

Die Peroxiredoxine des Nematoden
Caenorhabditis elegans (MAUPAS, 1900)

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades
- Dr. rer. nat. –
des Fachbereiches Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Kerstin Isermann
aus Hamburg

Hamburg 2004

Erstgutachter: PD Dr. I. Bruchhaus
Zweitgutachter: Prof. Dr. R.D. Walter

Termin der Disputation: 09.07.2004

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Priv.-Doz. Dr. I. BRUCHHAUS
Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. R. D. WALTER

Tag der Disputation: 09. Juli 2004

Hamburg, den 25. Juni 2004



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Arno Frühwald".

Professor Dr. Arno Frühwald
Dekan

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | V |
| <hr/> | |
| 1. EINLEITUNG | 1 |
| <hr/> | |
| 1.1. DER NEMATODE <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i> | 1 |
| 1.2. OXIDATIVER STRESS..... | 3 |
| 1.3. ZELLULÄRE ANTIOXIDANTISCHE SYSTEME | 4 |
| 1.4. PEROXIREDOXINE | 5 |
| 1.4.1 Peroxiredoxine in <i>Mammalia</i> | 9 |
| 1.4.2 Peroxiredoxine in parasitischen Nematoden | 10 |
| 1.5. ZIELSETZUNG..... | 11 |
| | |
| 2. MATERIAL UND METHODEN | 13 |
| <hr/> | |
| 2.1. REAGENZIEN UND CHEMIKALIEN | 13 |
| 2.1.1 Chemikalien | 13 |
| 2.1.2 Weitere Materialien | 13 |
| 2.1.3 Spezielle Geräte | 14 |
| 2.1.4 Enzyme | 14 |
| 2.1.5 Marker | 14 |
| 2.1.6 Antikörper zur Immunodetektion | 14 |
| 2.1.7 Oligonukleotide | 15 |
| 2.2. PUFFER UND LÖSUNGEN..... | 17 |
| 2.3. ORGANISMEN UND VEKTOREN | 18 |
| 2.3.1 <i>Escherichia coli</i> Stämme | 18 |
| 2.3.2 <i>Caenorhabditis elegans</i> Stämme | 19 |
| 2.3.3 Vektoren | 19 |
| 2.4. NÄHRMEDIEN UND KULTURBEDINGUNGEN..... | 20 |
| 2.4.1 Nährmedien | 20 |
| 2.4.2 Kulturführung und Reinigung von <i>C. elegans</i> | 20 |
| 2.4.3 Kultivierung von Bakterien | 21 |
| 2.5. TRANSFORMATION VON <i>ESCHERICHIA COLI</i> | 21 |
| 2.5.1 Herstellung chemokompetenter Bakterien für die Transformation | 21 |
| 2.5.2 Transformation von <i>E. coli</i> | 21 |
| 2.6. ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN..... | 22 |
| 2.6.1 Isolierung genomischer DNA aus <i>C. elegans</i> | 22 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.6.2 | Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>C. elegans</i> | 22 |
| 2.6.3 | Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> | 23 |
| 2.7. | FÄLLUNG UND AUFTRENNUNG VON NUKLEINSÄUREN | 23 |
| 2.7.1 | Fällung von Nukleinsäuren | 23 |
| 2.7.2 | Agarosegelelektrophorese | 23 |
| 2.8. | ENZYMATISCHE MODIFIKATION VON DNA | 24 |
| 2.8.1 | Restriktionsverdau | 24 |
| 2.8.2 | Ligation | 24 |
| 2.8.3 | DNA-Sequenzanalyse | 24 |
| 2.9. | AMPLIFIKATION VON DNA DURCH DIE POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR) | 24 |
| 2.9.1 | Reverse Transkription von RNA | 24 |
| 2.9.2 | Amplifikation von cDNA (Zweitstrangsynthese) | 25 |
| 2.10. | REINIGUNG UND ISOLIERUNG VON DNA | 25 |
| 2.10.1 | Chloropan-Extraktion | 25 |
| 2.10.2 | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen | 26 |
| 2.10.3 | Reinigung von PCR-Amplifikaten | 26 |
| 2.11. | NORTHERN-BLOT-ANALYSE..... | 26 |
| 2.11.1 | Northern-Blot | 26 |
| 2.11.2 | Virtueller Northern-Blot | 26 |
| 2.11.3 | Radioaktive Markierung von DNA | 27 |
| 2.11.4 | Hybridisierung der Northern-Blots mit radioaktiver DNA | 27 |
| 2.12. | BIOCHEMISCHE METHODEN..... | 27 |
| 2.12.1 | Isolierung von Gesamt-Proteinextrakt aus <i>C. elegans</i> | 27 |
| 2.12.2 | Proteinbestimmung nach Bradford | 27 |
| 2.12.3 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 28 |
| 2.12.4 | Western-Blot | 28 |
| 2.12.5 | Immunodetektion der transferierten Proteine | 28 |
| 2.13. | REKOMBINANTE EXPRESSION DER <i>C. ELEGANS</i> PEROXIREDOXINE | 29 |
| 2.13.1 | Überexpression in <i>E. coli</i> | 29 |
| 2.13.2 | Reinigung der rekombinanten Proteine über eine Nickelsäule | 29 |
| 2.13.4 | Dialyse der rekombinanten Proteine | 30 |
| 2.14. | BESTIMMUNG DER ENZYMAKTIVITÄT DER REKOMBINANTEN <i>C. ELEGANS</i> PEROXIREDOXINE | 30 |
| 2.14.1 | Filter-Disc-Assay | 30 |
| 2.14.2 | Peroxidase-Aktivität in Anwesenheit von DTT | 30 |
| 2.14.3 | Thioredoxin-Peroxidase-Aktivität | 31 |
| 2.14.4 | NO-Detoxification-Assay | 31 |
| 2.14.5 | L-Glutamin-Synthetase (GS) - Protection-Assay | 31 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.15. | <i>C. ELEGANS</i> VERSUCHE | 32 |
| 2.15.1 | RNA Interferenz (RNAi) | 32 |
| 2.15.2 | Überlebensdauer | 32 |
| 2.15.3 | Anzahl der Nachkommen | 33 |
| 2.15.4 | Empfindlichkeit gegenüber Stress | 33 |
| 2.15.5 | Induktion der Peroxiredoxin-Transkription durch oxidativen Stress | 33 |
| 2.15.6 | Expressionsmuster und Lokalisierung der Peroxiredoxine | 33 |
| 2.15.7 | Mikroinjektion von <i>C. elegans</i> | 34 |
| 2.16. | DATENBANKEN UND SPEZIELLE PROGRAMME | 34 |

3. ERGEBNISSE **35**

| | | |
|-------|--|----|
| 3.1. | IDENTIFIZIERUNG UND SEQUENZANALYSE VON DREI <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i> PEROXIREDOXINEN..... | 35 |
| 3.1.1 | Identifizierung und Struktur drei potentieller Peroxiredoxingene in <i>C. elegans</i> | 35 |
| 3.1.2 | Sequenz- und phylogenetische Analyse der drei <i>C. elegans</i> Peroxiredoxine (CePrxs) | 36 |
| 3.2. | <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i> PEROXIREDOXIN 1 (CEPRX1) | 40 |
| 3.2.1 | Regulation der Transkription in Anwesenheit von Peroxiden | 40 |
| 3.2.2 | CePrx1-Knockdown durch RNA Interferenz (RNAi) | 41 |
| 3.2.3 | Rekombinante Expression des <i>ceprx1</i> in <i>E. coli</i> | 44 |
| 3.2.4 | Enzymatische Fähigkeiten des rekombinanten CePrx1 (rCePrx1) | 44 |
| 3.2.5 | Expressionsmuster und Lokalisierung des CePrx1 in <i>C. elegans</i> | 47 |
| 3.3. | <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i> PEROXIREDOXIN 2 (CEPRX2) | 49 |
| 3.3.1 | Regulation der Transkription in Anwesenheit von Peroxiden | 49 |
| 3.3.2 | CePrx2-Knockdown durch RNAi | 50 |
| 3.3.3 | CePrx2-Knockout-Mutanten (VC289) | 50 |
| 3.3.4 | Rekombinante Expression des <i>ceprx2</i> in <i>E. coli</i> | 54 |
| 3.3.5 | Enzymatische Fähigkeiten des rekombinanten CePrx2 (rCePrx2) | 55 |
| 3.3.6 | Expressionsmuster und Lokalisierung des CePrx2 in <i>C. elegans</i> | 59 |
| 3.4. | <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i> PEROXIREDOXIN 3 (CEPRX3) | 61 |
| 3.4.1 | CePrx3-Knockdown durch RNAi | 61 |
| 3.4.2 | Rekombinante Expression des <i>ceprx3</i> in <i>E. coli</i> | 63 |
| 3.4.3 | Enzymatische Fähigkeiten des rekombinanten CePrx3 (rCePrx3) | 64 |
| 3.4.4 | Expressionsmuster und Lokalisierung des CePrx3 in <i>C. elegans</i> | 67 |

| | |
|---|-----------|
| 4. DISKUSSION | 69 |
| 4.1. IDENTIFIZIERUNG UND SEQUENZANALYSE VON DREI <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i> PEROXIREDOXINEN | 69 |
| 4.2. <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i> PEROXIREDOXIN 1..... | 74 |
| 4.2.1 Regulation der Transkription in Anwesenheit von Peroxiden | 74 |
| 4.2.2 CePrx1-Knockdown durch RNAi | 75 |
| 4.2.3 Rekombinante Expression und enzymatische Fähigkeiten des CePrx1 | 77 |
| 4.2.4 Expressionsmuster und Lokalisierung des CePrx1 in <i>C. elegans</i> | 80 |
| 4.3. <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i> PEROXIREDOXIN 2..... | 82 |
| 4.3.1 Regulation der Transkription in Anwesenheit von Peroxiden | 82 |
| 4.3.2 CePrx2-Knockdown und CePrx2-Knockout-Mutanten | 83 |
| 4.3.3 Rekombinante Expression und enzymatische Fähigkeiten des CePrx2 | 85 |
| 4.3.4 Expressionsmuster und Lokalisierung des CePrx2 in <i>C. elegans</i> | 88 |
| 4.4. <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i> PEROXIREDOXIN 3..... | 90 |
| 4.4.1 CePrx3-Knockdown durch RNAi | 90 |
| 4.4.2 Rekombinante Expression und enzymatische Fähigkeiten des CePrx3 | 91 |
| 4.4.3 Expressionsmuster und Lokalisierung des CePrx3 in <i>C. elegans</i> | 94 |
| 5. ZUSAMMENFASSUNG | 96 |
| 6. LITERATURVERZEICHNIS | 99 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|---|
| ABTS | 2,2'-Azino-bis(Ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) |
| A. bidest | <i>Aqua bidest</i> (doppelt destilliertes Wasser) |
| Amp | Ampicillin |
| AP | alkalische Phosphatase |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| BCIP | 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat |
| Bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| cDNA | komplementäre DNA |
| Da | Dalton |
| DEPC | Diethyl-Propyl-Carbonat |
| DMNQ | 2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinone |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat |
| ds | doppelsträngig |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| <i>et al.</i> | <i>et alii</i> (und andere) |
| GFP | <i>green fluorescent protein</i> |
| GSNO | S-Nitroso-L-Glutathion |
| h | Stunde(n) |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure |
| HO- | Hydroxylradikal |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalaktosid |
| l | Liter |
| Kb. | Kilobasen |
| LB | Luria-Bertani |
| Lsg | Lösung |
| M | Molar |
| min | Minute(n) |
| MOPS | 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure |
| mRNA | <i>messenger</i> -RNA |
| NADPH | Nikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat |

| | |
|--------|---|
| NBT | Nitroblautetrazoliumchlorid |
| NGM | <i>Nematode Growth Medium</i> |
| nor-1 | (±)-(E)-Methyl-2-[(E)-hydroxyimino]-5-nitro-6-methoxy-3-hexenamid |
| Nt. | Nukleotid(e) |
| OD | optische Dichte |
| ORF | <i>open reading frame</i> (offener Leserahmen) |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| Pwo | <i>Pyrococcus woesi</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | reverse Transkription-gekoppelte PCR |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TBE | Trisboratessigsäure |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| Tet | Tetracyclin |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| X-Gal | 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-Galaktopyranosid |

1. Einleitung

1.1. Der Nematode *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) ist ein freilebender terrestrischer Nematode, der sich von Bakterien ernährt. Die postembryonale Entwicklung vom Ei bis zum adulten Tier erfolgt über 4 Larvalstadien (L1 bis L4) und dauert unter optimalen Temperaturbedingungen (25°C) ca. 36 Stunden. Die Lebenserwartung der adulten Tiere beträgt 14 bis 20 Tage.

Der Lebenszyklus von *C. elegans* kann unter ungünstigen Umweltbedingungen von einem fakultativen Dauerstadium unterbrochen werden, wobei ein alternatives drittes Larvalstadium auftritt. Diese sogenannte Dauerlarve kann mit Hilfe ihrer stark verdickten Cuticula und einem stark reduzierten Stoffwechsel mehrere Monate überleben und sich anschließend unter verbesserten Lebensbedingungen zum 4. Larvalstadium weiterentwickeln.

Die adulten Tiere kommen in zwei Geschlechtsformen vor. Die Mehrzahl der Population wird von den autogamen Hermaphroditen gebildet, die eine Länge von bis zu 1,3 mm erreichen. Durch spontane Verteilungsfehler während der Meiose entstehen Männchen, die nur über ein Geschlechtschromosom verfügen. Sie erreichen eine Länge von ca. 0,6 mm, und ihr Anteil an der Population beträgt maximal 1%.

Die Hermaphroditen sind funktionelle Weibchen. Die im 4. Larvalstadium produzierten Spermien werden in Spermathecae gespeichert, und die adulten Tiere produzieren ausschließlich Oozyten. Während ihres reproduktiven Lebensabschnittes legen die Hermaphroditen ca. 300 Eier. Die Befruchtung durch ein männliches Tier stimuliert die Oozytenproduktion und die Anzahl der Nachkommen kann sich sogar verdoppeln.

Das Genom von *C. elegans* ist vollständig sequenziert und besteht aus etwa 9×10^7 Basenpaaren. Verteilt auf 6 Chromosomen sind bisher ca. 20.000 proteinkodierende Gene identifiziert worden. Bei *C. elegans* liegt Eutelie vor und der invariante Zellstammbaum ist von der befruchteten Eizelle bis zum adulten Tier bekannt. Adulte Hermaphroditen bestehen aus 959

Körperzellen, wovon 302 Neuronen sind. Die adulten Männchen bestehen aus 1031 Zellen.

Der schnelle Lebenszyklus, der einfache, morphologische Aufbau, seine Transparenz und das vollständig sequenzierte Genom machen *C. elegans* zu einem attraktiven Modellorganismus für biologische Fragestellungen. Er ist sehr leicht zu kultivieren und es steht eine Vielzahl experimenteller Möglichkeiten zur Verfügung. Durch Mikroinjektion lassen sich stabile Transfektanten erzeugen anhand derer z. B. durch Reportergenexpression die Regulation von Genen untersucht oder die Überexpression spezifischer Gene erreicht werden kann. Die Herstellung genomischer Knockouts ist relativ einfach und mit der Empfindlichkeit von *C. elegans* gegenüber RNA Interferenz steht eine weitere wichtige Methode zur Untersuchung von Proteinfunktionen zur Verfügung.

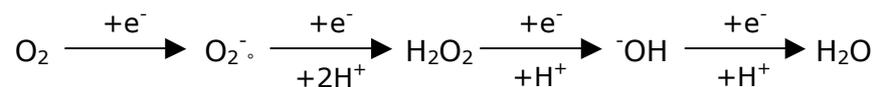
Aufgrund der engen Verwandtschaft dient *C. elegans* auch als Modellsystem für die Untersuchung parasitischer Nematoden. Diese stellen eine große Herausforderung nicht nur für die menschliche Gesundheit sondern auch für die Landwirtschaft dar. Nach WHO Schätzungen sind ca. 3 Billionen Menschen weltweit von Infektionen mit humanpathogenen Nematoden betroffen. Zu diesen gehören z. B. *Onchocerca volvulus* und *Wuchereria bancrofti*, die Erreger von Flussblindheit und Elephantiasis, sowie die Spul- und Haken- oder Grubenwürmer.

Pflanzenparasitische Nematoden wie z. B. der Wurzelgallennematode *Meloidogyne sp.* verursachen jährlich landwirtschaftliche Schäden in geschätzter Höhe von 80 Milliarden US Dollar (www.elegans.swmed.edu/Nematodes/).

Viel von dem genetischen Wissen über Nematoden, sowie über Nematodenentwicklung und -morphologie wurde an *C. elegans* gewonnen und ist auf andere Nematoden übertragbar.

1.2. Oxidativer Stress

Oxidativer Stress entsteht in aerober Umwelt durch die Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Zu diesen reaktiven Sauerstoffspezies gehören Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Superoxidradikale ($\text{O}_2^{\cdot-}$) sowie Hydroxylradikale ($\cdot\text{OH}$), die durch die unvollständige Reduktion von Sauerstoff zu Wasser entstehen. Der vollständige Reaktionsweg von molekularem Sauerstoff zu Wasser lässt sich wie folgt darstellen:



Die reaktiven Sauerstoffspezies entstehen in allen aeroben Organismen als Nebenprodukte des normalen Metabolismus und der Respiration. Die Bildung von ROS kann aber auch durch exogene Quellen wie z. B. ionisierende Strahlung, Xenobiotika und die Anwesenheit von Metallverbindungen hervorgerufen werden. Auch im Rahmen inflammatorischer Prozesse werden von aktivierten Immuneffektorzellen reaktive Sauerstoffspezies freigesetzt (*oxidative burst*). Durch Interaktion mit zellulären Zielen können sogenannte sekundäre ROS, wie z. B. Alkylhydroperoxide oder Lipidperoxide, entstehen.

Hohe Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffspezies können schwere zelluläre Schäden hervorrufen. Durch oxidative Schäden an Nukleinsäuren kann es zu DNA-Strangbrüchen und sogar zur Mutation ganzer Chromosomen kommen. Die Peroxidation von Membranphospholipiden führt zu einer Veränderung der Permeabilität und zur Entstehung weiterer toxischer Sekundärprodukte. Durch oxidative Modifikationen von Aminosäuren kann es zu Veränderungen von Proteinkonformationen kommen, die einen Verlust katalytischer Aktivität oder auch die Zerstörung transmembraner Ionenkanäle oder Metabolitentransporter zur Folge haben können. Oxidativer Stress wird mit vielen pathophysiologischen Prozessen wie z. B. neurodegenerativen Krankheiten, Arteriosklerose und Aktivierung des menschlichen Immunschwächevirus (HIV) in Verbindung gebracht (Sies 1993; Cohen 1994; Schreck *et al.* 1991). Reaktive Sauerstoffspezies können außerdem unkontrollierte Zellproliferation, Alterungsprozesse und Apoptose auslösen (Rhee *et al.* 2003; Pfeilschifter *et al.* 2003; Stone & Collins 2002).

Bei vielen dieser Prozesse kommt dem H_2O_2 eine Schlüsselrolle zu. Es entsteht *in vivo* durch die Disproportionierung von Superoxidanionen, durch die Autooxidation von Komponenten wie z. B. Catecholamin oder Ascorbat und auch als Nebenprodukt einiger Oxidase-Enzyme wie z. B. der Superoxid-Dismutase. Im Menschen kommt es in geringeren Dosen in fast allen Geweben vor, besonders hochkonzentriert ist es in den Mitochondrien (Halliwell *et al.* 2000). In geringen Konzentrationen ist H_2O_2 als solches nicht gefährlich, seine zytotoxische Wirkung entwickelt es in Verbindung mit UV-Strahlung oder reduzierten Metallionen durch die Umwandlung in das hochreaktive Hydroxylradikal (Cohen 1994).

Neben seiner zytotoxischen Wirkung machen die unpolare Natur und die Fähigkeit, durch Membranen zu diffundieren das H_2O_2 aber auch zu einem geeigneten *Second Messenger*. Auf viele externe Stimuli erfolgt die Erzeugung von H_2O_2 , welches die Induktion von Signalkaskaden vermittelt, die zu Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Apoptose führen können (Rhee *et al.* 2003; Bae *et al.* 1997; Stone & Collins 2002; Jacobsen 1996). So ist H_2O_2 z. B. an der Aktivierung der redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren wie z. B. Oxy R (Zheng *et al.* 1998) und $\text{NF}\kappa\text{B}$ (Schreck *et al.* 1991) beteiligt.

1.3. Zelluläre antioxidantische Systeme

Aerobe Organismen haben im Laufe der Evolution eine Vielzahl von Schutz- und Abwehrsystemen entwickelt, um sich vor oxidativem Stress und seinen Folgen zu schützen. Nach Sies (1993) lassen sich diese Abwehrsysteme in die drei Abschnitte "Prävention, Neutralisation und Reparatur" gliedern.

Als Prävention kann man Maßnahmen bezeichnen, welche eine Entstehung oder Freisetzung von ROS verhindern. Hierzu gehört z. B. das Verpacken von DNA in Chromatinstrukturen oder die Ausbildung spezieller Quartiärstrukturen von Enzymen, welche die Freisetzung der während der Katalyse entstehenden ROS verhindern.

Um dennoch entstandene Oxidantien abzufangen und zu neutralisieren, haben Organismen verschiedene enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien entwickelt. Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien

zählen kleinere Moleküle wie z. B. Vitamin E (α -Tocopherol) und C (Ascorbat) sowie Karotenoide, Thiole und auch Glutathion. Die enzymatischen Antioxidantien werden durch die sogenannten antioxidantischen Enzyme repräsentiert. Zu den wichtigsten antioxidantischen Enzymen gehören die Superoxid-Dismutasen (SOD), die Katalasen, die glutathionabhängigen Peroxidasen und die Peroxiredoxine.

Kommt es durch nicht abgefangene ROS zur Bildung toxischer Sekundärprodukte stehen weitere Enzyme wie z. B. die Glutathion S-Transferasen, Aldehyd-Reduktasen und -Dehydrogenasen oder auch Cytochrom P-450 zur Entgiftung bereit.

Ist bereits eine oxidative Schädigung zellulärer Strukturen erfolgt, werden Reparatursysteme zur Proteolyse, Lipolyse und DNA-Reparatur aktiviert.

1.4. Peroxiredoxine

Peroxiredoxine (Prxs) sind eine ständig wachsende Gruppe von antioxidantischen Enzymen, die in allen Organismen von den *Archea* bis zu den *Mammalia* vorkommt. Im Gegensatz zu allen anderen, bisher bekannten antioxidantischen Enzymen besitzen sie weder gebundene Metallionen, wie z. B. die SODs, noch prosthetische Gruppen wie z. B. die Katalasen oder Glutathion-Peroxidasen. Stattdessen reduzieren sie in Anwesenheit von Elektronendonatoren wie z. B. Thioredoxin, Peroxide mit Hilfe reaktiver Cysteinreste in ihrem aktiven Zentrum (Chae *et al.* 1994). Zu den von Peroxiredoxinen reduzierten Substraten gehören neben anorganischen und organischen Peroxiden auch reaktive Stickstoffverbindungen wie z. B. Peroxynitrit oder Stickstoffmonoxid (Hofman *et al.* 2002; Poole & Ellis 1996; Bryk *et al.* 2000; Peshenko & Shichi 2001). Außerdem gibt es Hinweise auf die Entgiftung reaktiver Schwefelverbindungen (Yim *et al.* 1994).

Obwohl es sich primär um cytosolische Proteine handelt, kommen Peroxiredoxine auch in den Mitochondrien, Peroxisomen, Chloroplasten und mit Membranen assoziiert vor (Review zu diesem Thema: Hofman *et al.* 2002). Sie werden in fast allen Zellen stark exprimiert: sie gehören zu den zehn häufigsten Proteinen in *Escherichia coli* (Link *et al.* 1997), sind nach Hämoglobin das meistsynthetisierte Protein in Erythrozyten

(Moore *et al.* 1991) und machen 0,1 bis 0.8% aller löslichen Proteine in anderen Säugetierzellen aus (Chae *et al.* 1999).

Aufgrund der Anzahl ihrer konservierten, reaktiven Cysteinreste unterteilt man die Peroxiredoxine in 1-Cys und 2-Cys Prxs (Chae *et al.* 1994). Die 2-Cys Prxs können weiter in typische und atypische 2-Cys Prxs unterteilt werden (Seo *et al.* 2000). Die reaktiven Cysteinreste der 2-Cys Prxs liegen um Position 50 und 170 der Aminosäuresequenz, in den 1-Cys Prxs fehlt das C-terminale Cystein. Die drei Peroxiredoxin-Familien unterscheiden sich außerdem in der das konservierte, N-terminale Cystein umgebenden Region: Bei 1-Cys Prxs ist diese Konsensussequenz *PVCT*, typische 2-Cys Prxs enthalten das konservierte Sequenzmotiv *FVCP* und das atypische, humane 2-Cys Prx 5 trägt die Sequenz *PGCS*.

Die Peroxidase-Reaktion besteht aus zwei Schritten um das redox-aktive, sogenannte "peroxidative" Cystein ($\text{Cys}_p/\text{C-S}_p\text{H}$). Nach allen bisher vorliegenden Daten ist der erste Schritt, in dem das peroxidative Cystein das Peroxidsubstrat angreift und dabei selber zur Sulfensäure ($\text{C-S}_p\text{OH}$) oxidiert wird allen drei Peroxiredoxin-Klassen gemein (Ellis & Poole 1997; Choi *et al.* 1998). Der zweite Schritt, die Auflösung der Cystein-Sulfensäure, unterscheidet die drei Peroxiredoxin-Klassen.

Typische 2-Cys Prxs bilden Homodimere mit zwei identischen aktiven Zentren (Hirotsu *et al.* 1999; Schroder *et al.* 2000; Alpey *et al.* 2000). Im zweiten Schritt der Peroxidase-Reaktion wird die Cystein-Sulfensäure des N-terminalen, peroxidativen Cysteins der einen Untereinheit durch die Sufhydrylgruppe des C-terminalen, sogenannten "auflösenden" (*resolving*) Cysteins ($\text{Cys}_r/\text{C-S}_r\text{H}$) der anderen Untereinheit angegriffen. Unter Abspaltung von H_2O folgt die Bildung eines stabilen intermolekularen Disulfids. Dieses wird anschließend durch zellspezifische disulfidhaltige Oxidoreduktasen [z. B. Thioredoxin, AhpF oder Tryparedoxin (Nogoceke *et al.* 1997; Poole *et al.* 2000; Bryk *et al.* 2002)] reduziert, die damit den katalytischen Zyklus schliessen (s. Abb. 1.1A). In mindestens einem Fall konnte gezeigt werden, dass typische 2-Cys Prxs auch Heterodimere bilden können (Jin *et al.* 1997).

Die atypischen 2-Cys Prxs haben den gleichen katalytischen Mechanismus wie typische 2-Cys Prxs. Sie sind jedoch funktionelle Monomere, in denen

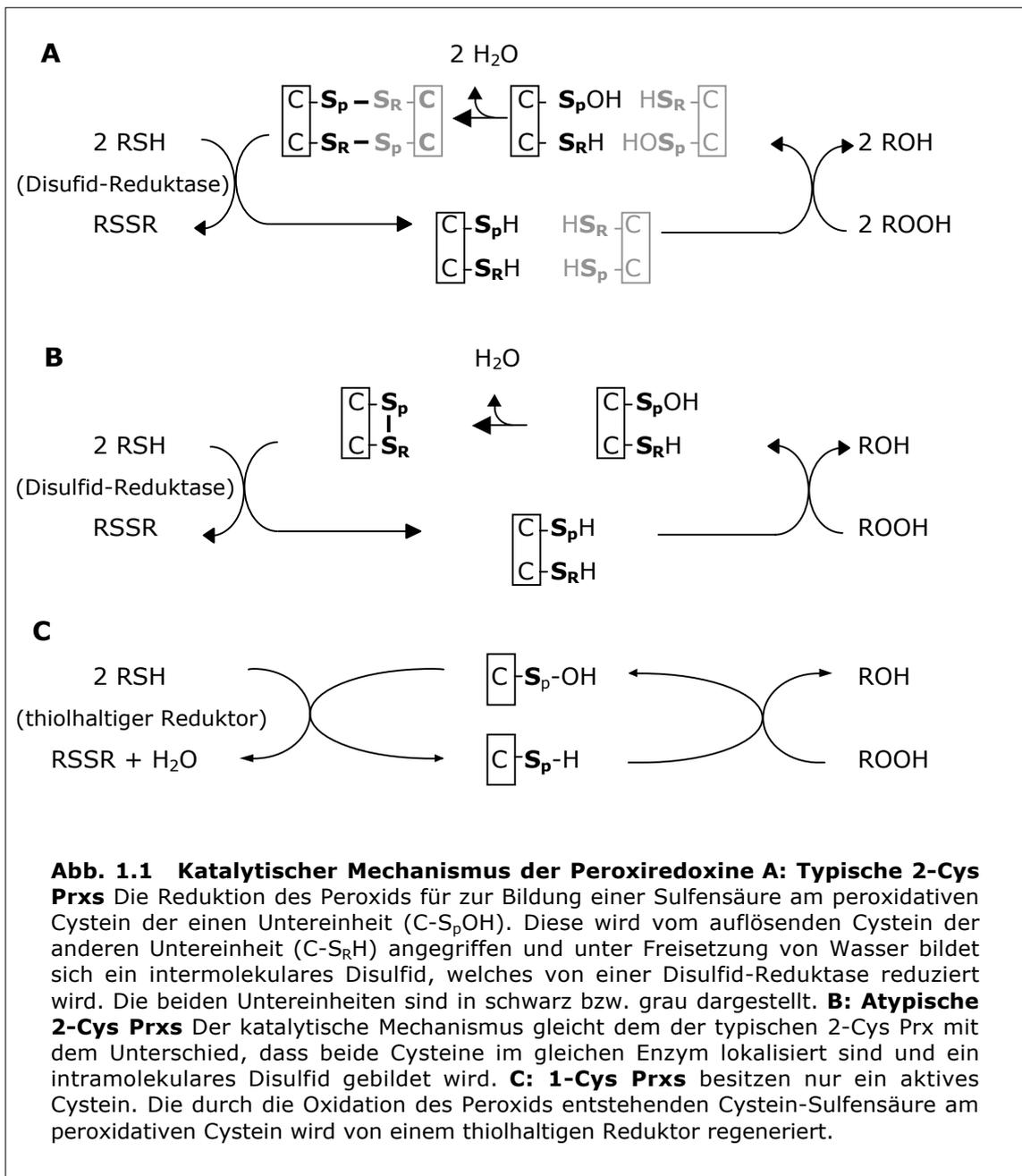
sowohl das Cys_p als auch das Cys_R im gleichen Polypeptid lokalisiert ist. Diese Konstellation führt während des katalytischen Zyklus zur Bildung eines intramolekularen Disulfids (→ Abb. 1.1B) (Seo *et al.* 2000; Choi *et al.* 2003).

Die 1-Cys Prxs besitzen nur das N-terminale Cys_p. Die während der Reduktion des Peroxids entstehende Sulfensäuregruppe am Cys_p, die in den 2-Cys Peroxiredoxinen als Zwischenprodukt der katalytischen Reaktion auftritt, ist in den 1-Cys Prxs das stabile Endprodukt. In einem geschlossenen katalytischen Zyklus wird sie von thiolhaltigen Elektronendonatoren regeneriert (s. Abb. 1.1C). Als Elektronendonatoren können *in vitro* DTT, Glutathion oder Thioredoxin dienen (Kang *et al.* 1998; Kawazu *et al.* 2000; Pedrajas *et al.* 2000). Für das humane 1-Cys Prx PRDX6 sind als physiologischer Redoxpartner neben Glutathion außerdem Lipidsäuren und Cyclophilin vorgeschlagen worden (Peshenko & Shichi 2001; Lee *et al.* 2001).

In Gegenwart hoher H₂O₂-Konzentrationen kann es zu einer Überoxidation der 2-Cys Prxs kommen. Hierbei wird die Sulfensäuregruppe des Cys_p noch bevor sie ein Disulfid mit dem Cys_R ausbilden kann, weiter zu Sulfin- oder Sulfonsäure (C-S_pO₂/O₃H) oxidiert (Yang *et al.* 2002). Eine Überoxidation wurde bisher an eukaryotischen Peroxiredoxinen von *Mammalia*, Pflanzen und Hefe beobachtet (Yang *et al.* 2002, Dietz *et al.* 2002, Park *et al.* 2000). Die Überoxidation von bakteriellen Prxs erfordert mehr als die hundertfache Konzentration an H₂O₂, die bereits für eine Überoxidation eukaryotischer Prxs ausreicht (Wood *et al.* 2003).

Obwohl Dimere die funktionelle Einheit der 2-Cys Peroxiredoxine bilden, wird häufig die Bildung von übergeordneten Oligomeren, insbesondere Decameren, beobachtet. Die Faktoren, die *in vitro* zu einer Bildung dieser Multimere führen, sind vielfältig. Die Oligomerisierung ist abhängig von der Konzentration des Proteins, der Ionenkonzentration und des pH-Wertes sowie vom Redoxstatus der aktiven Zentren (Review zu diesem Thema: Wood *et al.* 2003). Als primärer Faktor zur Stabilisierung der decameren Form *in vivo* gilt die Reduktion des Disulfids im aktiven Zentrum der Prxs. Damit besteht eine direkte Verbindung zwischen dem Redox-Status der reaktiven Cysteinreste und dem Oligomerisations-Status der Peroxiredoxine. Die reduzierten und die überoxidierten Formen liegen in

physiologischer Konzentration (physiologische *E. coli* AhpC-Konzentration ca. 5 μM) präferenziell als Decamer vor, während die durch ein Disulfid verbundenen Formen den Dimer-Status favorisieren (Wood *et al.* 2002; Schroder *et al.* 2000).



1.4.1 Peroxiredoxine in *Mammalia*

Es sind bisher 6 *Mammalia* Peroxiredoxine identifiziert worden. Die Peroxiredoxine 1 bis 4 gehören der Gruppe der typischen 2-Cys Prxs an, Peroxiredoxin 5 ist ein atypisches 2-Cys Prx und das Peroxiredoxin 6 gehört zu den 1-Cys Prxs.

Die humanen, typischen 2-Cys Peroxiredoxine sind in fast allen Geweben präsent. Eine besonders starke Expression des *prdx1* konnte in Leber und Gehirn nachgewiesen werden (Ishii *et al.* 1993; Mizusawa *et al.* 2000). Das PRDX2, auch bekannt als "Natural Killer Cell Enhancing Factor B" (NKEF-B) (Butterfield *et al.* 1999) oder Torin/Band-8, ist nach Hämoglobin das am häufigsten vorkommende Protein in Erythrozyten (Moore *et al.* 1991).

Neben ihrer Funktion in der Abwehr von oxidativem Stress werden die typischen 2-Cys Peroxiredoxine auch mit Zellproliferation, Alterungsprozessen und Apoptosekontrolle assoziiert (Neumann *et al.* 2003). Ihre Funktion in diesen Prozessen üben sie vermutlich über die Regulation der durch H₂O₂ vermittelten Signalkaskaden aus (Butterfield *et al.* 1999).

Innerhalb der typischen 2-Cys Prxs nimmt das PRDX3 als mitochondriales Protein eine Sonderstellung ein. Ihm wird eine Funktion bei der morphologischen Entwicklung der Mitochondrien und bei der Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials zugeschrieben (Wonsey *et al.* 2002).

Das PRDX4 ist das einzige Peroxiredoxin, welches sezerniert wird. Neben einer cytosolischen Form kommt so auch eine plasmatische Isoform vor. Diese kann über Heparansulfat an die Oberfläche von Endothelzellen binden und diese so vermutlich vor extrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies schützen (Okado-Matsumoto *et al.* 2000). PRDX4 ist außerdem bekannt als "Trx peroxidase-related activator of NF κ B and c-Jun N-terminal kinase" (TRANK) (Haridas *et al.* 1998).

Das kürzlich entdeckte atypische 2-Cys Peroxiredoxin 5 ist sowohl im Cytosol als auch in Peroxisomen und Mitochondrien nachgewiesen worden (Seo *et al.* 2000). Ebenso wie für das 1-Cys

Peroxiredoxin PRDX6 ist über seine möglichen Funktionen noch nichts bekannt.

Beim 1-Cys PRDX6 handelt es sich um ein bifunktionales Enzym, welches sowohl Thiol-Peroxidase-Aktivität als auch Phospholipase A₂-Aktivität aufweist (Chen *et al.* 2000). Es wird in besonders hohem Maße im Auge, in der olfaktorischen Region und in den Epithelzellen anderer Gewebe exprimiert und dort mit antioxidantischen Funktionen in Verbindung gebracht (Peshenko *et al.* 1998; Novoselov *et al.* 1999).

In vielen Krebsgeweben ist eine erhöhte Expression von Peroxiredoxingenen nachgewiesen worden (Noh *et al.* 2001; Yanagawa *et al.* 1999; Kinnula *et al.* 2002; Chang *et al.* 2001). Eine verminderte Expression in Teilen des Gehirns wird dagegen mit neurodegenerativen Krankheiten wie der Creutzfeld-Jakob-Krankheit in Verbindung gebracht wird (Krapfenbauer *et al.* 2002).

1.4.2 Peroxiredoxine in parasitischen Nematoden

In verschiedenen parasitischen Nematoden sind bisher 11 Peroxiredoxine identifiziert worden, wovon neun zu den typischen 2-Cys Peroxiredoxinen gehören (Lu *et al.* 1998; Zipfel *et al.* 1998; Ghosh *et al.* 1998; Klimowski *et al.* 1997; Tsuji *et al.* 2000) und zwei zu den 1-Cys Prxs (Chandrashekar *et al.* 1998; Chandrashekar *et al.* 2000). Die Proteine sind während des gesamten Lebenszyklus präsent und nur im Fall eines 2-Cys Peroxiredoxins aus *Onchocerca volvulus* ist ein Unterschied des Expressionsmusters zwischen Larven und adulten Tieren bekannt (Lu *et al.* 1998).

