

***In silico* Analysen, rekombinante Expression und
Struktur-Funktionsanalysen humaner
ADP-Ribosyl-X Hydrolasen (ARHs)**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
an der Universität Hamburg
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Department Biologie

vorgelegt von
Stefan Kernstock
aus Stuttgart

Hamburg 2008

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. med. F. NOLTE
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. T. BURMESTER
Tag der Disputation: 08. Februar 2008

Hamburg, den 24. Januar 2008



A handwritten signature in black ink that reads 'Jörg Ganzhorn'.

Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Dank

Ganz besonders danke ich Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte für die Überlassung des interessanten Themas, seine Hilfsbereitschaft und seine exzellente Betreuung.

Nur durch die hervorragenden und befruchtenden Kooperationen mit Dr. Christoph Müller-Dieckmann und Dr. Marc Niere waren einige der beschriebenen Versuche möglich, wofür ich sehr dankbar bin.

Den Mitarbeitern des Instituts für Immunologie danke ich für die Einarbeitung in die Techniken, die bereichernden wissenschaftlichen Diskussionen, Tipps bei praktischen Problemen und besonders für das sehr gute Arbeitsklima.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich für die finanzielle Unterstützung, die mir die Durchführung dieses Forschungsprojektes ermöglichte.

Ich danke Henrick Schomacker und Nikolaus Deigendesch für die Hilfe bei der Überarbeitung.

Meiner Frau Svenja Kernstock danke ich für die großartige Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Bemühungen, diese Arbeit noch lesbarer zu machen.

Einige Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits publiziert

Publikationen in Fachzeitschriften

NIERE*, M.; KERNSTOCK*, S.; KOCH-NOLTE, F. und ZIEGLER, M. (2008): Functional localization of two poly-ADP-ribose degrading enzymes to the mitochondrial matrix.

Mol. Cell. Biol. 28: 814-824.

* gleicher Beitrag. (equal contribution)

MÜLLER-DIECKMANN*, C.; KERNSTOCK*, S.; LISUREK, M.; VON KRIES, J. P.; HAAG, F.; WEISS, M. S. und KOCH-NOLTE, F. (2006): The structure of human ADP-ribosylhydrolase 3 (ARH3) provides insights into the reversibility of protein ADP-ribosylation.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103: 15026-31.

* gleicher Beitrag. (equal contribution)

KERNSTOCK, S.; KOCH-NOLTE, F.; MÜLLER-DIECKMANN, J.; WEISS, M. S. und MÜLLER-DIECKMANN, C. (2006): Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of human ARH3, the first eukaryotic protein-ADP-ribosylhydrolase.

Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. 62: 224-7.

Kongressbeiträge - Vorträge

KERNSTOCK, S.; MÜLLER-DIECKMANN, C. und KOCH-NOLTE, F. (2007): 3D structure determination of human ADP-ribosyl hydrolase 3, structure guided mutagenesis and 3D-modelling of related ADP-ribosyl hydrolases. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Hamburg. Online verfügbar unter doi:10.1240/sav_gbm_2007_h_001966.

KERNSTOCK, S. und KOCH-NOLTE, F. (2007): Structure and function of mammalian mono-ADP-ribosyltransferases and ADP-ribosylhydrolases. 4. PARP Regio Meeting, Heidelberg

Kongressbeiträge - publizierte Posterbeiträge

KERNSTOCK, S.; HAAG, F. und KOCH-NOLTE, F. (2006): Human ADP-ribosyl hydrolase 3 (ARH3), a novel enzyme with poly(ADP-ribose) glycohydrolase activity is localized in mitochondria. (Kurzfassung des Beitrags für die Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Braunschweig) **European Journal of Cell Biology** 85 Suppl. 56: S. 65.

KERNSTOCK, S.; HAAG, F. und KOCH-NOLTE, F. (2005): Secondary structure prediction and 3D-modelling of mammalian mono-ADP-ribosyl hydrolases. (Kurzfassung des Beitrags für die FEBS Konferenz, Budapest) **The Febs Journal**, 272 Suppl. 1: S. 89.

KERNSTOCK, S.; HAAG, F. und KOCH-NOLTE, F. (2004): In silico identification and cloning of ADP-ribosylhydrolase gene family members. (Kurzfassung des Beitrags für die FEBS Konferenz, Warschau) **European Journal of Biochemistry** 271 Suppl. 1: S. 77.

KERNSTOCK, S.; HÖFS, A.; SEYFRIED, F.; HAAG, F. und KOCH-NOLTE, F. (2004): Cloning of two novel ADP-ribosylhydrolase gene family members - role in signal transduction by reversible ADP-ribosylation? (Kurzfassung des Beitrags für die Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Berlin) **European Journal of Cell Biology** Suppl. 54: S. 29.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	8
1.1 Abstract	9
2. Einleitung	10
2.1 Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid und seine Rollen im Stoffwechsel	10
2.2 Mono-ADP-Ribosylierung	13
2.3 Poly-ADP-Ribosylierung	16
2.4 De-mono-ADP-Ribosylierung	19
2.4.1 Mono-ADP-Ribosyl-Arginin Hydrolase 1 (ARH1)	20
2.4.2 Weitere mono-ADP-Ribosyl-X Hydrolasen	21
2.5 De-poly-ADP-Ribosylierung	21
2.6 ADP-Ribosylierungszyklen	22
2.6.1 ADP-Ribosylierungszyklen bei Prokaryoten	22
2.6.2 ADP-Ribosylierungszyklen bei Säugetieren	23
2.7 NAD-abhängige Regulationsmechanismen in Mitochondrien	24
2.8 3D-Strukturanalyse von Enzymen der Mono- und Poly-ADP-Ribosylierung	25
3. Materialien	26
3.1 Eukaryotische Zelllinien	26
3.2 Bakterienstämme	26
3.3 Reagenzien	26
3.3.1 Nucleinsäuren und Nucleotide	26
3.3.2 Enzyme	28
3.3.3 Antikörper	29
3.3.4 Chemikalien	30
3.3.5 Puffer und Lösungen	32
<i>Zellkulturmedien und Lösungen</i>	32
<i>Kulturmedien für Bakterien</i>	33
<i>Antibiotika</i>	34
<i>Lösungen für die DNA-Gelelektrophorese</i>	34
<i>Lösungen für die Proteinbiochemie</i>	34
<i>Lösungen für die Aufreinigung rekombinanter Proteine</i>	35
<i>Lösungen für enzymatische Untersuchungen</i>	35
<i>Lösungen für Immunfluoreszenzanfärbungen</i>	36
3.3.6 Reagenzsysteme (<i>Kits</i>)	36
3.4 Verbrauchsmaterial	37
3.5 Laborgeräte	38
4. Methoden	40
4.1 Methoden der <i>in silico</i> Recherchen	40
4.1.1 BLAST-Suchen	40
4.1.2 Ermittlung orthologer und paraloger ARH-Gene	40
4.1.3 Multiple Sequenzalignments und Strukturvorhersagen	41
4.1.4 Vervollständigung partieller ARH-Sequenzen	41
4.1.5 Korrektur fehlerhafter ARH-Sequenzen	41
4.1.6 Bestimmung der Exon-Intron-Grenzen	42
4.1.7 Berechnung der Sequenzidentität zwischen ARH-Proteinen	42
4.1.8 Lokalisationsvorhersagen	42
4.2 Methoden der Molekularbiologie	43
4.2.1 Transformation von Bakterien	43

4.2.2	Kryokonservierung transformierter Bakterien.....	43
4.2.3	Klonierungs-PCR.....	43
4.2.4	Zielgerichtete Mutagenese.....	44
4.2.5	Präparation von Plasmid-DNA.....	45
4.2.6	Restriktionsverdau von DNA.....	45
4.2.7	DNA-Gelelektrophorese.....	46
4.2.8	Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	46
4.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten.....	46
4.2.10	DNA-Sequenzierung.....	47
4.3	Klonierungen.....	47
4.3.1	Klonierungen für die prokaryotische Expression.....	47
4.3.2	Klonierungen für die transiente eukaryotische Transfektion.....	48
4.3.3	Klonierungen für die stabile eukaryotische Transfektion.....	49
4.4	Methoden der rekombinanten Expression in <i>E. coli</i>	50
4.4.1	Expressionskulturen in kleinem Maßstab.....	50
4.4.2	Expressionskulturen in großem Maßstab.....	50
4.4.3	Testexpression und Detektion löslichen Proteins im Zelllysat.....	50
4.4.4	Proteinpräparation aus Kulturen in kleinem Maßstab.....	51
4.4.5	Proteinpräparation aus Kulturen in großem Maßstab.....	51
4.5	Methoden der Zellbiologie.....	53
4.5.1	Kryokonservierung eukaryotischer Zellen.....	53
4.5.2	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	53
4.5.3	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen.....	53
4.5.4	Stabil Transfektion von T-REx 293 Flp-In Zellen.....	54
4.5.5	Herstellung von Zelllysaten.....	54
4.5.6	Herstellung mono- und polyklonaler Antikörper.....	55
4.6	Immunocytochemie und Fluoreszenzmikroskopie.....	55
4.6.1	Kultivierung von Zellen.....	55
4.6.2	Fixierung und Permeabilisierung von Zellen.....	56
4.6.3	Anfärbung von Mitochondrien.....	56
4.6.4	Immunocytochemie.....	56
4.6.5	Fluoreszenzmikroskopie.....	57
4.7	Methoden der Protein-Biochemie.....	57
4.7.1	Quantifizierung von Proteinen.....	57
4.7.2	SDS-PAGE.....	58
4.7.3	Proteinfärbung in LDS-Polyacrylamid-Gelen.....	58
4.7.4	Westernblot.....	58
4.7.5	Silberfärbung.....	59
4.7.6	Immunodetektion.....	59
4.8	Enzymatische Untersuchungen.....	59
4.8.1	De-mono-ADP-Ribosylierung von Agmatin.....	59
4.8.2	Arginin-de-mono-ADP-Ribosylierung von M2-Antikörper.....	60
4.8.3	De-poly-ADP-Ribosylierung von PARP1.....	60
4.8.4	Analyse der De-poly-ADP-Ribosylierung durch mutierte ARH3-Proteine.....	61

5.	Ergebnisse	62
5.1	<i>In silico</i> Analysen der ARH-Genfamilie	62
5.1.1	ARH-Gene von Mensch und Maus	62
5.1.2	ARH-Gene in anderen Organismen	65
5.1.3	ARH-Familien in Vertebraten	68
5.2	Rekombinante Expression und Charakterisierung von ARH-Proteinen	76
5.2.1	Rekombinante Expression und Aufreinigung	76
5.2.2	Enzymatische Charakterisierung	81
	<i>De-mono-ADP-Ribosylierung von Agmatin</i>	82
	<i>Argininspezifische Protein-de-mono-ADP-Ribosylierung</i>	83
	<i>De-poly-ADP-Ribosylierung</i>	84
5.2.3	Kristallisation und 3D-Strukturanalyse von ARHs	85
	<i>Kristallisation von H. sapiens und M. musculus ARH3</i>	86
	<i>Kristallisation von H. sapiens ARH1</i>	88
	<i>Lösung der ARH3 3D-Struktur</i>	88
	<i>Docking von ADPR an ARH3</i>	95
5.2.4	Strukturgeleitete Mutagenese von ARH3	97
5.3	Subzelluläre Lokalisation und Enzymaktivität <i>in vivo</i>	103
5.3.1	Lokalisationsvorhersagen	103
5.3.2	Lokalisation von ARH-eGFP Fusionsproteinen	103
5.3.3	Mitochondriale Lokalisation von hsARH3	107
5.3.4	Generierung intramitochondrialer poly-ADP-Ribose <i>in vivo</i>	113
5.3.5	De-poly-ADP-Ribosylierung durch ARH3 <i>in vivo</i>	115
6.	Diskussion	118
6.1	Die ARH-Proteinfaltungsfamilie	119
6.2	Das ARH3-Protein des Menschen	124
6.2.1	Das aktive Zentrum von hsARH3	124
6.2.2	Putativer katalytischer Mechanismus von hsARH3	128
6.2.3	Lokalisation und <i>in vivo</i> Aktivität von hsARH3	129
6.2.4	Mögliche Funktionen von hsARH3	129
6.3	ARH1 und ARH2 des Menschen	131
6.4	ARHs in anderen Organismen	135
6.5	Ausblick	136
7.	Literatur	138
8.	Anhang	147
8.1	ARH-Proteinsequenzen	147
8.2	Alignments der Aminosäuresequenzen orthologer ARHs	151
8.2.1	Orthologe ARH1-Genprodukte	151
8.2.2	Orthologe ARH2-Genprodukte	152
8.2.3	Orthologe ARH3-Genprodukte	153
8.2.4	Orthologe ARH4-Genprodukte	154
8.3	Primer	155
8.4	Plasmidkarten	157
8.5	Abkürzungsverzeichnis	160

1. Zusammenfassung

Die ADP-Ribosylierung ist eine reversible, kovalente Modifikation von Proteinen, die die Funktionsweise der Zielproteine verändern kann. Bei der Mono-ADP-Ribosylierung, die von bakteriellen Toxinen und bei Säugetieren von endogenen Mono-ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) katalysiert wird, wird ADP-Ribose von NAD auf ein Substrat übertragen. Poly-ADP-Ribose-Polymerasen (PARPs) katalysieren die Poly-ADP-Ribosylierung, bei der am Zielprotein ein verzweigtes Polymer aus ADP-Ribosegruppen erzeugt wird. ADP-Ribosyl-X Hydrolasen (ARHs) und Poly-ADP-Ribosylglykohydrolyase (PARG) können die modifizierten Zielproteine de-ADP-ribosylieren. In Säugetier-Genomen finden sich drei Mitglieder der ARH-Familie (ARH1, ARH2 und ARH3). Ziel der vorliegenden Arbeit war die molekulare Charakterisierung humaner ARHs, mit einem Schwerpunkt auf ARH3.

Humanes ARH1 und ARH3 wurden kloniert und als rekombinante Proteine exprimiert. Rekombinantes ARH1 war fähig ADP-Ribosyl-Arginin zu spalten, während ARH3 keine Aktivität mit diesem Substrat zeigte; ARH3 war jedoch in der Lage, Poly-ADP-Ribose abzubauen. Die 3D-Struktur von ARH3 wurde in Kooperation mit Dr. Christoph Müller-Dieckmann (EMBL, Hamburg und ESRF, Grenoble, Frankreich) gelöst. ARH3 ist die erste publizierte ARH-Struktur und bildet den Archetyp einer neuen Proteinfaltungsfamilie. Das globuläre Protein besteht aus 18 α -Helices. Saure Aminosäuren an den Spitzen von vier zentralen Helices koordinieren zwei Magnesiumionen in einer Vertiefung. Durch *docking*-Experimente wurde die Bindung von ADP-Ribose und ADP-Ribosyl-ADP-Ribose in diesem putativen aktiven Zentrum modelliert. Zielgerichtete Mutagenesen der durch das *docking*-Experiment identifizierten Aminosäuren wurden durchgeführt und die enzymatische Aktivität der Mutanten wurde ermittelt. In Übereinstimmung mit der postulierten Funktion dieser Aminosäuren in der Bindung von ADP-Ribose zeigte sich bei vielen Mutanten ein Funktionsverlust. Die drei humanen ARH-Proteine wurden zur Untersuchung ihrer subzellulären Lokalisation als eGFP-markierte Fusionsproteine exprimiert. Während ARH1 in Cytosol und Zellkern nachweisbar war, zeigte ARH2 nur eine cytosolische Lokalisation. ARH3 war mitochondrial und nukleär lokalisiert. Unter Verwendung eines Zellkulturmodells mit intramitochondrial überexprimierter PARP1 konnte gezeigt werden, dass überexprimierte ARH3 auch *in vivo* Poly-ADP-Ribose abbaut und in der Matrix von Mitochondrien lokalisiert ist. Zusätzlich wurde durch Datenbankanalysen ARH4 entdeckt, ein neues ARH-Protein, das in Säugetieren fehlt, aber in Vögeln, Fröschen und Fischen vorkommt. Weitere ARH-Proteine wurden in Invertebraten, Archaeen, Bakterien und Viren identifiziert.

ARH-Proteine können zusammen mit ADP-Ribosyltransferasen und Poly-ADP-Ribosylpolymerasen als Komponenten endogener Regulationszyklen fungieren oder einen Schutzmechanismus vor ADP-ribosylierenden Toxinen darstellen. Die Strukturaufklärung der ARH3 und die durch *docking*-Experimente und zielgerichtete Mutagenese aufgezeigten Struktur-Funktionsbeziehungen bilden eine solide Grundlage für die weitere Charakterisierung von ARHs.

1.1 Abstract

ADP-ribosylation is a reversible covalent protein modification that can change the function of target proteins. In mono-ADP-ribosylation, which is catalysed by bacterial toxins and endogenous mammalian mono-ADP-ribosyl transferases (ARTs), ADP-ribose is transferred from NAD onto a substrate. Poly-ADP-ribosyl polymerases (PARPs) catalyse poly-ADP-ribosylation, the formation of branched ADP-ribose polymers on target proteins. ADP-ribosyl-X hydrolases (ARHs) and poly-ADP-ribosyl glycohydrolase (PARG) can de-ADP-ribosylate modified target proteins. Three members of the ARH-family (ARH1, ARH2 and ARH3) can be found in mammalian genomes. The aim of this study was to molecularly characterise human ARHs, with a focus on ARH3.

Human ARH1 and ARH3 were cloned and expressed as recombinant proteins. ARH1 was capable of cleaving ADP-ribosylarginine, while ARH3 showed no activity with this substrate; however, ARH3 was capable of degrading poly-ADP-ribose. The 3D-structure of ARH3 was solved in cooperation with Dr. Christoph Müller-Dieckmann (EMBL, Hamburg and ESRF, Grenoble, France). ARH3 is the first ARH structure published and forms the prototype of a novel protein fold family. The globular protein consists of 18 α -helices. Acidic amino acids on the tips of four central helices coordinate two magnesium ions in a cavity. Docking experiments were performed to model the binding of ADP-ribose and ADP-ribosyl-ADP-ribose to the putative active site. Site-directed mutagenesis of amino acids identified by the docking experiments was performed and the enzymatic activity of the mutants was assessed. Many mutants showed a loss of function, consistent with the postulated role for these amino acids in ADP-ribose binding. The three human ARH-proteins were expressed as eGFP-tagged fusion proteins to assess their subcellular localisation. While ARH1 was detectable in cytosol and nucleus, ARH2 showed only cytosolic localisation, and ARH3 showed mitochondrial and nuclear localisation. In a cell culture model with intra-mitochondrially overexpressed PARP1, overexpressed ARH3 degraded poly-ADP-ribose generated within the mitochondrial matrix. Data base searches identified a new vertebrate ARH, designated ARH4, present in birds, fish and frogs but missing in mammals. Additional ARH-proteins were identified in invertebrates, archaea, bacteria, and viruses.

Together with ADP-ribosyl transferases and poly-ADP-ribosyl polymerases, ARH proteins can act as components of endogenous regulatory cycles or they can serve as a protective mechanism against ADP-ribosylating toxins. The crystal structure of ARH3, and the structure-function relationships pinpointed by site-directed mutagenesis and docking experiments provide a solid basis for further structural and functional characterisation of ARHs.

2. Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Charakterisierung humaner ADP-Ribosyl-X Hydrolasen (ARHs). ARHs katalysieren die hydrolytische Spaltung der Bindung zwischen ADP-Ribose und einem Akzeptor X und regenerieren so das unmodifizierte Substrat, das zuvor durch ADP-Ribosylierung modifiziert wurde. Als Substrat für diese kovalente Modifikation dient Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD). In diesem Abschnitt werden die Rollen von NAD im Stoffwechsel beschrieben. Ein Schwerpunkt wird hierbei auf die mono- und poly-ADP-Ribosylierung gelegt. Die für diese Modifikationen verantwortlichen Enzyme, Mono-ADP-Ribosyltransferasen (mARTs) und Poly-ADP-Ribosylpolymerasen (PARPs), werden vorgestellt und die Funktion der Modifikationen wird diskutiert. Anschließend werden die de-ADP-ribosylierenden Proteine beschrieben: Einerseits die ARH-Proteine ARH1, ARH2 und ARH3, andererseits Poly-ADP-Ribosyl-Glykohydrolase (PARG). Regulatorisch bedeutende ADP-Ribosylierungszyklen werden als Beispiel für das Zusammenwirken der genannten Enzyme vorgestellt. Die Einleitung schließt mit der Beschreibung intramitochondrialer NAD-abhängiger Regulationsmechanismen und einem Überblick über verfügbare 3D-Strukturen von ADP-ribosylierenden und de-ADP-ribosylierenden Enzymen.

2.1 Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid und seine Rollen im Stoffwechsel

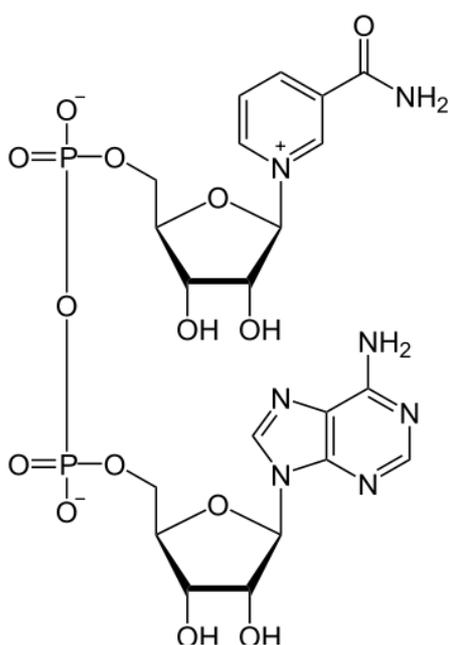


Abb. 2.1 Struktur von β -NAD⁺

Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD, siehe auch Abkürzungsverzeichnis in Anhang 8.5) ist ein über eine Phosphodiesterbindung 5'-5'' verknüpftes Dinukleotid. Besonderes Merkmal ist das Pyridin-Derivat Nikotinamid, das anstelle der üblichen Nukleobasen in β -Stellung an das C_{1''}-Atom des Riboserings gebunden ist. NAD wurde bereits 1935 als Coenzym für Redoxreaktionen beschrieben (Warburg et al. 1935). Inzwischen sind über 200 Enzyme bekannt, die NAD als Wasserstoff-Donor oder -Akzeptor verwenden. Man unterscheidet zwischen der oxidierten Form NAD⁺, bei der die Nikotinamidgruppe positiv geladen ist (Abb. 2.1) und der reduzierten Form NADH, die durch Aufnahme von zwei Elektronen und einem Proton aus NAD⁺ entsteht. Dies entspricht in der Summe der Übertragung eines Hydridions. Unter Aufhebung des aromatischen

Charakters des Nikotinamids wird das Hydridion in para-Position zum Stickstoffatom des Heterozyklus aufgenommen (Abb. 2.2). Zugunsten einer leichteren Lesbarkeit wird im weiteren Text auf die Anführung der positiven Ladung von NAD verzichtet, NAD bezeichnet NAD^+ . Das Redoxpaar NAD/NADH fungiert als Oxidationsmittel in katabolen Stoffwechselwegen, während Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-2'-Phosphat (NADP) im Redoxpaar NADP/NADPH als Reduktionsmittel für anabole Biosynthesen Verwendung findet (Stryer 1999a). NAD dient jedoch nicht nur als Oxidationsmittel, sondern kann auch einen Teil der Energie als NADH speichern. Diese Energie kann mit Hilfe der oxidativen Phosphorylierung, bei der NADH oxidiert und NAD regeneriert wird, genutzt werden, um einen Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran aufzubauen, der letztlich von der ATP-Synthase zur Synthese neuer ATPs genutzt wird. ATP kann als universeller Träger von Energieäquivalenten in Zellen angesehen werden, analog zu NADH und NADPH, den Trägern von Reduktionsäquivalenten (Stryer 1999b).

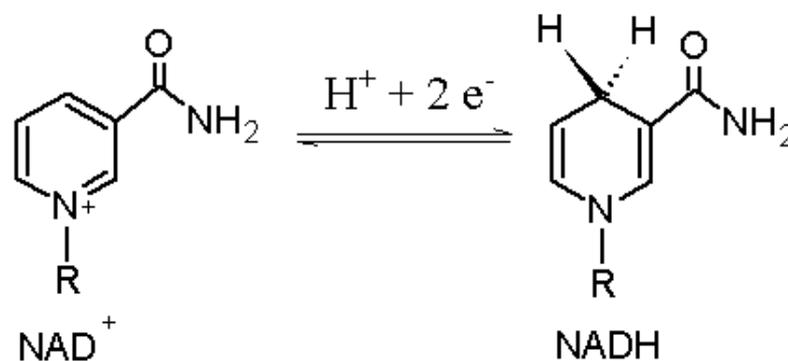


Abb. 2.2 NAD als Träger von Reduktionsäquivalenten. NAD wird durch Aufnahme von zwei Elektronen (e^-) und einem Proton reversibel zu NADH reduziert. Die Reduktion erfolgt in para-Stellung zum Stickstoffatom des Pyridinrings.

Eine weitere Funktion von NAD besteht darin, als Substrat für die Bildung von Botenstoffen innerhalb der Zelle zu fungieren. Mit einer intrazellulären Konzentration von ca. 400 μM ist NAD zur Bildung von Botenstoffen reichlich vorhanden und besitzt eine energiereiche Bindung zwischen Nikotinamid und Ribose, die bei der Bildung der Botenstoffe eine Rolle spielt. Inzwischen sind vier verschiedene von NAD abgeleitete Botenstoffe, sog. *second messenger*, bekannt. Durch Hydrolyse der β -N-glykosidischen Nikotinamid-Bindung von NAD durch Enzyme mit NAD-Glykohydrolaseaktivität entstehen Nikotinamid und ADP-Ribose (ADPR). Einige NAD-Glykohydrolasen katalysieren darüber hinaus die Bildung von zyklischer ADP-Ribose (cADPR) (Abb. 2.3) (Rusinko und Lee, 1989). Hierbei wird ebenfalls Nikotinamid abgespalten, die Bindung wird jedoch nicht hydrolysiert, sondern es erfolgt eine Substitution durch das Stickstoffatom N_1 des Adenins. Weiterhin können einige NAD-Glykohydrolasen den Austausch von Nikotinamid in NADP^+ durch Nikotinsäure katalysieren und so den Botenstoff Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotid-2'-Phosphat (NAADP) erzeugen (Lee und Aarhus 1995). Die drei genannten Nukleotide bewirken alle auf unterschiedliche Weise die Auslösung oder Verstärkung von intrazellulären Calciumsignalen (Lee 1997). cADPR aktiviert den Ryanodinrezeptor und führt zur Freisetzung von Calciumionen (Ca^{2+})

aus dem endoplasmatischen Retikulum (Guse 2005). ADPR bindet an TRPM2 und vermittelt den Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} (Fliegert et al. 2007). NAADP entlässt Ca^{2+} aus dem so genannten *acidic calcium store* (Yamasaki et al. 2005). Darüber hinaus haben ADPR, cADPR und das Abbauprodukt Adenosin auch extrazelluläre Signalfunktionen. Die Bildung dieser Substanzen im intra- und extrazellulären Raum sowie ihr möglicher Transport über die Zellmembran sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. An dieser Stelle soll hierzu nur erwähnt werden, dass das potenteste bekannte cADPR synthetisierende Enzym CD38 ein extrazelluläres membranständiges Protein ist, während die Calcium-mobilisierenden Funktionen von cADPR durch intrazelluläre Rezeptoren vermittelt werden (De Flora et al. 2004).

Ein viertes Derivat von NAD, O-Acetyl-ADP-Ribose (OAADPR) entsteht bei der durch Sirtuine katalysierten NAD-abhängigen Deacetylierung von Histonen und anderen Proteinen. Primär entsteht 2'-O-Acetyl-ADP-Ribose, durch Migration des Acetylrests steht diese Substanz jedoch mit 3'-O-Acetyl-ADP-Ribose im Gleichgewicht. OAADPR wurde bisher nicht mit Calciumsignalen in Verbindung gebracht, jedoch wurden Proteine mit OAADPR-spezifischen Bindungsstellen identifiziert (z.B. die Histonvariante macroH2A1.1) (Karras et al. 2005, Kustatscher et al. 2005) und es konnte gezeigt werden, dass die Injektion von OAADPR in befruchtete *Xenopus*-Oozyten die Reifung dieser Zellen unterdrückt (Borra et al. 2002). In Hefe scheint OAADPR auch über Bindung an *Silent information regulator 3* (*sir3*) das Stilllegen von Chromatinabschnitten zu vermitteln (Liou et al. 2005). OAADPR öffnet auch den Kationenkanal TRPM2 durch Bindung an die cytosolische Domäne und ist für die Vermittlung von Puromycin-ausgelöstem Zelltod essentiell (Grubisha et al. 2006).

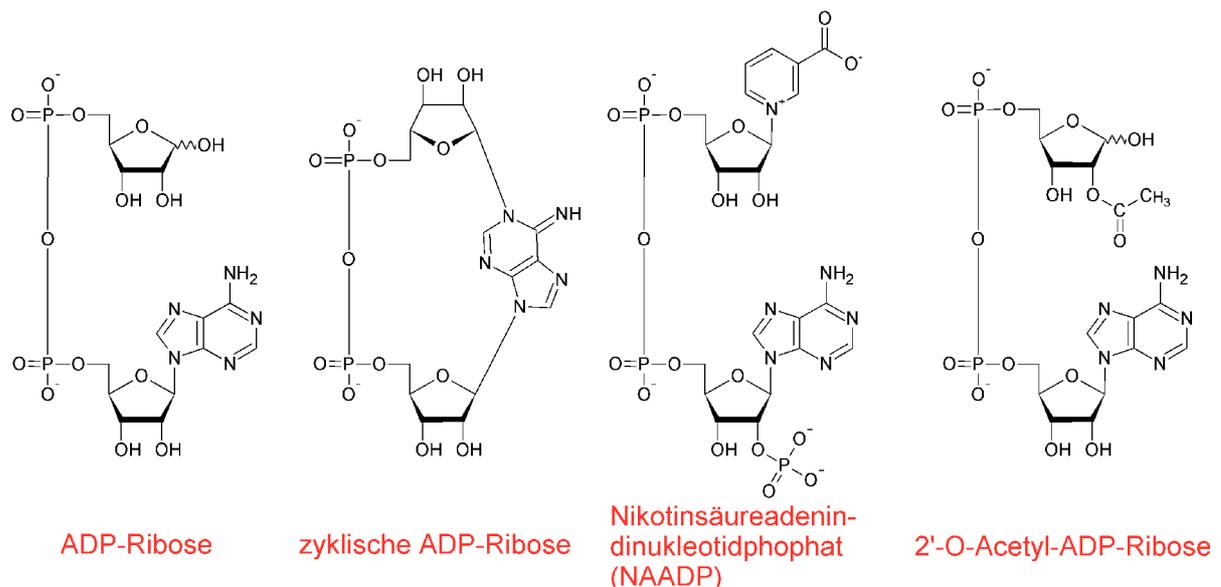


Abb. 2.3 Strukturen von ADPR, cADPR, NAADP und 2'-O-Acetyl-ADPR. Die durch Sirtuine primär gebildete 2'-O-Acetyl-ADP-Ribose steht durch Migration der Acetylgruppe mit 3'-O-Acetyl-ADP-Ribose im Gleichgewicht (nicht gezeigt). ADP-Ribose und O-Acetyl-ADP-Ribose können als α - oder β -Anomer vorliegen.

Schließlich macht die energiereiche β -N-glykosidische Nikotinamid-Bindung NAD zu einem Substrat für posttranslational modifizierende Enzyme. Diese Enzyme verwenden NAD als Donor für eine ADPR-Gruppe, die an das Zielmolekül angeknüpft wird. Die ADP-Ribosylierung findet am C_{1'}-Atom der Ribosegruppe von NAD statt, die über eine β -N-glykosidische Bindung mit Nikotinamid verbunden ist. Als Nukleophil dient ein Sauerstoff-, Schwefel- oder Stickstoffatom des Akzeptormoleküls. Nikotinamid wird freigesetzt und es entsteht ein über eine glykosidische Bindung ADP-ribosyliertes Molekül. Bei der nichtenzymatischen ADP-Ribosylierung kann freie ADP-Ribose direkt mit einem nukleophilen Akzeptor, i. A. Lysin oder Cystein, reagieren und Addukte bilden. Hierbei kommt es zur Ausbildung von α - oder β -glykosidischen Bindungen zu Cystein (Just et al. 1994; McDonald und Moss 1994), bzw. zur Ausbildung einer Schiff'schen Base mit Lysin (Cevantes-Laurean et al. 1993). Bei der enzymatischen ADP-Ribosylierung kommt es zu einer Inversion der Konfiguration am C_{1'}-Atom. Dies spricht dafür, dass die enzymatische Reaktion nach S_N2-Mechanismus abläuft oder dass das kationische Zwischenprodukt gut abgeschirmt ist.

2.2 Mono-ADP-Ribosylierung

Bei der Mono-ADP-Ribosylierung (im Folgenden MARsylierung genannt) wird eine einzelne ADP-Ribose-Gruppe von NAD auf ein Akzeptormolekül übertragen. Als Akzeptoren sind die Aminosäuren Arginin, Asparagin, Cystein und modifiziertes Histidin (Diphthamid) bekannt (Hassa et al. 2006). Die Poly-ADP-Ribosylierung (im Folgenden PARsylierung genannt) beginnt mit der MARsylierung eines Glutamatrestes (siehe Abschnitt 2.3). Darüber hinaus können bei *Pieris rapae* Guaninbasen in DNA als Akzeptoren auftreten (Takamura-Enya et al. 2001). Auch die MARsylierung von Aspartat, Phosphoserin, Serin und Threonin wurde postuliert, für diese Aminosäuren wurden aber noch keine korrespondierenden ADP-Ribosyltransferasen identifiziert (Hassa et al. 2006). In Abb. 2.4 sind die Reaktionsgleichungen der MARsylierung etablierter Akzeptoren dargestellt.

Erstmals wurde die MARsylierung als Wirkmechanismus des Diphtherietoxins beschrieben (Honjo et al. 1968). Dieses Toxin ADP-ribosyliert einen Diphthamidrest des Elongationsfaktors 2 und inhibiert dadurch die Proteinbiosynthese. Weitere bakterielle Toxine wie Pertussistoxin, Choleratoxin, Exotoxin A von *Pseudomonas aeruginosa* und C3-Toxine aus Clostridien und Staphylokokken sind ebenfalls Mono-ADP-Ribosyltransferasen (Aktories et al. 1992).

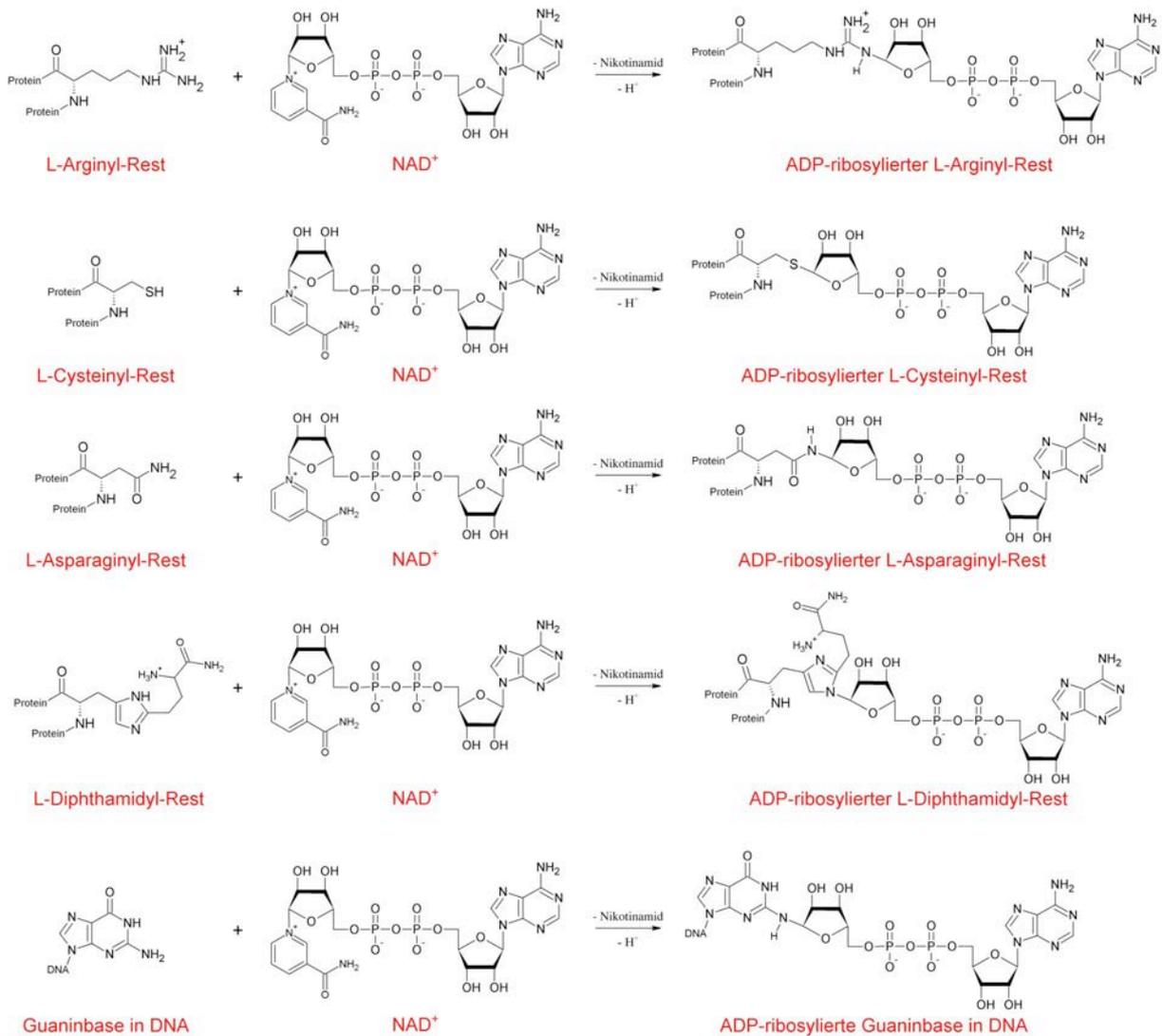


Abb. 2.4 Reaktionsgleichungen der Mono-ADP-Ribosylierung verschiedener Akzeptor-aminosäuren. Mono-ADP-Ribosyltransferasen mit Spezifität für Arginin (z. B. Cholera-toxin), Cystein (z. B. Pertussis-toxin), Asparagin (z. B. *Clostridium botulinum* C3-Toxin), Diphthamid (Diphtherie-toxin) und Guanin (Pierisin aus *Pieris rapae*) wurden molekular charakterisiert. Mono-ADP-Ribosylierung eines Glutamatrests dient zur Initiation der Poly-ADP-Ribosylierung (siehe Abb. 2.5).

Auch Eukaryoten verfügen über Mono-ADP-Ribosyltransferasen (mARTs). Diese lassen sich wiederum in die gut charakterisierte Gruppe der Ektoenzyme und die noch wenig untersuchte Gruppe der intrazellulären Enzyme einteilen (Corda und Di Girolamo 2003). Die Genfamilie der ekto-mARTs umfasst beim Menschen vier funktionale Gene (*ART1*, *ART3*, *ART4* und *ART5*) und zwei Introns enthaltende Pseudogene (analog zu *Art2a* und *Art2b*) (Glowacki et al. 2002). Die Maus verfügt hingegen über sechs funktionale mART-Gene (*Art1*, *Art2a*, *Art2b*, *Art3*, *Art4* und *Art5*) (Glowacki et al. 2002). Das Huhn verfügt mit *ART6* und *ART7* über zwei weitere Mitglieder der Genfamilie. Bei den ART-Proteinen handelt es sich um GPI-verankerte Ektoenzyme, mit Ausnahme der *ART5*, die keine hydrophobe C-terminale Sequenz aufweist und höchstwahrscheinlich sekretiert wird. Die ART-Proteine sind strukturell mit den bakteriellen ADP-ribosylierenden Toxinen verwandt (Glowacki et al. 2002). Mitglieder der

Ektoenzymfamilie ADP-ribosylieren Proteine wie Integrin $\alpha 7$ (Zolkiewska und Moss 1997), Defensin und P2X7 (Corda und Di Girolamo 2003, Seman et al. 2003).

Cytosolische Mono-ADP-Ribosyltransferasen konnten aus verschiedenen Geweben aufgereinigt werden. Aus Putenerythrozyten und Hühnerleber wurde je eine argininspezifische ADP-Ribosyltransferase isoliert (Moss et al. 1980; Tanigawa et al. 1984). In humanen Erythrozyten kommt eine mART vor, die auf $G_i\alpha$ wirkt (Tanuma et al. 1988). Aus Gehirn und Nebennierenmark von Ratten wurden vier mARTs aufgereinigt (Matsuyama und Tsuyama 1991, Fujita et al. 1995). ADP-Ribosylierungsaktivität wurde auch in Kaninchenmuskel, Hundeherz und Wachtelherz entdeckt (Peterson et al. 1990; Quist et al. 1994; Zolkiewska et al. 1992; Schwab et al. 2000).

In vivo wurde MARsylierung für die Substrate GRP78/BiP, ein Chaperon im endoplasmatischen Retikulum, G_β , eine Untereinheit heterotrimerer G-Proteine, und Glutamatdehydrogenase (GDH) nachgewiesen (Leno und Ledford 1990; Lupi et al. 2000; Herrero-Yraola et al. 2001). Darüber hinaus wurde die enzymatische Modifikation von Aktin, Tubulin, Desmin und *Brefeldin A* ADP-ribosyliertes Substrat (BARS) beschrieben (Di Girolamo et al. 2005). Aufgrund ihrer Größe und der negativen Ladungen in der Phosphodiesterbindung kann die ADP-Ribosylierung die Struktur und Funktion von Zielproteinen beeinflussen. MARsylierung führt oft zur Inaktivierung von Proteinen und stellt so einen Mechanismus zur Enzyminhibition unter physiologischen und pathologischen Bedingungen dar (Corda und Di Girolamo 2003). Außergewöhnlich ist der Purinozeptor P2X7, der in *Mus musculus* durch ART2-vermittelte MARsylierung aktiviert wird (Seman et al. 2003, Adriouch et al. 2007).

Obwohl intrazelluläre MARsylierung mehrfach beschrieben und mehrere ADP-Ribosyltransferasen partiell aufgereinigt wurden, konnten lange keine intrazellulären ADP-Ribosyltransferasen molekular charakterisiert werden. Dies änderte sich erst mit der Beschreibung von SIRT4, einem Mitglied der Sirtuin-Familie, als intramitochondriale mono-ADP-Ribosyltransferase (Haigis et al. 2006). Die Sirtuin-Familie umfasst beim Menschen sieben Mitglieder, die homolog zum Hefeprotein Sir2p (*Silent information regulator 2*) sind (Yamamoto et al. 2007). Sirtuine sind NAD-abhängige Deacetylasen, die Histone und andere Proteine demodifizieren und an der Stilllegung (*silencing*) von Chromatinabschnitten mitwirken. Für die Demodifikation wird NAD benötigt, das in einer transienten ADP-Ribosylierungs-Reaktion auf Acetyllysin übertragen wird. Durch intramolekulare Umlagerung entsteht das demodifizierte Lysin und OAADPR (siehe Abschnitt 2.1) (Lin 2007). SIRT4 und SIRT6 zeigen keine Deacetylase-Aktivität, sondern sind ADP-Ribosyltransferasen (Yamamoto et al. 2007). SIRT4 überträgt ADP-Ribose auf GDH- und führt zu dessen Inaktivierung (Haigis et al. 2006). Die inaktivierende MARsylierung von GDH an Cys119 wurde beschrieben (Herrero-Yraola et al. 2001, Choi et al. 2005), jedoch wurde noch nicht untersucht, ob SIRT4 diese Aminosäure modifiziert. Für SIRT6 gibt es indirekte Hinweise auf eine Beeinflussung der Basenexzisionsreparatur von DNA durch die ADP-Ribosylierungsaktivität (Yamamoto et al. 2007).

Darüber hinaus zeigen nur sechs der 17 Mitglieder der PARP-Familie bei *H. sapiens* PARsylierungsaktivität (siehe Abschnitt 2.3). Andere Mitglieder der PARP-Familie könnten MARsylierungsaktivität besitzen (Otto et al. 2005, siehe Abschnitt 2.2). Die meisten Familienmitglieder wurden bisher nicht eingehend untersucht, so dass Mitglieder der PARP-Familie viel versprechende Kandidaten für neue intrazelluläre ADP-Ribosyltransferasen darstellen.

2.3 Poly-ADP-Ribosylierung

Poly-ADP-Ribose (PAR) ist ein verzweigtes Homopolymer aus ADPR-Einheiten, die durch α -O-glykosidische Bindungen verknüpft sind. Die meisten ADPR-Einheiten sind durch 1''-2' Bindungen zwischen dem anomeren C-Atom der „terminalen“ Ribosegruppe der einen ADPR und der 2'-Hydroxygruppe der Ribosegruppe des Adenylatanteils der vorhergehenden ADPR verknüpft. Auf jeweils 20 bis 50 Reste kommt eine Verzweigung. Hier wird die ADPR auf gleiche Weise an die 2'-Hydroxygruppe der „terminalen“ Ribose geheftet (siehe Abb. 2.5). Die Polymere bestehen aus bis zu 200 bis 400 Monomeren (Hassa et al. 2006, Virág und Szabó 2002).

Als erstes PARsylierendes Enzym des Menschen wurde PARP1 charakterisiert (Kurosaki et al. 1987). PARP1 ist eines der häufigsten Nicht-Histon-Proteine im Zellkern und ist für den Großteil (ca. 90 %) der zellulären PAR-Synthese verantwortlich. Lange wurde PARP1 für das einzige PARsylierende Enzym gehalten, doch durch die Untersuchung von *PARP1*^{-/-} Mäusen wurde erkannt, dass weitere PAR-synthetisierende Enzyme existieren. Datenbank-Analysen identifizierten 16 bzw. 17 *PARP*-ähnliche Gene in den Genomen von *M. musculus* und *H. sapiens*. (Otto et al. 2005). Wegen der strukturellen Verwandtschaft zu Diphtherietoxin, einer mART, wurde als alternativer Name auch poly-ADP-Ribosyltransferase (pART) vorgeschlagen (Otto et al. 2005). Aufgrund struktureller Merkmale können die PARP-Gene in 5 Subgruppen eingeteilt werden. Bei sechs der kodierten PARP-Proteine (pART Subgruppen I und II) sind die drei katalytisch wichtigen Aminosäuren Histidin, Tyrosin und Glutamat von Diphtherietoxin und PARP1 konserviert. Diese *bona fide* PARPs sind neben PARP1 die Proteine PARP2, PARP3, vault-PARP, Tankyrase 1 und Tankyrase 2. Für diese Proteine wurde PARsylierungsaktivität nachgewiesen. Bei den 11 Mitgliedern der pART-Subgruppen III bis V ist das katalytisch wichtige Glutamat durch andere Aminosäuren (Leu, Thr, Ile oder Tyr) substituiert. Diese Enzyme zeigen keine PARsylierung, jedoch wurde eine Mono- oder Oligo-auto-ADP-Ribosylierung für PARP7 (pART14), PARP10 (pART10), PARP14 (pART8) und PARP15 (pART7), beschrieben (Chou et al. 2006, Hassa et al. 2006). Dies eröffnet die Möglichkeit einer trans-ADP-Ribosylierung durch diese und andere PARPs (Otto et al. 2005).

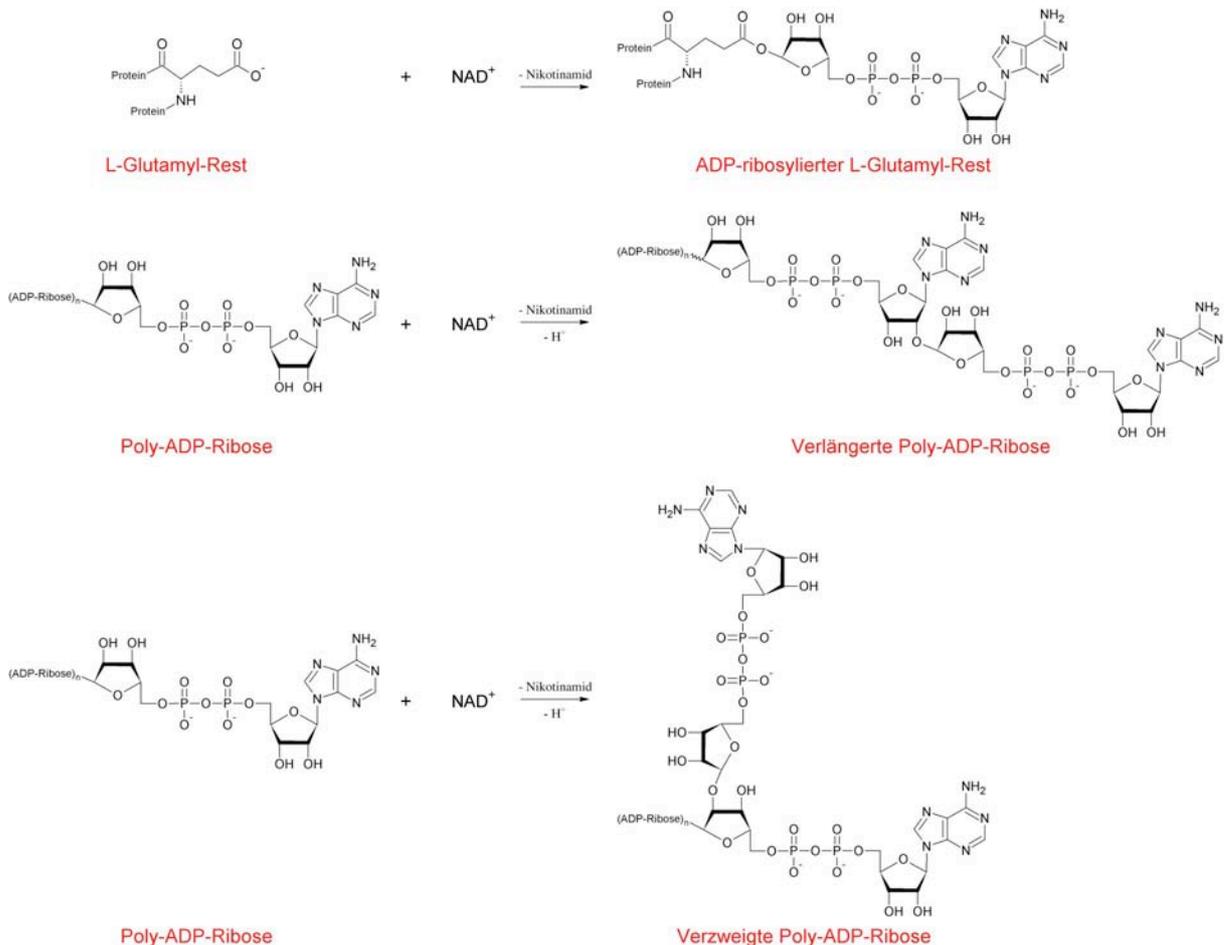


Abb. 2.5 Reaktionsgleichungen der Poly-ADP-Ribosylierung. Die PARsylierung wird durch ADP-Ribosylierung eines Glutamatrests initiiert (oben). Weitere ADPR-Einheiten werden durch 1-2-glykosidische Bindungen an Ribosegruppen des Adenylatanteils von PAR (Elongation, mittig) oder an Verzweigungsstellen (unten) angeheftet.

Vier unterschiedliche Enzymaktivitäten wurden für die Generierung von PAR postuliert:

- 1.) Die kovalente Auto-ADP-Ribosylierung eines Glutamatrests zur Initiation der Polymerisierung.
- 2.) Die Elongation des Polymers ausgehend von einer ADPR-Einheit.
- 3.) Die Verzweigung des Polymers.
- 4.) Die Freisetzung der PAR nach Auto-Modifikation, entweder durch eine endoglykolytische Spaltung von PAR oder durch eine ADP-Ribosyl-Protein Hydrolaseaktivität.

PARP1 scheint über die ersten drei genannten Enzymfunktionen zu verfügen. Ob es die generierte PAR auch freisetzen kann, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht geklärt (Hassa et al. 2006). Auch die anderen *bona fide* PARPs scheinen über die Fähigkeit zur Initiation und Elongation zu verfügen. Die erzeugten PAR-Polymere wurden noch nicht so eingehend charakterisiert wie diejenigen, die durch PARP1 erzeugt werden, sie scheinen aber kürzer und weniger stark verzweigt zu sein (Hassa et al. 2006).

Neben der Erzeugung freier und PARP-gebundener PAR wurde auch die direkte kovalente PARsylierung anderer Zielproteine vielfach postuliert. Über 200 verschiedene nukleäre Proteine wurden als Substrate für die PARsylierung beschrieben (Hassa et al. 2006). Die Analyse wird dadurch erschwert, dass freie PAR in salz-, säure- und detergentresistenter Weise nichtkovalent an Zielproteine binden kann. Wie bei freier ADPR ist darüber hinaus

eine nichtenzymatische Adduktbildung über die terminale Ribosegruppe freier PAR möglich. Bisher konnten kovalente PAR-Protein-Addukte nicht massenspektrometrisch analysiert werden und auch die Mutation von putativen Zielaminosäuren in Substraten konnte nicht die PAR-Inkorporation verhindern (Hassa et al. 2006). Dies ist jedoch möglicherweise durch die leichte Spaltung der Esterbindung zwischen Glutamat und PAR bzw. durch eine geringe Substratspezifität der PARP begründet. PARP-Proteine weisen eine strukturelle Verwandtschaft mit der Mono-ADP-Ribosyltransferase Diphtherietoxin auf (Otto et al. 2005). Daher ist die postulierte kovalente PARsylierung von Zielproteinen durchaus nahe liegend und wird von der Mehrzahl der Forscher auf diesem Gebiet vertreten.

PARP1 ist von großer Bedeutung für die Wahrung der genomischen Integrität (Bürkle et al. 2005, Hassa et al. 2006, Meyer-Ficca et al. 2005, Virág und Szabó 2002). PARP1 wird durch Strangbrüche in der DNA aktiviert. Durch die PARsylierung von PARP1 und anderen Akzeptorproteinen wird das Chromatin dekondensiert und für Reparaturenzyme zugänglich gemacht. Hierbei geht man davon aus, dass die starke negative Ladung der PAR die Dekondensation der DNA begünstigt und dass DNA-bindende Proteine die DNA freigeben und an PAR binden. Außerdem dienen PAR und PARP1 als Gerüststruktur, um die Bindung von DNA-Reparaturenzymen (u. a. XRCC1 und WRN) zu ermöglichen (Schreiber et al. 2002, Bürkle et al. 2005). Es wurde gezeigt, dass PAR als lokalisierte Energiequelle für den Basenexzisionskomplex fungiert. Unter Einbau des bei der *de novo* DNA-Synthese frei werdenden Pyrophosphats wird von PAR ATP abgespalten, das direkt für die DNA-Ligation zu Verfügung steht (Oei und Ziegler 2000). Nach mildem genotoxischem Stress begünstigt die PARP1-Aktivierung die DNA-Reparatur, so dass PARP1-positive Zellen diese Zustände besser überstehen als PARP1^{-/-}-Zellen oder Zellen, die mit PARP-Inhibitoren behandelt wurden. Dies deckt sich auch mit den Beobachtungen, dass die PARsylierungsaktivität in den Geweben verschiedener Säugetiere mit der Lebenserwartung des Gesamtorganismus korreliert (Grube und Bürkle 1992) und dass die PARsylierungskapazität der Blutzellen hundertjähriger Menschen signifikant erhöht ist (Muiras et al. 1998). Bei Überaktivierung der PARP1 durch hohe Dosen genotoxischer Agenzien oder durch oxidativen Stress bei Reperfusion nach Ischämie führt die PARP1-Aktivierung zu Apoptose oder im Extremfall zur so genannten „programmierten Nekrose“, bei der durch PARP1 der zelluläre NAD-Pool verbraucht wird. Als Folge gesteigerter NAD-Resynthese und dem Fehlen von NAD für katabole Oxidationsreaktionen wird auch der ATP-Pool entleert. Unter diesen Bedingungen sind PARP-Inhibitoren im Tierexperiment vorteilhaft und werden als therapeutische Intervention bei Ischämien wie Herzinfarkt und Schlaganfall diskutiert (Bürkle et al. 2005, Virág und Szabó 2002). Zur Vermeidung von malignen Neoplasien und altersbedingten Erkrankungen könnte sich hingegen eine Stimulation der PARP als vorteilhaft erweisen (Bürkle et al. 2005). PARP2 wird ebenfalls durch Strangbrüche in DNA aktiviert und kann einige Funktionen von PARP1 substituieren, zeigt jedoch eine geringere Aktivität. Eine Deletion von PARP1 und PARP2 in Mäusen ist im Embryonalstadium letal (Meyer-Ficca et al. 2005).

PARsylierung von *telomere repeat binding factor 1* durch die Tankyrase 1 und Tankyrase 2 inaktiviert TRF1 und führt bei Überexpression der Tankyrasen zur Verlängerung der Telomere, einem wichtigen Chromosomenmerkmal, das die Stabilität der Chromosomenenden gewährleistet (Virág und Szabó 2002).

Nicht nur bei der DNA-Reparatur ist PAR an der Bildung von strukturell wichtigen Komplexen beteiligt. In der Replikationsspindel wurde PAR als integraler Bestandteil identifiziert. Inkubation mit exogener PARG führt zum Zerfall der bipolaren Spindeln. PARP1 ist ebenfalls ein Bestandteil des Multiprotein-Replikationskomplexes, und mehrere Replikationsfaktoren und Zentromerproteine wurden als Substrate beschrieben (Meyer-Ficca et al. 2005, Virág und Szabó 2002).

Zusammenfassend kommt PAR eine zentrale Rolle in der Wahrung der Genomintegrität zu. Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen, Telomererhaltung und Kontrolle der DNA-Replikation und Chromosomsegregation tragen hierzu bei.

Das Wirkspektrum von PAR ist jedoch nicht auf das Feld der Genomintegrität beschränkt. Eine Regulation der Transkription findet über Wechselwirkung mit PARP1 und PARsylierung von p53, NF κ B und anderen Transkriptionsfaktoren statt (Bürkle et al. 2005, Virág und Szabó 2002). PARsylierung nach oxidativem Stress führt auch zu einem gesteigerten Proteinabbau durch das Proteasom (Ullrich und Grune 2001). Schließlich ist noch freie PAR als Botenstoff zu nennen, der die Freisetzung von *apoptosis inducing factor* (AIF) aus Mitochondrien vermittelt (Yu et al. 2006). Die Translokation von AIF aus Mitochondrien in den Zellkern ist ein frühes Ereignis nach Überaktivierung von PARP1 und geht der Freisetzung von Cytochrom C und der Caspaseaktivierung voraus. AIF scheint ein essentieller Effektor der PAR-vermittelten Apoptose zu sein (Hassa et al. 2006)

2.4 De-mono-ADP-Ribosylierung

In vielen Systemen wurde eine De-ADP-Ribosylierung beobachtet. Für diese Aktivität kommen zwei Mechanismen in Betracht. Zum einen könnte eine Phosphodiesterase die Phosphodiesterbindung zwischen Adeninnukleotid und Phosphoribose des ADP-ribosylierten Proteins hydrolysieren und AMP freisetzen. Dieser Mechanismus wird z.B. für die Oberflächen-ADP-Ribosylierung von Integrin α 7 auf Kaninchen-Skelettmuskelzellen postuliert (Zolkiewska und Moss 1997). Ein unbekanntes Enzym könnte eventuell den verbleibenden Phosphoriboserest abspalten und die Modifikation rückgängig machen, was für einen ADP-Ribosylierungszyklus unabdingbar wäre.

Zum anderen könnte eine ADP-Ribosyl-X Hydrolase (ARH) die komplette ADP-Ribosegruppe abspalten und das nichtmodifizierte Protein regenerieren. Die am besten charakterisierten eukaryotischen Mono-ADP-Ribosyl-X Hydrolasen sind die aus Putenerythrozyten isolierte ARH und die von Moss, Takada et al. klonierten ARH1-Homologen von Maus, Mensch und Ratte, die alle spezifisch für ADP-ribosyliertes Arginin sind (Moss et al. 1992; Takada et al. 1993; Takada et al. 1994).

2.4.1 Mono-ADP-Ribosyl-Arginin Hydrolase 1 (ARH1)

Rattus norvegicus ARH1 (rnARH1) wurde aus Rattenhirn aufgereinigt und aus einer Rattenhirn-cDNA-Bibliothek kloniert. Das offene Leseraster umfasst 1089 bp (363 Aminosäuren). Das *Arh1*-Gen wird in allen Rattengeweben exprimiert, es konnte im *Northernblot* eine 1,7 kb große mRNA nachgewiesen werden (Moss et al. 1992). ARH1 ist spezifisch für mono-ADP-Ribosyl-Arginin. ARH1-Proteine werden durch ADP-Ribose > ADP > AMP gehemmt. Arginin, Agmatin (ein Argininanalogon) und Guanidin haben hingegen keinen Hemmeffekt, was darauf hinweist, dass primär die ADP-Riboseeinheit, jedoch nicht das Arginin gebunden wird. Durch ARH1 de-ADP-ribosylierte Akzeptoraminosäuren lassen sich wieder re-ADP-ribosylieren. Die Enzymaktivität hat also keinen Effekt auf die Guanidinogruppe. Die untersuchten ARHs setzen nur α -ADP-ribosylierte Proteine um, also die Form, die durch die Aktivität der ARTs entsteht. Die Enzymaktivität der Ratten- und Maus-ARH1 werden durch Magnesiumionen und Dithiothreitol gesteigert. Die Aktivität der humanen ARH1 ist hingegen von Dithiothreitol unabhängig. Ein Sequenzvergleich zeigte, dass zwischen Ratten- und Maus-ARH1 alle fünf vorkommenden Cysteine konserviert sind, die humane ARH1 aber nur über vier Cysteine verfügt. Cystein 108 der Ratten- bzw. Maus-ARH1 ist beim Menschen durch Serin 103 ersetzt. Die Dithiothreitolabhängigkeit der humanen ARH1 kann durch Punktmutation dieses Serins zu Cystein hergestellt werden; genauso kann sie bei den beiden murinen ARH1-Proteinen durch Punktmutation des Cysteins zu Serin entfernt werden (Takada et al. 1993). Durch Sequenzvergleich wurden drei konservierte Bereiche zwischen der rnARH1 und der Dinitrogenase Reduktase-aktivierende Glykohydrolase (DRAG) aus *Rhodospirillum rubrum* entdeckt. Punktmutagenese zeigte, dass die beiden vicinalen Aspartatreste an Position 60 und 61 für die Katalyse, nicht aber für die Substratbindung essentiell sind. Diese Aminosäuren liegen wahrscheinlich im aktiven Zentrum (Konczalik und Moss 1999). Die Deletion von ARH1 führt zu gesunden und fortpflanzungsfähigen Mäusen, die jedoch eine gesteigerte Empfindlichkeit für Cholera toxin zeigen (Kato et al. 2007). Vorläufige Analysen von Moss et al. zeigten, dass primäre Fibroblasten aus ARH1^{-/-} Mausembryonen schneller proliferieren als Wildtyp-Zellen und nach Injektion in *nude* Mäuse zu Tumoren wuchsen (Vortrag von J. Moss 2004, zitiert nach Hassa et al. 2006). Diese Ergebnisse deuten auf eine regulatorische Funktion von ARH1 in eukaryotischen Zellen hin. Ein physiologisches Substrat von ARH1 wurde jedoch bisher nicht identifiziert.

2.4.2 Weitere mono-ADP-Ribosyl-X Hydrolasen

Durch PSI-BLAST Analysen konnten Glowacki et al. 2002 zwei neue *ARH*-Gene bei Mensch und Maus identifizieren (Glowacki et al. 2002). Diese Gene, *ARH2* und *ARH3*, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit kloniert, rekombinant exprimiert und charakterisiert. Von Oka et al. wurde beschrieben, dass *ARH3* nicht in der Lage ist, ADP-Ribosyl-arginin, -asparagin, -cystein oder -diphthamid zu spalten. Stattdessen konnte *ARH3* PAR zu ADPR degradieren und weist damit die gleiche Enzymaktivität wie *PARG* auf (siehe Abschnitt 2.5) (Oka et al. 2006 und diese Arbeit). Für *ARH3* wurde auch die spezifische Hydrolyse von *OAADPR*, dem Reaktionsprodukt von *Sirtuinen*, beschrieben (Ono et al. 2006). *ARH2* zeigte keine Aktivität mit den genannten Substraten (Oka et al. 2006, Ono et al. 2006).

Enzymatisch inaktive Mitglieder der *ARH*-Familie wurden in *Tripedalia cystophora* und *Danio rerio* entdeckt. *T. cystophora* verfügt über drei J1-Kristalline, der Zebrafisch hat ein Selenoprotein SelJ, das in Fischen konserviert ist. In beiden Organismen fungieren die Proteine als struktureller Bestandteil in Augenlinsen. Dies zeigt, dass die Funktion von *ARH*-Proteinen nicht auf die Hydrolyse von ADPR-haltigen Verbindungen beschränkt ist (Piatigorsky et al. 1993, Castellano et al. 2005).

