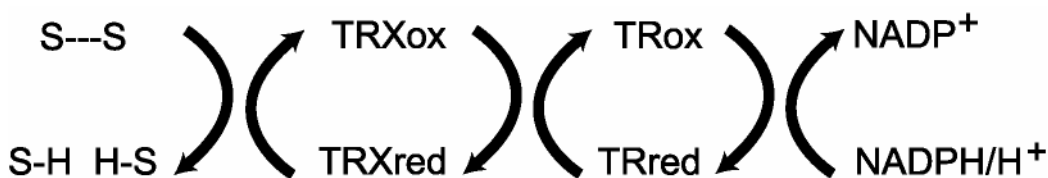


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Thioredoxin-Systems.

Disulfidbrücken (S-S) werden durch Thioredoxin (TRX) reduziert, welches dabei selber in den oxidierten Zustand übergeht. Das oxidierte Thioredoxin wird durch die Thioredoxinreduktase (TR) reduziert, welche wiederum von NADPH/H⁺ reduziert wird, das hinterher im oxidierten Zustand als NADP⁺ vorliegt.

1.2.2 Niedermolekulare Antioxidationsmittel

Die Gruppe der niedermolekularen Antioxidationsmittel („low-molecular-weight antioxidant“=LMWA) umfasst körpereigene Substanzen wie Glutathion (Halliwell und Gutteridge, 1989), Histidindi-peptide (Baldyrev, 1993), Harnsäure (Ames *et al.*, 1993) und Bilirubin (Stocker *et al.*, 1987). Viele der LMWAs werden exogen durch die Nahrung aufgenommen wie z.B. Ascorbinsäure (Vitamin C) (Halliwell und Gutteridge, 1989; Frei *et al.*, 1990) und Tocopherol (Vitamin E) (Herrera und Barbas, 2001). Diese Substanzen interagieren mit ROS und übertragen ein Elektron auf den Sauerstoffmetaboliten. Das Radikal wird dadurch unschädlich gemacht. Die LMWAs verhindern somit einen Schaden durch das Radikal an anderer Stelle. Auf Grund der ROS-Abfangfunktion der LMWAs und der daraus resultierenden Vermeidung von oxidativen Schäden, werden diese Moleküle häufig als Radikalfänger („scavenger“) bezeichnet. Die Radikalfänger haben gegenüber den Enzymen den Vorteil, dass sie wegen ihrer kleinen Größe leicht Membranen durchdringen und somit in unmittelbarer Nähe der biologischen Ziele von ROS wirken können.

1.3 OXIDATIVER STRESS

Oxidative Bedingungen sind die stimulierenden Kräfte für biochemische Prozesse und Ereignisse während der Lebensspanne von Zellen. Wenn jedoch die ROS ihren im Organismus zugeordneten Platz auf Grund einer erhöhten Produktionsrate verlassen und die Anzahl der im Organismus produzierten ROS die Menge der vorhandenen Antioxidationsmittel übersteigt, dann treten gehäuft oxidative Schäden an den zellulären Makromolekülen auf. Dieser Status wird als oxidativer Stress bezeichnet. Die von den unterschiedlichen Quellen produzierten ROS können dann mit allen Zellbestandteilen einschließlich Lipiden, DNA und Proteinen reagieren. Dieser nicht-spezifische Angriff der reaktiven Metaboliten führt zum Verlust der Zellintegrität, von Enzymfunktion sowie zu genetischer Instabilität (Hensley *et al.*, 2000; Levine und Stadtman, 2001; Stadtman und Levine, 2000).

1.3.1 ROS induzierte DNA-Schäden

Obwohl die DNA ein stabiles und gut geschütztes Molekül ist, können ROS mit der DNA reagieren und zu einer Vielzahl von Schäden führen. Interaktionen von ROS mit DNA führen zu Modifikationen von DNA-Basen, zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen, zu Verlust von einzelnen Purinen, zu Schäden an dem Desoxyribosezucker des DNA-

Rückgrats, zu DNA-Protein „Cross-linkage“ und zu Schäden am DNA-Reparatursystem. Jedoch sind nicht alle ROS reaktiv genug, um Schäden an der DNA zu erzeugen. Der größte DNA-Schaden wird durch Hydroxylradikale induziert, welche unter anderem aus H_2O_2 und $\text{O}_2^{\cdot-}$ über die Haber-Weiss-Reaktion erzeugt werden (zur Übersicht s. Kohen und Nyska, 2002).

1.3.2 ROS induzierte Lipidschäden

Zelluläre Membranen sind wegen der hohen Menge an ungesättigten Fettsäuren besonders anfällig für Oxidationen. Oxidation von Fettsäuren, auch als (Fettsäure-) Peroxidation bezeichnet, vollzieht sich in drei Schritten. Der erste Schritt beinhaltet den Angriff eines ROS-Metabolits an eine mehrfach ungesättigte Fettsäure und die Bildung eines Fettsäureradikals. Im zweiten Schritt reagiert dieses Fettsäureradikal mit Sauerstoff, wodurch ein Peroxyl (ROO^{\bullet}) gebildet wird, das im letzten Schritt den umgebenden Fettsäuren ein Wasserstoffmolekül entzieht. Auf diese Weise werden ein Hydroperoxidlipid sowie ein neues Fettsäureradikal gebildet, welches erneut Schritt 2 und 3 durchlaufen kann. Dieser Vorgang kann nach Induktion von ROS teilweise solange vollzogen werden, bis keine mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Membran vorhanden sind (Halliwell und Gutteridge, 1989; zur Übersicht s. Kohen und Nyska, 2002).

1.3.3 ROS induzierte Proteinschäden

Von den verschiedenen ROS erzeugen hauptsächlich $\bullet\text{OH}$, RO^{\bullet} und RNS-Radikale („reactive nitrogen species“) Schäden an Proteinen. H_2O_2 und $\text{O}_2^{\cdot-}$ sind unter physiologischen Bedingungen nicht in der Lage Proteine zu oxidieren, jedoch kann H_2O_2 die Schwefelgruppen in den Seitenketten von Cystein und Methionin oxidieren. Durch ROS können bestimmte Aminosäurereste modifiziert werden, wodurch sich die Tertiärstruktur verändert oder eine Degradation der betroffenen Proteine erfolgt. Aus diesen Proteinmodifikationen resultieren dann Verlust von Enzymaktivität, veränderte zelluläre Funktionen wie Energieproduktion, Störung der Bildung von Membranpotenzialen und Veränderungen in Typ und Gehalt von zellulären Proteinen. Zudem sind viele modifizierte Proteine sehr empfänglich für chemische Fragmentierung, Inaktivierung und erhöhte proteolytische Degradation (zur Übersicht s. Dean *et al.*, 1997; Stadman und Levine, 2000; Szweda *et al.*, 2002; Kohen und Nyska, 2002).

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass Krankheiten durch Proteinoxidation hervorgerufen werden können. Zu diesen Krankheiten zählen Alzheimer, Parkinson, Diabetes, rheumatoide Arthritis, Katarakt, Raucheremphysem, bronchopulmonale

Dysplasie, sowie zahlreiche weitere Krankheiten (zur Übersicht s. Dean *et al.*, 1997; Stadtman und Levine, 2000; Szweda *et al.*, 2002).

Neben diesen krankhaft bedingten Erscheinungen wurde auch eine Zunahme an oxidierten Proteinen mit fortgeschrittenem Alter nachgewiesen. Der altersbedingte Anstieg der oxidierten Proteine korreliert zum einen mit einer erhöhten ROS-Produktion im Alter. Zum anderen wird das für den Abbau der oxidierten Proteine zuständige Proteasom durch einige oxidierte Derivate in seiner Aktivität gehemmt (zur Übersicht s. Stadtman, 1992; Dean *et al.*, 1997; Szweda *et al.*, 2002; Stadtmann und Levine, 2003). Eine erhöhte Menge oxidierter Proteine wurde beispielsweise im menschlichen Gehirn, menschlichen Augenlinsen, Rattenhepatozyten und Körperproteinen von *Drosophila*-Fliegen nachgewiesen (zur Übersicht s. Stadtman und Levine, 2000; Finkel und Holbrook, 2000).

1.3.3.1 Oxidation von Methionin

Eines der häufigsten Ziele von ROS-bedingten Oxidationen in Proteinen stellen die schwefelhaltigen Seitenketten der Aminosäuren Cystein und Methionin dar. Die Schwefelatome der Seitenkette sind schwach nukleophil und daher relativ leicht zu oxidieren (Perrin und Koppenol, 2000). Während der Oxidation von Methionin entstehen zwei unterschiedliche Stereoisomere, Methionin-S-sulfoxid (Met-S-O) und Methionin-R-sulfoxid (Met-R-O) (Sharov *et al.*, 1999; Sharov und Schöneich, 2000), wobei das Schwefelatom das Chiralitätszentrum darstellt (siehe Abb. 1.3). In Gegenwart starker Oxidationsmittel kann MetO zu Methioninsulfon (MetO₂) oxidiert werden. MetO₂ scheint keine physiologische Bedeutung zu haben.

Die Oxidation von Methionin führt zu tief greifenden Veränderungen der physikalischen Eigenschaften der Seitenkette. Methioninreste sind hydrophob, jedoch im Vergleich zu anderen hydrophoben Aminosäureresten relativ flexibel (Bernstein *et al.*, 1989; Gellman, 1991). Die Seitenkette des Methioninsulfoxid wird durch das zusätzliche Sauerstoffatom steifer und polarer (Vogt, 1995).

Die Oxidation von Methioninen in Proteinen führt zu Strukturveränderungen (Hsu *et al.*, 1996; Sigalov und Stern, 1998; Gao *et al.*, 1998a), zur Verringerung oder Verlust der Enzymaktivität (Amiconi *et al.*, 1989; Hsu *et al.*, 1996; Hayes *et al.*, 1998; Davis *et al.*, 2000; Mohri *et al.*, 2002), sowie zur Degradation durch das Proteasom (zur Übersicht s. Vogt, 1995; Grune und Davies, 1997; Grune *et al.*, 1997; Ferrington *et al.*, 2001; Stadtman und Levine, 2003).

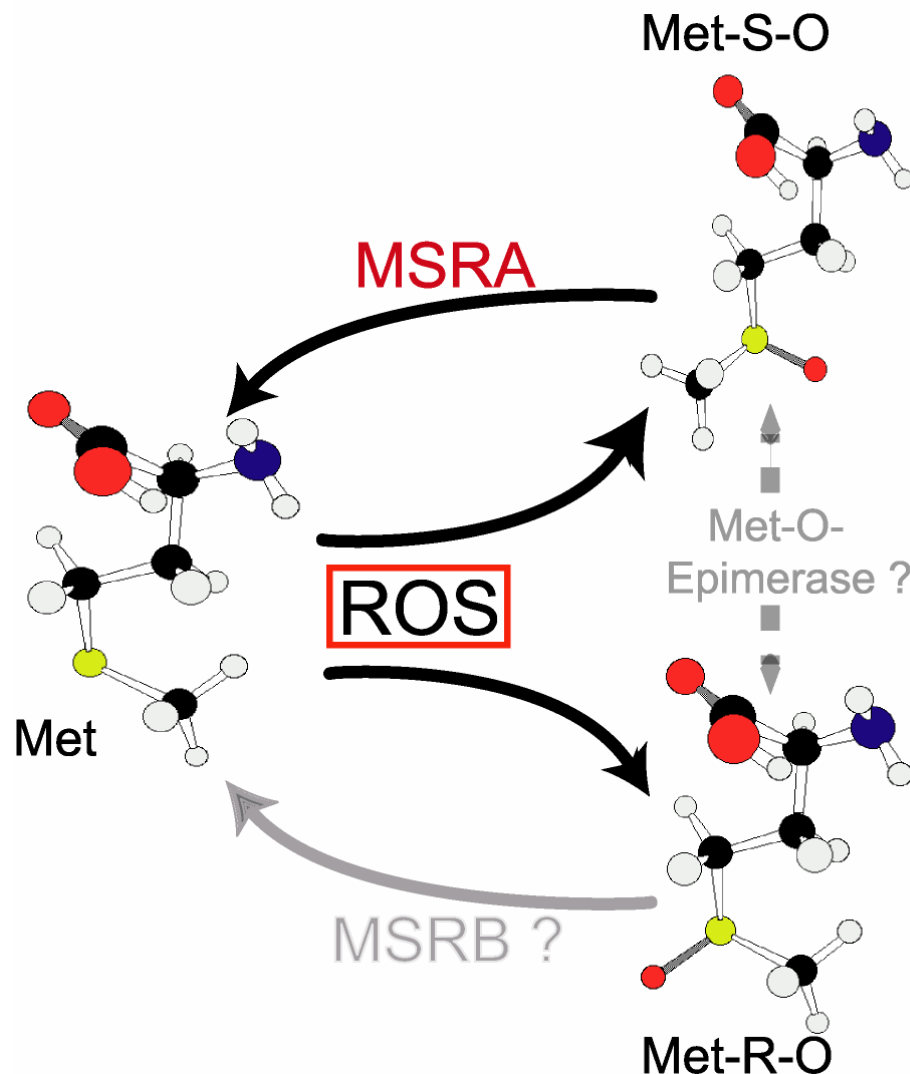


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Oxidation von Methionin und der enzymatischen Reduktion von Methioninsulfoxid.

Die Oxidation von Methionin durch ROS resultiert in der Produktion von zwei Stereoisomeren: Methionin-S-sulfoxid (Met-S-O) und Methionin-R-sulfoxid (Met-R-O). MSRA (rot) reduziert nur Met-S-O. Die Existenz einer Met-O-Epimerase oder eines MSRB-Enzyms (grau) wird vermutet, konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden. Farbkodierung der Atome: blau = Stickstoff; rot = Sauerstoff; schwarz = Kohlenstoff; grau = Wasserstoff; gelb = Schwefel.

Die Auswirkungen der Oxidation von Methionin auf die Proteinfunktion wurde ausführlich an Calmodulin (=CaM) untersucht. CaM ist für die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung und Inhibierung zahlreicher Enzyme (z.B. Nitritoxidsynthase, Adenylatzyklase, Ca^{2+} -ATPase der Plasmamembran und zyklische Nukleotidphosphodiesterase) verantwortlich. Nachdem jedes der vier so genannten „EF-Hand-Motive“ in CaM je ein Kalziumion gebunden hat, lagert sich CaM an das Zielprotein an und aktiviert/inhibiert es. Die Autoinhibition der Plasmamembran Ca^{2+} ATPase (=PMCA) wird durch Anlagerung von Calmodulin im C-terminalen Bereich revertiert, wodurch PMCA aktiviert wird. PMCA katalysiert unter ATP-Verbrauch den Transport von Ca^{2+} aus dem Cytoplasma in den extrazellulären Raum

(zur Übersicht s. Martonosi und Pikula, 2003). Die CaM-abhängige Aktivierung der PMCA wird durch die Oxidation von zwei carboxyterminalen Methioninen (M145 und M146) in Calmodulin unterbunden (Yao et al., 1996).

1.4 METHIONINSULFOXIDREDUKTASEN VOM TYP A

Von den 20 verschiedenen Aminosäuren können nur die Oxidationsprodukte der Cysteine sowie der Methionine enzymatisch reduziert werden. In den späten 70-er Jahren konnte gezeigt werden, dass MetO als Substrat für ein *E. coli* Enzym dient, welches die Reduktion von MetO zu Met katalysiert (Ejiri et al., 1979). Das zugehörige Enzym, die Methioninsulfoxidreduktase A (MSRA) wurde 2 Jahre später isoliert (Brot et al., 1981). Methioninsulfoxidreduktasen katalysieren die Reduktion von freiem und peptidgebundenem MetO unter Verwendung des Thioredoxin-Systems *in vivo* (Ejiri et al., 1980) oder DTT *in vitro* (Moskovitz et al., 1996) als Reduktionsmittel. Obwohl bei der Oxidation von Methionin zwei stereoisomere Methioninsulfoxide erzeugt werden, verwenden Methioninsulfoxidreduktasen vom Typ A (MSRA) ausschließlich Met-S-O als Substrat (Minetti et al., 1994; Sharov et al., 1999; Sharov und Schöneich, 2000) (siehe Abb. 1.3).

MSRA wurde erstmals 1992 kloniert und charakterisiert (Rahman et al., 1992). Seitdem wurde das *msrA* Gen aus mehr als 20 verschiedenen Spezies wie Bakterien, Hefen, Pflanzen, Insekten und Säugetieren kloniert (zur Übersicht s. Lowther et al., 2000a). Die Familie der MSRA-Proteine ist hoch homolog, wobei *E. coli* MSRA und Rinder MSRA zu 67 % bzw. 88 % homolog zur humanen MSRA sind (Weissbach et al., 2002).

1.4.1 Reaktionsmechanismus von MSRA Enzymen

Zahlreiche Experimente zeigten, dass bestimmte Cysteinreste in dem Enzym für die katalytische Aktivität zuständig sind. Gezielte Mutation des Cysteins in dem hochkonservierten Sequenzmotiv GCFWG führte zur Zerstörung der Aktivität in *E. coli*, Hefe und Rinder-MSRA (Lowther et al., 2000a; Moskovitz et al., 2000; Boschi-Muller et al., 2000). Auch eine Mutation von Phenylalanin oder Tryptophan im selben Motiv resultierte in einem Funktionsverlust (Moskovitz et al., 2000). Für weitere Cysteinreste, die sich im C-terminalen Bereich von *E. coli* und Rinder-MSRA befinden, konnte experimentell gezeigt werden, dass ihr Fehlen zu verminderter Aktivität mit TRX führte (Boschi-Muller et al., 2000; Lowther et al., 2000a). Dieselben Mutanten zeigten mit DTT jedoch kaum eine Beeinflussung in ihrer Aktivität. Daher wurde vermutet, dass diese Cysteine für die Regeneration des katalytisch aktiven Cysteins im GCFWG-Motiv durch

Disulfidbrückenbindungen verantwortlich sind (Lowther *et al.*, 2000a). Diese Vermutung wurden durch Kristallstrukturen von *E. coli* und Rinder-MSRA bestätigt (Tete-Favier *et al.*, 2000; Lowther *et al.*, 2000b).

Anhand dieser Erkenntnisse unterteilt man MSRA-Enzyme in drei Unterklassen: Der Prototyp für die erste Unterklasse ist das *N. meningitidis* Enzym, welches zwei essentielle Cysteine an den Positionen 206 und 348 enthält. Die zweite Unterklasse wird durch *E. coli* und Rinder-MSRA repräsentiert, die jeweils drei essentielle Cysteine enthalten (*E. coli*: C51, C198, C206; Rind: C72, C218, C227). Nur die Disulfidbrücke zwischen den beiden C-terminalen Cysteinen kann durch TRX reduziert werden. *Bacillus subtilis* MSRA prägt mit seinen zwei eng nebeneinander liegenden Cysteinen an Position 51 und 54 die dritte Unterklasse.

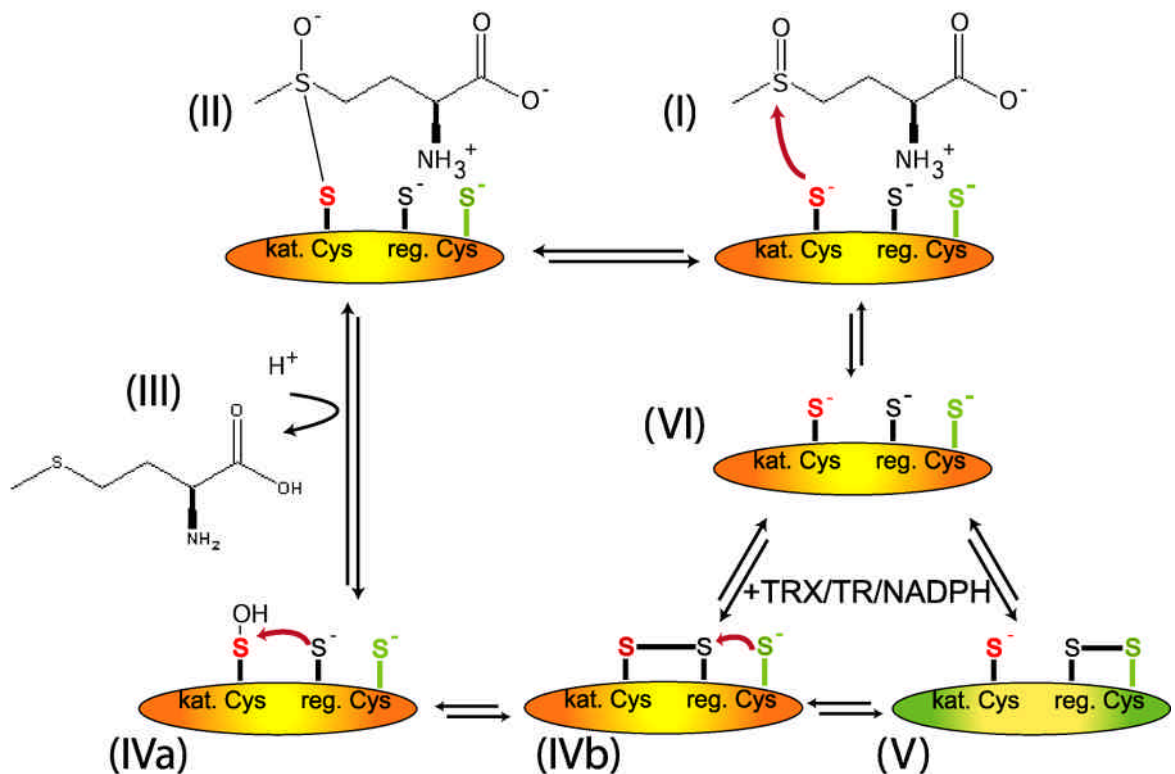


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Reaktionsmechanismen der MSRA-Enzyme.

Die Reaktionsmechanismen der bekannten MSRA-Enzyme sind gezeigt, wobei Unterschiede der einzelnen Unterklassen durch verschiedene Farbkodierungen hervorgehoben sind. Für alle Unterklassen ist das katalytisch aktive Cystein rot markiert; die regenerierenden Cysteine sind schwarz markiert. Im Fall der MSRA der Unterklasse II ist das für die Regeneration notwendige zusätzliche Cystein grün markiert.

Aus den oben geschilderten Erkenntnissen wird der in Abb. 1.4 schematisch dargestellte Reaktionsmechanismus für die verschiedenen MSR-Enzyme prognostiziert.

Zuerst erfolgt ein nukleophiler Angriff des katalytisch aktiven Cysteins an MetO (I), wobei ein MSR-MetO-Intermediat entsteht (II). Der Zerfall des instabilen Zwischenprodukts wird

durch die Aufnahme eines Protons eingeleitet, wodurch ein Sulfensäurederivat entsteht. Dies führt zur Freisetzung des reduzierten Methionins (III). Anschließend wird bei den MSRA-Enzymen der Unterklasse I und III eine Disulfidbrücke ausgebildet (IV), wohingegen MSRA der Unterklasse II eine Serie von Thiol-Disulfidaustauschen über die weiteren Cysteine durchlaufen (V). Bei diesen Thiol-Disulfidaustauschen wird das katalytische Cystein in den reduzierten Zustand versetzt. Die Regeneration der Cysteine in den vollständig reduzierten Zustand wird zum Abschluss des Reaktionsmechanismus durch Reduktion der Disulfidbrücke mit TRX oder DTT erreicht (VI).

Es konnte gezeigt werden, dass der Geschwindigkeitslimitierende Schritt in dem Reaktionsmechanismus von *Neisseria meningitidis* MSRA die Reduktion der Disulfidbrücke mit TRX darstellt (Antoine *et al.*, 2003).

1.4.2 Biologische Bedeutung der Methioninsulfoxidreduktasen

Die genaue Bedeutung von Methioninsulfoxidreduktasen für Organismen ist bis auf die offensichtliche Funktion als Reparaturenzym von oxidierten Proteinen noch nicht bekannt. Im folgenden Abschnitt sollen unterschiedliche Hypothesen zur möglichen Funktionen der MSR-Enzyme erläutert werden.

1.4.2.1 Reparatur von oxidativen Schäden

MSR-Enzyme schützen Zellen vor oxidativen Schäden (zur Übersicht s. Stadtman *et al.*, 2003). So sind MSRA-Knockout-Mutanten von *E. coli*, Hefen und kultivierten Säuger-Zelllinien anfälliger gegen oxidativen Stress und sterben eher als die Wildtyp-Organismen (Moskovitz *et al.* 1995; 1997; St. John *et al.*, 2001). Dahingegen ermöglichte eine Überexpression von MSRA in Hefen und *Drosophila* einen erhöhten Schutz gegen oxidativen Stress (Moskovitz *et al.*, 1997; Ruan *et al.*, 2003).

Ein weiterer Schutz der MSR-Enzyme vor oxidativen Schäden beruht auf ihrer Reparaturfähigkeit. Die Entstehung von Methioninsulfoxiden in Proteinen führt im Allgemeinen zur Degradation durch das Proteasom (zur Übersicht s. Stadtman, 1992; Stadtman und Levine, 2003) wie z. B. für das Calmodulin nachgewiesen (Ferrington *et al.*, 2001). Werden die Methioninsulfoxide in den Proteinen jedoch durch MSR reduziert, wird ein Abbau verhindert. Die Reparaturfähigkeit der MSR verzögert die Degradation der Proteine somit unter normalen physiologischen Bedingungen und bei oxidativem Stress.

1.4.2.2 Radikalfänger

Als weitere hypothetische Funktion der MSR-Enzyme wird der Schutz der Zellproteine vor oxidativen Schäden betrachtet (Levine *et al.*, 2000). Methioninreste in Proteinen werden durch ROS oxidiert, und aus den reaktiven Radikalen entstehen nicht-reaktive Substanzen. Die Methioninsulfoxide werden von den MSR-Enzymen reduziert; es entsteht ein Kreislauf aus von ROS generierten Methioninsulfoxiden und von MSRs reduzierte Methionine. Ein gut untersuchtes Beispiel für Methionine als Radikalfänger stellt die Glutamin-Synthetase dar. Glutamin-Synthetase enthält 16 Methionine, von denen 8 in *in vitro* Experimenten oxidiert wurden, ohne die Enzymaktivität zu beeinflussen (Levine *et al.*, 1999, 2000). Die oxidierbaren Methionine sind oberflächen-exponiert, wohingegen die nicht-oxidierbaren Methionine im Proteininneren verborgen sind. Des Weiteren sind die oxidationsempfindlichen Methionine in solch einer Weise um das katalytische Zentrum angeordnet, dass sie das katalytische Zentrum regelrecht vor Oxidation schützen.

1.4.2.3 Regulation der Lebensspanne

Eine weitere hypothetische Rolle der MSR-Enzyme stellt die Regulation der Lebensspanne dar (zur Übersicht s. Stadtman *et al.*, 2003). Bei alternden Ratten (Petropoulos *et al.*, 2001) und seneszenten humanen Fibroblasten (Picot *et al.*, 2004) wurde eine Verringerung der Expression und Aktivität von MSRA beobachtet. In Mäusen und Hefe wiesen MSRA-Knockout-Mutanten eine verkürzte Lebensspanne auf (Moskovitz *et al.*, 2001; Koc *et al.*, 2004). Die Lebensspanne konnte durch MSRA Expression in Hefe um ca. 25 % (Koc *et al.*, 2004) und in neuronalen Geweben von *Drosophila* Fruchtfliegen um ca. 70 % erhöht werden (Ruan *et al.*, 2002). Da mit zunehmendem Alter die Anzahl der durch ROS hervorgerufenen oxidativen Modifikationen in den Organismen ansteigt (zur Übersicht s. Stadtman und Berlett, 1998; Levine und Stadtman, 2001; Hensley und Floyd, 2002), könnte ein konstantes Expressionsniveau der MSR-Enzyme zur Verringerung des im Alter erhöhten Niveaus an oxidierten Proteinen führen und somit die Lebensspanne verlängern.

1.4.3 Gewebsverteilung und intrazelluläre Lokalisation von Methioninsulfoxidreduktasen

Wie schon bei den antioxidativen Enzymen CAT oder SOD, so sind auch MSRA-Enzyme, je nach Bedarf an ihren Reduktasefähigkeiten, in mehreren zellulären Kompartimenten vorzufinden. Kürzlich wurde gezeigt, dass Säuger-MSRA über eine aminoterminal mitochondriale Signalsequenz verfügen, welche das Enzym gezielt in die Mitochondrien – Ort der höchsten internen ROS-Produktion – transportiert (Hansel *et al.*, 2002). Neben

dieser mitochondrialen MSRA existiert noch eine weitere humane Isoform im Cytosol (Hansel *et al.*, eingereichtes Manuskript). Auch bei Ratten konnte sowohl eine mitochondriale als auch eine cytosolische Isoform der MSRA nachgewiesen werden (Vougier *et al.*, 2003).

Die menschlichen MSRA-Enzyme sind in allen bisher erforschten Geweben nachgewiesen worden; sie sind am stärksten in der Niere und Leber, dem Herzen, sowie dem Gehirn (Cerebellum und Hippocampus) exprimiert (Kuschel *et al.*, 1999).

2 PROBLEMSTELLUNG

Da MSRAs von den zwei erzeugten Stereoisomeren aus der Methioninoxidation nur die Met-S-O Form reduzieren können, was somit zu einer Akkumulation von Met-R-O Stereoisomeren im Organismus führt, wurde vermutet, dass mindestens ein weiteres Enzym an der Reduktion von Methioninsulfoxiden beteiligt sein muss. Hinweise auf dieses Enzym wurden durch MSRA-Knockout-Mutanten verschiedener Organismen erbracht (Moskovitz *et al.*, 2000), die trotz fehlenden MSRA-Enzyms auf Methioninsulfoxid-haltigem Medium wuchsen. Daraus entwickelte sich die Hypothese, dass weiteres MSR-Enzym existieren muss, das als MSRB-Enzym spezifisch die Met-R-O Form reduziert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, dieses beteiligte Enzym im Menschen zu identifizieren und zu klären, ob es sich dabei um ein MSRB-Enzym handelt. Dazu sollte das Enzym kloniert werden und nach erfolgter Expression dessen Aktivität sowie eventuell notwendige Kofaktoren bestimmt werden und mit der bereits identifizierten humanen MSRA verglichen werden. Neben der Aktivität sollte ferner der Reaktionsmechanismus des Enzyms charakterisiert werden. Zusätzlich sollte die Funktion und Rolle des identifizierten Proteins im physiologischen Kontext mit der des MSRA-Enzyms verglichen werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

Die beschriebenen Versuche wurden in einem molekularbiologischem Labor der Sicherheitsstufe S1 mit der dafür üblichen Ausstattung durchgeführt. Alle entsprechend zur Grundausstattung gehörenden Chemikalien und Geräte sind nicht einzeln aufgeführt. Die Gebrauchskemikalien wurden jeweils in den höchsten Reinheitsgraden erworben und die Lösungen mit deionisiertem Wasser (Millipore) angesetzt. Bei Verwendung spezieller Materialien und Chemikalien wird gesondert auf den Hersteller bzw. die Bezugsquelle hingewiesen.