Allein aufgrund ihrer antioxidantischen Aktivität als Thioredoxin- oder Thiol-Peroxidase *in vitro* wird den Peroxiredoxinen der parasitischen Nematoden meist eine Funktion beim Schutz vor oxidativen Angriffen der Wirtsphtagocyten zugeschrieben. Beweise, die solche Theorien unterstützen, gibt es bisher jedoch noch nicht. Zwei Peroxiredoxine, BmTPx1 und 2, sind in *Brugia malayi* identifiziert worden (Ghosh *et al.* 1998). Das BmTPx1 wurde mittels immunhistologischer Färbungen in Zellen der Hypodermis, besonders in den lateralen Hypodermisleisten, und nicht an der Parasitenoberfläche lokalisiert, wo es zu erwarten gewesen wäre, würde es

den Parasiten vor der Immunantwort des Wirtes schützen. Eine ähnliche Lokalisierung zeigte auch das Peroxiredoxin OvPxn2 aus *O. volvolus* (Zipfel *et al.* 1998). Lediglich die Lokalisierung des *O. volvolus* Peroxiredoxins OvTPx2 in der Hypodermis und Cuticula der Larven gibt Hinweise auf eine mögliche Funktion bei der Abwehr gegen exogenen oxidativen Stress. In den Mikrofilarien konnte das Protein jedoch nicht nachgewiesen werden (Lu *et al.* 1998). Wie das Enzym an der Parasitenoberfläche zu seinen reduzierenden Redoxpartnern kommen könnte, bleibt noch aufzuklären. In den adulten Tieren wurde das OvTPx2 im Intestinaltrakt und Uterusepithelium detektiert. Eine ähnliche Lokalisierung wurde für das *Dirofilaria immitis* 1-Cys Peroxiredoxin nachgewiesen, welches außerdem sezerniert wird (Chandrashekar *et al.* 2000). Auch in diesem Fall wäre die Identität eines möglichen physiologischen Redoxpartners außerhalb des Parasiten noch aufzuklären.

1.5. Zielsetzung

Peroxiredoxine bilden eine große Gruppe antioxidantischer Enzyme, die in allen Organismen vertreten sind. In Spezies, denen hocheffiziente Peroxidasen fehlen, wie z. B. einigen Bakterien, Hefe und Trypanosomen könnten die Peroxiredoxine die Hauptverteidigung gegen oxidativen Stress bilden. In höheren Eukaryoten "konkurrieren" sie bei der Bekämpfung von unspezifischem oxidativen Stress jedoch mit den hocheffizienten Katalasen oder Seleno-Peroxidasen. Bei parasitischen Nematoden ist eine alleinige Funktion der Peroxiredoxine als "Schutzenzym" vor dem Immunsystem des Wirtes in Anbetracht der bisherigen Untersuchungen unwahrscheinlich.

Die physiologische Bedeutung dieser Enzyme scheint bei weitem vielschichtiger und komplexer zu sein, als zunächst angenommen. Ihnen werden Funktionen in grundlegenden Zellprozessen wie Signaltransduktion, Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Apoptose zugeschrieben.

Um nähere Hinweise auf ihre physiologische Bedeutung zu erhalten, sollte anhand des Modellorganismus *C. elegans* exemplarisch eine Charakterisierung von Peroxiredoxinen in Nematoden vorgenommen

werden. Die verschiedenen *C. elegans* Peroxiredoxine sollten zunächst auf ihre möglichen Funktionen *in vivo* hin untersucht werden. Zu diesem Zweck sollten mit Hilfe der RNA Interferenz Tiere mit einem Knockdown der entsprechenden Peroxiredoxine erzeugt und charakterisiert werden. Außerdem sollten die enzymatischen Fähigkeiten der verschiedenen Peroxiredoxine nach rekombinanter Expression *in vitro* untersucht und mögliche physiologische Redoxpartner identifiziert werden. Das Expressionsmuster und die Lokalisierung der Peroxiredoxine sollte anhand von *gfp*-Reportergenexpressionen aufgeklärt werden. Hierzu sollten mittels Mikroinjektion transgene Tiere erzeugt werden, welche unter den *prx*-spezifischen Promotoren ein *gfp* exprimieren. Die transgenen Nematoden sollten anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Reagenzien und Chemikalien

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) in dem Reinheitsgrad p.A. bezogen.

Amersham Buchler (Braunschweig): α -[³²P]-dATP
Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg): dNTP Set **AppliChem** (Darmstadt): Agarose MP, 30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) **Becton Dickinson** (Cockeysville, USA): Hefeextrakt **Biomol** (Hamburg): Glycerin, HEPES **BioRad** (München): Bradford-Reagenz **BioWhittaker** (Rocklan, ME, USA): Seakem®GTC®Agarose **GibcoBRL Life Technologies** (Karlsruhe): TRIzol®-Reagenz **Promega** (Mannheim): Thioredoxin, BCIP, NBT **Roche Diagnostics** (Mannheim): Ampicillin, NADPH **Roth** (Karlsruhe): Milchpulver **Stratagene** (La Jolla, CA, USA): IPTG **QBiogene-Alexis GmbH** (Grünberg): DMNQ, GSNO, nor-1 **Qiagen** (Hilden): Ni-NTA-Superflow

2.1.2 Weitere Materialien

Ambion (Huntington, UK): Spin Columns **Amersham Biosciences** (Freiburg): MicroSpin™ S-300 HR Columns, Hybond-N **Invitrogen Life Technologies** (Karlsruhe): TOPO TA Cloning™ Kit, Easy-DNA™ Kit **Kisker** (Steinfurt): Avidin-Polystyrene Particles **Machery-Nagel** (Düren): NucleoSpin® Plasmid Kit **MBI Fermentas** (St. Leon-Rot): 6x Loading Dye Solution **Millipore** (Bradford, MA, USA): Stericup™, Sterilfilter Sterivac™ **MoBiTec GmbH** (Göttingen): Empty Lab Columns (10ml) **Promega** (Mannheim): Prime-a-gene® Labeling System **Qiagen** (Hilden): EndoFree™ Plasmid Maxi Kit, QIAquick PCR Purification Kit **Schleicher&Schuell** (Dassel): Optitran BA-S83 Reinforced NC, Whatman Papier **Spectrum Laboratories Inc.** (Rancho Dominguez, CA, USA): Spectra/Por® Membrane MWCO:6-8000

2.1.3 Spezielle Geräte

Biometra (Göttingen): Duo-Therm-Hybridisierungsöfen
BioRad (München): UV-Transilluminator **Bio-Tek Kontron Instruments** (München): Uvikon 933 Double Beam UV/VIS Spektro-Photometer **Hybaid** (Ashford, GB): Blotkammer OWL, Gelvorrichtung 13x18cm **PerkinElmer** (Rodgau-Jügesheim): DNA Thermal Cycler 480, GeneAmp PCR System 2400 **Stratagene** (La Jolla, CA, USA): UV Stratalinker™1800, Robocycler® Gradient 40

2.1.4 Enzyme

Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg): Restriktionsenzyme (3 – 20 U/μl), Taq-Polymerase (5 U/μl), T4-DNA-Ligase (hc) (5 U/μl) **Invitrogen Life Technologies** (Karlsruhe): Reverse Transkriptase Super Skript™II, RNase H⁻ **New England Biolabs GmbH** (Frankfurt a.M.): Restriktionsenzyme (3 – 20 U/μl) **Promega** (Mannheim): DNA-Polymerase I Klenow Fragment (1 U/μl) **Roche Diagnostics** (Mannheim): Expand Long Template PCR System (3,5 U/μl), *Pwo* DNA-Polymerase (5 U/μl) **Sigma-Aldrich** (Taufkirchen): Thioredoxin Reduktase aus *E. coli*, L-Glutamin- Synthetase (GS) aus *E. coli* **QBiogene-Alexis GmbH** (Grünberg): Proteinase K

2.1.5 Marker

MBI Fermentas (St. Leon-Rot): "Gene Ruler™ 1kb Ladder" (DNA-Längenstandard), "Prestained SDS Marker 10-20kDa" (Proteingrößenstandard) **BioRad** (München): Prestained SDS-PAGE Standards Low Range

2.1.6 Antikörper zur Immunodetektion

Die während dieser Arbeit generierten Antikörper stammen aus BalbC Mäusen. Diese wurden im Abstand von zwei Wochen je dreimal mit jeweils 50μg rekombinantem Protein immunisiert. Drei Wochen nach der letzten Immunisierung wurde das Serum gewonnen.

| ANTIKÖRPER | HERKUNFT / REFERENZ |
|---------------------------------------|---------------------|
| Anti-Mouse IgM, AP-konjugiert (Ziege) | Sigma |
| Anti- <i>C. elegans</i> Prx1 (Maus) | diese Arbeit |
| Anti- <i>C. elegans</i> Prx2 (Maus) | diese Arbeit |
| Anti- <i>C. elegans</i> Prx3 (Maus) | diese Arbeit |

2.1.7 Oligonukleotide

Die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen Life Technologies synthetisiert und werden im Folgenden nach ihrem Verwendungszweck aufgelistet. Die zu Klonierungszwecken eingefügten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und die Sequenzen in 3'→5'-Orientierung angegeben.

cDNA-Synthese

| | |
|------------------|---|
| CapFinder B1 | GAGAGAACGCGTGACGAGAGACTGACAGGGGGGGGG |
| CapFinder B2 | GAGAGAACGCGTGACGAGAGACTGACAG |
| Spliced Leader1 | GGTTTAATTACCCAAGTTTGAG |
| Spliced Leader2 | GGTTTTAACCCAGTTACTCAAG |
| Oligo dT Master | ACTCTATGAGAATTCGATGAGCGATCTG |
| Oligo dTA Biotin | ACTCTATGAGAATTCGATGAGCGATCTG(T) ₂₅ A |
| Oligo dTC Biotin | ACTCTATGAGAATTCGATGAGCGATCTG(T) ₂₅ C |
| Oligo dTG Biotin | ACTCTATGAGAATTCGATGAGCGATCTG(T) ₂₅ G |

Amplifikation der *prx*-Gene mit ihrer Promoterregion zur Klonierung für die Mikroinjektion

| | |
|----------------------|---|
| F09 -1900 S (Pst I) | GAGACTGCAGTGAAGCATTGCAAG |
| F09 Exon1 AS (Sma I) | GAGAT <u>CCCGGGTTCCT</u> CAGCACGGTCAGAGAAGGC |
| R07 -3000 S (Sal I) | GAGAG <u>TCGACTCC</u> ATGACCCCTTCTCTTCAATTCCT |
| R07 Ende AS (Sma I) | GAGAT <u>CCCGGGTTC</u> TTGTTGACCTTGTTGAAGTA |

Y38 -1900 S (Pst)

GACTGCAGCTAAATTTTTTTTAAATCTGAATACTG

Y38 Ende AS (Sma I)

GAGATCCCGGTTATTCTGCAAGTAAGCGTCTCCCTCGATG

Amplifikation der *prx*-kodierenden ORFs zur Klonierung für die Überexpression

R07 für pJC45 S (Nde I)

GAGACATATGTTTTCTTCTGCTGTTCTGA

R07 (ohne Mitosignal) für pJC45 S (Nde I)

GACATATGGCTTTCAAAGGAACTGCTG

R07 für pJC45 AS (Apa I)

GAGAGGGCCCTCACTTGTTGACCTTGTGAA

F09 für pJC S (Nde I)

GAGACATATGTCGAAAGCATTTCATCGGA

F09 für pJC45 AS (Apa I)

GAGAGGGCCCTTAGTGCTTCTTGAAGTACTCTTG

Y38 für pJC45 S (Nde I)

GAGACATATGAAGCTCGGAGACACCG

Y38 für pJC45 AS (Apa I)

GAGGGCCCTCAATTCTGCAAGTAAGCGTCTCCCTCG

Amplifikation der *prx*-kodierenden ORFs zur Klonierung für die RNAi Experimente

R07 für T7 S (Bam HI)

GAGAGGATCCATGTTTTCTTCTGCTGTTCTGA

R07 für T7 AS (Eco RI)

GAGAGAATTCCTTGTTGACCTTGTGAAAGTA

F09 für T7 S (Not I)

GAGAGCGGCCGCATGTCGAAAGCATTTCATCGGA

F09 für T7 AS (Pst I)

GAGACTGCAGGTGCTTCTTGAAGTACTCTTGGCT

Y38 für T7 AS (Pst I)

GACTGCAGATTCTGCAAGTAAGCGTCTCCCTCGATG

Y38 für T7 S (Not I)

GAGAGCGGCCGCATGAAGCTCGGAGACACCGT

2.2. Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen für die Arbeiten mit *C. elegans*

| | |
|------------|--|
| Lösung A | Cholesterin (5mg/ml in Ethanol) |
| Lösung B | 1 M CaCl ₂ |
| Lösung C | 0,8 M MgSO ₄ |
| Lösung D | 0,16 M KH ₂ PO ₄ ; 0,16 M K ₂ HPO ₄ ; pH 6,0 |
| M9 Puffer | 22 mM KH ₂ PO ₄ ; 22 mM Na ₂ HPO ₄ ; 85 mM NaCl. Nach dem Autoklavieren Zugabe von 1 ml Lösung C pro 1l Puffer. |
| NTE-Puffer | 0,1 M NaCl; 20 mM EDTA; 50 mM Tris |

Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

| | |
|------------------|---|
| 10x TBE | 0,89 M Tris; 0,89 M Borsäure; 25 mM EDTA |
| 10x MOPS | 0,2 M MOPS; 50 mM Natriumacetat; 20 mM EDTA; pH 7,0 |
| RNA-Probenpuffer | 72 µl MOPS (1x); 128 µl Formaldehyd; 360 µl Formamid |
| 20x SSC | 3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0 |
| TE Puffer | 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0 |
| Church-Mix | 0,5 M Na ₂ HPO ₄ ; 7% (w/v) SDS; 1 mM EDTA; pH 7,2 |
| Church-Wash | 40 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1% (w/v) SDS; pH 7,2 |

Lösungen für SDS-PAGE und Western-Blot

| | |
|-------------------------------|--|
| Ammoniumpersulfat | 25% (w/v) in A. bidest |
| 10x Elektrophorese- puffer | 0,25 M Tris; 0,5 M Glycin; 1% (w/v) SDS |
| SDS-Probenpuffer | 125 mM Tris/HCl; 20% (v/v) Glycerin; 20% (w/v) SDS; 20 mM DTT; 0,001% (w/v) Brom- phenolblau; pH 6,8 |
| Sammelgelpuffer | 0,5 M Tris; 0,4% (w/v) SDS; pH 6,8 |
| Trenngelpuffer | 1,5 M Tris; 0,4% (w/v) SDS; pH 8,8 |

Lösungen für die Coomassie-Färbung

| | |
|-------------|--|
| Färbelösung | 50% (v/v) Methanol; 40% (v/v) A. bidest; 10% (v/v) Eisessig; 0,05% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 |
| Entfärber | 45% (v/v) Methanol; 45% (v/v) A. bidest; 10% (v/v) Eisessig |

Puffer für die Immunodetektion von Proteinen

| | |
|-----------|---|
| AP-Puffer | 50 mM Tris/HCl; 0,1 M NaCl; 10 mM MgCl; pH 9,5 |
| TBS-T | 10 mM Tris/HCl; 0,15 M NaCl; 0,05% (v/v) Tween 20; pH 7,2 |

Puffer für die Ni²⁺-Chelatchromatographie

| | |
|-------------------|--|
| 8x Bindungspuffer | 40 mM Imidazol; 4 M NaCl; 160 mM Tris/HCl; pH 7,9 |
| 8x Waschpuffer I | 480 mM Imidazol; 4 M NaCl; 80 mM Tris/HCl; pH 7,9 |
| 4x Waschpuffer II | 800 mM Imidazol; 2 M NaCl; 80 mM Tris/HCl; pH 7,9 |
| 4x Elutionspuffer | 4 M Imidazol; 2 M NaCl; 80 mM Tris/HCl; pH 7,9 |

2.3. Organismen und Vektoren

2.3.1 *Escherichia coli* Stämme

| STAMM | GENOTYP | REFERENZ / HERKUNFT |
|--------------|--|---|
| DH5 α | supE44, Δ lacU169(ϕ 80 lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1 | HANAHAN,1983 |
| HT 115 | F-, mcrA, mcrB, IN(rrnD-rrnE)1, rnc14::Tn10 | Caenorhabditis Genetics Center ¹ |
| OP 50 | uracil auxotroph | Caenorhabditis Genetics Center |

¹ University of Minnesota, Minneapolis, USA

| STAMM | GENOTYP | REFERENZ / HERKUNFT |
|------------------------------|---|------------------------------|
| pAPlacI ^Q | [pAPlacI ^Q] | Dr. O. Fayet, Toulouse |
| Top10 One Shot TM | F-mcr A(mrr-hsd RMS-mcr BC)80, lacZ M15, lacX74, deoR, recA1, araD139 (araleu) 7697, galK, galU, rps L(StrR), endA1, nupG | Life Technologies, Karlsruhe |

2.3.2 *Caenorhabditis elegans* Stämme

| STAMM | LOKUS UND DELETIONSALLEL | ZUR VERFÜGUNG GESTELLT VON |
|---------------------------|--------------------------|---|
| N2 var. Bristol (Wildtyp) | | Dr. E. Liebau, BNI ² , Hamburg |
| VC 289 | tag-56 (gk169) | <i>C. elegans</i> Reverse Genetics Core Facility ³ |
| <i>pha-1</i> | (e2123) | Dr. R. Schnabel, Braunschweig |

2.3.3 Vektoren

| VEKTOR | INSERT | REFERENZ / HERKUNFT |
|------------------------|---|-------------------------------|
| pBX | dominantes <i>C. elegans pha-1</i> Gen | Dr. R. Schnabel, Braunschweig |
| pPD95_77 | - | A. Fire ⁴ (1986) |
| pPD95_77:: <i>prx1</i> | -3000Bp aufwärts v. Startkodon des <i>prx1</i> -Gens bis zum Genende | diese Arbeit |
| pPD95_77:: <i>prx2</i> | -1904Bp aufwärts v. Startkodon des <i>prx2</i> -Gens bis zum Nukleotid 185 des 1. Exons | diese Arbeit |
| pPD95_77:: <i>prx3</i> | -1568Bp aufwärts v. Startkodon des <i>prx3</i> -Gens bis zum Genende | diese Arbeit |
| pJC45 | - | Schlüter <i>et al.</i> (2000) |
| pJC45:: <i>prx1</i> | Prx 1 kodierende Region | diese Arbeit |
| pJC45:: <i>prx2</i> | Prx 2 kodierende Region | diese Arbeit |
| pJC45:: <i>prx3</i> | Prx 3 kodierende Region | diese Arbeit |

² Bernhard Nocht Institut für Tropenmedizin

³ "*C. elegans* Reverse Genetics Core Facility at the University of British Columbia", gegründet vom "Canadian Institute for Health Research", "Genome Canada", "Genome BC", der "Michael Smith Foundation" und den "National Institutes of Health".

⁴ Carnegie Institution of Washington, Baltimore, MD, USA

| VEKTOR | INSERT | REFERENZ / HERKUNFT |
|---|------------------------------------|--------------------------|
| T7pSport | modifizierter pSportI (Invitrogen) | Dr. T. Röder, Marburg |
| T7pSport:: <i>prx1</i> | Prx 1 kodierende Region | diese Arbeit |
| T7pSport:: <i>prx2</i> | Prx 2 kodierende Region | diese Arbeit |
| T7pSport:: <i>prx3</i> | Prx 3 kodierende Region | diese Arbeit |
| T7pSport:: <i>gfp</i> | | Dr. T. Röder |
| T7pSport:: <i>gqα</i> | Tyramin-Rezeptorgen | Dr. T. Röder |

2.4 Nährmedien und Kulturbedingungen

2.4.1 Nährmedien

| | |
|--------------|--|
| LB-Medium | 20g Lennox L Broth Base; ad 1l A. bidest; autoklavieren |
| LB-Agar | 30g Lennox L Broth Agar; ad 1l A. bidest; autoklavieren |
| NGM-Medium | 3g NaCl; 2,5g Peptone; ad 973ml A. bidest; nach dem Autoklavieren Zugabe von 1ml Lsg A; 0,5ml Lsg B; 1ml Lsg C; 25ml Lsg D |
| NGM-Agar | 17g Agar-Agar, 3g NaCl; 2,5g Peptone; ad 973ml A. bidest; nach dem Autoklavieren Zugabe von 1ml Lsg A; 0,5ml Lsg B; 1ml Lsg C; 25ml Lsg D |
| 2x YT-Medium | 800ml A. bidest; 16g Baktotrypton; 10g Hefeextrakt; 5g NaCl; pH 7,0 mit NaOH einstellen; ad 1l A. bidest; autoklavieren. |

Bei Bedarf wurde den Medien nach dem Abkühlen 100 μ g Ampicillin/ml und/oder 12,5 μ g Tetracyclin/ml und/oder 50 μ g Kanamycin/ml zugefügt.

2.4.2 Kulturführung und Reinigung von *C. elegans*

Die *C. elegans* Kulturen wurden auf NGM-Agar in Petrischalen (\varnothing 96mm) gehalten. Als Nahrung dienten *E. coli* OP50 Bakterien. Die Temperatur betrug 23°C. Die Kulturen wurden nicht synchronisiert.

Für die RNA-Gewinnung wurden Massenkulturen in 2l Erlenmeyerkolben mit 200 ml NGM-Medium angesetzt.

Die Reinigung der Kulturen erfolgte über einen Sucrosegradienten. Hierzu wurden die NGM-Agarplatten mit M9 Puffer abgespült und die abgespülten Würmer zum Absinken auf Eis inkubiert. Die Flüssigkulturen wurden direkt auf Eis gestellt. Nach 1h wurde ein Teil des Überstandes abgenommen, die restliche Kultur in 50ml Falcon-Gefäße verteilt und 5 min bei 4°C und 1500 Upm zentrifugiert. Die entstandenen Pellets wurden in 50 ml M9-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (4°C, 1300 Upm). Es folgte die Aufnahme der Pellets in 25ml M9-Puffer und Zugabe von 25 ml 60% Sucroselösung. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 4°C und 2000 Upm wurden die in einem Ring auf der Flüssigkeit konzentrierten Würmer abgenommen, gepoolt und anschließend 2x mit 50 ml M9-Puffer gewaschen.

2.4.3 Kultivierung von Bakterien

Die verschiedenen *E. coli* Stämme wurden über Nacht aerob in LB-Medium bei 37°C auf einem Rundschüttler angezogen. Zur Lagerung wurden die Zellen nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase mit 1/6 Volumen Glycerol versetzt und bei -70°C eingefroren.

2.5. Transformation von *Escherichia coli*

2.5.1 Herstellung chemokompetenter Bakterien für die Transformation

Die Herstellung chemokompetenter DH5 α -, HT115- und pAPlacI^Q-Zellen erfolgte nach Angaben der Hersteller.

2.5.2 Transformation von *E. coli*

Die Transformation aller *E. coli*-Stämme erfolgte nach Angaben des jeweiligen Herstellers durch die Hitzeschockmethode. Da das Klonierungssystem der Top10 One ShotTM-Zellen ein Blau-Weiß-Screening

zuließ, wurde der Transformationsansatz vor dem Ausplattieren mit 50 µl 2% X-Gal versetzt.

2.6. Isolierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der gewonnenen DNA- und RNA-Lösungen wurde bei Bedarf photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Reinheit wurde anhand des Verhältnisses von Extinktion₂₆₀ zu Extinktion₂₈₀ überprüft.

2.6.1 Isolierung genomischer DNA aus *C. elegans*

Es wurden gereinigte Würmer von zwei gut bewachsenen NGM-Agarplatten verwendet. Die Würmer wurden zunächst 2x mit NTE-Puffer gewaschen, sedimentiert und durch zweimaliges Einfrieren und Auftauen aufgeschlossen. Es folgte eine 45 minütige Inkubation bei 65°C in 1,5 ml NTE-Puffer, versetzt mit 750 µg Proteinase K und 1% (w/v) SDS. Anschließend wurde der Ansatz mit 500 µl Lösung B aus dem Easy-DNA™ Kit versetzt und gut durchmischt. Die DNA wurde mit 500 µl Chloroform extrahiert und anschließend durch Zugabe von 1,5 ml Ethanol gefällt. Sie wurde in TE-Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert. Bei Bedarf wurde eine Chloroform-Extraktion vorgenommen.

2.6.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. elegans*

Die gewünschte Menge an Würmern wurde gereinigt und in 4fachem Volumen TRIzol®-Reagenz aufgenommen. Der Aufschluss der Würmer erfolgte durch 3 – 4maliges Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff. Die RNA wurde mit 200 µl Chloroform pro eingesetztem ml TRIzol® extrahiert und mit 500µl Isopropyl pro ml eingesetztem TRIzol® gefällt. Anschließend wurde sie mit 80% (v/v) Ethanol gewaschen und in DEPC-H₂O gelöst. Zur Lagerung bei -20°C wurde die RNA mit 1/10 Volumen NaAcetat (3 M, pH 5,2) und 2,5 Volumen 99% (v/v) Ethanol versetzt.

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

Die Isolierung geringer Mengen an Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin®Plasmid Kits. Die Isolierung der für die Mikroinjektion von *C. elegans* benötigten, hochreinen Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des EndoFree™ Plasmid Maxi Kit durchgeführt. Die Präparationen erfolgten nach den Angaben der Hersteller.

2.7. Fällung und Auftrennung von Nukleinsäuren

2.7.1 Fällung von Nukleinsäuren

Die DNA- oder RNA-Lösungen wurden mit 1/10 Volumen 3 M NaAcetat pH 5.2 und 2,5 Volumen 99% (v/v) Ethanol versetzt und 12 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Die so gefällten Nukleinsäuren wurden mit 70% (v/v) gewaschen und anschließend in A. bidest oder DEPC-H₂O resuspendiert.

2.7.2 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte durch Agarosegelelektrophorese. DNA-Moleküle wurden mit 6x Loading Dye Solution versetzt und in mit 0,1 µg Ethidiumbromid pro ml Gel versetzten Agarosegelen aufgetrennt. Die Konzentration der Gele betrug 1% (w/v) Agarose in 1x TBE.

Die Auftrennung der RNA erfolgte in 0,8% (w/v) Agarose in 1x MOPS und 5,5% (v/v) Formaldehyd. Die Proben wurden mit 28 µl RNA-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 60°C inkubiert und nach Zugabe von 4 µl RNA-Dye und 1 µl Ethidiumbromid auf das Gel aufgetragen.

Die Detektion der DNA und RNA erfolgte mittels UV-Transilluminator.

2.8. Enzymatische Modifikation von DNA

2.8.1 Restriktionsverdau

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA erfolgte durch den Einsatz von Restriktionsendonukleasen mit den entsprechenden Puffersystemen nach Angaben der Hersteller.

2.8.2 Ligation

Die Ligation von linearisierter Plasmid-DNA mit DNA-Fragmenten erfolgte in einem 12 µl Ansatz mit dem T4-Ligase (hc) System nach Angaben des Herstellers.

2.8.3 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von DNA erfolgte anhand einer Variante der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1980). Die Reaktionen wurden mit Hilfe des "Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit" nach Angaben des Herstellers (Applied Biosystems) durchgeführt.

2.9. Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde mit 1 – 5 U der DNA-Polymerasen mit den dazugehörigen Puffersystemen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Hybridisierungstemperatur wurde nach der Schmelztemperatur der jeweiligen Oligonukleotide gewählt, die Dauer nach deren Länge und Spezifität.

2.9.1 Reverse Transkription von RNA

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase Super SkriptTMII wurde Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl und enthielt 1 – 5 µg RNA, je 0,2 µM der Oligonukleotide Oligo dT-Mix (zusammengesetzt aus gleichen Teilen biotinyliertem Oligo dTA, dTC und

dTG) und CapFinder B1, 1 mM dNTPs, 1 µl MnCl (40 mM), 3 µl 5x First-Strand-Buffer, 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl RNase Inhibitor und 0,2 µl BSA (10mg/ml). Der Ansatz wurde 50 min bei 42°C inkubiert, das Enzym anschließend 10 min bei 70°C inaktiviert. Die noch vorhandene RNA wurde anschließend mit RNase H entfernt.

2.9.2 Amplifikation von cDNA (Zweitstrangsynthese)

Um die cDNA zu amplifizieren, wurde diese zunächst an Avidin-Polystyrene Partikel gebunden. 3 µl Avidin Partikel pro µl cDNA Probe wurden 2x mit "Bind and Wash Puffer" gewaschen und zur cDNA gegeben. Die Bindung der cDNA an die Partikel erfolgte bei 37°C für 1h. Nach 2maligem Waschen mit TE-Puffer wurde die an die Partikel gekoppelte cDNA in 30 µl 10 mM Tris pH 7,6 aufgenommen.

Für die Amplifikation wurden 1,5 µl dieser gekoppelten cDNA als Template eingesetzt. Außerdem enthielt der Ansatz 5 / 0,5 U *taq*-/ *pwo*-Polymerase, 1x *taq*-Polymerase-Puffer, je 0,5 µM der Oligonukleotide Oligo dT Master und CapFinder B2 oder Spliced Leader 1 oder Spliced Leader 2, 500 µM dNTPs und optional 2,5 mM MgSO₄.

Die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

| | | | |
|----|--------------|--------------|-------------|
| 1x | 95°C / 1min | 50°C / 1min | 72°C / 7min |
| 7x | 95°C / 25sec | 50°C / 1min | 72°C / 7min |
| 8x | 95°C / 25sec | 50°C / 30sec | 72°C / 8min |
| 8x | 95°C / 25sec | 50°C / 30sec | 72°C / 9min |

2.10. Reinigung und Isolierung von DNA

2.10.1 Chloroform-Extraktion

Eine Chloroform-Extraktion wurde durchgeführt, um Proteine aus DNA-Lösungen zu entfernen. Dazu wurde die Probe mit 1 Volumen Chloroform [1 Volumen Tris-gesättigtes Phenol und 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1)] gemischt und zur Phasentrennung 10 min bei 13000

Upm zentrifugiert. Die im Überstand befindliche DNA wurde im nächsten Schritt mit Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert und anschließend gefällt.

2.10.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die DNA-Fragmente wurden bei einer Wellenlänge von 366 nm aus dem Gel ausgeschnitten und mit *Spin Columns* (Ambion) nach Angaben des Herstellers aus der Agarose eluiert.

2.10.3 Reinigung von PCR-Amplifikaten

PCR-Produkte wurden mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* nach Angaben des Herstellers gereinigt.

2.11. Northern-Blot-Analyse

2.11.1 Northern-Blot

Der als Northern-Blot bezeichnete Transfer von RNA aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte über Nacht mit 20x SSC-Puffer im Kapillarverfahren. Pro Probe wurden 20 µg RNA aufgetragen. Zur Fixierung der RNA wurde die Membran nach dem Blotten zuerst 1h bei 85°C gebacken und anschließend bei 1200 Joule im Stratalinker gelinkt.

2.11.2 Virtueller Northern-Blot

Als virtuellen Northern-Blot bezeichnet man den Transfer von Zweitstrang-cDNA auf eine Nylonmembran. Der virtuelle Blot wurde wie der Northern-Blot durchgeführt, das Agarosegel vor dem Blotten jedoch 1x 15 min in 0,25 M HCl, 2x 15 min in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl und 2x 15 min in 3 M NaAcetat pH 5,2 gewaschen.

2.11.3 Radioaktive Markierung von DNA

Die Markierung der DNA mit α -[³²P]-dATP erfolgte mit Hilfe des Prime-a-gene® Labeling Systems nach Angaben des Herstellers. Überschüssige radioaktive Nukleotide wurden anschließend mit *MicroSpin™ S-300 HR* Säulen abgetrennt.

2.11.4 Hybridisierung der Northern-Blots mit radioaktiver DNA

Die Blots wurden 1h bei 68°C in Church-Mix vorhybridisiert, nach Zugabe der radioaktiven Sonde wurde über Nacht bei 68°C hybridisiert. Der Blot wurde am nächsten Tag 2x 30 min in Church-Wash gewaschen und eingeschweißt. Die Detektion der Sonden erfolgte durch Exponierung auf einem Kodak BioMax Film bei -70°C.

2.12. Biochemische Methoden

2.12.1 Isolierung von Gesamt-Proteinextrakt aus *C. elegans*

Zur Isolierung von Gesamt-Proteinextrakt wurden gereinigte Nematoden von zwei dicht bewachsenen NGM-Agarplatten (ca. 100000 Würmer) in 2ml SDS-Probenpuffer aufgenommen und 10 min in einem Potter homogenisiert. Die Extrakte wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.12.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung löslicher Proteine erfolgte mit Hilfe des Bradford-Reagenz. Als Referenz diente eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin.

2.12.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Trennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse erfolgte im diskontinuierlichen System nach Laemmli (1970). Die Proben wurden vor dem Auftragen mit dem gleichen Volumen SDS-Probenpuffer versetzt und 2 min bei 95°C aufgeköcht. Die Trennung erfolgte in einem 12%igen Trenngel in einer 13 x 18 cm Gelvorrichtung (Hybaid). Zu analytischen Zwecken wurden die SDS-Gele über Nacht in Coomassie-Blau Lösung gefärbt und anschließend bis zum Erhalt eines transparenten Hintergrundes mit Coomassie-Entfärber entfärbt.

2.12.4 Western-Blot

Durch das Semi-Dry-Blotverfahren wurden die in der SDS-PAGE getrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dieses erfolgte in einer horizontalen OWL Blotkammer. Drei Lagen mit 1x Elektrophoresepuffer befeuchtetem Whatmanpapier wurden auf die Kathodenplatte der Kammer gelegt, darauf das Polyacrylamidgel. Auf das Gel wurde die ebenfalls mit 1x Elektrophoresepuffer getränkte Nitrocellulosemembran gelegt, darauf wieder 3 Lagen mit 1x Elektrophoresepuffer befeuchtetem Whatmanpapier. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 1,5 mA pro cm² Gel für 1,3h.

2.12.5 Immunodetektion der transferierten Proteine

Die Membran wurde zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen 30 min bei RT in 5% (w/v) Milchpulver in TBS-T geschwenkt. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C, anschließend wurde 4x 5 min mit TBS-T gewaschen. Die Membran wurde nun 1,5h bei RT mit dem 2. Antikörper inkubiert und dann erneut 4x 5 min mit TBS-T gewaschen.

Die enzymatische Nachweisreaktion des AP-gekoppelten zweiten Antikörpers erfolgte durch Zugabe von 66 µl NBT und 33 µl BCIP in AP-

Puffer. Die Farbentwicklung wurde durch Inkubation in A. bidest beendet und der Blot anschließend getrocknet und im Dunkeln aufbewahrt.

2.13. Rekombinante Expression der *C. elegans* Peroxiredoxine

2.13.1 Überexpression in *E. coli*

Die Überexpression der *C. elegans* Peroxiredoxine erfolgte in pAPlacI^Q-Zellen. Die *prx*-kodierenden Regionen wurden aus Zweitstrang-cDNA amplifiziert und in den pJC45-Expressionsvektor ligiert. Die rekombinanten Proteine trugen an ihrem N-Terminus einen aus 10 Histidinen bestehenden, sogenannten *His-tag*.

Die Vektoren pJC45::*prx1*, pJC45::*prx2* und pJC45::*prx3* wurden für die Überexpression des entsprechenden Peroxiredoxins in pAPlacI^Q-Zellen transformiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterienklone von den LB-Amp-Agarplatten in 500 ml LB-Amp-Kanamycin-Medium plus 50 ml 20% Glucose gelöst und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 geschüttelt. Die Expression der Peroxiredoxine wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Bakterien weitere 2h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden sie 20 min bei 10000 Upm zentrifugiert und die pelletierten Zellen bei -20°C eingefroren.

2.13.2 Reinigung der rekombinanten Proteine über eine Nickelsäule

Die rekombinanten Proteine wurden mit Hilfe der sogenannten *Fast Performanc Liquid Chromatography* über eine Säule mit Ni-NTA-Superflow nach Angaben des Herstellers gereinigt.

Die Proteinfractionen wurden durch SDS-PAGE auf ihre Reinheit und den Proteingehalt geprüft. Die Fraktionen mit dem höchsten Gehalt an rekombinantem Protein wurden gepoolt und dialysiert.

2.13.4 Dialyse der rekombinanten Proteine

Die rekombinanten Proteine wurden nach ihrer Reinigung für mindestens 15h bei 4°C im 250 bis 500fachen Volumen 50 mM Hepes pH 7,0 dialysiert. Es wurde ein *Spectra/Por®Membrane MWCO:6-8000* Dialyseschlauch verwendet.

2.14. Bestimmung der Enzymaktivität der rekombinanten *C. elegans* Peroxiredoxine

2.14.1 Filter-Disc-Assay

Das jeweilige Prx-Expressionsplamid (pJC45::*prx1*, pJC45::*prx2*, pJC45::*prx3*) wurde in pAPlacI^Q-Zellen transformiert und 200 µl des Transformationsansatzes in Top-Agar [0,8% (w/v) Agarose und 1 mM IPTG in LB-Medium] verdünnt, auf LB-Amp-Agarplatten ausgestrichen und 1h bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde der Vektor pJC45 transformiert. Anschließend wurden in 5 µl Cumene (270 mM) oder *tert*-Butylhydroperoxid (t-BOOH, 2 mM) getränkte Filter (Ø 5 mm) auf den Top-Agar gelegt und nach 24h bei 37°C wurde der Durchmesser der Lysehöfe um die Filter bestimmt.

2.14.2 Peroxidase-Aktivität in Anwesenheit von DTT

Die Fähigkeit der rekombinanten Peroxiredoxine, Wasserstoffperoxid und t-BOOH in Gegenwart von DTT zu entgiften, wurde mit der Ferrithiocyanat-Methode getestet.

Der Reaktionsansatz betrug 1 ml. Verschiedene Mengen an rekombinatem Enzym wurden mit 3 mM DTT 10 min bei 25 oder 37°C inkubiert und nach Zugabe von 625 µM H₂O₂ oder 700 µM t-BOOH für weitere 30 min bei 25 oder 37°C inkubiert. Die Proteine wurden anschließend mit 80 µl 100% TCA gefällt und die verbliebende Menge an Peroxid nach Zugabe von 100 µl 2,5 M Kaliumthiocyanat und 200 µl 10 mM Eisenammoniumsulfat photometrisch bei 480 nm bestimmt.

2.14.3 Thioredoxin-Peroxidase-Aktivität

Die Peroxidase-Aktivität in Anwesenheit von Thioredoxin-Reduktase (Trx-R) und Thioredoxin (Trx) wurde anhand der Oxidation von NADPH ermittelt, welche über die Peroxiredoxine an die Reduktion von H_2O_2 gekoppelt war.

Der 500 μl Reaktionsansatz enthielt 200 μM NADPH, 0,5 U Trx-R, 6 μM Trx, verschiedene Mengen an rekombinantem Peroxiredoxin und 1 mM H_2O_2 in 50 mM HEPES pH 7.0. Die Komponenten wurden nacheinander in festgelegten Zeitabständen zugegeben, die Veränderung der Absorption wurde für 18 min bei 340 nm in einer Quarzküvette gemessen.