2.5 De-poly-ADP-Ribosylierung

Zwei Mechanismen des Abbaus von PAR wurden postuliert, die Spaltung des Polymers durch eine Phosphodiesterase zu Phosphoribosyl-AMP und der Abbau durch eine Poly-ADP-Ribose Glykohydrolase zu ADPR (Hassa et al. 2006). Bisher wurde jedoch nur der Abbau zu ADPR beschrieben. Bei der De-PARsylierung sind wie bei der PARsylierung vier verschiedene Teilaktivitäten zu unterscheiden: 1.) Die exoglykolytische Spaltung, die ADPR von den Enden des PAR-Moleküls freisetzt. 2.) Die endoglykolytische Spaltung, die das PAR-Molekül intern in zwei kürzere Ketten zerlegt. 3.) Der Abbau von Verzweigungsstellen. 4.) Die Entfernung des letzten ADP-Riboserests, was einer De-MARsylierung gleichkommt. *PARG* scheint über die ersten drei genannten Aktivitäten zu verfügen, jedoch ist auch hier unklar, ob *PARG* den letzten ADP-Riboserest vom Protein abspalten kann. Eine ADP-Ribosyl-Protein Lyase wurde 1984 von Oka et al. aufgereinigt (Oka et al. 1984). Dieses Enzym war in der Lage die letzte ADP-Ribosegruppe von modifizierten Histonen zu entfernen. Dabei entstand jedoch keine ADP-Ribose, wie es bei einer Hydrolyseaktivität zu erwarten wäre, sondern ADP-Ribose wurde durch die Lyaseaktivität eliminiert und zur dehydrierten 5'-ADP-3"-Deoxypent-2"-enofuranose umgewandelt (Oka et al. 1984). Allerdings wurde die Arbeit von Oka et al. nicht von anderen Gruppen aufgegriffen und die ADP-Ribosylprotein Lyase wurde auch nicht kloniert.

Zuerst wurde die De-PARsylierung durch PARG beschrieben (Desnoyers et al. 1995). Die PARG-Genfamilie umfasst beim Menschen nur ein Gen, das allerdings für vier verschiedene Spleißvarianten kodiert. Die Deletion des PARG-Gens führt in Mäusen zu embryonaler Letalität (Koh et al. 2004). Eine Insertion in das *PARG*-Gen, die die Expression einer N-terminal trunkeierten Spleißvariante von einem alternativen Promotor vor Exon 4 erlaubt, führt zu lebensfähigen und fruchtbaren Mäusen, die jedoch besonders empfindlich für Schädigungen durch alkylierende Agenzien und ionisierende Strahlung sind (Cortes et al. 2004).

Vollängen-PARG111 (111 kd) kommt in der Zelle nur in geringen Mengen vor und ist nukleär lokalisiert. Die kürzeren Spleißvarianten PARG102 (102 kd), PARG99 (99 kd) und PARG60 (60 kd) kommen in größeren Mengen in der Zelle vor und sind im Cytosol lokalisiert, jedoch kann PARG102 bei genotoxischem Stress in den Zellkern translozieren, während PARG111 ins Cytosol wandert (Meyer-Ficca et al. 2004; Haince et al. 2006). Insgesamt liegt PARG in deutlich geringeren Mengen als PARP1 vor, jedoch zeigt PARG eine starke De-PARsylierungsaktivität, was die kurze Halbwertszeit (40 s bis 6 min) von PAR nach genotoxischem Stress erklärt (Hassa et al. 2006). Da PARP1 durch Auto-PARsylierung inaktiviert wird, ist eine PARG-Aktivität für die Reaktivierung von PARP1 notwendig und damit für die Depletion des NAD-Pools bei Überstimulation der PARP1 mitverantwortlich. Vor kurzem wurde gezeigt, dass PARG60 mit Mitochondrien assoziiert ist (Meyer et al. 2007, Niere et al. 2007).

Durch Oka et al. und im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass ARH3, ein Mitglied der ADP-Ribosyl-X Hydrolase Familie, ebenfalls De-poly-ADP-Ribosylierungsaktivität zeigt (Oka et al. 2006). Da PAR zu monomerer ADPR hydrolysiert wurde, scheint auch ARH3 über exo- und endoglykolytische Aktivität zu verfügen und Verzweigungsstellen in der PAR hydrolysieren zu können (Oka et al. 2006). PARG ist damit nicht länger das einzige bekannte de-PARsylierende Enzym in eukaryotischen Zellen.

2.6 ADP-Ribosylierungszyklen

2.6.1 ADP-Ribosylierungszyklen bei Prokaryoten

Lowery und Ludden konnten zeigen, dass die Stickstofffixierung des phototrophen Bakteriums *Rhodospirillum rubrum* durch ADP-Ribosylierung reguliert wird (Lowery und Ludden 1988). Die Enzyme Dinitrogenase Reduktase-ADP-Ribosyltransferase (DRAT) und Dinitrogenase Reduktase-aktivierende Glykohydrolase (DRAG) ADP-ribosylieren bzw. de-ADP-ribosylieren die Dinitrogenase Reduktase-Komponente des Dinitrogenasekomplexes. Die Dinitrogenase Reduktase wird als entscheidendes Schlüsselenzym im Stickstoffmeta-

bolismus reguliert. DRAT und DRAG helfen, die Signale zu integrieren, um die sehr energieaufwändige Stickstofffixierung nur in geeigneten Situationen zu aktivieren. Dieses Mono-ADP-Ribosylierungssystem war das erste, in dem mART, ARH und Zielprotein sowie die Gene der mART und der ARH aufgeklärt wurden. Bis heute ist es der am besten untersuchte ADP-Ribosylierungszyklus mit Regulationsfunktion (Lowery und Ludden 1988, Fitzmaurice et al. 1989). Weitere Zielproteine der ADP-Ribosylierung in Prokaryoten sind die Glutaminsynthetase in *Rhodospirillum rubrum* und *Rhizobium meliloti* sowie nicht identifizierte Proteine in *Streptomyces griseus* und *Pseudomonas maltophilia* (Ludden 1994). Bisher wurde keine Poly-ADP-Ribosylierung in Prokaryoten nachgewiesen.

2.6.2 ADP-Ribosylierungszyklen bei Säugetieren

Für viele Vorgänge wurde ein MARsylierungszyklus postuliert oder sogar schon nachgewiesen (Moss et al. 1997). Ausgelöst durch G-Protein-gekoppelte Sieben-Transmembranhelix-Rezeptoren führt eine ADP-Ribosylierung der G_{β} -Untereinheit von $G_{\beta\gamma}$ -Komplexen an Arg129 zum Verlust der Signalfunktion von $G_{\beta\gamma}$. Es tritt dann keine Inhibition von Calmodulin-stimulierten Typ-I-Adenylatzyklasen und keine Aktivierung von Phosphoinositid 3-kinase- γ und Phospholipase $C_{\beta 2}$ mehr auf. Diese Modifikation wird durch eine endogene cytosolische Hydrolase rückgängig gemacht (Lupi et al. 2002). Aus Gehirn und Nebennierenmark von Ratten konnte eine cytosolische Mono-ADP-Ribosyl-X Hydrolase aufgereinigt werden, die in der Lage ist, endogen ADP-ribosyliertes Aktin zu de-ADP-ribosylieren. ADP-Ribosylierung verhindert die Aktinfilamentbildung aus Aktinmonomeren. Aktinfilamente verhindern die Exocytose sekretorischer Vesikel an den Synapsen und die ADP-Ribosylierung trägt vermutlich dazu bei, diese Aktinbarriere aufzubrechen. Die isolierte ARH ist im Gehirn ebenfalls in den Synapsen lokalisiert und bildet wahrscheinlich zusammen mit den cytosolischen ARTs, die aus Rattenhirn aufgereinigt wurden, einen Regulationszyklus für die Sekretion von Neurotransmittern (Fujita et al. 1995, Okamoto et al. 1997). Herrero-Yraola et al. wiesen 2001 die Regulation der Glutamatdehydrogenase durch reversible ADP-Ribosylierung in den Mitochondrien humaner Hepatomzellen nach (Herrero-Yraola et al. 2001). Die Modifikation und Regulation von GDH wird im Abschnitt 2.7 beschrieben.

Für die zahlreichen beschriebenen Funktionen der PARsylierung (siehe Abschnitt 2.3) ist die Reversibilität der Modifikation durch de-PARsylierende Enzyme essentiell, da für PARP1 eine Inhibition durch Auto-PARsylierung gezeigt wurde, und um freie PAR zu erzeugen, die als Botenstoff in der Zelle dient. Die kurze Halbwertszeit von PAR nach genotoxischer Stimulation spricht für die hohe Dynamik des PAR-Metabolismus. Unter anderen Bedingungen gebildete PAR weist allerdings erheblich längere Halbwertszeiten auf. Es scheint also verschiedene „Arten“ von PAR in eukaryotischen Zellen zu geben, die sich in ihren Zielproteinen, ihrer Lokalisation, ihrer Stabilität und möglicherweise in ihrer Struktur unterscheiden. Ein Poly-ADP-Ribose-Kode wurde postuliert, der unterschiedliche Effekte und

Halbwertszeiten verschiedener PAR-Spezies erklären könnte, aber detaillierte Analysen dieses Phänomens stehen noch aus. Durch die Möglichkeit der Verzweigung können PAR-Ketten allerdings sehr komplexe Strukturen bilden (Hassa et al. 2006).

2.7 NAD-abhängige Regulationsmechanismen in Mitochondrien

NAD ist aufgrund seiner Beteiligung an Citratzyklus und oxidativer Phosphorylierung für die Funktion von Mitochondrien von zentraler Bedeutung und in diesem Kontext ausgiebig erforscht. Die Signalfunktion von NAD in Mitochondrien wurde jedoch erst in letzter Zeit erkannt. Zwei durch Sirtuin-Familienmitglieder katalysierte Reaktionen in Mitochondrien wurden detailliert beschrieben. MARsylierung von Cys119 inaktiviert GDH (Herrero-Yraola et al. 2001, Choi et al. 2005). Eine mitochondriale ADP-Ribosylcystein-Hydrolase wurde beschrieben, die diese Modifikation umkehren kann und das Enzym reaktiviert (Herrero-Yraola et al. 2001). Das Sirtuin SIRT4 MARsyliert und inaktiviert GDH; ob Cys119 die Modifikationsstelle ist wurde noch nicht charakterisiert (Haigis et al. 2006). Es wurde auch gezeigt, dass über diesen Mechanismus in β -Zellen des Pankreas die Aminosäure-stimulierte Insulinsekretion reguliert wird (Haigis et al. 2006, Ahuja et al. 2007). Die ADP-Ribosylcystein-Hydrolase ist noch nicht molekular charakterisiert worden. SIRT3 reguliert die Acetyl-Coenzym A Synthase 2 durch NAD-abhängige Deacetylierung und generiert dabei OAADPR (Hallows et al. 2006, Schwer et al. 2006). Deletion des *SIRT3*-Gens in Mäusen führt zu Hyperacetylierung zahlreicher Substrate in Mitochondrien (Lombard et al. 2007). Ob OAADPR in Mitochondrien als Botenstoff wirkt, ist bisher nicht bekannt. Möglicherweise regulieren Sirtuine über die Abhängigkeit ihrer enzymatischen Aktivität von der NAD-Konzentration verschiedene Signalwege in Reaktion auf den energetischen Zustand der Zelle (Yamamoto et al. 2007). Ob die mitochondrial lokalisierten Sirtuine SIRT3, SIRT4 und SIRT5 als NAD-Sensoren in Mitochondrien wirken, stellt ein spannendes Forschungsfeld dar.

Bereits mehrfach wurde der Nachweis intramitochondrialer PARsylierung berichtet (Scovassi 2004, Lai et al. 2007). Für keines der bekannten PARP-Familienmitglieder wurde eine mitochondriale Lokalisation vorhergesagt. Lai et al. berichteten in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit den Nachweis von PAR und PARP1 in Mitochondrien durch Immun-Elektronenmikroskopie. Auch mehrere PARsylierte mitochondriale Proteine wurden nachgewiesen und molekular charakterisiert (Lai et al. 2007). Lai et al. untersuchten in einem *in vivo* Modell Hirngewebe nach traumatischer Hirnverletzung und oxidativem Stress nach Reperfusion ischämischen Gewebes. Ob PARP1 und PAR auch unter physiologischen Bedingungen in Mitochondrien auftritt, wurde nicht untersucht. Die Assoziation von zwei PARG Isoformen und ARH3 mit Mitochondrien kann ebenfalls als unterstützender Befund

für die Hypothese eines intramitochondrialen PAR-Metabolismus gewertet werden (Meyer et al. 2007, Niere et al. 2007 und diese Arbeit).

Eine weitere Funktion von PAR in oder an Mitochondrien ist die durch freie PAR vermittelte Freisetzung von AIF aus Mitochondrien, ein essentieller Schritt der PARP-vermittelten Apoptose (Yu et al. 2006) (siehe Abschnitt 2.3, letzter Absatz).

2.8 3D-Strukturanalyse von Enzymen der Mono- und Poly-ADP-Ribosylierung

Die ersten dreidimensionalen Strukturen von ADP-ribosylierenden Enzyme aus Vertebraten waren ART2 aus *Rattus norvegicus* (pdb-ID: 1gxy) und die katalytische Domäne von PARP1 aus *Gallus gallus* (pdb-ID: 1pax) (Müller-Dieckmann et al. 2002, Ruf et al. 1996). Die Verfügbarkeit der dreidimensionalen Strukturen führte zu einem tieferen Verständnis katalytisch bedeutsamer Aminosäuren und erlaubte wegen der stärkeren Konservierung von Tertiärstruktur als von Primärsequenz auch Analogieschlüsse auf verwandte Proteine. So wurde erkannt, dass PARP1 mit Diphtherietoxin und ART2 mit VIP2 eine strukturelle Verwandtschaft zeigt, die die Verwandtschaft zwischen den beiden Säugetierproteinen übertrifft (Otto et al. 2005). Die Proteine der PARP-Familie konnten anhand von strukturellen Eigenschaften analysiert und neu gruppiert werden (Otto et al. 2005). Ähnlich tief greifende Fortschritte wären auch mit den 3D-Strukturen der demodifizierenden Enzyme ARH und PARG zu erwarten, jedoch liegt bis heute keine PARG-Struktur vor. Die Aufklärung der 3D-Struktur einer ersten eukaryotischen ARH war ein zentrales Ziel der hier vorgelegten Arbeit.

3. Materialien

3.1 Eukaryotische Zelllinien

Eukaryotische Zelllinien wurden von ATCC (*American type culture collection*) oder von Invitrogen bezogen oder waren bereits im Labor etabliert. Die Zelllinien sind in Tab. 3.1 aufgelistet:

Tab 3.1 Eukaryotische Zelllinien.

Name	Gewebe	Organismus	Quelle
CHO	Eierstock	<i>C. griseus</i>	Im Labor etabliert
293T	Embryonales Nierengewebe	<i>H. sapiens</i>	Im Labor etabliert
HeLa	Gebärmutterhalskrebs	<i>H. sapiens</i>	Im Labor etabliert
HeLa S3	Gebärmutterhalskrebs	<i>H. sapiens</i>	ATCC
L-929	Bindegewebe	<i>M. musculus</i>	Im Labor etabliert
Sp2/0	Myeloma	<i>M. musculus</i>	Im Labor etabliert
T-REx 293 Flp-In	Embryonales Nierengewebe	<i>H. sapiens</i>	Invitrogen

3.2 Bakterienstämme

Zur Transformation von Ligationsansätzen wurden ultrakompetente XL-10 Gold Zellen von Stratagene benutzt. Für Retransformationen wurden selbst hergestellte chemisch kompetente XL-2 Bakterien benutzt. Die *E. coli* Expressionsstämme BL21 (DE3), BL21(DE3)-Gold, BL21 CodonPlus (DE3) RIL, sowie Rosetta (DE3) wurden als chemisch kompetente Zellen von Novagen bezogen.

3.3 Reagenzien

3.3.1 Nukleinsäuren und Nukleotide

Oligonukleotide

Oligonukleotide für die Polymerasekettenreaktion (Primer) wurden mit den Programmen Webprimer ([URL: seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer](http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer)) und Primer3 ([URL: frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) entworfen und bei MWG bestellt. Die Primer sind nach Zielsequenzen sortiert im Anhang 8.3 aufgeführt.

ARH-kodierende cDNA-Klone

ARH-kodierende cDNA-Klone wurden über verfügbare Teilsequenzen identifiziert und von „RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH“, „Human Genome Mapping Project Resource Centre“ (HGMP-RC) oder dem *University of Texas Southwestern Medical Center* (UTSW) bezogen. In Tab. 3.2 sind die cDNA-Klone aufgelistet, rot hervorgehoben sind Klone, die die komplette kodierende Sequenz enthielten und für die Klonierung verwendet wurden. Der blau markierte Klon IMAGE:367370 enthielt auch die N-terminale Elongation des mmARH3-Proteins und einen Teil der 5'-untranslatierten Region und wurde für die Klonierung in peGFP-N1 benutzt.

Tab. 3.2 Auflistung der verwendeten cDNA-Klone. Die rot markierten Klone enthielten die vollständige kodierende Sequenz der jeweiligen ARHs und wurden für Klonierungen eingesetzt. Bei mmARH3 wurde für die Subklonierungen des Volllängenproteins in die Vektoren peGFP-N1 und pd2eGFP-N1 auf den blau markierten Klon zurückgegriffen. Für die Subklonierungen von mmARH3 mit deletierter N-terminaler Signalsequenz wurde hingegen der rot markierte Klon benutzt.

Gen	Quelle	Klon-ID	GenBank-ID	RZPD-ID
hsARH1	RZPD	IMAGE: 4419930	BC020574	IMAGp998I1910156
hsARH2	RZPD	IMAGE: 5299337	BI601003	IMAGp998K1811757
hsARH2	RZPD	IMAGE: 5299214	BI600670	IMAGp998F1511757
hsARH2	RZPD	IMAGE: 785497	AA449400	IMAGp998O021935
hsARH3	HGMP-RC	IMAGE: 4803538	BG697042	-
mmARH1	RZPD	IMAGE: 2647247	BC003437	IMAGp998C246606
mmARH2	UTSW	UTSW_H8E5	BG793111	-
mmARH3	HGMP-RC	IMAGE: 5293159	BI558202	-
mmARH3	HGMP-RC	IMAGE: 367370	AI427383	-
mmARH3	HGMP-RC	IMAGE: 4194282	BF383600	-
mmARH3	HGMP-RC	IMAGE: 4945959	BG917355	-
mmARH3	HGMP-RC	IMAGE: 4511485	BG298736	-
mmARH3	HGMP-RC	IMAGE: 480261	AI595428	-

Plasmide

pcDNA5/FRT/TO *	Invitrogen
pCMV/Myc/Mito *	Invitrogen
pCMV Sport6	Invitrogen
pd2EGFP-N1 *	Clontech/BD Biosciences
pEGFP-N1 *	Clontech/BD Biosciences
pET26b *	Novagen
pET28a	Novagen
pETM11	EMBL-Hamburg
pME	DNAX Research Institute
pOG44	Flp-Rekombinase Expressionsvektor, Invitrogen

pCMV/Myc/Mito_eGFP-PARP1 Expressionsvektor für mitochondrial lokalisiertes eGFP-PARP1-CD Fusionsprotein
(Dr. Niere, Bergen, Norwegen)

Karten der mit einem Stern markierten Vektoren befinden sich in Anhang 8.4.

Nukleotide

ADPR	Sigma-Aldrich
β-NAD	Sigma-Aldrich
dNTPs (je 2 mM)	Novagen-Toboyo
α- ³² P-NAD, 1000 Ci/mmol	Amersham/GE Healthcare

Längenmarker und DNA für enzymatische Untersuchungen

GeneRuler 100 bp Ladder Plus	Fermentas
GeneRuler 1kb Ladder	Fermentas
Fischspermien-DNA	Sigma-Aldrich

3.3.2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen

*Bam*HI (20.000 U/ml) – *Dpn*I (20.000 U/ml)– *Eco*RI (20.000 U/ml) – *Nde*I (20000 U/ml) *Nhe*I (10.000 U/ml) und *Xho*I (20.000 U/ml) wurden von New England Biolabs bezogen. Für Einzelverdau wurden die Enzyme in den mitgelieferten Puffern eingesetzt. Doppelverdau wurden entsprechend der Empfehlungen von New England Biolabs durchgeführt. Falls erforderlich wurde gereinigtes bovines Serumalbumin in der Konzentration 100 µg/ml zugesetzt.

Andere Enzyme

„Antarctic“ Phosphatase	New England Biolabs
Benzonase Nuklease	Novagen
<i>H. sapiens</i> PARP1, katalytische Domäne	Das rekombinante Protein wurde aus <i>E. coli</i> aufgereinigt.
Lysozym	Fermentas
<i>M. musculus</i> ART2.2	Das rekombinante Protein wurde von Jan Reyelt zur Verfügung gestellt.
<i>N. crassa</i> NADase	Sigma-Aldrich
<i>Pfu</i> Ultra DNA-Polymerase	Stratagene
T4 DNA-Ligase	Invitrogen

3.3.3 Antikörper

Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Spezifität	Bestell-Nr.	Lieferant	Eingesetzte Verdünnung
Anti-eIF2a	Kaninchen	polykl.	sc-11386	Santa Cruz	1:5000
Anti-FLAG	Kaninchen	polykl.	F7425	Sigma-Aldrich	1:1000
Anti-FLAG (M2)	Maus	monokl.	F3165	Sigma-Aldrich	1:1000
Anti-GFP (7.1 & 13.1)	Maus	monokl.	1814460	Roche	1:5000
Anti-PAR	Kaninchen	polykl.	96-10-04	Alexis	1:200
Anti-PAR (10H)	Maus	monokl.		Tulip Biolabs	1:200
Anti-hsARH3 (RG18.15)	Ratte	monokl.	Hybridoma- überstand	selbst erzeugt	1:10
Anti-mm/hsARH3 (RG18.89)	Ratte	monokl.	Hybridoma- überstand	selbst erzeugt	1:10

Sekundärantikörper

Alle für Immunfluoreszenzanfärbungen verwendeten Sekundärantikörper waren von gegen Ig anderer Spezies adsorbierter Qualität, um Kreuzreaktivität zu vermeiden.

Antikörper	Konjugat	Spezies	Lieferant	Eingesetzte Verdünnung
Anti-Kanin. IgG(H+L) (Fab') ₂ ,	PE	Ziege	Dianova	1:500
Anti-Maus IgG(H+L) (Fab') ₂ ,	PE	Ziege	Dianova	1:500
Anti-Ratte IgG(H+L) (Fab') ₂ ,	PE	Ziege	Dianova	1:500
Anti-Kanin. IgG(H+L)	Alexa647	Ziege	Mol. Probes	1:1000
Anti-Maus IgG(H+L)	Alexa647	Ziege	Mol. Probes	1:1000
Anti-Kaninchen IgG	PO	Ziege	Amersham	1:10000
Anti-Maus. IgG	PO	Ziege	Amersham	1:10000

3.3.4 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben wurden Chemikalien der höchsten erhältlichen Reinheit benutzt.

Aceton	Merck
Agarose, Elektrophoresequalität	Invitrogen
4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid (AEBSF)	MP Biomedicals
Ammoniumacetat	Merck
Ammoniumchlorid	Merck
Aqua ad iniectabilia	Baxter
Asparaginsäure	Merck
Bacto-Agar	Gibco-BRL
Bacto-Trypton	Gibco-BRL
Bacto-Hefeextrakt	Gibco-BRL
Borsäure	Merck
Carbenicillin	Serva
Calciumchlorid	Merck
<i>Complete Protease Inhibitor Cocktail</i>	Roche Applied Science
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Serva
Essigsäure	Merck
Ethylendiamintetraacetat, Natriumsalz (EDTA)	Sigma-Aldrich
Ethanol, reinst, getrocknet	Merck
Ethanol, vergällt	Walter CMP GmbH
Ethidiumbromid	Molecular Probes

Eisen(II)sulfat Heptahydrat	Merck
Eisen(III)citrat Monohydrat	Merck
Formaldehydlösung, mind. 37	Fluka
Glukose	Merck
Glycerol	Omni Lifescience
Goldpartikel, 1,0 Mikron	BioRad
Guanidiniumchlorid	Sigma-Aldrich
4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	Serva
Imidazol	Merck
Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Fermentas
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kanamycinsulfat	Roche Applied Science
Kupfer(II)chlorid Pentahydrat	Merck
α -Laktose Monohydrat	Merck
Lithiumchlorid	Merck
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Fluka
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Merck
Mangan(II)chlorid Tetrahydrat	Merck
Milchpulver	Carl Roth
Methanol p.a.	Walter CMP GmbH
MitoTracker Red CM-H ₂ XRos, reduzierte Form	Molecular Probes
Natriumcitrat	Merck
Natriumchlorid	J. T. Baker
Natriumdodecylsulfat (SDS), 10 % (w/v) Lösung	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	Merck
Natriummolybdat	Merck
Natriumsulfat	Merck
Nickel(II)sulfat Hexahydrat	Sigma-Aldrich
Ni-NTA Agarose	Qiagen
Paraformaldehyd	Merck
Ponceau S, Natriumsalz	Merck
ProLong Gold antifade reagent	Molecular Probes
Protino Ni-IDA-Matrix	Macherey-Nagel
Protino Ni-TED-Matrix	Macherey-Nagel
Silbernitrat	Merck
Trichloressigsäure	Merck
Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck
Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan, Chloridsalz (TRIS-HCl)	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Serva
Tween-20	USB Biochemicals
Zinksulfat	Merck

3.3.5 Puffer und Lösungen

Zellkulturmedien und Lösungen

Blasticidin S

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)

DMEM-komplett

1 x Dulbecco's PBS

Effectene Transfektionsreagenz

Fötale Kälberserum (FKS)

FuGene 6 Transfektionsreagenz

Gentamicin

HAT-Medium

HAT-Supplement

HEPES-Puffer, 1 M

Hybridoma Fusion and Cloning Supplement
(HFCS)

HT-Medium

HT-Supplement

Hygromycin B

IgG-armes fötales Kälberserum

IgG-armes Medium

Isotone Natriumchloridlösung, 154 mM

jetPEI Transfektionsreagenz

L-Glutamin, 200mM

Nicht-essentielle Aminosäuren, 100x

Natriumpyruvat, 100 mM

Invivogen

Gibco-BRL

DMEM mit 10 % FKS, 1 mM

Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 1 x
nicht-essentiellen Aminosäuren, 1 x
Gentamicin und 10 mM HEPES-Puffer.

2,67 mM KCl, 1,47 mM KH₂PO₄,
137,93 mM NaCl, 8,06 mM Na₂PO₄,
pH 7,4 (Invitrogen/Gibco-BRL)

Qiagen

Biochrom

Roche Applied Science

Gibco-BRL

RPMI-Medium mit 5 % FKS, 5 %
HFCS, 1 x HAT-Supplement, 2 mM L-
Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 3 µM
β-Mercaptoethanol und 1 x Gentamicin

Gibco-BRL

Gibco-BRL

Roche Applied Science

RPMI-Medium mit 5 % FKS, 5 %
HFCS, 1 x HT-Supplement, 2 mM L-
Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 3 µM
β-Mercaptoethanol und 1 x Gentamicin

Gibco-BRL

PAA Laboratories

PAN Biotech

RPMI-Medium mit 10 % IgG-armes
FKS, 2 mM L-Glutamin und 1 mM
Natriumpyruvat, 3 µM β-Mercapto-
ethanol und 1 x Gentamicin

Braun

Polyplus

Gibco-BRL

Gibco-BRL

Gibco-BRL

PEG (MW 3000 - 3700)	50 % PEG in DMEM (StemCell)
RPMI-Medium	RPMI-1640, Gibco-BRL
RPMI-Medium, komplett	RPMI-Medium mit 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat
Tetracyclin-freies DMEM-komplett	DMEM mit 10 % Tetracyclin-freiem FKS, 1 mM, Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 1 x nicht-essentiellen Aminosäuren und 10 mM HEPES-Puffer.
Tetracyclin-freies fötales Kälberserum	Clontech
TrypLE (Trypsin-like enzyme)	Gibco-BRL
Zeocin	Invitrogen

Kulturmedien für Bakterien

LB-Agar (Formulierung nach Miller)	Difco/BD Biosciences
LB-Medium (Formulierung nach Miller)	1 % Trypton, 1 % NaCl, 0,5 % Hefeextrakt (Invitrogen)
MDG, nichtinduzierendes Medium für das pET-System	27 mM Glukose, 18,8 mM Aspartat, 25 mM Na ₂ HPO ₄ , 25 mM KH ₂ PO ₄ , 50 mM NH ₄ Cl, 5 mM Na ₂ SO ₄ , 2 mM MgSO ₄ , 10 µM Fe(III)citrat, 4 µM CaCl ₂ , 2 µM Mn(II)Cl ₂ , 2 µM ZnSO ₄ , 400 nM Cu(II)Cl ₂ , 400 nM Ni(II)SO ₄ , 400 nM Na ₂ MoO ₄ , 400 nM H ₃ BO ₃ , verändert nach Studier 2005.
MDG-Agar	1 % Agar-Agar in MDG-Medium, Glukose und Aspartat wurden nach dem Autoklavieren zugesetzt.
SOC-Medium	2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 8,6 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose (Gibco-BRL)
Zym5052 Autoinduktionsmedium für das pET-System	1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Bacto-Hefeextrakt, 54 mM Glycerol, 2,8 mM Glukose, 5,6 mM α-Laktose, 25 mM Na ₂ HPO ₄ , 25 mM KH ₂ PO ₄ , 50 mM NH ₄ Cl, 5 mM Na ₂ SO ₄ , 2 mM MgSO ₄ , 50 µM

Fe(III)citrat, 20 μ M CaCl₂, 10 μ M Mn(II)Cl₂, 10 μ M ZnSO₄, 2 μ M Cu(II)Cl₂, 2 μ M Ni(II)SO₄, 2 μ M Na₂MoO₄, 2 μ M H₃BO₃, verändert nach Studier 2005.

Antibiotika

Eine Vorratslösung Carbenicillin (c = 100 mg/ml) wurde in demineralisiertem Wasser angesetzt. Das Antibiotikum wurde mit einer Konzentration von 100 μ g/ml eingesetzt. Eine Vorratslösung Chloramphenicol (c = 34 mg/ml) wurde in absolutem Ethanol angesetzt. Das Antibiotikum wurde mit einer Konzentration von 34 μ g/ml benutzt. Kanamycinsulfat-Vorratslösung (50 mg/ml) wurde von Roche Applied Science bezogen. Kanamycin wurde in der Konzentration 100 μ g/ml eingesetzt.

Lösungen für die DNA-Gelelektrophorese

Ladepuffer (6x)	Fermentas
TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (50x)	Gibco-BRL

Lösungen für die Proteinbiochemie

Antikörperpuffer	0,05 % Tween-20, 5 % Milchpulver in TBS
Antioxidans	Invitrogen
Blotpuffer	10 % Methanol, 0,1 % Antioxidans, 1x Transferpuffer
Blockpuffer	5 % Milchpulver in TBS
<i>Colloidal Blue Staining Kit</i>	Invitrogen
1 x Dulbecco's PBS	2,67 mM KCl, 1,47 mM KH ₂ PO ₄ , 137,93 mM NaCl, 8,06 mM Na ₂ PO ₄ , pH 7,4 (Invitrogen/Gibco-BRL)
ECL-Reagenz	GE Healthcare/Amersham Biosciences
Größenmarker für die SDS-PAGE	Mark12, Invitrogen
	MultiMark V, Invitrogen
LDS-Ladepuffer (4x)	Invitrogen

MOPS-Laufpuffer (20x)	1 M 3-(N-morpholino)-propansulfon-säure (MOPS), 1 M TRIS-Base, 69,3 mM Natriumdodecylsulfat (SDS), 20,5 mM EDTA (Invitrogen)
Ponceau S Färbelösung	0,1 % Ponceau S, Natriumsalz in 3 % Trichloressigsäure
Reduktionsmittel	0,5 M Dithiothreitol, stabilisiert (Invitrogen)
SimplyBlue Safestain	Invitrogen
TBS	0,025 M TRIS-HCl, pH 7.4, 0,15 M NaCl
Transferpuffer (20x)	0,5 M Bicin, 0,5 M BIS-TRIS, 20,5 mM EDTA, 1 mM Chlorobutanol (Invitrogen)
Waschpuffer	0,05 % Tween-20 in TBS

Lösungen für die Aufreinigung rekombinanter Proteine

BugBuster	Proteinextraktionsreagenz (Novagen)
IMAC-Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 500 mM NaCl, 3 mM β-Mercapto- ethanol, pH mit NaOH auf 8,0 eingestellt.
IMAC-Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 3 mM β-Mercaptoethanol, pH mit NaOH auf 8,0 eingestellt.
Laufpuffer für die Größen- ausschlusschromatographie	50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM Dithio- threitol, pH mit HCl auf 8,0 eingestellt, steril filtriert, entgast.
Kristallisationspuffer	20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 3 mM Dithiothreitol, pH mit HCl auf 7,0 eingestellt, steril filtriert, entgast.

Lösungen für enzymatische Untersuchungen

Agmatin-MARsylierungspuffer	PBS mit 2 mM MgCl ₂ und 1 mM DTT
DC-Laufpuffer 1	1 M Essigsäure
DC-Laufpuffer 2	300 mM LiCl in 0,9 M Essigsäure
Arginin-MARsylierungspuffer	PBS
PARsylierungspuffer	PBS mit 2,5 mM MgCl ₂ und 2,5 mM DTT
ARH-Reaktionspuffer	PBS mit 10 mM MgCl ₂ und 5 mM DTT

Lösungen für Immunfluoreszenzanfärbungen

Fixierungslösung	4 % Formaldehyd in PBS
Permeabilisierungslösung	0,5 % Triton X-100 in PBS
Blocklösung	DMEM-komplett
Antikörperlösung	Antikörper in DMEM-komplett
Waschlösung	0,1 % Triton X-100 in PBS
Hoechst 33342	10 µg/ml Hoechst 33342 in PBS
Einbettmedium	ProLong Gold <i>Antifade</i> Reagenz (Molecular Probes)

3.3.6 Reagenzsysteme (*Kits*)

BCA-Proteinquantifizierung	<i>BCA Protein Assay Reagent</i>	<i>Pierce</i>
Gelextraktion	<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen
PCR-Aufreinigung	<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	Qiagen
Plasmid-Präparation	<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	Qiagen
	<i>Endofree Plasmid Maxi Kit</i>	Qiagen
Sequenzierreaktionen	<i>BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit</i>	Applied Biosystems

3.4 Verbrauchsmaterial

Combitips	versch. Größen	Eppendorf
Deckgläser, 0,17 mm	9 x 9 mm	Science Services, München
Dünnschichtchromatographieplatten	Polyethylenimin- Cellulose	Merck
Einwegpipetten, steril	versch. Größen	Falcon/BD Biosciences
Einwegspritzen	versch. Größen	Braun
FACS-Röhrchen	5 ml roundbottom	Falcon/BD Biosciences
Filterpapier	Whatman	Schleicher & Schuell
Filmentwicklungslösung		Kodak
Filmfixierungslösung		Kodak
Filme für die Autoradiographie	BioMax MR	Kodak
Filme für die Chemolumineszenz	Hyperfilm ECL	GE Healthcare
Gelfiltrationssäulen	Microbiospin-6	BioRad
Kanülen	versch. Größen	Braun
Kulturflaschen für adhärent wachsende Zellen	T25, T75 96-well, flatbottom	Nunc Nunc
Kulturschalen für in Suspension wachsende Zellen	10 cm 25 cm	Greiner Greiner
Kryoröhrchen	1 ml	Nunc
96-well Mikrotiterplatten, roundbottom		Greiner
96-well Mikrotiterplatten, V bottom		Greiner
Nitrocellulosemembran	HyBond C	Pharmacia / GE Healthcare
Objektträger mit zellkulturbehandeltem	8 well μ -Slide	Ibidi
Plastikboden in Deckglasdicke, steril		
Parafilm		VWR
Pipettenspitzen, versch. Größen	Tipstack	Sarstedt
Polyacrylamid-Gele	Novex BIS-TRIS Gele 4-12% und 10%	Invitrogen
Polypropylenröhrchen, steril	15 ml, 50 ml	Greiner
Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF)	ImmobilonP	Boehringer Ingelheim
Reaktionsgefäße, versch. Größen	Safeseal	Sarstedt
Sterilfiltrationsapparaturen	Steriflip, Stericup	Millipore
StrataClean Matrix		Stratagene
Tefzel- <i>tubing</i>		BioRad
Ultrafiltrationseinheiten	Vivaspin20, MWCO 10.000 und 30.000	Vivascience
	Diafiltrationsbecher	Vivascience
Untersuchungshandschuhe	Peha-Soft	Hartmann

3.5 Laborgeräte

Analysenwaage	Analytical Plus	Ohaus
Autoklav	Modell 2540 EK Varioklav	Tuttnauer H+P Labortechnik GmbH
Brutschrank/CO ₂ -Inkubator	MCO-20AIC	Sanyo
Bakterienbrutschrank	B6060	Heraeus
Computer	MacBook, eMac, G3, G4	Apple
Cooler	Stratacooler	Stratagene
Erlenmeyerkolben	versch. Größen	Schott, Simax
Erlenmeyerkolben	2 l, mit Schikane	Kleinfeld Labortechnik
Feinwaage	Typ 1412	Sartorius
Filmentwicklungsmaschine	Fuji Medical Film, Processor FPM-100A	Fuji Photo Film Co., Ltd.,
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M, mit Apotome-Schieber	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop-Objektive	Plan-Apochromat 20x/0,80	Zeiss
	Plan-Neofluar 40x/0,75	Zeiss
	Plan-Apochromat 63x/1,25	Zeiss
Folienschweißgerät	vacufix electronic	Petra electric
FPLC-Anlage	Äkta-Prime	Pharmacia
Geldokumentation	Edas290 + Kamera DC290	Kodak
Glasflaschen	versch. Größen	Schott
Goldkopplungsgerät	<i>tubing prep station</i>	BioRad
Größenausschluss- chromatographiesäule	HiLoad 16/60 Superdex 75 Prep Grade	GE Healthcare
Heizblock	Thermomixer kompakt	Eppendorf
Inversmikroskop	-	Leitz
Kontaminationsmonitor	Contamat FHT 111 M	Eberline
Kühlzentrifuge	5417R	Eppendorf
<i>Laminar air flow</i> im PCR-Labor	Gelaire Class 100	Gelman
Laufkammern für die Agarose-Gelelektrophorese	Modell 40-0708 Modell B2	PEQLAB Biotechnologie Owl Separation Systems
Laufkammern für die SDS-PAGE und den Elektroblot	Novex MiniCell	Invitrogen
Inkubator	Incubat	Melag
Magnetrührer	RCT S 26	Omnilab/IKA-Labortechnik
Mikro-Pipetten	Typ „Research“	Eppendorf
Mikrowellenofen	M 637 EC	Miele
Neubauer-Zählkammer		Labor Optik
Pipettierhilfe	„Express“	Falcon/BD Biosciences

Photometer	Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech
Röntgenfilmkassetten	Suprema	Dr. Goos
Scanner	CanoScan 9800 F	Canon
Schüttelinkubator	Ecotron/Unitron	Infors
Sicherheitswerkbank	Herasafe HS12/2	Heraeus
Stickstofftank	K series	Taylor-Wharton
Spannungsgerät für die Agarose-Gelelektrophorese	Modell BI0105 LVD	Biometra
Spannungsgerät für die SDS-PAGE und den Elektoblot	Power Pac 200	BioRad
Thermocycler	TGradient und T3	Biometra
Tischzentrifuge	Biofuge <i>pico</i>	Heraeus
Ultraschallsonde	MSE	
Ultrazentrifuge	RC26 Plus	Sorvall
Ultrazentrifugenrotoren	SA-300	Sorvall
	SLA-3000	Sorvall
UV-Spektrometer	Ultrospec2000	Pharmacia
UV-Transilluminator	Typ TI 1	Biometra
Vortex	„ <i>press to mix</i> “	Neolab
Wasserbad	Typ 1007	Gesellschaft f. Labortechnik
Wasserdeionisierungsanlage	MilliQ synthesis	Millipore
	Elix 10	Millipore
Zentrifugen	GS-6KR	Beckman
	Rotanta 460	Hettich
-80°C-Truhe	HFC 586 Basic	Heraeus

4. Methoden

4.1 Methoden der *in silico* Recherchen

4.1.1 BLAST-Suchen

Mit Hilfe des *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) wurden Sequenzdatenbanken nach zur eingegebenen Sequenz ähnlichen Sequenzen durchsucht (Altschul et al. 1990). BLASTn wird allgemein zum direkten Vergleich einer Nukleotid-Sequenz mit einer Nukleotiddatenbank verwendet. tBLASTn vergleicht eine Proteinsequenz mit einer Nukleotiddatenbank, indem eine Übersetzung aller möglichen Leseraster der Nukleotid-Sequenzdatenbank benutzt wird. BLASTp durchmustert eine Proteindatenbank mit einer Proteinsequenz als Suchvorgabe. Mit PSI-BLAST (*Position Sensitive Iterative BLAST*) kann eine Suche nach verwandten Sequenzen mit geringer Sequenzidentität in einer Proteindatenbank durchgeführt werden. Nach einer klassischen BLASTp-Suche wird ein Sequenzalignment der erhaltenen Treffer in der Datenbank erstellt. Aus allen erhaltenen Sequenzen wird eine neue Suchsequenz zusammengestellt, bei der die Konservierung bestimmter Positionen zwischen den erhaltenen Sequenzen in eine Gewichtung einfließt. Iterativ schließen sich mehrere BLASTp-Suchen mit der jeweils durch neue erhaltene Sequenzen erweiterten und neu berechneten Konsensussequenz an, bis keine neuen Treffer mehr erzielt werden. BLAST-Suchen wurden über die Internetseiten des *National Center for Biology Information* (NCBI) (URL: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) und der Ensembl-Datenbank (URL: www.ensembl.org/Multi/blastview) durchgeführt. Für PSI-BLAST-Analysen wurde als Ausschlussgrenze ein Erwartungswert von $e = 0,005$ benutzt.

4.1.2 Ermittlung orthologer und paraloger ARH-Gene

Ausgehend von den bekannten Sequenzen der menschlichen *ARH*-Gene konnten durch BLASTn-Suchen gegen das Maus-Genom die *Arh*-Gene der Maus gefunden und chromosomal lokalisiert werden. tBLASTn-Suchen ausgehend von der hsARH1-Proteinsequenz identifizierten paraloge Gene im Mensch- und Maus-Genom. Die Ergebnisse der BLAST-Suchen deckten sich mit Ergebnissen der reziproken BLAST-Analysen der Datenbanken. Entsprechend konnten diese Daten der Ensembl-Datenbank für die Identifikation weiterer orthologer Gene anderer Spezies herangezogen werden und wurden durch eigene BLAST-Analysen bestätigt und ergänzt.

4.1.3 Multiple Sequenzalignments und Strukturvorhersagen

Multiple Sequenzalignments von Proteinsequenzen wurden mit dem Programm T-COFFEE erstellt (URL: www.ebi.ac.uk/t-coffee/) (Notredame et al. 2000). Strukturbasierte multiple Sequenzalignments von Proteinsequenzen wurden mit dem Programm Espresso erstellt (URL: www.tcoffee.org/) (Armougom et al. 2006). Sekundärstrukturvorhersagen wurden mit dem Programm PSIPred erstellt und auf die multiplen Sequenzalignments projiziert (URL: bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/) (Jones 1999). Mit dem unter der gleichen Adresse verfügbaren Programm GenTHREADER wurde die pdb-Datenbank nach strukturell verwandten Proteinen durchsucht (McGuffin und Jones 2003).

4.1.4 Vervollständigung partieller ARH-Sequenzen

Die deponierten ARH-Sequenzen wurden in multiplen Sequenzalignments analysiert. Dabei wurden bei einigen Sequenzen N- bzw. C-terminale Deletionen festgestellt. Durch Vergleich mit den Exon-Intron-Grenzen orthologer ARH-Gene konnten fehlende Exons identifiziert werden. tBLASTn-Suchen mit den kodierten Proteinsequenzen aus den Exons der orthologen Gene konnten die fehlenden Exons identifizieren. Exon-Intron-Grenzen wurden durch manuelle Suche nach Spleißdonor- und Spleißakzeptor-Konsensussequenzen ergänzt. Wenn möglich wurde die Zuordnung in Übereinstimmung mit *expressed sequence tags* (ESTs) oder GeneScan-Vorhersagen getroffen. Bei anderen ARH-Sequenzen fehlten Start- oder Stoppcodons. Diese wurden durch manuelle Suche in den angrenzenden untranslatierten Regionen zusammen mit den dazwischen liegenden DNA-Bereichen ergänzt.

4.1.5 Korrektur fehlerhafter ARH-Sequenzen

Die deponierten ARH-Sequenzen wurden in multiplen Sequenzalignment analysiert. Dabei wurden bei einigen Sequenzen Insertionen oder stark abweichende Sequenzen im N- bzw. C-terminalen Bereich festgestellt. In diesem Fall wurden die annotierten Exon-Intron-Grenzen mit den Exon-Intron-Grenzen bei orthologen ARH-Genen verglichen. Durch tBLASTn-Suchen und manuelle Analysen wurden die Exon-Intron-Grenzen dort, wo eine klare Zuordnung möglich war, so korrigiert, dass sie der Struktur orthologer ARH-Gene entsprachen.

4.1.6 Bestimmung der Exon-Intron-Grenzen

Die Phasen und Positionen der Exon-Intron-Grenzen sowie die Längen der Exons und Introns wurden dem Ensembl-Exon-Report entnommen. Bei unvollständig in der Datenbank hinterlegten Sequenzen wurden Exon-Intron-Grenzen durch manuelle Suche nach Spleißdonor- und Spleißakzeptor-Konsensussequenzen ergänzt. Wo möglich, wurde hierbei auf *GenScan*-Vorhersagen der Spleißstellen zurückgegriffen. Über die Position und Phase der Exon-Intron-Grenzen erfolgte die Zuordnung der jeweiligen ARH-Sequenz zu einer der vier ARH-Familien.

4.1.7 Berechnung der Sequenzidentität zwischen ARH-Proteinen

Zur Analyse der Sequenzidentität zwischen ARH-Proteinen wurden die korrigierten ARH-Sequenzen mit dem Programm MegAlign (DNA-Star) einem jeweils paarweisen Alignment mit dem ClustalW Algorithmus unterzogen. Aus den paarweisen Alignments wurde die Sequenzidentität in % nach der Formel $(\text{identische Positionen}) / (\text{Alignmentlänge inklusive möglicher Alignmentlücken ohne N- und C-terminale Elongationen eines der beiden Proteine})$ berechnet.

4.1.8 Lokalisationsvorhersagen

Die N-terminalen Aminosäuresequenzen von zu untersuchenden ARH-Proteinen wurden mit dem Programm TargetP 1.1 (URL: www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/) analysiert (Emanuelsson et al. 2000). Dabei wurden die Einstellungen für Nicht-Pflanzen-Proteine verwendet. Von ARH3-Proteinen wurden die ersten 30, 40, 50, 60 und 70 Aminosäuren analysiert, um eine Beeinflussung des Vorhersageergebnisses durch die Länge der eingegebenen Sequenz auszuschließen. Die putative Erkennungsstelle der Signalpeptidase wurde ebenfalls mit TargetP 1.1 vorhergesagt (Nielsen et al. 1997).

4.2 Methoden der Molekularbiologie

4.2.1 Transformation von Bakterien

Chemisch kompetente Bakterien wurden nach Herstellerangaben durch einen Hitzeschock transformiert. Von Ligationsansätzen wurden 2 - 4 μl in ultrakompetente XL-10-Bakterien (Stratagene) transformiert. Für Retransformationen wurde ca. 1 ng Plasmid in selbst präparierte kompetente XL-2 Bakterien transformiert. Der Hitzeschock wurde in diesem Fall für 90 s bei 37 °C durchgeführt. Zur Transformation von Expressionsstämmen wurde ca. 1 ng pET-Expressionsplasmid in chemisch kompetente Bakterien laut Herstellerangaben transformiert. Transformierte Bakterien wurden 1 h bei 37 °C und 230 Upm in SOC-Medium inkubiert und anschließend auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen. Mit pET-Expressionsplasmiden transformierte Bakterien wurden auf nichtinduzierende MDG-Agarplatten mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin ausgestrichen.

4.2.2 Kryokonservierung transformierter Bakterien

Transformierte Bakterien können konserviert werden, wenn man sie in einem glycerolhaltigen Medium bei -80 °C einfriert. Für die Kryokonservierung wurden BL21 (DE3)-Expressionsstämme ausschließlich in nichtinduzierendem laktosefreiem MDG-Medium kultiviert, um eine mögliche Selektion auf schlechte Expression zu vermeiden. 5 ml MDG-Medium mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin wurden mit einer einzelnen Kolonie der Retransformation inokuliert und bis zur beginnenden Trübung bei 37 °C und 250 Upm inkubiert. Dann wurden 700 μl der Bakteriensuspension mit 300 μl sterilem 50 % (w/v) Glycerol versetzt, gemischt und in einem Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Kryoröhrchen wurde anschließend in eine -80 °C Tiefkühltruhe überführt.

4.2.3 Klonierungs-PCR

Für Klonierungen wurden Primer eingesetzt, die 5' von einer ausreichend spezifischen DNA-Sequenz eine Erkennungsstelle für zwei verschiedene Restriktionsendonukleasen trugen. Um Mutationen während der Amplifikation zu minimieren, wurde die *Pfu*Ultra DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* von Stratagene benutzt. Nach der Polymerase-Kettenreaktion und der Aufreinigung des Amplifikats konnten die Amplifikate mit den beiden Restriktionsendonukleasen inkubiert und nach erneuter Aufreinigung über ihre kompatiblen Enden in entsprechend geschnittene Plasmide kloniert werden.

Die PCR-Ansätze für Klonierungen in pCDNA5/FRT/TO, pEGFP-N1, pETM11, pET26b und pET28a-preScission und wurden folgendermaßen angesetzt:

Tab. 4.1 Zusammensetzung der Klonierungs-PCR-Ansätze.

Bestandteil	Volumen	Bemerkung
demineralisiertes Wasser	35 µl	
<i>Pfu</i> Reaktionspuffer (10x)	5 µl	
dNTP-Mix, je 2 mM	5 µl	je 200 µM Endkonzentration
Vorwärtsprimer	1 µl	10 pmol, 200 nM Endkonzentration
Rückwärtsprimer	1 µl	10 pmol, 200 nM Endkonzentration
<i>PfuUltra</i>	1 µl	2,5 U
Matrizen-DNA	1 µl	der auf ca. 1 ng/µl verdünnten Plasmid-Lösung

Die verwendeten Primer sind in Anhang 8.3 aufgelistet. Tab. 4.2 zeigt das verwendete PCR-Programm.

Tab. 4.2 PCR-Programm für die Amplifikation zu klonierender DNA-Fragmente. Abweichend hiervon wurde für die Klonierung von mmARH3 in pEGFP-N1 wegen der Fehlpaarungen des Primers StK144 nahe am 3'-Ende eine *annealing*-Temperatur von 40 °C benutzt.

Temperatur	Dauer	Zykluszahl
95 °C	2 min	1x
95 °C	30 s	} 25x
56 °C	30 s	
68 °C	70 s	
68 °C	10 min	1x
4 °C	bis zur Probenentnahme	1x

4.2.4 Zielgerichtete Mutagenese

Die Mutagenese von Plasmiden wurde nach dem Protokoll des *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* durchgeführt. Abweichend wurde die Polymerase *PfuUltra* eingesetzt. Tab. 4.3 zeigt die Zusammensetzung der PCR-Ansätze.

Tab. 4.3 Zusammensetzung der Mutagenese-Ansätze.

Bestandteil	Volumen	Bemerkung
demineralisiertes Wasser	16,4 µl	
<i>PfuUltra</i> Reaktionspuffer (10x)	5 µl	
dNTP-Mix, je 2 mM	12,5 µl	je 500 µM Endkonzentration
Vorwärtsprimer (10 µM)	1,25 µl	250 nM Endkonzentration
Rückwärtsprimer (10 µM)	1,25 µl	250 nM Endkonzentration
<i>PfuUltra</i>	1 µl	2,5 U
Plasmid-DNA (1 ng/µl)	12,5 µl	

Die verwendeten Primer sind in Anhang 8.3 aufgelistet. Tab. 4.4 zeigt das benutzte PCR-Programm.

Tab. 4.4 PCR-Programm für die Mutagenese von Plasmiden.

<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>	<i>Zykluszahl</i>
95 °C	30 s	1 x
95 °C	30 s	} 17 x
55 °C	1 min	
68 °C	6,5 min	
68 °C	10'	1 x
4 °C	bis zur Probenentnahme	1 x

Nach der Polymerase-Kettenreaktion wurde dem Ansatz 1 µl *DpnI* (20 U) zugesetzt. Es wurde 2 h bei 37 °C und 20 min bei 65 °C inkubiert. 1 µl des Mutageneseansatzes wurde in XL10-Gold ultrakompetente Zellen oder für pET26b-Konstrukte direkt in BL21-Gold (DE3) Zellen transformiert und auf LB- bzw. MDG-Agarplatten mit Antibiotikum ausgestrichen. Aus Einzelkolonien wurden 5 ml-Kulturen in LB- oder MDG-Medium mit Antibiotikum angeimpft. Ein Aliquot der Kultur wurde für die Kryokonservierung des Klons verwendet. Aus dem Rest der Kultur wurde nach weiterer Inkubation Plasmid-DNA isoliert und durch Sequenzierung wurde die erfolgreiche Mutagenese bestätigt.

4.2.5 Präparation von Plasmid-DNA

Minipräparationen wurden aus 1 - 3 ml LB-Bakterienkultur mit Hilfe des *QIAprep Spin Miniprep Kits* durchgeführt. Die Elution erfolgte in 30 µl Elutionspuffer (10 mM TRIS, pH 8,5). Maxipräparationen wurden aus 180 ml LB-Bakterienkultur mit Hilfe des *Endofree Plasmid Maxi Kits* durchgeführt. Die Durchführung erfolgte wie in den Gebrauchsanweisungen beschrieben.

4.2.6 Restriktionsverdau von DNA

Die Inkubation der zu schneidenden DNA mit einer oder zwei Restriktionsendonukleasen (je 5 U/Ansatz) erfolgte in einem Volumen von 20 µl unter Verwendung des vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffers. Falls empfohlen, wurde aufgereinigtes bovines Serumalbumin (100 µg/ml) zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für drei bis sechs Stunden bei 37 °C. Falls möglich, wurde eine Hitzeinaktivierung der Restriktionsendonukleasen für 20 Minuten bei 65 bzw. 80 °C angeschlossen. Nicht hitzeinaktivierbare Restriktionsendonukleasen wurden bei

präparativen Restriktionsverdauen durch dreimalige Behandlung mit StrataClean-Matrix (Stratagene) entfernt.

4.2.7 DNA-Gelelektrophorese

Agarose wurde in TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer unter Erhitzen gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurde 100 ng/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die Agaroselösung wurde in einen Gelträger mit Gelkamm gegossen und gelierte bei der Abkühlung. Das Gel wurde in eine Laufkammer überführt, die so mit TAE-Puffer gefüllt war, dass das Gel vollständig bedeckt war. Die aufzutragende DNA-Probe wurde mit Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer elektrischen Feldstärke von ca. 5V/cm.

4.2.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die DNA-Banden auf dem UV-Transilluminator ausgeschnitten und mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) aufgearbeitet. Die Agarose wird hierbei durch eine zehnminütige Inkubation in einem Puffer mit einer hohen Konzentration Guanidiniumchlorid bei 50 °C aufgelöst. Die Durchführung erfolgte wie in der Gebrauchsanweisung beschrieben. Alternativ wurden PCR-Reaktionen und Verdau-Ansätze, in denen Fragmente von weniger als 75 bp als zu entfernendes Produkt auftraten ohne vorherige Gelelektrophorese mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

4.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Ligasen ermöglichen die kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten zu einem kontinuierlichen DNA-Strang. Dies ermöglicht die künstliche Rekombination von DNA aus unterschiedlichen Organismen und ist daher zur Grundlage der Gentechnik geworden. Die Ligase verknüpft unter ATP-Verbrauch Fragmente, falls diese an ihrem 3'-Ende eine Phosphatgruppe aufweisen und eine freie Hydroxygruppe am 5'-Ende des anderen Stranges vorliegt.

4 µl Ligasepuffer (5x) und 1 µl T4-Ligase (5 U, Invitrogen) wurden mit geschnittenem, aufgereinigtem Vektor und der dreifachen Stoffmenge an geschnittenem Fragment in einem Volumen von 20 µl ligiert. Die Reaktion wurde für 16 h bei 16 °C oder alternativ 30 min bei

25 °C und 16 h bei 8 °C durchgeführt. Es wurden 5-50 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Vom Ligationsansatz wurden 2 bis 5 µl für die Transformation von Bakterien benutzt. Als Kontrollen wurde jeweils ein Ansatz ohne zu klonierendes Fragment religiert und ein Ansatz ohne Zugabe von Vektor ligiert.

4.2.10 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen erfolgten nach der Sanger-Methode mit fluorchrommarkierten Didesoxynukleotiden. Das verwendete Dye-Terminator Sequenzierungskit (BigDye, Applied Biosystems) enthielt Enzym, Pufferkomponenten, Desoxynukleotide und die vier mit unterschiedlichen Fluorchromen markierten Terminatoren. Ein Sequenzieransatz bestand aus ca. 500 ng Matrizen-DNA, 4 µl des BigDye-Reaktionsmixes und 1 µM Sequenzierungsprimer in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die Sequenzierreaktion wurde in 28 Zyklen mit jeweils 40 s bei 96 °C, 15 s bei 50 °C und 4 min bei 60 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Amplifikate mit Ethanol gefällt gewaschen und getrocknet. Die Auswertung erfolgte auf dem *DNA-Sequencing System* Modell 370A (Applied Biosystems) des Servicelabors des Universitätsklinikums Eppendorf, Hamburg.

4.3 Klonierungen

4.3.1 Klonierungen für die prokaryotische Expression

Für die rekombinante Expression in *E. coli* wurden die kodierenden Sequenzen für ARH-Proteine von *H. sapiens* und *M. musculus* aus verfügbaren cDNA-Vektoren (Tab. 3.2) mit Hilfe einer korrekturlesenden DNA-Polymerase PCR-amplifiziert. Drei verschiedene Expressionsplasmide wurden verwendet, die eine Hexahistidin-Markierung in das rekombinante Protein einführen, welche die affinitätschromatographische Aufreinigung an einer Matrix mit immobilisierten Nickelionen erlaubt. Die Vektoren pET28a und pETM11 führen zur Expression N-terminal hexahistidinmarkierter Proteine mit einer Proteaseschnittstelle (Thrombin bzw. Tabakmosaikvirus NIa-Protease), die die Entfernung der Hexahistidinmarkierung erlaubt. Klonierung in den Vektor pET26b führt zur Expression eines C-terminal hexahistidinmarkierten Proteins.

Vektoren der pET-Serie ermöglichen eine strenge Kontrolle der Expression und weisen eine sehr starke Expression nach Induktion auf. Als starker Promotor wird der T7 Promotor des Bakteriophagen T7 eingesetzt, der nur durch die T7 Polymerase abgelesen werden kann. Die T7 Polymerase wird ihrerseits unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors in den

Expressionsstämmen kodiert. Diese Genkassette ist als lysogener Lambdaphage DE3 in das Genom der gängigen Expressionsstämme integriert. Durch Zugabe von Laktose wird der Induktor Allolaktose gebildet, der die Expression der T7 Polymerase ermöglicht. Eine Alternative hierzu ist die Verwendung des nichthydrolysierbaren Allolaktose-Analogons Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG). Die T7 Polymerase führt dann wiederum zur starken und irreversiblen Aktivierung der Transkription vom T7 Promotor. Verschiedene Expressionsstämme stehen für die Verwendung des pET-Systems zur Verfügung, aber Derivate des Stammes BL21 (DE3) werden am häufigsten eingesetzt.

Die ARH-kodierenden Sequenzen waren aus verfügbaren cDNA-Klonen (Tab. 3.2) in das Plasmid pME subkloniert und durch komplette Sequenzierung des Inserts überprüft worden. (Kernstock 2003). Diese pME-Plasmide wurden als Matrize für die Reamplifikation und Klonierung in bakterielle Expressionsplasmide eingesetzt. Zuvor wurde eine interne *NdeI*-Schnittstelle in der mmARH1-kodierenden Sequenz durch zielgerichtete Mutagenese mit den Primern StK106 und StK116 entfernt.

Mit den Primern wurden Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *XhoI* in das Amplifikat eingebracht, die die Klonierung in den entsprechend geschnittenen Vektor pET26b erlauben. Durch die Wahl dieser Klonierungsstellen erfolgt die Expression des kodierten Proteins cytosolisch. Die Hexahistidin-Markierung schließt sich am C-Terminus an das ARH-Protein an, den Übergang bildet die *XhoI*-Erkennungsstelle, die die Aminosäuren Leucin und Glutamat kodiert. Da ARH1 mit einem Leucin endet, wurde diese Aminosäure durch die *XhoI*-Schnittstelle kodiert und als Übergang zur Hexahistidin-Markierung tritt nur ein Glutamat auf. Die putative N-terminale Signalsequenz von ARH3 wurde für diese Klonierung deletiert. Ein Startcodon wurde eingefügt, so dass das exprimierte Protein hsARH3 Δ L (Δ 2-17) bzw. mmARH3 Δ L (Δ 2-23) entspricht.

Analog erfolgte die Klonierung der ARH-kodierenden Sequenzen in die Vektoren pETM11 und pET28a. Hierfür wurden Primer mit identischen ARH-spezifischen Sequenzen, aber mit Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *NheI* und *XhoI* benutzt (nicht gezeigt). Letztlich wurden die Vektoren aus der pET26b-Serie für die hier beschriebenen Versuche verwendet. Plasmidkarten der eingesetzten Plasmide sind in Anhang 8.4 aufgeführt.

4.3.2 Klonierungen für die transiente eukaryotische Transfektion

Die ARH-kodierenden Sequenzen waren aus verfügbaren cDNA-Klonen in das Plasmid pME subkloniert und durch komplette Sequenzierung des Inserts überprüft worden. (Kernstock 2003). Diese pME-Plasmide wurden als Matrize für die Reamplifikation und Klonierung von ARH1 und ARH2 in eukaryotische Expressionsplasmide benutzt. Da bei der Klonierung in die pME-Plasmide die kodierenden Sequenzen für die putativen N-terminalen Signalpeptide

der ARH3-Proteine deletiert wurden, wurden hsARH3 und mmARH3 aus den cDNA-Klonen IMAGE: 4803538 bzw. IMAGE: 367370 amplifiziert. In den Primern für hsARH3 und mmARH3 waren Mutationen enthalten, die die Umgebung des Startcodons der Kozak-Konsensussequenz anglichen, um eine gute und vergleichbare Expression der klonierten ARHs zu erzielen (Kozak 1987). Für die anderen vier ARHs entsprach die Umgebung des Startcodons schon ausreichend gut einer Kozak-Konsensussequenz. hsARH1 und 2 wurden unter Verwendung von Primern mit *NheI* und *BamHI*-Schnittstellen, hsARH3 mit Primern mit *XhoI* und *BamHI*-Schnittstellen und mmARHs mit Primern mit *NheI* und *EcoRI*-Schnittstellen amplifiziert und den entsprechend geschnittenen peGFP-N1 Plasmid kloniert. Diese Klonierungsstrategie führt zur Expression des ARH-Proteins mit einem C-terminalen Linker gefolgt von eGFP. Die Länge des Linkers betrug 7 Aminosäuren für hsARHs und 17 Aminosäuren für mmARHs. Die Klonierungen wurden durch Sequenzierung überprüft. Mit den gleichen Restriktionsenzymen wurde das Insert aus den peGFP-N1-Plasmiden ausgeschnitten und in das Plasmid pd2eGFP-N1 umklont. Plasmidkarten der eingesetzten Plasmide sind in Anhang 8.4 aufgeführt.

Das Plasmid pFLAG-N1_hsARH3 wurde durch zielgerichtete Mutagenese des Plasmids peGFP-N1_hsARH3 mit den Oligonukleotiden FLAG-f und FLAG-r erzeugt. Durch die Mutagenese wurde direkt hinter der 3'-gelegenen *BamHI*-Klonierungsstelle eine FLAG-Markierung gefolgt von zwei verschiedenen Stoppcodons (TAGTAA). Durch die Mutagenese wurde das Startcodon des eGFPs deletiert. Es erfolgte die Expression von Vollängen ARH3 gefolgt von einem Linker aus drei Aminosäuren (TDP) und der FLAG-Markierung (DYKDDDDK).

4.3.3 Klonierungen für die stabile eukaryotische Transfektion

Für die Verwendung des Flp-In Systems zur Erzeugung stabil transfizierter Zellen wurden hsARH-d2eGFP kodierende Sequenzen in das Plasmid pcDNA5/FRT/TO (siehe Anhang 8.4) umklont. Hierzu wurde zunächst durch zielgerichtete Mutagenese mit den Primern Nhe-f und Nhe-r die *NheI*-Klonierungsstelle des pcDNA5-Vektors wieder hergestellt, die bei der Klonierung der FRT/TO-Sequenzen zerstört wurde. Anschließend wurden die vollständigen für hsARH1-3-d2eGFP kodierenden Inserts in das Plasmid pcDNA5/FRT/TO umklont. Außerdem wurde auf gleiche Weise auch d2eGFP aus dem Plasmid pd2eGFP-N1 ohne Insert in das Plasmid pcDNA5/FRT/TO umklont.

4.4 Methoden der rekombinanten Expression in *E. coli*

4.4.1 Expressionskulturen in kleinem Maßstab

In einem 1 l Erlenmeyerkolben wurden 20 ml Zym5052 Medium mit 100 µg/ml Kanamycin vorgelegt und aus einem Glycerolstock mit pET26b-transfizierten BL21 (DE3) Gold Zellen inokuliert. Nachdem nach vier- bis sechsständiger Inkubation bei 37 °C und 250 Upm eine leichte Trübung einsetzte, wurde die Temperatur für weitere 18 h auf 21 °C reduziert. Die Autoinduktion erfolgt unter diesen Bedingungen zuverlässig beim Erreichen hoher Zelldichten. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation geerntet und das Sediment (ca. 600 mg/Kultur) bis zur Präparation bei -20 °C gelagert.

