

# Apoptose-Induktion durch mitochondriale Ferredoxine

(aus Säugern, Insekten & der Spaltheife)

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III  
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften  
der Universität des Saarlandes  
von

**Evi Derouet-Hümbert**

Saarbrücken  
2007

Tag des Kolloquiums:

04. Juni 2007

Dekan:

Professor Dr. U. Müller

Berichterstatter:

Vorsitzender:

Professor Dr. M. Kiemer

Gutachter:

PD Dr. M. Bureik

Professor Dr. U. Müller

Akademische Mitarbeiterin:

Dr. K. Hollemeyer

meinen Eltern

## A Short Fable

(by Richard N. Zare)

- but some confusing parts have been paraphrased by S. Krause -

One day a fox was travelling through the forest, when she entered into a clearing and saw a rabbit busily working a typewriter. Naturally, this unusual phenomenon intrigued the fox. So she approached the rabbit and instead of immediately eating her, asked what was going on.

"I'm typing my thesis," said the rabbit.

"What is the topic of your thesis," asked the fox.

"It's called Why Rabbits Eat Foxes."

"That's crazy," said the fox, "everyone knows that foxes eat rabbits, not the other way around."

"Why don't we step into my den and discuss this," the rabbit said, and the fox agreed. Time passed. Soon the rabbit emerged from the den, but the fox did not.

The following day, a wolf came into the same clearing. Same story, except this time the thesis title was Why Rabbits Eat Wolves. Same outcome: the rabbit came out of the den but the wolf did not. The day after, there was a similar occurrence with a weasel.

All this time an owl had been watching all this, she wondered why all the other animals had not come out, and said to herself "I must see what is going on here." So the owl crept up very quietly to the entrance of the rabbit's hole and peered in. After her eyes became accustomed to the darkness, she saw in one corner a neat pile of fox bones. Nearby, another pile of wolf bones. And in the middle of the den was an enormous, mean-looking Lion, who was just finishing a nice weasel dinner.

Moral: It is not the thesis topic that matters; it is choosing the right advisor.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGEN</b>		I
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>		IV
1.1	Zusammenfassung	IV
1.2	Summary (Zusammenfassung in englischer Sprache)	V
<b>2. EINLEITUNG</b>		1
<b>2.1 Die Apoptose</b>		1
2.1.1	Morphologie der Apoptose	1
2.1.2	Regulationsmechanismen der Apoptose	2
2.1.2.1	Der Zellzyklus	2
2.1.2.2	Die Tumorsuppressorgene p53 und p21	3
2.1.2.3	Mechanismus der zytotoxischen Wirkung von 5-Fluorouracil	3
2.1.3	Induktion der Apoptose	4
<b>2.2 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)</b>		6
2.2.1	Grundlegende Reaktionen zur Bildung von (ROS)	6
2.2.2	Die mitochondriale Elektronentransportkette	8
2.2.3	Das mitochondriale Cytochrom P450-Steroidhydroxylasesystem als	9
2.2.3.1	ROS-Bildner	10
2.2.4	Einteilung der Steroidhydroxylasesysteme	12
	Katalysemechanismus der Steroidhydroxylierung / Shunt-Pathway	
<b>2.3 Adrenodoxin</b>		13
2.3.1	Modelle des Adx-vermittelten Elektronentransportes	14
2.3.2	AdR- und Adx-vermittelte Radikalbildung	15
<b>2.4 Verknüpfung von Komponenten der Steroidhydroxylasesysteme mit der Apoptose</b>		16
<b>2.5 Die Cytochrome P450 in Insekten</b>		16
2.5.1	Mitochondriale P450 in <i>D. melanogaster</i>	17
<b>2.6 Die Spaltheife (<i>Schizosaccaromyces pombe</i>) als Modellorganismus</b>		18
2.6.1	Apoptose in Hefezellen	19
2.6.2	Zellzyklusanalyse mittels Hefezellen	20
<b>2.7 Zielsetzung</b>		21

---

<b>3.</b>	<b>MATERIAL &amp; METHODEN</b>	22
<b>3.1</b>	<b>Zellkulturmethoden &amp; fluoreszenzbasierte Untersuchungen</b>	22
3.1.1	Kultivierung von Säuger-Zellen	22
3.1.2	Transiente Transfektion	23
3.1.2.1	DEAE-Dextran Methode	23
3.1.2.2	Effectene® Transfektionsreagenz	23
3.1.3	Fluorimetrische Verfahren	24
3.1.3.1	Durchflußzytometrie	24
3.1.3.2	Bestimmung der Zell-Überlebensrate (Zelluntergangs-Assay)	25
3.1.3.3	Bestimmung der DNA-Degradation mittels enzymatischer Markierungsmethode (CaspSCREEN)	25
3.1.3.4	Mikroskopische Darstellung apoptotischer Zellen	25
3.1.3.5	Fluorimetrisches Verfahren zum Nachweis der ROS-Bildung	26
3.1.3.6	Bestimmung von Veränderungen im Mitochondrienpotential mittels MitoCapture™ Apoptosis Detection Kit	26
<b>3.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	27
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
3.2.2	Agarosegel-Elektrophorese	28
3.2.3	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	28
3.2.4	Ligation	28
3.2.5	Kultivierung von <i>Bakterien</i>	29
3.2.5.1	Bakterienglycerolkulturen	30
3.2.5.2	Herstellung kompetenter Bakterien	30
3.2.5.3	Bakterientransformation	30
3.2.5.4	Plasmidisolierung aus Bakterien	30
3.2.5.5	Photometrische Bestimmung der Plasmidkonzentration	30
3.2.6	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	31
3.2.7	DNA-Sequenzierung	31
<b>3.3</b>	<b>Proteinchemische Methoden</b>	31
3.3.1	Proteinextraktion aus Säugerzellen	31
3.3.2	Proteinextraktion aus Hefezellen	31
3.3.3	Proteinextraktion aus Bakterienkulturen	32
3.3.4	Aufreinigung der Proteine aus Bakterienkulturen	32
3.3.4.1	Säulenchromatographische Aufreinigungsverfahren	32
<b>3.4</b>	<b>Proteincharakterisierung</b>	33
3.4.1	UV/Vis-Spektren	33
3.4.2	Circular-Dichroismus(CD)-Spektroskopie	33
3.4.2.1	Bestimmung der thermischen Stabilität mittels (CD)-Spektroskopie	33
3.4.3	Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	34
3.4.4	Western Blot und immunologischer Proteinnachweis	34
3.4.5	Aktivitätsanalyse mittels <i>in vitro</i> Rekonstitution	35
3.4.6	Redoxpotentialbestimmung	35
3.4.7	ESR-Messungen	36

---

<b>3.5</b>	<b>Hefemethoden</b>	<b>36</b>
3.5.1	<i>S. pombe</i> Stämme	36
3.5.2	Kultivierung von <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	37
3.5.3	Spalthefeglycerolkulturen	37
3.5.4	Hefetransformation	37
3.5.5	Wachstumskurven	38
3.5.6	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Plattentest (Zellviabilitätsassay)	38
3.5.7	DAPI-Färbung	38
3.5.8	Durchflußzytometrische Analysen	38
3.5.9	Annexin V-Staining	39
3.5.10	TUNEL-Assay	39
3.5.11	Dihydrorhodamin123(DHR123)-Assay	39
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Apoptoseinduktion durch Überexpression von Adx oder CYP11A1 in Säugerzelllinien</b>	<b>40</b>
4.1.1	Einfluß der Überexpression von humanem Adx, bovinem Adx und CYP11A1 auf die Überlebensrate verschiedener Zelllinien	40
4.1.2	ROS-Generierung durch Überexpression von Adx oder CYP11A1	42
4.1.3	Überexpression von humanem Adx oder CYP11A1 und der mitochondrialen Apoptose-Pathway	44
<b>4.2</b>	<b>Versuche zur Charakterisierung der Aktivität des humanen Adx-Promotors bei Apoptoseinduktion</b>	<b>48</b>
4.2.1	Klonierung eines Reporterkonstrukts für den Adx-Promotor Untersuchung des Einflusses von Apoptose-induzierenden	48
4.2.2	Reagenzien auf die Aktivität des Adx-Promotors	48
4.2.3	Deletionsanalyse zur Identifikation der relevanten Bereiche des Promotors	50
4.2.4	Serial Analysis of Gene Expression (SAGEmap) der Adx-Expression	55
<b>4.3</b>	<b>Adrenodoxin &amp; Apoptose (Hefezellen)</b>	<b>58</b>
4.3.1	Einfluß von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und Auxotrophiemarkern auf das Wachstum von <i>S. pombe</i> und die ROS-Produktion	58
4.3.2	ROS-Generierung durch Überexpression von Adx	63
4.3.3	Einfluß der ROS-Produktion auf die Apoptose	65
4.3.4	Einfluß der Adx-induzierten, mitochondrialen ROS-Bildung auf den Zellzyklus	67
4.3.5	Einfluß der Überexpression von AdR und CYP11A1 auf die mitochondriale ROS-Produktion in <i>S. pombe</i>	69

---

<b>4.4</b>	<b>Charakterisierung des Adx-Homologen (Benoni) aus (<i>D. melanogaster</i>)</b>	<b>70</b>
4.4.1	<b>Sequenz</b>	70
4.4.2	Expression von Benoni	71
4.4.3	<b>Chromatographische Aufreinigung von Benoni</b>	76
4.4.4	Spektrometrische Charakterisierung von Benoni	78
4.4.4.1	UV/Vis-Spektrum	78
4.4.4.2	Redoxpotential	79
4.4.4.3	ESR-Messungen	79
4.4.5	Aktivitätsanalyse mittels in vitro Rekonstitution	81
4.4.6	Benoni und Apoptose	83
4.4.6.1	Einfluß der Überexpression von Benoni auf die Überlebensfähigkeit verschiedener Zelllinien	83
4.4.6.2	ROS-Bildung durch Überexpression von Benoni	84
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>85</b>
5.1	Adx und CYP11A1 (P450 <sub>sc</sub> ) induzieren Apoptose durch Bildung mitochondrialer ROS	85
5.2	Der Adx-Promotor als schwacher Promotor	88
5.3	Mitochondriale ROS lösen keine Apoptose in <i>S. pombe</i> aus	90
5.4	Benoni – das Adrenodoxin homolog aus <i>D. melanogaster</i>	92
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>95</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>117</b>
A )	Sequenzdaten humaner Adx-Promotor	117
B )	Primer zur Amplifikation des humanen Adx-Promotor	121
C )	Vollständige Auflistung der Adrenodoxin SAGE-Tags	122
D )	Optimierungsreport Benoni (ENTELECHON)	128
E )	Vektorkarte pKKHC-Expressionsvektor	130
F )	Publikationen	131
<b>8.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>132</b>

---

**ABKÜRZUNGEN**

AD	= DNS-Aktivierungsdomäne
ADP	= Adenosindiphosphat
AdR	= Adrenodoxinreduktase
Adx	= Adrenodoxin, adrenales Ferredoxin
Adx <sup>4-108</sup>	= auf 108 Aminosäuren C-terminal verkürzte Form des muren bovinen Adrenodoxins
Adx S112W	= auf 112 Aminosäuren C-terminal verkürzte Form des muren bovinen Adx mit Aminosäure-Substitution an Position 112 Serin zu Tryptophan
Adx T71E	= mures bovines Adrenodoxin mit Aminosäure-Substitutionen an Position 71 Threonin zu Glutaminsäure
Adx WT	= Adrenodoxin Wildtyp, mures bovines Adrenodoxin
Aldo	= Aldosteron
AMP	= Adenosinmonophosphat
ATP	= Adenosintriphosphat
bp	= Basenpaare
BD	= DNS-Bindedomäne
cDNS	= Desoxyribonukleinsäure die mittels reverser Transkriptase aus mRNA gebildet wurde
CYP11A1	= P450 <sub>sc</sub> , Side Chain Cleavage Enzyme
CYP11B1	= 11 $\beta$ -Hydroxylase
Da	= Dalton, Masseinheit für Proteine
DAPI	= 4',6-Diamidino-2-phenylindol
DIDS	= 4,4'-Diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfosäure-dinatrium, ROS-Fänger
DHE	= Dihydroethidium, Reagenz zum Nachweis der ROS-Bildung
DHR123	= Dihydrorhodamin123, Reagenz zum Nachweis der ROS-Bildung
DNS	= Desoxyribonukleinsäure
dNTP	= Desoxyribonukleosid-Triphosphat
EDTA	= Etylendiamintetraacetat
EMM	= Edinburgh Minimalmedium
FACS	= Durchflußzytometer
FAD	= Flavinadenindinucleotid
FMN	= Flavinmononucleotid
GAPDH	= Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
<i>gfp</i>	= <i>green fluorescence protein</i>
GPD	= Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase
H <sub>2</sub> O	= Wasser
HPLC	= <i>high performance liquid chromatography</i>
i. d. R	= in der Regel
IPTG	= Isopropyl- $\beta$ -D-thio-galactopyranosid
kDa	= Kilo-Dalton, Masseneinheit für Proteine = 1000 Da

NAC	= N-acetyl cystein, ROS-Fänger
NADH	= Nicotinamidadenindinucleotid
NADPH	= Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
n. f.	= nicht feststellbar
MnTBAP	= Mn(III)tetrakis(4-Benzoic acid)porphyrin Chlorid, ROS-Fänger
OD	= Optische Dichte
PCR	= Polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion
PI	= Propidiumiodid
RNS	= Ribonukleinsäure
SDS	= Sodium Dodecylsulfat
SDS-PAGE	= <i>Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese</i>
TEMED	= N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIRON	= 1,2-dihydroxybene-3,5-disulfonat, ROS-Fänger
u. A.	= unter Anderem
z. B.	= zum Beispiel
bzw.	= beziehungsweise

**Abkürzungen für Aminosäuren:**

A	Ala	Alanin	L	Leu	Leucin
R	Arg	Arginin	K	Lys	Lysin
N	Asn	Asparagin	M	Met	Methionin
D	Asp	Asparaginsäure	F	Phe	Phenylalanin
C	Cys	Cystein	P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin	S	Ser	Serin
E	Glu	Glutaminsäure	T	Thr	Threonin
G	Gly	Glycin	V	Val	Valin
H	His	Histidin	W	Trp	Tryptophan
I	Ile	Isoleucin	Y	Tyr	Tyrosin

**Einheiten:**

Länge	Meter	m
	Zentimeter	cm
Masse	Gramm	g
Molekulargewicht	Dalton	D
Stromstärke	Ampere	A
Spannung	Volt	V
Temperatur	Celsius	C
Volumen	Liter	l
Wellenlänge	Nanometer	nm
Zeit	Sekunde(n)	s
	Minute(n)	min
	Stunde(n)	h

**Vielfache und Bruchteile:**

$10^6$	Mega	M
$10^3$	Kilo	k
$10^{-3}$	Milli	m
$10^{-6}$	Mikro	$\mu$
$10^{-9}$	Nano	n

# 1. ZUSAMMENFASSUNG

## 1.1 Zusammenfassung

Mitochondriale P450-Systeme sind unverzichtbar für die Steroidbiosynthese in Säugern und bestehen aus drei Proteinen: der Adrenodoxinreduktase (AdR), dem Adrenodoxin (Adx) und einem mitochondrialen P450-Enzym (wie z. B. CYP11A1), welches regio- und stereospezifische Hydroxylierungsreaktionen katalysiert. Es war bereits bekannt, dass Adx und CYP11A1 (aber nicht AdR) *in vitro* reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bilden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals *in vivo* gezeigt, dass die Überexpression von humanem und bovinem Adx in einer Vielzahl von Zelllinien die Überlebensrate signifikant senkt. In der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 führt die transiente Überexpression von humanem Adx zu einer vermehrten Bildung von ROS, einem Zusammenbruch des Transmembranpotentials, zum Austritt von Cytochrom c aus den Mitochondrien, zur Aktivierung von Kaspasen und damit zur Apoptose. Demgegenüber führt eine Überexpression von humanem CYP11A1 lediglich bei manchen Zelllinien zur Apoptose, bei anderen jedoch nicht. Zur Beurteilung der evolutionären Konservierung der Apoptose-Induktion durch mitochondriale Ferredoxine wurden Adx-Überexpressionsversuche mit zwei weiteren Modellsystemen durchgeführt, und zwar mit der Spaltheife *S. pombe* und mit der Fruchtfliege *D. melanogaster*. In der Spaltheife bilden apoptotische Zellen ebenfalls ROS, allerdings war bislang unklar, ob diese ROS-Bildung ursächlich an der Apoptose-Induktion beteiligt ist, oder ob ROS lediglich als Beiprodukt im Verlauf der Apoptose entstehen. Hier konnte nach Expression einer aktivierten Adx-Mutante eine starke ROS-Bildung demonstriert werden, die jedoch nicht mit dem Auftreten typischer apoptotischer Marker oder einer erniedrigten Zellüberlebensrate einhergeht. Demgegenüber war in Zellen von *D. melanogaster* nach Überexpression von humanem Adx und seinem Fruchtfliege-Homologen Benoni sowohl die Bildung mitochondrialer ROS als auch die Auslösung von Apoptose nachweisbar. Das Benoni-Protein wurde erstmals rekombinant exprimiert und aufgereinigt sowie funktionell charakterisiert. Dabei wurde überraschenderweise gefunden, dass dieses Ferredoxin im Unterschied zu allen bislang bekannten Vertretern dieser Proteinfamilie nicht nur einen 2Fe-2S-Cluster enthält, sondern auch ein organisches Radikal.

## 1.2 Summary (Zusammenfassung in englischer Sprache)

Mitochondrial cytochrome P450 systems are an indispensable component of mammalian steroid biosynthesis; they catalyze regio- and stereo-specific steroid hydroxylations and consist of three protein entities: adrenodoxin reductase (AdR), adrenodoxin (Adx), and a mitochondrial cytochrome P450 enzyme (e.g. CYP11A1). It was previously known that Adx and CYP11A1 (but not AdR) are able to generate reactive oxygen species (ROS) *in vitro*.

In this study it was shown for the first time *in vivo* that overexpression of human or bovine Adx causes a significant loss of viability in a number of different cell lines. In the colon carcinoma cell line HCT116, transient overexpression of human Adx leads to increased ROS production, to a disruption of the mitochondrial transmembrane potential, to cytochrome c release from the mitochondria, to caspase activation and, thereby, to apoptosis. In contrast, overexpression of human CYP11A1 induced apoptosis only in some cell lines but failed to do so in others. To assess the evolutionary conservation of the ferredoxin-induced mitochondrial apoptosis, Adx overexpression was also carried out in two other model systems, namely in the fission yeast *S. pombe* and in the fruitfly *D. melanogaster*. In fission yeast ROS are also produced in cells that undergo an apoptotic-like cell death, but remained obscure whether they are actually causative for this phenomenon or whether they are merely produced as a by-product. Here it could be shown that expression of an activated Adx mutant leads to a strong increase in ROS production that is not accompanied by the appearance of typical apoptotic markers or decreased viability. In contrast, after overexpression of Adx or its fruitfly-homologue Benoni in cells of *D. melanogaster* display an increase in mitochondrial ROS production that actually causes apoptosis. The Benoni protein was recombinantly expressed, purified and functionally characterized. Surprisingly, this ferredoxin does not only contain a 2Fe-2S-Cluster but also features an organic radical that has not been found in any other member of this protein family.

---

## 2. EINLEITUNG

### 2.1 Die Apoptose

Das Phänomen des sog. „programmierten Zelltodes“, der Apoptose - abgeleitet vom altgriechischen Ausdruck für das Herabfallen des Laubes im Herbst - wurde bereits 1972 von Kerr und Mitarbeitern beschrieben und analysiert (Kerr *et al.*, 1972). Der Vorgang des Zellsterbens ist ein kompliziertes, durch viele Faktoren reguliertes Phänomen (Kerr *et al.*, 1994). Apoptose spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und bei der Gewebedifferenzierung von vielzelligen Organismen (Abastado, 1996; Glucksmann, 1951). Daher ist sie in den unterschiedlichsten Zelltypen zu finden (Ellis *et al.*, 1991; Korsmeyer, 1992; Reed, 1994; Ucker, 1991; Williams, 1991). Besonders hohe Apoptoseraten zeigen sich in proliferationsfreudigem, labilem Gewebe, wo durch physiologischen Zellverschleiß verbrauchte Zellen fortgehend durch nachwachsende, neue Zellen ersetzt werden müssen. Beispiele sind etwa die Haut, die Schleimhäute, die blutbildenden Zellen des Knochenmarks sowie nahezu alle unbehandelten malignen Tumore, da zu Beginn der Karzinogenese ein gesteigertes Zellwachstum quasi als Abwehrmechanismus von dem betroffenen Organismus hervorgerufen wird. Ebenfalls von Interesse ist die Apoptose für die Kontrolle und Aufrechterhaltung von Funktionen des Immunsystems (Rosler *et al.*, 1992).

#### 2.1.1 Morphologie der Apoptose

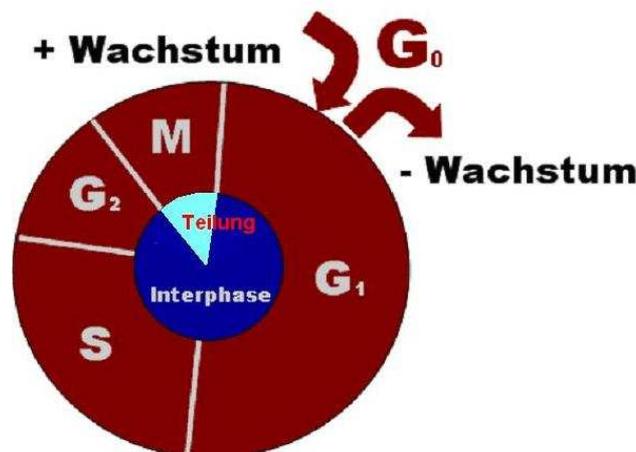
Bei diesem Phänomen handelt sich um eine evolutionär stark konservierte Art des Zelltodes, der durch eine Vielzahl biochemischer und morphologischer Abbauvorgänge der Zelle charakterisiert (Steller, 1995) und eindeutig von der Nekrose zu unterscheiden ist. Ein Hauptkriterium der apoptotischen Prozesse ist das Schrumpfen der Zelle, weswegen dieser Zelltod früher auch als „Schrumpfnekrose“ bezeichnet wurde. Durch Ausbildung von durchlässigen Poren an der Mitochondrienmembran erfolgt die Freisetzung von Cytochrom c, Procaspase-2, -3, -9 und AIF (Apoptose-induzierender Faktor) in den intermediären Spalt (Marchetti *et al.*, 1996). AIF ist durch Aktivierung von Endonukleasen in der Lage, bestimmte morphologische Veränderungen im Bereich des Zellkerns zu bewirken, wie etwa eine Kondensation der Chromatinstruktur (Karyopyknose) und Fragmentierung der Kern-DNS (Karyorrhexis) (Wyllie *et al.*, 1980). Anschließend schnüren sich von der äußeren Zellmembran kleine Vesikel, die sogenannte „Apoptosekörperchen“, ab, welche Kernmaterial und zytoplasmatische Bestandteile enthalten – ein Vorgang, der auch als „blebbing“ bezeichnet wird. Die Beseitigung der apoptotischen Zelle geschieht so schnell, dass dieser Vorgang selbst in Geweben mit hohen Apoptoseraten (z. B. Thymus) nur selten direkt beobachtet werden kann. Von entscheidender Bedeutung ist, dass bei dieser Form des Zellsterbens keine inflammatorische Reaktion ausgelöst wird, d.h., die Phagozyten werden durch den Kontakt mit den sterbenden Zellen nicht aktiviert. Hierfür sind vor allem eine vermehrte Expression von Phosphatidylserin und ein Verlust von bestimmten Kohlehydratresten auf der Außenseite der apoptotischen Zellmembran verantwortlich. Im Gegensatz zur Apoptose wird die Nekrose durch nicht-zelluläre Mechanismen wie beispielsweise

Thrombosen, Traumata oder Ischämien ausgelöst. (Haunstetter & Izumo, 1998; Schaper *et al.*, 1999).

## 2.1.1 Regulationsmechanismen der Apoptose

### 2.1.2.1 Der Zellzyklus

Als Zellzyklus bezeichnet man den regelmäßigen Wechsel zwischen einer **Interphase**, in der sich die Zellen in höchster Stoffwechselaktivität befinden, und der Zellteilung (Mitose), bei der die Erbinformation durch ein vorgegebenes Teilungsmuster auf die beiden entstehenden Tochterzellen verteilt wird. Einer Mitose geht immer eine Interphase voraus. Man unterscheidet in der Interphase 3 Abschnitte: die **G<sub>1</sub>-Phase** (Wachstumsphase der Zelle), die **S-Phase** (Replikationsphase der DNS) sowie die **G<sub>2</sub>-Phase** (Wachstumsphase ohne DNS-Synthese). Die Phase zwischen zwei Mitosen wird zusammenfassend auch als **Interphase** bezeichnet. Differenziert eine Zelle zu einer Dauerzelle, so verlässt sie den Zellzyklus und teilt sich dann nicht mehr. Dieser Zustand wird als **G<sub>0</sub>-Phase** bezeichnet (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Darstellung der unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus

Die Regulation des Zellzyklus wird, besonders an den Übergängen von der G<sub>1</sub>- in die S- und G<sub>2</sub>- in die M-Phase, über eine Gruppe von heterodimeren Proteinkinasen gesteuert. Diese cyclinabhängigen Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, CDKs) (Ayte *et al.*, 2001; Kearsey *et al.*, 1996; Noguchi *et al.*, 2002; Sherr, 1994; Watanabe *et al.*, 1995) bereiten die Zelle auf den Eintritt in die S-Phase vor, indem sie Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung aktivieren. Diese Faktoren wiederum bewirken die Expression von Enzymen, die für die Synthese der DNS in der S-Phase notwendig sind. Die CDKs selbst werden auf mehreren Ebenen reguliert und nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus exprimiert. Es erfolgt zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine Aktivierung der Cdk's mittels Bindung an Cycline, eine Inhibierung durch Bindung an CDK-Inhibitoren, eine aktivierende Phosphorylierung der CDKs durch die „Cdk activating kinase“ (CAK) und eine inhibierende Phosphorylierung durch Kinasen, die durch Phosphatasen wieder aufgehoben werden kann.

### 2.1.2.2 Die Tumorsuppressorgene p53 und p21

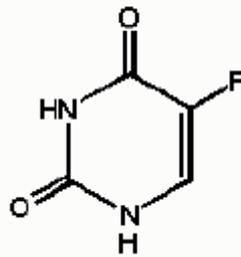
Tumorsuppressorgene wie p53 und p21 sind Regulatoren der Zellproliferation, welche die Zellvermehrung aktiv unterdrücken können. Sie spielen vor allem bei der Tumorgenese eine große Rolle. Wenn sie inaktiviert werden, kommt es zur übermäßigen Zellteilung. Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 stellen einen der häufigsten genetischen Defekte bei Tumoren dar. Als Antwort auf zellulären Stress, wie z. B. bei DNS-Schädigung und Aktivierung von Onkogenen, wird p53 aktiviert und induziert zahlreiche Zielgene - unter ihnen auch p21. (Bouvard *et al.*, 2000; Choisy-Rossi *et al.*, 1998; Choisy-Rossi *et al.*, 1999; Choisy-Rossi & Yonish-Rouach, 1998).

Durch das Einbringen des p53-Gens vom Wildtyp in Zellen mit fehlender normaler p53-Aktivität konnten einige seiner Funktionen identifiziert werden. Hierzu gehört auch die Regulierung des Zellwachstums mittels Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase (Kaufmann & Earnshaw, 2000; Oren, 1992). Im Gegensatz dazu konnte in einigen Tumoren jedoch auch eine erhöhte Apoptoserate nach p53-Expression gefunden werden (Kaufmann & Earnshaw, 2000; Yonish-Rouach *et al.*, 1991). In Zellen mit bekannter p53-Deletion konnte gezeigt werden, dass manche Mechanismen der Apoptoseinduktion nur im Beisein von intaktem p53 funktionieren, da es in diesen Zellen nicht möglich war, Apoptose durch Bestrahlung auszulösen, wohl aber durch Glucocorticoideinsatz (Donehower *et al.*, 1992).

Im Gegensatz zu gesunden Zellen zeichnen sich Tumorzellen durch unkontrolliertes Wachstum aus. Die CDKs kontrollieren wie bereits beschrieben den Zellzyklus. Ihre Aktivität ist durch die Bindung von Cyclinen (Sherr, 1994) sowie durch Phosphorylierung, Dephosphorylierung und durch die Assoziation mit verschiedenen negativ regulierenden Proteinen gesteuert. p21 ist ein solcher Regulator und gehört zur Gruppe der Cyclin-Kinase-Inhibitoren (*cyclin-kinase-inhibitors*, CKIs), wodurch es einen entscheidenden Einfluß auf den Zellzyklus erhält. In Tumoren wurden zwar nur selten Mutationen des p21-Gens gefunden, es ist jedoch durch seine Regulation durch das Tumor-Suppressor-Protein p53 (el-Deiry *et al.*, 1994; Michieli *et al.*, 1994; Shiohara *et al.*, 1994) indirekt an der Tumorgenese beteiligt (Cregan *et al.*, 1994). Entfällt der von p21 kontrollierte Zellzyklusstopp nach DNS-Schädigung, repliziert die Zelle ihr Genom mit den vorhandenen DNS-Schäden weiter.

### 2.1.2.3 Mechanismus der zytotoxischen Wirkung von 5-Fluorouracil

5-Fluorouracil (5-FU) ist ein Medikament aus der Gruppe der Zytostatika und wurde 1957 erstmals synthetisiert (Heidelberger & Anderson, 1964). Zytostatika haben die Eigenschaft, das Wachstum von Tumorzellen zu verlangsamen oder diese sogar abzutöten. 5-FU ist das am besten wirkende Chemotherapeutikum für Patienten mit Dickdarmkrebs und wird seit Jahrzehnten klinisch verwendet (Schull & Scheithauer, 2002). Es blockiert das Enzym Thymidylsynthase, indem es die Synthese von RNS und DNS inhibiert. Bei 3-5% der Behandelten treten jedoch schwere, z. T. tödliche Nebenwirkungen auf, die mit einem kompletten oder partiellen Verlust des für die metabolische Inaktivierung von 5-FU verantwortlichen Enzyms Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) in Zusammenhang gebracht werden (Fuwa *et al.*, 2002; Stanford *et al.*, 1976; Stanford *et al.*, 1977).



**Abbildung 2:** Strukturformel von 5-Fluorouracil

Bei der Therapie wird häufig versucht, den Effekt von 5-FU durch Kombination mit anderen Chemotherapeutika, Zusätze wie Folsäure sowie durch unterschiedliche Applikationsdauer zu verstärken. Eine Resistenz gegenüber 5-FU lässt sich durch Erhöhung der Thymidylatsynthetaseaktivität im Tumor, Suppression der Expression von Enzymen, die 5-FU in seine aktive Form umwandeln, Erhöhung der Metabolisierungsrate von 5-FU und Erhöhung der Menge an Deoxyuridinmonophosphat (dUMP), dem normalen Substrat der Thymidylatsynthetase (Fukushima *et al.*, 2001; Kimhi *et al.*, 2004; Nemunaitis *et al.*, 1997; Peters *et al.*, 1994) erklären.

Vielfältige Studien bei Patienten und in experimentellen Systemen beschreiben einen Zusammenhang zwischen der Inaktivierung von p53 und der Resistenz gegenüber 5-FU (Boyer *et al.*, 2004; Izawa *et al.*, 2005; Tiezzi *et al.*, 2006). Es wurde z. B. eine grundlegende Resistenz gegenüber durch 5-FU induzierter Apoptose in menschlichen Kolonkarzinomzellen (HCT116) mit einer zielgerichteten Ausschaltung des p53-Gens (HCT116(p53<sup>-/-</sup>)) gefunden (Hwang *et al.*, 2001). Diese Beobachtungen liefern eine Basis, um die 5-FU-Chemosensitivität genetisch zu untersuchen, indem man isogenetische Zellen, die sich einzig in ihrem p53-Status unterscheiden, als *in vitro*-System verwendet.

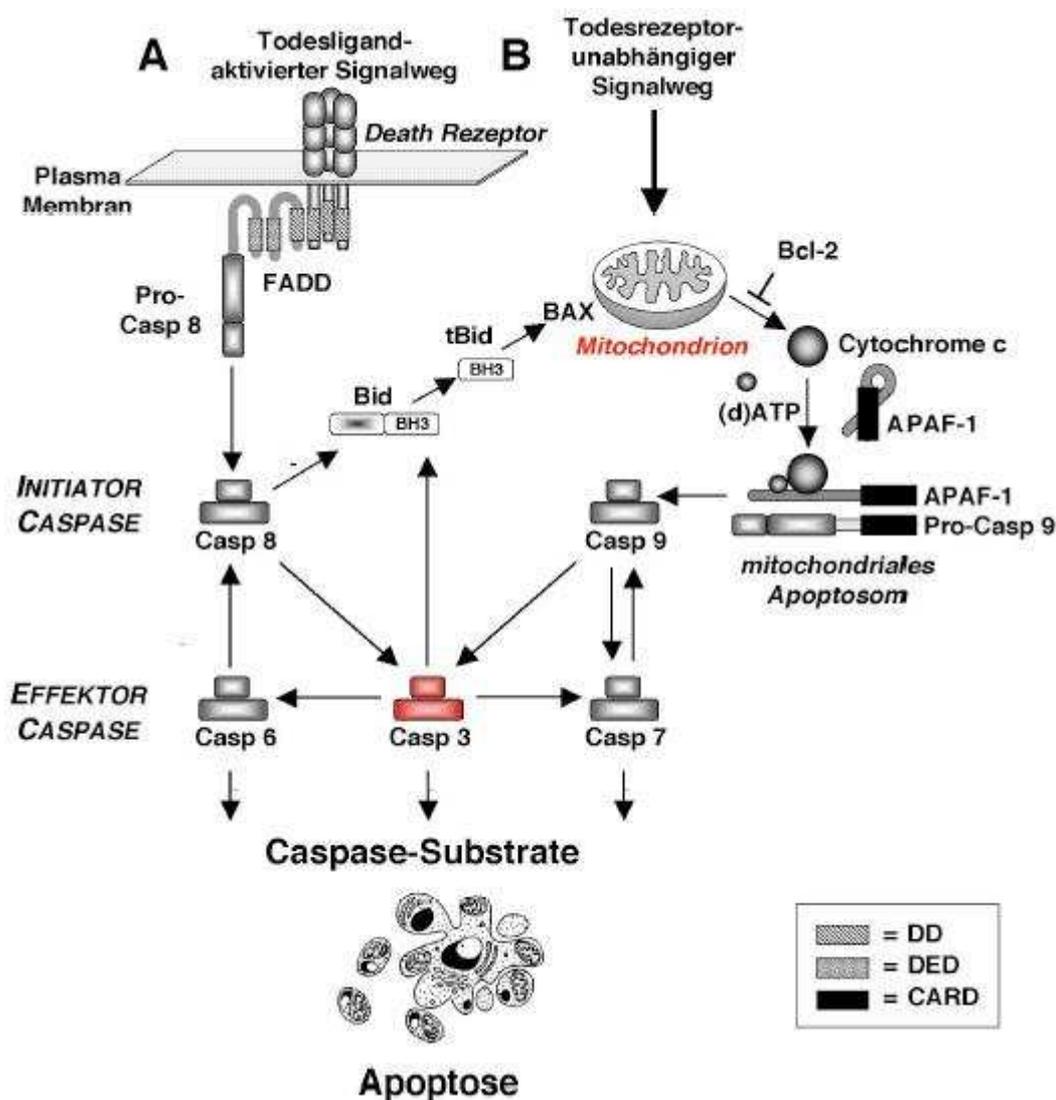
### 2.1.3 Induktion der Apoptose

Der Prozess der Apoptoseauslösung kann generell in zwei Kategorien eingeteilt werden: Der intrinsische (oder mitochondriale) und der extrinsische (oder Todesrezeptor) Signalweg (Hengartner & Bryant, 2000). Der intrinsische Signalweg wird durch bestimmte extrazelluläre Signale oder intrazelluläre Ereignisse wie DNS-Schädigung nach z. B. UV-Bestrahlung, oxidativen Stress oder aber durch Protein- und Lipidmodifikationen ausgelöst (Spoudeas *et al.*, 1993). Die Mitochondrien spielen hierbei eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung und Ausbreitung der Todessignale innerhalb der Zelle (Desagher & Martinou, 2000; Hwang *et al.*, 2001; Kaufmann & Earnshaw, 2000). Ebenfalls von Bedeutung ist das Tumorsuppressorgen p53, da der Zellzyklus bei entstandenem DNS-Schaden durch p53 in der G1-Phase arretiert, um so Zeit für die Reparatur zu gewinnen. Gelingt dies nicht, wird Apoptose induziert, um die Vermehrung von Stammzellen mit einem DNS-Fehler zu verhindern.

Auch von verschiedenen Zytostatika ist bekannt, dass sie ihre therapeutische Wirkung durch Auslösen von Zellsterben entfalten, wobei neben Tumoren auch schnell wachsende Normalgewebe betroffen sind, was zu unerwünschten Chemotherapie-Nebenwirkungen

und zur Tumorregressionen führt. Hier muss jedoch auch berücksichtigt werden, dass eine Überexpression der Proteinkinase C (PKC) für eine verzögerte Tumorzellantwort auf einen zytostatischen Reiz verantwortlich sein kann (Orly *et al.*, 1994).

Der extrinsische Signalweg wird über die Bildung eines *Death-inducing signal complex*, (DISC) im Cytoplasma vermittelt (Abbildung 3A) (Behrens *et al.*, 2000; Kischkel *et al.*, 1995). Durch Bindung eines Liganden wird ein membranständiger Signalkomplex gebildet, der aus CD95L, CD95 Rezeptor, dem Adapterprotein FADD und der Initiator-Caspase Procaspase-8 besteht, die hierdurch aktiviert wird. Caspase-8 wiederum spaltet und aktiviert die Effektor-Caspase-3, was zur Stimulierung der Caspase-Kaskade führt. Caspasen gehören zur Enzymgruppe der Proteasen. Beim Menschen sind bereits 15 verschiedene Caspasen beschrieben worden. Es handelt sich hierbei um inaktive Proenzyme mit einem Cystein im aktiven Zentrum, die durch proteolytische Spaltung aktiviert werden müssen. In der Zelle liegen die Caspasen als Vorläuferproteine (Procaspasen) vor, welche nach Apoptoseinduktion gespalten werden (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Signalwege zum programmierten Zelltod

Der vollständige Signalweg vom Rezeptor bis zum Auftreten der Todessubstrate beginnt am DISC. Viele apoptotische Stimuli bewirken jedoch zunächst den Austritt von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytosol. Cytochrom c bindet dort an verschiedene Faktoren und aktiviert dadurch indirekt die Caspase-Kaskade (nach Peter Daniel, 2002)

Besonders Caspase-8 und Caspase-3 spielen bei Induktion des Zelltodes eine große Rolle (Gamen *et al.*, 1997). Sie werden je nach Zelltyp unabhängig von der Zellzyklusphase, entweder indirekt durch mitochondriale Aktivierung über Cytochrom c oder direkt in den Apoptosemechanismus eingeschaltet (Hueber *et al.*, 1998; Scaffidi *et al.*, 1998). Die meisten Apoptosestimuli führen zum Austritt von Cytochrom c aus den Mitochondrien und bewirken so einen Verlust des Transmembranpotentials der inneren Mitochondrienmembran. Es bildet sich daraufhin im Zytosol ein Komplex aus Cytochrom c, Caspase-9 und weiteren Faktoren, den man als Apoptosom bezeichnet. Im Apoptosom wird Caspase-9 aktiviert (Abbildung 3B). So genannte Todesfaktoren aktivieren zusätzlich einen von den Mitochondrien unabhängigen Apoptosesignalweg. Dieses System ist vor allem bei der Eliminierung autoreaktiver Lymphozyten sowie für das Abschalten von Immunreaktionen von Bedeutung.

Eine weitere Stimulation der Krebsentstehung erfolgt durch das Hervorrufen oxidativer DNS-Schäden mittels reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die größtenteils durch generelle oder spezifische Reparaturmechanismen beseitigt werden können. Nicht reparierte oxidative DNS-Schäden führen zu permanenten Modifikationen des genetischen Materials und stellen somit ein wichtiges mutagenes Potential dar, das mit zunehmenden Alter akkumuliert. Die ROS-Mutagenität wurde in *Salmonella typhimurium* (Hassan *et al.*, 1991) und Säugetierzellen nachgewiesen, weswegen ROS als Initiatoren der Apoptose angesehen werden können. Die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies steht ebenfalls in Zusammenhang mit der Pathophysiologie zahlreicher Erkrankungen wie z. B. Diabetes (Piconi *et al.*, 2003), Arteriosklerose (White *et al.*, 1994), Hypertonie (Rathaus & Bernheim, 2002), Neoplasien und neurodegenerativen Erkrankungen (Buttke & Sandstrom, 1994; Hardy *et al.*, 1991; Lenaz, 1998; Schapira, 1998; Wallace, 1999) aber auch dem Alterungsprozess generell (Ashok & Ali, 2003). Außerdem spielt oxidativer Stress eine wichtige Rolle bei chronischen und akuten Entzündungen wie der rheumatoiden Arthritis, Eisen- und Kupferstoffwechselstörungen, Reperfusionsschäden, alkoholischen und anderen nutritiv-toxischen Leber- und Organschäden.

## 2.2 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

### 2.2.1 Grundlegende Reaktionen zur Bildung von ROS

Die unterschiedlichsten exogenen und endogenen Faktoren können Zellen unter Stress setzen. Neben hohen Konzentrationen von Metaboliten, Xenobiotika, sind es Hormonerzeugte Signale, Verletzungen, Entzündungen, Hitze, Bestrahlung, Sauerstoffmangel oder auch übermäßige Muskelarbeit, die zum Stress beitragen (Bakonyi T, 2004, Arnhold, 2004 #2979). Die Zelle antwortet auf den Stress u. a. mit der Bildung ROS. Diese entstehen aus unvollständigen Reduktionen von Sauerstoff des zellulären Metabolismus, wenn ein Sauerstoffmolekül weniger als 4 Elektronen aufnimmt (Christen P, 2004); weiterhin durch Autooxidation z. B. von Katecholaminen, Flavinen und Ferrodoxinen (Del Maestro, 1980), Xenobiotika-Einsatz sowie durch eine Vielzahl enzymatischer Reaktionen. Die Zellschädigung, die durch eine Überproduktion von ROS oder durch ein Defizit der Antioxidans- und/oder Reparatursysteme hervorgerufen wird, nennt man oxidativen Stress.

Eine der Hauptursachen für das Entstehen von ROS in Zellen stellt das Entweichen von Elektronen aus Elektronentransferketten dar (Fisher, 1988); so ist beispielsweise bekannt, dass die mitochondriale Atmungskette in der Lage ist, einen signifikanten Anteil

an ROS während der oxidativen Phosphorylierung zu bilden. Bereits der Transfer eines einzelnen Elektrons auf Sauerstoff führt zur Bildung eines Superoxid-Radikals (I):



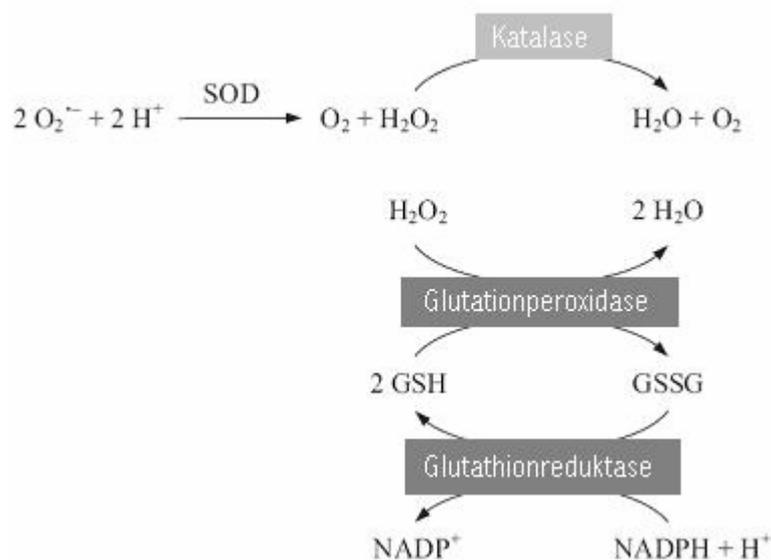
Diese Sauerstoffradikale sind hochreaktive Moleküle, die zum Auslösen einer Kettenreaktion befähigt sind, da sie Ausgangsform einer schwachen Säure sind (II):



Zwei Superoxidradikale können zu Wasserstoffperoxid weiterreagieren, eine Reaktion die man „Dismutation“ nennt (III). Es ist bekannt, dass diese Reaktion den Hauptanteil der in der Atmungskette gebildeten ROS stellt (Chance *et al.*, 1979):



Die gleiche Reaktion kann durch Enzyme wie die Superoxiddismutase (SOD) oder die Glutathionperoxidase katalysiert werden (Abbildung 4).



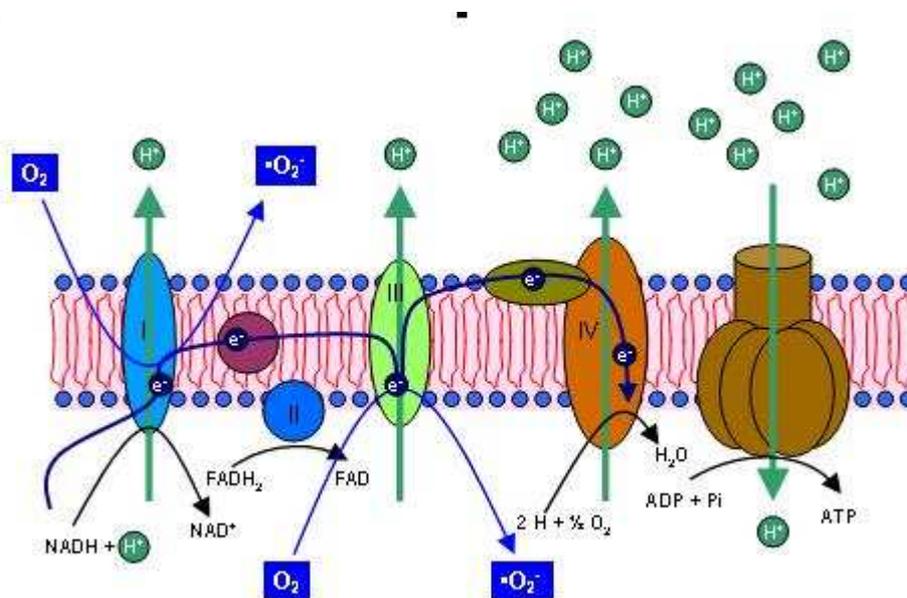
**Abbildung 4:** SOD katalysiert die direkte Umsetzung von Superoxidionen zu  $H_2O_2$

Catalase katalysiert die Reaktion von  $H_2O_2$  in Wasser und Sauerstoff ohne Radikalbildung. Glutathionperoxidase katalysiert die Reduktion von Peroxiden unter Verwendung von Glutathion (GSH) als Reduktionsäquivalent. Das Reaktionsprodukt, oxidiertes Glutathion (GSSG), wird erneut durch die Glutathionreduktase unter Verwendung von NADPH als Reduktionsäquivalent reduziert (modifiziert nach Hanukoglu, 2006).

Aufgrund ihrer hohen Reaktionsfähigkeit können ROS Makromoleküle wie Nukleinsäuren und Proteine und damit letztendlich ganze Zellen schädigen. So werden sie gemeinsam mit oxidativem Stress als möglicher Wirkmechanismus nicht-genotoxischer Kanzerogene angesehen, wie z. B. von Metallen (z. B. Fe, Cu), die selbst nicht kanzerogen wirksam sind (Filipic *et al.*, 2006).

## 2.2.2 Die mitochondriale Elektronentransportkette

Der grösste Teil der metabolischen Energie entsteht in den Mitochondrien mittels enzymatischer Redoxreaktionen. Die Kapazität des aeroben Energiestoffwechsels ist abhängig von der oxidativen Phosphorylierung, die Teil der Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran ist (Abbildung 5). Die mitochondriale Atmungskette besteht aus vier Enzymkomplexen, dem NADH-Dehydrogenase-Komplex (Komplex I), dem Succinat-Dehydrogenase-Komplex (Komplex II), dem Cytochrom  $bc_1$ -Komplex (Komplex III) und dem Cytochrom-c-Oxidase-Komplex (Komplex IV). Die Elektronenpaare werden innerhalb der Atmungskette von NADH und  $FADH_2$  in Abfolge von Redoxreaktionen auf die Komplexe I, II, III und IV und zuletzt auf molekularen Sauerstoff übertragen. Die durch die Elektronenabgabe freiwerdende Energie erzeugt einen Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran, dessen Abbau zur ATP-Erzeugung genutzt (d.h. zur ATP-Synthase) wird (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** ROS-Bildung in den Mitochondrien (Abbildung nach Kübler, Gyga, & Pfaar; 2006)

Der in den Mitochondrien umgesetzte Sauerstoff wird zu etwa 97% vollständig reduziert. Lediglich 1-3% des Sauerstoffs führen durch unvollständige Reduktion an Komplex I (NADH Dehydrogenase) und Komplex III (Cytochrom  $bc_1$ -Komplex) zur Bildung von ROS (Thannickal & Fanburg, 2000). Bis zu 1% des mitochondrialen Elektronenflusses führt zur Bildung von Superoxidanionen (Dalle-Donne *et al.*, 2005). Die auf beiden Seiten der inneren Mitochondrienmembran gebildeten Superoxidanionen werden über die Superoxiddismutase und die Glutathionperoxidase zu Wasserstoffperoxid und Wasser umgewandelt. In den Mitochondrien werden ungefähr 2 nmol Superoxidanionen pro Minute und mg Protein gebildet (Inoue *et al.*, 2003).

Nebem obigem Mechanismus wird in der vorliegenden Arbeit ein weiteres System zur Bildung mitochondrialer ROS *in vivo* und damit zur Auslösung von Apoptose beschrieben, das Cytochrom P450-Steroidhydroxylasesystem.

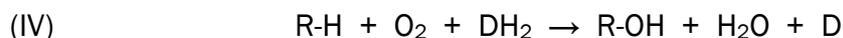
### 2.2.3 Das mitochondriale Cytochrom P450-Steroidhydroxylasesystem als ROS-Bildner

Dieses System besteht aus zwei ubiquitär exprimierten Proteinen, nämlich Adrenodoxinreduktase (AdR) und Adrenodoxin (Adx), sowie einem gewebespezifisch exprimierten, mitochondrialen P450-Enzym, welches als Elektronenakzeptor dient und die eigentliche Hydroxylierungsreaktion katalysiert. Bei den Cytochromen P450 handelt es sich um eine Multienzymfamilie, die Reaktionen katalysiert, bei denen molekularer Sauerstoff reduziert wird. Ihre Reaktionsbreite reicht über Hydroxylierungen, Dealkylierungen, Epoxidierungen bis hin zu weiteren Oxidationsreaktionen (Babcock *et al.*, 1992; Bernhardt, 1996). In Säugern beispielsweise sind sie beim Abbau von Xenobiotika und anderen Fremdstoffen beteiligt. Eine zentrale Rolle kommt ihnen jedoch auch bei der Biosynthese der Steroidhormone und beim Fettsäuremetabolismus zu.

Namensgebend für die Enzymfamilie der Cytochrome P450 war die Entdeckung eines Kohlenmonoxid-bindenden Pigment in den Lebermikrosomen der Ratte durch Klingenberg, welches ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 450 nm zeigt (Klingenberg, 1958). Als Omura und Sato wenige Jahre später dieses Pigment charakterisierten, nannten sie es wegen dieses Absorptionsverhaltens Cytochrom P450 (Coon, 2005; Estabrook, 2005; Omura & Sato, 1964). Normalerweise besitzen die zum Cytochrom b-Typ gehörenden Ferrocabonylkomplexe mit Häm als prosthetischer Gruppe ein Absorptionsmaximum bei 420 nm (Omura & Sato, 1964), Cytochrome P450 hingegen besitzen im reduzierten Zustand aufgrund ihres Kohlenmonoxid-Komplexes ein typisches Absorptionsmaximum bei 450 nm das einzigartig für Eisen(II)-protoporphyrin-haltige Häm-Proteine ist.

Bis 1996 wurden annähernd 500 verschiedene P450 Gene gefunden (Nelson *et al.*, 1996), heute sind es mehr als 6000. Daher wurde 1991 eine internationale Nomenklatur eingeführt (Nebert & Nelson, 1991). Die Nomenklatur der P450-Enzyme beginnt mit dem Stammnamen CYP gefolgt von Familie: Subfamilie: Gen (Nelson *et al.*, 1996). Bei den Monooxygenasen wird zwischen internen und externen Monooxygenasen unterschieden. Während interne Monooxygenasen dem Substrat die beiden erforderlichen Elektronen entziehen, benötigen die externen Monooxygenasen als Co-Substrat einen externen Elektronendonator zur reduktiven Sauerstoffspaltung (Hayaishi, 1969).

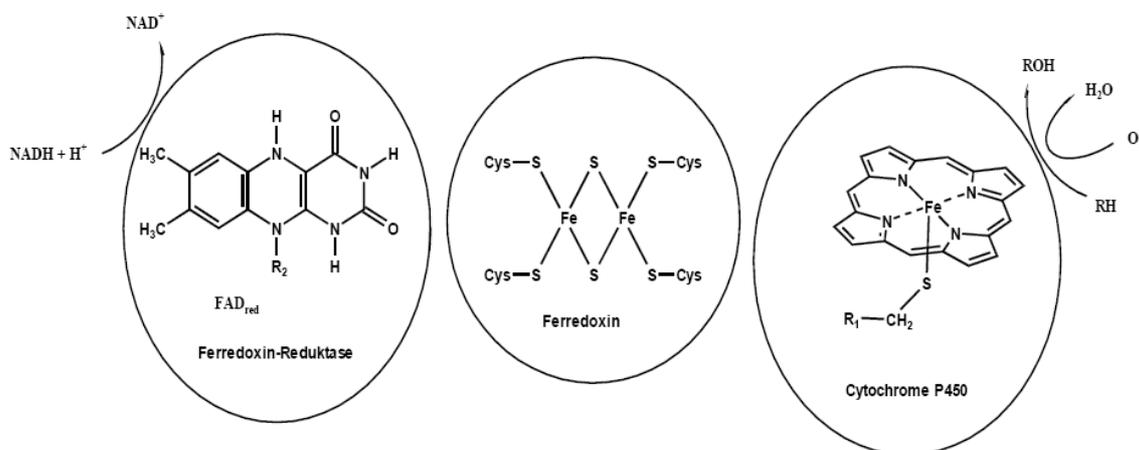
Allgemein katalysieren Cytochrome P450 folgende Hydroxylierungsreaktion (IV):



Hierbei bezeichnet R-H das organische Substrat (z. B. Steroide, Fettsäuren, Terpene, Prostaglandine, Xenobiotika),  $DH_2$  kennzeichnet den Elektronendonator und R-OH steht für das hydroxylierte Substrat.

### 2.2.3.1 Einteilung der Steroidhydroxylasesysteme

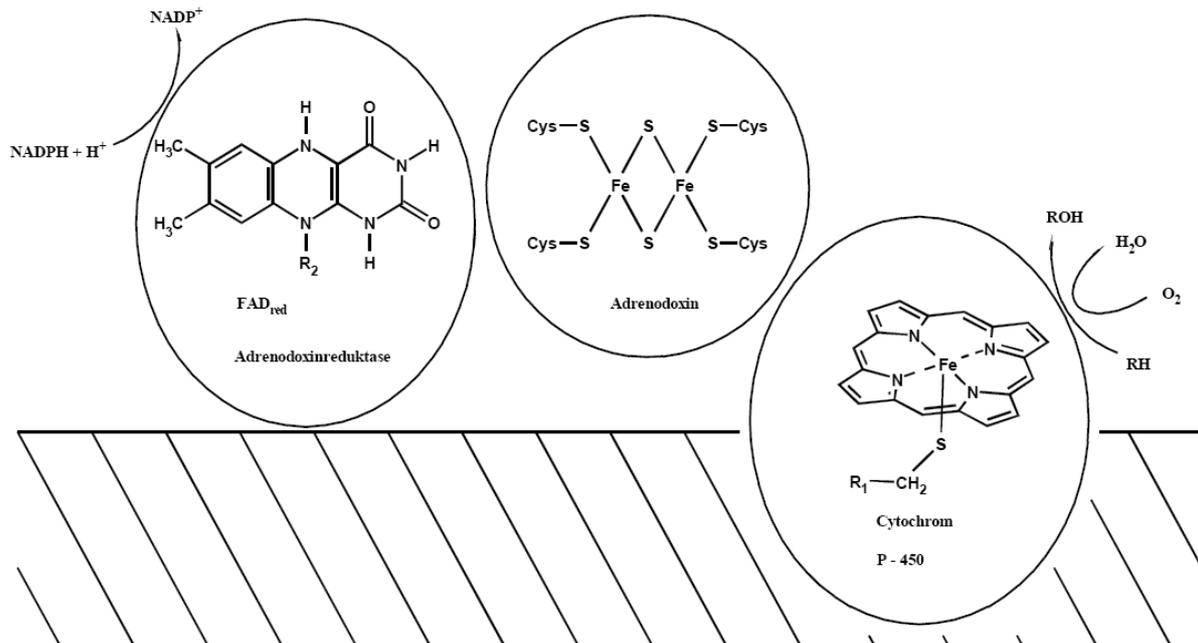
Die P450-Systeme werden in bakterielle/mitochondriale und mikrosomale Systeme unterteilt, die sich u.a. bezüglich ihrer Elektronentransportketten unterscheiden. Beim mitochondrialen/bakteriellen System (Typ I) sind der Elektronenübertragung zwischen NADPH und dem Cytochrom zwei Proteine zwischengeschaltet (Abbildung 6). Es handelt sich einerseits um eine FAD-haltige Ferredoxinreduktase, welche die Elektronen vom NADPH aufnimmt, und zum anderen um ein Ferredoxin, das als reaktive Gruppe einen [2Fe-2S]-Cluster trägt. In den bakteriellen P450-Systemen liegen diese Proteine in einer löslichen Form vor (Bernhardt, 1996; Hanukoglu *et al.*, 1981a; Hanukoglu *et al.*, 1981b)



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung des bakteriellen Cytochrom P450-System

Es besteht aus einer NADH-abhängigen, FAD-haltigen Reduktase, einem Eisen-Schwefel-Protein und einem Cytochrom P450. Alle Komponenten in diesem System sind löslich (nach Bernhardt, 1996).