2.14.4 NO-Detoxification-Assay

Eine Reduktion reaktiver Stickstoffverbindungen durch die Peroxiredoxine wurde anhand des durch sie vermittelten Schutzes von ABTS vor GSNO-vermittelter Oxidation zu ABTS^+ ermittelt. Das Reaktionsvolumen betrug 700 μl . Verschiedene Mengen des rekombinanten Peroxiredoxins wurden 5 min bei RT mit 1,7 mM GSNO inkubiert. 3,5 mM ABTS wurden zugegeben und das Protein nach 2 minüterer Inkubation bei RT durch Zugabe von 80 μl 100% TCA gefällt. Anschließend wurde die durch GSNO ausgelöste Oxidation des ABTS zu ABTS^+ durch Messen der Absorption bei 420 nm bestimmt.

Der Schutz vor Oxidation wird in Prozent angegeben, wobei die Extinktion der Probe ohne Prx als 100% Zerstörung und damit 0% Schutz festgelegt wurde.

2.14.5 L-Glutamin-Synthetase (GS) - Protection-Assay

Bestimmt wurde der Peroxiredoxin-vermittelte Schutz der *E. coli* GS vor Inaktivierung durch das Thiol/ $\text{Fe}^{3+}/\text{O}_2^-$ -System.

Der 500 μl Versuchsansatz enthielt 1 U GS, 20 mM DTT, 5 μM FeCl_3 und verschiedene Konzentrationen an rekombinantem Protein in 100 mM HEPES pH 7.0. Die Probe wurde für 10 min bei 37°C inkubiert, mit 500 μl γ -Glutamyltransferase-Assay Mixture (0,4 M ADP, 0,15 M Glutamin, 10 mM Kalium-Arsenat, 20 mM N-Hydroxylamin und 0,4 mM MnCl in 100 mM

Hepes pH 7,4) versetzt und weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Die verbliebene GS-Aktivität wurde nach Zugabe von 500 µl FeCl₃ (55mg/ml) bei 540 nm bestimmt.

Der vermittelte Schutz vor Inaktivierung wurde in Prozent relativ zur Inaktivierung in Abwesenheit von Peroxiredoxinen angegeben.

2.15. C. elegans Versuche

2.15.1 RNA Interferenz (RNAi)

Zur Erzeugung von Peroxiredoxin-Knockdowns wurde die Methode der RNA Interferenz gewählt. Diese wurde durch Fütterung der Würmer mit *E. coli* HT115, welche eine korrespondierende dsRNA produzierten, erzeugt.

Die *prx*-kodierenden offenen Leserahmen wurden zunächst aus Zweitstrang-cDNA amplifiziert, in den T7pSport-Vektor zwischen zwei T7-Promotoren kloniert und die Bakterien anschließend mit den entsprechenden Vektoren transformiert (T7pSport::*prx1*, T7pSport::*prx2*, T7pSport::*prx3*). Als Negativkontrolle diente ein Vektor mit einem *gfp*-kodierenden Gen (T7pSport::*gfp*), als Positivkontrolle der Vektor T7pSport::*gqα* mit bekanntem RNAi-Effekt (Eiablagedefekt). Je ein Einzelklon der transformierten Bakterien wurde in 2x YT-Amp-Tet-Medium gegeben und 8h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Kulturen auf NGM-Amp-IPTG (1mM)-Agarplatten ausplattiert (1ml Kultur pro Platte), über Nacht bei RT inkubiert und am nächsten Tag wurden die Würmer auf die Platten gesetzt.

Die transformierten *E. coli* HT115 wurden maximal eine Woche benutzt, die Würmer wurden alle zwei Tage auf frische Platten umgesetzt.

2.15.2 Überlebensdauer

Zur Bestimmung der Lebensdauer wurden zunächst zwei Tage alte Larven vereinzelt und diese Würmer anschließend bis zu ihrem Tod alle ein bis zwei Tage auf frische NGM-Agarplatten mit ausplattierten *E. coli* OP50 umgesetzt.

2.15.3 Anzahl der Nachkommen

L4-Larven wurden vereinzelt und jeden Tag auf frische NGM-Agarplatten umgesetzt. Die gelegten Eier bzw. geschlüpften Larven wurden täglich gezählt und so die Nachkommenanzahl pro Wurm bestimmt.

2.15.4 Empfindlichkeit gegenüber Stress

Die Resistenz von *C. elegans* gegenüber oxidativem oder nitrogenem Stress oder gegenüber Hitze wurde in 1ml Volumen in 24-Well-Gefäßen getestet. 15 Würmer wurden 90 oder 120 min mit H₂O₂, t-BOOH, Pyrogallol, Paraquat, GSNO (RT) oder bei 37°C inkubiert. Alle 10 oder 15 min wurde die Anzahl der noch lebenden Würmer bestimmt.

2.15.5 Induktion der Peroxiredoxin-Transkription durch oxidativen Stress

Um den Einfluss von oxidativem Stress auf die Transkription der Peroxiredoxingene zu überprüfen, wurden *C. elegans* Larven in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von H₂O₂ oder t-BOOH in M9-Puffer kultiviert. Anschließend wurde ihre RNA isoliert und einer virtuellen Northern-Blot-Analyse (s. Kap. 2.11.2) unterzogen.

Die Larven wurden mit Hilfe eines Siebes (40 µm Porengröße) von den adulten Hermaphroditen getrennt.

2.15.6 Expressionsmuster und Lokalisierung der Peroxiredoxine

Zur Aufklärung des Expressionsmusters und zur Lokalisierung der Peroxiredoxine in *C. elegans* wurde die sogenannte *gfp*-Reporterexpression gewählt. Die *prx*-Gene wurden inklusive ihrer entsprechenden Promotorregion aus genomischer DNA amplifiziert (im Falle des Prx2 nur bis zur Hälfte des 1. Exons) und in den Vektor pPD95_77 *in frame* vor *gfp*-Gen ligiert. Nach Mikroinjektion des jeweiligen Plasmids in *C. elegans* wurden unter dem entsprechenden *prx*-Promotor ein Prx-GFP-

Fusionsprotein exprimiert, welches unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert wurde.

2.15.7 Mikroinjektion von *C. elegans*

Die Mikroinjektion der DNA-Konstrukte erfolgte in die Gonaden von L4-Larven der *C. elegans pha-1*-Deletionsmutante. Das Markerplasmid pBX, welches ein dominantes *pha-1*-Gen trägt und eine Selektion der transgenen Nematoden bei 25°C ermöglicht, wurde zusammen mit dem jeweiligen Vektor pPD95_77::*prx1*, pPD95_77::*prx2* oder pPD95_77::*prx3* koinjiziert (DNA-Konzentration jeweils 90ng/µl). Die Nematoden wurden anschließend bei 25°C kultiviert. Die Folgegeneration ist Träger von Markerplasmid und DNA-Konstrukt.

2.16. Datenbanken und spezielle Programme

Die *C. elegans* Peroxiredoxine wurden mit Hilfe der *WormBase* (www.wormbase.org) und *NCBI* (www.ncbi.nlm.nih.gov/) Datenbanken identifiziert. Multiple Alignments wurden mit *Clustal W* ausgeführt (www.ebi.ac.uk/clustalw/) und der phylogenetische Stamm mit dem *Phylic Program Package* (*neighborhood joining approach*) erstellt. Signalsequenzen für den Transport in subzelluläre Kompartimente wurden mit den Programmen *MitoProtII* und *TargetP* (www.mips.biochem.mpg.de/cgi-bin/proj/medgen/mitofilter, www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/) identifiziert.

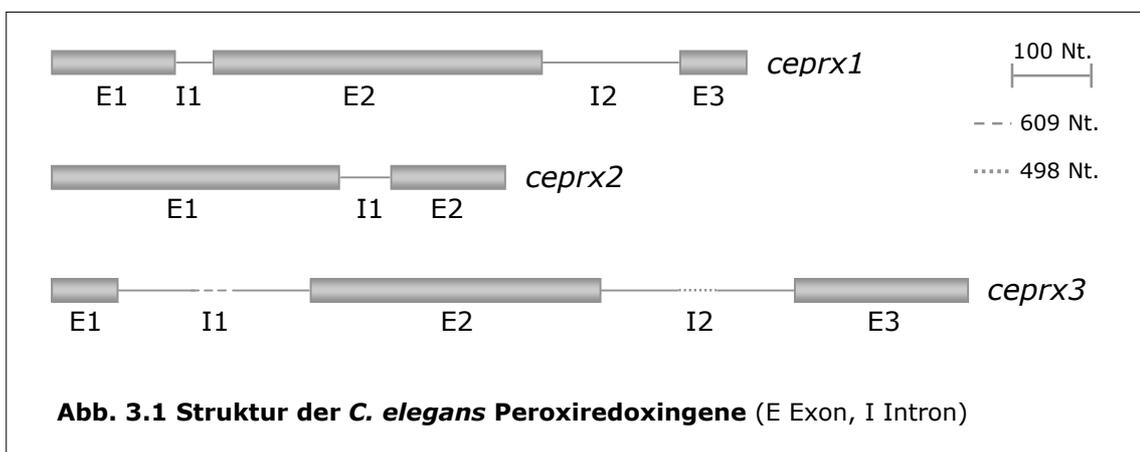
3. Ergebnisse

3.1. Identifizierung und Sequenzanalyse von drei *Caenorhabditis elegans* Peroxiredoxinen

3.1.1 Identifizierung und Struktur drei potentieller Peroxiredoxingene in *C. elegans*

In *C. elegans* konnten mit Hilfe der *WormBase* und *NCBI* Datenbanken drei potentielle Peroxiredoxingene identifiziert werden: *ceprx1* (R07E5.2), *ceprx2* (F09E5.11) und *ceprx3* (Y38C1AA.11). Der jeweilige Transkriptionsstart und die kompletten cDNA-Sequenzen der drei offenen Leserahmen konnten mittels RT-PCR und Sequenzierung bestätigt werden. Die Ergebnisse stimmten mit den annotierten Datenbanksequenzen des vollständig sequenzierten *C. elegans* Genoms überein (www.sanger.ac.uk/Projects/C_elegans/).

In Abbildung 3.1 ist die Struktur der drei Peroxiredoxingene schematisch dargestellt. Das *ceprx1*-Gen besteht aus 3 Exons. Der offene Leserahmen aus 681 Nukleotiden (Nt.) kodiert für ein Protein mit 226 Aminosäuren und einem rechnerischen Molekulargewicht von 24,9 kDa. Der offene Leserahmen des *ceprx2*-Gens aus 588 Nt. wird von einem Intron unterbrochen und kodiert für ein aus 195 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem rechnerischen Molekulargewicht von 21,8 kDa. Das aus drei Exons bestehende *ceprx3*-Gen kodiert für ein Protein aus 231 Aminosäuren, dessen rechnerisches Molekulargewicht 25,6 kDa beträgt. Der offene Leserahmen besteht aus 696 Nt..



Mittels PCR-Analysen wurde überprüft, ob die *prx*-mRNAs Träger von Spleißleitsequenzen sind. Die *prx*-kodierenden ORFs sollten zu diesem Zweck mit dem jeweiligen spezifischen Antisense Oligonukleotid und dem CapFinder (CF) B2, Spliced Leader (SL) 1 oder 2 Oligonukleotid aus der cDNA amplifiziert werden.

Die offenen Leserahmen des *prx1* und *prx3* ließen sich sowohl mit dem SL1 als auch mit dem SL2, nicht aber mit dem CF B2 amplifizieren. Die mRNAs beider Peroxiredoxine werden somit transgespleißt. Welche der beiden Spleißleitsequenzen die mRNAs tragen konnte nicht eindeutig geklärt werden (Daten nicht gezeigt). Der offene Leserahmen des *prx2* ließ sich nur mit dem SL1 amplifizieren (Daten nicht gezeigt). Das Ergebnis der PCR-Analyse zeigt, dass die transkribierte mRNA des *prx2* einen Spliced Leader 1 trägt. Die Sequenzierung des PCR-Amplifikats zeigte, dass die Spleißleitsequenz 1 direkt vor dem Transkriptionsstart liegt.

3.1.2 Sequenz- und phylogenetische Analyse der drei *C. elegans* Peroxiredoxine (CePrxs)

Eine Blast-Computeranalyse (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) der Aminosäuresequenzen der drei potentiellen Peroxiredoxine zeigte, dass CePrx1 und CePrx2, bezogen auf ihre gesamte Proteinelänge, eine Sequenzidentität von 64% zueinander haben. Die Identität zur CePrx3-Sequenz beträgt dagegen nur 19 bzw. 22%. Als einziges der drei *C. elegans* Peroxiredoxine besitzt das CePrx1 eine putative mitochondriale Signalsequenz, welche die ersten 40 Aminosäuren umfasst.

In Abbildung 3.2 sind die Aminosäuresequenzen der drei potentiellen *C. elegans* Peroxiredoxine im Vergleich mit den Aminosäuresequenzen einiger anderer Organismen dargestellt. CePrx1 und CePrx2 haben die beiden für 2-Cys Peroxiredoxine typischen konservierten Sequenzen *FVCP* (Position 76-79 bzw. 47-50) und *VCP* (Position 198-200 bzw. 169-171), welche die aktiven Cysteinreste umgeben (McGonigle *et al.* 1998). Sie lassen sich damit den typischen 2-Cys Prxs zuordnen. Die beiden Sequenzmotive *GGLG* und *YF*, die in allen Peroxiredoxinen vorkommen, die einer Inaktivierung durch Überoxidation gegenüber empfindlich sind (Wood *et al.* 2003), sind ebenfalls in CePrx1 und 2 vorhanden.

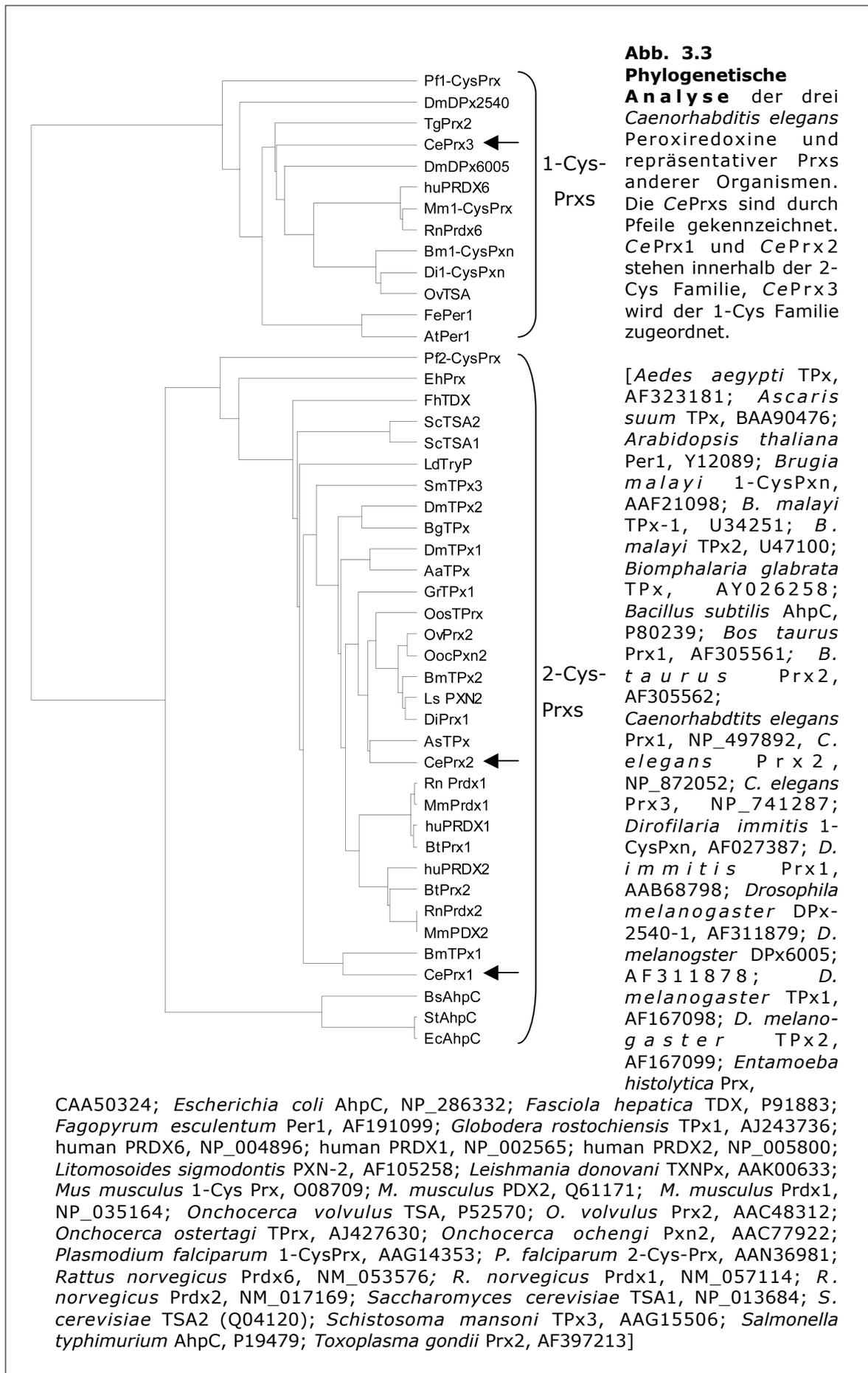
Das CePrx3 besitzt die für 1-Cys Peroxiredoxine typische, konservierte Sequenz *PVCT* (Position 42-47) (McGonigle *et al.* 1998). Es lässt sich damit den 1-Cys Prxs zuordnen.

Die vom bifunktionalen *Mammalia* Peroxiredoxin 6 bekannte Konsensussequenz für eine Phospholipase A₂ (*GXSXG*, Chen *et al.* 2000) kommt in keinem der drei CePrx vor. Auch die vom humanen PRDX2 bekannte Phosphorylierungsstelle für eine cyclinabhängige Kinase (*TPKK*, Chang *et al.* 2002) ist in keinem der drei *C. elegans* Peroxiredoxine vorhanden.

In Abb. 3.3 ist ein anhand der Aminosäuresequenzen erstellter Stammbaum verschiedener Peroxiredoxine dargestellt (*Phylic Program Package*). Der phylogenetische Vergleich der drei CePrxs mit repräsentativen 1-Cys und 2-Cys Prxs anderer Organismen bestätigt die aufgrund der Konsensussequenzen gemachte Zuordnung zur jeweiligen Peroxiredoxin-Familie. Der Stammbaum verdeutlicht außerdem die enge Verwandtschaft zu den Prxs parasitischer Nematoden.

| | | | | | | |
|------------|-----------------|------------|---------------|------------|-------------|-----------------|
| hu PRDX1 | 1:..... | MSSGN | AKIG | | HPAP | NFKATAVMPD:23 |
| hu PRDX2 | 1:..... | MASGN | ARIG | | KPAP | DFKATAVV.D:22 |
| C.e. Prx2 | 1:..... | MS.. | KAFI | | KPAP | QFKTQAVV.D:20 |
| C.e. Prx1 | 1:MFSSAVRALC | RTVPTVATRQ | LSTSRALLSL | RPLGPKNTV | | AFKGTAVV.D:49 |
| E.c. AhpC | 1:..... | | MSLIN | | TKIKP | FKNQAFK..N:18 |
| C.e. Prx3 | 1:..... | | MKLG | | DTVP | NFTFETDLRK:18 |
| hu PRDX6 | 1:..... | | MPGGLLLG | | DVAP | NFEANTTVGR:22 |
| PIA | | | | | | |
| hu PRDX1 | 24:GQFKDISLSD | YKGYVVF | FF | YELDFTEVCP | TEIIAFSDRA | EEFKKLNQV:73 |
| hu PRDX2 | 23:GAFKEVKLSD | YKGYVVL | FF | YELDFTEVCP | TEIIAFSTTVK | RTSAKLGCEV:72 |
| C.e. Prx2 | 21:GEFVDVLSLSD | YKGYVVL | FF | YELDFTEVCP | TEIIAFSDRA | EEFKAINTVV:70 |
| C.e. Prx1 | 50:GDFKVISDQD | YKGWLV | MMFF | YELDFTEVCP | TEIIAYGDRA | NEFRSLGAEV:99 |
| E.c. AhpC | 19:GEFIEITEKD | TEGRWSV | FFF | YFADFTVCP | TELGVDVADHY | EELQKLGVDV:68 |
| C.e. Prx3 | 19:NQTLHNYIG | ..EQWL | MLFS | HFADFTPVCT | TELAELVKLA | PEFRKRHWQI:65 |
| hu PRDX6 | 23:..IRFHDFLG | ..DSWG | ILFS | HRDFTEPVCT | TELGRAAKLA | PEFAKRNVKL:68 |
| CaP | | | | | | |
| hu PRDX1 | 74:IGASVDSHFC | HLAWNT | PKK | QGGLGPMN.. | ..IPLVSDPK | RTIAQDYGVL:119 |
| hu PRDX2 | 73:LGVSVDSQFT | HLAWINT | PRK | EGGLGPLN.. | ..IPLLADVT | RRLSEDDYVGL:118 |
| C.e. Prx2 | 71:LAASDVSFVS | HLAWIN | QPRK | HGGLGEMN.. | ..IPVLADTN | HQISRSDYVGL:116 |
| C.e. Prx1 | 100:VACSCDSHFS | HLAWNT | PRK | DGGLGDMD.. | ..IPLLADFN | KKIADSFVGL:145 |
| E.c. AhpC | 69:YAVSTDTHFT | HKAWH | SSSE | ..TIAKIK.. | ..YAMIGDPT | GALTRNFDNM:111 |
| C.e. Prx3 | 66:LAISIDSSET | HRDWAK | DINS | VAQLSNCGSH | LPFEIIADTD | RSICTELGMI:115 |
| hu PRDX6 | 69:IALSIDSVED | HLAWSK | DIN | AYNCEEPTEK | LPPFIIDDRN | RELAILLGLM:117 |
| Üox | | | | | | |
| hu PRDX1 | 120:KADE..... | GISFR | GLFII | DDKGILRQIT | VNDLPVGRSV | DETLRLVQAF:163 |
| hu PRDX2 | 119:KNDE..... | GIAFR | GLFII | DGKGVLRQIT | VNDLPVGRSV | DEALRLVQAF:162 |
| C.e. Prx2 | 117:KEDE..... | GIAFR | GLFII | DPSQNLRQIT | INDLPVGRSV | DETLRLVQAF:160 |
| C.e. Prx1 | 146:DKES..... | GLSYR | GLFLI | DPSGTVRHTT | CNDLPVGRSV | DETLRLVQAF:189 |
| E.c. AhpC | 112:REDE..... | GLADR | ATFVV | DQGIQIAIE | VTAEGIGRDA | SDLRLKIKAA:155 |
| C.e. Prx3 | 116:DPDEMNSEGI | CLSAR | AVMLF | GPDKLLKSKI | LYPATFGRNF | VEILRMVDGV:165 |
| hu PRDX6 | 118:DPAEKDEKGM | PVTAR | VVFVF | GPDKLLKLSI | LYPATFGRNF | DETLRLVVISL:167 |
| Prx | | | | | | |
| hu PRDX1 | 164:QFTDKH | GEVCP | AGWKPGSD | TIKP | |DVQ:189 |
| hu PRDX2 | 163:QYTDEH | GEVCP | AAWKPGSD | TIKP | |NVD:188 |
| C.e. Prx2 | 161:QFVEKH | GEVCP | AGWTPGSD | TIKP | |GVK:186 |
| C.e. Prx1 | 190:QFSDKH | G.VCP | EADWHEDSPTIKP | | |GLA:215 |
| E.c. AhpC | 156:QVASHPGEVCP | AKWKEG | EATLAP | | |SLD:187 |
| C.e. Prx3 | 166:QLGTKA | PVATP | ANWIAGDNVIAQP | SLSQE | RVIQELCGGD | PDKCKTVPLP:214 |
| hu PRDX6 | 168:QLTAEK | RVATP | VDWKGDSDVMVLE | TIPEE | EAKKLPFKG | ...VFTKELP:212 |
| Üox | | | | | | |
| hu PRDX1 | 190:KSKEY | FSKQK | | | |:199 |
| hu PRDX2 | 189:DSKEY | FSKHN | | | |:198 |
| C.e. Prx2 | 187:ESQEY | FKKH | | | |:195 |
| C.e. Prx1 | 216:TSKEY | FNKVN | K..... | | |:226 |
| E.c. AhpC | 188:LVGKI | | | | |:187 |
| C.e. Prx3 | 215:SGKSYLRVIE | GDAYLQ | N | | |:231 |
| hu PRDX6 | 212:SGKYLRYTP | QP | | | |:224 |

Abb. 3.2 Vergleich der Aminosäuresequenzen von Peroxiredoxinen verschiedener Organismen Für die Darstellung wurden die 2-Cys Prxs von *C. elegans* (C.e. Prx1, 2: NP_497892, NP_872052), *E. coli* (E.c. AhpC: NP_286332) und *H. sapiens* (hu PRDX1,2, NP_002565, NP_005800) sowie die 1-Cys Prxs von *C. elegans* (Prx3: NP_741287) und *H. sapiens* (PRDX6: NP_004896) verwendet. Die in allen Prxs konservierten Aminosäuren sind eingerahmt, konservierte Sequenzen um den aktiven Cysteinrest sind schwarz unterlegt, andere spezifische Konsensussequenzen grau. Die Charakteristik der Konsensussequenzen ist jeweils darüber angegeben: PIA: Phospholipase A₂, Üox: Sensitivität gegenüber Inaktivierung durch Überoxidation, CaP: Phosphorylierungsstelle für cyclinabhängige Kinase, Prx: Peroxidase-Aktivität. Die potenzielle mitochondriale Signalsequenz des CePrx1 ist durch graue Schriftfarbe gekennzeichnet.

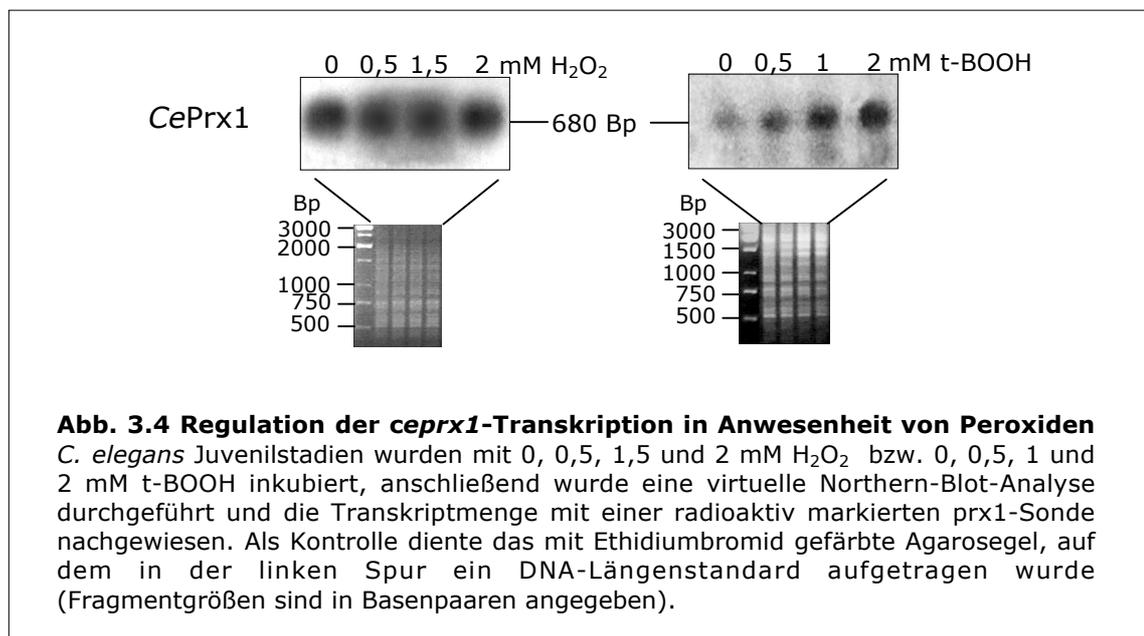


3.2. *Caenorhabditis elegans* Peroxiredoxin 1 (CePrx1)

3.2.1 Regulation der Transkription in Anwesenheit von Peroxiden

Um eine mögliche Regulation der *ceprx1*-Transkription durch oxidativen Stress zu untersuchen, wurden Induktionsstudien in Anwesenheit verschiedener Peroxide durchgeführt. *C. elegans* Juvenilstadien wurden drei Stunden in Gegenwart ansteigender Konzentrationen von H₂O₂ und *tert*-Butylhydroperoxid (*t*-BOOH) inkubiert. Anschließend wurde ihre RNA isoliert und einer virtuellen Northern-Blot-Analyse unterzogen (s. Kapitel 2.11.2). Zur Analyse der Transkriptmenge wurde der Blot mit der α -[³²P]-dATP markierten, kodierenden Region des *ceprx1* hybridisiert. Als Ladekontrolle der aufgetragenen cDNA-Mengen diente das mit Ethidiumbromid gefärbte Agarosegel.

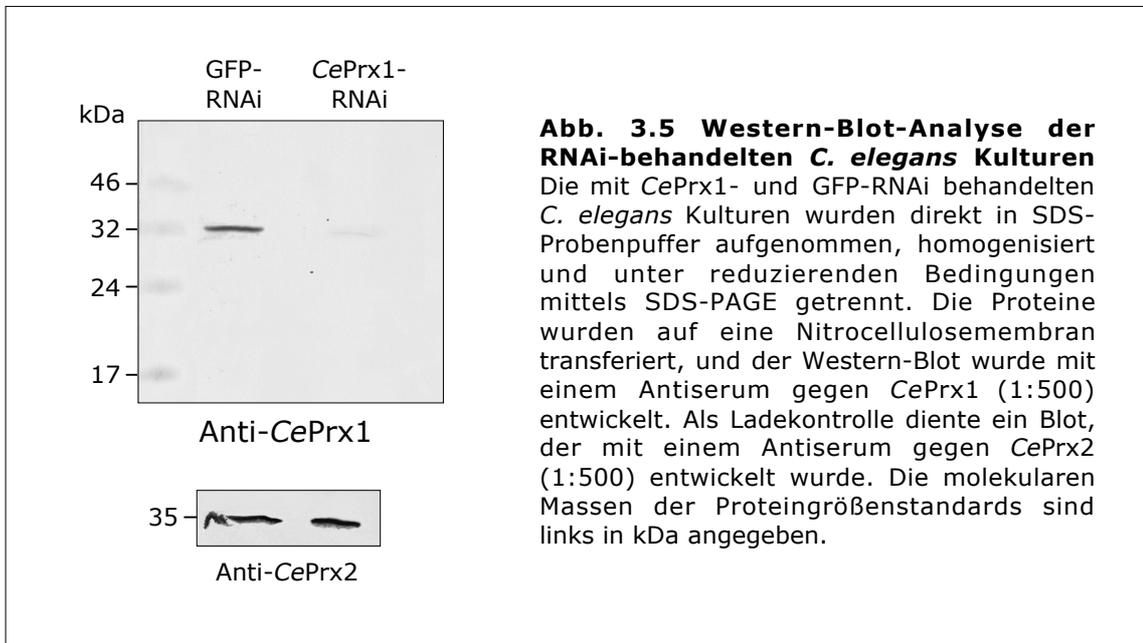
Die Analyse des in Abbildung 3.4 gezeigten, *ceprx1*-markierten virtuellen Northern-Blots zeigt einen deutlichen, konzentrationsabhängigen Anstieg der *ceprx1*-Transkriptmenge in Anwesenheit des organischen Peroxids *t*-BOOH. Dagegen hat die steigende Konzentrationen von H₂O₂ keinen Einfluss auf die *ceprx1*-Transkription. Die Ergebnisse deuten auf eine mögliche Funktion des CePrx1 bei der Reduktion von organischen, nicht aber von anorganischen Peroxiden hin.



3.2.2 CePrx1-Knockdown durch RNA Interferenz (RNAi)

Um die Funktion des *CePrx1* *in vivo* untersuchen zu können, wurde die Expression des *ceprx1* durch RNA Interferenz (RNAi) herunterreguliert. RNAi ermöglicht durch eine post-transkriptionelle Regulation einen sogenannten Knockdown des korrespondierenden Proteins. Auslöser für diesen Mechanismus ist die Anwesenheit kurzer dsRNA im Organismus, welche die Zerstörung der korrespondierenden mRNA bewirkt. Die RNAi wurde durch die Fütterung von *C. elegans* Kulturen mit *ceprx1*-dsRNA-produzierenden *E. coli* HT115 erzeugt (s. Kap. 2.15.1).

Die reduzierte *CePrx1*-Menge des Proteins in den RNAi-behandelten Nematoden wurde im Western-Blot kontrolliert (s. Abb. 3.5). Die RNAi Behandlung hatte fast den kompletten Verlust des *CePrx1* zur Folge. Das Protein konnte im *CePrx1*-RNAi-Extrakt nur noch in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden, während im Kontrollextrakt der GFP-RNAi-behandelten Tiere eine normale *CePrx1*-Menge nachzuweisen war.



3.2.2-1 Phänotypcharakterisierung

Unter normalen Kulturbedingungen konnten keine Unterschiede zwischen den Prx1-RNAi- und den Kontrolltieren (GFP-RNAi) beobachtet werden. Die Prx1-RNAi-Kulturen waren morphologisch unverändert, zeigten keine Entwicklungsdefizite, und auch die Anzahl der Nachkommen veränderte sich nicht. Die Lebensdauer betrug im Schnitt 11 Tage und unterschied sich damit nicht von der der Kontrollen (Daten nicht gezeigt).

3.2.2-2 Empfindlichkeit gegenüber Stress

Zur Untersuchung der CePrx1-Funktion *in vivo* wurde der Einfluss verschiedener oxidativer und nitrogener Stressoren sowie die Wirkung von Hitze auf die RNAi-behandelten *C. elegans* Kulturen untersucht. Eingesetzt wurden neben den Peroxiden H₂O₂ und t-BOOH der Redoxzykler Paraquat, welcher die Entstehung von intrazellulären Superoxidradikalen hervorruft, sowie Pyrogallol, eine Substanz, durch die extrazelluläre Superoxidradikale entstehen. Als nitrogener Stressor wurde das stickstoffmonoxidbildende GSNO eingesetzt. Für den Hitzestress wurde eine Temperatur von 37°C gewählt.

Die Überlebensrate der Tiere wurde während einer 90 minütigen Inkubation mit den Stressoren bestimmt. In der ersten Stunde wurde die Anzahl der noch lebenden Tiere alle 15 min kontrolliert, und nach 90 min erfolgte eine abschließende Zählung. Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abbildung 3.6 dargestellt.

Ein Unterschied in der Empfindlichkeit der beiden Versuchsgruppen konnte gegenüber H₂O₂ beobachtet werden. In den ersten 15 min starben bereits 52% der Prx1-RNAi- und nur 28% der GFP-RNAi- behandelten Tiere. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen bleibt in den ersten 60 min erhalten, ist nach 90 min jedoch fast aufgehoben.

In Anwesenheit von 10 mM t-BOOH lebten in beiden Versuchsgruppen nach 90 min noch über 70% der Tiere, die Sterberate verläuft über die gesamte Zeit fast identisch. Das gleiche gilt für die Inkubation in 40 mM Pyrogallol, auch hier konnte kein Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen beobachtet werden. In Anwesenheit von 5 mM GSNO überlebten in beiden Versuchsgruppen weniger als 30% der Tiere, es waren keine starken Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu beobachten. Die Toleranz

gegenüber Hitzestress war bei den RNAi-behandelten Tieren ebenfalls unverändert. Die Überlebensraten beider Versuchsgruppen bei 37°C zeigten in einen fast identischen Zeitverlauf.

In Anwesenheit von Paraquat konnte nach 15 min eine leicht erhöhte Empfindlichkeit der CePrx1-RNAi-behandelten Tiere beobachtet werden, es lebten noch 93% der GFP-RNAi und nur 80% Prx1-RNAi Tiere. Dieser geringe Unterschied ist jedoch bereits nach weiteren 15 min aufgehoben. Im weiteren Verlauf des Versuches waren keine Unterschiede mehr festzustellen.

Es konnte eine erhöhte Empfindlichkeit der CePrx1-RNAi-behandelten Tiere gegenüber H₂O₂ festgestellt werden. In Anwesenheit der übrigen getesteten Stressoren oder bei Hitzestress unterschied sich die Überlebensfähigkeit der RNAi-behandelten Nematoden nicht zu jener der Kontrolltiere.