4.4.2 Expressionskulturen in großem Maßstab

Ausgehend von einer Vorkultur in nichtinduzierendem MDG-Medium wurden je 400 ml Zym5052-Medium in 2 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen im Verhältnis 1:200 inokuliert. Insgesamt wurden pro Präparation vier Liter Kultur angesetzt. Nach einer vier- bis sechsständigen Kultivierung bei 37 °C und 250 Upm bis zur leichten Trübung der Expressionskulturen wurde die Temperatur über Nacht auf 24 °C reduziert. Am nächsten Morgen wurden die dicht gewachsenen Kulturen mit 1 mM IPTG induziert, da bei den verwendeten großen Kulturvolumina und der niedrigen Wachstumstemperatur die Autoinduktion nicht zuverlässig in diesem Zeitrahmen einsetzt. Vier Stunden später wurden die Bakterien nach insgesamt 21 h bei 24 °C durch Zentrifugation geerntet und das Sediment wurde in zwei Portionen à ca. 25 g eingefroren.

4.4.3 Testexpression und Detektion löslichen Proteins im Zellysat

BL21 (DE3)- und BL21-CodonPlus (DE3)-RIL-Zellen wurden frisch mit Expressionsplasmiden für ARH-Proteine transformiert. Am folgenden Tag wurden jeweils 12 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Kanamycin (für BL21(DE3) Bakterien) bzw. 100 µg/ml Kanamycin und 34 µg/ml Chloramphenicol (für BL21-CodonPlus (DE3)-RIL Bakterien) mit einer Einzelkolonie inokuliert. Nach sechsständiger Inkubation bei 37 °C und 230 Upm wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. 100 Minuten nach Induktion wurden die Bakterien per Zentrifugation geerntet und bis zur Lyse bei -20 °C gelagert. Die Zellen wurden in 600 µl BugBuster Proteinextraktionsreagenz mit 1 mM AEBSF, 10 µg/ml Lysozym, 25 U/ml Benzonase Nuklease und 3 mM β-Mercaptoethanol resuspendiert und 45 min bei Raumtemperatur auf einem Roller inkubiert. Das Lysat wurde durch zehnmütige

Zentrifugation bei 16000 g und 4 °C geklärt und der Überstand wurde möglichst vollständig abgenommen (ca. 500 µl). Das Präzipitat wurde mit 500 µl Waschlösung (1 % Triton X-100 und 10 mM MgCl₂ in PBS) gewaschen und erneut wie angegeben zentrifugiert. Das gewaschene Präzipitat wurde in 250 µl 50 mM HEPES, pH 7,5 mit 6 M Guanidiniumchlorid und 25 mM Dithiothreitol gelöst. Vor der SDS-PAGE wurden die in Guanidiniumchlorid solubilisierten Proteine 1:10 in demineralisiertem Wasser verdünnt. Je 2 µl des geklärten Lysats und der verdünnten solubilisierten Proteine wurden nebeneinander per SDS-PAGE analysiert. Die eingesetzte Menge Lysat entspricht 1/250 der Kultur, die eingesetzte Menge solubilisierten Proteins entspricht 1/1250 der Kultur.

4.4.4 Proteinpräparation aus Kulturen in kleinem Maßstab

Das Sediment einer 20 ml Expressionskultur wurde auf Eis aufgetaut. Die Lyse der Bakterien erfolgte mit BugBuster Proteinextraktionsreagenz (Novagen) mit folgenden Zusätzen: 200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM AEBSF, 25 U/ml Benzonase, 10 µg/ml Lysozym, 3 mM β-Mercaptoethanol. Es wurden 5 ml des Extraktionsreagenzes pro Gramm Bakterienfeuchtgewicht eingesetzt. Die Bakterien wurden in dem Extraktionsreagenz resuspendiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Roller inkubiert. Anschließend wurde das Lysat durch zehnmündige Zentrifugation bei 16000 g bei 4 °C geklärt.

Der Überstand wurde auf eine mit IMAC-Waschpuffer äquilibrierte Protino-1000 TED-Säule aufgetragen. Nach Herstellerangaben wurde mit 4 ml IMAC-Waschpuffer (50 mM Phosphatpuffer pH 8,0 mit 500 mM NaCl) gewaschen und mit 4,5 ml IMAC-Elutionspuffer (50 mM Phosphatpuffer pH 8,0 mit 500 mM NaCl und 250 mM Imidazol) eluiert. Das Eluat wurde über eine Vivaspin20 Ultrafiltrationseinheit mit einer Ausschlussgröße von 10.000 auf ca. 250 µl aufkonzentriert und mit Hilfe eines mit 20 ml IMAC-Waschpuffer gefüllten Diafiltrationsbechers umgepuffert. Das umgepufferte Protein wurde 10 min bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und ein Aliquot wurde für ein Polyacrylamid-Gel und für die photometrische Quantifizierung abgenommen. Die Präparation wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

4.4.5 Proteinpräparation aus Kulturen in großem Maßstab

Für eine Präparation wurden 25 g Bakterien auf Eis aufgetaut und in 6 ml Bakterien-Lysepuffer (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 1 mM AEBSF, 10 mM MgCl₂, 3 mM β-Mercaptoethanol, 10 µg/ml Lysozym, 12,5 U/ml Benzonase Nuklease, 0,1 % Triton X-100, pH 8,0) pro Gramm Bakterienfeuchtgewicht resuspendiert. Die Suspension wurde 30 min bei

Raumtemperatur auf einem Roller inkubiert, um die Zellmembran mit Lysozym teilweise abzubauen. Anschließend wurde die Suspension in Eiswasser abgekühlt. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4 °C. Die Suspension wurde in vier Portionen à 40 ml zehnmal für fünfzehn Sekunden mit einer Ultraschallsonde behandelt (75 % der maximalen Leistung). Zwischen den Ultraschallpulsen wurde jeweils eine Kühlzeit von fünfzehn Sekunden eingeräumt. Das Lysat wurde für 20 min bei 15500 g zentrifugiert um nicht lysierte Zellen und unlösliche Bestandteile zu präzipitieren. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Protino Ni-IDA-Matrix (1 g pro 50 ml Lysat) gemischt. Das Lysat wurde 1-2 Stunden auf einem Roller mit der Matrix inkubiert. Anschließend wurde die Matrix viermal mit insgesamt 175 ml IMAC-Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 3 mM β-Mercaptoethanol) gewaschen, in eine Säule überführt und mit weiteren 20 ml IMAC-Waschpuffer gespült. Eine weitere Waschung mit 30 ml IMAC-Waschpuffer mit 2,5 mM Imidazol schloss sich an. Dann wurde das gebundene Protein mit IMAC-Elutionspuffer (IMAC-Waschpuffer mit 250 mM Imidazol) in 3 ml Aliquoten eluiert. Fraktionen, die laut Kontrollgel größere Mengen des rekombinanten Proteins enthielten, wurden vereinigt und über eine Vivaspin20 Ultrafiltrationseinheit mit einer Ausschlussgröße von 30.000 aufkonzentriert.

Das Konzentrat der immobilisierten Metallionenchromatographie (4.3.4) wurde zur weiteren Aufreinigung einer Größenausschlusschromatographie unterzogen. Hierzu wurde eine HiLoad 16/60 Superdex 75 Prep Grade Chromatographiesäule mit mindestens zwei Säulenvolumen Laufpuffer (150 mM NaCl, 50 mM TRIS pH 8,0, 3 mM MgCl₂ 1 mM Dithiothreitol) äquilibriert. Das ARH-Konzentrat aus dem vorhergehenden Aufreinigungsschritt wurde auf ca. 700 µl aufkonzentriert und 5 min in einer Kühlzentrifuge hochtourig abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf die Größenausschlusschromatographie-Säule geladen. Die Chromatographie erfolgte bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,1 ml pro Minute über Nacht bei 4 °C mit Hilfe eines automatischen Fraktionierers in 1 ml Fraktionen. Während der Chromatographie wurde die OD₂₈₀ des Eluenten auf einem Schreiber aufgezeichnet. Proteinhaltige Fraktionen wurden per SDS-PAGE analysiert. Fraktionen, die keine höhermolekularen Verunreinigungen in der Coomassie-Färbung zeigten, wurden vereinigt und über eine Ultrafiltrationseinheit mit der Ausschlussgröße 30.000 auf ca. 1 ml Endvolumen konzentriert. Durch Einsatz eines Diafiltrationsbeckers konnte unter Verwendung der gleichen Ultrafiltrationseinheit das Protein in Kristallisationspuffer (20 mM HEPES, pH 7,0, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 3 mM DTT) umgepuffert werden. Die Proteinlösung wurde auf unter 1 ml aufkonzentriert, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, ein Aliquot wurde für eine photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration und für eine SDS-PAGE abgenommen. Das aufgereinigte Protein wurde bis zur erfolgten Qualitätskontrolle bei 4 °C gelagert und möglichst schnell der Kristallisierung zugeführt.

4.5 Methoden der Zellbiologie

4.5.1 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Ca. 10^6 Zellen wurden in 1 ml kaltem Einfriermedium (10 % (v/v) Dimethylsulfoxid mit 90 % (v/v) fötalem Kälberserum) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden in einem Cooler (Stratagene) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ langsam gefroren und nach mindestens 24 h bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in flüssigen Stickstoff überführt. Beim Auftauen wurde die Zellsuspension bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt und schnell in vorgewärmtes Medium überführt.

4.5.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Adhärent wachsende Zellen wurden üblicherweise in T25 Zellkulturflaschen (Nunc) in DMEM-komplett bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO_2 kultiviert. Für T-REx 293 Flp-In Zellen wurde Tetracyclin-freies DMEM-komplett mit Zeocin (250 $\mu\text{g/ml}$) und Blasticidin S (15 $\mu\text{g/ml}$) verwendet. Zur Selektion und Erhaltung von stabil transfizierten T-REx 293 Flp-In Zellen wurde das gleiche Medium mit Hygromycin B (200 $\mu\text{g/ml}$) statt Zeocin eingesetzt. Zum Passagieren wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml TrypLE-Lösung geerntet. Die Subkultivierung erfolgte im Verhältnis 1:5 bis 1:20 im Abstand von zwei bis drei Tagen.

Sp2/0 Zellen wurden in RPMI-komplett in 10 cm Zellkulturschalen kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte durch Verdünnung im Verhältnis 1:5 bis 1:10 im Abstand von zwei bis drei Tagen. Hybridomazellen wurden in HAT-Medium selektiert und anschließend auf HT-Medium umgesetzt. Nach dem Ausschleichen von Hypoxanthin und Thymidin wurden antikörperproduzierende Klone auf IgG-armes Medium umgesetzt.

4.5.3 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Für transiente Transfektionen mit eGFP-Expressionsplasmiden wurde jetPEI (Polyplus) eingesetzt. Bei Versuchen mit Mito-eGFP-PARP1 kam Effectene zum Einsatz. Endotoxinfreie Maxipräparationen der Plasmide wurden benutzt. Für Kotransfektionen wurden die beiden Plasmide vor Zugabe des Transfektionsreagenzes im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Durchführung erfolgte wie in den Gebrauchsanweisungen der Reagenzien beschrieben.

4.5.4 Stabil Transfektion von T-REx 293 Flp-In Zellen

Um stabil transfizierte T-REx 293 Flp-In Zellen zu erzeugen, wurden die Zellen mit pOG44, einem Expressionsplasmid für Flp-Rekombinase und einem der vier pcDNA5/FRT/TO-Vektoren mit den Insertionen hsARH1-d2eGFP, hsARH2-d2eGFP, hsARH3-d2eGFP oder ausschließlich d2eGFP im Verhältnis 1:9 kotransfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde FuGene 6 eingesetzt. Durch die Flp-Rekombinase inseriert die Expressionskassette des pcDNA5/FRT/TO-Vektors in eine Flp-Rekombinase Erkennungsstelle an einer definierten Stelle im Genom der T-REx 293 Flp-In Zellen. Durch die Insertion an dieser Stelle kommt das Hygromycin-Resistenzgen unter den Einfluss eines starken Promotors, der an der Integrationsstelle im Genom lokalisiert ist. 24 h nach der Transfektion kann die Selektion mit 200 µg/ml Hygromycin B begonnen werden, nach zwei Wochen wachsen positive Klone aus, die in Abwesenheit von Tetracyclin oder Doxycyclin durch die Bindung des in T-REx-Zellen exprimierten Tet-Repressors an Tet-Repressor-Bindungsstellen zwischen Promotor und inkloniertem Gen keine Expression dieses Zielgens zeigen.

4.5.5 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten für den Nachweis von eGFP-Fusionsproteinen im Westernblot wurden transfizierte Zellen durch Trypsinierung geerntet und nach Blockieren des Trypsins mit DMEM-komplett zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellzahl der Suspension wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. 10^6 Zellen wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß pelletiert und in 200 µl 1 % Triton X-100 oder 1 % SDS in PBS 20 min bei 37 °C unter mehrmaligem resuspendieren lysiert. Aufgrund der hohen Viskosität wurden die mit SDS erzeugten Lysate anschließend einige Sekunden mit einer Ultraschallsonde behandelt. Unlösliche Bestandteile wurden 5 min bei 1000 g und 25 °C abzentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt.

Zur Herstellung von Zelllysaten für den Nachweis intrazellulärer PAR wurden die Zellen auf konfluenten 6 cm Kulturschalen mit PBS gewaschen und direkt auf der Zellkulturschale durch Zugabe von 500 µl 1 % SDS in demineralisiertem Wasser mit *Complete protease inhibitor cocktail* lysiert. Nach 5 - 7 min auf einem Schüttler Das zähflüssige Zelllysate wurde mit einem Zellschaber in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 10 s mit einer Ultraschallsonde behandelt, um die DNA zu scheren. Anschließend wurde das Lysat 10 min bei 16000 g abzentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

4.5.6 Herstellung mono- und polyklonaler Antikörper

ARH-spezifische Antikörper wurden durch Immunisierung von Wistar-Ratten gewonnen. Die Tiere wurden mit einer Mischung aus pcDNA6- und pME- Expressionsplasmiden für mmARH1, mmARH3, hsARH1 und hsARH3 oder mit einer Mischung aus pcDNA6- und peGFP-N1-Expressionsplasmiden für mmARH2 DNA-immunisiert. Dazu wurden die Plasmide auf 1 μm Goldpartikel (Bio-Rad) gefällt (1 μg DNA/mg Gold) und mit einer Helios *gene gun* in die Haut der Versuchstiere geschossen. Nach 3 - 5 DNA-Immunisierungen wurde eine *boost*-Immunisierung mit 60 μg an Ni-NTA-Agarose immobilisiertem ARH1 bzw. ARH3 ΔL -Protein durchgeführt. Für die *boost*-Immunisierung mit mmARH2 wurde aus drei mit mmARH2-eGFP-Expressionsplasmid transfizierten T75-Flaschen CHO-Zellen das Fusionsprotein mit Anti-GFP-Antikörper immunpräzipitiert und an 150 μl Protein G Sepharose immobilisiert. 3 - 5 Tage nach der *boost*-Immunisierung wurden die Tiere getötet, entblutet und die Milzen wurden entnommen. Das Antiserum wurde gewonnen. Die Milzzellen wurden mit Polyethylenglykol mit Sp2/0-Zellen fusioniert. Nach 14 - 20 Tagen Selektion in HAT-Medium wurden überständige der Hybridomklone per Immunfluoreszenz an transfizierten Zellen getestet. Positive Klone wurden auf HT-Medium umgesetzt. Nach dem Ausschleichen von Hypoxanthin und Thymidin wurden die Hybridomazellen subkloniert, eingefroren und auf IgG-armes Medium umgesetzt. 500 ml Überstand wurde von ausgewählten Klonen geerntet. Spezifische monoklonale Antikörper wurden für mmARH1, mmARH3 und hsARH3 erhalten. Spezifische Antiseren wurden für mmARHs 1-3, hsARH1 und hsARH3 erhalten (Daten nicht gezeigt).

4.6 Immunocytochemie und Fluoreszenzmikroskopie

4.6.1 Kultivierung von Zellen

Adhärent wachsende Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in die Vertiefungen von 8 well μ -Slides (Ibidi) passagiert. Jeweils 250 μl einer Zellsuspension mit 10^5 Zellen pro ml wurden eingesetzt. Nach einem Tag hatten sich die Zellen auf dem Boden des Kulturgefäßes abgesetzt. In einigen Versuchen wurden die Zellen zu diesem Zeitpunkt mit jetPEI transfiziert. Der Boden der μ -Slides besteht aus Plastik in Deckglasdicke und erlaubt die Verwendung von Objektiven mit hoher numerischer Apertur. Zellen wurden entweder direkt mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert oder für immunocytochemische Anfärbungen fixiert und permeabilisiert.

4.6.2 Fixierung und Permeabilisierung von Zellen

Die Zellen auf den μ -Slides (Ibidi) wurden mit PBS gewaschen und für 30 min in 4 % Formaldehyd in PBS bei 4 °C fixiert. Es wurde nochmals mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung wurde 0,5 % Triton X-100 in PBS für 30 min bei Raumtemperatur eingesetzt.

4.6.3 Anfärbung von Mitochondrien

Mitochondrien wurden mit dem Farbstoff MitoTracker Red (reduzierte Form) von Molecular Probes angefärbt. Hierzu wurde ein frisches Aliquot des Farbstoffs in DMSO gelöst und die Konzentration des Farbstoffs wurde auf 1 mM eingestellt. Die Färbung erfolgte durch 750 nM MitoTracker Red in vorgewärmtem DMEM-komplett für 15 min bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und nicht gebundener Farbstoff wurde mit vorgewärmtem DMEM-komplett ohne Farbstoff 15 min bei 37 °C ausgewaschen.

4.6.4 Immunocytochemie

Nach der Permeabilisierung wurden die Zellen auf den μ -Slides (Ibidi) 1 h bei Raumtemperatur mit DMEM-komplett inkubiert um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Primärantikörper wurden in DMEM-komplett verdünnt und über Nacht bei 4 °C mit den Zellen inkubiert. Anschließend wurde einmal mit 0,1 % Triton X-100 in PBS und zweimal mit PBS gewaschen. Die Sekundärantikörper wurden in DMEM-komplett verdünnt, die Inkubation erfolgte für 1-3 h bei Raumtemperatur im Dunkeln. Alle eingesetzten Sekundärantikörper wurden in der Qualitätsstufe für minimale Kreuzreaktivität mit Immunglobulinen anderer Spezies bezogen. Anschließend wurde einmal mit 0,1 % Triton X-100 in PBS und fünfmal mit PBS gewaschen. Für Gegenfärbungen des Zellkerns wurde die dritte PBS-Waschung nach der Sekundärantikörper-Inkubation durch 10 μ g/ml Hoechst 33342 in PBS ersetzt und es wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde von den Zellen abgesaugt und die Zellen wurden mit ProLong Gold *Antifade* Reagenz (Molecular Probes) unter einem Deckglas eingebettet. Zur Aushärtung des Einbett-Mediums wurden die Zellen über Nacht bei 4 °C gelagert und anschließend am Mikroskop analysiert.

4.6.5 Fluoreszenzmikroskopie

Für mikroskopische Untersuchungen wurde ein inverses Mikroskop des Typs Axiovert 200M (Zeiss) benutzt. Das Mikroskop war mit den Objektiven Plan Apochromat 20x/0,8 NA, Plan Neofluar 40x/0,75 NA und Plan Apochromat 63x/1,25 NA (Ölimmersion) bestückt. Immersionsöl des Typs DF wurde von Cargille bezogen. Als Lichtquelle wurde die Quecksilberdampfampe HBO103 eingesetzt. Als Kamera wurde die CCD-Kamera AxioCam MRm benutzt. Die Bedienung des Mikroskops erfolgte mit der Software Axiovision (Zeiss). Optische Schnitte wurden mit dem Apotome-Schieber (Zeiss) erzeugt. z-Stapel wurden mit dem Apotome-Schieber und dem automatischen z-Vortrieb unter Verwendung des z-Stapel-Moduls der Axiovision Software aufgenommen.

4.7 Methoden der Protein-Biochemie

4.7.1 Quantifizierung von Proteinen

Der Proteingehalt von Zelllysaten wurde mit dem BCA-Protein Assay Reagent (Pierce) colorimetrisch im Vergleich zu einer parallel angesetzten BSA-Verdünnungsreihe bekannter Konzentration quantifiziert.

Für die photometrische Quantifizierung aufgereinigter Proteine bekannter Sequenz wurden Molekulargewichte und molare Extinktionskoeffizienten bei 280 nm ($\epsilon_{280\text{ nm}}$) mit Hilfe des Programms ProtParam (URL: www.expasy.ch/tools/protparam.html) berechnet: $\epsilon_{280\text{ nm}}(\text{hsARH1-His}_6) = 83310\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $M(\text{hsARH1-His}_6) = 40458\text{ g/mol}$; $\epsilon_{280\text{ nm}}(\text{mmARH1-His}_6) = 81820\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $M(\text{mmARH1-His}_6) = 41133\text{ g/mol}$; $\epsilon_{280\text{ nm}}(\text{hsARH3}\Delta\text{L-His}_6) = 26360\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $M(\text{hsARH3}\Delta\text{L-His}_6) = 38870\text{ g/mol}$; $\epsilon_{280\text{ nm}}(\text{mmARH3}\Delta\text{L-His}_6) = 26360\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $M(\text{mmARH3}\Delta\text{L-His}_6) = 38760\text{ g/mol}$. Proteinpräparationen wurden 1:10 bis 1:50 in PBS verdünnt und ein Absorptionsspektrum zwischen 220 und 320 nm wurde mit einem UV-Spektrometer aufgezeichnet. Anhand der Extinktion bei 280 nm wurde die Proteinkonzentration nach der Formel $c = \text{Extinktion}_{280\text{ nm}} / (\epsilon * 1\text{ cm})$ berechnet. Unter Verwendung der Molekulargewichte der ARH-Proteine wurden die Massenkonzentrationen nach folgender Formel berechnet: $\beta(\text{ARH}) = c(\text{ARH}) * M(\text{ARH})$.

4.7.2 SDS-PAGE

Für die Untersuchung von ARH-Proteinen wurden vorgegossene zehnpromtente BIS-TRIS-Gele (NuPage/Invitrogen) verwendet. Für die Untersuchung von intramitochondrialer PAR wurden vorgegossene 4 - 12 % BIS-TRIS-Gradientengele (NuPage/Invitrogen) verwendet. Die Proben wurden den empfohlenen Mengen LDS-Probenpuffer und Reduktionsmittel versetzt und 10 min bei 70 °C denaturiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation für 5 min bei 16000 g wurden die Überstände auf das Gel aufgetragen. Die Gele wurden wie vom Hersteller beschrieben vorbereitet, beladen und mit MOPS-Laufpuffer unter reduktiven Bedingungen bei einer Spannung von 200 V ca. 40 min der Elektrophorese unterzogen. Die Stromstärke betrug ca. 100 mA pro Gel.

4.7.3 Proteinfärbung in LDS-Polyacrylamid-Gelen

Für die Färbung von Proteinen nach der elektrophoretischen Auftrennung in der SDS-PAGE wurden die Färbereagenzien *Colloidal Blue Staining Kit* (Invitrogen) und SimplyBlue Safestain (Invitrogen) laut Herstellerangaben eingesetzt. Die Färbung mit SimplyBlue Safestain wurde mit Hilfe eines Mikrowellenofens durchgeführt.

4.7.4 Westernblot

Für Immunodetektionen und Membranfärbungen wurden die Proteine durch einen Elektrobplot orthogonal zur Auftrennungsrichtung der vorausgehenden SDS-PAGE auf eine proteinbindende Membran übertragen. Diese Methode bezeichnet man als Westernblot.

Nitrocellulosemembranen wurden für anschließende Silberfärbungen der Proteine verwendet. PVDF-Membranen kamen bei anschließender Immunodetektion zum Einsatz. Die PVDF-Membranen wurden vor dem Blot für 15 Sekunden in Methanol aktiviert. Die Blotapparatur wurde den Herstellerangaben entsprechend aufgebaut. Es wurde 90 Minuten lang auf die proteinbindende Membran geblottet. Der Blot erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 300 mA bei einer Spannung von ca. 30 V. Für PARsylierte Proteine erfolgte der Blot im Kühlraum bei 4 °C für 12 h bei einer Stromstärke von 150 mA. PVDF-Membranen wurden nach dem Blot mit Ponceau S Färbelösung (0,1 % Ponceau S in 3 % Trichloressigsäure) gefärbt, um den gleichmäßigen zu überprüfen. Anschließend wurde durch mehrmaliges Waschen mit TBS entfärbt.

4.7.5 Silberfärbung

80 µg Eisen(II)sulfat wurden in 9 ml Wasser gelöst und 500 µl vierzigprozentige Natriumcitratlösung wurden zugegeben. Dann wurden unter starkem Rühren tropfenweise 100 µl zwanzigprozentige Silbernitratlösung zugesetzt. Die Lösung wurde in einer Färbeschale über die Nitrozellulosemembran gegossen und unter Schwenken inkubiert, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Die Membran wurde mehrmals mit Wasser gewaschen und luftgetrocknet.

4.7.6 Immunodetektion

Nach dem Westernblot wurde die PVDF-Membran mit 5 % Milchpulver in TBS blockiert, um ein unspezifisches Binden des Antikörpers, der für den spezifischen Nachweis genutzt werden sollte, zu verhindern. Anschließend inkubierte man mit dem Protein- oder Markierungsspezifischen Antikörper in Antikörperpuffer und schloss nach mehrmaligem Waschen mit Waschpuffer eine Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper an. Für die Immunodetektion wurde das ECL (*enhanced chemoluminescence*)-Reagenz von Amersham Biosciences nach Herstellerangaben eingesetzt. Die eingesetzten Antikörper mit den verwendeten Konzentrationen und die Pufferzusammensetzungen sind in den Abschnitten 3.3.3 und 3.3.5 aufgeführt.

4.8 Enzymatische Untersuchungen

4.8.1 De-mono-ADP-Ribosylierung von Agmatin

1 mM Agmatin und 2 ng/µl ART2.2 (50 ng pro Ansatz) wurden in Agmatin-MARsylierungspuffer (PBS mit 2 mM MgCl₂ und 1 mM DTT) vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µM ³²P-NAD mit einer spezifischen Aktivität von 30 Ci/mmol (0,7 µCi pro Ansatz) gestartet. Nach 1 h bei 37 °C wurden Aliquote a 25 µl entnommen und ohne Zusatz oder mit 500 ng der verschiedenen ARH-Proteine 30 min bei 37 °C inkubiert. Parallel wurde 1 µM ³²P-NAD in Agmatin-MARsylierungspuffer mit 5 mU NADase aus *N. crassa* (Sigma-Aldrich, N9629) behandelt. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 5 µl StrataClean Matrix gefällt. Jeweils 0,5 µl des Überstands wurde auf eine Polyethylenimin-Cellulose Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen. Die Entwicklung des Chromatogramms erfolgte für 5 min in 1 M Essigsäure und anschließend für ca. 30 min in 0,3 M LiCl in 0,9 M Essigsäure. Nach dem Trocknen des Chromatogramms im Luftstrom

wurde eine Autoradiographie bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit BioMax MR Film in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie angefertigt.

4.8.2 Arginin-de-mono-ADP-Ribosylierung von M2-Antikörper

Die Mono-ADP-Ribosylierung von $5\text{ }\mu\text{g}$ M2-Antikörper wurde durch Inkubation mit 500 ng mmART2.2 und 200 nM ^{32}P -NAD (250 Ci/mmol $2,5\text{ }\mu\text{Ci}$ pro Ansatz) in $50\text{ }\mu\text{l}$ PBS durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde M2-Antikörper ohne Zusatz von mmART2.2 mit ^{32}P -NAD unter gleichen Bedingungen inkubiert. Nach 2 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden Aliquote à $10\text{ }\mu\text{l}$ entnommen und in vorbereitete Reaktionsgefäße überführt. Diese Gefäße enthielten $10\text{ }\mu\text{l}$ 50 mM MOPS-Puffer, $\text{pH } 7,5$ mit 10 mM DTT und 10 mM MgCl_2 ohne weiteren Zusatz bzw. mit 100 ng mmARH1 oder hARH3 ΔL . Nach 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden die Proteine durch Zugabe von $80\text{ }\mu\text{l}$ eiskaltem Aceton gefällt. Nach 1 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden die Proteine bei 16000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 20 min abzentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und die ausgefallenen Proteine wurden 5 min bei $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet. Anschließend wurden die Proben in LDS-Probenpuffer aufgenommen und 10 min bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ denaturiert. An eine SDS-PAGE mit einem 10% Gel mit MOPS-Puffer schloss sich ein *Westernblot* auf eine NC-Membran an. Die Proteine wurden durch eine Silberfärbung nachgewiesen. Ein Autoradiogramm der NC-Membran wurde angefertigt (BioMax MR Film, 75 min).

4.8.3 De-poly-ADP-Ribosylierung von PARP1

Pro Ansatz wurden $30 - 100\text{ }\mu\text{g/ml}$ PARP1 (oder PARP1-CD) in PARsylierungspuffer (PBS mit $2,5\text{ mM}$ DTT, $2,5\text{ mM}$ MgCl_2) und teilweise $60\text{ }\mu\text{g/ml}$ Fischspermien-DNA vorgelegt. Die PARsylierung wurde durch Zugabe von $1\text{ }\mu\text{M}$ ^{32}P -NAD (200 Ci/mmol ; $5\text{ }\mu\text{Ci/Ansatz}$) gestartet. Nach $15 - 40\text{ min}$ bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde nicht umgesetztes NAD durch Filtration über eine Micro Biospin6-Größenausschusschromatographiesäule entfernt. Aliquote des Filtrats ($0,25 - 1\text{ }\mu\text{g}$ PARP-Protein) wurden ohne Zusatz oder mit $0,2 - 1\text{ }\mu\text{g}$ ($10 - 67\text{ }\mu\text{g/ml}$) hsARH1 oder hsARH3 ΔL für 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in ARH-Reaktionspuffer (PBS mit 5 mM DTT und 10 mM MgCl_2) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von LDS-Probenpuffer gestoppt und sofort 10 min bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ denaturiert. Die Proben wurden einer Elektrophorese mit MOPS-Laufpuffer auf einem 10% PAG unterzogen. Anschließend wurden die Proteine in einem Zweirichtungsblot zunächst auf eine NC- (2 min) und anschließend auf eine PVDF-Membran (90 min) übertragen. Proteine auf der NC-Membran wurden mit einer Silberfärbung detektiert. Von der PVDF-Membran wurde eine Autoradiographie angefertigt (BioMax MR Film, 24 h). Alternativ wurde eine Coomassie-Färbung des Gels durchgeführt und nach Trocknen des Gels wurde eine Autoradiographie angefertigt (BioMax MR Film, 1 h).

4.8.4 Analyse der De-poly-ADP-Ribosylierung durch mutierte ARH3-Proteine

Pro Ansatz wurden 500 ng PARP1-CD (100 µg/ml) in PARsylierungspuffer und 400 ng (80 µg/ml) Fischspermien-DNA vorgelegt. Die PARsylierung wurde durch Zugabe von 1 µM ³²P-NAD (200 Ci/mmol; 5 µCi/Ansatz) gestartet. Nach 1 h bei 37 °C wurde nicht umgesetztes NAD durch parallele Filtration über mehrere Micro Biospin6-Größenausschusschromatographiesäulen entfernt.

5 µl Aliquote der vereinigten Filtrate (500 ng PARP-CD, 100 µg/ml) wurden in vorbereitete Reaktionsgefäße überführt. In diesen Reaktionsgefäßen wurden 10 µl Reaktionspuffer mit 100 µg/ml Lysozym vorgelegt. Die ARH-Proteine wurden auf 50 µg/ml in Reaktionspuffer mit 50 µg/ml Lysozym vorverdünnt. Eine serielle 1:3-Verdünnung über fünf Reaktionsgefäße wurde für jedes zu untersuchende Protein angefertigt. Dies führt zu Ansätzen mit 333 ng, 111 ng, 37 ng, 12,3 ng und 4,1 ng zu untersuchendes Protein in einer Lösung mit 100 µg/ml Gesamtproteingehalt.

Die Reaktionsansätze bestanden aus 500 ng PARP1-CD (33,3 µg/ml), 333 - 4,1 ng zu untersuchendes Protein (22,2 µg/ml - 0,27 µg/ml) und Lysozym ad 100 µg/ml Gesamtproteingehalt in PBS mit 5 mM DTT und 10 mM MgCl₂. Die Reaktionsansätze wurden 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend durch Zusatz von 2,86 x LDS-Probenpuffer gestoppt und sofort 10 min bei 70 °C denaturiert. Die Proben wurden einer Elektrophorese mit MOPS-Laufpuffer auf einem 10 % PAG unterzogen, pro Gel wurden zwei Proteine analysiert. Auf jedem Gel wurde darüber hinaus ein Ansatz als Negativkontrolle mitgeführt, dem nur Lysozym aber kein ARH-Protein zugesetzt wurde. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit dem *Coloidal Blue Staining Kit* gefärbt, getrocknet und für eine Autoradiographie benutzt (6 h mit BioMax MR Film).

Die Autoradiogramme wurden eingescannt und mit dem Computerprogramm Aida ausgewertet. Hierzu wurde das zu PAR korrespondierende Autoradiographie-Signal im Bereich zwischen 60 und 200 kd als Analysefläche markiert und anhand der Farbsättigung der Pixel quantifiziert.

5. Ergebnisse

Im Folgenden stelle ich die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen in drei Abschnitten dar. Der erste Teil behandelt die *in silico* Analysen der ARH-Genfamilie. Im zweiten Teil wird die rekombinante Expression und Aufreinigung von ARH-Proteinen sowie die 3D-Strukturaufklärung, enzymatische Charakterisierung und strukturgeleitete Mutagenese von hsARH3 gezeigt. Der dritte Teil umfasst Ergebnisse zur subzellulären Lokalisation von ARH-Proteinen und zur funktionellen Lokalisation von hsARH3 in Mitochondrien.

5.1 *In silico* Analysen der ARH-Genfamilie

5.1.1 ARH-Gene von Mensch und Maus

Im menschlichen Genom finden sich ebenso wie im Mausgenom drei ARH-Gene mit den offiziellen Gensymbolen *ADPRH*, *ADPRHL1* und *ADPRHL2*. Abb. 5.1 zeigt die chromosomale Lage der ARH Gene von Mensch und Maus. In der Tabelle sind darüber hinaus die Anzahl der Exons, die Länge der kodierten Proteine und benachbarte Gene angegeben. Die ARH-Gene von Mensch und Maus befinden sich auf verschiedenen Chromosomen, die Syntenie der jeweiligen Genomabschnitte ist jedoch gewahrt. Die Exon-Intron-Struktur der ARHs ist zwischen Mensch und Maus konserviert, bis auf ein zusätzliches Intron in der 5'-untranslatierten Region von hsARH1 (siehe Abschnitt 5.1.3 und Abb. 5.4).

Expressionsanalysen durch RT-PCR und *Northern Blot* (Kernstock 2003) decken sich mit der Repräsentation von ARH-kodierenden ESTs in den Datenbanken (*electronic northern*) und verfügbaren Microarrayuntersuchungen (GeneNote). MmARH1, hsARH3 und mmARH3 zeigen eine ubiquitäre Expression. HsARH1 ist nur in sehr geringen Mengen exprimiert. Die Expression von hsARH2 und mmARH2 beschränkt sich hauptsächlich auf Herz- und Skelettmuskel (Daten nicht gezeigt).

Abb. 5.2 zeigt ein Alignment der Aminosäuresequenzen von *H. sapiens* und *M. musculus* ARHs 1-3. Die Farbmarkierung zeigt an, ob die Positionen identisch (rot) oder ähnlich (blau) besetzt sind. Für die weiter entfernte ARH3 bezieht sich die Farbkodierung auf die gesamte ARH-Familie. Für ARH1 und ARH2 sind durch die Farbmarkierung die Gemeinsamkeiten zwischen diesen einander ähnlicheren Proteinen markiert. Exon-Intron-Grenzen wurden durch Hinterlegung der Intronposition in grün (Intronphase 0), gelb (Intronphase +1) oder magenta (Intronphase +2) hervorgehoben. Man erkennt die größere Ähnlichkeit zwischen ARH1 und ARH2 (44,8 % Sequenzidentität zwischen hsARH1 und hsARH2) verglichen mit ARH3 (ca. 17,9 bzw. 17,5 % Sequenzidentität zwischen hsARH1 bzw. hsARH2 und hsARH3) (siehe Abb. 6.5). Keine der Exon-Intron-Grenzen ist zwischen den paralogen ARH-Genen

ARH	Gensymbol	Hs Protein Zugriffs-Nr.	Mm Protein Zugriffs-Nr.	Chromosomale Lage		Anzahl Exons		Proteinlänge		Benachbarte Gene	
				Hs	Mm	Hs	Mm	Hs	Mm	5'	3'
1	<i>ADPRH</i>	NP_001116	NP_031440	3q13.31-33	16 B4	5	4	357	362	<i>CD80</i>	<i>PLA1A</i>
2	<i>ADPRHL1</i>	NP_612439	NP_766338	13q34	8 A1.1	7	7	354	353	<i>DCUNID2</i>	<i>GRTPI</i>
3	<i>ADPRHL2</i>	NP_060295	NP_598644	1p34.3	4 D2.2	6	6	363	373	<i>TEKT2</i>	<i>COL8A2</i>

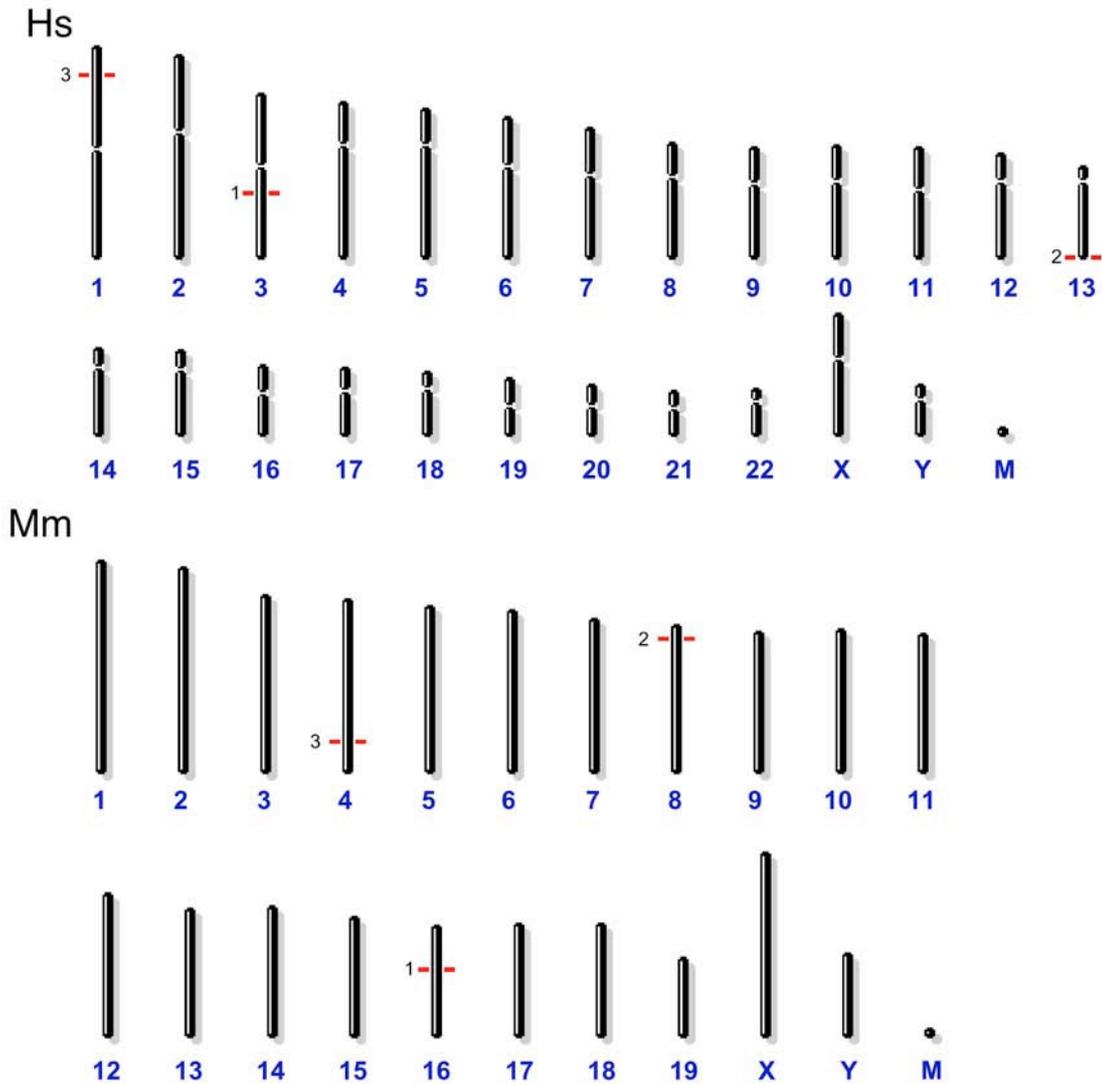


Abb. 5.1 Chromosomale Lage von ARH-Genen bei *H. sapiens* und *M. musculus*. Die Genorte wurden auf ein schematisches Karyogramm projiziert (rote Linien). Im oberen Teil der Abbildung sind Eigenschaften der ARH-Gene zusammengefasst.

```

hsARH1 -----MEKYVAAAMVLSAAGDALGYNGKWEFLQDGEKIHRQLA---QLGGLDA-
nmARH1 -----MGGGLIERVAAAMVLSAAGDTLGYFNGKWEFIRDGETIHQQLA---QMGDLEA-
hsARH2 -----MEKFKAAAMLIGSVGDALGYRNVCKENSTVGMKIQEELQ---RSGGLDHL
nmARH2 -----MEKFKAAAMLIGSVGDALGYGNICRENSVLG-SIQEELQ---KTGGLDSL
hsARH3 -----MAAAAMAAAAGGGAGAARSLSRFRGCLAGALLGDCVGSFYEAHDTVDLT-SVLRHVQSLPDPGTPGS
nmARH3 MAVAAAAAATAMSAAGGGGASAARSISRFRGCLAGALLGDCVGAUYEAHDTVSLA-SVLSHVESLEPDPGTPGS

hsARH1 -LDVGRWRVSDDTVMHLATAEALVEAGKAPKLTQLYLLAKHYQDCMEDMDGRAFGGASVHNAMQLKPKPNGW
nmARH1 -IDVARWRVSDDTVMHLATAEALMEAGQSPDLPRLYSLLAKHYRDCMGDMDGRAFGGACMQNAMLLQPNRADGY
hsARH2 VLSPGEWVSDNTIMHIAATAEALTTDYWC--LDDLYREMVRCYVEIVEKLPERRPDPATIEGCAQLKPNNYL--
nmARH2 VLSPGRWPVSDNTIMHMATAEALTTDYWC--LDDLYREMVKRYVETVETLSHRPDPSTIEGCSQLKPDNYL--
hsARH3 ERTEALY-TDDTAMARALVQSLL-AKEAFDEVDMAHRFAQYK---KDPDRGYGAGVTVFKKLLNPKCRDVF
nmARH3 ARTETLLY-TDDTAMTRALVQSLL-AKEAFDEVDMAHRFAQYK---KDPDRGYGAGVITVFKKLLNPKCRDVY

hsARH1 ---RIPFNSHEG-GCGAAMRAMCIGLRFPHHSQDLTLIQVSIESGRMTHHHPTGYLGALASALFTAYAVNSRPP
nmARH1 ---RIPFNSHEG-GCGAAMRAMCIGLRFPHPSQLDLLIQVSIESGRMTHHHPTGYLGLSLASALFTAYAVNGKSP
hsARH2 LAWHTPFNEKGS-GFGAATKAMCIGLRYWKPERLETLIEVSVECGRMTHNHPGFLGSLCTALFVSFAAQGKPL
nmARH2 LAWHTPFSEKGS-GFGAATKAMCIGMRYWKPERLETLIEVSIESGRMTHNHPGFLGSLCTALFASALQGKPL
hsARH3 EPARAQFNGKGSYNGGAMRVAGISLAYSSVDVQKFEARLSAQ---LTHASSLGYNGAILQALAVHLALQGE--
nmARH3 EPARAQFNGKGSYNGGAMRVAGISLAYSSVDVQKFEARLSAQ---LTHASSLGYNGAILQALAVHLALQGV--

hsARH1 LQWGKGLMELLPEAKKYIVQSGYFVEENLQHSYFQTKWENYLKLRGIL-DGESAPTFPESFGVKERDQFYTSL
nmARH1 WQWGKGLMEVLPPEAKKYITQSGYFVKENLQHSYFEKEWEKYLELRGIL-DGNSAPVFPQPFVKERDQFYIDV
hsARH2 VQWGRDMLRAVPLAEEYCRKTI RHTAEYQEHWFYFEAKWQFYLEERKISKDSENKAI FPDNYDAEEREKTYRKW
nmARH2 VQWGREMLKVLPLAEEYCRKTI RHMAYEYQEHWFYFEAKWQFYLEERKIREDAEDKVT FPDNYDAEERDRTYKRW
hsARH3 -----SSEHFLEQLLGHMEDLEGDAQSVLDARELGMEERPYSRLLKIGELLDQASVTREEV----V
nmARH3 -----SSEHFLEQLLGHMEELEGDAQSVLDARELGMEERPYSRLLKIGELLDQDVVSREEV----V

hsARH1 SYSGWGGSSGHDAPMIAY-----DAVLAAGDSWKELAHRAFFHGGSDSTAAIAGCWWGVMYGFKGVSPS
nmARH1 SYSGWGGSSGHDAPMIAY-----DALLAAGDSWKELAHRAFFHGGSDSTAAIAGCWWGVMYGFKGVNPA
hsARH2 SSEGRGRRGHADAPMIAY-----DALLAAGNSWTELCRAMFHGGESAAATGTIAGCLFGLLYGLDLVPGK
nmARH2 SSEGRGRRGHADAPMIAY-----DALLAGSNNWTELCRAMFHGGESAAATGTIAGCLFGLLHGLATVPRG
hsARH3 SELGNGIAAFESVPTAIYCFLRCMEPDPEIPSAFNLSLQRTLIIYSISLGGDTDTIATMAGAIAGAYYGMQVPEP
nmARH3 SELGNGIAAFESVPTAIYCFLRCMEPHPEIPSTFNLSLQRTLIIYSISLGGDTDTIATMAGAIAGAYYGMQVPEP

hsARH1 NYEKLEYRNRLEETARALYSLGSKEDTVISL
nmARH1 NYEKLEYRQRLEEAGRALYSLGSKEDPVLDP
hsARH2 LYQDLEDEKLEDLGAALYRLSTEEK-----
nmARH2 LYQELEHKGRLEDLGAALHRLSTEEK-----
hsARH3 WQSQCEGYEETDILAQSLHRVFQKS-----
nmARH3 WQSQCEGFEE TDVLAQSLHRVFQESS-----

```

Abb. 5.2 Alignment der Proteinsequenzen von ARH1-3 aus *H. sapiens* und *M. musculus*. Positionen, die in allen Proteinen identisch bzw. ähnlich besetzt sind, sind bei den ARH3-Proteinen rot bzw. blau eingefärbt. Darüber hinaus sind bei ARH1 und ARH2 die untereinander identischen bzw. ähnlichen Positionen rot bzw. blau gefärbt. Durch farbige Unterlegung wurden Position und Phase der Exon-Intron-Grenzen markiert. Grün zeigt Phase 0, gelb Phase +1 und magenta Phase +2. Das Alignment wurde mit dem Programm T-COFFEE (URL: www.ebi.ac.uk/t-coffee) erzeugt.

konserviert, jedoch sind sämtliche Exon-Intron-Grenzen zwischen den Orthologen aus Mensch und Maus konserviert. Weiterhin fällt eine N-terminale Verlängerung der ARH3 Proteine auf, die als mitochondriale Importsignalsequenz fungiert (siehe Abschnitt 5.3.1 und Abb. 5.28).

5.1.2 ARH-Gene in anderen Organismen

Um die Verbreitung von ARH-Genen in verschiedenen Organismen zu untersuchen, wurden die verfügbaren Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* (URL: www.ncbi.nlm.nih.gov) mit Hilfe der tBLASTn und PSI-BLAST-Algorithmen durchsucht. tBLASTn-Suchen mit der Sequenz von hsARH1 gegen alle verfügbaren komplett sequenzierten Genome zeigten eine weite Verbreitung von ARH-Genen bei Tieren, Pilzen, Archaeen, Eubakterien und einigen Viren, jedoch waren keine ARH-Gene in Pflanzen nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Üblicherweise verfügen Archaeen und Eubakterien über ein ARH-Gen, es gibt jedoch auch Organismen mit einer deutlich höheren Anzahl. Beispielsweise sind in den Genomen von *Streptomyces coelicolor* sieben und von *Streptomyces avermitilis* zehn verschiedene ARH-Gene nachweisbar. Eukaryoten verfügen meist über ein bis vier ARH-Gene. Tab. 5.1 zeigt einen *tiling path* der Ergebnisse einer PSI-BLAST-Suche gegen eukaryotische Sequenzen der nr-Proteindatenbank von *genbank*.

Als Sucheingabe wurden die Proteinsequenzen von hsARH3 und der katalytischen Domäne von hsPARG (Aminosäuren 577 - 912) eingesetzt. Da Suchen mit ARH-Sequenzen gegen die komplette nr-Datenbank in erster Iteration über 400 Treffer aus Prokaryoten verzeichnen, wurden die Analysen auf Eukaryoten beschränkt, um keine ARH3-spezifische Information zu verlieren. Parallel wurde eine Suche gegen die gesamte nr-Datenbank durchgeführt, die Ergebnisse sind in kursiv angegeben. Zielsequenzen in ausgewählten Vertebraten sind in rot, in anderen mehrzelligen Tieren in magenta gezeigt. Zielsequenzen in Pflanzen sind grün, in Pilzen braun, in ausgewählten einzelligen Eukaryoten blau und in Prokaryoten und Viren schwarz dargestellt. Einige Sequenzen, die im weiteren Verlauf identifiziert wurden (wie z.B. xtARH1 und xtARH2) fehlen, da sich die Übersetzungen dieser Nukleotidsequenzen nicht in der nr-Proteindatenbank finden. Die Abbildung wurde durch Auslassung der ARH-Proteine von *Bos taurus*, *Canis familiaris*, *Danio rerio*, *Pan troglodytes*, *Pongo pygmaeus*, *Rattus norvegicus*, *Xenopus laevis* und *Danio rerio* vereinfacht.

	<i>H. sapiens</i> ARH3	<i>H. sapiens</i> PARG katalytische Domäne
Iteration 1	hsARH 2 mmARH 3 ggARH 2, 3 xtARH 3 tnARH 3 spARH A, B agARH amARH sjARH 6 Pilz-ARHs crARH A (93 Treffer in 31 Organismen) (562 Treffer in 228 Organismen) 15 ARHs in Archaeen > 170 ARHs in Eubakterien 2 virale ARHs	mmPARG ggPARG tnPARG A, B, C dmPARG amPARG A, B spPARG A, B sjPARG cePARG A, B 3 Pilz-ARHs atPARG A, B, C osPARG A ddPARG tbPARG ehPARG A, B, C ttPARG A - J ptPARG A - K 2 bakterielle PARGs (?) 3 virale PARGs (225 Treffer in 54 Organismen)
Iteration 2	hsARH 1 mmARH 1, 2 ggARH 4 xtARH 4 tnARH 2, 4a, 4b 8 Pilz-ARHs, 4 Pilze mit 2 ARHs crARH B, C ehARH A ttARH A, B, C ddARH	osPARG B ttPARG K, L ptPARG L 10 virale PARGs
Iteration 3	ggARH1 tcJ1A, J1B ddARH B, C, D ttARH D, E, F crARH D, E	1 virale PARG
Iteration 4	tcJ1C ehARH B, C, D	Konvergiert
Iteration 5	Konvergiert (284 Treffer in 56 Organismen)	
...	<i>Suche gegen die gesamte nr-Datenbank konvergiert in Iteration 8</i>	
Zusammenfassung	(1037 Treffer in 314 Organismen) >300 ARHs in Eubakterien 19 ARHs in Archaeen keine ARHs in Pflanzen	(257 Treffer in 64 Organismen) 2 PARGs in Bakterien (?) keine PARGs in Archaeen

Tab. 5.1 Tiling path einer PSI-BLAST-Suche gegen die nr-Proteindatenbank von *genbank*. PSI-BLAST-Suchen wurden mit Vollängen hsARH3 und der katalytischen Domäne von hsPARG (AS 577-912) initiiert. Prokaryotische Sequenzen wurden für die Analyse mit ARH3 ausgeschlossen, da in erster Iteration über 400 bakterielle ARHs identifiziert wurden und hierdurch ARH3-spezifische Information verloren ging. Die Anzahl prokaryotischer Sequenzen, die in einer parallel durchgeführten Analyse mit der gesamten nr-Datenbank identifiziert wurden, sind kursiv gezeigt. Für PARG wurde die gesamte nr-Proteindatenbank genutzt. Treffer über einem Erwartungswert von $e < 0,005$ wurden für weitere Iterationen einbezogen. Ausgewählte **Vertebraten** sind in rot, **andere mehrzellige Tiere** in magenta, **Pilze** in braun, **Pflanzen** in grün, **Grünalgen** in blaugrün, ausgewählte **einzellige Eukaryoten** in blau und prokaryotische und virale Sequenzen in schwarz gezeigt. **Hs** = *H. sapiens*, **mm** = *M. musculus*, **gg** = *G. gallus*, **xt** = *X. tropicalis*, **tn** = *Tetraodon nigroviridis*, (bitte wenden)

ag = *Anopheles gambiae* (afrikanischer Malaria-Moskito), am = *Apis mellifera* (Honigbiene), dm = *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege), sp = *Strongylocentrotus purpuratus* (ein Seeigel), tc = *Tripedalia cystophora* (eine Würfelqualle) sj = *Schistosoma japonicum* (ein Plattwurm, Pärchenegel), ce = *Caenorhabditis elegans* (ein Fadenwurm), at = *Arabidopsis thaliana*, os = *Oryza sativa*, cr = *Chlamydomonas reinhardtii* (eine Grünalge), dd = *Dictyostelium discoideum* (ein Schleimpilz), eh = *Entamoeba histolytica*, tb = *Trypanosoma brucei*, tt = *Tetrahymena thermophila* (ein Wimpertierchen), *Paramecium tetraurelia* (ein Wimpertierchen)

Ausgehend von hsARH3 werden in erster Iteration die ARH3-Proteine anderer Organismen und erste ARH2-Proteine identifiziert. Die meisten ARH1-, ARH2- und ARH4-Proteine werden bereits in zweiter Iteration gefunden. Iteration 3 und 4 identifizieren u. a. die nur partiell hinterlegte ggARH1 und die *Tripedalia cystophora* Augenlinsen-Kristalline J1A, J1B und J1C, die zur ARH-Familie gehören, jedoch nicht enzymatisch aktiv sind. Bei Insekten und dem Plattwurm *S. japonicum* wurde jeweils eine ARH gefunden, beim Seeigel *S. purpuratus* sind zwei ARH-Proteine auffindbar. Die Suche konvergiert in der fünften Iteration. Analoge PSI-BLAST-Suchen wurden mit den anderen ARH-Proteinen von Mensch und Maus und mit rrDRAG, dem ARH-Homologen aus *Rhodospirillum rubrum*, initiiert und identifizierten in höheren Iterationen ebenfalls alle genannten ARH-Proteine (Daten nicht gezeigt). Ausgehend von ARH1 oder ARH2 werden in erster Iteration die anderen ARH1- und ARH2-Proteine identifiziert, die ARH3-Proteine werden überwiegend in der zweiten Iteration aufgespürt.

Mit der katalytischen Domäne von hsPARG wurden in erster Iteration PARG-Gene von Vertebraten und Invertebraten, Pilzen, Pflanzen und Protisten gefunden. Bereits in zweiter Iteration wurden neben zwei weiteren PARG-Genen auch virale PARGs identifiziert. Zwei bakterielle, als Tyrosyl-tRNA Synthetasen annotierte, Sequenzen wurden in *Desulfococcus oleovorans* und *Plesiocystis pacifica*, zwei Deltaproteobakterien gefunden (YP_001530599 und ZP_01908194). In den Sequenzen ist jeweils eine 46 Aminosäuren lange Region als Ähnlich zur katalytischen Domäne von PARG annotiert. Das Alignment deckt nicht den gesamten Bereich der hsPARG-CD ab. Die Erwartungswerte für die beiden Proteine sind mit $e = 10^{-25}$ bzw. 10^{-32} jedoch sehr niedrig, was für eine echte Ähnlichkeit der Proteine zu PARG spricht. PSI-BLAST Analysen mit den beiden bakteriellen Proteinen als Suchsequenz identifizierten bereits in erster Iteration eine erste Säugetier-PARG (von *M. domestica*), überraschenderweise waren jedoch, keine weiteren ähnlichen Sequenzen aus Prokaryoten auffindbar. Ob es sich bei diesen Proteinen tatsächlich um erste PARG-Gene bei Prokaryoten handeln könnte ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht geklärt. Die Suche konvergierte in der vierten Iteration ohne weitere putative PARG-Gene aus Bakterien oder Archaeen zu identifizieren. Säugetiere verfügen wie *G. gallus* nur über ein PARG-Gen, bei *Arabidopsis thaliana*, *Apis mellifera* oder *Caenorhabditis elegans*, *Entamoeba histolytica* und *Tetraodon nigroviridis* sind jedoch zwei bzw. drei unterschiedliche PARG-Proteine auffindbar. Die Ciliaten *Tetrahymena thermophila* und *Paramecium tetraurelia* verfügen sogar über zwölf unterschiedliche PARG-Proteine. *T. thermophila* verfügt auch über sechs verschiedene ARH-Proteine.

Es zeigt sich keine Überschneidung zwischen den PSI-BLAST-Suchen ausgehend von hsARH3 und der katalytischen Domäne von hsPARG, was als Hinweis darauf zu werten ist, dass keine an der Primärsequenz erkennbare Verwandtschaft zwischen ARH- und PARG-Proteinen besteht. Sekundärstrukturvorhersagen mit dem Programm PSIPred für ARH- und PARG-Proteine sagten für ARH3 34 % *coil*-Bereiche (122 von 363 Aminosäuren), 66 % α -helikale Bereiche (241 von 363 Aminosäuren) und keine β -Faltblattbereiche voraus. Im Gegensatz hierzu wurden für die katalytische Domäne von hsPARG 45 % *coil*-Bereiche (152 von 336 Aminosäuren), 32 % α -helikale Bereiche (109 von 336 Aminosäuren) und 22 % β -Faltblattbereiche (75 von 336 Aminosäuren) vorhergesagt. Weiterhin konnte ein Durchmusterung verfügbare dreidimensionaler Proteinstrukturen in der *protein database* mit Hilfe des Programms *Genthrader* mit hoher Signifikanz verwandte Strukturen für ARH-Proteine, jedoch nicht für die katalytische Domäne von PARG identifizieren. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse an, dass es sich anders als von Oka et al. postuliert (Oka et al. 2006) bei der ARH- und der PARG-Familie um zwei eigenständige Proteinfamilien handelt.

5.1.3 ARH-Familien in Vertebraten

Die Verbreitung von ARH-Genen bei Vertebraten wurde eingehender untersucht. Durch *datamining* in den verfügbaren Genomdatenbanken *genbank* und *Ensembl* konnten orthologe ARH-Gene in zahlreichen Vertebratengenomen identifiziert werden. In diesen Datenbanken wird im Rahmen der automatischen Annotation auf tBLASTn-Suchen bekannter Gene gegen die Genome anderer, noch nicht annotierter Organismen zurückgegriffen. Besonders für Genome, für die keine großen Projekte zur Klonierung und Sequenzierung von cDNA-Bibliotheken durchgeführt werden, ist dies neben der *ab initio* Vorhersage von Genen die einzig Erfolg versprechende Herangehensweise, um proteinkodierende Gene richtig zu identifizieren und zu annotieren. Ohne den experimentellen Beleg, dass die identifizierten Gene tatsächlich transkribiert und wie vorhergesagt gespleißt werden, müssen die Einträge in den Datenbanken jedoch als noch nicht gesichert gelten. Vervollständigt wurden diese Daten mittels eigener BLASTn- und tBLASTn-Suchen.

In Abb. 5.3 ist ein Auszug aus den Ergebnissen reziproker BLAST-Suchen in der *Ensembl*-Datenbank dargestellt. Links sind in Form eines Baums die Sequenzähnlichkeiten der verschiedenen deponierten ARH-Proteine graphisch dargestellt. Die Länge der Linien gibt dabei ein Maß für den Grad der Divergenz der beteiligten Sequenzen an. Blaue Knoten des Baums markieren die Lage von putativen gemeinsamen Vorläufern der analysierten Sequenzen. Rote Knoten markieren Duplikationsereignisse. Rechts ist in grün die graphische Repräsentation eines multiplen Sequenzalignments gezeigt. Grüne Bereiche markieren hier, welcher Bereich des jeweiligen Proteinprodukts zu den anderen ARH-Sequenzen homolog ist. Dadurch sind unvollständig hinterlegte Sequenzen oder trunkierte Gene erkennbar.

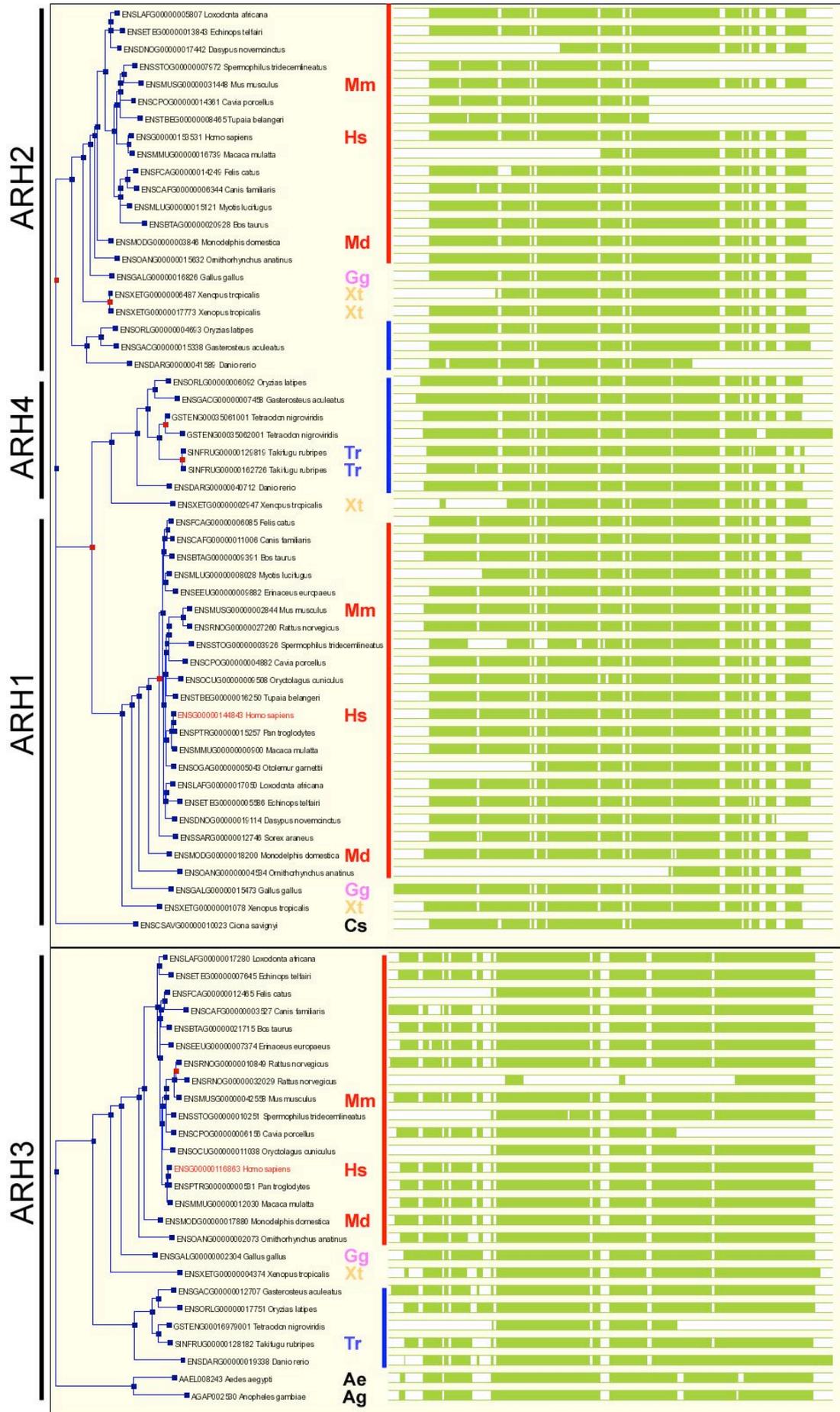


Abb. 5.3 Auszug aus Ergebnissen automatisierter reziproker tBLASTn-Analysen der Datenbank Ensembl. In der Datenbank sind zwei getrennte Dendrogramme für ARH3 (unten) und die anderen ARH-Proteine (oben) hinterlegt. Die Längen der Dendrogrammlinien geben die Divergenz der Proteine zueinander an. Zweibuchstabenkürzel und senkrechte Striche zeigen an, zu welcher Spezies bzw. zu welcher Klasse die Sequenzen gehören. Rot = Säugetiere, Gg = *G. Gallus*, Xt = *X. tropicalis*, blau = Fische, schwarz = Invertebraten (Ae = *Aedes aegypti*, Ag = *A. gambiae*, Cs = *C. savignyi* (eine Seescheide)). In Grün eine graphische Repräsentation eines multiplen Sequenzalignments gezeigt. Grüne Boxen zeigen zueinander passende Bereiche, weiße Boxen zeigen Alignmentlücken. In der Datenbank ist die ARH4-Familie als Untergruppe der ARH1 hinterlegt. Die Daten wurden der Ensembl-Datenbank entnommen.