3.1 GERÄTE UND SOFTWARE

Folgende Geräte wurden von den angegebenen Bezugsquellen bezogen:

Tecan Deutschland GmbH (Crailsheim, Deutschland): Sunrise Plattenlesephotometer

Pharmacia (Freiburg, Deutschland): Ultrospec III Photometer

LI-COR Inc. (Lincoln, NE, USA): LI-COR 4000

Perkin-Elmer (Weiterstadt, Deutschland): Voyager RP-DE™ MALDI-TOF

Folgende Software wurde von den angegebenen Bezugsquellen bezogen:

Accelrys GmbH (Unterhaching-München; Deutschland): MacVector™6.5

Tecan Deutschland GmbH (Crailsheim, Deutschland): Magellan 3.11

Wave Metrics Inc. (Lake Oswego, OR, USA): IgorPro 3.16

LI-COR Inc. (Lincoln, NE, USA): BaseImage™ 4.0

Applied Biosystems (Foster City, CA, USA): Voyager™ 5; DataExplorer™ 4.0

HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH (Lambrecht/Pfalz, Deutschland): PatchMaster

3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.2.1.1 Herstellung von DNA Primern für PCR

Die Oligonukleotide für PCR Produkte wurden mit MacVektor™6.5 ermittelt und bei JenaBioscience (Jena, Deutschland) nach den Angaben bestellt. Bei Auswahl der Primer wurde darauf geachtet, dass die Oligonukleotide eine Mindestlänge von 20 Basen hatten, die „Annealing“-Temperatur nicht unter 55 °C lag und der G-C Gehalt zwischen 40 - 60 % betrug.

Tab. 3.1: Tabellarische Auflistung der verwendeten Primer, der Annealing-Temperatur, die Verwendung des jeweiligen Primers und die eingebaute Schnittstelle.

Nr.	Sequenz	Restriktions- stelle	Verwendung	“Annealing”- Temperatur
798	agcgggtaccatggcgcg gctcctctggttgc	KpnI	vorderer Primer für CBS1 mit Oligo 799	55 °C
799	gtaagcttcagtgttctctg gtttgaactcaaacg	HindIII	hinterer Primer für CBS1 u. sCBS1	55 °C
877	gcagtcccgattctgcatat tc		vorderer Primer für SELX U95C Mutagenese mit Oligo 1009	55 °C
878r	agctgctgaatatgcagaat cg		hinterer Primer für SELX U95C Mutagenese mit Oligo 1008	55 °C
920	agaattcatggcgggctc ctctggttgc	EcoRI	vorderer Primer für CBS1 in pGEM-HE mit Oligo 799	55 °C
921	gagctcggccaagcgggc ggcggcgggccc	SacI	vorderer Primer für sCBS1 mit Oligo 799	55 °C
1008	cccgatccatgtcgttctg cagcttcttc	BamHI	vorderer Primer für SELX U95C mit Oligo 1009	50 °C
1009	tctaagcttctagtacacct gggaggcaga	HindIII	hinterer Primer für SELX U95C mit Oligo 1008	50 °C
1075	gaagacgaaggcgcccca gtgcc		hinterer Primer für sCBS W110A Mutagenese mit Oligo 921	48 °C
1076	ctg gca ctg ggg cgc ctt cgt ttt c		vorderer Primer für sCBS W110A Mutagenese mit Oligo 799	48 °C
1149	aagcttctcagtgttctctg tttgaactcaaacccacac tgttgatggaaaacctctga cc	HindIII	hinterer Primer für sCBS1 C169S mit Oligo 921	55 °C
1192	gtgactgtcggagcacac ggaatgatac		hinterer Primer für sCBS C90S;C93S Mutagenese mit Oligo 921	55 °C
1193	ggaatgtatcattccgtgtg ctccgacagtccac		vorderer Primer für sCBS C90S;C93S Mutagenese mit Oligo 799	55 °C
1194	ggttgctccaagcagtctg aagctcatctagg		vorderer Primer für sCBS C146S;C149S Mutagenese mit Oligo 799	55 °C
1195	cctagatgagcttcagactg cttgagacaacc		hinterer Primer für sCBS C146S;C149S Mutagenese mit Oligo 921	55 °C
1218	cagttctgagaaaaagtact cctctggcactgg		vorderer Primer für sCBS C105S Mutagenese mit Oligo 799	50 °C
1219	ccagtgccagaggagtact ttttctcagaactg		hinterer Primer für sCBS C105S Mutagenese mit Oligo 921	55 °C
1264	gagctccttgcaacgtgtg agctgcctcttg	SacI	vorderer Primer für CBS1? 1-41 Mutagenese mit Oligo 799	55 °C
1271	gaaaaagtactgctctggct gtgggtggccttc		vorderer Primer für sCBS T108C Mutagenese mit Oligo 799	55 °C
1272	ggccaccacagccagag cagtactttttctc		hinterer Primer für sCBS T108C Mutagenese mit Oligo 921	55 °C
1273	gaaaaagtactgctctggc gccccgtggccttcg		vorderer Primer für sCBS T108A Mutagenese mit Oligo 799	55 °C
1274	Ggccaccgccgcccaga gcagtactttttctc		hinterer Primer für sCBS T108A Mutagenese mit Oligo 921	55 °C

Nr.	Sequenz	Restriktions- stelle	Verwendung	„Annealing“- Temperatur
1294	ggtaccgtgttcttggtt gaactcaaag	KpnI	hinterer Primer für sCBS des sCBS/MSRA Hybrids mit Oligo 921	48 °C
1295	ggtaccatgctctcgcca cccggagggttgc	KpnI	vorderer Primer für MSRA des sCBS/MSRA Hybrids mit Oligo 1296	55 °C
1296	aagcttttttttaataccc actgggcaggacacg	HindIII	hinterer Primer für MSRA des sCBS/MSRA Hybrids mit Oligo 1295	55 °C
1482	gaaaaagtactgctctggc agtgggtggccttc	Quik change	vorderer Mutagenese Primer für MSRB1 T108S	56°C
1483	ggcaccactgccagag cagtacttttctc	Quik change	hinterer Mutagenese Primer für MSRB1 T108S	56°C
1493	gggtctcttgaacgtctga gctgcctc	Quik change	vorderer Mutagenese Primer für hMSRB1 C45S	55°C
1494	gaggcagctcagacgttgc aagagacc	Quik change	hinterer Mutagenese Primer für hMSRB1 C45S	55°C
1513	ggaatgtatcattctgtgtgc tgcgacagtcc	Quik change	vorderer Mutagenese Primer für hMSRB1 C90S	55 °C
1514	ggactgtcgcagcacaca gaatgatacttc	Quik change	hinterer Mutagenese Primer für hMSRB1 C90S	55 °C
1612	ggaatgtatcattcgtgtc ctgcgacagtcc	Quik change	vorderer Mutagenese Primer für hMSRB1 C92S	53 °C
1613	ggactgtcgcaggacacg caatgatacttc	Quik change	hinterer Mutagenese Primer für hMSRB1 C92S	53 °C
1624	gca tca acg ctg tgg ctt tga agt tca aac c	Quik change	vorderer Mutagenesprimer für hMSRB1 S712A	55 °C
1625	ggtttgaacttcaaagccac agcgttgatg c	Quik change	hinterer Mutagenesprimer für hMSRB1 S712A	55 °C
1626	gcatcaacggtgtggcttg aagtcaaacc	Quik change	vorderer Mutagenesprimer für hMSRB1 S712C	53 °C
1627	ggtttgaacttcaaagccac acagttgatgc	Quik change	hinterer Mutagenesprimer für hMSRB1 S712C	53 °C
1612	ggaatgtatcattcgtgtc ctgcgacagtcc	Quik change	vorderer Mutagenese Primer für hMSRB1 C92S	53 °C
1613	ggactgtcgcaggacacg caatgatacttc	Quik change	hinterer Mutagenese Primer für hMSRB1 C92S	53 °C

3.2.1.2 Amplifizierung von MSR „open-reading frames“

Die für die jeweiligen PCR-Fragmente verwendeten Oligonukleotide, Primer und „Annealing“-Temperaturen sind Tab. 3.1 zu entnehmen. Die PCR wurde mit 30 - 45 PCR-Zyklen durchgeführt, es wurden pro 5 Ansätze 1 µl *Taq* Polymerase (Promega Corporation, Madison, WI, USA) benutzt.

3.2.1.3 Mutagenese PCR

Mutagenese wurde mit dem “QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit” von Stratagene (Cedar Creek, TX, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Pro Ansatz wurden je 10-50 ng DNA mit 1 µl Primer verwendet. Die jeweiligen Oligonukleotide und die “Annealing”-Temperatur sind der Tab. 3.1 zu entnehmen. Es wurden je 24 Zyklen durchgeführt.

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte über ein 1 - 1,5 %-iges Agarose-Gel (Amresco, Solon, USA) in TBE-Puffer (90 mM Tris-Borat; 2 mM EDTA) mit 4 % Ethidiumbromid bei 100 mV. Das Ergebnis konnte dann unter UV-Licht ausgewertet werden. Aus dem Gel ausgeschnittene DNA-Banden wurden mit QIAEX® II (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben (Protokoll QIAEX II 02/99) aus dem Gel extrahiert. Die DNA wurde anschließend in H₂O aufgenommen.

3.2.3 DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen

Doppelsträngige (Plasmid-)DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen (RE) sequenzspezifisch gespalten. Enzymkonzentration, Pufferzusammensetzung und Verdauungstemperatur wurden entsprechend den Angaben des Enzymherstellers gewählt. Es wurde darauf geachtet, dass der Reaktionsansatz nicht mehr als 5 % Glycerol enthielt (RE-Lösungen enthalten 50 % Glycerol). Je nach Art der DNA und der verwendeten RE wurden 2 bis 10 U RE/µg DNA eingesetzt und für 2 bis 4 Stunden bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert. Bei Doppelrestriktionen wurde, wenn möglich, ein Puffer gewählt, in dem alle Enzyme möglichst effektiv schneiden. Bei unverträglichen Pufferanforderungen wurden die Restriktionsreaktionen nacheinander durchgeführt. Die Vollständigkeit des Verdau wurde durch Gelelektrophorese überprüft.

3.2.4 Dephosphorylierung von DNA

Restringierte Plasmid-DNA wurde vor der Ligation mit Phosphatase behandelt, um die 5'-Phosphate der DNA zu hydrolysieren. Dazu wurden 30 U bakterielle Phosphatase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in 10 mM Tris-HCl (pH 8) zum Restriktionsansatz zugegeben und für 1 h bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde die alkalische Phosphatase durch QIAEX-Behandlung (Protokoll QIAEX II 02/99) entfernt.

3.2.5 Ligationen

3.2.5.1 Ligation mit dem pGEM[®]-T Vektor System

Die Ligation wurde mit T4-DNA-Ligase (Promega Corporation, Madison, WI, USA) und dazugehörigem Puffer durchgeführt. Pro Ligationsansatz wurden 5 µl 2-fach Ligationspuffer, 50 ng pGEM[®]-T Vektor (Promega Corporation), 1 U T4 DNA Ligase und mit dem PCR-Fragment auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte im Biometra Personal Cycler (Whatman Biometra, Göttingen, Deutschland) über Nacht bei 40 Zyklen (10min bei 4 °C, 10 min bei 8 °C, 10 min bei 12 °C, 10 min bei 16 °C).

3.2.5.2 Ligationen in Expressionsvektoren

Zur Präparation der Expressionsvektoren wurden die aus pGEM-T mit den jeweiligen RE ausgeschnittenen Fragmente und die gleichermaßen verdauten, dephosphorylierten Expressionsvektoren nach Herstellerangaben in den Ligationsansatz (Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland) gemischt. Die Ligationsreaktion wurde im Biometra Personal Cycler nach demselben Verfahren wie für pGEM-T Vektoren (s. 3.2.5.1) durchgeführt.

3.2.6 Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzierung wurden 200 fmol DNA (4 µl bei „Mini-Preps“) und 1 pmol von speziellen IR-markierten Oligonukleotiden eingesetzt. Es wurde das „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP-Kit“ (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) verwendet. Das PCR-Programm für die Sequenzierungs-PCR durchlief 25 Zyklen mit je 30 s bei 95 °C (Denaturierung), 30 s bei 55 °C („Annealing“) und 40s bei 70°C (Elongation). Die Sequenzierung wurde nach dem „Cycle Sequencing protocol for the LI-COR system using the Thermo Sequenase“-Protokoll (MWG-BIOTECH, Ebersberg, Deutschland) im LI-COR 4000 mit dem Programm DataCollection[™] durchgeführt und mit BaseImageIR[™] ausgewertet. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit MacVector[™]6.5 analysiert.

3.2.7 RNA-Synthese

3.2.7.1 Linearisierung des pGEM-HE-Plasmides für die RNA-Synthese

Die Inkubation des Restriktionsansatzes (5 µg Plasmid-DNA, 10 µl RE-Puffer, 20 U RE, ad 100 µl H₂O) erfolgte für 120 min bei 37 °C. Anschließend wurde mit DEPC-H₂O auf 200 µl Endvolumen aufgefüllt. Die RE-Extraktion erfolgte durch Zugabe von 200 µl

Phenol-Chloroform Isoamylalkohol (25:25:1) (pH 7,8). Der Ansatz wurde für 2 min inkubiert, dabei wiederholt „gevortext“, anschließend zentrifugiert (2 min, 9500 g, RT) und die wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Dieser Extraktionsschritt wurde zweimal durchgeführt, dann wurde ein Volumen Chloroform zugegeben, nach durchmischen der Lösung erneut zentrifugiert (2 min, 9500 g, RT) und die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt. Es wurden 1/10 Volumen 3 M NaAcetat (pH 5,2) und 2 Volumina eiskaltes Ethanol zugegeben und für 20 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (15 min, 20000 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Die wässrige Phase konnte danach entfernt und das Sediment mit 70 % Ethanol (v/v) gewaschen werden. Das Sediment wurde dann in einem Rotations-Vakuum-Konzentrator getrocknet (15 min, 15 mbar, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Das getrocknete Sediment wurde in 10 μl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA (pH 8)) aufgenommen und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2.7.2 Herstellung von RNA für Expression in Oocyten

RNA wurde nach dem mMMESSAGE mMACHINE Protokoll (Ambion Inc., Austin, TX, USA) synthetisiert. Der Syntheseansatz (1 μg linearisierte DNA; 2 μl Transkriptionspuffer; 2 μl T7-Enzymmix; 10 μl dNTP/CAP Mix; ad 20 μl H_2O) wurde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 1,5 h inkubiert. Dann wurde 1 μl DNase I zugegeben und erneut für 15 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Es erfolgte eine Zugabe von 115 μl DEPC- H_2O und 15 μl 5 M Ammoniumacetat und im Anschluss eine Extraktion durch Zugabe von 100 μl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:25:1) (pH 7,8). Der Ansatz wurde zentrifugiert (2 min, 9500 g, RT) und die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt. Dazu wurde 100 μl Chloroform pipettiert und erneut zentrifugiert (2 min, 9500 g, RT). Die wässrige Phase wurde überführt und es wurde 1 Volumen Isopropanol zugegeben und für 20 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min, 20000 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurde die wässrige Phase entfernt und das Sediment in einem Rotations-Vakuum-Konzentrator getrocknet (10 min, 15 mbar, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Das getrocknete Sediment wurde in 15 μl DEPC- H_2O resuspendiert und anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2.8 Bakterienkultivierung

3.2.8.1 Herstellung von TY-Agarplatten

1,5 % Agar-Agar (Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurde in TY-Medium (1 % Bacto-Trypton (Roth); 0,5 % Hefe-Extrakt (Roth); 0,5 % NaCl (pH 7); autoklaviert) in der Mikrowelle bis zur Verflüssigung erhitzt. Nach Abkühlen der Flüssigkeit auf $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde Antibiotika (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin und/oder 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin) zugegeben und die

Lösung in 10 cm Petrischalen gegossen.

3.2.8.2 Vorkulturen

Einzelne Bakterienkolonien wurden mit Holzstäbchen von den Agarplatten in je ein Reagenzglas mit 2 ml TY-Medium und Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin) übertragen. Diese Ansätze wurden über Nacht bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt.

3.2.8.3 Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli*

Die *E. coli* Zellen (XL1-Stamm) wurden mit dem Z-competent *E. coli* Transformation Kit nach dem Hersteller-Protokoll (ZYMO Research, Orange County, CA, USA) behandelt. Sie werden darum im weiteren Verlauf als „Z-kompetent“ bezeichnet.

Die Zellen des *E. coli* Stamm M15(pREP4) wurden nach dem Hersteller-Protokoll (The QIAexpressionist 08/2002) hergestellt und werden im weiteren Verlauf als M15-Zellen bezeichnet.

3.2.8.4 Transformation von XL1-Z kompetenten Zellen

Die Ligationsprodukte wurden benutzt, um Z-kompetente *E. coli*-Zellen zu transformieren. Dazu wurden die aufgetauten Bakterien mit dem Ligationsprodukt versetzt (10 µl auf 200 µl XL1-Z) und 1 h auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien zentrifugiert (1 min, 5000 g, RT) und auf vorgewärmte TY-Agarplatten mit Antibiotikum ausplattiert. Im Fall des pGEM[®]-T Vektors wurde zusätzlich 100 µl 0,1 M IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactosid)(Fermentas) und 20 µl X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid)(50 mg/ml)(Roth) zugegeben. Der pGEM[®]-T Vektor enthält das Gen für β-Galactosid-Permease und überträgt auf die Empfängerzellen die Fähigkeit, β-Galactoside aufzunehmen, die dann von der β-Galactosidase hydrolysiert werden. Die Expression der β-Galactosid-Permease steht unter der Kontrolle des *lac*-Operons und kann so durch IPTG gestartet werden. Die Bakterien mit dem pGEM-T Vektor sind damit in der Lage X-Gal zu hydrolysieren, wobei ein blaues Chromophor entsteht. Erfolgreich transfizierte Bakterien sind leicht zu erkennen, weil sie ein DNA-Fragment im Leserahmen der β-Galactosid-Permease enthalten, damit eine funktionsuntüchtige β-Galactosid-Permease exprimieren und weiße Kolonien bilden. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37 °C.

3.2.8.5 Transformation von M15-Zellen

pQE-30-Konstrukte wurden per „Midi-Prep“ amplifiziert und 1 µg der „Midi-Prep“ dieses Konstrukts zur Transformation von M15-Zellen eingesetzt. Nach einstündiger Inkubation der M15-Bakterien mit dem Konstrukt auf Eis wurden die Bakterien für 1 min bei 42 °C geschockt, um eine Aufnahme des Plasmids zu ermöglichen. Nach einer weiteren Inkubation von 5 min auf Eis wurde den Zellen SOC-Medium zugegeben. Die Zellen wurden auf Ampicillin/Kanamycin-Agarplatten ausgestrichen, da der M15-Stamm neben der Ampicillin-Resistenz des pQE-30 Plasmids über ein pREP4 Plasmid verfügt, welches den M15 Stamm mit einer Kanamycin-Resistenz versieht.

3.2.9 Plasmidisolierung

3.2.9.1 Isolierung von Plasmid-DNA („Mini-Prep“)

Übernacht-Vorkulturen (1 – 2 ml) wurden 30 sec bei 10000 g zentrifugiert und das Bakteriensediment anschließend in 100 µl Puffer P1 (QIAprep[®] Midiprep Kit, QIAGEN) resuspendiert. Zur Lyse wurde 100 µl Puffer P2 (QIAGEN) zugegeben, 3 min inkubiert und mit 100 µl Puffer P3 (QIAGEN) neutralisiert. Die genomische DNA wurde mittels Zentrifugation (15 min, 10000 g, RT) von der Plasmid-DNA abgetrennt, da die genomische DNA hauptsächlich an den schweren Zellfragmenten assoziiert ist. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wurde mit 0,7 Volumina Isopropanol gefällt, zentrifugiert (10 min, 10000 g, 4 °C), mit 70 %-igen Ethanol (v/v) gewaschen und getrocknet. Das getrocknete Sediment wurde in 30 µl TE-Puffer (pH 8,0) mit RNase (20 U, QIAGEN) aufgenommen. Die Plasmid-DNA wurde in gelöster Form bei -20 °C aufbewahrt. Die „Mini-Prep“-Produkte wurden durch Restriktionsverdau und anschließende Auftrennung auf einem Agarose-Gel analysiert und bei richtigem Restriktionsmuster sequenziert.

3.2.9.2 Isolierung von Plasmid-DNA („Midi-Prep“)

Für die „Midi-Preps“ wurde das „QIAGEN Plasmid Midi Kit“ mit dem „QIAGEN Plasmid Purification-Protokoll“ (07/99) verwendet. Die DNA-Sedimente wurden in 200 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Konzentration der Probe konnte entsprechend ihrer optischen Dichte im Photometer bestimmt werden.

3.2.9.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zuerst wurden 1:100-Verdünnungen der DNA-Proben hergestellt (2 µl Probe auf 198 µl H₂O), die Messungen wurden im Photometer bei 260 nm mit H₂O als Referenz durchgeführt. Dabei entspricht bei doppelsträngiger DNA eine OD₂₆₀ von 1 einer Konzentration von 50 µg/µl.

3.2.10 Rekombinante Proteine

3.2.10.1 Expression und Reinigung von rekombinanten Proteinen

Für die Expression und Reinigung von rekombinanten Proteinen in M15-Zellen wurde das QIAGEN -Protokoll „The QIAexpressionist“ (01/00) verwendet. 100 ml Zellkultur wurden mit einer Übernachtskultur geimpft und wuchsen bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6. M15 Zellen enthalten das Plasmid pREP4, welches eine Kanamycinresistenz vermittelt und das *lac* Repressorprotein kontinuierlich exprimiert. Durch Zugabe von IPTG wird das *lac* Repressorprotein von der Operator Region verdrängt, wodurch die Expression gestartet wird. Die Expression wurde induziert durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM. Bei einer OD₆₀₀ = 2,5 wurden die Zellen zentrifugiert. Im Lysepuffer (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 5 mM Imidazol; 1mg/ml Lysozym (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)) erfolgte nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis der Ultraschallaufschluss des Zellsediments (6 * 10 sec). Anschließend wurde das Lysat zentrifugiert (20 min, 10000 g, 4 °C). Der Überstand (lösliche Proteine) wurde mit 1 ml 50 % Ni-NTA (QIAGEN) versehen und leicht geschüttelt (1 h, 200 rpm, 4 °C). Die Lysat-Ni-NTA-Mixtur wurde in eine Polypropylen-Säule (QIAGEN) überführt, der Durchfluss separat gesammelt und die Säule 2 x mit 4 ml Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol) gespült. Das Protein konnte anschließend mit 5 x 0,5 ml Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 125 mM Imidazol) eluiert werden. Nach Bestimmung des Proteingehalts wurden die Proben zur weiteren Reinigung und Konzentrierung des rekombinanten Proteins in Ultrafree-0,5 Zentrifugationsröhrchen (Ausschlussgröße: 5 kDa) (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) 5x zentrifugiert (10 min, 10000 g, 4 °C). Calmodulin wurde in 20 mM Tris/HCl (pH 7,8); 500 mM NaCl; 1 mM DTT gelagert. Für Aktivitätstest bzw. Oxidationsversuche sind die Proteine vor Gebrauch mit den Millipore Zentrifugationsröhrchen in 20 mM Tris HCl (pH 7,3) umgepuffert worden.

3.2.10.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit Coomassie

Die Konzentrationsbestimmungen wurden mit dem „Coomassie Plus Protein Assay Reagent“ (Pierce, Rockford, IL, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurden 50 µl unterschiedlicher Konzentrationen von Rinderserumalbumin (BSA)(Sigma) mit 1 ml der Reagenzlösung gemischt und nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT deren OD₅₉₅ gegen eine Referenz gemessen. Die Bestimmung unbekannter Proteinkonzentrationen erfolgte analog, wobei die Konzentrationen aus der Eichkurve ermittelt werden konnten.

3.2.10.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mit BCA

Die Konzentrationsbestimmungen wurden mit dem „BCA Protein Assay Reagent Kit“ (Pierce, Rockford, IL, USA) nach Herstellerangaben für Mikrotiterplatten durchgeführt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurden 25 µl unterschiedlicher Konzentrationen an BSA mit 200 µl der Reagenzlösung (Reagenz A:B im Verhältnis 50:1) gemischt und nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C deren OD₅₆₂ gegen eine Referenz gemessen. Zur Bestimmung unbekannter Proteinkonzentrationen wurde analog verfahren, wobei die Konzentrationen aus der Eichkurve errechnet wurden.

3.2.11 SDS-Polyacrylamid Elektrophorese

Das Trenngel enthielt 17 % Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8) (w/v) (National Diagnostics, Hull, England); 0,38 M Tris/HCl (pH 8,8); 1,5 ml 0,1 % SDS (w/v); 0,04 % APS (Sigma) und 0,07 % N,N-Methylenbisacrylamid (=TEMED)(Roth). Das Sammelgel enthielt 6 % Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8) (w/v); 0,125 M Tris/HCl (pH 6,8), 0,1% SDS (w/v), 0,05 % APS und 0,125 % TEMED.

Die zu analysierenden Proben wurden mit gleichem Volumen Probenpuffer (125 mM Tris-HCl (pH 6,8); 4 % SDS; 18 % Glycerol; 715 mM β-Mercaptoethanol; 0,1 % Bromphenolblau) 5 min gekocht und auf ein Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in der passenden Elektrophoresekammer (Biorad oder Biometra) bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA für ca. 1,5 h. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie (s. 3.2.11.1) gefärbt. Als Standard zur Bestimmung der Proteingrößen wurde ein Markergemisch (Roti-Mark-STANDARD (Roth)) aus Proteinen bekannter Molekulargewichte mit aufgetrennt. Aufgrund der Wanderung dieser Markerproteine wurde das unbekannte Molekulargewicht der Proteine bestimmt (modifiziert nach Laemmli, 1971).

3.2.11.1 Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie R-250

Die Gele wurden nach Beendigung der Elektrophorese in Färbelösung (0,25 % Coomassie R-250 (v/v) (Roth); 7 % Essigsäure (v/v) und 50 Methanol (v/v)) für 1 - 5 h geschwenkt. Ungebundenes Coomassie wurde durch wiederholtes Kochen des Gels in H₂O für 5 min entfernt und anschließend eine weitere Entfärbung in der Entfärbelösung (10 % Essigsäure (v/v); 10 % Methanol (v/v); 5 % Methanol (v/v)) erzielt.

3.3 BIOCHEMISCHE METHODEN

3.3.1 Aktivitätsassays

3.3.1.1 Aktivitätsbestimmung von MSR-Enzymen mit DTT

Der Reaktionsansatz enthielt 50 mM Tris/HCl (pH 7,3) und 0,2 mM oxidiertes Peptid (KIFM(O)K (JenaBioScience)). Verschiedene Konzentrationen an Enzym (hMSRA, hMSRB1 oder hMSRB2) wurden zugegeben und anschließend mit destilliertem Wasser auf 30 µl aufgefüllt. Als Reduktionsmittel wurde 10 mM DTT (Sigma) verwendet. Die Proben wurden 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 5 µl 6 % TFA (v/v) gestoppt und 3 µl 100 mM freies Methionin (Sigma) als Oxidationsschutz zugegeben. Die Analyse der Proben erfolgte über MALDI-TOF-MS (s. 3.4.1)(nach Jung *et al.*, 2002).

3.3.1.2 Aktivitätsbestimmung von MSR-Enzymen mit Thioredoxin

Der Ansatz zur Bestimmung der Aktivität von MSR-Enzymen mit dem Thioredoxinsystem enthielt 50 mM Tris/HCl (pH 7,3); 0,1 mM oxidiertes Peptid (KIFM(O)K (JenaBioScience)); 5 µM TRX (Sigma); 87 nM TRR (Sigma) und 200 µM NADPH als Reduktionsmittel. Die Oxidation von NADPH zu NADP wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm (Tecan Sunrise) über einen Zeitraum von 1 h verfolgt. Die Abnahme der Absorption des NADPH ist indirekt ein Maß für die Reduktaseaktivität der MSRs an den oxidierten Peptiden. Nach einer Stunde wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl 6 % TFA (v/v) gestoppt und 3 µl 100 mM freies Methionin (Sigma) zugegeben und die Proben bei -80 °C gelagert. Zusätzlich erfolgte eine Analyse der Proben über MALDI-TOF-MS (s. 3.4.1)(modifiziert nach Grimaud *et al.*, 2001).

3.3.1.3 Aktivitätsbestimmung von MSR-Enzymen mit freiem Methionin

Der Ansatz enthielt 0,1 mM Phosphatpuffer (); 10 mM DTT; 10 mM MetO und verschiedene MSR-Konzentrationen. Die Proben wurden 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Um DTT zu fällen, wurde der Probe N-Ethylmaleinimid (=NEM) (Sigma) in einer Endkonzentration von 20 mM zugegeben und 30 min inkubiert. Dann wurde die Probe zentrifugiert (2 min, 10000 g, RT) und der Überstand in ein frisches Eppendorfggefäß überführt. 0,25 ml der Probe und 0,25 ml 2,4-Dinitrofluorbenzol-Ethanol (0,7 % DNFB (Sigma) (w/v) in Ethanol) sowie 50 µl Derivatisierungspuffer (2 M KOH; 2,4 M KHCO₃) wurden zusammengemischt. Der Derivatisierungsprozess erfolgte über Nacht im Dunkelraum. Anschließend wurde die Probe filtriert (Ausschlußgröße 0,2 µm), in Eppendorfggefäße überführt und bei -20 °C gelagert. Die DNFB-derivatisierten Proben wurden über eine Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) an einem HP1500Series HPLC-Gerät (Hewlett-Packard GmbH, Böblingen, Deutschland) aufgereinigt und der Anteil an derivatisiertem Methionin bestimmt. Dazu wurde eine C-18 Säule (250 mm x 4,6 mm; 90 Å; 5µ Material (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)) mit Puffer A (1 % Acetonitril (pH 4,5) (Roth); 0,1 % TFA (Sigma)) äquilibriert. Dann wurde die Probe aufgetragen und folgendes Programm bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min durchgeführt:

6 min 5 % Puffer B (75 % Acetonitril; 0,1 % TFA; pH 4,5); innerhalb von 10 min auf 70 % Puffer B erhöht; dann 3 min bei 70 % Puffer B; innerhalb von 3 min eine Drosselung auf 5 % Puffer B.

Die derivatisierten Methionine wurden bei einer Wellenlänge von 365 nm detektiert (modifiziert nach Duescher et al, 1994; Sausen und Elfarrar, 1990).

3.3.2 Oxidation und Reduktion von Calmodulin

3.3.2.1 Oxidation von Calmodulin

Vor der Oxidation wurde Calmodulin (=CaM) in Oxidationspuffer (50 mM Homopipes (pH 5.0) (Research Organics, Cleveland, USA); 0,1 M KCl; 2,0 mM MgCl₂; 10mM EGTA) umgepuffert. Die Oxidation von 60 µM CaM wurde durch Zugabe von 100-500 mM H₂O₂ ($E_{240} = 39,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Nelson und Kiesow, 1972)) gestartet und dauerte ca. 18-24 h bei Raumtemperatur. Die oxidierten Calmoduline wurden im Anschluss per MALDI-TOF-MS analysiert (modifiziert nach Balog *et al.*, 2002).