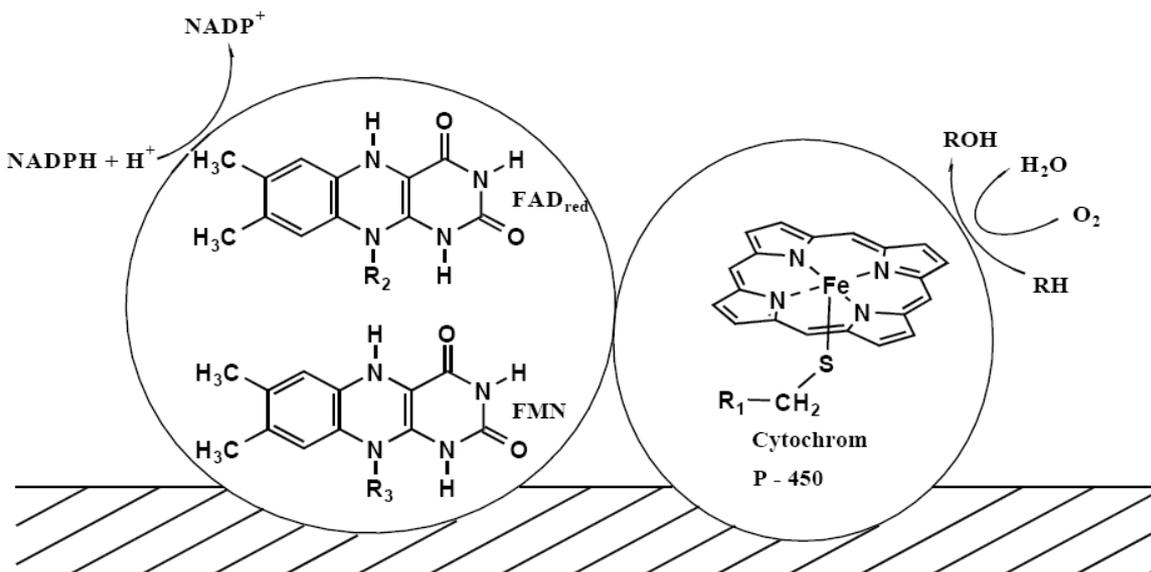
In den mitochondrialen P450-Systemen hingegen existieren eine membranassoziierte Reduktase (Hanukoglu *et al.*, 1990b) sowie ein lösliches Ferredoxin, das die Elektronen von der Reduktase aufnimmt und diese an das in der inneren Mitochondrienmembran verankerte Cytochrom weiterleitet (Abbildung 7) (Bernhardt, 1996; Hanukoglu *et al.*, 1981a; Hanukoglu *et al.*, 1981b). Beim Steroidhydroxylase-System nennt man das Ferredoxin Adx (Grinberg *et al.*, 2000; Ziegler *et al.*, 1999), seine Reduktase entsprechend AdR (ein FAD enthaltendes Flavoenzym) (Bernhardt, 1996); es stellt wie bei den bakteriellen Systemen ein lösliches Protein dar.



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung des mitochondrialen Cytochrom P450-Systems

Im Unterschied zum bakteriellen Cytochrom P450-System liegt die Reduktase im mitochondrialen System an die innere Mitochondrienmembran assoziiert und das Cytochrom in der inneren Mitochondrienmembran gebunden vor (nach Bernhardt, 1996).

Mikrosomale P450-Systeme (Typ II) bestehen aus membrangebundenen P450-Enzymen, die ihre Elektronen von  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  über eine FAD- und FMN-haltige NADPH-P-450-Reduktase beziehen (Degtyarenko & Kulikova, 2001). Das FAD kann hierbei von zwei Elektronen reduziert werden, während das FMN lediglich ein Elektron von FAD aufnehmen kann, welches es dann auf P450 überträgt (Abbildung 8).

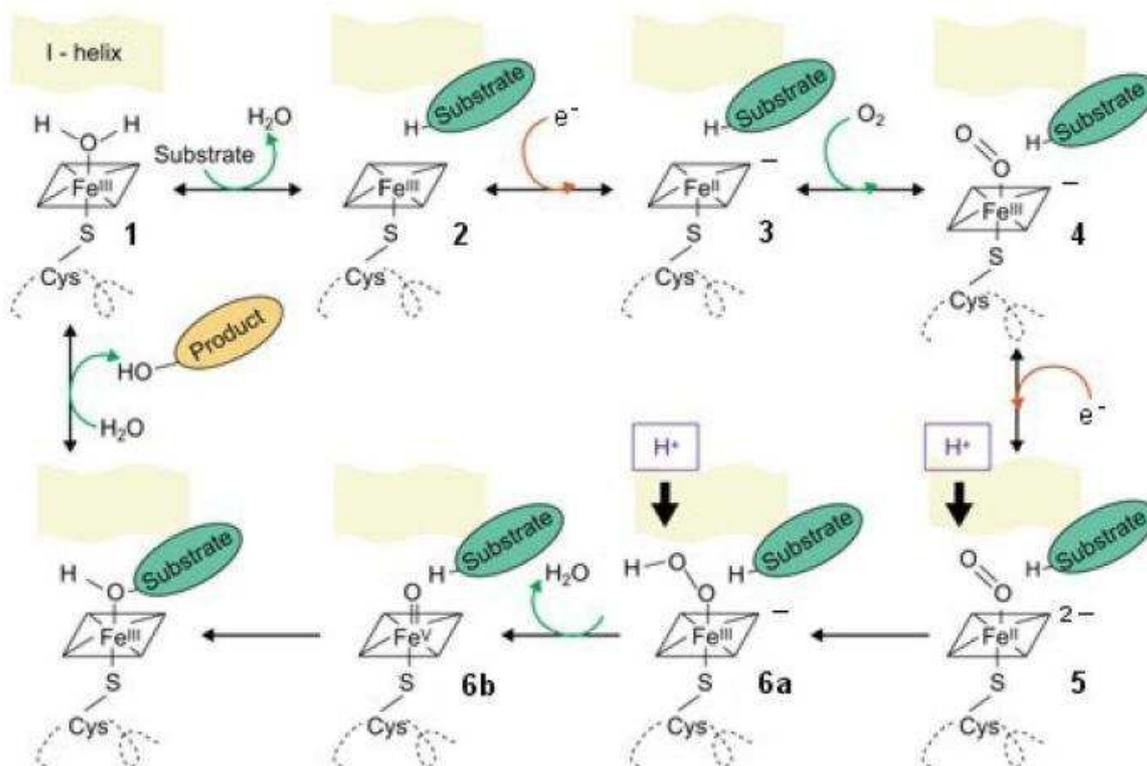


**Abbildung 8:** Schematische Darstellung eines mikrosomalen Cytochrom P450-Systems

Das System besteht aus einer NADPH-abhängigen, FAD- und FMN-haltigen Reduktase und dem Cytochrom P450 (nach Bernhardt, 1996).

## 2.2.4 Katalysemechanismus der Steroidhydroxylierung / Shunt-Pathway

Für den Katalysemechanismus der Steroidhydroxylierung existiert das Model eines cyclischen Prozesses (Abbildung 9), bei dem zunächst durch Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes eine Konformationsänderung im Cytochrom erfolgt. Normalerweise befindet sich an der sechsten Koordinationsstelle des Eisens das Sauerstoffatom eines Wassermoleküls (1). Bei Bindung des Substrats wird es jedoch verdrängt (2). In einem zweiten Schritt erfolgt dann die Übertragung eines Elektrons vom Adx auf das Eisen-(III)-atom des Cytochroms (Ferriform), wodurch es zu Eisen(II) reduziert wird (Ferroform) (3). Dieser Schritt macht die Bindung von molekularem Sauerstoff erst möglich (4). Das zweite Elektron wird unter Bildung eines  $O_2$ -Radikals auf den Sauerstoff übertragen (5). In einer internen Redoxreaktion entzieht das  $O_2$ -Radikal dem  $Fe^{2+}$  ein Elektron, und durch Umlagerung entsteht die hydroxylierte Verbindung. Gleichzeitig entsteht Wasser, so dass freies Cytochrom-P450 in der  $Fe^{3+}$ -Form regeneriert wird (6a). Ein Hinweis, dass in der aktiven Form nur ein Sauerstoffatom involviert ist, stellt die Aktivierung des Enzyms durch künstliche Sauerstoffdonatoren, wie z. B. Iodosylbenzen, dar. Dabei wird die komplizierte, reduktive Sauerstoffspaltung über einen sogenannten „shunt pathway“ umgangen.



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung des Cytochrom P450-Katalysemechanismus (modifiziert nach Werck-Reichert/Feyereisen, 2000)

Das im endoplasmatischen Retikulum enthaltene Cytochrom P450 ist ebenfalls in der Lage ROS zu bilden. Es reduziert molekularen Sauerstoff und bildet Superoxidation und Wasserstoffperoxid. Mit Hilfe dieser starken Oxidationsmitteln kann von der Fe(III)-Stufe

ein Sauerstoffatom direkt auf das Eisenatom im katalytischen Zentrum übertragen werden (6b) (Coon *et al.*, 1996), wobei in einem sogenannten Peroxid-Shunt der Fe(III)-peroxid-Komplex als aktives Intermediat erhalten wird (Jung *et al.*, 2005). Die P450-Enzyme werden in dieser Umgebung jedoch in kurzer Zeit inaktiviert.

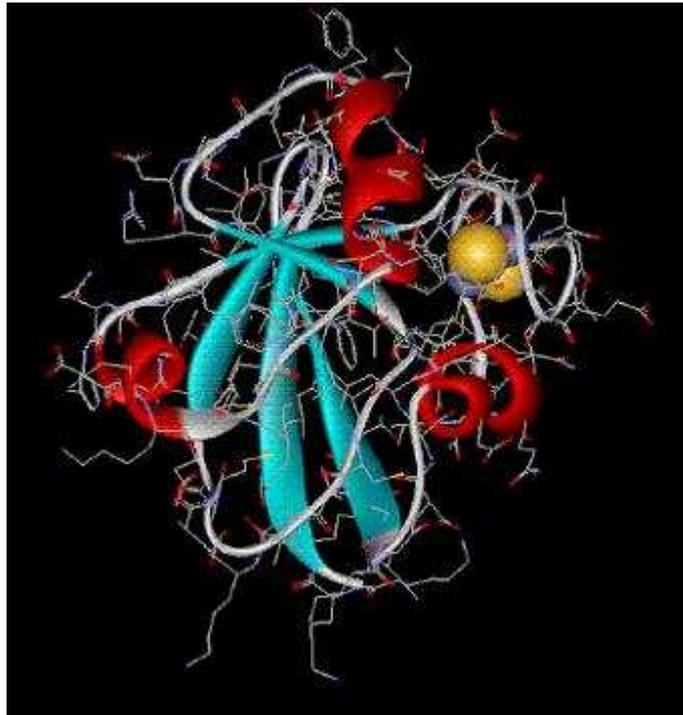
## 2.3 Adrenodoxin

Das 14,4 kDa große Adx ist das Ferredoxin der Nebennierenrinde (*Cortex glandulae suprarenalis*) und besitzt als aktives Zentrum einen [2Fe-2S]-Cluster, der vier Cysteine-Reste als Liganden trägt. Es wurde erstmals von Omura (Omura, 1966) beschrieben und nimmt Elektronen von der AdR auf, um sie auf die Cytochrome CYP11A1, CYP11B1 und CYP11B2 zu übertragen.

Innerhalb der Polypeptidkette des Adx unterscheidet man eine [2Fe-2S]-Cluster enthaltende Kerndomäne (gebildet aus den Aminosäuren Asp5-Cys55 sowie Gly91-Pro108) und eine Erkennungsdomäne, die mit den beiden Redoxpartnern AdR und den Cytochromen P450 wechselwirkt. Die Erkennungsdomäne (Aminosäuren 56-90) erleichtert auf Grund ihrer Flexibilität möglicherweise die Wechselwirkung mit der Reduktase und den Cytochromen. Im Bereich der Erkennungsdomäne befindet sich eine hochkonservierte saure Zwischenbrücke zwischen den Aminosäureresten 74 und 86, die eine wichtige Rolle für die Interaktion des Adx mit seinen Redoxpartnern spielt. Sowohl mittels chemischer Modifikationen (Geren *et al.*, 1984) als auch mittels ortsgerichteter Mutagenese-Studien (Coghlan & Vickery, 1991) konnte gezeigt werden, dass innerhalb dieser sauren Region die Aminosäurereste Asp76 und Asp79 eine wichtige Rolle bei der Wechselwirkung mit der AdR als auch mit CYP11A1 einzunehmen.

Bei Untersuchungen an der Interaktionsdomäne des bovinen Adx konnte nachgewiesen werden, dass die Aminosäuren 116-128 nicht essentiell für die Funktion des Adx sind (Cupp & Vickery, 1989). In unserer Arbeitsgruppe wurde ebenfalls gezeigt, dass eine Deletion der Aminosäuren 109-115 mit keiner Einschränkung der Funktionalität des Proteins einhergeht, und die verkürzte Adx-Mutante eine effizientere Wechselwirkung mit CYP11B1 aufweist (Uhlmann *et al.*, 1994). Welche zentrale Rolle die nahe am C-Terminus gelegene Aminosäure Pro108 für die korrekte Faltung und somit auch Stabilität des gesamten Proteins einnimmt, zeigt sich, wenn diese Aminosäure zusätzlich deletiert wird (Uhlmann *et al.*, 1997).

Mit der Entschlüsselung der 3D-Kristall-Struktur des verkürzten bovinen Adx (4-108) hat unsere Arbeitsgruppe einen wertvollen Beitrag zu der Wechselbeziehung zwischen Struktur und Funktion dieses Proteins geliefert (Abbildung 10) (Muller *et al.*, 1998). Bislang waren nur die dreidimensionalen Strukturen vom Pflanzen-Ferredoxin und des Ferredoxins von *Pseudomonas putida* bekannt, daher lieferte diese erstmalige Beschreibung eines Vertebraten-Ferredoxins ein tieferes Verständnis der biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften von [2Fe-2S]-Ferredoxinen (Grinberg *et al.*, 2000).



**Abbildung 10:** Dreidimensionale Ansicht von Adrenodoxin (Müller et al., 1998)

Dargestellt sind das Proteinerückgrat als Stäbchenmodell, die helikalen Bereiche (rot) und die Faltblattbereiche (hellblau) des Proteins. Der Eisen-Schwefel-Cluster ist als Kalotte dargestellt (Eisen: blauviolett, Schwefel: gelb).

Adx wird als Prä-Protein im Cytoplasma synthetisiert; seine ungewöhnlich lange Lokalisationssequenz (58 AS) dient der Zielsteuerung des Proteins zu seinem Wirkort, den Mitochondrien und wird bei dessen Eintritt abgespalten (Matocha & Waterman, 1984; Omura, 1998). Allgemein wird für den mitochondrialen Proteinimport die Beteiligung spezieller cytosolischer Faltungsproteine diskutiert. Solche Chaperone, wie beispielsweise das hsp70, unterstützen den Import, indem sie das neusynthetisierte Protein im ungefalteten Zustand belassen. Des weiteren geht man davon aus, dass ein so genannter Mitochondrien-Import-Stimulierungs-Faktor (MSF) mit dem mitochondrialen Prä-Protein einen Komplex bildet, der zu Rezeptoren an der äußeren Mitochondrienmembran geleitet wird (Komiya et al., 1996).

### 2.3.1 Modelle des Adx-vermittelten Elektronentransportes

Für den Mechanismus des Adx-vermittelten Elektronentransports von AdR zu den Cytochromen P450 werden folgende Modelle diskutiert :

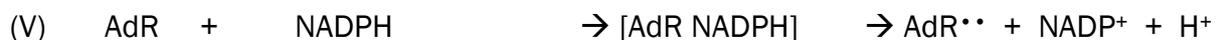
Adx bindet zunächst an die AdR und dissoziiert nach Aufnahme eines Elektrons von dieser wieder ab. Nachfolgend wird ein Reduktionsäquivalent durch Bildung eines Komplexes mit dem Cytochrom übertragen (Shuttle-Modell) (Lambeth & Kamin, 1979). Ein zweites Modell beschreibt einen ternären Komplex aus AdR, Adx und dem CYP11A1. Kido und Kimura konnten die Bildung eines solchen Komplexes in Gegenwart von Cholesterin und Phospholipiden beobachten (Kido et al., 1979). Einen Elektronentransport mittels eines zweifach-binären Komplexes postulieren Takeshima

und Hara, innerhalb dessen zwei Moleküle Adx auftreten, die sowohl an die AdR als auch an das Cytochrom P450 binden (Takeshima & Hara, 1991).

Der Prozess der Elektronenübertragung kann „gekoppelt“ oder „leaky“ stattfinden. In einem „gekoppelten“ P450-System werden alle Elektronen von NADPH zur Substrathydroxylierung verwendet. Wenn alle Elektronen von NADPH in einer Monooxygenierung verwendet werden, dann ist die Effizienz des Systems 100%. Wenn ein Teil der Elektronen zu anderen Akzeptoren übertragen wird, was zu einer Bildung von Sauerstoffradikalen führt, dann bezeichnet man den Prozess als „ungekoppelten“ Elektronentransfer einer Hydroxylierung, „leaky electron transfer“ oder „zwecklose“ Oxidierung (Hanukoglu, 2006). Einige der mikrosomalen P450 sind in höchstem Maße „ungekoppelt“ (Ding & Coon, 1991; Puntarulo & Cederbaum, 1996; Watabe *et al.*, 1993). Diese Ausströmung von Elektronen aus der Atmungskette wird als eine der Hauptquellen von Sauerstoffradikalen einer Zelle angesehen (Genova *et al.*, 2003; Turrens, 2003; Vinogradov & Grivennikova, 2005). Kürzlich wurde gezeigt, dass bereits ein Elektronenfluß von 0.15% zu einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung in der Elektronentransportkette führt (St-Pierre *et al.*, 2002). Bereits diese geringe Menge ist ausreichend, um eine Schädigung der Zelle zu bewirken, die sich in beschleunigter Alterung zeigt (St-Pierre *et al.*, 2002). In steroidogenen Geweben liegt eine hohe Konzentration an mitochondrialen P450s vor, daher ist in diesen Geweben die Kapazität zur freien Radikalbildung besonders hoch (Hanukoglu & Hanukoglu, 1986).

### 2.3.2 AdR- und Adx-vermittelte Radikalbildung

Das FAD-haltige Enzym AdR erkennt NADPH und Adx. AdR oxidiert NADPH unter Akzeptanz zweier Elektronen und reduziert Sauerstoff durch Übertragung eines einzelnen Elektrons auf Adx (Chu & Kimura, 1973a; Lambeth & Kamin, 1976). Diese Fähigkeit, Elektronen auf Sauerstoff zu übertragen, ist jedoch abhängig von der Komplexbildung zwischen den beiden Proteinen. In aeroben Lösungen wird AdR durch NADPH reduziert und bleibt in diesem Zustand, ohne sich selbst zu oxidieren (Chu & Kimura, 1973a; Hanukoglu *et al.*, 1993; Sugiyama *et al.*, 1979). Die Zugabe von Adx stimuliert die Oxidation von NADPH und die Reduktion von Sauerstoff. In einem ersten Schritt oxidiert AdR NADPH durch die Übertragung von zwei Elektronen auf das FAD-Coenzym (V):



Im nächsten Schritt wird Adx durch die Übertragung eines einzelnen Elektrons von AdR<sup>••</sup> reduziert (VI):



Adx selbst fungiert hierbei als Substrat der Reduktase. In einem dritten Schritt gibt das reduzierte Adx seine Elektronen unter Bildung von Sauerstoffradikalen an Sauerstoff weiter, wobei kinetische Analysen nahe legen, dass diese Reaktion stattfindet, während Adx an AdR gebunden vorliegt (VII) (Hanukoglu *et al.*, 1993):



Dieser Reaktion folgt klassischerweise ein Transfer des zweiten Elektrons von AdR zu Adx, ebenfalls unter Reduktion von Sauerstoff. Ist kein NADPH mehr vorhanden, so wird das reduzierte Adx wieder oxidiert, ein Vorgang der als „Autooxidation“ bezeichnet wird (Hanukoglu *et al.*, 1993). Während dieser Reaktion sinkt die Radikalbildung dramatisch. Die Oxidation von NADPH durch den AdR-Adx-Komplex ist eng verknüpft mit einer Inaktivierung von Adx, die durch Zugabe von SOD inhibiert werden kann (Rapoport *et al.*, 1995).

## 2.4 Verknüpfung von Komponenten der Steroidhydroxylasesysteme mit der Apoptose

Es wurde vor einiger Zeit herausgefunden, dass in humanen Kolonkarzinomzellen die AdR-Expression in Abhängigkeit von dem Tumorsuppressorgen p53 signifikant durch die Behandlung der Zellen mit 5-FU induziert wurde (Hwang *et al.*, 2001). Diese Beobachtung führte zur Vermutung einer AdR-abhängigen, p53-vermittelten Apoptose, hervorgerufen durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und dadurch von oxidativem Stress in den Mitochondrien. Dieses Model wurde durch die Beobachtung gestützt, dass ein p53-Bindungsmotiv im AdR-Promotor lokalisiert ist, welches von Wildtyp p53, p63 $\alpha$ , p63 $\gamma$ , p73 $\alpha$ , und p73 $\beta$  gebunden werden kann (Liu & Chen, 2002). Dennoch ist es schwierig, diese Studien in Einklang zu bringen, da bereits gezeigt wurde, dass eine Überexpression von AdR die Zellen zwar gegenüber oxidativem Stress sensibilisiert, aber keinen Effekt auf die Zellproliferation zeigt (Hwang *et al.*, 2001; Liu & Chen, 2002). Weiterhin wurde mittels *in vitro* Untersuchungen belegt, dass Elektronen zwar prinzipiell von NADPH über AdR zu Adx und damit zu Sauerstoff übertragen werden können, was in der Bildung von Superoxidanionen resultiert (Chu & Kimura, 1973b; Mitani & Ichiyama, 1975), allerdings kann AdR selbst keine freien Elektronen in Abwesenheit von Adx auf Sauerstoff übertragen (Hanukoglu & Jefcoate, 1980). In der Anwesenheit von NADPH und AdR können ROS entweder durch CYP11A1 - in Abwesenheit des Substrates Cholesterol - oder Adx produziert werden (Hanukoglu *et al.*, 1993).

## 2.5 Die Cytochrome P450 in Insekten

Erstmals wurden P450s in Insekten 1967 gefunden. Mittlerweile sind über 100 Insekten P450s bekannt (Nelson, 1998). Die Sequenz des 100 Mb großen euchromatischen Genoms der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) beinhaltet etwa 13.600 Gene, von denen viele Mitglieder großer Multienzymfamilien sind, wie zum Beispiel Transmembranrezeptoren, Proteinkinasen, Peptidasen (Ross *et al.*, 2000) und Cytochrome P450. In ihrem Genom wurden allein 90 P450 Sequenzen von 25 Familien gefunden (Tijet *et al.*, 2001). Von diesen Sequenzen codieren 83 für offenbar funktionelle Gene, wohingegen sieben Sequenzen Pseudogene darstellen. Über die Hälfte der Gene gehören zu zwei großen Familien, nämlich CYP4 und CYP6. Die CYP6-Familie ist spezifisch für Insekten, wohingegen die CYP4 Familie auch Vertebratensequenzen beinhaltet. Alle 22 CYP6-Gene werden dem Hausfliegengen CYP6A1 zugeordnet, das erstmals 1998 aus Insekten isoliert wurde (Guzov *et al.*, 1998). Die verbleibenden 21 CYP4-Gene werden dem Cockroach-Gen (Bradfield *et al.*, 1991) zugeordnet. CYP4C1

gehört ebenfalls zu dieser Familie, weil seine I-Helix Sequenz nahezu identisch mit der des Vertebraten CYP4-Proteins ist.

*D. melanogaster* hat sieben P450-Pseudogene: CYP9F3P fehlt die Häm-Bindungsdomäne; die Region vor diese Domäne - die normalerweise die PERF-Domäne beinhaltet - fehlt bei CYP6TP2. CYP6A15P; CYP307A2P, CYP49A1P, CYP313A1P und CYP6A16P zeigen eine Leserasterverschiebung in ihrer codierenden Sequenz, was zu nicht-funktionellen Proteinen führt. Sieht man sich die Verteilung der P450 Gene auf der Genkarte an, so fällt auf, dass die Gene auf Chromosom 4 und dem Y Chromosom vollständig fehlen, wohingegen über die Hälfte aller P450 Gene auf Chromosom 2 zu finden sind. Außerdem beinhaltet der längste Cluster insgesamt neun Gene. Lediglich fünf der gefundenen Gene enthalten keine Introns. Es zeigt sich eine relativ gute Korrelationen zwischen der Konservierung der Introns und der phylogenetischen Beziehung zwischen den Mitgliedern der P450 Unterfamilien (Tijet *et al.*, 2001). Den P450 werden 9 Familien zugewiesen (CYP2, CYP4, CYP6, CYP9, CYP12, CYP18, CYP28, CYP45 und CYP48). CYP12B1 aus *D. acanthopthera* spielt eine wichtige Rolle in der Kalzium-Homöostase (Danielson & Fogleman, 1997; Danielson *et al.*, 1997; Fogleman *et al.*, 1997).

Es wurde gezeigt, dass Insekten P450s an der Prozessierung von Pheromonen wie etwa Disparlur und Monocrotalin sowie Steroiden wie Ecdyson (Brattsten, 1979; Grieneisen *et al.*, 1993) beteiligt sind. Hier wird besonders CYP18 aus *D. melanogaster* genannt (Bassett *et al.*, 1997). Steroidhormone spielen in Insekten eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und Reproduktion, außerdem sind Insekten-P450 maßgeblich am Steroidmetabolismus (Baars, 1980) beteiligt. Des Weiteren helfen die P450 den Insekten beim Befall von Wirtspflanzen durch die Eliminierung von toxischen Pflanzenbestandteilen wie etwa Terpenen, Sterolen, Alkaloiden, Phenolen und Quinonen (Frank & Fogleman, 1992; Rosler *et al.*, 1992). Dadurch erhalten die Insekten eine hohe Toleranz gegenüber pflanzlichen Toxinen (Danielson *et al.*, 1998; Feyereisen, 1999; Fogleman *et al.*, 1997). In der Hausfliege (*Musca domestica*) wurde sogar gezeigt, dass P450s in rekonstitutiven Enzymsystemen Insektizide metabolisieren (Andersen *et al.*, 1994). Pestizidresistenzen werden ebenfalls mit P450s (z. B. der Familien CYP6 und CYP9) in Verbindung gebracht (Korytko & Scott, 1998; Smith & Scott, 1997; Wu *et al.*, 1998). Außerdem geht man davon aus, dass sie an der Synthese von *juvenile hormones* beteiligt sind, die eine wichtige Rolle bei der Entwicklung, dem Wachstum und der Reproduktion spielen. Obwohl die Funktionen vieler P450-Proteine von Vertebraten, Pilzen, Pflanzen und Bakterien bekannt sind, ist in *D. melanogaster* bislang nur ein einzelnes P450 funktionell charakterisiert: CYP6A2 (Dunkov *et al.*, 1997; Saner *et al.*, 1996)

### 2.5.1 Mitochondriale P450 in *D. melanogaster*

Die Familien CYP12, CYP301, CYP302, CYP314 und CYP315 gehören zu den mitochondrialen P450s in *D. melanogaster*. Diese Sequenzen stehen in enger Verwandtschaft zu dem Hausfliegengen CYP12A1 (Guzov *et al.*, 1998), dessen Sequenz, Lokalisation in den Mitochondrien sowie seine funktionelle Rekonstitution zu bovinem Adx und AdR als mitochondriales P450 bezeichnen lassen. Die Mitglieder der *D. melanogaster* CYP12 Familie (CYP12A4, CYP12A5, CYP12B2, CYP12C1, CYP12D1, CYP12E1), CYP301A1 und CYP302A1 haben ebenfalls vielfältige strukturelle Gemeinsamkeiten mit CYP12A1 und mit mitochondrialen Säuger-P450s: Es finden sich zwei basische Reste (Arg oder Lys und Lys) in der konservierten Region, die eine wichtige

Rolle bei der Bindung des Redoxpartners Adx (Pikuleva *et al.*, 1992; Wada & Waterman, 1992) spielen. Darüber hinaus ist die N-terminale Sequenz durch mehrere positiv geladenen Reste charakterisiert, was sie - im Gegensatz zu den mikrosomalen P450s, welche etwa 20 hydrophobe Reste als Membrananker im endoplasmatischen Retikulum aufweisen - als mitochondriale Importsequenz charakterisiert (Omura *et al.*, 1993).

Somit scheinen sowohl CYP12s, CYP301A1, CYP302A2, Cyp314A1 als auch CYP315A1 mitochondriale P450s darzustellen. CYP314A1 zeigt jedoch einen typischen mikrosomalen N-terminus und es fehlen die geladenen Reste, welche zur Interaktion mit dem Adx-Homolog erforderlich sind. Die Funktion der 8 mitochondrialen P450s von *D. melanogaster* ist bis dato unbekannt. Es gibt keine bekannten endogenen Substrate für das Hausfliegengenen CYP12A1, obwohl dieses P450 in der Lage ist Xenobiotika zu metabolisieren (Guzov *et al.*, 1998). Die Vertebraten P450s sind am Metabolismus der Steroidhormone, Vitamin D und Gallensäure beteiligt. Bislang gibt es lediglich indirekte Hinweise darauf, dass die letzten drei Schritte im Insekten-Ecdysteroidmetabolismus von mitochondrialen P450s katalysiert werden. (Feyereisen, 1999). Denkbare Redoxpartner für mitochondriale P450s wären eine Adx-ähnliche Sequenz (43% Identität zu bovinem Adx), und eine AdR ähnliche Sequenz (40% Identität zu dem bovinem Protein), die im *D. melanogaster*-Genom gefunden wurden.

## 2.6 Die Spaltheife (*Schizosaccharomyces pombe*) als Modellorganismus

Die Spaltheife *S. pombe* ist ein einzelliger eukaryotischer Organismus, der sich seit Jahrzehnten als Modellsystem für molekular-genetische Studien bewährt hat. Sie wurde erstmals 1893 von Lindner beschrieben, der die Hefezellen aus dem ostafrikanischen "millet beer" isolierte und nach dem Swahili-Wort für Bier „*pombe*“ benannte (Lindner, 1893). Die Gattung der Spaltheifen (*Schizosaccharomyces*), die durch die einzelnen Spezies *S. pombe*, *S. octosporus* und *S. japonicus* charakterisiert ist, zählt zu der Ordnung der *Schizosaccharomycetales*. Zu dieser wird auch die Familie der *Saccharomycetaceae* gezählt, deren bekannteste Spezies wohl *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) darstellt. Obwohl beide Familien der Klasse der Ascomyceten zuzuordnen sind, ist keine nahe Verwandtschaft zu anderen Ascomyceten zu finden. Man nimmt an, dass sich die Entwicklungslinien schon vor ca. 1000 Millionen Jahren trennten, kurz nachdem die Trennung der Ascomyceten von den Metazoen stattfand. Demnach ist auch die Verwandtschaft zwischen den Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* untereinander nicht größer als zu Metazoen.

Namensgebend für diese beiden Hefen war ein morphologisches Merkmal: Die Spaltheife *S. pombe* vermehrt sich durch Querteilung der Mutterzelle, die Sprosshefe *S. cerevisiae* hingegen bildet Knospen, die sich später von der Mutterzelle trennen. Solange genügend D-Glucose und Stickstoff vorhanden sind vermehren sich beide Hefen rein vegetativ. Bei Nährstoffmangel hingegen wird eine geschlechtliche Fortpflanzung eingeleitet, die durch die Bildung von resistenten Sporen die Überlebenschancen verbessert. Bei der geschlechtlichen Fortpflanzung fusionieren dann Hefezellen mit unterschiedlichem Paarungstyp („*mating type*“  $h^+$  und  $h^-$ ) bei *S. pombe*. Die Regulation der Bildung verschieden geschlechtlicher Zellen ist zwischen *S. cerevisiae* und *S. pombe* stark konserviert. Die genetischen Untersuchungen an *S. pombe* begannen 1950, als es Leupold gelang, aus der ursprünglichen *S. pombe*-Kultur den homothallischen Stamm 968  $h^{90}$  und zwei heterothallische Stämme 975  $h^+$  und 972  $h^-$  zu isolieren. Der homothallische Stamm ist in der Lage, den Paarungstyp zu wechseln, wohingegen

heterothallische Stämme entweder nur aus genetisch stabilen P(+)- oder M(-)-Zellen bestehen, die keine geschlechtliche Fortpflanzung mehr durchführen können und bei Nährstoffmangel in die stationäre Wachstumsphase übergehen (Leupold, 1957; Leupold, 1958). Da die Spaltheefe zu höheren eukaryotischen Zellen besonders auch im Hinblick auf mitochondriale Strukturen eine höhere Homologie aufweist als *S. cerevisiae*, erscheint es sinnvoll, *S. pombe* als Modellsystem für die durch mitochondriale Ferredoxine induzierte Apoptose zu verwenden (Bureik et al., 2000).

### 2.6.1 Apoptose in Hefezellen

Warum Apoptose in einzelligen Organismen vorkommt, wird derzeit kontrovers diskutiert, denn es gibt keinen zwingenden Grund, dass Hefen (Frohlich & Madeo, 2000) und Bakterien (Cairns, 2002) als Antwort auf DNS-Schädigung oder exogene Auslöser mit Zellsterben reagieren. *S. cerevisiae* ist derzeit – auch bedingt durch kommerzielles Interesse – die am besten untersuchte Hefe. So ist auch nicht weiter verwunderlich, dass sie bereits als Modellorganismus zu Erforschung apoptotischer Mechanismen eingesetzt wurde. Madeo entdeckte 1997 erstmals an *S. cerevisiae* apoptotische Marker (Madeo et al., 1997), wie sie auch aus Säugerzellen bekannt sind. Er konnte die Kondensation von Chromatin, den Austritt von Phosphatidylserin und DNS-Fragmentierung mittels einer Zellzyklusmutante CDC48p nachweisen. Ausserdem zeigte er mittels verschiedenen ROS-Scavengern, dass in allen bis dato bekannten Fällen der „Hefeapoptose“ der Zelltod mit einer Freisetzung von ROS einhergeht (Madeo et al., 1999). Des weiteren konnte durch Expression von E4orf4 aus Adenoviren sowohl Apoptose in menschlichen als auch in Hefezellen ausgelöst werden (Afifi et al., 2001).

Im Jahr 2000 wurde eine neue Caspasefamilie entdeckt, die Metacaspasen. Diese neue Gruppe der Caspasen zeigt sowohl in der Primär- als auch in der Sekundärstruktur eine Homologie zu den menschlichen Caspasen, allerdings ist sie ausschließlich in Protisten, Pflanzen und Pilzen zu finden (Uren et al., 2000). Zwei Jahre später zeigten Madeo et al., dass die Bäckerhefe mit YCA1 (yeast caspase 1) ein Mitglied der Metacaspasefamilie besitzt und dieses funktionelle Gemeinsamkeiten mit Säugercaspasen aufweist: Bei Überexpression von YCA1 und gleichzeitigem Sauerstoffstress wird in der Zelle der kontrollierte Zelltod eingeleitet. Zellen mit YCA1-Deletion sind deutlich resistenter gegenüber ROS-induzierter Apoptose (Madeo et al., 2002a; Madeo et al., 2002b). Auch wurde gezeigt, dass die Hemmung der Reparatur von DNS-Doppelstrangbrüchen zu Apoptose führt, die ebenfalls durch YCA1 eingeleitet wird.

Da *S. pombe* ebenfalls bereits seit Jahren als Modellsystem komplex biologischer Phänomene eingesetzt wird, ist es nicht weiter verwunderlich, dass auch sie auf dem Gebiet der Apoptoseforschung eingesetzt wurde. Vor einigen Jahren wurde gezeigt, dass Zelltod in *S. pombe* durch die Überexpression von pro-apoptotischen Säugerproteinen ausgelöst werden kann (Ink et al., 1997; Jurgensmeier et al., 1997; Ryser et al., 1999). Des weiteren wurde gezeigt, dass Diacylglycerol (DAG) in der Lage ist, mittels ROS-Produktion Lipoapoptose in Hefen zu induzieren (Low et al., 2005; Zhang et al., 2003). Außerdem wurde der exogene Inhibitor *bir1* des (IAP)-ähnlichen Proteins charakterisiert (Uren et al., 1999). Nahezu alle phänotypischen Veränderungen, die man in einer Säugerzelle im Verlauf der Apoptose findet, konnten auch in der Spaltheefe nachgewiesen werden (Burhans et al., 2003). Ähnlich wie in Säugerzellen werden auch in diesem Organismus ROS mittels einer Vielzahl externer oder interner Auslöser produziert und sind in der Lage dadurch den Zellsterben hervorzurufen (Rodriguez-Menocal & D'Urso,

2004). Allerdings ist unklar, ob ROS lediglich als ein Beiprodukt der Apoptose entstehen oder selbst in der Lage sind Apoptose auszulösen.

## 2.6.2 Zellzyklusanalyse mittels Hefezellen

Die Analyse des Zellzyklus an den beiden Hefen *cerevisiae* bzw. *pombe* lieferte viele wichtige Erkenntnisse über den zeitlichen Ablauf der verschiedenen Prozesse und der sie kontrollierenden Mechanismen (Hartwell *et al.*, 1974). So wurden beispielsweise temperatursensitive (ts-) Mutanten welche in einem bestimmten Stadium des Zellzyklus arretieren für verschiedene Untersuchungen herangezogen. Durch Klonierung des menschlichen Homologs der „Cyclin dependent kinase“ (cdc2) in eine ts-Mutante von *S. pombe*, die einen cdc2-Defekt aufweist und der dadurch erfolgenden Komplementierung dieses Defektes konnte gezeigt werden, dass die Zellzyklussteuerung in Eukaryonten stark konserviert ist (Lee & Nurse, 1987).

Ein weiteres eindrucksvolles Beispiel der Zellzyklusregulation liefert der *wee*-Phänotyp der Hefe *S. pombe*, bei dem kleinere Zellen ausgebildet werden. Die Ursache des Phänotyps ist ein vorschneller Eintritt in die Mitose, bevor die Zelle die Größe erreicht hat, bei der normalerweise das Signal zur Zellteilung ausgelöst wird. *Wee*-Zellen entstehen aufgrund einer Überaktivität der cyclinabhängigen Kinase Cdc2 von *S. pombe*. Die erhöhte Cdc2-Aktivität kann beispielsweise die Folge einer Mutation im *cdc2*-Gen (gefolgt von einer Unempfindlichkeit gegenüber *Wee*) oder im *wee1*-Gen sein. Das *wee1*-Gen codiert eine Kinase, die Tyr-15 der Cdc2-Kinase phosphoryliert. Das Vorhandensein einer Phosphatgruppe an dieser Aminosäure hemmt die Cdc2-Aktivität. Eine Mutation im *wee1*-Gen verhindert diese Hemmung und es kommt zu einer Überaktivität. Ebenso kann auch ein Überschuss der Phosphatase Cdc25, die das Phosphat von Tyr-15 entfernt, zum *wee*-Phänotyp führen (al-Khodairy & Carr, 1992; Barale *et al.*, 1982; Beach *et al.*, 1982; Dickinson, 1981; Fantès, 1979; Novak & Mitchison, 1986; Nurse, 2004).

## 2.7 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob die Überexpression von Adx aus unterschiedlichen Organismen in der Lage ist, Apoptose in verschiedenen Geweben und Organismen zu induzieren. Es wurde bereits von mir in meiner Diplomarbeit gezeigt, dass die transiente Überexpression des menschlichen Elektronentransferproteins in der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 Apoptose auslösen kann. Es sollte daher untersucht werden, ob diese Ergebnisse unabhängig vom Zelltyp reproduziert werden können, und ob weitere Komponenten des Steroidhydroxylasesystems (CYP11A1) ebenfalls in der Lage, sind Zelltod auszulösen. Weiterhin sollte versucht werden, die im Kolonkarzinomzell-System erzielten Ergebnisse in der Spaltheefe zu reproduzieren. Hefen dienen seit Jahrzehnten als Modellsystem zur Erforschung biochemischer Vorgänge. Da die Spaltheefe eine hohe Homologie zu eukaryotischen Zellen insbesondere im Hinblick auf mitochondriale Strukturen aufweist, erschien es sinnvoll, die Adx-induzierte Apoptose in diesem Organismus zu untersuchen.

Für die Beurteilung der physiologischen Bedeutung dieser Transfektionsexperimente sollte weiterhin geklärt werden, inwieweit eine Transkriptionsregulation des Adx-Gens während der Apoptose erfolgt und auf welche Weise diese gesteuert wird, insbesondere im Hinblick auf eine eventuelle Beteiligung der Tumorsuppressoren p53 und p21. Die Ermittlung der spezifischen Bedingungen, unter denen die Adx-Expression im Verlauf der Apoptose modifiziert wird, waren ebenfalls Bestandteil dieser Arbeit.

Weiterhin sollte das Adx-Homologe aus *D. melanogaster* aufgereinigt und charakterisiert werden. Da Apoptose bei der Metamorphose der Fruchtfliege eine entscheidende Rolle spielt und *D. melanogaster* ebenfalls seit Jahren als Modellsystem zur Untersuchung von Entwicklungs-, Lern- und Verhaltensvorgängen dient, wurde dieser Organismus ebenfalls zu Untersuchung der Adx-induzierten Apoptose herangezogen.

## 3 MATERIAL & METHODEN

### 3.1 Zellkulturmethoden & fluoreszbbasierte Untersuchungen

#### 3.1.1 Kultivierung von Säuger-Zellen

Die Kultivierung der Säuger-Zellen orientierte sich an den von Denner *et al.* (Denner *et al.*, 1995a; Denner *et al.*, 1995b) beschriebenen Methoden. Die verwendeten Lösungen und Medien stammen, falls nicht anders erwähnt, von der Fa. Sigma und wurden vor Gebrauch auf 37 °C vorgewärmt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Brutschrank (Fa. Heraeus) mit konstanter Temperatur von 37 °C bei 6 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95 % relative Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden nach erreichter Maximaldichte subkultiviert und Volumina entsprechend 6 x 10<sup>5</sup> Zellen in Kulturgefäße mit entsprechender Menge Medium ausgesät. Die verwendeten Zellen mit den entsprechenden Anzuchtsmedien sind in Tabelle 1 aufgeführt:

**Tabelle 1:** Verwendete Zellkulturmedien

#### Verwendete Medien :

<b><u>DMEM+ : (für COS-1-Zellen)</u></b>	
Dulbecco`s modified Eagle Medium (DMEM) 1x	100 ml
L-Glutamin (200 mM)	2 ml
5000 U Penicillin, 5mg/ml Streptomycin-Lösung	1 ml
Natriumpyruvat (100 mM)	1 ml
Fetales Kälberserum (FBS)	5 ml
<b><u>DMEM+10 : (für U373-MG-, SNB-19-, SK-Mel-28-, A431-, V79MZ-Zellen)</u></b>	
Dulbecco`s modiefied Eagle Medium (DMEM) 1x	100 ml
Fetales Kälberserum (FBS)	10 ml
5000 U Penicillin, 5mg/ml Streptomycin-Lösung	1 ml
<b><u>DMEM+2 : (für RatC6-Zellen)</u></b>	
Dulbecco`s modiefied Eagle Medium (DMEM) 1x	100 ml
Fetales Kälberserum (FBS)	2 ml
5000 U Penicillin, 5mg/ml Streptomycin-Lösung	1 ml
<b><u>McCoy´s 5A : (für die HCT116-Zelllinien sowie die MeWO-Zellen)</u></b>	
McCoy´s 5A Medium 1x	100 ml
Fetales Kälberserum (FBS) (Fa. Gibco)*	5 ml
5000 U Penicillin, 5mg/ml Streptomycin-Lösung	1 ml
<b><u>RPMI : (für Terra-Zellen sowie T47D-Zellen)</u></b>	
RPMI Medium	100 ml
Fetales Kälberserum (FBS)	5 ml
5000 U Penicillin, 5mg/ml Streptomycin-Lösung	1 ml
<b><u>Schneiders Drosophila Medium : (für Schneider-2-Zellen)</u></b>	
Schneiders Drosophila Medium	100 ml
Fetales Kälberserum (FBS)	10 ml
5000 U Penicillin, 5mg/ml Streptomycin-Lösung*	1 ml

### 3.1.2 Transiente Transfektion

#### 3.1.2.1 DEAE-Dextran Methode

Die transiente Transfektion erfolgte mit Modifikationen nach Zuber *et al.* (Zuber *et al.*, 1988). Dazu wurden pro Transfektionsansatz Volumina von  $2-8 \times 10^6$  Zellen in jede Vertiefung einer 6-Well-Platte (Fa. Nucleobond) ausgesät und unter Zugabe von Medium für 18 Stunden inkubiert. Daraufhin wurde das Medium durch frisches Medium (ohne FBS, mit 10 % Hepes-Puffer) ersetzt und für weitere 3 Stunden inkubiert. Um eine DNS-Präzipitation zu vermeiden wurden für jeden Transfektionsansatz folgende Lösungen vorbereitet und anschließend vorsichtig vereinigt: a) 400  $\mu$ l Medium (ohne FBS, mit 10 % Hepes-Puffer) mit 2,5  $\mu$ l DEAE-Dextran-Lösung (50 mg/ml) (Fa. Amersham); b) 2  $\mu$ g Plasmid-DNS mit 100  $\mu$ l Medium (ohne FBS, mit 10 % Hepes-Puffer). Dann wurde das Medium der Zellen durch diese DNS-DEAE-Dextran-Lösung ersetzt. Nach einer Stunde Inkubation erfolgte die Zugabe einer Lösung aus 500  $\mu$ l Medium und 1,5  $\mu$ l Chloroquin (1 mM) und eine weitere Inkubation von 3 Stunden. Abschließend wurde das Medium entfernt und die Permeabilität der Zellwand für die Plasmid-DNS durch einen DMSO-Schock erhöht. Dazu wurden die Zellen exakt 2 Minuten lang mit einer 10 % igen DMSO-Lösung (in Hank´s-Puffer) versetzt und nach zweimaligem Waschen mit Hank´s-Puffer unter Zugabe von 2 ml Medium pro Transfektionsansatz 24 Stunden inkubiert.

#### 3.1.2.2 *Effectene*® Transfektionsreagenz

Ein weitere Methode zur Transfektion von Zelllinien beruht auf der Verwendung des *Effectene*® Transfektionsreagenz der Fa. Invitrogen, welches ein nicht-liposomales kationisches Lipid ist. Die DNS-Moleküle werden bei dieser Methode mittels Enhancer und optimiertem Puffer kondensiert und anschließend mit dem *Effectene*® Lipid zu kleinen Komplexen verpackt, die dann in die Zelle geschleust werden. Die Transfektion wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Da bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten keine durch das *Effectene*® Transfektionsreagenz ausgelösten cytotoxischen Begleiterscheinungen festgestellt wurden, war es nicht notwendig, das DNS-Transfektionsreagenz-Gemisch nach sechs Stunden von den Zellen zu entfernen.

Transfizierte Zellen wurden mit Hilfe eines Tropfens des Einbettmittels „FluorSave“ (Fa. Calbiochem) luftblasenfrei auf einem Objektträger unter einem Deckglas fixiert. Nach drei-stündiger Aushärtung bei 30°C war das Mikroskopieren unter Verwendung von Immersionsöl möglich. Es wurde das Fluoreszenzmikroskop DM LB HC der Fa. Leica mit dem Filtersystem A-L für die FITC oder DAPI-Fluoreszenz und dem Filtersystem GFP-L für die GFP-Fluoreszenz verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm „analySIS“ der Fa. Soft Imaging GmbH.

### 3.1.3 Fluorimetrische Verfahren

#### 3.1.3.1 Durchflußzytometrie

Das Prinzip der Durchflußzytometrie basiert auf der Messung unterschiedlicher Eigenschaften einzelner Zellen, die in einem Flüssigkeitsstrom einen Laserstrahl passieren. Jede Zelle interagiert dabei mit dem Laserlicht, was zu einer Streuung des Lichtes führt. Die Streuung wird durch verschiedene zellbiologische Parameter wie Zellgröße, Zellmembran, Zellkern und Granularität beeinflusst. Darüber hinaus können Zelloberflächen-Antigene durch Markierung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern nachgewiesen werden. Diese Fluorochrome werden durch das Laserlicht angeregt und können gemessen werden. Es ist möglich, folgende optische Parameter gleichzeitig zu messen:

<i>Vorwärtsstreulicht (FSC = forward scatter):</i>	Ein Teil des Lichtes wird relativ zur Achse der Einstrahlung in einem Winkel von zwei bis sechs Grad gestreut. Diese Streuung gilt als Maß für die Zellgröße, denn große Zellen streuen mehr Licht als kleine Zellen.
<i>Seitwärtsstreulicht (SSC = sideward scatter):</i>	Diese Bezeichnung steht für das im rechten Winkel zum einfallenden Strahl gestreute Licht. Die Intensität dieses Lichtes ist von der Granularität, den kernhaltigen Bestandteilen der Zelle abhängig. Höhere Granularität bedingt stärkeres Seitwärtsstreulicht.
<i>Fluoreszenz:</i>	Spezielle Filtersysteme zerlegen das seitwärts abgestrahlte Licht in drei verschiedene Spektralbereiche. Damit ist es möglich, sowohl Einzel-, als auch Doppel- und Dreifachfluoreszenzen zu messen. Dies erlaubt eine gleichzeitige Analyse mehreren, verschiedenen Parametern.

Um eine durchflußzytometrische (oder FACS) Analyse durchführen zu können, wurden die Zellen mit einem GFP-Plasmid transfiziert, welches durch Laserlicht der Wellenlänge 488 nm anregbar ist und grün fluoresziert. Die Messung erfolgte in PBS oder Wasser (H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>) mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS Calibur, Becton Dickinson). Zum Einstellen der Streulichtparameter wurden unmarkierte Zellen verwendet. Zur Kontrolle der Autofluoreszenz wurden unbehandelte vitale Zellen als Kontrollgruppe parallel gemessen, um das Ausmaß der Apoptose und Nekrose in den Versuchsgruppen beurteilen zu können. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm *Cell Quest* (Fa. Becton Dickinson).

Für den durchflußzytometrischen Nachweis von Apoptose wurden folgende Methoden angewendet: der Zelluntergangs-Assay, der *CaspSCREEN flow cytometric apoptosis detection assay*, der Dihydroethidium (DHE)- sowie der Dihydrorhodamin123 (DHR123)-Assay zum Nachweis der ROS-Bildung und der *MitoCapture™ apoptosis detection kit*. Alle

Experimente wurden sofern nicht anders erwähnt dreimal mit Triplettsätzen durchgeführt. Da die auftretende Standardabweichung innerhalb eines Messwertes eine Besonderheit der FACS-Analyse darstellt, wurde weiterhin jeder Messwert dreimal vermessen.

### **3.1.3.2 Bestimmung der Zell-Überlebensrate (Zelluntergangs-Assay)**

Bei dieser Methode wurden die Zellen zunächst mit dem GFP-exprimierenden Plasmid pEGFPc1 transient transfiziert und die Transfektionsraten der Zellen vor und nach Apoptoseinduktion miteinander verglichen, was einen Rückschluss auf die „überlebenden“ Zellen zuließ. Durch Auftragung der Zellgranularität (SSC-Kanal) gegen die Intensität des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes (FL1-Kanal) konnten die entsprechenden Zellpopulationen differenziert dargestellt werden.

### **3.1.3.3 Bestimmung der DNS-Degradation mittels enzymatischer Markierungsmethode (CaspSCREEN)**

Die Proteasen der Caspase-Familie spielen eine wichtige Rolle im Prozess der Apoptose. Der CaspSCREEN Assay (Fa. Apotech) verwendet (Aspartyl)-Rhodamin110 (D<sub>2</sub>R), ein normalerweise nicht fluoreszierender Stoff, der durch zelluläre Caspasen gespalten wird. Dadurch entsteht Rhodamin110, dessen Fluoreszenz im FACS auf dem FL1-Kanal gemessen werden kann. Da die Zelle sehr permeabel für (D<sub>2</sub>R) ist, bietet dieser Assay eine ideale Methode um Apoptose in lebenden Zellen nachzuweisen.

Die Zellen wurden wie unter 3.1.2.2 beschrieben transient transfiziert, Apoptose ausgelöst und durchflußzytometrisch analysiert. Die Ergebnisse ließen sich wie folgt darstellen: es wurde die Intensität des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes (FL1-Height) gegen die Anzahl der gemessenen Zellen (Counts) aufgetragen. Diese Darstellungsform ergibt für apoptotische Zellen einen im Vergleich zur Kontrollgruppe höheren Median-Wert (nach rechts verschobener Peak) (Kobayashi *et al.*, 2004a; Kobayashi *et al.*, 2004b; Mancini *et al.*, 1997; Mancini *et al.*, 1998).

### **3.1.3.4 Mikroskopische Darstellung apoptotischer Zellen**

Der lichtmikroskopische Nachweis von apoptotischen Zellen erfolgte durch das Anfärben der Zellen mit Acridinorange (AO) (Fa. Aldrich), ein DNS-interkalierender Farbstoff. Damit lassen sich einzelne Phasen der Apoptose unterscheiden. Der Farbstoff kann Doppelstrang-DNS sowie denaturierte DNS in Zellen oder Zellkernen unterschiedlich färben. Interkaliert AO zwischen Doppelstrang-DNS, so fluoresziert er - sobald er in dieser Form gebunden ist - grün; in denaturierten Teilen der DNS fluoresziert AO rot. Für die AO-Färbung wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und nach Zusatz von AO (0,5% w/v in PBS) unter Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes mit dem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert.

### 3.1.3.5 Fluorimetrisches Verfahren zum Nachweis der ROS-Bildung

Zum Nachweis der ROS-Bildung in den Zellen wurde Dihydroethidium (DHE) eingesetzt, eine zellpermeable Substanz, die mit Sauerstoffradikalen zu Ethidium reagiert, welches im Zellkern mit der DNS interkaliert. Bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 420 nm kann die Fluoreszenz im Zellkern durchflußzytometrisch bestimmt werden. Eine Zunahme der Fluoreszenz wird der Zunahme reaktiver Sauerstoffspezies gleichgesetzt. Die Fluoreszenz von Ethidium wurde mit dem PI-Filter am FACSCalibur bestimmt. DHE ist relativ spezifisch für Superoxidanion-Radikale ( $O_2^{\cdot-}$ ), kann aber auch mit Hydroxyl-Radikalen ( $\cdot OH$ ) und Wasserstoffperoxid reagieren (Munzel *et al.*, 2002) und besitzt unter bestimmten Bedingungen eine Tendenz zum Redox-Cycling (Marchesi *et al.*, 1999; Rota *et al.*, 1999a; Rota *et al.*, 1999b; Wang *et al.*, 2004).

Für eine FACS Analyse der ROS-Bildung, wurden  $2-8 \times 10^5$  Zellen mit wahlweise folgenden Plasmiden transfiziert: pECE-hAdx (Chang *et al.*, 1988) (enthält humanes Adx), pbAdx4 (Okamura *et al.*, 1985) (enthält bovines Adx) oder pSVL-hCYP11A1 (Cao & Bernhardt, 1999) (enthält humanes CYP11A1). Als Kontrollgruppe wurden mit pSVL-Vektor ohne Insert (mock) transfizierte Zellen getestet. Nach 24 Stunden wurde das Medium entfernt und die Zellen für 30 min mit 2 nM DHE bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im FACS analysiert. Zur Auswertung wurde die Fluoreszenzintensität von Ethidium (FL2-Height) gegen die Anzahl der gemessenen Zellen (Counts) aufgetragen. Aus den Histogramm-Plots wurde anschließend die mittlere Fluoreszenzintensität der Proben bestimmt (Limoli & Giedzinski, 2003). Vermehrte ROS-Bildung zeigte einen im Vergleich zur Kontrollgruppe höheren Median-Wert (nach rechts verschobener Peak). Bei den dargestellten Balkendiagrammen bzw. Tabellen handelt es sich um die Mittelwerte der gemessenen Ethidiumfluoreszenzintensität  $\pm$  Standardabweichungen, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$  \*\*\*\* $p < 0.001$  verglichen mit der Kontrollgruppe.

Eine Art negativer ROS-Nachweis ließ sich unter Zuhilfenahme von so genannten ROS-Fängern oder Scavengern durchführen. Es handelt sich bei diesen Reagenzien um Substanzen, die in der Lage sind freie Radikale zu binden und dadurch den in der Zelle entstehenden Schaden zu verringern oder zu verhindern. In dieser Arbeit wurden verschiedene ROS-Fänger eingesetzt: MnTBAP (Fa. Alexis) (Endkonzentration: 10 mM) (Ghafourifar *et al.*, 1999); DIDS (Endkonzentration: 250 mM) (Santos *et al.*, 1999; Thangaraju *et al.*, 1999b), Tiron (Fa. Aldrich) (Endkonzentration: 1 mM) (Ledenev *et al.*, 1986) und NAC (Endkonzentration: 5 mM) (Tsai *et al.*, 1996). Dazu wurde den Zellen sechs Stunden nach erfolgter Transfektion Medium, welches die ROS-Scavenger in entsprechenden Konzentrationen erhielt zugesetzt. Die Zellen wurden dann weitere 24 Stunden kultiviert bevor die Detektion der ROS-Bildung mittels DHE im FACSCalibur erfolgte.

### 3.1.3.6 Bestimmung von Veränderungen im Mitochondrienpotential mittels MitoCapture™ Apoptosis Detection Kit

Der Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials ( $\Psi_m$ ) innerhalb einer Zelle spielt eine wichtige Rolle beim Ablauf des programmierten Zelltods (Henry-Mowatt *et al.*, 2004). Um eine solche Veränderung durchflußzytometrisch zu detektieren, wurde

das *MitoCapture™ mitochondrial apoptosis detection kit* (Fa. Apotech) eingesetzt. Diesem Kit liegt folgendes Prinzip zu Grunde: Der kationische Fluoreszenzfarbstoff MitoCapture™ aggregiert in gesunden Zellen in den Mitochondrien (rote Fluoreszenz:  $E_{\max}$  590 nm), in apoptotischen Zellen kann er dies jedoch aufgrund eines veränderten Transmembranpotentials der Mitochondrien nicht und liegt dort als grün-fluoreszierendes Monomer ( $E_{\max}$  530 nm) im Cytoplasma der Zelle vor (Chen et al., 2001). Die Zellen wurden in einer Dichte von  $2-8 \times 10^5$  ausgesät, mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert, nach Anleitung des Herstellers aufbereitet und am FACSCalibur vermessen. Dazu wurden für die grüne Fluoreszenz der FITC-Filter und für die rote Fluoreszenz der PI-Filter am Gerät verwendet. Anschließend erfolgte die Auswertung der mittels CellQuestPro Software dargestellten Histogramm-Plots. Die gezählten Ereignisse (counts) wurden gegen die Fluoreszenzintensität aufgetragen und die mittlere gemessene Fluoreszenz (Median) bestimmt (Kobayashi et al., 2004a; Kobayashi et al., 2004b; Mancini et al., 1997; Mancini et al., 1998).

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Diese Methode erlaubt die Amplifizierung spezifischer DNS-Fragmente. Das zu amplifizierende DNS-Fragment (*template*) wird dabei von zwei synthetischen Oligonucleotiden (*Primer*) flankiert. An den freien 3'-Enden dieser Primer bindet eine hitzestabile DNS-Polymerase, die den Einbau von Desoxyribonucleotiden katalysiert. Der sich wiederholende Zyklus der PCR, der zu einer exponentiellen Vermehrung des gewählten DNS-Abschnitts führt, beinhaltet die folgenden Reaktionsschritte: a) Denaturierung des doppelsträngigen Template durch Erhöhung der Temperatur, b) Anlagerung der Primer an die Einzelstränge (*Annealing*), c) Bindung der Polymerase an die Primer, und davon ausgehend, durch den Einbau entsprechender Desoxyribonucleotide Synthese von jeweils einem neuen Doppelstrang (*Extension*). Ein Standard-PCR-Programm ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt:

**Tabelle 2:** Standard-PCR-Programm

Allg. Ablauf	Temperatur	Dauer
Schritt 1: Start-Denaturierung	94 °C	5 min
Schritt 2: Denaturierung	94 °C	0,5 min
Schritt 3: Annealing	55 °C	0,5 min
Schritt 4: Extension	72 °C	1,5 min
Schritt 5: 30-fachen Wdh. Der Schritte 2 bis 4		
Schritt 6: End-Extension	72 °C	5 min
Schritt 7: Kühlung	10 °C	unendlich

### 3.2.2 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese von DNS und der Verdau mit Restriktionsenzymen wurden nach der Beschreibung von Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 2001) durchgeführt. Für die Restriktion wurden Enzyme der Fa. Promega verwendet. Die Polymerasen für die PCR stammten von den Firmen Promega ("Pfu-DNS Polymerase"), sowie Qbiogene ("Taq-DNS Polymerase"), der "PCR-dNTP-Mix" von der Fa. Bionline.

### 3.2.3 Isolation von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

DNS-Fragmente wurden mittels "*nucleo spin extract*"-Kit der Fa. Macherey-Nagel isoliert. Die zu reinigenden DNS-Fragmente wurden aus dem Agarosegel herausgeschnitten und den Herstellerangaben entsprechend weiterbehandelt.