Analysen der dargestellten ARH-Gene zeigten, dass in Vertebraten vier verschiedene ARH-Paraloge nachweisbar sind. Während Säugetiere über ARHs1-3 verfügen (rot), sind bei Fischen nur die ARHs 2-4 konserviert (blau). *Gallus gallus* (magenta) und *Xenopus tropicalis* (orange) verfügen hingegen über alle vier ARH-Paraloge. Die fehlende ggARH4 wurde *in silico* kloniert (siehe unten). Darüber hinaus sind Duplikationen der Gene xtARH2, tnARH4 und trARH4 aufgetreten. Die duplizierten ARH4-Gene befinden sich bei *T. nigroviridis* in gleicher Orientierung direkt nebeneinander und sind nur durch 1154 bp voneinander getrennt. Bei xtARH2 und trARH4 liegen die beiden duplizierten Genorte auf unterschiedlichen *contigs*, jedoch unterscheiden sich die Intronlängen der beiden Proteine voneinander, was gegen eine fälschliche doppelte Deponierung der gleichen Sequenz spricht. Die kodierten tnARH4 bzw. trARH4 Proteine sind zu 95 % bzw. 98 % identisch. Die ersten Exons von xtARH2b fallen in eine Sequenzlücke, der C-terminale Teil (287 Aminosäuren) der beiden ARH2-Proteine ist jedoch zu 99 % identisch (siehe Anhang 8.2). In *Rattus norvegicus* scheint eine Duplikation eines ARH3-Fragments aufgetreten zu sein, an der jedoch nur der C-terminale Teil der proteinkodierenden Sequenz beteiligt ist. Nahe am Ursprung des Baums für die ARHs 1, 2 und 4 werden zwei Duplikationsereignisse postuliert, die zu einer Aufspaltung einerseits in ARH2 und andererseits in ARH1 und ARH4 führen. Aufgrund der geringen Verlässlichkeit der putativen Duplikation zu ARH1 und ARH4 (*confidence score* 0,03 von 1) erscheint es jedoch sinnvoller, keine Reihenfolge der Duplikationsereignisse vorzuschlagen.

Manche der in den Datenbanken hinterlegten Sequenzen weisen offensichtliche Fehler auf, die durch manuelle Überprüfung der ARH-Gensequenzen der Organismen *G. gallus*, *X. tropicalis* und *T. rubripes*, soweit möglich, korrigiert wurden. In Anhang 8.1 sind die verwendeten ARH-Sequenzen angegeben. Für ggARH2, hsARH1-3, mdARH1-2, mmARH1-3 und xtARH1, 2a, 3 konnte auf die unter den angegebenen Zugriffscodes hinterlegten Sequenzen zurückgegriffen werden. Für trARH2, trARH3, trARH4 und trARH4b wurden C-terminale Aminosäuren bis zum Stoppcodon ergänzt. Für trARH3, ggARH1 und mdARH3 wurden überzählige N-terminale Aminosäuren bis zum putativen Startcodon gekürzt. Für trARH2, trARH4a und trARH4b wurden 3'-gelegene Spleißstellen korrigiert und das korrekte Leseraster wieder hergestellt. Bei ggARH3 findet sich eine Sequenzlücke in Intron 4-5, die jedoch beidseitig von den gleichen Sequenzen umgeben ist. Dies führt in der Datenbank zur irrtümlichen Insertion eines zusätzlichen Introns, das entfernt wurde. Bei trARH4a wurde unter Verwendung von EST-Daten ein 5'-gelegenes Exon ergänzt, das die ersten zwei Aminosäuren des Proteins kodiert. Aufwändig gestaltete sich die Gewinnung der

Gensequenzen von ggARH4 und xtARH4. Für xtARH4 sind nur sechs proteinkodierende Exons auffindbar, der 5'-gelegene Teil des Gens liegt jedoch in einer Sequenzlücke. Über sequenzierte cDNAs aus *X. tropicalis* ist die Ergänzung des fehlenden Teils der proteinkodierenden Sequenz möglich, jedoch konnten keine Informationen über die Position der Exon-Intron-Grenzen in diesem Bereich erhalten werden. BLASTn-Suchen ergaben, dass der ergänzte Bereich nicht in der verfügbaren *X. tropicalis* Genomsequenz (*release 4.1*, Ensembl Version 47) enthalten ist. Das putative ggARH4-Gen findet sich auf drei kurzen, nicht miteinander verknüpften *contig*-Segmenten, die noch nicht auf Chromosomen kartiert wurden (*contigs* 958.4, 1593.3 und 197.10). Die entsprechenden Abschnitte wurden durch tBLASTn-Suchen mit korrespondierenden Sequenzen aus *T. rubripes*, *X. tropicalis*, *X. laevis* und *T. nigroviridis* identifiziert und *in silico* kloniert. Ein Beleg für die räumliche Nähe der gefundenen *contig*-Segmente zueinander liegt in der aktuell verfügbaren *G. gallus* Genomsequenz (*release 2.1*, Ensembl Version 47) allerdings nicht vor.

Abb. 5.4 zeigt die Exon-Intron-Organisation von ARH-Genen aus *H. sapiens*, *M. musculus*, *M. domestica*, *G. gallus*, *X. tropicalis* und *T. rubripes*. Exons sind maßstabsgerecht als Rechtecke dargestellt. Farbige Bereiche markieren den proteinkodierenden Bereich einschließlich des Stoppcodons, ihre Länge ist über den Exons angegeben. Nicht ausgefüllt sind 5'- und 3'-gelegene untranslatierte Bereiche der mRNA, ihre Länge ist unter dem jeweiligen Bereich angegeben. Introns sind durch zusammenführende Linien markiert und nicht maßstabsgerecht dargestellt, jedoch sind auch ihre Längen angegeben. Zahlen zwischen proteinkodierenden Exons zeigen die jeweilige Phase der Exon-Intron-Grenze an. Zueinander korrespondierende Exons wurden mit gleichen Farben ausgefüllt.

Klar erkennbar ist die vollständige Konservierung der jeweiligen Position und Phase aller Exon-Intron-Grenzen zwischen den orthologen ARH1-, ARH2- und ARH3-Genen. Weiterhin sind für ARH1 und ARH2 die Längen aller internen Exons konserviert. Gleiches gilt eingeschränkt auch für ARH3, es zeigt sich jedoch bei xtARH3 eine Verkürzung von Exon 2 um drei Nukleotide und bei trARH3 ist Exon 4 um drei Nukleotide verlängert. Möglicherweise müssen für xtARH3 und trARH3 weitere N-terminale Aminosäuren ergänzt werden, da das angenommene Startcodon in beiden Fällen zu einem im Vergleich zu den orthologen ARH3 verkürzten Protein führt (siehe Anhang 8.2.3) 5' des angegebenen Startcodons wurden jedoch keine weiteren Startcodons vor dem nächsten Stoppcodon im Leseraster gefunden. xtARH3 verfügt über eine putative Spleißakzeptorstelle 15 Nukleotide vor dem angegebenen Startcodon. Diese Nukleotide kodieren für Aminosäuren, die den anderen ARH3-Sequenzen in diesem Bereich ähnlich sind (siehe Anhang 8.2.3). Möglicherweise verfügt xtARH3 daher über ein weiteres 5'-gelegenes Exon.

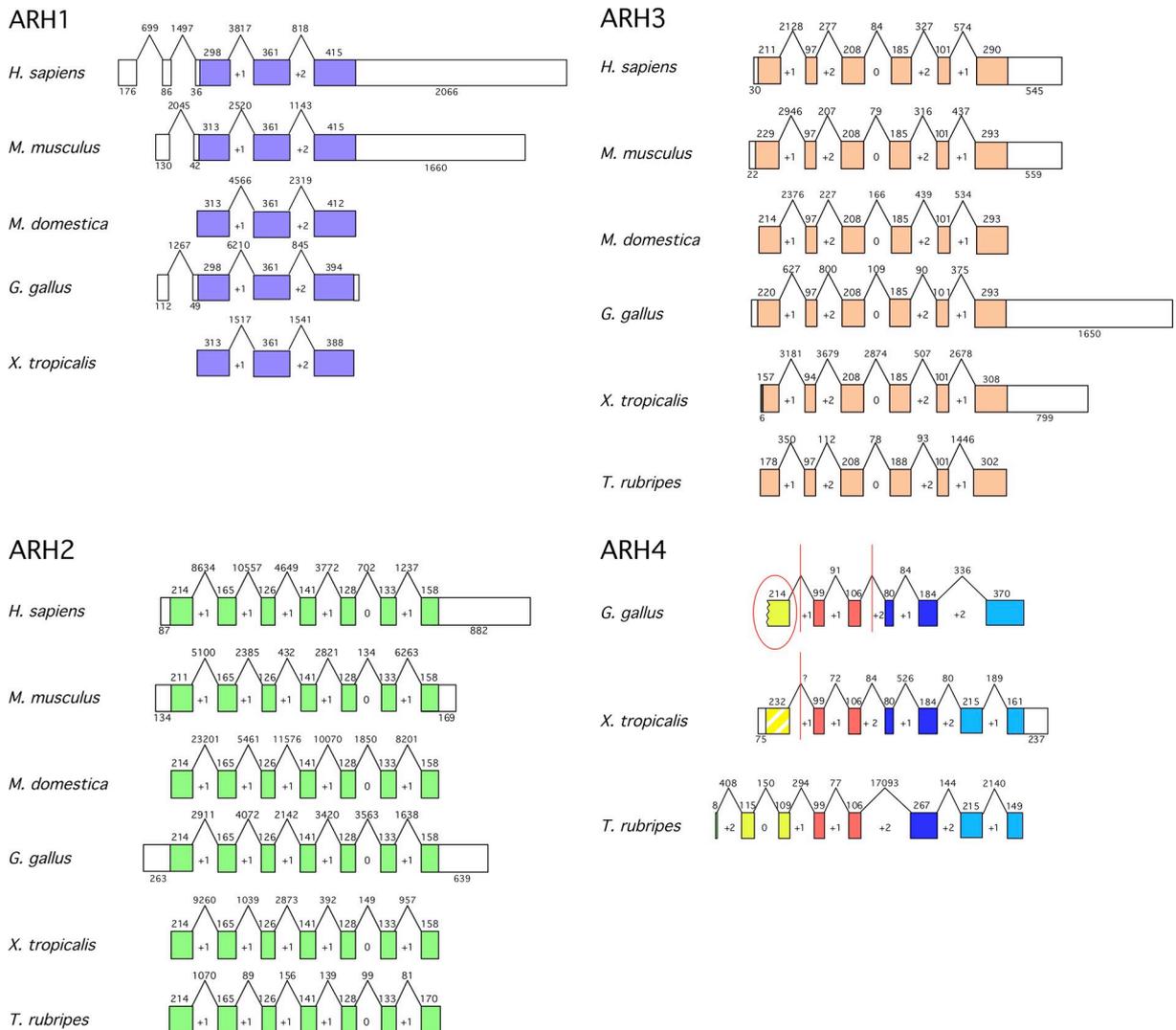


Abb. 5.4 Exon-Intron-Organisation von ARH-Genen. Exons sind als maßstabsgerechte Rechtecke gezeigt. Farbige Bereiche markieren den proteinkodierenden Bereich inklusive Stoppocodon. Die Länge in Nucleotiden ist über den Rechtecken angegeben. Nicht gefüllte Bereiche zeigen untranslatierte Regionen und sind unterhalb beschriftet. Introns sind über den Exonlücken durch zusammenführende Linien markiert und ihre Länge in Nucleotiden ist angegeben. Zahlen zwischen den Exons zeigen die Phase der Exon-Intron-Grenze. Für alle gezeigten Gene außer *G. gallus* ARH4 ist die proteinkodierende Sequenz einschließlich des putativen Startcodons gezeigt. Bei *G. gallus* ARH4 konnte das Startcodon nicht identifiziert werden (rot eingekreist). Die Exon-Intron-Organisation ist für ARHs 1-3 konserviert. Bei ARH4 treten drei Introns auf, die nicht in allen Organismen konserviert sind, daher sind Exons, die gleiche Proteinbereiche kodieren, in gleicher Farbe markiert. Rote Linien zeigen *contig*-Grenzen an, daher konnte die Länge der betroffenen Introns nicht ermittelt werden. Der 5'-gelegene Teil der *X. tropicalis* ARH4 (gelb gestreift) wurde aus einer cDNA ergänzt, daher sind keine Informationen über mögliche Exon-Intron-Grenzen in diesem Bereich verfügbar.

Für ARH4 ist eine weitgehende Konservierung der Transkriptstruktur erkennbar. Zwei interne Exons sind in Position, Phase und Länge vollständig konserviert (rot). Auch die Exon-Intron-Grenze nach *T. rubripes* Exon 6 ist konserviert. Hingegen treten drei Intronpositionen auf, die nicht konserviert sind. *T. rubripes* Exon 6 (violett) wird bei *G. gallus* und *X. tropicalis* von einem zusätzlichen Intron geteilt. Ebenso wird das letzte proteinkodierende Exon von *G. gallus* (blau) in *X. tropicalis* und *T. rubripes* von einem zusätzlichen Intron geteilt. Das Intron, das in trARH4 die Exons 2 und 3 trennt, fehlt bei *G. gallus* (gelb). Für xtARH4 wurde

der 5'-gelegene Teil der cDNA (gelb gestreift) aus einer klonierten cDNA ergänzt und erlaubt daher keinen Aufschluss über Exon-Intron-Grenzen. Das erste verzeichnete Exon von *G. gallus* enthält kein Start-ATG, es ist denkbar, dass dieses wie bei *T. rubripes* in einem weiteren Exon kodiert wird. Wegen der Kürze des proteinkodierenden Bereichs in Exon 1 von trARH4 konnte ein entsprechender Bereich im *G. gallus* Genom jedoch nicht identifiziert werden.

Im Alignment (Abb. 5.5) der drei humanen ARH-Gene mit ggARH4, xtARH4 und trARH4 erkennt man, dass keine der Exon-Intron-Grenzen zwischen den paralogen ARH-Genen konserviert ist. Drei Exon-Intron-Grenzen zwischen hsARH2 und den ARH4-Genen besitzen jeweils die gleiche Phase und sind um nur eine Aminosäure verschoben, jedoch handelt es sich um konservierte Sequenzbereiche, so dass eine Ungenauigkeit des Alignments in diesen Bereichen unwahrscheinlich erscheint. Weiterhin sind zwei der drei Introns nicht bei allen ARH4-Genen vorhanden. Aufgrund der Transkriptstrukturen und der fehlenden Konservierung von Exon-Intron-Grenzen ist eine Einteilung der ARH-Gene in die Gruppen ARH1, ARH2, ARH3 und ARH4 möglich. Während Säugetiere nur über die ARHs 1-3 verfügen, sind bei Fischen die ARHs 2-4 vertreten. *G. gallus* und *X. tropicalis* verfügen über alle vier ARH-Paraloge. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der reziproken BLAST-Suchen (Abb. 5.3).

Abb. 5.6 zeigt die Sequenzidentität der untersuchten ARH-Proteine zueinander. Die angegebene Sequenzidentität bezeichnet identische Positionen bezogen auf die Alignmentlänge einschließlich von Lücken der längeren Sequenz. N- und C-terminale Elongationen eines Proteins wurden jedoch bei der Ermittlung der Alignmentlänge vernachlässigt. Sequenzalignments der orthologen ARH-Genprodukte sind in Anhang 8.2 aufgeführt.

		ARH1					ARH2					ARH4				ARH3								
		hs	mm	md	gg	xt	hs	mm	md	gg	xt	tr	gg	xt	tr	hs	mm	md	gg	xt	tr	ag	hs	ag
ARH1	hs		82,1	77	65,8	66,1	44,8	44,3	45,1	43,1	46,8	45,4	48,2	52,7	54,3	17,9	17,1	19,9	16,5	16	16,8	18,8	hs	
	mm	82,1		74,3	63,5	66,3	42,8	42,5	43,1	43,6	45,9	43,6	46,1	51,4	51,4	16,3	15,5	17,7	15,5	16,6	15,7	16,3	mm	
	md	77	74,3		63	62,7	42,5	42,5	43,1	40,3	42,3	42,5	47	50	53,9	18,5	18,2	19,9	17,1	17,1	16	18,2	md	
	gg	65,8	63,5	63		64,3	44,6	44,6	44,3	42,6	44,9	44,9	47,4	53,4	51,7	20,9	20,3	21,1	18,6	16,9	16,9	19,1	gg	
	xt	66,1	66,3	62,7	64,3		44,8	43,9	45	44,5	46,5	43,9	44,8	51	51,8	17	16,7	18,4	15,3	16,7	15,9	19,5	xt	
ARH2	hs	44,8	42,8	42,5	44,6	44,8	84,7	83,6	77,4	74,9	70,1	41,8	47,2	45,5	17,5	17,8	18,1	15,8	17,2	14,4	16,9	hs		
	mm	44,3	42,5	42,5	44,6	43,9	84,7	83,3	77,1	74,5	70,3	42,2	46,2	45,3	16,7	17,3	17,6	15,6	19,3	14,2	16,1	mm		
	md	45,1	43,1	43,1	44,3	45	83,6	83,3		83,1	79,7	70,9	41	45,5	45,8	16,7	18,1	18,4	16,4	17,5	15,3	17,8	md	
	gg	43,1	43,6	40,3	42,6	44,5	77,4	77,1	83,1		80,2	71,5	40,7	45,5	46	16,7	16,9	18,4	15,3	16,9	15,5	16,1	gg	
	xt	46,8	45,9	42,3	44,9	46,5	74,9	74,5	79,7	80,2		70,3	39,8	44,6	45,8	16,4	17,5	18,6	14,7	17,8	14,4	17,5	xt	
ARH4	tr	45,4	43,6	42,5	44,9	43,9	70,1	70,3	70,9	71,5	70,3		41,6	46,1	44,7	15,1	15,6	16,8	14,8	15,9	14,8	16,8	tr	
	gg	48,2	46,1	47	47,4	44,8	41,8	42,2	41	40,7	39,8	41,6		60,7	54,2	18,3	17,2	18,9	19,5	19,5	18,1	19,8	gg	
	xt	52,7	51,4	50	53,4	51	47,2	46,2	45,5	45,5	44,6	46,1	60,7		60,2	17,3	17,5	18,7	17	15,3	17,5	17,8	xt	
	tr	54,3	51,4	53,9	51,7	51,8	45,5	45,3	45,8	46	45,8	44,7	54,2	60,2		17,7	16,6	18	15,5	16,3	17,5	16,6	tr	
	hs	17,9	16,3	18,5	20,9	17	17,5	16,7	16,7	16,7	16,4	15,1	18,3	17,3	17,7	91,5	91,5	82,1	66,7	53,4	52,9	35,8	hs	
ARH3	mm	17,1	15,5	18,2	20,3	16,7	17,8	17,3	18,1	16,9	17,5	15,6	17,2	17,5	16,6	82,1	80,3		67,9	55,2	51,4	36	mm	
	md	19,9	17,7	19,9	21,1	18,4	18,1	17,6	18,4	18,4	18,6	16,8	18,9	18,7	18	66,7	64,9	67,9		52,6	50,4	36,2	md	
	gg	16,5	15,5	17,1	18,6	15,3	15,8	15,6	16,4	15,3	14,7	14,8	19,5	17	15,5	53,4	51,4	55,2	52,6		48,3	34,3	gg	
	xt	16	16,6	17,1	16,9	16,7	17,2	19,3	17,5	16,9	17,8	15,9	19,5	15,3	16,3	52,9	51,9	51,4	50,4	48,3		33,9	xt	
	tr	16,8	15,7	16	16,9	15,9	14,4	14,2	15,3	15,5	14,4	14,8	18,1	17,5	17,5	35,8	35,9	36	36,2	34,3	33,9		tr	
ag	18,8	16,3	18,2	19,1	19,5	16,9	16,1	17,8	16,1	17,5	16,8	19,8	17,8	16,6								ag		

Abb. 5.6 Sequenzidentität verschiedener ARH-Proteine zueinander. Sequenzalignments wurden mit ClustalW berechnet. Gelb unterlegt sind die Identitäten der orthologen Proteine. Blassgelb unterlegt sind die Identitäten der einander ähnlicheren Paralogen. Hs = *H. sapiens*, mm = *M. musculus*, md = *Monodelphis domestica* (ein Opossum), gg = *G. gallus*, xt = *X. tropicalis*, tr = *T. rubripes*, ag = *Anopheles gambiae* (afrikanischer Malariamoskito).

Während die ARH1-, ARH2- und ARH4-Paralogen zueinander jeweils ca. 45 % Sequenzidentität zeigen (hellgelb unterlegt), beträgt die Sequenzidentität zwischen ARH3 und den anderen ARHs jeweils nur ca. 17 % (weiß). Die orthologen Proteine zeigen untereinander jeweils eine Sequenzidentität von 48,3 bis 91,5 % (gelb unterlegt). Die Konservierung der orthologen Sequenzen zwischen Säugetieren und Fischen ist bei ARH2 am größten. Anhand der Transkriptstruktur gelingt auch die Zuordnung von ARH-Genen zu den ARH1-, ARH2- oder ARH4-Gruppen, während dies allein aufgrund der Sequenzidentität nicht möglich wäre. Das als Einzelkopie auftretende ARH-Gen aus *Anopheles gambiae* kodiert für ein Protein, das eine deutlich größere Sequenzidentität mit der ARH3-Gruppe als mit anderen ARH-Proteinen aufweist.

5.2 Rekombinante Expression und Charakterisierung von ARH-Proteinen

5.2.1 Rekombinante Expression und Aufreinigung

Es wurden drei Plasmid-Serien für die Expression von Mensch- und Maus-ARHs erzeugt. Die pET28a-preScission- und die pETM11-Serie kodiert für ARH-Proteine mit einer N-terminalen Hexahistidin-Markierung, die durch eine dazwischen liegende Proteaseschnittstelle entfernt werden kann. Das Abschneiden der Hexahistidin-Markierung führte allerdings wiederholt zum Ausfallen des rekombinanten Proteins, so dass eine dritte pET26b-Plasmidserie erzeugt wurde. Durch die gewählte Klonierungsstrategie wurde die im Vektor enthaltene pelB-Signalsequenz deletiert und die cDNA für die ARH-Proteine eingefügt. Es wurden rekombinante Proteine mit C-terminaler Hexahistidin-Markierung cytosolisch exprimiert. Die putative N-terminale Signalsequenz von ARH3 wurde für diese Klonierung deletiert. Ein Startcodon wurde eingefügt, so dass das exprimierte Protein hsARH3 Δ L (Δ 2-17) bzw. mmARH3 Δ L (Δ 2-23) entspricht. Für alle im Folgenden beschriebenen Expressionen in *E. coli* wurden die pET26b-Vektoren eingesetzt.

Für eine Testexpression wurden Expressionsplasmide der pET26b-Serie, die für hsARH1, hsARH2 oder hsARH3 Δ L kodieren, in die *E. coli* Expressionsstämme BL21 (DE3) bzw. BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene) transformiert. 12 ml LB-Medium mit 100 μ g/ml Kanamycin wurde mit einer Einzelkolonie inokuliert. Nach dem Wachsen der Kultur und erfolgter Induktion wurde ein Zellextrakt mit 600 μ l BugBuster Proteinextraktionsreagenz hergestellt (siehe Methoden 4.4.3) und durch Zentrifugation geklärt. Das Präzipitat wurde gewaschen und nach erneuter Zentrifugation wurde das gewaschene Präzipitat, das die Einschlusskörper aus ausgefallenem überexprimiertem Protein enthält, in 6 M Guanidiniumchlorid gelöst. Aliquote des geklärten Zellysats und der solubilisierten Proteine wurden per SDS-PAGE analysiert (siehe Abb. 5.7).

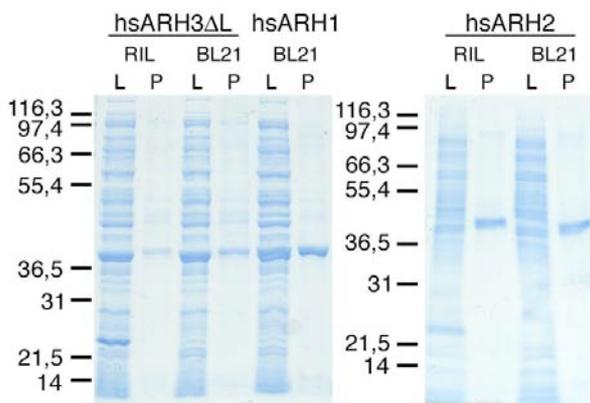


Abb. 5.7 Test der Löslichkeit überexprimierter ARH-Proteine. 2 μ l Zellysate (L, 1/250 des Gesamtvolumens) und 0,2 μ l gewaschene ausgefallene Proteine (P, 1/1250 des Gesamtvolumens) wurden nebeneinander aufgetragen. Rekombinantes ARH-Protein ist als Bande bei ca. 39 kd erkennbar. Während hsARH3 Δ L überwiegend und hsARH1 zu einem Teil im Zellysate vorliegt, ist hsARH2 nur in der Fraktion der ausgefallenen Proteine aufzufinden. RIL = BL21 CondonPlus (DE3)-RIL, BL21 = BL21 (DE3).

Dabei wurde eine fünfmal größere Menge des geklärten Zellysaten aufgetragen. Die Identifikation der rekombinanten ARH-Proteine erfolgte über deren charakteristische Größe von knapp 40 kd. Deutlich erkennbar ist, dass hsARH3 Δ L zum überwiegenden Teil in der

löslichen Fraktion vorzufinden ist. HsARH1 verteilt sich zwischen löslicher und unlöslicher Fraktion, jedoch liegt ein ausreichend großer Anteil des Proteins löslich vor. HsARH2 ist nur in der unlöslichen Fraktion erkennbar. Die Verwendung des CodonPlus-Bakterienstammes scheint weder für hsARH2 noch für hsARH3ΔL eine Steigerung der Expression oder der Löslichkeit zu bewirken. Daher wurde im Weiteren BL21 (DE3) bzw. das leichter transformierbare Derivat BL21-Gold (DE3) als Expressionsstamm benutzt. Weitere Optimierungen der Expressionsbedingungen führten zu dem Ergebnis, dass eine niedrigere Wachstumstemperatur (21 bzw. 24 °C) sowie eine Erhöhung der NaCl-Konzentration des Lysepuffers auf 500 mM einen positiven Effekt auf die Ausbeute an löslichem ARH1 bzw. ARH3ΔL Protein bewirkt, jedoch war auch hier kein lösliches ARH2-Protein detektierbar (Daten nicht gezeigt).

Für enzymatische Assays wurden Proteine frisch aus Minikulturen präpariert. Dazu wurde das Autoinduktionsmedium Zym5052 (Studier 2005) verwendet. In einer anfänglichen Wachstumsphase dient Glukose und Glycerol als Energie- und Kohlenstoffquelle. Durch die Anwesenheit von Glukose wird das *lac*-Operon reprimiert. Erst beim Erreichen hoher Zelldichten wird die verfügbare Glukose vollständig metabolisiert und die im Medium vorhandene Laktose wird in den Induktor Allolaktose umgewandelt. Die Induktion erfolgt beim Erreichen hoher Zelldichten nach Übernacht-Inkubation in kleinen Volumina zuverlässig (Daten nicht gezeigt). Variationen im Inokulum oder der Wachstumsgeschwindigkeit verschiedener Kulturen müssen daher nicht ausgeglichen werden. Aus 20 ml Kultur wurden ca. 600 mg Bakterienfeuchtgewicht gewonnen und mit 3 ml BugBuster Proteinextraktionsreagenz lysiert (siehe Abschnitt 4.4.4). Die Lysate wurde durch Zentrifugation geklärt und der Überstand wurde auf äquilibrierte Protino-1000 TED-Säule gegeben. Das Waschen und Eluieren erfolgte mit 50 mM Phosphatpuffer pH 8,0 mit 500 mM NaCl, wobei der Waschpuffer kein Imidazol enthielt, der Elutionspuffer hingegen 250 mM Imidazol. Abb. 5.8 zeigt ein repräsentatives Ergebnis einer Proteinaufreinigung der sechs ARH-Proteine von Mensch und Maus.

Unter Verwendung dieses Expressionssystems gelang die Präparation von hsARH1, mmARH1, hsARH3ΔL und mmARH3ΔL in löslicher Form mit zufrieden stellenden Ausbeuten. ARH2 war unter diesen Bedingungen unlöslich. ARH3 bindet nicht vollständig an die Protino TED-Matrix. Dennoch wurde die Protino TED-Matrix eingesetzt, da mit dieser Matrix hohe Reinheiten in einer einschrittigen Aufreinigung erzielt werden konnten.

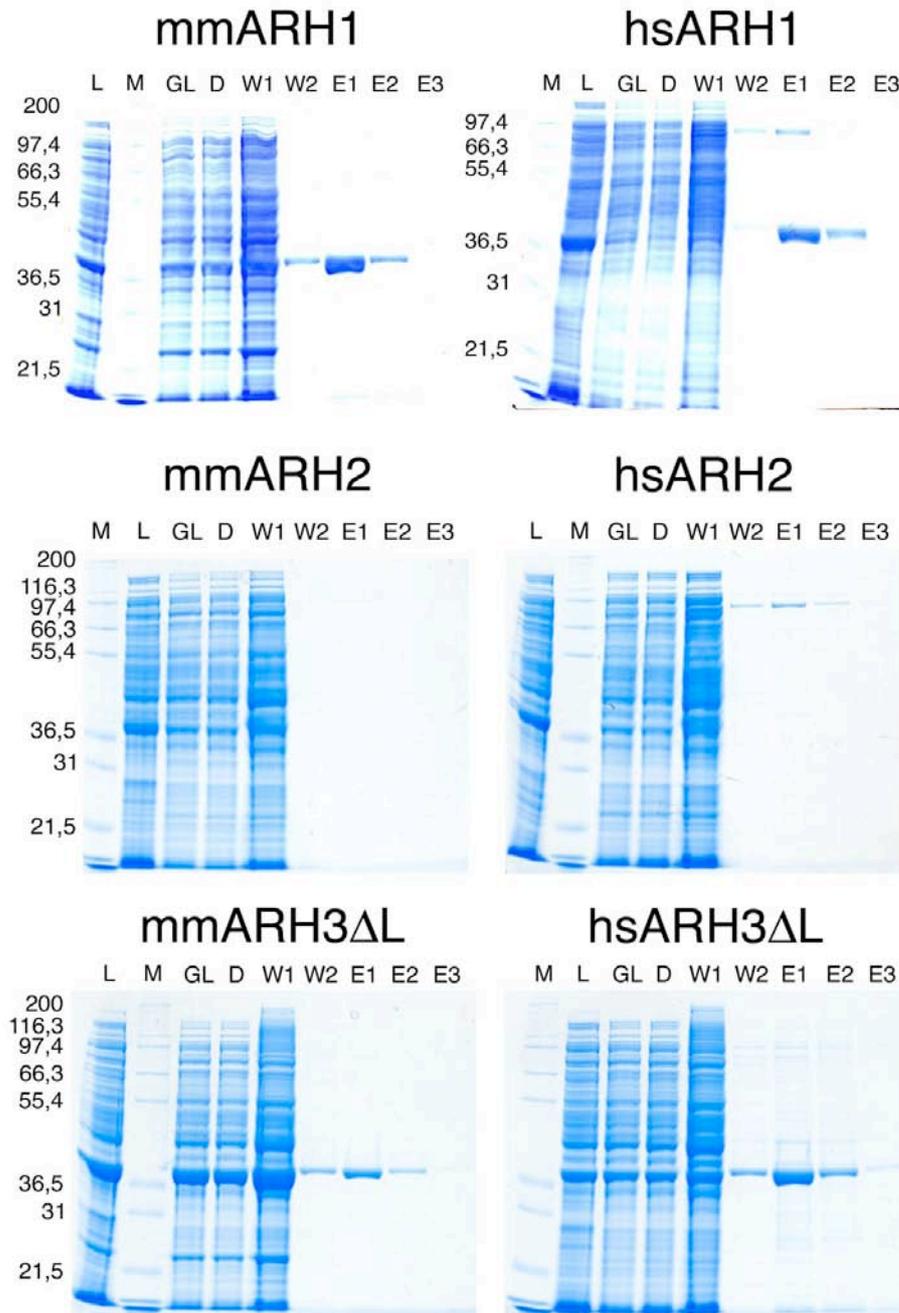


Abb. 5.8 Testexpression der Proteine ARH1-3 aus *H. sapiens* und *M. musculus*. Die Aufreinigung eines 3 ml Bakterienlysats aus 20 ml Zym5052-Kultur (ca. 600 mg Bakterienfeuchtgewicht) erfolgte an Protino-1000 TED-Säulen nach Herstellerangaben. Von Lysat vor der Zentrifugation (L), geklärtem Lysat (GL) und Durchlauf der Säule (D) wurden je 2 μ l (1/1500) aufgetragen. Von den Wasch (W) und Eluatfraktionen (E) wurden je 20 μ l aufgetragen (1/100 bzw. 1/75). ARH1 und ARH3 Δ L lassen sich gut exprimieren und aufreinigen. ARH2 ist im Lysat vor der Zentrifugation erkennbar, aber nicht in den löslichen Fraktionen.

Zur Präparation großer Mengen hochreinen Proteins wurde das vorgestellte Expressionssystem für einen größeren Maßstab etabliert. Die Expression und Aufreinigung gelang für Mensch- und Maus- ARH1 und ARH3. Gezeigt wird hier die Präparation und Aufreinigung von hsARH1.

Die Lyse und Aufreinigung des rekombinanten Proteins über immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) entspricht im Wesentlichen dem Vorgehen bei einer Minipräparation und ist im Methodenteil detailliert beschrieben (siehe Abschnitt 4.4.5). Unterschiedlich sind die Präparation des Ganzzelllysats und die verwendete IMAC-Matrix. Um die großen Materialmengen einfach und kostengünstig handhaben zu können, wurde auf die Verwendung von BugBuster verzichtet. Stattdessen wurde das Ganzzelllysats durch Resuspendieren der geernteten Bakterien in Bakterien-Lysepuffer und anschließende Ultraschallbehandlung erzeugt. Da sich für die Kristallisation ein weiterer Aufreinigungsschritt anschließt, konnte mit Protino-IDA eine andere Affinitätsmatrix gewählt werden, die die hexahistidinmarkierten Proteine weniger selektiv, aber mit deutlich höherer Affinität bindet. Die Bindung des rekombinanten Proteins erfolgte im „batch“-Verfahren durch Hinzufügen der Matrix zum Lysat. Erst nach mehreren Waschschritten wurde die Matrix in eine Chromatographiesäule übertragen. Abb. 5.9 zeigt eine typische IMAC-Aufreinigung von hsARH1 aus zwei Litern Expressionskultur an 3 g Protino IDA-Matrix (ca. 6 ml Säulenvolumen).

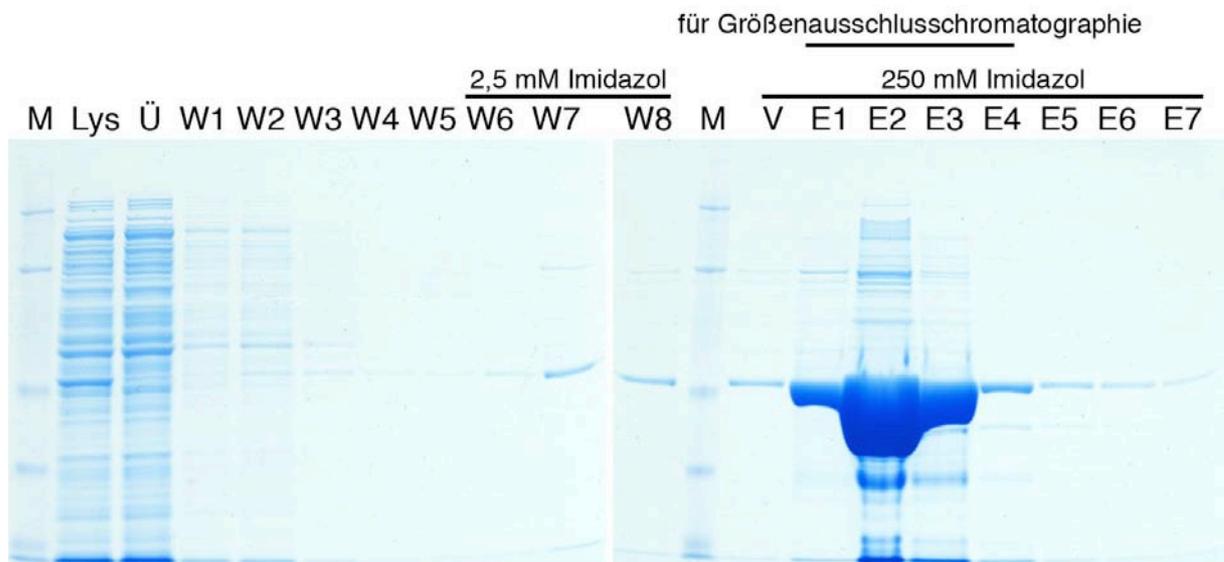


Abb. 5.9 Affinitätschromatographie an immobilisierten Nickelionen zur Aufreinigung von hexahistidinmarkierter hsARH1 in großem Maßstab. 160 ml Geklärtes Lysat aus 2 l Kultur (26,7 g Bakterienfeuchtgewicht) wurden mit 3 g Protino IDA-Matrix vereinigt. Nach 1 - 2 h Inkubation wurde der Überstand entfernt. Die Matrix wurde viermal mit insgesamt 175 ml IMAC-Waschpuffer gewaschen (W1 - W3) und in eine Säulenhülse überführt (6 ml Säulenvolumen). 20 ml IMAC-Waschpuffer (W4) und dreimal 10 ml IMAC-Waschpuffer mit 2,5 mM Imidazol (W6 - W8) wurden über die Säule gegeben. Nach einer Vorelution mit 3 ml IMAC-Elutionspuffer (250 mM Imidazol) wurde das rekombinante Protein in 3 ml Aliquoten mit IMAC-Elutionspuffer eluiert (E1 - E7). 2 µl von Lysat (L), Überstand (Ü) und Waschfraktion W1 bzw. 20 µl der restlichen Fraktionen wurden aufgetragen. Die aufgetragenen Eluatmengen entsprechen 1/150 des Gesamtvolumens. Fraktionen E1 bis E4 wurden vereinigt und für die Größenausschlusschromatographie eingesetzt.

Geringe Mengen des gebundenen Proteins wurden durch die Waschung mit 30 ml 2,5 mM Imidazol entfernt (W6 - W8), eine Voreluion (V) mit 3 ml 250 mM Imidazol verdrängte restlichen Waschpuffer aus der Matrix. Das Protein wurde dann in 12 ml 250 mM in den Fraktionen E1 - E4 eluiert. Diese Fraktionen wurden über eine Ultrafiltrationseinheit mit einer Ausschlussgröße von 30.000 auf ca. 1 ml aufkonzentriert.

Das Konzentrat der hsARH1-haltigen Fraktionen wurde einer Größenausschlusschromatographie unterzogen. Dazu wurde es wie im Methodenteil beschrieben (siehe Abschnitt 4.4.5) auf eine mit Laufpuffer äquilibrierte HiLoad Superdex 75 16/75 Prep Grade Chromatographiesäule aufgetragen und bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,1 ml pro Minute über Nacht eluiert. Es wurden Fraktionen à 1 ml gesammelt und proteinhaltige Fraktionen wurden per SDS-PAGE analysiert. Abb. 5.10 zeigt die SDS-PAGE-Analyse dieser proteinhaltigen Fraktionen.

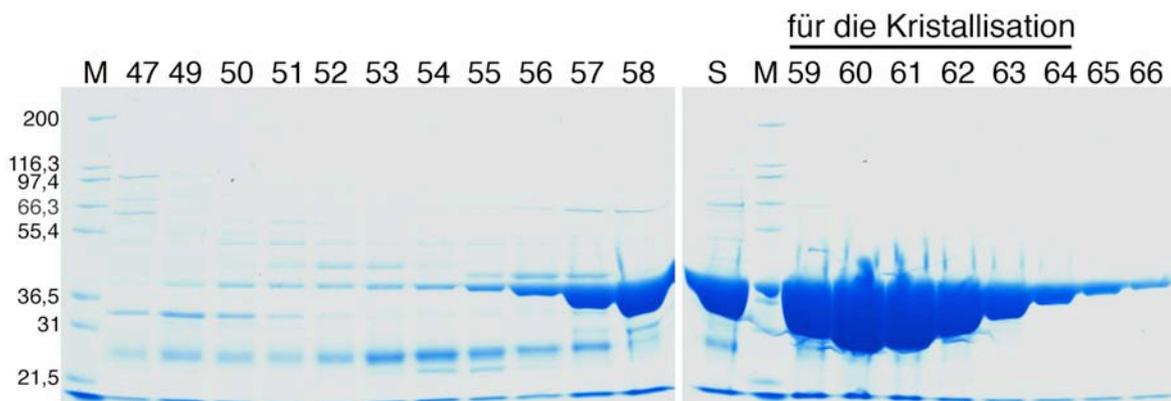


Abb. 5.10 Größenausschlusschromatographie zur Aufreinigung von hsARH1. Die vereinigten hsARH1-haltigen Fraktionen der IMAC (Abb. 5.9) wurden aufkonzentriert und auf eine Superdex 75 Größenausschlusschromatographiesäule geladen. Die Chromatographie erfolgte über Nacht bei 0,1 ml/min. 1 ml Fraktionen wurden gesammelt und jeweils 20 μ l (1/50) Fraktionen wurden auf ein SDS-PAGE aufgetragen. Eine sehr hohe Beladung des Gels wurde gewählt, um auch geringe höhermolekulare Kontaminanten noch detektieren zu können. In Spur S wurde 1 μ l der Proteinpräparation vor der Größenausschlusschromatographie aufgetragen. Fraktionen 59 und 64 wurden vereinigt und für die Kristallisation eingesetzt. Niedermolekulare Kontaminanten wie z.B. Lysozym in der Gelfront wurden durch anschließende Ultrafiltration mit einem Größenausschluss von 30.000 entfernt.

In Spur S ist 1 μ l der eingesetzten hsARH1-Präparation vor der Größenausschlusschromatographie zu sehen. Man erkennt die Verdünnung des hsARH1-Protein über die Fraktionen 53 bis 66. Höhermolekulare Verunreinigungen eluieren in früheren Fraktionen (erkennbar in Fraktion 47). Eine höhermolekulare Verunreinigung findet sich auch noch in Fraktionen 55 bis 58, die daher verworfen wurden. Fraktionen 59 - 64 wurden vereinigt und über eine Ultrafiltrationseinheit mit einer Ausschlussgröße von 30.000 auf ca. 500 μ l aufkonzentriert und dann mit Hilfe der gleichen Ultrafiltrationseinheit und eines Diafiltrationsbeckers in Kristallisationspuffer umgepuffert. Die umgepufferte Proteinlösung wurde wiederum auf ca. 800 μ l aufkonzentriert und durch eine zehnmütige Zentrifugation bei 16000 g wurden unlösliche Aggregate entfernt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß übertragen. Ein Aliquot wurde für die photometrische Quantifizierung des

Proteins eingesetzt. Nach Ermittlung der Proteinkonzentration wurde die Präparation für die Kristallisation auf 15 mg/ml verdünnt. Die Ausbeute an hochreinem Protein betrug im gezeigten Fall 19,05 mg aus 2 l Kultur.

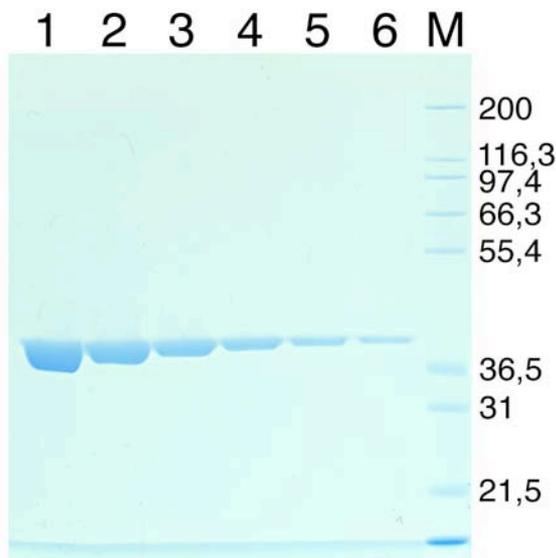


Abb. 5.11 Kontrollgel der aufgereinigten hsARH1. In Spur 1 bis 6 wurde eine serielle 1:2 Verdünnung der Präparation ausgehend von 0,5 μ l (=7,5 μ g) in Spur 1 aufgetragen.

Abb. 5.11 zeigt ein Kontrollgel des präparierten hsARH1-Proteins. In Spur 1 wurden 0,5 μ l der Proteinpräparation aufgetragen, was einer Proteinmenge von 7,5 μ g entspricht. Spuren 2-6 zeigen eine serielle Verdünnung der Präparation um Faktor 2. In Spur 6 sind ca. 230 ng Protein enthalten, was der Größenordnung des Proteingehalts der sichtbaren Markerbanden entspricht. Es sind keine Störbanden in der verwendeten Präparation sichtbar, was für eine Reinheit von über 99 % spricht.

5.2.2 Enzymatische Charakterisierung

Die enzymatischen Eigenschaften der verfügbaren rekombinanten Proteine ARH1 und ARH3 wurden an etablierten mono- oder poly-ADP-ribosylierten Substraten getestet. Durch Verwendung radioaktiv markierten NADs ist die Inkorporation von ADP-Ribose in das Substrat detektierbar. Eine Einschränkung der Untersuchungsmöglichkeiten ergibt sich aus der begrenzten Verfügbarkeit etablierter Substrate und modifizierender Enzyme. Ohne eine zuverlässige Modifikation der Substrate ist jedoch eine Untersuchung der Demodifikation nicht möglich.

De-mono-ADP-Ribosylierung von Agmatin

Agmatin, das decarboxyliertem Arginin entspricht, kann unter Verwendung von rekombinanter mmART2.2 mono-ADP-ribosyliert werden. Die N-glykosidische Bindung zur ADP-Ribose erfolgt dabei an gleicher Position und in gleicher Weise wie bei der ADP-Ribosylierung von Argininresten in Proteinen. Daher konnte ADP-ribosyliertes Agmatin als Modellsubstrat für die Arginin De-ADP-Ribosylierung verwendet werden. Wie im Methodenteil (4.8.1) beschrieben, wurde ein Überschuss Agmatin mit einer geringen Menge ^{32}P -NAD zusammen mit 50 ng rekombinanter ART2.2 für 1 h bei 37 °C inkubiert. Aliquote der Reaktion wurden ohne Zusatz bzw. mit 500 ng rekombinantem ARH-Protein weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Das mmART2.2-Protein wurde nicht entfernt. Als Kontrolle wurde ein Aliquot ^{32}P -NAD mit 5 mU NADase hydrolysiert, um eine Referenz für ADP-Ribose zu erzeugen. Anschließend wurden die enthaltenen Proteine mit proteinbindender Matrix (StrataClear, Stratagene) entfernt und 0,5 μl des Überstands auf eine Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen. Durch die Dünnschichtchromatographie wurden die radioaktiv markierten Spezies des Reaktionsmixes getrennt. Die Detektion erfolgt durch Autoradiographie (Abb. 5.12)

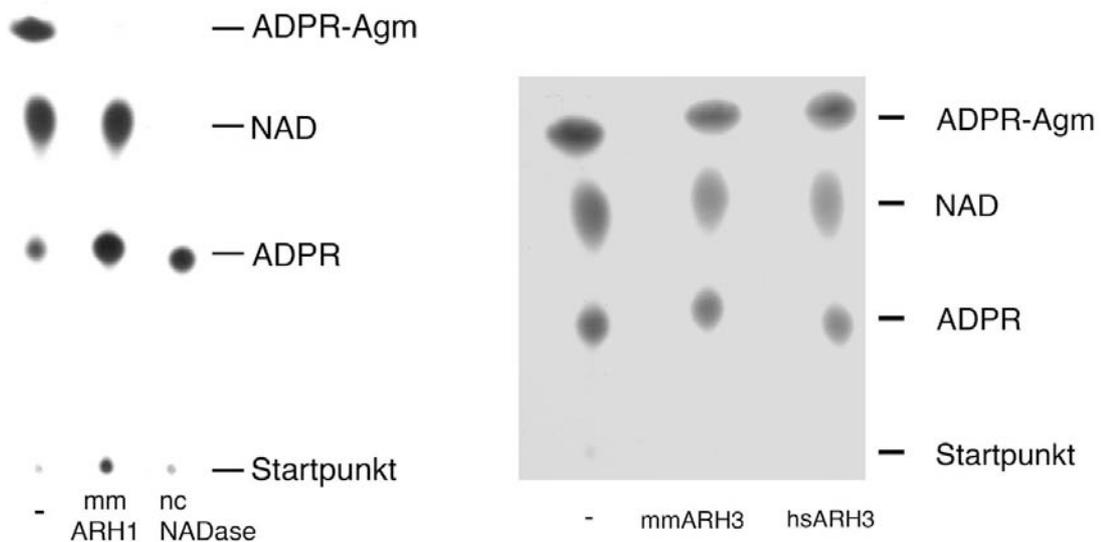


Abb. 5.12 Hydrolyse von ADP-Ribosyl-Agmatin durch ARH1. ^{32}P -ADP-Ribosyl-Agmatin wurde durch Inkubation von 1 mM Agmatin, 1 μM ^{32}P -NAD (30 Ci/mmol, 0,7 μCi pro Ansatz) und 50 ng mmART2.2 in Agmatin-MARsylierungspuffer für 30 min bei 37 °C erzeugt. Anschließend wurden Aliquote der Reaktion ohne Zusatz bzw. mit 500 ng ARH-Protein 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Proteine wurden aus dem Ansatz ausgefällt und 1 μl des Reaktionsansatzes (50 μl) wurden auf eine PEI-Cellulose-Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 5 Minuten in 1 M Essigsäure und anschließend für 30 Minuten in 300 mM LiCl in 0,9 M Essigsäure. Bei Zusatz von mmARH1 wird ADPR-Agmatin vollständig zu ADPR abgebaut, dadurch steigt auch die Intensität des ADPR-Signals an. mmARH3 und hsARH3 zeigen hingegen keine Hydrolyseaktivität. Als Kontrolle wurde ^{32}P -NAD direkt mit *N. crassa* NADase zu ADPR hydrolysiert.

ADP-Ribosyl-Agmatin migriert nahe der Lauffront ($R_f \approx 0,90 - 0,95$). Näher zum Auftragungspunkt hin finden sich nicht umgesetztes NAD ($R_f \approx 0,66 - 0,75$) und ADP-Ribose ($R_f \approx 0,36 - 0,48$). Aufgrund des Wechsels des Laufmittels nach ca. 5 Minuten sind die R_f -

Werte von Versuch zu Versuch etwas unterschiedlich. Das NAD wurde nicht vollständig umgesetzt, was möglicherweise durch eine geringe Aktivität der mmART2.2-Präparation oder durch eine Bindung und Inaktivierung von mmART2.2 an die Wand des Reaktionsgefäßes zu erklären ist.

MmARH1 hydrolysiert ADP-Ribosyl-Agmatin effizient zu ADP-Ribose und dem (nicht radioaktiv markierten) Agmatin. Weder hsARH3ΔL noch mmARH3ΔL zeigen erkennbare Hydrolyseaktivität mit diesem Substrat.

Argininspezifische Protein-de-mono-ADP-Ribosylierung

Als weiteres Modellsubstrat für die argininspezifische Protein-de-mono-ADP-Ribosylierung wurde die leichte Kette des M2-Antikörpers eingesetzt. Der monoklonale Antikörper M2 bindet an das FLAG-Epitop des rekombinanten mmART2.2-Proteins ohne dieses zu inhibieren. Argininreste der leichten Kette des Antikörpers fungieren als Substrat für die argininspezifische Mono-ADP-Ribosylierung. Nach der Inkubation wurden die Ansätze mit LDS-Probenpuffer versetzt, die Proteine wurden hitzedenaturiert und es wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Eine Autoradiographie der Membran ermöglichte die Detektion ³²P-ADP-ribosylierter Proteine.

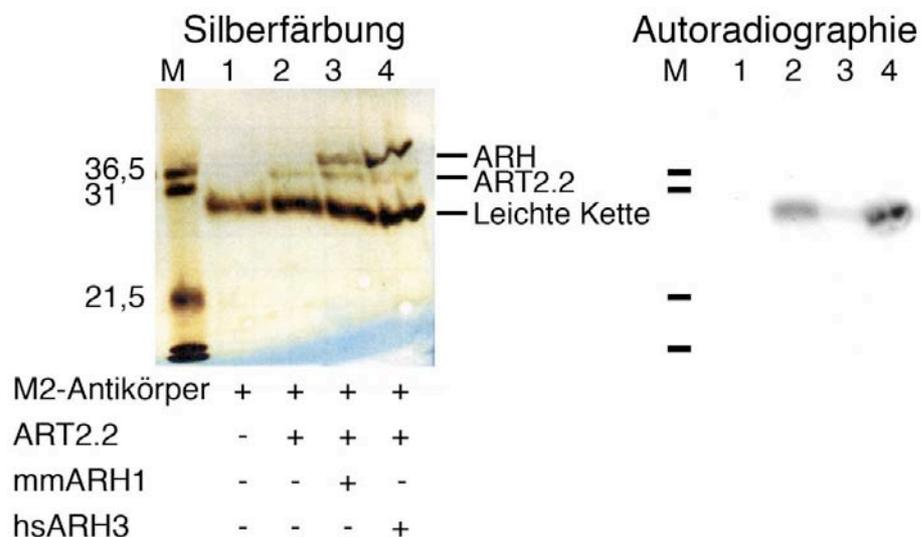


Abb. 5.13 Spaltung von proteingebundenem ADP-Ribosyl-Arginin durch ARH1. 5 µg M2-Antikörper wurden mit 500 ng mmART2.2 und 200 nM ³²P-NAD 2 h bei 37 °C in PBS inkubiert. Hierbei wurde die leichte Kette des M2-Antikörpers mono-ADP-ribosyliert. Ohne mmART2.2 kommt es nicht zur Inkorporation von Radioaktivität (Spur 1). Aliquote der Reaktion (1 µg Antikörper und 100 ng mmART2.2) wurden mit verschiedenen Zusätzen 1 h bei 37 °C weiter inkubiert. 100 ng hsARH3ΔL führt zu keiner Reduktion der inkorporierten Radioaktivität (Spuren 2 und 4). Bei Zusatz von 100 ng mmARH1 wird die ADP-Ribosylierung der leichten Kette fast vollständig umgekehrt.

In Abb. 5.13 sind Silberfärbung und Autoradiographie eines repräsentativen Versuchs gezeigt. In vier Ansätzen wurde M2-Antikörper mit ^{32}P -NAD inkubiert. Ohne Zusatz von mmART2.2 erfolgt keine Inkorporation von Radioaktivität. Bei Zusatz von mmART2.2 wird die leichte Kette des Antikörpers ADP-ribosyliert. Der Zusatz von hsARH1-Protein führt zur Entfernung der inkorporierten Radioaktivität aus dem ADP-ribosylierten Substrat. HsARH3 zeigt auch mit diesem Substrat keine Hydrolyseaktivität.

De-poly-ADP-Ribosylierung

Zur Untersuchung der De-poly-ADP-Ribosylierungsaktivität wurde rekombinantes PARP1-Protein eingesetzt. Sowohl Volllängen-PARP1 als auch die katalytische Domäne von PARP1 (PARP1-CD) kann sich effizient auto-poly-ADP-ribosylieren. In Gegenwart gescherter DNA wird PARP1 stark aktiviert und modifiziert sowohl sich selbst als auch Proteinbestandteile der DNA-Präparation. Die Volllängen-PARP1 neigt stark zu Fragmentierung.

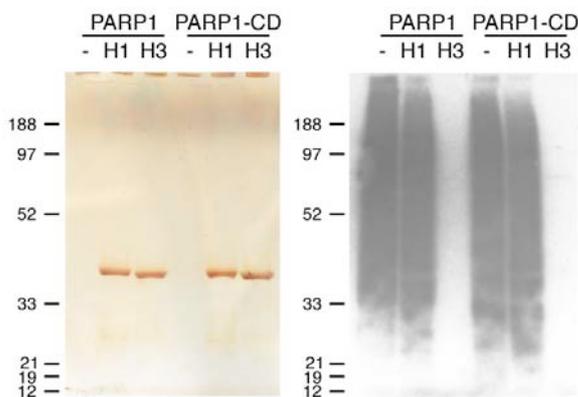


Abb. 5.14 De-poly-ADP-Ribosylierung durch hsARH3. 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PARP1 bzw. der katalytischen Domäne von PARP1 (PARP1-CD) wurden in Gegenwart einer groben DNA-Präparation aus Fischspermien-DNA (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA) mit 1 μM ^{32}P -NAD (200 Ci/mmol, 5 $\mu\text{Ci}/\text{Ansatz}$) 40 min bei 37 °C inkubiert. Hierbei entstehen zahlreiche poly-ADP-ribosylierte Proteine im Bereich von 21 bis über 200 kd. Nach der Größenausschlusschromatographie zur Entfernung des nicht metabolisierten ^{32}P -NADs wurden Aliquote der Reaktion mit 1 μg hsARH1 (H1) bzw. hsARH3 ΔL (H3) oder ohne Zusatz für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Proteine wurden nach der PAG 2 min auf eine NC-Membran und 90 min auf eine PVDF-Membran geblottet. Von der PVDF-Membran wurde ein Autoradiogramm angefertigt (rechts). In der Silberfärbung der NC-Membran (links) sind nur die ARH-Proteine erkennbar. hsARH3 führt zur vollständigen Entfernung der inkorporierten Radioaktivität, während hsARH1 keine Hydrolyseaktivität zeigt. (BioMax MR Film, 24 h).

Nach Inkorporation des radioaktiven ^{32}P -NADs als Poly-ADP-Ribose in die Proteinsubstrate wurde überschüssiges ^{32}P -NAD durch eine Größenausschlusschromatographie entfernt und Aliquote des Ansatzes wurden ohne weiteren Zusatz bzw. mit hsARH1 respektive hsARH3 ΔL bei 1 h 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hitzedenaturierung in LDS-Probenpuffer gestoppt und die Proben wurden auf ein SDS-PAG aufgetragen. Dabei wandert freigesetzte ADP-Ribose mit der Lauffront der Elektrophorese und kann vor der Autoradiographie entfernt werden. Die inkorporierte Poly-ADP-Ribose ist durch Schwärzung eines aufgelegten Films detektierbar. Abb. 5.14 zeigt die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs mit Zusatz von gescherter DNA aus Fischspermien. Abb. 5.15 zeigt einen repräsentativen Versuch ohne Zusatz von DNA.

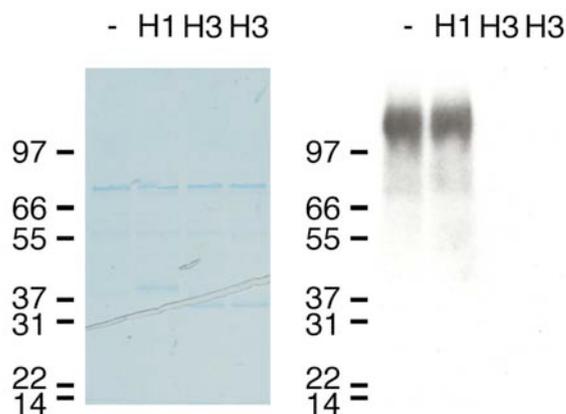


Abb. 5.15 De-Poly-ADP-Ribosylierung durch hsARH3. HsPARP1 (100 µg/ml) wurde ohne Zusatz von DNA mit 1 µM ³²P-NAD (200 Ci/mmol, 5 µCi/Ansatz) 15 min bei 37 °C inkubiert. Es entsteht auto-poly-ADP-ribosylierte PARP1 bei ca. 120 kd. Nach der Größenausschlusschromatographie zur Entfernung nicht inkorporierten ³²P-NADs wurden Aliquote mit 500 ng hsARH1 (H1) oder 500 ng hsARH3 (H3) einer frischen (links) oder 20 Tage alten Präparation (rechts) versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine PAGE und eine Autoradiographie des Gels. Der Ansatz mit hsARH1 unterscheidet sich nicht vom Ansatz, der ohne Zusatz weiter inkubiert wurde. Alte und neue hsARH3-Präparation führen zum vollständigen Abbau der poly-ADP-Ribose. (BioMax MR Film, 1 h).

Poly-ADP-ribosylierte Proteine laufen höher als die unmodifizierte Proteine und sind wegen der Heterogenität der Modifikation nicht als scharfe Bande sondern als verschmierter Bereich erkennbar. Dieser tritt bei Abwesenheit von DNA im Hochmolekularen (>100 kd) auf, ist jedoch bei der Modifikation kleinerer Substrate in Anwesenheit der groben DNA-Präparation als Schwärzung der gesamten Spur detektierbar.

Die Zugabe von ARH3 zu poly-ADP-ribosylierter PARP1 führt zu einer vollständigen Entfernung der inkorporierten Radioaktivität. Auch bei Verwendung von zahlreichen poly-ADP-ribosylierten Substraten aus einer groben DNA-Präparation ist die poly-ADP-Ribosylierung vollständig umkehrbar. Dies gilt unabhängig davon, ob Vollängen-PARP1 oder PARP1-CD eingesetzt wird. MmARH3 zeigt die gleiche enzymatische Aktivität wie hsARH3 (Daten nicht gezeigt). Sowohl eine frische als auch eine 20 Tage alte hsARH3-Präparation zeigen eine vergleichbare enzymatische Aktivität, was für die relative Stabilität des Enzyms spricht. HsARH1 zeigt hingegen keinen Effekt auf die inkorporierte Poly-ADP-Ribose.

5.2.3 Kristallisation und 3D-Strukturanalyse von ARHs

Enzymatische Versuche zeigten, dass enzymatisch aktive ARH1- und ARH3-Proteine produziert werden konnten, die auch nach 20 Tagen noch löslich und enzymatisch aktiv waren. Zusammen mit den optimierten Expressions- und Purifikationsverfahren erlaubte dies die Kristallisation von ARH-Proteinen.

Zum Durchmustern verschiedener Kristallisationsbedingungen wurde in Kooperation mit Dr. Jochen Müller-Dieckmann, die Hochdurchsatz-Kristallisationseinheit am EMBL-Hamburg eingesetzt (Müller-Dieckmann, J. 2006). Die Reproduktion und Optimierung von Kristallisationsansätzen sowie die Röntgenstreuexperimente wurden von unserem Kooperationspartner Dr. Christoph Müller-Dieckmann (EMBL-Hamburg und ESRF, Grenoble, Frankreich) durchgeführt.

Kristallisation von H. sapiens und M. musculus ARH3

Aufgereinigtes hsARH3 Δ L Protein kristallisierte in zwei verschiedenen Kristallformen deren Eigenschaften in Tab. 5.2 zusammengefasst sind. Orthorhombische Kristalle wuchsen bei 20 °C nach dem Mischen gleicher Volumina Proteinlösung (10 mg/ml hsARH3 Δ L in 20 mM TRIS-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 3 mM DTT) und Reservoirlösung (100 mM MES pH 6,0, 10 % (w/v) PEG 3350). Plättchenförmige Kristalle wuchsen nach ca. zwei Wochen aus einem Präzipitat und erreichten üblicherweise eine Größe von 300 x 200 x 50 μ m (siehe Abb. 5.16 A). Die Kristalle streuten Röntgenstrahlen bis zu einer Auflösung von 1,6 Å (Kernstock et al. 2006).

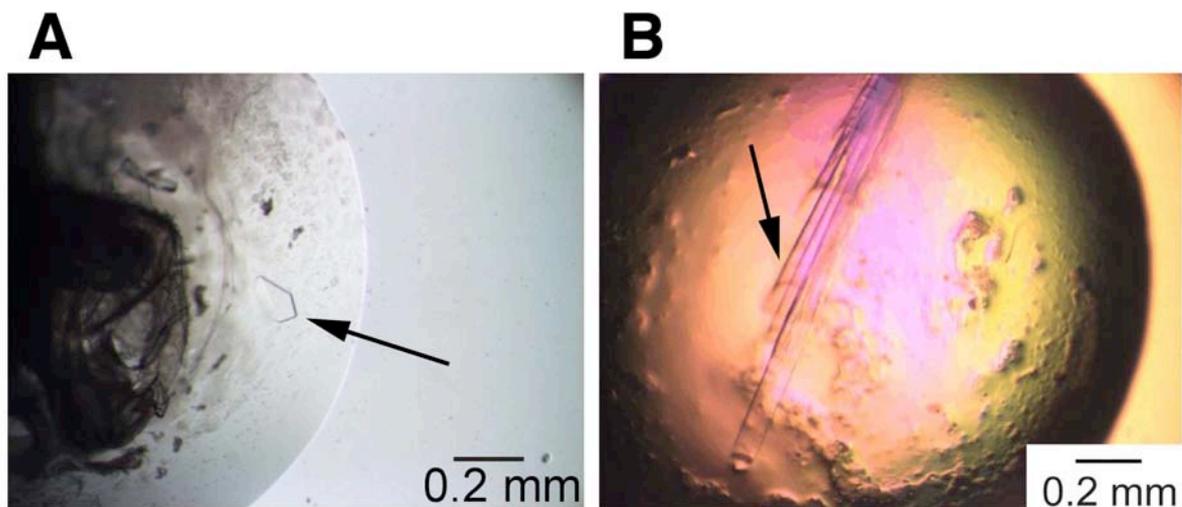


Abb. 5.16 Proteinkristalle von hsARH3 Δ L. hsARH3 Δ L kristallisierte im hängenden Tropfen in orthorhombischen Kristallen (A) und in Gegenwart von ADP in monoklinen Nadeln (B).