Proteinsequenz von Säugetier Calmodulin (gi:223872)

```
0      MADQLTEEQI AEFKEAFSLF DKDGDGTITT KELGTVMRSL
41     GQNPTAELQ DMINEVDADG NGTIDFPEFL TMMARKMKDT
81     DSEEEIREAF RVFDKDGNGY ISAAELRHVM TNLGEKLTDE
121    EVDEMIREAD IDGDGQVNYE EfvQMMTAK
```

3.3.2.2 Reduktion von Calmodulin

Oxidiertes CaM wurde in 20 mM Tris-HCl (pH 7,3) umgepuffert. 100 μ M Calmodulin wurde in Gegenwart von 10 mM DTT, 10 μ M MSRA und/oder 10 μ M MSRB bei einer Inkubationszeit von 1 h reduziert. Anschließend wurde ein Aliquot entnommen und per MALDI-TOF-MS analysiert (modifiziert nach Grimaud *et al.*, 2001).

3.3.2.3 Bindungsmessung von hEAG-C und Calmodulin

Calmodulin wurde kovalent auf eine karboxillierte Dextranmatrix eines CM5 Chips in einer Dichte von 1000 relativen Einheiten (10^{-6} kgm⁻²) mit N-hydroxysuccinimide/ethyl-diethylaminopropyl-carbodiimide (NHS/EDC) nach Herstellerangaben immobilisiert. Die Anzahl der Bindungsstellen des Calmodulin für das C-terminale hEAG-Fragment wurde über Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (=SPR) an einem BIAcore 2000 (BIAcore AB, Uppsala, Sweden) vor, während und nach Oxidation gemessen. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 20 μ l/min bei einer Temperatur von 20 °C. Die Oxidation des immobilisierten Calmodulin erfolgte über das Mikroflusssystem mit Oxidationspuffer (s. 3.3.2.1) und 100 mM H₂O₂. Die anschließende Reduktion mit je 10 μ M MSR-Enzymen wurde wie unter Punkt 3.3.2.2 beschrieben durchgeführt (modifiziert nach Karlsson *et al.*, 1991; Sjolander *et al.*, 1991).

3.4 MASSENSPEKTROMETRISCHE METHODEN

3.4.1 MALDI-TOF-MS-Analyse der MSR-Proben

Die mit den MSR-Enzymen inkubierten Peptide wurden mit einem Matrix-unterstützten Laserdesorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometer (=MALDI-TOF-MS) analysiert. Matrix A (10 mg α -Hydroxy-Zimtsäure (Sigma) in Acetonitril (Roth)) wurde für 5 min bei 42 ° erwärmt, zentrifugiert und als dünne Schicht auf die Probenplatte aufgetragen. Die getrocknete, kristalline Matrix wurde mit einer Glassplatte zerbrochen. Darauf wurde je 1 μ l der in Matrix B (10 mg α -Hydroxy-Zimtsäure in 33 % Acetonitril/ 0,1 % TFA (v/v) (Sigma)) verdünnten Reaktionsmische (1:10) aufgetragen. Zur Vermeidung

von Salzablagerungen wurden die Spots zweimal mit 1 % TFA gewaschen und unter Vakuumbildung (100 mbar) getrocknet (modifiziert nach Vorm und Roepstorff, 1994).

Die Massenspektren wurden in einem Voyager RP-DE™ MALDI-TOF Gerät mit einem Stickstofflaser ($\lambda=337$ nm) aufgenommen. Die synthetischen Peptide wurden im Reflektormodus (Bingröße: 2 ns) bei 20 kV Beschleunigungsspannung, 68 % Gitterspannung und 180 ns Verzögerung gemessen. Es wurden je 10 Spektren bestehend aus 50 je Einzelspektren akkumuliert. Zur Analyse der Enzymaktivität wurden die integrierten Peaks des reduzierten Peptids in Relation zu den integrierten Peaks von beiden, dem oxidierten und dem reduzierten Peptid, gebracht.

3.4.2 MALDI-TOF-MS-Analyse von Calmodulin

Als Matrix wurde 10 mg Sinapinsäure (Sigma) in 500 μ l 45 % Acetonitril / 0,1% TFA aufgelöst. Die CaM-Proben wurde im Verhältnis 1:10 mit der Matrix vermischt, wovon anschließend 1 μ l aufgetragen und unter Vakuumbildung (100 mbar) getrocknet wurde.

Die Massenspektren wurden in einem Voyager RP-DE™ MALDI-TOF aufgenommen. Die Calmoduline wurden im linearen Modus (Bingröße: 2 ns) bei 25 kV Beschleunigungsspannung, 90 % Gitterpannung und 600 ns Verzögerung gemessen. Zur Bestimmung des MW wurden je 10 Spektren bestehend aus je 60 Einzelspektren akkumuliert. Aus den akkumulierten Spektren wurden der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet.

3.5 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE METHODEN

3.5.1 MSR Aktivitätsbestimmung in *Xenopus laevis* Froschoozyten (*in vivo*) mit ShakerC/B

Die RNA des *Drosophila* ShakerC/B Kanal und der MSR-Enzymen wurde in Froschoozyten koexprimiert und die Kaliumströme des ShakerC/B Kanals in den Oozyten mittels der Zwei-Elektroden-Klemme gemessen. Dazu wurden Froschoozyten chirurgisch aus *Xenopus laevis* isoliert. Die Oozyten wurden mit 50 nl RNA injiziert. 1-2 Tage nach Injektion wurden die Kaliumströme des ShakerC/B Kanal gemessen. Das Membranpotential wurde auf -80 mV eingestellt und anschließend für 400 msec auf 40 mV eingestellt. Die Ströme wurden mit PatchMaster (Heka) gemessen (nach Ciorba *et al.*, 1997, 1999).

Pipettenlösung: 2 M KCl

Badlösung: 115 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 1,8 mM CaCl₂; 10 mM HEPES (pH 7,2)

3.5.2 Calmodulinbindung an hEAG Kanälen im Inside-out Patch von *Xenopus laevis* Froschoozyten

50 nl cRNA des humanen EAG Kanals wurde in Froschoozyten injiziert, für wenigstens 24 h bei 17 °C gelagert und anschließend die Kaliumströme in den Oozyten mittels der Patch-Clamp Methode mit der Software PatchMaster (Heka) gemessen. Rekombinantes Calmodulin und Calmodulin-Mutanten wurden in der Ca²⁺-haltigen Lösung verdünnt (20µg/ml). Der Patch wurde direkt in den Strom eines Mehrkanalperfusionssystems befördert, wodurch verschiedenen Calmodulin-Mutanten oder Lösungen wechselweise auf den Patch gespült wurden. Patchpipetten wurden aus Aluminiumsilikat mit einem Widerstand von 1-2 MO hergestellt. Das Membranpotential wurde auf -110 mV eingestellt und anschließend für 200 ms auf 50 mV eingestellt (nach Schönherr *et al.*, 2000).

Pipettenlösung: 103,6 mM Na-Aspartat; 11,4 mM KCl; 1,8 mM CaCl₂; 10 mM HEPES (pH 7,2)

Ca²⁺-freie Lösung: 100 mM K-Aspartat; 15 mM KCl; 10 mM EGTA; 10 mM HEPES (pH 7,2); 0,5 mM DTT

Ca²⁺-haltige Lösung: 115 mM K-Aspartat; 10 mM EGTA; 8,73 mM CaCl₂; 10 mM HEPES (pH 7,2); 0,5 mM DTT

4 ERGEBNISSE

4.1 IDENTIFIKATION VON MSR-VARIANTEN

MSR-Varianten wurden durch Sequenzvergleich auf DNA und Proteinebene identifiziert. Der Leserahmen von *cbs1* (=hMSRB1; Genbank AAD38899) wurde aus einer Ciliarkörper-cDNA-Bank kloniert. hMSRB1 zeigt Homologie zum C-terminalen Ende von MSRA aus Mikroorganismen: 43 % Homologie zur *H. pylori* MSR (O25011) und 36 % Homologie zur *S. pneumoniae* MSR (P35593). Zusätzlich besteht 41 % Homologie zwischen hMSRB1 und dem C-terminalen Bereich von pilB aus *N. gonorrhoeae* (P14930) (Huang *et al.*, 1999) (s. Abb. 4.1). Dieser C-terminale Bereich von PILB besitzt MSR Aktivität (Wizemann *et al.*, 1996; Olry *et al.*, 2002).

Das Protein hCBS2 (=hMSRB2) wurde über Homologievergleiche mit einer menschlichen cDNA-Datenbank (BLAST-Sequenzsuche: Genbank XM_170724 u. AL833622) als mögliche MSR-Variante identifiziert (Hansel *et al.*, 2003). Auf Proteinebene besteht 65 % Homologie zu hMSRB1; 55 % Homologie zu hSELX und 50-70 % zu putativen bakteriellen MSRB-Enzymen (s. Abb. 4.1).

Das Selenoprotein hSELX wurde mittels Computeralgorithmen gefunden (Lescure *et al.*, 1999). Die Algorithmen überprüften die DNA-Datenbanken nach SECIS-Strukturen (SECIS="Selenocysteine insertion sequence"), um neue Selenocystein-enthaltende Proteine identifizieren zu können. Sequenzvergleiche zeigten, dass hSELX 29 % Homologie zu der MSRB-Domäne von PILB aus *N. gonorrhoeae* (P14930), *H. pylori* (O25011), *H. influenzae* (P45213), *M. capricolum* (S46920) und *S. pneumoniae* (P35593) aufweist (s. Abb. 4.1).

4.2 KLONIERUNG VON MSR-VARIANTEN

4.2.1 Klonierung von humanen MSRB-Genen

In DNA-Datenbanken wurden die jeweiligen offenen Leserahmen der putativen MSR-Varianten herausgesucht und PCR-Primer erstellt. Anschließend wurde hMSRB1 aus menschlichen Lungen-cDNA-Pools, hMSRB2 aus cDNA-Pools des menschlichen Herzen und hSELX aus menschlichen Knochenmark-cDNA-Pools mit den entsprechenden Primern amplifiziert. Das Codon für Selenocystein (UGA) wurde durch Mutagenese durch ein Codon für Cystein (UGC) ersetzt (SELX U95C). Nach Überprüfung der Leserahmen durch Sequenzierung wurden die amplifizierten Fragmente in einen bakteriellen Expressionsvektor (pQE-30) übertragen.

hCBS1		M A R L L W L L R G L T L G T A P R	18	
hCBS2		M S A F N L L	7	
hSELX			0	
D.melanogaster			0	
E.coli			0	
A.thaliana			0	
N.gonorrhoeae	R E Q Q K Y Q L P L V V E N E P L K N F Y D A E E Y H Q D Y L I K N P N G Y C H		350	
hCBS1	R A V R G Q A G G G G P G T G P G L G E A G S L A T C E	L P L A K S E W Q K K L	58	
hCBS2	H L V T K S Q P V A L R A C G L P S G S C R D K K N C K	V V F S Q Q E L R K R L	47	
hSELX			0	
D.melanogaster		M D N K S E K	V T V N K E E L R K R L	19
E.coli		M A N K P	S A E E L K K N L	14
A.thaliana	M A A S P L V	W Q K T E E E W R A V L	19	
N.gonorrhoeae	I D I R K A D E P L P G K T K A A P Q G K G F D A A T Y K K P	S D A E L K R T L	390	
hCBS1	T P E Q F Y V T R E K G T E P P F S G I Y L N N K E A G M Y H C V C C D S P L F		98	
hCBS2	T P L Q Y H V T Q E K G T E S A F E G E Y T H H K D P G I Y K C V V C G T P L F		87	
hSELX		M S F C S F F G G E V F Q N H F E P G V Y V C A K C G Y E L F	31	
D.melanogaster	T P V Q Y Q V T Q E A G T E R P P T G C Y N K H Y E K G V Y Q C I V C H Q D L F		59	
E.coli	S E M Q F Y V T Q N H G T E P P F T G R L L H N K R D G V Y H C L I C D A P L F		54	
A.thaliana	S F E Q F R I L R Q K G T E K P G T G E Y D K F F E E G I F D C V G C K T P L Y		59	
N.gonorrhoeae	T E E Q Y Q V T Q N S A T E Y A F S H E Y D H L F K P G I Y V D V V S G E P L F		430	
hCBS1	S S E K K Y C S G T G W P S F S E A H G T S G S D E S H T G I L R R L D T S L G		138	
hCBS2	K S E T K F D S G S G W P S F H D V I N S E A I T F T D - - - - - D F S Y G		120	
hSELX	S S R S K Y A H S S P W P A F T E T I H A D S V A K R P - - - - - E H N R S		64	
D.melanogaster	S S E T K Y D S G C G W P A F N D V L D K G K V T L H R - - - - - D A S I P		92	
E.coli	H S Q T K Y D S G C G W P S F Y E P V S E E S I R Y I K - - - - - D L S H G		87	
A.thaliana	K S T T K F D S G C G W P A F F E G L P G A I N R T P - - - - - D P - D		89	
N.gonorrhoeae	S S A D K Y D S G C G W P S F T R P I D A K S V T E H D - - - - - D F S F N		463	
hCBS1	S A - R T E V V C K Q C E A H L G H V F P - D G P G P N G Q R - F C I N S V A L		175	
hCBS2	M H - R V E T S C S R C G A H L G H I F D - D G P R P T G K I - Y C I N S A A L		157	
hSELX	E A L K - V S C G K C G N G L G H E F L N D G P K P G Q S R - F C I F S S S L		101	
D.melanogaster	E R I R T E V R C A R C M A H M G H V F E - D G P K P T R K R - Y C I N S A S I		130	
E.coli	M Q - R I E I R C G N C D A H L G H V F P - D G P Q P T G E R - Y C V N S A S L		124	
A.thaliana	G R - R T E I T C A A C D G H L G H V F K G E G Y G N P T D E R H C V N S V S I		128	
N.gonorrhoeae	M R - R T E V R S R A A D S H L G H V F P - D G P R D K G G L R Y C I N G A S L		501	
hCBS1	K F K P R K H		182	
hCBS2	S F T P A D S S G T A E G G S G V A S P A Q A D K A E L		185	
hSELX	K F V P K G K E T S A S Q G H		116	
D.melanogaster	E F V N A D P A T S S P P V A T P T A A P I A Q Q		155	
E.coli	R F T D G E N G E E I N G		137	
A.thaliana	S F N P A K S S S I I		139	
N.gonorrhoeae	K F I P L E Q M D A A G Y G A L K G E V K		522	

Abb. 4.1: Homologievergleich verschiedener MSRB-Proteinsequenzen.

Die putativen MSRB-Enzyme hCBS1 (AAD38899), hCBS2 (kodiert durch AL833688) und hSELX (kodiert durch AA057045) wurden mit *Drosophila* MSRB (NP731522), *E. coli* MSRB (NP754077), *A. thaliana* MSRB (AAD03444) und *N. gonorrhoeae* PILB-MSRB (P14930) verglichen. Identische Aminosäuren sind dunkel-grau markiert und ähnliche Aminosäuren sind durch hell-graue Kästchen markiert.

4.2.2 Erzeugung von MSRA/MSRB-Hybridproteinen

In Anlehnung an das natürliche Fusionsprotein PILB wurden künstliche Hybridproteine aus den humanen MSRA- und MSRB-Enzymen hergestellt. Zur Herstellung dieser Hybridproteine wurden 2 verschiedene Strategien verfolgt: Bei Strategie 1) wurde zuerst der verkürzte Leserahmen der hMSRA-Sequenz in den Vektor kloniert, gefolgt von der Vollängensequenz des hMSRB1-Leserahmen. In Strategie 2) war die Reihenfolge

vertauscht, so dass zuerst der verkürzte Leserahmen der hMSRB1-Sequenz gefolgt von dem vollständigen hMSRA-Leserahmen in den Vektor kloniert wurde. Die Fragmente wurden wiederum sequenziert und in den bakteriellen Expressionsvektor (pQE-30) übertragen.

4.3 EXPRESSION VON MSR-PROTEINEN

Die MSR-Enzyme wurden als rekombinante His-Tag-Proteine (6 aufeinander folgende Histidine am N-terminalen Ende) in *E. coli* exprimiert und über Ni-NTA-Matrix gereinigt. hMSRA wurde nach Kuschel *et al.* (1999) ohne die Aminosäuren 1-22 (MW=25,2 kD) als lösliches Protein exprimiert (s. Abb. 4.2a). hMSRB1 wurde zuerst fast ausschließlich als unlösliches Protein exprimiert. Nach Entfernung der 22 N-terminalen Aminosäuren von hMSRB1 (=hMSRB Δ 1-22; MW=18,8 kD), welche als mitochondriale Signalsequenz identifiziert wurden (Huang *et al.*, 1999), konnte jedoch lösliches hMSRB1-Protein hergestellt werden (s. Abb. 4.2c). Zur weiteren Bestimmung der Enzymaktivität von rekombinantem hMSRB1 wurde ausschließlich hMSRB Δ 1-22 verwendet. Die Proteine hMSRB2 (MW=21,4 kD) (s. Abb. 4.2d) und hSELX U95C (MW=14,1 kD) (s. Abb. 4.2b) wurden als lösliche Proteine exprimiert.

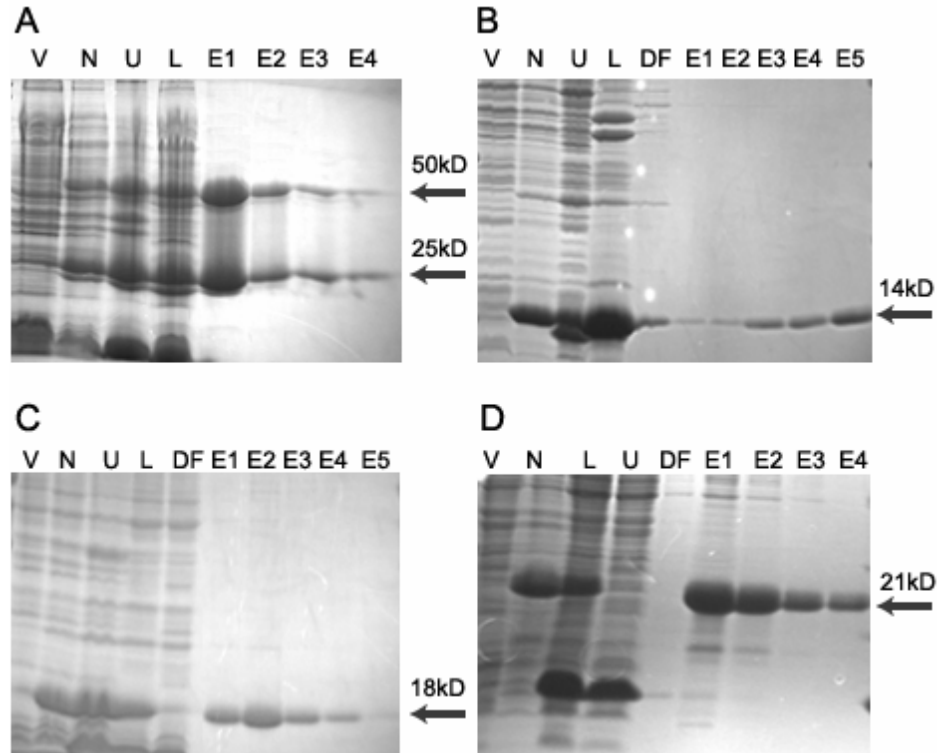


Abb. 4.2: Expression von putativen MSR Proteinen (15 % SDS-Gel). Expression von hMSRA¹⁻²² (A), von hSELX U95C (B), von hMSRB1¹⁻²² (C) und von hMSRB2 (D). Die Spuren enthalten folgende Proben: V (vor Induktion), N (nach Induktion), U (unlösliches Protein), L (lösliches Protein), DF (Durchfluss der Ni-NTA-Säule), W1/W2 (Waschpuffer über Ni-NTA-Säule) und E1/E2/E3/E4/E5 (Elution des an der Ni-NTA-Säule gebundenen Proteins mit 50-250 mM Imidazol). Die Pfeile geben die über Proteinmarker ermittelten Größen der Proteine an.

4.3.1 Expression der MSRA/MSRB-Hybridproteine

Die MSRA/MSRB-Hybridproteine (MW=45kD) wurden unter den Standardbedingungen (37 °C; 1 mM IPTG) ausschließlich als unlösliche Proteine exprimiert. Nach Erniedrigung der Expressionstemperatur auf 20 °C und Verringerung der Induktionsmenge auf 0,5 mM IPTG wurde lösliches Protein exprimiert (s. Abb. 4.3).

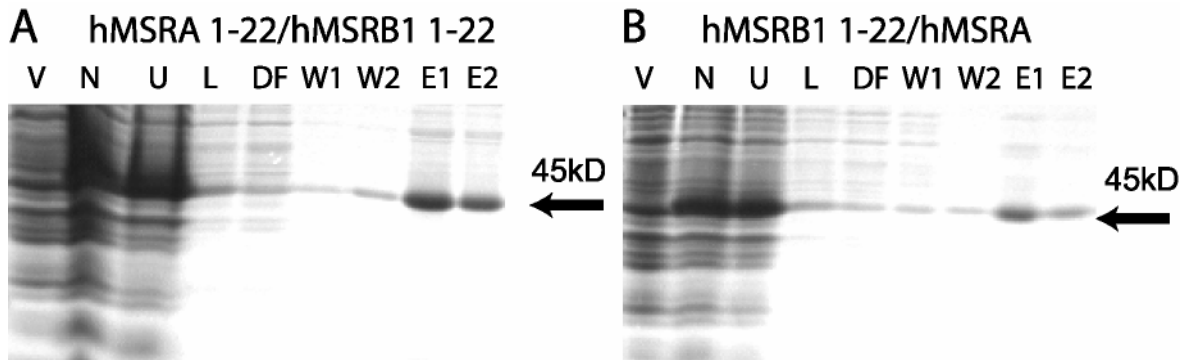


Abb. 4.3: Expression von hMSRA/MSRB-Fusionsproteinen bei 20°C (15 %-tiges SDS-Gel)
 (A) Expression des Fusionsprotein hMSRA[?] 1-22/hMSRB1[?] 1-22 bei 20 °C und 0,5 mM IPTG als Induktor;
 (B) Expression des Fusionsprotein hMSRB1[?] 1-22/hMSRA bei 20 °C und einer 0,5 mM IPTG als Induktor.
 Die Spuren enthalten folgende Proben: V (vor Induktion), N (nach Induktion), U (unlösliches Protein), L (lösliches Protein), DF (Durchfluss der Ni-NTA-Säule), W1/W2 (Waschpuffer über Ni-NTA-Säule) und E1/E2 (Elution des an der Ni-NTA-Säule gebundenen Proteins mit 50-250 mM Imidazol). Die Pfeile geben die über Proteinmarker ermittelten Größen der Proteine an.

4.4 AKTIVITÄTSMESSUNG DER MSR-VARIANTEN

4.4.1 Aktivitätsmessung der MSR-Varianten mit MetO-haltigen Peptiden und DTT

MSR-Enzyme können DTT als Reduktionsmittel für ihre Reduktaseaktivität verwenden (Moskovitz *et al.*, 1996). Die Aktivität der exprimierten Enzyme mit DTT wurde untersucht und verglichen. Als Maß für die Aktivität der MSR-Enzyme mit DTT wurde der Anteil an reduziertem Peptid (KIFMK; MW = 707 Da) in Relation zur Menge an oxidiertem Peptid (KIFM(O)K; MW = 723 Da) ermittelt. Der Anteil an reduziertem Peptid in Relation zur Gesamtmenge an Peptid wurde mit MALDI-TOF-MS quantifiziert. Eine Anlagerung von Alkalimetall-Ionen bei der Analyse per MALDI-TOF-MS wurde durch Anwendung der Dünnschicht-Präparations-Methode (Vorm und Roepstorff, 1994) vermieden. Diese Methode erlaubt durch robuste Matrixablagerung ein mehrfaches Waschen der Probenpräparationen mit 0,1 %-iger TFA-Lösung, wobei Alkalimetall-Ionen entfernt werden. Es wurde eine Eichkurve mit definierten Gemischen aus oxidiertem/reduziertem Peptid ermittelt (s. Abb. 4.4).

Die Verhältnisse von Methioninsulfoxid- und Methionin enthaltenden Peptiden in definierten Mengen ergeben sich direkt aus der Auswertung der Massenspektren dieser Peptidmischungen. In Proben, die ausschließlich KIFMK (Abb. 4.4b) oder KIFM(O)K

(Abb. 4.4d) enthalten sollten, sind $4,9 \pm 2,8 \%$ bzw. $5,0 \pm 4,6 \%$ Peptide der jeweils anderen Spezies enthalten.

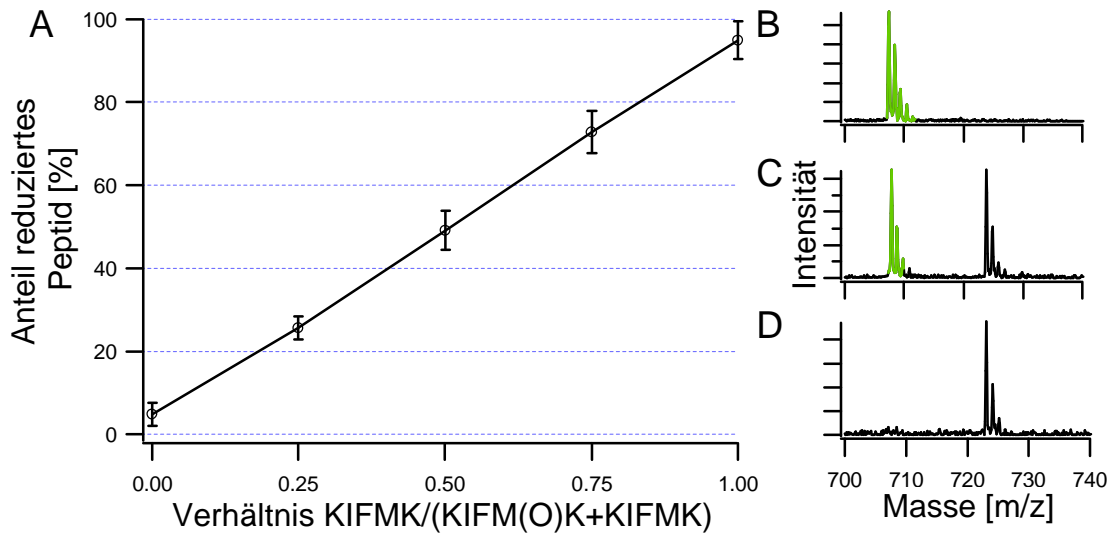


Abb. 4.4: MALDI-TOF-MS-Analyse von definierten Peptidmischungen.

(A) 20 pmol der jeweiligen Peptidgemische wurden mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Die Anteile der verschiedenen Peptidspezies wurden quantifiziert. Die gemessenen Anteile der reduziertes Methionin enthaltenden Peptide (KIFMK) wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung aus 6 Versuchen dargestellt. MALDI-TOF-MS-Spektren des reduzierten Peptids (B), des Gemisch aus reduziertem und oxidiertem Peptid im Verhältnis 1:1 (C) und des oxidierten Peptids (D). Die Masse des reduzierten Peptids beträgt 707 Da (grün); die des oxidierten Peptids 723 Da.

Zur Bestimmung der MSR-Aktivität wurden 10 mM DTT eingesetzt. Diese Konzentration ist für die Reaktion bei den verwendeten Bedingungen im Sättigungsbereich und somit nicht limitierend.

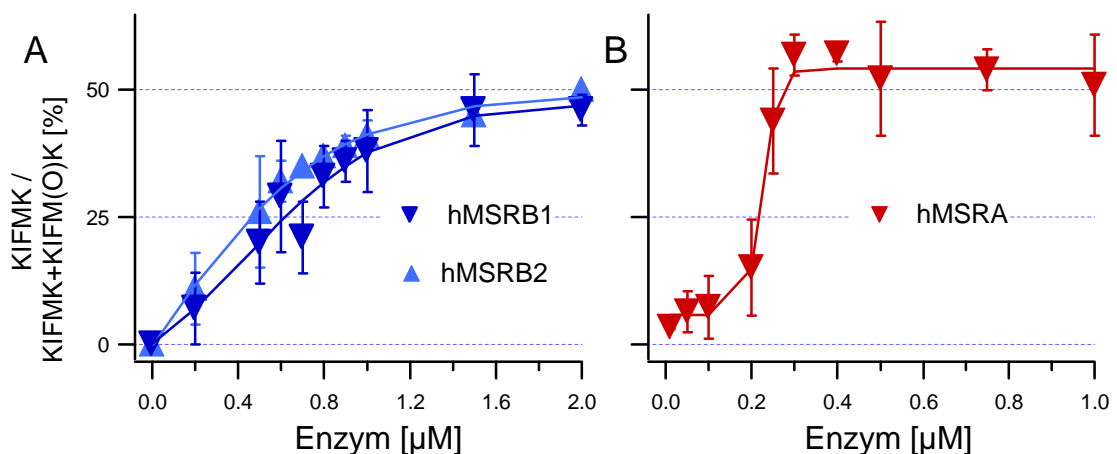


Abb. 4.5: Enzymaktivität der verschiedenen MSR-Varianten mit DTT als Reduktionsmittel.

(A) Inkubation des Methioninsulfoxid-enthaltenden Peptids mit verschiedenen Konzentrationen an hMSRB1 (dunkelblau) und hMSRB2 (hellblau) (n=7) (B) Inkubation des Methioninsulfoxid-enthaltenden Peptids mit verschiedenen Konzentrationen an hMSRA (rot) als Vergleich (n=7). Die Kurven für die MSRB-Enzyme wurden über eine Einfach-exponentiale Funktion den Werten angepasst. Für hMSRA erfolgte keine Anpassung.

Um die Hälfte an eingesetztem Substrat während der einstündigen Inkubation umzusetzen, wurde eine Enzymaktivität von $0,6 \mu\text{M}$ hMSRB1 benötigt. In $200 \mu\text{M}$ MetO-haltiges Peptid waren ca. $100 \mu\text{M}$ Met-R-O-haltiges Substrat enthalten. Nach folgender Berechnung (Enzymkonzentration [μM] / Substratkonzentration [μM] / Zeit [min]) ergibt sich somit für hMSRB1 die Umsatzzahl von 2,8 Moleküle Substrat pro Minute (Abb. 4.5; dunkelblau). Für hMSRB2 liegt die ermittelte Konzentration für halbmaximalen Umsatz bei $0,45 \mu\text{M}$ und einer Umsatzzahl von 3,7 Molekülen Substrat pro Minute (Abb. 4.5; hellblau). Für hMSRA liegt die ermittelte Konzentration für halbmaximalen Umsatz bei $0,23 \mu\text{M}$. Daraus ergibt sich eine Umsatzzahl von 7,2 Molekülen Substrat pro Minute (Abb. 4.5; rot). Für hSELX U95C konnte bei einer Konzentration von bis zu $100 \mu\text{M}$ keine Aktivität gemessen werden ($n=3$).

Mit dem Reduktionsmittel Glutathion (15 mM) konnte keine MSR-Aktivität nachgewiesen werden.

4.4.2 Aktivitätsmessung der MSR-Varianten mit MetO-haltigen Peptiden und dem Thioredoxin-System

Im physiologischen Kontext besteht der Elektronendonator der MSR-Enzyme aus den Komponenten Thioredoxin, Thioredoxinreduktase und $\text{NADPH}+\text{H}^+$ (Ejiri, 1979). $\text{NADPH}+\text{H}^+$ fungiert als letzter Donor in der Elektronenübertragungskette von MSR (s. Abb. 1.2). Reduziertes $\text{NADPH}+\text{H}^+$ und oxidiertes NADPH können über ihre Absorptionsmaxima unterschieden werden. $\text{NADPH}+\text{H}^+$ verfügt im Vergleich zum oxidierten NADPH über ein zusätzliches Absorptionsmaximum bei 340 nm . Somit wurde über die Absorption bei 340 nm indirekt die MSR-Aktivität der exprimierten Enzyme mit dem physiologischen System untersucht und verglichen. Die Absorptionswerte von NADPH wurden normiert, in Relation zum Zeitpunkt 0 gestellt und grafisch aufgetragen. Zusätzlich wurden die Ansätze nach erfolgter Reaktion per MALDI-TOF-MS analysiert, um die absoluten Werte der Reduktion zu erhalten (s. Abb. 4.6).