### 3.2.4 Ligation und TOPO™-Klonierung

Bei einer Ligation handelt es sich um die Neukombination von Genabschnitten, die mittels Restriktionsenzymen geschnitten wurden. Dazu wurde zunächst der Plasmidring geschnitten, anschließend erfolgte die Anlagerung eines fremden DNS-Fragmentes aus dem Restriktionsansatz durch Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Basen. Es werden kovalente Bindungen über das Enzym T4-DNS-Ligase (Phosphodiester-Bindungen zwischen der freien 5-Phosphatgruppe und der freien 3'-OH-Gruppe der Desoxyribose) gebildet und das linearisierte Plasmid schließt sich wieder zu einem Ring.

Bei einer TOPO-Klonierung handelt es sich um eine Klonierung in einen Vektor der durch einen Thymidin-Überhang am 3'-Ende kovalent an ein Topoisomerase gebunden ist. Der Thymidin-Überhang ermöglicht eine direkte Insertion von Taq-Polymerase-amplifizierten PCR-Produkten. Die Topoisomerase I entstammt dem *Vaccina*-Virus und katalysiert die Ligation von Vektor und Insert. Das Enzym bindet an doppelsträngige DNS und spaltet die Phosphodiesterbrücken am 5'-CCCTT-Ende eines DNS-Strangs. Die hierbei freiwerdende Energie wird zum Aufbau einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphat des gespaltenen DNS-Strangs und einem Tyrosin-Rest (Tyr-274) der Topoisomerase I genutzt. Diese kovalente Phospho-Tyrosin-Bindung zwischen Vektor und Topoisomerase I wird in einem nächsten Schritt von der 5'-Hydroxy-Gruppe des amplifizierten DNS-Fragments angegriffen, wobei es zu einer Umkehrung der Reaktion und damit zur Freisetzung der Topoisomerase I kommt (Sekiguchi & Shuman, 1994). Die Durchführung erfolgte mit dem TOPO-Kit (Fa. Invitrogen) nach Herstellerangaben.

### 3.2.5 Kultivierung von Bakterien

Die Bakterien wurden in komplexen Flüssigmedien (Nährbouillon; Fa. Sifin, LB; Fa. Gibco, SOC; (Sambrook *et al.*, 2001)) mit entsprechenden Antibiotika kultiviert. Dazu wurden die Flüssigkulturen bei 25-37 °C im Schüttelinkubator (150 - 250 UpM) inkubiert. Das Wachstum der Bakterien wurde mit Hilfe der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm im Spektralphotometer (UV-2101 PC, Shimadzu) verfolgt. Zur Herstellung von Festmedien wurde dem entsprechenden Flüssigmedium 1 % Agarose hinzugefügt. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3:** Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
TOP10 One Shot	<i>F-mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>recA1</i> <i>deoR</i> <i>araD139(ara-leu)7697</i> <i>galUgalK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>	US Patent 5,487,993 Invitrogen, Carlsbad/USA
BL21(DE3)	<i>F-dcm ompT hsdS(r<sub>B</sub>- m<sub>B</sub>-) gal <math>\lambda</math></i> (DE3)	(Stratagene, ; Studier, 1991)
BL21(DE3) pLysS	<i>F-dcm ompT hsdS(r<sub>B</sub>- m<sub>B</sub>-) gal <math>\lambda</math></i> (DE3) [pLysS Cm <sup>r</sup> ] <sup>a</sup>	(Davanloo <i>et al.</i> , 1984; Stratagene, ; Studier & Moffatt, 1986)
BL21(DE3) pLysE	<i>F-<math>\lambda</math>(DE3) ompT hsdS(r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>-)</i> <i>dcm gal pLysE Cm<sup>r</sup></i>	Novagen, Madison/USA
Rosetta	<i>F-ompT hsdSB(r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>-) gal dcm</i> <i>lacY1 pRARE (Cm<sup>r</sup>)</i>	Novagen, Madison/USA (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von AK Hartmann)
JM109	<i>e14-(McrA-) recA1 endA1 gyrA96</i> <i>thi-1 hsdR17(r<sub>K</sub>- m<sub>K</sub>+) supE44</i> <i>relA1 <math>\lambda</math> (lac-proAB) [F' traD36</i> <i>proAB lacI<sup>q</sup>Z<math>\lambda</math> M15]</i>	(Sambrook <i>et al.</i> , 2001; Stratagene)
BC (BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL )	<i>F-ompT hsdS(r<sub>B</sub>- m<sub>B</sub>-) dcm+ Tet<sup>r</sup> gal</i> <i><math>\lambda</math> (DE3) endA Hte [argU ileY leuW</i> <i>Cm<sup>r</sup>]</i>	(Carstens, 1999; Stratagene)
BCC	BC + pREP4groESL	(Carstens, 1999; Stratagene)

Von *E. coli* B abgeleitete Stämme sind besonders für die Proteinexpression geeignet, da ihnen sowohl die Lon Protease als auch die OmpT (Outer membrane) Protease fehlen, die zur Proteindegradation während der Reinigung führen können. Mit der Bezeichnung (DE3) versehene Stämme tragen daher eine chromosomale Kopie des T7 RNA Polymerase Gens unter der Kontrolle des lacUV5 Promotors. Daher sind diese Stämme für T7 Expressionssysteme, wie z. B. pET-3d, geeignet. Die Bezeichnung pLysS weist auf einen Stamm hin, der ein pET-kompatibles Cm<sup>r</sup> Plasmid enthält, das das Gen für T7 Lysozym enthält; T7 Lysozym ist ein natürlicher Inhibitor der T7 RNA Polymerase, so dass in diesen Stämmen die Basalexpression unterdrückt werden kann.

### 3.2.5.1 Bakterienglycerinkulturen

Dauerkulturen von Bakterienstämmen wurden durch Vermischen der Zellsuspensionen mit sterilem Glycerin im Verhältnis 1:1 angelegt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert (Sambrook *et al.*, 2001).

### 3.2.5.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Bakterienzellen, die freie DNS aufnehmen können, bezeichnet man als kompetent. Bakterien, die keine natürliche Kompetenz besitzen, können durch verschiedene Methoden kompetent gemacht werden. Verbreitet ist die  $\text{CaCl}_2$ -Methode. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Protokoll von Hanahan (Hanahan, 1983) verwendet.

### 3.2.5.3 Bakterientransformation

Das Einschleusen von DNS in einen Mikroorganismus bezeichnet man als Transformation. Bei der verwendeten Methode macht man sich den Umstand zunutze, dass die nach Hinzufügen einer Salzlösung poröse Bakterienmembran durch eine kurze (etwa 30 Sekunden dauernde) Temperaturerhöhung auf  $42^{\circ}\text{C}$  für die Fremd-DNS durchlässig wird. Eine unmittelbar auf diesen Temperaturanstieg folgende Abkühlung des Reaktionsansatzes erhöht die Effizienz dieser so genannten Hitzeschocktransformation. Die Transformation der *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNS erfolgte nach der Beschreibung von Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 2001).

### 3.2.5.4 Plasmidisolierung aus Bakterien

Die Isolierung der Plasmid-DNS aus Bakterienzellen erfolgte anhand der Herstellerangaben mittels „Wizard® Plus“ Mini- und Midi-Kit (Fa. Promega), sowie dem „Plasmid Mini Kit“ (Fa. Qiagen).

### 3.2.5.3 Photometrische Bestimmung der Plasmidkonzentration

Die DNS-Konzentration lässt sich photometrisch über die Absorption der DNS bei 260 nm bestimmen (Sambrook *et al.*, 2001). Zu diesem Zweck wurde von der DNS im UV/VIS-Spektralphotometer (UV-2101 PC Fa. Shimadzu) ein Spektrum zwischen 200 nm und 300 nm aufgenommen.

### 3.2.6 Proteinexpression in *E. coli*

Zunächst wurden geeignete *E. coli* Stämme mit dem Plasmid, das die cDNS des gewünschten Proteins beinhaltet transformiert und 24 Stunden kultiviert. Ein Selektionsmedium wurde mit dieser Vorkultur angeimpft und im Schüttelinkubator bei 37°C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5-1,0 inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten OD<sub>600nm</sub> erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM. Bei IPTG handelt es sich um ein nicht-fermentiertes Lactoseanalogon, welches den *lac* Repressor inhibiert und dadurch die Proteinexpression in den Zellen startet. Die Expressionsbedingungen für das Adx-Homolog aus *D. melanogaster* wurden an die eingesetzten *E. coli* Stämme angepasst. Zur Kontrolle der Expressionsintensität wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben für die Proteinanalyse mittels SDS-Polyacrylamidelektrophorese entnommen.

### 3.2.7 DNS-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNS erfolgte mit einer modifizierten Didesoxymethode (Sanger *et al.*, 1977) in einem automatischen Sequenziersystem "DNS-Sequencer 4000" der Fa. Licor anhand der Herstellerangaben. Sie wurden freundlicherweise von Frau Nathalie Lenz und Frau Katharina Bompais durchgeführt. Weitere Sequenzierungen erfolgten durch die Fa. Sequiserve.

## 3.3 Proteinchemische Methoden

### 3.3.1 Proteinextraktion aus Säugerzellen

Als Vorbereitung für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-Page) mußten zunächst die Proteine aus den entsprechenden Organismen gewonnen werden. Dazu wurden die Zellen wie gewohnt transfiziert und unter Standardbedingungen inkubiert. Die Proteinaufreinigung erfolgte nach den von Denner *et al.* beschriebenen Methoden (Denner *et al.*, 1995a; Denner *et al.*, 1995b).

### 3.3.2 Proteinextraktion aus Hefezellen

Zunächst wurden Vorkulturen der in Tabelle 3.5.1 aufgeführten Hefestämme im Schüttelinkubator bei 30°C für 24 Stunden im entsprechenden Selektionsmedium inkubiert. Nach Überimpfen einer 100 ml Hauptkultur mit 10 ml der Vorkultur wurde diese bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> von 1,5 bis 2 inkubiert. Dann erfolgte die Proteinextraktion nach der von Matthes *et al.* (Matthes *et al.*, 1994) beschriebenen Methode.

### 3.3.3 Proteinextraktion aus Bakterienkulturen

Zunächst wurden die Bakterien transformiert, kultiviert und induziert. Nach erfolgter Expression wurden die Zellen pelletiert und das in 50 ml Lysepuffer resuspendierte Pellet mittels Ultraschall aufgeschlossen. Das verwendete Programm im Ultraschall-Desintegrator (USD 30) (2/8 Zoll Sonotrode, Fa. Emich) ist in Tabelle 4 dargestellt. Es wurde lediglich der abzentrifugierte Überstand des aufgeschlossenen Lysat für die Aufreinigung verwendet.

**Tabelle 4:** Ultraschall-Programm zum Aufschluss

Sondentyp	1
Amplitude	50hz
Gesamtdauer	20min
Puls	30sek
Ratio	1 (30sek Beschallung - 30sek Pause)
Temperatur	10°C (zusätzliche Kühlung der Zellen mit Eis)
Rührgeschwindigkeit	100UpM

### 3.3.4 Reinigung der Proteine aus Bakterienkulturen

#### 3.3.4.1 Säulenchromatographische Reinigungsverfahren

Die Ionenaustauschchromatographie ist eine Form der Adsorptionschromatographie, die auf der Interaktion zwischen geladenen gelösten Molekülen beruht. Der Ionenaustausch findet an Ionenaustauschergruppen statt, z. B.  $\text{SO}_3^-$  oder  $\text{NH}_3^+$ . Diese Gegenionen können durch andere Ionen ersetzt werden. Als Anionenaustauscher wurde DEAE-TOYOPEARL 650 S (Fa. Tosoh), welcher Diethylaminoethylgruppen als positiv geladene Gruppen trägt verwendet. Die Säule (115 ml Säulenvolumen,  $\varnothing$  2,6 cm) wurde vor Laden des Proteinlysats nach Herstellerangaben äquilibriert. Die Flußrate betrug konstant 1,5 ml/min. Ungebundene Proteine wurden durch Waschen mit etwa 2-3 Säulenvolumina Puffer (20 mM Tris/HCl (pH 9,0) entfernt. Anschließend erfolgte mittels dem in Tabelle 5 aufgeführten Gradienten-Programm die Elution. Die gesammelten Fraktionen wurden spektroskopisch analysiert und für die anschließende Gelfiltration mittels Centricon 30 (Fa. Millipore) auf ein Volumen zwischen 0,3 und 0,5 ml eingengt. Es wurden weiterhin SourceE 30Q und Source 30S (Fa. Amersham) als Säulenmaterial verwendet.

**Tabelle 5:** Elutionsprogramm

<b>1,5 ml/min Flußrate</b>	
00 – 20 ml	0 % Elutionspuffer
20 – 30 ml	20 % Elutionspuffer
<b>3,0 ml/Fraktion werden gesammelt</b>	
30 – 100 ml	50 % Elutionspuffer
100 – 150 ml	70 % Elutionspuffer
150 – 200 ml	100 % Elutionspuffer
200 – 250 ml	100 % Elutionspuffer

Das Prinzip der Gelfiltration beruht auf der Trennung der Moleküle nach Größe, während sich die in Lösung befindlichen Moleküle durch sie hindurch bewegen. Die Gelmatrix – ein Phasengemisch aus einer festen und einer flüssigen Phase - fungiert dabei als Molekularsieb. Es bilden sich Poren einheitlicher Größe, die eine Ausschlussgrenze für die Größe der zu trennenden Substanzen festlegen. Die Elution der zu trennenden Moleküle erfolgt nach abnehmendem Molekulargewicht. Das in der Arbeit verwendete Säulenmaterial Superdex 75 (Fa. Amersham Pharmacia) eignet sich für die Trennung globulärer Proteine von 3 bis 70 kDa. Es handelt sich um ein zusammengesetztes Gel, in dem die Dextran-Ketten, die hauptsächlich die Filtrations-Eigenschaften bestimmen, kovalent an eine stark verzweigte Agarose-Matrix gebunden sind. Die verwendete Säule besaß eine Länge von 60 cm und einen Durchmesser von 1,6 cm. Sie wurde mit 20 mM Kaliumphosphat (pH 9,0) äquilibriert und eluiert. Die Flußrate betrug 0,2 ml/min.

### **3.4 Proteincharakterisierung**

#### **3.4.1 UV/Vis-Spektren**

Die in der Arbeit vorliegenden Spektren wurden im Bereich von 250 und 700 nm mit einem UVPC-2101 Zweistrahlphotometer der Fa. Shimadzu aufgezeichnet. Je nach Wellenlängenbereich in dem die Proben analysiert wurden, erfolgte die Messung unter Verwendung von Quarzküvetten unterschiedlicher Schichtdicke ( 0,1 – 1 cm).

#### **3.4.2 Circular-Dichroismus(CD)-Spektroskopie**

Eine Methoden zur Konformationsanalyse von Peptiden ist die Circular-Dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) (Pingoud & Jeltsch, 1997). CD-Spektroskopie nutzt die Wechselwirkung optisch aktiver Substanzen mit polarisiertem Licht und analysiert die unterschiedliche Absorption in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Dadurch kann die Absolutkonfiguration von Molekülen bestimmt werden. Optische Aktivität beruht im Allgemeinen auf dem Fehlen von Symmetrie und im Speziellen auf dem Vorhandensein eines asymmetrischen Kohlenstoffatoms, das man als chirales Zentrum im Molekül bezeichnet. Die CD-Spektren wurden mit einem Jasco 715 Spektropolarimeter aufgenommen. Bei der thermischen Denaturierung erfolgte die Temperaturregulation der Quarzküvette mit der Schichtdicke von 1 cm (sichtbarer und mittlerer UV-Bereich) durch ein Peltier-Element (Jasco; PTC-348WI). Drei Spektren wurden von jeder Probe gemessen, akkumuliert und durch den Abzug der jeweiligen Küvettenpektren korrigiert.

##### **3.4.2.1 Bestimmung der thermischen Stabilität mittels (CD)-Spektroskopie**

Die Umgebung des [2Fe-2S]-Clusters ist für die CD-Hauptbande bei 440 nm verantwortlich. Wird das Signal bei 440 nm verfolgt, während das Protein aufgeheizt wird, so kann anhand der Signaländerung bestimmt werden, bei welcher Temperatur das Protein seine

strukturelle Integrität verliert und sich entfaltet. Der verwendete Puffer enthielt 5 mM oder 50 mM HEPES bei einem pH-Wert von 7,5. Um den Sauerstoff zu entfernen, wurde der Puffer bei einem Vakuum von  $-1$  bar 30 min entgast. In anaerober Umgebung (95% Stickstoff und 5% Wasserstoff) wurde die Küvette befüllt und mit einem Teflonstopfen verschlossen. Die Proben wurden im CD-Spektrometer von  $20^{\circ}\text{C}$  bis  $80^{\circ}\text{C}$  aufgeheizt und die Signaländerung bei 440nm für die oxidierten Form verfolgt.

Parameter des CD-Gerätes für die chemischen Denaturierung:

<i>Range</i>	650-200nm
<i>Sensitivity</i>	50mdeg
<i>Resolution</i>	0.5nm
<i>Accumulation</i>	3
<i>Band with</i>	10nm
<i>Response</i>	1sec
<i>Scan speed</i>	500nm/min

Parameter des CD-Gerätes für die thermische Denaturierung:

<i>Heating rate</i>	$60^{\circ}\text{C}/\text{h}$
<i>Sensitivity</i>	100mdeg
<i>Resolution</i>	1C
<i>Accumulation</i>	1
<i>Band with</i>	10nm
<i>Response</i>	2sec

### 3.4.3 Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Technik, Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts zu trennen, beruht auf der Anwesenheit des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS), welches sich mit Proteinen zu stark negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen verbindet. Damit ist die spezifische Ladung der Proteine nicht mehr entscheidend für ihre Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Innerhalb einer Gelmatrix aus hydrolysierten, quervernetzten Polymeren ist somit im Wesentlichen nur noch die Proteingröße für das Wanderungsverhalten entscheidend. Dieses Trennsystem wurde erstmals von Lämmli beschrieben (Laemmli et al., 1976).

### 3.4.4 Western Blot und immunologischer Proteinnachweis

Um die nach ihrer Größe getrennten Proteine immunologisch nachweisen zu können, wurden sie vom SDS-Gel zunächst auf eine Nitrozellulosemembran (Western Blot) übertragen. Das in der Arbeit angewandte Verfahren beruht auf der Methode von Sambrook (Sambrook et al., 2001).

Die Detektion der Proteine auf der Nitrocellulosemembran erfolgte durch Chemolumineszenz mittels „ECL Plus Western Blotting Detection Reagents“ (Fa. Amersham Biosciences). Dazu wurden die Detektionsreagenzien nach Anleitung des Herstellers gemischt, auf die Nitrozellulosemembran aufgetragen und 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgetupft und die Membran luftblasenfrei in Klarsichtfolie eingeschlagen. In einer Filmkassette legt man auf die Membran einen

„Hyperfilm-ECL“ (Fa. Amersham Biosciences) und belichtet diesen 1 Minute lang, bevor man ihn entwickelt. Bei schwachen Signalen muss die Belichtungszeit erhöht werden. Es wurden polyklonale Primärantikörper zum Nachweis von Cytochrom c, p53 und p21Waf (Fa. Pharmacia) sowie Adx verwendet. Als Sekundärantikörper wurde "Anti-rabbit IgG" (Fa. Dako) eingesetzt.

### 3.4.5 Aktivitätsanalyse mittels *in vitro* Rekonstitution

Um zu überprüfen, ob Benoni in der Lage ist, Elektronen auf CYP11A1 zu übertragen, wurde ein nach Beckert modifizierter CYP11A1-Substratumsetzungs-Test durchgeführt (Beckert *et al.*, 1994). CYP11A1 ist *in vivo* für die Umwandlung von Cholesterin zu Pregnenolon verantwortlich. Dabei werden die für die Reaktion benötigten Elektronen von NADPH bereitgestellt und über AdR und Adx auf das Cytochrom P450 übertragen. Die Substratumsetzung kann *in vitro* rekonstituiert werden, sofern eine vollständige Elektronenübertragungskette vorhanden ist (Sugano *et al.*, 1989).

Als Reaktionspuffer diente 50 mM HEPES (pH 7,4) mit 0,05 % Tween 20. Die Endkonzentrationen der eingesetzten Komponenten betragen 0,4 µM CYP11A1, 0,5 µM AdR, 400 µM Cholesterin, 5 µM Glucose-6-Phosphat, 1 µM MgCl<sub>2</sub>, 1 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 100 µM NADPH zum Starten der Reaktion und 0,4 U Cholesteroxidase. Als interner Standard diente 100 µM Cortisol. Als Positivkontrolle wurde gereinigtes Adx von Herrn Wolfgang Reinle verwendet. Die eingesetzten Konzentrationen der Benoni-Varianten lagen im Bereich zwischen 0,05 µM bis 1,6 µM. Die Reaktionszeit betrug 10 Minuten bei 37 °C unter starkem Schütteln. Die Steroide wurden anschließend mit Chloroform extrahiert, getrocknet und in 200 µM Acetonitril aufgenommen. Die HPLC-Analyse erfolgte an einer Anlage der Fa. JASCO unter Verwendung einer "C18 reversed phase"-Säule (Fa. Waterman) mit einem Lösungsmittelsystem, bestehend aus Acetonitril/Isopropanol (30:1). Zur Detektion wurde die Absorption bei 240 nm gemessen und die Auswertung anhand des Chromatogramms mit der Software Borwin der Fa. Jasco vorgenommen. Alle Experimente wurden sofern nicht anders erwähnt mindestens dreimal durchgeführt.

### 3.4.6. Redoxpotentialbestimmung

Das Redoxpotential von Benoni wurden mittels der Farbstoff-Photoreduktionsmethode mit Safranin T als Indikator und Elektronenüberträger bestimmt (Sligar & Gunsalus, 1976). Hierbei wurden die Absorptionsänderungen bei den Wellenlängen 520 nm und 414 nm spektralphotometrisch verfolgt und anschließend durch Verwendung der Nernst'schen Gleichung  $E = E_0 + (RT / zF) * \ln c(\text{Ox}) / c(\text{Red})$  ausgewertet. Dabei entspricht E dem Redoxpotential in V, E<sub>0</sub> dem Standardpotential in V, R ist die Gaskonstante mit einem Wert von 8,314 J/(mol K), T die Temperatur in K, z beschreibt die Anzahl der übertragenen Elektronen, F ist die Faraday-Konstante mit einem Wert von 96500 J/(mol V) und c (Ox) bzw. c (Red) ist die Konzentration des Oxidationsmittels bzw. des Reduktionsmittels jeweils in mol/l.

### 3.4.7. ESR-Messung

Mit Hilfe der Elektronenspinresonanz (ESR) wird die resonante Mikrowellenabsorption einer Probe in einem statischen Magnetfeld gemessen. Dadurch ist es möglich Proben zu untersuchen, die über ein permanentes magnetisches Moment (ein oder mehr ungepaarte Elektronen) verfügen. Diese Methode wurde 1944 von Jewgeni Konstantinowitsch Sawoiski erstmals beschrieben: Bringt man eine Probe mit permanentem magnetischem Moment (magnetisches Moment) in ein Magnetfeld, so spalten sich die entarteten Energiezustände auf (Zeeman-Effekt). Durch Bestrahlung mit einer Mikrowelle, deren Energie der Aufspaltung der Zeeman-Niveaus entspricht, kommt es zur Absorption (Zeemann, 1914). In der Praxis wird die zu untersuchende Probe in einem veränderlichen Magnetfeld mit einer Mikrowelle fester Frequenz bestrahlt. Das aufgezeichnete Absorptionsspektrum erlaubt Rückschlüsse auf die magnetische Umgebung der magnetischen Momente. Die ESR-Messungen der vorliegenden Arbeit wurden freundlicherweise durch Herrn Dr. R. Kappl vom Institut für Biophysik in Homburg durchgeführt.

## 3.5 Spalthefe-Methoden

### 3.5.1 *Schizosaccaromyces pombe*-Stämme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 6 aufgeführt.

**Tabelle 6:** Verwendete *S. pombe*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
MB100	<i>h<sup>-</sup> cdc2.1w / leu1.32</i>	(Enoch & Nurse, 1990)
MB154	<i>h<sup>+</sup> cdc2.3w / leu1.32 / ade<sup>-</sup></i>	(Enoch & Nurse, 1990)
MB271	<i>h<sup>-</sup> leu1<sup>-</sup></i>	
MB292	MB 100 / Adx108	vorliegende Arbeit
MB293	MB 154 / Adx108	vorliegende Arbeit
CAD45	<i>h<sup>-</sup> leu1<sup>-</sup> / pNMT1-Adx-wt</i>	vorliegende Arbeit
CAD46	<i>h<sup>-</sup> leu1<sup>-</sup> / pNMT1-Adx S112W</i>	vorliegende Arbeit
CAD47	<i>h<sup>-</sup> leu1<sup>-</sup> / pNMT1-Adx D113Y</i>	vorliegende Arbeit
CAD48	<i>h<sup>-</sup> leu1<sup>-</sup> / pNMT1-Adx 108</i>	vorliegende Arbeit
TH75	<i>h<sup>-</sup> leu1<sup>-</sup> / pNMT1-Adx-wt-AdR-CYP11B1</i>	vorliegende Arbeit
IN01	<i>h<sup>-</sup> leu1<sup>-</sup> / pNMT1-Adx-wt-AdR</i>	vorliegende Arbeit

### 3.5.2 Kultivierung von *Schizosaccharomyces pombe*

Die Anzucht der Spaltheefe *S. pombe* erfolgte in Edinburgh Minimal Medium (EMM). Die Zusammensetzungen der Nährmedien für *S. pombe* erfolgten nach Alfa *et al.* (Alfa *et al.*, 1993). Für Selektionsmedien wurde das Medium je nach verwendetem Spalthefestamm mit Adenin (ade), Histidin (his), Leucin (leu), Uracil (ura) oder Kombinationen dieser Zusatzlösungen supplementiert. Die Arbeitskonzentration dieser Zusätze betrug jeweils 0,1 g/l. Zum Zubereiten von Kulturplatten wurde EMM mit entsprechenden Selektionssupplementen und 2 % Agar versetzt. Bei Versuchen, in denen die Expression der transformierten Gene unterdrückt werden sollte, wurde durch Zugabe von Thiamin in einer Endkonzentration von 5  $\mu$ M der *nmt41*-Promotor abgeschaltet. Etwa 4 h nach Zugabe von Thiamin erfolgt die Abschaltung, wohingegen das Anschalten des Promotors zwischen 20 und 24 h benötigt (Maundrell, 1993).

Für eine Vorkultur eines Hefestammes, wurden 10 ml EMM mit den jeweils nötigen Auxotrophiemarkerlösungen versehen und mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte beimpft. Diese Kultur wurde dann für 24 Stunden bei 30°C im Rotationsschüttler inkubiert, so dass die Zellen die stationäre Wachstumsphase erreichten. Für eine Hauptkultur wurde die benötigte Menge EMM (üblicherweise 100-200 ml) mit allen nötigen Zusätzen (Auxotrophiemarker, Steroide) versehen und mit 1/40 Volumenteil der Vorkultur beimpft.

### 3.5.3 Spalthegeglycerinkulturen

Zur langfristigen Lagerung wurden von allen Spalthefestämmen Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurde eine Suspension des jeweiligen Stammes im Verhältnis 1:1 mit sterilem Glycerin gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Kulturen wurden bei -80°C aufbewahrt.

### 3.5.4 Hefetransformation

Aufgrund der Dicke und Stabilität der Hefezellwand unterscheidet sich eine Hefetransformation von einer Bakterientransformation. Die hier verwendete Lithiumacetat (LiAc)-Methode stützt sich auf die Eigenschaft der Alkali-Ionen, die Zellwand porös zu machen. Die Durchführung dieser Methode orientierte sich an der Beschreibung von F. Hostenbach (<http://www.bio.uva.nl/pombe/handbook/section2/section2-7.html>) und ging im wesentlichen auf die Beschreibungen von Ito zurück (Ito *et al.*, 1983).

### 3.5.5 Wachstumskurven

Als Vorkultur wurden 10 ml des entsprechend supplementierten Selektionsmedium mit einem Spalthefeklon angeimpft und bei 30°C im Schüttler (150 U/min) über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Animpfung einer 10 ml Hauptkultur in der Dichte  $5 \times 10^5$  Zellen und anschließende Inkubation bei 30°C im Schüttler (150 U/min). Es wurde über einen Zeitraum von 8 Stunden alle 2 Stunden Proben dieser Hauptkultur entnommen und die Generationszeiten mittel OD<sub>595</sub>-Messung bestimmt.

### 3.5.6 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Plattentest ( Zellviabilitätsassay)

Es wurden wie bereits unter 3.5.2 beschrieben Vorkulturen der jeweiligen Stämme angeimpft. Am nächsten Tag erfolgte eine 1:2000 Verdünnung der Vorkulturen in H<sub>2</sub>Odest. Je 200 µl dieser Verdünnung wurde auf EMM-Platten ohne Zusatz, sowie EMM-Platten die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in den Konzentrationen 0,5 mM; 1 mM; 3 mM und 5 mM enthielten ausplattiert. Die Platten wurden anschließend für 4 Tage bei 30°C inkubiert. Um die Viabilität der Zellen in % zu bestimmen, wurden die Kolonien auf den Platten gezählt. Bei der Auswertung handelt es sich um die Kalkulation dreier unabhängiger Experiment mit Dreifachwerten.

$$\text{Viabilität [\%]} = \frac{\text{Anzahl der Kolonien H}_2\text{O}_2\text{ enthaltende Platte}}{\text{Anzahl der Kolonien EMM-Platte (Kontrolle)}} * 100$$

### 3.5.7 DAPI (4',6-Diamidin-2-phenyl-indol) -Färbung

Für die DAPI-Färbung wurden Zellen einer frühen stationären *S. pombe* Kultur abzentrifugiert, in Methanol gewaschen, fixiert und anschließend mit einer 1:10<sup>3</sup> verdünnten Lösung aus 50:50 MeOH:H<sub>2</sub>O und DAPI (Stock: 1.0 mg·mL<sup>-1</sup> in H<sub>2</sub>O) gefärbt. Nachdem die Zellsuspension auf dem Objektträger getrocknet war, wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop DM LB HC der Fa. Leica betrachtet und die Daten mittels analySIS Software der Fa. Soft Imaging GmbH verarbeitet und ausgewertet.

### 3.5.8 Durchflußzytometrische Analysen

Die Durchführung der durchflußzytometrischen Analysen erfolgte in der Spalthefe, wie bereits im Kapitel 3.1.4.1 für Säugerzellen beschrieben, es wurde allerdings destilliertes Wasser an Stelle von PBS zur Analyse verwendet. In allen Experimenten wurden 30000 Zellen gezählt und die dargestellten Werte wurden aus drei unabhängigen Experimenten mit Triplett-Ansätzen kalkuliert. Für alle Zellzyklusexperimente wurden die Kulturbedingungen, das Propidiumiodid-Staining (PI) sowie die durchflußzytometrischen Analysen wie von Alfa *et al.* beschrieben, durchgeführt (Alfa *et al.*, 1993).

### 3.5.9 Annexin-Färbung

Bei intakten Zellen befindet sich das Phospholipid Phosphatidylserin nahezu ausschließlich auf der Innenseite der doppelschichtigen Zytoplasmamembran. Diese Polarität wird in einer sehr frühen Phase der Apoptose-Kaskade aufgehoben. In der Folge gelangt Phosphatidylserin an die Außenseite der Zytoplasmamembran. Annexin V bindet mit hoher Affinität an Phosphatidylserin. Über den Nachweis des gebundenen Annexin V können die apoptotischen Zellen dargestellt werden. Der Nachweis erfolgte mittels Annexin-V-FLUOS Kit der Fa. Roche nach Herstellerangaben.

### 3.5.10 TUNEL-Assay

Der TUNEL-Assay dient der Identifizierung von Brüchen ein- und doppelsträngiger DNS. Eingelagerte Marker (Deoxyuridin Triphosphat) werden durch chemische Reaktionen mit bestimmten Enzymen katalysiert und durchflußzytometrisch (Sailer *et al.*, 1995) fluoreszenz- oder lichtmikroskopisch (Lopes *et al.*, 1998) erkannt. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu der *in situ cell death detection kit*, POD der Fa. Roche nach Herstellerangaben verwendet.

### 3.5.11 Dihydrorhodamin123 (DHR123)-Assay

Dihydrorhodamin 123 ist eine weitere Verbindung, die zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies dient. DHR123 wird durch ROS zu Rhodamin123, dem eigentlichen Fluoreszenzfarbstoff, oxidiert. Die Rhodamin123-Färbung ist durchflußzytometrisch im FL2-Kanal zu erkennen und kann als apoptotischer Marker herangezogen werden. Für die Färbung wurde 1 ml der zu untersuchenden Kultur steril entnommen und mit 2 µl DHR123-Lösung versetzt. Sofort nach der Zugabe wurde gut gemischt und anschließend für 2 Stunden bei 30°C geschüttelt. Die Zellen wurden nach Waschen in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> aufgenommen und die Fluoreszenz im Rhodamin-Kanal gemessen.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Apoptoseinduktion durch Überexpression von Adx oder CYP11A1 in Säugerzelllinien

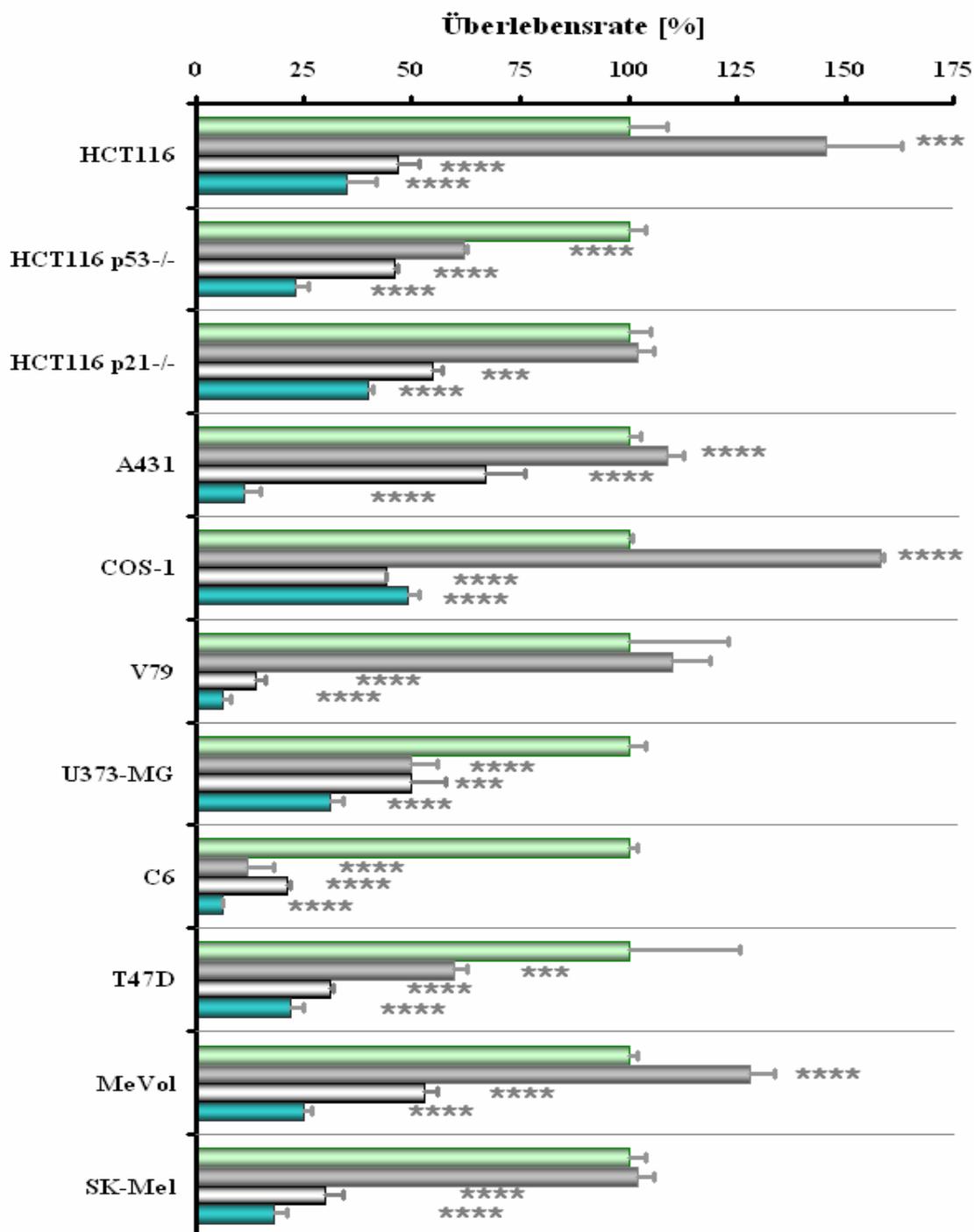
#### 4.1.1 Einfluß der Überexpression von humanem Adx, bovinem Adx und CYP11A1 auf die Überlebensrate verschiedener Zelllinien

In einem ersten Experiment wurde mittels Zelluntergangs-Assay (wie unter 3.1.3.2 beschrieben) untersucht, ob die Überexpression von humanen oder bovinem Adx sowie CYP11A1 einen Einfluß auf die Überlebensrate von Zellen hat. Zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz wurden zunächst verschiedene Zelllinien (Tabelle 7) transient mit pEGFPc1 und pSVL (leerer Vektor) kotransfiziert. Anschließend erfolgte die Kotransfektion der Zellen mit pEGFPc1 und einem Expressionsplasmid für humanes Adx (hAdx), bovines Adx (bAdx) oder humanes CYP11A1 (hCYP11A1).

**Tabelle 7:** Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Merkmal	Referenz
COS-1	Affennierenzelllinie, die mit dem T-Antigen des SV40- Virus immortalisiert wurde	ATCC-Nr. CRL-1650™
HCT116	Humane Kolorektalkarzinom-zelllinie (Wildtyp)	(Waldman <i>et al.</i> , 1995)
HCT116 p53 <sup>-/-</sup>	HCT116-Zellen mit funktionslosem p53-Gen	(Bunz <i>et al.</i> , 1999)
HCT116 p21 <sup>-/-</sup>	HCT116-Zellen mit funktionslosem p21-Gen	(Waldman <i>et al.</i> , 1995)
MeWo	Humane maligne Melanom-Zelllinie	(Meissauer <i>et al.</i> , 1991)
SK-Mel-28	Humane maligne Melanom-Zelllinie	(Carey <i>et al.</i> , 1979)
V79MZ	Hamsterlungen-Fibroblasten	(Waxman <i>et al.</i> , 1989)
A431	Humane epidermale Karzinom-Zelllinie	ATCC-Nr. CRL-1555™
T47D	Humane Mammakarzinom-Zelllinie	ATCC-Nr. HTB-133™
RatC6	Maligne Glioblastom-Zelllinie aus der <i>Rattus norvegicus</i>	ATCC-Nr. CCL-107™
U373-MG	Humane Glioblastom-Zelllinie	ATCC-Nr. HTB-17™

Die Anzahl der GFP-exprimierenden, überlebenden Zellen wurde 24 Stunden nach der Transfektion mittels durchflußzytometrischer Analyse (FACS) bestimmt und mit der Anzahl der überlebenden Zellen des Kontrollexperimentes verglichen. Es zeigte sich, dass sowohl die Überexpression von humanem als auch bovinem Adx zu einem signifikanten Einbruch der Überlebensrate in allen getesteten Zelllinien führte (Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Effekt von transient transfizierten steroidogenen Proteinen auf die Überlebensrate verschiedener Zelltypen. Alle Zellen wurden mit pEGFPc1 und leerem Vektor (grüne Balken) bzw. einem Expressionsplasmid für hCYP11A1 (grau), bAdx (weiß) oder hAdx (grünblau) kotransfiziert. Die Überlebensraten wurden wie unter 3.1.3.2 beschrieben berechnet. Dargestellte Daten: Mittelwerte  $\pm$  STABWN, t-test: \*\*\* $p < 0.005$ , \*\*\*\* $p < 0.001$  verglichen mit der Kontrolle. (Derouet-Humbert et al., 2005).

Die Überexpression von hCYP11A1 zeigte unter den gleichen Bedingungen uneinheitliche Auswirkungen: In den Zelllinien HCT116, COS-1, A431 und MeVol stieg die Überlebensrate, in HCT116p53<sup>-/-</sup>-Zellen, U373-MG-Zellen, C6-Zellen und in T47D-Zellen sank die Überlebensrate und in den übrigen Zelllinien blieb die Überlebensrate konstant im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 11).

In diesem ersten Experiment konnte somit eindeutig gezeigt werden, dass die Überexpression von humanem und bovinem Adx einen deutlichen Einfluß auf die Überlebensrate aller getesteter Zelllinien hat, wohingegen die Überexpression von CYP11A1 lediglich in HCT116p53<sup>-/-</sup>, U373-MG-, C6- und in T47D-Zellen zu einer verminderten Lebensfähigkeit der Zellen führte.

#### 4.1.2 ROS-Generierung durch Überexpression von Adx oder CYP11A1

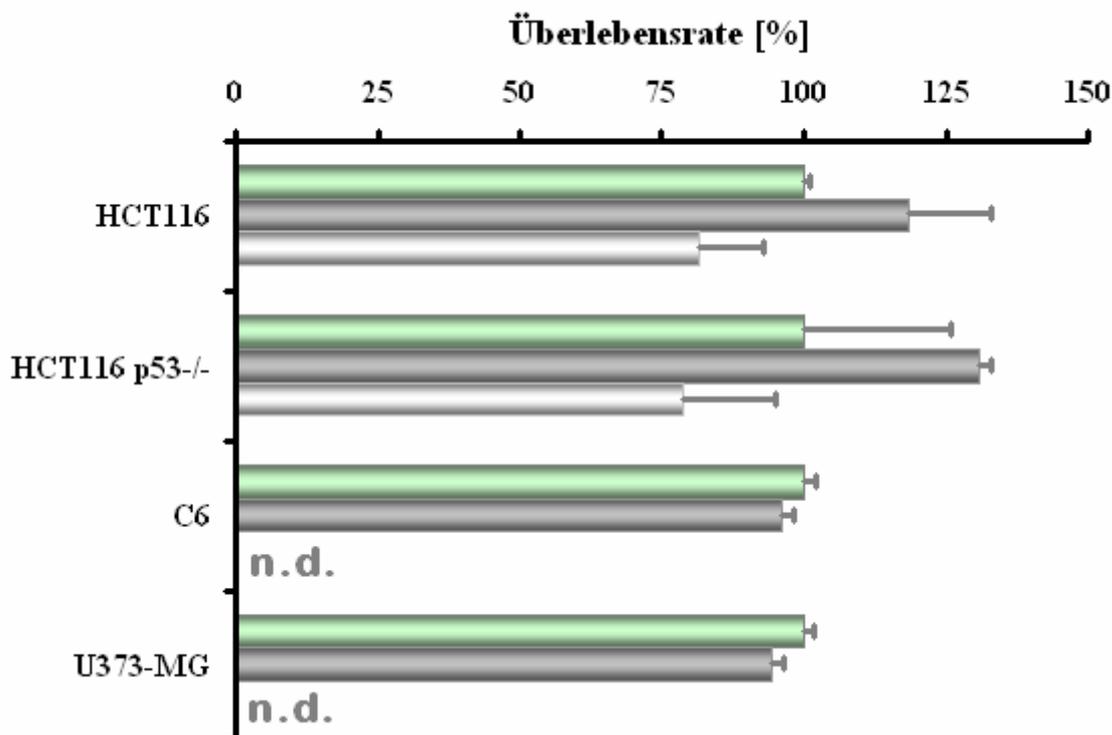
Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob hAdx oder hCYP11A1 in der Lage sind *in vivo* ROS zu produzieren. Dazu wurde die Umwandlung von Dihydroethidium (DHE) zu Ethidium 24 Stunden nach transienter Expression mit den jeweiligen Plasmiden in HCT116-Zellen, HCT116p53<sup>-/-</sup>-Zellen und HCT116p21<sup>-/-</sup>-Zellen wie unter 3.1.3.5 beschrieben bestimmt. Die Überexpression von Adx führte wie in Tabelle 8 dargestellt in allen drei Zelllinien zu einem signifikanten Anstieg der Ethidiumkonzentration, welche mit einer zunehmenden ROS-Produktion *in vivo* korreliert. Es konnte somit eindeutig belegt werden, dass die Überexpression von Adx in der Lage ist, ROS in Kolonkarzinomzellen zu produzieren. Dieser Effekt konnte unter Verwendung des ROS-Inhibitors N-acetyl-L-cystein (NAC) wie bereits in der Literatur beschrieben aufgehoben werden (Tsai *et al.*, 1996).

**Tabelle 8:** Zunahme der DHE-Konversion nach transienter Expression von hAdx

Zelllinie	Fluoreszenzintensität		
	Mock	hAdx	hAdx + NAC
HCT116	9,4 ± 1,0	25,9 ± 12,1****	12,1 ± 5,7
HCT116 p53 <sup>-/-</sup>	11,1 ± 0,5	17,7 ± 1,3****	9,8 ± 0,3
HCT116 p21 <sup>-/-</sup>	9,7 ± 0,5	18,6 ± 1,2****	9,5 ± 0,4

Bei den in Tabelle 8 dargestellten Daten handelt es sich um die Mittelwerte der gemessenen Ethidiumfluoreszenzintensität aus drei unabhängigen Experimenten (jeweils Dreifachwerte) ± STABWN; t-test: \*\*\*\*p<0.001 verglichen mit unbehandelten Zellen (Kontrolle).

Die beiden Adx-sensitiven Zelllinien HCT116 und HCT116p53<sup>-/-</sup>, sowie die zwei CYP11A1-sensitiven Zelllinien (C6 und U373-MG) wurden außerdem mit pEGFPc1 und hAdx bzw. hCYP11A1 kotransfiziert und die Zellüberlebensrate nach 24 stündiger Behandlung mit dem ROS-Inhibitor 1,2-dihydroxybenz-3,5-disulfonat (TIRON) in der Konzentration 1 mM (Ledenev *et al.*, 1986) durchflußzytometrisch bestimmt (Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Einfluß der Adx- oder CYP11A1-induzierten ROS-Produktion auf die Zellüberlebensrate

Die Zellen wurden mit peGFPc1 und einem Expressionsplasmid für hCYP11A1 (graue Balken) oder hAdx (weiße Balken) kotransfiziert und die Überlebensraten 24 Stunden nach Behandlung der Zellen mit dem ROS-Scavanger TIRON (1 mM) durchflußzytometrisch bestimmt. Als Kontrolle wurden unbehandelte, mit peGFPc1 und leerem Vektor transfizierte Zellen (grüne Balken) mitgeführt. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  STABWN; n.d. = nicht durchgeführt (Derouet-Humbert *et al.*, 2005).

Wie in Abbildung 12 dargestellt, konnte in keiner der getesteten Zelllinien eine Veränderung der Lebensfähigkeit in Anwesenheit des ROS-Scavangers TIRON festgestellt werden. Offensichtlich ist TIRON in der eingesetzten Konzentration in der Lage, die durch Adx-Überexpression gebildeten ROS zu neutralisieren.

In einem nächsten Experiment wurde außerdem der Einfluß weiterer ROS-Inhibitoren auf die Adx-induzierte ROS-Produktion in den drei verschiedenen HCT116-Zelllinien untersucht. Nach transients Transfektion mit hAdx wurden die Zelllinien dazu entweder mit dem ROS-Scavanger Mangan(III)-Tetrakis-(4-Benzoessäure)-Porphyrin (MnTBAP), 4,4'-Diisothio-cyanatostilben-2,2'-Disulfonsäure (DIDS) oder NAC für 24 Stunden inkubiert (Ghafourifar *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 1999; Thangaraju *et al.*, 1999a). Als Kontrolle wurden mit peGFPc1 und pSVL-Vektor transfizierte Zellen ohne den Zusatz eines ROS-Scavangers verwendet. Die DHE-Konversion wurde durchflußzytometrisch bestimmt.

**Tabelle 9:** Einfluß unterschiedlicher ROS-Inhibitoren auf die Adx-induzierte ROS-Bildung

Zelllinie	Fluoreszenzintensität			
	Kontrolle	MNTBAP	DIDS	NAC
HCT116	55,8 ± 9,0	84,4 ± 2,7 ****	111,8 ± 2,4 ****	128,5 ± 4,2 ****
HCT116 p53 <sup>-/-</sup>	39,5 ± 2,5	69,2 ± 2,7 ****	102,3 ± 1,4 ****	97,1 ± 3,1 ****
HCT116 p21 <sup>-/-</sup>	59,9 ± 6,5	81,7 ± 2,8 ****	102,4 ± 4,7 ****	76,9 ± 3,4 ****

Bei den in Tabelle 9 dargestellten Daten handelt es sich um die Mittelwerte der gemessenen Ethidiumfluoreszenzintensität (FL-2-Kanal) aus drei unabhängigen Experimenten (jeweils Dreifachwerte) ± STAWN; t-test: \*\*\*\*p<0.001 verglichen mit unbehandelten Zellen (Kontrolle).

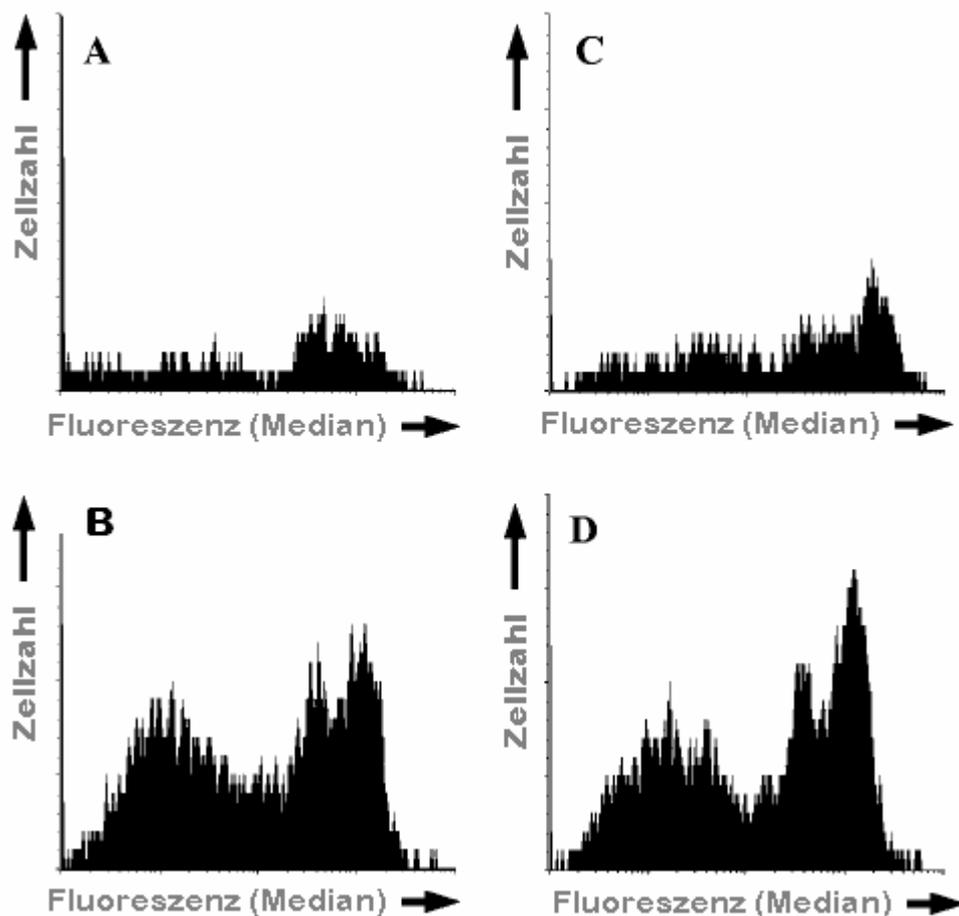
Mit diesen Experimenten wurde belegt, dass Adx *in vivo* ROS produzieren kann, was zu einer verminderten Zellviabilität der getesteten Zelllinien führt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die durch Adx-induzierte gesteigerte ROS-Produktion mittels der eingesetzten ROS-Inhibitoren signifikant verhindert werden konnte (Tabelle 9).

In diesem Zusammenhang wurde außerdem die humane Adx-Mutante (Adx-C46S) untersucht. Diese Mutante ist nicht mehr in der Lage den [2Fe-2S]-Cluster richtig zu inkorporieren, kann daher auch keine Elektronen mehr übertragen und dadurch ROS bilden (Daten nicht gezeigt) (Uhlmann *et al.*, 1992).

### 4.1.3 Überexpression von humanem Adx oder CYP11A1 und der mitochondriale Apoptose-Pathway

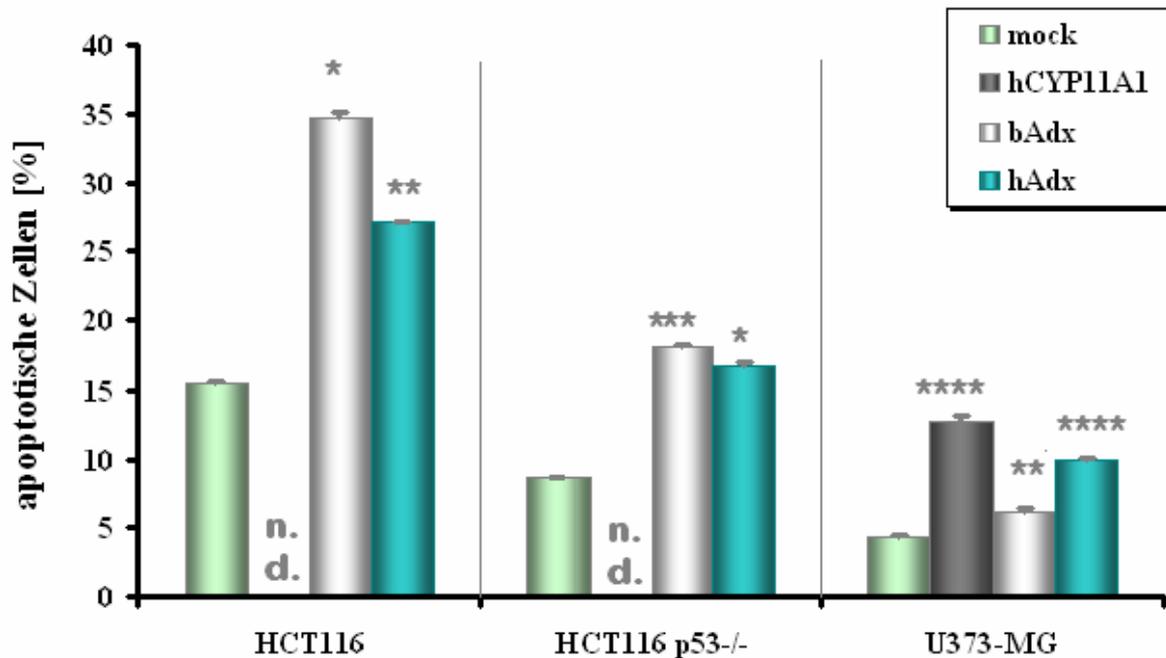
Da die ROS-Bildung innerhalb der Mitochondrien durch die Atmungskette ab einer bestimmten Konzentration zu einem Zusammenbruch des Transmembranpotentials ( $\Delta\psi$ ) und damit zum Zelltod führt, wurde auch untersucht, ob die durch hAdx oder hCYP11A1 hervorgerufene ROS-Produktion ebenfalls zu einem Zusammenbruch von  $\Delta\psi$  führt. Dazu wurden HCT116- sowie U373-MG-Zellen transient mit entweder pSVL-Vektor (Kontrolle) oder mit einem Expressionsplasmid für hAdx oder hCYP11A1 transfiziert. Nach 24 Stunden wurde  $\Delta\psi$  unter Verwendung des MitoCapture™ Kit durchflußzytometrisch wie unter 3.1.3.6 beschrieben bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt. Es handelt sich hierbei um die exemplarische Abbildung der Histogramm-Plots eines Experimentes. Insgesamt wurde die Bildung von ROS mittels des *MitoCapture™ mitochondrial apoptosis detection kit* in drei unabhängigen Versuchen mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Während sich im Kontrollexperiment nur wenige Zellen mit zerstörtem Transmembranpotential fanden, zeigten sowohl die hAdx-transfizierten HCT116-Zellen als auch die hCYP11A1-transfizierten U373-MG-Zellen einen Anstieg an  $\Delta\psi$  (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Zusammenbruch des Transmembranpotentials ( $\Delta\psi$ )** nach transienter Expression von hAdx oder hCYP11A1. HCT116-Zellen (A,B) oder U373-MG-Zellen (C,D) wurden transient mit pSVL-Vektor (A,C) oder mit einem Expressionsplasmid für hAdx (B) bzw. hCYP11A1 (D) transfiziert. Nach 24 Stunden wurde  $\Delta\psi$  bestimmt wie unter 3.1.3.6 bestimmt. Obige Darstellung zeigt exemplarisch die Histogramm-Plots eines Experimentes (Derouet-Humbert et al., 2005).

Da ROS - ebenso wie reaktive Stickstoffintermediate - den Zelluntergang sowohl in Form von apoptotischen als auch nekrotischen Zellen stimulieren können, wurde anschließend untersucht, welcher Signalwege bei Überexpression von Adx und CYP11A1 ausgelöst wird. Dazu wurden HCT116-Zellen, HCT116p53<sup>-/-</sup>-Zellen und U373-MG-Zellen transient mit bAdx, hAdx oder hCYP11A1 transfiziert und auf Caspase-Aktivität hin untersucht. Mittels FACS-Analyse ließ sich die Caspase-vermittelte Spaltung des nicht-fluoreszierenden Reagenz (aspartyl)<sub>2</sub>-Rhodamin 110 zum fluoreszierenden Rhodamin 110 wie unter 3.1.3.3 beschrieben verfolgen. Die folgenden Experimente zeigten, dass die Überexpression von beidem - humanem und bovinem Adx - sowohl in HCT116-Zellen als auch HCT116p53<sup>-/-</sup>-Zellen zu einer gesteigerten Caspase-Aktivität führten (Abbildung 14). In U373-MG-Zellen führte zusätzlich die Überexpression von hCYP11A1 zu einem erhöhten Aktivitätslevel der Caspasen. Diese Ergebnisse wurden auch durch immunologischen Nachweis der Caspase 3-Aktivität im Western Blot bestätigt (Daten nicht gezeigt).

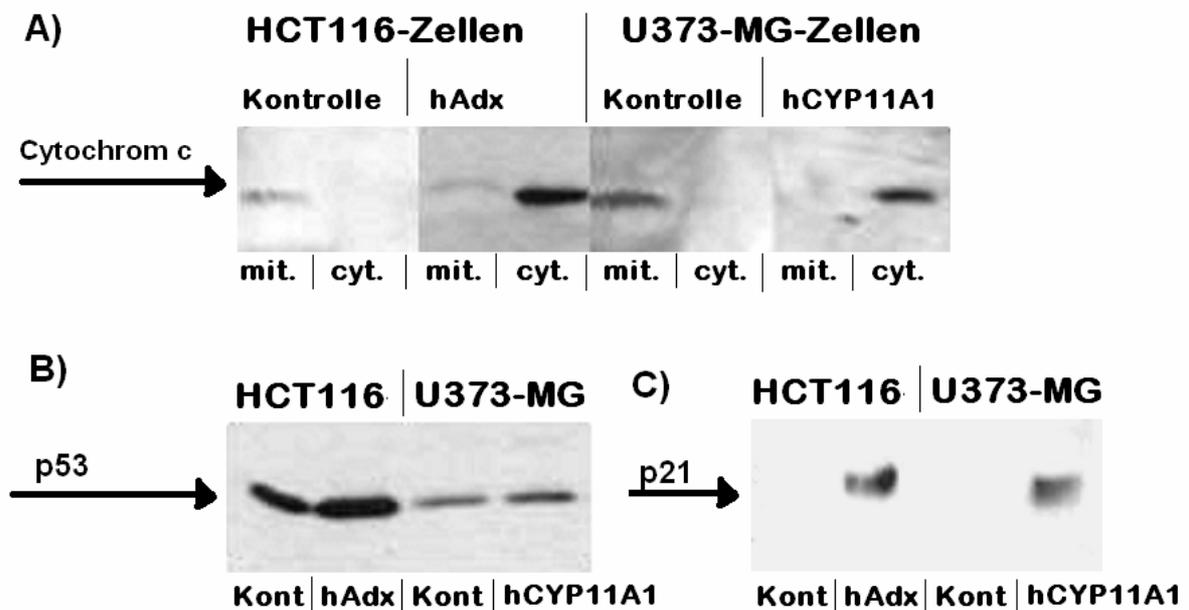


**Abbildung 14:** Caspase-Aktivierung nach Überexpression von Adx oder CYP11A1

HCT116-, HCT116p53<sup>-/-</sup>- und U373-MG-Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid für hCYP11A1 (graue Balken), bAdx (weiße Balken) oder hAdx (grünblaue Balken) transient transfiziert. Nach 24 stündiger Expression wurden die apoptotischen Zellen durch die Caspase-abhängige Bildung von fluoreszierendem Rhodamin 110 aus nicht-fluoreszierendem (asparyl)<sub>2</sub>-Rhodamin 110 nachgewiesen. Als Kontrolle wurden mit pSVL-Vektor transfizierte Zellen (grüne Balken) verwendet. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  STABWN; t-test: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ , \*\*\*\* $p < 0.001$  verglichen mit der Kontrollgruppe; n.d. = nicht durchgeführt (Derouet-Humbert *et al.*, 2005).