Monokline Kristalle wuchsen bei 20 °C nach dem Mischen gleicher Volumina ADP-haltiger Proteinlösung (10 mg/ml hsARH3 Δ L in 20 mM TRIS-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 3 mM DTT und 2 mM ADP) und Reservoirlösung (100 mM HEPES pH 7,0, 200 mM Calciumacetat und 18 % PEG 8000). Nadelförmige Kristalle (ca. 75 x 75 x 300 μ m) wuchsen innerhalb einiger Tage (siehe Abb. 5.16 B). Die Kristalle streuten Röntgenstrahlen bis zu einer Auflösung von 2,05 Å (Kernstock et al. 2006). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Kristallformen ist die Anwesenheit von ADP im Kristallisationsansatz, das

im Kristall als Untereinheit des Substrats die Position von ADP-Ribose einnehmen könnte. Jedoch war in der gelösten Struktur keine Elektronendichte für ADP sichtbar.

In Gegenwart von ADP-Ribose konnte hsARH3 nicht in ausreichend hohen Konzentrationen eingesetzt werden, ohne auszufallen, was eine direkte Kokristallisation verhinderte. Ein Tränken von Kristallen mit ADPR, ADP, AMP, 5'-Phosphoribose, Ribose oder Pyrophosphat führte zur sofortigen Zerstörung der Proteinkristalle (Müller-Dieckmann, C. et al. 2006).

Aufgereinigtes mmARH3 Δ L-Protein kristallisierte in monoklinen Nadeln. Eigenschaften des Kristalls sind in Tab. 5.2 zusammengefasst. Die monoklinen Kristalle wuchsen bei 22 °C nach dem Mischen gleicher Volumina Proteinlösung (5 mg/ml hsARH3 Δ L in 10 mM HEPES pH 7,0, 150 mM NaCl) und Reservoirlösung (100 mM MES pH 6,2, 6 % (w/v) PEG 4000). Innerhalb von ein bis zwei Wochen erschienen lange oft verwachsene Kristallnadeln mit einer Länge von bis zu über 1 mm und einem Durchmesser von ca. 150 μ m (siehe Abb. 5.17). Die Kristalle streuten Röntgenstrahlen bis zu einer Auflösung von 1,8 Å.

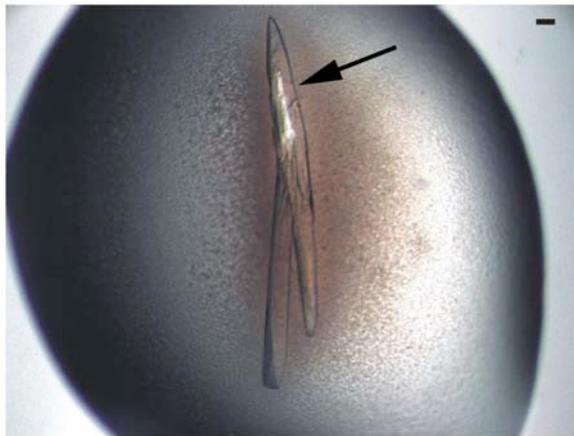


Abb. 5.17 Proteinkristalle von mmARH3 Δ L. Das Protein kristallisierte im hängenden Tropfen in monoklinen Nadeln. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m.

Tab. 5.2 Eigenschaften von ARH3-Kristallen. Raumgruppe und Parameter der Einheitszelle sowie die Auflösungsgrenze beim Röntgenbeugungsexperiment sind aufgeführt.

<i>Protein</i>	<i>hsARH3</i>	<i>hsARH3</i>	<i>mmARH3</i>
Kristallform	orthorhombisch	monoklin	monoklin
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁	P2 ₁
Parameter der Einheitszelle			
a (Å)	56,34	57,33	53,88
b (Å)	60,35	60,63	60,10
c (Å)	97,17	102,88	91,79
β (°)		96,43	90,09
Auflösungsgrenze (Å)	1,60	2,05	1,80

Kristallisation von H. sapiens ARH1

Beim Einsatz von Proteinpräparation mit einer Reinheit von über 99 % wurden unter zahlreichen Bedingungen Proteinmikrokristalle erhalten. Dazu wurde das rekombinante Protein in einer Konzentration von 15-20 mg/ml in 20 mM HEPES, pH 7,0, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ und 3 mM DTT eingesetzt. Erste Kristallisationsbedingungen wurden optimiert und ausreichend große Kristalle wurden gezüchtet, die jedoch in einer Dimension nur bis zu einer Auflösungsgrenze von ca. 7 Å streuten. Es wurde erneut ein Durchmustern zahlreicher Kristallisationsbedingungen mit Hilfe der Hochdurchsatz-Kristallographieeinheit am EMBL-Hamburg durchgeführt, hierbei wurde sowohl das unmodifizierte Protein als auch reduktiv methyliertes Protein eingesetzt. Beide Präparationen wurden für das Durchmustern mit und ohne ADP-Ribose in einem molaren Verhältnis von 1:5 eingesetzt. Für das unmodifizierte Protein ohne ADP-Ribose wurden hierbei neue Kristallisationsbedingungen identifiziert und optimiert. Momentan werden Versuche zur Lösung des Phasenproblems durchgeführt.

Lösung der ARH3 3D-Struktur

Das Phasenproblem für hsARH3 Δ L konnte durch Schweratomderivatisierung der orthorhombischen Kristallform mit einer Xenongas-Druckkammer gelöst werden. Die Struktur des Protomers konnte mit einer Auflösung von 1,6 Å gelöst werden und umfasst ein Polypeptid mit 339 Aminosäuren, zwei Magnesiumionen und 258 gebundenen Wassermolekülen. Die Koordinaten der Struktur wurden in der *protein data bank* (pdb) unter der pdb-ID 2foz hinterlegt. Molekularer Ersatz mit dem eng verwandten Protomer der orthorhombischen Kristallform erlaubte auch das Lösen des Phasenproblems für die monokline Kristallform. Die Struktur zweier leicht unterschiedlicher Protomere pro Einheitszelle wurde mit einer Auflösung von 2,0 Å ermittelt und unter der pdb-ID 2fp0

hinterlegt. Dieser Datensatz umfasst zwei Polypeptidketten mit je 339 Aminosäuren, vier Magnesiumionen und 147 gebundenen Wassermolekülen. Trotz der Anwesenheit von ADP im Kristallisationsansatz konnte keine Elektronendichte für ADP detektiert werden.

Molekularer Ersatz mit dem Protomer aus hsARH3 erlaubte auch das Lösen des Phasenproblems für den mmARH3-Kristall. Die Struktur zweier leicht unterschiedlicher Protomere pro Einheitszelle wurde mit einer Auflösung von 1,80 Å ermittelt und unter der pdb-ID 2qty hinterlegt. Dieser Datensatz umfasst zwei Polypeptidketten mit je 340 Aminosäuren, vier Magnesiumionen und 200 gebundene Wassermoleküle. MmARH3 unterscheidet sich an 26 Positionen von der hsARH3 Struktur, 17 dieser Unterschiede können als konservativ beschrieben werden. 24 dieser Positionen liegen an der Proteinoberfläche und entfernt vom aktiven Zentrum. Zwei Aminosäuren im Proteinkern, Thr66 und Val233 unterscheiden sich von den entsprechenden Resten in der hsARH3 Struktur, Ala65 und Ile232. Eigenschaften der erhaltenen ARH3-Strukturen sind in Tab. 5.3 zusammengefasst.

Tab. 5.3 Eigenschaften der gelösten ARH3-Strukturen. Modellierte Aminosäuren und gebundene Wassermoleküle der drei Strukturen 2foz, 2fp0 und 2qty sind aufgeführt. Darüber hinaus sind als Qualitätskriterien der Modelle die Standardabweichungen interner Bindungslängen und Winkel, die B-Faktoren der Strukturen und die Verteilung der Φ - Ψ -Winkel der Aminosäuren in einem Ramachandran-Plot angegeben.

Protein	hsARH3	hsARH3	mmARH3
Kristallform	orthorhombisch	monoklin	monoklin
Auflösungsgrenze (Å)	1,60	2,05	1,80
Erkennbare Aminosäuren	339	678 (2 Prot.)	680 (2 Prot.)
Nicht aufgelöste Loops	G47-T54	G47-T54	G47-R53
Gebundene Wassermoleküle	258	147	200
Pdb-ID	2foz	2fp0	2qty
Standardabweichungen der			
internen Bindungslängen (Å)	0,012	0,023	0,016
internen Winkel (°)	1,34	1,93	1,47
Mittlere B-Faktoren			
Protein (Å ²)	24,3	48,6	18,3
Ionen (Å ²)	11,4	28,2	12,5
Wassermoleküle (Å ²)	29,7	45,3	19,6
Ramachandran-Plot			
Bevorzugte Region	92,9 %	93,1 %	97,0 %
Erlaubte Region	6,4 %	6,1 %	2,4 %

Die C_α-Atome der fünf ARH3-Protomere lassen sich mit einer mittleren Abweichung von 0,4-0,5 Å gut überlagern und unterscheiden sich im Wesentlichen nur durch Unterschiede an den Termini und in vier Loop-Regionen. Diese unterschiedlich geformten Loops sind 1) der nicht aufgelöste Loop zwischen Helix 2 und Helix 3, 2) der Loop zwischen Helix 9 und Helix 10, 3) der Loop zwischen Helix 11 und Helix 12 und der Loop zwischen Helix 14 und Helix 15. Alle vier Loops liegen an der Oberfläche des Proteins und Loop 2) und Loop 4) sind an Kristallkontakten beteiligt. Wegen der großen Ähnlichkeit der ARH3-Strukturen werden

Struktureigenschaften im Folgenden an der Struktur mit der höchsten Auflösung (hsARH3, 2foz) diskutiert. Unterschiede an der Oberfläche des mmARH3 Proteins werden in Abb. 5.20 gezeigt. Eine Zusammenschau der verschiedenen Protomere erfolgt im Zusammenhang mit der Magnesiumkoordinierung (siehe Abb. 5.21).

Die Nummerierung von Aminosäurepositionen von ARH3-Proteinen bezieht sich in der gesamten Arbeit durchgängig auf die Sequenzposition in der gelösten ARH3 Δ L Struktur. Hierdurch wird der Vergleich der ARH-Proteine erleichtert, da unter dieser Nomenklatur wichtige Aminosäuren verschiedener ARH3-Proteine die gleiche Nummer erhalten und Aminosäuren von ARH-Proteinen ohne N-terminale Elongation ähnliche Nummern erhalten. Um die Position im nativen Protein zu erhalten, sind für hsARH3 16 und für mmARH3 22 zu addieren.

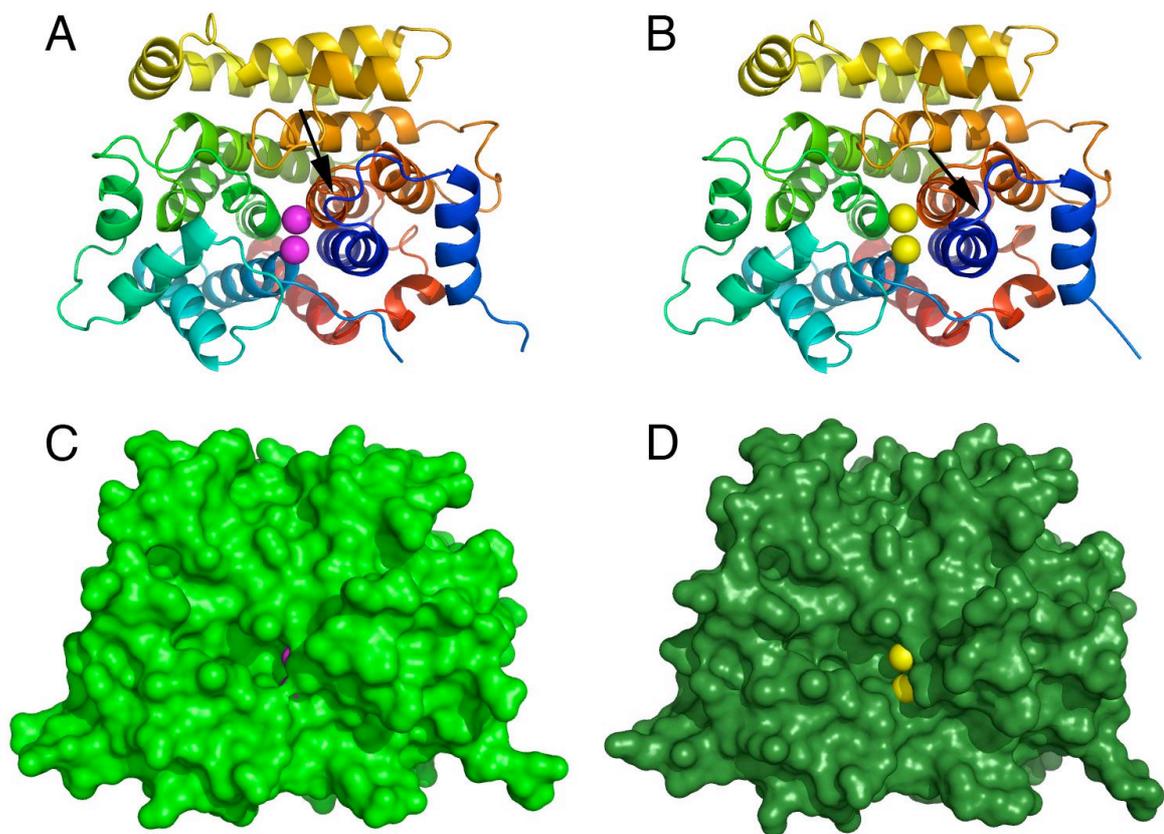


Abb. 5.18 Die 3D-Struktur von hsARH3. In A und C ist die Struktur 2foz, in B und D die Struktur 2fp0 gezeigt. Oben sind *Cartoon*-Darstellungen von hsARH3 Δ L zu sehen, die in einem Farbverlauf vom N- (blau) zum C-Terminus (rot) koloriert sind. Zwei Magnesiumionen (magenta für 2foz, gelb für 2fp0) sind an den Spitzen von vier zentralen α -Helices koordiniert. Ein 8 Aminosäuren langer Loop zwischen Helix 2 und Helix 3 (rechts unten im Bild) ist in der Struktur nicht aufgelöst. Als deutlichster Unterschied zwischen den zwei Strukturen ist der Loop zwischen Helix 1 und Helix 2 in 2fp0 (B) nach rechts unten von den Magnesiumionen weggedreht (Pfeile). Unten sind Oberflächendarstellungen ohne gebundene Wassermoleküle gezeigt. Man erkennt eine Vertiefung im Protein, an deren Ende die beiden Magnesiumionen sitzen. Durch die Verlagerung des Loops liegen die Magnesiumionen in der Struktur 2fp0 frei zugänglich vor, während sie in 2foz nur von der Vertiefung im Protein aus zugänglich sind.

ARH3 ist ein kompaktes monomeres Protein und besteht aus 18 Alphahelices, die zusammen 64% des Proteins umfassen. Es sind keine Betafaltblätter vorhanden. ARH3 bildet den Archetyp einer neuen vollständig alphahelikalen Proteinfaltungsfamilie (erstmalig beschrieben in Müller-Dieckmann, C. et al. 2006). Abb. 5.18 A zeigt eine *Cartoon*-Darstellung des hsARH3 Δ L Proteins aus der orthorhombischen Kristallform. Der Verlauf der Polypeptidkette ist durch einen Farbverlauf vom N-Terminus (blau) zum C-Terminus (rot) dargestellt. In magenta sind zwei Magnesiumionen gezeigt, die eng nebeneinander auf den Spitzen von vier zentralen Alphahelices koordiniert sind, die das Protein durchdringen. Für beide Magnesiumbindungsstellen ergibt sich eine Besetzung von 100 %. Rechts unten in Abb. 5.18 A ist ein Loop zwischen Pro46 und Glu55 erkennbar, in dem für 8 Aminosäuren keine Elektronendichte dargestellt werden konnte. Diese Aminosäuren fehlen daher in der Struktur.

Abb. 5.18 C zeigt eine Oberflächendarstellung des ARH3 Proteins (2foz) in gleicher Orientierung wie in Abb. 5.18 A ohne gebundene Wassermoleküle. Deutlich erkennbar ist eine Vertiefung im Protein, an deren rechter Wandung die Magnesiumionen koordiniert sind. Es liegt nahe, dass diese Vertiefung das putative aktive Zentrum des Proteins darstellen könnte, da für ARH1 beschrieben wurde, dass die Katalyse magnesiumabhängig verläuft (Moss et al. 1992).

Abb. 5.18 B und 5.18 D zeigen die Struktur des Protomers A aus dem 2fp0-Kristall in *Cartoon*- und Oberflächendarstellung in gleicher Orientierung wie die 2foz-Struktur. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Strukturen besteht in der Positionierung des Loops zwischen den Helices 1 und 2 (schwarzer Pfeil). Dieser Loop hat sich in der 2fp0-Struktur von den Magnesiumionen weg nach rechts unten bewegt. Hierdurch wird auch das in diesem Loop befindliche Glutamat 25 von den Magnesiumionen weggezogen, so dass in der Oberflächendarstellung des Proteins die Magnesiumionen der 2fp0-Struktur frei zugänglich sind. An anderen Positionen zeigen sich keine deutlichen Unterschiede.

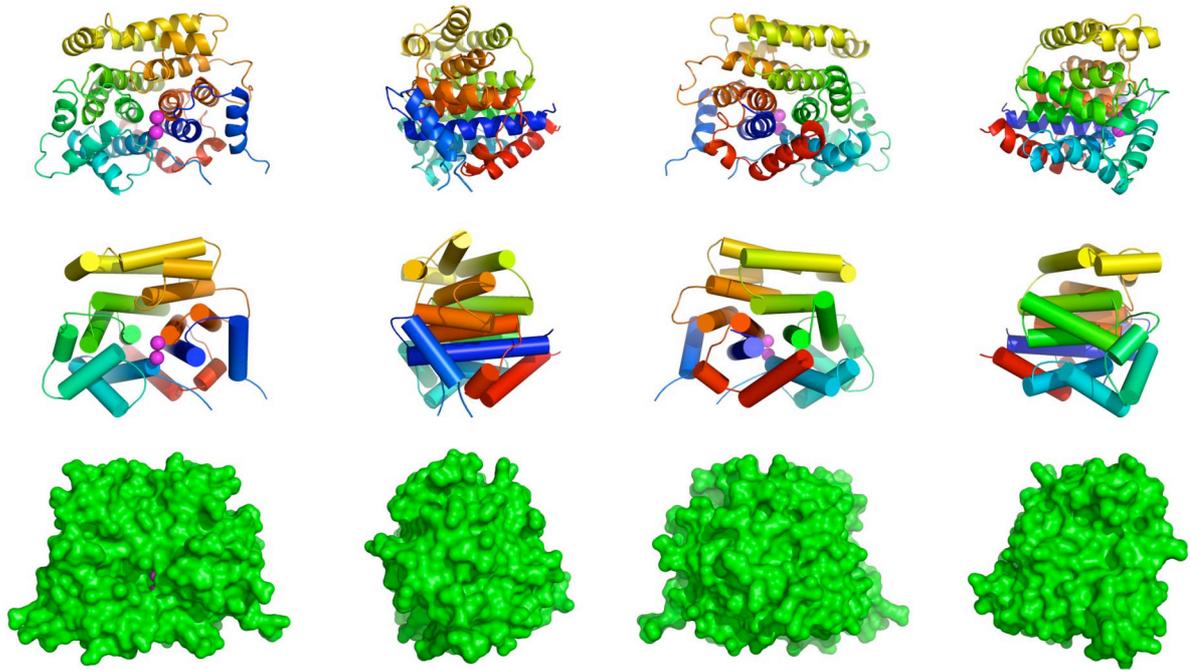


Abb. 5.19 Rotation der hsARH3-Struktur um die z-Achse. Oben ist eine mit einem Farbverlauf vom N- (blau) zum C-Terminus (rot) kolorierte *Cartoon*-Darstellung der 2foz-Struktur gezeigt. In der Mitte ist eine gleich kolorierte vereinfachte *Cartoon*-Darstellung mit geglätteten Loops und zylindrischen Helices zu sehen. Die untere Reihe zeigt Oberflächendarstellungen. Magnesiumionen sind als magentafarbene Sphären gezeigt. In vier Spalten ist eine Rotation der Struktur um die Z-Achse um jeweils 90° gezeigt.

Abb. 5.19 zeigt eine Rotation der hsARH3 Δ L Struktur um die z-Achse. Die Einzelbilder ergeben sich jeweils nach einer Rotation um 90°. Oben ist die *Cartoon*-Darstellung gezeigt. In der Mitte ist eine vereinfachte *Cartoon*-Darstellung mit zylindrischen Helices und geglätteten Loops gezeigt, um die Orientierung zu erleichtern. Die untere Zeile zeigt die Oberflächendarstellung des Proteins ohne gebundene Wassermoleküle. Magnesiumionen sind als magentafarbene Sphären dargestellt. Durch die Rotation kann man die Dimensionen des Proteins von ca. 62 x 53 x 50 Å erkennen. N- und C-Terminus des Proteins liegen benachbart zueinander (ca. 18 Å Abstand) auf der gegenüberliegenden Seite des Proteins. Die N-terminale Deletion des ARH3-Proteins scheint die Faltung nicht zu stören, der entsprechende Bereich des Proteins würde am N-Terminus (blau) angeknüpft sein.

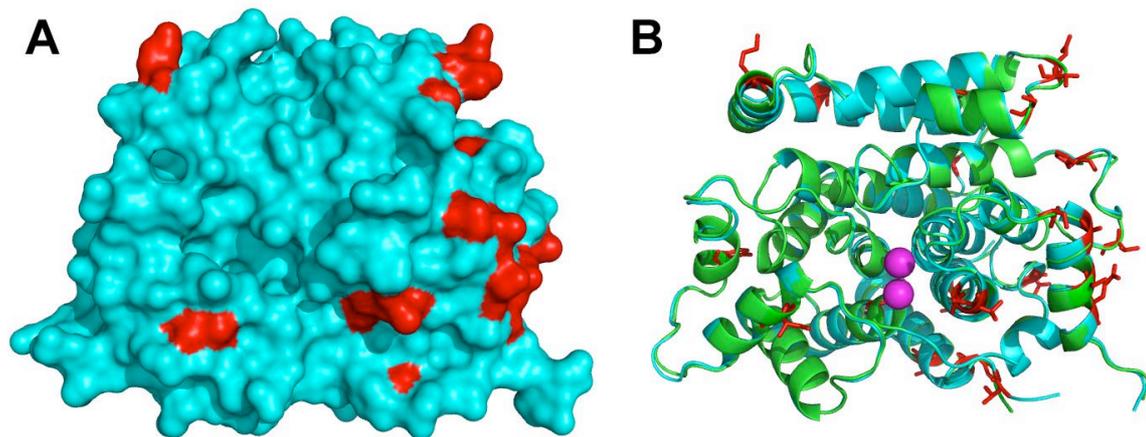


Abb. 5.20 Die 3D-Struktur von mmARH3ΔL. Eine Oberflächendarstellung von mmARH3ΔL ist in A gezeigt. Unterschiede zur hsARH3-Sequenz sind rot markiert. Abb. B zeigt eine Überlagerung der hsARH3ΔL-2foz-Struktur (grün) mit mmARH3ΔL (cyan). Aminosäuren, die sich von der hsARH3-Sequenz unterscheiden sind als rotes Stabmodell gezeigt. Magenta gefärbte Sphären sind Magnesiumionen. Die Orientierung von mmARH3ΔL entspricht derjenigen von hsARH3ΔL in den vorhergehenden Abbildungen.

Abb. 5.20 zeigt eine Oberflächendarstellung der Struktur von mmARH3ΔL (A) und eine Überlagerung der hsARH3ΔL (2foz) und mmARH3ΔL Struktur (B). Erkennbar ist die fast optimale Überlagerung von hsARH3ΔL (grün) und mmARH3ΔL (cyan). Aminosäuren der mmARH3ΔL Struktur, die sich von hsARH3ΔL unterscheiden, sind rot markiert. Die Unterschiede beschränken sich im Wesentlichen auf die Oberfläche des Proteins, das putative aktive Zentrum ist unverändert.

In Abb. 5.21 sind die Magnesium-koordinierenden Zentren der verfügbaren ARH3-Strukturen dargestellt. Hierfür wurden die C_α-Positionen der Magnesium-koordinierenden Aminosäuren überlagert. In Teil A sind die Aminosäuren als Stabmodell gezeigt, Sauerstoffatome sind rot und Stickstoffatome sind blau eingefärbt. Über die Aminosäuren ist eine halbtransparente Oberflächendarstellung der jeweiligen Struktur projiziert. Magnesiumionen sind als halbtransparente magentafarbene bzw. gelbe Sphären gezeigt. Mögliche Koordinationen sind als gelbe gestrichelte Linien dargestellt.

Erkennbar ist, dass die Koordination der Magnesiumionen in der mmARH3-Struktur fast perfekt der Bindung in hsARH3-2foz entspricht (linke Teilabbildungen). In diesen beiden Strukturen ist auch die Aminosäure Glu25 an der Koordination beteiligt. Da Glu25 von oben an Magnesiumion II bindet, ergibt sich eine „geschlossene“ Konformation. Hingegen ist Glu25 in den beiden Protomeren des monoklinen hsARH3-Kristalls nicht an der Magnesiumkoordination beteiligt und die Magnesiumionen sind zugänglich (rechte Teilabbildungen). Glu25 ist in den beiden Protomeren in zwei unterschiedlichen Konformationen vor und ist deutlich weiter von den Magnesiumionen entfernt, was sich durch die Bewegung des Loops zwischen Helix 1 (A) und Helix 2 (A') weg vom putativen aktiven Zentrum erklärt (siehe Abb. 5.18).

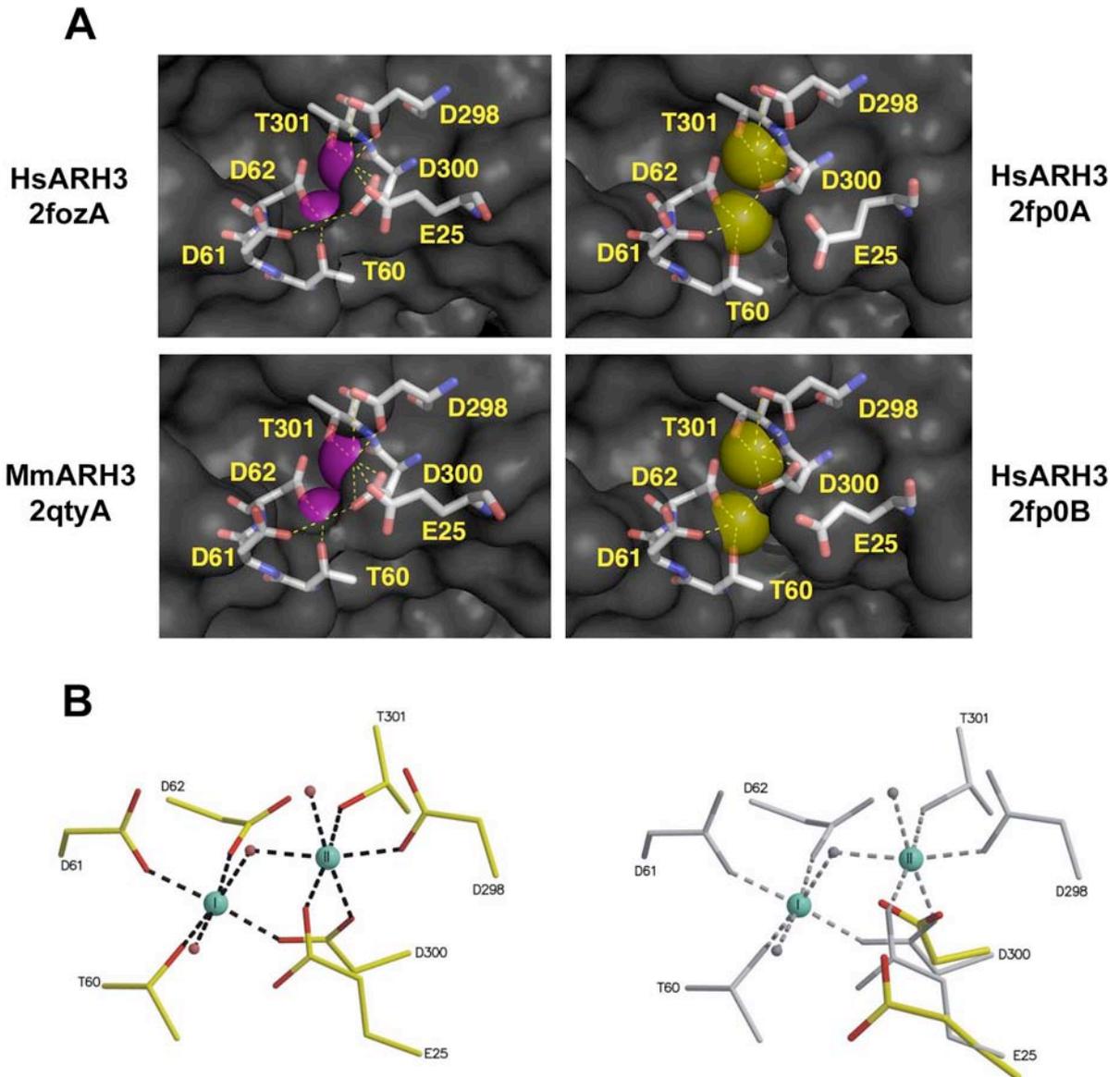


Abb. 5.21 Magnesium-Koordination in den verschiedenen ARH3-Strukturen. Die C_{α} -Positionen der Magnesium-koordinierenden Aminosäuren von 2foz, 2fp0A, 2fp0B und 2qty wurden überlagert. Teil A zeigt die Magnesium-koordinierenden Aminosäuren als Stabmodelle mit roten Sauerstoff- und blauen Stickstoffatomen unter einer halbtransparenten Oberflächendarstellung der jeweiligen Struktur. Die Magnesiumionen sind als magentafarbene (2foz und 2qty) bzw. gelbe (2fp0A und 2fp0B) halbtransparente Sphären gezeigt. Gelbe gestrichelte Linien zeigen mögliche Koordinierungen mit einer Länge von 2,1 bis 3,1 Å an. Die Koordination der Ionen ist bei 2foz und 2qty praktisch identisch. In den beiden 2fp0-Strukturen ist Glu25 von den Magnesiumionen wegbewegt und liegt in zwei unterschiedlichen Konformationen vor. In Teil B ist links die Koordination in 2foz mit koordinierten Wassermolekülen gezeigt. Asp300 und ein Wassermolekül verbrücken die beiden Magnesiumionen. Die Koordination der Magnesiumionen erfolgt in optimaler hexagonaler Geometrie. Rechts sind in grau die Aminosäuren von 2foz gezeigt, darüber projiziert sind diejenigen Aminosäuren aus 2fp0A, die sich deutlich verlagert haben. Man erkennt die Wegbewegung von Glu25, das nicht länger Magnesiumion II koordiniert und die Drehung von Asp300, das seinen bidentalen Charakter verloren hat.

In Teil B von Abb. 5.21 ist die Magnesiumkoordination in 2fozA einschließlich der an die Magnesiumionen koordinierten Wassermoleküle gezeigt (links). Unterschiede zu dieser Koordination, wie sie in 2fp0A auftreten, sind rechts farbig überlagert. Erkennbar ist eine optimale hexagonale Koordination der Magnesiumionen in 2fozA. Die beiden Ionen werden durch ein Wassermolekül und Asp300 verbrückt. In der 2fp0A-Struktur dreht sich Asp300 in Richtung Mg II und Glu25 bewegt sich weg von Mg II.

Docking von ADPR an ARH3

Die Strukturlösung von hsARH3 mit gebundener ADP-Ribose durch Kokristallisation oder Tränken von hsARH3-Kristallen mit ADP-Ribose war nicht möglich. Deshalb wurden *docking*-Experimente durchgeführt, um ein Modell der Substratbindung an ARH3 zu entwickeln. Vorhergehende Experimente identifizierten hsARH3 als ein Poly-ADP-Ribose abbauendes Enzym. Als Minimalbestandteil des Substrats kann freie ADP-Ribose betrachtet werden. Durch Einsatz des rekombinanten Proteins für eine isothermische Kalorimetrie konnte gezeigt werden, dass hsARH3 tatsächlich Mono-ADP-Ribose mit mikromolarer Affinität bindet ($K_D = 1,6 \mu\text{M}$) (Müller-Dieckmann, C. et al. 2006). Die Vertiefung in der hsARH3 Δ L-Struktur, die die gebundenen Magnesiumionen enthält, diente als Ansatzpunkt, um die ADPR-Bindungsstelle und damit das aktive Zentrum zu identifizieren. Hierzu wurde die Bindung von ADPR an die hsARH3-Struktur mit Hilfe eines *Docking*-Programms (FlexX unter Zuhilfenahme von Sybyl) simuliert und optimiert. Dockingexperimente wurden von Michael Lisurek (Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin) durchgeführt. Sowohl ADP-Ribose als auch ADP-Ribosyl-ADP-Ribose wurden als Liganden benutzt. Abb. 5.22 zeigt eins von vier signifikanten Dockingergebnissen für ADPR mit einer Wertungszahl von 5 aus 5. Hierbei bindet ADPR in die erkennbare Vertiefung des Proteins, wobei die „terminale“ ADPR-Gruppe, die in PAR die zu spaltende Bindung trägt, in der Nähe der Magnesiumionen zu liegen kommt. Auch die beiden Phosphatgruppen sind in der Vertiefung des Proteins gebunden, hingegen gibt es weniger Wechselwirkungen mit dem Adenosinanteil des Liganden.

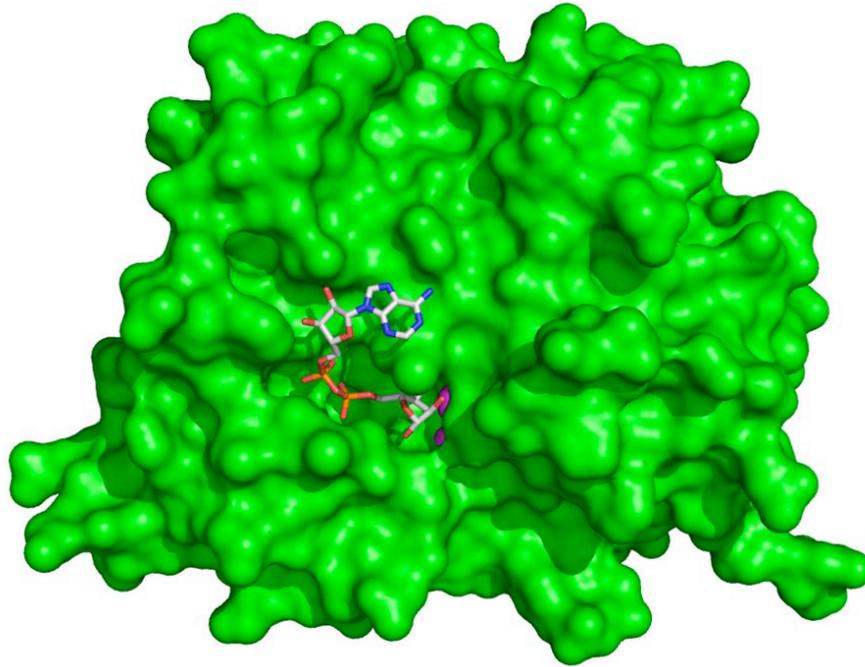


Abb. 5.22 Docking von ADP-Ribose an die hsARH3 Δ L-Struktur. Eines von vier ähnlichen Docking-Ergebnissen ist gezeigt. ADP-Ribose bindet in einer Vertiefung in der Nähe der Magnesiumionen. Die „terminale“ Ribosegruppe, an der die zu spaltende Bindung im Fall von PAR sitzt, bindet in der Nähe der Magnesiumionen.

Die anderen signifikanten Dockingergebnisse zeigen eine praktisch identische Positionierung der „terminalen“ Ribose- und der daran anschließenden Phosphatgruppe, jedoch geringe Bewegungen der zweiten Phosphatgruppe und Rotationen der Adeninbase. ADP-Ribosyl-ADPR bindet in den Simulationen im Wesentlichen äquivalent zur gezeigten ADP-Ribosegruppe, jedoch ist in den erhaltenen Dockingergebnissen nicht die zu spaltende Bindung im aktiven Zentrum, sondern die zweite ADPR-Gruppe schließt sich an die Ribose des Adenylateils von ADPR an. Die zweite ADPR-Gruppe zeigt eine deutlich größere Variabilität in den möglichen Bindungsmodi. Als verlässlicher Konsensus der verschiedenen *docking*-Experimente erscheint deshalb der Bindungsmodus von ADPR wie in Abb. 5.22 gezeigt.

5.2.4 Strukturgeleitete Mutagenese von ARH3

Die *docking*-Ergebnisse wurden genutzt, um eine strukturgeleitete Mutagenese des ARH3-Proteins durchzuführen.

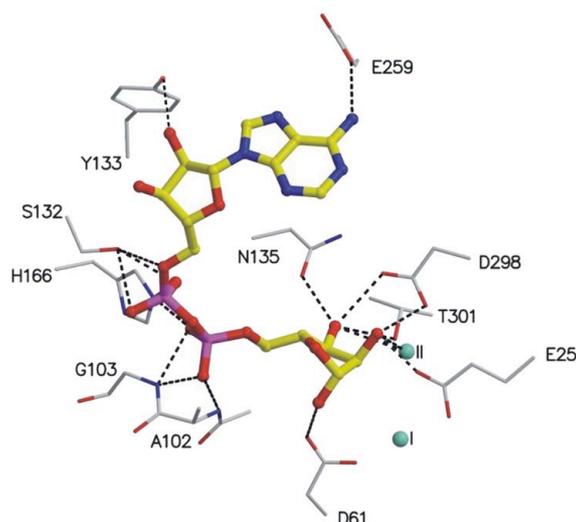


Abb. 5.23 Simulierte Bindung von ADP-Ribose an hsARH3. Die vergrößerte Darstellung zeigt ADPR als Stabmodell. Aminosäuren, die in der Simulation Wasserstoffbrücken zum Liganden eingehen, sind als Linienmodell gezeigt. Die Wasserstoffbrücken zu den Aminosäuren und die polaren Kontakte zu Magnesium II sind als gestrichelte Linien gezeigt.

Abb. 5.23 zeigt vergrößert die simulierte Bindung von ADP-Ribose an hsARH3 und das Wasserstoffbrückennetzwerk. Nur jeweils eine positive Wechselwirkung wird für die Adeninbase (Glu259) und die Adenosin-Ribose (Y133) vorhergesagt. An der Mehrzahl der Interaktionen sind hingegen die Phosphatgruppen und die „terminale“ Ribosegruppe beteiligt. Das α -Phosphat von ADPR wird durch Wasserstoffbrückenbindungen von Ser132 und His166, das β -Phosphat durch Wechselwirkungen mit Stickstoffatomen aus den Peptidbindungen von Ala102 und Gly103 gebunden. Fünf Aminosäurereste befinden sich in Wasserstoffbrückenabstand zu den Hydroxygruppen der „terminalen“ Ribosegruppe. Vier dieser fünf Aminosäuren (Glu25, Asp61, Asp298 und Thr301) sind auch an der Magnesiumbindung beteiligt (siehe Abb. 5.21). Als fünfte Aminosäure tritt Asn135 auf. Auch das Magnesiumion II befindet sich im richtigen Abstand zur Ribosegruppe, um durch die C_2' -Hydroxygruppe koordiniert zu werden. Alle Aminosäurepositionen, an denen Seitenkettenatome an der Wechselwirkung beteiligt sind, wurden durch zielgerichtete Mutagenese verändert. In Tab. 5.4 sind alle erzeugten Mutanten aufgelistet und ihre Expressierbarkeit aufgeführt.

Tab. 5.4 Zusammenfassung erzeugter Mutanten des hsARH3ΔL Proteins.

Mutation	Art der Mutation	Exprimierbarkeit
hsARH3ΔL E25A	nicht konservativ	gut
hsARH3ΔL E25Q	konservativ	gut
hsARH3ΔL D61N	konservativ, ungeladen	gut
hsARH3ΔL S132A	Verlust der Hydroxygruppe	gut
hsARH3ΔL Y133A	nicht konservativ	gut
hsARH3ΔL N135A	nicht konservativ	mittelmäßig
hsARH3ΔL N135H	möglichst konservativ	nicht exprimierbar
hsARH3ΔL H166A	nicht konservativ	sehr gering
hsARH3ΔL H166Q	möglichst konservativ	gut
hsARH3ΔL E259A	nicht konservativ	mittelmäßig
hsARH3ΔL D298A	nicht konservativ	neigt zu Aggregation
hsARH3ΔL D298E	konservativ, länger	gut
hsARH3ΔL D298N	konservativ, ungeladen	gut
hsARH3ΔL T301A	nicht konservativ	gut
hsARH3ΔL T301S	konservativ	gut

Löslich exprimierbare Varianten konnten für eine Untersuchung der Enzymaktivität herangezogen werden. Die Proteine wurden wie in Abschnitt 4.4.4 beschrieben jeweils frisch aus dem Bakterienpellet einer 20 ml Expressionkultur aufgereinigt. Abb. 5.24 zeigt jeweils 200 ng der Proteine, die für den Assay eingesetzt wurden und belegt die gleichmäßige Proteinmenge in den verschiedenen Ansätzen sowie die Reinheit der eingesetzten Proteine. Geringe Unterschiede im Migrationsverhalten der Proteine erklären sich durch die unterschiedliche Größe der Mutanten.

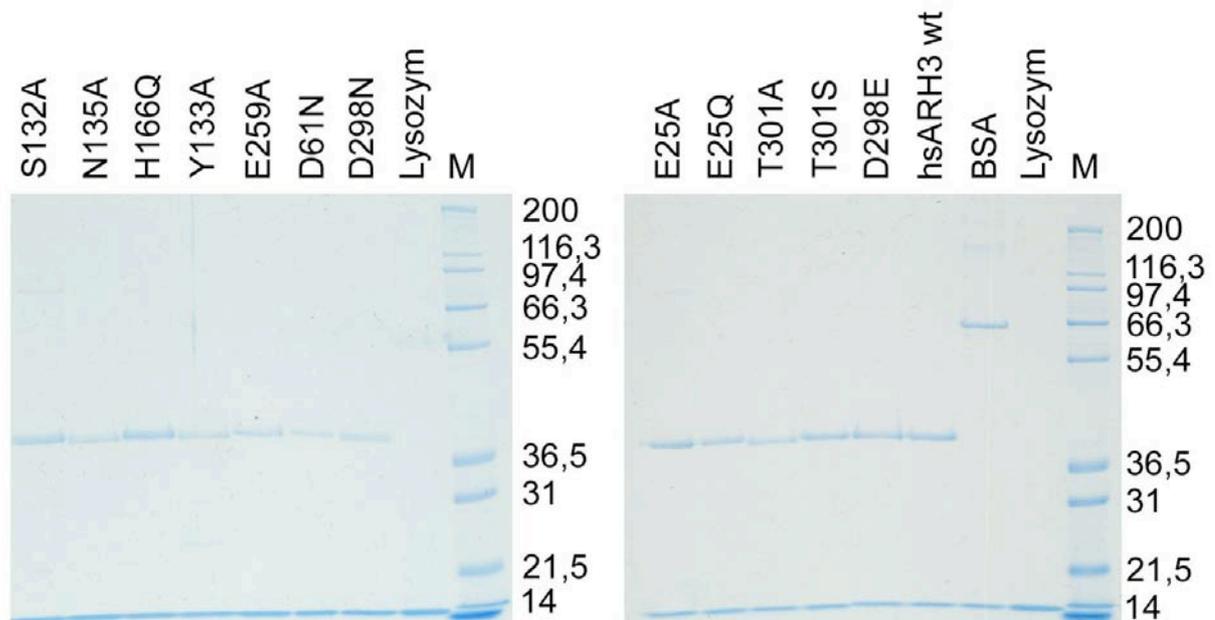


Abb. 5.24 Kontrolle der für die enzymatische Untersuchung eingesetzten Proteine. 4 µl der vorverdünnten Proteine (jeweils 200 ng der hsARH3ΔL-Proteine bzw. BSA) für die enzymatische Untersuchung in Abb. 5.25 wurden auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Proben enthielten bereits 200 ng Lysozym (Bande bei 14 kd). Kontrollansätze mit ausschließlich Lysozym enthielten 400 ng Lysozym. Die Reinheit und vergleichbare Konzentration der eingesetzten Proteine ist ersichtlich.

Für die enzymatische Charakterisierung wurde analog zum De-poly-ADP-Ribosylierungsassay verfahren (siehe Abschnitte 4.8.4 und 5.2.2), allerdings wurde eine Verdünnung der ARH-Proteine zu je fünf verschiedenen Zielkonzentrationen (333 ng, 111 ng, 37 ng, 12,3 ng und 4,1 ng) vorgenommen und die Demodifikationsreaktion wurde bereits nach 30 Minuten abgebrochen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung konnte die im Substrat verbliebene PAR durch Autoradiographie ermittelt und durch densitometrische Auswertung des Röntgenfilms quantifiziert werden. Auf jedem Gel wurde als Kontrolle die Inkubation mit 1 µg Lysozym durchgeführt. Die Gesamtmenge an zugesetztem Protein wurde in allen Ansätzen mit Lysozym auf 1 µg eingestellt. Abb. 5.25 zeigt die Analyse von vier exemplarischen Proteinen, hsARH3ΔL-wt, hsARH3ΔL T301A, hsARH3ΔL T301S und als Negativkontrolle bovines Serumalbumin (BSA).

Abb. 5.26 zeigt die densitometrische Auswertung dieses Versuchs. Dargestellt ist die jeweils verbleibende Schwärzung des Röntgenfilms bezogen auf die Schwärzung des Kontrollansatzes mit 1 µg Lysozym auf dem gleichen Gel. In Schwarz sind hsARH3ΔL wildtyp bzw. BSA dargestellt. Die hsARH3-Mutanten sind als farbige Linien dargestellt, wobei rote Linien Positionen bezeichnen, die an der Bindung der „terminalen“ Ribosegruppe beteiligt sind. Blaue Linien markieren Mutanten der phosphatbindenden Positionen, magenta bzw. grün sind die Linien für mit der Adenosin-Ribose (Y133) bzw. der Adeninbase (E259) interagierende Reste. Während mit 4,1 ng wildtyp hsARH3ΔL über die Hälfte der inkorporierten Aktivität freigesetzt werden kann, kann bei zahlreichen Mutanten auch bei Gegenwart der achtzigfachen Proteinmenge keine Abnahme festgestellt werden, vielmehr verhalten sie sich indifferent zum Substrat, ebenso wie BSA. Zu den inaktiven Mutanten zählen D61N, D298E, T301A und die beiden Mutanten der phosphatbindenden Reste S132A und H166Q. Eine minimale Restaktivität haben hsARH3ΔL E25A, E25Q, Y133A und D298N. Eine deutliche Restaktivität weisen die Mutanten N135A und T301S auf. Die Mutante E259A unterscheidet sich in ihren enzymatischen Eigenschaften nicht vom Wildtypenzym.

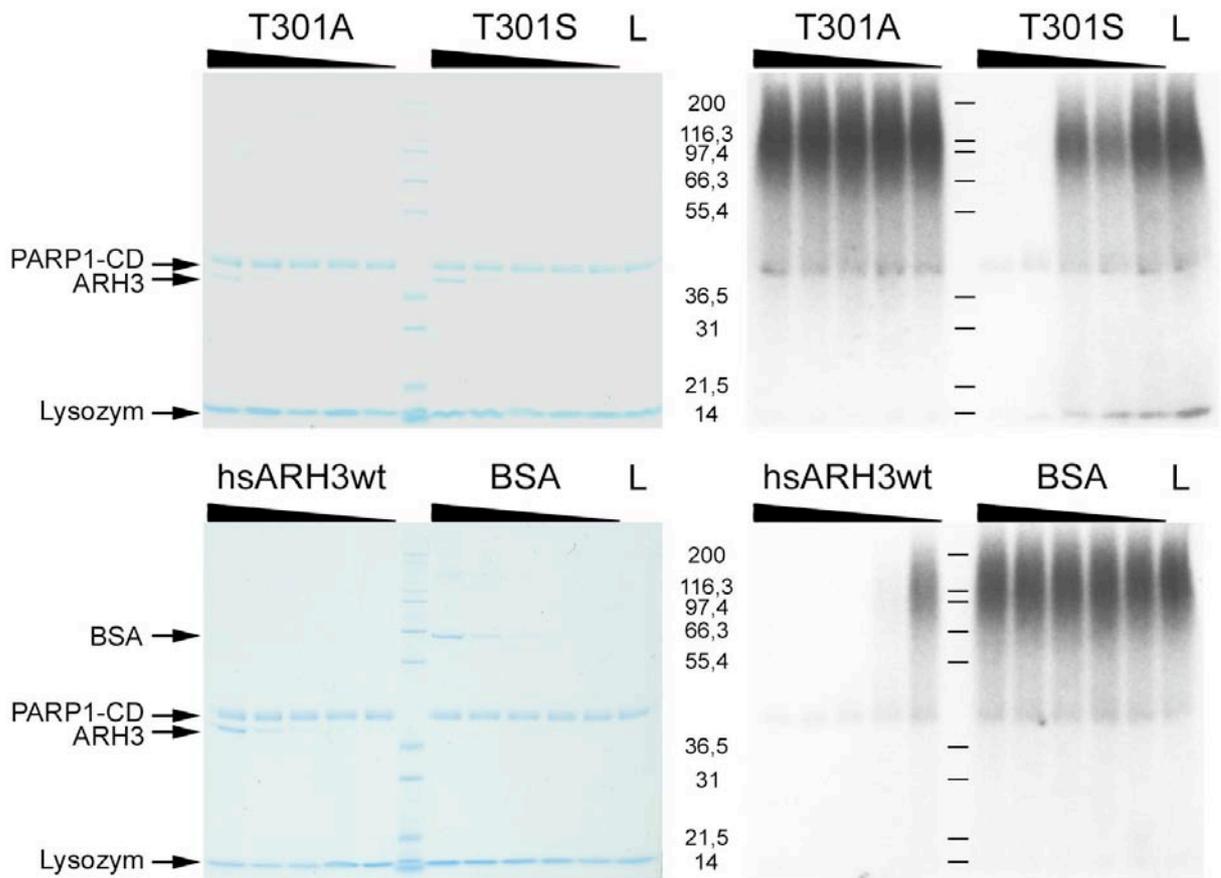


Abb. 5.25 Enzymatische Charakterisierung von hsARH3-Mutanten. Die in Abb. 5.24 dargestellten Proteine wurden in fünf seriellen 1:3 Verdünnungsschritten (333 ng, 111 ng, 37 ng, 12,3 ng, 4,1 ng) für einen De-poly-ADP-Ribosylierungsassay eingesetzt. Zunächst wurde PARP1-CD (100 µg/ml, 500 ng/Ansatz) in Gegenwart von 400 ng (80 µg/ml) Fischspermien-DNA und 1 µM ³²P-NAD durch Inkubation für 1 h bei 37 °C auto-poly-ADP-ribosyliert. Durch Gelfiltration wurde nicht umgesetztes NAD entfernt. Aliquote der PARsilierten PARP1-CD wurden mit den vorbereiteten Proteinverdünnungen vereinigt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgter Reaktion wurden die Ansätze per SDS-PAGE analysiert, gefärbt, getrocknet und Autoradiogramme angefertigt. Das verbleibende PAR-Signal zwischen 66 und 200 kd wurde densitometrisch quantifiziert. Auf jedem Gel wurde hierfür als Negativkontrolle ein Ansatz mit ausschließlich Lysozym (L) mitgeführt. Exemplarisch sind hier vier Analysen gezeigt. hsARH3wt führt bei 4,1 ng zu einer Reduktion der PAR, mit 12,3 ng ist die PAR praktisch vollständig abgebaut. Bei BSA sieht man wie bei der inaktiven Mutante hsARH3 T301A keine Aktivität. Die Mutante hsARH3 T301S zeigt noch eine Restaktivität und baut in hohen Konzentrationen die PAR vollständig ab.

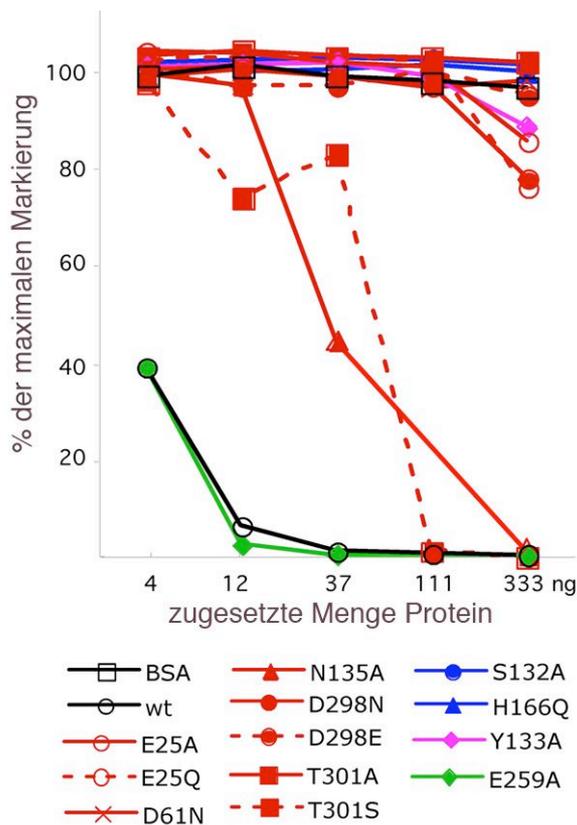


Abb. 5.26 Densitometrische Auswertung der enzymatischen Charakterisierung verschiedener hsARH3 Varianten. Das verbleibende PAR-Signal zwischen 66 und 200 kd nach Inkubation mit der angegebenen Menge Protein für 30 min bei 37 °C wurde densitometrisch quantifiziert und auf das PAR-Signal des Ansatzes auf dem gleichen Gel bezogen, der nur mit Lysozym inkubiert wurde. Rot sind Positionen, die an der Bindung der „terminalen“ Ribosegruppe beteiligt sind, blau sind Positionen, die die Phosphatgruppe des Adenylatanteils binden. Magenta und grün sind Reste, die mit der Adenosin-Ribosegruppe bzw. der Adeninbase wechselwirken. In schwarz sind hsARH3ΔL (wt) und BSA gezeigt.

In Abb. 5.27 sind die untersuchten Mutanten auf eine Oberflächendarstellung der hsARH3-Struktur projiziert. Gezeigt ist die Struktur 2fp0, da die relevanten Bereiche wegen der offenen Konformation leichter einsehbar sind. Rot zeigt Positionen, deren Mutagenese in mindestens einem Fall zu einem vollständigen oder fast vollständigen Verlust der Enzymaktivität führt. In orange sind Positionen gezeigt, deren Mutagenese die Enzymaktivität einschränkt, aber nicht vollständig zerstört. Hierzu zählt neben N135A auch noch die Mutagenese von Thr301 zu Serin (hier nicht gezeigt). Interessanterweise tritt Serin an dieser Stelle in drei anderen Mitgliedern der ARH-Familie auf, mjARH, hsARH1 und mmARH1. In grün sind Positionen von hsARH3 gezeigt, deren Mutagenese im Rahmen dieser Untersuchung (E259A) oder Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (E222, E223, E245 und E246) (Oka et al. 2006) keinen Effekt auf die Enzymaktivität zeigt.

Mutagenesen an allen durch das *docking*-Experiment implizierten Positionen außer E259 zeigen eine deutliche Einschränkung der Aktivität. Nur die Mutagenese von E259, eine Position die weit entfernt vom putativen Reaktionszentrum liegt und die nicht in allen erhaltenen *docking*-Ergebnissen als Bindungspartner konserviert war, zeigt keinen Effekt auf die Enzymaktivität. Das gleiche gilt für Mutagenesen anderer Glutamatreste auf der Proteinoberfläche, die ebenfalls weit entfernt vom aktiven Zentrum liegen. Helix D, die in Mutagenesen von *Rhodospirillum rubrum* DRAG und ARH1 als potentiell regulatorisch wichtiger Bereich identifiziert wurde, liegt tatsächlich in der Nähe des aktiven Zentrums.

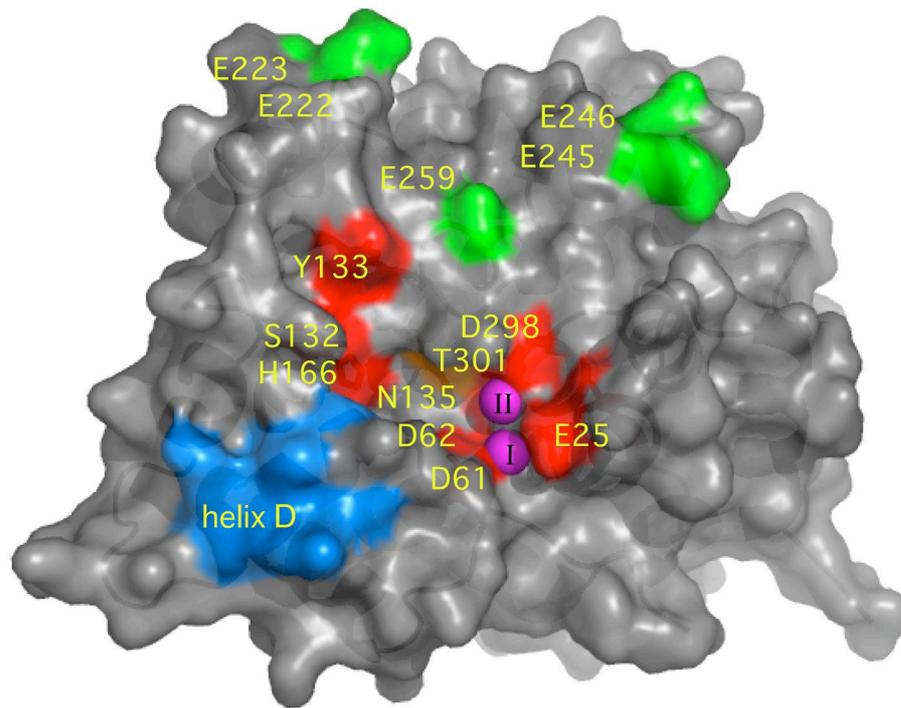
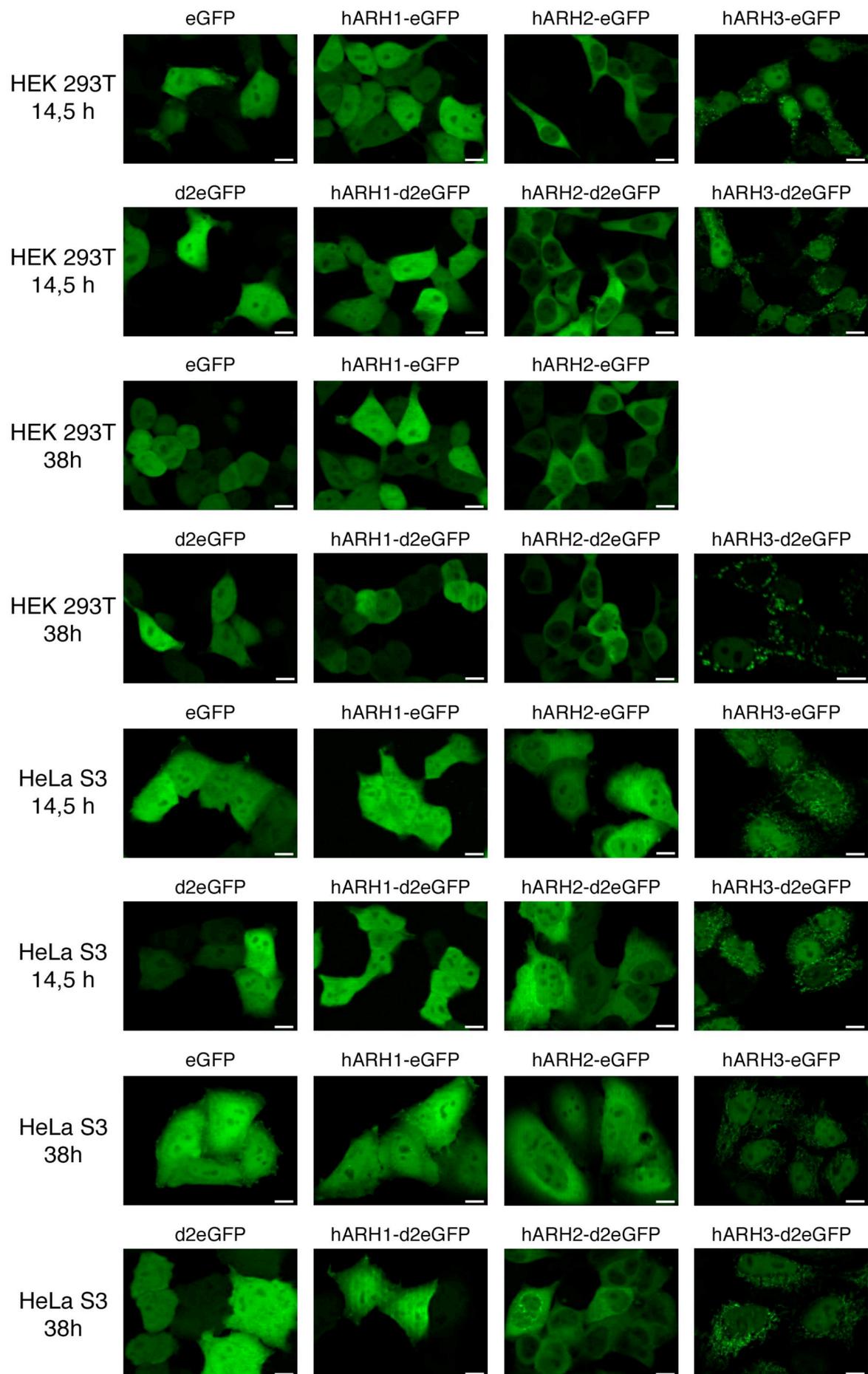


Abb. 5.27 Effekt und Position untersuchter hsARH3-Mutanten. Auf eine Oberflächendarstellung der 2fp0-Struktur wurden die modifizierten Aminosäuren projiziert. Rot zeigt Funktionsverlust des Enzyms bei mindestens einer der analysierten Substitutionen, orange eine Einschränkung der Enzymaktivität, grün zeigt keinen Effekt auf die Enzymaktivität an. In blau ist Helix D, ein in anderen ARH-Proteinen regulatorisch wichtiger Bereich gezeigt (siehe Diskussion). Positionen D62, E222-223 und E245-246 wurden von Oka et al. charakterisiert und nicht im Rahmen dieser Arbeit untersucht (Oka et al. 2006).

Primern wurden Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen in das Amplifikat eingeführt, die eine Klonierung der ARHs in den entsprechend geschnittenen Vektor peGFP-N1 erlauben. Für ARH1 und ARH2 entspricht die Umgebung des Startcodons weitgehend einer Kozak-Konsensus-Sequenz (Kozak 1987). Für ARH3 wurden 5' des Startcodons gelegene Nukleotide mit dem Primer eingeführt, um auch hier eine Kozak-Konsensus-Sequenz zu erzeugen und eine vergleichbare Expression der verschiedenen ARHs zu erreichen. Nach der Klonierung entsteht ein Expressionskonstrukt, das im Falle von peGFP-N1 ein Fusionsprotein aus N-terminaler hsARH mit nativem N-Terminus gefolgt von einem 7 Aminosäuren langen Verbindungsstück und dem C-terminalen eGFP (*enhanced green fluorescent protein*), einer rotverschobenen und für die Expression in Säugetierzellen optimierten Variante des GFP (*green fluorescent protein*) aus *Aequorea victoria* kodiert. Der Vektor pd2eGFP-N1 ist ein Derivat des peGFP-N1-Vektors, der zusätzlich C-terminal des eGFPs eine prolin-, glutamat-, serin- und threoninreiche (PEST) Sequenz kodiert. Die PEST-Sequenz ist eine Bindungsstelle für Ubiquitin-Ligasen und führt zu einem proteasomvermittelten Abbau des Fusionsproteins mit einer auf ca. zwei Stunden reduzierten Halbwertszeit. Die Inserts der peGFP-N1-Plasmidserie wurden mit den gleichen Restriktionsendonukleasen ausgeschnitten und in pd2eGFP-N1 umklontiert. Alle sechs ARHs aus *H. sapiens* und *M. musculus* wurden in peGFP-N1 und pd2eGFP-N1 kloniert (siehe Abschnitt 4.3.2). Alle erhaltenen Konstrukte wurden durch Sequenzierung des ARH-Inserts überprüft.

Abb. 5.29 zeigt mikroskopische Immunfluoreszenzaufnahmen von transient mit ARH-eGFP Expressionsvektoren transfizierten Zellen. Die Transfektion erfolgte mit dem Transfektionsreagenz jetPEI parallel in vier verschiedene adhärent wachsende Zelllinien: CHO, 293T, HeLa S3 und L929. 14,5 h und 38 h nach Transfektion wurden optische Schnitte der lebenden Zellen aufgenommen. Wie der Kontrollvektor, der nur eGFP kodiert, kommt es auch beim hsARH1-eGFP Fusionskonstrukt zu einer cytosolischen und nukleären Färbung. Im Unterschied hierzu zeigt hsARH2 eine cytosolische Färbung, die Kerne sind jedoch bis auf einen geringen Hintergrund ausgespart. Dieser Effekt zeigt sich am deutlichsten bei 293T-Zellen und tritt bei L929-Zellen nicht auf. hsARH3 zeigt eine deutliche granuläre perinukleäre Färbung, jedoch keine cytosolische Färbung. Darüber hinaus ist das Nukleoplasma in hsARH3-transfizierten Zellen angefärbt. Dieses Fluoreszenzmuster tritt einheitlich in allen untersuchten Zelllinien auf. Die Zelllinien unterscheiden sich hauptsächlich durch die Expressionsstärke, die bei den *large-T*-Antigen-positiven Zelllinien CHO und 293T stärker ist sowie durch die Transfektionseffizienz, die bei den L929-Zellen deutlich geringer ist. Die Verwendung des pd2eGFP-Konstrukts führt zu gleichen Ergebnissen im Falle von hsARH1, hsARH2 und von eGFP allein. Allerdings tritt bei ARH3 eine leichte Reduktion der Kernfärbung im Verhältnis zur mitochondrialen Anfärbung auf, die wahrscheinlich auf einen bevorzugten proteasomvermittelten Abbau des nukleären Fusionsproteins zurück zu führen ist. Auch im zeitlichen Verlauf 14,5 h und 38 h nach Transfektion kommt es zu keiner Veränderung des Fluoreszenzmusters. Fusionsproteine mit mmARHs zeigten identische Fluoreszenzmuster (Daten nicht gezeigt).