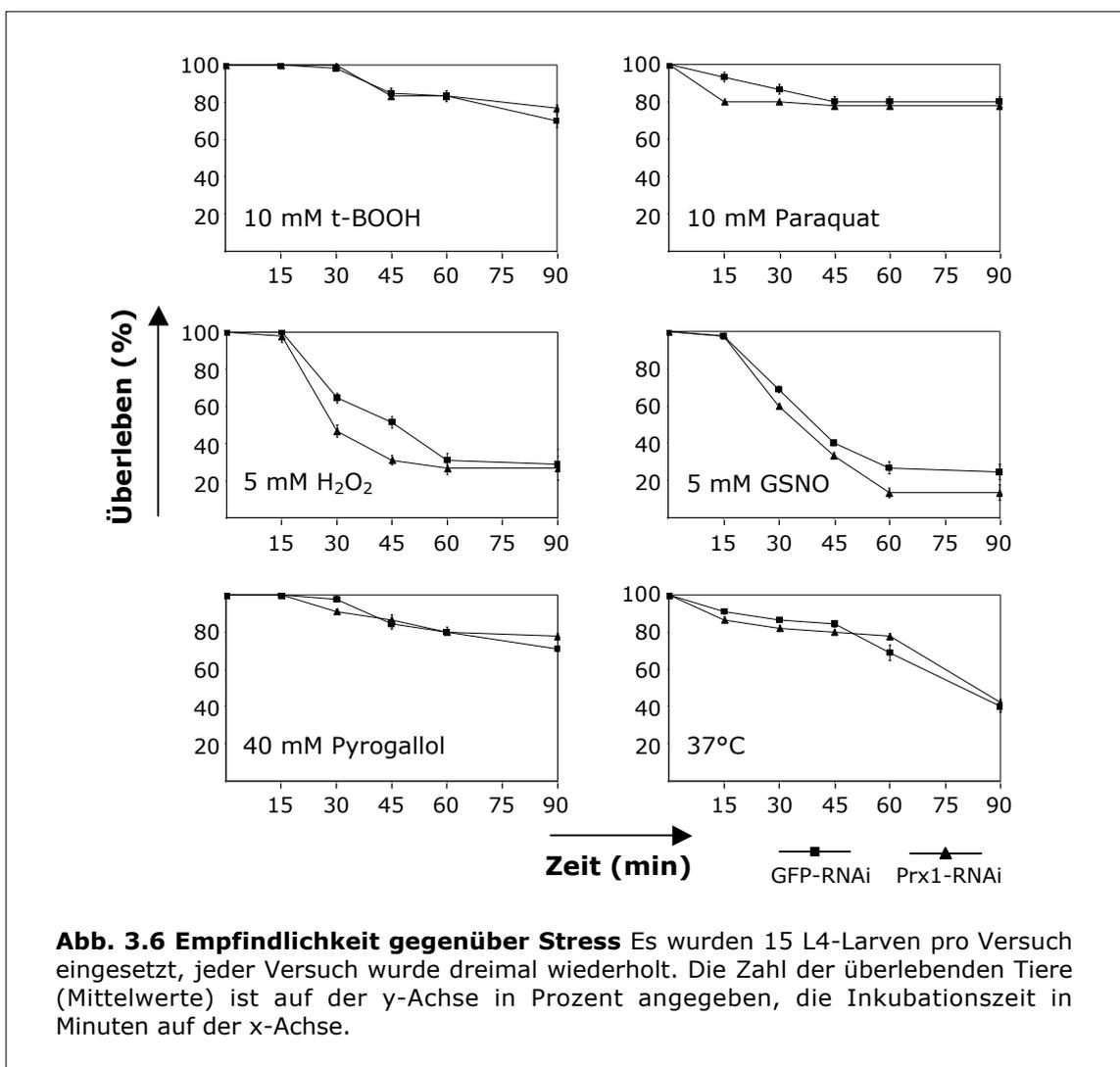
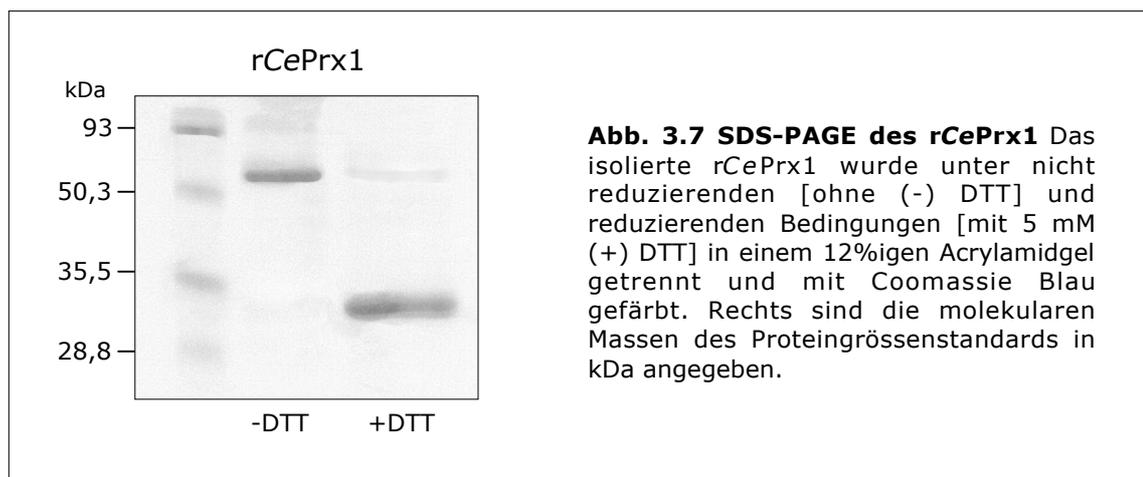


Abb. 3.6 Empfindlichkeit gegenüber Stress Es wurden 15 L4-Larven pro Versuch eingesetzt, jeder Versuch wurde dreimal wiederholt. Die Zahl der überlebenden Tiere (Mittelwerte) ist auf der y-Achse in Prozent angegeben, die Inkubationszeit in Minuten auf der x-Achse.

3.2.3 Rekombinante Expression des *ceprx1* in *E. coli*

Um das CePrx1 näher zu charakterisieren und seine enzymatischen Fähigkeiten untersuchen zu können, wurde es mit einem N-terminalen *His-tag* rekombinant in *E. coli* pAPlacI^Q Zellen exprimiert. Das rekombinante Protein wurde anschließend über eine Nickelsäule aus der löslichen Fraktion des Bakterienhomogenats isoliert.

Das rekombinante *C. elegans* Peroxiredoxin 1 (rCePrx1) hatte in der SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von ca. 30 kDa. Ein Antikörper gegen das rekombinante Protein erkannte im Western-Blot von *C. elegans*-Extrakten ein Protein der gleichen molekularen Masse (s. Abb. 3.5) In der SDS-PAGE verschob sich das Molekulargewicht des rekombinanten Proteines unter nicht reduzierenden auf ca. 60 kDa. Dieses Verhalten lässt auf eine Dimerisierung schliessen (s. Abb. 3.7).



3.2.4 Enzymatische Fähigkeiten des rekombinanten CePrx1 (rCePrx1)

3.2.4-1 Schutz vor organischen Peroxiden

Ein möglicher CePrx1-vermittelter Schutz gegen organische Peroxide wurde anhand *ceprx1*-exprimierender *E. coli* pAPlacI^Q Zellen in einem Filter-Disc-Assay untersucht (s. Kap. 2.14.1). Als Kontrolle dienten Bakterien, die nur mit dem pJC45-Vektor transformiert wurden. Die Transformanten wuchsen in Top-Agar auf dem mit Cumenehydroperoxid (Cumene) oder t-BOOH getränkte Filter lagen. Am nächsten Tag wurde der

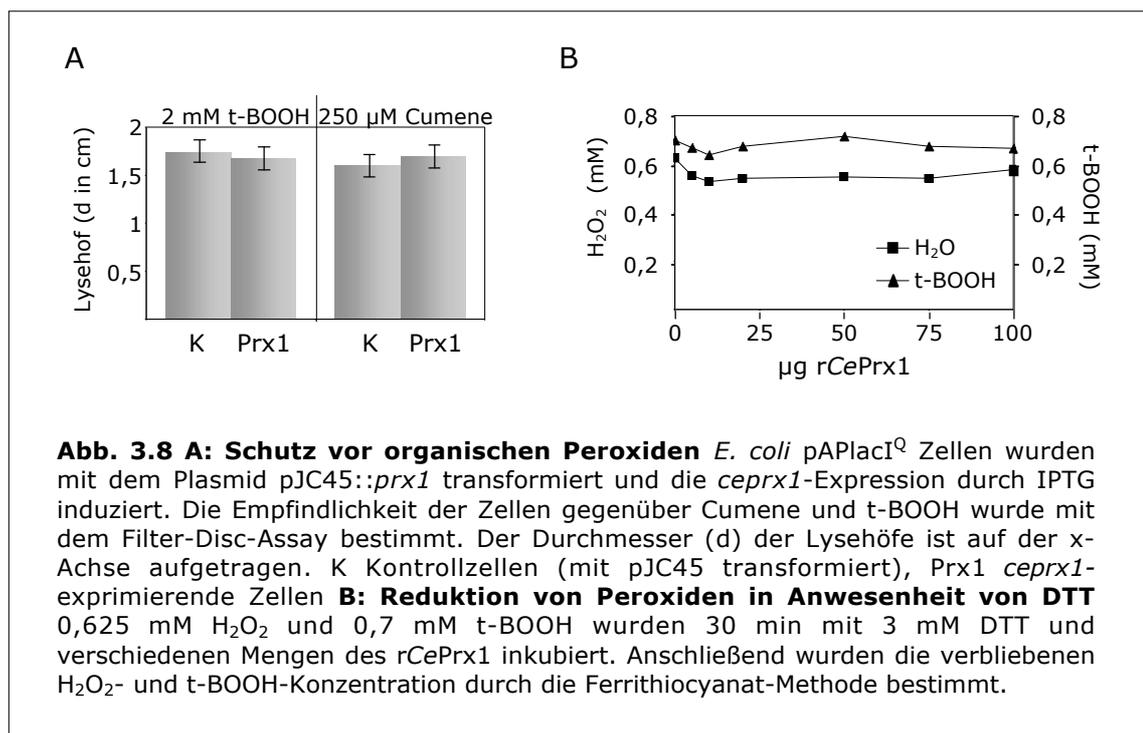
Durchmesser der Zone um die Filter ausgemessen, auf der keine Bakterien wachsen konnten.

Die Auswertung des Tests zeigte, dass die *ceprx1*-Expression die Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber den beiden getesteten Peroxiden nicht herabsetzt (s. Abb. 3.8A). Die Durchmesser der Lysehöfe von Kontroll- und *ceprx1*-exprimierenden Bakterien um die Cumene- ($1,6 \pm 0,14$ cm und $1,7 \pm 0,08$ cm) bzw. t-BOOH- ($1,75 \pm 0,19$ cm und $1,67 \pm 0,2$ cm) getränkten Filter unterschieden sich nicht.

3.2.4-2 Thiol-Peroxidase-Aktivität

Um einen möglichen Abbau von Peroxiden durch das rekombinante CePrx1 nachzuweisen, wurde die Ferrithiocyanat-Methode angewandt (s. Kap. 2.14.2). Verschiedene Mengen des rCePrx1 wurden in Anwesenheit von DTT mit H_2O_2 oder t-BOOH inkubiert. Nach 30 min wurde die verbliebene Menge des jeweiligen Peroxids durch Zugabe von KSCN und $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ photometrisch bestimmt.

Das rekombinante CePrx1 war nicht in der Lage, H_2O_2 oder t-BOOH zu reduzieren. In Anwesenheit von 3 mM DTT konnte weder bei einer Reaktionstemperatur von $37^\circ C$ (s. Abb. 3.8B) noch bei $25^\circ C$ (Daten nicht gezeigt) eine Thiol-Peroxidase-Aktivität nachgewiesen werden.



3.2.4-3 Thioredoxin-Peroxidase-Aktivität

In einem Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase-Assay (siehe Kap. 2.14.3) wurde das rCePrx1 auf eine mögliche Thioredoxin-Peroxidase-Aktivität hin untersucht. Diese konnte in Anwesenheit des *E. coli* Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase- (Trx/Trx-R-) Systems nachgewiesen werden (s. Abb. 3.9). Nach Zugabe von H₂O₂ war in dem Versuchsansatz ein starker Abfall der Absorption bei 340 nm zu beobachten. Diese Absorptionsabnahme ist auf die Oxidation des NADPH zurückzuführen und wird in Anwesenheit von H₂O₂ vom rekombinanten CePrx1 im Trx/Trx-R-System katalysiert.

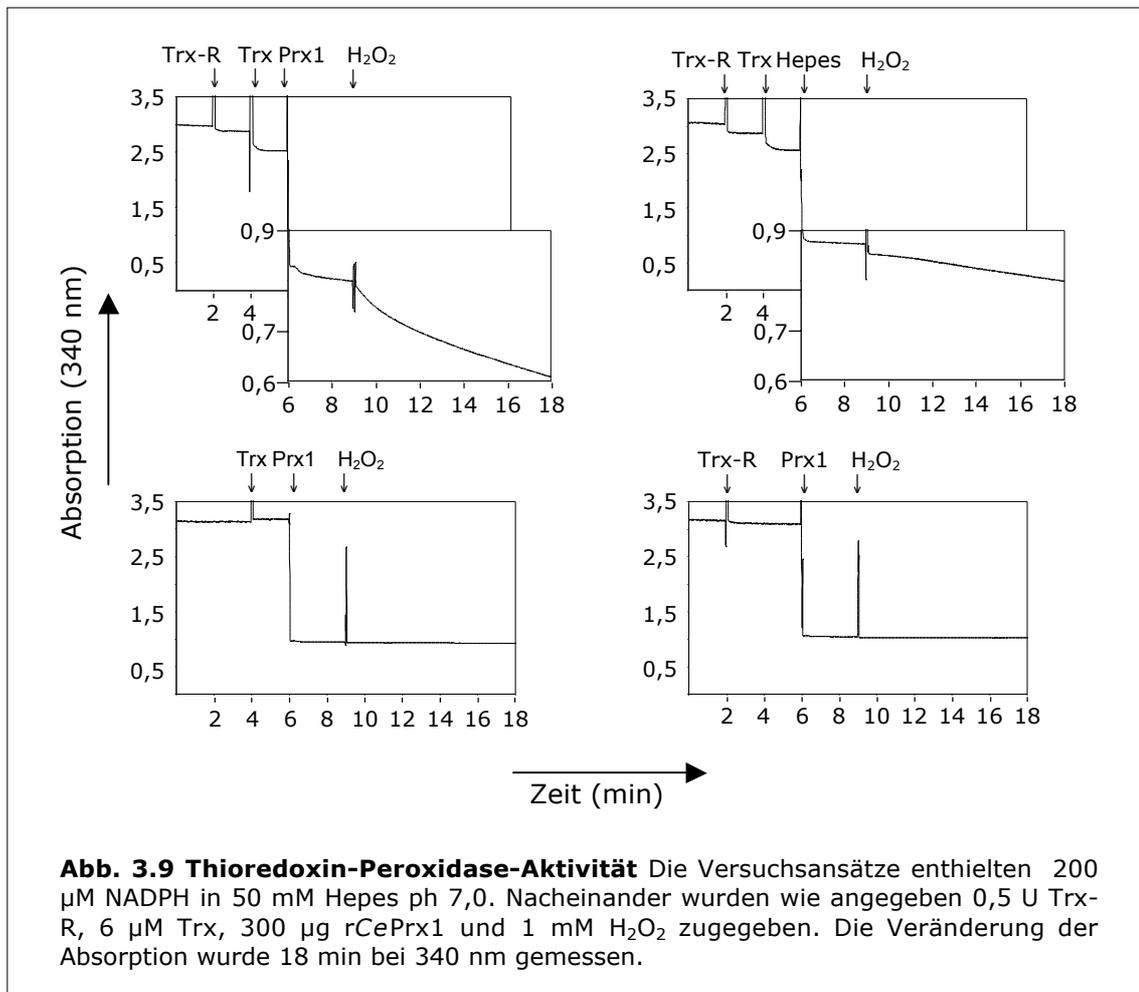
Die Oxidation des NADPH ist abhängig von der Anwesenheit beider Komponenten des Trx/Trx-R-Systems. Im Gegensatz dazu konnte auch in Abwesenheit des rCePrx1 eine Oxidation von NADPH nachgewiesen werden, die Absorptionsabnahme war in diesem Fall jedoch langsamer und nicht so stark wie in Anwesenheit des rCePrx1.

Das Ergebnis spricht für eine Thioredoxin-Peroxidase-Aktivität des rCePrx1. Die Oxidation des NADPH in Abwesenheit des rCePrx1 zeigt, dass auch das Trx/Trx-R-System die Fähigkeit hat H₂O₂ in geringen Maßen zu reduzieren (s. Abb. 3.9).

3.2.4-4 Entgiftung von reaktiven Stickstoffverbindungen

Um eine mögliche Reduktion von reaktiven Stickstoffverbindungen durch das rCePrx1 zu untersuchen, wurde ein NO-Detoxification-Assay durchgeführt (s. Kap. 2.14.4). Hierbei wurde der durch das CePrx1 vermittelte enzymatische Schutz von ABTS vor einer Oxidation zu ABTS⁺ durch GSNO ermittelt.

Das rCePrx1 ist nicht in der Lage, ABTS vor Oxidation durch GSNO zu schützen. Auch die Anwesenheit zunehmender Mengen des rekombinanten Enzyms konnte die Oxidation zu ABTS⁺ im Vergleich zur Kontrolle nicht mindern. Ein rCePrx1-vermittelter Schutz war nicht nachzuweisen (0%) (Daten nicht gezeigt). Dieses Versuchsergebnis lässt darauf schließen, dass das rekombinante CePrx1 nicht in der Lage ist, Stickstoffverbindungen zu reduzieren.



3.2.5 Expressionsmuster und Lokalisierung des CePrx1 in *C. elegans*

Der zeitliche Verlauf der Expression und die Lokalisierung des CePrx1 in *C. elegans* wurden anhand einer *gfp*-Reportergenexpression analysiert (s. Kap. 2.15.6). Unter dem *prx1*-spezifischen Promotor wurde in den Nematoden ein GFP-CePrx1-Fusionsprotein exprimiert. Das Konstrukt zur Erzeugung der transgenen Tiere, welches in die Gonaden von *C. elegans pha-1* Mutanten injiziert wurde, enthielt das *prx1*-Gen inklusive 3000 Bp der flankierenden Sequenz oberhalb des Transkriptionsstartes in Fusion mit dem *gfp*-Gen.

Eine *gfp*-Expression konnte in allen Entwicklungsstadien vom Ei bis zum adulten Tier beobachtet werden. Die *gfp*-Expression war in den frühen Larvalstadien der Transfektanten schwach und wurde im Laufe der Entwicklung stärker. Im Gegensatz zur schwachen GFP-Expression in den

Larvalstadien war in den sich noch in den Eiern der adulten Hermaphroditen befindlichen Embryonen eine starke *gfp*-Expression zu beobachten (s. Abb. 3.10). Die L4-Larven und adulten Tiere zeigten eine *gfp*-Expression im gesamten Intestinaltrakt (s. Abb. 3.10), wozu Pharynx und Darm zählen. In der Hypodermis konnte ebenfalls eine, wenn auch schwächere, *gfp*-Expression detektiert werden (s. Abb. 3.10). Auffällig ist die "gepunktete" Struktur der *gfp*-Expression. Dies könnte auf eine mitochondriale Lokalisierung des Prx1 hinweisen und entspräche damit den Ergebnissen der Proteinsequenzanalyse, bei der am CePrx1 eine putative mitochondriale Signalsequenz erkannt wurde.

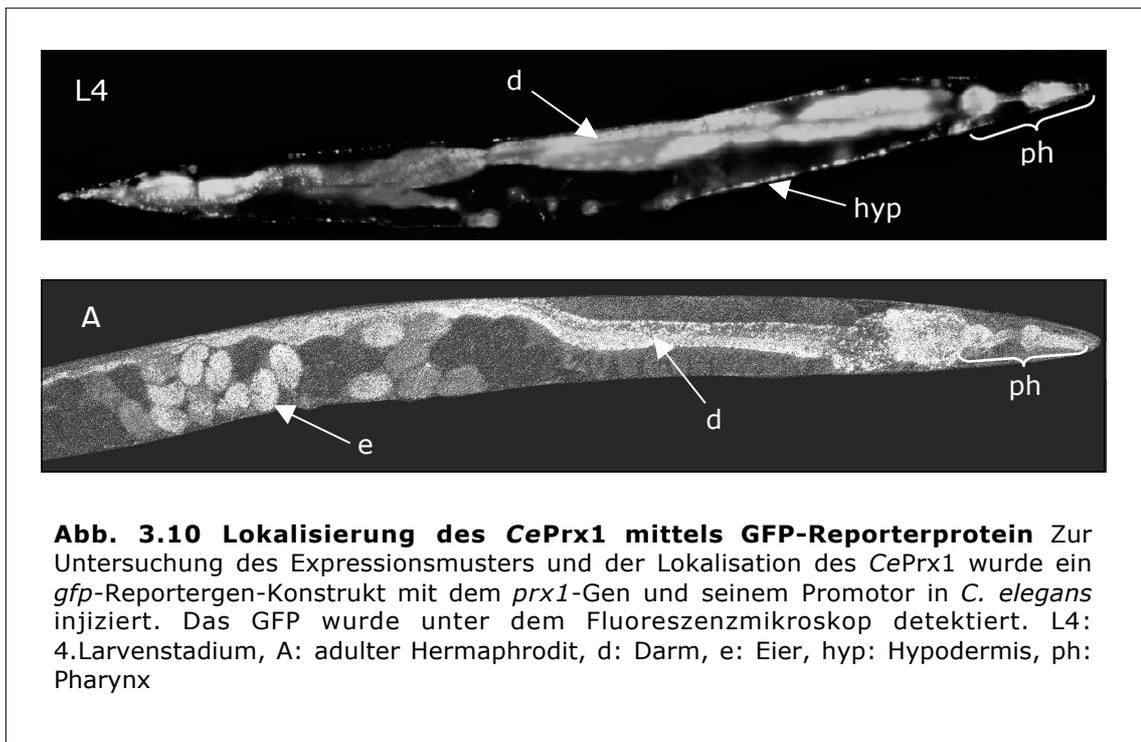


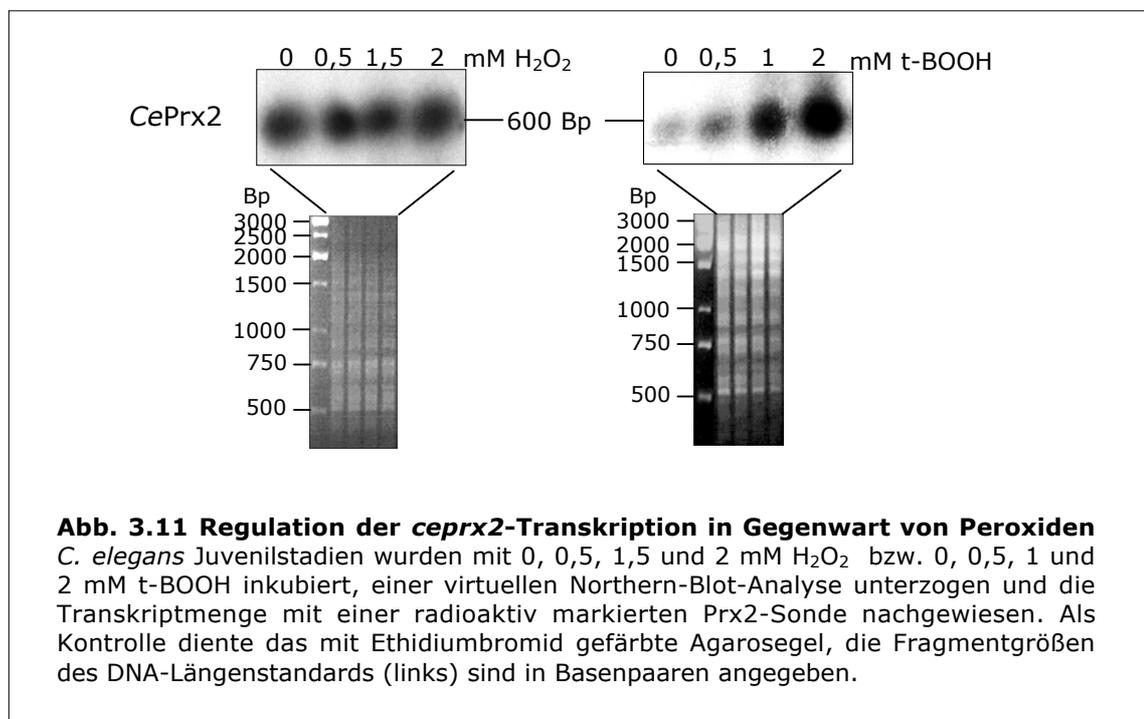
Abb. 3.10 Lokalisierung des CePrx1 mittels GFP-Reporterprotein Zur Untersuchung des Expressionsmusters und der Lokalisation des CePrx1 wurde ein *gfp*-Reportergen-Konstrukt mit dem *prx1*-Gen und seinem Promotor in *C. elegans* injiziert. Das GFP wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert. L4: 4.Larvenstadium, A: adulter Hermaphrodit, d: Darm, e: Eier, hyp: Hypodermis, ph: Pharynx

3.3. *Caenorhabditis elegans* Peroxiredoxin 2 (CePrx2)

3.3.1 Regulation der Transkription in Anwesenheit von Peroxiden

Um Hinweise auf eine mögliche Regulation der *ceprx2*-Transkription zu erhalten, wurde diese, wie bereits für das CePrx1 beschrieben, in Gegenwart verschiedener Peroxide mit Hilfe einer virtuellen Northern-Blot-Analyse überprüft. Die Blots wurden mit der α -[32 P]-dATP markierten, kodierenden Region des *ceprx2*-Gens hybridisiert.

Die Analyse der Blots zeigt einen deutlichen Einfluss des organischen Peroxids t-BOOH auf die Transkription des *ceprx2*. Die Transkriptmenge nimmt mit steigenden Konzentrationen des t-BOOH zu. Im Gegensatz dazu zeigt die Anwesenheit von H_2O_2 keinen Einfluss auf die *ceprx2*-Transkription (s. Abb. 3.11). Dieses Ergebnis deutet auf eine Funktion des CePrx2 bei der Reduktion von organischen Peroxiden hin.



3.3.2 CePrx2-Knockdown durch RNAi

Zur Aufklärung der möglichen Funktion des *CePrx2 in vivo* wurden mit Hilfe der RNAi *C. elegans* Kulturen mit einem *CePrx2*-Knockdown erzeugt. Der Knockdown des *CePrx2* wurde im Western-Blot bestätigt (s. Abb. 3.12A). Die Menge *CePrx2* in den *CePrx2*-RNAi-behandelten Tieren ist deutlich geringer als im Kontrolleextrakt, konnte jedoch noch nachgewiesen werden.

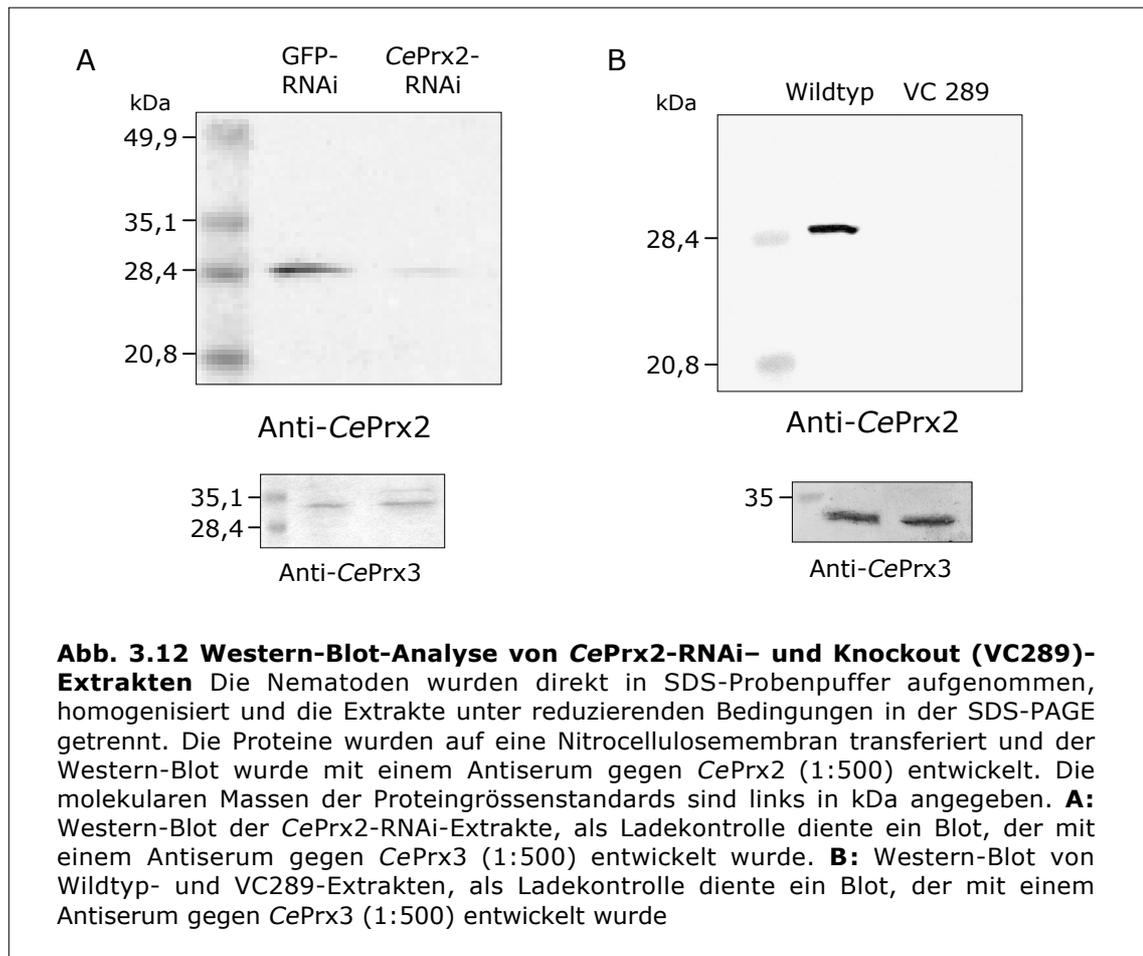
3.3.2-1 Phänotypcharakterisierung

Die *CePrx2*-RNAi-behandelten *C. elegans* Kulturen zeigten im Vergleich zur Kontrolle einen stark veränderten Phänotyp. Die Hermaphroditen waren deutlich kleiner als die GFP-RNAi-Kontrolltiere (s. Abb. 3.13), produzierten weniger Eier und hatten eine stark reduzierte Nachkommenschaft (s. Abb. 3.14A).

Für weitere Untersuchungen wurde der *C. elegans* Stamm VC289 mit einem genomischen Knockout des *CePrx2* verwendet. Dieser wurde von der "*C. elegans* Reverse Genetics Core Facility" an der Universität von British Columbia zur Verfügung gestellt.

3.3.3 CePrx2-Knockout-Mutanten (VC289)

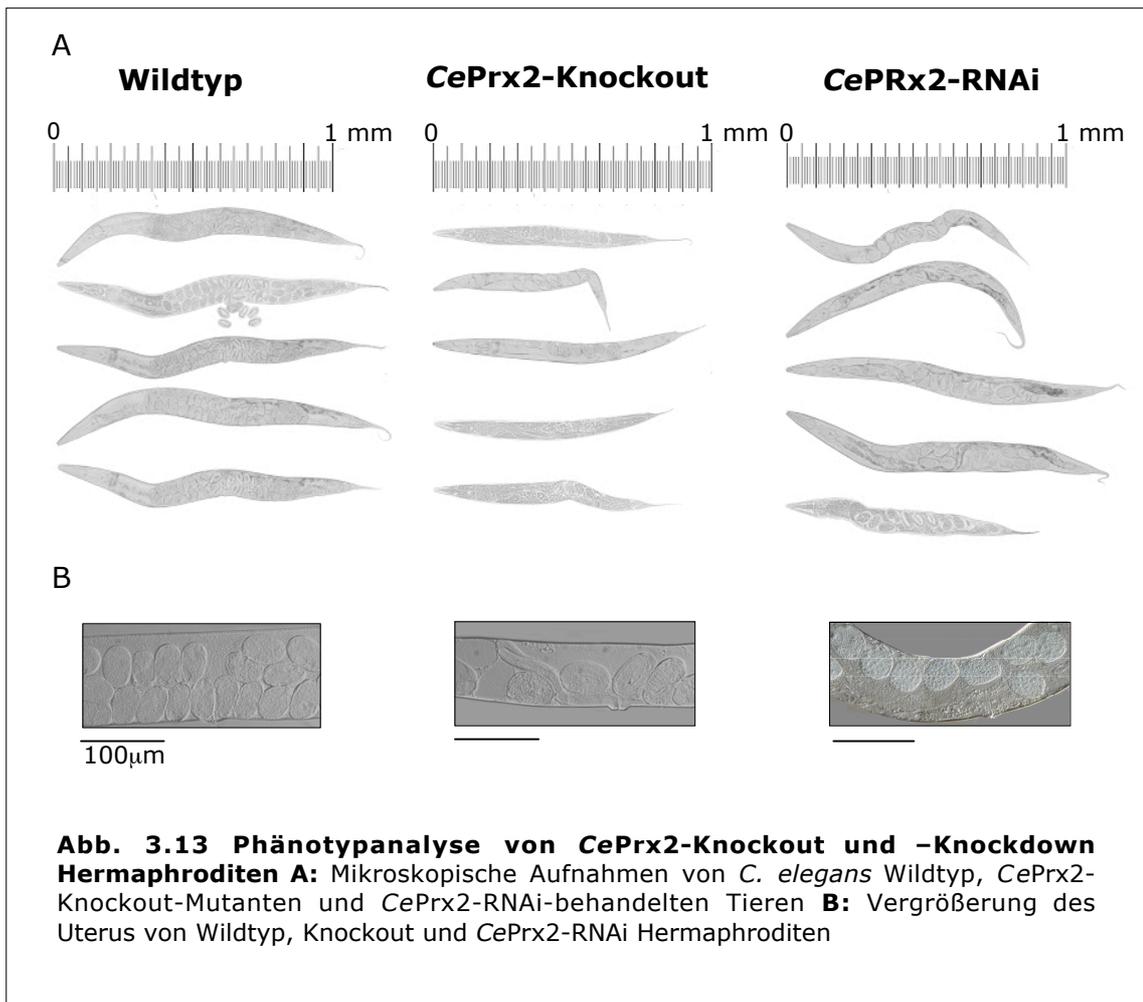
Der *C. elegans* VC289 Stamm ist Träger einer 405 Bp umfassenden genomischen Deletion, die 200 Bp oberhalb des *ceprx2*-Transkriptionsstarts beginnt und den grössten Teil des 1. Exons des Gens umfasst. Wie in Western-Blot-Analysen nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 3.12B), geht mit der Zerstörung des korrespondierenden Gens der komplette Verlust des *CePrx2* einher.



3.3.3-1 Vergleich der Phänotypen von CePrx2-Knockdown, CePrx2-Knockout und *C. elegans* Wildtyp

Die Hermaphroditen der CePrx2-Knockout-Mutanten zeigten im Vergleich zum Wildtyp einen ähnlich veränderten Phänotyp wie bereits die CePrx2-RNAi-behandelten *C. elegans* Kulturen (s. Abb. 3.13). Beide wiesen gegenüber dem Wildtyp eine Reduktion von Länge und Durchmesser um ca. 25% auf. Dieser Phänotyp war bei allen VC289 Mutanten und bei 2/3 der CePrx2-RNAi-behandelten Tiere zu beobachten (s. Abb. 3.13A). Die Wildtyp Hermaphroditen waren im Schnitt $1,09 \pm 0,02$ mm lang und hatten einen Durchmesser von $0,093 \pm 0,005$ mm. Die Länge der CePrx2-Knockout-Mutanten war signifikant auf $0,82 \pm 0,04$ mm reduziert, der Durchmesser sank auf $0,061 \pm 0,004$ mm ($P < 0,0001$).

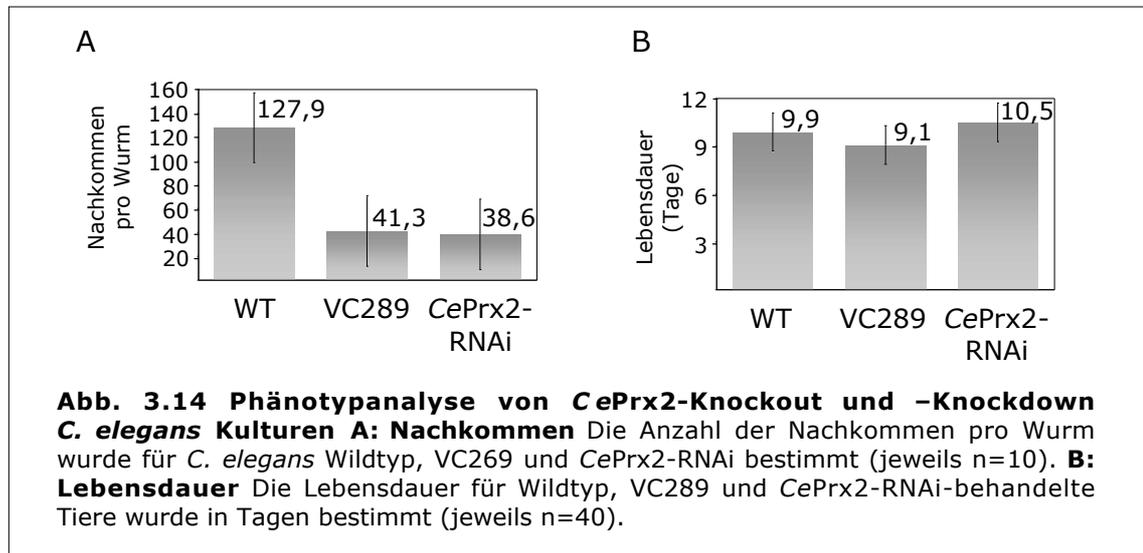
Zusätzlich zu ihrer geringen Grösse war in beiden Gruppen auch die Anzahl der Eier im Uterus reduziert (s. Abb. 3.13B).



Als Folge der geringen Eiproduktion sank die Zahl der Nachkommen der RNAi- und Knockout-Mutanten gegenüber der der Wildtypen um fast 70% (in beiden Fällen $P < 0,0001$) (s. Abb. 3.14A). Unter den gegebenen Kulturbedingungen produzierten die Wildtyp-Tiere im Schnitt $127,9 \pm 20$ Nachkommen pro Wurm, die CePrx2-Knockout-Mutanten $41,3 \pm 25$ und die RNAi-behandelten $38,6 \pm 23$. Der Unterschied in der Nachkommenzahl zwischen RNAi- und Knockout-Mutanten ist nicht signifikant ($P > 0,5$).

Um festzustellen, ob die geringe Grösse der RNAi- und Knockout-Mutanten an einer verminderten Nahrungsaufnahme oder -verwertung liegt, wurden sie hinsichtlich ihres Pharynxpumpens und ihrer Defäkationsrate untersucht. Hier konnten jedoch keine Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis deutet auf eine normale Nahrungsaufnahme und Verwertung hin.

Eine mögliche Rolle des CePrx2 im Alterungsprozess von *C. elegans* wurde untersucht, indem die Lebensdauer der CePrx2-Knockout und -RNAi-behandelten Tiere bestimmt wurde. Es konnte keine signifikante Veränderung im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (s. Abb.3.14B).