Als Kontrolle wurde eine Probe ohne Enzym verwendet. Diese Kontrolle zeigte trotz fehlenden Enzyms eine stetige, leichte Abnahme der Absorption von NADPH über den gesamten Messzeitraum an (Abb. 4.6a-c). Bei einer Enzymkonzentration von $5 \mu\text{M}$ hMSRB1 und höher war eine stetige Verringerung der NADPH-Absorption zu beobachten. Nach ca. 40 min wurde im Vergleich zur Kontrolle keine weitere Verringerung der Absorption von NADPH gemessen (Abb. 4.6a). Mittels MALDI-TOF-MS wurde nach Inkubation ein Anteil von $44,2 \%$ ($5 \mu\text{M}$ hMSRB1) bzw. $46,6 \%$ ($7 \mu\text{M}$ hMSRB1) des

reduzierten Peptids nachgewiesen (4.6d; dunkelblau). Es wurde eine Enzymkonzentration von $2,1 \mu\text{M}$ hMSRB1 eingesetzt, um einen halbmaximalen Umsatz des Substrates zu erzielen, woraus sich eine Umsatzzahl von 0,4 Molekülen Substrat pro Minute errechnet. Die Berechnung erfolgte mit derselben Gleichung wie in 4.4.1 angegeben, jedoch wurde für die Versuche mit dem TRX-System nur $100 \mu\text{M}$ Met-O-haltiges Peptid bzw. $50 \mu\text{M}$ Met-R-O verwendet.

Für hMSRB2 wurde ab einer Enzymkonzentration von $5 \mu\text{M}$ eine rasche Abnahme der NADPH-Absorption beobachtet. Nach 40 min endete im Vergleich zur Kontrolle die Verringerung der Absorption (Abb. 4.6b). Die Analyse der Proben mit MALDI-TOF-MS zeigten, dass schon ab einer Enzymkonzentration von $3 \mu\text{M}$ hMSRB2 ein Anteil von ca. 47 % reduziertes Peptid in der Probe enthalten war (Abb. 4.6d; hellblau). Es wurde eine Enzymkonzentration von $1,6 \mu\text{M}$ hMSRB2 eingesetzt, um einen halbmaximalen Umsatz des Substrates zu erzielen, woraus sich eine Umsatzzahl von 0,5 Molekülen Substrat pro Minute errechnet.

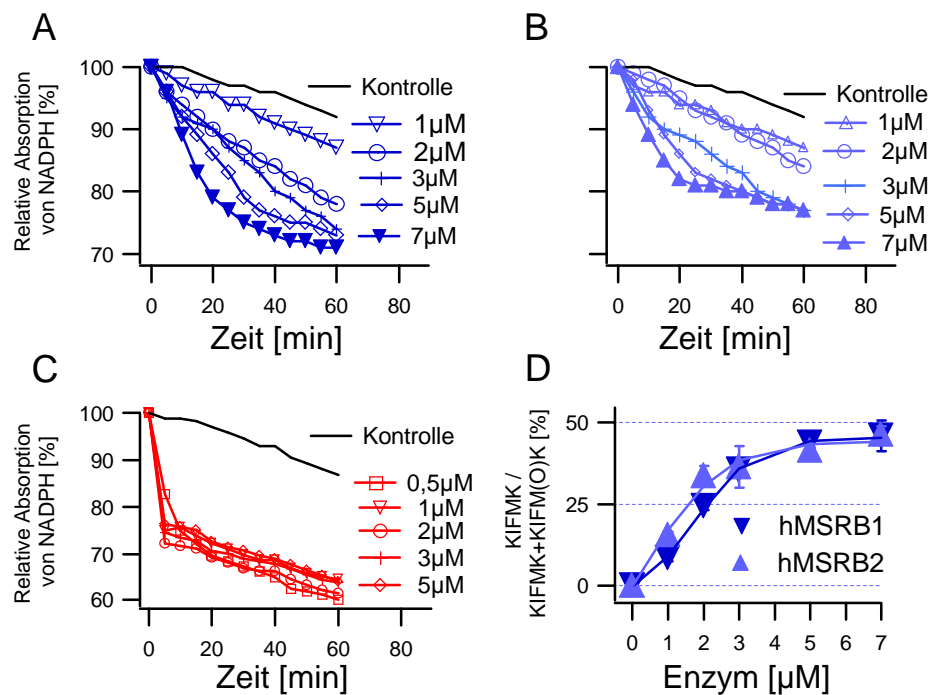


Abb. 4.6: Enzymaktivität der MSR-Varianten mit dem Thioredoxin-System.

Photometrische Messung bei Inkubation des KIFM(O)K-Peptids mit verschiedenen Konzentrationen von (A) hMSRB1 (dunkelblau) und (B) hMSRB2 (hellblau) und (C) hMSRA (rot) in Anwesenheit des TRX/TR/NADPH-Systems bis ein Stillstand der NADPH-Absorption bei 340 nm eintrat. Ein Reaktionsansatz ohne Enzym diente als Kontrolle. (D) Enzymaktivität der verschiedenen MSR-Varianten mit TRX über MALDI-TOF-MS-Analyse. Grafische Darstellung des Anteils an reduziertem Peptid nach Inkubation mit unterschiedlichen Enzymkonzentrationen (hMSRB1: dunkelblau; hMSRB2: hellblau). Die Kurven für (D) wurden über eine Einfach-exponentiale Funktion den Werten angepasst.

Zum Vergleich wurden verschiedene Konzentrationen an MSRA eingesetzt. Bei allen verwendeten Konzentrationen war eine rasche Abnahme in der NADPH-Absorption nach

10 min zu beobachten. Anschließend war im Vergleich zur Kontrolle keine weitere Verringerung der Absorption zu detektieren (Abb. 4.6c). So wurde schon bei einer Enzymkonzentration von 0,5 μM MSRA eine 50 %-ige Reduktion des Substrates mit MALDI-TOF-MS beobachtet (Daten nicht gezeigt).

4.4.3 Aktivitätsmessung der MSR-Varianten mit freiem MetO und DTT

Da MSR-Enzyme auch freies Methionin reduzieren können (Ejiri *et al.*, 1979), wurde die Aktivität der MSR-Varianten mit freiem Methionin als Substrat gemessen und verglichen. Einzelne Aminosäuren sind zu klein, um sie mit MALDI-TOF-MS detektieren zu können. Deshalb wurden die freien Methioninsulfoxide nach MSR-Inkubation mit DNFB (=2,4-Dinitrofluorobenzol) derivatisiert und per RP-HPLC analysiert (Sausen und Elfarra, 1990; Duescher *et al.*, 1994).

Freies Methionin wurde nach ca. 13 min von der Säule gewaschen; Methioninsulfoxid nach ca. 6 min. Inkubation mit 5 μM hMSRA (Abb. 4.7b) führte zu einer Detektion von 33,6 % freiem Methionin (Abb. 4.7a). Inkubation mit 50 μM hMSRB1 resultierte in 22,8 % freiem Methionin (Abb. 4.7b). Eine Inkubation mit 50 μM hMSRB2 (Abb. 4.7c) führte zu 51,3 % reduziertem Methionin.

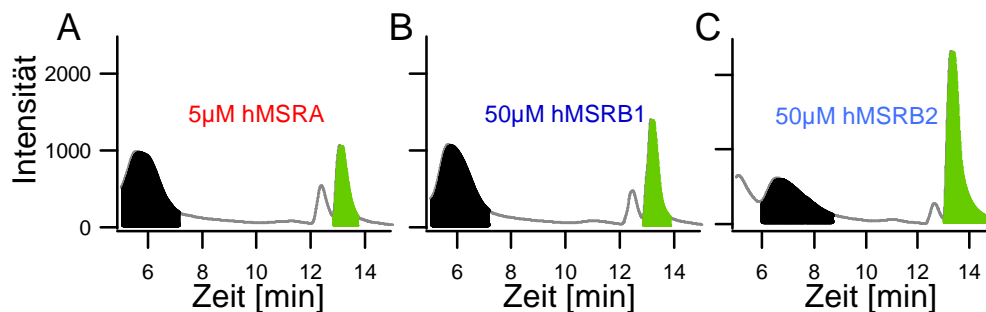


Abb. 4.7: Reverse-Phase HPLC-Chromatogramme der Methioninsulfoxide nach Inkubation mit den MSR-Varianten. Freies Methionin und Methioninsulfoxid wurde nach Inkubation mit verschiedenen MSR-Varianten mit DNFB derivatisiert und per RP-HPLC analysiert. (A) Reverse-phase-HPLC-Chromatogramm mit freiem Methionin (grün) und freiem Methioninsulfoxid (schwarz). Methioninsulfoxid nach einstündiger Inkubation mit 5 μM hMSRA (B); 50 μM hMSRB1 (C) und 50 μM hMSRB2 (D) (n=3).

4.4.4 Nachweis der MSRB-Aktivität der identifizierten MSR-Varianten

Um zu zeigen, dass die charakterisierten Proteine Methioninsulfoxidreduktasen vom Typ B sind, wurde das Thioredoxin-System mit MetO-haltigen Peptiden verwendet. Das Peptidgemisch wurde zuerst mit MSRA inkubiert, bis ein Stillstand der NADPH-Absorption zu beobachten war (Abb. 4.8a). Dadurch wurden aus dem Met-R-O/Met-S-O-Peptidgemisch ausschließlich Met-R-O-haltige Peptide erzeugt. Die MALDI-TOF-MS-Analyse verifizierte ca. 47 % reduziertes Peptid (Abb. 4.8b). Anschließend wurde

hMSRB1 (dunkelblau) bzw. hMSRB2 (hellblau) zugegeben, was in einer weiteren Abnahme der NADPH-Absorption resultierte. Die mit MALDI-TOF-MS ermittelte Gesamtmenge an reduziertem Peptid war nach Zugabe von hMSRB1 (dunkelblau) ca. 88 % und bei hMSRB2 (hellblau) ca. 92 %. Erneute Zugabe von hMSRA erzielte weder eine weitere Abnahme der NADPH-Absorption noch konnte eine Zunahme an reduziertem Peptid mit MALDI-TOF-MS bestätigt werden. Auch bei einer vertauschten Inkubationsreihenfolge wurde mit den MSRB-Enzymen nur 50 % des Substrats umgesetzt und erst nach Inkubation mit MSRA konnte eine vollständige katalytische Umsetzung des Substrats erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

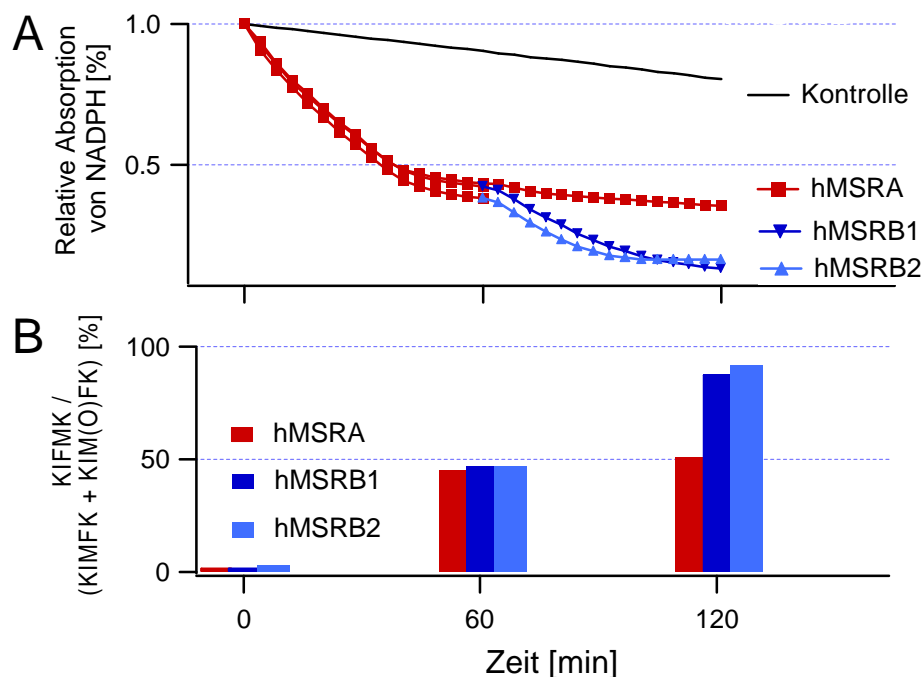


Abb. 4.8: Enzymaktivität der verschiedenen MSR-Varianten mit dem Thioredoxin-System.

(A) Photometrische Messung der Absorption von NADPH+H⁺ bei 340 nm. Inkubation des KIFM(O)K-Peptids mit hMSRA in Anwesenheit des TRX/TR/NADPH-Systems bis ein Stillstand der NADPH-Absorption eintrat (60min). Zugabe von hMSRB1 (dunkelblau) und hMSRB2 (hellblau) resultierte in einer weiteren Abnahme der NADPH-Absorption. Zugabe von hMSRA (rot) erzielte keinen weiteren Effekt. Die Kontrolle enthielt den Reaktionsansatz ohne MSR-Enzym. (B) MALDI-TOF-MS-Analyse zur Darstellung des Anteils an reduziertem Peptid (KIFMK) im Ansatz vor der Inkubation (0 min), nach MSRA-Inkubation (60 min) und nach weiterer Inkubation mit hMSRA (rot), hMSRB1 (dunkelblau) und hMSRB2 (hellblau) (Jung *et al.*, 2002).

4.4.5 Einfluss von Zink auf die MSR-Aktivität

Die MSRB der Unterklasse I enthalten in ihrer Proteinsequenz ein Zink-Binde-Motiv (CxxC) (Kumar *et al.*, 2003). Die identifizierten humanen Methioninsulfoxidreduktasen hMSRB1, hMSRB2 und hSELX gehören dieser Unterklasse an. Um zu überprüfen, ob Zink einen Einfluss auf die Aktivität dieser Enzyme hat, wurden verschiedene Zinkhaltige

Puffer sowie der Zink-Chelator EDTA im DTT-Assay verwendet. Die Kontrolle ohne Zinkhaltigen Puffer wurde normiert und gegen die weiteren Proben verglichen. Für eine Enzymkonzentration von $0,5 \mu\text{M}$ hMSRB1 konnte mit Zinkchlorid (=ZnCl₂) gezeigt werden, dass die Aktivität gesteigert wurde. Bei $10 \mu\text{M}$ bzw. $100 \mu\text{M}$ ZnCl₂ wurde eine leichte Erhöhung der Aktivität um 10 % bzw. 43 % gegenüber der Kontrolle (ohne Zink und ohne Chelator) gemessen. Eine Konzentration von 1 mM ZnCl₂ reduzierte die Aktivität auf 35 %. Bei Verwendung von $10 \mu\text{M}$ ZnAc (Zinkacetat) bzw. $10 \mu\text{M}$ ZnSO₄ (Zinksulfat) wurde eine erhöhte Aktivität von 18 % bzw. 19 % gemessen. Wurde der Zink-Chelator EDTA den Proben zugesetzt, wurde bei Konzentrationen von $0,5 \text{ mM}$; 1 mM und 5 mM jeweils eine Erhöhung der Aktivität um 38 %; 12 % und 3 % ermittelt (Abb. 4.9a). Für hMSRB2 wurde bei einer Enzymkonzentration von $0,4 \mu\text{M}$ bei keinem der verwendeten Zink enthaltenden Puffer eine erhöhte Aktivität festgestellt. Der Einsatz von 1 mM ZnCl₂ führte zur Verringerung der Aktivität auf 13 %. Wurde EDTA in den Konzentrationen von 1 mM bzw. 5 mM eingesetzt, konnte eine Erhöhung der Aktivität um 20 % und 24 % beobachtet werden. Eine EDTA-Konzentration von $0,5 \text{ mM}$ bewirkte keine Veränderung der Aktivität (Abb. 4.9b).

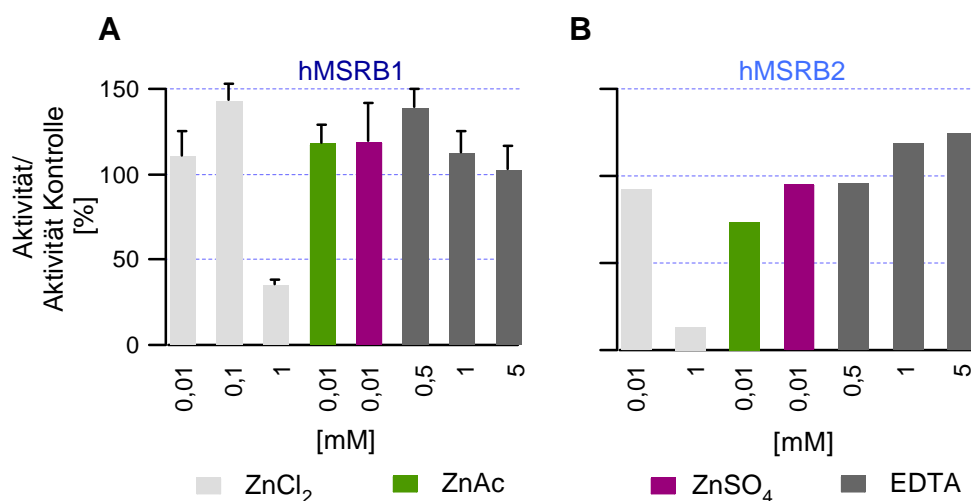


Abb. 4.9: Einfluss von Zink auf die Aktivität von Säuger-MSRB.

Enzymaktivität von (A) $0,5 \mu\text{M}$ hMSRB1 ($n=4$) und (B) $0,4 \mu\text{M}$ hMSRB2 ($n=2$) mit DTT unter Verwendung verschiedener Zinkhaltiger Puffer sowie dem Zink-Chelator EDTA. Die gemessenen Werte wurden normiert und mit der Kontrolle (ohne Zink und EDTA) verglichen.

4.4.6 Aktivitätsmessung der MSR-Fusionsproteine

Die nach den zwei Klonierungsstrategien (s. 4.2.2) exprimierten MSR-Fusionsproteine wurden auf ihre Aktivität mit DTT als Reduktionsmittel sowie mit dem Thioredoxin-System untersucht. Dazu wurden die KIFM(O)K-Peptide als Substrat verwendet und eine Stunde lang mit den Fusionsproteinen inkubiert. Für das Fusionsprotein in der MSR/B/A-

Orientierung wurde eine ca. 72 %-ige Reduktion des KIFM(O)K-Peptids mit DTT bei einer Konzentration von 0,5 μM erreicht und eine vollständige Reduktion mit 94 % Anteil an dem KIFMK-Peptid bei einer Konzentration von 5 μM . Für eine 75 %-ige Reduktion des KIFM(O)K-Peptids mit DTT war vom Fusionsprotein in der MSRB/A-Orientierung eine Konzentration von 5 μM notwendig (Abb. 4.10a; lila). Bei 10 μM MSRA/B-Fusionsprotein war eine fast vollständige Reduktion des Substrats mit 89 % Anteil an KIFMK-Peptid gemessen worden (Abb. 4.10a; grün). Als Kontrolle wurde das Substrat mit MSRA und MSRB in den angegebenen Konzentrationen inkubiert (Abb. 4.10a; schwarz). Die Kontrolle reduzierte bei einer Enzymkonzentration von 1 μM MSRA und MSRB fast vollständig das Substrat.

Die Versuche mit dem Thioredoxin-System zeigten, dass ab einer Enzymkonzentration von 5 μM mit MSRB/A eine fast vollständige Reduktion des Peptids erzielt wurde (Abb. 4.10a; lila). Im Vergleich dazu wurde bei einer Konzentration von 10 μM MSRA/B eine Reduktion von ca. 70 % erzielt (Abb. 4.10b; grün). Als Kontrolle diente eine zeitgleiche Applikation mit MSRA und MSRB. Ab einer Konzentration von 3 μM MSRA und MSRB wurde eine fast vollständige Reduktion des Substrats gemessen (Abb. 4.10b; schwarz).

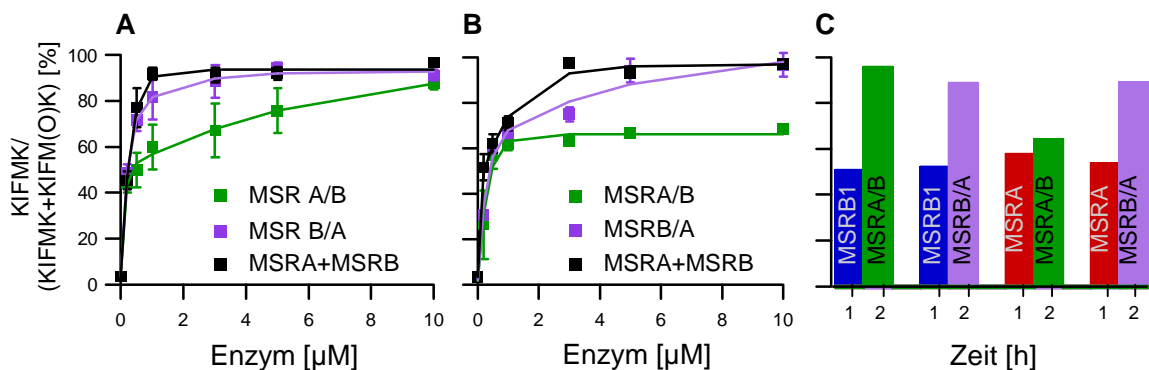


Abb. 4.10: Enzymaktivität der MSR-Fusionsproteine.

(A) Der Anteil an reduziertem Peptid wurde nach einstündiger Inkubation mit den MSR-Fusionsproteinen mit DTT als Reduktionsmittel ($n=8$) und (B) dem physiologischen Thioredoxin-System über MALDI-TOF-MS ermittelt ($n=5$) (MSRA/B, grün; MSRB/A, lila; MSRA+MSRB, schwarz). (C) Analyse der Aktivität der einzelnen MSR-Komponenten der Fusionsproteine. Zuerst erfolgte eine Inkubation des Substrats für eine Stunde mit MSRB1 (blau) oder MSRA (rot). Dann wurde jeweils MSRA/B (grün) und MSRB/A (lila) zugegeben. Der Anteil an reduziertem Peptid wurde über MALDI-TOF-MS ermittelt ($n=2$).

Zur Analyse der einzelnen Komponenten mit dem Thioredoxin-System wurde das oxidierte Peptid jeweils mit hMSRA (Abb. 4.10c, rot) bzw. hMSRB1 (Abb. 4.10c, blau) für eine Stunde inkubiert und ein Anteil von ca. 50 % reduziertem Peptid per MALDI-TOF-MS gemessen. Dadurch wurden jeweils Met-S-O bzw. Met-R-O als Substrat für die anschließende Inkubation mit den Fusionsproteinen erzeugt. Das MSRA/B-Fusionsprotein (Abb. 4.10c; grün) reduzierte das Met-S-O fast vollständig, jedoch wurde keine weitere

Reduktion mit Met-R-O als Substrat gemessen. Das MSRB/A-Fusionsprotein reduzierte sowohl das Met-R-O als das Met-S-O fast vollständig (Abb. 4.10c; lila).

4.5 CHARAKTERISIERUNG DES REAKTIONSMECHANISMUS HUMANER MSRB-ENZYME

4.5.1 Identifizierung von essentiellen Stellen in humanen MSRB-Enzymen

Da der Reaktionsmechanismus der MSRB-Enzyme zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht aufgeklärt war, sollten die für die Aktivität der humanen MSRB-Enzyme essentiellen Aminosäuren identifiziert werden. Abb. 4.11 zeigt einen Vergleich der humanen MSRB mit homologen MSRB-Enzymen verschiedener Organismen. In hCBS1 konnten 8 Cysteine identifiziert werden, wovon 5 Cysteine konserviert und 3 Cysteine nicht-konserviert vorliegen (C45, C92 und C105). Das konserviert vorliegende Cystein C169 bildet mit Serin S172 ein so genanntes CxxS-Motiv (Cystein getrennt von Serin durch zwei beliebige Aminosäuren) aus (Abb. 4.11; rot). Dieses CxxS-Motiv konnte häufig in Redox-Enzymen wie TRX nachgewiesen werden, wo es zur Reduktion von intra- und intermolekularen Disulfidbrücken verwendet wird (Arner und Holmgren, 2000; Fomeko und Gladyshev, 2002, 2003). In humanem SELX (Lescure *et al.*, 1999) bzw. SELR aus Mäusen (Moskovitz *et al.*, 2002a) ist dieses Cystein durch ein Selenocystein ersetzt.

Die konserviert vorliegenden Cysteine C90, C93, C146 und C149 bilden zwei so genannte CxxC-Motive (zwei Cysteine getrennt durch zwei beliebige Aminosäuren) aus (Abb. 4.11, grün). CxxC-Motive in Proteinen können entweder Zink binden oder als aktive Zentren von Redox-Proteinen fungieren (Fomenko und Gladyshev, 2003).

Das Threonin T108 in hMSRB1 befindet sich an homologer Position zu dem zweiten konservierten Cystein der MSRB-Enzyme der Unterklasse II (Abb. 4.11; hellblau).

Das Tryptophan W110 (Abb. 4.11; dunkelblau) liegt in der Sequenz GCGWPSF, welche eine starke Homologie zum MSRA-Sequenzmotiv GCFWG aufweist. Eine Mutation einer der zwischen den Glycinen liegenden Aminosäuren führte zu sofortigem Aktivitätsverlust (Moskovitz *et al.*, 2000).

Somit wurden während der Analyse der MSRB-Enzyme 5 konservierte Cysteine, drei nicht-konservierte Cysteine, ein Serin, ein Threonin und ein Tryptophan als putative Teilnehmer des Reaktionsmechanismus identifiziert und durch Mutagenese (QuikChange) ausgetauscht. Die daraus resultierenden Mutanten wurden exprimiert, aufgereinigt, konzentriert (Abb. 4.12) und auf ihre Aktivität im Vergleich zum Wildtyp getestet.

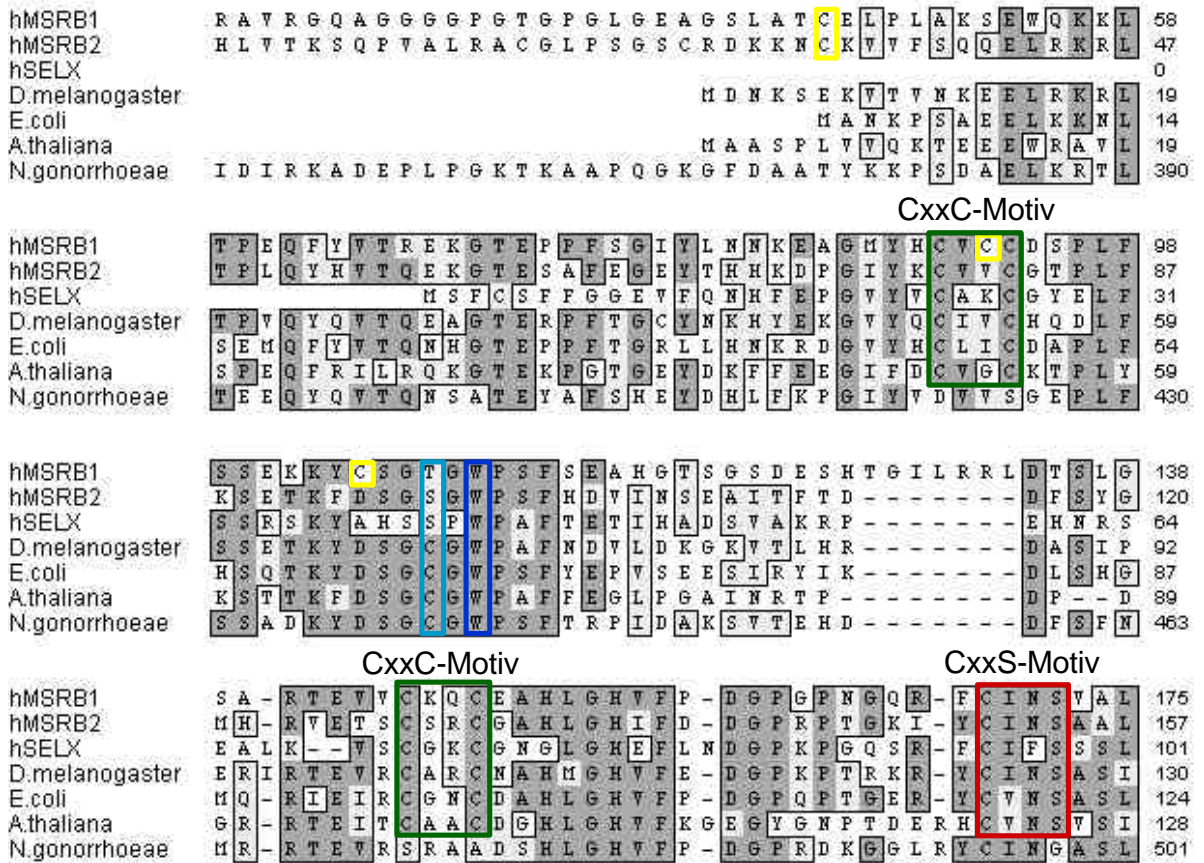


Abb. 4.11: Homologievergleich verschiedener MSRB-Proteinsequenzen.

hMSRB1 Aminosäuren, die zur Identifikation des Reaktionsmechanismus mutiert wurden, sind farbig markiert. Drei nicht-konservierte Cysteine (C45, C92 und C105; gelb) und 5 konservierte Cysteine wurden identifiziert. C169 formt mit S172 ein CxxS-Motiv (rot) und die Cysteine C90, C93, C146 und C149 formen zwei CxxC-Motive (grün). An homologer Position zu T108 (hellblau) ist in SELX und hCBS2 ein Serin vorzufinden, wohingegen bei den MSRB-Enzymen der Unterklasse II ein Cystein konserviert vorliegt. Tryptophan W110 (dunkelblau) wurde in der zum MSRA-Sequenzmotiv GFCWG homologen Sequenz GCGWPSF identifiziert. Als Proteine wurden hCBS1 (AAD38899), hCBS2 (kodierte durch AL833688), hSELX (kodierte durch AA057045), *Drosophila* MSRB (NP731522), *E. coli* MSRB (NP754077), *A. thaliana* MSRB (AAD03444) und *N. gonorrhoeae* PILB-MSRB (P14930) verglichen. Identische Aminosäuren sind dunkel-grau markiert während ähnliche Aminosäuren durch hell-graue Kästchen markiert sind.