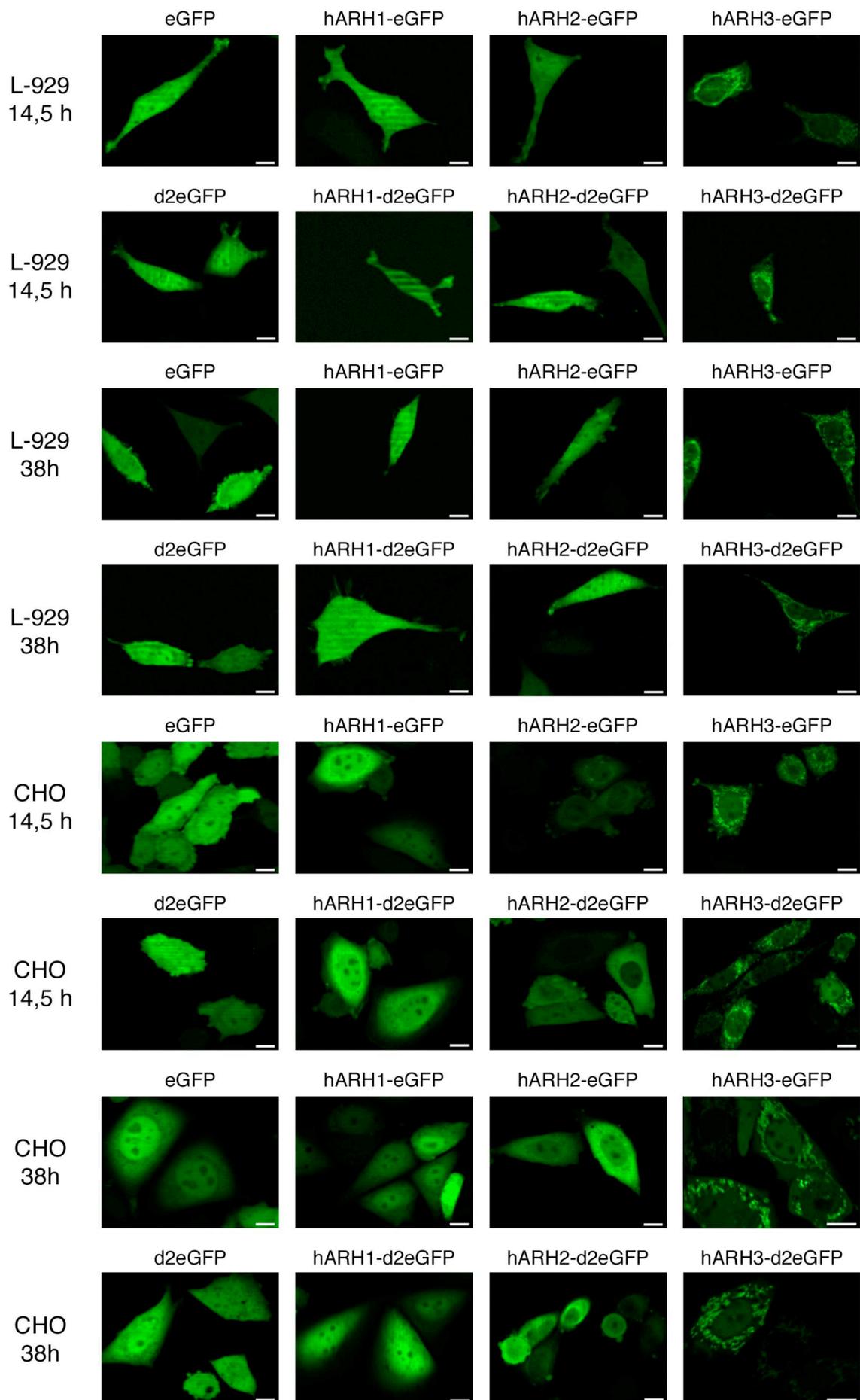


Abb. 5.29 Fluoreszenzmuster von hsARH-eGFP-Fusionsproteinen. Acht verschiedene Expressionskonstrukte für eGFP und d2eGFP bzw. Fusionsproteine der drei hsARHs mit diesen Reportern wurden parallel in 293T, HeLa S3, L929 und CHO Zellen transfiziert. Nach 14,5 und 38 h wurden optische Schnitte der Zellen angefertigt. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 µm. Die Aufnahmen wurden mit einem Plan Neofluar 40x/0,75 NA Objektiv angefertigt. Die Aufnahmen der hsARH3-transfizierten 293T und CHO-Zellen wurden mit einem Plan Apochromat 63x/1,25 NA Ölimmersionsobjektiv angefertigt. Die Aufnahme der hsARH3-eGFP-transfizierten 293T Zellen 38 h nach Transfektion wurde nicht aufgenommen, das Fluoreszenzmuster entsprach aber dem bei hsARH3-d2eGFP-Transfektion.

Abb. 5.30 zeigt die eGFP-Fluoreszenz von stabil transfizierten T-REx 293 Flp-In Zellen, 24 h nach Induktion der Expression von d2eGFP, hsARH1-d2eGFP, hsARH2-d2eGFP bzw. hsARH3-d2eGFP (siehe Abschnitt 4.5.4). Es handelt sich hier um konventionelle mikroskopische Aufnahmen und nicht um optische Schnitte. Auch hier ist eine cytosolische und nukleäre Expression von hsARH1-d2eGFP und d2eGFP feststellbar, hsARH2-d2eGFP ist im Zellkern schwächer vertreten als im Cytosol. hsARH3-d2eGFP zeigt eine nukleäre und perinukleär-granuläre Anfärbung. Ein Effekt der Transfektion auf die Immunfluoreszenzmuster kann damit auch ausgeschlossen werden.

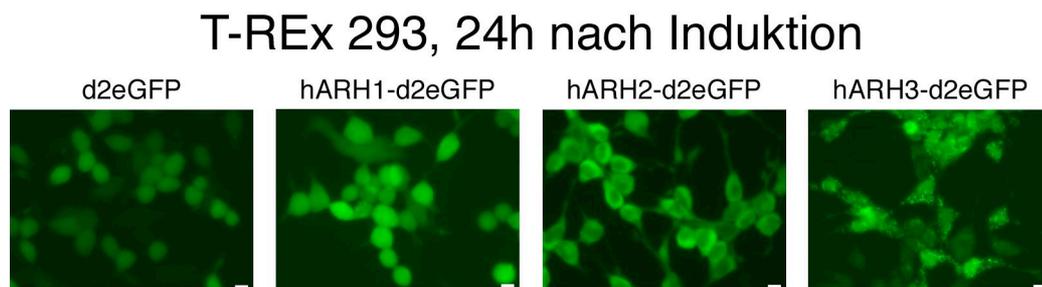


Abb. 5.30 Fluoreszenzmuster von ARH-d2eGFP-Fusionsproteinen in stabil transfizierten Zellen. 24 h nach Induktion der Expression des Fusionsproteins mit 1 µg/ml Doxycyclin wurden konventionelle mikroskopische Aufnahmen mit einem PlanApochomat 20x/0,8 NA Objektiv angefertigt. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm.

5.3.3 Mitochondriale Lokalisation von hsARH3

Um die Identität der Granula zu überprüfen, in denen ARH3 lokalisiert ist, wurden HeLa Zellen mit hsARH3-eGFP Expressionskonstrukt transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit MitoTracker Red (reduzierte Form) angefärbt. Der Farbstoff MitoTracker Red (reduzierte Form) kann als nichtfluoreszierende Vorstufe per Diffusion in die Zellen gelangen und akkumuliert in der Mitochondrienmembran. Dort wird er ausschließlich in aktiv respirierenden Mitochondrien zur fluoreszierenden Form oxidiert und gleichzeitig durch eine nukleophile Substitution kovalent an mitochondrialen Bestandteilen fixiert. Überschüssiger Farbstoff wurde durch Mediumwechsel ausgewaschen. Anschließend wurde ein Stapel optischer Schnitte mit unterschiedlicher Fokustiefe (z-Stapel) aufgenommen um die räumliche Verteilung des Fusionsproteins und der Mitochondrien in den Zellen zu ermitteln. Die

Aufnahmen sind hier in zwei verschiedenen Darstellungen gezeigt. Abb. 5.31 zeigt einen z-Stapel in Aufsicht in erweiterter Fokus-Darstellung (*extended focus image*). Hierbei werden die einzelnen optischen Schnitte übereinander projiziert und es wird jeweils die Bildebene mit der höchsten Signalintensität im jeweiligen Kanal ausgewählt. Da die Signalintensität von Strukturen dann maximal ist, wenn sie in der Fokusebene des Mikroskops abgebildet werden, entsteht so ein Überlagerungsbild, in dem man gleichzeitig Strukturen auf unterschiedlichen Bildebenen scharf darstellen kann, es entsteht der Eindruck eines erweiterten Fokus. Die beiden linken Teilabbildungen zeigen den Rot- bzw. den Grünkanal, die rechte Teilabbildung zeigt die Überlagerung. Weiterhin ist über und rechts von den Teilabbildungen jeweils eine Seitenansicht in x-z bzw. y-z Projektion gezeigt.

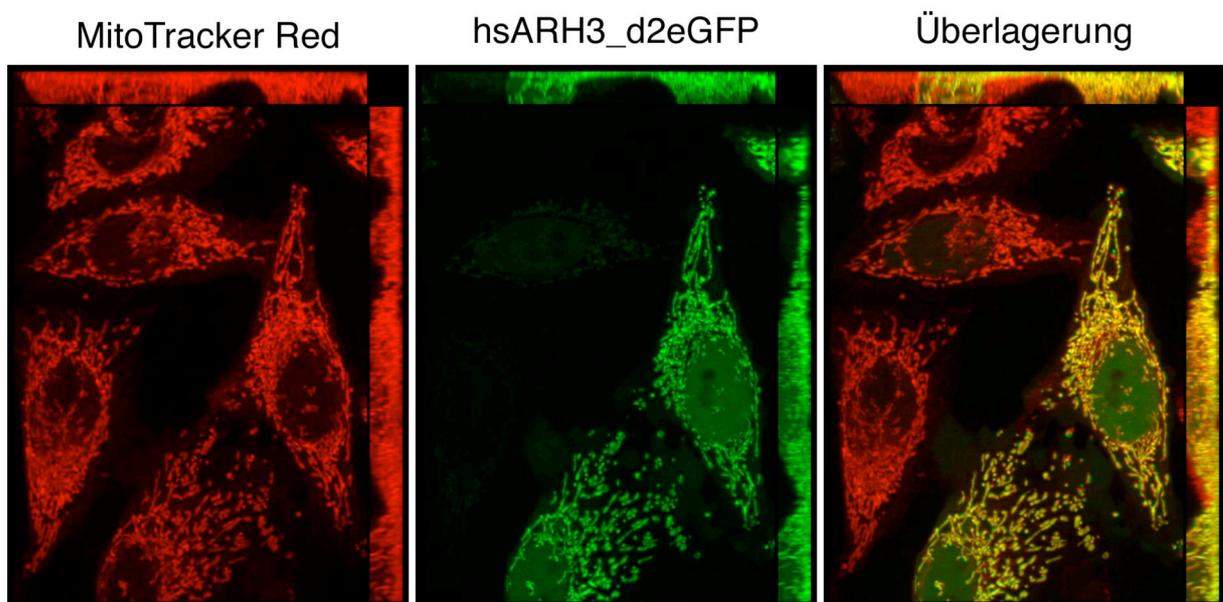


Abb. 5.31 **Kolokalisation von hsARH3 mit MitoTracker Red.** HeLa-Zellen wurden mit hsARH3-eGFP-Expressionskonstrukt transfiziert und 24 h nach Transfektion mit 750 nM MitoTracker Red (reduzierte Form) gefärbt. Ein z-Stapel aus optischen Schnitten wurde mit einem Plan-Apochromat 63x/1,25 NA Ölimmersionsobjektiv angefertigt. Die Abbildung zeigt den z-Stapel in erweiterter Fokusdarstellung als Überlagerung aller Einzelbilder. Über und neben dem jeweiligen Bild sind Projektionen in x-z und y-z-Richtung gezeigt. Die Farbkanäle sind einzeln und als Überlagerung gezeigt. Man erkennt die hsARH3-eGFP-Fluoreszenz in Mitochondrien und im Zellkern, während MitoTracker Red nur die Mitochondrien anfärbt.

Abb. 5.32 zeigt eine Folge von Teilbildern des gleichen z-Stapels, die Fokusposition ist jeweils links oben angegeben. Bei den Bildern handelt es sich um Überlagerungen des Rot- und Grünkanals, gelbe Pixel zeigen eine Kolokalisation des Fusionsproteins mit dem MitoTracker Red Farbstoff an.

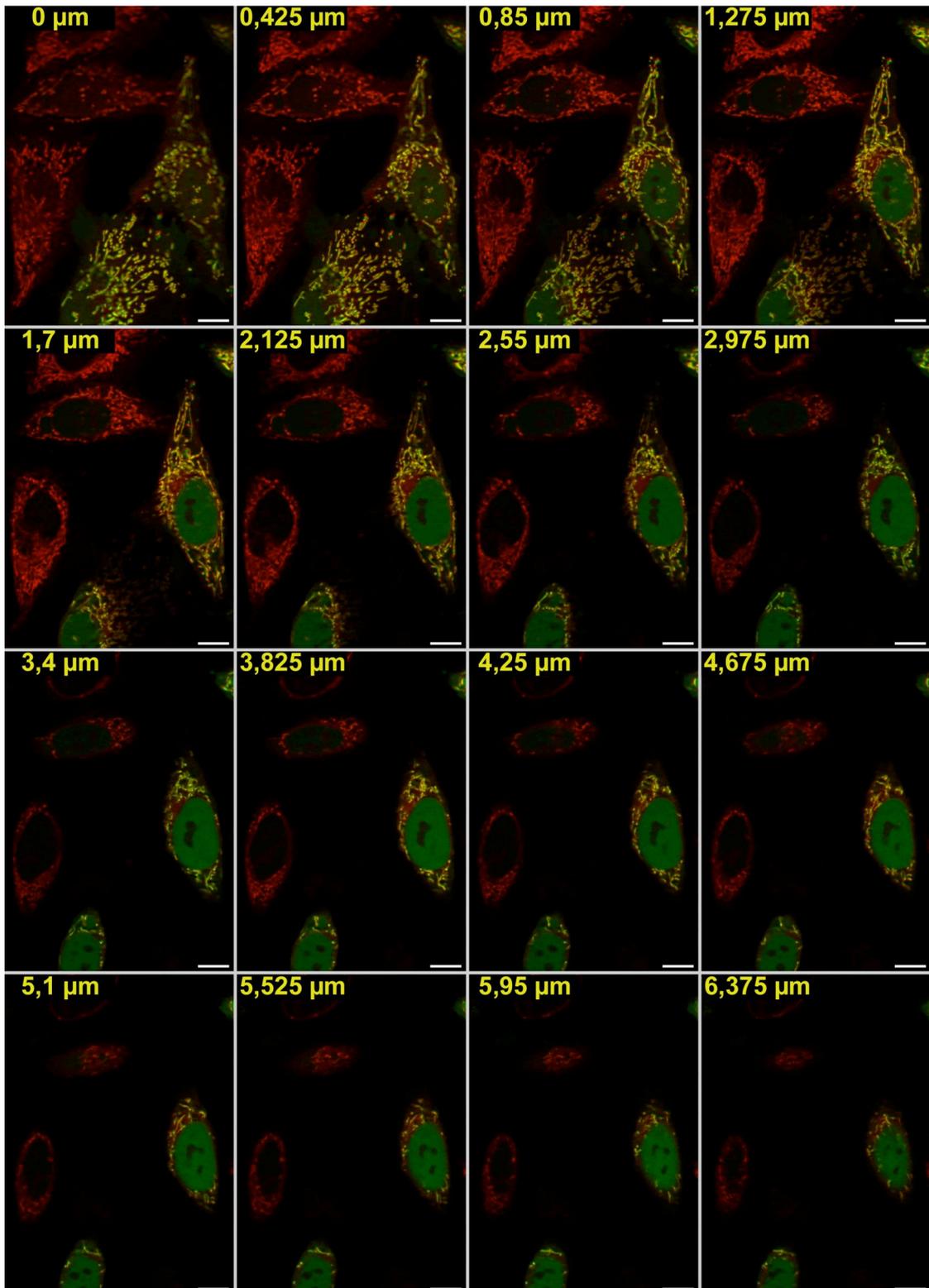


Abb. 5.32 Kolokalisation von hsARH3 mit MitoTracker Red. HeLa-Zellen wurden mit hsARH3-eGFP-Expressionskonstrukt transfiziert und 24 h nach Transfektion mit 750 nM MitoTracker Red (reduzierte Form) gefärbt. Ein z-Stapel aus optischen Schnitten wurde mit einem Plan-Apochromat 63x/1,25 NA Ölimmersionsobjektiv angefertigt. In der Abbildung sind Überlagerungen des Rot- und Grünkanals der verschiedenen Schnittebenen nebeneinander gezeigt, in gelb ist die jeweilige relative Fokusposition angegeben. Man erkennt die hsARH3-eGFP-Fluoreszenz in Mitochondrien und im Zellkern, während MitoTracker Red nur die Mitochondrien anfärbt.

Im Bild erkennbar sind zwei stark eGFP-positive Zellen rechts bzw. unten sowie benachbart dazu zwei sehr schwach eGFP-positive Zellen. Zwei weitere Zellen links oben im Bild sind eGFP-negativ. In den einzelnen optischen Schnitten wie auch in den Seitenansichten des z-Stapels ist erkennbar, dass die HeLa-Zellen abgeplattet an der Oberfläche der Kulturschale festgewachsen sind. Der Zellkern ist die höchste Erhebung im Profil der Zelle. Entsprechend findet sich der überwiegende Anteil der mitochondrialen Anfärbung im flachen Bereich des Zellprofils nahe der Oberfläche der Kulturschale (Fokuspositionen 0 bis 1,7 μm). Oberhalb von 2,55 μm ist die eGFP-Färbung des Kerns dominant. Mitochondrien sind jedoch auch hier noch erkennbar und aufgrund des Zellprofils auf den perinukleären Bereich beschränkt.

Man erkennt eine deutliche Kollokalisierung des granulären Fluoreszenzanteils des ARH3-eGFP Fusionsproteins mit der MitoTracker Red Anfärbung. Sowohl in den Einzelbildern als auch in der erweiterten Fokus-Darstellung sind die gleichen Strukturen transfizierter Zellen in beiden Kanälen detektierbar. In untransfizierten Zellen ist nur die MitoTracker Red Fluoreszenz nachweisbar, was ein Überstrahlen der Fluorochrome vom Rot- in den Grünkanal ausschließt. Weiterhin ist die Kernfärbung durch ARH3-eGFP in den transfizierten Zellen deutlich erkennbar. Auch hier kommt es zu keinem Überstrahlen in den anderen Kanal. Da die erweiterte Fokus-Darstellung jeweils die höchsten Signalintensitäten darstellt, ist hier auch deutlich erkennbar, dass die eGFP-Signalintensität in den Mitochondrien höher ist als im Zellkern, was auch dem optischen Eindruck bei konventionellen Mikroskopieaufnahmen entspricht. Jedoch ist das Volumen des Zellkerns besonders durch dessen Ausdehnung in Z-Richtung deutlich größer und daher eine Aussage über den Anteil an Fusionsprotein, der im mitochondrialen bzw. nukleären Kompartiment lokalisiert ist, nicht möglich.

Um eine mögliche proteolytische Spaltung des Fusionsproteins mit einer artifiziellen Anreicherung des eGFP im Zellkern auszuschließen, wurden HeLa und CHO Zellen nach Transfektion mit peGFP-N1 ohne Insert bzw. hsARH3-eGFP-Expressionskonstrukt lysiert (siehe Abschnitt 4.5.5), die Proteine wurden einer SDS-PAGE unterzogen und ein Westernblot mit anschließender Immunodetektion des eGFP-Anteils mit monoklonalem Antikörper wurde durchgeführt. Abb. 5.33 zeigt die Ergebnisse der Immunodetektion.

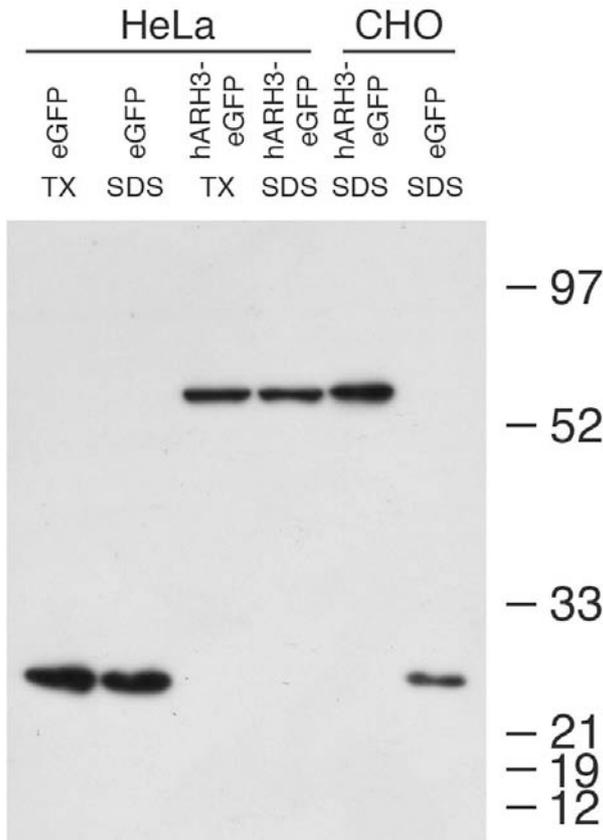
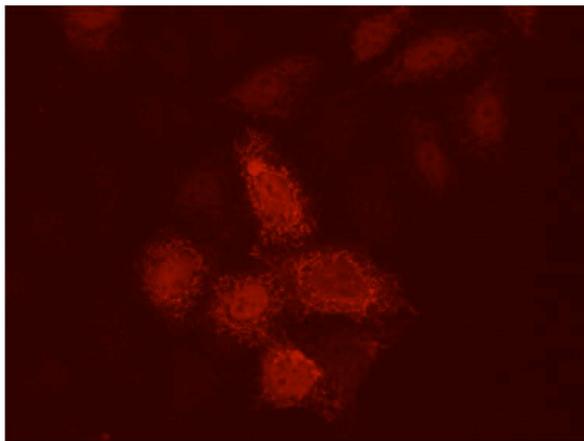
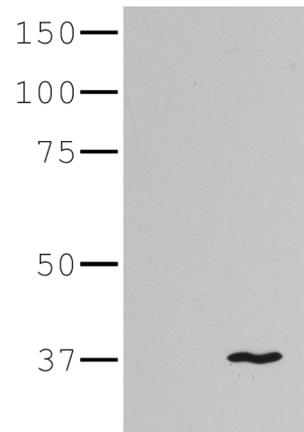


Abb. 5.33 Westernblot zur Detektion von eGFP und hsARH3-eGFP aus Zelllysaten transfizierter Zellen. Transfizierte HeLa und CHO Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit den angegebenen Konstrukten durch Trypsinierung geerntet und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellzahl der Suspension wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. 10^6 Zellen wurden mit 200 μ l 1 % Triton X-100 (TX) oder 1 % SDS lysiert und die Zelllysate wurden einer SDS-PAGE und einem Westernblot unterzogen. Pro Spur wurden 65000 Zelläquivalente geladen. eGFP wurde durch einen monoklonalen Antikörper detektiert (1:5000).

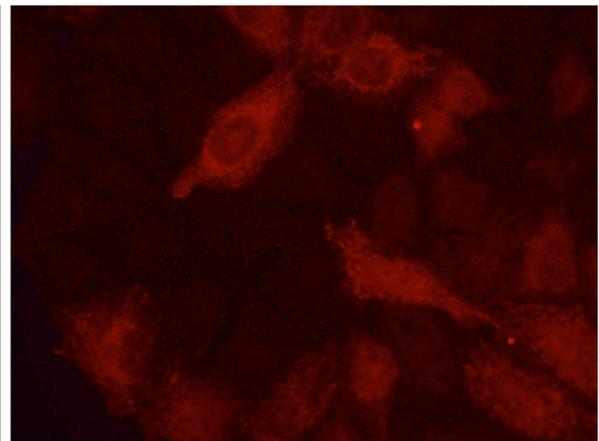
HeLa-Zellen wurden parallel mit 1 % TX-100 und 1 % SDS lysiert. Die SDS-Lyse führt zu einer sofortigen Lyse der Zellkerne und setzt die DNA aus dem Zellkern frei, daher muss vor der Gelelektrophorese mechanisch die DNA geschert werden um die Viskosität zu reduzieren. Hierbei ist zu erwarten, dass auch nukleäre Proteine gelöst werden. Bei der Lyse mit TX-100 werden die Zellkerne permeabilisiert, aber nicht vollständig denaturiert. Unabhängig von der Lyse werden eGFP und hsARH3-eGFP wie erwartet bei Proteingrößen von ca. 25 kd und ca. 60 kd detektiert. Berechnet wurden Molekulargewichte der Proteine von 26,9 kd bzw. 66,6 kd. Im Falle von hsARH3-eGFP ist jedoch keine niedrigmolekulare Bande erkennbar, die auf eine proteolytische Spaltung schließen ließe. Dies legt den Schluss nahe, dass es sich bei der mikroskopisch festgestellten nukleären eGFP-Fluoreszenz tatsächlich um ein Fluoreszenzsignal des intakten Fusionsproteins handelt.

Für hsARH3 wurde zusätzlich ein pFLAG-N1_hARH3, ein Konstrukt mit C-terminalem FLAG-Epitop kloniert, um auszuschließen, dass eGFP einen Effekt auf die mitochondriale oder die nukleäre Lokalisation zeigt (siehe Abschnitt 4.3.2). Im Westernblot (Abb. 5.34) erkennt man, dass in Ganzzelllysaten transfizierter Zellen eine einzelne Bande bei 37 kd durch den FLAG-spezifischen M2-Antikörper detektiert wird. Immunfluoreszenzanfärbungen von hsARH3-FLAG transfizierten Zellen wurden durchgeführt (Abb. 5.35).

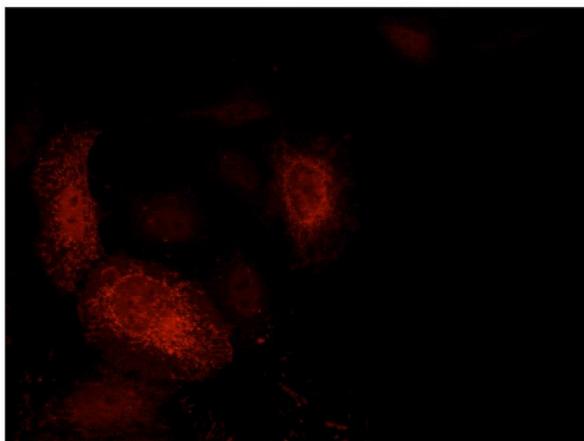
Abb. 5.34 Westernblot zur Detektion von hsARH3-FLAG. HeLa S3-Zellen wurden mit Leervektor (Spur links) oder mit pFLAG-N1_hsARH3 transfiziert (rechts). 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 1 % TX-100 lysiert und einer SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot unterzogen. Der Proteingehalt der Lysate wurde durch Quantifizierung mit der BCA-Färbereaktion ermittelt. Pro Spur wurden 25 µg Protein geladen. Der gleichmäßige Transfer der Proteine wurde durch Ponceau S Färbung der PVDF-Membran kontrolliert. Die Detektion des FLAG-markierten Proteins erfolgte durch den M2-Antikörper (1:5000).



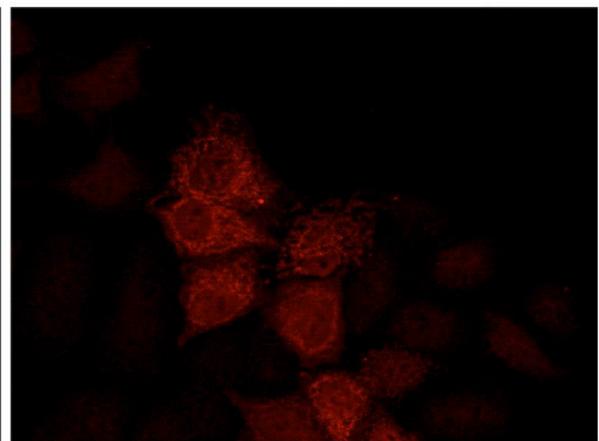
pAk anti-FLAG, anti-KaninchenIg-PE



M2 mAk anti-FLAG - anti-MausIg-PE



RG18.15 mAk anti hsARH3 - antiRattenIg-PE



RG18.89 mAk anti-mm/hsARH3 - antiRattenIg-PE

Abb. 5.35 Immunfluoreszenzmikroskopische Detektion überexprimierter hsARH3. HeLa S3 Zellen wurden mit dem pFLAG-N1_hsARH3 Vektor transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert. Das rekombinante Protein konnte mit polyklonalem Kaninchen Anti-FLAG-Antikörper und mit M2-Antikörper über die FLAG-Markierung nachgewiesen werden. Auch die direkte Detektion unter Verwendung der selbst erzeugten monoklonalen Antikörper RG18.15 und RG18.89 gelang. Es zeigt sich eine deutliche mitochondriale Anfärbung und eine nukleäre Anfärbung. Die Aufnahmen wurden mit einem Plan Neofluar 40x/0,75 NA Objektiv angefertigt. Konventionelle Aufnahmen wurden von mit Anti-FLAG-Antikörper, optische Schnitte von mit Anti-ARH3-Antikörpern behandelten Zellen gemacht.

Das rekombinante Protein ist in transfizierten Zellen mit FLAG-spezifischen affinitätsaufgereinigten polyklonalen Kaninchenantikörpern und mit FLAG-spezifischen monoklonalen Mausantikörpern detektierbar (obere Teilbilder). Auch die selbst hergestellten ARH3-spezifischen monoklonalen Antikörper RG18.15 und RG18.89 detektieren das rekombinante Protein (untere Teilbilder) (siehe Abschnitt 4.5.6). In allen vier Anfärbungen sind eine starke mitochondriale und eine nukleäre Lokalisation nachweisbar.

5.3.4 Generierung intramitochondrialer Poly-ADP-Ribose *in vivo*

Um zu testen, ob hsARH3 auch unter physiologischen Bedingungen in der Lage ist, PAR abzubauen, wurde in Kooperation mit Dr. Marc Niere (Universität Bergen, Norwegen) ein Assaysystem etabliert, das mitochondrial lokalisierte PAR in intakten Zellen einem Abbau durch überexprimierte ARH3 unterwirft. Hierzu wurden eukaryotische Zellen mit dem Vektor pCMV/myc/mito_eGFP-PARP1 transfiziert, der die Expression eines Fusionsproteins aus eGFP und der katalytischen Domäne von PARP1 verursacht. Durch die artifiziell eingeführte mitochondriale Importsignalsequenz von Untereinheit 8A der Cytochrom C Oxidase wird das Fusionsprotein in die Mitochondrien importiert. Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 10H anti-PAR lässt sich die Akkumulation von PAR in der Immunfluoreszenz und im Westernblot nachweisen. Die Kotransfektion von hsARH3 Expressionsvektoren ermöglicht die Untersuchung des Einflusses, den hsARH3 auf die intramitochondriale PAR hat.

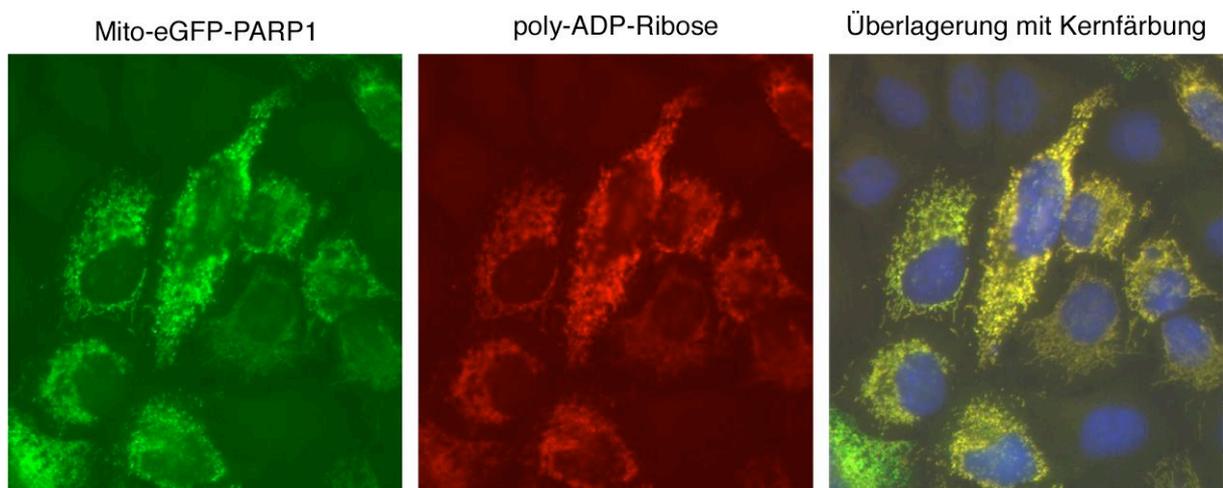


Abb. 5.36 Lokalisation und enzymatische Aktivität von mito-eGFP-PARP1. HeLa S3 Zellen wurden 24 h nach Transfektion fixiert und permeabilisiert. PAR wurde durch polyklonalen Kaninchen anti-PAR Antikörper und PE-konjugierten Ziege anti-Kaninchen-Ig Antikörper nachgewiesen (mittig). Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt (rechts). Das eGFP-Signal (links) kolokalisiert mit dem PAR-Signal (mittig und Überlagerung rechts). PAR ist nur in eGFP-positiven Zellen nachweisbar. Konventionelle mikroskopische Aufnahmen wurden mit einem Plan Neofluar 40x/0,75 NA Objektiv angefertigt.

HeLa S3-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für mito-eGFP-PARP1 transfiziert (Abb. 5.36). Die eGFP-Fluoreszenz zeigt eine granuläre perinukleäre Färbung, im Zellkern ist

keine Färbung nachweisbar. Eine immunocytochemische Anfärbung der Zellen nach Fixierung und Permeabilisierung mit gegen PAR gerichtetem polyklonalem Kaninchen-Antikörper zeigt eine Akkumulation von PAR, die mit der eGFP-Fluoreszenz kolokalisiert. Eine Kontrolltransfektion mit einem Expressionskonstrukt für mito-eGFP zeigt auch in diesem Fall eine mitochondriale eGFP-Fluoreszenz, jedoch ist keine PAR in den Zellen nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Nach Kotransfektion der Expressionsvektoren für mito-eGFP-PARP1 und für hsARH3-FLAG (pFLAG-N1_hsARH3) in HeLa S3 Zellen wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und einer immunocytochemischen Anfärbung mit dem monoklonalen Antikörper M2, der gegen das FLAG-Epitop gerichtet ist, unterzogen (Abb. 5.37). ARH3 zeigt eine granuläre perinukleäre Färbung, die mit der eGFP-Fluoreszenz des mito-eGFP-PARP1-Konstrukts kolokalisiert ist. Darüber hinaus ist hsARH3 auch im Nukleoplasma transfizierter Zellen nachweisbar. Das Fluoreszenzmuster der hsARH3-Lokalisation entspricht der Lokalisation des hsARH3-eGFP Fusionsproteins. Wie bereits gezeigt, (siehe Abb. 5.31 und 5.32) lässt sich eine Kolokalisation des hsARH3-eGFP Fusionsproteins mit MitoTracker Red feststellen, einem Farbstoff, der spezifisch Mitochondrien anfärbt. Neben der nukleären Lokalisation zeigt ARH3 damit auch eine Kolokalisation mit dem durch eine etablierte mitochondriale Importsignalsequenz intramitochondrial lokalisierten mito-eGFP-PARP1 Protein.

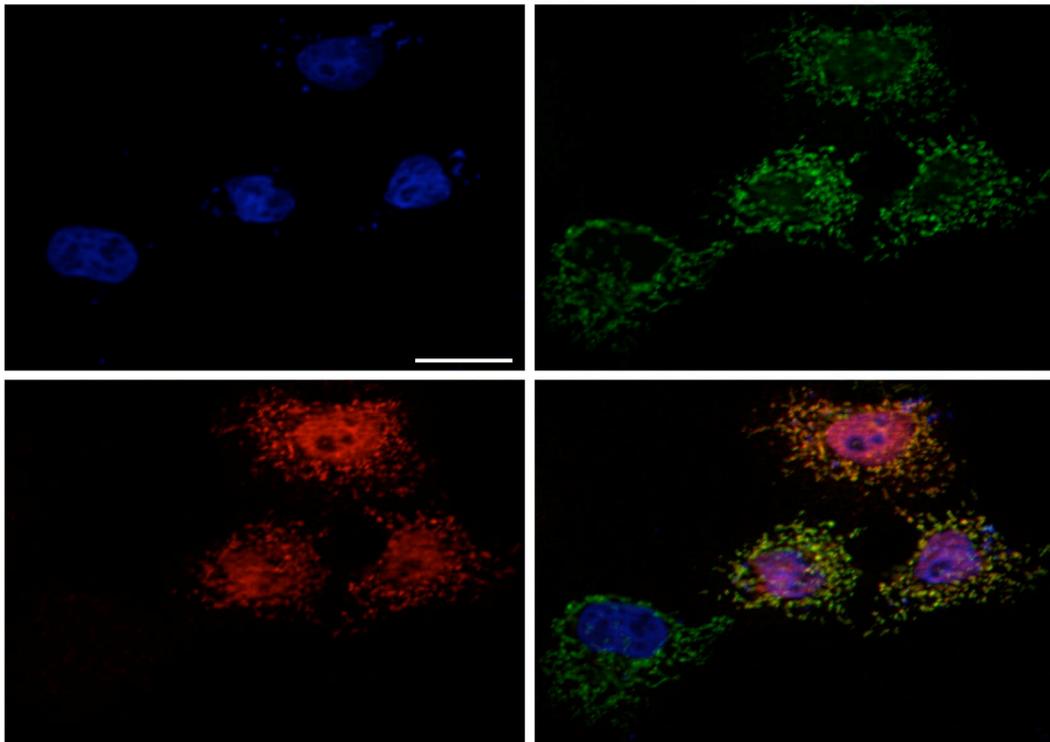


Abb. 5.37 Kolokalisation von Mito-eGFP-PARP1 und hsARH3-FLAG. HeLa S3 Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für Mito-eGFP-PARP1 und hsARH3-FLAG kotransfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen permeabilisiert eine Immunodetektion von hsARH3-FLAG mit dem M2-Antikörper durchgeführt. Gezeigt sind optische Schnitte der Gegenfärbung der Zellkerne mit Hoechst33342 (links oben), der eGFP-Fluoreszenz (rechts oben), der M2-Anfärbung (links unten) und eine Überlagerung der drei Kanäle (rechts unten). Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m. Die Aufnahmen wurden mit einem Plan Apochromat 63x/1,25 NA Ölimmersionsobjektiv angefertigt.

5.3.5 De-poly-ADP-Ribosylierung durch ARH3 *in vivo*

HeLa S3 Zellen wurden entweder mit dem mito-eGFP-PARP1-Konstrukt und dem hsARH3-FLAG-Expressionsvektor oder als Negativkontrolle mit dem mito-eGFP-PARP1-Konstrukt und einem Leervektor transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und einer immunocytochemischen Anfärbung mit 10H-Antikörper anti-PAR und polyklonalem Kaninchen anti-FLAG Antikörper unterzogen (Abb. 5.38). MitoPARP1-positive Zellen sind durch die endogene Fluoreszenz des eGFPs erkennbar. In den Mitochondrien der Kontrollzellen (Teilbilder links oben) kann eine starke PAR-Akkumulation durch die Immunoreaktivität des 10H-Antikörpers nachgewiesen werden, die mit der mitochondrialen eGFP-Färbung kolokalisiert ist. Hingegen ist in den mit hsARH3 kotransfizierten Zellen praktisch keine PAR mehr nachweisbar, diese Zellen zeigen jedoch eine Immunoreaktivität mit dem FLAG-spezifischen Kaninchenserum, was die Anwesenheit des hsARH3-FLAG-Proteins in den Mitochondrien und Kernen der kotransfizierten Zellen anzeigt (Teilbilder rechts oben).

Als sehr seltenes Ereignis (weniger als 0,25 % der eGFP-positiven Zellen) sind in den doppeltransfizierten Ansätzen Zellen erkennbar, die immer noch PAR-positiv sind (Teilbilder rechts unten, gelber Pfeil). Diese Zellen erwiesen sich als FLAG-negativ und stellen nur mit mito-eGFP-PARP1 transfizierte Zellen dar. Benachbarte FLAG-positive Zellen sind PAR-negativ. Als Kontrollexperiment wurden von unserem Kooperationspartner Dr. Marc Niere (Universität Bergen, Norwegen) Zellen mit mito-eGFP-PARP1 und einer FLAG-markierten cytosolisch lokalisierten PARG (cytoPARG) kotransfiziert (Teilbilder links unten). Obwohl das de-poly-ADP-ribosylierende Protein in den Zellen detektiert werden kann, findet kein Abbau der mitochondrialen PAR statt. Die Transfektion einer mitochondrial lokalisierten PARG führt jedoch wie bei hsARH3 zum Abbau der PAR (Daten nicht gezeigt). Dies bestätigt eine Akkumulation von PAR im Inneren der Mitochondrien. Das Substrat ist für cytosolisch lokalisierte Proteine nicht zugänglich. Dadurch spricht wiederum der Abbau der PAR durch hsARH3 für eine intramitochondriale Lokalisation des Proteins und gegen eine bloße Assoziation an Mitochondrien.

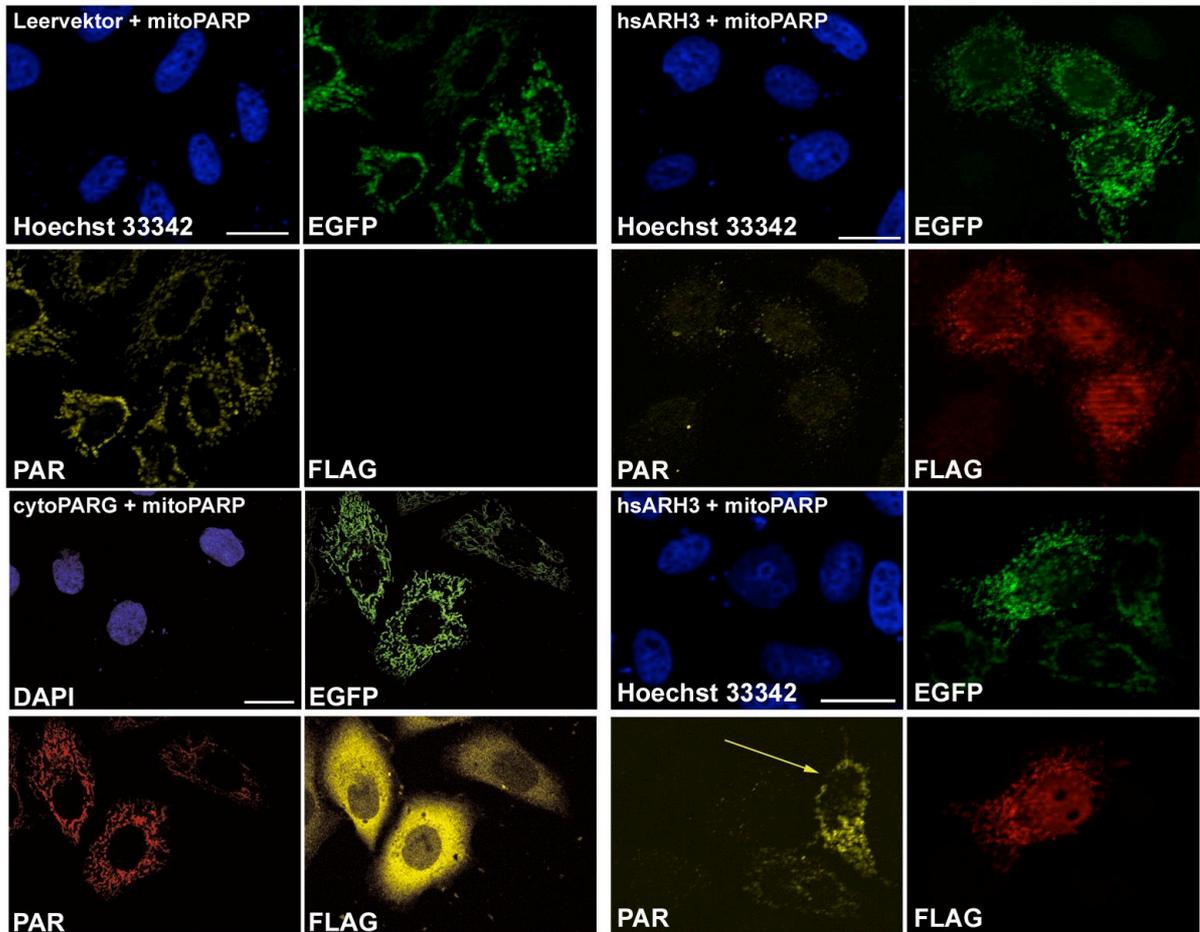


Abb. 5.38 Abbau intramitochondrialer PAR durch hsARH3 *in vivo*. HeLa S3 Zellen wurden mit Mito-eGFP-PARP1 und einem Leervektor, hsARH3-FLAG oder cytoPARG-FLAG transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen permeabilisiert und PAR sowie FLAG-Markierungen wurden über 10H-Antikörper (→ Anti-Maus-Ig PE) bzw. Kaninchen anti-FLAG Antikörper (→ Anti-Kaninchen-Ig Alexa647) detektiert. Bei Kotransfektion eines Leervektors ist ein unverändert starkes PAR-Signal im *far-red*-Kanal detektierbar (Teilbilder links oben). hsARH3 führt zu einem effizienten Abbau der PAR (Teilbilder rechts). Als seltenes Ereignis sind einfach transfizierte Zellen aufzufinden, die immer noch PAR-positiv, jedoch FLAG-negativ sind (Pfeil). Koexpression einer cytosolisch lokalisierten PARG hat keinen Effekt auf die mitochondriale PAR-Akkumulation. Die optischen Schnitte nach Kotransfektion eines Leervektors bzw. von hsARH3 wurden mit einem Plan Achromat 63x/1,25 NA Ölimmersionsobjektiv mit einem Apotome-Schieber angefertigt. Die Aufnahmen der Kotransfektion von cytoPARG wurden von Dr. Marc Niere (Univ. Bergen, Norwegen) an einem konfokalen Laserscanningmikroskop mit einem 63x/1,4 NA Ölimmersionsobjektiv angefertigt (10H → Anti-Maus-Ig Alexa 594 und Kaninchen Anti-FLAG → Anti-Kaninchen Alexa 633).

Um diesen Effekt in einer großen Anzahl Zellen parallel untersuchen zu können wurden stabil transfizierte T-REx 293 Zellen eingesetzt, die induzierbar ein hsARH3-eGFP Fusionsprotein exprimieren (siehe Abschnitt 4.5.4 und Abb. 5.30). Die stabil transfizierten T-REx 293 hsARH3-d2eGFP-Zellen wurden unter Selektionsdruck mit 15 µg/ml Blasticidin S und 200 µg/ml Hygromycin B gehalten. Die entsprechenden Resistenzgene liegen für Hygromycin am Integrationsort der hsARH3-d2eGFP Expressionskassette und für Blasticidin am Genort des Tetracyclin-Repressors. Durch die Doppelselektion werden Zellen selektiert, die noch beide Genorte in transkriptionell aktiver Form enthalten und damit mit hoher Wahrscheinlichkeit auch eine funktionelle Expressionskassette besitzen und konstitutiv den Tetracyclin-Repressor exprimieren.

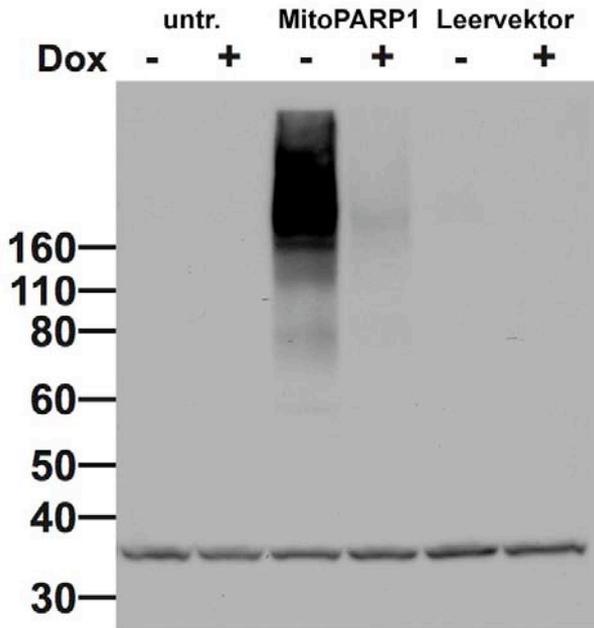


Abb. 5.39 Annähernd vollständiger Abbau mitochondrialer PAR durch hsARH3 *in vivo*. T-REx 293 Flp-In hsARH3-d2eGFP Zellen wurden untransfiziert belassen oder mit Leervektor bzw. MitoPARP-Expressionskonstrukt transfiziert. In einem Teil der Zellen wurde die Expression des hsARH3-d2eGFP-Proteins gleichzeitig durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin induziert. 66 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 1 % SDS in Wasser lysiert. Gleiche Proteinmengen wurden für einen Westernblot eingesetzt (25 µg pro Spur). eIF2α wurde als Ladekontrolle im unteren Teil des Blots detektiert. Im oberen Teil des Blots wurde PAR mit 10H-Antikörper detektiert.

Die T-REx 293 hsARH3-d2eGFP-Zellen wurden auf 35 mm Zellkulturschalen ausplattiert. 24 h später erfolgte die Transfektion von pCMV/Myc/Mito_eGFP-PARP1 bzw. Leervektor pCMV/Myc/Mito mit Effectene Transfektionsreagenz. Kontrollzellen wurden untransfiziert weiterkultiviert. In einem Teil der Ansätze wurde zeitgleich mit der Transfektion die Expression von ARH3 durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin induziert. 66 h nach Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 % SDS in Wasser mit *Complete Protease Inhibitor Cocktail* auf einem Schüttler lysiert. Das Lysat wurde mit einem Zellschaber in ein Reaktionsgefäß überführt und die DNA wurde durch eine Ultraschallbehandlung geschert, um die Viskosität des Lysats herabzusetzen. Zentrifugieren der Lysate entfernte unlösliche Bestandteile (siehe Abschnitt 4.5.5). Ein Aliquot des geklärten Zelllysats wurde für eine Proteinbestimmung verwendet. Für die elektrophoretische Auftrennung wurden je Spur des Polyacrylamid-Gels 25 µg Gesamtprotein geladen. Anschließend wurden die Proteine per Elektrolot auf eine PVDF-Membran übertragen. Durch Ponceau S Färbung wurde eine gleichmäßige Transfereffizienz im gesamten Gel sichergestellt. Die PVDF-Membran wurde blockiert und auf Höhe der 40 kd Markerbande zerschnitten. Der untere Teil des Blots wurde für die Überprüfung der gleichmäßigen Beladung eingesetzt. Hierzu wurde mit einem polyklonalen Antiserum eIF2α detektiert (siehe Abb. 5.39). Auf dem oberen Teil des Blots wurde mit monoklonalem 10H-Antikörper PAR detektiert. In pCMV/Myc/Mito_eGFP-PARP1 transfizierten Zellen zeigt sich eine starke Akkumulation von PAR (Spur 3). Durch Induktion der hsARH3 Expression wird der PAR-Gehalt des Zelllysats fast vollständig abgebaut (Spur 4). Untransfizierte Zellen (Spuren 1 und 2) und mit Leervektor transfizierte Zellen (Spuren 5 und 6) zeigen unabhängig von der ARH3-Induktion keine PAR-Akkumulation.

6. Diskussion

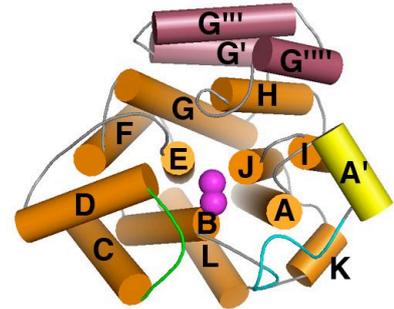
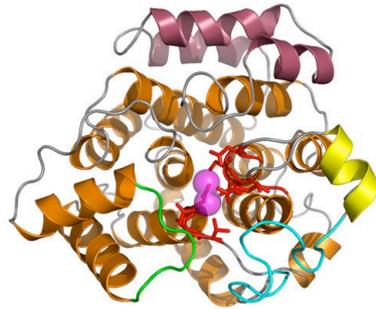
In diesem Kapitel werden die erzielten Ergebnisse im Rahmen der verfügbaren Literatur und Daten anderer Forscher diskutiert. Im ersten Teil wird die ARH-Proteinfaltungsfamilie eingehend analysiert. Zwei neue Mitglieder der ARH-Faltungsfamilie wurden identifiziert und ermöglichen durch den Strukturvergleich die Identifizierung eines konservierten ARH-Faltungskerns. Im Vergleich mit hsARH3 ist es auch möglich, erste Hypothesen zu möglichen Funktionen der beiden bisher nicht charakterisierten prokaryotischen ARH-Proteine zu entwickeln. Im zweiten Teil werden die verfügbaren Informationen zu hsARH3 diskutiert. Durch *docking*-Experimente und Mutagenesen wurde das aktive Zentrum des ARH3-Proteins definiert. Aus der Struktur lässt sich auch ein hypothetischer katalytischer Mechanismus ableiten. Der Nachweis, dass überexprimierte ARH3 nukleär und intramitochondrial lokalisiert ist und *in vivo* intramitochondriale PAR abbauen kann, eröffnet spannende Perspektiven für die Beteiligung von ARH3 am PAR- und OAADPR-Katabolismus. Der Teil schließt mit einer Diskussion möglicher Funktionen der ARH3. Im dritten Teil werden die aus dem Strukturvergleich der ARH3 mit den beiden prokaryotischen ARH-Proteinen gewonnenen Informationen auf ARH1 und ARH2 angewandt und wahrscheinliche strukturelle und funktionelle Eigenschaften von ARH1 und ARH2 werden diskutiert. Aus diesen strukturellen Überlegungen, biochemischen Daten zu Enzymaktivität und Lokalisation und Informationen aus der Literatur werden Hypothesen zu möglichen Funktionen dieser Proteine entwickelt und offene Fragen werden aufgezeigt. Im vierten Teil werden ARH-Proteine bei anderen Organismen diskutiert. Von besonderem Interesse ist die identifizierte ARH4. Mögliche Funktionen von ARH4 werden in Ergänzung oder Abgrenzung zu den anderen drei ARH-Proteinen diskutiert. Des Weiteren werden ARHs bei Invertebraten und Prokaryoten kurz diskutiert. Es werden auch biochemisch charakterisierte ARH-Aktivitäten, die bisher von keinem der bekannten ARH-Proteine vermittelt zu sein scheinen, aufgegriffen und die Frage wird behandelt, ob diese vermuteten Enzyme mit ARH-Aktivität zur ARH-Familie gehören könnten oder einer anderen Proteinfamilie zuzurechnen sind. Das Kapitel endet mit einem Ausblick auf wichtige offene Fragen und zeigt einige Projekte zur Fortführung der Forschungsarbeit auf. Darüber hinaus werden einige Gebiete genannt, von denen insgesamt ein starker Impetus für das Forschungsfeld der ADP-Ribosylierung erwartet werden kann.

6.1 Die ARH-Proteinfaltungsfamilie

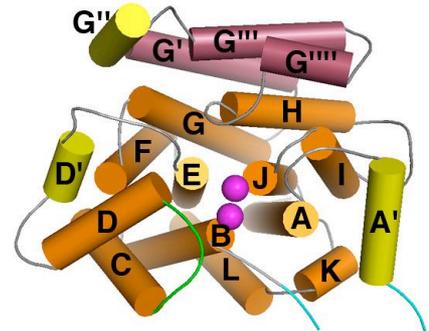
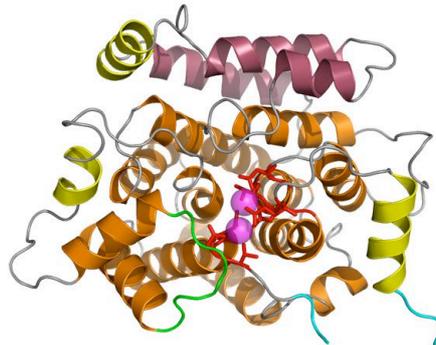
Zwei weitere Proteinstrukturen der ARH-Faltungsfamilie wurden beim Durchmusterung der *protein data bank* mit GenTHREADER identifiziert. Diese Strukturen wurden im Rahmen von *structural genomics*-Projekten in der Datenbank deponiert und bisher nicht in eigenen Publikationen beschrieben. Das Produkt des Gens *mj1187* aus *Methanocaldococcus jannaschii* stellt eine putative ARH dieses thermophilen Archaeen dar. Die Struktur wurde mit einer Auflösung von 2,70 Å gelöst und unter der pdb-ID 1t5j deponiert. Das Produkt des Gens *TTHA1059* aus *Thermus thermophilus* Hb8 stellt eine putative ARH dieses thermophilen Eubakteriums dar. Diese Struktur wurde mit einer Auflösung von 1,65 Å gelöst und unter der pdb-ID 2cwc deponiert. Die Tatsache, dass mit diesen beiden Proteinen, die miteinander nur ca. 20 % Sequenzidentität teilen, drei divergente Strukturen der ARH-Faltungsfamilie verfügbar sind, erlaubt eine genauere Analyse der ARH-Faltung.

Die drei Strukturen können mit einer mittleren Abweichung von 1,3 - 1,4 Å für 240 einander zugeordnete C α -Positionen überlagert werden. Abb. 6.1 zeigt die drei Strukturen 1t5j, 2foz und 2cwc einzeln in der gleichen Orientierung nach der Überlagerung. Links sind *Cartoon*-Darstellungen gezeigt. Rechts sind zur leichteren Orientierung vereinfachte Darstellungen mit zylindrischen Helices und geglätteten Loops gezeigt. Die Struktur 2cwc enthält keine gebundenen Magnesiumionen, während für 1t5j ein Magnesium mit zwei alternativen Bindungsstellen mit einer Besetzung von je 50 % beschrieben wurde. Magnesiumionen sind als magentafarbene Sphären gezeigt. Zwölf Helices sind in allen Strukturen konserviert und werden im Folgenden als Helices A-L bezeichnet (orange in Abb. 6.1). ARH3 teilt mit 1t5j drei weitere Helices G', G''' und G'''' (violett in Abb. 6.1). Helices, die in dieser Orientierung nur in einer Struktur vorkommen, sind gelb markiert.

mjARH
1t5j



hsARH3
2foz



ttARH
2cwc

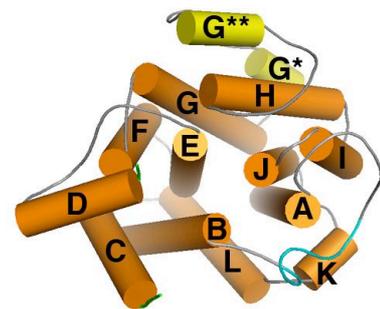
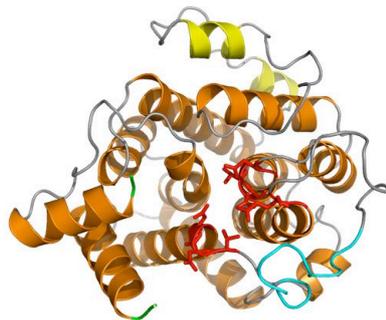


Abb. 6.1 Strukturvergleich von hsARH3 mit mjARH und ttARH. Die linke Spalte zeigt *Cartoon*-Repräsentationen der 3D-Strukturen, links ist eine vereinfachte Darstellung mit zylindrischen Helices und geglätteten Loops gezeigt. Orangefarbene Helices (A-L) sind in allen drei Strukturen konserviert. Die zentralen Helices A, B, E und J tragen an ihren Spitzen die Magnesium-koordinierenden Aminosäuren (rot). Helices G', G'' und G''' sind in mjARH und ttARH konserviert. Gelbe Helices kommen in dieser Position und Orientierung nur in einer der Strukturen vor. In cyan und grün sind die A'B- bzw. CD-Loops gezeigt, die zum aktiven Zentrum hin gefaltet bzw. nicht aufgelöst sind. Magnesiumionen sind als magentafarbene Sphären gezeigt.

In allen drei Strukturen sind die vier zentralen Alphahelices A, B, E und J konserviert, an deren Spitzen in hsARH3 und 1t5j die Magnesium-koordinierenden Aminosäuren sitzen (die Aminosäuren sind rot markiert, siehe auch Abb. 6.2 und 6.3). Acht weitere konservierte Helices orientieren sich um diese vier Helices herum. Diese zwölf Helices bilden zusammen den Kern der ARH-Faltung und sind in der Struktur 2cwc am besten zu erkennen. Eine größere Insertion erfolgt zwischen den Helices G und H. Hier finden sich bei ARH3 und 1t5j die drei Helices G', G'' und G'''. ARH3 verfügt darüber hinaus auch noch über eine Helix G'', die in 1t5j fehlt. 2cwc weist eine Insertion von zwei Helices G* und G** auf. Die Position der Helix G** ähnelt der Position von Helix G'', die Helix ist jedoch deutlich kürzer. Weitere Insertionen von jeweils einer Alphahelix finden sich in 1t5j zwischen den Helices A und B und in ARH3 zwischen den Helices A und B sowie D und E.

Zwei Loops scheinen eine erhöhte Mobilität aufzuweisen, was sich durch das Fehlen von Elektronendichte in mindestens einer der Strukturen in diesem Bereich zeigt. In der ARH3-Struktur fehlt ein Teil des A'B-Loops (cyan in Abb. 6.1). Der entsprechende A'B Loop in 1t5j bzw. der C-terminale Teil des AB-Loops in 2cwc sind aufgelöst und interessanterweise in Richtung der Magnesiumionen gefaltet. Zwölf Aminosäuren des CD-Loops (grün in Abb. 6.1) fehlen in der Struktur von 2cwc. Auch dieser Loop ist in Richtung des putativen aktiven Zentrums orientiert. Es ist denkbar, dass die erhöhte Mobilität dieser Loops in zumindest einigen der untersuchten Strukturen für eine Rolle dieser Loops bei der Substratbindung oder der Katalyse sprechen könnte. Interessanterweise sind die nicht aufgelösten Loops deutlich länger als die korrespondierenden Loops der anderen Strukturen, was eine Interaktion in der Nähe des putativen aktiven Zentrums noch eher denkbar macht.

Ein strukturbasiertes Sequenzalignment der drei ARH-Strukturen ist in Abb. 6.2 gezeigt. Die Proteinsequenzen wurden mit Hilfe des Computerprogramms EXPRESSO unter Verwendung der korrespondierenden pdb-Datensätze einem Alignment unterzogen. Die Großbuchstaben A-L bezeichnen die Helices des ARH3-Proteins. Die Farbkodierung entspricht derjenigen in Abb. 6.1, darüber hinaus wurden Magnesium-koordinierende Aminosäuren in hsARH3 und 1t5j sowie die zu diesen Resten korrespondierenden Aminosäuren in 2cwc rot unterlegt. Nicht aufgelöste Loop-Regionen wurden blau unterlegt. Der Grad der Konservierung der Proteinsequenz ist unter dem Alignment angegeben. Erkennbar ist die fast perfekte Konservierung der Magnesium-koordinierenden Aminosäuren sowie die gute Konservierung der konservierten Helices A-L (orange). Die vier zentralen Helices A, B, E und J zeigen die höchste Konservierung. Während der AB-Loop einschließlich der evtl. enthaltenen Helix A' in allen drei Strukturen ähnlich lang ist, ergibt sich durch die Position der Helix A' in ARH3 ein deutlich längerer A'B-Loop (cyan und blau unterlegt). Der CD-Loop (grün) ist in 2cwc deutlich länger als in den anderen Strukturen.