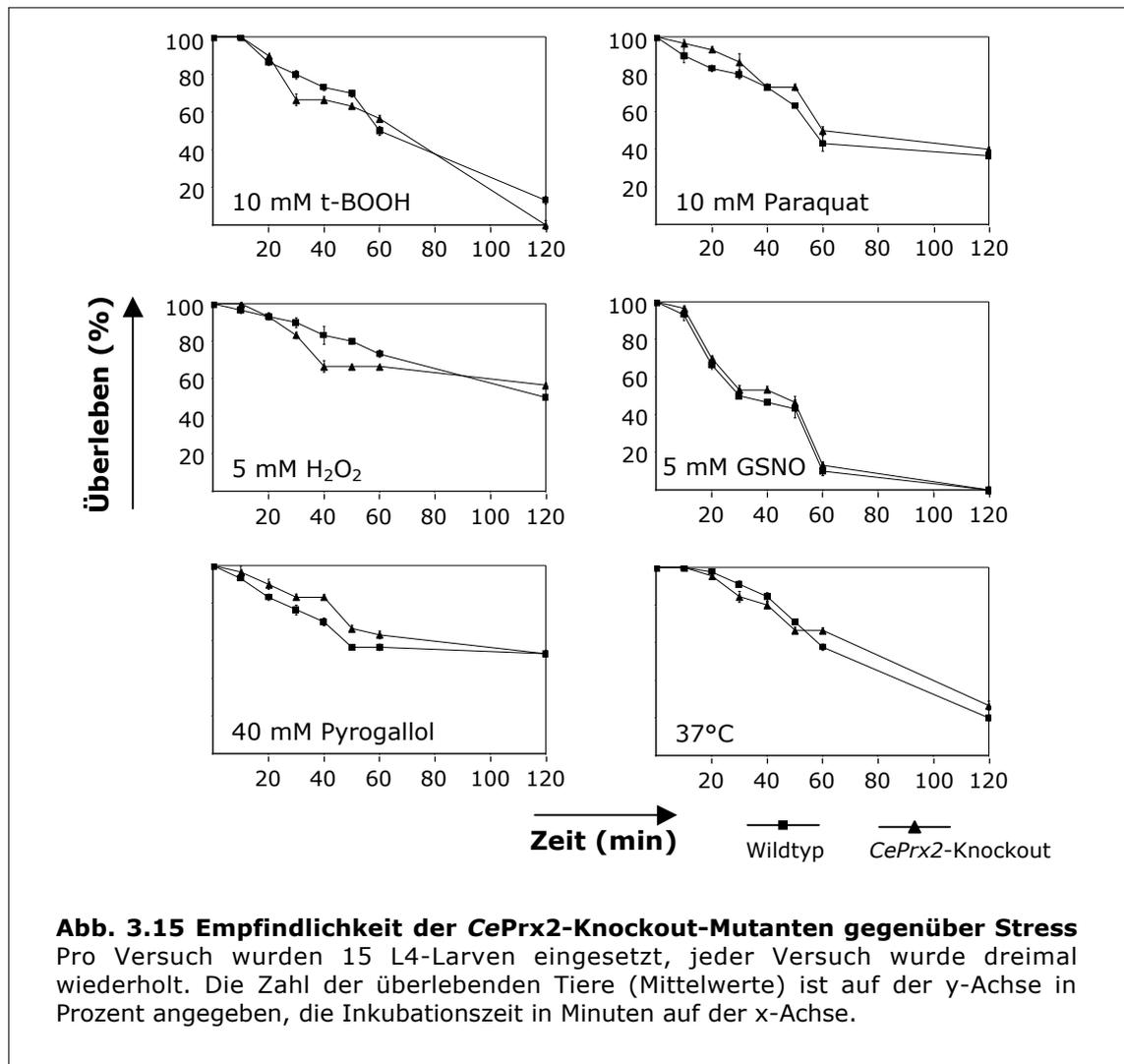


3.3.3-2 Empfindlichkeit gegenüber Stress

Um weitere Hinweise auf die Funktion des CePrx2 *in vivo* zu erhalten, wurde, wie für die CePrx1-Knockdown Tiere, der Einfluss verschiedener oxidativer und nitrogener Stressoren auf die Knockout-Mutanten untersucht. Wie die CePrx1-RNAi-behandelten *C. elegans* Kulturen wurden die Knockout-Mutanten außerdem auf ihre Toleranz gegenüber Hitze getestet. Die Zählungen erfolgten in den ersten 60 min alle 10 min und abschließend nach 120 min.

Die Ergebnisse der Versuche sind in Abb. 3.15 dargestellt. Die einzige Abweichung zwischen Wildtyp und VC289 ist in Anwesenheit von H₂O₂ beobachtet worden. Nach 40 min lebten nur noch 66% der Knockout Mutanten aber noch 83% der Wildtypen. Der Unterschied ist nach 60 min jedoch wieder ausgeglichen. Die Knockout-Mutanten zeigten im Vergleich zum Wildtyp also nur im Zeitraum um 40 min eine gering erhöhte Empfindlichkeit gegenüber H₂O₂. Die Überlebensfähigkeit der CePrx2-Knockout-Mutanten unterschied sich in Anwesenheit der anderen getesteten oxidativen oder nitrogenen Stressoren nicht zu jener der Kontrolltiere. Auch die Empfindlichkeit gegenüber Hitzestress ist durch den CePrx2-Knockout nicht erhöht. In Anwesenheit von 10 mM t-BOOH lebten in beiden

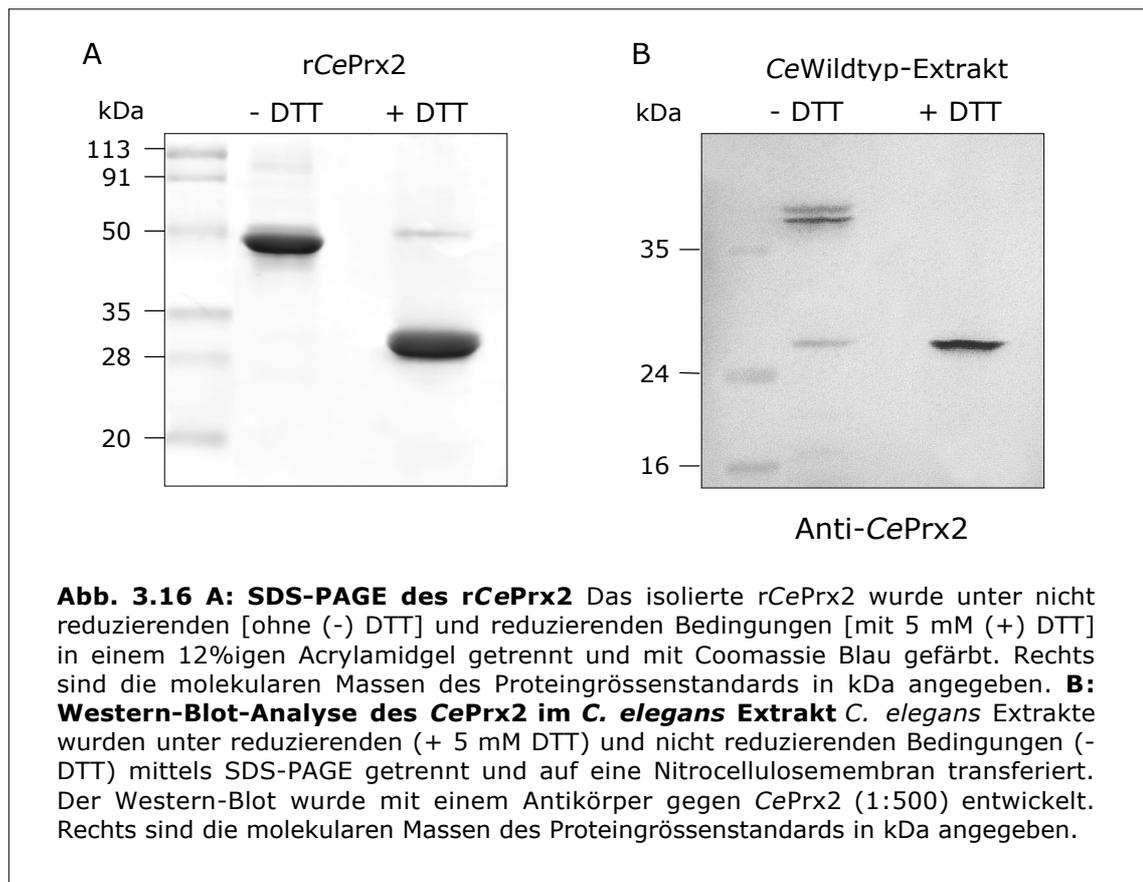
Versuchsgruppen nach 60 min nur noch ca. die Hälfte der Tiere. Nach 2h waren alle Knockout-Mutanten tot, bei den Wildtypen überlebten 13% diesen Zeitraum. Die Sterberate verläuft über die gesamte Zeit fast identisch. Das gleiche gilt für die Inkubationen in 40 mM Pyrogallol, 10 mM Paraquat, 5 mM GSNO und bei 37°C. Es konnte bei keinem dieser Stressoren ein Unterschied in der Überlebensrate festgestellt werden.



3.3.4 Rekombinante Expression des *ceprx2* in *E. coli*

Zur Analyse seiner enzymatischen Fähigkeiten wurde das CePrx2 zunächst rekombinant mit einem N-terminalen *His-tag* in *E. coli* pAPlacI^Q Zellen exprimiert und anschließend über eine Nickelsäule aus der löslichen Fraktion des Bakterienhomogenats isoliert.

Das rekombinante CePrx2 hatte in der SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von ca. 28 kDa. Ein Antikörper gegen das rekombinante Protein erkannte im *C. elegans* Extrakt ein Protein mit der gleichen molekularen Masse. Unter nicht reduzierenden Bedingungen verschob sich das molekulare Gewicht des rekombinanten und des nativen Proteins auf ca. 50 kDa, was eine Dimerisierung des CePrx2 vermuten lässt (s. Abb. 3.16A und B). Im Western-Blot der Extrakte war im Gegensatz zum SDS-Gel mit dem rekombinanten Protein eine Doppelbande zu sehen.



3.3.5 Enzymatische Fähigkeiten des rekombinanten CePrx2 (rCePrx2)

3.3.5-1 Schutz vor organischen Peroxiden

Anhand eines Filter-Disc-Assays wurde, wie bereits für das CePrx1 beschrieben, die Fähigkeit des CePrx2 untersucht, Bakterien vor organischen Peroxiden zu schützen.

Das Ergebnis des Tests zeigte, dass eine Expression des *ceprx2* die Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber Cumene und t-BOOH erheblich

herabsetzte (s. Abb. 3.17A). Die Lysehöfe der Kontrollzellen um den mit Cumene getränkten Filter hatten einen Durchmesser von $1,6 \pm 0,14$ cm, eine *ceprx2*-Expression der Zellen verringerte den Durchmesser signifikant auf $1,1 \pm 0,09$ cm ($P < 0,001$). Das gleiche Bild ergab sich in Anwesenheit von t-BOOH. Der Durchmesser der Lysehöfe betrug bei den Kontrollzellen $1,7 \pm 0,19$ cm, während die Expression des CePrx2 den Durchmesser auch hier signifikant auf $1,1 \pm 0,08$ cm verkleinerte ($P < 0,001$). Die erhöhte Resistenz der Bakterien gegenüber Cumene und t-BOOH spricht für die Fähigkeit des CePrx2, organische Peroxide entgiften zu können.

3.3.5-2 Antioxidantische Aktivität

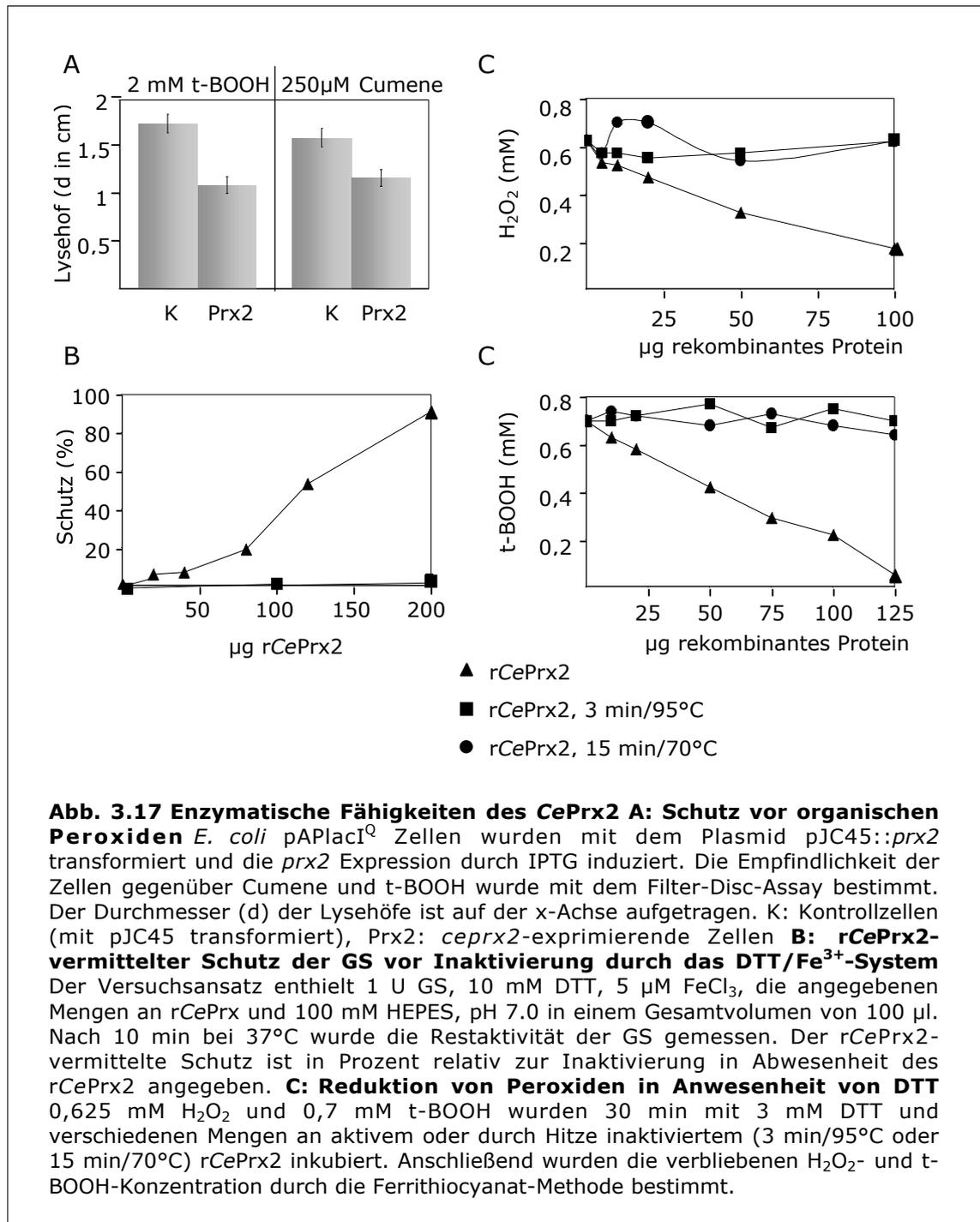
Eine antioxidantische Aktivität des rCePrx2 wurde anhand des L-Glutamin-Synthetase- (GS)-Protection-Assays untersucht, bei dem der rCePrx2-vermittelte, enzymatische Schutz der GS vor oxidativer Inaktivierung bestimmt wurde (s. Kap. 2.14.5).

Wie in Abb. 3.17B gezeigt wird, kann das rCePrx2 in Anwesenheit von DTT die GS in einem metallkatalysierten Oxidationssystem ($\text{Fe}^{3+}/\text{O}_2$) vor Inaktivierung durch Thiylradikale und/oder H_2O_2 schützen. Der rCePrx2-vermittelte Schutz ist abhängig von der Konzentration des rekombinanten Enzyms, wobei eine Inaktivierung der GS in Anwesenheit von $200 \mu\text{g}$ rCePrx2 fast komplett verhindert wurde (91% Schutz). Dieser Schutz liegt nach einer Inaktivierung des rCePrx2 durch Hitzedenaturierung bei 95°C für 3 min nicht mehr vor (3% Schutz).

3.3.5-3 Thiol-Peroxidase-Aktivität

Der mögliche Abbau von Peroxiden durch das rekombinante CePrx2 wurde anhand der Ferrithiocyanat-Methode in Anwesenheit von DTT untersucht.

Wie in Abbildung 3.17C gezeigt wird, war das rekombinante CePrx2 in der Lage, H_2O_2 und t-BOOH in Anwesenheit von 3 mM DTT zu reduzieren. Die Konzentrationsabnahme der Peroxide ist abhängig von der rCePrx2-Menge. Diese Thiol-Peroxidase-Aktivität wurde durch Erhitzen des rekombinanten Proteins für 3 min bei 95°C oder für 15 min bei 70°C völlig unterbunden. Die Peroxidkonzentrationen blieben in diesem Fall auch mit zunehmenden Mengen des rCePrx2 konstant.

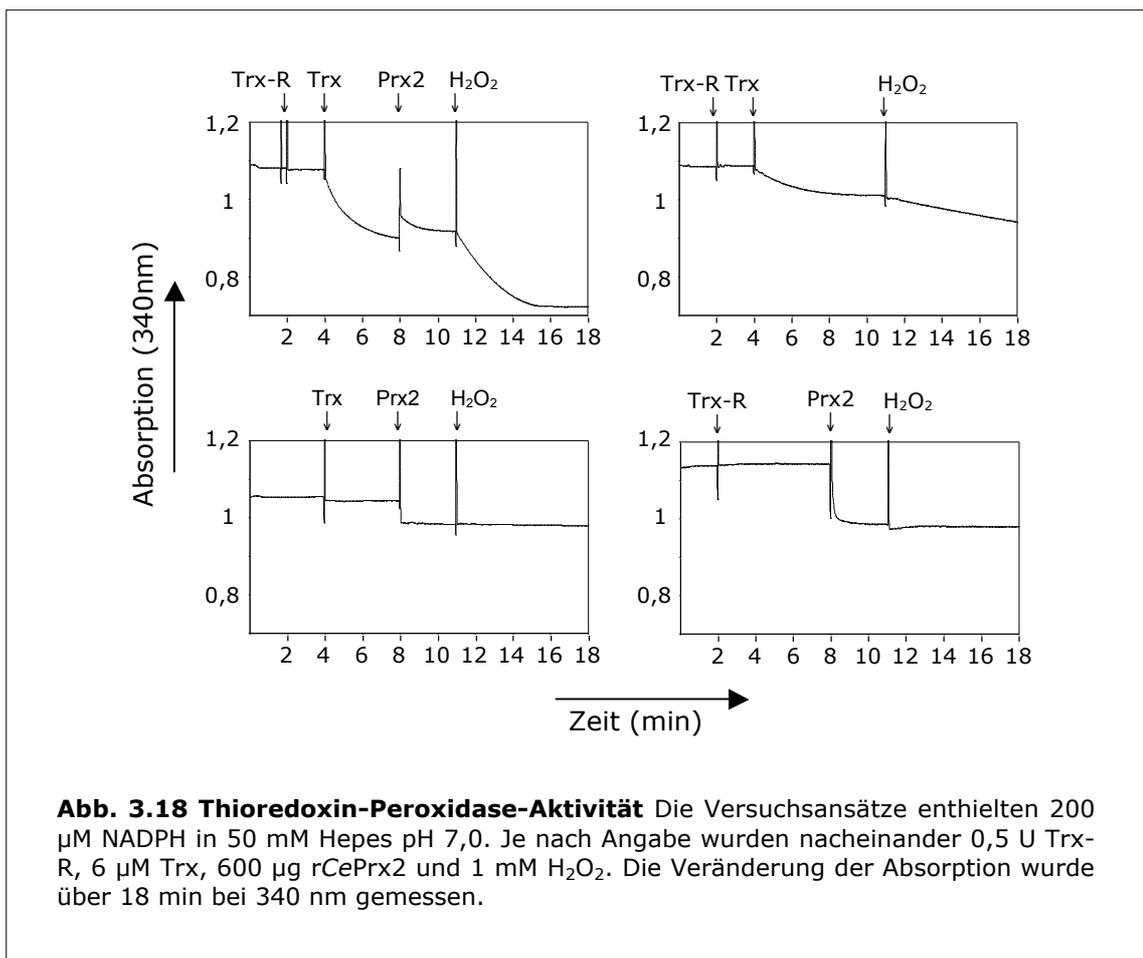


3.3.5-4 Thioredoxin-Peroxidase-Aktivität

In einem Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase-Assay wurde, wie bereits für das rCePrx1, eine Thioredoxin-Peroxidase-Aktivität des rCePrx2 nachgewiesen (s. Abb. 3.18). In Anwesenheit von rCePrx2 im Versuchsansatz nahm die Absorption bei 340 nm nach Zugabe von H₂O₂ innerhalb kurzer Zeit sehr stark ab. Die Abnahme der Absorption ist auf die Oxidation des NADPH zurückzuführen, welche H₂O₂-abhängig vom rCePrx2

über das Trx/Trx-R-System katalysiert wird. Ca. 5 min nach Zugabe des H_2O_2 wird das NADPH nicht weiter oxidiert, und die Absorptionskurve flacht ab.

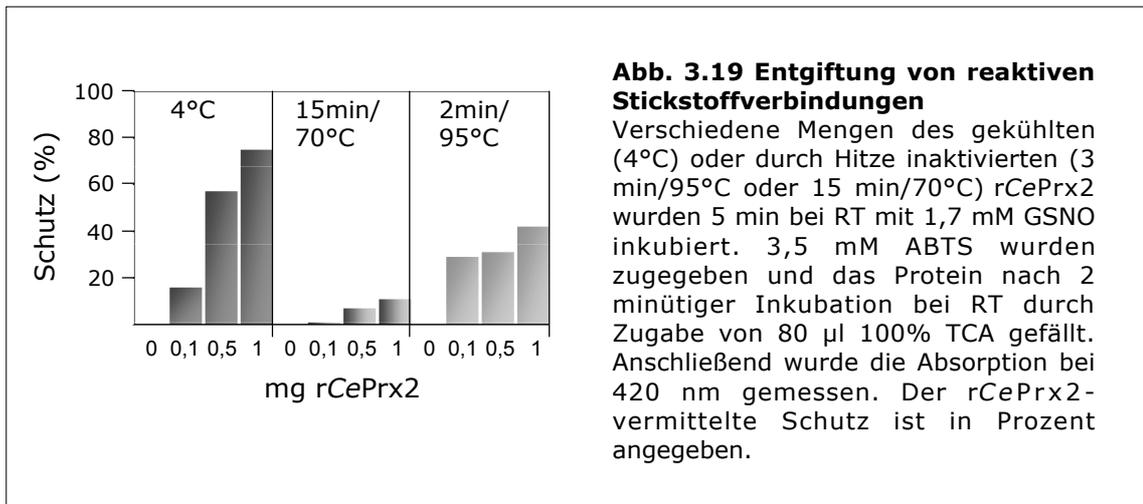
Die Oxidation des NADPH ist abhängig von der Anwesenheit beider Komponenten des Trx/Trx-R-Systems, findet jedoch, wie schon in den Versuchen mit dem rCePrx1 beobachtet (s. Kapitel 3.2.4-3), in geringem Umfang auch in Abwesenheit des rCePrx2 statt.



3.3.5-5 Entgiftung von reaktiven Stickstoffverbindungen

In einem, wie bereits für das CePrx1 durchgeführten, NO-Detoxification-Assay konnte ein enzymatischer rCePrx2-vermittelter Schutz von ABTS vor Oxidation durch GSNO nachgewiesen werden (s. Abb. 3.19). Der Schutz nahm mit steigenden Mengen des rekombinanten Enzyms zu. Die Anwesenheit von 1 mg rCePrx2 bewirkte einen 75%igen Schutz. Durch Denaturierung des rCePrx2 bei 95°C für 2 min wurde die Schutzwirkung auf 42% herabgesetzt, war jedoch immer noch vorhanden. Eine Inkubation des

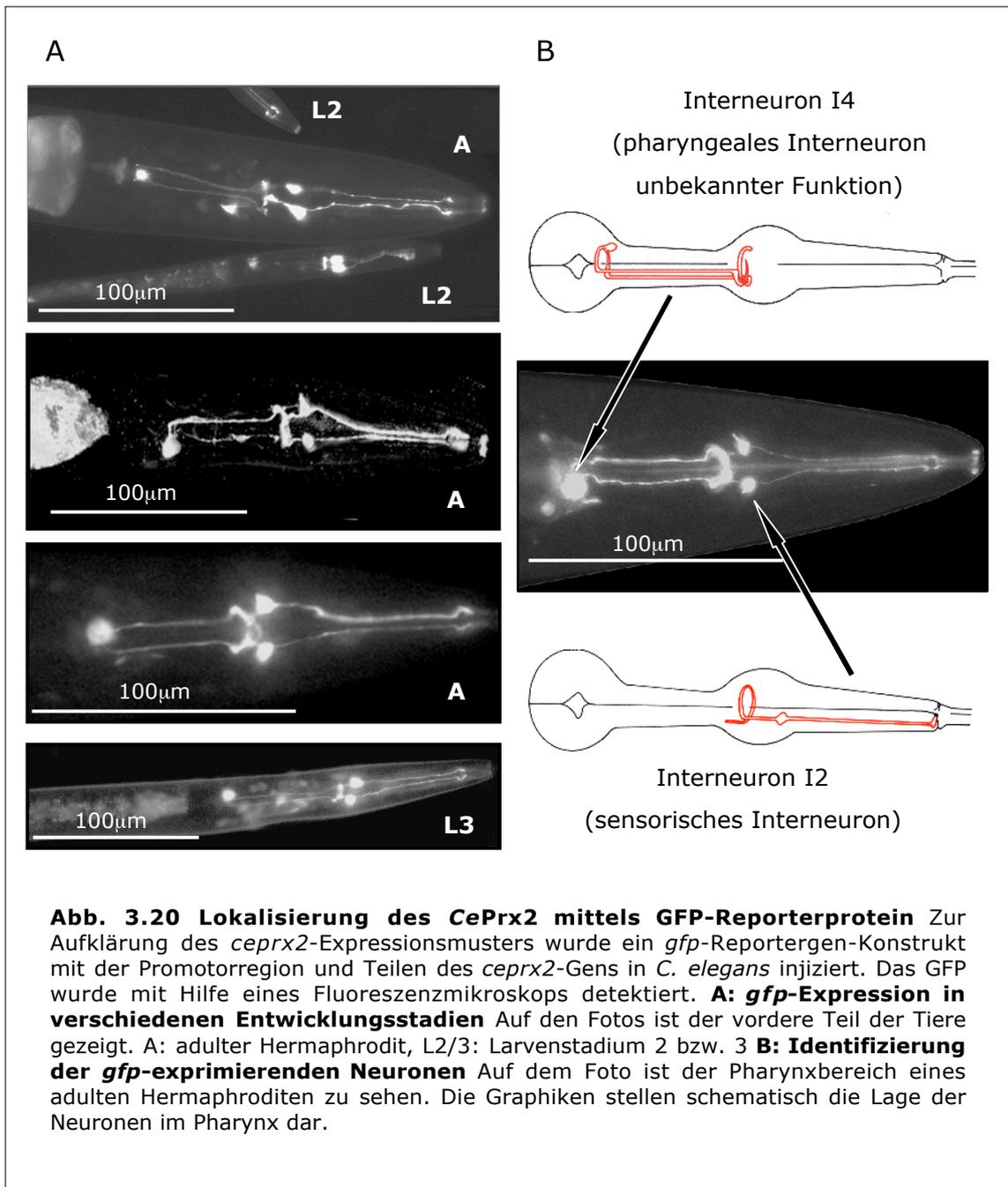
rCePrx2 für 15 min bei 70°C hatte im Gegensatz dazu eine stärkere Auswirkung auf die Aktivität des Enzyms. Der durch das CePrx2 vermittelte Schutz wurde in diesem Fall fast aufgehoben (11%). Das Ergebnis dieses Tests zeigt, dass das rCePrx2 in der Lage ist, ABTS vor einer Oxidation durch GSNO zu schützen und deutet damit auf eine mögliche Funktion bei der Entgiftung von Stickoxiden hin.



3.3.6 Expressionsmuster und Lokalisierung des CePrx2 in *C. elegans*

Der zeitliche Verlauf der Expression und die Lokalisierung des CePrx2 in *C. elegans* wurden, wie bereits für das CePrx1 beschrieben, anhand einer *gfp*-Reporterexpression unter dem *prx2*-spezifischen Promotor analysiert. Das Konstrukt zur Erzeugung der transgenen Tiere (pPD95_77::*prx2*) wurde in die Gonaden von *C. elegans pha-1*-Mutanten injiziert. Es enthielt die ersten 185 Nukleotide des *prx2*-Gens und 1904 Bp der flankierenden Sequenz oberhalb des Transkriptionsstartes in Fusion mit einem *gfp*-Gen.

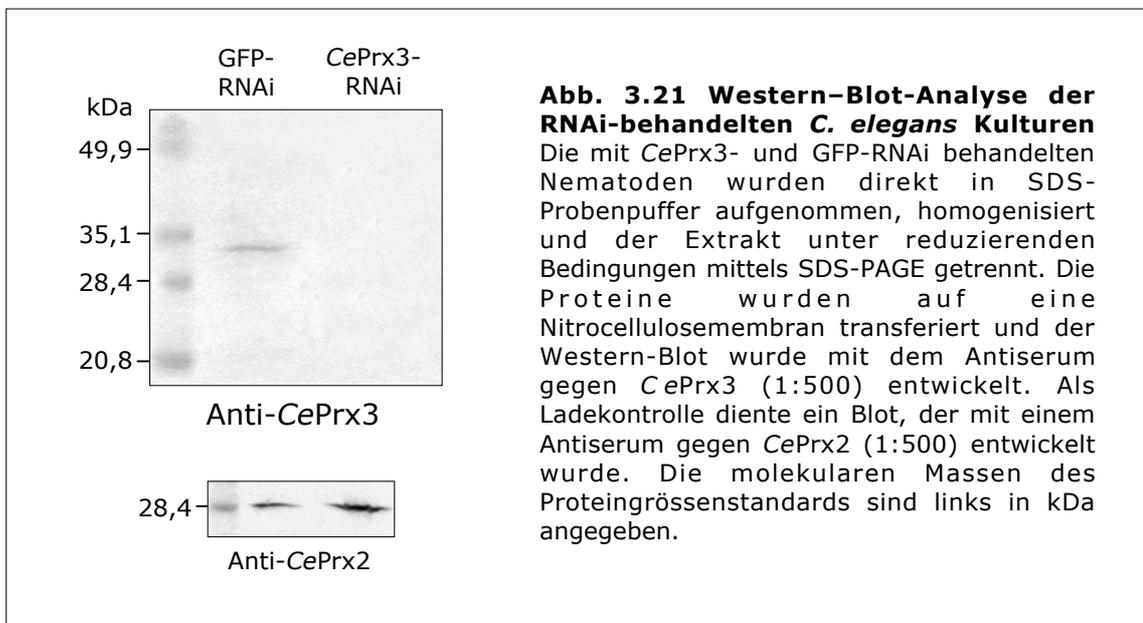
Die transgenen Tiere zeigten vom ersten Larvalstadium bis zum adulten Tier in allen Entwicklungsstadien eine identische *gfp*-Expression (s. Abb. 3.20A). Diese beschränkte sich auf zwei Neuronentypen des Pharynx. Die *gfp*-exprimierenden Neuronen konnten mit Hilfe der *WormBase* Zelldatenbank (www.wormbase.org) als das einzelne, pharyngeale Interneuron I4 und das paarige, sensorische Interneuron I2 identifiziert werden (s. Abb. 3.20B).



3.4. *Caenorhabditis elegans* Peroxiredoxin 3 (CePrx3)

3.4.1 CePrx3-Knockdown durch RNAi

Um Hinweise auf die Funktion des *CePrx3 in vivo* zu erhalten, wurden mit Hilfe von RNAi *C. elegans* Kulturen mit einem *CePrx3*-Knockdown erzeugt. Die Erzeugung der RNAi erfolgte, wie bereits für das *CePrx1* beschrieben, durch Fütterung der *C. elegans* Kulturen mit *ceprx3*-dsRNA-produzierenden *E. coli* HT115. Der *CePrx3*-Knockdown konnte in einer Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Das Protein wurde in den Extrakten der RNAi-behandelten Tiere nicht mehr detektiert.



3.4.1-1 Phänotypanalyse

Die *CePrx3*-RNAi-behandelten Tiere zeigten unter normalen Kulturbedingungen gegenüber dem Wildtyp keine Phänotypveränderungen. Es konnten weder Verhaltensauffälligkeiten oder morphologische Unterschiede, noch Veränderungen der Defäkation oder des Pharynxpumpens festgestellt werden. Die Lebensdauer war nicht verkürzt, und die Anzahl der Nachkommen war im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert (Daten nicht gezeigt).

3.4.1-2 Empfindlichkeit gegenüber Stress

Um Hinweise auf eine Funktion des *CePrx3* zu erhalten, wurde, wie bereits für das *CePrx1* beschrieben (s. Kap. 3.2.2-2), der Einfluss verschiedener oxidativer und nitrogener Stressoren sowie der Einfluss von Hitze auf die *CePrx3*-RNAi Kulturen untersucht. Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abb. 3.22 dargestellt.

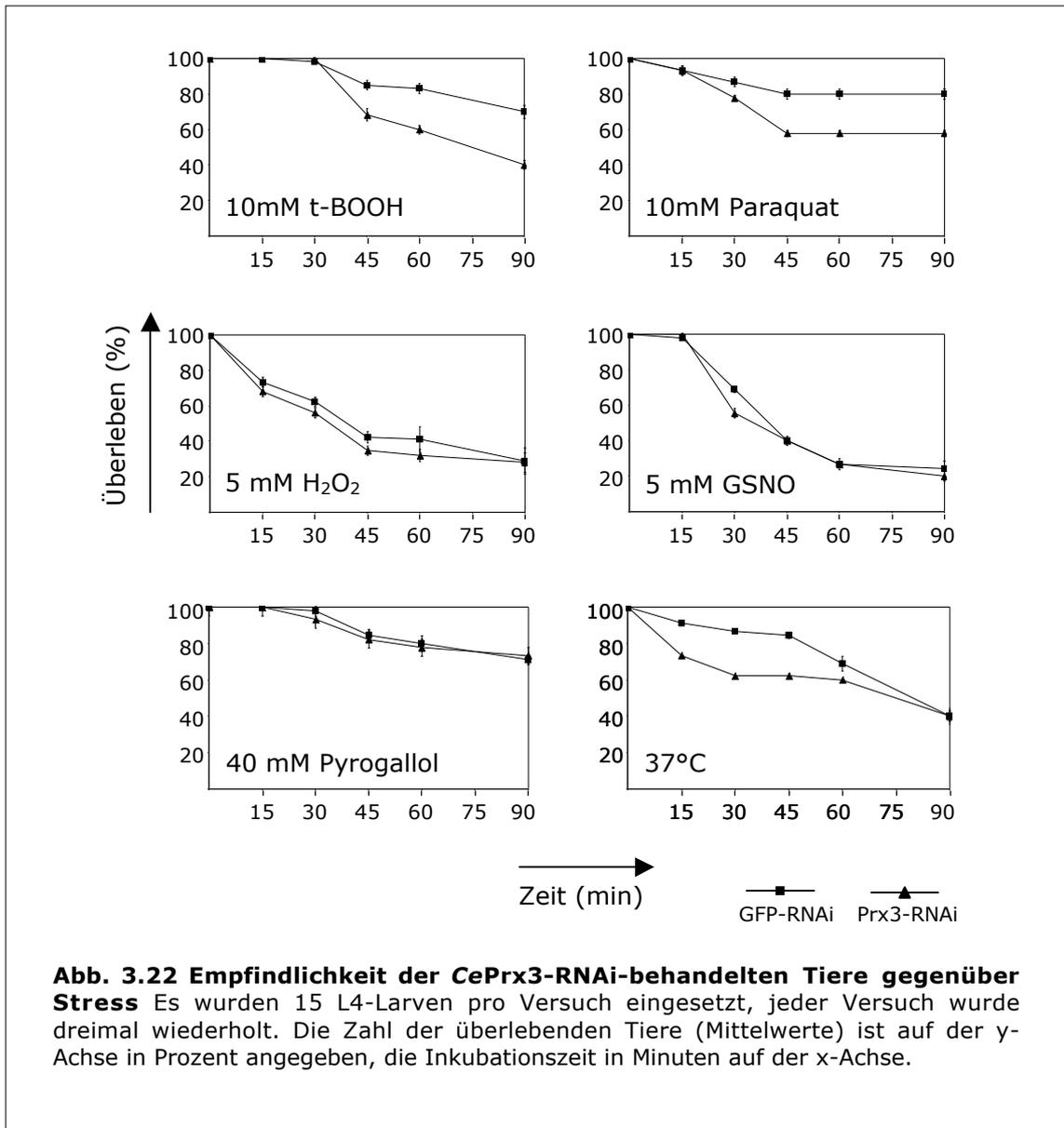
Im Gegensatz zu den *CePrx1*-Knockdown Tieren und den *CePrx2*-Knockout-Mutanten zeigten die *CePrx3*-RNAi-behandelten Nematoden eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber t-BOOH, Paraquat und Hitze. Gegenüber den anderen oxidativen oder nitrogenen Stressoren konnte keine Veränderung der Sensitivität festgestellt werden.

Bei Inkubation in 10 mM t-BOOH lebten nach 45 min in der Kontrollgruppe noch 84,4% der Tiere, während in der *CePrx3*-RNAi Gruppe nur 62,8% diesen Zeitraum überlebten. Ein Unterschied in der Überlebensrate blieb über die gesamte Versuchsdauer erhalten und betrug nach 90 min 30%.

In Anwesenheit von 10 mM Paraquat lebten nach 45 min nur noch 58% der *CePrx3*-RNAi-behandelten Tiere aber noch 80% der Kontrollen. Diese Werte veränderten sich bis zum Ende des Versuchs nicht mehr.