Der Ablauf der Apoptose kann prinzipiell über zwei Signalkaskaden erfolgen (Budihardjo *et al.*, 1999). Die mitochondriale Signalkaskade führt zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Cytosol und aktiviert Caspase-9. Diese Caspase aktiviert weitere *downstream* liegende Caspasen (z. B. Caspase-3), welche selbst apoptotische Signale durch Spaltung weiterer zellulärer Proteine freisetzen. Es wurde daher untersucht, ob die durch mitochondriale Cytochrome P450 vermittelte ROS-Produktion zur Cytochrom c-Freisetzung und damit Aktivierung dieser Signalkaskade führt. Dazu wurden Western Blot-Analysen zur Detektion von Cytochrom c in HCT116-Zellen, HCT116p53<sup>-/-</sup>-Zellen und U373-MG-Zellen durchgeführt, welche zuvor transient mit hAdx bzw. hCYP11A1 transfiziert worden waren. Wie in Abbildung 15a zu sehen ist, führte die Überexpression von hAdx dazu, dass Cytochrom c in beiden Kolonkarzinomzelllinien aus den Mitochondrien ins Cytosol freigesetzt wurde. Die Überexpression von hCYP11A1 zeigte in U373-MG-Zellen einen ähnlichen Effekt. Bei den in Abbildung 15 gezeigten Western-Blots handelt es sich um die Darstellung eines einzelnen Experimentes, das jedoch insgesamt dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt wurde.

Weiterhin wurde untersucht, ob die transiente Expression von hAdx bzw. hCYP11A1 einen Effekt auf den Proteinlevel der Tumorsuppressorgene p53 oder p21 hat. Für diese Untersuchungen wurden die Zelllinien HCT116 und U373-MG mit einem Expressionsplasmid für hAdx, bAdx oder hCYP11A1 transfiziert. Die Gesamt-Proteinlysate der Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion präpariert und mittels Immunoblotting die Expression von p53 und p21Waf analysiert. Wie in Abbildung 15b und 15c dargestellt ist in beiden Fällen ein starker Anstieg des Proteinlevels von p21Waf zu verzeichnen, während der Proteinlevel von p53 nur moderat nachweisbar ist.



**Abbildung 15: Western Blot-Analyse**

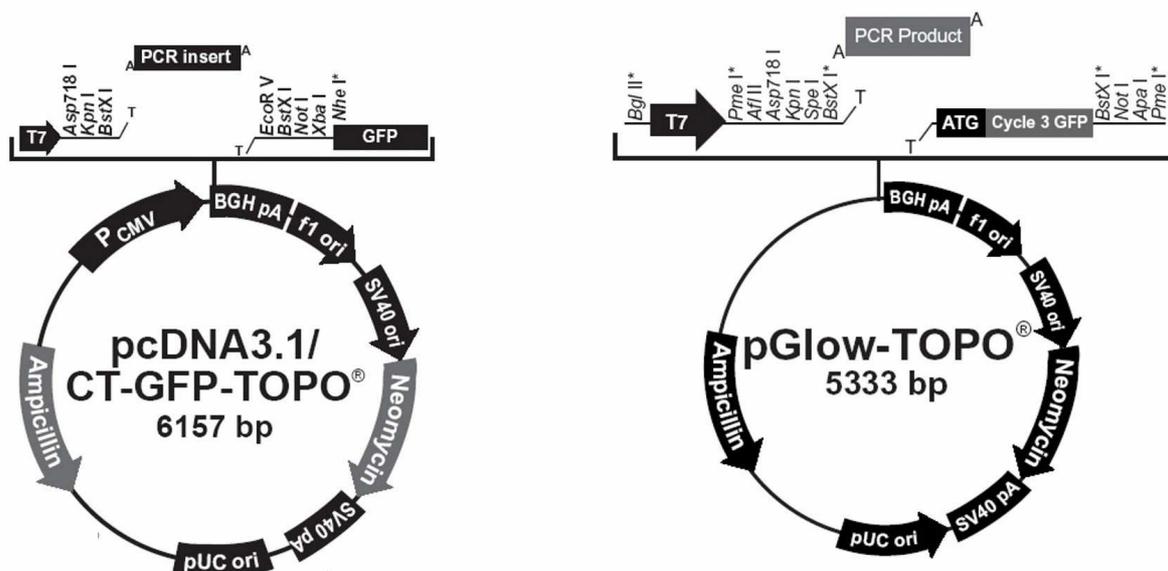
24 Stunden nach transienter Transfektion der Zellen mit hAdx bzw. hCYP11A1 wurden Proteinlysate aus HCT116-Zellen und U373-MG-Zellen präpariert und fraktioniert. (A) Cytochrom c wurde wie beschrieben in der mitochondrialen und cytoplasmatischen Fraktion gefunden. (B) Detektion von p53 im Gesamt-Proteinlysat. (C) Detektion von p21Waf im Gesamt-Proteinlysat. Es handelt sich bei den Abbildungen um die Darstellung eines einzelnen Experimentes, das jedoch insgesamt dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt wurde.

Mit den obigen Experimenten konnte eindeutig belegt werden, dass sowohl humanes als auch bovines Adx in allen getesteten Zelllinien in der Lage ist, Apoptose auszulösen. Dieser Zelltod wird durch die Bildung mitochondrialer ROS induziert und kann durch den Einsatz geeigneter ROS-Fänger verhindert werden. Es wurde weiterhin gezeigt, dass die transiente Überexpression von hAdx oder hCYP11A1 zu einer geringfügigen Stabilisierung des Tumorsuppressorgen p53 und damit verbunden zu starker Induktion der p21Waf-Expression führt. Für die Beurteilung der physiologischen Bedeutung dieser Transfektionsexperimente sollte in weiteren Experimenten geklärt werden, ob eine Transkriptionsregulation des Adx-Gens während der Apoptose erfolgt und auf welche Weise diese gesteuert wird.

## 4.2 Versuche zur Charakterisierung der Aktivität des humanen Adx-Promotors bei Apoptose-Induktion

### 4.2.1 Klonierung eines Reporterkonstrukts für den Adx-Promotor

Die Amplifikation des 2,5 kb langen Adx-Promotors erfolgte mit Hilfe zweier flankierender Oligonukleotide (Sequenzen Anhang B) aus genomischer DNS von insgesamt drei verschiedenen Probanden. Anschließend wurde die Sequenz zunächst in den Zellkultur-Vektor pcDNS3.1-GFP/TOPO mit GFP-cDNS TOPO-kloniert. Des Weiteren wurden die Sequenzen in ein TOPO-Reportersystem (Fa. Quiagen), welches den Zellkultur-Vektor pGLOW verwendet, kloniert. Dieser Vektor ist ebenfalls für durchflußzytometrische Analysen geeignet. Durch die Verwendung dieses neuen Vektors konnte die Arbeitszeit entscheidend verkürzt werden, da nach Klonierung das Entfernen des CMV-Promotors zur Promotorstudie entfiel (Abbildung 16). Die Sequenzierung der Reporterkonstrukte wurde von der Fa. Sequiserve durchgeführt. Das Plasmid pEHD1 enthielt ein (mit der in der Literatur angegebenen Sequenz übereinstimmendes) 2,5 kb langes Promotor-Fragment upstream der GFP-cDNS im Vektor pGLOW (Sequenzen Anhang A).

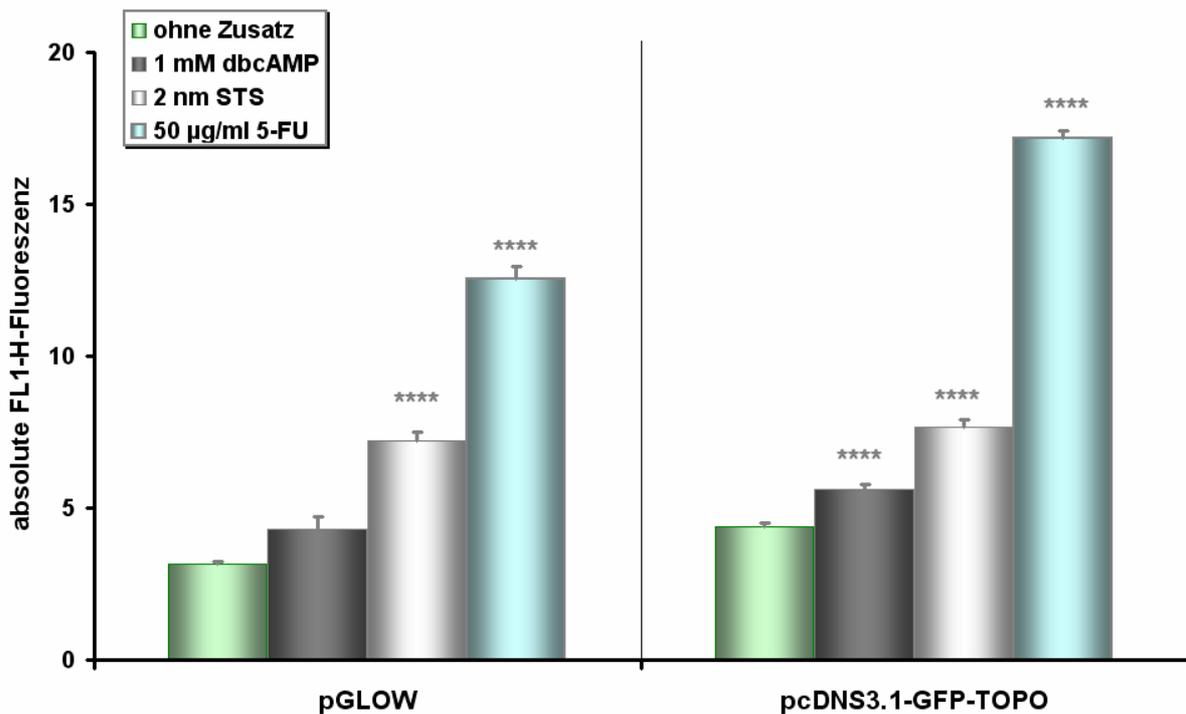


**Abbildung 16:** Vergleich der Vektorkarten des Zellkulturvektors pcDNS3.1/CT-GFP-TOPO und dem Zellkulturvektor für Reporterassays pGLOW-TOPO.

### 4.2.2 Untersuchung des Einflusses von Apoptose-induzierenden Reagenzien auf die Aktivität des Adx-Promotors

Zunächst wurden ein Aktivitätsassay durchgeführt, um die Funktionalität beider Vektoren vergleichen zu können (Abbildung 17). Dazu wurden die HCT116-Zellen transient mit jeweils einem Konstrukt der Promotorsequenz im Vektor pcDNS3.1/CT-GFP-TOPO (pEDH2) als auch mit einem Konstrukt im Vektor pGLOW-TOPO (pEDH1) transient transfiziert. Die GFP-Fluoreszenz beider Konstrukte wurde durchflußzytometrisch

bestimmt (FL1-Kanal) und als Indikator für die Promotoraktivität gewertet. Auf diese Weise konnte die basale Aktivität des Adx-Promotors durch Quantifizierung der Fluoreszenzintensität im FACS ermittelt werden. Die Zellen wurden ausserdem mit den beiden Apoptose-induzierenden Reagenzien 5-FU und Staurosporin (STS) behandelt. Weiterhin wurden mit dbcAMP behandelte Zellen zur internen Kontrolle verwendet, da bereits in früheren Experimenten mit dem bovinen Adx-Promotor gezeigt wurde, dass dieser durch dbcAMP (ein Proteinkinase A-Aktivator) stimuliert wird (Chen & Guo, 2000).

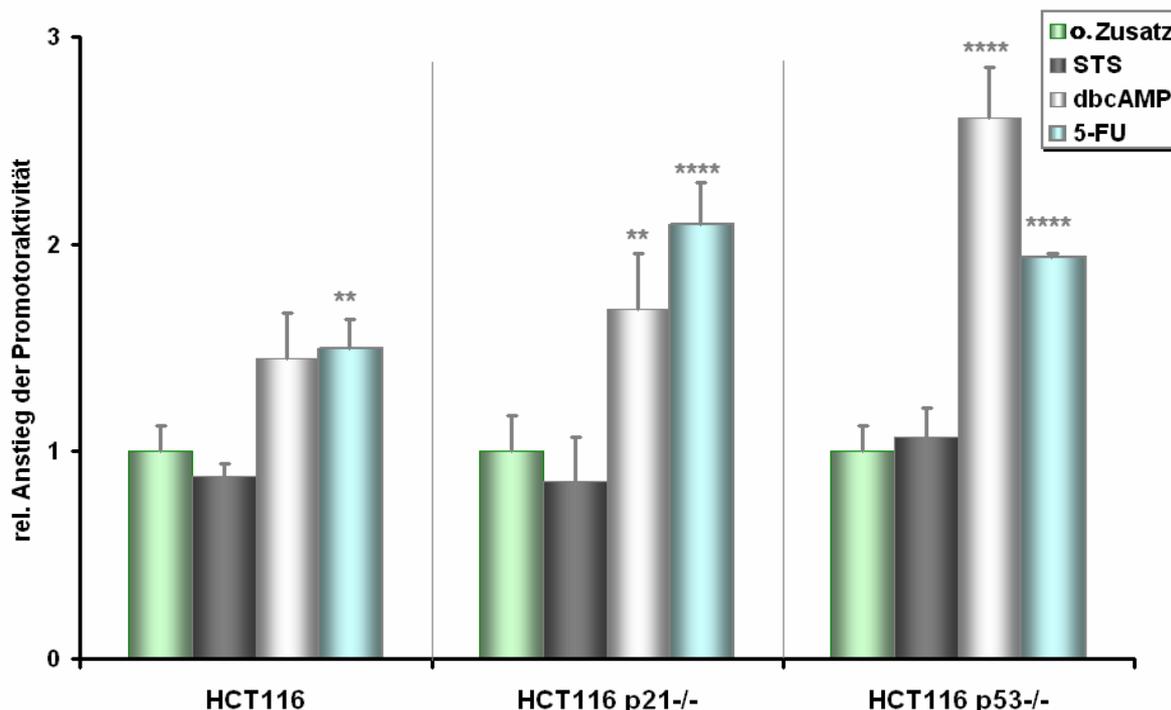


**Abbildung 17: Vergleich der absoluten GFP-Reporterfluoreszenz (FL1-H) in HCT116-Zellen**

Es wurde die absolute FL1-H-Fluoreszenz der Zellen 24 Stunden nach Transfektion mit pEDH1 (Reporterkonstrukt in pGLOW-TOPO) bzw. pEDH2 (Reporterkonstrukt in pcDNS3.1-GFP-TOPO) unter dem Einfluß von 1 mM dbcAMP (graue Balken), 2 nM STS (weiße Balken) sowie 50 µg/ml 5-FU (blaugrüne Balken) bestimmt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Bei den dargestellten Diagrammen handelt es sich um die Auswertung von drei unabhängigen Versuchen mit jeweils Dreifachwerten  $\pm$  STABWN; t-test: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ , \*\*\*\* $p < 0.001$  verglichen unbehandelten Zellen (grüne Balken).

Wie aus Abbildung 17 ersichtlich, zeigten beide Reporterkonstrukte annähernd gleiche GFP-Fluoreszenz unter den getesteten Bedingungen. Das Konstrukt pEDH2 in pcDNS3.1/CT-GFP-TOPO zeigte unter dem Einsatz von 1 mM dbcAMP eine geringfügig höhere Reporteraktivität wie das Konstrukt pEDH1, die jedoch auf Grund der sehr viel einfacheren Handhabung von pGLOW vernachlässigbar erschien. Daher wurde in weiteren Experimenten lediglich der pGLOW-Vektor eingesetzt.

Um herauszufinden, ob sich die Aktivität des Adx-Promotors unter den ausgewählten Bedingungen signifikant verändert, wurden die drei Zelllinien zunächst mit 0,4 µg des Reporterplasmid pEDH1 transient transfiziert. Es folgte eine Inkubation der Zellen unter obigen Bedingungen mit anschließender FACS-Analyse. Als interne Kontrolle wurden mock-, d.h., mit leerem Vektor transfizierte Zellen mitgeführt.



**Abbildung 18:** Aktivierung des humanen Adx-Promotors in HCT116-Zellen

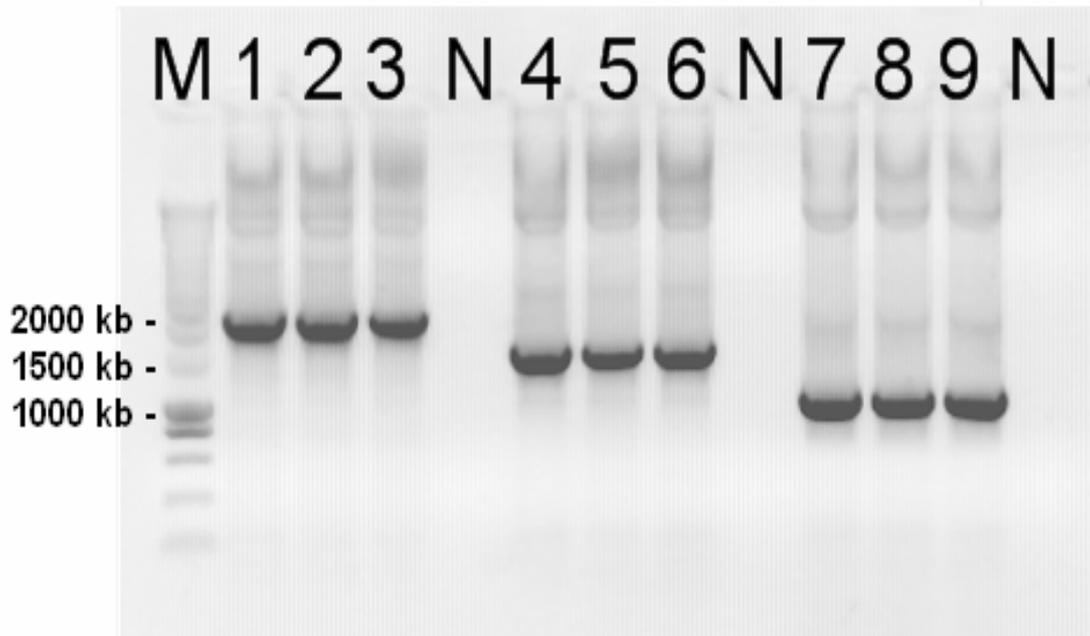
Die Zelllinien HCT116, HCT116p53<sup>-/-</sup> und HCT116p21<sup>-/-</sup> wurden mit pEDH1 transient transfiziert. Der rel. Anstieg der Promotoraktivität wurde nach 24 Stunden unter dem Einfluß von 2 nM STS (graue Balken), 1 mM dbcAMP (weiße Balken) oder 50 µg/ml 5-FU (blaugrüne Balken) mittels GFP-Fluoreszenz durchflußzytometrisch bestimmt. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um Mittelwerte ± STABWN; t-test: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005, \*\*\*\*p<0.001 verglichen unbehandelten Zellen (grüne Balken).

Wie in Abbildung 18 dargestellt ist, zeigte Staurosporin keinen Anstieg der GFP-Fluoreszenzintensität und somit Veränderung im Aktivitätslevel des Adx-Promotors. Der Einsatz von dbcAMP führte lediglich in HCT116p53<sup>-/-</sup> und HCT116p21<sup>-/-</sup>-Zellen zu einem signifikanten Anstieg der Promotor-Aktivität, wohingegen 5-FU einen signifikanten Anstieg der Promotoraktivität in allen getesteten Zelllinien bewirkte. Die größte Veränderung in der Aktivität des Promotors zeigte sich in HCT116p21<sup>-/-</sup>-Zellen. Mit diesem ersten Experiment konnte somit gezeigt werden, dass es möglich ist eine Veränderung in der Aktivität des Adx-Promotors in HCT116p53<sup>-/-</sup> und HCT116p21<sup>-/-</sup>-Zellen mittels Einsatz von dbcAMP und 5-FU in den verwendeten Konzentrationen zu dokumentieren. Um zu ermitteln, welche Teilregionen innerhalb des Promotors für diese Aktivitätsänderung verantwortlich sind, sollte im Folgenden eine Deletionsanalyse mit anschließender Bestimmung der Promotoraktivität erfolgen.

#### 4.2.3 Deletionsanalyse zur Identifikation der relevanten Bereiche des Promotors

Für diese Untersuchung wurden zunächst 5'-Oligonukleotide hergestellt, die sukzessive in 500 bp-Abständen vom 5'-Ende des Adx-Promotors binden (Sequenzen Anhang 6.2). Nach der Amplifikation wurden die so erhaltenen Promotorfragmente (Abbildung 19) in den Zellkultur-Vektor pGLOW-TOPO kloniert. Es erfolgte die transiente Transfektion der

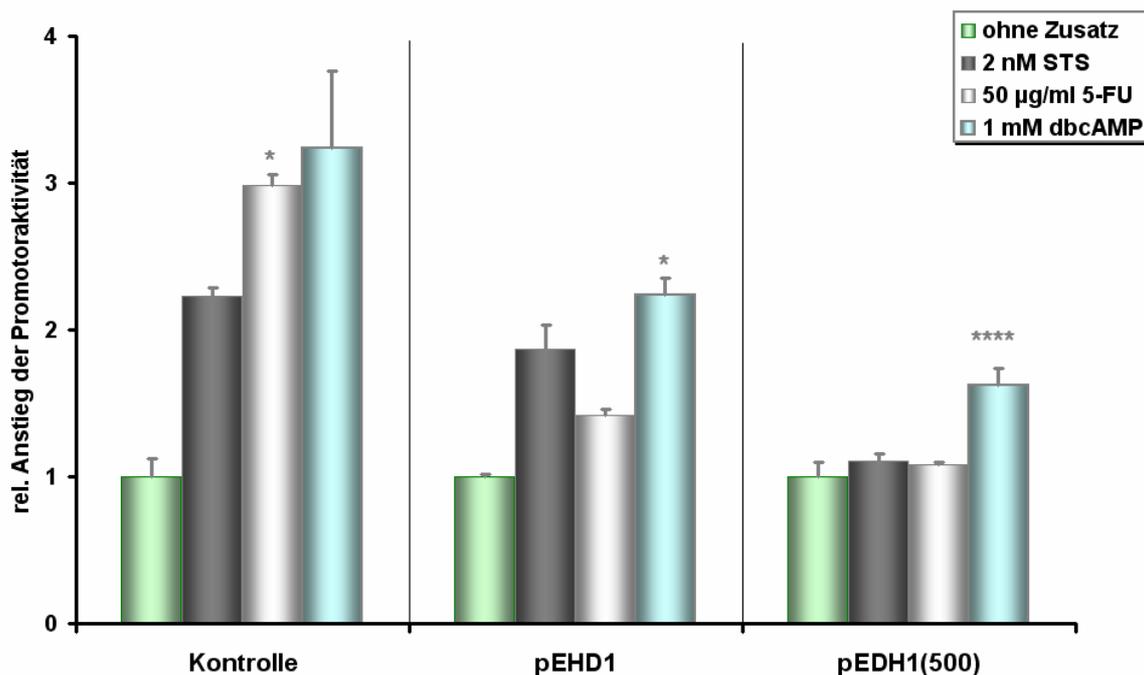
Zelllinien HCT116, HCT116p53<sup>-/-</sup> und HCT116p21<sup>-/-</sup> mit diesen Reporterkonstrukten und Inkubation für 24 Stunden mit 1 mM dbcAMP, 2 nM STS und 50 µg/ml 5-FU. Die Adx-Transkriptionsveränderung wurde im FACS durchflußzytometrisch mittels Bestimmung der GFP-Fluoreszenz (FL1-Kanal) analysiert (→ grobmaschige Deletionsanalyse).



**Abbildung 19:** 1,0 % iger Agarosegel der Promotorsequenz-Amplifikate nach PCR

Spur 3,6,9: Positivkontrolle (genomische DNS); Spur M: Molekulargewichtsmarker; Spur N: Negativkontrolle (ohne DNS Matrize); Spur 1,2: Amplifikat von pEDH1 (Vollängenkonstrukt) amplifiziert mit den Primern phAdx2000 und pGLOW PR; Spur 4,5: pEDH1 amplifiziert mit phAdx1500 und pGLOW PR; Spur 7,8: pEDH1 amplifiziert mit phAdx1000 und pGLOW PR.

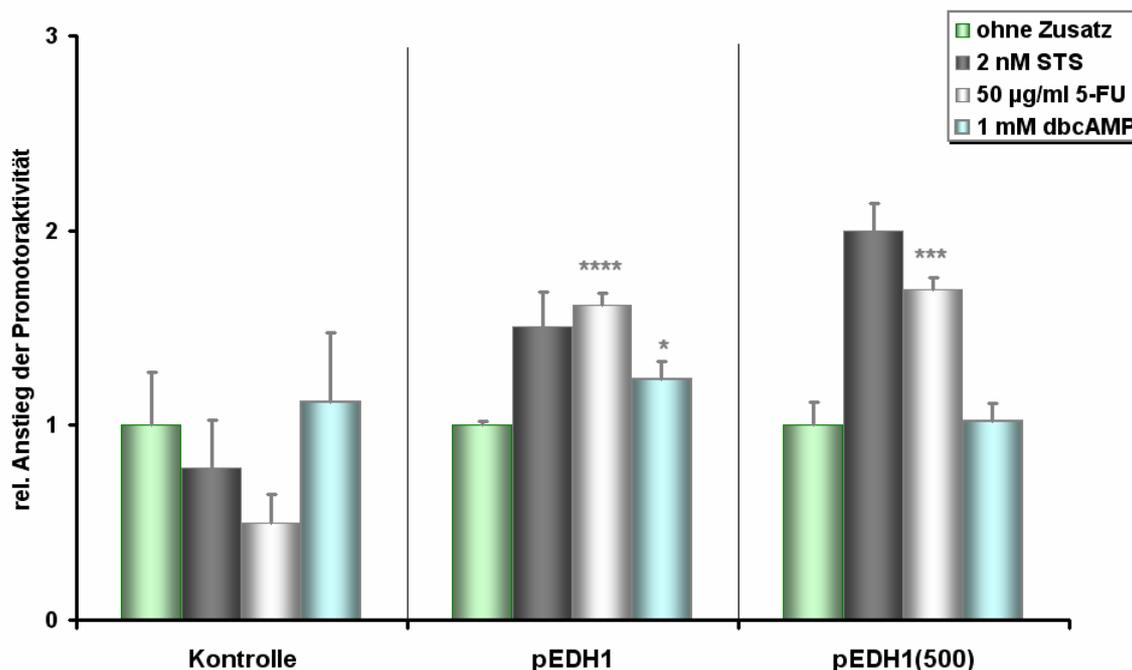
Da das Promotor-Reporterkonstrukt pEDH1(500) zuerst vollständig kloniert und richtig sequenziert vorlag, wurden die weiteren Experimente mit diesem Konstrukt durchgeführt. Es erfolgte die transiente Transfektion der Zelllinien HCT116, HCT116p53<sup>-/-</sup> und HCT116p21<sup>-/-</sup> mit diesem auf 500 bp verkürzten Promotor-Reporterkonstrukt, Behandlung mit 2 nM STS, 50 µg/ml 5-FU oder 1 mM dbcAMP für 24 Stunden und anschließende FACS-Analyse. Als Vergleichsgruppe wurden mit dem Vollängenkonstrukt pEDH1 transfizierte Zellen und als interne Kontrolle mit dem Ausgangsplasmid pGLOW-TOPO transfizierte Zellen mitgeführt.



**Abbildung 20:** Aktivierung des humanen Adx-Promotors in HCT116-Zellen

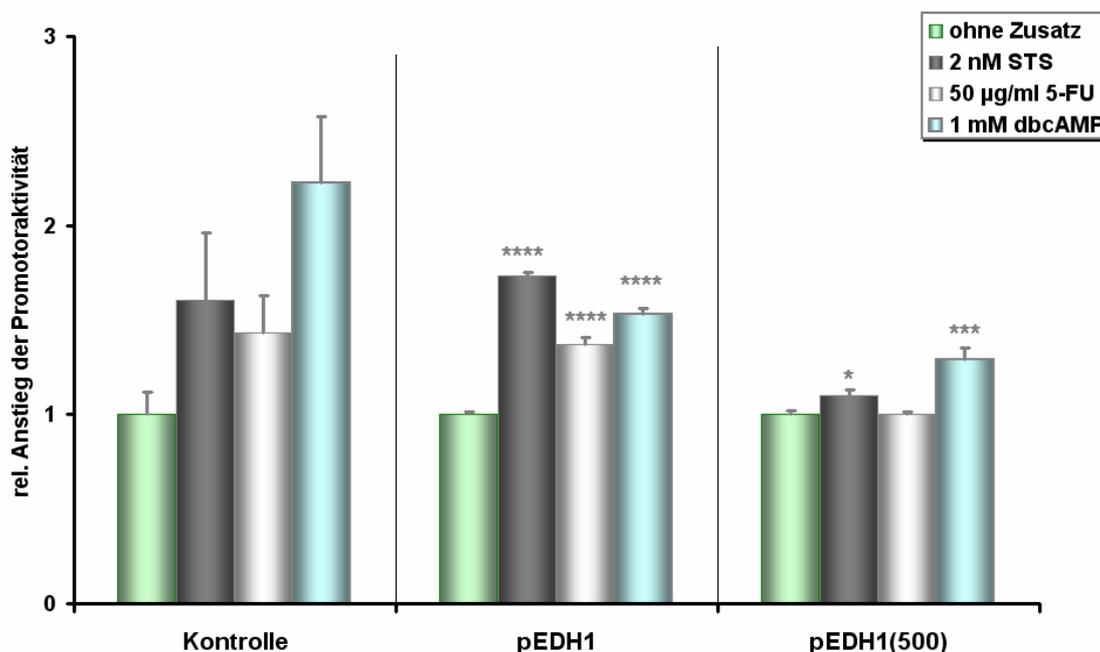
Die HCT116-Zellen wurden mit jeweils 0,4 µg pEDH1 (Vollängenkonstrukt), pEDH1(500) bzw. pGLOW (Kontrolle, grüne Balken) transient transfiziert. Nach 24 Stunden wurde die GFP-Fluoreszenz aller Zellen im FACS analysiert. Die Promotoraktivität der unbehandelten, fluoreszenten Zellen (Kontrolle, grüne Balken) bzw. der Zellen unter dem Einfluß von 2 nM STS (graue Balken), 1 mM dbcAMP (weiße Balken) oder 50 µg/ml 5-FU (blaugrüne Balken) wurde verglichen. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  STABWN; t-test: \* $p < 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.001$ .

Wie in Abbildung 20 dargestellt, zeigten die mit dem Ausgangsplasmid pGLOW transfizierten Kontrollzellen unter den getesteten Bedingungen bereits stärkere Fluoreszenzsignale, wie die mit Vollängenkonstrukt pEDH1 transfizierten Vergleichszellen. In den mit den Reporterkonstrukten pEDH1 und pEDH1(500) transfizierten HCT116-Zellen konnte weiterhin lediglich unter Verwendung von 1 mM dbcAMP ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität und damit verbunden eine erhöhte Reporteraktivität ermittelt werden. Diese Ergebnisse stehen in Widerspruch zu den in Abbildung 18 dargestellten Ergebnissen.



**Abbildung 21:** Aktivierung des humanen Adx-Promotors in HCT116p21<sup>-/-</sup>-Zellen

Mit 0,4 µg pEDH1 (Vollängenkonstrukt), pEDH1(500) bzw. pGLOW (Kontrolle) transient transfizierte HCT116p21<sup>-/-</sup>-Zellen wurden 24 Stunden nach Behandlung mit 2 nM STS (graue Balken), 1 mM dbcAMP (weiße Balken) oder 50 µg/ml 5-FU (blaugrüne Balken) im FACS analysiert. Dargestellte Daten: Mittelwerte des rel. Anstieg der Promotoraktivität ± STABWN; t-test: \*p<0.05, \*\*\*p<0.005, \*\*\*\*p<0.001 verglichen mit unbehandelten Zellen (grüne Balken).



**Abbildung 22:** Aktivierung des humanen Adx-Promotors in HCT116p53<sup>-/-</sup>-Zellen

Mit 0,4 µg pEDH1, pEDH1(500) bzw. pGLOW (Kontrolle) transient transfizierte HCT116p53<sup>-/-</sup>-Zellen wurden 24 Stunden nach Behandlung 2 nM STS (graue Balken), 1 mM dbcAMP (weiße Balken) oder 50 µg/ml 5-FU (blaugrüne Balken) im FACS analysiert. Dargestellte Daten: Mittelwerte ± STABWN; t-test: \*p<0.05, \*\*\*p<0.005, \*\*\*\*p<0.001 verglichen mit unbehandelten Zellen (grüne Balken).

Bei den in den Abbildungen 21 und 22 dargestellten Ergebnissen zeigte ebenfalls das zur Kontrolle verwendete pGLOW-Plasmid bereits annähernd gleiche (Abbildung 21) bis deutlich höhere GFP-Fluoreszenzintensitäten (Abbildung 22) wie das Vollängenkonstrukt (pEDH1) bzw. verkürzte Reporterkonstrukt pEDH1(500) bei vergleichsweise hohen Standardabweichungen. Der relative Anstieg der Promotoraktivität im Vergleich zur Kontrolle konnte somit nicht bestimmt werden.

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass es sich bei dem untersuchten Adx-Promotor um einen sehr schwachen Promotor handelt. Es konnte in keiner Zelllinie trotz eingehender Bemühungen Bedingungen gefunden werden, bei denen eine stärkere Aktivität des Promotors messbar gewesen wäre (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde an dieser Stelle erneut mittels Durchmusterung der entsprechenden Datenbanken überprüft, ob in der Zwischenzeit durch die systematischen Expressionsanalyseprojekte neue Daten zum Expressionslevel von Adrenodoxin erhalten worden waren.

#### 4.2.4 Serial Analysis of Gene Expression (SAGEmap) der Adx-Expression

Die *serial analysis of gene expression* (kurz SAGE)-Technik bestimmt nahezu quantitativ die Expressionsniveaus aller Gene in einer Probe (mit gewissen technisch bedingten Einschränkungen) (el-Deiry *et al.*, 1994). Zur Analyse der Adx-Expression wurde die SAGE-Analyse SAGEmap-Datenbank herangezogen (Abhilasha & Krishna, 1998; el-Deiry *et al.*, 1994; Hellal-Levy *et al.*, 1999). Diese Datenbank enthält die Ergebnisse von SAGE-Experimenten mit verschiedenen Zelllinien. Wie in Abbildung 23 zu sehen, zeigte die Durchmusterung der Datenbank, dass Adx-SAGE-Tags in einer großen Zahl von SAGE-Bibliotheken gefunden wurden (vollständige Auflistung aller Gewebe und Zelllinien s. Anhang C).

	NORMAL		CANCER	
		Brain		
		Retina	No Data	
		Thyroid		
		Lung		
		Heart	Not Applicable	
		Breast Breast cell subtypes		
		Stomach		
		Pancreas		
		Liver		
		Kidney		
		Colon		
		Peritoneum		
		Ovary		
		Placenta	Not Applicable	
		Prostate		

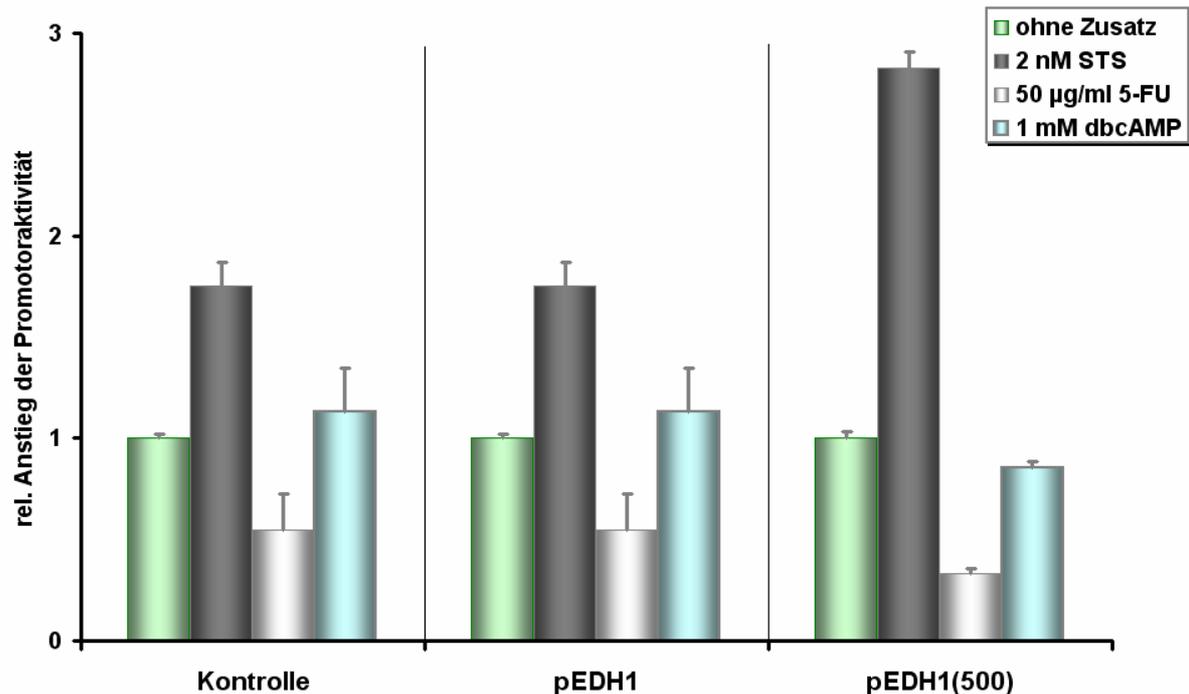
**Abbildung 23:** Darstellung der Adx-exprimierenden Gewebe mittels SAGEmap Anatomic Viewer

Anhand dieser Daten wurde ersichtlich, dass die basale Expression von Adrenodoxin sowohl in Kolonkarzinomzellen als auch in verschiedenen Geweben äußerst gering ist (Ausnahme: gesundes Placenta-Gewebe). Lediglich die Brustkrebszelllinie MCF-7 zeigte einen vergleichsweise hohen Expressionlevel an Adx (Tabelle 10).

**Tabelle 10:** Vergleich der Adx-Expression in verschiedenen Geweben und Zelllinien mittels SAGEmap

Library	Total Tags in Library	Tags per 200,000	Color Code
SAGE_Placenta_first_trimester_normal_B_1	89265	47	
SAGE_Liver_normal_B_1	66308	24	
SAGE_Breast_carcinoma_CL_MCF7estradiol_10H	59583	23	
SAGE_Breast_carcinoma_CL_MCF7estradiol_3h	59583	23	
SAGE_Breast_carcinoma_CL_MCF7control_0h	59877	16	
SAGE_Colon_normal_B_NC1	49610	8	
SAGE_Colon_adenocarcinoma_CL_SW837	61148	6	
SAGE_Colon_adenocarcinoma_B_Tu102	55700	3	
SAGE_Colon_adenocarcinoma_CL_HCT116	55641	3	
SAGE_Colon_adenocarcinoma_CL_RKO	51294	3	

Daher wurden die bisher getätigten Experimente mit dieser Zelllinie erneut durchgeführt. Die MCF7-Zellen wurden dazu mit pEDH1, pEDH1(500) bzw. Kontrollplasmid transient transfiziert, für 24 Stunden mit 2 nM Staurosporin, 50 µg/ml 5-FU oder 1 mM dbcAMP inkubiert und anschließend die Fluoreszenzintensität der Reporterkonstrukte im FACS bestimmt und verglichen. Wie in Abbildung 24 dargestellt, zeigte sich auch in diesem Experiment, dass der Hintergrund an fluoreszenten Zellen in der Kontrollgruppe annähernd gleich hoch war, wie in den mit dem Vollängenkonstrukt oder mit dem verkürzten Promotorfragment transfizierten Zellen. Sowohl das Absinken der Promotoraktivität unter Verwendung von 50 µg/ml 5-FU, als auch der erhöhte Aktivitätslevel des Promotors unter dem Einfluß von 2 nM Staurosporin waren nicht signifikant..



**Abbildung 24:** Aktivierung des humanen Adx-Promotors in MCF-7-Zellen

MCF-7-Zellen wurden mit 0,4 µg pEDH1 (Vollängenkonstrukt), pEDH1(500) bzw. pGLOW (Kontrolle) transient transfiziert. Nach 24 Stunden wurde der rel. Anstieg der Reporteraktivität der unbehandelten, fluoreszenten Zellen (grüne Balken) bzw. der Zellen unter dem Einfluß von 2 nM STS (graue Balken), 1 mM dbcAMP (weiße Balken) oder 50 µg/ml 5-FU (blaugüne Balken) durchflußzytometrisch bestimmt und verglichen. Dargestellte Daten: Mittelwerte ± STABWN.

Die Ergebnisse obiger Experimente lassen den Schluß zu, dass es sich bei dem untersuchten Adx-Promotor um einen sehr schwachen Promotor handelt, der mit der hier eingesetzten Methode zum fluorimetrischen Nachweis der Aktivitätsänderung nicht weitergehend untersucht werden kann. Auf weitere Experimente wurde daher verzichtet.

An dieser Stelle erschien es sinnvoller herauszufinden, ob es möglich ist die im Kolonkarzinomzell-System erzielten Ergebnisse in der Spaltheife zu reproduzieren. Die Spaltheife wird bereits seit Jahrzehnten als Modellsystem zur Erforschung biochemischer Vorgänge genutzt und weist zudem eine sehr hohe Homologie zu eukaryotischen Zellen insbesondere im Hinblick auf mitochondriale Strukturen auf.

## 4.3 Apoptose-Induktion durch Überexpression von Adrenodoxin in Spaltheezellen

### 4.3.1 Einfluß von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Auxotrophiemarkern auf das Wachstum von *S. pombe* und die ROS-Produktion

Um herauszufinden, ob die Überexpression von Adx auf Spaltheezellen ebenfalls einen Einfluß zeigt, wurden verschiedene Stämme hergestellt. Dazu wurde der Ausgangsstamm MB271 (*h-leu1.32*) zunächst mit einem Expressionsplasmid für Adx-WT bzw. einer Adx-Mutante transformiert. So wurden folgende Stämme erhalten:

CAD45 (*h-leu1.32* / pNMT1-Adx-WT)  
CAD46 (*h-leu1.32* / pNMT1-Adx-S112W)  
CAD47 (*h-leu1.32* / pNMT1-Adx-D113Y)  
CAD48 (*h-leu1.32* / pNMT1-Adx<sup>1-108</sup>)

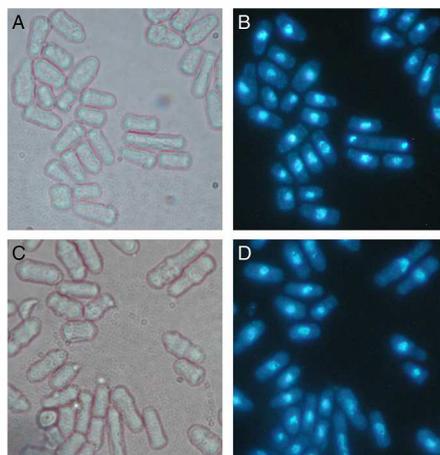
Adx-S112W ist eine C-terminal um 16 Aminosäuren verkürzte, aktivierte Adx-Mutante. Hier wurde in Anlehnung an das Putidaredoxin, welches terminal ein Tryptophan trägt, das terminale Serin durch Tryptophan ersetzt. Das führt zu einer geringeren Affinität zu ihrem Redoxpartner CYP11A1 (Schiffler *et al.*, 2001). Adx-D113Y ist eine Adx Mutante mit erhöhter Bindungsaffinität zu AdR, was zu einem leicht verbessertem Substratumsatz führt. Ihre Bindungsaffinität zu CYP11B1 ist jedoch verschlechtert (A. Bichet, 2007; Hannemann, 2005). Adx<sup>4-108</sup> ist die derzeit älteste bekannte Adx-Mutante. Ihr fehlen am C-Terminus 20 Aminosäuren, wodurch eine verbesserte Bindungsaffinität zu AdR und CYP11A1 erzielt wurde (Grinberg *et al.*, 2000; Uhlmann *et al.*, 1997).

Des weiteren wurde folgende Stämme verwendet, die freundlicherweise von Herrn M. Sc. Clin. Biochem. T. Hakki zur Verfügung gestellt wurden:

MB311 (*h-leu1.32* / pNMT1-Adx-WT / -AdR)  
TH75 (*h-leu1.32* / pNMT1-Adx-WT / -AdR / -CYP11B1)

Bei MB311 handelt es sich um einen Stamm mit einem Expressionsplasmid für Adx-WT und AdR; TH75 ist ein Stamm mit einem Expressionsplasmid für Adx-WT, AdR und P450. Die die korrekte subzelluläre Lokalisation von Adx wurde in beiden Stämmen mittels Westernblotanalyse der mitochondrialen Proteinlysate von Herrn M. Sc. Clin. Biochem. T. Hakki bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Zunächst wurde der Einfluß der Adx-Expression auf das Wachstum der entsprechenden Hefestämme lichtmikroskopisch sowie fluoreszenzmikroskopisch mittels DAPI-Färbung wie unter 3.5.7 beschrieben untersucht.



**Abbildung 25:** DAPI-Färbung von MB271- (A und B) und CAD48-Zellen (C und D)

Die DAPI-Färbung wurde wie unter 3.5.7 beschrieben durchgeführt, die DAPI-Emission mittels Leica DM LB HC Fluoreszenzmikroskop und zugehöriger Software analysIS (Soft Imaging GmbH) dargestellt (B und D).

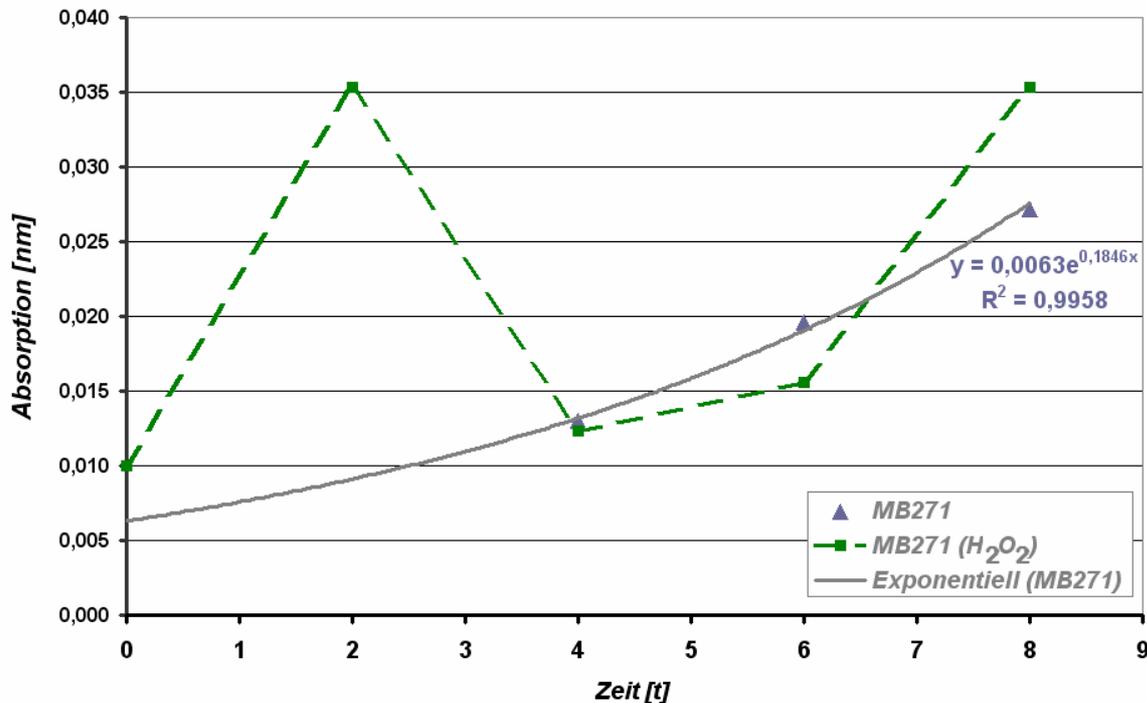
Wie die Abbildung 25 zeigt, führte weder die Expression von Adx-WT noch die Expression von CAD48 zu einem auffälligen Phänotyp. Die Zellen schienen zwar während des Wachstums und der stationären Phase geringfügig länger als die entsprechenden WT-Zellen zu sein, jedoch konnte mittels Wachstumskurven nachgewiesen werden, dass die Lebensfähigkeit und das Wachstum der entsprechenden Zellen durch den veränderten Phänotyp nicht nennenswert beeinflusst wurde (Tabelle 11).

**Tabelle 11:** Generationszeiten der verschiedenen Hefestämme

Stamm	Generationszeit		
	td	td <sub>min</sub>	td <sub>max</sub>
MB271	4,1 ± 0,51	3,3	4,2
MB271 (+ 1mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	nicht feststellbar (n.f.)	n.f.	n.f.
CAD45	4,3 ± 0,15	4,1	4,6
CAD46	4,5 ± 0,23	4,1	4,7
CAD47	4,5 ± 0,27	4,1	4,8
CAD48	4,3 ± 0,10	4,2	4,4
TH75	5,1 ± 0,36	4,6	5,4
MB311	6,1 ± 0,36	5,7	6,4

Bei der in Tabelle 11 dargestellten Auswertung handelt es sich um die Mittelwerte ± STABWN von sechs unabhängigen Experimenten, welche mit Dreifach-Ansätzen durchgeführt wurden.

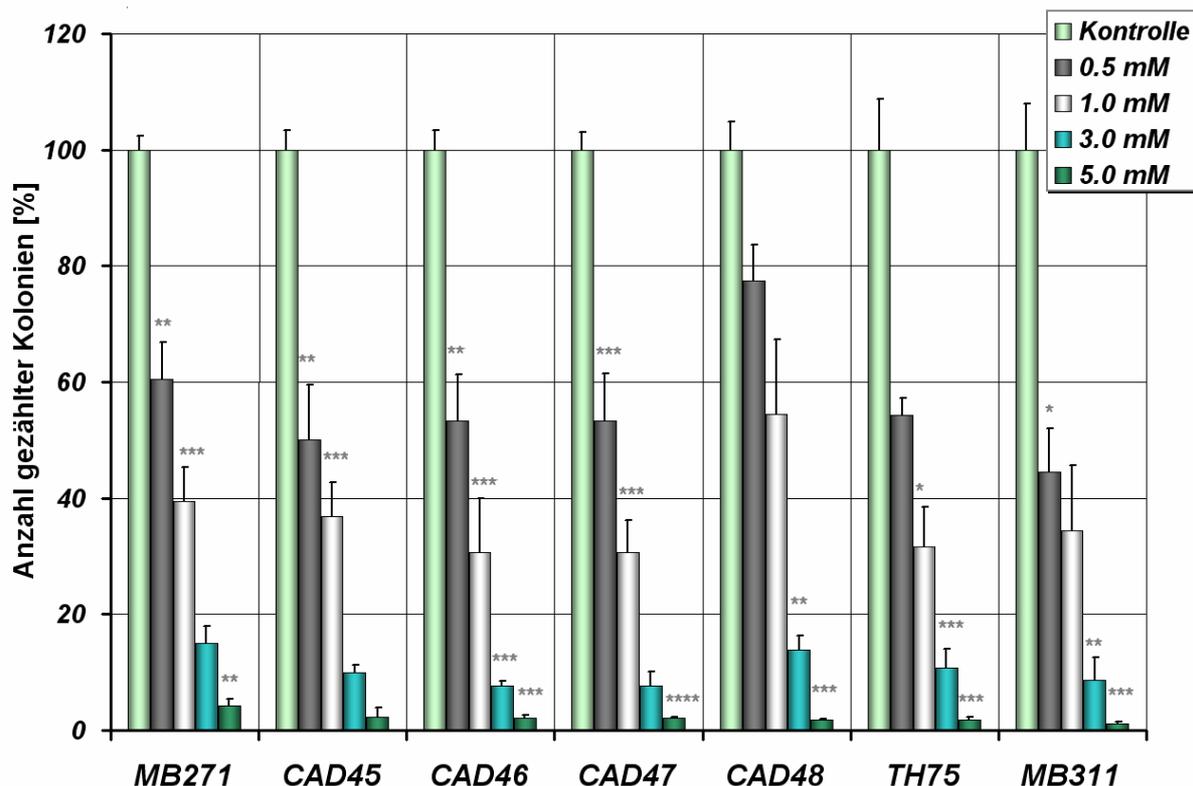
Bei der Bestimmung der Wachstumskurven wurde als Positivkontrolle der mit 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelte Ausgangsstamm MB271 mitgeführt. Es konnte hier ein Zusammenbruch der Überlebensrate gezeigt werden, wodurch eine Bestimmung der Generationszeit nicht mehr möglich war (Exemplarische Abbildung 26).



**Abbildung 26:** Wachstumskurve von MB271

Exemplarische Darstellung einer Wachstumskurve für MB271 und mit 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten MB271-Zellen (Positivkontrolle). Es konnte ein Zusammenbruch der Überlebensrate festgestellt werden. Das Experiment wurde in sechs unabhängigen Versuchen mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

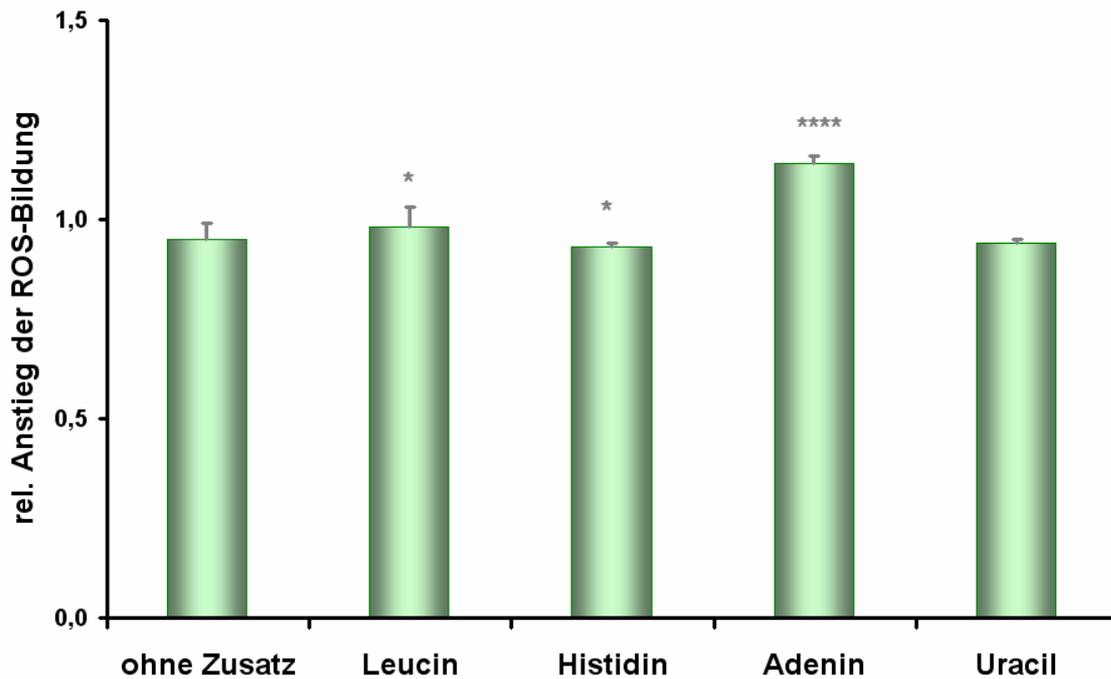
Es wurde ausserdem ein Zellviabilitätstest mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Plattentest durchgeführt, um die geeignete Konzentration an Wasserstoffperoxid zu bestimmen, ab der *S. pombe* sensitiv reagiert. Dazu wurden die Stämme MB271, CAD45-48, TH75 und MB311 auf entsprechend supplementierte EMM-Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ausplattiert und die gewachsenen Kolonien nach 4-tägiger Inkubation bei 30°C ausgezählt. Alle Stämme zeigten eine Abnahme der Viabilität mit Anstieg der eingesetzten Konzentration an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Bereits unter der Verwendung von 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sank die Rate überlebender Zellen um etwa 40 %, wobei zu bemerken ist, dass der Stamm CAD48 eine etwas geringere Sensitivität gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Konzentrationen bis 3 mM zeigte. Als Positivkontrolle wurde daher für alle weiteren Experimente die Konzentration 3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gewählt, da hier auch bei CAD48 ein vergleichbarer Einbruch der Zellviabilität erzielt wurde (Abbildung 27).



**Abbildung 27:** Einfluß von  $H_2O_2$  auf der Wachstum von *S. pombe* ( $H_2O_2$ -Plattentest)

Die Stämme MB271, CAD45-48, TH75 und MB311 wurden auf entsprechend supplementierte EMM-Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen an  $H_2O_2$  ausplattiert und die Viabilität der Zellen nach 4-tägiger Inkubation bei  $30^\circ C$  untersucht. Alle Stämme zeigten eine signifikante Abnahme der Viabilität mit Anstieg der Konzentration an  $H_2O_2$ . Bei den dargestellten Daten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  STABWN; t-test: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ , \*\*\*\* $p < 0.001$  verglichen mit der Kontrollgruppe.

Um sicherzustellen, dass die Supplementierung der Hefestämme mit den entsprechenden Auxotrophiemarkern keinen Einfluß auf die ROS-Bildung zeigt, wurde der Stamm MB228 ( $h^-/WT$ ) in den verschiedenen supplementierten Medien kultiviert, mit DHE behandelt und die Konversion von DHE zu Ethidium im FACS analysiert. Die erhaltenen Mittelwerte der einzelnen Messungen wurden zu MB228 (ohne Zusatz) in Bezug gesetzt, um den relativen Anstieg der ROS-Bildung darstellen zu können.