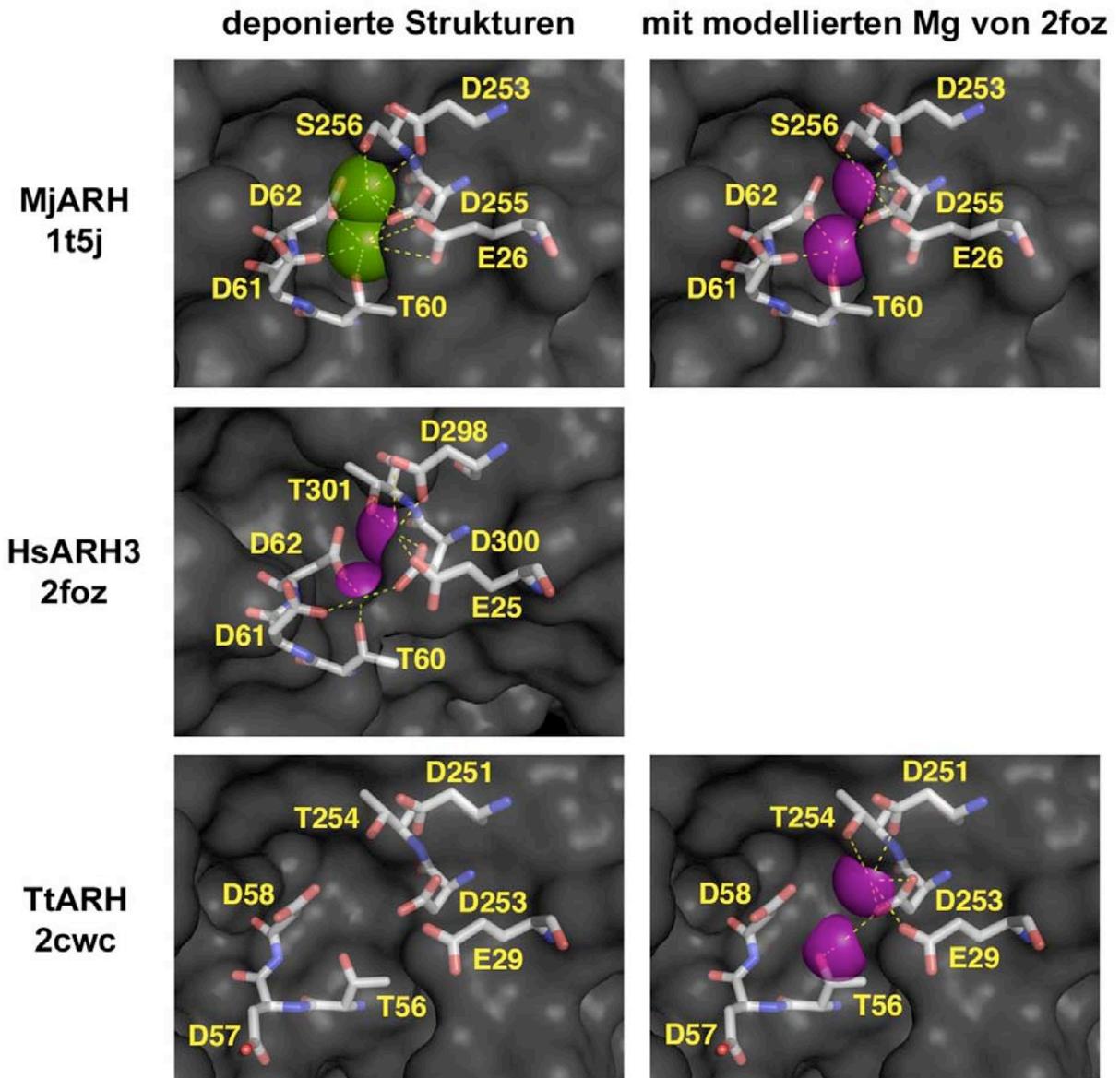


Abb. 6.3 Vergleich der Magnesium-koordinierenden Zentren von hsARH3, mjARH und ttARH. Die C_{α} -Positionen der sieben gezeigten Aminosäuren der drei Strukturen wurden überlagert. Links sind die deponierten Strukturen dargestellt. Rechts wurden die Magnesiumionen von hsARH3 in die anderen Strukturen projiziert. Mögliche Koordinationen sind durch gelbe gestrichelt Linien gezeigt. Magnesiumionen aus der hsARH3-Struktur sind magenta, diejenigen aus der mjARH-Struktur grün.

In Abb. 6.3 ist die Magnesiumbindungsstelle der verfügbaren ARH-Strukturen gezeigt. Hierfür wurden die C_{α} -Positionen der sieben gezeigten Aminosäuren überlagert. Aminosäuren sind als Stabmodelle mit roten Sauerstoffatomen und blauen Stickstoffatomen gezeigt, eine Oberflächenrepräsentation des Proteins ist halbtransparent überlagert. Mögliche Koordinationen sind als gestrichelte gelbe Linien gezeigt. Die linke Spalte zeigt die Bindungsstellen mit den in der Datenbank deponierten Magnesiumionen. Für hsARH3 wurden zwei Magnesiumionen gefunden (magenta), während für mjARH zwei Magnesiumbindungsstellen, die sich teilweise durchdringen, mit einer Besetzung von jeweils 50 % beschrieben wurden (grün). Für 2cwc wurden keine Magnesiumionen deponiert. Deutlich erkennbar ist die vollständige Konservierung der gezeigten Aminosäuren zwischen

hsARH3 und ttARH sowie die, bis auf den konservativen Austausch Ser256 zu Thr301, fast vollständige Konservierung zwischen hsARH3 und mjARH. Die Positionierung der Aminosäuren in mjARH entspricht derjenigen in hsARH3. Auch die Positionen in ttARH entsprechen denen in hsARH3, jedoch sind Asp57 und Asp58 von der putativen Mg-Bindungsstelle weggeklappt bzw. weggedreht. In den rechten Teilabbildungen wurden die Magnesiumionen aus 2foz (magenta) mit den anderen Strukturen überlagert. Die Positionierung der Aminosäuren in mjARH ist mit einer Koordination von zwei Magnesiumionen an diesen Positionen vereinbar. Für ttARH ist eine Koordination des oberen Magnesiumions mit der vorgefundenen Struktur vereinbar, aber auch eine Besetzung der zweiten Position scheint nach einer Bewegung von Asp57 und Asp58 möglich.

Obwohl die drei untersuchten Proteine von Organismen aus den drei Domänen Eubakterien, Archaeen und Eukaryoten stammen und damit phylogenetisch weit voneinander entfernt stehen, ist die Magnesiumbindung fast vollständig konserviert, was für eine funktionelle Bedeutung spricht. Es kann postuliert werden, dass auch ttARH Magnesium binden kann. Bei den ARH1-Proteinen von Mensch und Maus fungiert Magnesium als Aktivator der Enzymaktivität, und Mutationen, die die für die Magnesiumkoordination essentiellen vicinalen Aspartate am Anfang der Helix B betreffen, führen zu einem Aktivitätsverlust (Konczalik und Moss 1999). In Analogie zu den ARH1-Proteinen kann daher postuliert werden, dass es sich bei mjARH und ttARH ebenfalls um enzymatisch aktive Mitglieder der ARH-Familie handelt.

6.2 Das ARH3-Protein des Menschen

6.2.1 Das aktive Zentrum von hsARH3

Durch *docking*-Experimente konnte das putative aktive Zentrum von hsARH3 identifiziert werden. Als modellierter Ligand wurde monomere ADPR eingesetzt, da für diesen Liganden in der isothermen Kalorimetrie eine Bindung an hsARH3 mit mikromolarer Affinität gemessen werden konnte (Müller-Dieckmann, C. et al. 2006). An den meisten Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand sind die „terminale“ Ribosegruppe und die Phosphatgruppen beteiligt. Nur zwei Aminosäuren (Y133 und E259) interagieren mit dem Adenosinanteil von ADPR und die Mutagenese von E259 hat keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität. Dies ist im Einklang mit Ergebnissen der enzymatischen Untersuchung von ARH1-Proteinen und DRAG. Hier konnte eine Inhibition des Enzyms am effektivsten mit ADPR erreicht werden. ADP und AMP hatten nur einen geringen inhibitorischen Effekt, was für eine primäre Bindung der „terminalen“ Ribosegruppe und der Phosphatgruppen spricht. Bei Kokristallisation von ADP mit hsARH3 kristallisierte hsARH3 zwar in einer anderen Kristallform, ADP war aber nicht im Komplex aufzulösen, was für eine

schwache Bindung spricht und die Bedeutung der „terminalen“ Ribosegruppe für die Substratbindung unterstreicht.

In der hsARH3-Struktur mit modellierter ADPR ist die „terminale“ Ribosegruppe in direkter Nähe zu zwei Magnesiumionen komplexiert. Die Beobachtung, dass bei ARH1 und DRAG die enzymatische Aktivität durch Zusatz von Magnesiumionen gesteigert werden kann, spricht für eine funktionelle Bedeutung der Magnesiumionen für die Katalyse auch bei hsARH3. Darüber hinaus zeigt die räumliche Nähe von Magnesiumionen und der Ribosegruppe, die im Substrat PAR die zu spaltende Bindung trägt, dass das *docking*-Experiment ADPR in einer plausiblen Orientierung im aktiven Zentrum positioniert hat.

Die Substitution derjenigen Aminosäuren, die laut *docking*-Experiment an der Bindung von ADPR beteiligt sind, ermöglichte die Prüfung der Bedeutung dieser Aminosäuren für die enzymatische Aktivität der hsARH3. Tatsächlich decken sich die Ergebnisse der enzymatischen Untersuchung der Mutanten sehr gut mit dem vorhergesagten Bindungsmodus des Substrats. Fast alle Mutationen von laut *docking*-Experiment ADPR-bindenden Aminosäuren führen zu einem massiven oder vollständigen Funktionsverlust. T301S und N135A zeigen eine deutliche Einschränkung (ca. 30 % Restaktivität), während E259A keinen Effekt auf die Funktion von hsARH3 hat (Tab. 6.1).

Ausgehend von der hsARH3-Struktur lassen sich auch vorhergehende Mutagenesen an hsARH1, rnARH1, hsARH3 und rrDRAG plausibel erklären (siehe Tab. 6.1). Alle gefundenen Mutationen, die zu einer mehr als fünfzigfachen Reduktion der Aktivität dieser Enzyme führen, betreffen Positionen, die bei hsARH3 durch das *docking* identifiziert wurden (Asp61, Asp62 und Asp300 von hsARH3). Mutationen von rnARH1, hsARH1 und rrDRAG in Helix D wurden mit einer Regulation der ARH-Aktivität durch Reduktionsmittel (ARH1) oder Membranassoziation (rrDRAG) in Zusammenhang gebracht. Tatsächlich liegt Helix D benachbart zum aktiven Zentrum, was mit einer regulatorischen Bedeutung dieser Region kompatibel ist.

Der Hauptunterschied zwischen den verschiedenen Kristallformen von hsARH3 besteht in einer Bewegung des Loops zwischen Helix A (1) und Helix A' (2). Damit kommt es auch zu einer deutlichen Bewegung von Glu25 weg vom Magnesium-koordinierenden Zentrum. Die wahrscheinlichste Erklärung für diesen Unterschied ist die Anwesenheit von ADP. Die Auswirkung dieses niedrigaffin bindenden Substratanalogons weist ebenfalls auf die richtige Identifikation des aktiven Zentrums hin.

Tab. 6.1 Effekte von Mutationen verschiedener ARH-Proteine auf deren Enzymaktivität. Zusammengefasst sind mutierte Positionen in hsARH3, hsARH1, rARH1 und rrDRAG sowie die jeweilige Restaktivität der mutierten Proteine. Äquivalente Positionen in hsARH3 und Publikationsort der dargestellten Ergebnisse sind angegeben. Die Positionen von hsARH3 beziehen sich auf die Position in der Sequenz der gelösten ARH3 Struktur. Die Position im nativen Protein erhält man, indem man 16 für hsARH3 und 22 für mmARH3 addiert. Modifiziert nach Müller-Dieckmann, C. et al. 2006.

<i>Mutierte Position</i>	<i>Restaktivität in % des wt-Proteins</i>	<i>Äquivalent in hsARH3</i>	<i>Referenz</i>
<i>Homo sapiens ARH3</i>			
E25A, Q	1		Diese Arbeit
D61N	0		Diese Arbeit
D61N/D62N	0		Oka et al. 2006
S132A	0		Diese Arbeit
Y133A	1		Diese Arbeit
N135A	30		Diese Arbeit
H166Q	0		Diese Arbeit
E222Q/E223Q	100		Oka et al. 2006
E245Q/E246Q	100		Oka et al. 2006
E259A	100		Diese Arbeit
D298N, E	1, 0		Diese Arbeit
T301A, S	0, 30		Diese Arbeit
<i>Rattus norvegicus ARH1</i>			
D60A, Q, N	0	D61	Konczalik und Moss 1999
D60E	100	D61	Konczalik und Moss 1999
D61A, Q, N	0	D62	Konczalik und Moss 1999
D61E	100	D62	Konczalik und Moss 1999
H65A	95	R67	Konczalik und Moss 1999
C108S	100 (reg*)	Helix D (5)	Takada et al. 1993
R139A	89	R140	Konczalik und Moss 1999
D285A	95	Helix I (15)	Konczalik und Moss 1999
<i>Homo sapiens ARH1</i>			
S103C	100 (reg*)	Helix D (5)	Takada et al. 1993
<i>Rhodospirillum rubrum DRAG</i>			
V98L	100 (reg*)	Helix D (5)	Kim et al. 2004
N100K	100 (reg*)	Helix D (5)	Kim et al. 2004
C102S	100 (reg*)	Helix D (5)	Kim et al. 2004
D123A	70	S132	Antharavally et al. 2001
H142L	95	S150	Antharavally et al. 2001
H158N	2	H166	Antharavally et al. 2001
D243G	0	D300	Antharavally et al. 2001
E279R	100	D334	Antharavally et al. 2001

Docking-Experimente wurden auch mit di- und trimerer ADPR durchgeführt. Dabei wurden Bindungsmodi erhalten, die für eine ADPR-Gruppe im Wesentlichen der gezeigten Bindung von monomerer ADPR entsprechen. Weitere ADPR-Gruppen schlossen sich an die Ribose des Adenylateils von ADPR an, besetzten also nicht das aktive Zentrum selbst. Aus den modellierten Bindungen der weiteren ADPR-Gruppen zum Protein ließ sich kein gemeinsames Muster ableiten. Es ist jedoch denkbar, dass produktive *docking*-Ergebnisse mit der „offenen“ Konformation, wie sie in der Kristallform 2fp0 vorliegt, erreichbar gewesen wären. Allerdings wurden *docking*-Experimente nur mit der höher aufgelösten Struktur 2foz durchgeführt. Möglicherweise beschreibt die 2foz-Struktur mit modellierter ADPR den Zustand nach erfolgter Hydrolyse der PAR-Bindung, während in der 2fp0-Struktur durch Bewegung von Glu25 Magnesiums-Koordinationsstellen für eine Bindung des Substrats oder die Aktivierung von Wassermolekülen für die Katalyse zur Verfügung stehen. Entsprechend könnte die „richtige“ Lage der „terminalen“ Ribosegruppe im *docking* an 2foz falsch vorhergesagt worden sein und eine Korrektur des Modells könnte zu einem späteren Zeitpunkt erforderlich werden. Falls ARH3 tatsächlich primär eine ADPR-Gruppe im aktiven Zentrum bindet und relativ indifferent zum anderen Partner der O-glykosidischen Bindung ist, erlaubt dies die Umsetzung von PAR an Verlängerungs- und Verzweigungsstellen, wobei jeweils die terminale ADPR-Einheit im aktiven Zentrum binden könnte. Dies steht im Einklang mit der beobachteten exo- und endoglykolytischen Spaltung von PAR zu ADPR-Monomeren (Oka et al. 2006).

Insgesamt erscheint die Identifikation des aktiven Zentrums plausibel und von mehreren Argumentationssträngen gestützt. Die Orientierung der ADPR-Gruppe mit der „terminalen“ Ribose nahe der Magnesiumionen und die Lage der Phosphatgruppen scheint aufgrund biochemischer Daten (Mutagenesen, Aktivierung von ARH1 durch Magnesium) und aufgrund des Vergleichs verschiedener *docking*-Ergebnisse, die sich in diesem Bereich kaum unterschieden, verlässlich modelliert worden zu sein. Die genaue Bindung des Adenosin-Anteils von ADPR ist weniger verlässlich und wegen der Identifikation deutlich weniger beteiligter Aminosäuren auch weit weniger klar definiert. Durch die durchgeführten enzymatischen Assays wurde nicht die Frage beantwortet, ob die erzeugten Mutanten noch in der Lage sind, Magnesiumionen oder das Substrat zu binden, sondern es wurde nur die enzymatische Aktivität ermittelt. Daher lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht zwischen Aminosäuren, die für die Substratbindung oder die Katalyse wichtig sind unterscheiden.

6.2.2 Putativer katalytischer Mechanismus von hsARH3

Docking-Experimente mit ADPR und ADP-Ribosyl-ADPR führten zu mehreren signifikanten Ergebnissen, in denen die „terminale“ Ribosegruppe und die Phosphatgruppen einer ADPR-Einheit im aktiven Zentrum in praktisch identischer Weise vorlagen. Die 2'-Hydroxygruppe der „terminalen“ Ribose koordiniert Magnesium-Ion 2, das als Elektronensenke dienen könnte, um die Empfänglichkeit des anomeren C-Atoms für einen nukleophilen Angriff weiter zu erhöhen. Die drei sauren Reste Glu25, Asp61 und Asp298 befinden sich in einem Radius von 5 Å um das anomere C-Atom. Ein möglicher Reaktionsmechanismus ist in Abb. 6.4 dargestellt.

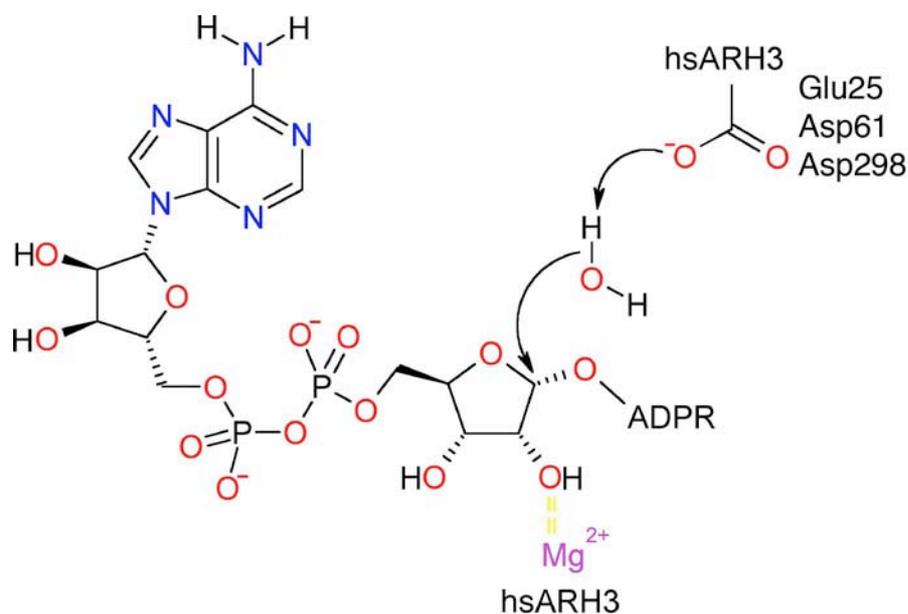


Abb. 6.4 Putativer Reaktionsmechanismus von hsARH3. Im hier vorgeschlagenen Mechanismus fungiert ein Magnesium II (magenta) als elektronenziehende Gruppe und aktiviert die Ribosegruppe für eine nukleophile Substitution am anomeren C-Atom. Eine negativ geladene Seitenkette von hsARH3 aktiviert ein Wassermolekül für den nukleophilen Angriff, der zur hydrolytischen Spaltung führt. Drei negativ geladene Seitenketten von hsARH3, Glu25, Asp61 und Asp298 sind in einem Radius von 5 Å um das anomere C-Atom angeordnet.

Die Aktivierung des Riboserings durch den elektronenziehenden Effekt des Magnesiumions und die Aktivierung eines Wassermoleküls durch eine saure Seitenkette könnten den nukleophilen Angriff des Wassermoleküls auf das anomere C-Atom begünstigen und so die Hydrolyse von PAR katalysieren. Das Substrat OAADPR wurde nicht in das aktive Zentrum modelliert, aber auch hier ist eine Aktivierung der 2'- oder 3'-gebundenen Acetylgruppe durch die Nähe des positiv geladenen Magnesiumions denkbar, was den Angriff eines durch eine saure Seitenkette aktivierten Wassermoleküls begünstigen würde. Asp61 und Asp298 sind auf dem Boden der Magnesium-bindenden Vertiefung lokalisiert. Als wahrscheinlichster Kandidat für die Aktivierung des Wassermoleküls kann daher Glu25 gelten, da dieser Rest sich auf der Oberfläche des Proteins befindet und sich seine Position in den beiden hsARH3-Kristallen um 1,8 Å unterscheidet, was auf eine Beweglichkeit dieses Rests schließen lässt. Mutationen von Glu25 führen zu einer 99-prozentigen Reduktion der Enzymaktivität.

Denkbar ist, dass durch die Aktivierung der Ribose durch Magnesium die Hydrolyse bei geringer Geschwindigkeit auch ohne zusätzliche Aktivierung eines Wassermoleküls stattfinden kann, was die Restaktivität erklären würde.

6.2.3 Lokalisation und *in vivo* Aktivität von hsARH3

Durch Verwendung von überexprimierten ARH3-eGFP und ARH3-FLAG Fusionsproteinen konnte die Lokalisation von hsARH3 untersucht werden. Unabhängig von Zelllinie, Expressionsplasmid, Zeitpunkt nach Transfektion und Art der Markierung wurde eine starke mitochondriale und eine schwächere nukleäre Lokalisation festgestellt. Dies deckt sich zum Teil mit den Ergebnissen von Oka et al., die eine cytosolische und nukleäre Lokalisation endogenen ARH3-Proteins in Mausgeweben und Lysaten humaner Zellen mit Hilfe eines Peptidantikörpers feststellten, jedoch eine Zentrifugation bei 100000 g zur Trennung von Cytosolfraction und Membranfraction einsetzten (Oka et al. 2006). Es ist denkbar, dass Mitochondrien bei dieser Behandlung ihre Integrität verloren haben und ARH3 in den Überstand abgegeben wurde. Ob auch endogenes ARH3 intramitochondrial lokalisiert ist, könnte durch Anwendung der erzeugten ARH3-spezifischen monoklonalen Antikörper für Immunfluoreszenzanfärbungen genauer untersucht werden.

Enzymatische Assays unter Verwendung mitochondrial lokalisierter PARP1 zeigen, dass überexprimiertes ARH3-Protein tatsächlich in lebenden Zellen PAR abbauen kann. Außerdem zeigt es, dass ARH3 unter den Bedingungen, die im Inneren von Mitochondrien vorliegen, aktiv ist. Freie PAR wird als Botenstoff gehandelt, der ein Zelltod auslösendes Signal an Mitochondrien übermittelt. Die Tatsache, dass PAR-Akkumulation in Mitochondrien nicht toxisch ist, schließt ein Wirken dieses Zelltodsignals im Inneren der Mitochondrien aus, was wiederum zeigt, dass kein Import von PAR in Mitochondrien für die Vermittlung des Zelltod-Signals notwendig ist. Darüber hinaus stellt das System aus mitochondrial lokalisierter PARP1 und ARH3 eine Möglichkeit dar, den intramitochondrialen NAD-Pool von Zellen zu depletieren, um den NAD-Stoffwechsel und die putative *de novo* Synthese von NAD in diesen Organellen eingehender zu untersuchen (Niere et al. 2007).

6.2.4 Mögliche Funktionen von hsARH3

Die phylogenetisch weite Verbreitung von ARH3-Proteinen könnte für eine grundlegende Bedeutung von ARH3 für den Metabolismus tierischer Zellen sprechen. Für hsARH3 sind bisher zwei enzymatische Aktivitäten beschrieben worden, die Hydrolyse von PAR (Oka et al. 2006 und unsere Analysen: Müller-Dieckmann, C. et al. 2006) und die Hydrolyse von OAADPR (Ono et al. 2006).

Sirtuine sind in Bakterien, Archaeen, Hefen, Pflanzen, Protozoen und Metazoen nachgewiesen worden (Frye 2000). Das Reaktionsprodukt OAADPR der sirtuinkatalysierten Deacetylierung zeigt in *S. cerevisiae* und *X. laevis* Oozyten Signalfunktion. In Menschen wurde die Histonvariante macroH2A1.1 nachgewiesen, die in Heterochromatin vorkommt und eine funktionelle OAADPR-Bindungsstelle aufweist. Der Ionenkanal TRPM2 kann durch OAADPR geöffnet werden und so den Puromycin-induzierten Zelltod auslösen. Dies spricht für eine Botenstofffunktion von OAADPR. Bisher ist ARH3 das einzige bekannte Enzym, das OAADPR zu ADPR abbauen kann. Ein Abbau von OAADPR zu AMP und 2'-O-Acetyl-5'-Phosphoribose durch NUDIX-Hydrolasen funktioniert effizient in *S. cerevisiae*, aber das humane Protein wird durch OAADPR stark inhibiert (Rafty et al. 2002). Falls die Signalvermittlung über OAADPR tatsächlich einen evolutiv konservierten Mechanismus darstellt, könnte dies die Konservierung von ARH3 in Vertebraten und Invertebraten erklären. Jedoch konnte in den komplett sequenzierten Genomen der Organismen *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und *Caenorhabditis briggsae* durch tBLASTn-Suchen mit agARH und hsARHs kein ARH-Gen identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise ist der Signalmechanismus über OAADPR nicht essentiell und daher nicht zwingend konserviert, oder es gibt alternative Wege zur Termination des OAADPR-Signals, beispielsweise durch die genannte Aktivität einer Phosphodiesterase.

Eine weitere Funktion von ARH3, die Umkehrung von PARsylierung, könnte ebenfalls die weite Verbreitung von ARH3 in Tieren erklären. Während PAR ein etabliertes und potentes intrazelluläres Signal darstellt, ist eine physiologische Funktion von ARH3 im PAR-Stoffwechsel noch nicht gezeigt worden. In dieser Arbeit wurde jedoch nachgewiesen, dass überexprimierte ARH3 intramitochondriale PAR effizient abbauen kann. ARH-Proteine finden sich jedoch nicht bei Pflanzen (siehe Tab. 5.1), obwohl Pflanzen über PARP-Proteine verfügen. ARH3 scheint also für den PAR-Metabolismus nicht essentiell zu sein.

Die mitochondriale Lokalisation von hsARH3 eröffnet die Möglichkeit, dass dieses Enzym eine Rolle beim Abbau intramitochondrialer PAR spielt. Mehrere Berichte von intramitochondrialer PAR-Akkumulation wurden bereits publiziert, dennoch ist die physiologische Bedeutung des intramitochondrialen PAR-Metabolismus immer noch umstritten. Es ist denkbar, dass PARsylierungen in Mitochondrien nicht die Größenordnung von nukleärer PARsylierung erreichen und wegen der konstitutiven Anwesenheit von PAR-degradierender ARH3 nur ein transientes Ereignis darstellen. Möglicherweise wurde dadurch der zweifelsfreie Nachweis intramitochondrialer PARsylierung bisher erschwert. Tatsächlich wurde beim Einsatz des mitoPARP-Systems ein Abbau der intramitochondrialen PAR nach Inhibition von PARP1 mit dem spezifischen Inhibitor PJ-34 festgestellt (Niere et al. 2007). Dieser Abbau könnte von endogenen PAR-hydrolysierenden Enzymen wie mitochondrial lokalisierten PARG-Isoformen oder ARH3 vermittelt sein. Durch selektive Deletion oder Herabregulierung dieser Enzyme sollte ein Nachweis intramitochondrialer PAR erleichtert werden.

Da die Deletion von SIRT3 in Mäusen zur Hyperacetylierung zahlreicher mitochondrialer Proteine führt, besteht erwiesenermaßen eine Quelle für intramitochondriale OAADPR (Lombard et al. 2007). Eine Signalfunktion von OAADPR in Mitochondrien wurde bisher noch nicht beschrieben, jedoch ist die Existenz eines OAADPR-bildenden und eines OAADPR-abbauenden Enzyms in Mitochondrien mit dieser Hypothese kompatibel.

Es ist ebenfalls denkbar, dass die ARH3 in Mitochondrien noch weitere enzymatische Funktionen ausübt. Ein offensichtlicher Kandidat wäre die nachgewiesene Hydrolyse von Mono-ADP-Ribosyl-Cystein Bindungen an GDH, dem Substrat von SIRT4. Eine in der mitochondrialen Matrix lokalisierte ARH mit dieser Aktivität wurde biochemisch charakterisiert, jedoch noch nicht identifiziert (Herrero-Yraola et al. 2001). Es wurde keine Aktivität von ARH3 auf ADP-Ribosyl-Cysteinreste in Trichloressigsäure-gefällten Proteinen gefunden (Oka et al. 2006). Falls ARH3 jedoch eine hohe Substratspezifität aufweist, könnte dennoch eine De-ADP-Ribosylierung von GDH mit den Daten von Oka et al. vereinbar sein. Eigene Versuche zur cysteinspezifischen De-ADP-Ribosylierung von $G_i\alpha$ und GDH zeigten keine Enzymaktivität von ARH3, jedoch gelang die Restitution des ADP-Ribosylierungssystems nicht zufrieden stellend (Daten nicht gezeigt).

Zur Rolle von ARH3 im Zellkern liegen momentan noch keine Daten vor. Da sowohl OAADPR-bildende Sirtuine als auch PAR im Zellkern eine wichtige Rolle spielen, ist es nahe liegend, eine Beteiligung von ARH3 an diesen Prozessen zu postulieren. Der Nachweis oder der Ausschluss der Beteiligung von ARH3 an diesen Prozessen stellt ein wichtiges Ziel für weitere Untersuchungen des OAADPR- und PAR-Katabolismus dar. Möglicherweise müssen einige Funktionen von PARG vor diesem Hintergrund neu bewertet werden. Da die Deletion von PARG in Mäusen zu embryonaler Letalität führt, ist jedoch anscheinend keine funktionelle Kompensation der PARG-Funktion durch ARH3 möglich. Ähnlich wie PARP1 bei den PARPs vorherrscht, scheint PARG die primäre De-PARsylierungsaktivität im Zellkern zu liefern.

6.3 ARH1 und ARH2 des Menschen

Durch den Strukturvergleich verschiedener ARH-Proteine (Abschnitt 6.1) wurden Einblicke in die ARH-Struktur möglich, die sich auf eine erste Diskussion der bisher nicht aufgeklärten Strukturen von ARH1 und ARH2 ausweiten lassen. Unter Verwendung der Strukturen 2foz, 1t5j und 2cwc konnte ein Faltungskern der ARH-Familie identifiziert werden (Helices A-L). Ein strukturbasiertes Alignment dieser drei Strukturen mit hsARH1 und hsARH2 wurde mit dem Programm EXPRESSO erstellt (siehe Abb. 6.5). Dieses Programm berücksichtigt PSIPred Sekundärstrukturvorhersagen für Sequenzen unbekannter Struktur. Im Alignment wird die gleiche Farbkodierung wie in Abb. 6.1 und Abb. 6.2 verwendet.

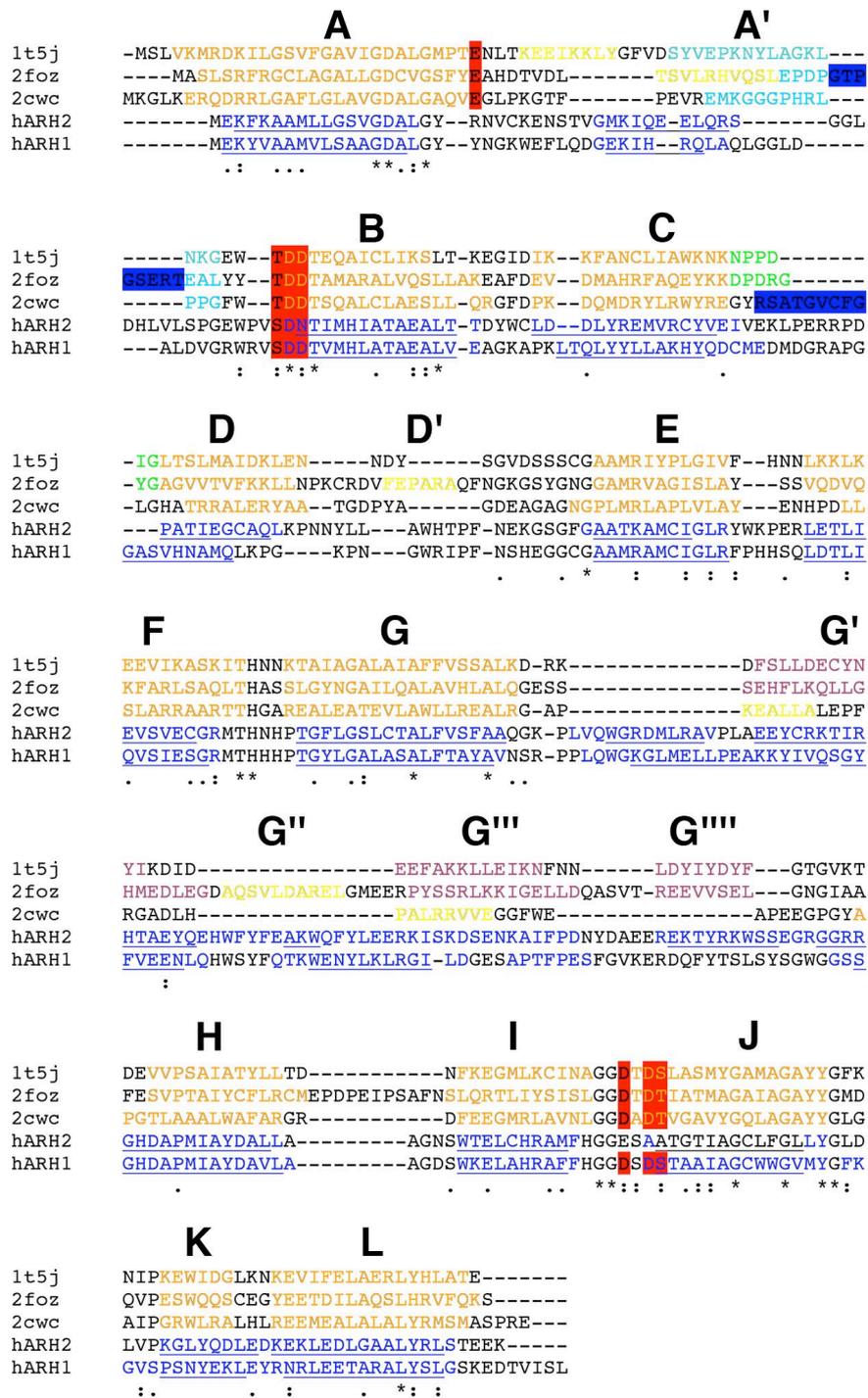


Abb. 6.5 Auf Sekundärstrukturvorhersagen und 3D-Strukturen basierendes Sequenzalignment von hsARH1, hsARH2, hsARH3, mjARH und ttARH. Helices sind durch die Schriftfarben orange (strikt konserviert), violett (in hsARH3 und mjARH konserviert) und gelb (nicht konserviert) markiert. Die Beschriftung über dem Alignment bezeichnet die Helices von hsARH3. Für hsARH1 und hsARH2 wurden Sekundärstrukturvorhersagen mit dem Programm PSIPred ermittelt. Blaue Schrift zeigt Bereiche, die als alpha-helikal vorhergesagt wurden, unterstrichene blaue Schrift zeigt Bereiche mit hoher Verlässlichkeit der Vorhersage (interne Wertungszahl > 5). Rot unterlegt sind Aminosäuren, die in hsARH3 und mjARH die Magnesium-Koordination vermitteln sowie die korrespondierenden Reste in ttARH, hsARH1 und (soweit zutreffend) hsARH2. Cyan respektive grün sind der A'B-Loop bzw. der C-terminale Teil des AB-Loops respektive der CD-Loop gezeigt. Blau unterlegt sind zwei Bereiche in diesen Loops, die in der 3D-Struktur nicht aufgelöst werden konnten. Der Grad der Konservierung ist unter dem Sequenzalignment angegeben. (* = identisch; : = sehr ähnlich; . = ähnlich). Das Alignment wurde mit dem Programm EXPRESSO erzeugt.

Darüber hinaus werden Reste von hsARH1 und hsARH2, die durch das Programm PSIPred als alphahelikale vorhergesagt wurden blau eingefärbt. Unterstrichene Positionen bezeichnen dabei Reste die mit hoher Wahrscheinlichkeit alphahelikale sind, d.h. die eine interne Wertungszahl von 5 oder höher im Wertebereich von 0 bis 10 aufweisen. Sowohl für hsARH1 als auch für hsARH2 wird eine rein alphahelikale Struktur vorhergesagt. Im Alignment ist eine Zuordnung eines alphahelikalen Bereichs von hsARH1 und hsARH2 zu jeder der konservierten Helices A-L erkennbar. Ein helikaler Bereich wird auch im Bereich der A'-Helix und im Bereich der Helices G'-G'''' von hsARH3 vorhergesagt, hingegen wird kein helikaler Bereich vorhergesagt, der zu Helix D' korrespondieren würde. Ein Einschub zwischen den Helices G und H ist etwas länger als die korrespondierende Region aus hsARH3 und deutlich länger als bei mjARH und ttARH. Ein zusätzliches helikales Element scheint sich zwischen den Helices G und G' zu befinden. Zu berücksichtigen ist hierbei allerdings, dass die Informationen über den Bereich zwischen den Helices G und H weniger verlässlich sind, da hier die vorhergesagten Sekundärstrukturelemente nicht klar voneinander abgegrenzt sind. Der HI-Loop ist bei hsARH3 im Vergleich zu den vier anderen Proteinen deutlich länger. Der A'B-Loop scheint in hsARH1 und hsARH2 kürzer zu sein als in hsARH3. Hingegen ist der CD-Loop von hsARH1 und hsARH2 deutlich länger als der entsprechende Loop in hsARH3 und entspricht am ehesten dem CD-Loop aus ttARH, der in der Struktur nicht aufgelöst werden konnte. A'B- und CD-Loop sind wegen ihrer Nähe zum putativen aktiven Zentrum und wegen ihrer unterschiedlichen Länge interessante Kandidaten für Strukturmerkmale, die eine unterschiedliche Enzymaktivität und Substratspezifität erklären könnten.

Eine Aminosäure, die zu Glu25 korrespondiert konnte durch das Alignment nicht identifiziert werden, jedoch existiert ein Glutamatrest in den AA'-Loops von hsARH1 und hsARH2, der möglicherweise diese Funktion übernehmen könnte. Andere Magnesium-koordinierende Reste sind in hsARH1 bis auf den konservativen Austausch von Thr301 in hsARH3 gegen Ser305 in hsARH1 konserviert. Ser305 entspricht der Besetzung dieser Position in 1t5j. Die Mutation T301S von hsARH3 führte nur zu einem eingeschränkten Aktivitätsverlust und ist demnach mit enzymatischer Aktivität kompatibel.

In hsARH2 sind nur die Positionen Ser56 und Asp57 konserviert. An Stelle von hsARH3 Asp62 findet sich in hsARH2 Asparagin (Asn58). In mARH1 führt die entsprechende Substitution D61N zu einem vollständigen Funktionsverlust (siehe Tab. 6.1). Der zweite Block an Magnesium-koordinierenden Aminosäuren von D298 bis T301 (DXDS) befindet sich bei hsARH2 direkt hinter einer Exon-Intron-Grenze und unterscheidet sich völlig von den Positionen in hsARH1 und hsARH3 (EXAA). Dies zeigt, dass ARH2 höchstwahrscheinlich kein Magnesium binden kann und wahrscheinlich enzymatisch inaktiv ist.

Zusammenfassend erscheint sehr wahrscheinlich, dass hsARH1 und hsARH2 ebenfalls die ARH-Faltung annehmen und dass der Faltungskern mit den Helices A-L konserviert ist. Von besonderem Interesse wäre eine Aufklärung der Strukturen von hsARH1 und hsARH2 im Hinblick auf die Loop-Regionen A'B und CD wegen ihrer Nähe zum putativen aktiven Zentrum. Der AA'-Loop begrenzt in hsARH3 die Substratbindungstasche auf der Seite, an der in PAR die zu spaltende Bindung sitzt und trägt die bewegliche Aminosäure Glu25. Damit sind der AA'-Loop und der A'B-Loop wahrscheinliche Kandidaten für Regionen der ARH-Proteine, die die Substratspezifität erklären könnten. Mit der hoffentlich bald verfügbaren Kristallstruktur von hsARH1 könnten Unterschiede zwischen hsARH1 und hsARH3 definiert und daraus Hypothesen zur Erklärung der Substratspezifität der ARH-Proteine entwickelt und experimentell überprüft werden. Auch die enzymatische Charakterisierung der beiden prokaryotischen ARHs könnte es ermöglichen, für die Substratspezifität und/oder Katalyse wichtige Unterschiede zu entdecken.

ARH1 zeigt eine ubiquitäre Expression auf mRNA-Ebene in allen untersuchten Geweben der Maus, beim Menschen ist das Expressionsniveau sehr niedrig. hsARH1-eGFP Fusionsprotein verteilt sich homogen im Cytosol und im Nukleus. ARH1 kann *in vitro* ADP-Ribosyl-Arginin hydrolysieren. Eine cytosolische argininspezifische ARH-Aktivität wurde mehrmals beschrieben. Die Demodifikation von Aktin, G α und G β wurde gezeigt. Die Deletion des ARH1-Gens in Mäusen zeigt, dass ARH1-defiziente Mäuse gesund und fortpflanzungsfähig sind, ihr Gewebe jedoch mehr ADP-Ribosyl-Arginin enthält und sie empfindlicher auf Cholera toxin reagieren. Dennoch ist eine Beteiligung von ARH1 an einem endogenen Regulationsmechanismus in eukaryotischen Zellen bisher nicht nachgewiesen worden. Ob ARH1 eine generelle Bedeutung als Gegenspieler von argininspezifischen ADP-ribosylierenden Toxinen zukommt, muss noch weiter untersucht werden.

Für ARH2 konnte bisher keine Aktivität festgestellt werden. Überraschend ist jedoch, dass ARH2 von allen Vertebraten-ARHs die höchste Konservierung der Sequenzidentität aufweist (Abb. 5.6). mRNA für ARH2 wurde in Mensch und Maus in Herz- und Skelettmuskel nachgewiesen (Kernstock 2003). hsARH2-eGFP akkumuliert im Cytosol und ist aus dem Zellkern ausgeschlossen. Die hohe Konservierung und gewebsspezifische Expression lässt vermuten, dass ARH2 Funktionen im Cytosol von Zellen des Muskelgewebes erfüllt. Es ist denkbar, dass ARH2 neue Funktionen übernommen hat. ARH-Proteine erfüllen bei *Tripedalia cystophora* und *Danio rerio* strukturelle Funktionen in der Augenlinse (Piatigorsky et al. 1993, Castellano et al. 2005). Eine strukturelle Aufgabe von ARH2 im Muskelgewebe erscheint jedoch unwahrscheinlich, da die Zellarchitektur durch andere Proteine bereits hochstrukturiert ist. Ebenfalls unwahrscheinlich, aber nicht ausgeschlossen, ist die Möglichkeit, dass sich die Spezifität des Enzyms geändert hat und ein anderes Substrat umgesetzt wird. Eine dritte Möglichkeit zeigen Beispiele von Enzymfamilien auf, in denen einige Mitglieder die enzymatische Aktivität verloren haben, aber immer noch Liganden binden können, die dem ursprünglichen Substrat ähneln. Beispielsweise wurden NUDIX- und A1pp-ähnliche katalytische Domänen ohne messbare Enzymaktivität gefunden, die eine neue

Funktion als ADPR- oder OAADPR-Sensor übernommen haben könnten (Grubisha et al. 2006, Karras et al. 2005). Ähnlich könnte auch ARH2 in der Lage sein, ADPR zu binden. Unterstützt wird diese Möglichkeit durch Mutagenesen von rnARH1, bei denen gezeigt wurde, dass die Magnesiumionen nicht essentiell für die Substratbindung sind (Konczalik und Moss 1999).

6.4 ARHs in anderen Organismen

Die Gruppierung von Vertebraten-ARHs in eine der vier ARH-Gruppen kann mit großer Sicherheit über die Analyse der Exon-Intron-Struktur erfolgen, da die Exon-Intron-Struktur von ARH1-3 konserviert ist. Bei ARH4 finden sich mehrere Exon-Intron-Grenzen, die nicht in allen gefundenen ARH4-Genen vorkommen, aber andere Exon-Intron-Grenzen sind streng konserviert. Es konnten keine Exon-Intron-Grenzen gefunden werden, die zwischen paralogen ARH-Genen konserviert sind, was für eine frühe Trennung der vier ARH-Gene spricht. Am wahrscheinlichsten erscheint, dass ein gemeinsamer Vorfahr bereits über vier getrennte ARH-Gene verfügte und dass nach der Radiation der Vertebraten bei Fischen ARH1 und bei Säugetieren ARH4 deletiert wurde. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass bei der Radiation der Vertebraten Genomduplikationen postuliert wurden, die das Auftreten mehrerer paraloger ARH-Gene erklären könnten. Diese postulierten Genomduplikationen konnten wegen der langen Zeit, die seit Radiation der Vertebraten verstrichen ist, bisher nicht zweifelsfrei belegt werden (Seoighe 2003).

Mit ARH4 wurde ein neues ARH-Protein gefunden, das bei Säugetieren fehlt. Ein Aminosäure-Sequenzalignment der ARHs zeigt, dass ARH4 an denjenigen Positionen, die in hsARH3 die Magnesium-Koordination vermitteln, mit ARH1 übereinstimmt. Wahrscheinlich kann ARH4 ebenfalls Magnesiumionen binden und möglicherweise verfügt ARH4 ebenfalls über eine enzymatische Aktivität. Diese putative enzymatische Aktivität könnte identisch zu derjenigen von ARH1 sein, was die Deletion des jeweils anderen Proteins bei zwei Vertebratenlinien kompensieren könnte. Andererseits ist denkbar, dass ARH4 über eine andere enzymatische Aktivität verfügt; möglicherweise gibt es in Geweben von Fischen, Vögeln und Fröschen eine ARH-Aktivität, die in Säugetieren fehlt? Bisher wurde kein Mitglied der ARH4-Familie kloniert und auf enzymatische Aktivität untersucht, durch die hier vorgestellten *in silico* Analysen sind die Vorarbeiten hierzu aber geleistet. Die Charakterisierung der Aktivität von ARH4, ob komplementär, verschieden oder ähnlich im Vergleich zu ARH1, verspricht weitere Einblicke in den ADPR-Stoffwechsel von Vertebraten.

Die Identifikation der ARH-ähnlichen SelJ-Kristalline in der Augenlinse von *D. rerio* zeigt, dass Vertebraten noch weitere ARH-Gene besitzen können. SelJ konnte in dieser Arbeit weder durch PSI-BLAST noch durch tBLASTn-Suchen identifiziert werden, da es nicht in

der Proteindatenbank hinterlegt ist und die tBLASTn-Suchen mit anderen Vertebraten-ARHs nicht sensitiv genug waren. Dies lässt die Möglichkeit offen, dass die Genome von Vertebraten noch weitere ARH-Familienmitglieder enthalten könnten. Mehrere aufgereinigte und charakterisierte ARH-Proteine zeigten Molekulargewichte, die nicht mit den bisher untersuchten ARH-Proteinen übereinstimmen (62 bzw. 83 kd, Fujita et al. 1995, Okamoto et al. 1997, Oka et al. 1984). Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass in Zukunft noch weitere Enzyme mit ARH-Aktivität kloniert und charakterisiert werden, die nicht zur ARH-Familie gehören oder eine ARH-Domäne mit anderen Proteindomänen fusioniert haben.

Einige ARHs in Invertebraten wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifiziert, jedoch nicht detailliert analysiert. Interessanterweise scheinen die meisten Invertebraten nur über ein ARH-Protein zu verfügen. Für die Insekten *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* und *Apis mellifera* kann dieses ARH-Protein aufgrund der Sequenzidentität zu hsARH3 der ARH3-Familie zugeordnet werden (siehe Abb. 5.3 und Abb. 5.6 gezeigt). Ein ARH-Protein aus *Ciona savignyi* ist der ARH1/2/4-Gruppe ähnlicher als ARH3 (siehe Abb. 5.3).

In zahlreichen Bakterien und Archaeen konnten DRAG-ähnliche ARH-Proteine gefunden werden, jedoch sind DRAT-ähnliche ART-Proteine deutlich seltener anzutreffen. In mehreren Organismen, darunter auch *M. jannaschii* und *T. thermophilus*, deren Genom komplett sequenziert wurde, sind keine DRAT-Homologe nachweisbar. Die Konservierung der Primärsequenz ist bei ARH-Proteinen höher als bei mART-Proteinen. In mehreren Untersuchungen gelang die Identifikation entfernter mART-Proteine erst durch mehrere Iterationen einer PSI-BLAST-Suche während verwandte ARHs aus anderen phylogenetischen Königreichen schon in der ersten Iteration entdeckt werden (Glowacki et al. 2002 und Tab. 5.1). Möglicherweise gibt es funktionelle *mART*-Gene in Bakterien und Archaeen, die wegen der geringen Sequenzähnlichkeit bisher einer Entdeckung entgingen. Alternativ könnten die DRAG-Homologe einen Abwehrmechanismus gegen Bakteriophagen-mARTs darstellen. Beispielsweise kodiert der Bakteriophage T4 zwei mARTs, die nach Infektion die α -Untereinheit der RNA-Polymerase modifizieren und dadurch die Expression von Wirtsgenen unterdrücken (Mailhammer et al. 1975).

6.5 Ausblick

Viele offene Fragen erfordern weiterführende Untersuchungen, um tiefere Einblicke in die Funktion der einzelnen ARH-Proteine zu erhalten:

ARH3 kann PAR und OAADPR abbauen. Beide Substanzen vermitteln intrazelluläre Signale in eukaryotischen Zellen und sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Die physiologische Funktion der ARH3-Aktivitäten ist noch nicht geklärt, aber eine eingehende Untersuchung ihres Beitrags zum PAR und OAADPR-Metabolismus ist notwendig. Die

Identifikation von ARH3 erlaubt die Generierung von ARH3^{-/-}-Mäusen und die Anwendung von siRNA-Techniken. Damit könnte der Effekt von ARH3 detailliert untersucht werden. Darüber hinaus könnte sich dies als System zur Untersuchung des intramitochondrialen OAADPR- und PAR-Metabolismus anbieten. Eingehende Untersuchungen zur möglichen Demodifikation von GDH durch ARH3 stehen ebenfalls noch aus.

Durch den Einsatz der erzeugten monoklonalen Antikörper kann die Lokalisation endogener ARHs untersucht werden und eröffnet damit die Möglichkeit, endogen exprimierte ARHs für enzymatische Untersuchungen aufzureinigen, was auch die genauere Charakterisierung von ARH2 greifbar werden lässt. Der Funktion von ARH2 könnte man durch die Suche nach Bindungspartnern z.B. durch Koimmunpräzipitation nachgehen. Aufgrund des Expressionsmusters bietet sich hierfür Herz- oder Skelettmuskel an.

Tiefere Einblicke in die ARH-Struktur waren durch Vergleich von hsARH3, mjARH und ttARH möglich. Eine Charakterisierung der enzymatischen Aktivität von mjARH und ttARH könnte auch einen Einblick ermöglichen, welche Bereiche der ARH-Proteine für die Substratspezifität zuständig sind. Die erfolgreiche Kristallisation von hsARH1 lässt auch hoffen, dass bald die 3D-Struktur einer ADP-Ribosyl-Arginin-spezifischen ARH zu Verfügung steht.

Immer noch fehlt ein Regulationsmechanismus, an dem die gut charakterisierte ARH1 beteiligt ist. Andererseits wurde noch kein ARH-Protein identifiziert, das die beobachtete Cystein-de-ADP-Ribosylierungsaktivität aufweist. Wahrscheinlich steht die Identifikation zusätzlicher de-ADP-ribosylierender Proteine noch aus. Ähnlich wie bei den ADP-ribosylierenden Enzymen könnten sie zu einer anderen Proteinfamilie gehören. Tatsächlich wurden Proteine mit ARH-Aktivität aufgereinigt, die ein Molekulargewicht aufweisen, das nicht mit einem der untersuchten ARH-Proteine kompatibel ist (62 bzw. 83 kd, Fujita et al. 1995, Okamoto et al. 1997, Oka et al. 1984).

Mit der Charakterisierung erster intrazellulärer ADP-ribosylierender Enzyme in jüngster Zeit bieten sich auch bessere Systeme zur Untersuchung der De-ADP-Ribosylierung an. Die Identifikation von modifizierenden Enzymen und Zielproteinen erlaubt die kontrollierte Erzeugung von ADP-ribosylierten Substraten zum Testen von ARH-Proteinen. Durch die Verfügbarkeit dieser Komponenten potentieller Regulationszyklen durch ADP-Ribosylierung sind in Zukunft noch zahlreiche Entdeckungen zu erwarten. Auch durch die genauere Analyse der PARP- und Sirtuin-Familie werden sich Wissenslücken schließen und möglicherweise neue Zusammenhänge klar werden.

Schließlich erlaubt die Identifikation von ARH4 die Klonierung und enzymatische Charakterisierung dieser neuen ARH-Familie.

7. Literatur

- Adriouch et al. 2007 ADRIOUCH, S.; BANNAS, P.; SCHWARZ, N.; et al.: ADP-ribosylation at R125 gates the P2X7 ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site. In: *FASEB J.* (2007) (Vor Drucklegung online publiziert: doi:10.1096/fj.07-9294com).
- Ahuja et al. 2007 AHUJA, N.; SCHWER, B.; CAROBBIO, S.; et al.: Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. In: *J. Biol. Chem.* 282(2007): S. 33583-92.
- Aktories et al. 1992 AKTORIES, K.; MOHR, C.; KOCH, G.: Clostridium botulinum C3 ADP-ribosyltransferase. In: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 175(1992): S.115-31.
- Altschul et al. 1990 ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; et al.: Basic local alignment search tool. In: *J. Mol. Biol.* 215(1990): S. 403-10.
- Armougom et al. 2006 ARMOUGOM, F.; MORETTI, S.; POIROT, O.; et al.: Espresso: Automatic incorporation of structural information in multiple sequence alignments using 3D-Coffee. In: *Nucleic Acids Res.* 34(2006): S. W604-8.
- Borra et al. 2002 BORRA, M. T.; O'NEILL, F. J.; JACKSON, M. D.; et al.: Conserved enzymatic production and biological effect of O-acetyl-ADP-ribose by silent information regulator 2-like NAD⁺-dependent deacetylases. In: *J. Biol. Chem.* 277(2002): S. 12632-41.
- Bürkle et al. 2005 BÜRKLE, A.; DIEFENBACH, J.; BRABECK, C.: et al.: Ageing and PARP. In: *Pharmacol. Res.* 52(2005): S. 93-9.
- Castellano et al. 2005 CASTELLANO, S.; LOBANOV, A. V.; CHAPPLE, C.; et al.: Diversity and functional plasticity of eukaryotic selenoproteins: identification and characterization of the SelJ family. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102(2005): S. 16188-93.
- Cevantes-Laurean et al. 1993 CEVANTES-LAUREAN, D.; MINTER, D. E.; JACOBSON, E. L.; et al.: Protein glycation by ADP-ribose: studies of model conjugates. In: *Biochemistry* 32 (1993): S.1528-34.
- Choi et al. 2005 CHOI, M. M.; HUH, J. W.; YANG, S. J.; et al.: Identification of ADP-ribosylation site in human glutamate dehydrogenase isozymes. In: *FEBS Lett.* 579(2005): S. 4125-30.
- Chou et al. 2006 CHOU, H. Y.; CHOU, H. T.; LEE, S. C.: CDK-dependent activation of poly(ADP-ribose) polymerase member 10 (PARP10). In: *J. Biol. Chem.* 281(2006): S. 15201-7.
- Cordeiro und Di Girolamo 2003 CORDA, D.; DI GIROLAMO, M.: Functional aspects of protein mono-ADP-ribosylation. In: *EMBO Journal* 22(2003): S. 1953-8.

- Cortes et al. 2004
CORTES, U.; TONG, W. M.; COYLE, D. L.; et al.: Depletion of the 110-kilodalton isoform of poly(ADP-ribose) glycohydrolase increases sensitivity to genotoxic and endotoxic stress in mice. In: *Mol. Cell. Biol.* 24(2004): S. 7163-78.
- De Flora et al. 2004
DE FLORA, A.; ZOCCHI, E.; GUIDA, L.; et al.: Autocrine and paracrine calcium signaling by the CD38/NAD⁺/cyclic ADP-ribose system. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1028(2004): S. 176-91.
- Desnoyers et al. 1995
DESNOYERS, S.; SHAH, G. M.; BROCHU, G.; et al.: Biochemical properties and function of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. In: *Biochimie* 77(1995): S. 433-8.
- Di Griolamo 2005
DI GRIOLAMO, M.; DANI, N.; STILLA, A.; et al.: Physiological relevance of the endogenous mono(ADP-ribosylation) of cellular proteins. In: *FEBS journal* 272(2005): S. 4565-75.
- Emanuelsson et al. 2000
EMANUELSSON, O.; NIELSEN, H.; BRUNAK, S.; et al.: Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. In: *J. Mol. Biol.* 300(2000): S. 1005-16.
- Fitzmaurice et al. 1989
FITZMAURICE, W. P.; SAARI, L. L.; LOWERY, R. G.; et al.: Genes coding for the reversible ADP-ribosylation system of dinitrogenase reductase from *Rhodospirillum rubrum*. In: *Mol. Gen. Genet.* 218(1989): S. 340-7.
- Fliegert et al. 2007
FLIEGERT, R.; GASSER, A.; GUSE, A. H.: Regulation of calcium signalling by adenine-based second messengers. In: *Biochem. Soc. Trans.* 35(2007): S. 109-14.
- Frye 2000
FRYE, R. A.: Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273(2000): S. 793-8.
- Fujita et al. 1995
FUJITA, H.; OKAMOTO, H.; TSUYAMA, S.: ADP-ribosylation in adrenal glands: purification and characterization of mono-ADP-ribosyltransferases and ADP-ribosylhydrolase affecting cytoskeletal actin. In: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27(1995): S. 1065-78.
- Glowacki et al. 2002
GLOWACKI, G.; BRAREN, R.; FIRNER, K.; et al.: The family of toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferases in humans and the mouse. In: *Protein Science* 11(2002): S. 1657-70.
- Grube und Bürkle 1992
GRUBE, K.; BÜRKLE, A.: Poly(ADP-ribose) polymerase activity in mononuclear leukocytes of 13 mammalian species correlates with species-specific life span. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89(1992): S. 11759-63.
- Grubisha et al. 2006
GRUBISHA, O.; RAFTY, L. A.; TAKANISHI, C. L.; et al.: Metabolite of SIR2 reaction modulates TRPM2 ion channel. In: *J. Biol. Chem.* 281(2006): S. 14057-65.

- Guse 2005 GUSE, A. H.: Second messenger function and the structure-activity relationship of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). In: *Febs J.* 272(2005): S. 4590-7.
- Haigis et al. 2006 HAIGIS, M. C.; MOSTOSLAVSKY, R.; HAIGIS, K. M.; et al.: SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. In: *Cell* 126(2006): S. 941-54.
- Haince et al. 2006 HAINCE, J. F.; OUELLET, M. E.; McDONALD, D.; et al.: Dynamic relocation of poly(ADP-ribose) glycohydrolase isoforms during radiation-induced DNA damage. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1763(2006): S. 226-37.
- Halbleib und Ludden 2000 HALBLEIB, C. M.; LUDDEN, P. W.: Regulation of biological nitrogen fixation. In: *J. Nutrition* 130(2000): S. 1081-4.
- Hallows et al. 2006 HALLOWS, W. C.; LEE, S.; DENU, J. M.: Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(2006): 10230-5.
- Hassa et al. 2006 HASSA, P. O.; HAENNI, S. S.; ELSER, M.; et al.: Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: Where are we today and where are we going? In: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70 (2006): S. 789-829.
- Herrero-Yraola et al. 2001 HERRERO-YRAOLA, A.; BAKHIT, S. M. A.; FRANKE, P.; et al.: Regulation of glutamate dehydrogenase by reversible ADP-ribosylation in mitochondria. In: *EMBO Journal* 20(2001): S. 2404-12.
- Honjo et al. 1968 HONJO, T.; NISHIZUKA, Y.; HAYAISHI, O.: Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. In: *J. Biol. Chem.* 243(1968): S. 3553-5.
- Jones 1999 JONES, D. T.: Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. In: *J. Mol. Biol.* 292(1999): S. 195-202.
- Just et al. 1994 JUST, I.; WOLLENBERG, P. MOSS, J.; et al.: Cysteine-specific ADP-ribosylation of actin. In: *Eur. J. Biochem.* 221(1994): S. 1047-54.
- Karras et al. 2005 KARRAS, G. I.; KUSTATSCHER, G.; BUHECHA, H. R.; et al.: The macro domain is an ADP-ribose binding module. In: *Embo J.* 24(2005): S. 1911-20.
- Kato et al. 2007 KATO, J.; ZHU, J.; LIU, C.; et al.: Enhanced sensitivity to cholera toxin in ADP-ribosylarginine hydrolase-deficient mice. In: *Mol. Cell Biol.* 27(2007): S. 5534-43.
- Kernstock 2003 KERNSTOCK, S.: Klonierung und molekulare Charakterisierung neuer putativer mono-ADP-Ribosylhydrolasen von Mensch und Maus. Diplomarbeit, Universität Hamburg (2003).

- Kernstock et al. 2006 KERNSTOCK, S.; KOCH-NOLTE, F.; MÜLLER-DIECKMANN, J.; et al.: Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of human ARH3, the first eukaryotic protein-ADP-ribosylhydrolase. In: *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 62(2006): S. 224-7.
- Koh et al. 2004 KOH, D. W.; LAWLER, A. M.; POITRAS, M. F.; et al.: Failure to degrade poly(ADP-ribose) causes increased sensitivity to cytotoxicity and early embryonic lethality. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(2004): 17699-704.
- Konczalik und Moss 1999 KONCZALIK, P.; MOSS, J.: Identification of Critical, Conserved Vicinal Aspartate Residues in Mammalian and Bacterial ADP-ribosylarginine Hydrolases. In: *J. Biol. Chem.* 274(1999): S. 16736-40
- Kozak 1987 KOZAK, M.: An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. In: *Nucleic Acids Research* 15(1987): S. 8125-31.
- Kurosaki et al. 1987 KUROSAKI, T.; USHIRO, H.; MITSUUCHI, Y.; et al.: Primary structure of human poly(ADP-ribose) synthetase as deduced from cDNA sequence. In: *J. Biol. Chem.* 262(1987): S. 15990-7.
- Kustatscher et al. 2005 KUSTATSCHER, G.; HOTHORN, M.; PUGIEUX, C.; et al.: Splicing regulates NAD metabolite binding to histone macroH2A. In: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12(2005): S. 624-5.
- Lai et al. 2007 LAI, Y.; CHEN, Y.; WATKINS, S. C.; et al.: Identification of Poly-ADP-Ribosylated Mitochondrial Proteins after Traumatic Brain Injury. In: *J. Neurochem.* (2007): Elektronische Publikation vor Drucklegung, PMID: 17996029.
- Lee 1997 LEE, H. C.: Mechanisms of calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. In: *Physiol. Rev.* 77(1997): S. 1133-64.
- Lee und Aarhus 1995 LEE, H. C.; AARHUS, R.: A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose. In: *J. Biol. Chem.* 270(1995): S. 2152-7.
- Leno und Ledford 1990 LENO, G. H.; LEDFORD, B.E.: Reversible ADP-ribosylation of the 78 kDa glucose-regulated protein. In: *FEBS letters* 276(1990): S. 29-33.
- Lin 2007 LIN, H.: Nicotinamide adenine dinucleotide: beyond a redox coenzyme. In: *Org. Biomol. Chem.* 16(2007): S. 2541-54.
- Liou et al. 2005 LIOU, G. G.; TANNY, J. C.; KRUGER, R. G.; et al.: Assembly of the SIR complex and its regulation by O-acetyl-ADP-ribose, a product of NAD-dependent histone deacetylation. In: *Cell* 121(2005): S. 515-27.

- Lombard et al. 2007 LOMBARD, D. B.; ALT, F. W.; CHENG, H. L.; et al.: Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. In: *Mol. Cell. Biol.* 27(2007): S. 8807-14.
- Lowery und Ludden 1988 LOWERY, R. G.; LUDDEN, P. W.: Purification and properties of dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. In: *J. Biol. Chem.* 263(1988): S. 16714-9.
- Ludden 1994 LUDDEN, P. W.: Reversible ADP-ribosylation as a mechanism of enzyme regulation in procaryotes. In: *Mol. Cell Biochem.* 138(1994): S. 123-9.
- Lupi et al. 2000 LUPI, R.; CORDA, D.; GIROLAMO, M.: Endogenous ADP-ribosylation of the G protein beta subunit prevents the inhibition of type 1 andenylyl cyclase. In: *J. Biol. Chem.* 275(2000): S. 9418-24
- Lupi et al. 2002 LUPI, R.; DANI, N.; DIETRICH, A.; et al.: Endogenous mono-ADP-ribosylation of the free Gbetagamma prevents stimulation of phosphoinositide 3-kinase-gamma and phospholipase C-beta2 and is activated by G-protein-coupled receptors. In: *Biochem. J.* 367(2002): S. 825-32.
- Mailhammer et al. 1975 MAILHAMMER, R.; YANG, H. L.; REINESS, G.; et al.: Effects of bacteriophage T4-induced modification of *Escherichia coli* RNA polymerase on gene expression in vitro. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72(1975): S. 4928-32.
- Matsuyama und Tsuyama 1991 MATSUYAMA, S.; TSUYAMA, S.: Mono-ADP- ribosylation in brain: purification and characterization of ADP-ribosyltransferases affecting actin from rat brain. In: *J. Neurochem.* 57(1991): S. 1380-7.
- McDonald und Moss 1994 MCDONALD, L. J.; MOSS, J.: Enzymatic and nonenzymatic ADP-ribosylation of cysteine. In: *Mol. Cell. Biochem.* 138(1994): S. 221-6.
- McGuffin und Jones 2003 MCGUFFIN, L. J.; JONES, D. T.: Improvement of the GenTHREADER method for genomic fold recognition. In: *Bioinformatics* 19(2003): S. 874-81.
- Meyer et al. 2007 MEYER, R. G.; MEYER-FICCA, M. L.; WHATCOTT, C. J.; et al.: Two small enzyme isoforms mediate mammalian mitochondrial poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) activity. In: *Exp. Cell Res.* 313(2007): S. 2920-36.
- Meyer-Ficca et al. 2004 MEYER-FICCA, M. L.; MEYER, R. G.; COYLE, D. L.; et al.: Human poly(ADP-ribose) glycohydrolase is expressed in alternative splice variants yielding isoforms that localize to different cell compartments. In: *Exp. Cell. Res.* 297(2004): S. 521-32.