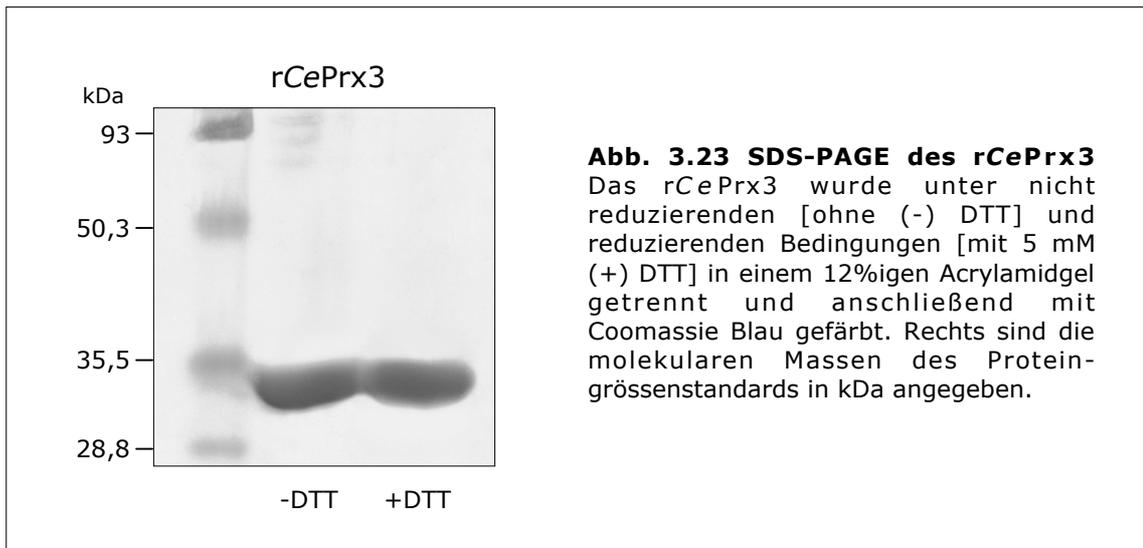
Auch in den ersten 45 min der Inkubation bei 37°C wurde eine leicht erhöhte Empfindlichkeit der *CePrx3*-RNAi-behandelten Tieren festgestellt. Nach 15 min lebten noch 91% der Kontrolltiere und nur noch 73% der *CePrx3*-RNAi-behandelten. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen blieb bis 45 min erhalten und glich sich bis zum Versuche aus. Nach 90 min lebten in beiden Gruppen noch 40% der Tiere.

In ihrer Empfindlichkeit gegenüber H₂O₂, Pyrogallol und GSNO unterschieden sich die *CePrx3*-RNAi-behandelten Tiere in keiner Weise von den Kontrollen. Die Anzahl der überlebenden Nematoden veränderte sich über den Zeitraum des Versuchs in beiden Gruppen fast identisch. Die Inkubation mit 5 mM H₂O₂ bzw. GSNO überlebten in beiden Gruppen weniger als 30% der Tiere. In Anwesenheit von 40 mM Pyrogallol lebten nach 90 min in beiden Versuchsgruppen noch über 70% der Tiere.



3.4.2 Rekombinante Expression des *ceprx3* in *E. coli*

Wie zuvor *ceprx1* und *ceprx2* wurde das *ceprx3* rekombinant in *E. coli* pAPlacI^Q Zellen exprimiert und das rekombinante Protein anschließend über eine Nickelsäule aus dem Bakterienhomogenat gereinigt. Wie in Abb. 3.23 gezeigt wird, wies das rekombinante CePrx3 (rCePrx3) in der SDS-PAGE unter reduzierenden sowie unter nicht reduzierenden Bedingungen jeweils ein Molekulargewicht von ca. 30 kDa auf. Diese Eigenschaft lässt vermuten, dass das rCePrx3 keine Dimere bildet.



3.4.3 Enzymatische Fähigkeiten des rekombinanten CePrx3 (rCePrx3)

3.4.3-1 Schutz vor organischen Peroxiden

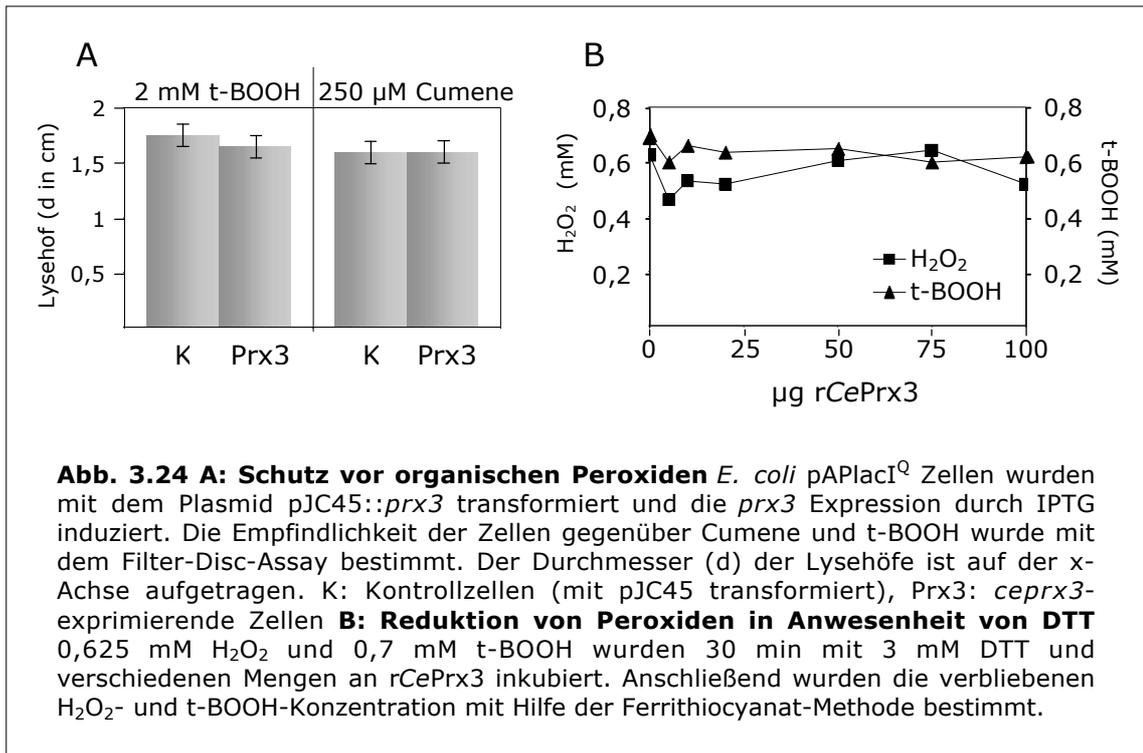
In einem Filter-Disc-Assay wurde anhand von t-BOOH und Cumene die Fähigkeit des rCePrx3 überprüft, Bakterien vor organischen Peroxiden zu schützen.

Das Ergebnis des Tests ist in Abb. 3.24A dargestellt. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen konnte kein Unterschied im Durchmesser der Lysehöfe zwischen *ceprx3*-exprimierenden und Kontrollzellen festgestellt werden. Die Expression des *ceprx3* vermittelte keinen Schutz vor Cumene oder t-BOOH. Das Ergebnis des Filter-Disc-Assays lässt vermuten, dass das CePrx3 nicht in der Lage ist organische Peroxide zu reduzieren.

3.4.3-2 Thiol-Peroxidase-Aktivität

Mit Hilfe der Ferrithiocyanat-Methode wurde anhand von H₂O₂ und t-BOOH untersucht, ob das rCePrx3 in Anwesenheit von DTT Peroxide reduzieren kann.

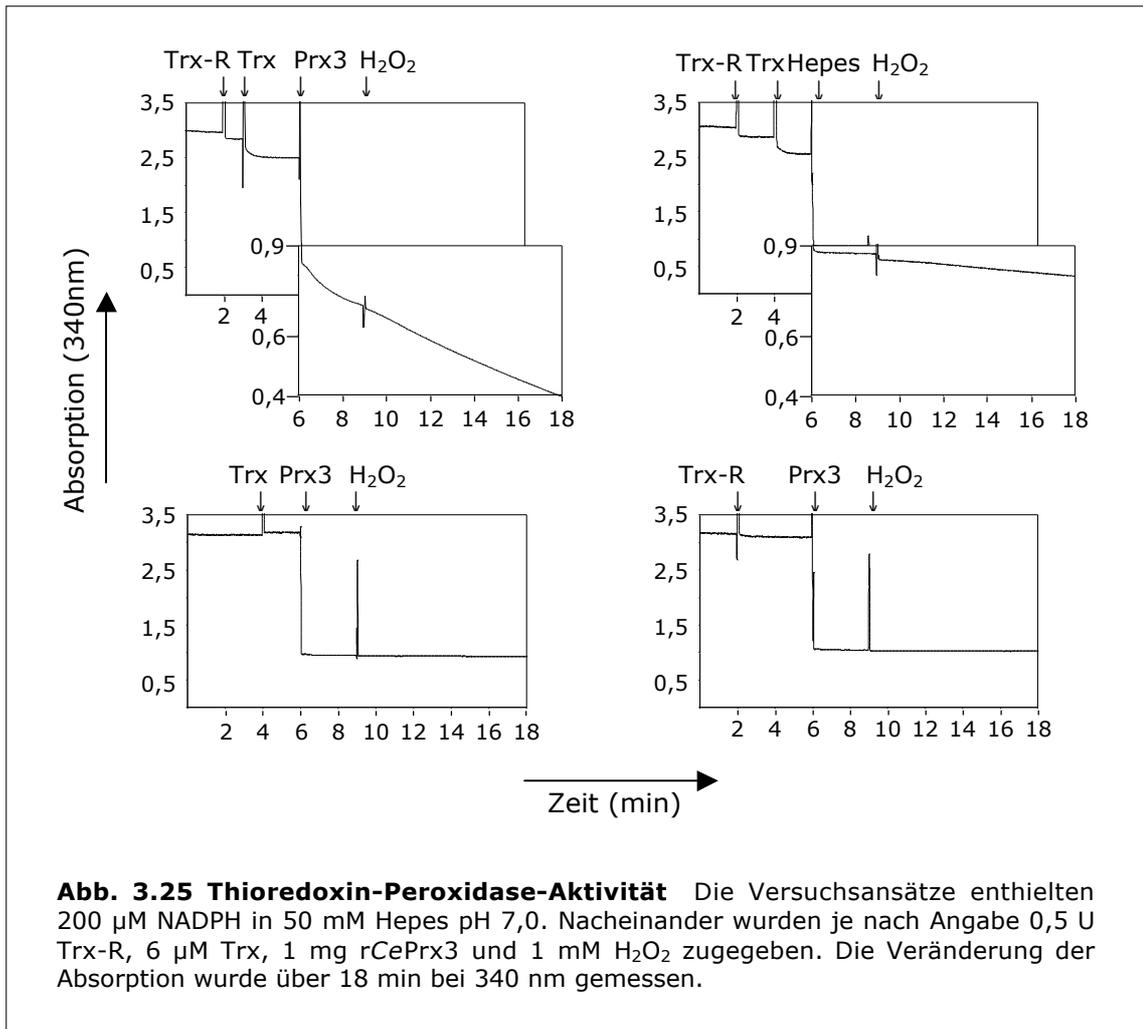
In Anwesenheit von 3 mM DTT konnte bei Reaktionstemperaturen von 25°C (Daten nicht gezeigt) oder 37°C (s. Abb. 3.24B) keine Thiol-Peroxidase-Aktivität nachgewiesen werden. Die Peroxidkonzentrationen nahmen auch bei zunehmenden Mengen des rCePrx3 nicht ab. Das rCePrx3 ist nicht in der Lage, Reduktionsäquivalente von DTT zu akzeptieren.



3.4.3-3 Thioredoxin-Peroxidase-Aktivität

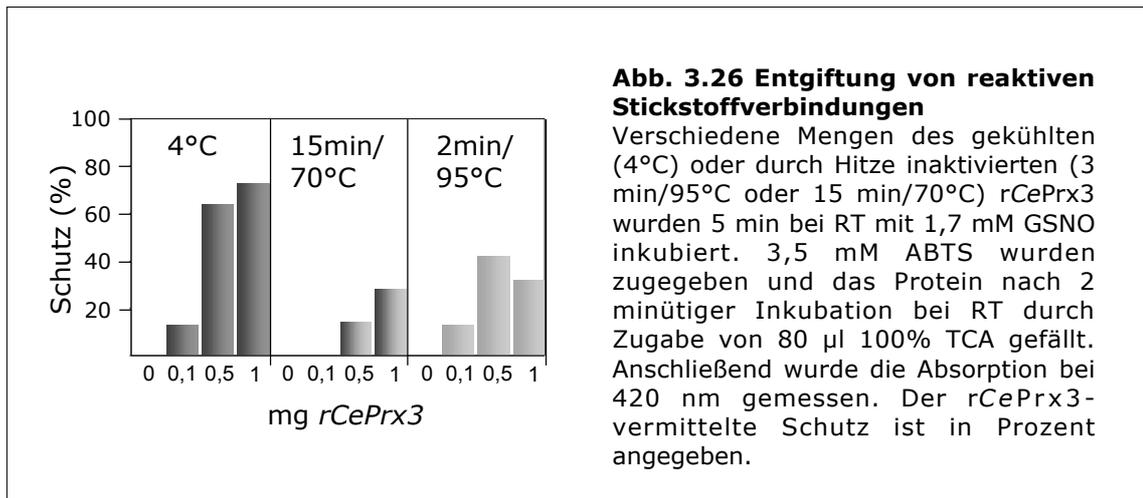
Da eine Peroxidase-Aktivität des rCePrx3 in Anwesenheit des Thiols DTT nicht nachzuweisen war, wurde überprüft, ob eine solche Aktivität in Anwesenheit des Trx/Trx-R-Systems auftritt.

In Gegenwart des *E. coli* Trx/Trx-R-Systems konnte eine Thioredoxin-Peroxidase-Aktivität des rCePrx3 nachgewiesen werden (s. Abb. 3.25). In dem Versuchsansatz mit allen Komponenten nahm die Absorption bei 340 nm nach Zugabe von H₂O₂ stark ab. Die Abnahme der Absorption ist auf eine, an das Trx/Trx-R-System gekoppelte, durch das H₂O₂ ausgelöste Oxidation des NADPH durch rCePrx3 zurückzuführen. Diese war abhängig von der Anwesenheit des Trx/Trx-R-Systems. Ein geringer Abfall der Absorption wurde, wie bereits für das rCePrx1 und 2, auch in Abwesenheit des rCePrx3 gemessen und ist auf eine schwache Peroxidase-Aktivität des Thioredoxins zurückzuführen.



3.4.3-4 Entgiftung von reaktiven Stickstoffverbindungen

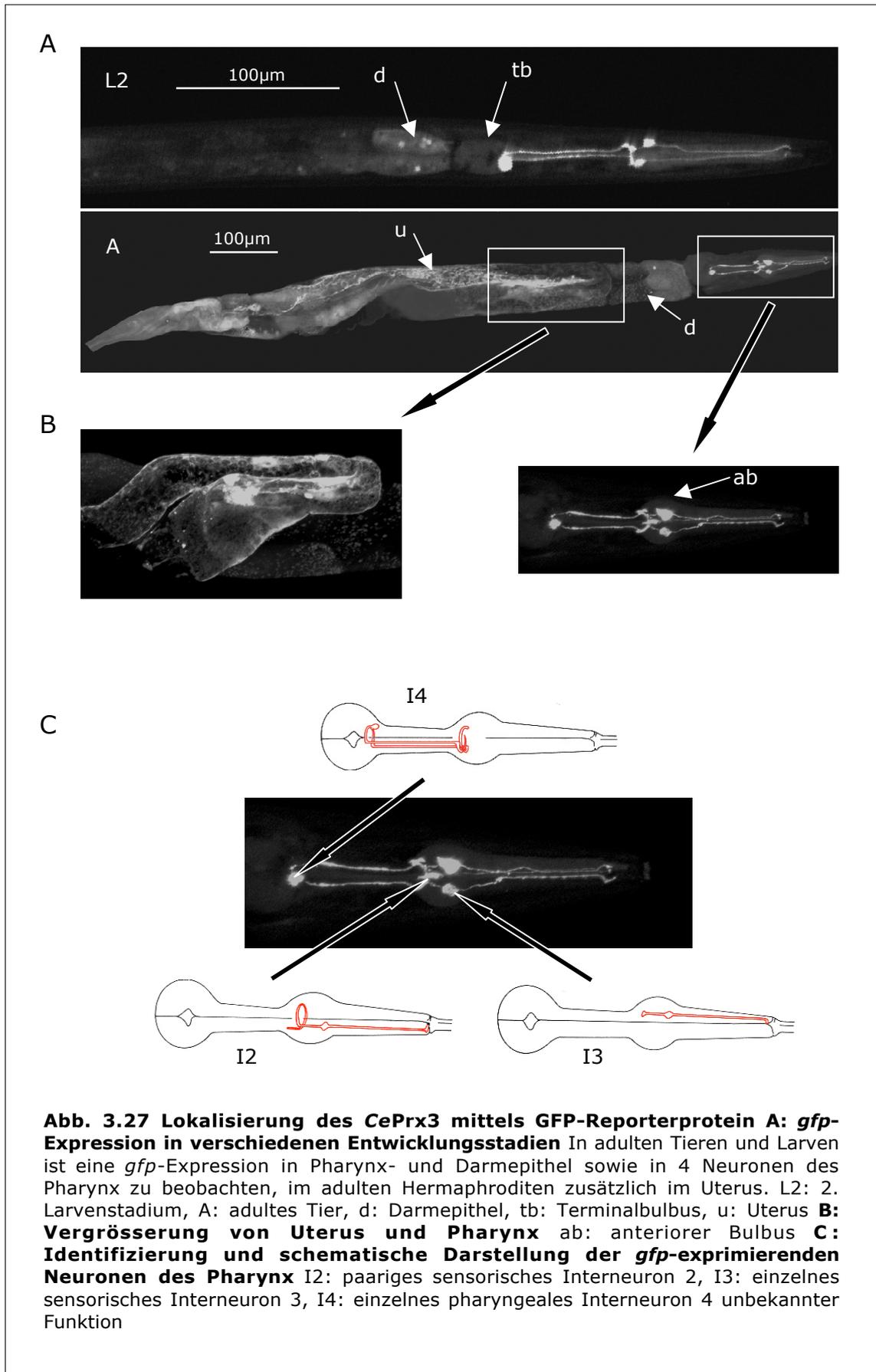
In einem NO-Detoxification-Assay konnte gezeigt werden, dass das rekombinante CePrx3 in der Lage ist, ABTS vor Oxidation durch GSNO zu schützen (s. Abb. 3.26). Die Schutzwirkung des rCePrx3 nimmt mit steigender Konzentration des Proteins zu. 0,1 mg rCePrx3 vermitteln ABTS einen 12%igen, die Anwesenheit von 1 mg rCePrx3 bereits einen 72%igen Schutz vor der ABTS-Oxidation. Dieser Schutz geht auch nach Erhitzen des rCePrx3 für 15 min bei 70°C oder 1 min bei 95°C nicht komplett verloren, er sinkt jedoch in beiden Fällen auf ca. 30%. Das Ergebnis spricht für die Fähigkeit des CePrx3, reaktive Stickstoffverbindungen zu entgiften.



3.4.4 Expressionsmuster und Lokalisierung des CePrx3 in *C. elegans*

Anhand einer *gfp*-Reporterexpression unter dem *ceprx3*-spezifischen Promotor wurde der zeitliche Verlauf der Expression und die Lokalisierung des CePrx3 analysiert. Ein Konstrukt mit dem *prx3*-Gen und seiner putativen Promoterregion (1568 Bp der flankierenden Sequenz oberhalb des Transkriptionsstarts) in Fusion mit dem *gfp*-Gen wurde in die Gonaden von *C. elegans pha1* Mutanten injiziert. Das in den Folgegenerationen generiert GFP-CePrx3-Fusionsprotein konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

Die *prx3-gfp*-Expression ist in Abb. 3.27 gezeigt. Das Prx3-GFP wurde in allen Entwicklungsstadien in drei Neuronentypen des Pharynx nachgewiesen. Diese wurden mit Hilfe der *WormBase* Zelldatenbank (www.wormbase.org) als das einzelne pharyngeale Interneuron I4, das paarige, sensorische Interneuron I2 und als das einzelne, sensorische Interneuron I3 identifiziert (Abb. 3.27C). Das Prx3-GFP konnte außerdem während des gesamten Lebenszyklus im Pharynx und im Darm der Nematoden detektiert werden. Eine nur auf die adulten Hermaphroditen beschränkte Lokalisierung des Fusionsproteins wurde im Uterus der Hermaphroditen beobachtet.



4. Diskussion

In aerober Umwelt lebende Organismen haben effiziente und spezifische Abwehrmechanismen entwickelt, um gefährliche Oxidantien wie z. B. Wasserstoffperoxid oder Superoxidradikale zu entgiften. Zu diesen Abwehrmechanismen gehören kleine Moleküle wie z. B. Thiole oder Karotenoide und die antioxidantischen Enzyme.

Peroxiredoxine sind eine stetig wachsende Familie von Proteinen, die zusammen mit Katalasen, Superoxid-Dismutasen und anderen Peroxidasen zu den antioxidantischen Enzymen gehören und damit einen Teil der antioxidantischen Abwehr bilden. Sie sind in die Regulation des Redox-Status der Zellen involviert und scheinen neben ihrer Funktion bei der Abwehr gegen oxidativen Stress auch in zellulären Prozessen wie z. B. Apoptosekontrolle, Zellproliferation oder Redoxsignalkaskaden eine entscheidende Rolle zu spielen.

4.1. Identifizierung und Sequenzanalyse von drei *Caenorhabditis elegans* Peroxiredoxinen

Der aus 681 Nt. bestehende offene Leserahmen des *prx1*-Gens wird von zwei Introns unterbrochen. Das erste Intron besteht aus 46 Nt., das zweite aus 178 Nt. Kurze Introns wie das erste sind typisch für *C. elegans*, bei dem die Hälfte aller Introns kürzer ist als 60 Nt. und damit von Vertebraten nicht mehr entfernt werden könnte (Wieringa et al 1984, Ogg et al. 1990). *C. elegans* hat jedoch auch die Fähigkeit beibehalten, sehr lange Introns aus dem Primärtranskript herauszuschneiden. So besteht z. B. das erste Intron des *unc-7*-Gens aus 18 Kb. (Starich et al. 1993).

Der offene Leserahmen des während dieser Arbeit isolierten *prx2*-Gens besteht aus 588 Nt. und wird ebenfalls von einem für *C. elegans* typisch kurzen, aus 60 Nt. bestehenden Intron unterbrochen. Dagegen sind die beiden Introns des *prx3*-Gens, dessen offener Leserahmen aus 696 Nt. besteht, mit 809 bzw. 698 Nt. sehr lang.

PCR-Analysen haben ergeben, dass die transkribierten mRNAs der drei *prx*-Gene alle Träger einer Spleißleitsequenz sind und damit transgespleißt werden. Transspleißen ist eine Form der RNA-Prozessierung, die bei

Nematoden, Trematoden, Cestoden, Trypanosomen und auch Cnidaria vorkommt. Beim Transsplicing wird eine kurze Leitsequenz, der sogenannte Spliced Leader (SL), an das 5'-Ende der mRNA gespleißt. Diese SL-Sequenzen sind sehr stark konserviert. Bei Trypanosomen tragen alle mRNAs einen SL, in *C. elegans* werden ca. 80% der Gene transgespleißt, wobei ca. 70% der mRNAs einen SL1 und ca. 10% einen SL2 tragen.

Es konnte nur für die transkribierte mRNA des *prx2* eindeutig geklärt werden, dass sie einen SL1 trägt. Die SL1 Akzeptorstelle liegt direkt vor dem Transkriptionsstart, was bei *C. elegans* nicht ungewöhnlich ist. Der durchschnittliche Abstand zwischen SL1 und Transkriptionsstart ist mit 5-7 Nt. nur etwas größer (Blumenthal und Stewart, 1997). Obwohl die SL-Sequenzen innerhalb der Nematoden sehr stark konserviert sind, konnte die genaue Funktion des SL1 bisher nicht eindeutig geklärt werden. Eine mögliche Bedeutung liegt in der Stabilisierung der mRNAs, einer erhöhten Initiation der Translation und in einer Lenkung des intrazellulären Transportes (Donelson & Zeng 1990).

CePrx1 und CePrx2 zeigen in ihrer Aminosäuresequenz die beiden in typischen 2-Cys Peroxiredoxinen konservierten Regionen *FVCP* und *VCP*, die im Allgemeinen um Position 50 bzw. 170 der Aminosäuresequenz liegen und die zwei reaktiven Cysteinreste enthalten. Diese beiden katalytisch essentiellen Cysteinreste wurden durch Mutationsexperimente erstmals in *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert (Chae *et al.* 1993). Sie werden in CePrx1 bzw. CePrx2 durch Cys⁷⁸ und Cys¹⁹⁹ bzw. Cys⁴⁹ und Cys¹⁷⁹ repräsentiert, wobei die Position der beiden Cysteinreste im CePrx1 durch eine verlängerte N-terminale, putative mitochondriale Leitsequenz etwas verschoben ist.

Die Aminosäuresequenz des CePrx3 enthält die für 1-Cys Peroxiredoxine typische Konsensussequenz *PVCT*, in welche das katalytische Cystein dieser Peroxiredoxinfamilie eingebettet ist. Auch hier wurde die Funktion mittels Mutationsstudien geklärt (Kang *et al.* 1998).

Die drei in allen Peroxiredoxinen konservierten Aminosäurereste *P*⁴⁴, *T*⁴⁸ und *R*¹²⁷ (Nummerierung der Aminosäuren nach ihrer Position im *humanen* PRDX2) sind auch in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *C. elegans* Peroxiredoxinen vorhanden. Sie umgeben das aminoternale Cystein des

PRDX2 in einer schmalen, für Lösungsmittel zugänglichen Tasche, welche durch ein Loop-Helix-Strukturmotiv gebildet wird (Wood *et al.* 2003). Wie durch Mutationsstudien gezeigt werden konnte (Montemartini *et al.* 1999), ist die Anwesenheit von T⁴⁸ und R¹²⁷ für die katalytische Aktivität der Peroxiredoxine erforderlich, wobei sie vermutlich das während der Peroxidreduktion entstehende Thiolatanion des Cys_p stabilisieren (Wood *et al.* 2003).

Im Gegensatz zu bakteriellen Peroxiredoxinen werden die meisten eukaryotischen 2-Cys Peroxiredoxine in Anwesenheit hoher H₂O₂-Konzentrationen inaktiviert. Diese Inaktivierung ist Folge einer Überoxidation. Zwei Sequenzmotive, *GGLG* und *YF*, sind allen gegenüber einer Inaktivierung durch Überoxidation sensitiven Peroxiredoxinen gemein (Wood *et al.* 2003). Diese anscheinend später in der Evolution erworbene Sensitivität deutet auf eine Funktion dieser Peroxiredoxine in der durch Peroxide vermittelten Signaltransduktion hin (Wood *et al.* 2003). Beide Sequenzmotive konnten in den 2-Cys Peroxiredoxinen CePrx1 und CePrx2 identifiziert werden, nicht aber im 1-Cys Peroxiredoxin CePrx3.

Zwei weitere, von humanen Peroxiredoxinen bekannte, funktionelle Konsensussequenzen konnten in den CePrx-Sequenzen nicht identifiziert werden. Eine davon ist die für eine Ca²⁺-unabhängige Phospholipase A₂ (aiPIA) charakterisierte Konsensussequenz *GDSWG*, welche vom humanen 1-Cys Peroxiredoxin 6 bekannt ist (Chen *et al.* 2000). Eine solche Phospholipase-Aktivität wurde bisher bei keinem weiteren Peroxiredoxin nachgewiesen. Die zweite ist die Phosphorylierungsstelle *T⁹⁰PKK* für eine cyclinabhängige Kinase (cdK), bekannt vom humanen 2-Cys Peroxiredoxin 1 (Chang *et al.* 2002). Die Phosphorylierung des *hPRDX1* dient in spezifischen Stadien des Zellzyklus der Inaktivierung des Enzyms. Von anderen Peroxiredoxinen ist eine solche Phosphorylierung bisher noch nicht bekannt, um eine diesbezügliche Aussage für die *C. elegans* Peroxiredoxine treffen zu können, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Die phylogenetische Analyse der CePrxs ergab für das CePrx1 und CePrx2 eine eindeutige Zuordnung zur Familie der typischen 2-Cys Peroxiredoxine. Der höchste Verwandtschaftsgrad des CePrx1 besteht zum TPx1 aus *Brugia malayi*, die Sequenzidentität zwischen den beiden

Peroxiredoxinen beträgt 65%. Die engste Verwandtschaft des CePrx2 besteht zum Peroxiredoxin TPx von *Ascaris suum* (s. Abb.3.3), wobei die Sequenzidentität der beiden Peroxiredoxine 80% beträgt. Der phylogenetische Stammbaum zeigt eine engere Verwandtschaft des CePrx2 mit den humanen Peroxiredoxinen 1 und 2 als mit den Peroxiredoxinen 1 aus *C. elegans* oder *B. malayi*. Die Sequenzidentität zwischen CePrx2 und CePrx1 beträgt nur 64%, die zwischen CePrx2 und hPRDX1 dagegen 74%. Die aufgrund der Aminosäuresequenz vorgenommene Zuordnung des CePrx3 zur Familie der 1-Cys Peroxiredoxine wurde durch die phylogenetische Analyse bestätigt (s. Abb. 3.3). Die Verwandtschaften zu den 1-Cys Peroxiredoxinen anderer Nematoden ist jedoch nicht so eng wie bei CePrx1 und 2. Die höchste Sequenzidentität besteht mit je 49% zum *Dirofilaria immitis* 1-CysPxn und zum humanen PRDX6.

Mittels Datenbankanalyse konnte gezeigt werden, dass das CePrx1 eine putative mitochondriale Leitsequenz trägt, und damit eine Lokalisierung des Proteins in den Mitochondrien wahrscheinlich ist. Eine Lokalisierung in den Mitochondrien ist bereits von dem humanen 2-Cys Peroxiredoxin 3 (Wonsey *et al.* 2002), dem Peroxiredoxin TXNPx aus *Leishmania infantum* (Castro *et al.* 2002) und dem 1-Cys Peroxiredoxin Prx1p aus *S. cerevisiae* (Pedrajas *et al.* 2000) bekannt. Träger einer putativen mitochondrialen Signalsequenz ist außerdem das *B. malayi* TPx2 (Ghosh *et al.* 1998).

Die Mitochondrien verbrauchen ca. 85% Prozent des von der Zelle benötigten Sauerstoffs und auch die Mehrheit der in der Zelle vorkommenden reaktiven Sauerstoffspezies entstehen als Nebenprodukte der Atmungskette. Durch die univalente Reduktion von molekularem Sauerstoff entstehen Superoxidradikale, aus welchen spontan oder enzymatisch Wasserstoffperoxid gebildet wird. Ein erhöhter oxidativer Stress in den Mitochondrien kann zu einer Reduktion des Membranpotenzials und einer Beeinträchtigung der ADP-Phosphorylierung führen und damit den Zelltod auslösen (Gunter *et al.* 1994; Zoratti *et al.* 1995). Durch Oxidation und *Crosslinken* von Thiolgruppen membranständiger Proteine können die reaktiven Sauerstoffspezies außerdem eine calciumabhängige, unspezifische Permeabilisierung der

inneren Membran bewirken (Castilho *et al.* 1995; Kowaltowski *et al.* 1998). Es wird angenommen, dass diese unspezifische Permeabilisierung zur Freisetzung mitochondrialer Komponenten wie z.B. Cytochrom C in das Cytosol und damit zur Apoptose führt (Kroemer (1997); Zhivotovsky (1998); Yang *et al.* 1997; Kluck *et al.* 1997; Green and Reed 1998). Um diesen oxidativen Schäden und damit einem möglichen Zelltod vorzubeugen, benötigen die Mitochondrien ein effektives Abwehrsystem gegen reaktive Sauerstoffspezies. Ein solches mitochondrienspezifisches antioxidantisches System wurde bereits für *Mammalia*-Zellen postuliert. Es besteht neben der Mn-Superoxid-Dismutase aus dem Thioredoxin 2, der Thioredoxin-Reduktase 2 und dem Peroxiredoxin 3 (Lee *et al.* 1999). Ein mitochondriales Trx/Trx-R-System mit einem Peroxiredoxin als terminaler Thioredoxin-Peroxidase ist auch für *S. cerevisiae* beschrieben (Pedrajas *et al.* 2000) Das kürzlich entdeckte Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase System in *C. elegans* (Ko and Chow 2002; Buettner *et al.* 1999) ist nicht in den Mitochondrien lokalisiert. Die *C. elegans* Thioredoxin-Reduktase 3 ist jedoch Träger einer putativen mitochondrialen Signalsequenz (www.wormbase.org) und mindestens zwei identifizierte Gene kodieren jeweils für ein putativ mitochondriales Thioredoxin (www.wormbase.org: *gene summary* B0024.9 bzw. B0228.5). Damit wäre eine Funktion des CePrx1 in einem mitochondrialen, antioxidantischem Trx/Trx-R-System durchaus denkbar.

4.2. *Caenorhabditis elegans* Peroxiredoxin 1

4.2.1 Regulation der Transkription in Anwesenheit von Peroxiden

Von den humanen Peroxiredoxinen 1, 2, 3 und 6 ist bekannt, dass die Anwesenheit oxidativer Stressoren wie z. B. H_2O_2 und t-BOOH die Expression der korrespondierenden Gene induziert (Mitsumoto *et al.* 2001). Interessanterweise wird die Transkription des *ceprx1* nur in Gegenwart von t-BOOH erhöht, nicht aber in Gegenwart von H_2O_2 . Ähnliches ist von Induktionsstudien der *C. elegans* Katalasen bekannt, weiteren antioxidantischen Enzymen zur Entgiftung von H_2O_2 . Auch hier hatte die Inkubation der Nematoden in Gegenwart von H_2O_2 keine induzierende Wirkung auf die Transkription der Katalasegene, nach einer Inkubation in Paraquat konnte jedoch eine Induktion der Transkription nachgewiesen werden (Eckelt 1998).

Das Ergebnis der CePrx1-Induktionsstudie steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der RNAi-Versuche und Enzymtests, die alle auf eine Funktion des CePrx1 bei der Reduktion von H_2O_2 - und nicht von t-BOOH - hindeuten und somit eine Induktion der Transkription durch H_2O_2 hätten erwarten lassen. Es ist jedoch möglich, dass die normale Konzentration der antioxidantischen Enzyme im Organismus ausreicht, um das extrazellulär applizierte H_2O_2 zu entgiften. Neben den Peroxiredoxinen könnten in diesem Fall auch die katalytisch stark aktiven Katalasen bei der Entgiftung des H_2O_2 mitwirken.

Die Peroxidase-Aktivität der Katalasen ist dagegen wesentlich schwächer, so dass die normale Kapazität der antioxidantischen Enzyme für die Reduktion des applizierten t-BOOHs möglicherweise nicht ausreicht und eine Induktion des Peroxiredoxins notwendig macht. Außerdem ist das t-BOOH stabiler als H_2O_2 . Durch seine Lipidlöslichkeit kann es mehrfach ungesättigte Fettsäuren attackieren und damit eine Kettenreaktion auslösen, durch die wiederum H_2O_2 und Lipidperoxide entstehen. Dadurch wäre die tatsächliche Konzentration an Peroxiden viel höher als die eingesetzte Konzentration an t-BOOH und könnte so eine Induktion des CePrx1 erforderlich machen.

Obwohl für das rCePrx1 weder eine Reduktion organischer Peroxide noch ein CePrx1-vermittelter Schutz vor organischen Peroxiden nachgewiesen

wurde, deutet das Ergebnis dieser Induktionsstudie auf eine Funktion bei der Entgiftung dieser Peroxidspezies hin.

4.2.2 CePrx1-Knockdown durch RNAi

Bei den CePrx1-RNAi-behandelten Nematoden konnten gegenüber dem Wildtyp keine Veränderungen des Phänotyps festgestellt werden. Das CePrx1 scheint somit keinen Einfluss auf die morphologische Entwicklung von *C. elegans* zu haben. Auch die Lebensdauer veränderte sich im Vergleich zu den Kontrollen nicht. Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, als dass für andere antioxidantische Enzyme wie Katalase und SOD ein Einfluss auf die Lebensdauer verschiedener Organismen nachgewiesen werden konnte. So wurde z. B. in *Drosophila melanogaster* Mutanten, die eine extrem verkürzte Lebensspanne aufweisen, eine stark erniedrigte Konzentration von SOD festgestellt (Bartosz *et al.* 1979). Auch in *C. elegans* ist eine verlängerte Lebensdauer mit einer verstärkten Produktion von SOD und Katalase assoziiert (Vanfleteren 1993; Larsen 1993).

Gendeletionen und RNAi-Experimente mit Peroxiredoxinen anderer Organismen ergaben für die meisten von ihnen eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress und damit eine Funktion bei der Entgiftung von ROS. Eine solche Funktion wurde in Untersuchungen mit der *D. melanogaster* Thioredoxin-Peroxidase (TPx1) nachgewiesen, in denen TPx1-RNAi-behandelte *Drosophila*-Zellen eine erhöhte Sensitivität gegenüber H₂O₂ und Paraquat zeigten (Radyuk *et al.* 2003). Auch die CePrx1-RNAi-behandelten Tiere zeigten eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber H₂O₂. Diese erhöhte Sensitivität lässt auf eine Funktion des CePrx1 beim Schutz vor Peroxiden schließen. Im Einklang mit der Fähigkeit des rekombinanten Proteins, in Anwesenheit des Trx/Trx-R-Systems H₂O₂ zu reduzieren, spricht dieses Ergebnis für eine Funktion des CePrx1 bei der Entgiftung von Wasserstoffperoxid. Eine solche Fähigkeit wäre auch im Hinblick auf die mögliche Lokalisierung des CePrx1 in den Mitochondrien von besonderer Wichtigkeit, da in diesen Zellorganellen extrem hohe Konzentrationen an H₂O₂ auftreten (Halliwell *et al.* 2000).

Die leicht erhöhte Empfindlichkeit der RNAi-behandelten Tiere gegenüber Paraquat, welches die Entstehung von endogenen Superoxidradikalen

hervorrufen, nicht aber gegenüber Pyrogallol, welches exogene Superoxidradikale produziert, liefert außerdem einen Hinweis auf eine mögliche Funktion des Ce Prx1 bei der Entgiftung endogener Radikale.

Es konnte keine erhöhte Sensitivität gegenüber dem organischen Peroxid t-BOOH festgestellt werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass dem CePrx1 keine Rolle beim Schutz vor exogen applizierten organischen Peroxiden zukommt. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der Induktionsversuche, bei denen schon in Gegenwart sehr niedriger exogener Konzentrationen t-BOOHs ein deutlicher Anstieg der *ceprx1*-Transkription zu beobachten war. Bisher gibt es keine Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse. Möglicherweise kann der CePrx1-Verlust durch eine verstärkte Expression anderer Peroxidasen kompensiert werden. Eine solche Kompensation wurde in *Helicobacter pylori* nachgewiesen, wo der PRX-Knockout eine verstärkte Expression des Gens für die Peroxidase NapA zur Folge hatte (Olczak *et al* 2002). Obwohl keine erhöhte Sensitivität gegenüber t-BOOH festgestellt werden konnte, ist es nicht auszuschließen, dass dem CePrx1 dennoch eine Funktion beim Schutz vor organischen Peroxiden zukommt. Ein Schutz könnte möglicherweise nur vor physiologisch niedrigen Konzentrationen endogener Stressoren vermittelt werden und sich nicht durch Inkubation in hochkonzentrierten Lösungen nachweisen lassen.