Für Versuche mit DTT wurde eine Enzymkonzentration von 0,7 μ M hMSRB1 gewählt. Diese Enzymkonzentration erzielte eine Reduktion von 40 % mit dem Wildtyp-Enzym. Die Mutanten hMSRB1 C90S; hMSRB1 C90S; C93S; hMSRB1 C146S; C149S und hMSRB1 C169S reduzierten ca. 3 % des KIFM(O)K Peptids, was dem Anteil an reduziertem Peptid in der Kontrolle (ohne Enzym) entspricht. Die Mutanten hMSRB1 C45S, hMSRB1 C92S, hMSRB1 C105S, hMSRB1 T108S und die Dreifach-Mutante hMSRB1 C45S, C92S, C105S reduzierten je ca. 40 % des oxidierten Peptids, also ähnlich dem Wildtyp-Enzym. Die Mutante hMSRB1 T108A reduzierte 14,4 % Substrat; die Mutante hMSRB1 T108C reduzierte 8,4 % Substrat; die Mutante hMSRB1 W110A reduzierte 8,1 % Substrat; die Mutante hMSRB1 S172A reduzierte 13,3 % Substrat und die Mutante hMSRB1 S172C reduzierte 22 % Substrat (Abb. 4.13).

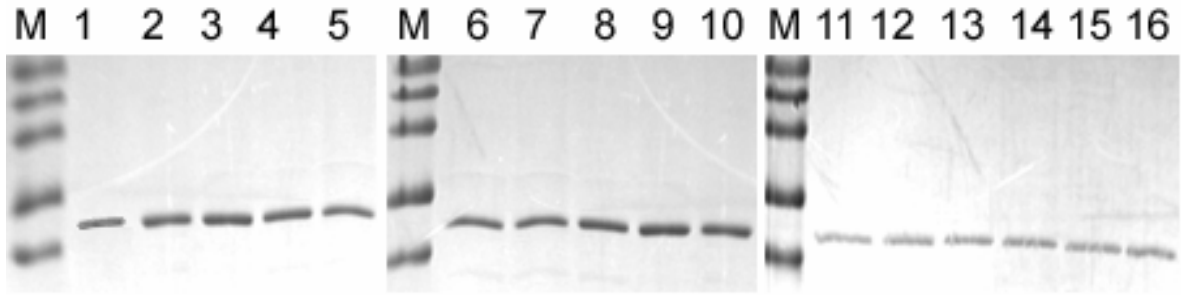


Abb. 4.12: Expression der MSR1B1-Mutanten (11,5 %-iges SDS-Gel).

Die MSR1B1-Mutanten wurden nach Expression über Ni-NTA-Matrices gereinigt, aufkonzentriert und je $3\mu\text{g}$ Protein wurden pro Spur aufgetragen. Die Spuren enthalten folgende Proben: Marker (M); hMSRB1 (1), hMSRB1 C45S (2), hMSRB1 C90S (3), hMSRB1 C90S; C93S (4), hMSRB1 C92S (5), hMSRB1 C105S (6), hMSRB1 T108A (7), hMSRB1 T108C (8), hMSRB1 T108S (9), hMSRB1 W110A (10), hMSRB1 C146S; C149S (11); hMSRB1 C169S (12), hMSRB1 S172S (13), hMSRB1 S172C (14), hMSRB1 C45S; C105S (15), hMSRB1 C45S; C92S; C105S (16).

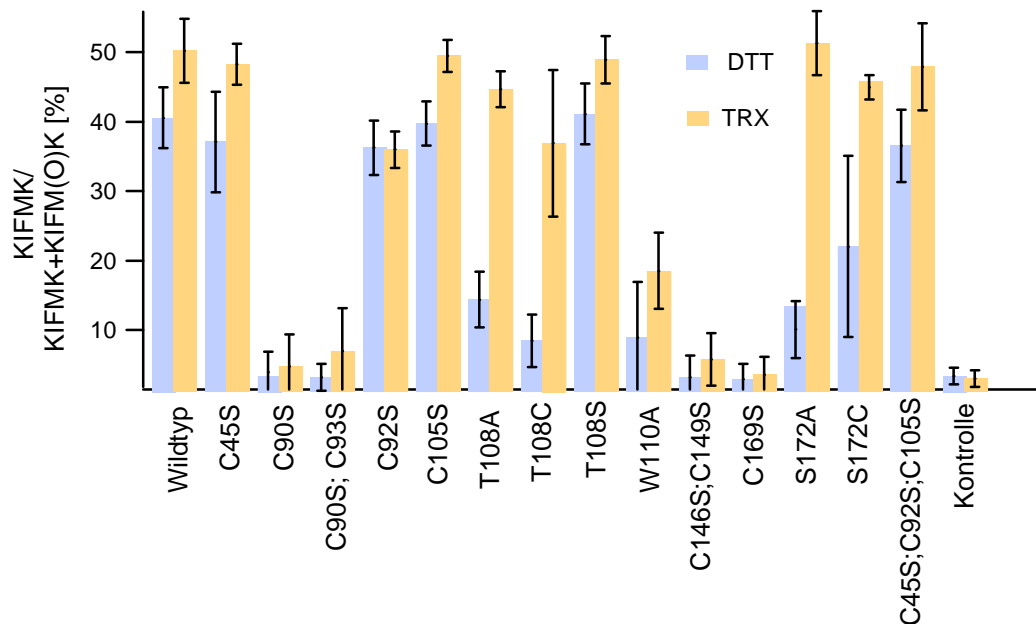


Abb. 4.13: Enzymaktivität der MSR1B1-Mutanten mit DTT und dem Thioredoxin-System.

Enzymaktivität der MSR1B1-Mutanten ($0,7\mu\text{M}$ Enzym) mit DTT als Reduktionsmittel (lila; $n=6-12$) und Enzymaktivität der MSR1B1-Mutanten ($7\mu\text{M}$ Enzym) mit dem Thioredoxin-System (orange; $n=6-13$).

Für die Versuche mit dem Thioredoxin-System wurde eine Enzymkonzentration von $5\mu\text{M}$ gewählt, mit der eine Reduktion von 50 % des Substrats in der Inkubationszeit erzielt wurde. Die Mutanten hMSRB1 C90S; hMSRB1 C90S; C93S; hMSRB1 C146S; C149S und hMSRB1 C169S reduzierten ca. 5 % des KIFM(O)K Peptids, was dem Anteil an reduziertem Peptid in der Kontrolle entspricht. Die Mutanten hMSRB1 C45S, hMSRB1 C105S, hMSRB1 T108S, hMSRB1 S172A, hMSRB1 S172C und die Dreifach-Mutante hMSRB1 C45S, C92S, C105S reduzierten wie der Wildtyp je ca. 50 % des oxidierten Peptids. Die Mutante hMSRB1 C92S reduzierte ca. 36 % Substrat; die Mutante hMSRB1 T108A reduzierte 42,5 % Substrat; die Mutante hMSRB1 T108C reduzierte 30,2 %

Substrat, und die Mutante hMSRB1 W110A reduzierte 18,5 % Substrat (Abb. 4.13).

4.6 PHYSIOLOGISCHE FUNKTION VON MSR-ENZYMEN

4.6.1 Einfluss von MSR-Enzymen auf die Inaktivierungsrate des Shaker C/B-Kanals

Oxidation des Methionin an Position 3 in der aminoterminalen Ballldomäne des *Drosophila* Shaker C/B-Kanals (ShC/B) bedingt eine verlangsamte Inaktivierung des Kanals (Ciorba *et al.*, 1997; 1999; Hoshi und Heinemann, 2001). Koexpression mit hMSRA stellt die schnelle Inaktivierung des Kanals wieder her (Kuschel *et al.*, 1999). Es sollte überprüft werden, ob humane MSRB-Enzyme - ähnlich der MSRA - die schnelle Inaktivierung des ShC/B-Kanals regenerieren können. Dazu wurde in *Xenopus* Froschoozyten RNA des ShC/B-Kanals und der entsprechenden MSR-Enzyme injiziert. Die Messung des Gesamtstroms erfolgte 2 Tage nach Injektion über die 2-Elektroden-Spannungsklemme-Methode. Die gemessenen Kaliumströme bei einer Depolarisation des Membranpotentials von -100 mV auf $+40$ mV wurden normiert und gemittelt.

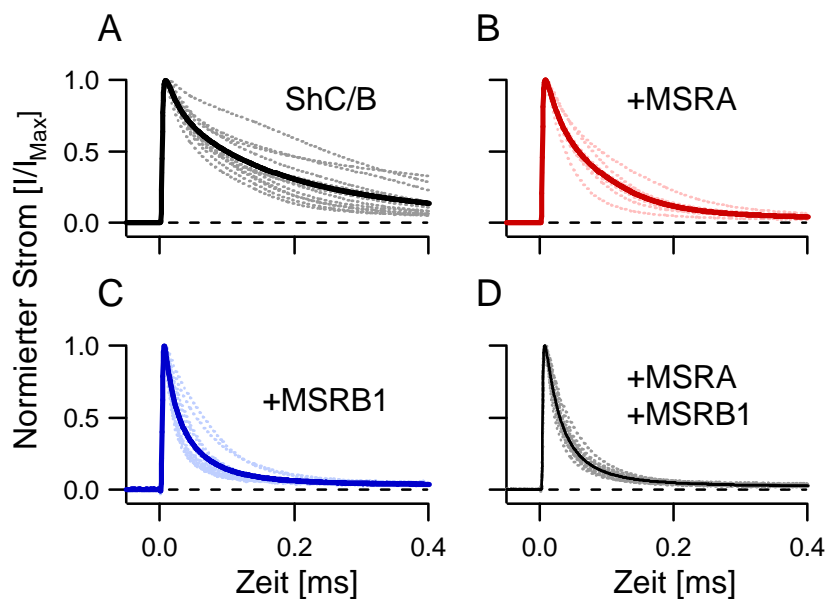


Abb. 4.14: Effekt von MSR auf ShakerC/B-Kaliumkanäle exprimiert in *Xenopus* Oozyten.

Darstellung normierter Kaliumströme der Inaktivierungszeiten des in Oozyten exprimierten ShC/B-Kanals. Die Ströme wurden durch Depolarisation des Membranpotentials von -100 mV auf $+40$ mV ausgelöst. Ströme von individuellen Oozytenmessungen wurden als gestrichelte Linie dargestellt, gemittelte Ströme wurden als ganze Linie dargestellt. (A) Expression des ShC/B-Kaliumkanals (schwarz) (n=12) (B) Koexpression des ShC/B-Kaliumkanals mit hMSRA (rot) (n=9) (C) Koexpression des ShC/B-Kaliumkanals mit hMSRB1 (dunkelblau) (n=13) (D) Koexpression des ShC/B-Kaliumkanals mit hMSRA und hMSRB1 (n=14).

Abb. 4.14a zeigt die normierten Kaliumströme des ShC/B-Kanals. Der gemittelte Zeitverlauf der Inaktivierung ist schwarz markiert. Im Vergleich dazu sind die Inaktivierungsverläufe des ShC/B-Kanals mit hMSRA (Abb. 4.14b; rot) und hMSRB1 (Abb. 4.14c; dunkelblau) gezeigt. Dabei wird ersichtlich, dass die

Inaktivierungszeitkonstanten bei Koexpression mit MSRA (rot) und MSRB1 (dunkelblau) niedriger als ohne MSR-Enzym (schwarz) sind. Somit stellt hMSRB1 genau wie hMSRA die durchschnittliche Inaktivierungsrate von ShC/B wieder her. Eine zeitgleiche Koexpression mit MSRA und MSRB1 (Abb. 4.14d) ergab eine ähnliche Inaktivierung wie die Expression der einzelnen MSR-Enzyme. Diese Ergebnisse konnten in zwei weiteren Versuchen an frisch präparierten Oozyten bestätigt werden (je 10 Oozyten pro Versuch; Daten nicht gezeigt).

4.6.2 Einfluss von Oxidation und MSR-Enzymen auf die Calmodulin-abhängige Inhibierung des hEAG-Kanal

4.6.2.1 Erzeugung von rekombinantem Calmodulin und Calmodulin-Mutanten

Volllänge cDNA von hCalmodulin (=CaM) (Genbank M27319) wurde aus einer cDNA-Bank menschlicher Gehirne amplifiziert (Schönherr *et al.*, 2000). In der Calmodulin-Mutante 1 (=CaM 1) wurden 3 Methionine (M71L; M72L; M76L) durch Leucin ersetzt. Bei der Calmodulin-Mutante 2 (=CaM 2) wurden die Methionine M145 und M146 durch Leucin ausgetauscht. Die Calmodulin-Mutante 1/2 (M71L; M72L; M76L; M144L; M145L) vereinigt die Mutanten CaM 1 und CaM 2. Die Proteine wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert (Abb. 4.15a), aufgereinigt und konzentriert (Abb. 4.15b).

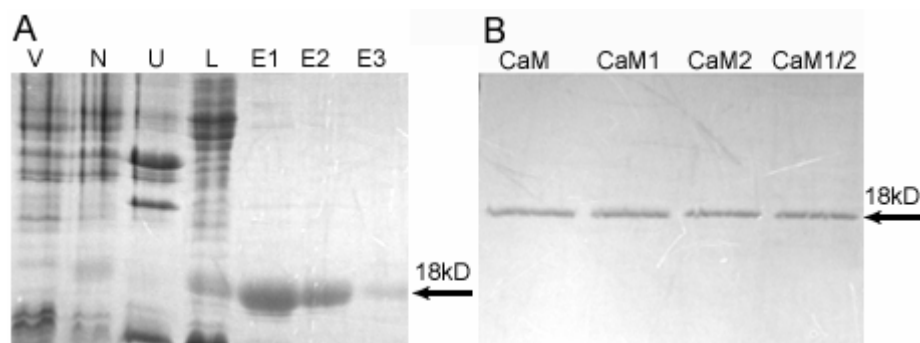


Abb. 4.15: Expression von Calmodulin und Calmodulin-Mutanten (11,5 %-iges SDS-Gel). (A) Überexpression von Calmodulin. Die Spuren enthalten: V (vor Induktion), N (nach Induktion), U (unlösliches Protein), L (lösliches Protein) und E1/E2/E3 (Elution des an der Ni-NTA-Säule gebundenen Proteins mit 50-250 mM Imidazol). (B) Calmodulin und die Calmodulin-Mutanten wurden gereinigt, aufkonzentriert und je 5 µg Protein pro Spur aufgetragen. Die Pfeile geben die über Proteinmarker ermittelten Größen der Proteine an.

4.6.3 Oxidation von rekombinantem Calmodulin

Die Oxidation der in CaM und den CaM-Mutanten vorhandenen Methionine mit Wasserstoffperoxid wurde mit MALDI-TOF-MS überprüft. Dabei wurde das Molekulargewicht des rekombinanten Calmodulin und der Mutanten vor und nach Oxidation gemessen. In Abbildung 4.16 sind beispielhaft die MALDI-TOF-MS-Spektren

von unbehandeltem Calmodulin (CaM_{red} ; MW: 18.336 Da) und oxidiertem Calmodulin ($=\text{CaM}_{\text{ox}}$; MW CaM_{ox} : $18.336 + (10 \cdot 16) = 18.496$ Da) gezeigt. Das gemessene Molekulargewicht lag für CaM_{red} bei 18.341 ± 5 Da, was einer Abweichung von 5 Da zum theoretischen Wert entspricht. CaM_{ox} hat ein um 160 Da höheres Molekulargewicht von 18.496 Da, gemessen wurden 18498 ± 10 Da. Die Abweichung zum errechneten Molekulargewicht beträgt 2 Da. Tab. 4.1 zeigt die Werte der MALDI-TOF-MS-Messungen für CaM und die CaM-Mutanten vor Oxidation, nach Oxidation und nach anschließender Inkubation mit MSR-Enzymen.

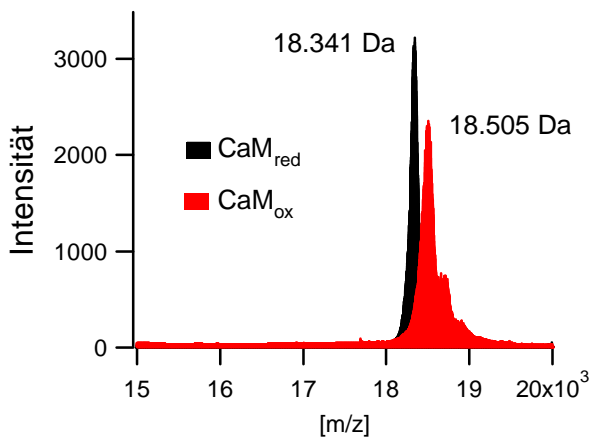


Abb. 4.16: MALDI-TOF-MS-Spektren von Calmodulin vor und nach Oxidation. Das Molekulargewicht von Calmodulin wurde vor (schwarz) und nach 24-stündiger Oxidation mit 500 mM H_2O_2 (rot) durch MALDI-TOF-MS ermittelt.

Die Calmodulin-Mutanten wurden vollständig mit Wasserstoffperoxid oxidiert. Die gemessene Masse erhöhte sich für CaM1_{ox} um 116 Da, für CaM2_{ox} um 121 Da und für $\text{CaM1/2}_{\text{ox}}$ um 83 Da, wobei die Abweichungen der gemessenen Massen zu den theoretischen Massen nicht höher als 10 Da waren. Inkubation des oxidierten Calmodulin mit $10 \mu\text{M}$ hMSRA resultierte in einer Verringerung des Molekulargewichts für CaM_{ox} um 81 Da, für CaM1_{ox} um 47 Da, für CaM2_{ox} um 63 Da und für $\text{CaM1/2}_{\text{ox}}$ um 44 Da. Inkubation des oxidierten Calmodulin mit $10 \mu\text{M}$ hMSRB resultierte in einer Verringerung des Molekulargewichts für CaM_{ox} um 87 Da, für CaM1_{ox} um 57 Da, für CaM2_{ox} um 65 Da und für $\text{CaM1/2}_{\text{ox}}$ um 47 Da. Die Verringerung des Molekulargewichts nach MSR-Inkubation betrug somit ca. die Hälfte der Differenz zwischen den oxidierten und den reduzierten Calmodulin-Proteinen. Nach Inkubation der oxidierten Calmodulin-Proteine mit beiden MSR-Enzymen wurde jeweils eine Masse ähnlich der theoretischen Masse des reduzierten Proteins gemessen (Tab. 4.1).

Tab 4.1: Tabellarische Darstellung der Bestimmung des Oxidationsstatus der rekombinanten Calmoduline.

Die Werte geben für Calmodulin und die Calmodulin-Mutanten jeweils die theoretische Masse (=theor. Masse) sowie die per MALDI-TOF-MS gemessene Masse (=gem. Masse) an. Die Proteine wurden vor und nach 16-stündiger Oxidation mit 500 mM H₂O₂ gemessen. Reduktion der oxidierten Proteine erfolgte für 1 h mit 10 µM hMSRA bzw. 10 µM hMSRB1. Molekulare Massen sind in Dalton angegeben. Zahlen in den Klammern geben die maximale Anzahl der Methionine im Protein an. Es wurden je 10-20 Werte gemessen, der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.

	Reduziert		Oxidiert							
	theor. Masse	gem. Masse	theor. Masse	gem. Masse	Anzahl MetO	+MSRA		+MSRB		+MSRA +MSRB
						gem. Masse	Anzahl MetO	gem. Masse	Anzahl MetO	gem. Masse
CaM	18.336	18.341 ± 1	18 496	18.498 ± 10	10,13 (10)	18.415 ± 20	4,94 (10)	18.411 ± 23	4,69 (10)	18.339 ± 18
CaM 1	18.282	18.283 ± 7	18 394	18.399 ± 10	7,31 (7)	18.342 ± 17	3,75 (7)	18.337 ± 13	3,44 (7)	18.283 ± 15
CaM 2	18.300	18.305 ± 24	18 428	18.426 ± 7	7,88 (8)	18.363 ± 10	3,93 (8)	18.361 ± 16	3,81 (8)	18.299 ± 16
CaM 1/2	18.246	18.243 ± 6	18 326	18.325 ± 10	4,94 (5)	18.281 ± 17	2,19 (5)	18.279 ± 18	2,06 (5)	18.248 ± 13

4.6.4 Interaktion zwischen hEAG C-Terminus und Calmodulin (*in vitro*)

Calmodulin bindet unter Kalziumaufnahme am hEAG Kanal an der Calmodulinbindedomäne (=CBD) des C-terminalen Bereichs zwischen den Aminosäuren 673 bis 770 (Schönherr *et al.*, 2000). Zur Überprüfung der Interaktion zwischen dem Kanal und CaM wurde die Bindung zwischen den Calmodulin-Mutanten und dem hEAG C-Terminus (=hEAG-C) von Dr. Ralf Glaser (Institut für Biochemie und Biophysik, Universität Jena) über Oberflächen-Plasmonen-Resonanz an einem BIAcore 2000 gemessen.

Wie aus Abb. 4.17 zu entnehmen ist, verringerte sich die Anzahl der Bindungsstellen von CaM (schwarz) und CaM1 (grün) während der Oxidation. Die Anzahl der Bindungsstellen von CaM2 (lila) und CaM1/2 (orange) wies dagegen eine kleine Verringerung auf. Wurden die Proteine dann mit MSRA bzw. MSRB inkubiert, war ein deutlicher Anstieg der Affinität bei CaM und CaM1 zu beobachten. Auch bei CaM2 und CaM1/2 konnte ein leichter Anstieg der Bindung beobachtet werden. Bei allen vier Proteinen wurde aber nach Reduktion nicht der Anfangswert der relativen Bindung erreicht.

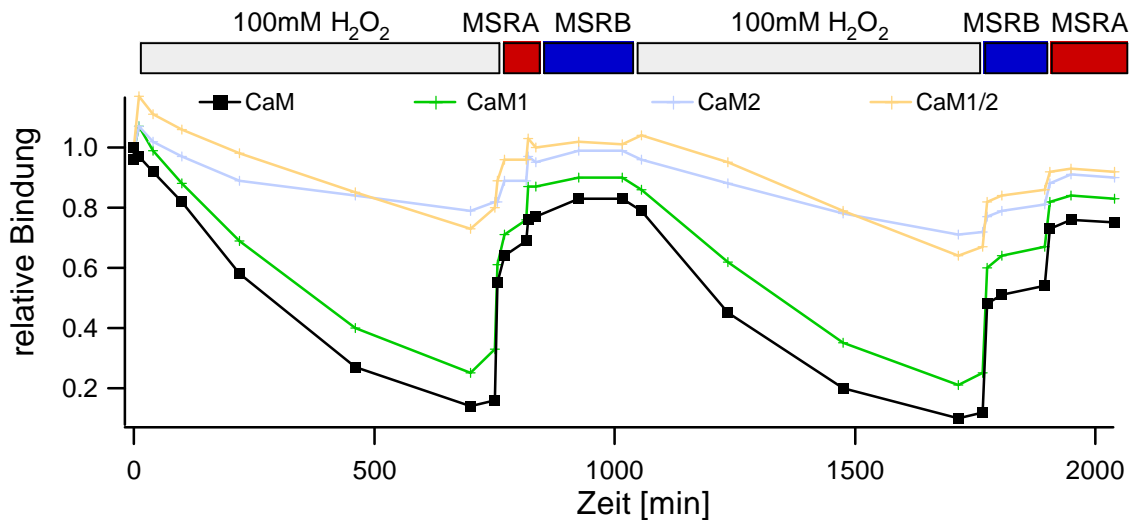


Abb. 4.17: Interaktion von Calmodulin mit hEAG-C nach Oxidation und Reduktion.

Die Interaktion von Calmodulin (schwarz) und Calmodulin-Mutanten (CaM1 = grün; CaM2 = lila; CaM1/2 = orange) wurde über Oberflächen-Plasmonen-Resonanz gemessen. Die gemessene Dichte an gebundenem hEAG-C wurde normiert aufgetragen. Zuerst wurde das auf den Chip gebundene Calmodulin mit 100 mM H_2O_2 (grau) über einen Zeitraum von 12 h oxidiert. Anschließend wurden die Proteine zuerst mit MSRA (rot) und dann mit MSRB (blau) wieder reduziert. Der Oxidations- und Reduktionsvorgang wurde wiederholt, wobei die Reihenfolge der MSR-Enzyme während der Reduktion vertauscht wurde, so dass zuerst mit MSRB und dann mit MSRA reduziert wurde ($n = 2$).

Bei einer weiteren Oxidation mit anschließender umgekehrter Reihenfolge der Reduktion, also erst Inkubation mit MSRB und dann mit MSRA, stieg bei CaM und CaM1 die Bindung sprunghaft an. Der erreichte Endwert der relativen Bindung entsprach ungefähr dem Wert nach der zuerst durchgeführten Reduktion. CaM2 und CaM1/2 wiesen wiederum einen leichten Abfall der Bindung bei Oxidation auf. Während der Reduktion stieg die Bindung wieder leicht an.

4.6.5 Inhibierung des hEAG-Kanals mit Calmodulin und Calmodulin-Mutanten (*in vivo*)

Mit der „Patch-Clamp“-Methode wurde die Hemmung des hEAG-Kanals mit den Calmodulin-Mutanten vor und nach Oxidation gemessen. hEAG mRNA wurde in Oozyten injiziert und der Kaliumstrom nach zwei Tagen gemessen. Dazu wurde eine Pipette direkt an die Zellmembran angesaugt und ein kleiner Membranfleck aus der Zelle herausgerissen („inside-out“-Konfiguration). Anschließend wurden Calmodulin und die Calmodulin-Mutanten über den Membranfleck gespült, um die dort lokalisierten hEAG-Kanäle zu hemmen.

Es erfolgte eine Hemmung der hEAG-Kanäle in dem Membranfleck mit je 20 $\mu\text{g/ml}$ (schwarz), 5 $\mu\text{g/ml}$ (rot) und 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Calmodulin (Abb. 4.18a). Mit 20 bzw. 5 $\mu\text{g/ml}$ Calmodulin wurde eine fast vollständige Hemmung des Kaliumstroms erzielt. Dagegen wurde der Kanal bei einer Konzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ nicht mehr vollständig gehemmt.

Alle weiteren Untersuchungen wurden mit einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ Calmodulin durchgeführt.

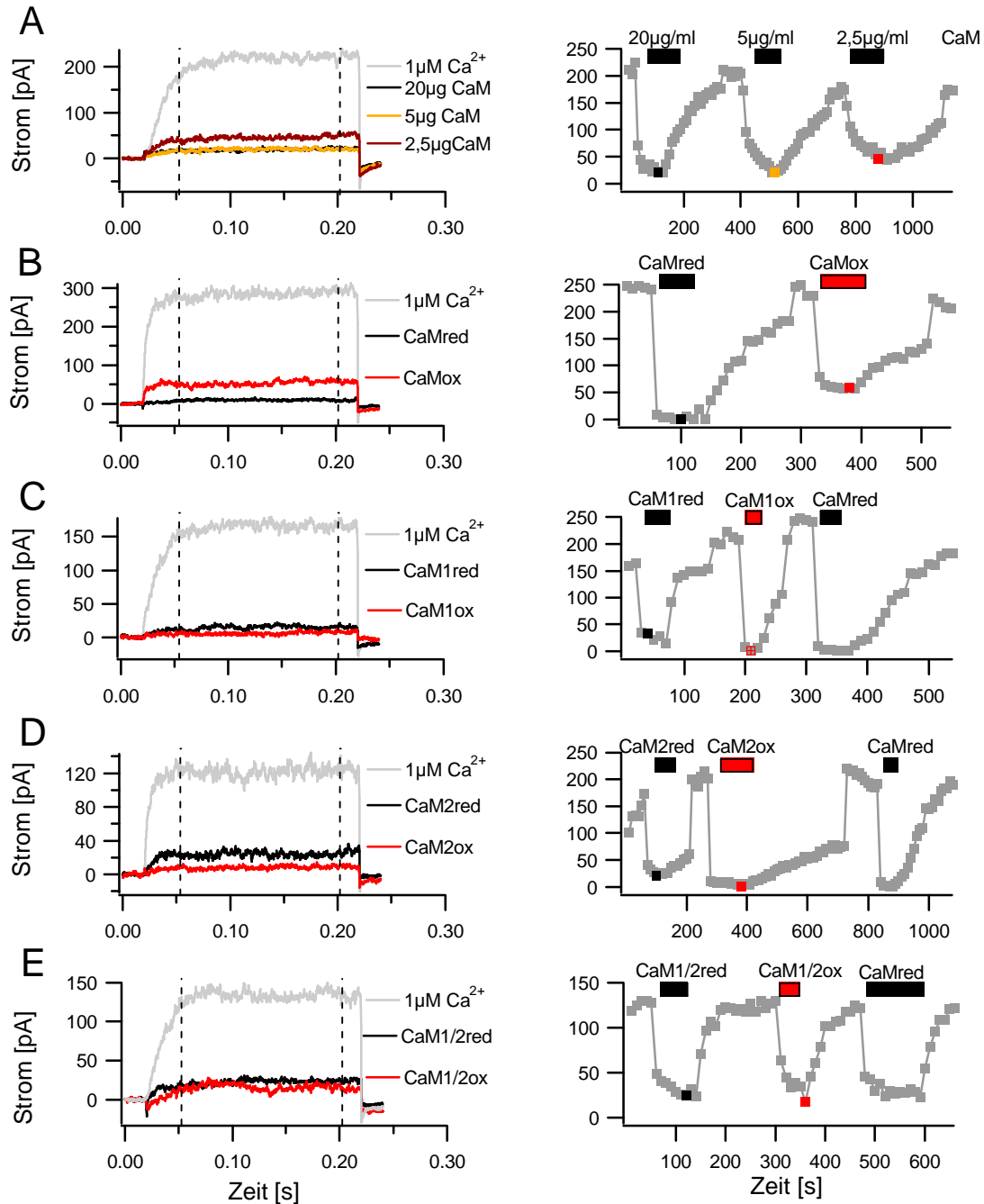


Abb. 4.18: Hemmung des hEAG-Kanals durch CaM und CaM-Mutanten.

Der hEAG-Kanal wurde in *Xenopus* Oozyten exprimiert. Mit einer „Patch-Clamp“-Apparatur wurde ein Membranfleck entfernt und der Kaliumstrom in der „inside-out“ Konfiguration gemessen. Hemmung des Kaliumstroms wurde durch Zugabe von Calmodulin und Calmodulin-Mutanten in Gegenwart von 1 μM Kalzium erzielt (links, hellgrau). (A) Bestimmung der Calmodulinkonzentration zur Hemmung des hEAG-Kanals. Links: hEAG-Ströme mit 20 $\mu\text{g/ml}$ (schwarz), 5 $\mu\text{g/ml}$ (orange) und 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (rot) Calmodulin. Die gestrichelte Linie in der linken Abbildung zwischen 50 bis 200 ms zeigt den für die gemittelte Stromamplitude ausgewählten Bereich an, welcher gegen die Zeit aufgetragen wurde (rechts). Hemmung des hEAG-Kanals durch oxidiertes (rot) und reduziertes (schwarz) (B) Calmodulin, (C) CaM1, (D) CaM2 und (E) CaM1/2.

Eine Zugabe von CaM_{red} (schwarz) führte zu einer sofortigen Hemmung des Kaliumstroms. Wurde oxidiertes Calmodulin (rot) über den Membranfleck gespült, so war auch hier eine Verringerung des Kaliumstroms zu beobachten. Die Abnahme des Stroms war jedoch geringer als mit dem nicht-oxidierten Protein. Wurde der Membranfleck mit CaM1_{red} (Abb. 4.18c), CaM2_{red} (Abb. 4.18d) oder CaM3_{red} (Abb. 4.18e) gespült, so war in allen drei Fällen eine komplette Hemmung des Kaliumstroms zu messen. Oxidation der drei Calmodulin-Mutanten CaM1_{ox}, CaM2_{ox} oder CaM3_{ox} verhinderte diese vollständige Hemmung des Kanals nicht (Abb. 4.18b-e).