- Meyer-Ficca et al. 2005 MEYER-FICCA, M. L.; MEYER, R. G.; JACOBSON, E. L.; et al.: Poly(ADP-ribose) polymerases: managing genome stability. In: *Int. Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37(2005): S. 920-6.
- Moss et al. 1980 MOSS, J.; STANLEY, S. J.; WATKINS, P. A.: Isolation and Properties of an NAD- and Guanidine-dependent ADP-ribosyltransferase from Turkey Erythrocytes. In: *J. Biol. Chem.* 255(1980): S. 5838-40.
- Moss et al. 1992 MOSS, J.; STANLEY, S. J.; NIGHTINGALE, M. S.; et al.: Molecular and immunological characterization of ADP-ribosylarginine hydrolases. In: *J. Biol. Chem.* 267(1992): S. 10481-88.
- Moss et al. 1997 MOSS, J.; ZOLKIEWSKA, A.; OKAZAKI, I.: ADP-ribosylarginine hydrolases and ADP-ribosyltransferases. Partners in ADP-ribosylation cycles. In: *Adv. Exp. Med. Biol.* 419(1997): S. 25-33.
- Müller-Dieckmann et al. 2002 MÜLLER-DIECKMANN, C.; RITTER, H.; HAAG, F.; et al.: Structure of the ecto-ADP-ribosyl transferase ART2.2 from rat. In: *J. Mol. Biol.* 322(2002): S. 687-96.
- Müller-Dieckmann, C. et al. 2006 MÜLLER-DIECKMANN, C.; KERNSTOCK, S.; LISUREK, M.; et al.: The structure of human ADP-ribosylhydrolase 3 (ARH3) provides insights into the reversibility of protein ADP-ribosylation. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(2006): S. 15026-31.
- Müller-Dieckmann, J. 2006 MÜLLER-DIECKMANN, J.: The open-access high-throughput crystallization facility at EMBL Hamburg. In: *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62(2006): S. 1446-52.
- Muiras et al. 1998 MUIRAS, M. L.; MULLER, M.; SCHACHTER, F.; et al.: Increased poly(ADP-ribose) polymerase activity in lymphoblastoid cell lines from centenarians. In: *J. Mol. Med.* 76 (1998): S. 346-54.
- Nielsen et al. 1997 NIELSEN, H.; ENGELBRECHT, J.; BRUNAK, S.; et al.: Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. In: *Protein Eng.* 10(1997): S. 1-6.
- Niere et al. 2007 NIERE, M.; KERNSTOCK, S.; KOCH-NOLTE, F.; et al.: Functional localization of two poly-ADP-ribose degrading enzymes to the mitochondrial matrix. In: *Mol. Cell. Biol.* (2007) (Vor Drucklegung online publiziert: doi:10.1128/MCB.01766-07).
- Notredame et al. 2000 NOTREDAME, C.; HIGGINS, D. G.; HERINGA, J.: T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. In: *J. Mol. Biol.* 302(2000): S. 205-17.
- Oei und Ziegler 2000 OEI, S. L.; ZIEGLER, M.: ATP for the DNA ligation step in base excision repair is generated from poly(ADP-ribose). In: *J. Biol. Chem.* 275(2000): S. 23234-9.

- Oka et al. 1984 OKA, J.; UEDA, K.; HAYAISHI, O.; et al.: ADP-ribosyl protein lyase. Purification, properties, and identification of the product. In: *J. Biol. Chem.* 259(1984): S. 986-95.
- Oka et al. 2006 OKA, S.; KATO, J.; MOSS, J.: Identification and characterization of a mammalian 39-kDa Poly(ADP-ribose) glycohydrolase. In: *J. Biol. Chem.* 281(2006): S. 705-13.
- Okamoto et al. 1997 OKAMOTO, H.; FUJITA, H.; MATSUYAMA, S.; et al.: Purification, characterization, and localization of an ADP-ribosylactin hydrolase that uses ADP-ribosylated actin from rat brains as a substrate. In: *J. Biol. Chem.* 272(1997): S. 28116-125.
- Okazaki und Moss 1999 OKAZAKI, I. J.; MOSS, J.: Characterization of glycosylphosphatidyl-inositol-anchored, secreted, and intracellular vertebrate mono-ADP-ribosyltransferases. In: *Annu. Rev. Nutr.* 19(1999): S. 485-509.
- Ono et al. 2006 ONO, T.; KASAMATSU, A.; OKA, S.; et al.: The 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase ARH3 hydrolyzes O-acetyl-ADP-ribose, a product of the Sir2 family of acetyl-histone deacetylases. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(2006): S. 16687-91.
- Otto et al. 2005 OTTO, H.; RECHE, P. A.; BAZAN, F.; et al.: In silico characterization of the family of PARP-like poly(ADP-ribosyl)transferases (pARTs). In: *BMC Genomics* 6 (2005): S. 139, doi: 10.1186/1471-2164-6-139.
- Piatigorsky et al. 1993 PIATIGORSKY, J.; HORWITZ, J.; NORMAN, B. L.: J1-crystallins of the cubomedusan jellyfish lens constitute a novel family encoded in at least three intronless genes. In: *J. Biol. Chem.* 268(1993): S. 11894-901.
- Peterson et al. 1990 PETERSON, J. E.; LAREW, J. S. A.; GRAVES, D. J.: Purification and partial characterization of arginine-specific ADP-ribosyltransferase from skeletal muscle microsomal membranes. In: *J. Biol. Chem.* 265(1990): S. 17062-9.
- Quist et al. 1994 QUIST, E. E.; COYLE, D. L.; VASAN, R.; et al.: Modification of cardiac membrane adenylate cyclase activity and Gs alpha by NAD and endogenous ADP-ribosyltransferase. In: *J. Mol. Cell Cardiol.* 26(1994): S. 251-60.
- Rafty et al. 2002 RAFTY, L. A.; SCHMIDT, M. T.; PERRAUD, A. L.; et al.: Analysis of O-acetyl-ADP-ribose as a target for Nudix ADP-ribose hydrolases. In: *J. Biol. Chem.* 277(2002): S. 47114-22.
- Ruf et al. 1996 RUF, A.; MENNISSIER DE MURCIA, J.; DE MURCIA, G.; et al.: Structure of the catalytic fragment of poly(AD-ribose) polymerase from chicken. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93(1996): S. 7481-5.

- Rusinko und Lee 1989 RUSINKO, N.; LEE, H. C.: Widespread occurrence in animal tissues of an enzyme catalyzing the conversion of NAD⁺ into a cyclic metabolite with intracellular Ca²⁺-mobilizing activity. In: *J. Biol. Chem.* 264(1989): S. 11725-31.
- Schreiber et al. 2002 SCHREIBER, V.; AME, J. C.; DOLLE, P.; et al.: Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. In: *J. Biol. Chem.* 277(2002): S. 23028-36.
- Schwab et al. 2000 SCHWAB, C. J.; COLVILLE, M. J.; FULLERTON, A. T.; et al.: Evidence of endogenous mono-ADP-ribosylation of cardiac proteins via anti-ADP-ribosylarginine immunoreactivity. In: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223(2000): S. 389-96.
- Schwer et al. 2006 SCHWER, B.; BUNKENBORG, J.; VERDIN, R. O.; et al.: Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(2006): S. 10224-9.
- Scovassi 2004 SCOVASSI, A. I.: Mitochondrial poly(ADP-ribosylation): from old data to new perspectives. In: *Faseb J.* 19(2004): S. 1487-8.
- Seman et al. 2003 SEMAN, M.; ADRIOUCH, S.; SCHEUPLEIN, F.; et al.: NAD-Induced T Cell Death: ADP-Ribosylation of Cell Surface Proteins by ART2 Activates the Cytolytic P2X7 Purinoceptor. In: *Immunity* 19(2003): S. 571-82.
- Seoighe 2003 SEOIGHE, C.: Turning the clock back on ancient genome duplication. In: *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13(2003): S. 636-43.
- Stryer 1999a STRYER, L.: *Biochemie*. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verlag. 4. Auflage (1999): S. 473-5.
- Stryer 1999b STRYER, L.: *Biochemie*. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verlag. 4. Auflage (1999): S. 557-84.
- Stryer 1999c STRYER, L.: *Biochemie*. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verlag. 4. Auflage (1999): S. 975.
- Studier 2005 STUDIER, W.: Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. In: *Protein Expr. Purif.* 1(2005): S. 207-34
- Takada et al. 1993 TAKADA, T.; IIDA, K.; MOSS, J.: Cloning and site-directed mutageneses of human ADP-ribosylarginine hydrolase. In: *J. Biol. Chem.* 268(1993): S. 17837-43.
- Takada et al. 1994 TAKADA, T.; OKAZAKI, I. J.; MOSS J.: ADP-ribosylarginine hydrolases. In: *Mol. Cell Biochem.* 138(1994): S. 119-22.

- Takamura-Enya et al. 2001 TAKAMURA-ENYA, T.; WATANABE, M.; TOTSUKA, Y.; et al.: Mono(ADP-ribosyl)ation of 2'-deoxyguanosine residue in DNA by an apoptosis-inducing protein, pierisin-1, from cabbage butterfly. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98(2001): S. 12414-9.
- Tanigawa et al. 1984 TANIGAWA, Y.; TSUCHIYA, M.; IMAI, Y.; et al.: ADP-ribosyltransferase from Hen Liver Nuclei. In: *J. Biol. Chem.* 259(1984): S. 2022-9.
- Tanuma et al. 1988 TANUMA, S.; KAWASHIMA, K.; ENDO, H.: Eukaryotic Mono(ADP-ribosyl)transferase that ADP-ribosylates GTP-binding regulatory G_i protein. In: *J. Biol. Chem.* 263(1988): S. 5485-9.
- Ullrich und Grune 2001 ULLRICH, O.; GRUNE, T.: Proteasomal degradation of oxidatively damaged endogenous histones in K562 human leukemic cells. In: *Free Radic. Biol. Med.* 31(2001): S. 887-93.
- Virág und Szabó 2002 VIRÁG, L.; SZABÓ, C.: The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. In: *Pharmacol. Rev.* 54(2002): S. 375-429.
- Warburg et al. 1935 WARBURG, O.; CHRISTIAN, W.; GRIESE, A.: Wasserstoffübertragendes Co-Ferment, seine Zusammensetzung und Wirkungsweise. In: *Biochem. Zeitung* 282(1935): S. 157-65.
- Yamamoto et al. 2007 YAMAMOTO, H.; SCHOONJANS, K.; AUWERX, J.; et al.: Sirtuin Functions in Health and Disease. In: *Mol. Endocrinol.* 21(2007): S. 1745-55.
- Yamasaki et al. 2005 YAMASAKI, M.; CHURCHILL, G. C.; GALIONE, A.: Calcium signalling by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP). In: *Febs J.* 272(2005): S. 4598-606.
- Yu et al. 2006 YU, S. W.; ANDRABI, S. A.; WANG, H.; et al.: Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(2006): S. 18314-9.
- Zolkiewska et al. 1992 ZOLKIEWSKA, A.; NIGHTINGALE, M. S.; MOSS, J.: Molecular characterization of NAD:arginine ADP-ribosyltransferase from rabbit skeletal muscle. In: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89(1992): S. 11352-6.
- Zolkiewska und Moss 1997 ZOLKIEWSKA, A.; MOSS, J.: The alpha 7 integrin as a target protein for cell surface mono-ADP-ribosylation in muscle cells. In: *Adv. Exp. Med. Biol.* 419(1997): S. 297-303.

8. Anhang

8.1 ARH-Proteinsequenzen

Die verwendeten Aminosäuresequenzen der ARH-Proteine sind alphabetisch aufgelistet. Hinter dem Proteinnamen ist der Zugriffskode für die Ensembl- bzw. *genbank*-Datenbank angegeben. Manuelle Ergänzungen und Korrekturen der Sequenzen wurden ausgehend von den deponierten Sequenzen vorgenommen. Kleinbuchstaben bezeichnen manuell ergänzte oder entfernte Aminosäuren. Fehlende Exons wurden ergänzt und falsche Exon-Intron-Grenzen bzw. überzählige Exons korrigiert. Diese Änderungen sind durch farbige Unterlegung markiert und hinter dem Zugriffskode erklärt.

>agARH (AGAP002530-PA)

MLEKSLMLSKFRGSLGALVGDCCGAPFEGQLMDSGAKLILKKNLKDLEGPPFNAPYKKYTDDTAMTIQTARALV
DPNGYSQKLLAKNFVVEFFKEPNRGYGAAVGEVFRKLRQTKIADPTGPAMAQFNGSGSFGNGAAMRISPVALYCV
NKSIDELVRLVKESSEITHTNVLGVNGAILQALAIRQSLLLNPNEPFCWKAFLAELKQHMVEIEKGNPDLDANP
NAYEKQLQNMETLLDHRVDPDENVNLNLLGHVAAALYSVPTAVYCFRLRHTQDLLKDTDRKSFRTLEYAISLGGD
CDTIGSMACAI SGAYYGEP AISSALLKHCE SADSVAELAEQLFQVAGTQ

>ggARH1 (ENSGALP00000024910 - 35 N-terminale Aminosäuren bis zum zweiten Methionin entfernt)

MENYVASMVLSALGDTLGYNAKWEFLKSGPAIHSELAAMGGLGNFNIKGWVSDDTVMHLATAEALVAAGRNP
LMHLYSLIAENYKECMNDMDNRPGETCMDNALNLDPRRPETWKAPFSPKGGGCGAAMRSMCIGLRFHRAAELDT
LVQVSIESGRMTHHNPTGYLGLSALASALFTALAVNGVPLVWVKRLLDVLPRAKAYVHGTGSFVEENMRHWSYFEE
QWKAYLKERGILDGVSPTFPSPKYGVEERDSFYNSLSYSGWGGSSGHDAPMIAYDALLGAGQSWTELAHRAFFHG
GSDSTAAIAACWGWAMHGFRGIATSLYADLEYRERLEEVAKELYRISQA

>ggARH2 (ENSGALP00000027115)

MDKFKAAALVLAGVGDALGYRNF SRQDNALGAKIQQELKEIGGLENLVLSPDKWPVSDNTLMHMATAEAVITDYWC
LEDLYRELVKRYVDAVDKLSGRRPDPATIEGCRELKP DNYLLAWHTPFNEKSGFGASTKAMCLGMRYWKPERLE
SLIEVSI ECGRMTHHNPTGFLGSLCTALFVAYAIQ GKPLVQWGREMMKVVPMAEYCKKTI RHMAEYQEHWFYFE
AKWQFYLEEREINEENQNKAVFPDNYDAEEREKTYRRWSSEGRGRRGH DAPMIAYDALLGCGGDWTELCNRSMF
HGGE SAATGSIAGCLYGLVYGLSKVPKGM YQDLEQRERLEYLGENLYRLSMEEK

>ggARH3 (ENSGALP00000003617, ein überzähliges Intron wurde gestrichen (cyan))

MAAAGAGSGRAAVSRSRPPPARFRGCLAGALLGDCLGAVFEGRSVVKLPDLLSFLRGGLEPPGGEPEPAGSARRET
LSYTD TAMSRCVVQSLLAKREFDEVDMAKRFAEYKKEPNRGYGMVNVVFKKLLSPQCSDFE PARAQFNGKG
SYNGGAMRVAGIPLTYSDVQDVKKFAKLSAELTHANSLGYNGAILQALAVHLALQGEV SRETFLQLISHMEDI
EADDKSLTDARALGFEDLPFSRRLKKIKEFLELSSVPKEDVLFELNGIAALRSVPTAIYSFLRCMEADPDIPEH
YNNLQRTI IYICISLGGDTNTIATMAGAIAGAYYGEEQVPPSWEQSCEAFQETQKMANSLEHLYCQQL

>ggARH4 (Zusammengesetzt aus BLAST-Treffern in Contig958.4 (gelb), Contig1593.3 (grün und cyan) und dem um 17 N-terminale Aminosäuren gekürzten Transkript ENSGALP00000019395. Exon 1 fehlt).

DRYEAALLLAAAGDALGFRGGLWEYCTAGARIHKELPALGGLSSIELRPPDWPLSDDTILHLETAEGLSSGLEGD
ALLQELARRYVAAMEDMEGRKPGPSSILGTSQLRPGEPHGYRIPFNPTGTGCGAAMRSLAIGLRYRPRPEELPTLI
RVSIESGRMTLHHFTGYLGALAVLFGALGVRGEPPELWGAELLRILPHAWDYVEGEGVAVEENAAAWDFGDTW
RRYLESRGLLGGGGPPRVPSLPTPEERDAEYVRWALGGWAGRS GHDAPMVALEALLAAGDSWEELCARAVLHGGD
NDSTGTIAAGCWGLRWGLSRVPPGMHRHLEYRQRLCHVAHRLHALAWGH

>hsARH1 (ENSP00000349496)

MEKYVAAMVLSAAGDALGYNGKWEFLQDGEKIHRQLAQLGGLDALDVGRWRVSDDTVMHLATAEALVEAGKAPK
LTQLYLLAKHYQDCMEDMDGRAPGGASVHNAMQLKPKPNGWRI PFNSHEGGCGAAMRAMCIGLRFPHHSQLDT
LIQVSIESGRMTHHHPTGYLGALASALFTAYAVNSRPPLQWGKGLMELLPEAKKYIVQSGYFVEENLQHWSYFQT
KWENYLKLRGILDGESAPTFPESFGVKERDQFYTSLSYSGWGGSSGHDAPMIAYDAVLAAGDSWKELAHRAFFHG
GSDSDSTAAIAGCWGVMYGFKGVSPSNYEKLEYRNRLEETARALYSLGSKEDTVISL

>hsARH2 (ENSP00000364567)

MEKFKAAMLLGSVGDALGYRNVCKENSTVGMKIQEELQSRGGLDHLVLSPEWVSDNTIMHIATAEALTTDYWC
LDDLYREMVRKYVEIVEKLPERRPDPATIEGCAQLKPNNYLLAWHTPFNEKSGSGAATKAMCIGLRYWKPERLE
TLIEVSVCEGRMTHNHPTGFLGSLCTALFVSFAAQGKPLVQWGRDMLRAVPLAEYCRKTI RHTAEYQEHWFYFE
AKWQFYLEERKISKDSENKAI FPDNYDAEEREKTYRKWSSEGRGRRGHDAPIAYDALLAAGNSWTELCHRAMF
HGGESAATGTIAGCLFGLLYGLDLVPGGLYQDLEDKEKLEDLGAALYRLSTEEK

>hsARH3 (ENSP00000362273)

MAAAAMAAAAGGGAGAARSLSRFRGCLAGALLGDCVGSFYEAHDTVDLTSVLRHVQSLEPDPGTPGSETEALYY
TDDTAMARALVQSLLAKEAFDEVDMHRFAQEYKKDPDRGYGAGVTVFKKLLNPKCRDVFEPARAQFNGKGSYG
NGGAMRVAGISLAYSSVQDVQKFARLSAQLTHASSLGYNGAILQALAVHLALQGESSEHFLKQLLGHMEDLEGD
AQSVLDARELGMEERPYSRLKKIGELLDQASVTREEVVSELNGIAAFESVPTAIYCFLRCEPDPEIPSAFNS
LQRTLIYSISLGGDTDTIATMAGAIAGAYYGMDQVPESWQQSCEGYEETDILAQSLHRVFAQS

>mdARH1 (ENSMODP00000022695)

MSTGLLERYVAAMVLSAVGDSLGYFNKWEFLNGELIHQQLAKLGGLDAINIEGWRVSDDTVMHLATAEALITA
GKEEDLTRVYSLIARHYKECMDMDGRAPGSTASVSNALKLEPDEPNGWRI PFNKHEGGCGAAMRAMCIGLRFPH
PEQDQDTLIQVSIESGRMTHHHPTGYLGAVASALFTAYAVNGKPPQEWGKGLMEVLPKAKNYIVQAGYYVKENLES
WDYFQDQWEKYLKLRGISNNGPPTFPPELFGVKERDEFYKSVSYSGWGGSSGHDAPLIAYDAI LAEEDSWKELAHR
AFFHGGSDSTAAIAGCWGVMHGFKGVSPSNYKRLEYKDRLEKAARALYALQSKESSVITH

>mdARH2 (ENSMODP00000004716)

MDKFKAALLLGAVGDALGYRNISRENSVLGPKIQEELKELGGLDKLVLSAEKWPVSDNTFMHVATAEALITDYWC
LDDLYREMVKRYVEIVEKLPGRRPDPATAEGCLQLKPDNYLLAWHTPFNEKSGSGAATKAMCIGMRYWKPERLE
TLIEVSI ECGRMTHNHPTGFLGSLCTALFVSYAIQGKPLVQWGRDMMKVVPMAEEFCKKTI RHMAEYQEHWFYFE
AKWQFYLEERKIAEDQDNKAI FPDRIYDAEERDKTYRKWSSEGRGRRGHDAPIAYDALLGAGDNWTELCNRAMF
HGGESGATGSIAGSLYGLLYGLTTIPKGLYQDLEHKDKLEHLGEALYRLSSEEK

>mdARH3 (ENSMODP00000022289)

xxxxxMAAVMAAVTGTAAGAARSLSRFRGCLAGALLGDCLGAVYEAHDDVTMASLLSHVGSLEPEPGAKGSART
EALYYTDDTAMTRALVQSLLAKEAFDEVDMKRFAQEYKKDPDRGYGAAVITVFKKLLNPKCIDVFEPARAQFNG
KGSYNGGAMRVAGISLAYSNKDVQKFARLSAQLTHASSLGYNGATLQALAVHLALQGESREQFLQQLLDHME
EVENDDRSLSEARELGMEERPYNLKLKIGEFLEQGLMTKEEVVSELNGIAAFESVPTAIYCFLRMAPDPAIP
ATFNSLQRTLIYSISLGGDTDTIATMAGAIAGAYYGMEQVPESWQQSCEGYEETDVLARNLHQLFSKDL

>mjARH (mj1187, NP_248182.1)

MVKMRDKILGSVFGAVIGDALGMPTENLTKEEIKKLYGFVDSYVEPKNYLAGKLNKGEWTDDEQAICLIKSLTK
EGIDIKKFANCLIAWKNKPPDIGLTSLMAIDKLENNDYSGVDSSSCGAAMRIYPLGIVFHNNLKKLKEEVIKAS
KITHNNKTAIAGALAI AFFVSSALKDRKDFSLDECYNIKDI DEEFACKLLEIKNFNNLDYIYDYFGTGVKTD
VVP SAIATYLLTDNFKEGMLKCINAGGDTDSLASYGAMAGAYYGFKNI PKEWIDGLKNKEVI FELAEERLYHLAT
E

>mmARH1 (ENSMUSP0000002923)

MGGGLIEREYVAAMVLSAAGDTLGYFNGKWEFIRDGETIHQQLAQMGDLEAIDVARWRVSDDTVMHLATAEALMEA
GQSPDLPRLYSLLAKHYRDCMGMDGRAPGGACMQNAMLLQPNRADGYRIPFNSHEGGCGAAMRAMCIGLRFPH
SQLDLLIQVSIESGRMTHHHPTGYLGSLSASALFTAYAVNGKSPWQWGKGLMEVLPEAKKYITQSGYFVKENLQHW
SYFEKEWEKYLELRGILDGNSAPVFPQPFVGVKERDQFYIDVSYSGWGGSSGHDAPMIAYDALLAAGDSWKELAHR
AFFHGGSDSTAAIAGCWWGVMYGFKGVNPANYEKLEYRQRLEEAGRALYSLGSKEDPVLDP

>mmARH2 (ENSMUSP00000033825)

MEKFKAAMLLGSVGDALGYGNICRENSVLGSIQEELQKTGGLDSLVLSPGRWPVSNDTIMHMATAEALTTDYWCL
DDLYREMVKRYVETVETLSEHRPDPSTIEGCSQLKPDNYLLAWHTPFSEKSGFGAATKAMCIGMRYWKPERLET
LIEVSIIEGRMTHNHPTGFLGSLCTALFASYALQGKPLVQWGREMLKVLPLAEEYCRKTI RHMAEYQEHWFYFEA
KWQFYLEERKIREDAEDKVTFFPDNYDAEERDKTYKKWSSEGRGGRRGHDAPMIAYDALLASGSNWTELCQRAMFH
GGESGATGTIAGCLFGLLHGLATVPRGLYQELEHKGRLEDLGAALHRLSTEEK

>mmARH3 (ENSMUSP00000099677)

MAVAAAAAATAMSAAGGGGASAAARSISRFRGCLAGALLGDCVAVYEAHDTVSLASVLSHVESLEPDPGTPGSAR
TETLYYTDDTAMTRALVQSLLAKEAFDEVDMAHRFAQEYKQKDPDRGYGAGVITVFKLLNPKCRDVYEPARAQFN
GKGSYNGGAMRVAGISLAYSSVQDVQKFARLSAQLTHASSLGYNGAILQALAVHLALQGVSSSEHFLEQLLGHM
EELEGDAQSVLDAKELGMEERPYSRRLKKGVELLDQDVVSREEVVSSELGNGIAAFESVPTAIYCFRLCMEPHPEI
PSTFNSLQRTLIYSISLGGDTDTIATMAGAIAGAYYGMEQVPESWQQSCEGFEETDVLAQSLHRVFQESS

>rrDRAG (P14300)

MTGPSVHDRALGAFLGLAVGDALGATVEFMTKGEIAQQYGIHRKMTGGGWLRLKPGQITDDTEMSLALGRSLAAK
GTLVDVADICEEFALWLKSRPVDVGNTRRGI RRYMHEGTTTAPYSEG DAGNGAAMRCLPAALATLGH PADLEPVW
LAQARITHNHPLSDAACLT LGRMVHHLIGGRGMKACREANRLVHQHRDFHFEPYKQSSAYIVDTMQTVLHYFF
VTDTFKSLIQTVNQGDADTTGALAGMLAGATYGVDDIPSGWLSKLDKVEREIRRQVDALLALAGLD

>trARH2 (SINFRUP00000162937, Exons 1-7, 5'-gelegener Teil von Exon 7 deletiert, Rest bis zum Stoppcodon ergänzt)

MEKFKAAMVLGAAGDALGYRKGRWGNCTSGKKIQEELASLGGLGIQKLDPDNWPLSDATLMHMTTAEALVTDYWC
LEDLYRELVRLYVEAMVSLQGRVPDPATVEGCVHLKPHNFLLAWHTPFNEKSGSGFGAAAKAMCVGMRYWQPERLN
SLVEVSTEIGRMTHNHPTGFLGSLTTALFASYAIIQKPLVAWGRELKKAISLAEYCKKTI RHMAEYQENWFYFE
AKWQFYLEERGIEKKEEQKNPSFPDRYDAEETDKMYKRWSSEGRPGRRGHDAPMIAYDALLAAGSNWAE LCKRAVF
HGGEGEATGLIAGCLYGLMHGFQVPPQGLYQDLDKRErleelgealyraassekcidk

>trARH3 (SINFRUP00000135574)

xMMAVRAMTAGGPASLSRFRGALVAAVLGDCVGGFEFEGAEVPMERVLQHLNSLDETGTGNLDYSDDTAMARCV
VRSILAHAGYDERDMAHRFAKEYGESPDGRYGTGVVHVLKLLSSSHLSDVYQPARDQFNGRGSFGNGGAMRAAPF
ALAFPKLADVRRFACLGAMLT HSCSLGYNGAVLQALAVHLSLQGALDLPQQFISRLITEMEDVESDDMSRKDARI
LKEAEKPFCDRLHRVRDLMDRSKVSIEEVISELGNGIAALHSVPTAIFCVLHCLEPRECLPENYGGGLERTIAYSL
ALGGDTDTIACMAGAIAGAHYIEAIPQSWINCEGAEDADVTAERLHVLYHQStrgr

>trARH4a (SINFRUP00000137376, das 1 Nukleotid lange Intron 7-8 wurde entfernt (cyan) und das Leseraster wieder hergestellt. Das 5'-gelegene Exon 1 (rot), wurde mit Hilfe des ESTs CA589803.1 ergänzt)

mdgPATLEHYKAAMVLSGAGDALGYRNELEWFEFNMSGPAIHQEVKELGGLKNIRVELPDWPVSDDTVLHLATAEGL
ATGKTGEELLHEVAARYVEGMKMDGRAPGPSSIWGVSQKPGEEGGFRVPYNDQGTGCGAAMRSMCIGLRYPKP
DQLLSLVAVAVETGRMTHPHPTGFLGAVASALFTAYAVQRRPVTTWGLGLIKEALPVAQNFVQGRGFAVAETERD
WGYFGDKWQWYLNLRGISNRRGPIWIPANYGPAERDQVFKTFLSLGWAGRSRGHAPMIALDALLGAGSDWEELMC
RAAFHGGSDSTAVIacc1wg1lygfgqvpegnyskleyrnrleksaeqlyalsh

>trARH4b (SINFRUP00000182868, das 1 Nukleotid lange Intron 7-8 wurde entfernt (cyan) und das Leseraster wieder hergestellt. Das 5'-gelegene Exon 1 fehlt.

PATLEHYKAAMVLSGAGDALGYRNELWEFNMSGPAIHQEVKELGGLKNIRELPDWPVSDDTVLHLATAEGLATGK
TGEELLHEVAARYIEGMKMDGRAPGNSTIWGVSQKPGEEGGYRVPYNVRRGGGCGAAMRSMCIGLRYPKPDQLL
SLVAVAVETGRMTHPHPTGFLGAVASALFTAYAVQRRPVTTWGLGLIKEALPVAQNFVQGGQFAVAETERDWGYF
GDKWQWYLNLRGISNGRGPVIWPANYGPAERDQVYETFSLSGWAGCCGHDAPMIALDALLGAGSDWEELMCRAAF
HGGSDSDSTAVIaccclwgllygfgqvpegnyskleyrnrlksaeqlyalsh

>ttARH (YP_144325)

MKGLKERQDRRLGAFGLAVGDALGAQVEGLPKGTFPEVREMKGGGPHRLPPGFWTDDTSQALCLAESLLQRGFD
PKDQMDRYLRWYREGYRSATGVCFLGHATRRLERYAATGDPYAGDEAGAGNGPLMRLAPLVLAYENHPDLLSL
ARRAARTTHGAREALEATEVLAWLLREALRGAPKEALLALEPFRGADLHPALRRVVEGGFWEAPEEGPGYAPGTL
AAALWAFARGRDFEEMRLAVNLGGDADTVGAVYQQLAGAYYGLGAI PGRWLRALHLREEMEALALALYRSMAS
PRE

>xtARH1 (ENSXETP0000002340)

MCSGLVENYVAAMVLSGAGDALGYNRGKWEFSRQGLKIHNELAELGGIENIDVNHVLSDDTVMHIAATAEALVEA
GKNTDPATLYPLLAKKYKECMHDMNGRAPGNTCMDSAYRLKPNTPDGWKI PFHKSAGGCGAAMRAMCIGLRFRRHP
DQLDDLIRISVESGRMTHHHPTGYLGSLSLAASFSSYAINRKPPEHWGKGLLDVLPKAKTYVEESGRDQDNLMTW
SYFESSWKSXYLTLRGILDGNSQPKFPENYGVVEERDKFYTSLSFHWGGSSGHDAPMIAYDAILGSGDSWTELSHR
AFFHGGSDSDSTAAIAASWWGAMYGFKGVSKANYKKLEYRDRLEKLGRGLYQLS

>xtARH2a (ENSXETP000000385499)

MEKFKAAMILAGTGDALGYKNFSWEMCASGVKIQEELKQLGGLENLVL PADKWPVSNNTLMHIATAESLVS DYWS
LEDLYREMVKHYVDVVDKLGRRPDPATIEGCANLKP DNYPYLLAWHTPFNEKSGSFGAATKAMCIGMKYWKPGRLE
TLIEVSIESGRMTHNHPTGFLGSLCTALFTSYAIQEKPVVQWGRDMMKVLPMAEYCKKTIRHMAEYQEHWFYFE
AKWQFYLEEREIAEENENKPKFPDKYDAEERDKTYRKWSSEGRGRRGH DAPMIAYDALLGAGDDWKELCNRATF
HGGEGGATGSIAGCLYGLLYGISKVPKNLYEQLEMKERLETLGEKLYQVATVEK

>xtARH2b (ENSXETP00000014204, N-terminal unvollständig wegen einer 5'-gelegenen Sequenzlücke in scaffold_8515)

SLATDYWSLEDLYREMVKHYVDVVDKLGRRPDPATIEGCANLKP DNYPYLLAWHTPFNEKSGSFGAATKAMCMGMK
YWKPGRLETTLIEVSIESGRMTHNHPTGFLGSLCTALFTSYAIQEKPVVQWGRDMMKVLPMAEYCKKTIRHMAEY
QEHWFYFEAKWQFYLEEREIAEENENKPKFPDKYDAEERDKTYRKWSSEGRGRRGH DAPMIAYDALLGAGDDWK
ELCNRATFHGGEGGATGSIAGCLYGLLYGISKVPKNLYEQLEMKERLETLGEKLYQVATVEK

>xtARH3 (ENSXETP00000009538) (6 Aminosäuren bis zu einer putativen Spleißakzeptorstelle 5' des angegebenen Startcodons wurden ergänzt)

vsaglkMMAAGVSRFRGSLGALLGDCIGAVFEGHTNVTKEFLFDYMKSLDKGERLKRVLTYTDDTAMARSIVQS
VLENYEFNIEDLANRFTTEYNRDPDRGYGTAVVHVFEKLGSGEYKHFVSPAREQFDGKGSYNGAAMRVVGISLA
YPRIPDIEYARTSGMLTHASSLGYNGAILQALAVHYALQGELAPETFLDQLLDHMKEVETDKKSRSDALELEMD
EFPYCNKLRKIKAF LAREDVTRKDIVKELNGIQAFESVPTAIYSFLRCLKPVSELSELTNLQRTIAFCILLGG
DTDTIATMAAAIAGAYHGEEQIPLNWKLSAEGYKDAEDWGEKHLHQLYCRRLQSTTS

>xtARH4 (CAJ82490)

METNPPSRERYRAAMLLSAAGDALGYRNQLWEYCKSGPQIHAELQELGGLGRVRVALPDWPLSDDTVLHLATAES
LGTGKLQGALYME LASRYVSAMSDMEGRKPGPTSILGTSQLRPGEPGGYRIPFNPSATGCGAAMRAMCIGLRFPR
PSDLPLQLVAVSVESGKMTNHPTGYLGSLSALFTALSVQGVPLELWGCRLLEATPLALKYVQSTETDPGQHEQD
WGYFQESWKRYLSE RGLSQGLGPAAFPAAYGAAERDVEYNKWSLDGWPGRS GH DAPMIAYDALLGGGASWEELCS
RSMFHGGSDSDSTGVIAGCCWGARYGLSGVPQGNYTELEYRHRLESAADTLHTLAWGGAE

8.2 Alignments der Aminosäuresequenzen orthologer ARHs

Die Alignments der wie oben beschrieben korrigierten Proteinsequenzen orthologer ARH-Proteine wurden mit dem Programm T-COFFEE erstellt. Der Grad der Konservierung ist unter dem Alignment angegeben (* = identisch; : = sehr ähnlich; . = ähnlich).

8.2.1 Orthologe ARH1-Genprodukte

```

hsARH1  -----MEKYVAAMVLSAAGDALGYNGKWEFLQDGEKIHRQLAQLGGLDALDVGRWRVSD
mmARH1  MGGGLIERYVAAMVLSAAGDTLGYFNGKWEFIRDGETIHQQLAQMGDLEAIDVARWRVSD
xtARH1  MCSGLVENYVAAMVLSGAGDALGYNRGKWEFSRQGLKIHNELAELGGIENIDVNHWLVSD
ggARH1  -----MENYVASMVLSALGDTLGYNAKWEFLKSGPAIHSELAAMGGLGNFSIKGWRVSD
mdARH1  MSTGLLERYVAAMVLSAVGDSLGYFNKWEFLNGELIHQQLAKLGGLDAINIEGWRVSD
      :*.***:****. **:*** . ***** .* ** :** :*.: :.: * ***

hsARH1  DTMVHLATAEALVEAGKAPKLTQLYLYLLAKHYQDCMEDMDGRAPGGA-SVHNAMQLKPGK
mmARH1  DTMVHLATAEALMEAGQSPDLPRLYSLLAKHYRDCMGDMDGRAPGGA-CMQNAMLLQPNR
xtARH1  DTMVHIATAEALVEAGKNTDPATLYPLLAKKYKECMHDMNGRAPGNT-CMDSAYRLKPNT
ggARH1  DTMVHLATAEALVAAGRNPDLMLHLYSLIAENYKECMNDMDNRPGET-CMDNALNLDPRR
mdARH1  DTMVHLATAEALITAGKEEDLTRVYSLIARHYKECMDDMDGRAPGSTASVSNALKLEPDE
      *****:*****: **: . :* *:*:*:*:* **:.***** : :. .* *.*

hsARH1  PNGWRIPFNSHEGGCGAAMRAMCIGLRFPHHSQLDTLIQVSIESGRMTHHHPTGYLGALA
mmARH1  ADGYRIPFNSHEGGCGAAMRAMCIGLRFPHPSQLDLLIQVSIESGRMTHHHPTGYLGSLA
xtARH1  PDGWKIPFHKSAGGCGAAMRAMCIGLRFHRHPDQLDDLIRISVESGRMTHHHPTGYLGSLA
ggARH1  PETWKAPFSPKGGGCGAAMRSMCIGLRFHRAAELDTLVQVSIESGRMTHHNPTGYLGSLA
mdARH1  PNGWRIPFNKHEGGCGAAMRAMCIGLRFPHPEQDQLTIQVSIESGRMTHHHPTGYLGAVA
      :. :. ** *****:***** : : * *::*:*****:*****:.*

hsARH1  SALFTAYAVNSRPPLQWGKGLMELLPEAKKYIVQSGYFVEENLQHWSYFQTKWENYLKLR
mmARH1  SALFTAYAVNGKSPWQWGKGLMEVLPEAKKYITQSGYFVKENLQHWSYFEKEWEKYLELR
xtARH1  ASLFSSYAINRKPPHEWGWKGLLDVLPKAKTYVEESGRDVQDNLMTWSYFESSWKSYLTLR
ggARH1  SALFTALAVNGVPPPLVWGRLLDVLPRAKAYVHGTGSFVEENMRHWSYFEEQWKAYLKER
mdARH1  SALFTAYAVNGKPPQEWGWKGLMEVLPAKKNYIVQAGYVVKENLESWDYFQDQWEKYLKLR
      :***: *:* .* *** *::**.* ** : :* *::*: *.*: .*: ** *

hsARH1  GILDGESAPTFPESFGVKERDQFYTSLSYSGWGGSSGHDAPMIAYDAVLAAGDSWKELAH
mmARH1  GILDGNSAPVFPQPFGVKERDQFYIDVSYSGWGGSSGHDAPMIAYDALLAAGDSWKELAH
xtARH1  GILDGNSQPKFPENYGVVEERDKFYTSLSFHGWGGSSGHDAPMIAYDAILGSGDSWTELSH
ggARH1  GILDGVSPPTFPSKYGVEERDSFYNSLSYSGWGGSSGHDAPMIAYDALLGAGQSWTELSH
mdARH1  GISNG-GPPTFPELFGVKERDEFYKSVSYSGWGGSSGHDAPLIAYDAILAAEDSWKELAH
      ** :* . * ** . :*:***.* .:*: *****:*****:*. :*: **:*

hsARH1  RAFFHGGSDSDSTAAIAGCWVGVMYGFKGVSPSNYEKLEYRNRLEETARALYSLGSKEDTV
mmARH1  RAFFHGGSDSDSTAAIAGCWVGVMYGFKGVNPANYEKLEYRQRLEEAGRALYSLGSKEDPV
xtARH1  RAFFHGGSDSDSTAAIAASWVGAMYGFKGVSKANYKKLEYRDRLEKLGRGLYQLS-----
ggARH1  RAFFHGGSDSDSTAAIAACWVGAMHGFRGIATSLYADLEYRERLEEVAKELYRISQA----
mdARH1  RAFFHGGSDSDSTAAIAGCWVGMHGFKGVSPSNYKRLEYKDRLEKAARALYALQSKESSV
      *****:*****..**.*:*:*:*: : * ***:***: .: ** :

hsARH1  ISL
mmARH1  LDP
xtARH1  ---
ggARH1  ---
mdARH1  ITH

```


8.2.3 Orthologe ARH3-Genprodukte

Für xtARH3 wurden sechs putative N-terminale Aminosäuren ergänzt (Kleinbuchstaben).

```

xtARH3 -----vsaglkMMAAGVSRFRGSLLGALLGDCIGAVFEGHTNVTKEFLFDY
ggARH3 -----MAAAGAGSGRAAVSRSRPPPARFRGCLAGALLGDCIGAVFEGRSVVKLPDLSF
hsARH3 -----MAAAAMAAAAGGGAGAARSLSRFRGCLAGALLGDCVGSFYEAHDTVDLTSLVRH
mdARH3 -----MAAVMAAVTGGTAAGAARSLSRFRGCLAGALLGDCIGAVYEAHDDVTMASLLSH
mmARH3 MAVAATAAATAASAAGGGGASAARSISRFRGCLAGALLGDCVAVYEAHDTVSLASVLSH
frARH3 -----MMAVRAMTAGGPASLSRFRGALVAAVLGDCVGGFEGEAEVPMERVLQH
          :                   :****.*.*:****:*.*:*.* *      : : .

xtARH3 MKSLD-----KGERLKRVLTYTDDTAMARSIVQSVLENYEFNIEDLANRFTTEYNRD
ggARH3 LRGLEPPGGEGEPAGSARRETLSTDDTAMSRVQVQSLAKREFDEVDMAKRFAEYKKE
hsARH3 VQSLEPDPG---TPGSERTEALYTTDDTAMARALVQSLLAKEAFDEVDMAHRFAQEYKKD
mdARH3 VGSLEPEPG---AKGSARTEALYTTDDTAMTRALVQSLLAKEAFDEVDMAKRFAQEYKKD
mmARH3 VESLEPDPG---TPGSARTEALYTTDDTAMTRALVQSLLAKEAFDEVDMAHRFAQEYKKD
frARH3 LNSLDETKG-----TGNLDYSDDTAMARCVVRSILAHAGYDERDMAHRFAKEYGES
          : .*:                   * *:****:*.*:*:*:* : : : *:*:*:* ** ..

xtARH3 PDRGYGTAVVHVFEKLGSGEYKHVFS PAREQFDGKGSYGNGAAMRVVGISLAYPRIPII
ggARH3 PNRGYGMAVVNVFKKLLSPQCSDFEPPARAQFNGKGSYGNGGAMRVAGIPLTYSVDVQDVK
hsARH3 PDRGYGAGVTVFKKLLNPKCRDVFEPARAQFNGKGSYGNGGAMRVAGISLAYSSVQDVQ
mdARH3 PDRGYGAAVITVFKKLLNPKCIDVFEPARAQFNGKGSYGNGGAMRVAGISLAYSNKDVQ
mmARH3 PDRGYGAGVITVFKKLLNPKCRDVYEPARAQFNGKGSYGNGGAMRVAGISLAYSSVQDVQ
frARH3 PDRGYGTGVVHVLKLLSSSHLSDVYQPARDQFNDRGSFGNGGAMRAAPFALAFPKLADVR
          *:**** .*: *::** . . .*:..** **:*:*:*:*..***.. :.*::. * :

xtARH3 EYARTSGMLTHASSLGYNGAILQALAVHYALQGE-LAPETFLDQLLDHMKEVETDKKRSR
ggARH3 KFAKLSAELTHANSLGYNGAILQALAVHLALQGE-VSRETFLQLISHMEDIEADKSLT
hsARH3 KFARLSAQLTHASSLGYNGAILQALAVHLALQGE-SSSEHFLKQLLGHMEDLEGDAQSVL
mdARH3 KFARLSAQLTHASSLGYNGATLQALAVHLALQGE-SSREQFLQQLLDHMEEVENDDRSL
mmARH3 KFARLSAQLTHASSLGYNGAILQALAVHLALQGV-SSSEHFLQQLLGHMEELEGDAQSVL
frARH3 RFACLGAMLTHSCSLGYNGAVLQALAVHLSLQGALDLPQQFISRLITEMEDVESDDMSRK
          :.* .. ***: ***** ***** :*** : *:::*: .*:::* * *

xtARH3 DALELEMDEFYPYCNKLRKIKAFIAREDVTRKDIVKELGNGIQAFESVPTAIYSFLRCLKP
ggARH3 DARALGFEDLPSRRLKIKIREFLELSSVPKEDVLFELGNGIAALRSVPTAIYSFLRCMEA
hsARH3 DARELGMEERPYSRLKIKIGELLDQASVTREEVSELGNGIAAFESVPTAIYCFRLCMEP
mdARH3 EARELGMEERPYNLKLKIKIGEFLEQLMTKEEVLSELGNGIAAFESVPTAIYCFRLCMEP
mmARH3 DAKELGMEERPYSRLKIKVGEELLDQDVVSREEVSELGNGIAAFESVPTAIYCFRLCMEP
frARH3 DARILKEAEKPFCDRLHRVRDLMDRSKVSIEEVISELGNGIAALHSVPTAIFCVLHCLEP
          :* * : * : *::: : : : : : : ***** *:*:*:*:*..*:*: .

xtARH3 VSELPSELTNLQRTIAFCILLGGDTDTIATMAAAIAGAYHGEEQIPLNWKLSAEGYKDAE
ggARH3 DPDIPEHYNNLQRTIICYISLGGDTNTIATMAGAIAGAYYGEEQVPPSWEQSCEAFQETQ
hsARH3 DPEIPSAFNSLQRTLIYISLGGDTDTIATMAGAIAGAYYGMDQVPESWQSQCEGYEETD
mdARH3 DPAIPATFNSLQRTLIYISLGGDTDTIATMAGAIAGAYYGMEQVPESWQSQCEGYEETD
mmARH3 HPEIPSTFNSLQRTLIYISLGGDTDTIATMAGAIAGAYYGMEQVPESWQSQCEGFEETD
frARH3 RECLPENYGGLERTIAYSLLALGGDTDTIACMAGAIAGAHYGIEAIPQSWINCCEGAEDAD
          :* .*:**: :.: *****:*** **.******:* : :* .* ..* ::::

xtARH3 DWGEKHLHQLYCRRLQSTTS
ggARH3 KMANSLHELYCQQL-----
hsARH3 ILAQLSLHRVFQK-S-----
mdARH3 VLARNLHQLFQSKDL-----
mmARH3 VLAQLSLHRVFQESS-----
frARH3 VTAERLHVLYHQSTRGR--
          .. ** : : .

```

8.2.4 Orthologe ARH4-Genprodukte

```

ggARH4 -----DRYEAAALLLAAAGDALGFRGGLWEYCTAGARIHKELPALGGLSSIELRPPDW
xtARH4 METNPPSRERYRAAMLLSAAGDALGYRNQLWEYCKSGPQIHAEHQELGGLGRVRVALPDW
trARH4a -MDGPATLEHYKAAMVLSGAGDALGYRNELWEFNMSGPAIHQEVKELGGLKNIRVELPDW
trARH4b ----PATLEHYKAAMVLSGAGDALGYRNELWEFNMSGPAIHQEVKELGGLKNIR-ELPDW
          :*:.*:.*:.*:*****:*  ***:  :*. ** *:  ****  :.  ***

ggARH4  PLSDDTILHLETAEGLSSGLEGDALLQELARRYVAAMEDMEGRKPGPSSILGTSQLRPGE
xtARH4  PLSDDTVLHLATAESLGTGKLQGALYMELASRYVSAMSDMEGRKPGPTSILGTSQLRPGE
trARH4a PVSDDTVLHLATAEGLATGKTGEELLHEVAARYVEGMKMDMDGRAPGPSSIWGVSQLKPGE
trARH4b PVSDDTVLHLATAEGLATGKTGEELLHEVAARYIEGMKMDMDGRAPGNSTIWGVSQLKPGE
          *:****:***  **.*.:*  *  *:.* ** :  :*.**:* **  :*:.*.***:***

ggARH4  PHGYRIPFNPTGTGCGAAMRSLAIGLRYPRPEELPTLIRVSIESGRMTLHHFTGYLGALA
xtARH4  PGGYRIPFNPSATGCGAAMRAMCIGLRFPRPSDLPQLVAVSVESGKMTNHPHTGYLGLSLA
trARH4a EGGFRVPYNDQGTGCGAAMRSMCIGLRYPKPDQLLSLVAVAVETGRMTHPHPTGFLGAVA
trARH4b EGGYRVPYNVRGGCGAAMRSMCIGLRYPKPDQLLSLVAVAVETGRMTHPHPTGFLGAVA
          *:*:*.*  .  *****:.*.***:*:*:*  *  *:  :*:.*:* **  *  ***:***:.*

ggARH4  VALFGALGVRGEPPELWGAELLR-ILPHAWDYVEGEGVAVEENAAAWDFFGDTWRRYLES
xtARH4  SALFTALSVQGVPLELWGCRLLE-ATPLALKYVQSTETDPGQHEQDWGYFQESWKRYLSE
trARH4a SALFTAYAVQRRPVTTWGLGLIKEALPVAQNFVQGRGFAVAETERDWGYFGDKWQWYLNL
trARH4b SALFTAYAVQRRPVTTWGLGLIKEALPVAQNFVQGGFAVAETERDWGYFGDKWQWYLNL
          ***  *  .*:  *  **  *:.  *  *  .:*.  :  *  .:*  :.*:  **

ggARH4  RGLLGGGGPPRVPSLPTPEERDAEYVRWALGGWAGRSBGHDAPMVALEALLAAGDSWEELC
xtARH4  RGLSQGLGPAAFPAAAYGAAERDVEYNKWSLDGWPGRSBGHDAPMIAYDALLGGGASWEELC
trARH4a RGISNDRGPVIWPANYGPAERDQVFKTFSLSGWAGRSBGHDAPMIALDALLGAGSDWEELM
trARH4b RGISNDRGPVIWPANYGPAERDQVYETFSLSGWAGCCGHDAPMIALDALLGAGSDWEELM
          **:  *  **  *:  .  ***  :  :*:.*.*  .*****:*  :***.*  .****

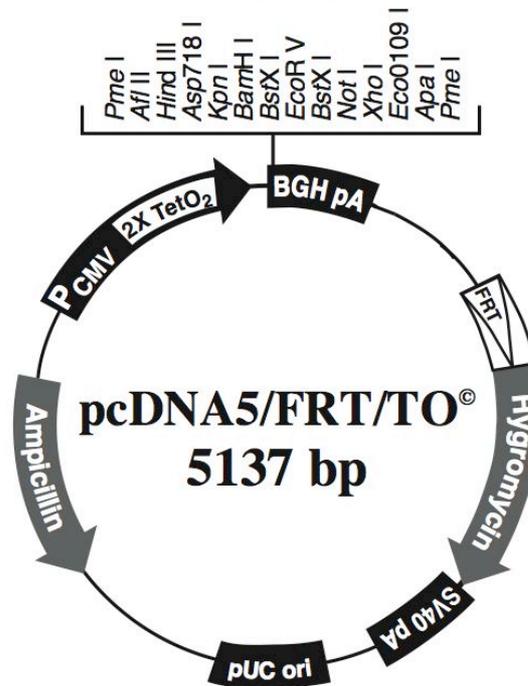
ggARH4  ARAVLHGGDNDSTGTIAAGCWGLRWGLSRVPPGMHRHLEYRQRLCHVAHRLHALAWGH--
xtARH4  SRSMFHGGDSSTGVIAGCCWGARYGLSGVPQGNYTELEYRHRLESAADTLHTLAWGGAE
trARH4a CRAAFHGGDSSTAVIACCLWGLLYGFQGVPEGNYSKLEYRNRLEKSAEQLYALSH----
trARH4b CRAAFHGGDSSTAVIACCLWGLLYGFQGVPEGNYSKLEYRNRLEKSAEQLYALSH----
          .*:  :****.***..**  **  :*:  **  *  :  .*****:**  *  *  :*:

```


mmARH1	StK113	TAAGCgAaTtcCGGGATCTAATACAGGGTCTTCTTTTGA	pEGFP-Klon.
mmARH1	StK115	AAGCAcTcGagGGGATCTAATACAGGGTCTTCTTTTGA	pET26b-Klon.
mmARH1	StK116	TGCCATTACCGGCATAcGCCGTA AAAAGAGCG	- <i>NdeI</i> -Sequenz
mmARH2	StK123	ACAAGgctagcATGGAGAAGTTCAAGGCTGCAATG	pEGFP-Klon.
mmARH2	StK125	CAAGAGAcAtATGAGAGAAGTTCAAGGCTGC	pET26b-Klon.
mmARH2	StK133	TAAGCgAaTtcCCTTTTCcTCTGTGGACAGGCGGT	pEGFP-Klon.
mmARH3	StK144	GAAGTGctagcTAGTCCGCGCcacGATGG	pEGFP-Klon_Kozak
mmARH3	StK145	CGATGACcAtAtGAGATCTATCTCGCGCTTCCG	pET26b-Klon.
mmARH3	StK154	CTGCGGaatTccCGAGCTCTCCTGGAAGACTCG	pEGFP-Klon.
mmARH3	StK155	AAGCAcTcGagCGAGCTCTCCTGGAAGACTCGGT	pET26b-Klon.
pcDNA5/FRT/TO	Nhe-f	CAGCCTCCGGACgCTAGCGTTTAAAC	+ <i>NheI</i> -Sequenz
pcDNA5/FRT/TO	Nhe-r	GTTTAAACGCTAGcGTCCGGAGGCTG	+ <i>NheI</i> -Sequenz

8.4 Plasmidkarten

Plasmidkarten der Vektoren pcDNA5/FRT/TO, pCMV/myc/mito, pd2eGFP-N1, peGFP-N1 und pET26b sind in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet.



CMV Forward priming site

721 AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG

781 GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATAA GCAGAGCTCT CCCTATCAGT GATAGAGATC

Tetracycline operator (TetO₂)

841 TCCCTATCAG TGATAGAGAT CGTCGACGAG CTCGTTTAGT GAACCGTCAG ATCGCCTGGA

901 GACGCCATCC ACGCTGTTTT GACCTCCATA GAAGACACCG GGACCGATCC AGCCTCCGGA

Pme I* Afl II Hind III Asp718 I Kpn I BamH I BstX I*

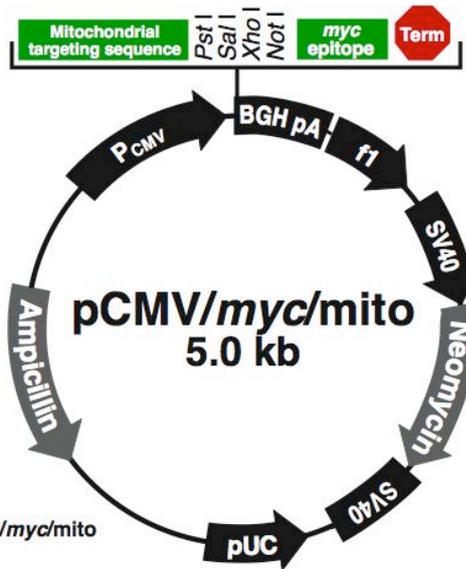
961 CTCTAGCGTT TAAACTTAAG CTTGGTACCG AGCTCGGATC CACTAGTCCA GTGTGGTGGA

EcoR V BstX I* Not I Xho I Eco0109 I Apa I Pme I*

1021 ATTCTGCAGA TATCCAGCAC AGTGGCGGCC GCTCGAGTCT AGAGGGCCCG TTAAACCCG

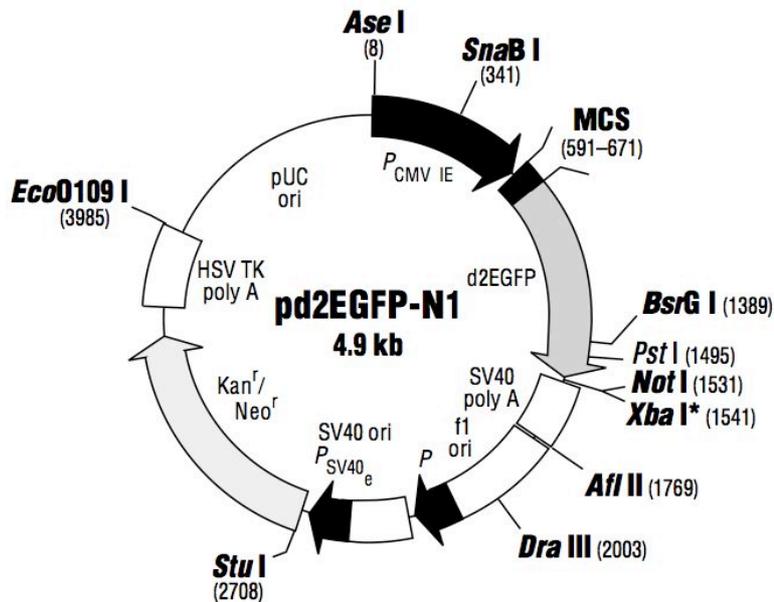
BGH Reverse priming site

1081 CTGATCAGCC TCGACTGTGC CTTCTAGTTG CCAGCCATCT

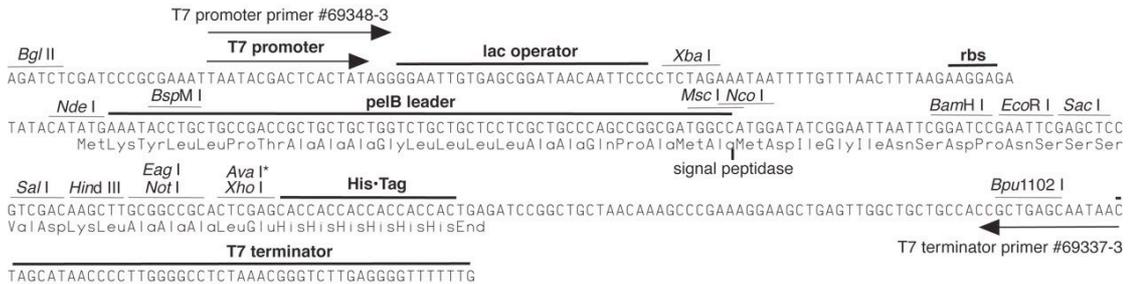
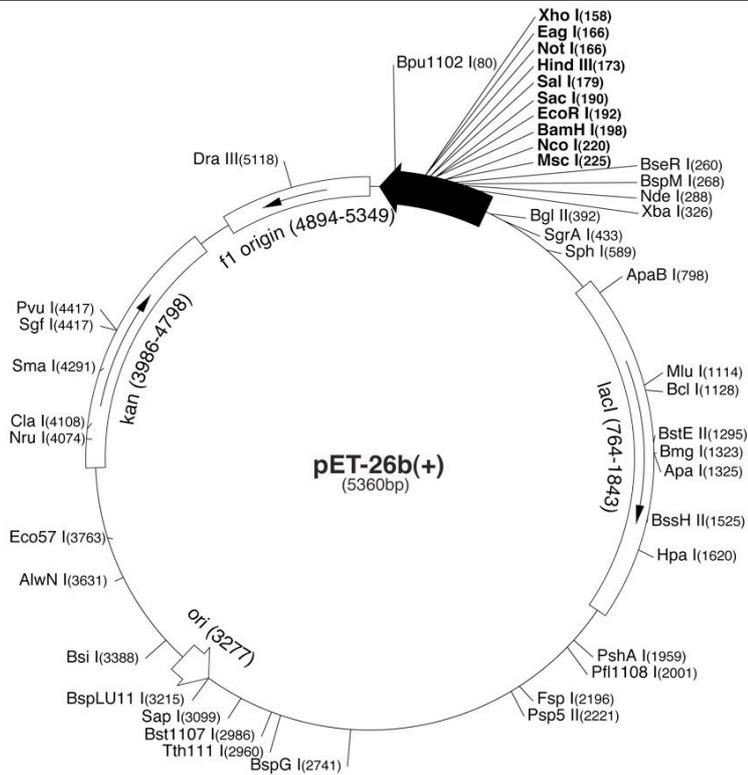
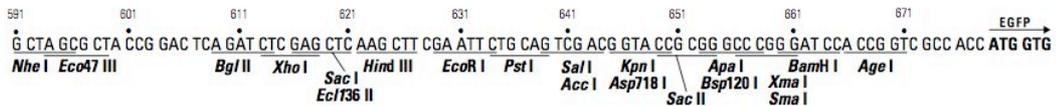
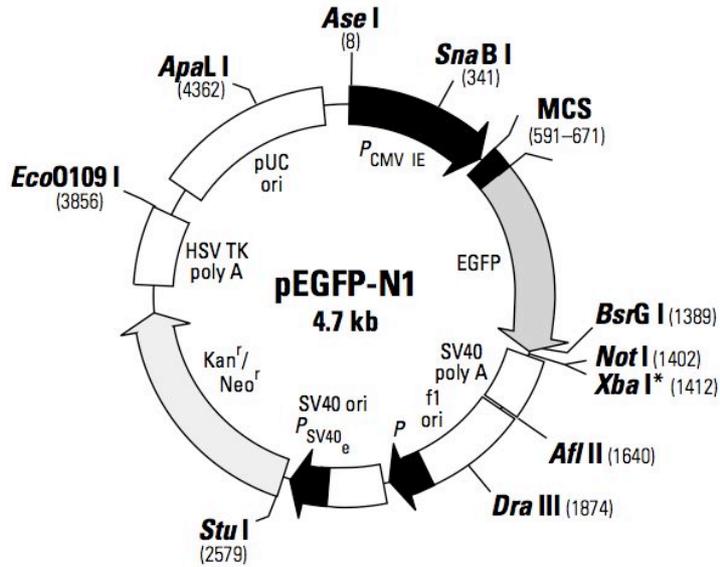


Comments for pCMV/myc/mito
4967 nucleotides

- CMV immediate-early promoter: bases 12-627
- CMV priming site: bases 544-564
- Mitochondrial targeting sequence: bases 636-722
- Multiple cloning site: bases 723-757
- myc epitope: bases 759-788
- BGH Reverse priming site: bases 824-841
- BGH polyadenylation sequence: bases 823-1037
- f1 origin: bases 1100-1513
- SV40 promoter/origin: bases 1578-1889
- Neomycin (G418) resistance gene (ORF): bases 1897-2691
- SV40 polyadenylation sequence: bases 2707-2946
- pUC origin: bases 3131-3804
- Ampicillin resistance gene (ORF): 3949-4809



591 601 611 621 631 641 651 661 671 d2EGFP
 G CTA GCG CTA CCG GAC TCA GAT CTC GAG CTC AAG CTT CGA ATT CTG CAG TCG ACG GTA CCG CGG GCC CGG GAT CCA CCG GTC GCC ACC ATG GTG
 Nhe I Eco47 III Bgl II Xho I Sac I Hind III EcoR I Pst I Sal I Kpn I Apa I BamH I Age I
 Eco136 II Asp718 I Sac II Xma I Sma I



pET-26b(+) cloning/expression region

8.5 Abkürzungsverzeichnis

3D	Dreidimensional
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ADPR	ADP-Ribose
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
AIF	<i>Apoptosis inducing factor</i>
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ARH	ADP-Ribosyl-X Hydrolase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
cADPR	Zyklische ADP-Ribose
BARS	<i>Brefeldin A ADP-ribosylated substrate</i>
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
BLASTn	Nukleotid-BLAST
BLASTp	Protein-BLAST
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Mischung gleicher Stoffmengen der vier Desoxy-nukleosid-Triphosphate für die PCR
DRAG	Dinitrogenase Reduktase-aktivierende Glykohydrolase
DRAT	Dinitrogenase Reduktase ADP-Ribosyltransferase
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
(Fab') ₂	Bivalentes antigenbindendes Antikörperfragment
FKS	Fötale Kälberserum
GDH	Glutamatdehydrogenase
HAT	Mischung aus Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin
HAT	Mischung aus Hypoxanthin und Thymidin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HFCS	<i>Hybridoma Fusion and Cloning Supplement</i>
IgG	Immunglobulin G
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
LDS	Lithiumdodecylsulfat
mAK	Monoklonaler Antikörper
MARsylierung	Mono-ADP-Ribosylierung
mART	Mono-ADP-Ribosyltransferasen
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)

NAADP	Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotid-2'-Phosphat
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-2'-Phosphat
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NUDIX	Nukleosid-diphosphat verknüpft mit X
OAADPR	2'- oder 3'-O-Acetyl-ADP-Ribose
PAG	Polyacrylamid-Gel
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAK	Polyklonaler Antikörper
PAR	Poly-ADP-Ribose
PARsylierung	Poly-ADP-Ribosylierung
PARG	Poly-ADP-Ribosyl-Glykohydrolase
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
PO	Peroxidase
PSI-BLAST	<i>Position sensitive iterative BLASTp</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sir2	<i>Silent information regulator 2</i>
SIRT	Sirtuin
tBLASTn	<i>Translated BLASTn</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
TRIS	Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)
TRPM2	<i>Transient receptor potential melastatin-related channel 2</i>
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
WRN	<i>Werner Syndrome related protein</i>
XRCC1	<i>X-ray repair cross-complementing protein 1</i>