Die RNAi-behandelten Nematoden zeigten keine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber GSNO. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass das CePrx1 bei einem Schutz vor reaktiven Stickstoffverbindungen (RNS) keine Rolle spielt. Diese These wird durch die Ergebnisse des Enzymtests mit dem rekombinanten CePrx1 unterstützt, der ebenfalls keinen Hinweis auf eine Fähigkeit zur Reduktion von Stickoxiden ergeben hat. Da jedoch beide Untersuchungen mit GSNO durchgeführt wurden, ist es nicht auszuschließen, dass ein Schutz vor anderen RNS wie z. B. Peroxynitrit vermittelt werden kann. Um diesbezüglich eine genaue Aussage treffen zu können, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Das CePrx1 ist vermutlich in den Mitochondrien lokalisiert. Für das mitochondriale humane PRDX3 wurde gezeigt, dass das Fehlen des Proteins in humanen und Rattenzellen eine Veränderung des mitochondrialen Membranpotenzials und morphologische Veränderungen der Mitochondrien

zur Folge hat, zusätzlich zeigten die Zellen jedoch auch eine verringerte Wachstumsrate (Wonsey *et al.* 2002). Die Auswirkung eines CePrx1-Knockdowns auf die Mitochondrien wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Zur Aufklärung einer solchen möglichen Funktion sind weitere Untersuchungen nötig.

Bei der Analyse dieser Ergebnisse ist außerdem zu bedenken, dass die Methode der RNA Interferenz einem genetischen Knockout nicht gleichzusetzen ist. Die Western-Blot-Analyse der RNAi-Extrakte hat gezeigt, dass trotz der RNAi-Behandlung eine basale Synthese des Proteins stattfand. Um genauere Aussagen bezüglich der Funktion des CePrx1 treffen zu können, und die Ergebnisse zu verifizieren, wäre die Erzeugung und anschließende Untersuchung eines genomischen Knockouts des CePrx1 wünschenswert.

4.2.3 Rekombinante Expression und enzymatische Fähigkeiten des CePrx1

Das rCePrx1 weist in der SDS-Gelelektrophorese ein Molekulargewicht von 32 kDa auf. Dieses wurde durch Western-Blot-Analyse von *C. elegans* Extrakten auch für das native CePrx1 bestätigt. Typische 2-Cys Peroxiredoxine bilden Dimere (Schroder *et al.* 2000; Alphey *et al.* 2000). Diese Eigenschaft konnte in der SDS-PAGE anhand der Verschiebung des Molekulargewichts unter nicht reduzierenden Bedingungen auch für das CePrx1 bestätigt werden. Auffällig sind die ebenfalls unter nicht reduzierenden Bedingungen auftretenden Proteinbanden im hochmolekularen Bereich (über 90 kDa, s. Abb. 3.7). Hierbei könnte es sich um CePrx1-Oligomere handeln. Eine solche Bildung von Oligomeren ist typisch für Peroxiredoxine und möglicherweise sogar Bestandteil ihres Reaktionsmechanismus (Wood *et al.* 2002). So konnte für das AhpC aus *Salmonella typhimurium* gezeigt werden, dass die Bildung von Decameren eine wichtige Rolle bei der Regulation der Aktivität spielt (Wood *et al.* 2002).

4.2.3-1 Enzymatische Fähigkeiten des CePrx1

Eine *ceprx1*-Expression konnte die Empfindlichkeit von *E. coli* Zellen gegenüber den organischen Peroxiden Cumene und t-BOOH nicht herabsetzen. Das CePrx1 besitzt anscheinend nicht die Fähigkeit, Alkylhydroperoxide zu reduzieren. Diese Aussage wird durch die Untersuchungen der CePrx1-RNAi-behandelten Nematoden gestützt, die keine erhöhte Sensitivität gegenüber t-BOOH aufwiesen und somit nicht auf eine Funktion des CePrx1 beim Schutz vor organischen Peroxiden hindeuten. Im Gegensatz dazu steht die beobachtete Induktion der *ceprx1*-Transkription in Anwesenheit von t-BOOH, diese könnte jedoch möglicherweise die Antwort auf die sekundären Peroxide sein, die in einer durch das t-BOOH ausgelösten Kettenreaktion entstehen. Dazu gehört auch H_2O_2 , welches in Gegenwart des Trx/Trx-R-Systems vom CePrx1 reduziert werden kann.

In Anwesenheit des chemischen Reduktors DTT zeigte das rCePrx1 keine Peroxidase-Aktivität. Weder H_2O_2 noch t-BOOH wurden reduziert. Dieses Ergebnis ist nicht ungewöhnlich, da die Eigenschaft, Reduktionsäquivalente vom DTT zu akzeptieren, bis vor kurzem den 1-Cys Peroxiredoxinen zugeschrieben worden ist (Mc Gonigle *et al.* 1998). Als typischer Reduktor der eukaryotischen 2-Cys Peroxiredoxine gilt Thioredoxin, auch wenn einige von ihnen durchaus Reduktionsäquivalente vom DTT akzeptieren.

Für 2-Cys Peroxiredoxine verschiedenster Organismen wurde gezeigt, dass sie ihre Reduktionsäquivalente von zellspezifischen, disulfidhaltigen Oxidoreduktasen wie z. B. Thioredoxin, AhpF, Tryparedoxin oder Ahpc erhalten (Nogoceke *et al.* 1997; Poole *et al.* 2000; Bryk *et al.* 2002). Eine Eigenschaft der Peroxiredoxine ist ihre Fähigkeit, diese Reduktionsäquivalente auf H_2O_2 und teilweise auch auf organische Peroxide zu übertragen (Wood *et al.* 2003). Eine solche Eigenschaft konnte im Rahmen dieser Arbeit, wie schon erwähnt, anhand des rekombinanten Proteins auch für das CePrx1 nachgewiesen werden. Das CePrx1 akzeptiert Reduktionsäquivalente vom Thioredoxin und kann somit in Anwesenheit des Trx/Trx-R-Systems als Thioredoxin-Peroxidase H_2O_2 reduzieren. Da ein

putativ mitochondriales Trx/Trx-R-System in *C. elegans* vorkommt (s. Kap. 4.2.2), gilt der für die typischen 2-Cys Peroxiredoxine postulierte Reaktionsmechanismus vermutlich auch für das CePrx1.

Die NADPH-Absorptionskurve in einem wie hier durchgeführten Trx/Trx-R-Assay weist in Gegenwart von Peroxiredoxinen, die durch hohe Peroxidkonzentrationen inaktiviert werden, einen typischen Kurvenverlauf auf (Yang *et al.* 2002) Die zunächst starke Oxidation des NADPH, zu erkennen an einer schnell abnehmenden Absorption, wird nach wenigen Minuten schwächer und stagniert dann. Das NADPH wird nach der Inaktivierung des Peroxiredoxins nicht weiter oxidiert, die Absorption nimmt nicht weiter ab, und die Kurve flacht ab.

Obwohl in der Aminosäuresequenz des CePrx1 die Konsensussequenzen für eine Sensitivität gegenüber Überoxidierung vorkommen, deutet die Auswertung dieses Versuchs nicht auf eine solche Eigenschaft des CePrx1 hin. Eine mögliche Überoxidation wäre in Anbetracht der putativen mitochondrialen Lokalisierung des CePrx1 auch nicht von Vorteil, da überoxidierte Peroxiredoxine vermutlich durch sogenannte Retroreduktions-Komplexe regeneriert werden (Chevallet *et al.* 2003), welche nach Vermutung von Chevallet und Kollegen (2003) in den Mitochondrien nicht vorkommen. Damit wäre eine durchgängig effektive, antioxidantische Abwehr nicht gewährleistet, da die inaktivierten CePrx1 Moleküle nicht regeneriert werden könnten, sondern erst durch eine *de novo*-Synthese ersetzt werden müssten.

Tetaud und Fairlamb (1998) haben nachgewiesen, dass das *Crithidia fasciculata* 2-Cys Peroxiredoxin TryP in Anwesenheit des Trx/Trx-R-Systems neben H₂O₂ auch organische Peroxide reduzieren kann. Eine solche Alkyl-Peroxidase-Aktivität besitzen die 2-Cys Peroxiredoxine TryP aus *Leishmania major* und TPx aus *Globobdera rostochiensis* nicht (Levick *et al.* 1998; Robertson *et al.* 2000). Ob das rCePrx1 in der Lage ist, im Trx/Trx-R-System neben H₂O₂ auch organische Peroxide zu reduzieren, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht und müsste überprüft werden. Die Ergebnisse aus dem Filter-Disc-Assay und den RNAi-Versuchen sprechen gegen eine solche Fähigkeit.

Die hier beobachtete Peroxidase-Aktivität des Trx/Trx-R-Systems ist vermutlich auf die antioxidantische Aktivität des Thioredoxins

zurückzuführen und wurde bereits für das *Plasmodium falciparum* Trx/Trx-R-System beschrieben (Arnér & Holmgren 2000; Krnajski et al 2001).

Von vielen Peroxiredoxinen verschiedener Organismen ist bisher bekannt, dass sie die Fähigkeit besitzen, reaktive Stickstoffverbindungen zu entgiften. Bryk und Kollegen (2000) haben nachgewiesen, dass das AhpC aus *Salmonella typhimurium* Peroxynitrit reduzieren kann. Neben Peroxynitrit kann das Peroxiredoxin 1 aus *L. chagasi* auch andere Stickoxide entgiften, diese Fähigkeiten sind auch vom Peroxiredoxin Tsa2p aus *S. cerevisiae* bekannt (Barr & Gedamu 2003; Wong et al. 2002). Das Ergebnis des hier mit dem rCePrx1 durchgeführten Versuches hat keinen Hinweis auf eine solche enzymatische Aktivität des CePrx1 ergeben. Das rCePrx1 konnte GSNO nicht entgiften und somit keinen enzymatischen Schutz vor Stickoxiden vermitteln. Auch wenn eine mögliche Entgiftung anderer RNS, insbesondere von Peroxynitrit, durch das CePrx1 nicht ganz ausgeschlossen werden kann, scheint eine solche Aktivität nach den Ergebnissen dieser Arbeit unwahrscheinlich. Die Funktion des CePrx1 liegt vermutlich nicht in der Abwehr und dem Schutz vor RNS, sondern in der Reduktion und dem Schutz vor ROS.

4.2.4 Expressionsmuster und Lokalisierung des CePrx1 in *C. elegans*

Die Expression des *ceprx1* wird stadienspezifisch reguliert, wobei die Expression in den Larvenstadien schwächer ist und im Laufe der Entwicklung zunimmt. Diese Beobachtung stimmt mit dem Ergebnis einer genomweiten *C. elegans* Microarray-Studie überein, in der für das *ceprx1*-Gen (R07E5.2) eine Zunahme der Expression vom L1-Stadium bis zum adulten Tier beobachtet wurde (Jiang et al. 2001). Eine Zunahme der Expression vom 1. Larvenstadium bis zum adulten Tier ist auch vom *Onchocerca volvolus* Peroxiredoxin 2 bekannt, dessen Lokalisierung der des CePrx1 ebenfalls ähnelt (Lu et al. 1998). Es konnte in der Cuticula und Hypodermis der Larven sowie im Uterusepithelium und im Intestinaltrakt der adulten Tiere nachgewiesen werden. Das dem CePrx1 am nächsten verwandte *B. malayi* Peroxiredoxin Tpx-1 wird ebenfalls in der Hypodermis

exprimiert, allerdings ist die Expression hier nicht stadienspezifisch (Ghosh *et al.* 1998). In beiden Fällen handelt es sich jedoch nicht um mitochondriale Proteine, und die postulierte Hauptfunktion liegt angesichts ihrer körperoberflächennahen Lokalisation in der Abwehr gegen das Immunsystem des Wirts. Als freilebender Nematode benötigt *C. elegans* eine solche Abwehr nicht, und die Funktion des CePrx1 liegt, auch in Anbetracht der putativen mitochondrialen Lokalisierung, eher in der Abwehr von endogenen, als Nebenprodukte des normalen Stoffwechsels erzeugten reaktiven Sauerstoffspezies. Dass dem CePrx1 eine antioxidantische Funktion zukommt, geht aus seinen enzymatischen Fähigkeiten als Thioredoxin-Peroxidase und auch aus der erhöhten Empfindlichkeit der CePrx1-RNAi-behandelten Nematoden gegenüber H₂O₂ hervor.

Im Gegensatz zum Ergebnis der oben erwähnten Microarray-Studie, nach dem die *ceprx1*-Expression in den Eiern und 1 Larvalstadium am niedrigsten ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine starke *gfp-ceprx1*-Expression in den sich noch in den Eiern befindlichen Embryonen detektiert. Eine aufgrund der Entwicklungsvorgänge hohe Metabolismusrate und eine daraus folgende erhöhte Peroxidkonzentration könnten eine verstärkte Peroxiredoxinpräsenz erfordern. Dem CePrx1 würde auch in diesem Fall eine Funktion bei der Reduktion der endogen, durch den normalen Metabolismus entstehenden Peroxide zukommen.

4.3. *Caenorhabditis elegans* Peroxiredoxin 2

4.3.1 Regulation der Transkription in Anwesenheit von Peroxiden

Wie bereits erwähnt wird die Expression der humanen Peroxiredoxine 1, 2, 3 und 6 in Anwesenheit sowohl anorganischer als auch organischer Peroxide induziert (Mitsumoto *et al.* 2001). Die Induktionsstudien dieser Arbeit zeigten, dass die Transkription des *ceprx2* in Gegenwart von t-BOOH, aber nicht in Gegenwart von H₂O₂ erhöht wird. Das gleiche Ergebnis zeigten die *ceprx1*-Induktionsstudien und ähnliches ist, wie bereits erwähnt (s. Kap. 4.2.1), auch von Induktionsstudien der *C. elegans* Katalasegene bekannt, deren Transkription ebenfalls nicht durch eine Inkubation der Nematoden mit H₂O₂ induziert wird.

Obwohl das rCePrx2 H₂O₂ reduzieren kann, und ihm damit vermutlich eine Funktion bei der Reduktion von anorganischen Peroxiden zukommt, scheint eine verstärkte Transkription auch in Anwesenheit hoher H₂O₂-Konzentrationen nicht notwendig. Es wäre durchaus möglich, dass die normale Konzentration der antioxidantischen Enzyme im Organismus ausreichend ist, um das extrazellulär applizierte H₂O₂, welches sehr instabil ist, zu entgiften.

Zusammen mit der im Enzymtest nachgewiesenen Reduktion von t-BOOH und dem CePrx2-vermittelten Schutz von *E. coli* Zellen vor t-BOOH und Cumene spricht dieses Ergebnis eindeutig für eine Funktion des CePrx2 bei der Reduktion von organischen Peroxiden. Eine mögliche Erklärung für die Tatsache, dass eine Induktion durch t-BOOH aber nicht durch H₂O₂ ausgelöst wurde, ist die längere Halbwertszeit des organischen Peroxids und die durch seine Anwesenheit ausgelöste Entstehung weiterer Peroxide. Auch ist die Peroxidase-Aktivität von z. B. Katalasen wesentlich geringer als ihre Katalase-Aktivität, so dass die normale antioxidantische Kapazität der Zelle zur Entgiftung des organischen Peroxids in diesem Fall nicht ausreicht und eine Induktion des Peroxiredoxins erforderlich macht.

4.3.2 CePrx2-Knockdown und CePrx2-Knockout-Mutanten

Der Phänotyp der CePrx2-Knockout-Mutanten unterschied sich stark von dem der Wildtypen. Die Knockout-Tiere waren signifikant kleiner (30-40%) und produzierten weniger Eier und damit 70% weniger Nachkommen als der Wildtyp. Das gleiche konnte für die RNAi-behandelten Kulturen beobachtet werden. Hier zeigten ca. 2/3 der Tiere einen veränderten Phänotyp. Interessanterweise waren Merkmale wie z. B. Nahrungsaufnahme oder Defäkation unverändert, was eine einfache Erklärung des beobachteten Phänotyps durch eine verminderte Nahrungsaufnahme oder -verwertung und einer daraus folgenden Unterversorgung ausschließt.

Gendelektionen und RNAi-Experimente mit Peroxiredoxinen anderer Organismen ergaben für die meisten von ihnen eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress und damit eine Rolle bei der Entgiftung von ROS. Eine solche Funktion wurde für die Peroxiredoxine der Blaualge *Synechocystis* (Klughammer *et al.* 1998), des Prdx6 der Maus (Wang *et al.* 2003), der Hefe Alkylhydroperoxid Reduktase 1 (Nguyen-nhu & Knoop 2002) und der *Drosophila* Thioredoxin Peroxidase (Radyuk *et al.* 2003) nachgewiesen. Im Gegensatz dazu zeigten die CePrx2-Knockout-Mutanten keine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber oxidativen oder nitrogenen Stressoren.

Obwohl gezeigt werden konnte, dass das rekombinante Protein *in vitro* sowohl in Gegenwart von DTT als auch in Anwesenheit des Trx/Trx-R-Systems H₂O₂ reduzieren kann, zeigten die CePrx2-Knockout-Mutanten nur eine leicht erhöhte Sensitivität gegenüber exogenem H₂O₂. Eine verstärkte Sensitivität der Knockout-Mutanten gegenüber t-BOOH war ebenfalls nicht nachzuweisen, obwohl die Induktionsversuche eine erhöhte Transkription des *prx2* in Gegenwart dieses organischen Peroxids gezeigt haben, und das rekombinante Protein in der Lage war, t-BOOH zu reduzieren.

Eine Theorie, nach der die Wachstums- und Entwicklungsdefizite der Knockout-Mutanten Folge einer durch die Deletion des CePrx2 ausgelösten, erhöhten Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies sind, welche die normale Zellentwicklung nachhaltig stören, wird durch diese Ergebnisse nicht gestützt. Sie deuten vielmehr auf eine physiologische Funktion des

CePrx2 bei der embryonalen und morphologischen Entwicklung hin. Ähnliches ist von dem *S. cerevisiae* Peroxiredoxin TSA2 bekannt. Es wurde gezeigt, dass die Transkription dieses Peroxiredoxins durch die Anwesenheit oxidativer Stressoren induziert wird und das Protein Peroxidase-Aktivität aufweist. Zusätzlich zeigten die TSA2-Nullmutanten eine stark reduzierte Wachstumsrate. Ihre Sensitivität gegenüber oxidativen Stressoren war im Vergleich zu den Kontrollen jedoch ebenfalls unverändert (Park *et al.* 2000). Für das TSA2 wurde eine Funktion bei der Zellproliferation postuliert. Im Rahmen einer solchen Funktion könnte das CePrx2 z. B. als Regulator in der Signaltransduktion von Wachstums- und Entwicklungsfaktoren wirken.

Die Sensitivität der Knockout-Mutanten gegenüber GSNO war im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls unverändert. Die Ergebnisse des Enzymtests, in dem gezeigt werden konnte, dass rCePrx2 einen enzymatischen Schutz vor GSNO vermitteln kann, hätten im Gegensatz dazu eine erhöhte Sensitivität gegenüber RNS vermuten lassen. Es ist jedoch möglich, dass CePrx2 und CePrx3, für das ebenfalls die Fähigkeit zur Entgiftung von GSNO nachgewiesen wurde, bei einem Schutz vor RNS kooperieren. Diese Theorie wird auch für die Peroxiredoxine TSA1 und 2 aus *S. cerevisiae* postuliert, da Untersuchungen ergeben haben, dass nur eine *tsa1Δtsa2Δ* Doppelmutante, nicht aber der Knockout nur eines der beiden Peroxiredoxine, eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber nitrogenem Stress zeigt (Wong *et al.* 2002). Im Rahmen dieser Arbeit sind keine Doppel-RNAi-Versuche durchgeführt worden. Um diese Theorie zu bestätigen, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Trotz dieser Ergebnisse ist eine mögliche Funktion des CePrx2 bei der Eliminierung endogener ROS und RNS nicht auszuschließen. In Anbetracht des Expressionsmusters des CePrx2 in nur drei Neuronen ist es auch möglich, dass seine Schutzfunktion auf diese spezifischen Zellen begrenzt ist. Da sowohl H₂O₂ als auch Stickstoffmonoxid als wichtige Signalmoleküle in der Signaltransduktion gelten (Pfeilschifter *et al.* 2003), könnte die Funktion des CePrx2 auch in der Regulation der von ihnen vermittelten Signalkaskaden liegen.

4.3.3 Rekombinante Expression und enzymatische Fähigkeiten des CePrx2

Das CePrx2 konnte erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden. Das Molekulargewicht des rekombinanten Proteins stimmte mit dem des im Western-Blot detektierten, nativen CePrx2 überein. Typische 2-Cys Peroxiredoxine bilden obligatorische Dimere (Hirotzu *et al.* 1999, Schröder *et al.* 2000; Wood *et al.* 2002), und auch das rCePrx2 lag unter nicht reduzierenden Bedingungen als Dimer vor. Wie anhand des mit dem Antikörper gegen das rCePrx2 entwickelten Western-Blots von nicht reduziertem *C. elegans* Extrakt gezeigt werden konnte, stimmt die Dimerisierung des rekombinanten Proteins mit den Eigenschaften des nativen CePrx2 überein. Interessanterweise wurde im Western-Blot auf Höhe des Dimers eine Doppelbande detektiert. Hierbei könnte es sich möglicherweise um ein mit CePrx1 gebildetes Heterodimer handeln. Das Molekulargewicht eines solchen Heterodimers wäre aufgrund des höheren Molekulargewichts von CePrx1 etwas größer als das eines CePrx2-Homodimers. Eine Bildung von Heterodimeren wurde bereits für die humanen Peroxiredoxine PRDX1 und 4 beschrieben (Jin *et al.* 1997).

4.3.3-1 Enzymatische Fähigkeiten des CePrx2

Bereits die rekombinante Expression des CePrx2 in *E. coli* zeigte seine antioxidantischen Fähigkeiten. In Versuchen mit den *ceprx2*-exprimierenden Bakterien wurde nachgewiesen, dass diese im Gegensatz zu Kontrollzellen eine erhöhte Resistenz gegenüber organischen Peroxiden aufweisen. Das Protein ist somit in der Lage, die Bakterien vor ROS zu schützen, und das Ergebnis zeigt die antioxidantische Aktivität des CePrx2. Obwohl ein Knockout des CePrx2 in *C. elegans* keine erhöhte Sensitivität des gesamten Organismus gegenüber oxidativem Stress zur Folge hatte und damit keine Hinweise auf eine Funktion beim Schutz vor ROS lieferte, kann eine Überexpression des *ceprx2* in einzelnen Zellen sehr wohl einen Schutz vor ROS vermitteln.

Die antioxidantische Aktivität des rCePrx2 wurde im GS-Protection-Assay bestätigt. Das rCePrx2 war in der Lage, die L-Glutaminsynthetase vor Inaktivierung durch das Thiol/Fe³⁺/O₂⁻-System zu schützen.

In diesem System werden, als Folgereaktionen auf die durch Fe^{3+} ausgelöste Autooxidation der Thiole zu Thiylradikalen, reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxidradikale und H_2O_2 generiert.

Das Ergebnis dieses Versuches lässt keine eindeutige Aussage bezüglich der hier ausgeübten enzymatischen Aktivität des rCePrx2 zu. Die antioxidantische Aktivität könnte sowohl auf die Entgiftung von Thiylradikalen als auch auf die Entgiftung des sekundär entstehenden H_2O_2 zurückgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass das rCePrx2 H_2O_2 in Gegenwart von DTT reduzieren kann. Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass auch der Schutz der GS auf die Entgiftung des H_2O_2 zurückzuführen ist. Allerdings können auch Peroxiredoxine, die keine Thiol-Peroxidase-Aktivität besitzen, die GS vor Inaktivierung durch das Thiol/ $\text{Fe}^{3+}/\text{O}_2^-$ -System schützen (Kim *et al.* 1988). Für das TSA aus *S. cerevisiae* konnte außerdem gezeigt werden, dass es reaktive Schwefelverbindungen entgiften kann (Yim *et al.* 1994). Es wäre also durchaus möglich, dass auch das CePrx2 in der Lage ist, Thiylradikale zu entgiften, und der Schutz der GS vor Inaktivierung auf dieser Fähigkeit beruht.

Wie schon erwähnt, ist für die Reduktion von t-BOOH und H_2O_2 durch das rCePrx2 die Anwesenheit des chemischen Reduktors DTT ausreichend. Dieser kommt im Organismus normalerweise nicht vor. Die Fähigkeit, Reduktionsäquivalente vom DTT anzunehmen, galt bisher als typisches Merkmal von 1-Cys Peroxiredoxinen. Das physiologische Äquivalent zu DTT ist für Peroxiredoxine, die keine Reduktionsäquivalente vom Thioredoxin oder Glutathion akzeptieren, bisher noch nicht identifiziert. Es ist anzunehmen, dass das CePrx2 neben den hier getesteten H_2O_2 und t-BOOH noch weitere organische sowie anorganische Peroxide reduzieren und damit entgiften kann.

Die nachgewiesene Thioredoxin-Peroxidase-Aktivität des rCePrx2 zeigt, dass die im katalytischen Zyklus gebildete, intermolekulare Disulfidbrücke zwischen den reaktiven Cysteinresten des CePrx2 vom Thioredoxin reduziert werden kann. Zusätzlich zu seiner Funktion als Thiol-

Peroxidase könnte das CePrx2 damit als terminale Peroxidase in einem *C. elegans* Trx/Trx-R-System fungieren.

Die Auswertung des Versuchs deutet auf eine weitere mögliche Eigenschaft des CePrx2 hin: Etwa 5 min nach Zugabe des rCePrx2 in den kompletten Versuchsansatz wurde ein Abflachen der NADPH-Absorptionskurve beobachtet (s. Abb. 3.18). Ein solcher Kurvenverlauf entsteht, wenn das vorhandene H₂O₂ verbraucht ist oder das Peroxiredoxin durch Überoxidation inaktiviert wird (Yang *et al.* 2002). Die in diesem Versuch eingesetzte hohe Konzentration von H₂O₂ macht einen Verbrauch unwahrscheinlich, was auf eine Überoxidierung mit folgender Inaktivierung des rCePrx2 schließen lässt. Die in der CePrx2-Aminosäuresequenz identifizierten, konservierten Sequenzmotive, die eine Empfindlichkeit gegenüber Überoxidation kennzeichnen, unterstützen diese Theorie.

Peroxiredoxine verschiedenster Organismen können reaktive Stickstoffverbindungen entgiften (Peshenko & Shichi 2001; Barr & Gedamu 2003; Wong *et al.* 2002; Bryk *et al.* 2000), und der hier durch das rCePrx2 vermittelte Schutz des ABTS vor Oxidation durch GSNO spricht dafür, dass auch das CePrx2 eine solche enzymatische Fähigkeit besitzt. Die Anwesenheit eines Reduktors wie z. B. DTT oder Thioredoxin ist für die Entgiftung von GSNO nicht notwendig. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits von Chen *et al.* (1998) für das *E. coli* AhpC beschrieben, welches ebenfalls in der Abwesenheit von AhpF einen Schutz vor Stickoxidverbindungen vermitteln kann.

Das rCePrx2 vermittelt interessanterweise auch noch nach extremer Hitzeeinwirkung (2 min Inkubation bei 95°C oder 15 min bei 70°C) einen, wenn auch verminderten, Schutz vor Oxidation durch GSNO. Die Hitzeresistenz der hier ermittelten Aktivität könnte auf eine Beteiligung der Cysteinreste bei der Reaktion deuten, da diese insbesondere in Disulfidformation sehr stabil sind. Bisher konnte der genaue Mechanismus der Reduktion von RNS nicht aufgeklärt werden. Bryk und Mitarbeiter (2000) postulieren, dass bei der Entgiftung von Stickstoffmonoxid dieselben reaktiven Cysteinreste involviert sind, die bei der Reduktion von Peroxiden beteiligt sind. Im Gegensatz dazu konnte für das Peroxiredoxin 1 aus *Leishmania chagasi* gezeigt werden, dass die konservierten Cysteine zwar

für die Entgiftung von Peroxynitrit, nicht aber für die Entgiftung von Stickstoffmonoxid essentiell sind (Barr & Gedamu 2003). Welcher von diesen vorgeschlagenen Mechanismen für das CePrx2 zutrifft, könnte nur anhand von Mutationsstudien mit Sicherheit geklärt werden.

4.3.4 Expressionsmuster und Lokalisierung des CePrx2 in *C. elegans*

Das *ceprx2* wird in allen Entwicklungsstadien von *C. elegans* exprimiert. Die Expression ist jedoch auf zwei spezifische Neuronentypen des Pharynx beschränkt, die als Interneuron I2 und I4 identifiziert wurden. Die genaue Funktion dieser Neuronen ist bisher nicht bekannt, und um diese aufzuklären, bedarf es weiterer Untersuchungen.

Ein auf nur zwei Zelltypen beschränktes Expressionsmuster ist für Peroxiredoxine ungewöhnlich. Sie werden normalerweise in ganzen Geweben oder verschiedenen Zellen eines Organismus exprimiert. Im Menschen ist eine Expression im Lungengewebe, in der Leber und Teilen des Gehirns, im Testis und in Blutzellen bekannt (Fujii & Ikeda 2002, Chae *et al.* 1994, Mizusawa *et al.* 2000). In anderen Nematoden wurden Peroxiredoxine bisher in der Hypodermis, der Cuticula, im Intestinaltrakt und im Uterusepithelium nachgewiesen (Lu *et al.* 1998; Ghosh *et al.* 1998). Eine Expression in einzelnen Neuronen wurde noch nicht beschrieben.

Die Expression in den Neuronen könnte für eine Funktion des CePrx2 bei der Signaltransduktion sprechen. Superoxidradikale, Stickstoffmonoxid und H₂O₂ sind für die Zellen im Allgemeinen zwar toxisch, in niedrigen Konzentrationen können sie jedoch auch als *Second Messenger* fungieren. Besonders H₂O₂ ist ein effektives Signalmolekül, da es schnell produziert und zu kontrollieren ist. Eine Funktion wird ihm bereits in der NFκB und MAP (mitogen-activated protein)-Kinase Signaltransduktion zugeschrieben (Rhee *et al.* 2000).

Neuere Untersuchungen haben Hinweise darauf geliefert, dass eukaryotische Peroxiredoxine neben ihrer Funktion bei der Entgiftung von ROS und RNS auch als Regulatoren in den durch Peroxide bzw. H₂O₂ vermittelten Signalkaskaden wirken. In diesem Modell würden die 2-Cys Peroxiredoxine die Peroxidkonzentrationen in der ruhenden Zelle niedrig

halten, um eine unspezifische Signaltransduktion zu verhindern. Ein plötzlicher, explosionsartiger Anstieg der Peroxidkonzentration während der Signalkaskade und die daraus folgende Überoxidation der Peroxiredoxine würde deren schnelle Inaktivierung bewirken und damit die Signaltransduktion ermöglichen. Die Peroxiredoxine würden demnach als sogenannte *Floodgates* oder Schleusentore fungieren, welche die Peroxide im Ruhezustand der Zelle von ihren möglichen Zielpartnern fernhalten und im entscheidenden Moment "die Schleusen öffnen", d. h. die Signaltransduktion ermöglichen (Wood *et al.* 2003).

Voraussetzung für eine solche regulatorische Funktion in der Signaltransduktion ist die Möglichkeit zur Inaktivierung durch Überoxidation. Die beiden konservierten Sequenzmotive, welche die gegenüber Überoxidation sensitiven Peroxiredoxine kennzeichnen, sind auch in der Aminosäuresequenz des CePrx2 zu finden (s. Abb. 3.2). Die Anwesenheit dieser Sequenzmotive und der charakteristische Verlauf der NADPH-Absorptionskurve im Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase-Assay (s. Abb. 3.18) sprechen für eine Sensitivität des CePrx2 gegenüber Überoxidation. Neben einer Schutzfunktion vor ROS und RNS könnte das CePrx2 auch für die Peroxid-Signaltransduktion in den zwei Neuronentypen von Bedeutung sein.

4.4. *Caenorhabditis elegans* Peroxiredoxin 3

4.4.1 CePrx3-Knockdown durch RNAi

Die CePrx3-RNAi-behandelten Nematoden zeigten gegenüber dem Wildtyp keine phänotypischen Veränderungen. Sie waren morphologisch unverändert, zeigten keine Entwicklungsdefizite und ihre Lebensdauer sowie die Anzahl der Nachkommen war nicht beeinträchtigt. Dem CePrx3 scheinen bei Entwicklungs- und Alterungsprozessen keine grundlegenden Funktionen zuzukommen.

In den Untersuchungen hinsichtlich der Sensitivität gegenüber oxidativem Stress zeigten sich jedoch Unterschiede zwischen den CePrx3-RNAi-behandelten und den Kontrolltieren. So konnte eine erhöhte Empfindlichkeit der RNAi-behandelten Tiere gegenüber t-BOOH, Paraquat und Hitzestress festgestellt werden. Diese Ergebnisse sprechen für einen CePrx3-vermittelten Schutz vor organischen Peroxiden und intrazellulären Superoxidradikalen sowie vor Hitzestress. Gendeletionen und RNAi-Experimente mit Peroxiredoxinen anderer Organismen ergaben, wie bereits erwähnt, für die meisten von ihnen eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress und damit eine Funktion bei der Entgiftung von ROS.

Die erhöhte Sensitivität gegenüber Hitze könnte auf eine mögliche Funktion des CePrx3 in der Hitzeschockantwort hindeuten, welche durch erhöhte Temperatur ausgelöst wird.

Es konnte keine erhöhte Sensitivität gegenüber H₂O₂ nachgewiesen werden, was zunächst darauf schließen lässt, dass das CePrx3 keinen Schutz vor anorganischen Peroxiden vermitteln kann. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der Enzymtests mit dem rekombinanten Protein, die gezeigt haben, dass es in der Lage ist, H₂O₂ zu reduzieren und damit auf eine Funktion des CePrx3 bei der Entgiftung von H₂O₂ hindeuten. Eine Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse wäre die Kompensation des CePrx3-Ausfalles durch eine verstärkte Expression anderer Peroxidasen. Möglicherweise wird ein Schutz vor H₂O₂ nur vor physiologisch niedrigen Konzentrationen endogener Stressoren vermittelt, und für die Reduktion exogen applizierter, hoher H₂O₂-Konzentrationen sind primär andere antioxidantische Enzyme wie z. B. Katalase zuständig.

Auch die im Vergleich zu den Kontrollen nicht erhöhte Empfindlichkeit gegenüber GSNO steht im Gegensatz zu dem im Enzymtest nachgewiesenen CePrx3-vermittelten Schutz vor diesem nitrogenen Stressor. Wie schon für das CePrx2 (s. Kap. 4.3.2) beschrieben, wäre eine mögliche Kooperation zwischen CePrx3 und 2 bei dem Schutz vor RNS eine Erklärung für dieses Ergebnis.

Bei der Analyse dieser Ergebnisse sollte die Tatsache, dass die Methode der RNA Interferenz keinesfalls einem genetischen Knockout gleichkommt, nicht außer Acht gelassen werden. In der Western-Blot-Analyse der RNAi-behandelten Kulturen war das CePrx3 zwar nicht mehr nachzuweisen, es ist aber nicht auszuschließen, dass trotz der RNAi-Behandlung eine basale Synthese des CePrx3 stattfand. Um genauere Aussagen treffen zu können und die hier erzielten Ergebnisse zu verifizieren, bedarf es, wie schon für das CePrx1 erwähnt, der Erzeugung und anschließenden Untersuchung eines genomischen Knockouts des CePrx3.

4.4.2 Rekombinante Expression und enzymatische Fähigkeiten des CePrx3

Die SDS-PAGE-Analyse des rekombinanten Proteins hat gezeigt, dass das rCePrx3 unter reduzierenden sowie unter nicht reduzierenden Bedingungen als Monomer vorliegt. Damit würde es sich von den 1-Cys Peroxiredoxinen PRDX6 und Prx1p aus Mammalia bzw. *S. cerevisiae* unterscheiden, die beide Dimere bilden (Choi *et al.* 1998; Pedrajas *et al.* 2000). Die Dimerisierung dieser beiden 1-Cys Peroxiredoxine basiert auf völlig unterschiedlichen Mechanismen. Die Dimerisierung des PRDX6 erfolgt über ionische und/oder hydrophobe Interaktionen der C-terminalen Domänen beider Untereinheiten, während für die Dimer-Bildung des Prx1p eine Disulfidbrückenbindung im verlängerten N-terminalen Bereich des Proteins verantwortlich ist. Diese wird zwischen den jeweiligen Cys³⁸ der beiden Untereinheiten gebildet (Pedrajas *et al.* 2000).

Da hydrophobe und ionische Wechselwirkungen durch Aufkochen bei 95°C und im SDS-Gel aufgehoben werden, wäre ein aufgrund solcher

Interaktionen gebildetes Dimer in einer SDS-PAGE nicht nachzuweisen. Die meisten für die Dimerisierung des PRDX6 wichtigen Aminosäuren (z. B. F⁴³, T⁴⁴, P⁴⁵, V⁴⁶, T⁴⁸, T⁴⁹, F⁵⁰ und Y¹⁴⁹) sind im CePrx3 ebenfalls konserviert, und beide Proteine haben im Vergleich zu den 2-Cys Peroxiredoxinen einen verlängerten C-terminus (s. Abb. 3.2). Eine dem PRDX6 ähnliche, auf ionischen und/oder hydrophoben Interaktionen basierende Dimerisierung des CePrx3 wäre damit durchaus möglich. Um das zu bestätigen, bedarf es weiterer Analysen des rekombinanten Proteins.

In der N-terminalen Aminosäuresequenz des CePrx3 sind vor dem konservierten, aktiven Cys⁴⁴ keine weiteren Cysteinreste vorhanden, und der N-Terminus ist auch nicht wie bei dem Prx1p verlängert. Eine Dimerisierung aufgrund einer Disulfidbrückenbindung im N-terminalen Bereich, wie für das Prx1p postuliert, kann damit für das CePrx3 ausgeschlossen werden.