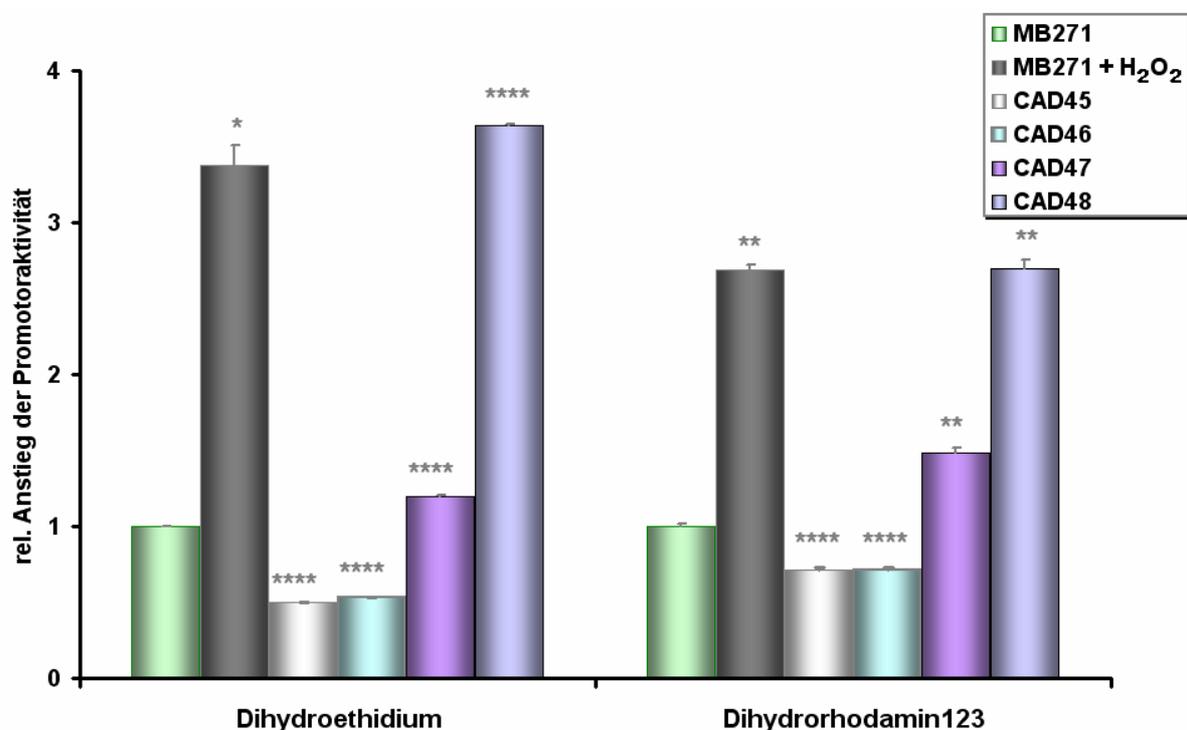
**Abbildung 28:** Einfluß der Aminosäuresupplementierung auf die ROS-Produktion

Der Parentalstamm MB228 wurde in EMM (Kontrolle) sowie in EMM mit Aminosäuren kultiviert und der relative Anstieg der ROS-Produktion durchflußzytometrisch mittels DHE-Konversion bestimmt (FL2-Kanal). Dargestellt sind die Mittelwerte (je drei unabhängige Experimente mit Dreifachwerten)  $\pm$  STABWN, welche zur Kontrolle (MB228 ohne Zusätze) in Relation gesetzt wurden, t-test: \* $p < 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.001$ .

Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, wurde kein Einfluß der Auxotrophiemarker auf die ROS-Bildung in MB228 festgestellt. Die Ergebnisse der bisherigen Experimente zeigen, dass die Überexpression von Adx in der Spaltheife zwar zu einem geringfügig veränderten Phänotyp führt, was jedoch keine Veränderungen im Wachstum der Hefezellen hervorruft. Es konnte außerdem eine geeignete Positivkontrolle (3 mM  $H_2O_2$ ) für die nachfolgenden Experimente ermittelt werden.

### 4.3.2 ROS-Generierung durch Überexpression von Adx

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Expression von Adx zu einer gesteigerten ROS-Produktion in *S. pombe* führt. Dazu wurden die Zellen neben DHE außerdem mit Dihydrorhodamin123 behandelt und die Konversion zu Rhodamin123 im FACS gemessen. Als Positivkontrolle wurden mit 3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelte MB271-Zellen verwendet. Es konnte lediglich im Stamm CAD48, welcher die verkürzte Adx<sup>1-108</sup> Mutante exprimiert, eine um 3,6fach gesteigerte Ethidiumbildung bzw. 2,7fache Rhodamin123-Bildung festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigten sowohl der mit Adx-WT als auch die mit Adx-S112W transformierten Stämme keine signifikante ROS-Bildung im Vergleich zum Ausgangsstamm. Der mit Adx-D113Y transformierte Stamm zeigte eine geringfügig erhöhte Ethidium bzw. Rhodamin123-Bildung (Abbildung 29).

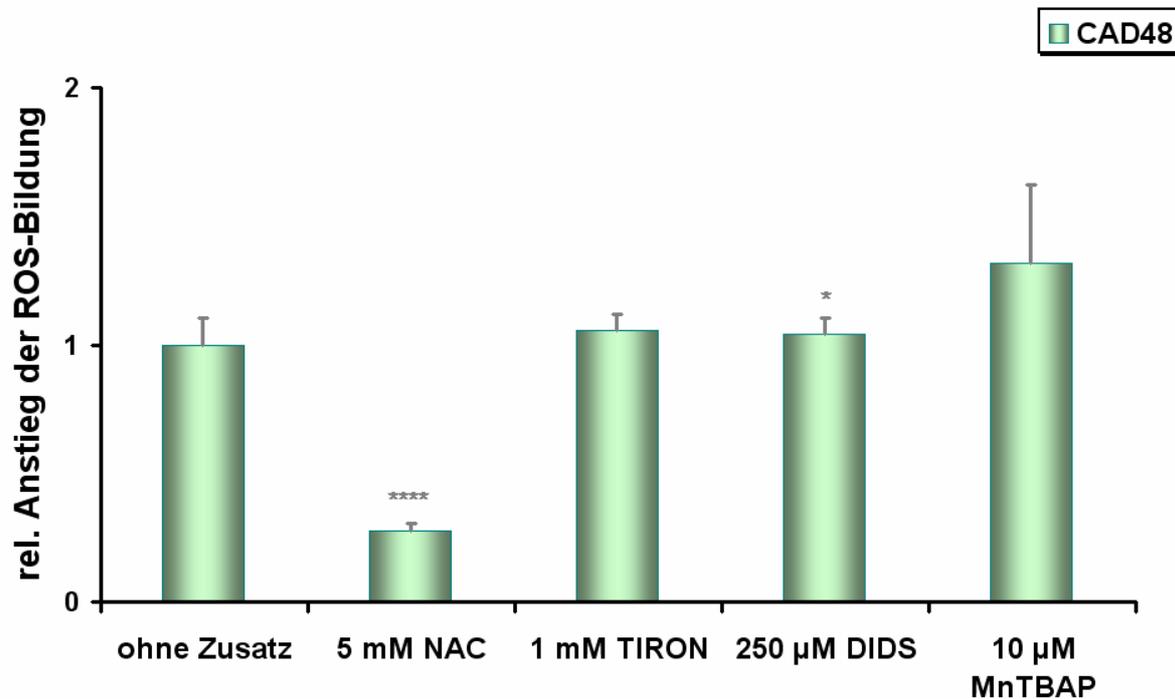


**Abbildung 29:** Adx-induzierte ROS-Bildung in *S. pombe*

Der Wildtypstamm MB271 ( $\pm$  3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Positivkontrolle)) sowie die Adx-exprimierenden Stämme CAD45-CAD48 wurden in EMM ( $\pm$  Aminosäuresupplementierung) kultiviert und der relative Anstieg der ROS-Bildung durchflußzytometrisch bestimmt. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  STABWN; t-test: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005, \*\*\*\*p<0.001 verglichen mit MB271 (grüne Balken). Es konnte ein signifikanter Anstieg der ROS-Produktion in der Positivkontrolle, CAD47 und CAD48 festgestellt werden.

Um diese Ergebnisse zu validieren, wurde der Einfluß verschiedener ROS-Inhibitoren auf den Stamm mit der stärksten ROS-Bildung untersucht. Dazu wurde der Stamm CAD48 sowohl ohne den Zusatz eines ROS-Scavengers (Kontrolle) als auch unter Zugabe der ROS-Scavenger MnTBAP, DIDS, TIRON oder NAC in den für Säugerzellen ermittelten Konzentrationen für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die DHE-Konversion durchflußzytometrisch bestimmt. Wie in Abbildung 29 zu sehen, zeigen die Ergebnisse unter der Verwendung von DHE und DHR123 kaum Unterschiede. Daher wurde in den folgenden Experimenten auf den Einsatz von DHR123 verzichtet. Im Gegensatz zu den

Ergebnissen die für Säugerzellen ermittelt wurden, konnte in der Spaltheife lediglich durch Zugabe des ROS-Scavangers NAC in einer Konzentration von 5 mM der Effekt der durch Adx-induzierten, gesteigerten ROS-Produktion aufgehoben werden (Abbildung 30).



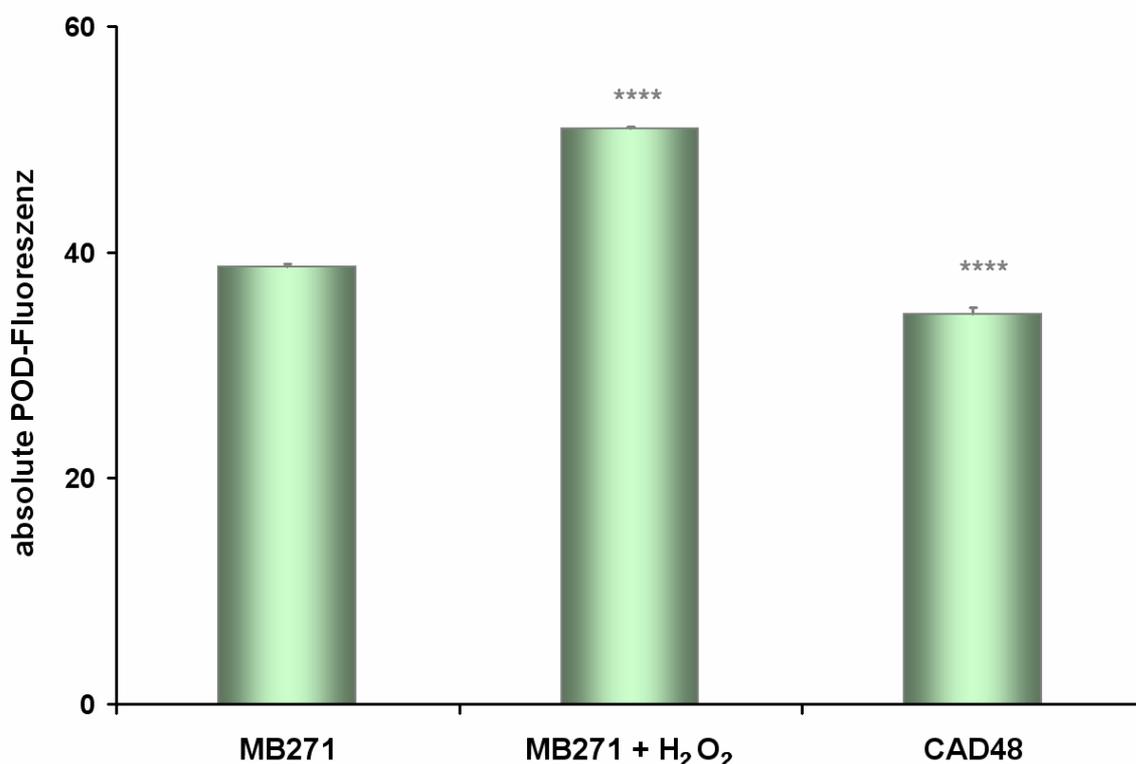
**Abbildung 30:** Einfluß unterschiedlicher ROS-Inhibitoren auf die Adx-induzierte ROS-Bildung

Der Adx-exprimierende Stamm CAD48 wurde in EMM kultiviert, 24 Stunden mit 5 mM NAC, 1 mM TIRON, 250 µM DIDS bzw, 10 µM MnTBAP inkubiert und der relative Anstieg der ROS-Bildung im FACS bestimmt. Es konnte eine Aufhebung der ROS-Bildung unter Einsatz von 5 mM NAC erwirkt werden. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  STABWN; t-test: \* $p < 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.001$  verglichen mit der Kontrollgruppe.

Wie die obigen Experimente zeigen führt die Überexpression von Adx<sup>1-108</sup> im Spaltheifestamm CAD48 zu einer vermehrten ROS-Bildung, welche jedoch mittels ROS-Inhibitor NAC in der Konzentration von 5 mM unterdrückt werden konnte. Um herauszufinden, ob die vermehrte ROS-Bildung in der Spaltheife zu typischen Merkmalen von Apoptose führt, wurden weitere Nachweismethoden aus der Zellkultur zum Einsatz gebracht.

### 4.3.3 Einfluß der ROS-Produktion auf die Apoptose

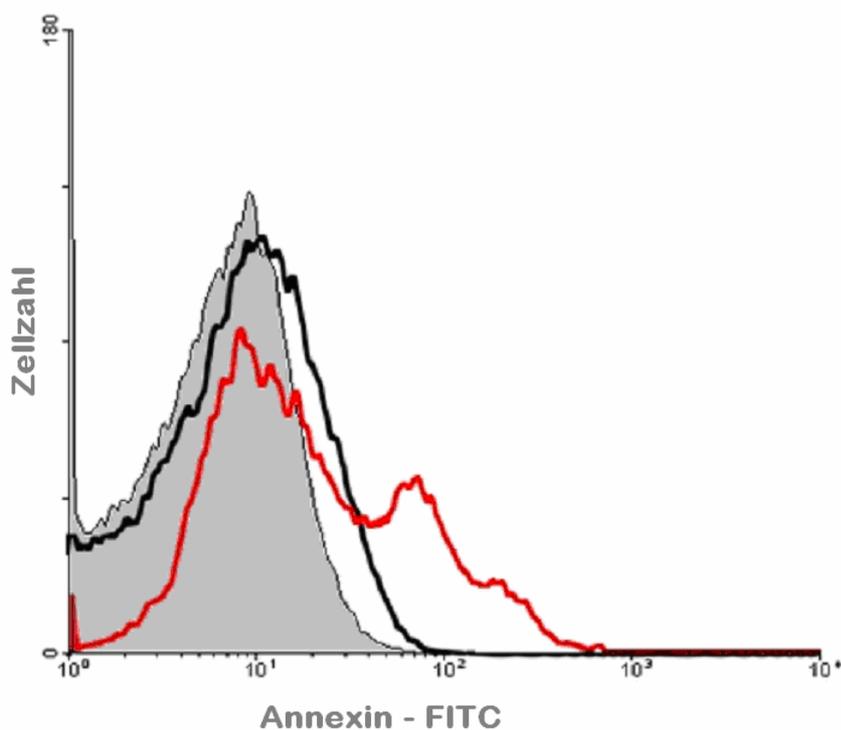
Der Nachweis typischer Marker der Apoptose lässt sich beispielsweise durch die Darstellung von DNS-Fragmentierung und atypischer Chromatinkondensation (TUNEL) erbringen. Dazu wurde der Stamm CAD48, Ausgangsstamm MB271 (Negativkontrolle) und mit 3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelte MB271-Zellen (Positivkontrolle) verwendet. Der TUNEL-Assay wurde wie unter 3.5.10 beschrieben durchgeführt. Die POD-Fluoreszenz, welche als Maß der DNS-Fragmentierung betrachtet wird, wurde durchflußzytometrisch bestimmt. Wie in Abbildung 31 dargestellt zeigten die Zellen des Stamm CAD48 keine erhöhte DNS-Fragmentierung oder atypische Chromatinkondensation, wohingegen die Positivkontrolle eine eindeutig erhöhte POD-Fluoreszenz aufwies.



**Abbildung 31:** TUNEL-Assay

Der Wildtypstamm MB271 ( $\pm$  3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Positivkontrolle)) sowie der Adx-exprimierende Stamm CAD48 wurden 24 Stunden in EMM kultiviert und die DNS-Fragmentierung mittels TUNEL-Assay durchflußzytometrisch bestimmt. Es handelt sich um die Auswertung dreier unabhängiger Experimente; dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen, absoluten POD-Fluoreszenz  $\pm$  STABWN; t-test: \*\*\*\*p<0.001. Es wurde keine vermehrte DNS-Fragmentierung bei CAD48 festgestellt.

Außerdem wurde der Austritt von Phosphatidylserin aus der Zellmembran mittels Annexin-V-Assay der Fa. Roche untersucht. Hierbei wurde ebenfalls MB271 als Negativkontrolle sowie mit 3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelte MB271-Zellen als Positivkontrolle mitgeführt. Der Austritt von Phosphatidylserin aus der Zellmembran wurde durchflußzytometrisch mittels Messung der FITC-Fluoreszenz bestimmt. Hierbei konnte keine Veränderung im Membranpotential von CAD48 festgestellt werden, wohingegen die Positivkontrolle eine eindeutige Auslagerung von Phosphatidylserin zeigte (Abbildung 32).



**Abbildung 32:** Annexin V-Assay

Der Wildtypstamm MB271 ( $\pm 3$  mM  $H_2O_2$  (Positivkontrolle)) sowie der Adx-exprimierende Stamm CAD48 wurden 24 Stunden in EMM kultiviert und der Austritt von Phosphatidylserin aus der Zellmembran mittels bestimmung der FITC-Fluoreszenz durchflußzytometrisch ermittelt. Die Positivkontrolle (rot) zeigt einen eindeutigen Anstieg von Phosphatidylserin-Austritt (Verschiebung nach rechts), wohingegen sich CAD48 (schwarz) wie die Kontrolle MB271 (grau schattiert) verhält.

Da die Bäckerhefe laut Madeo in der stationären Phase resistenter gegenüber Wasserstoffperoxid ist, wurde sowohl in der stationären als auch in der exponentiellen Phase der Nachweis apoptotischer Marker erbracht (Skulachev, 2002). In *S. pombe* war kein solcher Effekt nachzuweisen (Tabelle 12).

**Tabelle 12:** Annexin V-Assay

Stamm	Annexin - FITC
stat. MB271	$10,51 \pm 0,23$
stat. MB271 (+ 3 mM $H_2O_2$ )	$32,02 \pm 0,10$
stat. CAD48	$11,07 \pm 0,13$
exp. MB271	$6,38 \pm 0,06$
exp. MB271 (+ 3 mM $H_2O_2$ )	$18,05 \pm 0,20$
exp. CAD48	$8,30 \pm 0,09$

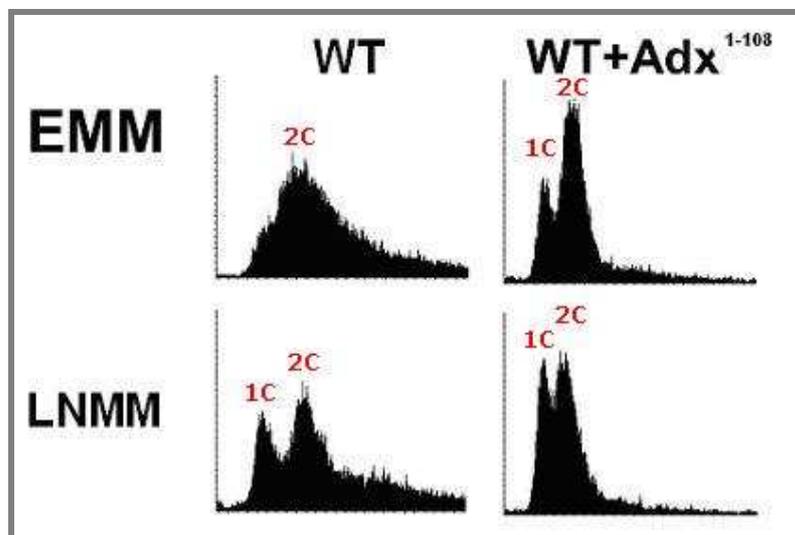
Bei den in Tabelle 12 dargestellten Daten handelt es sich um die Mittelwerte der gemessenen, absoluten FITC-Fluoreszenz dreier unabhängiger Experimente  $\pm$  STABWN.

#### 4.3.4 Einfluß der Adx-induzierten, mitochondrialen ROS-Bildung auf den Zellzyklus

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob die durch Adx<sup>1-108</sup> ausgelöste mitochondriale ROS-Bildung einen Einfluß auf den Zellzyklus hat. Dazu wurde der Ausgangsstamm MB271 mit sowohl EMM als auch Stickstoffmangelmedium (LNMM) kultiviert, die Zellzyklusverteilung durchflußzytometrisch nach Propidiumiodid (PI)-staining analysiert und mit der von CAD48 verglichen (Abbildung 33).

Die mit sub1C bezeichnete Fraktion stellt den Anteil der Zellen dar, der weniger als den haploiden Chromosomensatz enthält und welcher mit dem Anteil an apoptotischen Zellen gleichgesetzt werden kann. Der mit 1C bezeichnete Peak zeigt die Anzahl der Zellen in der Gap (G)-1-Phase des Zellzyklus. In dieser Phase enthalten die Zellen den einfachen Chromosomensatz (2n). Der Peak zwischen 1C und 2C entspricht Zellen in der Synthese (S)-Phase nach der Zytokinese und der Peak rechts von 2C entspricht S-Phase-Zellen vor der Zytokinese. Der 2C-Peak stellt den Anteil der Zellen dar, die sich in der G2-Phase bzw. in der Mitose (M)-Phase befinden.

Bei Kultivierung in Vollmedium (EMM) zeigte der Wildtypstamm einen breiten Peak mit einer Dominanz an G2-Zellen, wohingegen die Zellen in Stickstoffmangelmedium (LNMM) vermehrt in G1 verblieben (Alfa *et al.*, 1993). Durch die Expression von Adx<sup>1-108</sup> veränderte sich dieses Profil. In Minimalmedium erschien ein deutlicher Peak an G1-Zellen und die Anzahl der Zellen in den beiden S-Phase Regionen war deutlich verringert. Letzteres fand sich auch in LNMM.

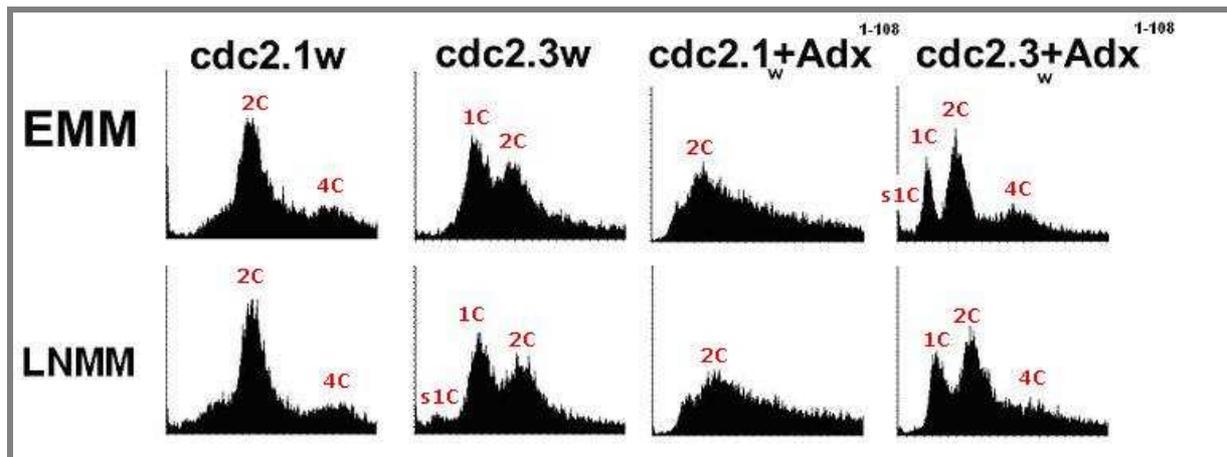


**Abbildung 33:** Zellzyklusverteilung von *S. pombe* nach Adx-Expression

Der Wildtypstamm (MB271) sowie CAD48 (WT / Adx<sup>1-108</sup>) wurden in EMM bzw. in Stickstoffmangelmedium (LNMM) kultiviert und durchflußzytometrisch nach Propidiumiodid (PI)-Färbung analysiert. (Exemplarische Darstellung eines Histogramm-Plot (PI-Fluoreszenz gegen Zellzahl) mittels FACS)

Zusätzlich wurde das Plasmid pNMT1-Adx<sup>1-108</sup> in die beiden temperatursensitiven Stämme MB100 (*h- cdc2.1w leu1.32*) (Nurse & Thuriaux, 1980) und MB154 (*h+ cdc2.3w ade6.616 leu1.32*) (Fantes, 1981) transformiert. Diese Stämme beeinhalteten die Checkpointmutanten *cdc2.1w* und *cdc2.3w*. Die so erhaltenen Stämme MB 292 (*h- cdc2.1w leu1.32 / pNMT1-Adx<sup>1-108</sup>*) und MB 293 (*h+ cdc2.3w ade6.616 leu1.32 /*

pNMT1- $Adx^{1-108}$ ) wurden ebenfalls untersucht (Abbildung 34). Die Expression von  $Adx^{1-108}$  beeinflusste die Temperatursensitivität der beiden *cdc2* Mutanten hierbei nicht. In einem *cdc2.1w* Hintergrund führte die Expression von  $Adx^{1-108}$  zu einem nahezu kompletten Verlust der G2 Zellen mit einer Verschiebung der Zellen in die S-Phase Region. In der *cdc2.3w* Mutante erfolgte ebenfalls eine Verschiebung der Zellen in die S-Phase Region, zugleich ließ sich ein Anstieg der G2-Zellen feststellen. Lediglich unter der Verwendung von EMM-Medium zeigte sich ein Anstieg an apoptotischen Zellen durch die Expression von  $Adx^{1-108}$ .



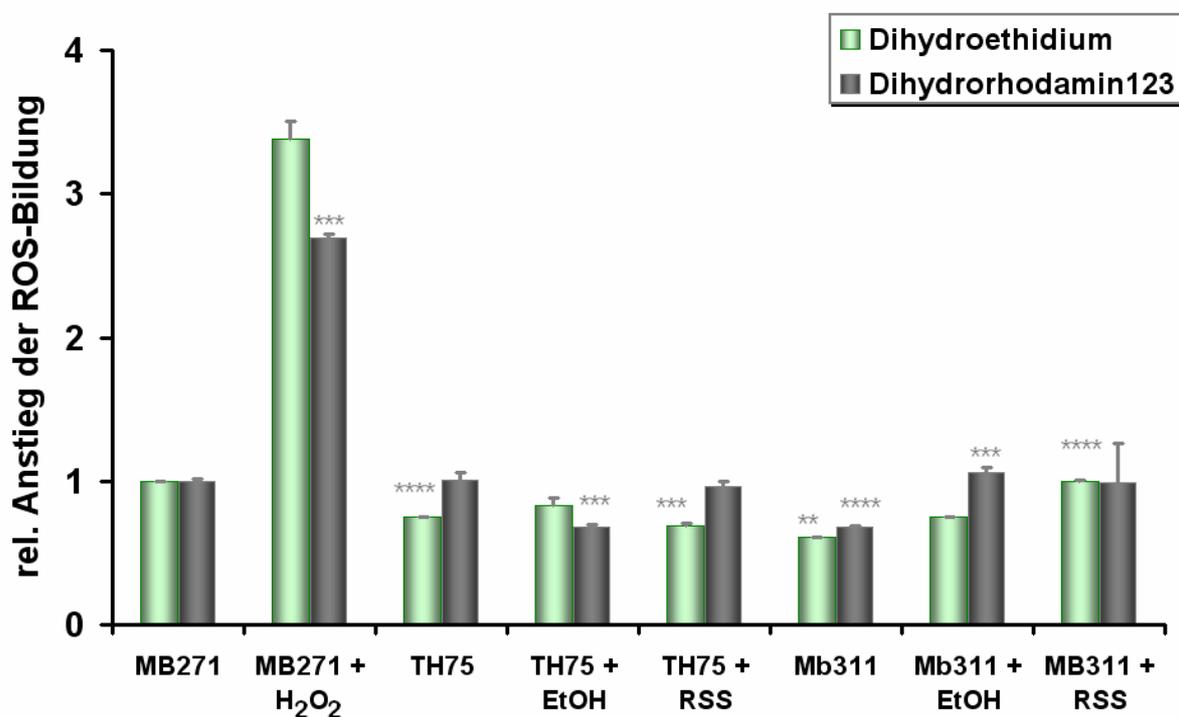
**Abbildung 34:** Zellzyklusverteilung von *S. pombe* nach *Adx*-Expression

Die Checkpointmutanten MB100 (*cdc2.1w*) und MB154 (*cdc2.3w*) sowie die  $Adx^{1-108}$  exprimierenden Stämme MB292 (*cdc2.1w* /  $Adx^{1-108}$ ) und MB293 (*cdc2.3w* /  $Adx^{1-108}$ ) wurden in entweder EMM bzw. LNMM kultiviert und durchflußzytometrisch nach Propidiumiodid (PI)-Färbung analysiert. (Exemplarische Darstellung eines Histogramm-Plot mittels FACS)

Wie festzustellen war zeigte die Expression von  $Adx^{1-108}$  einen Einfluß auf den Zellzyklus. Bereits in normalem Vollmedium verschiebt sich der Anteil der Zellen deutlich in die G1-Phase bei gleichzeitiger Verringerung des Anteils an Zellen in der S-Phase. Eine Zunahme an apoptotischen Zellen (sub1C-Peak) war hier jedoch nicht festzustellen. Lediglich vor einem *cdc2.3w* Hintergrund führte die gleichzeitige Expression von  $Adx^{1-108}$  zu einem Anstieg an apoptotischen Zellen.

#### 4.3.5 Einfluß der Überexpression von AdR und CYP11B1 auf die mitochondriale ROS-Produktion in *S. pombe*

Nach den bisher erhaltenen Ergebnissen stellte sich die Frage, ob die Anwesenheit von AdR und P450 im Hefesystem in der Lage ist, die ROS-Produktion zu unterbinden. Dazu wurde ein DHE-Assay mit den Stämmen MB271 (Kontrolle), TH75 (Adx/AdR/CYP11B1 exprimierender Stamm) und MB311 (Adx & AdR exprimierender Stamm) durchgeführt. Wie in Abbildung 35 dargestellt zeigten sowohl MB311 als auch TH75 keinen Anstieg in der ROS-Produktion, was darauf schliessen lässt, dass die Anwesenheit von AdR und P450 im Hefesystem in der Lage sind, die ROS-Produktion zu unterbinden.



**Abbildung 35:** Adx-induzierte ROS-Bildung in *S. pombe*

Der Wildtypstamm (MB271) ( $\pm$  3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Positivkontrolle)), MB311 (Adx / AdR) sowie TH75 (Adx / AdR /CYP11B1) wurden in EMM ( $\pm$  Aminosäuren) kultiviert und der relative Anstieg der ROS-Bildung unter dem Einfluß des CYP11B1-Substrates RSS durchflußzytometrisch bestimmt. Es konnte in allen Fällen kein Anstieg der ROS-Produktion festgestellt werden. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  STABWN; t-test: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ , \*\*\*\* $p < 0.001$  verglichen mit der Kontrollgruppe.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass lediglich die Überexpression von Adx<sup>1-108</sup> in der Lage ist, vermehrt ROS in der Spalthefe zu produzieren. Es ist möglich diese ROS-Produktion mittels des Scavanger NAC zu unterbinden. Dennoch lassen sich in der Spalthefe keine weiteren apoptischen Marker wie DNS-Fragmentierung oder der Austritt Phosphatidylserin aus der Zellmembran feststellen. Der Einfluß auf den Zellzyklus steht lediglich vor einem *cdc2.3w* Hintergrund im Zusammenhang mit einer vermehrten Auftreten an apoptischen Zellen.

## 4.4 Charakterisierung des Adx-Homologen (Benoni) aus *Drosophila melanogaster*

In dem letzten Kapitel dieser Arbeit sollte geklärt werden, in wie weit die Fähigkeit von humanen und bovinem Adx ROS in verschiedenen Organismen zu produzieren auf andere Ferredoxine, im speziellen das Adx-Homolog der Fruchtfliege *D. melanogaster* zu übertragen sind. Dazu sollte zunächst die Homologie des Adx-Homolog aus *D. melanogaster*, (im folgenden mit Benoni bezeichnet) zu humanem und bovinem Adx untersucht werden.

### 4.4.1 Sequenz

Die Nukleotidsequenz für das 1999 gefundene Adx-Homolog aus *D. melanogaster* (Feyereisen, 1999) findet sich in der Datenbank Flybase unter der Bezeichnung FBgn0035529 bzw. CG1319. Da sowohl die Funktion als auch die Struktur von Adx aus verschiedenen Organismen bekannt sind (Chang *et al.*, 1988; Grinberg *et al.*, 2000; Kakuta *et al.*, 2001; Mo *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 1998, Sevrioukova, 2003 #2982; Muller, 1998; Muller *et al.*, 2003; Vidakovic *et al.*, 1996), wurde die Primärstruktur von Benoni mit der von humanem und bovinem Adx verglichen, um Aussagen über den Grad der Homologie und über die Natur des zu untersuchenden Proteins zu treffen. Dazu wurde mittels dem Programm Clustal W ein Sequenzvergleich von Benoni mit der Aminosäuresequenz der maturen Form von humanem und bovinem Adx vorgenommen; zur graphischen Darstellung wurde BOXSHADE verwendet (Abbildung 36). Dabei zeigten die drei Sequenzen über weite Bereiche deutliche Homologien.



**Abbildung 36:** Homologievergleich der Adronodoxinsequenzen aus unterschiedlichen Organismen.

Tatsächlich sind 68 der insgesamt 158 Aminosäuren des *D. melanogaster* Proteins identisch mit den Aminosäuren an den entsprechenden Positionen des bovinen und humanen Adx, was einer Übereinstimmung von 43,04 % entspricht. Zählt man die nicht völlig identischen, aber dennoch ähnlichen Aminosäuren hinzu, so erhält man eine Homologie von 52,29 %. Sowohl die Sequenz von Benoni, welches die mitochondriale Importsequenz trägt (prä-Benoni) als auch die Sequenz des maturen Benoni wurden von der Fa. Entelechon synthetisch hergestellt (Sequenzen Anhang D). Die Sequenz von prä-Benoni wurde unverändert synthetisiert (Original-Codon-Usage), wohingegen die Sequenz von Benoni Codon-usage optimiert für *E. coli* hergestellt wurde. Die Codon Usage beschreibt das Phänomen, dass Varianten des universellen genetischen Codes von unterschiedlichen Spezies verschiedenartig benutzt werden und spielt daher eine große Rolle bei der Regulation der Proteinbiosynthese. Selten benutzte Codons können die Translation bremsen, währenddessen oft genutzte Codons die Translation beschleunigen können. Bei der Produktion fremder Proteine in Bakterien kann es aus diesem Grund von Vorteil sein, das in den Produzenten eingebrachte Gen in seiner "codon usage" dem Repertoire des verwendeten Bakterienstamms anzugleichen und somit zu einer höheren Expression zu gelangen. Zur Durchführung der folgenden Expressionsstudien wurde die Sequenz von Benoni in pKKHC-Vektor, einem für die Expression in *E. coli* geeigneten Expressionsvektor, subkloniert (Vektorkarte Anhang F).

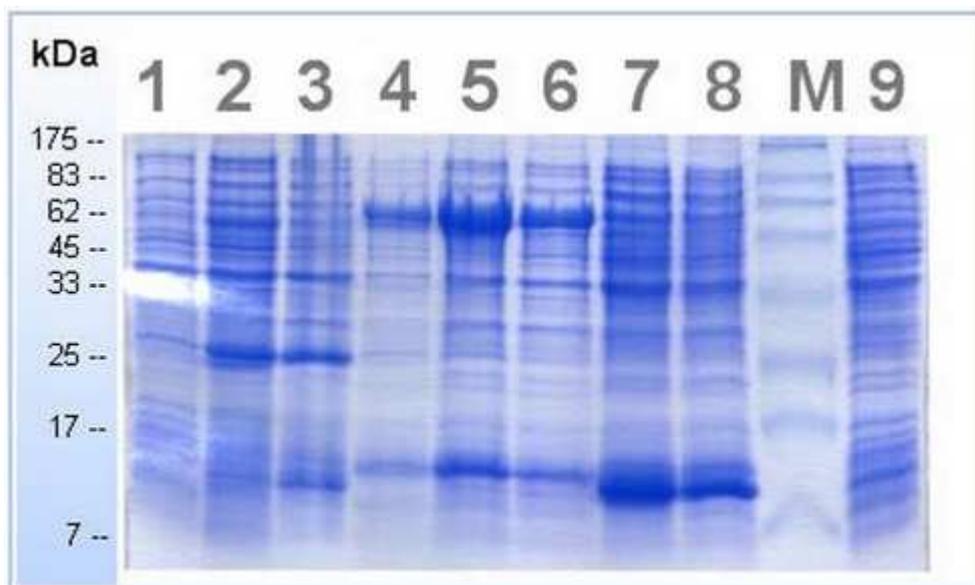
#### 4.4.2 Expression von Benoni

Um geeignete Bedingung für die Expression von Benoni zu finden, wurden verschiedene *E. coli* Stämme unter unterschiedlichen Bedingungen getestet. Dazu wurden die Zellen zunächst mit dem Benoniplasmid transformiert und für 12 Stunden bei Temperaturen von 25-37 °C im Schüttelinkubator (200 rpm) kultiviert. Anschließend wurden 500 ml mit entsprechenden Selektionsmarkern (Ampicillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (50 µg/ml)) versetztes NB-Medium mit 1/10 – 1/40 dieser Vorkultur beimpft. Diese Hauptkultur wurde unter gleichen Bedingungen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 – 1,0 weiter inkubiert. Dann erfolgte die Induktion mit IPTG. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Induktion geerntet und Proben mit gleicher Anzahl von Zellen für eine SDS-Page mit 45%igem Gel verwendet (Abbildungen 37-42).

Ausgehend von der Aminosäuresequenz von Benoni konnte mit Hilfe des unter [http://us.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html) zugänglichen Programm Compute pI/Mw das theoretische Molekulargewicht sowie der theoretische isoelektrische Punkt (IEP) des maturen Proteins errechnet werden. Für den IEP ergab sich ein Wert von 4,44, während das berechnete Molekulargewicht mit 17 kDa angegeben wurde. Diese Berechnungen deckten sich mit den experimentell ermittelten Werten im SDS-Gel (Abbildung 37, Spur 5). Humanes Adx, welches als Kontrolle mitgeführt wurde, hat ein Molekulargewicht von 14 kDa und seine Bande fand sich im SDS-Gel zwischen 6,5 – 17,5 kDa. Es handelt sich bei allen dargestellten SDS-Gelen um die exemplarische Abbildung eines Geles; die Experimente wurden jedoch mindestens dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

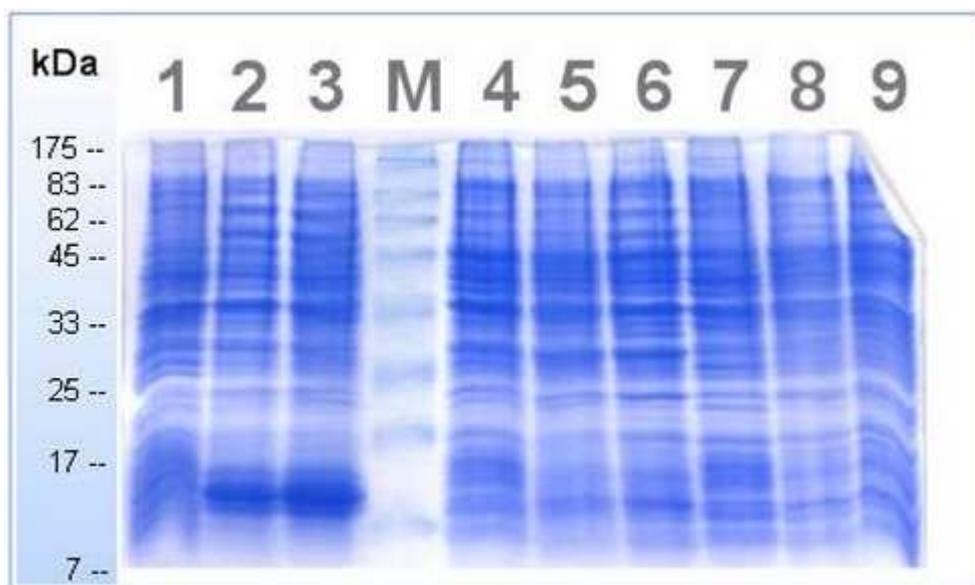
Die *E. coli* Stämme BCC (Abbildung 37, Spur 5), BL21 (Abbildung 39, Spur 5) und plysE (Abbildung 40, Spur 5) exprimierten Benoni bereits nach 12 stündiger Inkubation bei 37 °C, 200 rpm. Hier war eine Benoni-Bande unterhalb der 17 kDa-Markerbande zu erkennen. In Rosetta-Zellen sowie JM109-Zellen war keine Expression von Benoni möglich (Abbildung 38). Im Stamm BC (Abbildung 37, Spur 3) sowie BL21(DE3)

(Abbildung 39, Spur 9) war die Expression zwar vorhanden, aber relativ schwach und die Benoni-Bande erst nach 24 Stunden deutlich zu erkennen. Daher wurden diese Stämme für weitere Expressionsstudien ausgeschlossen. Die nächsten Experimente wurden lediglich pLysE-Zellen durchgeführt, da in diesem Stamm bereits nach 12 Stunden die stärkste Expression erzielt wurde.



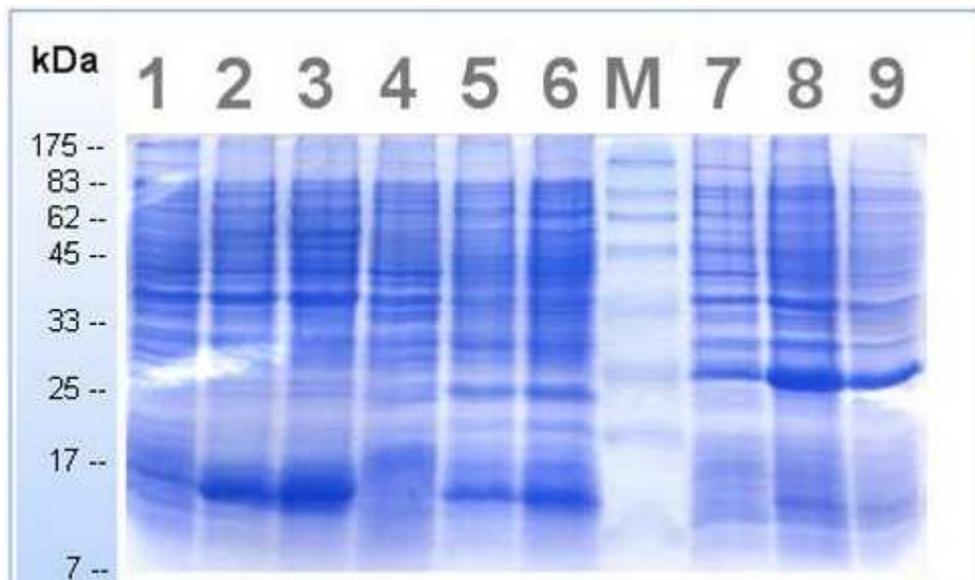
**Abbildung 37:** Expression von Benoni bei 37°C, 200 rpm

Transformation erfolgte mit 0,5 µg Benoni bzw. hAdx (Kontrolle). Es wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten SDS-Proben hergestellt. Die Spuren 1-3 enthalten das Proteinlysate von BC-Zellen (0 h - 12 h - 24 h), die Spuren 4-6 Proteinlysate von BCC-Zellen (0 h - 12 h - 24 h) und die Spuren 7-9 Proteinlysate der hAdx exprimierenden Kontrolle (24 h - 12 h - 0 h).



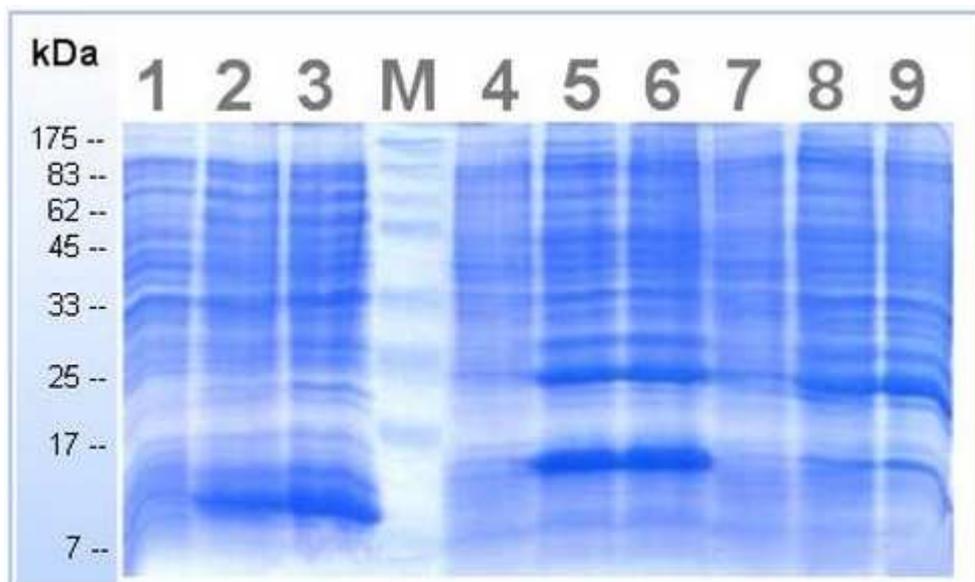
**Abbildung 38:** Expression von Benoni bei 37°C, 200 rpm.

Die Zellen wurden mit 0,5 µg Benoni bzw. 0,5 µg humanem Adx (Kontrolle) transformiert. Spur 1-3: Kontrolle (0 h - 12 h - 24 h), Spur 4-6: JM109-Zellen (0 h - 12 h - 24 h) und Spur 7-9: Rosetta-Zellen (0 h - 12 h - 24 h). Keine der getesteten Zellen exprimiert Benoni.



**Abbildung 39:** Expression von Benoni bei 37°C, 200 rpm

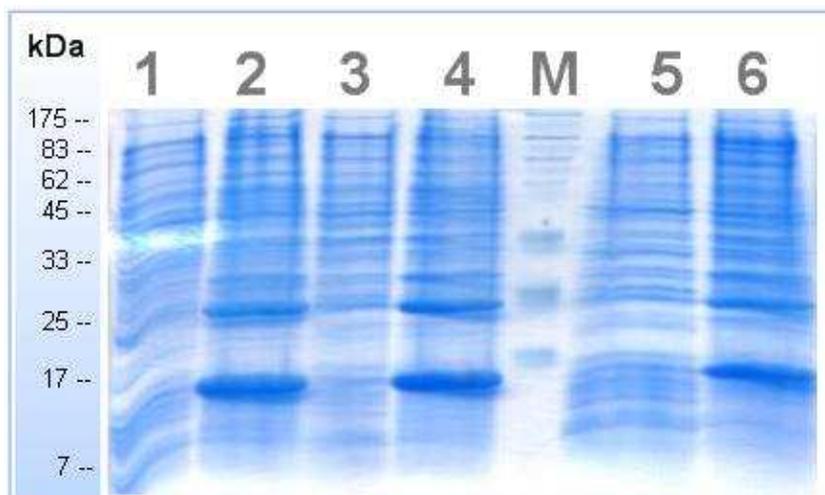
Transformation der Zellen erfolgte mit 0,5 µg Benoni oder 0,5 µg humanem Adx (Kontrolle). Spur 1-3: Kontrolle (0 h - 12 h - 24 h), Spur 4-6: BL21-Zellen (0 h - 12 h - 24 h) und Spur 7-9: BL21(DE3)-Zellen (0 h - 12 h - 24 h). Bereits nach 12 stündiger Expression ist in Spur 5 eine Benoni-Bande zu erkennen.



**Abbildung 40:** Expressionslevel von Benoni in pLysE und pLysS-Zellen

Der Expressionslevel wurde nach Transformation der Zellen mit 0,5 µg Benoni oder 0,5 µg humanem Adx (Kontrolle) untersucht. Spur 1-3: Kontrolle (0 h - 12 h - 24 h), Spur 4-6: pLysE-Zellen (0 h - 12 h - 24 h) und Spur 7-9: pLysS-Zellen (0 h - 12 h - 24 h). Bereits 12 h nach Induktion ist in Spur 5 eine Benoni-Bande vorhanden.

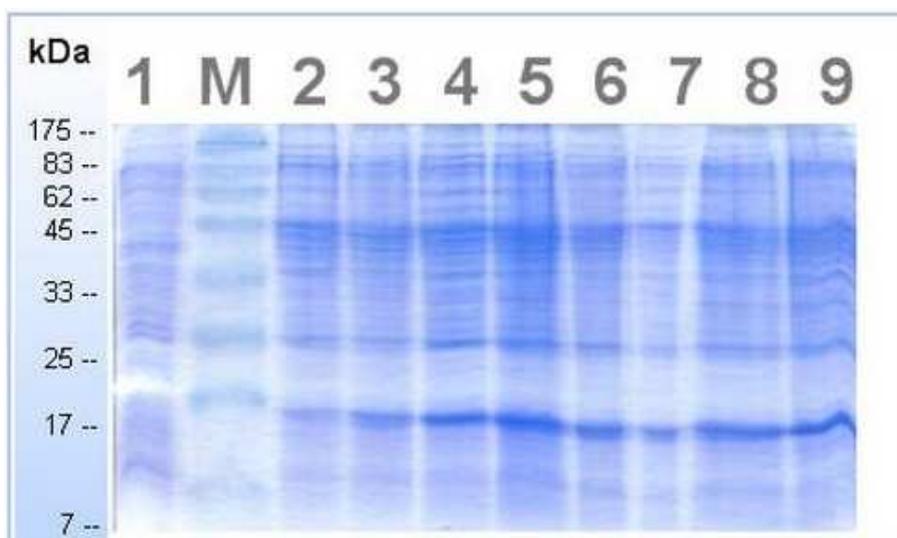
Um die Expressionsbedingungen weiter zu optimieren, wurden die Zellen in unterschiedlichen Medien mit und ohne Zugabe von Ascorbat als Stabilisator kultiviert. Dabei zeigte sich, dass weder die Zugabe von Ascorbat, noch die Zusammensetzung des Mediums einen entscheidenden Einfluß auf den Expressionslevel von Benoni hatte (Abbildung 41).



**Abbildung 41:** Expression von Benoni bei 37°C, 200 rpm

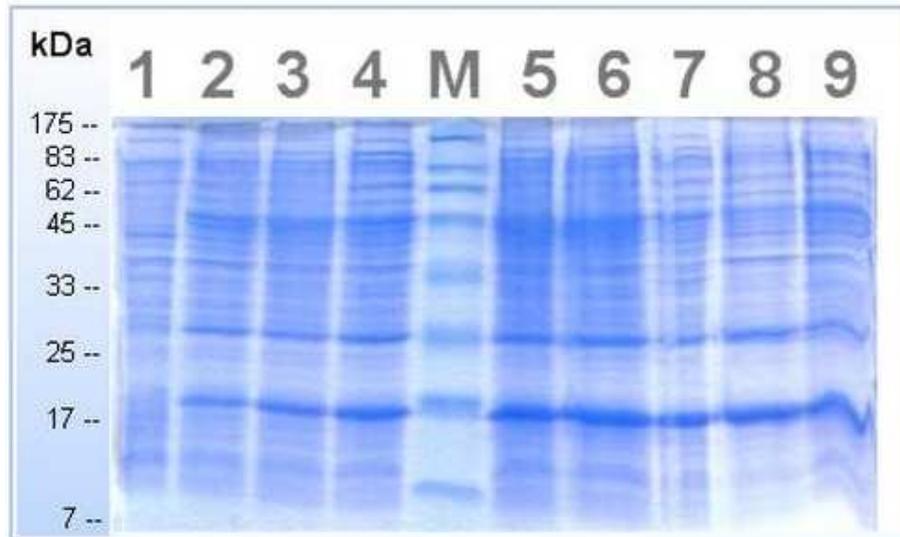
Die Zellen wurden mit 0,5 µg Benoni transformiert und in verschiedenen Medien mit (3, 4) und ohne (1, 2, 5, 6) Zugabe von Ascorbat inkubiert. Spur 1-4: Proteinlysate von pLysE-Zellen in NB-Medium, Spur 5-6: Proteinlysate von pLysE-Zellen in SD-Medium. Bei der Auftragung in den Spuren 1, 3 und 5 handelte es sich um nicht-induzierte Kontrollzellen, die Zellen in den Spuren 2, 4 und 6 wurden mit 250 µg/l IPTG induziert.

Für alle weiteren Expressionsstudien wurden die pLysE-Zellen daher ausschließlich in NB-Medium ohne weitere Zusätze kultiviert. Um herauszufinden, ob eine Verlängerung der Expressionszeit oder Veränderungen der Inkubationstemperatur einen entscheidenden Einfluß auf den Expressionlevel von Benoni haben, wurden Zeitreihen bei den Temperaturen 25°C, 30°C und 37°C durchgeführt. Dazu wurden pLysE-Zellen zunächst mit dem Benoniplasmid transfiziert, induziert und anschließend die Expression von Benoni unter Einfluß der verschiedenen Inkubationstemperaturen zu verschiedenen Zeitpunkten überprüft.



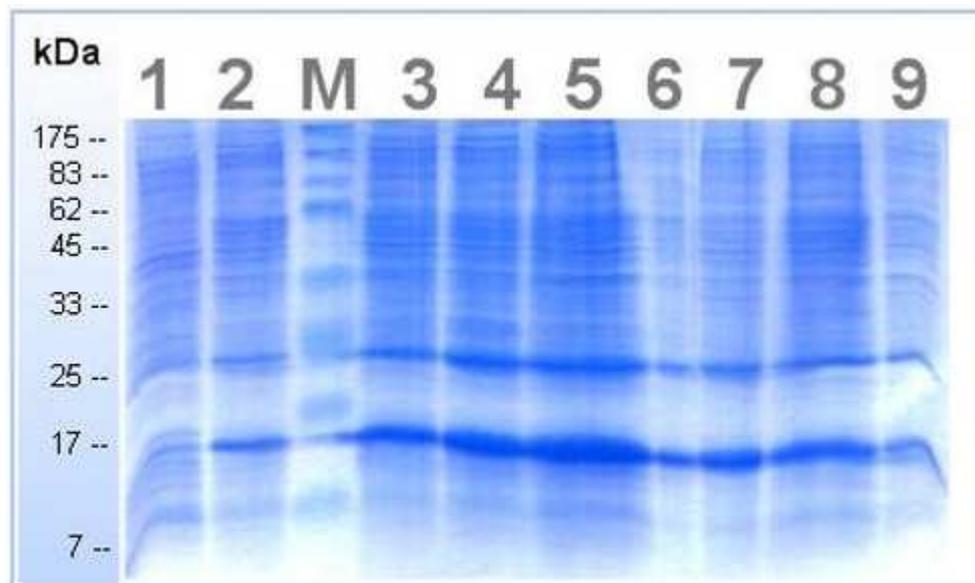
**Abbildung 42:** Expression von Benoni bei 25°C, 200 rpm

Spur 1: Proteinlysate von pLysE-Zellen zum Zeitpunkt 0 h der Induktion (250 µg/l IPTG). Spur 2-9: Proteinlysate von pLysE-Zellen zum Zeitpunkt 6 h bis 48 h nach Induktion (Abstand jeweils 6 h). Bereits nach 6 Stunden wird Benoni exprimiert (Spur 2), nach 24 h ist die Expression am größten (Spur 5).



**Abbildung 43: Expression von Benoni bei 30°C, 200 rpm**

Die Zellen wurden mit 0,5 µg Benoni transformiert und SDS-Proben nach verschiedenen Zeitpunkten hergestellt, um den Verlauf der Expressionsstärke zu verfolgen. Spur 1: Proteinlysate von pLysE-Zellen zum Zeitpunkt der Induktion (250 µg/l IPTG). Spuren 2-9: Proteinlysate von pLysE-Zellen zum Zeitpunkt 6 h bis 48 h nach Induktion (Abstand jeweils 6 h).



**Abbildung 44: Expression von Benoni bei 37°C, 200 rpm**

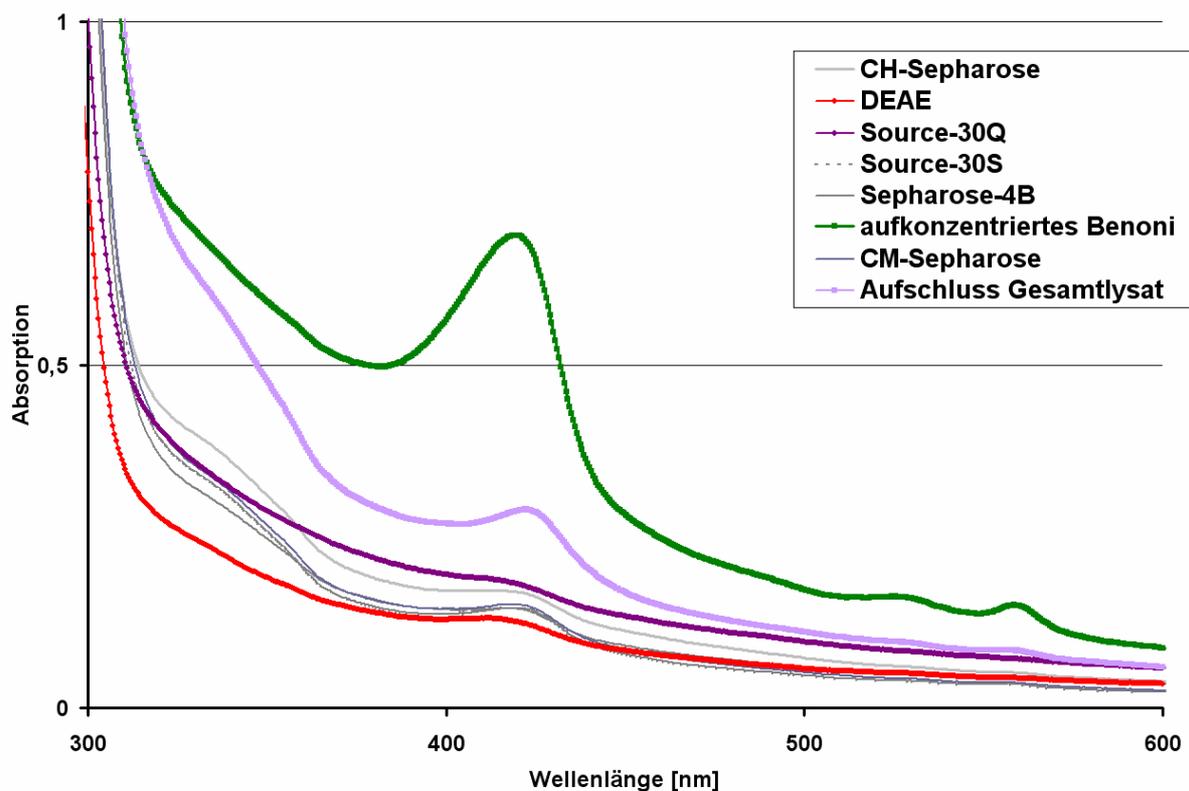
Die Zellen wurden mit 0,5 µg Benoni transformiert. Spur 1: SDS-Proben von pLysE-Zellen zum Zeitpunkt der Induktion (250 µg/l IPTG). Spuren 2-9: SDS-Proben von pLysE-Zellen zum Zeitpunkt 6 h bis 48 h nach Induktion (Abstand jeweils 6 h).

Wie in Abbildung 42-44 deutlich zu erkennen ist, wurde Benoni unter allen getesteten Expressionsbedingungen bereits nach 6 Stunden exprimiert, allerdings wurde die maximale Expression erst 24 Stunden nach Induktion erreicht. Bei 37°C wurde die stärkste Expressionsrate erreicht (Abbildung 44), aber aufgrund der mit höherer Temperatur auftretenden, stärkeren Nebenbanden, wurde Benoni in den folgenden Experimenten für 48 Stunden bei lediglich 25°C exprimiert. Es wurde bewusst eine

verlängerte Expressionsdauer gewählt, da das Protein keine Stabilitätsprobleme aufzeigte und bisherige Erfahrungen zu einer verlängerten Expression bei niedrigen Temperaturen raten.