5 DISKUSSION

5.1 EXPRESSION HUMANER MSRBS

Die Klonierung und Expression der humanen MSRB-Enzyme hMSRB2 und SELX U95C konnte ohne Schwierigkeiten bewerkstelligt werden, da diese als lösliche Proteine exprimiert wurden. Dagegen wurden hMSRB1-Proteine fast ausschließlich als unlösliche Proteine exprimiert. Analog zur Vorgehensweise mit hMSRA, wo die Entfernung der mitochondrialen Signalsequenz zur Expression von löslichem Protein führte (Kuschel *et al.*, 1999), konnte nach Abtrennen der mitochondrialen Signalsequenz in hMSRB1 (Huang *et al.*, 1999) lösliches Protein exprimiert werden. Die verkürzte Form der hMSRB1 (hMSRB1? 1-22) wurde für die folgenden Aktivitätsmessungen verwendet.

5.2 AKTIVITÄT HUMANER METHIONINSULFOXIDREDUKTASEN

5.2.1 Aktivität humaner Methioninsulfoxidreduktasen mit DTT

Die ermittelten Enzymaktivitäten wurden untereinander verglichen und der Aktivität von hMSRA gegenübergestellt. Die Messung der Enzymaktivitäten per MALDI-MS-TOF wurde anfangs durch Anlagerung von Alkalimetallen (Na^+ und K^+) an das synthetische Pentapeptid KIFMK (MW=723 Da) gestört. Die Anlagerung von Natriumionen an das oxidierte Peptid (MW=723 + 22) ergibt eine Masse von 745 Da, welche mit der Masse nach Anlagerung von Kalium an das reduzierte Peptid (MW=707 + 38) identisch ist. Die Verwendung der Dünnschicht-Präparations-Methode (Vorm und Roepstorff, 1994) ermöglichte durch mehrfache Waschvorgänge eine Entfernung der Alkalimetalle aus den kristallisierten Peptiden (Jung *et al.*, 2002).

Das rekombinante MSRB1-Enzym setzte 2,8 Moleküle MetO-Peptid/min um, das MSRB2-Enzym setzte 3,7 Moleküle MetO-Peptid/min und MSRA setzte 7,2 Moleküle MetO-Peptid/min um (s. Abb. 4.5)(Jung *et al.*, 2002; Hansel *et al.*, 2003). Die Aktivität der humanen MSRB-Enzyme mit DTT war somit um das 2,5-fache (hMSRB1) bzw. um das 2-fache (hMSRB2) geringer als bei humaner MSRA. Eine Aktivität mit SELX U95C konnte selbst bei einer Enzymkonzentration von 100 μM nicht nachgewiesen werden. Dies entspricht dem 50-fachen der Konzentration von hMSRB1 bzw. hMSRB2, die für eine vollständige Reduktion von Met-R-O nötig ist. Die Aktivität bei Maus-SELR ist mit einem Selenocystein im aktiven Zentrum um ca. 180-fach höher als mit einem Cystein (Moskovitz *et al.*, 2002a). Da hSELX und Maus-SELR stark homolog sind, ist zu vermuten, dass die Relationen der Aktivitäten beim Wildtyp SELX und der SELX U95C-

Mutante ähnlich verteilt sind. Jedoch war es einerseits nicht möglich, in ausreichenden Mengen eine solch hohe Konzentration an hSELX aufzureinigen und andererseits waren Versuche erfolglos, den Wildtyp mit Selenocystein zu exprimieren (Daten nicht gezeigt).

5.2.2 Aktivität humaner Methioninsulfoxidreduktasen mit dem TRX-System

Die Aktivität der MSRB-Enzyme mit dem TRX-System wurde sowohl photometrisch als auch über MALDI-TOF-MS-Analyse ermittelt. Die Enzymaktivität der humanen MSRB-Enzyme war ca. um das 6- bis 10-fache geringer als bei hMSRA. Bei einer Enzymkonzentration von 0,5 μM hMSRA wurde eine Reduktion von 50 % des Substrats erzielt (Daten nicht gezeigt). Um dieselbe Menge an reduziertem Peptid mit den humanen MSRB-Enzymen zu erhalten, war eine Enzymkonzentration von 5 μM hMSRB1 bzw. 3 μM hMSRB2 notwendig (s. Abb. 4.6). hMSRB1 setzte somit 0,4 Moleküle MetO-Peptid/min um und hMSRB2 0,5 Moleküle MetO-Peptid/min. Auch mit dieser Nachweismethode konnte keine Aktivität der hSELX U95C gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Laut Literatur setzt *E. coli* MSRB 0,6 Moleküle MetO-Peptid/min mit TRX als Reduktionsmittel um (Grimaud *et al.*, 2001). Die in der Promotionsarbeit errechneten Umsatzraten für die humanen MSRB-Enzyme sind somit geringfügig niedriger als die für *E. coli* MSRB. Jedoch konnte gezeigt werden, dass sowohl die in der hier vorliegenden Arbeit als auch die bei Grimaud und Mitarbeitern (Grimaud *et al.*, 2001) verwendete Menge an Thioredoxin die Aktivität der Enzyme limitierte. Es wäre eine 15-fach höhere Konzentration an TRX (75 μM TRX statt 5 μM) notwendig gewesen, um im sättigenden Bereich zu messen. Mit diesen Konzentrationen an TRX setzte *N. meningitidis* PILB-MSRB 0,2 Moleküle MetO-Peptid/sec um (Olry *et al.*, 2002). Daher ist zu erwarten, dass die Umsatzraten der humanen MSRB-Enzyme deutlich ansteigen sollten, wenn die Messungen mit einer sättigenden TRX-Konzentration durchgeführt werden würden. Auf die Anpassung der Thioredoxinkonzentration wurde während der Arbeit verzichtet, da die Kosten für diesen Versuch durch den Kauf von Thioredoxin erheblich steigen würden.

5.2.3 Aktivität humaner Methioninsulfoxidreduktasen mit freiem Methionin

MSRB2 erzielte mit freiem Methionin eine höhere Enzymaktivität als hMSRB1. So wurde mit 50 μM hMSRB2 eine Reduktion von 51,3 % Substrat und mit 50 μM hMSRB1 nur eine Reduktion von 22,8 % Substrat (s. Abb. 4.7) bei gleicher Zeit erzielt. Infolgedessen hat hMSRB1 bei gleicher Enzymkonzentration weniger als die Hälfte dessen an Substrat umgesetzt wie hMSRB2. Auch mit freiem Methioninsulfoxid als Substrat weisen die humanen MSRB-Enzyme eine geringere Enzymaktivität auf als hMSRA. So wurde mit

5 μM MSRA, was 1/10 der verwendeten Konzentration von hMSRB1 entspricht, im Vergleich deutlich mehr an Substrat umgesetzt. hMSRA reduzierte 33,6 % während hMSRB1 nur ca. 23 % Substrat umsetzte (s. Abb. 4.7).

Literaturquellen zufolge wurden die Umsatzraten für freies Methionin als Substrat mit Thioredoxin als Reduktionsmittel (Grimaud *et al.*, 2001) durchgeführt. Für die hier gemessenen Enzymaktivitäten mit freiem Methionin wurde aber DTT als Elektronendonator verwendet, so dass die Literaturdaten nicht mit den Ergebnissen für humane MSR-Enzyme verglichen werden können. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass die humanen MSRB-Enzyme (hMSRB1, hMSRB2 und SELX) in der Lage sind, freies Methionin als Substrat zu verwerten, aber deren Aktivitäten wurden nicht genauer bestimmt (Kim und Gladyshev, 2003).

5.2.4 Nachweis der MSRB-Aktivität der identifizierten Methioninsulfoxidreduktasen

Das TRX-System wurde schließlich auch dafür eingesetzt, um zu beweisen, dass die neu identifizierten und charakterisierten MSR-Enzyme zum Typ B gehören. Dazu wurde das Met-R-O/Met-S-O-Peptidgemisch mit hMSRA inkubiert, bis ein Stillstand der NADPH-Absorption im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten war (Abb. 4.8a). Laut Literatur reduziert MSRA ausschließlich Met-S-O (Minetti *et al.*, 1994; Sharov *et al.*, 1999; Sharov und Schöneich, 2000). Somit wurden durch Inkubation mit MSRA aus dem oxidierten Peptidgemisch alle Met-S-O enthaltenden Peptide reduziert. Diese Vermutung wurde per MALDI-TOF-MS-Analyse bestätigt, wobei ca. 50 % reduziertes Methionin gemessen wurde (Abb. 4.8). Auch eine erneute Zugabe von MSRA erzielte keine weitere Veränderung des Anteils an reduziertem Methionin. Die Met-R-O enthaltenden Peptide wurden von MSRA somit katalytisch nicht umgesetzt und sollten den putativen MSRB-Enzymen als Substrat dienen. So wurde nach Zugabe von hMSRB1 (Abb. 4.8a; dunkelblau) bzw. hMSRB2 (Abb. 4.8a; hellblau) eine weitere Abnahme der NADPH-Absorption beobachtet sowie ca. 88 % bzw. ca. 92 % reduziertes Methionin über MALDI-TOF-MS gemessen (Abb. 4.8b)(Jung *et al.*, 2002; Hansel *et al.*, 2003). Dieser Versuch wurde wiederholt mit einer vertauschten Reihenfolge der Enzyminkubation. Zuerst wurde das Substratpeptid mit den MSRB-Enzymen inkubiert und anschließend mit hMSRA (Daten nicht gezeigt). Auch bei einer vertauschten Inkubationsreihenfolge wurde mit den MSRB-Enzymen nur 50 % des Substrats umgesetzt und erst nach Inkubation mit MSRA konnte eine vollständige katalytische Umsetzung des Substrats erreicht werden. Diese Versuche beweisen, dass die neu identifizierten MSR-Enzyme der Gruppe der MSRB-

Enzyme zugeordnet werden können.

Die Aktivitäten der beiden untersuchten humanen MSRB-Enzyme unterscheiden sich nur unwesentlich mit DTT oder mit TRX als Reduktionsmittel. Es konnte jedoch kürzlich gezeigt werden, dass die subzelluläre Lokalisation der humanen MSRB-Enzyme variiert. So wurde hMSRB1 in den Mitochondrien nachgewiesen, während hMSRB2 aufgrund unterschiedlicher Signalsequenzen im N- und C-Terminus sowohl in das endoplasmatische Retikulum als auch in die Mitochondrien transportiert wird. SELX dagegen ist im Cytosol und Nukleus lokalisiert (Kim und Gladyshev, 2003). Zudem scheinen die humanen MSRB-Enzyme trotz Vorkommen in denselben Geweben unterschiedlich stark exprimiert zu sein. hMSRB1 wird stark im Herzen, besonders in den Ventrikeln, im Skelettmuskel, sowie in den detoxifizierenden Organen Leber und Niere exprimiert (Jung *et al.*, 2002). Dagegen ist hMSRB2 stark in glatten Muskelgeweben exprimiert (Hansel *et al.*, 2003).

5.2.5 Einfluss von Zink auf die MSRB-Aktivität

Da MSRB-Enzyme der Unterklasse I wie *Drosophila* MSRB (Kumar *et al.*, 2002; Kryukov *et al.*, 2002) und die humanen MSRB-Enzyme (Kim und Gladyshev, 2003) Zink enthalten, sollte der Einfluss von Zink auf die Aktivität mit unterschiedlichen Zink enthaltenden Puffern und Zink-Chelatoren untersucht werden (Abb. 4.9). Für *Drosophila* MSRB konnte keine signifikante Beeinflussung der Aktivität mit Zink enthaltenden Puffern oder Zink-Chelatoren gemessen werden (Kumar *et al.*, 2002). Bei den humanen MSRB-Enzymen wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet, aber hier konnte eine Verringerung der Enzymaktivität bei einer Zinkkonzentration von über 1 mM detektiert werden (Kim und Gladyshev, 2003). Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Daten weichen somit leicht von den Literaturdaten ab. Bei Zinkkonzentrationen von unter 1 mM wurden für die verschiedenen Puffer deutliche Steigerungen der Aktivität von bis zu 43 % für hMSRB1 gemessen. Mit hMSRB2 konnte keine Beeinflussung der Aktivität festgestellt werden (Abb. 4.9b). Ähnlich wie in der Literatur angegeben, wurde für beide Enzyme eine drastisch verringerte Aktivität bei einer Konzentration von 1 mM Zinkchlorid gemessen. So wurde für hMSRB1 unter diesen Bedingungen nur noch 35 % Aktivität und für hMSRB2 sogar nur noch 13 % Aktivität gemessen. Da bei hMSRB1 eine deutliche Steigerung der Enzymaktivität mit Zink enthaltenden Puffern nachzuweisen war, wird vermutet, dass während bzw. nach der Expression nicht alle rekombinanten Enzyme Zink gebunden haben. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass der Gehalt an Zink in *Drosophila* MSRB ca. 0,8 Mol Zink/Mol Enzym (Kumar *et al.*, 2002), in

hMSRB1 ca. 0,36 Mol Zink/Mol Enzym und in hMSRB2 ca. 0,61 Mol Zink/Mol Enzym betrug (Kim und Gladyshev, 2003). In allen drei Fällen war keine 1:1 Stöchiometrie messbar. Besonders gering war der Zinkgehalt in hMSRB1. Somit könnte zusätzliches Zink im Puffer die ohne Zink inaktiven Enzyme aktivieren, wodurch die Aktivität steigt. Da bei hMSRB2 der Zinkgehalt deutlich höher war (Kim und Gladyshev, 2003), könnte dies der Grund dafür sein, dass eine Verbesserung der Enzymaktivität nicht nachweisbar war. Der geringe Zinkgehalt bei hMSRB1 könnte eine mögliche Begründung für die niedrigere Enzymaktivität gegenüber hMSRB2 sein.

Mit dem Zink-Chelator EDTA wurde für die verschiedenen Konzentrationen keine Verringerung der Aktivität beobachtet. Stattdessen lag die Aktivität mit EDTA sogar teilweise 20 % höher als bei der Kontrolle. Auch die Arbeitsgruppe um Vadim Gladyshev hat mit Zink-Chelatoren wie EDTA oder CDTA keinen Einfluss auf den Zinkgehalt im Enzym feststellen können. Es wird vermutet, dass das Zink in den MSR-B-Enzymen fest gebunden vorliegt und für Metall-Chelatoren nicht ohne weiteres zugänglich ist (Kumar *et al.*, 2002). Die hier gemessenen Daten bestätigen die Vermutung, dass das Zink in einer festen Bindung zum Enzym vorliegt, wodurch der Chelator das Metallion nicht mehr vom Enzym lösen kann. Jedoch ist die Erhöhung der Enzymaktivität durch Zugabe von EDTA ein unerwartetes Ergebnis. Wahrscheinlich ist das darauf zurückzuführen, dass bei der Proteinaufreinigung zusätzlich Metalle eluiert werden, die dann im Puffer vorliegen und das Enzym in der Aktivität leicht inhibieren. Diese Metalle könnten dann durch EDTA gebunden werden, wodurch die Enzymaktivität steigt.

5.3 HUMANE MSR-FUSIONSPROTEINE

5.3.1 Expression humaner MSR-Fusionsproteine

Die humanen MSR-Fusionsproteine konnten erst mit einer Expressionstemperatur von 20 °C und einer Endkonzentration von 0,5 mM IPTG als lösliches Protein exprimiert werden. Trotz dieser Veränderungen wurde immer noch der größte Teil als unlösliches Protein exprimiert (s. Abb. 4.3). Die Expression der Fusionsproteine als zum größten Teil unlösliche Proteine könnte ihren Grund in der Verwendung der jeweiligen Vollängenproteine haben. Sowohl das MSRA/B-Konstrukt mit dem vollständigen *msrB1* Leserahmen als auch das MSRB/A-Konstrukt mit dem ungekürzten *msrA* Leserahmen verfügen über eine mitochondriale Signalsequenz. Da die Expression von hMSRA bzw. hMSRB1 mit dieser Signalsequenz zu einer Expression von unlöslichen Proteinen führte (Kuschel *et al.*, 1999; Jung *et al.*, 2002), ist zu vermuten, dass diese Signalsequenz auch

hierbei für die Expressionsprobleme verantwortlich ist.

5.3.2 Aktivität der humanen MSR-Fusionsproteine

Das Enzym PILB aus pathogenen Bakterien (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*) stellt ein fusioniertes MSRA/B-Enzym dar. PILB besteht aus drei unabhängigen funktionellen Domänen; einer N-terminalen putativen Disulfidoxidoreduktase, einer mittleren MSRA- und einer C-terminalen MSRB-Domäne. Die MSR-Domänen fungieren als Fusionsproteine, sind jedoch auch unabhängig voneinander aktiv. Verschiedene Fragestellungen sollten mit den Fusionsproteinen überprüft werden. So sollte eine Enzymaktivität der MSR-Fusionsproteine nachgewiesen werden und deren Aktivitäten untereinander sowie mit hMSRA und hMSRB als Kontrolle verglichen werden. Dazu wurden die Aktivitäten der humanen MSR-Fusionsproteine mit DTT und dem TRX-System als Reduktionsmittel gemessen (Abb. 4.10). Beide MSR-Fusionsproteine waren sowohl mit DTT als auch mit TRX in der Lage das Substrat katalytisch umzusetzen. Sowohl mit DTT als auch mit TRX wiesen beide Fusionsproteine eine geringere Reduktion des Substrats auf als bei der kombinierten Inkubation von hMSRA und hMSRB1, welche als Kontrolle diente. Bei der Kontrolle erzielte die kombinierte Zugabe der einzelnen Enzyme schon bei einer Konzentration von 0,5 μM eine fast vollständige Reduktion des Substrats mit DTT. Erst mit 3 μM MSRB/A-Fusionsprotein wurde 90 % Substrat reduziert. Um eine vollständige Reduktion des Substrats mit dem MSRA/B-Fusionsprotein zu erzielen, musste dagegen eine Konzentration von 10 μM eingesetzt werden (Abb. 4.10a). Die geringere Enzymaktivität der Fusionsproteine gegenüber den einzelnen Enzymen könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Fusionsproteine durch ihre Größe weniger mobil oder flexibel sind. Dadurch würden die Fusionsproteine weniger Substrat erreichen können und somit auch weniger katalytisch umsetzen. Andererseits könnte die geringere Aktivität auch dadurch erklärt werden, dass die einzelnen MSR-Komponenten sich gegenseitig sterisch behindern.

Mit TRX als Reduktionsmittel war die erforderliche Enzymkonzentration mit 3 μM MSRA und 3 μM MSRB für die vollständige Reduktion des Substrats am niedrigsten. Um eine 90 %-ige Reduktion des Substrats mit hMSRB/A zu erzielen, war schon eine Enzymkonzentration von 5 μM notwendig und überraschenderweise konnte für das MSRA/B Protein keine vollständige Reduktion mit TRX nachgewiesen werden. Zwar wurde schon mit 0,5 μM MSRA/B ca. 60 % des Substrats reduziert, jedoch konnte auch mit höheren Enzymkonzentrationen bis zu 10 μM die Menge an reduziertem Substrat nicht

erhöht werden (s. Abb. 4.10b).

Demzufolge scheint also eine der Komponenten im MSRA/B-Fusionsprotein mit TRX nicht aktiv zu sein. Zur Identifizierung der betroffenen Komponente wurde das Substrat je mit MSRA bzw. MSRB inkubiert. Nachdem so die Proben entweder Met-S-O oder Met-R-O enthielten, wurde Fusionsprotein zugegeben. Dabei zeigte sich, dass das MSRB/A-Fusionsprotein sowohl Met-R-O als auch Met-S-O als Substrat verwendet. Das MSRA/B-Fusionsprotein verwendet aber nur Met-S-O als Substrat, nicht jedoch Met-R-O (s. Abb. 4.10c). Die für den Umsatz von Met-R-O notwendige MSRB-Komponente ist somit im MSRA/B-Fusionsprotein nicht aktiv.

Gemäß den Literaturangaben weist die MSRB-Domäne von PILB eine ca. 10-fach geringere Aktivität auf als die MSRA-Domäne. Da für das PILB-Protein im Vergleich zur einzelnen MSRA-Domäne eine um 30 % geringere Aktivität gemessen wurde, scheinen sich die Domänen sterisch zu behindern, (Olry *et al.*, 2002). Aus den Kristallstrukturdaten von MSRA geht hervor, dass sich der C-terminale Teil des Proteins zum aktiven Zentrum hin faltet, das sich in Mittelpunkt des Proteins befindet (Lowther *et al.*, 2000b; Tete-Favier *et al.*, 2000). Bei MSRB ist dies genau umgekehrt: das aktive Zentrum liegt am C-Terminus und der regenerierende Teil in der Sequenzmitte (Lowther *et al.*, 2002). Daher ist zu vermuten, dass durch die Struktur des MSRA-Enzyms die korrekte Faltung der MSRB-Komponente im rekombinanten MSRA/B-Fusionsprotein gestört wird. Diese Beeinträchtigung tritt jedoch nur bei dem MSRA/B-Fusionsprotein auf und nicht bei dem MSRB/A-Konstrukt. Also erscheint das MSRB/A-Fusionsprotein als geeignetes Objekt, um einen gezielten Einfluss der beiden MSR-Komponenten auf die Lebensspanne von Fruchtfliegen zu untersuchen. Bisher wurde durch Expression von MSRA in neuronalen Geweben von *Drosophila* eine Verlängerung der Lebensspanne von ca. 70 % beobachtet (Ruan *et al.*, 2002). Nun soll das Fusionsprotein im Labor von Prof. Toshinori Hoshi (Universität von Pennsylvania, USA) in neuronalen Geweben von *Drosophila* überexprimiert werden, um zu ermitteln, ob sich ein additiver Effekt der jeweiligen MSR-Komponenten auf die Lebensspanne messen lässt.

5.4 REAKTIONSMECHANISMUS HUMANER MSRBs

In den MSRA-Enzymen spielen Cysteine eine wichtige Rolle im Reaktionsmechanismus (Lowther *et al.*, 2000a; Moskovitz *et al.*, 2000; Boschi-Muller *et al.*, 2000). Über Cysteine werden intramolekulare Disulfidbrücken gebildet, welche durch TRX reduziert werden und demzufolge die Regeneration des katalytisch aktiven Cysteins ermöglichen (s. Abb. 1.4). Nach Mutation der an der Disulfidbrückenbildung beteiligten Cysteine wurde zwar noch

mit DTT aber nicht mehr mit TRX Enzymaktivität beobachtet (Boschi-Muller *et al.*, 2000; Lowther *et al.*, 2000a). Um zu überprüfen, ob ein ähnlicher Mechanismus auch bei den humanen hMSRB-Enzymen vorliegt, wurden Sequenzvergleiche von MSRB-Enzymen verschiedener Organismen erstellt, wobei 5 konservierte Cysteine, 3 nicht-konservierte Cysteine, ein Threonin, ein Serin und ein Tryptophan als putativ katalytisch aktive Aminosäuren identifiziert wurden (Abb. 4.11). Die identifizierten Aminosäuren wurden über Mutagenese ausgetauscht und deren Enzymaktivität mit DTT und TRX als Reduktionsmittel gemessen.

5.4.1 Katalytisch aktives Zentrum

Das Cystein C169 von hMSRB1 (Abb. 4.11) bildet mit dem Serin S172 ein CxxS-Motiv aus. In TRX werden diese Motive zur Reduktion von intra- und intermolekularen Disulfidbrücken verwendet und sind maßgeblich an der Enzymaktivität beteiligt (Arner und Holmgren, 2000; Fomenko und Gladyshev, 2002, 2003). Daher wurde vermutet, dass sich in hMSRB1 an dieser Position das aktive Zentrum befindet. Bestärkt wurde diese Vermutung dadurch, dass das an dem Motiv beteiligte Cystein in humanem SELX (Lescure *et al.*, 1999) bzw. SELR aus Mäusen (Moskovitz *et al.*, 2002a) durch ein Selenocystein ersetzt ist. In allen bisher bekannten Selenoproteinen ist das Selenocystein im aktiven Zentrum lokalisiert (zur Übersicht s. Gladyshev und Hatfield, 1999; Behne und Kyriakopoulos, 2001). Tatsächlich führte der Austausch des Cysteins C169 zu einem Serin (=hMSRB1 C169S) zu einem vollständigen Aktivitätsverlust sowohl mit DTT als auch mit TRX (Jung *et al.*, 2002). Mittlerweile wurde das homologe Cystein durch Mutagenesestudien in *N. meningitidis* PILB-MSRB (C495S) und *Drosophila* MSRB (C124S) (Olry *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2002) identifiziert. Kristallstrukturen von PILB-MSRB aus *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* bestätigten diese Ergebnisse (Lowther *et al.*, 2002; Kauffmann *et al.*, 2002) und zeigten zudem, dass durch Wasserstoffbrückeninteraktion eine Triade zwischen D484-R493-C495 gebildet wird, welche die Deprotonierung des katalytisch aktiven C495 fördert (Lowther *et al.*, 2002). Die neben dem katalytisch aktiven Cystein (C495) an der Triade beteiligten Aminosäuren Asparaginsäure (D484) sowie Arginin (R493) sind in den bisher bekannten MSRB-Enzymen streng konserviert. Außerdem zeigten die Kristallstrukturen, dass das reaktive Zentrum der MSRB-Enzyme eine zu den MSRA-Enzymen gespiegelte Struktur aufweist, was ein Grund für die unterschiedliche Substratspezifität der MSR-Enzyme sein könnte (Lowther *et al.*, 2002).

In *Drosophila* MSRB resultierte ein Austausch des Serin im CxxS-Motiv zu Alanin in einer verringerten Aktivität mit DTT und dem Aktivitätsverlust mit TRX (Kumar *et al.*, 2002). Auf Grund dieser Daten haben die Autoren vermutet, dass das Serin den vom Cystein ausgehenden nukleophilen Angriff auf das Substrat unterstützt und ferner das Sulfensäureintermediat stabilisiert. Durch Austausch des Serin im CxxS-Motiv zu Cystein sollte eine gesteigerte Enzymaktivität erzielt werden, weil dadurch ein CxxC-Motiv im katalytischen Zentrum entsteht, welches schon bei Mäuse-MSRA (Moskovitz *et al.*, 2002a) und in Hefe-Disulfidisomerase (Norgaard *Et al.*, 2001) zu einer erhöhten Aktivität führte. Erstaunlicherweise resultierte in hMSRB1 die Mutagenese des Serin S172 zu einem Alanin oder Cystein (=hMSRB1 S172A; S172C) in einer verringerten Aktivität mit DTT. Jedoch wurde eine unveränderte Aktivität mit TRX gemessen. Diese Daten stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen in *Drosophila* MSRB (Kumar *et al.*, 2002). Möglicherweise stellt in hMSRB1 das Serin an dieser Position keine essentielle Funktion für die *in vivo* Enzymaktivität dar, weil die Aktivität mit dem physiologischen Reduktionsmittel TRX nicht beeinträchtigt wird und auch durch ein CxxC-Motiv nicht gesteigert werden konnte.

5.4.2 CxxC als Zink-bindendes Motiv

Die MSRB-Enzyme der Unterklasse I werden durch die Anwesenheit von 4 konservierten Cysteinen definiert, die zu zwei CxxC-Motiven (zwei Cysteine getrennt durch zwei beliebige Aminosäuren) angeordnet sind (Kumar *et al.*, 2002). Die Cysteine der charakteristischen CxxC-Motive wurden durch Serine ersetzt, wodurch die Mutanten hMSRB1 C90S, hMSRB1 C90S; C93S und hMSRB1 C143S; C146S entstanden. Bei allen drei Mutanten führte dies zu einem vollständigen Aktivitätsverlust mit TRX sowie mit DTT. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei *Drosophila* MSRB beobachtet, wo eine Mutation eines oder mehrerer der am Motiv beteiligten Cysteine zu Aktivitätsverlust führte. Zusätzlich wurde gezeigt, dass diese CxxC-Motive Zink binden (Kumar *et al.*, 2002; Kryukov *et al.*, 2002). Auch für die humanen MSRB-Enzyme - einschließlich MSRB1 – wurde gezeigt, dass die Proteine Zink enthalten (Kim und Glasyshev, 2003). Aus diesen Ergebnissen lässt sich somit auch ohne Untersuchung des Zinkgehaltes folgern, dass die CxxC-Motive in hMSRB1 für die Bindung von Zink zuständig sind und für die weiteren Untersuchungen eines möglichen Regenerationspartners des aktiven Cysteins C169 außer Betracht bleiben können. Welche Funktion das Zink in den MSRB-Enzymen hat, ob es zur Erhaltung der Struktur dient oder sogar einen direkten Einfluss auf die Enzymaktivität oder Regeneration des Enzyms nach erfolgter Reduktion hat, ist bisher

noch nicht geklärt.

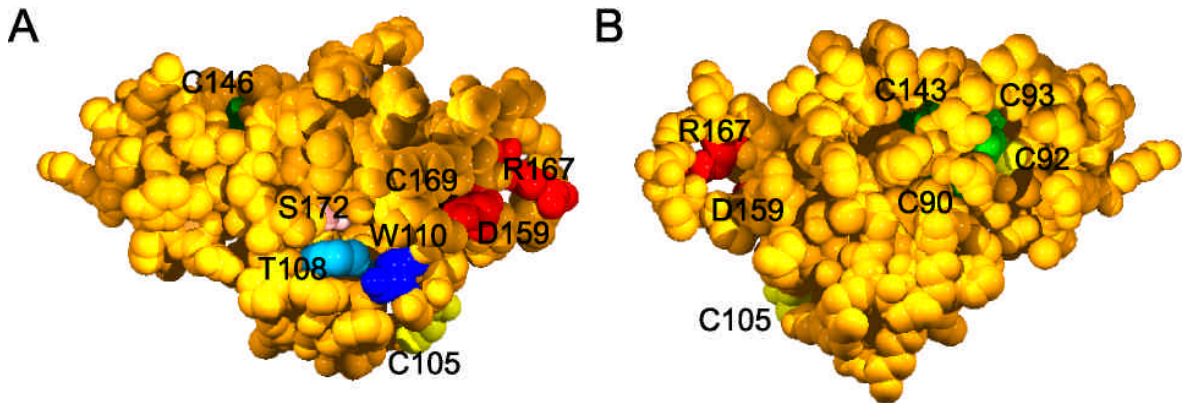


Abb. 5.1: Ansicht der 3D-Strukturvorhersage von hMSRB1

Ansicht der 3D-Strukturvorhersage der hMSRB1 von (A) vorne und von (B) hinten. Das katalytisch aktive Cystein C169 (schwarz) formt mit Serin S172 (rosa) das CxxS-Motiv im aktiven Zentrum. Die Cysteine C90, C93, C146 und C149 formen zwei Zink-bindende CxxC-Motive (grün). Die in der Box I lokalisierten Aminosäuren Threonin T108 (hellblau) und Tryptophan W110 (dunkelblau) sind an der Substratbindung beteiligt. Zusätzlich sind die drei nicht-konservierten Cysteine C45, C92 und C105 (gelb) sowie die für den nukleophilen Angriff auf das Substrat notwendigen Aminosäuren Asparagin D159 und Arginin R167 (rot) farblich hervorgehoben. Die 3D-Strukturvorhersage des humanen MSRB1-Enzyms (Aminosäuresequenz: E46-H182) wurde über die Swiss-PDB-Datenbank (<http://www.expasy.ch>) über Homologievergleiche mit der Kristallstruktur von *Neisseria* PILB-MSRB erstellt (Lowther *et al.*, 2002; PDB: 1L1D) und mit dem Swiss-PDB-Viewer (Guex *et al.*, 1997) und PovRay visualisiert.