4.4.2-1 Enzymatische Fähigkeiten des CePrx3

Die rekombinante Expression des CePrx3 in *E. coli* schützt die Zellen nicht vor organischen Peroxiden und deutet damit nicht auf eine Funktion des Proteins bei der Reduktion von organischen Peroxiden hin. Auch in den Enzymtests zeigte das rekombinante CePrx3 keine Alkyl-Peroxidase-Aktivität. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den Ergebnissen der RNAi-Versuche, in denen eine deutlich erhöhte Empfindlichkeit der CePrx3-RNAi-behandelten Tiere gegenüber t-BOOH zu beobachten war. Die Alky-Peroxidase-Aktivität wurde jedoch nur in Anwesenheit von DTT getestet, und Untersuchungen hinsichtlich einer solchen Aktivität in Gegenwart des Trx/Trx-R-Systems stehen noch aus.

Die Anwesenheit des chemischen Reduktors DTT ist für eine Peroxidase-Aktivität des rCePrx3 nicht ausreichend. Untersuchungen an anderen 1-Cys Peroxiredoxinen haben ergeben, dass die meisten von ihnen Reduktionsäquivalente vom DTT akzeptieren. Das humane PRDX6 kann *in vitro* in der Anwesenheit von DTT Peroxide reduzieren, allerdings ist der physiologische Redoxpartner dieses Peroxiredoxins bisher noch nicht identifiziert worden. Als mögliche Elektronendonatoren sind Glutathion, Lipidsäuren und Cyclophilin vorgeschlagen worden (Chen *et al.* 2000;

Peshenko & Shichi 2001; Lee *et al.* 2001). Auch das 1-Cys Peroxiredoxin aus *P. falciparum* besitzt eine Thiol-Peroxidase-Aktivität, welche von der Anwesenheit von DTT oder Glutathion abhängig ist (Kawazu *et al.* 2000). Mit der fehlenden Thiol-Peroxidase-Aktivität entbehrt das CePrx3 eine typische Eigenschaft der 1-Cys Peroxiredoxine.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch nachgewiesen, dass das rCePrx3 eine Thioredoxin-Peroxidase-Aktivität besitzt, d. h. es kann vom Thioredoxin im Trx/Trx-R-System reduziert werden. Auch an anderen 1-Cys Peroxiredoxinen konnte eine solche Thioredoxin-Peroxidase-Aktivität kürzlich nachgewiesen werden. So akzeptieren die 1-Cys Peroxiredoxine aus *S. cerevisiae* und *P. falciparum* Reduktionsäquivalente vom Thioredoxin (Pedrajas *et al.* 2000; Krnajski *et al.* 2001). Die Analyse der Absorptionskurve in diesem Versuch gibt keinen Hinweis auf eine Überoxidation des rCePrx3. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Analyse der Aminosäuresequenz, in der die charakteristischen Konsensussequenzen für eine mögliche Überoxidation fehlen.

Die Entgiftung von reaktiven Stickstoffspezies ist für Peroxiredoxine aus den verschiedensten Organismen bekannt, z. B. kann das 1-Cys Peroxiredoxin aus *Bos taurus* Peroxynitrit reduzieren (Peshenko & Shichi 2001). Der durch das rCePrx3 vermittelte Schutz des ABTS vor Oxidation durch GSNO spricht dafür, dass auch das CePrx3 reaktive Stickstoffverbindungen entgiften kann. Wie auch von Chen *et al.* (1998) für das *E. coli* AhpC beschrieben, ist die Anwesenheit eines Reduktors wie z. B. DTT oder Thioredoxin dafür nicht notwendig.

Wie bereits für das CePrx2 beobachtet, kann auch das CePrx3 noch nach extremer Hitzeeinwirkung (2 min Inkubation bei 95°C oder 15 min bei 70°C) einen Schutz vor Stickoxiden vermitteln.

Der genaue Mechanismus der Reduktion von RNS ist bisher noch nicht aufgeklärt. Die Hitzeresistenz der hier ermittelten Aktivität könnte auf eine Beteiligung der Cysteine bei der Reaktion hindeuten, da diese insbesondere in Disulfidformation sehr stabil sind. Wie bereits in Kapitel 4.3.3-1 erwähnt, gibt es kontroverse Diskussionen über eine Involvierung der reaktiven Cysteinreste in die Reduktion von reaktiven Stickstoffverbindungen.

Welcher von den vorgeschlagenen Reaktionsmechanismen für das CePrx3 zutrifft, könnte wie für das CePrx2 nur anhand von Mutationsstudien aufgeklärt werden.

4.4.3 Expressionsmuster und Lokalisierung des CePrx3 in *C. elegans*

Das GFP-CePrx3-Fusionsprotein konnte in allen *C. elegans* Entwicklungsstadien nachgewiesen werden. Es wurde jedoch insofern ein stadienspezifischer Unterschied im Expressionsmuster beobachtet, als dass eine *gfp-ceprx3*-Expression im Uterus nur in voll entwickelten adulten Hermaphroditen stattfand. Die Expression im Intestinaltrakt und in drei spezifischen Neuronentypen des Pharynx fand dagegen ohne Unterschied in allen Entwicklungsstadien statt.

Die Neuronen wurden als die Interneurone I2, I3 und I4 identifiziert, wobei in den Neuronen I2 und I4 auch das *ceprx2* exprimiert wird (s. Abb. 3.3.6). Bei I2 und I3 handelt es sich um sensorische Interneurone, die genaue Funktion aller drei Neuronentypen ist bisher noch nicht bekannt. Eine Expression in einzelnen Nervenzellen wurde von Peroxiredoxinen bisher noch nicht beschrieben, sie werden normalerweise in ganzen Geweben exprimiert. Die Expression in den Neuronen könnte für eine Funktion des CePrx3 bei der Signaltransduktion sprechen, denn Superoxidradikale, Stickstoffmonoxid und H₂O₂ können in niedrigen Konzentrationen als *Second Messenger* fungieren. Eine solche Funktion wird bisher jedoch ausschließlich für die 2-Cys Peroxiredoxine postuliert, und als Voraussetzung für eine regulatorische Funktion in der Signaltransduktion wird die Möglichkeit zur Inaktivierung durch Überoxidation angesehen (Wood *et al.* 2003). Die beiden konservierten Sequenzmotive, welche die gegenüber Überoxidation sensitiven Peroxiredoxine kennzeichnen, sind in der Aminosäuresequenz des CePrx3 nicht zu finden (s. Abb. 3.2). Auch die Auswertung des Thio-redoxin-Reduktase-Assays gab keine Hinweise auf eine Sensitivität des CePrx3 gegenüber Überoxidation.

Eine antioxidantische Funktion des CePrx3 geht eindeutig aus seinen enzymatischen Fähigkeiten als Thio-redoxin-Peroxidase und aus der erhöhten Empfindlichkeit der CePrx3-RNAi-behandelten Nematoden

gegenüber Paraquat und t-BOOH hervor. Die Funktion des CePrx3 könnte in der Reduktion der endogenen, als Nebenprodukt des normalen Stoffwechsels erzeugten reaktiven Sauerstoffspezies liegen. Eine Lokalisierung im Intestinaltrakt, wo eine besonders hohe Metabolismusrate vorliegt, macht daher Sinn.

Eine Expression in Teilen des Uterus ist auch von Peroxiredoxinen anderer Nematoden bekannt. So sind das *D. immitis* 1-Cys Peroxiredoxin sowie das *O. volvolus* Peroxiredoxin TPx2 im Uterus der adulten Weibchen lokalisiert (Chandrashekar *et al.* 2000; Lu *et al.* 1998). Obwohl es sich bei dem OvTPx2 um ein 2-Cys Peroxiredoxin handelt, könnten diese drei Peroxiredoxine zumindest im Uterus eine ähnliche Funktion haben. Die RNAi-Versuche haben gezeigt, dass das CePrx3 keinen Einfluss auf die Entwicklung der Embryonen hat. Die Eiproduktion war nicht beeinträchtigt, und auch die Entwicklung und Morphologie der Larven zeigten keine Veränderungen gegenüber dem Wildtyp. Die Funktion des CePrx3 liegt auch hier vermutlich in der Reduktion von endogenem oxidativen Stress.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, wie komplex die Funktionen der Peroxiredoxine selbst in einem einfachen Organismus wie *C. elegans* sind. Im Rahmen seiner antioxidantischen Aktivität kommt dem CePrx1 vermutlich eine Funktion beim Schutz der Mitochondrien vor oxidativem Stress zu. Die Lokalisation des CePrx2 und der stark veränderte Phänotyp der Knockout-Mutanten deuten darauf hin, dass ihm Funktionen sowohl in morphologischen Entwicklungsprozessen als auch bei der Signaltransduktion zukommen. Die Ergebnisse der Untersuchungen zum CePrx3 gaben keine Hinweise auf eine Funktion bei Entwicklungs- oder Alterungsprozessen. Lediglich die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Hitze deutet auf mögliche regulatorische Funktionen bei der Hitzeschockantwort hin. Im Ganzen lassen die Ergebnisse jedoch eine antioxidantische Funktion des CePrx3 bei der Reduktion von endogen entstandenen ROS und RNS vermuten.

5. Zusammenfassung

Um sich vor oxidativem Stress und den durch ihn verursachten Schäden zu schützen, haben aerob lebende Organismen effiziente antioxidative Systeme entwickelt. Zu den enzymatischen Antioxidantien gehören die Peroxiredoxine. Ein charakteristisches Merkmal dieser Enzymfamilie ist ein konservierter Cysteinrest innerhalb ihrer Aminosäuresequenz, der an der Reduktion von Hydroperoxiden beteiligt ist. Es gibt zunehmend Hinweise, dass den Peroxiredoxinen neben einer Funktion als Antioxidantien auch Funktionen in grundlegenden Zellprozessen wie Signaltransduktion, Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Apoptose zukommen.

Zur Vertiefung des Verständnisses der Funktionen der Peroxiredoxine sollte am Beispiel des Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* eine Charakterisierung der Peroxiredoxine und ihrer physiologischen Bedeutung in Nematoden vorgenommen werden.

Mit Hilfe von Datenbankanalysen wurden in *C. elegans* drei potentielle Peroxiredoxingene, *ceprx1*, *ceprx2* und *ceprx3*, identifiziert. Anhand der abgeleiteten Aminosäuresequenzen konnten das CePrx1 und CePrx2 den typischen 2-Cys Peroxiredoxinen und das CePrx3 den 1-Cys Peroxiredoxinen zugeordnet werden. Das CePrx1 ist außerdem Träger einer putativen mitochondrialen Signalsequenz. Induktionsstudien zeigten, dass sowohl die *ceprx1*- als auch die *ceprx2*-Expression durch *tert*-Butylhydroperoxid induziert werden.

Um die Funktion des CePrx1 aufzuklären, wurden mittels RNA Interferenz (RNAi) *C. elegans* Kulturen mit einem CePrx1-Knockdown erzeugt. Die Nematoden zeigten keine morphologischen Veränderungen, und auch die Lebensdauer und die Anzahl der Nachkommen waren im Vergleich zum Wildtyp unverändert. Der CePrx1-Knockdown hatte jedoch eine erhöhte Empfindlichkeit der Tiere gegenüber H₂O₂ und, in geringem Maße, auch gegenüber Paraquat zur Folge. Untersuchungen an einem rekombinant hergestellten CePrx1 zeigten, dass das Protein in einem

Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase-System als terminale Peroxidase fungieren und so H_2O_2 reduzieren kann. Mittels *gfp*-Reporterexpression wurde das CePrx1 in den späten Embryonalstadien der Eier, in der Hypodermis und im Intestinaltrakt der adulten Tiere lokalisiert. Es zeigte sich, dass die Expression des *ceprx1* im Laufe der Entwicklung vom 1. Larvalstadium bis zum adulten Tier zunimmt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und die putative mitochondriale Lokalisierung deuten auf eine Funktion des CePrx1 beim Schutz der Mitochondrien vor oxidativem Stress hin.

Neben den durch RNAi erzeugten CePrx2-Knockdown Kulturen stand eine *C. elegans* Mutante mit einem genomischen Knockout des *ceprx2*-Gens zur Verfügung. Knockdown und Knockout-Mutanten zeigten den gleichen, gegenüber dem Wildtyp stark veränderten Phänotyp. Die Größe der Nematoden war um ca. 25% reduziert und aufgrund einer verringerten Eiproduktion sank die Anzahl ihrer Nachkommen um 70%. Dieser Effekt wird vermutlich nicht durch verminderte Nahrungsaufnahme oder -verwertung verursacht, da weder Veränderungen des Pharynxpumpens noch der Defäkation auftraten. Die Lebensdauer der Mutanten war im Vergleich zum Wildtyp unverändert und es wurde keine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber reaktiven Sauerstoff- (ROS) oder Stickstoffverbindungen (RNS) oder Hitze festgestellt. Durch rekombinante Expression wurde gezeigt, dass das CePrx2 sowohl eine Thiol- als auch eine Thioredoxin-Peroxidase-Aktivität besitzt, wobei das Enzym neben H_2O_2 auch Alkylhydroperoxide reduzieren kann. Außerdem ist das CePrx2 in der Lage, reaktive Stickoxidverbindungen (NO_x) zu reduzieren. Lokalisationsstudien mittels *gfp*-Reporterexpression ergaben eine Lokalisierung des CePrx2 in lediglich zwei Neuronentypen des Pharynx (I2, I4).

Die enzymatischen Fähigkeiten des CePrx2 weisen es eindeutig als antioxidantisches Enzym aus. Die Charakterisierung der Knockout-Mutanten und die Lokalisationsstudien zeigen jedoch, dass die Funktion des CePrx2 nicht allein in der Abwehr von oxidativem Stress liegt, sondern ihm auch wichtige Funktionen in anderen physiologischen Bereichen zukommen. Dabei könnte es im Rahmen der durch Peroxide oder Stickstoffmonoxid vermittelten Signalkaskaden regulatorische Funktionen ausüben.

Um die Funktionen des CePrx3 *in vivo* zu untersuchen, wurde mit Hilfe von RNAi ein Knockdown erzeugt. Die Nematoden zeigten keine morphologischen Veränderungen. Der CePrx3-Knockdown hatte weder Einfluss auf die Entwicklung noch auf die Lebensdauer der Nematoden. In pharmakologischen Untersuchungen wurde jedoch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber t-BOOH, Paraquat und Hitze (37°C) festgestellt. Ein rekombinant hergestelltes CePrx3 zeigte Thioredoxin-Peroxidase-Aktivität und war außerdem in der Lage, Stickoxidverbindungen zu reduzieren. Eine *gfp*-Reportergenexpression zeigte, dass das *ceprx3* in allen Entwicklungsstadien in drei spezifischen Neuronentypen des Pharynx (I2, I3 und I4) und im Intestinaltrakt exprimiert wird. In den adulten Hermaphroditen wurde das CePrx3 außerdem in Teilen des Uterus lokalisiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das CePrx3 nicht an Entwicklungs- oder Alterungsprozessen beteiligt ist. Die enzymatischen Fähigkeiten deuten auf eine Funktion bei der Abwehr von ROS und RNS hin.

Literaturverzeichnis

- Agami, R., Blandino, G., Oren, M., und Shaul, Y. (1999) Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis. *Nature* **399**: 809-813.
- Alphey, M.S., Bond, C.S., Tetaud, E., Fairlamb, A.H., und Hunter, W.N. (2000) The structure of reduced trypanothione peroxidase reveals a decamer and insight into reactivity of 2Cys-peroxiredoxins. *J Mol Biol* **300**: 903-916.
- Arner, E.S., und Holmgren, A. (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* **267**: 6102-6109.
- Bae, Y.S., Kang, S.W., Seo, M.S., Baines, I.C., Tekle, E., Chock, P.B., und Rhee, S.G. (1997) Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **272**: 217-221.
- Barr, S.D., und Gedamu, L. (2003) Role of peroxiredoxins in *Leishmania chagasi* survival. Evidence of an enzymatic defense against nitrosative stress. *J Biol Chem* **278**: 10816-10823.
- Bartosz, G., Leyko, W., und Fried, R. (1979) Superoxide dismutase and life span of *Drosophila melanogaster*. *Experientia* **35**: 1193.
- Blumenthal, T.a.S., K (1997) RNA Processing and Gene Structure. In *C. elegans II*. Donald L. Riddle, T.B., Barbara J. Meyer, James R. Priess (ed). Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 117-146.
- Bryk, R., Griffin, P., und Nathan, C. (2000) Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* **407**: 211-215.
- Bryk, R., Lima, C.D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., und Nathan, C. (2002) Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein. *Science* **295**: 1073-1077.
- Buettner, C., Harney, J.W., und Berry, M.J. (1999) The *Caenorhabditis elegans* homologue of thioredoxin reductase contains a selenocysteine insertion sequence (SECIS) element that differs from mammalian SECIS elements but directs selenocysteine incorporation. *J Biol Chem* **274**: 21598-21602.
- Butterfield, L.H., Merino, A., Golub, S.H., und Shau, H. (1999) From cytoprotection to tumor suppression: the multifactorial role of peroxiredoxins. *Antioxid Redox Signal* **1**: 385-402.
- Castilho, R.F., Kowaltowski, A.J., Meinicke, A.R., und Vercesi, A.E. (1995) Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(II)citrate or t-butyl hydroperoxide in the presence of Ca²⁺: effect of coenzyme Q redox state. *Free Radic Biol Med* **18**: 55-59.
- Castro, H., Budde, H., Flohe, L., Hofmann, B., Lunsdorf, H., Wissing, J., und Tomas, A.M. (2002) Specificity and kinetics of a mitochondrial peroxiredoxin of *Leishmania infantum*. *Free Radic Biol Med* **33**: 1563-1574.
- Chae, H.Z., Kim, I.H., Kim, K., und Rhee, S.G. (1993) Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **268**: 16815-16821.

- Chae, H.Z., Robison, K., Poole, L.B., Church, G., Storz, G., und Rhee, S.G. (1994) Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 7017-7021.
- Chae, H.Z., Kim, H.J., Kang, S.W., und Rhee, S.G. (1999) Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res Clin Pract* **45**: 101-112.
- Chandrashekar, R., Curtis, K.C., Lu, W., und Weil, G.J. (1998) Molecular cloning of an enzymatically active thioredoxin peroxidase from *Onchocerca volvulus*. *Mol Biochem Parasitol* **93**: 309-312.
- Chandrashekar, R., Tsuji, N., Morales, T.H., Carmody, A.B., Ozols, V.O., Welton, J., und Tang, L. (2000) Removal of hydrogen peroxide by a 1-cysteine peroxiredoxin enzyme of the filarial parasite *Dirofilaria immitis*. *Parasitol Res* **86**: 200-206.
- Chang, T.S., Jeong, W., Choi, S.Y., Yu, S., Kang, S.W., und Rhee, S.G. (2002) Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* **277**: 25370-25376.
- Chen, J.W., Dodia, C., Feinstein, S.I., Jain, M.K., und Fisher, A.B. (2000) 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J Biol Chem* **275**: 28421-28427.
- Chen, L., Xie, Q.W., und Nathan, C. (1998) Alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC) protects bacterial and human cells against reactive nitrogen intermediates. *Mol Cell* **1**: 795-805.
- Chevallet, M., Wagner, E., Luche, S., van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E., und Rabilloud, T. (2003) Regeneration of peroxiredoxins during recovery after oxidative stress: only some overoxidized peroxiredoxins can be reduced during recovery after oxidative stress. *J Biol Chem* **278**: 37146-37153.
- Choi, H.J., Kang, S.W., Yang, C.H., Rhee, S.G., und Ryu, S.E. (1998) Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nat Struct Biol* **5**: 400-406.
- Choi, J., Choi, S., Cha, M.K., Kim, I.H., und Shin, W. (2003) Crystal structure of *Escherichia coli* thiol peroxidase in the oxidized state: insights into intramolecular disulfide formation and substrate binding in atypical 2-Cys peroxiredoxins. *J Biol Chem* **278**: 49478-49486.
- Cohen, G. (1994) Enzymatic/nonenzymatic sources of oxyradicals and regulation of antioxidant defenses. *Ann N Y Acad Sci* **738**: 8-14.
- Dietz, K.J., Horling, F., König, J., und Baier, M. (2002) The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. *J Exp Bot* **53**: 1321-1329.
- Donelson, J.E., und Zeng, W. (1990) A comparison of trans-RNA splicing in trypanosomes and nematodes. *Parasitology Today* **6**: 327-334.
- Eckelt, V. (1998) Molekulare und biochemische Charakterisierung der Katalasen der Nematoden *Ascaris suum* (Goeze, 1782) und *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900). Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

- Ellis, H.R., und Poole, L.B. (1997) Novel application of 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole to identify cysteine sulfenic acid in the AhpC component of alkyl hydroperoxide reductase. *Biochemistry* **36**: 15013-15018.
- Fujii, J., und Ikeda, Y. (2002) Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein. *Redox Rep* **7**: 123-130.
- Ghosh, I., Eisinger, S.W., Raghavan, N., und Scott, A.L. (1998) Thioredoxin peroxidases from *Brugia malayi*. *Mol Biochem Parasitol* **91**: 207-220.
- Green, D.R., und Reed, J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**: 1309-1312.
- Gunter, T.E., Gunter, K.K., Sheu, S.S., und Gavin, C.E. (1994) Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am J Physiol* **267**: C313-339.
- Halliwell, B., Clement, M.V., und Long, L.H. (2000) Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett* **486**: 10-13.
- Haridas, V., Ni, J., Meager, A., Su, J., Yu, G.L., Zhai, Y., Kyaw, H., Akama, K.T., Hu, J., Van Eldik, L.J., und Aggarwal, B.B. (1998) TRANK, a novel cytokine that activates NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase. *J Immunol* **161**: 1-6.
- Hirotsu, S., Abe, Y., Okada, K., Nagahara, N., Hori, H., Nishino, T., und Hakoshima, T. (1999) Crystal structure of a multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 12333-12338.
- Hofmann, B., Hecht, H.J., und Flohe, L. (2002) Peroxiredoxins. *Biol Chem* **383**: 347-364.
- Ishii, T., Yamada, M., Sato, H., Matsue, M., Taketani, S., Nakayama, K., Sugita, Y., und Bannai, S. (1993) Cloning and characterization of a 23-kDa stress-induced mouse peritoneal macrophage protein. *J Biol Chem* **268**: 18633-18636.
- Jacobson, M.D. (1996) Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem Sci* **21**: 83-86.
- Jiang, M., Ryu, J., Kiraly, M., Duke, K., Reinke, V., und Kim, S.K. (2001) Genome-wide analysis of developmental and sex-regulated gene expression profiles in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 218-223.
- Jin, D.Y., Chae, H.Z., Rhee, S.G., und Jeang, K.T. (1997) Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF-kappaB activation. *J Biol Chem* **272**: 30952-30961.
- Kang, S.W., Baines, I.C., und Rhee, S.G. (1998) Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. *J Biol Chem* **273**: 6303-6311.
- Kawazu, S., Tsuji, N., Hatabu, T., Kawai, S., Matsumoto, Y., und Kano, S. (2000) Molecular cloning and characterization of a peroxiredoxin from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **109**: 165-169.

- Kim, K., Kim, I.H., Lee, K.Y., Rhee, S.G., und Stadtman, E.R. (1988) The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system. *J Biol Chem* **263**: 4704-4711.
- Kinnula, V.L., Lehtonen, S., Sormunen, R., Kaarteenaho-Wiik, R., Kang, S.W., Rhee, S.G., und Soini, Y. (2002) Overexpression of peroxiredoxins I, II, III, V, and VI in malignant mesothelioma. *J Pathol* **196**: 316-323.
- Klimowski, L., Chandrashekar, R., und Tripp, C.A. (1997) Molecular cloning, expression and enzymatic activity of a thioredoxin peroxidase from *Dirofilaria immitis*. *Mol Biochem Parasitol* **90**: 297-306.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., und Newmeyer, D.D. (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**: 1132-1136.
- Klughammer, B., Baier, M., und Dietz, K.J. (1998) Inactivation by gene disruption of 2-cys-peroxiredoxin in *Synechocystis spec.* PCC leads to increased stress sensitivity. *Physiologia Plantarum* **104**: 699-706.
- Ko, F.C., und Chow, K.L. (2002) A novel thioredoxin-like protein encoded by the *C. elegans* dpy-11 gene is required for body and sensory organ morphogenesis. *Development* **129**: 1185-1194.
- Kowaltowski, A.J., Netto, L.E., und Vercesi, A.E. (1998) The thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition. Evidence for the participation of reactive oxygen species in this mechanism. *J Biol Chem* **273**: 12766-12769.
- Krapfenbauer, K., Yoo, B.C., Fountoulakis, M., Mitrova, E., und Lubec, G. (2002) Expression patterns of antioxidant proteins in brains of patients with sporadic Creutzfeldt-Jacob disease. *Electrophoresis* **23**: 2541-2547.
- Krnajski, Z., Walter, R.D., und Muller, S. (2001) Isolation and functional analysis of two thioredoxin peroxidases (peroxiredoxins) from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **113**: 303-308.
- Kroemer, G. (1998) The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways. *Cell Death Differ* **5**: 547.
- Larsen, P.L. (1993) Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 8905-8909.
- Lee, S.P., Hwang, Y.S., Kim, Y.J., Kwon, K.S., Kim, H.J., Kim, K., und Chae, H.Z. (2001) Cyclophilin a binds to peroxiredoxins and activates its peroxidase activity. *J Biol Chem* **276**: 29826-29832.
- Lee, S.R., Kim, J.R., Kwon, K.S., Yoon, H.W., Levine, R.L., Ginsburg, A., und Rhee, S.G. (1999) Molecular cloning and characterization of a mitochondrial selenocysteine-containing thioredoxin reductase from rat liver. *J Biol Chem* **274**: 4722-4734.
- Levick, M.P., Tetaud, E., Fairlamb, A.H., und Blackwell, J.M. (1998) Identification and characterisation of a functional peroxiredoxin from *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* **96**: 125-137.

- Link, A.J., Robison, K., and Church, G.M. (1997) Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. *Electrophoresis* **18**: 1259-1313.
- Lu, W., Egerton, G.L., Bianco, A.E., and Williams, S.A. (1998) Thioredoxin peroxidase from *Onchocerca volvulus*: a major hydrogen peroxide detoxifying enzyme in filarial parasites. *Mol Biochem Parasitol* **91**: 221-235.
- McGonigle, S., Dalton, J.P., and James, E.R. (1998) Peroxiredoxins: A New Antioxidant Family. *Parasitology Today* **14**: 139-145.
- Mitsumoto, A., Takanezawa, Y., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nakagawa, Y. (2001) Variants of peroxiredoxins expression in response to hydroperoxide stress. *Free Radic Biol Med* **30**: 625-635.
- Mizusawa, H., Ishii, T., and Bannai, S. (2000) Peroxiredoxin I (macrophage 23 kDa stress protein) is highly and widely expressed in the rat nervous system. *Neurosci Lett* **283**: 57-60.
- Montemartini, M., Kalisz, H.M., Hecht, H.J., Steinert, P., and Flohe, L. (1999) Activation of active-site cysteine residues in the peroxiredoxin-type trypanothione peroxidase of *Crithidia fasciculata*. *Eur J Biochem* **264**: 516-524.
- Moore, R.B., Mankad, M.V., Shriver, S.K., Mankad, V.N., and Plishker, G.A. (1991) Reconstitution of Ca(2+)-dependent K⁺ transport in erythrocyte membrane vesicles requires a cytoplasmic protein. *J Biol Chem* **266**: 18964-18968.
- Neumann, C.A., Krause, D.S., Carman, C.V., Das, S., Dubey, D.P., Abraham, J.L., Bronson, R.T., Fujiwara, Y., Orkin, S.H., and Van Etten, R.A. (2003) Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature* **424**: 561-565.
- Nguyen-nhu, N.T., and Knoops, B. (2002) Alkyl hydroperoxide reductase 1 protects *Saccharomyces cerevisiae* against metal ion toxicity and glutathione depletion. *Toxicol Lett* **135**: 219-228.
- Nogoceke, E., Gommel, D.U., Kiess, M., Kalisz, H.M., and Flohe, L. (1997) A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. *Biol Chem* **378**: 827-836.
- Noh, D.Y., Ahn, S.J., Lee, R.A., Kim, S.W., Park, I.A., and Chae, H.Z. (2001) Overexpression of peroxiredoxin in human breast cancer. *Anticancer Res* **21**: 2085-2090.
- Novoselov, S.V., Peshenko, I.V., Popov, V.I., Novoselov, V.I., Bystrova, M.F., Evdokimov, V.J., Kamzalov, S.S., Merkulova, M.I., Shuvaeva, T.M., Lipkin, V.M., and Fesenko, E.E. (1999) Localization of 28-kDa peroxiredoxin in rat epithelial tissues and its antioxidant properties. *Cell Tissue Res* **298**: 471-480.
- Ogg, S.C., Anderson, P., and Wickens, M.P. (1990) Splicing of a *C. elegans* myosin pre-mRNA in a human nuclear extract. *Nucleic Acids Res* **18**: 143-149.
- Okado-Matsumoto, A., Matsumoto, A., Fujii, J., and Taniguchi, N. (2000) Peroxiredoxin IV is a secretable protein with heparin-binding properties under reduced conditions. *J Biochem (Tokyo)* **127**: 493-501.

- Olczak, A.A., Olson, J.W., und Maier, R.J. (2002) Oxidative-stress resistance mutants of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* **184**: 3186-3193.
- Park, S.G., Cha, M.K., Jeong, W., und Kim, I.H. (2000) Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 5723-5732.
- Pedrajas, J.R., Miranda-Vizuete, A., Javanmardy, N., Gustafsson, J.A., und Spyrou, G. (2000) Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *J Biol Chem* **275**: 16296-16301.
- Peshenko, I.V., Novoselov, V.I., Evdokimov, V.A., Nikolaev, Y.V., Kamzalov, S.S., Shuvaeva, T.M., Lipkin, V.M., und Fesenko, E.E. (1998) Identification of a 28 kDa secretory protein from rat olfactory epithelium as a thiol-specific antioxidant. *Free Radic Biol Med* **25**: 654-659.
- Peshenko, I.V., und Shichi, H. (2001) Oxidation of active center cysteine of bovine 1-Cys peroxiredoxin to the cysteine sulfenic acid form by peroxide and peroxynitrite. *Free Radic Biol Med* **31**: 292-303.
- Pfeilschifter, J., Eberhardt, W., und Huwiler, A. (2003) Nitric oxide and mechanisms of redox signaling. *J Am Soc Nephrol* **14**: S237-240.
- Poole, L.B. (1996) Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. 2. Cystine disulfides involved in catalysis of peroxide reduction. *Biochemistry* **35**: 65-75.
- Poole, L.B., Reynolds, C.M., Wood, Z.A., Karplus, P.A., Ellis, H.R., und Li Calzi, M. (2000) AhpF and other NADH:peroxiredoxin oxidoreductases, homologues of low Mr thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* **267**: 6126-6133.
- Radyuk, S.N., Sohal, R.S., und Orr, W.C. (2003) Thioredoxin peroxidases can foster cytoprotection or cell death in response to different stressors: over- and under-expression of thioredoxin peroxidase in *Drosophila* cells. *Biochem J* **371**: 743-752.
- Rhee, S.G., Bae, Y.S., Lee, S.R., und Kwon, J. (2000) Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE* **2000**: PE1.
- Rhee, S.G., Chang, T.S., Bae, Y.S., Lee, S.R., und Kang, S.W. (2003) Cellular regulation by hydrogen peroxide. *J Am Soc Nephrol* **14**: S211-215.
- Robertson, L., Robertson, W.M., Sobczak, M., Helder, J., Tetaud, E., Ariyanayagam, M.R., Ferguson, M.A., Fairlamb, A., und Jones, J.T. (2000) Cloning, expression and functional characterisation of a peroxiredoxin from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol Biochem Parasitol* **111**: 41-49.
- Sanger, F., Coulson, A.R., Barends, B.G., Smith, A.J., Roe, B.A. (1980) Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J Mol Biol* **143**: 161-78
- Schreck, R., Rieber, P., und Baeuerle, P.A. (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *Embo J* **10**: 2247-2258.

- Schroder, E., Littlechild, J.A., Lebedev, A.A., Errington, N., Vagin, A.A., und Isupov, M.N. (2000) Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution. *Structure Fold Des* **8**: 605-615.
- Seo, M.S., Kang, S.W., Kim, K., Baines, I.C., Lee, T.H., und Rhee, S.G. (2000) Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J Biol Chem* **275**: 20346-20354.
- Sies, H. (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* **215**: 213-219.
- Starich, T.A., Herman, R.K., und Shaw, J.E. (1993) Molecular and genetic analysis of unc-7, a *Caenorhabditis elegans* gene required for coordinated locomotion. *Genetics* **133**: 527-541.
- Stone, J.R., und Collins, T. (2002) The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. *Endothelium* **9**: 231-238.
- Tetaud, E., und Fairlamb, A.H. (1998) Cloning, expression and reconstitution of the trypanothione-dependent peroxidase system of *Crithidia fasciculata*. *Mol Biochem Parasitol* **96**: 111-123.
- Tsuji, N., Kasuga-Aoki, H., Isobe, T., und Yoshihara, S. (2000) Cloning and characterisation of a peroxiredoxin from the swine roundworm *Ascaris suum*. *Int J Parasitol* **30**: 125-128.
- Wang, X., Phelan, S.A., Forsman-Semb, K., Taylor, E.F., Petros, C., Brown, A., Lerner, C.P., und Paigen, B. (2003) Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidative stress. *J Biol Chem* **278**: 25179-25190.
- Wieringa, B., Hofer, E., und Weissmann, C. (1984) A minimal intron length but no specific internal sequence is required for splicing the large rabbit beta-globin intron. *Cell* **37**: 915-925.
- Wong, C.M., Zhou, Y., Ng, R.W., Kung Hf, H.F., und Jin, D.Y. (2002) Cooperation of yeast peroxiredoxins Tsa1p and Tsa2p in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J Biol Chem* **277**: 5385-5394.
- Wonsey, D.R., Zeller, K.I., und Dang, C.V. (2002) The c-Myc target gene PRDX3 is required for mitochondrial homeostasis and neoplastic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 6649-6654.
- Wood, Z.A., Poole, L.B., Hantgan, R.R., und Karplus, P.A. (2002) Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry* **41**: 5493-5504.
- Wood, Z.A., Poole, L.B., und Karplus, P.A. (2003a) Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* **300**: 650-653.
- Wood, Z.A., Schroder, E., Robin Harris, J., und Poole, L.B. (2003b) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* **28**: 32-40.
- Yanagawa, T., Ishikawa, T., Ishii, T., Tabuchi, K., Iwasa, S., Bannai, S., Omura, K., Suzuki, H., und Yoshida, H. (1999) Peroxiredoxin I expression in human thyroid tumors. *Cancer Lett* **145**: 127-132.

- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P., und Wang, X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* **275**: 1129-1132.
- Yang, K.S., Kang, S.W., Woo, H.A., Hwang, S.C., Chae, H.Z., Kim, K., und Rhee, S.G. (2002) Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid. *J Biol Chem* **277**: 38029-38036.
- Yim, M.B., Chae, H.Z., Rhee, S.G., Chock, P.B., und Stadtman, E.R. (1994) On the protective mechanism of the thiol-specific antioxidant enzyme against the oxidative damage of biomacromolecules. *J Biol Chem* **269**: 1621-1626.
- Zhang, P., Liu, B., Kang, S.W., Seo, M.S., Rhee, S.G., und Obeid, L.M. (1997) Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. *J Biol Chem* **272**: 30615-30618.
- Zheng, M., Aslund, F., und Storz, G. (1998) Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* **279**: 1718-1721.
- Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Brustugun, O.T., und Doskeland, S.O. (1998) Injected cytochrome c induces apoptosis. *Nature* **391**: 449-450.
- Zipfel, P.F., Schrum, S., Bialonski, A., und Buttner, D.W. (1998) The peroxidoxin 2 protein of the human parasite *Onchocerca volvulus*: recombinant expression, immunolocalization, and demonstration of homologous molecules in other species. *Parasitol Res* **84**: 623-631.
- Zoratti, M., und Szabo, I. (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* **1241**: 139-176.

DANKSAGUNG

Frau PD Dr. Iris Bruchhaus möchte ich für die Bereitstellung dieses spannenden Themas, die Betreuung meiner Arbeit und ihre stetige Diskussionsbereitschaft danken.

Herrn Prof. Dr. Egbert Tannich danke ich für die Unterstützung dieses Projektes, seine wertvollen Anregungen und sein großes Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Rolf D. Walter danke ich für die bereitwillige Übernahme des Koreferates.

Besonderer Dank geht an Frau Dr. Eva Liebau für ihre fachliche und praktische Unterstützung sowie ihre Diskussionsbereitschaft und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Ein großes Dankeschön für die tolle Zusammenarbeit und die gute Stimmung im Labor, ihre Unterstützung, ihre Hilfsbereitschaft und ihr Interesse geht an meine Kolleginnen Sassia Touzni, Simone Harder, Meike Bente, Ina Hennings und Heidrun v. Thien – es hat Riesenspaß gemacht, mit Euch zusammen zu arbeiten!

Zuletzt und doch zuerst möchte ich mich bei meinen Eltern und Jogi für ihre Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Ermutigungen bedanken.

CURRICULUM VITAE

| | |
|--|--|
| Zur Person | Kerstin Isermann geboren am 09.02.1974 in Hamburg ledig |
| Promotion 02/2001 bis 02/2004 | Dissertation am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg (Abteilung für Molekulare Parasitologie) bei Fr. PD Dr. Iris Bruchhaus: <i>Die Peroxiredoxine des Nematoden Caenorhabditis elegans (Maupas, 1900)</i> |
| 07/2004 | Disputation |
| Berufstätigkeit 02/2001 bis 02/2004 | Wissenschaftliche Angestellte am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg (Abteilung für Molekulare Parasitologie) |
| Studium der Biologie 10/1997 bis 02/2001 | Hauptstudium an der Universität Hamburg (Fächer: Zoologie, Genetik, Biochemie) mit Abschluss Diplom Diplomarbeit am Zoologischen Institut in Hamburg in der Abteilung Neurophysiologie bei Dr. Thomas Röder: <i>Muscarinische Acetylcholinrezeptoren des Nematoden Caenorhabditis elegans (Maupas, 1900)</i> |
| 10/1994 bis 09/1997 | Grundstudium an der Universität Hamburg |
| Auslandsaufenthalt 09/1993 bis 06/1994 | Akademisches Auslandsstudienjahr am <i>Mills College</i> , Oakland, Kalifornien, USA |
| Schulbildung 08/1984 bis 06/1993 | Gymnasium Glinde mit Abschluss Abitur |
| 08/1980 bis 06/1984 | Grundschule Tannenweg, Glinde |