#### 4.4.3 Chromatographische Aufkonzentrierung und Reinigung von Benoni

Um herauszufinden, unter welchen Bedingungen Benoni aufkonzentriert und vorgereinigt werden kann, wurden verschiedene Ionenaustauscher getestet. Dieses Experiment wurde im Micro-Maßstab durchgeführt. Dazu wurde das bereits aufgeschlossene und mittels Centripreps YM-30 eingeeengte Gesamtlysate der Benoni-exprimierenden pLysE-Zellen nach der Expression unter den in 4.4.2 ermittelten Bedingungen in einem Eppendorfgefäß mit jeweils 2 ml der verschiedenen Säulenmaterialien über einen Zeitraum von 2 Stunden vermischt. Nach dem Waschen des Säulenmaterials wurde ein UV/Vis-Spektrum vom „Durchlauf“ und Eluat erstellt um herauszufinden, wie hoch die Bindungsaffinität des entsprechenden Säulenmaterials gegenüber Benoni ist. Es wurde festgestellt, dass Benoni unter den gewählten Bedingungen in der Lage war, sowohl an den Anionenaustauscher SourceQ (Abbildung 45, lila Kurve) als auch DEAE (Abbildung 45, rote Kurve) zu binden, da hier im „Durchlauf“ kein charakteristisches Benoni-Spektrum mehr zu erkennen war (Abbildung 45, grüne Kurve).

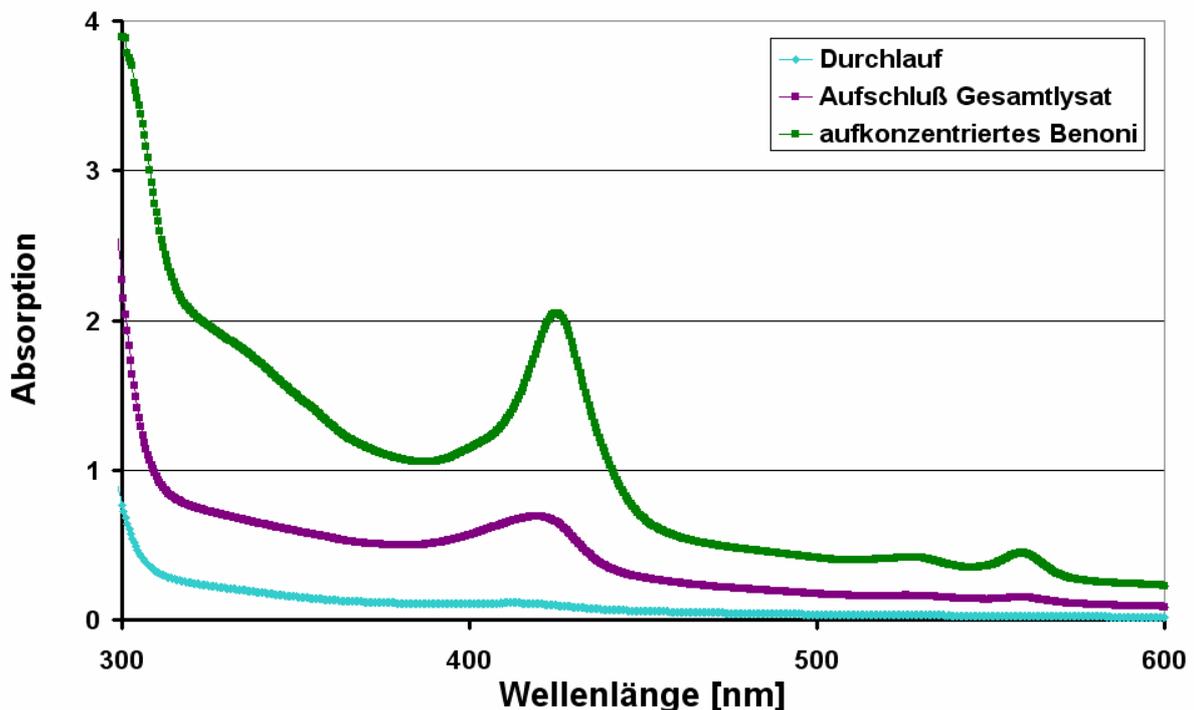


**Abbildung 45:** Testung verschiedener Säulenmaterialien

Transformation der Zellen mit 0,5 µg Benoni; 48 h Expression bei 25 °C, 200 rpm. Vermessen wurde sowohl der Aufschluss des Gesamtproteinlysates (flüchtigfarbene Kurve), als auch der Durchlauf der jeweiligen Säulenmaterialien nach Auftragung des Proteinlysates. Aufkonzentriertes Benoni (grüne Kurve) zeigt einen charakteristischen Peak bei 420 nm sowie einen Nebenpeak bei 560 nm.

Während bei der Reinigung über SourceQ im Eluat aber nur farblose Fraktionen auftraten, zeigte bei der Reinigung mit DEAE ein Teil der Fraktionen eine deutliche Rotfärbung. Es wurde daher nur eine Vorreinigung über DEAE-Säule in Betracht gezogen. Da die Menge des eluierten Proteines im Vergleich zur Proteinmenge des Zell-Aufschlusses jedoch sehr gering erschien, wurde das Bindungs- und Elutionsverhalten von Benoni mittels SDS-PAGE überprüft.

Dazu wurden jeweils Proben vom Aufschluss vor der Säule, vom Durchlauf der Säule sowie von der Eluatfraktion hergestellt. So konnte nachgewiesen werden, dass bei beiden verwendeten Säulenmaterialien Durchlaufraktionen auftraten, die eine ausgeprägte Bande auf der Höhe der 17 kDa Markerbande zeigten (Daten nicht gezeigt). Ein Teil des Zielproteins konnte offensichtlich aufkonzentriert werden, der Großteil des Proteins ging jedoch bei dieser Reinigung verloren; ein Umstand der auch unter Verwendung eines größeren Säulenvolumens nicht behoben werden konnte. Es wurde daher versucht das Volumen des Proteinlysates lediglich durch die Verwendung von Centriprep YM-30 Zentrifugalfiltereinheiten der Fa. Amicon soweit einzuengen, dass das verbleibende Proteingemisch mittels einer Superdex75 (Fa. Amersham Biosciences) Gelchromatographiesäule getrennt werden konnte. Aufgrund der deutlichen Rotfärbung der Benoni-enthaltenden Fraktionen konnten diese gesammelt, spektralphotometrisch vermessen und erneut eingengt werden. Mit dem so erhaltenen „aufgereinigten“ Benoni wurden die folgenden Studien zur Charakterisierung durchgeführt.



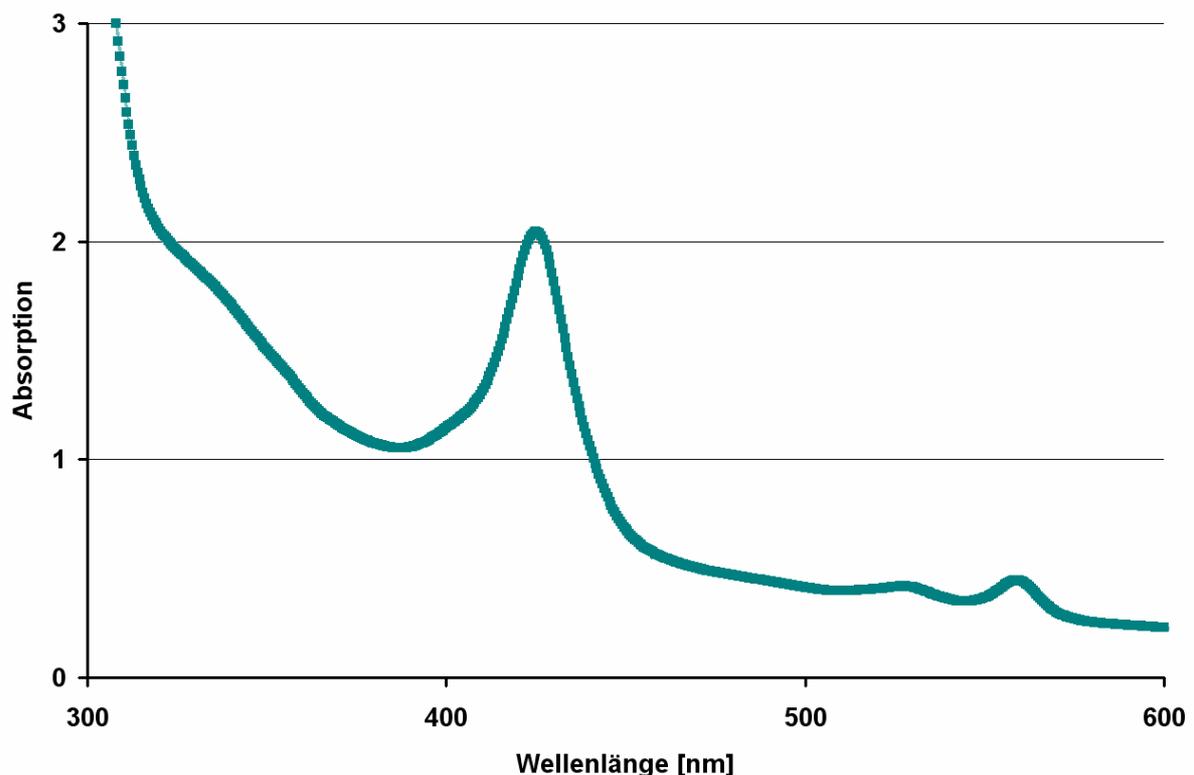
**Abbildung 46: Gelchromatographische Reinigung**

Das Volumen des aufgeschlossenen Gesamtlusates der Benoni-Expression (lila Kurve) wurde zunächst unter Verwendung von Centripreps YM-30 vermindert. Anschließend erfolgte die Reinigung über eine Superdex75-Gelfiltrationssäule und erneute Aufkonzentrierung mittels Centripreps YM-30 (grüne Kurve). Im Durchlauf der Säule war kaum noch Benoni vorhanden (hellblaue Kurve).

#### 4.4.4 Spektrometrische Charakterisierung von Benoni

##### 4.4.4.1 UV/Vis Spektrum

Das UV-Vis-Spektrum von Benoni zeigte überraschenderweise keine typischen Merkmale eines [2Fe-2S]-Ferredoxins. Das Maximum bei 414 war im Vergleich zu Adx zu längeren Wellenlängen verschoben, das Maximum bei 454 nm nicht vorhanden. Der charakteristische Doppelpeak zwischen 290 und 370 nm zeigte Veränderungen, das Maximum und die Schulter sind im Vergleich zu Adx vertauscht.



**Abbildung 47:** UV/Vis-Spektrum Benoni

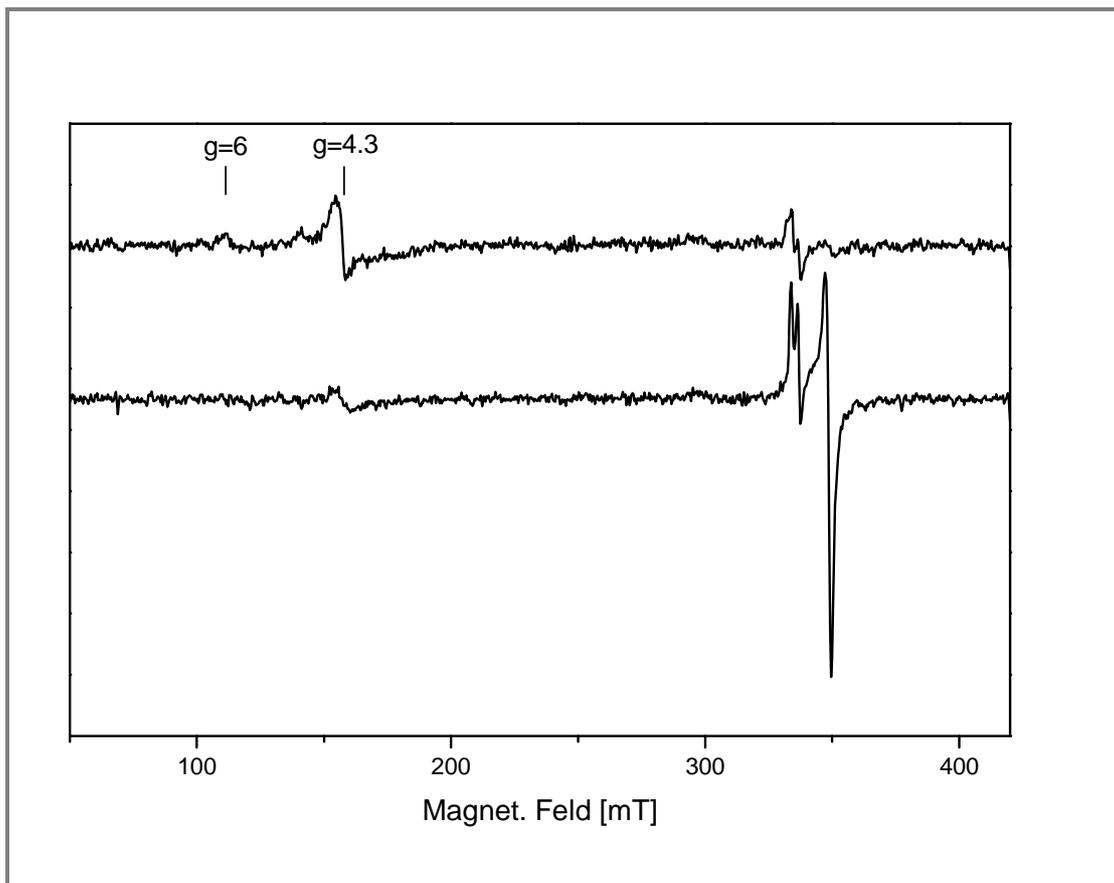
Aufgereinigtes Benoni zeigt einen charakteristischen Peak bei 420 nm und 560 nm.

##### 4.4.4.2 Redoxpotential

Die Bestimmung des Redoxpotentials mit der Photoreduktionsmethode mit Safranin T führte aufgrund des offensichtlich unerwartet niedrigen Potentials des Adx-Homologen aus *D. melanogaster* zu keinem eindeutigen Ergebnis. Es kann daher lediglich festgehalten werden, dass das Redoxpotential niedriger als etwa  $-360$  mV sein muss. Dieser Wert stellt die Bestimmungsgrenze dieses Systems dar.

#### 4.4.4.3 ESR-Messungen

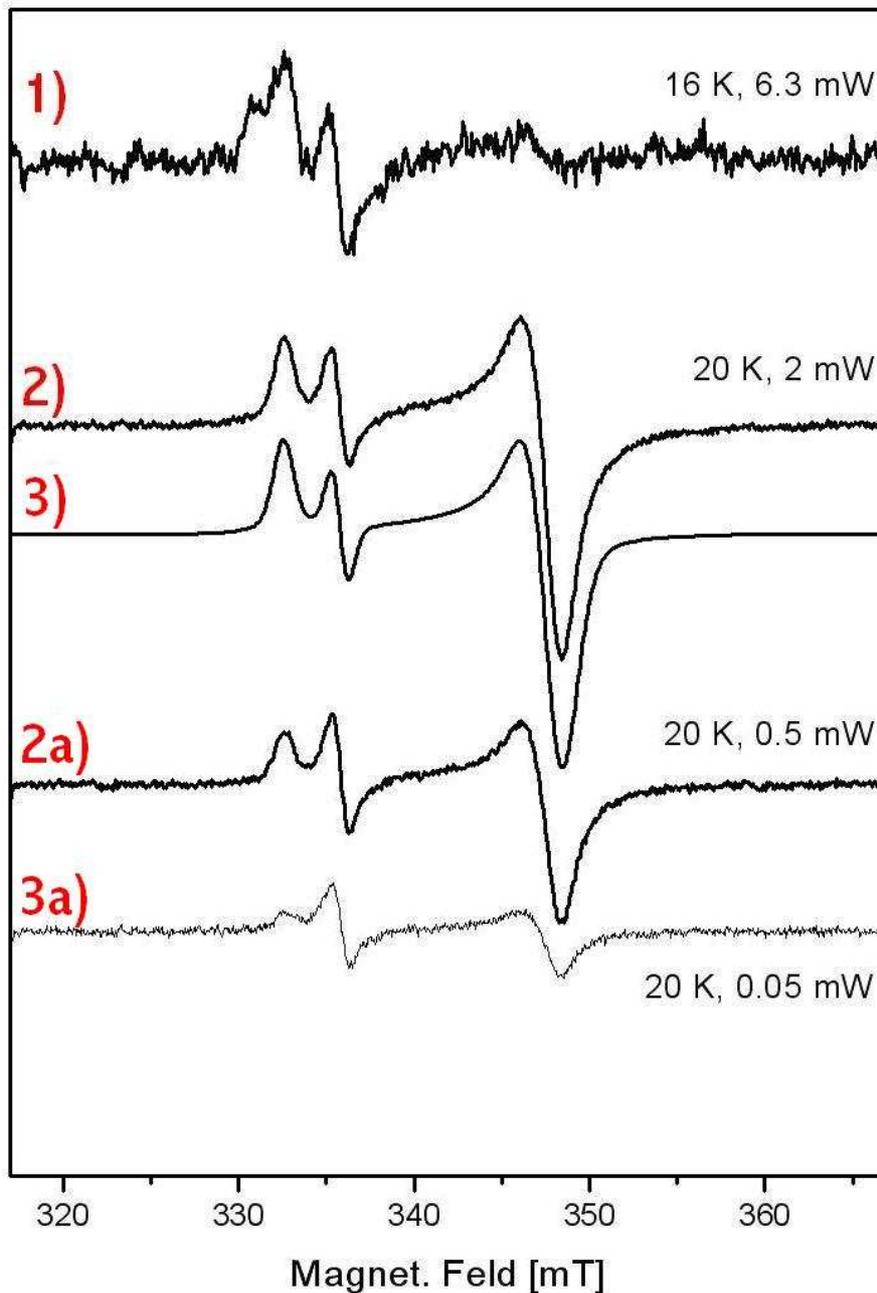
Die ESR-Messungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Reinhard Kappl am Institut für Biophysik der Universität in Homburg durchgeführt. Der Graph der Abbildung 48 zeigt im oberen Bereich die Probe im oxidierten, im unteren Bereich die Probe im reduzierten Zustand. Man sieht Resonanzen bei  $g=6$  und  $4.3$  bei niedrigem Feld, die von gebundenem und unspezifisch gebundenem  $\text{Fe}^{3+}$  stammen. Nach der Reduktion sind diese Signale fast verschwunden.  $\text{Fe}^{2+}$  ist nicht sichtbar, dafür intensives Signal um  $g=2$ , d.h., bei 340 mT (= 3400G).



**Abbildung 48:** ESR-Spektrum Benoni

Die Graphen in Abbildung 49 sind im Bereich um  $g=2$  vergrößert dargestellt. Das oberste Spektrum zeigt den Graphen der oxidierten Probe (1), jene darunter stammen von der reduzierten Probe. Der Graph (3) entspricht der Simulation des reduzierten Spektrums (2), welche bei 20 dB (=2 mW) aufgenommen wurde. Die reduzierte Benoni-Probe zeigt hierbei ein typisches, fast axiales ESR-Spektrum eines FeS-clusters sowie eine einzelne Linie bei  $g=2.005$ . Letztere stammt von einem organischen Radikal (ohne Metall). Die Simulation reproduziert das Spektrum recht gut. Die beiden unteren Spektren (2a+3a) sind bei geringeren Leistungen (Dämpfung 26dB (0.5 mW) und 36 dB (0.05 mW)) aufgenommen. Dabei sieht man deutlich, dass das FeS-Signal wegen seiner schnelleren Relaxation bei niedrigen Leistung stärker an Intensität verliert als das organische Radikal. Diese Reaktion ist typisch für unabhängige Signalsspezies. Das Spektrum der oxidierten Probe scheint schon etwas reduzierten FeS-Cluster zu enthalten. Daneben sind noch zwei

weitere Signale bei niedrigem Feld zu sehen, von denen eines nach Reduktion zu verschwinden scheint. Dieses Signal kann von dem organischen Radikal stammen.



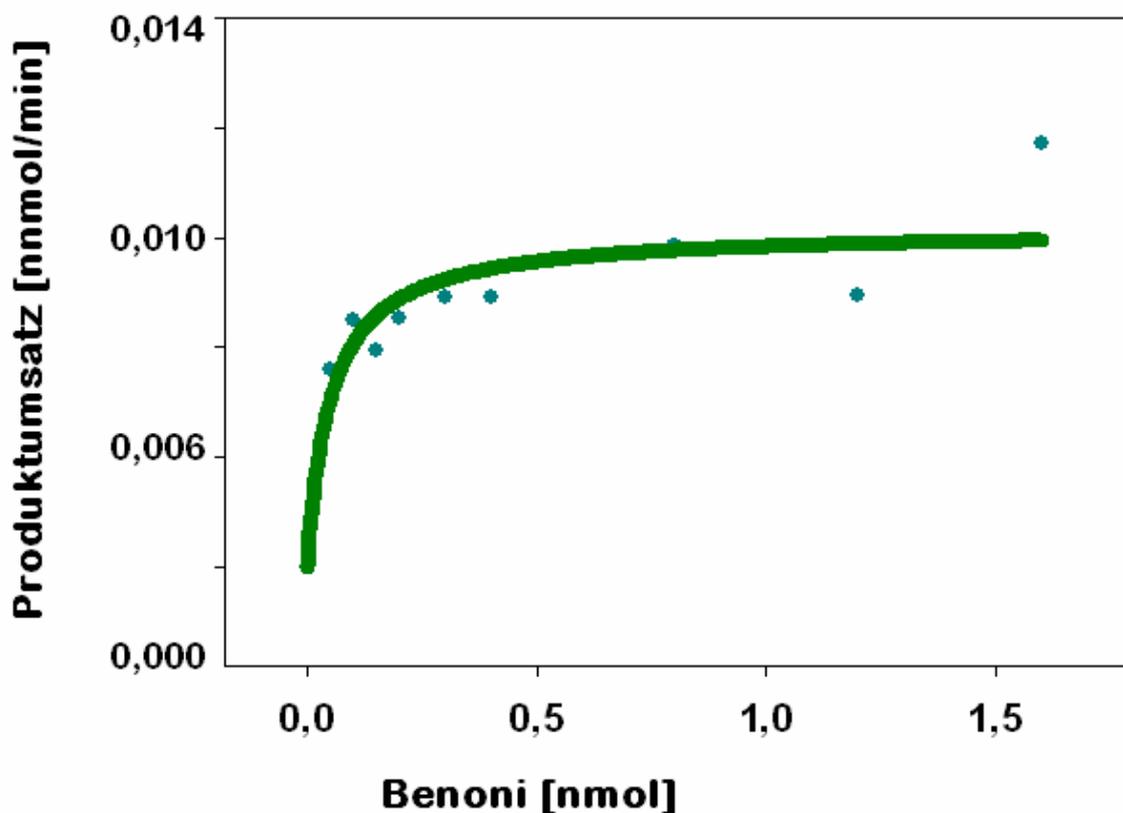
**Abbildung 49:** ESR-Spektren von Benoni

(1) Spektrum der oxidierten Probe, (2/2a) Spektrum der reduzierten Probe und (3/3a) Simulation der reduzierten Probe bei unterschiedlichen Leistungen. Simulationsparameter: FeS:  $g_1=2.0245$ ,  $g_2=1.9371$ ,  $g_3=1.9338$  mit gauss. Linienbreiten von 11, 21, 19 G (1.1, 2.1, 1.9 mT); org. Rad.:  $g=2.0052$  (isotrop) und LBs von 10 G (1 mT).

Es konnte in diesem Experiment gezeigt werden, dass Benoni zur Gruppe der 2Fe-2S Ferredoxine gehört.

#### 4.4.5 Aktivitätsanalyse mittels *in vitro* Rekonstitution

Um zu überprüfen, ob Benoni in der Lage ist, Adx *in vitro* funktionell zu ersetzen, wurde ein CYP11A1-Substratumsatz-Test durchgeführt. Anstelle von Adx wurde gereinigtes Benoni eingesetzt. Beim Test zum CYP11A1-abhängigen Substratumsatz wird Cholesterin von CYP11A1 zu Pregnenolon umgesetzt. *In vivo* werden dabei die für diese Reaktion benötigten Elektronen von NADPH bereitgestellt und über AdR und Adx auf das Cytochrom P450 übertragen. Auch *in vitro* kann eine Substratumsatzung erfolgen, sofern eine vollständige Elektronenübertragungskette vorhanden ist. Ersetzt man also bovines Adx durch Benoni, so eignet sich dieser Test zur Untersuchung der vermuteten Interaktion von Benoni mit der AdR.



**Abbildung 50:** CYP11A1-Substratumsatzs-Test

Die Substratumsatzung von Cholesterin zu Pregnenolon kann *in vitro* rekonstituiert werden, sofern eine vollständige Elektronenübertragungskette vorhanden ist.

Die Ergebnisse des CYP11A1-Substratumsatzungs-Testes (Abbildung 50) bestätigten, dass eine funktionelle Elektronentransferkette vorliegt und Benoni in der Lage ist, Reduktionsäquivalente von NADPH aufzunehmen, wodurch es Adx funktionell ersetzt. Weiterhin konnte der  $K_M$ - und  $v_{max}$ -Wert von Benoni bestimmt werden. Der  $K_M$ -Wert gibt die Substratkonzentration an, bei der die halb-maximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht wird und stellt eine charakteristische Größe eines Enzyms und des von ihm umgesetzten Substrates dar. Er gibt einen Hinweis auf die Affinität des Substrates, d.h., geringe  $K_M$ -Werte kennzeichnen eine hohe Affinität. Weiterhin existiert in der Enzymkinetik das

Phänomen der Sättigung: bei sehr hohen Substratkonzentrationen kann die Umsatzgeschwindigkeit  $v$  nicht weiter gesteigert werden, d.h., es wird ein Wert  $v_{\max}$  erreicht.

**Tabelle 13:** Kinetische Konstanten von Benoni im Vergleich mit bovinem Adx

Adrenodoxin	$K_M$ [nM]	$V_{\max}$ [nmol Pregnenolon prod./min/nmol CYP11A1]	Katalytische Effizienz $V_{\max} / K_M$
Bovines Adx	$0,121 \pm 0,021$	$0,052 \pm 0,002$	0,430
Benoni	$0,027 \pm 0,009$	$0,008 \pm 0,001$	0,296

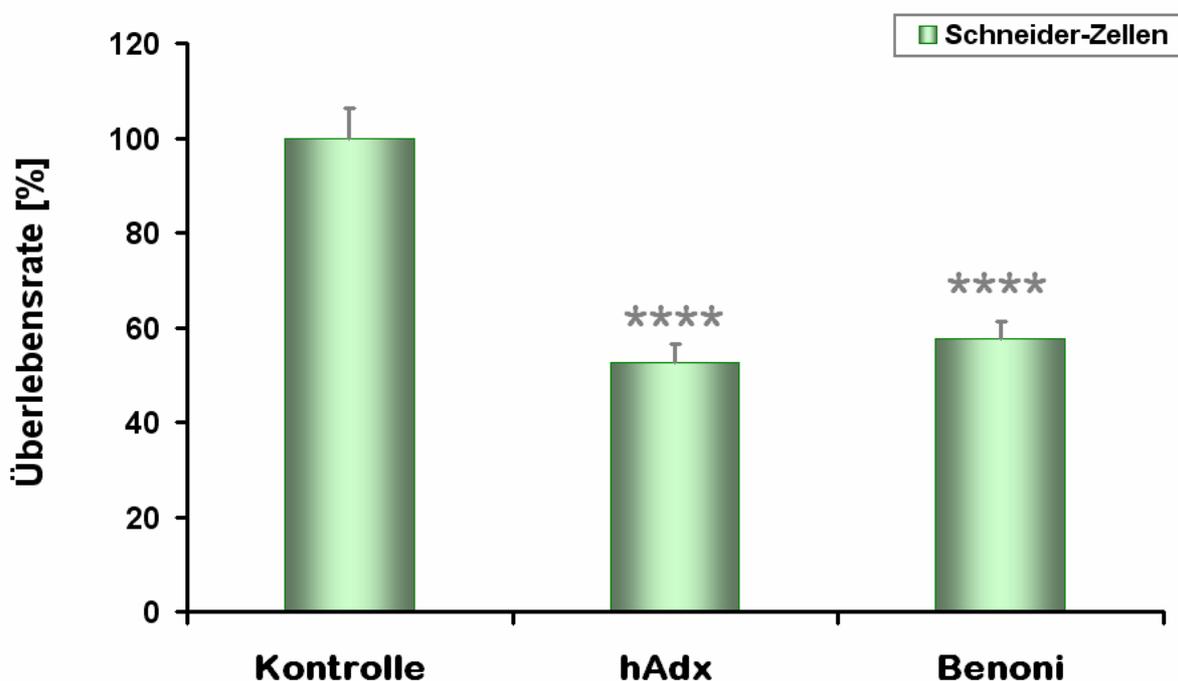
In Tabelle 13 sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente  $\pm$  STABWN dargestellt. Die ermittelten  $K_M$ - und  $v_{\max}$ -Werte für Benoni und bAdx zeigen, dass Benoni zwar in der Lage ist die Elektronentransportkette zu komplementieren, allerdings mit einer geringeren katalytischen Effizienz wie bAdx.

Durch Vergleich der experimentell ermittelten  $K_M$ - und  $v_{\max}$ -Werte für Benoni und bAdx wird klar, dass Benoni zwar in der Lage ist die Elektronentransportkette zu komplementieren, allerdings zeigt Adrenodoxin eine deutlich höhere katalytische Effizienz. D.h., Adrenodoxin bedingt mit einer höheren Effektivität die Bildung von Pregnenolon. Mittels der bisherigen Experimente konnte belegt werden, dass es sich bei Benoni um ein 2Fe-2S-Protein handelt, welches in der Lage ist, bovinen Adx funktionell zu ersetzen, wenn auch mit geringerer Effizienz. Daher sollte nun in weiteren Versuchen herausgefunden werden, ob Benoni auch *in vivo* ROS produzieren und damit Apoptose auszulösen kann.

#### 4.4.6 Benoni und Apoptose

##### 4.4.6.1 Einfluß der Überexpression von Benoni auf die Überlebensrate von Insektenzellen

Um zunächst den Einfluß einer Überexpression von Benoni auf die Überlebensrate von Insektenzellen zu untersuchen, wurden Schneider-Zellen transient mit pEGFPc1 und pSVL (leerer Vektor: mock) oder einem Expressionsplasmid für Benoni transfiziert. Die Anzahl der GFP-exprimierenden, überlebenden Zellen wurde 24 Stunden nach Transfektion mittels FACS bestimmt und mit der Anzahl der überlebenden, mock-transfizierten Zellen verglichen.

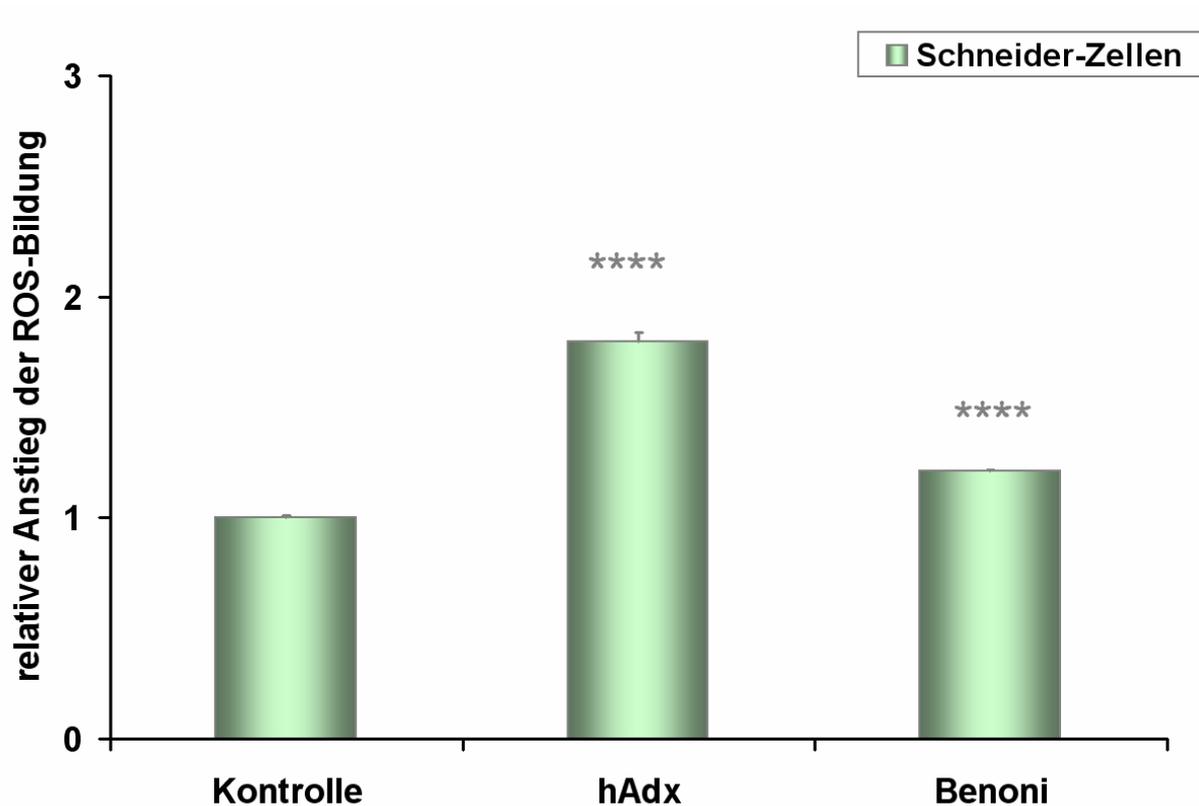


**Abbildung 51:** Effekt von transient transfiziertem Benoni auf die Zellüberlebensrate von Schneider-Zellen. Alle Zellen wurden mit pEGFPc1 und entweder leerem Vektor (Kontrolle) oder einem Expressionsplasmid für hAdx oder Benoni transfiziert. Die GFP-Fluoreszenz wurde 24 Stunden nach Transfektion mittels FACS bestimmt. Dargestellte Daten: Mittelwerte dreier Messungen (mit jeweils Dreifachwerten)  $\pm$  STABWN; t-test: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ , \*\*\*\* $p < 0.001$  verglichen mit Kontrollzellen.

Es wurde festgestellt, dass sowohl die Überexpression von humanem Adx als auch von Benoni zu einem signifikanten Einbruch der Überlebensrate in der getesteten Zelllinie führte (Abbildung 51). Die Anzahl der überlebenden Zellen verringerte sich um annähernd 50 %.

#### 4.4.6.2 ROS-Bildung durch Überexpression von Benoni

Um herauszufinden, ob Benoni *in vivo* ROS produzieren kann, wurde die Umwandlung von Dihydroethidium (DHE) zu Ethidium 24 Stunden nach transienter Expression mit entweder dem Benoni-Plasmid oder humanem Adx (Positivkontrolle) in Schneider-Zellen mittels FACS bestimmt (Abbildung 52).



**Abbildung 52: Benoni-induzierte ROS-Bildung**

Schneider-Zellen wurden mit entweder 1 µg Benoni oder hAdx transient transfiziert und der relative Anstieg der ROS-Bildung mittels DHE-Konversion nach 24 Stunden durchflußzytometrisch bestimmt. Dargestellte Daten: Mittelwerte dreier Messungen (mit jeweils Dreifachwerten) ± STABWN; t-test: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005, \*\*\*\*p<0.001 verglichen mit der Kontrolle. Es konnte ein Anstieg der ROS-Produktion in beiden Fällen festgestellt werden.

Die Überexpression von Benoni führte in dieser Zelllinie zu einem signifikanten Anstieg der Ethidiumkonzentration, was mit einer zunehmenden ROS-Produktion *in vivo* korreliert. Allerdings war dieser Effekt wesentlich geringer, als er durch humanes Adx ausgelöst wurde.

## 5. DISKUSSION

### 5.1 Adx und CYP11A1 (P450<sub>sc</sub>) induzieren Apoptose durch Bildung mitochondrialer ROS

Eukaryotische Cytochrome P450 können abhängig von ihrer subzellulären Lokalisation in zwei übergeordnete Gruppen unterteilt werden, nämlich mikrosomale und mitochondriale P450s (Einleitung 2.2.3.1). Beide verwenden NADPH als Elektronendonator für Monooxygenierungen. Die unterschiedlichen P450-Enzyme sind weiterhin von bestimmten Transferproteinen zur Elektronenübertragung abhängig. Im Falle der mikrosomalen P450s handelt es sich um eine Reduktase sowie im Fall der mitochondrialen P450s um AdR zusammen mit Adx (Bernhardt, 1996). Die Funktion eines löslichen Elektronentransportproteins zwischen der NADPH-abhängigen AdR und mehreren mitochondrialen P450s macht Adx zu einem der wichtigsten Bestandteile der Steroidbiosynthese in den adrenalen Mitochondrien von Vertebraten. Adx überträgt Elektronen zum Cytochrom P450<sub>sc</sub> (CYP11A1), welches wiederum die Seitenkettenabspaltung von Cholesterol katalysiert (Bird & Conley, 2002). Ausserdem transferiert es Elektronen zu den Cytochromen der CYP11B Familie, die an der Bildung von Cortisol und Aldosteron beteiligt sind (Bureik *et al.*, 2002). Adx liefert zuletzt sogar Elektronen für die mitochondrialen P450s die am Vitamin D-Metabolismus beteiligt sind (Miller & Portale, 2002). Bis heute kennt man drei unterschiedliche mRNAs von humanem Adx, die sich lediglich in der Länge ihrer 3'-untranslatierten Region unterscheiden (Picado-Leonard *et al.*, 1988) und die von zwei Genen (Chang *et al.*, 1988; Chang *et al.*, 1990) auf dem Chromosom 11q22 (Morel *et al.*, 1988; Sparkes *et al.*, 1991) codiert werden. Sie werden in allen bislang untersuchten Geweben exprimiert (Picado-Leonard *et al.*, 1988). Die Translation der Adx mRNA liefert Präadrenodoxin, welches durch endoproteolytische Spaltung beim Transport in die Mitochondrien prozessiert wird (Matocha & Waterman, 1984). Die strukturelle Aufklärung dieser verkürzten bovinen Adx-Mutante (Muller *et al.*, 1998) im Vergleich zu dem Vollängenkonstrukt von bovinem Wildtyp-Adx (Pikuleva *et al.*, 2000) lieferte bedeutende Hinweise, um die Beziehung zwischen Struktur und Funktion dieses Proteins besser verstehen zu können. Kürzliche Untersuchungen wiesen darauf hin, dass AdR eine Rolle bei der Auslösung von Apoptose spielen könnte (Hwang *et al.*, 2001; Liu & Chen, 2002).

Im Zusammenhang mit dem programmierten Zelltod wird die Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) genannt. Diese tragen zur Auslösung der apoptotischen Signalkaskade bei (Buccellato *et al.*, 2004; Saran *et al.*, 2000). Prinzipiell kann daher die mitochondriale Bildung von ROS Apoptose auslösen, was bereits am Beispiel der Atmungskette gezeigt wurde (Turrens, 2003). Dennoch gibt es keinen experimentellen Hinweis darauf, dass AdR selbst in der Lage ist, *in vitro* (Hanukoglu *et al.*, 1993) oder *in vivo* (Hwang *et al.*, 2001; Liu & Chen, 2002) ROS zu produzieren. Im Gegensatz dazu wurde sowohl für Adx als auch für das mitochondriale P450 CYP11A1 (P450<sub>sc</sub>) gezeigt, dass beide unter bestimmten Bedingungen ROS *in vitro* zu bilden können. Diese Ergebnisse wurden allerdings nie im zellulären Kontext bestätigt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Adx oder CYP11A1 mittels Bildung mitochondrialer ROS Apoptose *in vivo* auslösen.

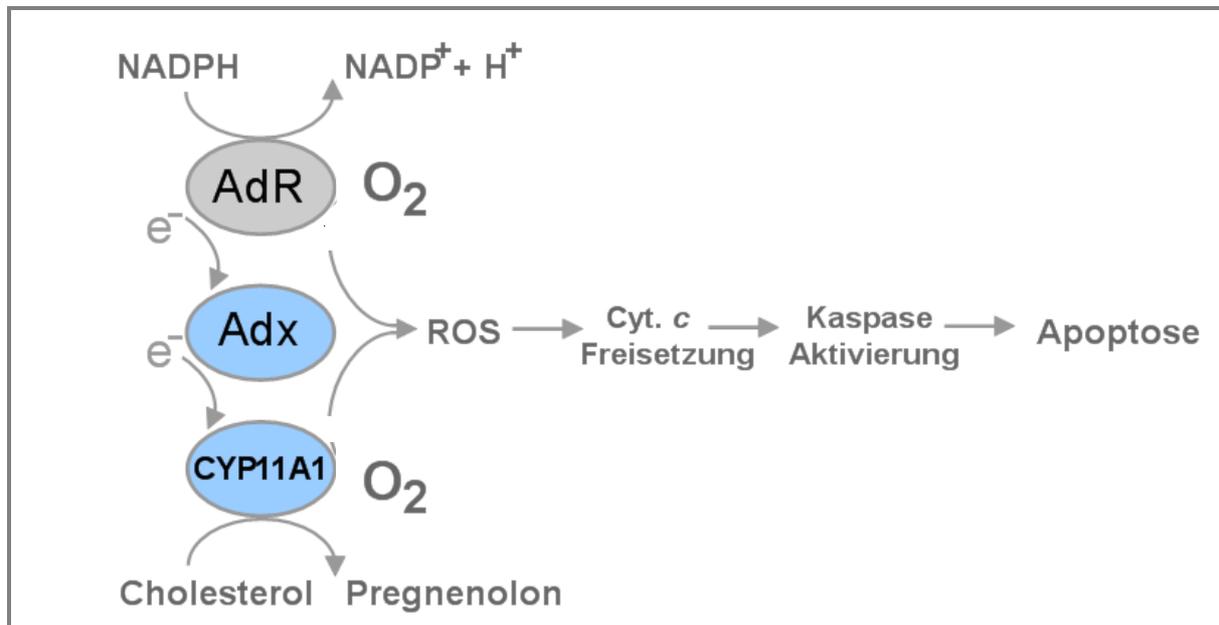
Es wurde zunächst gezeigt, dass die Überexpression von sowohl humanem als auch bovinem Adx zu einem signifikanten Einbruch der Überlebensrate in allen elf gestesteten Säugerzelllinien führte (Abbildung 11). In zehn von elf Fällen zeigte humanes Adx einen

stärkeren Einfluß auf die Zellen als sein bovines Pendant, wobei die Ursache für dieses unterschiedliche Verhalten der beiden eng verwandten Ferredoxinen unklar bleibt. Auch reagierten manche Zelllinien sensitiver auf Adx-Überexpression als andere. Dabei ist zu jedoch anzumerken, dass keine Zelllinie unbeeinflusst blieb. Diese Tatsache bestätigte, dass Adx-Überexpression zu einer reduzierten Zellviabilität in unterschiedlichen Zelltypen führt. In HCT116-Zellen führte die Überexpression von Adx-WT zur Bildung von ROS (Tabelle 8; Abbildung 12) und damit zu einem Verlust der Zellviabilität. Zellen die mit einem „ROS-Fänger“ behandelt wurden, zeigten normales Wachstum (Tabelle 9; Abbildung 12). Zellen die eine Cluster-defiziente Mutante (Adx-Ser46) von Adx exprimierten, zeigten ebenfalls normales Wachstum. Diese Mutante ist nicht mehr in der Lage Holo-Adx zu bilden, wodurch das Protein seine Funktion als Elektronentransporter verliert. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Überexpression von Adx in HCT116-Zellen zu einem Zusammenbruch des Transmembranpotentials der Mitochondrien ( $\Delta\psi$ ) (Abbildung 13) und damit zur Caspaseaktivierung (Abbildung 14) und zu einem Austritt von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytoplasma führt (Abbildung 15a). Diese Ergebnisse stellen dar, dass Überexpression von Adx Apoptose auszulöst und dass diese durch Adx-induzierte Apoptose über einen mitochondrialen Signalweg stattfindet.

Die Überexpression von humanem CYP11A1 zeigte im Gegensatz zu seinem Redoxpartner Adx unterschiedliche Effekte auf die untersuchten elf Zelllinien (Abbildung 11). In vier Zelllinien war eine Zunahme, in ebenfalls vier Zelllinien eine Abnahme der Zellviabilität festzustellen und in weiteren drei Zelllinien zeigte sich kein Einfluß durch Überexpression von CYP11A1. Interessanterweise waren die beiden Glioblastomzelllinien U373-MG (human) und rat C6 (Ratte) am sensitivsten gegenüber CYP11A1-Überexpression. Wie bereits für Adx dargestellt, konnte auch hier nach Zugabe eines „ROS-Fängers“ kein solcher Effekt mehr nachgewiesen werden (Abbildung 12). In U373-MG-Zellen führte die Überexpression von CYP11A1 zu einem  $\Delta\psi$ -Zusammenbruch (Abbildung 13), Caspaseaktivierung (Abbildung 14) und Freisetzung von Cytochrom c (Abbildung 15a). Somit ist CYP11A1 zwar in einigen Zelllinien in der Lage, Apoptose über den mitochondrialen Signalweg auszulösen, jedoch nicht generell. Der Grund für diese Gewebsspezifität ist zum jetzigen Zeitpunkt unklar. Es ist von *in vitro* Untersuchungen bekannt, dass AdR in der Abwesenheit von Adx keine Elektronen auf molekularen Sauerstoff überträgt. Bei Zugabe von CYP11A1 zum System kann die Oxidationsrate von NADPH jedoch über die normale Oxidationsrate hinaus unter alleiniger Anwesenheit AdR und Adx gesteigert werden. In Anwesenheit von Cholesterol werden die Elektronen zur NADPH-Oxidation gänzlich durch den Cholesterolmetabolismus bezogen (Hanukoglu *et al.*, 1993). Demnach könnte auch die Gewebsspezifität der durch CYP11A1 induzierten Apoptose erklärt werden. Die Verfügbarkeit des mitochondrialen Cholesterol differiert in unterschiedlichen Geweben. Auf diesem Gebiet sollten weitere Untersuchungen erfolgen. Außerdem könnte in diesem Kontext interessant sein, ob die Überexpression von anderen mitochondrialen P450s ebenfalls Apoptose induzieren kann und wenn das der Fall ist, ob diese Effekte ebenfalls gewebsspezifisch sind.

Auf Grundlage der bereits bekannten Daten und der in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse wurde ein Model für die durch das mitochondriale CYP11A1-System induzierte Apoptose entworfen. In diesem Model ist der bereits bekannte Elektronen-Signalweg von NADPH über AdR und Adx zu CYP11A1 verbunden mit einem Signalweg, der von Sauerstoff zu der Bildung von ROS führt und dadurch Apoptose auslöst (Abbildung 53). Wie bereits dargelegt, wird die Bildung von ROS aus Sauerstoff *in vitro* durch reduziertes Adx und reduziertes CYP11A1 (unter einem niedrigen Cholesterollevel), jedoch nicht durch reduziertes AdR hervorgerufen (Hwang *et al.*, 2001). Dementsprechend konnte sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch durch andere

Arbeitsgruppen (Hwang *et al.*, 2001; Liu & Chen, 2002) kein Einbruch der Zellviabilität nach stabiler oder transients Überexpression von AdR festgestellt werden.



**Abbildung 53:** Vorgeschlagener Mechanismus zur mitochondrialen ROS-Produktion mit Auslösung von Apoptose

In den Transfektionsstudien der vorliegenden Arbeit führte das Vorhandensein von NADPH, Sauerstoff und AdR (als ubiquitär exprimiertes Protein in den Mitochondrien aller Zellen) teilweise zu einer Reduktion des überexprimierten Adx. Dadurch wurden ROS gebildet. ROS-Bildner können hierbei Adx oder CYP11A1 sein. Die Produktion mitochondrialer ROS begünstigt das Zusammenbrechen des elektrochemischen Gradienten innerhalb der Mitochondrienmembran. Das führt zum Kollabieren des Membranpotentials ( $\Delta\psi$ ), gefolgt vom Austritt von Cytochrom c aus den Mitochondrien und damit verbunden zur Aktivierung von Caspase-9. Das Modell wird unterstützt durch den Befund, dass die Überexpression der Adx-Apomutante (Adx-46Ser), die nicht mehr in der Lage ist den [2Fe-2S]-Cluster einzubauen und damit unfähig zur Redoxaktivität ist, keine Apoptose auslösen kann.

Es wurde vor kurzem gezeigt, dass die Redoxaktivität von Adx für die ROS-Produktion *in vitro* erforderlich ist (Hanukoglu, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde dargestellt, dass die Redoxaktivität von Adx für die ROS-Produktion *in vivo* ebenfalls erforderlich ist. AdR-mRNS wurde in allen untersuchten Geweben gefunden (Brentano *et al.*, 1992), was nahe legt, dass die basale Expression von AdR in allen getesteten Zelllinien ausreichend hoch ist, um die Reduktion von Adx zu gewährleisten, die für die ROS-Bildung erforderlich ist. Daher muss die AdR-Expression der Zellen nicht zusätzlich extern durch z. B. Behandlung mit 5-FU stimuliert werden, um die Adx-induzierte Apoptose auszulösen.

Antioxidativen Vitaminen könnte in steroidogenen Geweben eine entscheidende Rolle als Fänger für die von den P450-Systemen generierten Radikalen zukommen (Hanukoglu *et al.*, 1993). In früheren Studien wurde bereits ein Model vorgestellt, welches nahe legt, dass z. B. die Synthese der Steroidhormone in Abhängigkeit vom Ascorbinsäurelevel in Geweben abnimmt (Laney *et al.*, 1990; Riley & Behrman, 1991). Ausserdem zeigten Studien, dass die Konzentration an Ascorbinsäure im adrenalen Kortex am höchsten ist

(Hanukoglu *et al.*, 1990a; Hornig, 1975). Im Gegensatz dazu zeigt sich in den fötalen Eierstöcken keine steroidogene Expression und keine Expression von CYP11A1 (Voutilainen & Miller, 1986), wodurch folglich ein Überschuss an AdR (Brentano *et al.*, 1992) und Adx (Voutilainen *et al.*, 1988) mRNA vorliegt. Die Beobachtung, dass die Mehrzahl der in den fötalen Eierstöcken vorhandenen Eizellen vor der Geburt durch Apoptose bereits aufgebraucht wurden (Vaskivuo *et al.*, 2001), könnte auf eine apoptotische Funktion von AdR und Adx in diesen Zellen hindeuten.

Nach Überexpression von Adx in HCT116 oder CYP11A1 in U373-MG-Zellen konnte eine geringfügige Stabilisierung des Tumorsuppressorgen p53 und eine starke Induktion des CDK Inhibitors p21 festgestellt werden (Abbildung 15b + 15c).

ROS sind nur eine der unzähligen bedeutenden Komponenten des apoptotischen Zellsterbens. Sie können innerhalb der Zellen an unterschiedlichen Orten generiert werden und sind meist gesundheitsschädlich für den Organismus bzw. toxisch für die Zelle selbst. In den letzten Jahren wurde in vielfältigen Studien dargestellt, dass ROS unter pathologischen Bedingungen ein breites Spektrum an Oxidationsreaktionen katalysieren können. Es wurde bereits gezeigt dass ROS innerhalb der Atmungskette sowie durch die mikrosomalen P450 Enzyme generiert werden können (Kuthan *et al.*, 1978; Nordblom & Coon, 1977); von letzteren scheint CYP2E1 eine besondere Bedeutung zuzukommen (Dai *et al.*, 1993; Ekstrom & Ingelman-Sundberg, 1989; Liu & Baliga, 2003). Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass das mitochondriale P450-System ebenfalls in der Lage ist ROS zu bilden. Sie spielen eine entscheidende Rolle in der Induktion des mitochondrialen Signalweges der Apoptose. Es zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht klar, ob die durch das mitochondriale P450-System ausgelöste Apoptose ein Phänomen ist, das lediglich auf einige Zelltypen unter bestimmten physiologischen Bedingungen beschränkt ist, oder ob es sich hierbei um eine Art „mitochondrial-vermittelte“ Apoptose im Allgemeinen handelt. Die ubiquitäre Expression von AdR und Adx scheint letztere Annahme zu bestärken. Klärung dieser noch offenen Fragen könnte einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis des mitochondrialen Elektronentransfers hinsichtlich der Apoptose-induktion leisten.

## 5.2 Der Adx-Promotor als schwacher Promotor

Nachdem gezeigt wurde, dass sowohl humanes als auch bovines Adx in der Lage sind, Zelltod in unterschiedlichen Zelllinien auszulösen, unabhängig von deren p53-Status, sollte die Expression von Adx nach Auslösung der Apoptose in Kolonkarzinomzellen untersucht werden. Menschliche Kolonkarzinomzellen sind ein sehr gut charakterisiertes Zellsystem, das sich für diese Untersuchungen eignet, da neben der HCT116(WT)-Zelllinie auch Zellen mit einem stabilen Genom, in denen beide Allele des p53-Gens (bzw. des p21-Gens) durch homologe Rekombination inaktiviert wurden, existieren (Kaeser *et al.*, 2004). Zur funktionellen Analyse des Adx-Promotors *in vivo* dienten Reporter-gen-Assays. Das Reporter-gen-Konstrukt enthielt dabei ein zu analysierendes 2,5 kb große Promotor-DNS-Fragment des Adx-Gens und nachgeschaltet das Gen des grünen fluoreszierenden Proteins (GFP), dessen Bildung mittels Durchflußzytometrie quantifiziert werden konnte (Abbildung 16b). Auf diese Weise sollte sich die Aktivität des Promotors bestimmt werden.

Zunächst wurden unter Verwendung verschiedener Apoptose-stimulierender Reagenzien Bedingungen gesucht, die eine Änderung der Aktivität des Promotors erwirkten

(Abbildung 18). Ein solches Reagenz ist beispielsweise 5-FU aus der Gruppe der Zytostatika, welches seit Jahrzehnten klinisch verwendet wird (Heidelberger, 1965; Schull & Scheithauer, 2002). Es blockiert das Enzym Thymidylsynthase, indem es die Synthese von RNA und DNA inhibiert. Bei 3-5% der Behandelten treten jedoch schwere, z.T. tödliche Nebenwirkungen auf, die mit einem kompletten oder partiellen Verlust des für die metabolische Inaktivierung von 5-FU verantwortlichen Enzyms Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) in Zusammenhang gebracht werden (Fuwa *et al.*, 2002; Stanford *et al.*, 1976; Stanford *et al.*, 1977). Da eine grundlegende Resistenz gegenüber 5-FU induzierter Apoptose in HCT116-Zellen mit einer zielgerichteten Ausschaltung des p53-Gens gefunden wurde (Hwang *et al.*, 2001), eignete sich die Behandlung der Zellen mit 5-FU besonders, um Unterschiede der Promotoraktivität herauszustellen, die mit dem Vorhandensein des p53-Gens in Verbindung stehen. Als weiteres Reagenz wurde Staurosporin (Bureik *et al.*, 2005; Meidan *et al.*, 1992), sowie dbcAMP (Funkenstein *et al.*, 1983; Kramer *et al.*, 1984) verwendet. Der Naturstoff Staurosporin ist ein wirkungsvoller Inhibitor der Klasse der Adenosintriphosphat (ATP) abhängigen Protein-Kinasen, denn er passt genau in die ATP-Bindetasche dieser Enzyme. Staurosporin wurde bereits in den verschiedensten Zellkultursystemen als Induktor des intrinsischen Weges der klassischen Apoptose eingesetzt (Leist & Jaattela, 2001). Auf diese Weise konnten Veränderungen in der Adx-Expression unter sehr unterschiedlichen Bedingungen detektiert werden, wobei die Gemeinsamkeit der Experimente immer in der Auslösung von Apoptose lag.

Die Analyse der Aktivität des humanen Adx Promotors in HCT116, HCT116(p53<sup>-/-</sup>) und HCT116(p21<sup>-/-</sup>) Zellen zeigte keine Notwendigkeit eines funktionellen p53-Gens für die basale Adx-Aktivität oder für die Induktion des PKA-Signalweges. Der geringfügige Anstieg der Promotoraktivität nach Behandlung der Zellen mit 5-FU (das in der Lage ist p53 in HCT116-Zellen zu aktivieren) war in HCT116(p53<sup>-/-</sup>)-Zellen stärker ausgeprägt als in Wildtyp HCT116-Zellen (Abbildung 20-22). Es konnte daher kein Hinweis für eine Transkriptionsregulation von Adx durch p53 unter den beschriebenen Bedingungen gefunden werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den von Hwang *et al.* gefundenen Ergebnissen (Hwang *et al.*, 2001). Außerdem ist die Anwesenheit eines intakten p53-Gens für die durch Adx-induzierte Apoptose nicht notwendig, wie am Beispiel des Zellüberlebensassay in HCT116(p53<sup>-/-</sup>) dargestellt wurde (Abbildung 11). Diese Ergebnisse liefern ebenfalls keinen Hinweis auf das Vorhandensein eines positiven *feed-forward-loops* zwischen Adx und p53 während der Auslösung der Apoptose.

Nachdem die Bedingungen gefunden worden waren, unter denen eine Änderung der Adx-Expression auftrat, sollten die für diesen Effekt verantwortlichen Bereiche des Adx-Promotors identifiziert werden. Hierzu wurde eine sog. Deletionsanalyse durchgeführt. Dazu wurden die durch schrittweise (zunächst grobmaschige) Verkürzung des Adx-Promotors (Abbildung 19) erhaltenen Fragmente in das Reportersystem pGLOW kloniert. Dann erfolgte die Transfektion der Zellen mit diesen verkürzten Konstrukten und Inkubation unter den gefundenen Apoptose-induzierenden Bedingungen. Anschliessend wurde die Promotoraktivität durchflußzytometrisch bestimmt. So sollte festgestellt werden, ob die Deletion einer bestimmten Region des Promotors zu einer veränderten Adx-Expression führte. In allen getesteten Zellen konnte selbst unter dem Einfluß der unterschiedlichen Reagenzien keine Änderung der Promotoraktivität zwischen den Zellen der Kontrollgruppe und dem sequenzierten Vollängenkonstrukt pEDH1 bzw. dem bereits erheblich verkürzten 500 bp Fragment pEDH1(500) ermittelt werden (Abbildungen 20-22). Daher wurde mittels Durchmusterung der SAGEmap-Datenbank überprüft, ob neue Daten zum Expressionslevel von Adx erhalten worden waren (Abhilasha & Krishna, 1998; el-Deiry *et al.*, 1994; Hellal-Levy *et al.*, 1999): SAGEmap: a public gene expression resource. *Genome Res.* 10: 1051-1060). Diese Datenbank enthält die Ergebnisse von

SAGE-Experimenten (el-Deiry *et al.*, 1994) verschiedener Zelllinien. Mit Hilfe dieser Datenbank wurde ermittelt, dass der basale Adx-Level in den verwendeten Kolonkarzinomzellen nur äußerst gering ist. Der Vergleich unterschiedlicher Zelllinien zeigte, dass lediglich die Brustkrebszelllinie MCF-7 eine vergleichsweise hohe Adx-Expression zeigte (Abbildung 23 und Tabelle 10). Dennoch konnte auch in dieser Zelllinie keine signifikante Änderung der Fluoreszenzintensität für den Promotor oder das verkürzte Promoterfragment im Vergleich zu der Kontrolle ermittelt werden (Abbildung 24).

Offensichtlich handelt es sich bei dem Adx-Promotor unter den hier getesteten Bedingungen um einen sehr schwachen Promotor. Es müsste daher eine andere Methode etabliert werden, um auch kleinste Aktivitätsänderungen des Promotors nachweisen zu können. Allerdings gab es keine experimentellen Hinweise auf eine Veränderung der Adx-Expression im Verlauf der Apoptose, insofern ist es fraglich, ob für die hier bearbeitete Fragestellung der Aufwand einer Adx-Promotoranalyse lohnenswert ist. Die Verwendung von Reporterassays zur durchflußzytometrischen Analyse in der Zellkultur stellen jedenfalls kein geeignetes System dar, um die Promotoraktivität *in vivo* nachzuweisen. Es sollte für weitere Reporterstudien auch die bei Zellkulturexperimenten auftretenden relativ großen Standardabweichungen berücksichtigt werden..