5.4.3 Substratbindemotiv

Die MSRB-Enzyme der Unterklasse II (z. B. *N. meningitidis* PILB-MSRB-Domäne; *E. coli* MSRB (=YEAA)) unterscheiden sich von der Unterklasse I außer durch das Fehlen des CxxC-Motivs auch dadurch, dass neben dem konservierten katalytisch aktiven Cystein im N-terminalen Bereich ein weiteres konserviertes Cystein ungefähr in der Mitte der Proteinsequenz lokalisiert ist. Dieses Cystein ist in ca. 50 % der MSRB Unterklasse I abwesend; dort wird es entweder durch ein Serin oder ein Threonin ersetzt (Kumar *et al.*, 2002). Für die Regenerationsfähigkeit der *N. meningitidis* MSRB ist das Cystein C440 bzw. C69 in *Drosophila* MSRB essentiell (Abb. 4.11; hellblau). Austausch des Cysteins zu Serin beeinflusste die Aktivität mit DTT nicht, führte aber zu Verlust der Aktivität mit TRX (Olry *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2002). Wenn das an homologer Position in hMSRB1 Threonin T108 an der Regeneration des katalytisch aktiven Cysteins C169 beteiligt sein sollte, dann müsste der Austausch zu einem Cystein die Aktivität des Enzyms nicht beeinflussen oder sogar erhöhen. Erstaunlicherweise wies die Mutante hMSRB1 T108C jedoch eine im Vergleich zum Wildtyp auf 20 % (DTT) bzw. 60 % (TRX) verringerte Aktivität auf. Ein Austausch zu einem Serin (hMSRB1 T108S), das in hMSRB2 und hSELX an homologer Stelle vorzufinden ist, führte erwartungsgemäß mit beiden Reduktionsmitteln zu keiner Veränderung der Aktivität gegenüber dem Wildtyp (Abb.

4.13). Somit ist eine Beteiligung des Threonin T108 an der Regeneration des katalytisch aktiven Cysteins C169 auszuschließen. Der Austausch des Tryptophan W110 zu Alanin resultierte in einer geringeren Aktivität von 8 % mit DTT bzw. von 19 % mit TRX im Vergleich zum Wildtyp auf (Jung *et al.*, 2002). Die Daten für die Mutanten deuten eher auf eine Beteiligung des konservierten Motivs mit den Aminosäuren C105, T108 und W110 an der Substratbindung als an der Katalyse. Diese Vermutung wird unterstützt von Untersuchungen an der Kristallstruktur des *N. gonorrhoeae* PILB-MSRB, wo eine Beteiligung des zu hMSRB1 W110 homologen Tryptophans an der Substratbindung prognostiziert wurde (Lowther *et al.*, 2002).

5.4.4 Möglicher Reaktionsmechanismus für humane MSRB-Enzyme

Für den Reaktionsmechanismus humaner MSRB-Enzyme können zwei Hypothesen in Betracht gezogen werden. Zum einen könnte ein weiteres Cystein in hMSRB eine Disulfidbrückenbildung mit C169 eingehen, und somit die Regeneration durch TRX ermöglichen. Oder das am C169 gebildete Sulfensäureintermediat wird direkt durch TRX reduziert. Die erste Hypothese wird gestützt durch Befunde für *Xanthomonas campestris*, wo ein zu *N. meningitidis* alternativer Reaktionsmechanismus nachgewiesen wurde. *X. campestris* verfügt ähnlich wie die humanen MSRBs kein zu *N. meningitidis* C440 homologes Cystein. Es konnte für den Organismus gezeigt werden, dass ein weiteres Cystein (C31), welches in den MSRB-Enzymen der unterschiedlichen Organismen nicht konserviert vorliegt, eine Disulfidbrücke mit dem katalytisch aktiven Cystein (C117) bildet und durch TRX regeneriert werden kann (Neiers *et al.*, 2004).

Um die erste Hypothese zu überprüfen, wurden die drei nicht konservierten Cysteine C45, C92 und C105 durch Serin ersetzt (Abb. 4.11; orange, blau). Allerdings wurde bei keiner dieser drei Mutanten eine Beeinflussung der Enzymaktivität mit DTT oder TRX nachgewiesen (s. Abb. 4.13). Infolgedessen scheint kein Cystein als Regenerationspartner für das aktive Cystein C169 zu funktionieren. Um einen Reaktionsmechanismus ähnlich den MSRA-Enzymen der Unterklasse II auszuschließen, die jeweils drei essentielle Cysteine enthalten (*E. coli*: C51, C198, C206; Rind: C72, C218, C227) und nur die Disulfidbrücke zwischen den beiden C-terminalen Cysteinen durch TRX reduziert werden kann (Boschi-Muller *et al.*, 2000; Lowther *et al.*, 2000a), wurde eine Dreifach-Mutante (hMSRB1 C45S, C92S, C105S) erstellt. Aber auch der gleichzeitige Austausch mehrerer Cysteine führte zu keiner Beeinflussung der Aktivität mit DTT und TRX.

Daraus lässt sich folgern, dass für die humanen MSRB-Enzyme, wie wohl auch für die

anderen Säuger-MSRBs, ein abweichender Reaktionsmechanismus gemäß der zweiten Hypothese zu dem prognostizierten der MSRBs der Unterklasse II (Olry *et al.*, 2002) zu erwarten ist.

Der Reaktionsmechanismus von *Neisseria* PILB-MSRB umfasst vier verschiedene Schritte (Abb. 5.2a). Zuerst erfolgt ein nukleophiler Angriff des katalytisch aktiven Cysteins C495 an MetO (I). Dabei entsteht als instabiles Zwischenprodukt ein MSR-MetO-Intermediat, das sofort in ein Sulfensäurederivat und Met zerfällt (Abb. 5.2aII). Ein nukleophiler Angriff von C440 an das Sulfensäureintermediat führt zur Bildung einer Disulfidbrücke (III). Das TRX-System regeneriert das Enzym in den vollständig reduzierten Zustand durch Reduktion der Disulfidbrücke (VI) (Olry *et al.*, 2002).

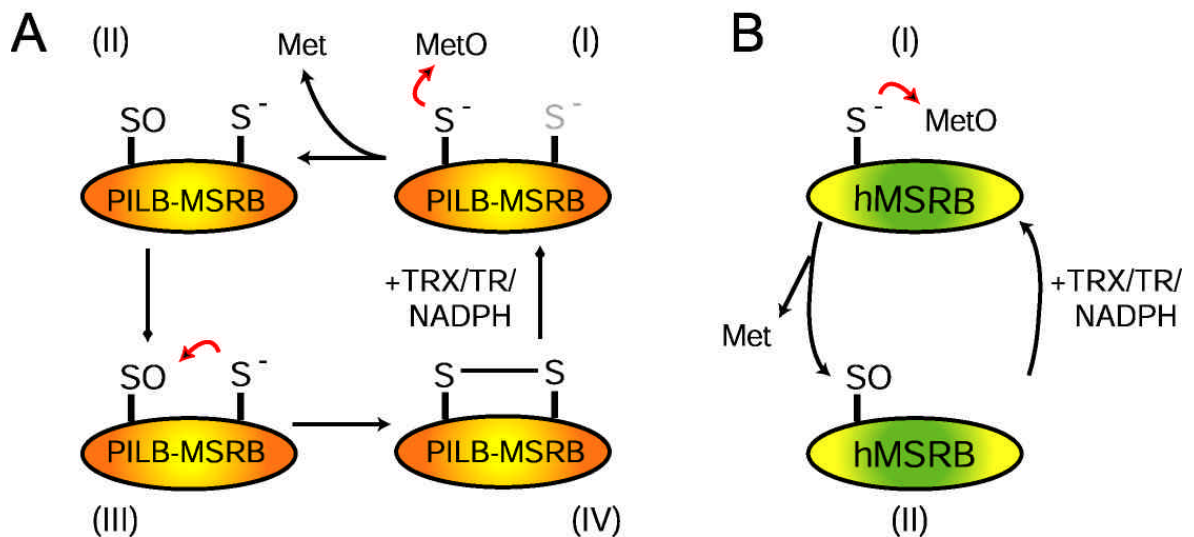


Abb. 5.2: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus von MSRB-Enzymen

Die Reaktionsmechanismen von (A) *Neisseria* PILB-MSRB (nach Olry *et al.*, 2002) und (B) humanen MSRB-Enzymen sind schematisch dargestellt. Das katalytisch aktive Cystein ist schwarz markiert und das damit interagierende Cystein grau. Nukleophile Angriffe von deprotonierten Schwefelatomen in Cysteinen sind mit einem roten Pfeil hervorgehoben.

Anfangs ähnelt der Reaktionsmechanismus der humanen MSRB-Enzyme dem des *Neisseria* PILB-MSRB. Auch hier erfolgt im ersten Schritt ein nukleophiler Angriff des katalytisch aktiven Cysteins C169 (Abb. 5.2bI). Es entstehen das schnell zerfallende Intermediat und daraus wiederum das Sulfensäureintermediat und das reduzierte Substrat. Da kein weiteres Cystein intramolekular mit C169 interagiert, muss das Sulfensäureintermediat direkt durch das TRX-System regeneriert werden (Abb. 5.2bII).

5.5 PHYSIOLOGISCHE FUNKTION VON MSR-ENZYMEN

5.5.1 Einfluss von MSR-Enzymen auf die Inaktivierungsrate des Shaker C/B-Kanals

Zur Untersuchung der physiologischen Funktion von MSR-Enzymen sollte ein möglichst einfaches, für Oxidation sensitives System verwendet werden, das eine direkte Beeinflussung durch MSR-Enzyme ermöglicht. Der Spannungsgesteuerte *Drosophila* Shaker C/B-Kaliumkanal (ShC/B) wurde als geeignetes System ausgewählt, da eine direkte Beeinflussung des Auswärtsstromes der Kaliumionen durch Methioninoxidation gezeigt wurde (Ciorba *et al.*, 1997, 1999). Da Oozyten mit mRNA injiziert werden, sind in diesen die Messungen des Kanalstroms einfacher zu handhaben als in transient transfizierten Zelllinien.

Der ShC/B-Kaliumkanal setzt sich aus vier Untereinheiten mit je einer N-terminalen Balldomäne zusammen. Bei Depolarisation wird die Kanalpore geöffnet und Kaliumionen strömen von innen nach außen durch den Kanal (geöffneter Zustand). Anschließend wird der Kanal durch die Balldomäne geschlossen (inaktivierter Zustand). Der aminoterminal Bereich des Shaker C/B-Kanals enthält an Position 3 ein oxidationsanfälliges Methionin. Die Oxidation von M3 erfolgt durch ROS-erzeugende Reagenzien wie Chloramin T oder durch ROS wie z. B. Peroxynitrit (Ciorba *et al.*, 1997).

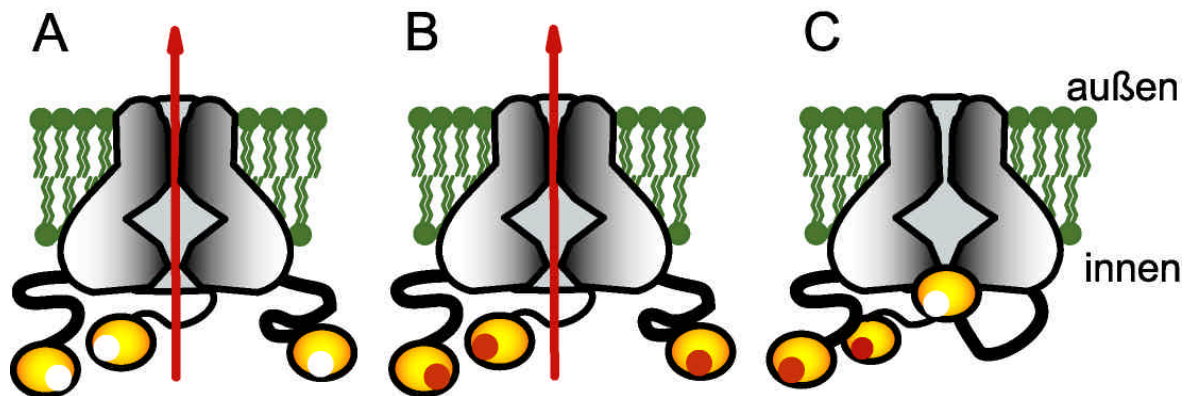


Abb. 5.3: Schematische Darstellung des ShC/B-Kanals

Der ShC/B-Kanal wird schematisch in Aufsicht gezeigt, so dass je drei der vier Untereinheiten in der Membran eingebettet zu erkennen sind. In den N-terminalen Balldomänen (orange) sind die oxidations-sensitiven Methionine angedeutet (weiß = Met; rot = MetO). (A) ShC/B-Kanal im reduzierten Zustand während der Depolarisation. Kaliumionen strömen von innen nach außen (roter Pfeil). (B) ShC/B-Kanal nach Depolarisation im oxidierten Zustand. Die Kaliumionen können weiterhin durch den Kanal strömen, da die oxidierten Balldomänen die Pore nicht schließen können. (C) ShC/B-Kanal nach Depolarisation im oxidierten Zustand in Gegenwart von Methioninsulfoxidreduktasen. Der Kanal liegt im inaktivierten Zustand vor, da eine der oxidierten Balldomänen durch MSR-Enzyme in den reduzierten Zustand überführt wurde und diese Balldomäne die Kanalpore verschlossen hat (nach Hoshi und Heinemann, 2000).

Durch Oxidation der Methionine an Position 3 aller vier Untereinheiten zu Methioninsulfoxid wird das Schließen des Kanals durch die N-terminale Balldomäne

verhindert, was in einer Erhöhung der für die Kanalinaktivierung notwendigen Zeitkonstante resultiert (Ciorba *et al.*, 1999). Die Inaktivierung des Kanals wird dadurch unterbunden (Abb. 5.3). Da die für die Inaktivierung notwendige Zeitkonstante des ShC/B-Kanals durch Koexpression mit Rinder-MSRA beschleunigt werden konnte (Ciorba *et al.*, 1997, 1999), scheint dieser Kanal durch MSRA regulierbar zu sein.

Die Inaktivierungszeitkonstante des ShC/B-Kanals in Abwesenheit von MSR-Enzymen ist sehr variabel. Durch Koexpression mit hMSRB1 (Abb. 4.14c) und hMSRA (Abb. 4.14b) konnte die Zeitkonstante beschleunigt werden (Jung *et al.*, 2002), wodurch eine *in vivo* Aktivität der humanen Methioninsulfoxidreduktasen gezeigt werden konnte. Somit wird eine gezielte Regulation des Kanals durch das Zusammenspiel zwischen reaktiven Sauerstoffspezies und Methioninsulfoxidreduktasen ermöglicht. Dabei ist aber noch nicht geklärt, wie die MSR-Enzyme die Regulation des Kanals bewirken. Eine Hypothese vermutet eine direkte Interaktion der MSR-Enzyme mit dem oxidierten Methionin der N-terminalen Balldomäne. Dabei scheint keine stereospezifische Regulation des Kanals zu bestehen, da sowohl MSRA als auch MSRB die Zeitkonstante der Inaktivierung beschleunigen können. Eine weitere Hypothese schreibt den MSR-Enzymen eine indirekte Regulation des Kanals über die Verringerung des intrazellulären Niveaus an ROS zu. Demzufolge würden die reaktiven Sauerstoffspezies z. B. die oberflächen-exponierten Methionine der Gluthamin-Synthetase oxidieren, welche wiederum durch die MSR-Enzyme reduziert werden. Dies würde zu einer Verringerung der Menge an ROS führen. Dadurch könnten nicht mehr in allen Balldomänen die Methionine oxidiert werden, wodurch die Inaktivierung des Kanals weiterhin gewährleistet würde.

5.5.2 Regulation des humanen EAG-Kanals durch Calmodulin und Methioninoxidation

5.5.2.1 Erzeugung von Calmodulin-Mutanten

Oxidation von Methionin in Calmodulin (CaM) wurde mit fortschreitendem Alter festgestellt, wobei ca. zwei Methioninsulfoxide pro Calmodulin nachgewiesen wurden (Michaelis *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 1998b).

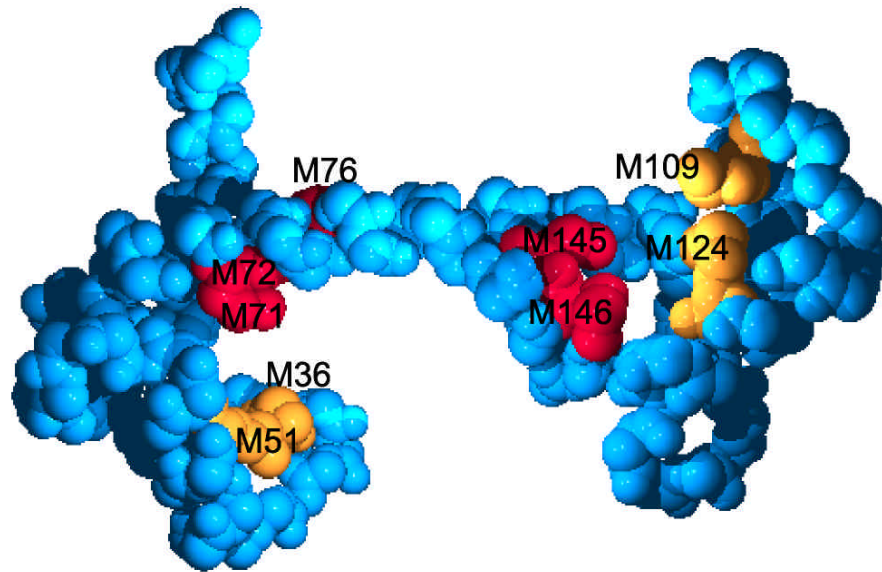


Abb. 5.4: Ansicht der 3D-Struktur von Calmodulin

Ansicht der 3D-Struktur von Calmodulin (PDB-Datei: 1CLL). Rot markierte Methionine wurden durch Mutagenese zu Leucinen ausgetauscht, während orange markierte Methionine nicht mutiert wurden. Die Struktur wurde mit dem Swiss-PDB-Viewer (Guex *et al.*, 1997) und PovRay visualisiert.

Die C-terminalen Methionine M145, M146 sind für *in vitro* Oxidationen am anfälligsten (Yao *et al.*, 1996). So führte die Oxidation der C-terminalen Methionine M145 und M146 zur Inhibierung der CaM-abhängigen Aktivierung der Plasmamembran Ca^{2+} ATPase (Bartlett *et al.*, 2003). Zudem wurde bei Ratten eine Verringerung der Nitrioxidsynthetase-Aktivierung durch Oxidation des Methionin M145 von Calmodulin beobachtet (Montgomery *et al.*, 2003). Das Adenylatzyklase-Toxin aus *Bordetella pertussis* dagegen bindet nicht mehr an Calmodulin, wenn die Methionine M109, M124 und M145 oxidiert vorliegen (Vouquier *et al.*, 2004). In seneszenten Rattengehirn wiederum sind die Methionine M36, M51, M71, M72, M109 und M124 am häufigsten Oxidationsprozessen ausgesetzt (Gao *et al.*, 1998b). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Calmodulin-Mutanten CaM1 (M71L; M72L; M76L), CaM2 (M145L; M146L), CaM 1/2 (M71L; M72L; M76L; M145L; M146L), CaM M145L und CaM M146L über PCR-Mutagenese erzeugt. Leucin wurde für den Austausch verwendet, da dessen Größe ähnlich der von Methionin ist und α -helikale Strukturen stabilisiert (Richardson und Richardson, 1989).

5.5.2.2 Oxidation und Reduktion von rekombinantem Calmodulin

Rekombinantes Calmodulin und Calmodulin-Mutanten wurden mit Wasserstoffperoxid oxidiert und der Erfolg der Oxidation mit MALDI-TOF-MS überprüft (Abb. 4.16 und Tab. 4.1). Anfangs war eine korrekte Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine nicht möglich, da erhebliche Abweichungen vom theoretisch errechneten Molekulargewicht

auftraten. Dies beruhte auf der Tatsache, dass pro Molekül CaM bis zu 4 Moleküle Kalziumionen über die so genannten „EF-Hand-Motive“ gebunden werden können. Nach Zugabe von EGTA, einem starken Kalzium-Chelator, konnten die Kalziumionen entfernt werden und die gemessenen Massen der Proteine wurden mit einer Abweichung von ca. 10 Da von der theoretischen Masse ermittelt. Sowohl mit hMSRA als auch mit hMSRB wurde jeweils die Hälfte der vorhandenen Methioninsulfoxide in CaM zu Methioninen reduziert. Inkubation mit beiden Enzymen resultierte in einer vollständigen Reduktion von CaM (Tab. 4.1). Da sowohl mit hMSRA als auch mit hMSRB jeweils die Hälfte der vorhandenen Methioninsulfoxide in CaM zu Methioninen reduziert wurde, lässt sich daraus folgern, dass keine stereospezifische Oxidation der Methionine in Calmodulin erfolgte.

5.5.2.3 Interaktion zwischen hEAG C-Terminus und Calmodulin-Mutanten

Die humanen EAG (ether à go-go) Kanäle gehören zu den spannungsabhängigen Kaliumkanälen. Diese Kanäle werden durch Depolarisierung der Membran aktiviert und können durch intrazelluläre Kalziumionen (Stansfeld *et al.*, 1996) und Calmodulin inhibiert werden (Schönherr *et al.*, 2000). Die Kanäle der EAG-Familie kommen in diversen Tumor-Zellen vor und spielen vermutlich eine wichtige Rolle in der Proliferation dieser Zellen (Bianchi *et al.*, 1998; Pardo *et al.*, 1999). Daher ist ein tief greifendes Verständnis der Regulation des hEAG-Kanals von Bedeutung, um wirksam gegen proliferierende Tumorzellen vorgehen zu können.

Der hEAG-Kanal enthält im C-terminalen Bereich eine Calmodulinbindedomäne (CBD). Diese Bindedomäne wurde benutzt, um eine Bindung zwischen Calmodulin und dem hEAG-C-Terminus (hEAG-C) über Oberflächen Plasmonen Resonanz zu bestimmen (Abb. 4.17). Mit dieser Methode konnte Ralf W. Glaser (Institut für Biochemie und Biophysik, FSU Jena) zeigen, dass sowohl CaM als auch CaM1 eine verringerte Bindung für hEAG-C im oxidierten Zustand aufweisen. Dagegen sind CaM2 und CaM1/2 nur schwach durch eine Oxidation betroffen; deren Bindung wurde nur leicht durch Oxidation heruntergesetzt. Die Bindung konnte durch Inkubation mit MSRA bzw. mit MSRB wieder hergestellt werden.

Aus diesen Ergebnissen können folgende Rückschlüsse gezogen werden. Zum einen befindet sich ein oxidations-sensitives Methionin, welches maßgeblich die Bindung von CaM zu hEAG-C beeinflusst, im C-terminalen Bereich von Calmodulin. Der Austausch der Methionine M145 und M146 zu Leucin in CaM2 bzw. CaM1/2 führte im Gegensatz zu CaM und CaM1 zu einer relativ konstanten Bindung zwischen Protein und Kanal trotz

Oxidation. Da ein nicht-oxidiertes Methionin durch die Leucine simuliert wurde, scheint eines der beiden Methionine essentiell für die Bindung zwischen Calmodulin und dem Kanal zu sein. Um aufzuklären, welches Methionin – M145 oder M146 – für die Bindung essentiell ist, müssten weitere Calmodulin-Mutanten erstellt und untersucht werden, die entweder nur M145 oder M146 zu einem Leucin ersetzen. Mittels Simulationen wurde vorausgesagt, dass die Oxidation von M145 zu einer Verstärkung der Peptidbindung und einer Schwächung der Ca^{2+} -Bindung führt, wohingegen die Oxidation von M146 zu einer Schwächung der Peptidbindung und einer höheren Affinität für Ca^{2+} führen soll (Jas und Kuczerak, 2002). Von daher ist zu vermuten, dass die Oxidation von M146 zur Verringerung der Bindung zwischen CaM und hEAG-C führt.

Zum anderen konnte gezeigt werden, dass neben dem C-terminalen Methionin ein weiteres Methionin an der Bindung zwischen Calmodulin und dem hEAG-Kanal beteiligt sein muss, da auch CaM2 und CaM1/2 eine leichte Beeinflussung der Bindung während Oxidation aufwiesen. Da bisher die Methionine M71, M72, M76, M145 und M146 schon durch Mutagenese ausgetauscht wurden, muss wenigstens ein anderes Methionin daran beteiligt sein. Es ist auszuschließen, dass eine weitere Aminosäure für die verringerte Bindung von CaM2 bzw. CaM1/2 verantwortlich ist, da eine Inkubation mit MSR-Enzymen die Bindung wieder herstellt. Somit müsste zur genauen Klärung der an der Bindung beteiligten Methionine zusätzlich M36, M51, M109 und M124 durch Mutagenese ausgetauscht werden. Dabei erscheinen die Methionine M109 und M124 als potentielle Kandidaten, da das Adenylatzyklase-Toxin aus *Bordetella pertussis* nach Oxidation dieser Methionine nicht mehr an Calmodulin gebunden hat (Vougier *et al.*, 2004).

5.5.3 Regulation des hEAG-Kanals mit Calmodulin und Calmodulin-Mutanten

Um eine *in vivo* Auswirkung der Methioninoxidation von CaM und CaM-Mutanten zu untersuchen, wurde die "Patch-Clamp"-Methode verwendet. Es zeigte sich, dass sowohl der Calmodulin-Wildtyp als auch die Calmodulin-Mutanten im reduzierten Zustand in der Lage sind, den hEAG-Kanal *in vivo* zu hemmen (Abb. 4.18). Die Calmodulin-Mutanten konnten trotz ihres oxidierten Zustandes weiterhin den Kanal vollständig inhibieren. Da mit den Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Experimenten ein Verlust der Bindung zwischen dem hEAG-Kanal und CaM-Wildtyp bzw. CaM1 gemessen wurde, war für die *in vivo* Experimente eine geringe Hemmung des hEAG-Kanals mit CaM und CaM1 zu erwarten. Dies war auch tatsächlich der Fall für CaM_{ox} , jedoch nicht für CaM1_{ox} . Das könnte daran liegen, dass die verwendete Konzentration an Calmodulin zu hoch gewesen

war, wodurch keine signifikante Änderung der Hemmung durch Calmodulin zu beobachten war. Für CaM2 und CaM1/2 war nach den Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Experimenten eine starke Hemmung des Kanals sowohl im oxidierten als auch im reduzierten Zustand zu erwarten. Dies war dann auch in den Patch-Clamp Experimenten zu beobachten. So haben beide Calmodulin-Mutanten, oxidiertes wie nicht-oxidiertes CaM2 und CaM1/2, jeweils eine vollständige Hemmung des Kanals bewirkt.

In den *in vitro* Experimenten wurde gezeigt, dass MSRA und MSRB nach Oxidation von Calmodulin dessen Bindung zum Kanal wieder herstellen können. Es ist zu erwarten, dass bei *in vivo* Experimenten die MSR-Enzyme dieselbe Funktion zeigen würden. Daher würden Methioninsulfoxidreduktasen ein geeignetes Mittel zur Regulation von hEAG-Kanälen darstellen, wenn die Enzyme sowohl unter normalen Bedingungen als auch unter oxidativem Stress in Calmodulin entstandene Methioninsulfoxide reduzieren können. Zusätzlich könnten MSR-Enzyme durch die hEAG-Regulation die Proliferation von Tumorzellen beeinflussen, wodurch medizinische Anwendungen ermöglicht würden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Von molekularem Sauerstoff abstammende reaktive Sauerstoffspezies sind essenziell für die Existenz und Entwicklung von Zellen. Wenn jedoch reaktive Sauerstoffspezies unter oxidativem Stress ihren Produktionsort verlassen und die Menge der Antioxidantien nicht zur Neutralisation ausreicht, dann treten gehäuft oxidative Schäden an den zellulären Makromolekülen auf. Oxidation von Methionin (Met) führt zur Entstehung zweier Stereoisomere: Methionin-S-sulfoxid (Met-S-O) und Methionin-R-sulfoxid (Met-R-O). Met-S-O wird enzymatisch durch Methioninsulfoxidreduktasen A zu Methionin reduziert. Met-R-O wird von diesen Enzymen nicht als Substrat erkannt.

- Im Laufe dieser Arbeit wurde gezeigt, dass drei humane Methioninsulfoxidreduktasen vom Typ B existieren, die ausschließlich Met-R-O als Substrat verwenden. Unsere Experimente zeigten für zwei der humanen MSRB-Enzyme einen Substratumsatz von ca. 3 Molekülen pro Minute mit DTT und einen Substratumsatz von 0,5 Molekülen pro Minute mit TRX als Reduktionsmittel. Der Substratumsatz war gegenüber dem humanen MSRA-Enzym ca. 2,5-fach geringer mit DTT bzw. 6-10-fach geringer mit TRX.
- Für die humanen MSRB-Enzyme konnten am Reaktionsmechanismus beteiligte Aminosäuren identifiziert werden. Das katalytische Zentrum der MSRB-Enzyme enthält ein aktives Cystein, welches im Gegensatz zu den Methioninsulfoxidreduktasen anderer Organismen nicht durch intramolekulare Disulfidbrücken regeneriert wird. Zudem scheinen humane MSRB-Enzyme Zink zu binden.
- Das in pathogenen Bakterien gefundene PILB-Protein tritt als natürliches Fusionsprotein aus MSRA und MSRB auf. Aus den humanen Methioninsulfoxidreduktasen vom Typ B und Typ A konnte ein Fusionsprotein hergestellt werden, welches sowohl Met-R-O als auch Met-S-O als Substrat umsetzt. Mit dem Fusionsprotein soll in Fruchtfliegen ein additiver Effekt der MSR-Komponenten zur Verlängerung der Lebensspanne untersucht werden.
- Die regulative Rolle von Methioninsulfoxidreduktasen konnte an Kaliumkanälen verdeutlicht werden. Die durch Methioninoxidation hervorgerufene, variable Inaktivierungszeitspanne des *Drosophila* ShC/B-Kanals konnte sowohl durch humane Methioninsulfoxidreduktasen vom Typ A als auch vom Typ B beschleunigt werden. Dabei zeigte sich, dass eine nicht-stereospezifische Oxidation des Kanals stattfindet.

- Wir haben weiterhin die Regulation des humanen EAG-Kanals durch Oxidation von Calmodulin dargestellt. Wir konnten zwei C-terminale Methionine in Calmodulin identifizieren, welche für eine Bindung an den Kanal essentiell sind. Die nach Oxidation verringerte Bindung konnte durch die Methioninsulfoxidreduktasen wieder hergestellt werden.