Ist eine geeignete Methode gefunden, so bestünde der nächste Schritt in der Identifikation eines oder mehrerer Transkriptionsfaktoren, die an die zuvor isolierten Adx-Promotorregionen binden. Diese Transkriptionsfaktoren könnten dann entweder mit bereits bekannten Erkennungssequenzen von Transkriptionsfaktoren verglichen werden oder, falls keine Übereinstimmung zu finden ist, könnte die Identifizierung der relevanten Transkriptionsfaktoren, z. B. mittels Elektrophoretische-Mobilitätsshift-Assays (EMSA), durchgeführt werden.

### 5.3 Mitochondriale ROS lösen keine Apoptose in *S. pombe* aus

Es wurde bereits gezeigt, dass mitochondriale Cytochrome P450 eine mögliche Quelle für die mitochondriale ROS-Bildung darstellen und dass sowohl die Überexpression von humanem als auch von bovinem Adx ausreichend ist, um ROS-induziertes Zellsterben in unterschiedlichen Säugerzellen auszulösen (Derouet-Humbert *et al.*, 2005). In sterbenden Hefezellen werde ebenfalls ROS als Antwort auf eine Vielzahl externer und interner Stimuli gebildet (Rodriguez-Menocal & D'Urso, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Effekte einer Adx-Überexpression auf die Spalthefe *S. pombe* untersucht und hinsichtlich der Ergebnisse der Adx-induzierten Apoptose in Säugerzellen verglichen. Die Überexpression von sowohl WT- als auch unterschiedlicher Adx-Mutanten zeigte weder einen veränderten Phänotyp der Hefezellen (Abbildung 25) noch Auswirkungen auf die Generationszeit der untersuchten Stämme (Tabelle 11). Die gleichzeitige Überexpression von sowohl Adx und AdR als auch dieser Proteine zusammen mit einem Cytochrom P450 führte zu einer verlangsamten Generationszeit (Tabelle 11), allerdings ohne Auswirkungen auf den Phänotyp. In den Hefestämmen, die entweder die aktivierte Mutante Adx-D113Y oder Adx<sup>1-108</sup> exprimierten, konnte eine signifikante Zunahme der mitochondrialen ROS-Bildung festgestellt werden (Abbildung 29). Es bleibt jedoch unklar, warum die ebenfalls aktivierte Adx-S112W sowie der WT-Adx keine Zunahme der ROS-Produktion bewirken. Mittels NAC konnte diese ROS-Bildung unterbunden werden, die ebenfalls getesteten „ROS-Fänger“ DIDS, MnTBAP und Tiron

zeigten in den für Säugerzellen eingesetzten Standardkonzentrationen diese Wirkung nicht (Abbildung 30).

Obwohl die Expression von Adx<sup>1-108</sup> in CAD48 eine annähernd vierfach gesteigerte Radikalbildung im Vergleich zum Background zeigt, ist kein Zellsterben festzustellen. Diese Tatsache konnte sowohl mittels TUNEL-Assay als auch Annexin-V-staining belegt werden (Abbildung 31 und Tabelle 12). Zum Vergleich: Nach transienter Transfektion von humanem Adx-WT in die Zelllinie HCT116(p53<sup>-/-</sup>) stieg die mitochondriale ROS-Produktion lediglich 1.6fach über den Background, was jedoch zu einer massiven Abnahme der Zellviabilität (50 %) führte (Derouet-Humbert *et al.*, 2005). Diese Daten lassen annehmen, dass die Spaltheife eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber mitochondrialen Stress im Vergleich zu Säugerzellen aufweist was wiederum auf das Fehlen eines mitochondrial-induzierten Apoptosesignalweg hinweisen könnte. Darüber hinaus ist eben diese Stabilität gegenüber ROS eine weitere Eigenschaft, die die Spaltheife als Modelorganismus zur Untersuchung rekombinanter Expression verschiedener Säugercytochrome P450 für biotechnologische Anwendungen attraktiv macht. Hier sind sowohl die Herstellung von Hydroxysteroiden (Dragan *et al.*, 2005) als auch die Entwicklung von Testsystemen für die Identifikation verschiedener P450 Inhibitoren zu nennen (Bureik *et al.*, 2004; Ehmer *et al.*, 2002).

Es wurde vermutet, dass die Produktion mitochondrialer ROS zu einer Stabilisierung des Tumorsuppressorgen p53 führt, was wiederum in einem p53-vermittelten Zellzyklusarrest und dadurch der Induktion von Apoptose resultiert (Hwang *et al.*, 2001). Obwohl *S. pombe* über kein homologes p53-Gen verfügt, so teilt sie dennoch viele grundlegende Regulationsmechanismen mit Säugerzellen (Ink *et al.*, 1997; Nishitani & Nurse, 1997; Nurse, 1997). Daher wurde ebenfalls untersucht, ob die Bildung mitochondrialer ROS durch die verkürzte Adx-Mutante Adx<sup>1-108</sup> einen Effekt auf die Kontrollpunkte des Zellzyklus zeigt. Bei Kultivierung in Vollmedium (EMM) zeigt der Wildtypstamm in der FACS-Analyse einen breiten Peak mit einer Dominanz an G2-Zellen, wohingegen die Zellen in Stickstoffmangelmedium (LNMM) vermehrt in G1 verblieben (Alfa *et al.*, 1993). Durch die Expression von Adx<sup>1-108</sup> wird die Verteilung der Zellen in Richtung der G1-Phase verändert. Die Anzahl der Zellen in den beiden S-Phase Regionen erschien verringert (Abbildung 33).

Um aufzuklären welchen Einfluß Adx auf die Kontrollpunkte des Zellzyklus ausübt, wurde Adx<sup>1-108</sup> in zwei temperatursensitiven *cdc2*-Mutanten exprimiert. Die Mutante *cdc2.1w* ist unabhängig vom Wee1 Inhibitor (einer Phosphatase). Die *cdc2.3w* Mutante sensitiviert die Zellen gegenüber dem Cdc25-Aktivator (einer Phosphatase). Dies führt in beiden Fällen zu einem verfrühten Eintritt in die Mitose, verfrühter Zellteilung und damit zu insgesamt kleineren Zellen (Wee-Zellen) (Enoch & Nurse, 1990). Die Expression von Adx<sup>1-108</sup> beeinflusste die Temperatursensitivität der beiden *cdc2* Mutanten hierbei nicht (Daten nicht gezeigt). In einem *cdc2.1w* Hintergrund führte die Expression von Adx<sup>1-108</sup> zu einem nahezu kompletten Verlust der G2 Zellen mit einer Verschiebung der Zellen in die S-Phase Region unter normalen Wachstumsbedingungen. In der *cdc2.3w* Mutante erfolgte ebenfalls eine Verschiebung der Zellen in die S-Phase Region, zugleich ließ sich ein Anstieg der G2-Zellen feststellen. Lediglich in EMM-Medium zeigte sich ein Anstieg an apoptotischen Zellen durch die Expression von Adx<sup>1-108</sup> (Abbildung 34). Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass die mitochondriale ROS-Produktion zwar einen Einfluß auf die Zellzykluskontrolle in der Spaltheife haben könnte, jedoch keine Apoptose auslöst. Des Weiteren liegt nahe, dass die Cdc2-Kinase an diesem Kontrollmechanismus beteiligt ist. Die Aufklärung der gegensätzlichen Ergebnissen, die jeweils durch Überexpression von Adx in den beiden *cdc2* Mutanten erhalten wurden, waren jedoch kein Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Um den in Abbildung 53 aufgezeigten möglichen Signalweg der mittels mitochondrialer ROS induzierten Apoptose zu bestätigen, wurde ein weiterer ROS-Assay mit zwei unterschiedlichen Hefestämmen durchgeführt. Es konnte dabei gezeigt werden, dass sowohl der Adx/AdR-exprimierende Stamm MB311 als auch der Adx/AdR/CYP11A1-exprimierende Hefestamm TH75 nicht mehr in der Lage waren, ROS zu produzieren (Abbildung 35). Nach dem vorgeschlagenen Modell sollte bei Fehlen des entsprechenden Cytochrom P450 als Elektronenakzeptor und Vorhandensein von Substrat die Entstehung von ROS gefördert werden. In der Spaltheefe sind jedoch weder Adx-WT noch AdR in der Lage ROS zu produzieren.

## 5.4 Benoni – das Adrenodoxinhomolog aus *D. melanogaster*

Die cDNS-Sequenz des Adx-Homologen Benoni aus *D. melanogaster* wurde durch die Fa. Entelechon synthetisch hergestellt (Anhang 6.4). Für die *in vivo*-Experimente wurde das Protein mit identischer Codonusage, für die Expressionsstudien und funktionelle Charakterisierung Codon-usage optimiert für *E. coli* synthetisiert (Anhang 6.4). Ausgehend von der Aminosäuresequenz von Benoni wurde unter Zuhilfenahme des frei zugänglichen Programms Compute pI/Mw das theoretische Molekulargewicht sowie der theoretische isoelektrische Punkt (IEP) des maturen Proteins errechnet. Für den IEP wurde der Wert 4,44 vorausgesagt, während das berechnete Molekulargewicht mit 17 kDa angegeben wurde.

Die Expression von Benoni lieferte lediglich ca. 1 % der Ausbeute, die für das bovine Adx erreicht werden kann. Im bovinen Adx wird durch die freie Carboxylgruppe am Prolin 108 eine Stabilisierung erreicht, weswegen die verkürzte Form (Aminosäuren 4-108) stabiler exprimiert (Grinberg *et al.*, 2000; Uhlmann *et al.*, 1997). Es könnte daher sinnvoll sein, Benoni ebenfalls zu verkürzen um die Ausbeute zu erhöhen. Für die Expression wurden verschiedene *E. coli* Stämme getestet, wobei das Protein in pLysE-Zellen am stärksten exprimiert (Abbildungen 37-40). Die Zellen wurden bei einer OD<sub>600</sub> von 0,8 mit IPTG induziert und bei 25 °C für 48 Stunden inkubiert (Abbildung 42). Eine Erhöhung der Expressionstemperatur führte zwar zu einer insgesamt stärkeren Expression, jedoch auch zu vermehrter Fremdproteinexpression, welche die Aufreinigung erschwerte (Abbildungen 42-44). Benoni zeigte keine Stabilitätsprobleme, weswegen auf die Zugabe von Ascorbat verzichtet werden konnte (Abbildung 41).

Im SDS-Gel zeigte Benoni neben der vorhergesagten 17 kDa Bande ein teilweise verändertes Laufverhalten, das höhere Molekularmassen vortäuscht, als aus der Aminosäuresequenz abgeleitet werden konnte (Abbildung 37, Spur 5). Dabei handelte es sich wahrscheinlich um Dimer-Bildung, auch wenn deren Vorhandensein in SDS-Gelen umstritten ist. Andere Ferredoxine zeigen ein ähnliches Verhalten (Pueyo & Gomez-Moreno, 1991; Pueyo *et al.*, 1991), und frühere Untersuchungen deuten auf eine Dimerbildung von Adx in wässriger Lösung hin (Jose *et al.*, 2002; Pikuleva *et al.*, 2000).

Bei der Aufkonzentrierung und Reinigung von Benoni wurden lediglich Konzentratoren (Centriprep YM-30 Zentrifugalfiltereinheit) mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa, sowie eine Gelfiltrationssäule verwendet (Abbildung 46). Aufgrund einer deutlichen Rotfärbung des Proteins konnte sichergestellt werden, dass es die intakte Membran der Zentrifugaleinheit trotz eines Molekulargewichtes von nur ca. 17 kDa nicht durchdrang. In einem solchen Fall wäre das Protein in Durchlauf zu erkennen gewesen. Es wurde weiterhin versucht, Benoni mit dem Antikörper gegen bovines Adx nachzuweisen, was

jedoch nicht gelang, da trotz gleicher Menge an aufgetragenem Protein lediglich Adx detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Um Expressionsstudien in verschiedenen Organen von *D. melanogaster* durchführen zu können, müsste demnach ein spezifischer Antikörper hergestellt werden.

Das UV-Vis-Spektrum von Benoni (Abbildung 47) charakterisiert es nicht eindeutig als [2Fe-2S]-Ferredoxin. Im Vergleich zu Adx ist das Maximum bei 414 zu längeren Wellenlängen verschoben, das Maximum bei 454 nm ist nicht vorhanden. Der charakteristische Doppelpeak zwischen 290 und 370 nm zeigt Veränderungen, das Maximum und die Schulter sind im Vergleich zu Adx vertauscht. Auf Zugabe des Reduktionsmittels Natriumdithionit verlor Benoni zwar ebenso wie Adx offensichtlich seinen Cluster und blich aus, es war jedoch nicht möglich, ein UV/Vis-Spektrum des reduzierten Proteins aufzuzeichnen. Das ESR-Spektrum von Benoni zeigte hingegen sowohl im reduzierten als auch im oxidierten Zustand ein ganz typisches, fast axiales Spektrum eines FeS-Clusters. Zusätzlich wurde in der Probe ein organisches Radikal detektiert. Wegen seiner schnelleren Relaxation verlor das FeS-Signal bei niedriger Leistung stärker an Intensität als das organische Radikal.

In diesem Zusammenhang war interessant zu klären, ob es andere Proteine mit einer solchen Cluster-Radikal-Verbindung gibt: Eisen-Schwefel-Cluster nehmen ebenfalls eine Schlüsselrolle bei den mittels S-Adenosylmethionin (SAM) vermittelten Katalyseprozessen ein. Proteine, die zu dieser Klasse von Enzymen gehören, nutzen einen reduzierten [4Fe-4S]-Cluster um ein Elektron zum SAM-Molekül zu transportieren, wodurch die Spaltung zu Methionin und einem Deoxyadenosyl-Radikal erfolgt (Benda *et al.*, 2002; Broderick, 1999; Layer *et al.*, 2002; Ollagnier *et al.*, 1997; Petrovich & Jaffe, 1997). Bei der Biothinsynthese handelt es sich beispielsweise um ein solches (SAM)-abhängiges radikalisiertes Enzym (Benda *et al.*, 2002; Cospers *et al.*, 2003; Cospers *et al.*, 2002a; Cospers *et al.*, 2002b; Cospers *et al.*, 2004). Sie enthält sowohl einen [4Fe-4S]-Cluster, der durch drei Cysteinreste in einer für sie typischen CXXXCXXC-Anordnung koordiniert wird (Sofia *et al.*, 2001), als auch einen [2Fe-2S]-Cluster (Broach & Jarrett, 2006). Proteine wie das aktivierende Enzym Pyruvat-Format-Lyase (PFL) (Krebs *et al.*, 2002), die anaerobe Ribonukleotid-Reduktase (APR) (Agar *et al.*, 2000; Tamarit *et al.*, 1999) und die Lysin 2,3-Aminomutase (LAM) (Chen *et al.*, 2003) gehören ebenfalls zu dieser Familie. Es sollten weitere Untersuchungen der Clusterregion angestrebt werden, da bei den oben genannten Enzymen – im Unterschied zu Benoni – die Entstehung des Radikals erst durch den Eisen-Schwefel-Cluster katalysiert wird.

Die Messung des Redoxpotentials führte zu keinem konkreten Ergebnis, was jedoch auf die Messmethode zurückzuführen war. Diese Messungen müssen demnach mit anderen Methoden wiederholt werden. Eine geeignete Methode stellt die Photoreduktionsmethode mit 5-Deazaflavin als Photoreduktans und Benzylviologen als Farbindikator dar (Hugo *et al.*, 1998). Die Redoxpotentiale der *plant-type* Ferredoxine liegen normalerweise zwischen -310 und -455 mV (Thomson *et al.*, 1977), die der *vertebrate-type* Ferredoxine -235 bis -273 mV deutlich darüber (Grinberg *et al.*, 2000). Benoni nimmt hier vermutlich eine Mittelstellung ein, die jedoch bestätigt werden muss.

Benoni ist offensichtlich in der Lage Reduktionsäquivalente von NADPH aufzunehmen und kann Adx dadurch als Elektronenüberträger zwischen AdR und CYP11A1 funktionell ersetzen. Wie in Abbildung 50 dargestellt, katalysiert es die Umwandlung von Cholesterol zu Pregnenolon mittels CYP11A1. Vergleicht man jedoch die katalytische Effizienz von Benoni mit der von bAdx, so kann festgestellt werden, dass es eine deutlich geringere Substratspezifität zu CYP11A1 zeigt. Dadurch wird etwa ein Drittel weniger Pregnenolon gebildet, als dies unter dem Einsatz von bAdx geschieht.

Es wurde gezeigt, dass sowohl humanes Adx als auch Benoni zu einem signifikanten Einbruch der Überlebensfähigkeit in Schneider-Zellen führte (Abbildung 51). Weiterhin führte die Überexpression von Benoni in diesen Zellen zur Bildung von mitochondrialen ROS (Abbildung 52) und damit zu einem Verlust der Zellviabilität. Allerdings lag der durch humanes Adx verursachte ROS-Level deutlich über dem von Benoni. Diese Ergebnisse zeigen dass die Überexpression von Benoni in der Lage ist Apoptose auszulösen und dass diese durch Benoni-induzierte Apoptose ebenfalls über einen mitochondrialen Signalweg durch Bildung von ROS stattfindet.

Gegenwärtig wird bei unserem Kooperationspartner Prof. Dr. U. Müller (Institut für Zoologie/Physiologie) versucht, mittels der Erzeugung von transgenen Fliegen, welche Benoni überexprimieren, weitere Erkenntnisse über die Eigenschaften dieses neuen Vertreters der Proteinfamilie der Ferredoxine zu erhalten.

---

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- A. Bichet, F.H., M. Rekowski, R. Bernhardt. (2007) A new application of the yeast two-hybrid system in protein engineering.
- Abastado, J.P. (1996) Apoptosis: function and regulation of cell death. *Res Immunol*, 147, 443-456.
- Abhilasha and Krishna, A. (1998) Immunolocalization of cytochrome P450 side chain cleavage, 17-alpha-hydroxylase and aromatase in the ovary of vesperilionid bat (*Scotophilus heathi*) during different phases of ovulatory delay. *Biol Res*, 31, 49-57.
- Afifi, R., Sharf, R., Shtrichman, R. and Kleinberger, T. (2001) Selection of apoptosis-deficient adenovirus E4orf4 mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol*, 75, 4444-4447.
- Agar, J.N., Krebs, C., Frazzon, J., Huynh, B.H., Dean, D.R. and Johnson, M.K. (2000) IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU. *Biochemistry*, 39, 7856-7862.
- al-Khodairy, F. and Carr, A.M. (1992) DNA repair mutants defining G2 checkpoint pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo J*, 11, 1343-1350.
- Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M. and Warbrick, E. (1993) *Experiments with fission yeast. A laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Andersen, J.F., Utermohlen, J.G. and Feyereisen, R. (1994) Expression of house fly CYP6A1 and NADPH-cytochrome P450 reductase in *Escherichia coli* and reconstitution of an insecticide-metabolizing P450 system. *Biochemistry*, 33, 2171-2177.
- Ashok, B.T. and Ali, R. (2003) Aging research in India. *Exp Gerontol*, 38, 597-603.
- Ayte, J., Schweitzer, C., Zarzov, P., Nurse, P. and DeCaprio, J.A. (2001) Feedback regulation of the MBF transcription factor by cyclin Cig2. *Nat Cell Biol*, 3, 1043-1050.
- Baars, A.J. (1980) Biotransformation of xenobiotics in *Drosophila melanogaster* and its relevance for mutagenicity testing. *Drug Metab Rev*, 11, 191-221.
- Babcock, G.T., Varotsis, C. and Zhang, Y. (1992) O<sub>2</sub> activation in cytochrome oxidase and in other heme proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1101, 192-194.
- Bakonyi T, R.Z. (2004) High altitude and free radicals. *J Sports Sci Med* 3, 64-69.
- Barale, R., Rusciano, D. and Loprieno, N. (1982) Mutations induced by X-rays and UV radiation during the nuclear cell cycle in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mutat Res*, 92, 39-47.

- Bassett, M.H., McCarthy, J.L., Waterman, M.R. and Sliter, T.J. (1997) Sequence and developmental expression of Cyp18, a member of a new cytochrome P450 family from *Drosophila*. *Mol Cell Endocrinol*, 131, 39-49.
- Beach, D., Durkacz, B. and Nurse, P. (1982) Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature*, 300, 706-709.
- Beckert, V., Dettmer, R. and Bernhardt, R. (1994) Mutations of tyrosine 82 in bovine adrenodoxin that affect binding to cytochromes P45011A1 and P45011B1 but not electron transfer. *J Biol Chem*, 269, 2568-2573.
- Behrens, R., Hayles, J. and Nurse, P. (2000) Fission yeast retrotransposon Tf1 integration is targeted to 5' ends of open reading frames. *Nucleic Acids Res*, 28, 4709-4716.
- Benda, R., Tse Sum Bui, B., Schunemann, V., Florentin, D., Marquet, A. and Trautwein, A.X. (2002) Iron-sulfur clusters of biotin synthase in vivo: a Mossbauer study. *Biochemistry*, 41, 15000-15006.
- Bernhardt, R. (1996) Cytochrome P450: structure, function, and generation of reactive oxygen species. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 127, 137-221.
- Bird, I.M. and Conley, A.J. (2002) Steroid Biosynthesis: Enzymology, Integration and Control. In Mason, J.I. (ed.), *Genetics of Steroid Biosynthesis and Function*. Taylor & Francis, London and New York, Vol. 6, pp. 1-35.
- Bouvard, V., Zaitchouk, T., Vacher, M., Duthu, A., Canivet, M., Choisy-Rossi, C., Nieruchalski, M. and May, E. (2000) Tissue and cell-specific expression of the p53-target genes: bax, fas, mdm2 and waf1/p21, before and following ionising irradiation in mice. *Oncogene*, 19, 649-660.
- Boyer, J., Maxwell, P.J., Longley, D.B. and Johnston, P.G. (2004) 5-Fluorouracil: identification of novel downstream mediators of tumour response. *Anticancer Res*, 24, 417-423.
- Bradfield, J.Y., Lee, Y.H. and Keeley, L.L. (1991) Cytochrome P450 family 4 in a cockroach: molecular cloning and regulation by regulation by hypertrehalosemic hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 4558-4562.
- Brattsten, L.B. (1979) Ecological significance of mixed-function oxidations. *Drug Metab Rev*, 10, 35-58.
- Brentano, S.T., Black, S.M., Lin, D. and Miller, W.L. (1992) cAMP post-transcriptionally diminishes the abundance of adrenodoxin reductase mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 4099-4103.
- Broach, R.B. and Jarrett, J.T. (2006) Role of the [2Fe-2S]<sub>2</sub><sup>+</sup> cluster in biotin synthase: mutagenesis of the atypical metal ligand arginine 260. *Biochemistry*, 45, 14166-14174.
- Broderick, J.B. (1999) Catechol dioxygenases. *Essays Biochem*, 34, 173-189.

- Buccellato, L.J., Tso, M., Akinci, O.I., Chandel, N.S. and Budinger, G.R. (2004) Reactive oxygen species are required for hyperoxia-induced Bax activation and cell death in alveolar epithelial cells. *J Biol Chem*, 279, 6753-6760.
- Budiardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. and Wang, X. (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15, 269-290.
- Bunz, F., Hwang, P.M., Torrance, C., Waldman, T., Zhang, Y., Dillehay, L., Williams, J., Lengauer, C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1999) Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest*, 104, 263-269.
- Bureik, M., Hubel, K., Dragan, C.-A., Scher, J., Becker, H., Lenz, N. and Bernhardt, R. (2004) Development of test systems for the discovery of selective human aldosterone synthase (CYP11B2) and 11 $\beta$ -hydroxylase (CYP11B1) inhibitors. Discovery of a new lead compound for the therapy of congestive heart failure, myocardial fibrosis and hypertension. *Mol Cell Endocrinol*, 217, 249-254.
- Bureik, M., Lisurek, M. and Bernhardt, R. (2002) The human steroid hydroxylases CYP11B1 and CYP11B2. *Biol Chem*, 383, 1537-1551.
- Bureik, M., Mion, A., Kenyon, C.J. and Bernhardt, R. (2005) Inhibition of aldosterone biosynthesis by staurosporine. *Biol Chem*, 386, 663-669.
- Bureik, M., Schiffler, B., Rüdiger, V., Vogel, F. and Bernhardt, R. (2000) Fission yeast as a model system to study mitochondrial cytochrome P450 systems. In Okamoto, M., Ishimura, Y. and Nawata, H. (eds.), *Molecular Steroidogenesis*. Universal Academy Press, Tokyo, Vol. 29, pp. 97-98.
- Burhans, W.C., Weinberger, M., Marchetti, M.A., Ramachandran, L., D'Urso, G. and Huberman, J.A. (2003) Apoptosis-like yeast cell death in response to DNA damage and replication defects. *Mutat Res*, 532, 227-243.
- Buttke, T.M. and Sandstrom, P.A. (1994) Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today*, 15, 7-10.
- Cairns, J. (2002) A DNA damage checkpoint in Escherichia coli. *DNA Repair (Amst)*, 1, 699-701.
- Cao, P.R. and Bernhardt, R. (1999) Interaction of CYP11B1 (cytochrome P-450 $\beta$ ) with CYP11A1 (cytochrome P-450 $\alpha$ ) in COS-1 cells. *Eur J Biochem*, 262, 720-726.
- Carey, T.E., Lloyd, K.O., Takahashi, T., Travassos, L.R. and Old, L.J. (1979) AU cell-surface antigen of human malignant melanoma: solubilization and partial characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 2898-2902.
- Carstens, C.P.a.A. (1999) Codon Bias-Adjusted BL21 Derivatives for Protein Expression. *Stratagene*, 12, 49-51.
- Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 59, 527-605.

- 
- Chang, C.Y., Wu, D.A., Lai, C.C., Miller, W.L. and Chung, B.C. (1988) Cloning and structure of the human adrenodoxin gene. *DNA*, 7, 609-615.
- Chang, C.Y., Wu, D.A., Mohandas, T.K. and Chung, B.C. (1990) Structure, sequence, chromosomal location, and evolution of the human ferredoxin gene family. *DNA Cell Biol*, 9, 205-212.
- Chen, C. and Guo, I.C. (2000) Effect of cAMP on protein binding activities of three elements in upstream promoter of human CYP11A1 gene. *Life Sci*, 67, 2045-2049.
- Chen, D., Walsby, C., Hoffman, B.M. and Frey, P.A. (2003) Coordination and mechanism of reversible cleavage of S-adenosylmethionine by the [4Fe-4S] center in lysine 2,3-aminomutase. *J Am Chem Soc*, 125, 11788-11789.
- Chen, J.J., Wang, P.S., Chien, E.J. and Wang, S.W. (2001) Direct inhibitory effect of digitalis on progesterone release from rat granulosa cells. *Br J Pharmacol*, 132, 1761-1768.
- Choisy-Rossi, C., Reisdorf, P. and Yonish-Rouach, E. (1998) Mechanisms of p53-induced apoptosis: in search of genes which are regulated during p53-mediated cell death. *Toxicol Lett*, 102-103, 491-496.
- Choisy-Rossi, C., Reisdorf, P. and Yonish-Rouach, E. (1999) The p53 tumor suppressor gene: structure, function and mechanism of action. *Results Probl Cell Differ*, 23, 145-172.
- Choisy-Rossi, C. and Yonish-Rouach, E. (1998) Apoptosis and the cell cycle: the p53 connection. *Cell Death Differ*, 5, 129-131.
- Christen P, J.P. (2004) *Biochemie*. Springer Verlag.
- Chu, J.W. and Kimura, T. (1973a) Studies on adrenal steroid hydroxylases. Complex formation of the hydroxylase components. *J Biol Chem*, 248, 5183-5187.
- Chu, J.W. and Kimura, T. (1973b) Studies on adrenal steroid hydroxylases. Molecular and catalytic properties of adrenodoxin reductase (a flavoprotein). *J Biol Chem*, 248, 2089-2094.
- Coghlan, V.M. and Vickery, L.E. (1991) Site-specific mutations in human ferredoxin that affect binding to ferredoxin reductase and cytochrome P450<sub>sc</sub>. *J Biol Chem*, 266, 18606-18612.
- Coon, M.J. (2005) Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45, 1-25.
- Coon, M.J., Vaz, A.D. and Bestervelt, L.L. (1996) Cytochrome P450 2: peroxidative reactions of diversozymes. *Faseb J*, 10, 428-434.
- Cosper, M.M., Cosper, N.J., Hong, W., Shokes, J.E., Broderick, W.E., Broderick, J.B., Johnson, M.K. and Scott, R.A. (2003) Structural studies of the interaction of S-

- adenosylmethionine with the [4Fe-4S] clusters in biotin synthase and pyruvate formate-lyase activating enzyme. *Protein Sci*, 12, 1573-1577.
- Cosper, M.M., Jameson, G.N., Davydov, R., Eidsness, M.K., Hoffman, B.M., Huynh, B.H. and Johnson, M.K. (2002a) The [4Fe-4S]<sub>2</sub> cluster in reconstituted biotin synthase binds S-adenosyl-L-methionine. *J Am Chem Soc*, 124, 14006-14007.
- Cosper, M.M., Jameson, G.N., Eidsness, M.K., Huynh, B.H. and Johnson, M.K. (2002b) Recombinant *Escherichia coli* biotin synthase is a [2Fe-2S]<sub>2</sub> protein in whole cells. *FEBS Lett*, 529, 332-336.
- Cosper, M.M., Jameson, G.N., Hernandez, H.L., Krebs, C., Huynh, B.H. and Johnson, M.K. (2004) Characterization of the cofactor composition of *Escherichia coli* biotin synthase. *Biochemistry*, 43, 2007-2021.
- Cregan, S.P., Boreham, D.R., Walker, P.R., Brown, D.L. and Mitchel, R.E. (1994) Modification of radiation-induced apoptosis in radiation- or hyperthermia-adapted human lymphocytes. *Biochem Cell Biol*, 72, 475-482.
- Cupp, J.R. and Vickery, L.E. (1989) Adrenodoxin with a COOH-terminal deletion (des 116-128) exhibits enhanced activity. *J Biol Chem*, 264, 1602-1607.
- Dai, Y., Rashba-Step, J. and Cederbaum, A.I. (1993) Stable expression of human cytochrome P450<sub>2E1</sub> in HepG2 cells: characterization of catalytic activities and production of reactive oxygen intermediates. *Biochemistry*, 32, 6928-6937.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Colombo, R. and Milzani, A. (2005) Is there an answer? *IUBMB Life*, 57, 189-192.
- Danielson, P.B. and Fogleman, J.C. (1997) Isolation and sequence analysis of cytochrome P450 12B1: the first mitochondrial insect P450 with homology to 1 alpha,25 dihydroxy-D3 24-hydroxylase. *Insect Biochem Mol Biol*, 27, 595-604.
- Danielson, P.B., Foster, J.L., McMahon, M.M., Smith, M.K. and Fogleman, J.C. (1998) Induction by alkaloids and phenobarbital of Family 4 Cytochrome P450s in *Drosophila*: evidence for involvement in host plant utilization. *Mol Gen Genet*, 259, 54-59.
- Danielson, P.B., MacIntyre, R.J. and Fogleman, J.C. (1997) Molecular cloning of a family of xenobiotic-inducible drosophilid cytochrome p450s: evidence for involvement in host-plant allelochemical resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 10797-10802.
- Davanloo, P., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. and Studier, F.W. (1984) Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 2035-2039.
- Degtyarenko, K.N. and Kulikova, T.A. (2001) Evolution of bioinorganic motifs in P450-containing systems. *Biochem Soc Trans*, 29, 139-147.
- Del Maestro, R.F. (1980) An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand Suppl*, 492, 153-168.

- Denner, K., Doehmer, J. and Bernhardt, R. (1995a) Cloning of CYP11B1 and CYP11B2 from normal human adrenal and their functional expression in COS-7 and V79 Chinese hamster cells. *Endocr Res*, 21, 443-448.
- Denner, K., Vogel, R., Schmalix, W., Doehmer, J. and Bernhardt, R. (1995b) Cloning and stable expression of the human mitochondrial cytochrome P45011B1 cDNA in V79 Chinese hamster cells and their application for testing of potential inhibitors. *Pharmacogenetics*, 5, 89-96.
- Derouet-Humbert, E., Roemer, K. and Bureik, M. (2005) Adrenodoxin (Adx) and CYP11A1 (P450scc) induce apoptosis by the generation of reactive oxygen species in mitochondria. *Biol Chem*, 386, 453-461.
- Desagher, S. and Martinou, J.C. (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*, 10, 369-377.
- Dickinson, D.P. (1981) Polypeptide synthesis in cell cycle mutants of fission yeast. *J Cell Sci*, 51, 203-217.
- Ding, X.X. and Coon, M.J. (1991) Purification and characterization of cytochromes P450 in rabbit nasal microsomes. *Methods Enzymol*, 206, 603-612.
- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Butel, J.S. and Bradley, A. (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, 356, 215-221.
- Dragan, C.-A., Zearo, S., Hannemann, F., Bernhardt, R. and Bureik, M. (2005) Efficient conversion of 11-deoxycortisol to cortisol (hydrocortisone) by recombinant fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res*, 5, 621-625.
- Dunkov, B.C., Guzov, V.M., Mocelin, G., Shotkoski, F., Brun, A., Amichot, M., Ffrench-Constant, R.H. and Feyereisen, R. (1997) The *Drosophila* cytochrome P450 gene *Cyp6a2*: structure, localization, heterologous expression, and induction by phenobarbital. *DNA Cell Biol*, 16, 1345-1356.
- Ehmer, P.B., Bureik, M., Bernhardt, R., Muller, U. and Hartmann, R.W. (2002) Development of a test system for inhibitors of human aldosterone synthase (CYP11B2): screening in fission yeast and evaluation of selectivity in V79 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 81, 173-179.
- Ekstrom, G. and Ingelman-Sundberg, M. (1989) Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450 (P-450IIE1). *Biochem Pharmacol*, 38, 1313-1319.
- el-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietenpol, J.A., Burrell, M., Hill, D.E., Wang, Y. and et al. (1994) WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res*, 54, 1169-1174.
- Ellis, R.E., Yuan, J.Y. and Horvitz, H.R. (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol*, 7, 663-698.

- Enoch, T. and Nurse, P. (1990) Mutation of fission yeast cell cycle control genes abolishes dependence of mitosis on DNA replication. *Cell*, 60, 665-673.
- Estabrook, R.W. (2005) Steroid hydroxylations: a paradigm for cytochrome P450 catalyzed mammalian monooxygenation reactions. *Biochem Biophys Res Commun*, 338, 290-298.
- Fantes, P. (1979) Epistatic gene interactions in the control of division in fission yeast. *Nature*, 279, 428-430.
- Fantes, P.A. (1981) Isolation of cell size mutants of a fission yeast by a new selective method: characterization of mutants and implications for division control mechanisms. *J Bacteriol.*, 146, 746-754.
- Feyereisen, R. (1999) Insect P450 enzymes. *Annu Rev Entomol*, 44, 507-533.
- Filipic, M., Fatur, T. and Vudrag, M. (2006) Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity. *Hum Exp Toxicol*, 25, 67-77.
- Fisher, A. (1988) In Halliwell, B. (ed.), *Oxygen radicals and tissue injury*. FASEB Publishing, Bethesda, MD.
- Fogleman, J.C., Danielson, P.B. and Frank, M.R. (1997) Comparison of *Drosophila* cytochrome P450 metabolism of natural and model substrates. *J Insect Physiol*, 43, 953-957.
- Frank, M.R. and Fogleman, J.C. (1992) Involvement of cytochrome P450 in host-plant utilization by Sonoran Desert *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 11998-12002.
- Frohlich, K.U. and Madeo, F. (2000) Apoptosis in yeast—a monocellular organism exhibits altruistic behaviour. *FEBS Lett*, 473, 6-9.
- Fukushima, M., Fujioka, A., Uchida, J., Nakagawa, F. and Takechi, T. (2001) Thymidylate synthase (TS) and ribonucleotide reductase (RNR) may be involved in acquired resistance to 5-fluorouracil (5-FU) in human cancer xenografts in vivo. *Eur J Cancer*, 37, 1681-1687.
- Funkenstein, B., Waterman, M.R., Masters, B.S. and Simpson, E.R. (1983) Evidence for the presence of cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450 and adrenodoxin in fresh granulosa cells. Effects of follicle-stimulating hormone and cyclic AMP on cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450 synthesis and activity. *J Biol Chem*, 258, 10187-10191.
- Fuwa, N., Kodaira, T., Kamata, M., Matsumoto, A., Furutani, K., Tachibana, H. and Ito, Y. (2002) Phase I study of combination chemotherapy with 5-fluorouracil (5-FU) and nedaplatin (NDP): adverse effects and recommended dose of NDP administered after 5-FU. *Am J Clin Oncol*, 25, 565-569.
- Gamen, S., Anel, A., Lasierra, P., Alava, M.A., Martinez-Lorenzo, M.J., Pineiro, A. and Naval, J. (1997) Doxorubicin-induced apoptosis in human T-cell leukemia is mediated by caspase-3 activation in a Fas-independent way. *FEBS Lett*, 417, 360-364.

- Genova, M.L., Pich, M.M., Biondi, A., Bernacchia, A., Falasca, A., Bovina, C., Formiggini, G., Parenti Castelli, G. and Lenaz, G. (2003) Mitochondrial production of oxygen radical species and the role of Coenzyme Q as an antioxidant. *Exp Biol Med (Maywood)*, 228, 506-513.
- Geren, L.M., O'Brien, P., Stonehuerner, J. and Millett, F. (1984) Identification of specific carboxylate groups on adrenodoxin that are involved in the interaction with adrenodoxin reductase. *J Biol Chem*, 259, 2155-2160.
- Ghafourifar, P., Schenk, U., Klein, S.D. and Richter, C. (1999) Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation. *J Biol Chem*, 274, 31185-31188.
- Glucksmann, A. (1951) The histogenesis of radiation-induced and of benzpyrene induced epidermal tumours in the mouse. *J Pathol Bacteriol*, 63, 176-177.
- Grieneisen, M.L., Warren, J.T. and Gilbert, L.I. (1993) Early steps in ecdysteroid biosynthesis: evidence for the involvement of cytochrome P-450 enzymes. *Insect Biochem Mol Biol*, 23, 13-23.
- Grinberg, A.V., Hannemann, F., Schiffler, B., Muller, J., Heinemann, U. and Bernhardt, R. (2000) Adrenodoxin: structure, stability, and electron transfer properties. *Proteins*, 40, 590-612.
- Guzov, V.M., Unnithan, G.C., Chernogolov, A.A. and Feyereisen, R. (1998) CYP12A1, a mitochondrial cytochrome P450 from the house fly. *Arch Biochem Biophys*, 359, 231-240.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166, 557-580.
- Hannemann, F.B., A.; Zöllner, A.; Bureik, M.; Schiffler, B.; Bernhardt, R. (2005) How much can we improve Adx/redox partner interaction and electron transfer ? *14th International Conference on Cytochromes P450*, Dallas, Texas U.S.A., p. 54.
- Hanukoglu, I. (2006) Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells. *Drug Metab Rev*, 38, 171-196.
- Hanukoglu, I., Feuchtwanger, R. and Hanukoglu, A. (1990a) Mechanism of corticotropin and cAMP induction of mitochondrial cytochrome P450 system enzymes in adrenal cortex cells. *J Biol Chem*, 265, 20602-20608.
- Hanukoglu, I. and Hanukoglu, Z. (1986) Stoichiometry of mitochondrial cytochromes P-450, adrenodoxin and adrenodoxin reductase in adrenal cortex and corpus luteum. Implications for membrane organization and gene regulation. *Eur J Biochem*, 157, 27-31.
- Hanukoglu, I. and Jefcoate, C.R. (1980) Mitochondrial cytochrome P-450sec. Mechanism of electron transport by adrenodoxin. *J Biol Chem*, 255, 3057-3061.

- 
- Hanukoglu, I., Privalle, C.T. and Jefcoate, C.R. (1981a) Mechanisms of ionic activation of adrenal mitochondrial cytochromes P-450<sub>scc</sub> and P-450<sub>11β</sub>. *J Biol Chem*, 256, 4329-4335.
- Hanukoglu, I., Rapoport, R., Weiner, L. and Sklan, D. (1993) Electron leakage from the mitochondrial NADPH-adrenodoxin reductase- adrenodoxin-P450<sub>scc</sub> (cholesterol side chain cleavage) system. *Arch Biochem Biophys*, 305, 489-498.
- Hanukoglu, I., Spitsberg, V., Bumpus, J.A., Dus, K.M. and Jefcoate, C.R. (1981b) Adrenal mitochondrial cytochrome P-450<sub>scc</sub>. Cholesterol and adrenodoxin interactions at equilibrium and during turnover. *J Biol Chem*, 256, 4321-4328.
- Hanukoglu, I., Suh, B.S., Himmelhoch, S. and Amsterdam, A. (1990b) Induction and mitochondrial localization of cytochrome P450<sub>scc</sub> system enzymes in normal and transformed ovarian granulosa cells. *J Cell Biol*, 111, 1373-1381.
- Hardy, L., Clark, J.B., Darley-Usmar, V.M., Smith, D.R. and Stone, D. (1991) Reoxygenation-dependent decrease in mitochondrial NADH:CoQ reductase (Complex I) activity in the hypoxic/reoxygenated rat heart. *Biochem J*, 274, 133-137.
- Hartwell, L.H., Culotti, J., Pringle, J.R. and Reid, B.J. (1974) Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science*, 183, 46-51.
- Hassan, J.O., Mockett, A.P., Catty, D. and Barrow, P.A. (1991) Infection and reinfection of chickens with *Salmonella typhimurium*: bacteriology and immune responses. *Avian Dis*, 35, 809-819.
- Haunstetter, A. and Izumo, S. (1998) Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res*, 82, 1111-1129.
- Hayashi, O. (1969) Electronic aspects of catalysis of the oxygenases. *Ann N Y Acad Sci*, 158, 318-335.
- Heidelberger, C. (1965) Fluorinated pyrimidines. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 4, 1-50.
- Heidelberger, C. and Anderson, S.W. (1964) Fluorinated Pyrimidines. Xxi. the Tumor-Inhibitory Activity of 5-Trifluoromethyl-2'-Deoxyuridine. *Cancer Res*, 24, 1979-1985.
- Hellal-Levy, C., Couette, B., Fagart, J., Souque, A., Gomez-Sanchez, C. and Rafestin-Oblin, M.E. (1999) Specific hydroxylations determine selective corticosteroid recognition by human glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. *FEBS Lett*, 464, 9-13.
- Hengartner, M.O. and Bryant, J.A. (2000) Apoptotic cell death: from worms to wombats ... but what about the weeds? *Symp Soc Exp Biol*, 52, 1-12.
- Henry-Mowatt, J., Dive, C., Martinou, J.C. and James, D. (2004) Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. *Oncogene*, 23, 2850-2860.

- Hornig, D. (1975) Distribution of ascorbic acid, metabolites and analogues in man and animals. *Ann N Y Acad Sci*, 258, 103-118.
- Hueber, A., Durka, S. and Weller, M. (1998) CD95-mediated apoptosis: no variation in cellular sensitivity during cell cycle progression. *FEBS Lett*, 432, 155-157.
- Hugo, N., Armengaud, J., Gaillard, J., Timmis, K.N. and Jouanneau, Y. (1998) A novel -2Fe-2S- ferredoxin from *Pseudomonas putida* mt2 promotes the reductive reactivation of catechol 2,3-dioxygenase. *J Biol Chem*, 273, 9622-9629.
- Hwang, P.M., Bunz, F., Yu, J., Rago, C., Chan, T.A., Murphy, M.P., Kelso, G.F., Smith, R.A., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (2001) Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Nat Med*, 7, 1111-1117.
- Ink, B., Zornig, M., Baum, B., Hajibagheri, N., James, C., Chittenden, T. and Evan, G. (1997) Human Bak induces cell death in *Schizosaccharomyces pombe* with morphological changes similar to those with apoptosis in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 17, 2468-2474.
- Inoue, M., Sato, E.F., Nishikawa, M., Park, A.M., Kira, Y., Imada, I. and Utsumi, K. (2003) Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem*, 10, 2495-2505.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol*, 153, 163-168.
- Izawa, H., Yamamoto, H., Damdinsuren, B., Ikeda, K., Tsujie, M., Suzuki, R., Kitani, K., Seki, Y., Hayashi, T., Takemasa, I., Ikeda, M., Ohue, M., Sekimoto, M., Monden, T. and Monden, M. (2005) Effects of p21cip1/waf1 overexpression on growth, apoptosis and differentiation in human colon carcinoma cells. *Int J Oncol*, 27, 69-76.
- Jose, J., Bernhardt, R. and Hannemann, F. (2002) Cellular surface display of dimeric Adx and whole cell P450-mediated steroid synthesis on *E. coli*. *J Biotechnol*, 95, 257-268.
- Jung, C., Schunemann, V., Lenzian, F., Trautwein, A.X., Contzen, J., Galander, M., Bottger, L.H., Richter, M. and Barra, A.L. (2005) Spectroscopic characterization of the iron-oxo intermediate in cytochrome P450. *Biol Chem*, 386, 1043-1053.
- Jurgensmeier, J.M., Krajewski, S., Armstrong, R.C., Wilson, G.M., Oltersdorf, T., Fritz, L.C., Reed, J.C. and Otilie, S. (1997) Bax- and Bak-induced cell death in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*, 8, 325-339.
- Kaesler, M.D., Pebernard, S. and Iggo, R.D. (2004) Regulation of p53 stability and function in HCT116 colon cancer cells. *J Biol Chem*, 279, 7598-7605.
- Kakuta, Y., Horio, T., Takahashi, Y. and Fukuyama, K. (2001) Crystal structure of *Escherichia coli* Fdx, an adrenodoxin-type ferredoxin involved in the assembly of iron-sulfur clusters. *Biochemistry*, 40, 11007-11012.

- Kaufmann, S.H. and Earnshaw, W.C. (2000) Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res*, 256, 42-49.
- Kearsey, S.E., Labib, K. and Maiorano, D. (1996) Cell cycle control of eukaryotic DNA replication. *Curr Opin Genet Dev*, 6, 208-214.
- Kerr, J.F., Winterford, C.M. and Harmon, B.V. (1994) Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73, 2013-2026.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-257.
- Kido, T., Arakawa, M. and Kimura, T. (1979) Adrenal cortex mitochondrial cytochrome P-450 specific to cholesterol side chain cleavage reaction. Spectral changes induced by detergents, alcohols, amines, phospholipids, steroid hydroxylase inhibitors, and steroid substrates, and conditions for adrenodoxin binding to the cytochrome. *J Biol Chem*, 254, 8377-8385.
- Kimhi, O., Drucker, L., Neumann, A., Shapiro, H., Shapira, J., Yarkoni, S., Lahav, M., Radnay, J. and Lishner, M. (2004) Fluorouracil induces apoptosis and surface molecule modulation of peripheral blood leukocytes. *Clin Lab Haematol*, 26, 327-333.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J*, 14, 5579-5588.
- Klingenberg, M. (1958) Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*, 75, 376-386.
- Kobayashi, H., Ouchi, N., Kihara, S., Walsh, K., Kumada, M., Abe, Y., Funahashi, T. and Matsuzawa, Y. (2004a) Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circ Res*, 94, e27-31.
- Kobayashi, K., Hayashi, M., Nakano, H., Shimazaki, M., Sugimori, K. and Koshino, Y. (2004b) Correlation between astrocyte apoptosis and Alzheimer changes in gray matter lesions in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 6, 623-632; discussion 673-681.
- Komiya, T., Sakaguchi, M. and Mihara, K. (1996) Cytoplasmic chaperones determine the targeting pathway of precursor proteins to mitochondria. *Embo J*, 15, 399-407.
- Korsmeyer, S.J. (1992) Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood*, 80, 879-886.
- Korytko, P.J. and Scott, J.G. (1998) CYP6D1 protects thoracic ganglia of houseflies from the neurotoxic insecticide cypermethrin. *Arch Insect Biochem Physiol*, 37, 57-63.
- Kramer, R.E., Rainey, W.E., Funkenstein, B., Dee, A., Simpson, E.R. and Waterman, M.R. (1984) Induction of synthesis of mitochondrial steroidogenic enzymes of bovine adrenocortical cells by analogs of cyclic AMP. *J Biol Chem*, 259, 707-713.

- Krebs, C., Broderick, W.E., Henshaw, T.F., Broderick, J.B. and Huynh, B.H. (2002) Coordination of adenosylmethionine to a unique iron site of the [4Fe-4S] of pyruvate formate-lyase activating enzyme: a Mossbauer spectroscopic study. *J Am Chem Soc*, 124, 912-913.
- Kuthan, H., Tsuji, H., Graf, H. and Ullrich, V. (1978) Generation of superoxide anion as a source of hydrogen peroxide in a reconstituted monooxygenase system. *FEBS Lett*, 91, 343-345.
- Laemmli, U.K., Amos, L.A. and Klug, A. (1976) Correlation between structural transformation and cleavage of the major head protein of T4 bacteriophage. *Cell*, 7, 191-203.
- Lambeth, J.D. and Kamin, H. (1976) Adrenodoxin reductase. Properties of the complexes of reduced enzyme with NADP<sup>+</sup> and NADPH. *J Biol Chem*, 251, 4299-4306.
- Lambeth, J.D. and Kamin, H. (1979) Adrenodoxin reductase-adrenodoxin complex. Flavin to iron-sulfur electron transfer as the rate-limiting step in the NADPH-cytochrome c reductase reaction. *J Biol Chem*, 254, 2766-2774.
- Laney, P.H., Levy, J.A. and Kipp, D.E. (1990) Plasma cortisol and adrenal ascorbic acid levels after ACTH treatment with a high intake of ascorbic acid in the guinea pig. *Ann Nutr Metab*, 34, 85-92.
- Layer, G., Verfurth, K., Mahlitz, E. and Jahn, D. (2002) Oxygen-independent coproporphyrinogen-III oxidase HemN from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 277, 34136-34142.
- Ledenev, A.N., Konstantinov, A.A., Popova, E. and Ruuge, E.K. (1986) A simple assay of the superoxide generation rate with Tiron as an EPR-visible radical scavenger. *Biochem Int*, 13, 391-396.
- Lee, M.G. and Nurse, P. (1987) Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature*, 327, 31-35.
- Leist, M. and Jaattela, M. (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 589-598.
- Lenaz, G. (1998) Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys Acta*, 1366, 53-67.
- Leupold, U. (1957) [Physiologic and genetic studies of adenine-dependant mutants of *Schizosaccharomyces pombe*; a contribution to the problem of pseudoallele.]. *Schweiz Z Pathol Bakteriol*, 20, 535-544.
- Leupold, U. (1958) Studies on recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 23, 161-170.
- Limoli, C.L. and Giedzinski, E. (2003) Induction of chromosomal instability by chronic oxidative stress. *Neoplasia*, 5, 339-346.

- Lindner, P. (1893) Schizosaccharomyces Pombe n. sp., ein neuer Gährungserreger. *Wochenschrift für Brauerei*, 10, 1298-1300.
- Liu, G. and Chen, X. (2002) The ferredoxin reductase gene is regulated by the p53 family and sensitizes cells to oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene*, 21, 7195-7204.
- Liu, H. and Baliga, R. (2003) Cytochrome P450 2E1 null mice provide novel protection against cisplatin-induced nephrotoxicity and apoptosis. *Kidney Int*, 63, 1687-1696.
- Lopes, S., Jurisicova, A., Sun, J.G. and Casper, R.F. (1998) Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod*, 13, 896-900.
- Low, C.P., Liew, L.P., Pervaiz, S. and Yang, H. (2005) Apoptosis and lipoapoptosis in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *FEMS Yeast Res*.
- Madeo, F., Engelhardt, S., Herker, E., Lehmann, N., Maldener, C., Proksch, A., Wissing, S. and Frohlich, K.U. (2002a) Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine. *Curr Genet*, 41, 208-216.
- Madeo, F., Frohlich, E. and Frohlich, K.U. (1997) A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J Cell Biol*, 139, 729-734.
- Madeo, F., Frohlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S.J., Wolf, D.H. and Frohlich, K.U. (1999) Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol*, 145, 757-767.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lachelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S.J., Wesselborg, S. and Frohlich, K.U. (2002b) A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell*, 9, 911-917.
- Mancini, M., Anderson, B.O., Caldwell, E., Sedghinasab, M., Paty, P.B. and Hockenbery, D.M. (1997) Mitochondrial proliferation and paradoxical membrane depolarization during terminal differentiation and apoptosis in a human colon carcinoma cell line. *J Cell Biol*, 138, 449-469.
- Mancini, M., Sedghinasab, M., Knowlton, K., Tam, A., Hockenbery, D. and Anderson, B.O. (1998) Flow cytometric measurement of mitochondrial mass and function: a novel method for assessing chemoresistance. *Ann Surg Oncol*, 5, 287-295.
- Marchesi, E., Rota, C., Fann, Y.C., Chignell, C.F. and Mason, R.P. (1999) Photoreduction of the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein: a spin trapping and direct electron spin resonance study with implications for oxidative stress measurements. *Free Radic Biol Med*, 26, 148-161.
- Marchetti, P., Castedo, M., Susin, S.A., Zamzami, N., Hirsch, T., Macho, A., Haeflner, A., Hirsch, F., Geuskens, M. and Kroemer, G. (1996) Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med*, 184, 1155-1160.

- Matocha, M.F. and Waterman, M.R. (1984) Discriminatory processing of the precursor forms of cytochrome P-450<sub>sc</sub> and adrenodoxin by adrenocortical and heart mitochondria. *J Biol Chem*, 259, 8672-8678.
- Matthes, G., Richter, E., Tofote, U. and Pawlow, I. (1994) [Mechanical donation of whole blood simultaneous extraction of concentrated erythrocytes and fresh plasma using MCS-3P]. *Beitr Infusionsther Transfusionsmed*, 32, 9-11.
- Maundrell, K. (1993) Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene*, 123, 127-130.
- Meidan, R., Aberdam, E. and Aflalo, L. (1992) Steroidogenic enzyme content and progesterone induction by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-generating agents and prostaglandin F<sub>2</sub> alpha in bovine theca and granulosa cells luteinized in vitro. *Biol Reprod*, 46, 786-792.
- Meissauer, A., Kramer, M.D., Hofmann, M., Erkell, L.J., Jacob, E., Schirrmacher, V. and Brunner, G. (1991) Urokinase-type and tissue-type plasminogen activators are essential for in vitro invasion of human melanoma cells. *Exp Cell Res*, 192, 453-459.
- Michieli, P., Chedid, M., Lin, D., Pierce, J.H., Mercer, W.E. and Givol, D. (1994) Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res*, 54, 3391-3395.
- Miller, W.L. and Portale, A.A. (2002) Vitamin D Biosynthesis and its Disorders. In Mason, J.I. (ed.), *Genetics of Steroid Biosynthesis and Function*. Taylor & Francis, London and New York, Vol. 6, pp. 57-79.
- Mitani, F. and Ichiyama, A. (1975) Enzymic studies on adrenocortical deoxycorticosterone 11beta-hydroxylase system. *J Biol Chem*, 250, 8010-8015.
- Mo, H., Pochapsky, S.S. and Pochapsky, T.C. (1999) A model for the solution structure of oxidized terpredoxin, a Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> ferredoxin from *Pseudomonas*. *Biochemistry*, 38, 5666-5675.
- Morel, Y., Picado-Leonard, J., Wu, D.A., Chang, C.Y., Mohandas, T.K., Chung, B.C. and Miller, W.L. (1988) Assignment of the functional gene for human adrenodoxin to chromosome 11q13—qter and of adrenodoxin pseudogenes to chromosome 20cen—q13.1. *Am J Hum Genet*, 43, 52-59.
- Muller, A., Muller, J.J., Muller, Y.A., Uhlmann, H., Bernhardt, R. and Heinemann, U. (1998) New aspects of electron transfer revealed by the crystal structure of a truncated bovine adrenodoxin, Adx(4-108). *Structure*, 6, 269-280.
- Muller, J. (1998) Regulation of aldosterone biosynthesis: the end of the road? *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*, 25, S79-85.
- Muller, J.J., Lapko, A., Ruckpaul, K. and Heinemann, U. (2003) Modeling of electrostatic recognition processes in the mammalian mitochondrial steroid hydroxylase system. *Biophys Chem*, 100, 281-292.

- Munzel, T., Afanas'ev, I.B., Kleschyov, A.L. and Harrison, D.G. (2002) Detection of superoxide in vascular tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 1761-1768.
- Nebert, D.W. and Nelson, D.R. (1991) P450 gene nomenclature based on evolution. *Methods Enzymol*, 206, 3-11.
- Nelson, D.R. (1998) Metazoan cytochrome P450 evolution. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 121, 15-22.
- Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C. and Nebert, D.W. (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6, 1-42.
- Nemunaitis, J., Cox, J., Meyer, W., Courtney, A. and Mues, G. (1997) Irinotecan hydrochloride (CPT-11) resistance identified by K-ras mutation in patients with progressive colon cancer after treatment with 5-fluorouracil (5-FU). *Am J Clin Oncol*, 20, 527-529.
- Nishitani, H. and Nurse, P. (1997) The cdc18 protein initiates DNA replication in fission yeast. *Prog Cell Cycle Res*, 3, 135-142.
- Noguchi, E., Shanahan, P., Noguchi, C. and Russell, P. (2002) CDK phosphorylation of Drc1 regulates DNA replication in fission yeast. *Curr Biol*, 12, 599-605.
- Nordblom, G.D. and Coon, M.J. (1977) Hydrogen peroxide formation and stoichiometry of hydroxylation reactions catalyzed by highly purified liver microsomal cytochrome P-450. *Arch Biochem Biophys*, 180, 343-347.
- Novak, B. and Mitchison, J.M. (1986) Change in the rate of CO<sub>2</sub> production in synchronous cultures of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: a periodic cell cycle event that persists after the DNA-division cycle has been blocked. *J Cell Sci*, 86, 191-206.
- Nurse, P. (1997) Checkpoint pathways come of age. *Cell.*, 91, 865-867.
- Nurse, P. (2004) Wee beasties. *Nature*, 432, 557.
- Nurse, P. and Thuriaux, P. (1980) Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 96, 627-637.
- Okamura, T., John, M.E., Zuber, M.X., Simpson, E.R. and Waterman, M.R. (1985) Molecular cloning and amino acid sequence of the precursor form of bovine adrenodoxin: evidence for a previously unidentified COOH-terminal peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 5705-5709.
- Ollagnier, S., Mulliez, E., Schmidt, P.P., Eliasson, R., Gaillard, J., Deronzier, C., Bergman, T., Graslund, A., Reichard, P. and Fontecave, M. (1997) Activation of the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. The essential role of the iron-sulfur center for S-adenosylmethionine reduction. *J Biol Chem*, 272, 24216-24223.

- Omura, T. (1966) Isolation from adrenal cortex of a nonheme iron protein and a flavoprotein functional as a reduced triphospho pyridine nucleotide-cytochrome P450 reductase. *Arch Biochem Biophys*, 117.
- Omura, T. (1998) Mitochondria-targeting sequence, a multi-role sorting sequence recognized at all steps of protein import into mitochondria. *J Biochem (Tokyo)*, 123, 1010-1016.
- Omura, T., Ishimura, Y. and Fujii-Kuriyama, Y. (eds.). (1993) *Cytochrome P-450*. VCH, Weinheim.
- Omura, T. and Sato, R. (1964) The carbonmonoxid-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem*, 239, 2370.
- Oren, M. (1992) The involvement of oncogenes and tumor suppressor genes in the control of apoptosis. *Cancer Metastasis Rev*, 11, 141-148.
- Orly, J., Rei, Z., Greenberg, N.M. and Richards, J.S. (1994) Tyrosine kinase inhibitor AG18 arrests follicle-stimulating hormone- induced granulosa cell differentiation: use of reverse transcriptase- polymerase chain reaction assay for multiple messenger ribonucleic acids. *Endocrinology*, 134, 2336-2346.
- Peters, G.J., van der Wilt, C.L., van Groeningen, C.J., Smid, K., Meijer, S. and Pinedo, H.M. (1994) Thymidylate synthase inhibition after administration of fluorouracil with or without leucovorin in colon cancer patients: implications for treatment with fluorouracil. *J Clin Oncol*, 12, 2035-2042.
- Petrovich, R.M. and Jaffe, E.K. (1997) Magnetic resonance studies on the active site and metal centers of *Bradyrhizobium japonicum* porphobilinogen synthase. *Biochemistry*, 36, 13421-13427.
- Picado-Leonard, J., Voutilainen, R., Kao, L.C., Chung, B.C., Strauss, J.F., 3rd and Miller, W.L. (1988) Human adrenodoxin: cloning of three cDNAs and cycloheximide enhancement in JEG-3 cells. *J Biol Chem*, 263, 3240-3244. Erratum in: *J Biol Chem* 1988 Aug 3245;3263(3222):11016.
- Piconi, L., Quagliari, L. and Ceriello, A. (2003) Oxidative stress in diabetes. *Clin Chem Lab Med*, 41, 1144-1149.
- Pikuleva, I.A., Lapko, A.G. and Chashchin, V.L. (1992) Functional reconstitution of cytochrome P-450<sub>scc</sub> with hemin activated with Woodward's reagent K. Formation of a heme protein cross-link. *J Biol Chem*, 267, 1438-1442.
- Pikuleva, I.A., Tesh, K., Waterman, M.R. and Kim, Y. (2000) The tertiary structure of full-length bovine adrenodoxin suggests functional dimers. *Arch Biochem Biophys*, 373, 44-55.
- Pingoud, A. and Jeltsch, A. (1997) Recognition and cleavage of DNA by type-II restriction endonucleases. *Eur J Biochem*, 246, 1-22.