7 LITERATUR

- Amiconi, G., Ascoli, F., Barra, D., Bertollini, A., Matarese, R.M., Verzili, D., Brunori, M.** (1989). Selective oxidation of methionine beta(55)D6 at the alpha 1 beta 1 interface in hemoglobin completely destabilizes the T-state. *J Biol Chem.* 264: 17745-17749.
- Antoine, M., Boschi-Muller, S., Branlant, G.** (2003). Kinetic characterization of the chemical steps involved in the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase A from *Neisseria meningitidis*. *J Biol Chem.* 278: 45352-45357.
- Arner, E.S., Holmgren, A.** (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem.* 267: 6102-6109.
- Aust, S.D., Roerig, D.L., Pederson, T.C.** (1972). Evidence for superoxide generation by NADPH-cytochrome c reductase of rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47: 1133-1137.
- Balog, E.M., Norton, L.E., Bloomquist, R.A., Cornea, R.L., Black, D.J., Louis, C.F., Thomas, D.D., Fruen, B.R.** (2003). Calmodulin oxidation and methionine to glutamine substitutions reveal methionine residues critical for functional interaction with ryanodine receptor-1. *J Biol Chem.* 278: 15615-15621.
- Bartlett, R.K., Bieber Urbauer, R.J., Anbanandam, A., Smallwood, H.S., Urbauer, J.L., Squier, T.C.** (2003). Oxidation of Met144 and Met145 in calmodulin blocks calmodulin dependent activation of the plasma membrane Ca-ATPase. *Biochemistry* 42: 3231-3238.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chan, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A.** (1980). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1620-1624.
- Behne, D., Kyriakopoulos, A.** (2001). Mammalian selenium-containing proteins. *Annu Rev Nutr.* 21: 453-473.
- Benhar, M., Engelberg, D., Levitzki, A.** (2002). ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO Rep* 3: 420-425.
- Bernstein, H.D., Poritz, M.A., Strub, K., Hoben, P.J., Brenner, S., Walter, P.** (1989). Model for signal sequence recognition from amino-acid sequence of 54K subunit of signal recognition particle. *Nature.* 340: 482-486.
- Bianchi, L., Wible, B., Arcangeli, A., Tagliatela, M., Morra, F., Castaldo, P., Crociani, O., Rosati, B., Faravelli, L., Olivotto, M., Wanke, E.** (1998). *herg* encodes a K⁺ current highly conserved in tumors of different histogenesis: a selective advantage for cancer cells? *Cancer Research* 58:815-822
- Bielski, B.H.J., Cabelli, D.E.** (1995). Superoxide and hydroxyl radical chemistry in aqueous solution. In: *Active oxygen in chemistry*, Foote, C.S.; Valentine, J.S.; Greenberg, A.; Liebman, J.F. (eds.). Chapman and Hall, London, pp. 66-104.
- Boldyrev, A.A.** (1993). Does carnosine possess direct antioxidant activity? *Int J. Biochem* 25: 1101-1107.
- Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Van Dorsselear, A., Branlant, G.** (2000). A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 275: 35908-35913.
- Boveris, A., Oshino, N., Chance, B.** (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 128: 617-630.
- Brot, N., Weissbach, L., Werth, J., Weissbach, H.** (1981). Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78: 2155-2158.
- Brot, N., Weissbach, H.** (2000). Peptide methionine sulfoxide reductase: biochemistry and physiological role. *Biopolymers.* 55: 288-296.
- Capdevila, J., Parkhill, L., Chacos, N., Okita, R., Maters, B.S., Estabrook, R.W.** (1981). The oxidative metabolism of arachidonic acid by purified cytochromes P-450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101: 1357-1363.

- Chance, B., Sies, H., Boveris, A.** (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605.
- Ciorba, M.A., Heinemann, S.H., Weissbach, H., Brot, N., Hoshi, T.** (1997). Modulation of potassium channel function by methionine oxidation and reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 9932-9937.
- Ciorba, M.A., Heinemann, S.H., Weissbach, H., Brot, N., Hoshi, T.** (1999). Regulation of voltage-dependent K⁺ channels by methionine oxidation: effect of nitric oxide and vitamin C. *FEBS Lett.* 442: 48-52.
- Davis, D.A., Newcomb, F.M., Moskovitz, J., Wingfield, P.T., Stahl, S.J., Kaufman, J., Fales, H.M., Levine, R.L., Yarchoan, R.** (2000). HIV-2 protease is inactivated after oxidation at the dimer interface and activity can be partly restored with methionine sulphoxide reductase. *Biochem J.* 346: 305-311.
- Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M.J.** (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 324: 1-18.
- Dizdaroglu, M., Rao, G., Halliwell, B., Gajewski, E.** (1991). Damage to the DNA bases in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of ferric and cupric ions. *Arch. Biochem. Biophys.* 285: 317-324.
- Droge, W.** (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95.
- Duescher, R.J., Lawton, M.P., Philpot, R.M., Elfarra, A.A.** (1994). Flavin-containing monooxygenase (FMO)-dependent metabolism of methionine and evidence for FMO3 being the major FMO involved in methionine sulfoxidation in rabbit liver and kidney microsomes. *J Biol Chem.* 269: 17525-17530.
- Ejiri, S.I., Weissbach, H., Brot, N.** (1979). Reduction of methionine sulfoxide to methionine by *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 139: 161-164.
- Ejiri, S.I., Weissbach, H., Brot, N.** (1980). The purification of methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*. *Anal Biochem.* 102: 393-398.
- Engelhardt, J.F.** (1999). Redox-mediated gene therapies for environmental injury: Approaches and concepts. *Antiox Redox Signal* 1: 5-27.
- Ferrington, D.A., Sun, H., Murray, K.K., Costa, J., Williams, T.D., Bigelow, D.J., Squier, T.C.** (2001). Selective degradation of oxidized calmodulin by the 20 S proteasome. *J Biol Chem.* 276: 937-943.
- Freeman, B.A., Crapo, J.D.** (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 47: 412-426.
- Frei, B., Stocker, R., England, L., Ames, B.N.** (1990). Ascorbate: The most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv Exp Med Biol* 264: 155-163.
- Finkel T.** (2000). Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett.* 476: 52-4.
- Finkel, T., Holbrook, N.J.** (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247.
- Fomenko DE, Gladyshev VN.** (2002). CxxS: fold-independent redox motif revealed by genome-wide searches for thiol/disulfide oxidoreductase function. *Protein Sci.* 11: 2285-2296.
- Fomenko, D.E., Gladyshev, V.N.** (2003). Identity and functions of CxxC-derived motifs. *Biochemistry.* 42: 11214-11225.
- Gao, J., Yin, D.H., Yao, Y., Sun, H., Qin, Z., Schoneich, C., Williams, T.D., Squier, T.C.** (1998a). Loss of conformational stability in calmodulin upon methionine oxidation. *Biophys J.* 74: 1115-1134.
- Gao, J., Yin, D., Yao, Y., Williams, T.D., Squier, T.C.** (1998b). Progressive decline in the ability of calmodulin isolated from aged brain to activate the plasma membrane Ca-ATPase. *Biochemistry.* 37: 9536-9548.
- Gellman, S.H.** (1991). On the role of methionine residues in the sequence-independent recognition of nonpolar protein surfaces. *Biochemistry* 30: 6633-6636.

- Gladyshev, V.N., Hatfield, D.L.** (1999). Selenocysteine-containing proteins in mammals. *J Biomed Sci.* 6: 151-160.
- Grimaud, R., Ezraty, B., Mitchell, J.K., Lafitte, D., Briand, C., Derrick, P.J., Barras, F.** (2001). Repair of oxidized proteins. Identification of a new methionine sulfoxide reductase. *J Biol Chem.* 276: 48915-48920.
- Grune, T., Davies, K.J.** (1997a). Breakdown of oxidized proteins as a part of secondary antioxidant defenses in mammalian cells. *Biofactors.* 6: 165-172.
- Grune, T., Reinhecker, T., Davies, K.J.A.** (1997). Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J* 11: 526-534.
- Guex, N., Peitsch, M.C.** (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 18(15): 2714-2123.
- Gutteridge, J.M., Quinlan, G.J., Kovacic, P.** (1998). Phagomimetic action of antimicrobial agents. *Free Radic Res* 28: 1-14.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.** (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1-14.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.** (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press (Clarendon), London.
- Halliwell, B., Cross, C.E.** (1994). Oxygen-derived species: Their relation to human disease and environmental stress. *Environ. Health Perspect.* 102: 5-12.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.** (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med.* 18: 125-126.
- Hansel, A., Kuschel, L., Hehl, S., Lemke, C., Agricola, H.J., Hoshi, T., Heinemann, S.H.** (2002). Mitochondrial targeting of the human peptide methionine sulfoxide reductase (MSRA), an enzyme involved in the repair of oxidized proteins. *FASEB J.* 16: 911-913.
- Hansel, A., Jung, S., Hoshi, T., Heinemann, S.H.** (2003). A second human methionine sulfoxide reductase (hMSRB2) reducing methionine-R-sulfoxide displays a tissue expression pattern distinct from hMSRB1. *Redox Report* 8: 385-389.
- Hatfield, D.L., Gladyshev, V.N.** (2002). How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol Cell Biol.* 22: 3565-3576.
- Hayes, C.S., Illades-Aguilar, B., Casillas-Martinez, L., Setlow, P.** (1998). *In vitro* and *in vivo* oxidation of methionine residues in small, acid-soluble spore proteins from *Bacillus* species. *J Bacteriol.* 180: 2694-2700.
- Herrera, E., Barbas, C.** (2001). Vitamin E: Action, metabolism and perspectives. *J. Physiol Biochem* 57: 43-56.
- Hensley, K., Floyd, R.A.** (2001). Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: a look back, a look ahead. *Arch Biochem Biophys.* 397: 377-383.
- Holmgren, A.** (1985). Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.* 54: 237-271.
- Holmgren, A.** (1995). Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure* 3: 239-243.
- Hoshi, T., Heinemann, S.** (2001). Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *J Physiol.* 531: 1-11.
- Hsu, Y.-R., Narhi, L.O., Spahr, C., Langley, K.E., Lu, H.S.** (1996). *In vitro* methionine oxidation of *Escherichia coli*-derived human stem cell factor: effects on the molecular structure, biological activity, and dimerization. *Protein Sci.* 5: 1165-1173.
- Huang, W., Escribano, J., Sarfarazi, M., Coca-Prados, M.** (1999). Identification, expression and chromosome localization of a human gene encoding a novel protein with similarity to the *pilB* family of transcriptional factors (pilin) and to bacterial peptide methionine sulfoxide reductases. *Gene* 233: 233-240.
- Imlay, J.A., Chin, S.M., Linn, S.** (1988). Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. *Science* 240: 640-642.

- Jas, G.S., Kuczera, K.** (2002). Free-energy simulations of the oxidation of c-terminal methionines in calmodulin. *Proteins*. 8: 257-268.
- Jung, S., Hansel, A., Kasperczyk, H., Hoshi, T., Heinemann, S.H.** (2002). Activity, tissue distribution and site-directed mutagenesis of a human peptide methionine sulfoxide reductase of type B: hCBS1. *FEBS Lett*. 527: 91-94.
- Kaltschmidt, B., Sparna, T., Kaltschmidt, C.** (1999). Activation of NF- κ B by reactive oxygen intermediates in the nervous system. *Antioxid Redox Signal* 1: 129-144.
- Karlsson, R., Michaelsson, A., Mattsson, L.** (1991). Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J. Immunol. Methods* 145: 229-240.
- Kauffmann B, Favier F, Olry A, Boschi-Muller S, Carpentier P, Branlant G, Aubry A.** (2002). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the peptide methionine sulfoxide reductase B domain of *Neisseria meningitidis* PILB. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*: 1467-1469.
- Kim, H.Y., Gladyshev, V.N.** (2003). Methionine Sulfoxide Reduction in Mammals: Characterization of Methionine-R-Sulfoxide Reductases. *Mol Biol Cell*. 15: 1055-1064.
- Koc, A., Gasch, A.P., Rutherford, J.C., Kim, H.Y., Gladyshev, V.N.** (2004). Methionine sulfoxide reductase regulation of yeast lifespan reveals reactive oxygen species-dependent and -independent components of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 101: 7999-8004.
- Kohen, R., Nyska, A.** (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*. 30: 620-50.
- Kryukov, G.V., Kumar, R.A., Koc, A., Sun, Z., Gladyshev, V.N.** (2002). Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 4245-4250.
- Kumar, R.A., Koc, A., Cerny, R.L., Gladyshev, V.N.** (2002). Reaction mechanism, evolutionary analysis, and role of zinc in *Drosophila* methionine-R-sulfoxide reductase. *J Biol Chem*. 277: 37527-37535.
- Kuschel, L., Hansel, A., Schonherr, R., Weissbach, H., Brot, N., Hoshi, T., Heinemann, S.H.** (1999). Molecular cloning and functional expression of a human peptide methionine sulfoxide reductase (hMsrA). *FEBS Lett*. 456: 17-21.
- Lescure, A., Gautheret, D., Carbon, P., Krol, A.** (1999). Novel selenoproteins identified *in silico* and *in vivo* by using a conserved RNA structural motif. *J Biol Chem*. 274: 38147-38154.
- Levine, R.L., Berlett, B.S., Moskowitz, J., Mosoni, L., Stadtman, E.R.** (1999). Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech Ageing Dev*. 107: 323-332.
- Levine, R.L., Moskowitz, J., Stadtman, E.R.** (2000). Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB Life*. 50(4-5): 301-307.
- Levine, R.L., Stadtman, E.R.** (2001). Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol*. 36: 1495-1502.
- Low, S.C., Berry, M.J.** (1996). Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes. *Trends Biochem Sci*. 21: 203-208.
- Lowther, W.T., Brot, N., Weissbach, H., Honek, J.F., Matthews, B.W.** (2000a). Thiol-disulfide exchange is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 6463-6468.
- Lowther, W.T., Brot, N., Weissbach, H., Matthews, B.W.** (2000b). Structure and mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase, an "anti-oxidation" enzyme. *Biochemistry* 39: 13307-13312.
- Lowther, W.T., Weissbach, H., Etienne, F., Brot, N., Matthews, B.W.** (2002). The mirrored methionine sulfoxide reductases of *Neisseria gonorrhoeae* pilB. *Nat Struct Biol*. 9: 348-352.
- Martonosi, A.N., Pikula, S.** (2003). The network of calcium regulation in muscle. *Acta Biochim Pol*. 50: 1-30.

- McCord, J.M.** (1979). Superoxide, superoxide dismutase and oxygen toxicity, in: Hodgson, E., Bend, J.R., Philpot, R.M. (Eds.), *Reviews in Biochemical Toxicology*, Vol. 1, Elsevier, Amsterdam, pp. 109-124.
- Meier, B., Cross, A.R., Hancock, J.T., Kaup, F.J., Jones, O.T.** (1991). Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts. *Biochem J.* 275: 241-245.
- Mello-Filho, A.C., Meneghini, R.** (1984). *In vivo* formation of single-strand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by the Haber-Weiss reaction. *Biochim. Biophys. Acta* 781: 56-63.
- Michaelis, M.L., Bigelow, D.J., Schoneich, C., Williams, T.D., Ramonda, L., Yin, D., Huhmer, A.F., Yao, Y., Gao, J., Squier, T.C. (1996). Decreased plasma membrane calcium transport activity in aging brain. *Life Sci.* 59: 405-12.
- Minetti G, Balduini C, Brovelli A.** (1994). Reduction of DABS-L-methionine-dl-sulfoxide by protein methionine sulfoxide reductase from polymorphonuclear leukocytes: stereospecificity towards the l-sulfoxide. *Ital J Biochem.* 43: 273-83.
- Miranda-Vizuete, A., Damdimopoulos, A.E., Pedrajas, J.R., Gustafsson, J.A., Spyrou, G.** (1999). Human mitochondrial thioredoxin reductase cDNA cloning, expression and genomic organization. *Eur. J. Biochem.* 261: 405-412.
- Mohri, M., Reinach, P.S., Kanayama, A., Shimizu, M., Moskovitz, J., Hisatsune, T., Miyamoto, Y.** (2002). Suppression of the TNF α -induced increase in IL-1 α expression by hypochlorite in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43: 3190-3195.
- Montgomery, H.J., Bartlett, R., Perdicakis, B., Jervis, E., Squier, T.C., Guillemette, J.G.** (2003). Activation of constitutive nitric oxide synthases by oxidized calmodulin mutants. *Biochemistry.* 42: 7759-7768.
- Moskovitz, J., Rahman, M.A., Strassman, J., Yancey, S.O., Kushner, S.R., Brot, N., Weissbach, H.** (1995). *Escherichia coli* peptide methionine sulfoxide reductase gene: regulation of expression and role in protecting against oxidative damage. *J Bacteriol.* 177: 502-507.
- Moskovitz, J., Weissbach, H., Brot, N.** (1996). Cloning the expression of a mammalian gene involved in the reduction of methionine sulfoxide residues in proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 2095-2099.
- Moskovitz, J., Berlett, B.S., Poston, J.M., Stadtman, E.R.** (1997). The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94: 9585-9589.
- Moskovitz, J., Poston, J.M., Berlett, B.S., Nosworthy, N.J., Szczepanowski, R., Stadtman, E.R.** (2000). Identification and characterization of a putative active site for peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) and its substrate stereospecificity. *J Biol Chem.* 275: 14167-14172.
- Moskovitz, J., Bar-Noy, S., Williams, W.M., Requena, J., Berlett, B.S., Stadtman, E.R.** (2001). Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *PNAS USA.* 98: 12920-12925.
- Moskovitz, J., Singh, V.K., Requena, J., Wilkinson, B.J., Jayaswal, R.K., Stadtman, E.R.** (2002a). Purification and characterization of methionine sulfoxide reductases from mouse and *Staphylococcus aureus* and their substrate stereospecificity. *Biochem Biophys Res Commun.* 290: 62-65.
- Moskovitz, J., Yim, M.B., Chock, P.B.** (2002b). Free radicals in disease. *Arch Biochem Biophys.* 397: 354-359.
- Neiers, F., Kriznik, A., Boschi-Muller, S. Branlant, G.** (2004). Evidence for a new sub-class of methionine sulfoxide reductases B with an alternative thioredoxin recognition signature. *J Biol. Chem.* 279: 42462-42468.
- Nelson, D.P., Kiesow, L.A.** (1972). Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal Biochem.* 49: 474-478.
- Novoselov, S.V., Rao, M., Onoshko, N.V., Zhi, H., Kryukov, G.V., Xiang, Y., Weeks, D.P., Hatfield, D.L., Gladyshev, V.N.** (2002). Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J.* 21: 3681-3693.

- Olry, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselear, A., Branlant, G.** (2002). Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of PILB, a probable virulence factor from *Neisseria meningitidis*. *J Biol Chem.* 277: 12016-12022.
- Packer, L. Kraemer, K., Rimbach, G.** (2001). Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition* 17: 888-895.
- Papa, S., Skulachev, V.P.** (1997). Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol. Cell. Biochem.* 174: 305-319.
- Pardo, L.A., del Camino, D., Sánchez, A., Alves, F., Brüggemann, A., Beckh, S., Stümer, W.** (1999). Oncogenic potential of EAG K+ channels. *EMBO* 18:5540-5547
- Perrin, D., Koppenol, W.H.** (2000). The quantitative oxidation of methionine to methionine sulfoxide by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys.* 377: 266-72.
- Petropoulos, I., Mary, J., Perichon, M., Friguet, B.** (2001). Rat peptide methionine sulphoxide reductase: cloning of the cDNA, and down-regulation of gene expression and enzyme activity during aging. *Biochem J.* 355: 819-825.
- Picot, C.R., Perichon, M., Cintrat, J.C., Friguet, B., Petropoulos, I.** (2004). The peptide methionine sulfoxide reductases, MsrA and MsrB (hCBS-1), are downregulated during replicative senescence of human WI-38 fibroblasts. *FEBS Lett.* 558: 74-78.
- Rahman, M.A., Nelson, H., Weissbach, H., Brot, N.** (1992) Cloning, sequencing, and expression of the *Escherichia coli* peptide methionine sulfoxide reductase gene. *J. Biol. Chem.* 267 15549-15551.
- Richardson, J.S., Richardson, D.C.** (1989). Prediction of protein structure and the principles of protein conformation (Fasman, G.D., Ed.) pp 1-98, Plenum Press, New York.
- Ruan, H., Tang, X.D., Chen, M.L., Joiner, M.L., Sun, G., Brot, N., Weissbach, H., Heinemann, S.H., Iverson, L., Wu, C.F., Hoshi, T.** (2002). High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. *PNAS USA.* 99: 2748-2753
- Sausen, P.J., Elfarra, A.A.** (1990). Cysteine conjugate S-oxidase. Characterization of a novel enzymatic activity in rat hepatic and renal microsomes. *J Biol Chem.* 265: 6139-45.
- Schönherr, R., Löber, K., Heinemann, S.H.** (2000). Inhibition of human ether à go-go potassium channels by Ca²⁺/calmodulin. *EMBO J.* 19: 3263-3271.
- Sen, C.K.** (1998). Redox signalling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochem Pharmacol* 55: 1747-1758.
- Sen, C.K.** (2000). Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr Top Cell Regul* 36: 1-30.
- Shackelford, R.E., Kaufmann, W.K., Paules, R.S.** (2000). Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med.* 28: 1387-1404.
- Sharov, V.S., Ferrington, D.A., Squier, T.C., Schoneich, C.** (1999). Diastereoselective reduction of protein-bound methionine sulfoxide by methionine sulfoxide reductase. *FEBS Lett.* 455: 247-50.
- Sharov, V.S., Schöneich, C.** (2000). Diastereoselective protein methionine oxidation by reactive oxygen species and diastereoselective repair by methionine sulfoxide reductase. *Free Radic Biol Med.* 29: 986-94.
- Sigalov, A.B., Stern, L.J.** (1998). Enzymatic repair of oxidative damage to human apolipoprotein A-I. *FEBS Lett.* 433: 196-200.
- Sjolander, S., Urbaniczky, C.** (1991). Integrated fluid handling system for biomolecular interaction analysis. *Anal. Chem.* 63: 2338-2345.
- Skulachev, V.P.** (1997). Aging is a specific biological function rather than the result of a disorder in complex living systems: biochemical evidence in support of Weismann's hypothesis. *Biochemistry* 62: 1191-1195.
- Spyrou, B., Enmark, E., Miranda-Vizuete, A., Gustafsson, J.Å.** (1997). Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *J. Biol. Chem* 272: 2936-2941.
- Stadtman, E.R.** (1992). Protein oxidation and aging. *Science.* 257: 1220-1224.

- Stadtman, E.R., Berlett, B.S.** (1998). Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev.* 30: 225-243.
- Stadtman, E.R., Levine, R.L.** (2000). Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci.* 899: 191-208.
- Stadtman, E.R., Moskovitz, J., Levine, R.L.** (2003). Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences. *Antioxid Redox Signal.* 5: 577-582.
- Stadtman, E.R., Levine, R.L.** (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids.* 25: 207-218.
- St. John, G., Brot, N., Ruan, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Weissbach, H., Nathan, C.** (2001). Peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 9901-9906.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., Glaser, A.N., Ames, B.M.** (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235: 1043-1046.
- Sun, Q.A., Wu, Y., Zappacosta, F., Jeang, K.T., Lee, B.J., Hatfield, D.L., Gladyshev, V.N.** (1999). Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. *J Biol Chem.* 274: 24522-24530.
- Szweda, P.A., Friguier, B., Szweda, L.I.** (2002). Proteolysis, free radicals, and aging. *Free Radic Biol Med.* 33: 29-36.
- Tete-Favier, F., Cobessi, D., Leonard, G.A., Azza, S., Talfournier, F., Boschi-Muller, S., Branlant, G., Aubry, A.** (2000). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 56: 1194-1197.
- Thannickal, V.J., Fanburg, B.L.** (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279: 1005-1028
- Turrens, J.F.** (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci. Rep.* 17: 3-8.
- Vorm, O., Roepstorff, P.** (1994). Peptide sequence information derived by partial acid hydrolysis and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Biol Mass Spectrom.* 23: 734-740.
- Vogt, W.** (1995). Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radic Biol Med.* 18: 93-105.
- Vougier, S., Mary, J., Friguier, B.** (2003). Subcellular localization of methionine sulphoxide reductase A (MsrA): evidence for mitochondrial and cytosolic isoforms in rat liver cells. *Biochem J.* 373: 531-537.
- Vougier, S., Mary, J., Dautin, N., Vinh, J., Friguier, B., Ladant, D.** (2004). Essential role of methionine residues in calmodulin binding to *Bordetella pertussis* adenylate cyclase, as probed by selective oxidation and repair by the peptide methionine sulfoxide reductases. *J Biol Chem.* 279: 30210-30218.
- Weissbach, H., Etienne, F., Hoshi, T., Heinemann, S.H., Lowther, W.T., Matthews, B., St John, G., Nathan, C., Brot, N.** (2002). Peptide methionine sulfoxide reductase: structure, mechanism of action, and biological function. *Arch Biochem Biophys.* 397: 172-178.
- Wessel, D., Flugge, U.I.** (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem.* 138: 141-143.
- Wizemann, T.M., Moskovitz, J., Pearce, B.J., Cundell, D., Arvidson, C.G., So, M., Weissbach, H., Brot, N., Masure, H.R.** (1996). Peptide methionine sulfoxide reductase contributes to the maintenance of adhesins in three major pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7985-7990.
- Yao, Y., Yin, D., Jas, G.S., Kuczer, K., Williams, T.D., Schoneich, C., Squier, T.C.** (1996). Oxidative modification of a carboxyl-terminal vicinal methionine in calmodulin by hydrogen peroxide inhibits calmodulin-dependent activation of the plasma membrane Ca-ATPase. *Biochemistry.* 35: 2767-2787.

8 ANHANG

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Stefan H. Heinemann herzlich bedanken für ein vielseitiges und spannendes Thema. Die wissenschaftlichen Diskussionen haben mir viel Spaß gemacht. Für die fachliche Unterstützung und die Möglichkeit der Teilnahme an interessanten Tagungen möchte ich mich besonders bedanken.

Mein Besonderer Dank gilt Dr. Alfred Hansel, der durch fachliche Kompetenz und hilfreiche Ratschläge zum großen Teil am Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat. Ohne seine tatkräftige Mithilfe und intensive Beteiligung hätten manche der hier vorgestellten Experimente in dieser Form nicht zustande kommen können.

Priv. Doz. Dr. Roland Schönherr und Dr. Guido Gessner danke ich ganz herzlich für die Einführung in die Arbeitsmethoden der Elektrophysiologie sowie für die intensive Unterstützung bei der Auswertung dieser Daten.

Herrn Prof. Dr. Toshinori Hohsi danke ich für das Interesse an dieser Arbeit und die vielen Informationen wissenschaftlicher Art.

Ich möchte mich bei all meinen Kooperationspartnern bedanken. Bei Frau Dr. Renate Bublitz und Fr. Helga Endmann für die Einführung in die Ermittlung und Auswertung der MALDI-Daten; bei Dr. Matthias Görlach und Michela Carella für die wertvolle Unterstützung zur Proteinaufreinigung sowie Dr. Ralf W. Glaser für die Messungen am BIA-Core-Gerät.

Hier möchte ich auch bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekular und zelluläre Biophysik ein herzliches Dankeschön sagen, für die vielen anregenden Tipps, das angenehme Arbeitsklima und die langjährige gute Zusammenarbeit.

Mein herzlicher Dank geht auch an Dr. Ronny Hänold und Dr. Enrico Jandt für die sicherlich mühsame Durchsicht dieser Arbeit.

LEBENS LAUF

Name: Jung
 Vorname: Stephan
 Wohnort: Hans-Berger-Straße 19
 07747 Jena
 Telefon: 03641/238875

Geburtsdatum: 02.11.1973
 Geburtsort: Wanne-Eickel jetzt Herne
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig
 Kinder: Tristan Thorben Jung; geboren am 05.09.2003

SCHULBILDUNG:

1980 – 1984 Overberg Grundschule, Herne
 1984 – 1993 Gymnasium Eickel, Herne
 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife (Note: 2,7)

ZIVILDienst:

1993 – 1995 Familien u. Krankenpflege, Herne

Ausbildung / Studium

10/1995 – 02/2001 Studium an der Ruhr-Universität-Bochum
 Studiengang : Diplom Biologe (Note: 1,3)

02/1998 – 03/1998 Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für
 Pflanzenphysiologie (Ruhr-Universität-Bochum)

05/1998 – 01/1999 Technischer Assistent am Lehrstuhl für
 Pflanzenphysiologie (Ruhr-Universität-Bochum)

04/2000 – 01/2001 Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für
 Pflanzenphysiologie (Ruhr-Universität-Bochum)

02/2001 – 03/2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für
 Pflanzenphysiologie (Ruhr-Universität-Bochum)

04/2001 – 06/2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Molekulare und zelluläre Biophysik (FSU Jena)
07/2002 – 07/2004	Stipendiat des Graduiertenkollegs 768 „Biomolekulare Schalter“ (FSU Jena)
09/2004 – 02/2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter des Instituts für Immunologie (FSU Jena)

PUBLIKATIONEN

Jung S, Hansel A, Kasperczyk H, Hoshi T, Heinemann SH. (2002). Activity, tissue distribution and site-directed mutagenesis of a human peptide methionine sulfoxide reductase of type B: hCBS1. FEBS Lett. 527: 91-94.

Hansel A, **Jung S**, Hoshi T, Heinemann SH (2003). A second human methionine sulfoxide reductase (hMSRB2) reducing methionine-R-sulfoxide displays a tissue expression pattern distinct from hMSRB1. Redox Report 8: 385-389.

KONGRESSBEITRÄGE

Hansel A, **Jung S**, Roßner A, Hoshi T, Heinemann SH (2002). The human peptide methionine sulfoxide reductases – a family of enzymes involved in oxidative stress defense. Signal Transduction 3-4: 137.

Jung S, Hansel A, Hoshi T, Heinemann SH (2003). Stereospecific enzymatic reduction of methionine sulfoxide. CellSignals 2003 Jena

Jung S, Hansel A, Kasperczyk H, Hoshi T, Heinemann SH (2002). Functional characterization and tissue distribution of a human methionine sulfoxide reductase of type B. hCBS1. Pflügers Archiv 443: 234.

Thiele JJ, Sander CS, Ogawa F, Oehrl O, Elsner P, **Jung S**, Hansel A, Heinemann SH (2004). Peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA), a protein oxidation repair enzyme, is expressed in human epidermis and upregulated by solar simulated UV irradiation. Journal of investigative Dermatology 122 (3): A148-A148 887

KONGRESSTEILNAHMEN

- 15.03.–19.03.2002 81. jährliches Treffen der Physiological Society; Scandinavian Physiological Society und Deutschen Physiologischen Gesellschaft (DPG) in Tübingen
- 07.11. -09.11.2002 6. jährliches Treffen der Signaltransduktions-Gesellschaft (STS) in Weimar
- 24./25.01.2003 1. Treffen des wissenschaftlichen Nachwuchses der GBM-Studiengruppe „Biochemische Pharmakologie und Toxikologie“ in Günzburg/Donau
- 01.03.-05.03.2003 47. jährliches Treffen der Biophysical Society in San Antonio, TX, USA
- 22.05.-24.05.2003 1. Treffen des Graduiertenkollegs 768 „Biomolekulare Schalter“ in Siegmundsburg; Organisation und Gestaltung
- 30.06.-04.07.2003 53. jährliches Treffen der Nobelpreisträger in Lindau
- 25.10.-27.10.2003 Cell Signals '03, 1st meeting of the joint research centres SFB604 and GRK768 in Jena
- 21.06.-24.06.2004 11. Arbeitstagung „Mikromethoden in der Proteinchemie“ in Martinsried
- 24.06.-26.06.2004 2. Treffen des Graduiertenkollegs 768 „Biomolekulare Schalter“ in Sonneberg