- Pueyo, J.J. and Gomez-Moreno, C. (1991) Purification of ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase, flavodoxin and ferredoxin from a single batch of the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7119. *Prep Biochem*, 21, 191-204.
- Pueyo, J.J., Gomez-Moreno, C. and Mayhew, S.G. (1991) Oxidation-reduction potentials of ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase and flavodoxin from *Anabaena* PCC 7119 and their electrostatic and covalent complexes. *Eur J Biochem*, 202, 1065-1071.
- Puntarulo, S. and Cederbaum, A.I. (1996) Role of cytochrome P-450 in the stimulation of microsomal production of reactive oxygen species by ferritin. *Biochim Biophys Acta*, 1289, 238-246.
- Rapoport, R., Sklan, D. and Hanukoglu, I. (1995) Electron leakage from the adrenal cortex mitochondrial P450<sub>scc</sub> and P450<sub>c11</sub> systems: NADPH and steroid dependence. *Arch Biochem Biophys*, 317, 412-416.
- Rathaus, M. and Bernheim, J. (2002) Oxygen species in the microvascular environment: regulation of vascular tone and the development of hypertension. *Nephrol Dial Transplant*, 17, 216-221.
- Reed, J.C. (1994) Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol*, 124, 1-6.
- Riley, J.C. and Behrman, H.R. (1991) Oxygen radicals and reactive oxygen species in reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med*, 198, 781-791.
- Rodriguez-Menocal, L. and D'Urso, G. (2004) Programmed cell death in fission yeast. *FEMS Yeast Res*, 5, 111-117.
- Rosler, A., Leiberman, E. and Cohen, T. (1992) High frequency of congenital adrenal hyperplasia (classic 11 beta-hydroxylase deficiency) among Jews from Morocco. *Am J Med Genet*, 42, 827-834.
- Ross, J.T., McMillen, I.C., Adams, M.B. and Coulter, C.L. (2000) A premature increase in circulating cortisol suppresses expression of 11beta hydroxysteroid dehydrogenase type 2 messenger ribonucleic acid in the adrenal of the fetal sheep. *Biol Reprod*, 62, 1297-1302.
- Rota, C., Chignell, C.F. and Mason, R.P. (1999a) Evidence for free radical formation during the oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2',7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. *Free Radic Biol Med*, 27, 873-881.
- Rota, C., Fann, Y.C. and Mason, R.P. (1999b) Phenoxyl free radical formation during the oxidation of the fluorescent dye 2',7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase. Possible consequences for oxidative stress measurements. *J Biol Chem*, 274, 28161-28168.
- Ryser, S., Vial, E., Magnenat, E., Schlegel, W. and Maundrell, K. (1999) Reconstitution of caspase-mediated cell-death signalling in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet*, 36, 21-28.

- Sailer, B.L., Jost, L.K. and Evenson, D.P. (1995) Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J Androl*, 16, 80-87.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Saner, C., Weibel, B., Wurgler, F.E. and Sengstag, C. (1996) Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ Mol Mutagen*, 27, 46-58.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-5467.
- Santos, F.T., Scofano, H.M., Barrabin, H., Meyer-Fernandes, J.R. and Mignaco, J.A. (1999) A novel role of 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid as an activator of the phosphatase activity catalyzed by plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *Biochemistry*, 38, 10552-10558.
- Saran, A., Kumar, U., Shahi, S.K., Rai, H.S. and Jaiswal, C.P. (2000) Evaluation of tumour markers in carcinoma breast. *Indian J Pathol Microbiol*, 43, 437-440.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J*, 17, 1675-1687.
- Schaper, J., Elsasser, A. and Kostin, S. (1999) The role of cell death in heart failure. *Circ Res*, 85, 867-869.
- Schapira, A.H. (1998) Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. *Biochim Biophys Acta*, 1366, 225-233.
- Schiffler, B., Kiefer, M., Wilken, A., Hannemann, F., Adolph, H.W. and Bernhardt, R. (2001) The interaction of bovine adrenodoxin with CYP11A1 (cytochrome P450<sub>sc</sub>) and CYP11B1 (cytochrome P450<sub>11β</sub>). Acceleration of reduction and substrate conversion by site-directed mutagenesis of adrenodoxin. *J Biol Chem*, 276, 36225-36232.
- Schull, B. and Scheithauer, W. (2002) [Raltitrexed and oxaliplatin in colorectal cancer: in vitro and in vivo study of a synergistic cytostatic combination]. *Acta Med Austriaca*, 29, 124-131.
- Sekiguchi, J. and Shuman, S. (1994) Requirements for noncovalent binding of vaccinia topoisomerase I to duplex DNA. *Nucleic Acids Res*, 22, 5360-5365.
- Sherr, C.J. (1994) Growth factor-regulated G1 cyclins. *Stem Cells*, 12 Suppl 1, 47-55; discussion 55-47.
- Shiohara, M., el-Deiry, W.S., Wada, M., Nakamaki, T., Takeuchi, S., Yang, R., Chen, D.L., Vogelstein, B. and Koeffler, H.P. (1994) Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. *Blood*, 84, 3781-3784.

- Skulachev, V.P. (2002) Programmed death in yeast as adaptation? *FEBS Lett*, 528, 23-26.
- Sligar, S.G. and Gunsalus, I.C. (1976) A thermodynamic model of regulation: modulation of redox equilibria in camphor monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73, 1078-1082.
- Smith, F.F. and Scott, J.G. (1997) Functional expression of house fly (*Musca domestica*) cytochrome P450 CYP6D1 in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Insect Biochem Mol Biol*, 27, 999-1006.
- Sofia, H.J., Chen, G., Hetzler, B.G., Reyes-Spindola, J.F. and Miller, N.E. (2001) Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res*, 29, 1097-1106.
- Sparkes, R.S., Klisak, I. and Miller, W.L. (1991) Regional mapping of genes encoding human steroidogenic enzymes: P450scc to 15q23-q24, adrenodoxin to 11q22; adrenodoxin reductase to 17q24-q25; and P450c17 to 10q24-q25. *DNA Cell Biol*, 10, 359-365.
- Spoudeas, H.A., Slater, J.D., Rumsby, G., Honour, J.W. and Brook, C.G. (1993) Deoxycorticosterone, 11 beta-hydroxylase and the adrenal cortex. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 39, 245-251.
- St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J. and Brand, M.D. (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem*, 277, 44784-44790.
- Stanford, F.R., Carey, L.C., King, D.R. and Anderson, G.W. (1976) Adverse effects of elemental diets on tolerance for fluorouracil (5-fu) toxicity in rats. *Surg Forum*, 27, 42-43.
- Stanford, J.R., King, D., Carey, L. and Anderson, G. (1977) The adverse effects of elemental diets on tolerance for 5-FU toxicity in the rat. *J Surg Oncol*, 9, 493-501.
- Steller, H. (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, 267, 1445-1449.
- Stratagene. BL21-CodonPlus Competent Cells.
- Stratagene. JM109 Competent Cells.
- Stratagene. Stratagene BL21(DE3) Competent Cells, BL21(DE3)pLysS Competent Cells and BL21 Competent Cells.
- Studier, F.W. (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol*, 219, 37-44.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, 189, 113-130.

- Sugano, S., Morishima, N., Ikeda, H. and Horie, S. (1989) Sensitive assay of cytochrome P450<sub>scc</sub> activity by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, 182, 327-333.
- Sugiyama, T., Miura, R. and Yamano, T. (1979) Differences between the reactivities of two pyridine nucleotides in the rapid reduction process and the reoxidation process of adrenodoxin reductase. *J Biochem (Tokyo)*, 86, 213-223.
- Takekoshi, M. and Hara, T. (1991) High density lipoprotein cholesterol as a mechanistic probe for the side chain cleavage reaction. *Biochem Biophys Res Commun*, 179, 161-169.
- Tamarit, J., Mulliez, E., Meier, C., Trautwein, A. and Fontecave, M. (1999) The anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. The small protein is an activating enzyme containing a [4Fe-4S]<sub>2</sub> center. *J Biol Chem*, 274, 31291-31296.
- Thangaraju, M., Sharma, K., Liu, D., Shen, S.H. and Srikant, C.B. (1999a) Interdependent regulation of intracellular acidification and SHP-1 in apoptosis. *Cancer Res*, 59, 1649-1654.
- Thangaraju, M., Sharma, K., Liu, D., Shen, S.H. and Srikant, C.B. (1999b) Interdependent regulation of intracellular acidification and SHP-1 in apoptosis. *Cancer Res*, 59, 1649-1654.
- Thannickal, V.J. and Fanburg, B.L. (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279, L1005-1028.
- Thomson, A.J., Cammack, R., Hall, D.O., Rao, K.K., Briat, B., Rivoal, J.C. and Badoz, J. (1977) The low temperature magnetic circular dichroism spectra of iron-sulphur proteins. II. Two-iron ferredoxins. *Biochim Biophys Acta*, 493, 132-141.
- Tiezzi, D.G., De Andrade, J.M., Candido dos Reis, F.J., Marana, H.R., Ribeiro-Silva, A., Tiezzi, M.G. and Pereira, A.P. (2006) Apoptosis induced by neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Pathology*, 38, 21-27.
- Tijet, N., Helvig, C. and Feyereisen, R. (2001) The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene*, 262, 189-198.
- Tsai, J.C., Jain, M., Hsieh, C.M., Lee, W.S., Yoshizumi, M., Patterson, C., Perrella, M.A., Cooke, C., Wang, H., Haber, E., Schlegel, R. and Lee, M.E. (1996) Induction of apoptosis by pyrrolidinedithiocarbamate and N-acetylcysteine in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 271, 3667-3670.
- Turrens, J.F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 552, 335-344.
- Ucker, D.S. (1991) Death by suicide: one way to go in mammalian cellular development? *New Biol*, 3, 103-109.

- Uhlmann, H., Beckert, V., Schwarz, D. and Bernhardt, R. (1992) Expression of bovine adrenodoxin in *E. coli* and site-directed mutagenesis of /2Fe-2S/ cluster ligands. *Biochem Biophys Res Commun*, 188, 1131-1138.
- Uhlmann, H., Iametti, S., Vecchio, G., Bonomi, F. and Bernhardt, R. (1997) Pro108 is important for folding and stabilization of adrenal ferredoxin, but does not influence the functional properties of the protein. *Eur J Biochem*, 248, 897-902.
- Uhlmann, H., Kraft, R. and Bernhardt, R. (1994) C-terminal region of adrenodoxin affects its structural integrity and determines differences in its electron transfer function to cytochrome P-450. *J Biol Chem*, 269, 22557-22564.
- Uren, A.G., Beilharz, T., O'Connell, M.J., Bugg, S.J., van Driel, R., Vaux, D.L. and Lithgow, T. (1999) Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 10170-10175.
- Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L.A., Pisabarro, M.T., Seshagiri, S., Koonin, E.V. and Dixit, V.M. (2000) Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell*, 6, 961-967.
- Vaskivuo, T.E., Anttonen, M., Herva, R., Billig, H., Dorland, M., te Velde, E.R., Stenback, F., Heikinheimo, M. and Tapanainen, J.S. (2001) Survival of human ovarian follicles from fetal to adult life: apoptosis, apoptosis-related proteins, and transcription factor GATA-4. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 3421-3429.
- Vidakovic, M.S., Fraczkiwicz, G. and Germanas, J.P. (1996) Expression and spectroscopic characterization of the hydrogenosomal [2Fe-2S] ferredoxin from the protozoan *Trichomonas vaginalis*. *J Biol Chem*, 271, 14734-14739.
- Vinogradov, A.D. and Grivennikova, V.G. (2005) Generation of superoxide-radical by the NADH:ubiquinone oxidoreductase of heart mitochondria. *Biochemistry (Mosc)*, 70, 120-127.
- Voutilainen, R. and Miller, W.L. (1986) Developmental expression of genes for the steroidogenic enzymes P450scc (20,22-desmolase), P450c17 (17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase), and P450c21 (21-hydroxylase) in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab*, 63, 1145-1150.
- Voutilainen, R., Picado-Leonard, J., DiBlasio, A.M. and Miller, W.L. (1988) Hormonal and developmental regulation of adrenodoxin messenger ribonucleic acid in steroidogenic tissues. *J Clin Endocrinol Metab*, 66, 383-388.
- Wada, A. and Waterman, M.R. (1992) Identification by site-directed mutagenesis of two lysine residues in cholesterol side chain cleavage cytochrome P450 that are essential for adrenodoxin binding. *J Biol Chem*, 267, 22877-22882.
- Waldman, T., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1995) p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res*, 55, 5187-5190.
- Wallace, D.C. (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, 283, 1482-1488.

- Wang, Y.L., Liu, Y.C., Yang, Z.S. and Zhao, G.C. (2004) Electrochemical cleavage of DNA in the presence of copper-sulfosalicylic acid complex. *Bioelectrochemistry*, 65, 77-81.
- Watabe, S., Hara, T., Kohno, H., Hiroi, T., Yago, N. and Nakazawa, T. (1993) In vitro degradation of mitochondrial proteins by ATP-dependent protease in bovine adrenal cortex. *J Biochem (Tokyo)*, 113, 672-676.
- Watanabe, N., Broome, M. and Hunter, T. (1995) Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. *Embo J*, 14, 1878-1891.
- Waxman, D.J., Lapenson, D.P., Morrissey, J.J., Park, S.S., Gelboin, H.V., Doehmer, J. and Oesch, F. (1989) Androgen hydroxylation catalysed by a cell line (SD1) that stably expresses rat hepatic cytochrome P-450 PB-4 (IIB1). *Biochem J*, 260, 81-85.
- White, C.R., Brock, T.A., Chang, L.Y., Crapo, J., Briscoe, P., Ku, D., Bradley, W.A., Gianturco, S.H., Gore, J., Freeman, B.A. and et al. (1994) Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 1044-1048.
- Williams, G.T. (1991) Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell*, 65, 1097-1098.
- Wu, P., Guo, Z., Zhang, Y., Liu, Y., Liang, X., Zhang, R., Lai, W., Takeda, Y., Isamu, M. and Takeda, R. (1998) Aldosterone overproduction and CYP11B2 mRNA overexpression in vessels of spontaneously hypertensive rats. *Horm Res*, 50, 28-31.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F. and Currie, A.R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 68, 251-306.
- Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A. and Oren, M. (1991) Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*, 352, 345-347.
- Zeemann, P.a.M.I. (1914) Magneto-optische Untersuchungen m. besond. Berücks. d. magnet. Zerlegung d. Spektrallinien, Leipzig.
- Zhang, Q., Chieu, H.K., Low, C.P., Zhang, S., Heng, C.K. and Yang, H. (2003) *Schizosaccharomyces pombe* cells deficient in triacylglycerols synthesis undergo apoptosis upon entry into the stationary phase. *J Biol Chem*, 278, 47145-47155.
- Ziegler, G.A., Vornrhein, C., Hanukoglu, I. and Schulz, G.E. (1999) The structure of adrenodoxin reductase of mitochondrial P450 systems: electron transfer for steroid biosynthesis. *J Mol Biol*, 289, 981-990.
- Zuber, M.X., Mason, J.I., Simpson, E.R. and Waterman, M.R. (1988) Simultaneous transfection of COS-1 cells with mitochondrial and microsomal steroid hydroxylases: incorporation of a steroidogenic pathway into nonsteroidogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 699-703.

## 7. ANHANG

### A) Sequenzen humaner Adx-Promotor

#### Gesamtsequenz pEDH1 in pGLOW

ACTAGT

```

CATCTTCAGA GAAAGGCATA GAACTGTCTC CTGGGCGTGC ATCCTTAACT TTGGCAAATC
AATCTCCTAA AATGATTGAG AATTGTCTCA TCATTTTTCT CGATTGACAC CTTTATAAAA
GGGTTGGAGG AAATTGGCAT GTTTGCCCTT CTTGCAGCAT GTGAGGACAC AGCAACAGGA
CACCATCTTG GAAGCAGAGA CTGGGCCTCT CTATCAGACA TTAAACCAGT TGGCACCTGG
GCGACCCAGT ATCCAGAACT GTGAGAAAAT AAATTCCTGT TCTTTACACA TTACCCAGTC
TGTGTGTTAT TCTGTTATAG CATCATAAAC AGAATAAGAC AAAAGTCTTC AAACAATGAA
TGGATTTTGA AAGGAGTAAA AGATGGGCTG GGCATGGTGG CTCATGCCTG TAGTCCCGGC
ACTTTGGAAG GCTGAGGTGG GCAGATTGCT TGAGCTCAGG AGTTCCAGAC TAGCCTGGGC
AACATGGCAA AACCCCATCT CTAAGGAAAA AAAGAAAAAA AAAGGGATGG AGGGGTGGGA
GTTTTATAGA CAAAGAAATA CATAAGCAA CAGATAAGCA AAAGCACGTC CTCAGTAATT
CCATGTTGCT TTATCTGTAT TCATGATCAT GTTTACAAAT CCATTCTGGA ATTCTGCTGA
CTACTGATAT TTGCAATTTT TGGCATTACT TCTCATCCAC CTTAGAAAAC CTGGAGAACA
TTTTTTCTAT CTTTAATCTT CATATACATG CTTAATGAAT TCTGATGATT ATTAATGGAA
ATTTCATAAC ATCAATTTAT TCACCAATAT TTATTAGACC CTTGATATGT TCAAGACCCT
GTAGCTGGTG CTGTCGGAGT CACTAAGATG AACTATATAA ATAACTACTC TATGTGTACG
AATAACTACC CTACAAAGCA GAAAGCTATC AAGTGCCTTA AGGGAGTTGA AACTGTATTT
GCTACAGGAG GGCTGAGAGA AGACAGAACA TCTACGATTT TTTTTCTTTT CAATTCTCTT
CCTACAATA ATTCAATCCGA CTTTGGGAAGT TTGGTCTTAC TAAAAACAAA AGTTAGCTGT
TCTTTTACAA CCTCCTCTTC AAGATTACTT GTCAGGGTTT GCTGTGCCCT TCGCAGCTTG
AAAGACTTTC TCTTCATCCA ACGATTTGAG GCAATTAGGA GCCACTGCC TCTCTCTGCC
ATTGGGTTCC AGAAAGCACC ATACATTGTC CGCAGATACT TTAICTCATGC TTACACTTTC
TTGTCTGAA TCTTCAAAAA TTAGTGGCGT GTGGTGGCAC ACGCCTGTAG TCCTAGCTAC
TCGGGAGGCT GAGGCAGGAG AATCACTTGA ACCTGGGAGG CGGAGGTTGC AGTGAGCCGA
GATTTGCGCA CTGCACTACA GCCTGGGCAG AATAGAGAGA CCCCATGTCA AAAAAAGAAA
AAAAAAGTAT CTGATTGTGT TTAGCATATC TGCAATATCC CTTTGACTTT GGCCTTTAGC
CTCTTTATGA GTACCTGTAT GGAGGAAGGC CCAGGAAGCG GTAGCCTTCC TGGTTTGTGA
CGCACGGTGT GCATTGCGTA TTAGATTAAC ATCAGAATGG CCCTGAAGGC TGGAACATCT
TATCTGTGTT TGAGAGTTAT GGAAACTCTG ATCCTCCATG AGAATAAATT TTCCAAGGTC
TCAGATCTCT AAAGCAGTAG ATCTTGGATC TGAACATTGC TATTTCTGAC CTTAAAGCCC
ATGCATTTCC CACAACATAT GAACCATGAT AAGGTGTATT TTAAAGTTCA TCTTTTCTGT
TTTTTGTGAA AGTCTTTTGTAG AGATCTCAGC TCATCACAAA GTTTCCGGTT CAGTCTCGTG
GGTTTCATGT ACTCAGCCAG CATTTACTTG CCAGTCAAGG TCTAGGATGG CTACCTGTCC
TCTGCAGGAG CCCCAAGCCT ATTCATTAAT TTCATTTACA ATTTTATAGT CATAATTATT
TCTTTGTATA ATAGCATTCT GAGATTTTCC AAAATTTCCC ACTGTTTTTG TTTTACAGTG
GGCAGAATTC ACTTTGCTCT AACTTGACTC CAAGATGACA CAATTTCCCA GTTTTTTTTT
TAACGGCTAG GGGATGGGGG TATGCGGAAC AGAACACAGT GGTCTAGCTA ACCGATTTCC
GCTAGACGTC CAGCTATCTT TCAAAATATT TTGTTTCTGC ACGGCAACTT CAGCCGCTAA
AAAAGCATCC AGCTTACAAC GGAACCTGGA GGGTTGGTAA AGGCCCCCTG CGCTGGCCCC
GCCCCATGGG ACCGGGCGGC GTGGGCGTGA GAGGCGGGGC GGGGCCGCGC TCTGCTTGCC
AATGTCTTTA TAGGTCACCC GGAAGGCACG CGGAACCTCG GCGCGGTGCT TCCAGCAGGG
TCTCTCCGCC ACTCCAGCCC CGCGCCCCTC GCCGCGGCC TCGGGCGTCT GCGCCGCAGC
TGCCGCCCCC GCTCTTTTGG AGTCTCTCGC GGCCTCAAAG CGCGGCCTGC GTCGCTTCCG
GCAGTTCCCG ACCGCGGGCG ATGC

```

**Gesamtsequenz pEDH2 in pcDNA3.1-GFP**

ACTAGT

CATCTTCAGA GAAAGGCATA GAACTGTCTC CTGGGCGTGC ATCCTTAACT TTGGCAAATC  
 AATCTCCTAA AATGATTGAG AATTGTCTCA TCATTTTTCT CGATTGACAC CTTTATAAAA  
 GGGTTGGAGG AAATTGGCAT GTTTGCCCTT CTTGCAGCAT GTGAGGACAC AGCAACAGGA  
 CACCATCTTG GAAGCAGAGA CTGGGCCTCT CTATCAGACA TTAACCAGT TGGCACCTGG  
 GCGACCCAGT ATCCAGAACT GTGAGAAAAT AAATTCCTGT TCTTTACACA TTACCCAGTC  
 TGTGTGTTAT TCTGTTATAG CATCATAAAC AGAATAAGAC AAAAGTCTTC AAACAATGAA  
 TGGATTTTGA AAGGAGTAAA AGATGGGCTG GGCATGGTGG CTCATGCCTG TAGTCCCGGC  
 ACTTTGGAAG GCTGGGGTGG GCAGATTGCT TGAGCTCAGG AGTTCCAGAC TAGCCTGGGC  
 AACATGGCAA AACCCCATCT CTAAGGAAAA AAAGAAAAAA AAAGGGATGG AGGGGTGGGA  
 GTTTTATAGA CAAAGAAATA CATAAGCAAA CAGATAAGCA AAAGCACGTC CTCAGTAATT  
 CCATGTTGCT TTATCTGTAT TCATGATCAT GTTTACAAAAT CCATTCTGGA ATTCTGCTGA  
 CTA CTACTGATAT TTGCAATTTT TGGCATTACT TCTCATCCAC CTTAGAAAAC CTGGAGAACA  
 TTTTCTCTAT CTTTAATCTT CATATACATG CTTAATGAAT TCTGATGATT ATTAATGGAA  
 ATTTCATAAC ATCAATTTAT TCACCAATAT TTATTAGACC CTTGATATGT TCAAGACCCT  
 GTAGCTGGTG CTGTCGGAGT CACTAAGATG AACTATATAA ATA ACTACTC TATGTGTACG  
 AATAACTACC CTACAAAGCA GAAAGCTATC AAGTGCCTTA AGGGAGTTGA AACTGTATTT  
 GCTACAGGAG GGCTGAGAGA AGACAGAACA TCTACGATTT TTTTCTTTT CAATTCTCTT  
 CCTACAATA ATT CATCCGA CCTTGGAAGT TTGGTCTTAC TAAAAACAAA AGTTAGCTGT  
 TCTTTTACAA CCTCCTCTTC AAGATTACTT GTCAGGGTTT GCTGTGCCCT TCGCAGCTTG  
 AAAGACTTTC TCTTCATCCA ACGATTTGAG GCAATTAGGA GCCACTGCCT TCTCTCTGCC  
 ATTGGGTTCC AGAAAGCACC ATACATTGTC CGCAGATACT TTACTCATGC TTACTTTTC  
 TTGTTCTGAA TCTTCAAAAA TTAGTGGCGT GTGGTGGCAC ACGCCTGTAG TCCTAGCTAC  
 TCGGGAGGCT GAGGCAGGAG AATCACTTGA ACCTGGGAGG CGGAGGTTGC AGTGAGCCGA  
 GATTTGCCCA CTGCACTACA GCCTGGGCAG AATAGAGAGA CCCCATGTCA AAAAAAGAAA  
 AAAAAAGTAT CTGATTGTGT TTAGCATATC TGCAATATCC CTTTGACTTT GGCCTTTAGC  
 CTCTTTATGA GTACCCTGAT GGAGGAAGGC CCAGGAAGCG GTAGCCTTCC TGGTTTGTGA  
 CGCACGGTGT GCATTGCGTA TTAGATTAAC ATCAGAATGG CCCTGAAGGC TGGAACATCT  
 TATCTGTGTT TGAGAGTTAT GGAACTCTG ATCCTCCATG AGAATAAATTT TTCCAAGGTC  
 TCAGATCTCT AAAGCAGTAG ATCTTGGATC TGAACATTGC TATTTCTGAC CTTAAAGCCC  
 ATGCATTTCC CACAACATAT GAACCATGAT AAGGTGTATT TTAAAGTTCA TCTTTTCTGT  
 TTTTGTGAA AGTCTTTTAG AGATCTCAGC TCATCACAAA GTTTCCGGTT CAGTCTCGTG  
 GGTTCATGT ACTCAGCCAG CATTTACTTG CCAGTCAAGG TCTAGGATGG CTACCTGTCC  
 TCTGCAGGAG CCCCAAGCCT ATTCATTAAT TTCATTTACA ATTTTATAGT CATAATTATT  
 TCTTTGTATA ATAGCATTCT GAGATTTTCC AAAATTTCCC ACTGTTTTTG TTTTACAGTG  
 GGCAGAATTC ACTTTGCTCT AACTTGA CTC CAAGATGACA CAATTTCCA GTTTTTTTTT  
 TAACGGCTAG GGGATGGGGG TATGCGGAAC AGAACACAGT GGTCTAGCTA ACCGATTTCC  
 GCTAGACGTC CAGCTATCTT TCAAAATATT TTGTTTCTGC ACGGCAACTT CAGCCGCTAA  
 AAAAGCATCC AGCTTACAAC GGAACCTGGA GGGTTGGTAA AGGCCCCCTG CGCTGGCCCC  
 GCCCATGGG ACCGGGCGGC GTGGGCGTGA GAGGCGGGGC GGGGCCGCGC TCTGCTTGCC  
 AATGCTTTTA TAGGTCACCC GGAAGGCACG CGGAACCTCG GCGCGGTGCT TCCAGCAGGG  
 TCTCTCCGCC ACTCCAGCCC CGCGCCCCTC GCCGCGGCC TCGGGCGTCT GCGCCGCAGC  
 TGCCGCCCCC GCCTCTTTGG AGTCTCTCGC GGCCTCAAAG CGCGGCCTGC GTGCTTCCG  
 GCAGTTCCCG ACCGCGGGCG ATG C

**Gesamtsequenz pEDH3 in pGLOW****ACTAG**

TCATCTTCAG AGAAAGGCAT AGAACTGTCT CCTGGGCGTG CATCCTTAAC TTTGGCAAAT  
 CAATCTCCTA AAATGATTGA GAATTGTCTC ATCATTTTTC TCGATTGACA CCTTTATAAA  
 AGGGTTGGAG GAAATTGGCA TGTTTGCCCT TCTTGCAGCA TGTGAGGACA CAGCAACAGG  
 ACACCATCTT GGAAGCAGAG ACTGGGCCTC TCTATCAGAC ATTAACCAG TTGGCACCTG  
 GCGGACCCAG TATCCAGAAC TGTGAGAAAA TAAATTCCTG TTCTTTACAC ATTACCCAGT  
 CTGTGTGTTA TTCTGTTATA GCATCATAAA CAGAATAAGA CAAAAGTCTT CAAACAATGA  
 ATGGATTTTG AAAGGAGTAA AAGATGGGCT GGGCATGGTG GCTCATGCCT GTAGTCCCGG  
 CACTTTGGAA GGCTGAGGTG GGCAGATTGC TTGAGCTCAG GAGTTCCAGA CTAGCCTGGG  
 CAACATGGCA AAACCCCATC TCTAAGGAAA AAAAGAAAA AAAAGGGATG GAGGGGTGGG  
 AGTTTATAG ACAAAGAAAT ACATAAGCAA ACAGATAAGC AAAAGCACGT CCTCAGTAAT  
 TCCATGTTGC TTTATCTGTA TTCATGATCA TGTTTACAAA TCCATTCTGG AATTCTGCTG  
 ACTACTGATA TTTGCAATTT TTGGCATTAC TTCTCATCCA CCTTAGAAAA CCTGGAGAAC  
 ATTTTTTCTA TCTTTAATCT TCATATACAT GCTTAATGAA TTCTGATGAT TATTAATGGA  
 AATTTCATAA CATCAATTTA TTCACCAATA TTTATTAGAC CCTTGATATG TTCAAGACCC  
 TGTAGCTGGT GCTGTCGGAG TCAC TAAGAT GAACTATATA AATAACTACT CTATGTGTAC  
 GAATAACTAC CCTACAAAGC AGAAAGCTAT CAAGTGCCTT AAGGGAGTTG AAACGTGATT  
 TGCTACAGGA GGGCTGAGAG AAGACAGAAC ATCTACGATT TTTTTTCTTT TCAATTCTCT  
 TCCTACAAC AATTCATCCG ACCTTGAAG TTTGGTCTTA CTAAAAAAA AAGTTAGCTG  
 TTCTTTTACA ACCTCCTCTT CAAGATTACT TGTCAGGGTT TGCTGTGCC TTTCGAGCTT  
 GAAAGACTTT CTCTTCATCC AACGATTTGA GGCAATTAGG AGCCACTGCC TTCTCTCTGC  
 CATTGGGTTT CAGAAAGCAC CATACTTGT CCGCAGATAC TTTACTCATG CTTACACTTT  
 CTTGTTCTGA ATCTTCAAAA ATTAGTGGCG TGTGGTGGCA CACGCCTGTA GTCCTAGCTA  
 CTCGGGAGGC TGAGGCAGGA GAATCACTTG AACCTGGGAG GCGGAGGTTG CAGTGAGCCG  
 AGATTTGCGC ACTGCACAC AGCCTGGGCA GAATAGAGAG ACCCCATGTC AAAAAAGAA  
 AAAAAAGTA TCTGATTGTG TTTAGCATAT CTGCAATATC CCCTTGACTT TGGCCTTTAG  
 CCTCTTTATG AGTACCCTGA TGGAGGAAG CCCAGGAAGC GGTAGCCTTC CTGGTTTGTG  
 ACGCACGGTG TGCATTGCGT ATTAGATTAA CATCAGAATG GCCCTGAAGG CTGGAACATC  
 TTATCTGTGT TTGAGAGTTA TGGAACTCT GATCCTCCAT GAGAATAAAT TTTCCAAGGT  
 CTCAGATCTC TAAAGCAGTA GATCTTGGAT CTGAACATTG CTATTTCTGA CCTTAAAGCC  
 CATGCATTTT CCACAACATA TGAACCATGA TAAGGTGTAT TTTAAAGTTC ATCTTTTCTG  
 TTTTTTGTGA AAGTCTTTTA GAGATCTCAG CTCATCACAA AGTTTCCGGT TCAGTCTCGT  
 GGGTTTCATG TACTCAGCCA GCATTTACTT GCCAGTCAAG GTCTAGGATG GCTACCTGTC  
 CTCTGCAGGA GCCCAAGCC TATTCATTAA TTTCAATTAC AATTTTATAG TCATAATTAT  
 TTCTTTGTAT AATAGCATTG TGAGATTTTC CAAAATTTCC CACTGTTTTT GTTTTACAGT  
 GGGCAGAATT CACTTTGCTC TAACTTGACT CCAAGATGAC ACAATTTCC AGTTTTTTTT  
 TTAACGGCTT GGGGATGGGG GTATGCGGAA CAGAACACAG TGGTCTAGCT AACCATTTC  
 CGCTAGACGT CCAGCTATCT TTCAAATAT TTTGTTTCTG CATGGCAACT TCAGCCGCTA  
 AAAAAGCATC CAGCTTACAA CGGAACCTGG AGGGTTGGTA AAGGCCCCCT GCGCTGGCCC  
 CGCCCATGG GACCGGGCGG CGTGGGCGTG AGAGGCGGGG CGGGGCCGCG CTCTGCTTGC  
 CAATGTCTTT ATAGGTCACC CGGAAGGCAC GCGGAACCTC GGCGCGGTGC TTCCAGCAGG  
 GTCTCTCCGC CACTCCAGCC CCGCGCCCTT CGCCGCGGCC CTCGGGCGTC TGCGCCGCAG  
 CTGCCGCCCC CGCTCTTTG GAGTCTCTCG CGGCCTCAAA GCGCGGCCTG CGTCGCTTCC  
 GGCAGTTCCT GACCGCGGGC GATGC

**Gesamtsequenz pEDH4 in pcDNA3.1-GFP**

ACTAGT

```

CATCTTCAGA GAAAGGCATA GAACTGTCTC CTGGGCGTGC ATCCTTAACT TTGGCAAATC
AATCTCCTAA AATGATTGAG AATTGTCTCA TCATTTTCTT CGATTGACAC CTTTATAAAA
GGGTTGGAGG AAATTGGCAT GTTTGCCCTT CTTGCAGCAT GTGAGGACAC AGCAACAGGA
CACCATCTTG GAAGCAGAGA CTGGGCCTCT CTATCAGACA TTAAACCAGT TGGCACCTGG
GCAAACCCAGT ATCCAGAACT GTGAGAAAAT AAATTCCTGT TCTTTACACA TTACCCAGTC
TGTGTGTTAT TCTGTTATAG CATCATAAAC AGAATAAGAC AAAAGTCTTC AAACAATGAA
TGGATTTTGA AAGGAGTAAA AGATGGGCTG GGCATGGTGG CTCATGCCTG TAGTCCCGGC
ACTTTGGAAG GCTGAGGTGG GCAGATTGCT TGAGCTCAGG AGTTCCAGAC TAGCCTGGGC
AACATGGCAA AACCCCATCT CTAAGGAAAA AAAGAAAAAA AAAGGGATGG AGGGGTGGGA
GTTTTATAGA CAAAGAAATA CATAAGCAA CAGATAAGCA AAAGCACGTC CTCAGTAATT
CCATGTTGCT TTATCTGTAT TCATGATCAT GTTTACAAAAT CCATTCTGGA ATTCTGCTGA
CTACTGATAT TTGCAATTTT TGGCATTACT TCTCATCCAC CTTAGAAAAC CTGGAGAACA
TTTTTTCTAT CTTTAATCTT CATATACATG CTTAATGAAT TCTGATGATT ATTAATGGAA
ATTTCATAAC ATCAATTTAT TCACCAATAT TTATTAGACC CTTGATATGT TCAAGACCCT
GTAGCTGGTG CTGTCGGAGT CACTAAGATG AACTATATAA ATAACTACTC TATGTGTACG
AATAACTACC CTACAAAGCA GAAAGCTATC AAGTGCCTTA AGGGAGTTGA AACTGTATTT
GCTACAGGAG GGCTGAGAGA AGACAGAACA TCTACGATTT TTTTTCTTTT CAATTCTCTT
CCTACAATA ATTCAATCCGA CCTTGGAAGT TTGGTCTTAC TAAAAAAAAA AGGTTAGCTG
TTCTTTTACA ACCTCCTCTT CAAGATTACT TGTCAGGGTT TGCTGTGCC TTTCGAGCTT
GAAAGACTTT CTCTTCATCC AACGATTTGA GGCAATTAGG AGCCACTGCC TTCTCTCTGC
CATTGGGTTT CAGAAAGCAC CATACTTGT CCGCAGATAC TTTACTCATG CTTACACTTT
CTTGTTCTGA ATCTTCAAAA ATTAGTGGCG TGTGGTGGCA CACGCCTGTA GTCCTAGCTA
CTCGGGAGGC TGAGGCAGGA GAATCACTTG AACCTGGGAG GCGGAGGTTG CAGTGAGCCG
AGATTTGCGC ACTGCACTAC AGCCTGGGCA GAATAGAGAG ACCCCATGTC AAAAAAAGAA
AAAAAAGTA TCTGATTGTG TTTAGCATAT CTGCAATATC CCCTTGACTT TGGCCTTTAG
CCTCTTTATG AGTACCCTGA TGGAGGAAGG CCCAGGAAGC GGTAGCCTTC CTGGTTTGTG
ACGCACGGTG TGCATTGCGT ATTAGATTAA CATCAGAATG GCCCTGAAGG CTGGAACATC
TTATCTGTGT TTGAGAGTTA TGGAACTCT GATCCTCCAT GAGAATAAAT TTTCCAAGGT
CTCAGATCTC TAAAGCAGTA GATCTTGGAT CTGAACATTG CTATTTCTGA CCTTAAAGCC
CATGCATTTT CCACAACATA TGAACCATGA TAAGGTGTAT TTTAAAGTTC ATCTTTTCTG
TTTTTTGTGA AAGTCTTTTA GAGATCTCAG CTCATCACAA AGTTTCCGGT TCAGTCTCGT
GGGTTTCATG TACTCAGCCA GCATTTACTT GCCAGTCAAG GTCTAGGATG GCTACCTGTC
CTCTGCAGGA GCCCAAGCC TATTCATTAA TTTCAATTTAC AATTTTATAG TCATAATTAT
TTCTTTGTAT AATAGCATTG TGAGATTTTC CAAAATTTCC CACTGTTTTT GTTTTACAGT
GGGCAGAATT CACTTTGCTC TAACTTGACT CCAAGATGAC ACAATTTCCC AGTTTTTTTT
TTAACGGCTA GGGGATGGGG GTATGCGGAA CAGAACACAG TGGTCTAGCT AACCATTTC
CGCTAGACGT CCAGCTATCT TTCAAATAT TTTGTTTTCTG CACGGCAACT TCAGCCGCTA
AAAAAGCATC CAGCTTACAA CGGAACCTGG AGGGTTGGTA AAGGCCCCCT GCGCTGGCCC
CGCCCCATGG GACCGGGCGG CGTGGGCGTG AGAGGCGGGG CGGGGCCGCG CTCTGCTTGC
CAATGTCTTT ATAGGTCACC CGGAAGGCAC GCGGAACCTC GGCGCGGTGC TTCCAGCAGG
GTCTCTCCGC CACTCCAGCC CCGCGCCCTT CGCCGCGGCC CTCGGGCGTC TGCGCCGCAG
CTGCCGCCCC CGCTCTTTTG GAGTCTCTCG CGGCCTCAAA GCGCGGCCTG CGTCGCTTCC
GGCAGTTCCT GACCGCGGGC G ATG C

```

Legende :  Deletion Punktmutation Insertion → Punktmutation mit Leserasterverschiebung

## B) Primer zur Amplifikation des humanen Adx-Promotor

### ACTAGT

**CATCTTCAGAGAAAGGCATAGAAGTGTCTCCTGGGCG** TGCATCCTTAACTTTGGCAAATC -2481  
 AATCTCCTAAAATGATTGAGAATTGTCTCATCATTTTTCTCGATTGACACCTTTATAAAA -2421  
 GGGTTGGAGGAAATTGGCATGTTTGCCCTTCTTGACAGCATGTGAGGACACAGCAACAGGA -2361  
 CACCATCTTGAAGCAGAGACTGGGCCTCTCTATCAGACATTAACCAGTTGGCACCTGG -2301  
 GCGACCCAGTATCCAGAAGTGTGAGAAAATAAATTCCTGTTCTTTACACATTACCCAGTC -2241  
 TGTGTGTTATTCTGTTATAGCATCATAAACAGAATAAGACAAAAGTCTTCAAACAATGAA -2181  
 TGGATTTTTGAAAGGAGTAAAAGATGGGCTGGGCATGGTGGCTCATGCCGTGTAGTCCCGC -2121  
 ACTTTGGAAGGCTGAGGTGGGCAGATTGCTTGAGCTCAGGAGTTCCAGACTAGCCTGGGC -2061  
 AACATGGCAAAACCCCATCTCTAAGGAAAAAAGAAAAAAGGATGGAGGGGTGGGA -2001  
 GTTTTATAGACAAAGAAATACATAAGCAAACAGATAAGCAAAGCACGTCCCTCAGTAATT -1941  
**CCATGTTGCTTTAT** CTGTATTTCATGATCATGTTTACAAATCCATTCTGGAATTCTGCTGA -1881  
 CTACTGATATTTGCAATTTTTGGCATTACTTCTCATCCACCTTAGAAAACCTGGAGAACA -1821  
 TTTTTTCTATCTTTAATCTTTCATATACATGCTTAATGAATTCTGATGATTATTAATGGAA -1761  
 ATTTTCATAACATCAATTTATTACCAATATTTATTAGACCCCTTGATATGTTCAAGACCCCT -1701  
 GTAGCTGGTGTGTGCGGAGTCACTAAGATGAACTATATAAATAACTACTCTATGTGTACG -1641  
 AATAACTACCCTACAAAGCAGAAAGCTATCAAGTGCCTTAAGGGAGTTGAAACTGTATTT -1581  
 GCTACAGGAGGGCTGAGAGAAGACAGAACATCTACGATTTTTTTTTCTTTTCAATTCTC**TT** -1521  
**CCTACAACCTAATTCATCCGACCTTGGAAAGTTGG** TCTTACTAAAAACAAAAGTTAGCTGT -1461  
 TCTTTTACAACCTCCTCTTCAAGATTACTTGTGTCAGGGTTTGTGTCGCCCTTCGCAGCTTG -1401  
 AAAGACTTTCTCTTCATCCAACGATTTGAGGCAATTAGGACCACTGCCTTCTCTCTGCC -1341  
 ATTGGGTTCCAGAAAGCACCATAACATTGTCCGAGATACTTTACTCATGCTTACACTTTTC -1281  
 TTGTTCTGAATCTTCAAAAATTAGTGGCGTGTGGTGGCACACGCCTGTAGTCTTAGCTAC -1221  
 TCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCACTTGAACCTGGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCCGA -1121  
 GATTTCCGCACTGCACTACAGCCTGGGCAGAATAGAGAGACCCCATGTCAAAAAAGAAA -1101  
 AAAAAAGTATCTGATTGTGTTTAGCATATCTGCAATATCCCTTGACTTTGGCCTTTAGC -1041  
 CTCTTTATGAGTAC **CCTGATGGAGGAAGGCCAGGAAGCG** GTAGCCTTCTGGTTTGTGA - 981  
 CGCACGGTGTGCATTGCGTATTAGATTAACATCAGAATGGCCCTGAAGGCTGGAACATCT - 921  
 TATCTGTGTTTGGAGAGTTATGGAACTCTGATCCTCCATGAGAATAATTTTTCCAAGGTC - 861  
 TCAGATCTCTAAAGCAGTAGATCTTGATCTGAACATTGCTATTTCTGACCTTAAAGCCC - 801  
 ATGCATTTCCCAACATATGAACCATGATAAGGTGTATTTTTAAAGTTCATCTTTTCTGT - 741  
 TTTTTGTGAAAGTCTTTTAGAGATCTCAGCTCATCAAAAGTTTCCGGTTCAGTCTCGTG - 681  
 GGTTCATGTACTCAGCCAGCATTTACTTGCCAGTCAAGGTCTAGGATGGCTACCTGTCC - 621  
 TCTGCAGGAGCCCCAAGCCTATTCATTAATTTCAATTTACAATTTTATAGTCATAATTAAT - 561  
 TCTTTGTATAATAGCATTCTGAGATTTTCCAAAATTTCC **CACTGTTTTTGTTFACAGTG** - 501  
**GGC**AGAATTCACCTTTGCTCTAACTTGACTCCAAGATGACACAATTTCCAGTTTTTTTTT - 441  
 TAACGGCTAGGGGATGGGGTATGCGGAACAGAACACAGTGGTCTAGCTAACCGATTTC - 381  
 GCTAGACGTCCAGCTATCTTTCAAAATATTTTGTCTGCACGGCAACTTCAGCCGCTAA - 321  
 AAAAGCATCCAGCTTACAACGGAACCTGGAGGGTTGGTAAAGGCCCCCTGCGCTGGCCCC - 261  
 GCCCCATGGGACCGGGCGGCGTGGGCGTGAGAGGCGGGGCGGGGCGCGCTCTGCTTGCC - 201  
 AATGTCTTTATAGGTCACCCGGAAGGCACGCGGAACCTCGGCGGGTCTTCCAGCAGGG - 141  
 TCTCTCCGCACTCCAGCCCCGCGCCCTCGCCGCGGCCCTCGGGCGTCTGCGCCGACG - 81  
 TGCCGCCCGCCTCTTTGGAGTCTCTCGCGGCCCTCAAAGCGCGGCTGCGTCTGCTCCG - 21  
 GCAGTTCCCGACCGCGGGCG **ATG C**

Legende :   
X phAdx PF  
X phAdx pGLOW PR  
X phAdx(2000)  
X phAdx(1500)  
X phAdx(1000)  
X phAdx(500)

P53-Erkennungssequenz: 5'-GGGCATGGTGGCTCATGCC-3'

### C) Vollständige Auflistung der Adrenodoxin SAGE-Tags

Die Tags geben an, in welchen Geweben Adx exprimiert wird.

Library	Total Tags in Library	Tags per 200,000	Color Code
SAGE_Placenta_first_trimester_normal_B_1	89265	47	
SAGE_Liver_normal_B_1	66308	24	
SAGE_Stomach_normal_epithelium_B_body1	24761	24	
SAGE_Breast_carcinoma_CL_MCF7estradiol_10H	59583	23	
SAGE_Breast_carcinoma_CL_MCF7estradiol_3h	59583	23	
SAGE_Placenta_hydatidiform_mole_B_1	101677	23	
SAGE_Placenta_normal_B_1	118083	23	
SAGE_Cartilage_dedifferentiated_chondrosarcoma_metastasis_CL_UIEKO	37747	21	
SAGE_Pancreas_normal_CS_H126	32223	18	
SAGE_Brain_glioblastoma_B_H1371	49338	16	
SAGE_Breast_carcinoma_CL_MCF7control_0h	59877	16	
SAGE_Breast_carcinoma_CL_ZR75_1_estrogen	38797	15	
SAGE_Liver_cholangiocarcinoma_CL_K4	52973	15	
SAGE_Prostate_carcinoma_CL_PC3_Mock	38819	15	
SAGE_Stomach_adenocarcinoma_B_G234	64925	15	
SAGE_Stomach_normal_B_antrum	26653	15	
SAGE_Bone_marrow_normal_AP_CD34+/CD38+/lin+	81595	14	
SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_828	99939	14	
SAGE_Brain_ependymoma_B_1394	56314	14	
SAGE_Brain_glioblastoma_B_R70	99099	14	
SAGE_Heart_normal_B_1	83063	14	
SAGE_Bone_marrow_normal_AP_CD34+/CD38-/lin-	86391	13	
SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_584	103008	13	
SAGE_Pancreas_carcinoma_CL_PL45	29557	13	
SAGE_Brain_astrocytoma_grade_II_B_H501	128309	12	
SAGE_Brain_ependymoma_B_239	46653	12	
SAGE_Brain_medulloblastoma_CL_mhh-1	47858	12	
SAGE_Ovary_carcinoma_CL_ES2-1	31159	12	
SAGE_Pancreas_normal_CS_HX	31985	12	
SAGE_Prostate_normal_B_2	64058	12	

SAGE_Vascular_endothelium_normal_liver_associated_AP_NLEC1	77759	12	
SAGE_Brain_ependymoma_B_H580	68614	11	
SAGE_Thyroid_follicular_adenoma_B_TT005	101578	11	
SAGE_Breast_fibroadenoma_MD	55883	10	
SAGE_Lung_tumor_associated_chronic_inflammation_B_UIHMO	98962	10	
SAGE_Brain_ependymoma_B_R628	120431	9	
SAGE_Brain_medulloblastoma_B_H306	60454	9	
SAGE_Brain_medulloblastoma_CL_H341	43920	9	
SAGE_Breast_carcinoma_CL_ZR75_1_tamoxifen	40052	9	
SAGE_Colon_adenocarcinoma_CL_Caco2	60682	9	
SAGE_Embryonic_stem_cell_BG01_normal_p20_CL_SHE19	201668	9	
SAGE_Fibroblasts_CL_postcrisis	21833	9	
SAGE_Kidney_carcinoma_B_D2	100281	9	
SAGE_Lung_normal_B_1	88708	9	
SAGE_Ovary_carcinoma_CL_A2780	21369	9	
SAGE_Prostate_carcinoma_CL_LNCaP_no-DHT	62160	9	
SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_R140	118733	8	
SAGE_Brain_normal_thalamus_B_1	24015	8	
SAGE_Breast_metastatic_carcinoma_B_95-260	45087	8	
SAGE_Colon_normal_B_NC1	49610	8	
SAGE_Kidney_embryonic_CL_293+beta-catenin	23519	8	
SAGE_Liver_cholangiocarcinoma_B_K2D	46853	8	
SAGE_Ovary_normal_CL_IOSE29EC-11	47159	8	
SAGE_Stomach_normal_MD_14S	73353	8	
SAGE_Brain_astrocytoma_grade_II_B_H388	106285	7	
SAGE_Brain_glioblastoma_B_R336	102322	7	
SAGE_Brain_normal_peds_cortex_B_H1571	77554	7	
SAGE_Brain_oligodendroglioma_B_H988	27864	7	
SAGE_Cartilage_chondrosarcoma_grade_2_CL_UIFU0	75019	7	
SAGE_Cartilage_dedifferentiated_chondrosarcoma_metastasis_CL_UIGPO	108319	7	
SAGE_Vascular_endothelium_hemangioma_B_146	75680	7	
SAGE_White_Blood_Cells_monocyte_depleted_mononuclear_cells_normal_AP_A1	54230	7	
SAGE_White_Blood_Cells_monocyte_depleted_mononuclear_cells_normal_AP_P1	51900	7	
SAGE_Brain_ependymoma_B_R1023	122690	6	

SAGE_Brain_glioblastoma_B_H1353	124805	6	
SAGE_Brain_medulloblastoma_B_98-04-P117	32570	6	
SAGE_Brain_meningioma_grade_III_B_SF2366	59786	6	
SAGE_Breast_normal_myoepithelium_AP_myoepithelial1	57222	6	
SAGE_Cartilage_chondrosarcoma_grade_1_CL_UIICO	33081	6	
SAGE_Colon_adenocarcinoma_CL_SW837	61148	6	
SAGE_Peritoneum_mesothelioma_B_12	32529	6	
SAGE_Prostate_carcinoma_B_pool2	66034	6	
SAGE_Prostate_carcinoma_CL_LNCaP	60250	6	
SAGE_Stomach_adenocarcinoma_MD_HG7	93714	6	
SAGE_Vascular_endothelium_breast_carcinoma_associated_AP_DCIS6	65314	6	
SAGE_Vascular_normal_CS_VEGF+	57316	6	
SAGE_Brain_ependymoma_B_R512	75379	5	
SAGE_Breast_carcinoma_B_95-259	39364	5	
SAGE_Breast_carcinoma_epithelium_AP_IDC7	73410	5	
SAGE_Breast_normal_epithelium_AP_Br_N	37121	5	
SAGE_Breast_normal_stroma_AP_1	79152	5	
SAGE_Cartilage_chondrosarcoma_grade_2_CL_UIGEO	77757	5	
SAGE_Embryonic_stem_cell_H13_normal_p22_CL_SHE15	221101	5	
SAGE_Lung_adenocarcinoma_B_1	36325	5	
SAGE_Brain_astrocytoma_grade_II_B_H563	88568	4	
SAGE_Brain_glioblastoma_CS_TA2	46678	4	
SAGE_Brain_medulloblastoma_B_98-04-P494	43068	4	
SAGE_Brain_medulloblastoma_B_98-09-P558	85984	4	
SAGE_Brain_medulloblastoma_B_DL5	83671	4	
SAGE_Breast_carcinoma_CL_MDA435C	47270	4	
SAGE_Breast_carcinoma_CL_MDA435H48	40323	4	
SAGE_Cartilage_dedifferentiated_chondrosarcoma_metastasis_CL_UIFKO	85944	4	
SAGE_Cartilage_dedifferentiated_chondrosarcoma_metastasis_CL_UIGXO	88439	4	
SAGE_Embryonic_stem_cell_H7_normal_p33_CL_SHE13	272465	4	
SAGE_Embryonic_stem_cell_HES4_normal_p36_CL_SHE11	209232	4	
SAGE_Kidney_embryonic_CL_293-control	41955	4	
SAGE_Lung_normal_CL_L15	42226	4	
SAGE_Ovary_adenocarcinoma_B_OVT-6	41443	4	

SAGE_Ovary_normal_CS_HOSE_4	47728	4	
SAGE_Prostate_carcinoma_CL_LNCaP-C	40029	4	
SAGE_Prostate_carcinoma_CL_LNCaP-T	43542	4	
SAGE_Prostate_carcinoma_CL_PC3_AS2	40768	4	
SAGE_Skin_melanoma_B_DB2	41338	4	
SAGE_Thyroid_follicular_carcinoma_B_TT004	124664	4	
SAGE_Brain_astrocyte_normal_CL_NHA5	51481	3	
SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_R927	107344	3	
SAGE_Brain_astrocytoma_grade_II_B_H359	105764	3	
SAGE_Brain_astrocytoma_grade_II_B_H516	108116	3	
SAGE_Brain_ependymoma_B_1150	62373	3	
SAGE_Brain_ependymoma_B_R455	51825	3	
SAGE_Brain_glioblastoma_B_GBM1062	59762	3	
SAGE_Brain_glioblastoma_CL_H392	55990	3	
SAGE_Brain_glioblastoma_CL_H54+EGFRvIII	56982	3	
SAGE_Brain_glioblastoma_control_CL_H247	60428	3	
SAGE_Brain_medulloblastoma_B_H1322	59498	3	
SAGE_Brain_medulloblastoma_CL_4-HCR	66599	3	
SAGE_Brain_medulloblastoma_CL_D283	66316	3	
SAGE_Brain_meningioma_grade_I_B_SF4465	54647	3	
SAGE_Breast_carcinoma_B_DCIS-4	60605	3	
SAGE_Breast_carcinoma_B_IDC-4	64095	3	
SAGE_Breast_carcinoma_B_IDC-5	60451	3	
SAGE_Breast_carcinoma_associated_myofibroblast_AP_IDC7	65091	3	
SAGE_Breast_carcinoma_associated_myofibroblast_AP_T112603	63813	3	
SAGE_Breast_carcinoma_epithelium_AP_DCIS-3	57402	3	
SAGE_Breast_normal_organoid_B	58181	3	
SAGE_Cartilage_dedifferentiated_chondrosarcoma_metastasis_CL_UGDO	109862	3	
SAGE_Colon_adenocarcinoma_B_Tu102	55700	3	
SAGE_Colon_adenocarcinoma_CL_HCT116	55641	3	
SAGE_Colon_adenocarcinoma_CL_RKO	51294	3	
SAGE_Embryonic_stem_cell_H1_normal_p31_CL_SHE17	276203	3	
SAGE_Liver_cholangiocarcinoma_CL_K3	54842	3	
SAGE_Muscle_normal_B_old	53889	3	
SAGE_Muscle_normal_B_young	53947	3	

SAGE_Ovary_cystadenoma_CL_ML10-10	55144	3	
SAGE_Retina_Peripheral_normal_B_1	59661	3	
SAGE_Retina_Peripheral_normal_B_2	105312	3	
SAGE_Spinal_cord_normal_B_1	54785	3	
SAGE_Stomach_adenocarcinoma_MD_HS29	58831	3	
SAGE_Stomach_carcinoma_B_G189	63075	3	
SAGE_Thyroid_normal_B_001	115938	3	
SAGE_Universal_reference_human_RNA_CL	51729	3	
SAGE_White_Blood_Cells_monocyte_normal_AP_P1	102355	3	
SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_H272	96059	2	
SAGE_Brain_ependymoma_B_R510	84073	2	
SAGE_Brain_glioblastoma_B_H1425C	88990	2	
SAGE_Brain_glioblastoma_hypoxia_CL_H247	71765	2	
SAGE_Brain_medulloblastoma_B_97-05-P015	69971	2	
SAGE_Brain_medulloblastoma_B_C609	74612	2	
SAGE_Brain_medulloblastoma_B_H275	72318	2	
SAGE_Breast_carcinoma_B_IDC-3	68891	2	
SAGE_Breast_carcinoma_associated_myofibroblast_AP_T392303	74281	2	
SAGE_Breast_carcinoma_associated_stroma_B_IDC7	68024	2	
SAGE_Breast_carcinoma_epithelium_AP_DCIS6	72857	2	
SAGE_Embryonic_stem_cell_H9_normal_p38_CL_SHES2	401432	2	
SAGE_Embryonic_stem_cell_HSF6_normal_p50_CL_SHES9	224488	2	
SAGE_Eye_lens_B_UIHIO	85898	2	
SAGE_Lymph_Node_normal_B_1	99426	2	
SAGE_Pelvis_mixoid_chondrosarcoma_grade2_B_UIHTO	83577	2	
SAGE_Prostate_normal_epithelium_CS_confluent	71897	2	
SAGE_Stomach_carcinoma_B_xenograft_X101	69749	2	
SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_343	100158	1	
SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_407	108312	1	
SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_439	107824	1	
SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_H970	106982	1	
SAGE_Brain_astrocytoma_grade_II_B_H530	102439	1	
SAGE_Brain_fetal_normal_B_S1	305546	1	
SAGE_Brain_glioblastoma_B_H833	100600	1	
SAGE_Embryonic_stem_cell_H14_normal_p22_CL_SHE14	212170	1	
SAGE_Embryonic_stem_cell_H1_normal_p54_CL_SHE16	218214	1	

---

SAGE_Embryonic_stem_cell_HES3_normal_p16_CL_SHE10	205353	1	
SAGE_Retina_macula_normal_B_HMAC2	102417	1	
SAGE_White_Blood_Cells_monocyte_normal_AP_A1	101085	1	
SAGE_White_Blood_Cells_monocytes_normal_AP_C1	102483	1	

Es wurde dabei folgender TAG verwendet : GATGAGTGGA

<b>Color Code</b>										
<b>Tags per 200,000</b>	<2	<4	<8	<16	<32	<64	<128	<256	<512	>512

## D) Optimierungreport Benoni (ENTELECHON)



**Optimization report**  
Created with Leto 1.0

### Sequence

Below the original sequence and optimized sequence are listed, labelled with 'Org.' and 'Opt.' respectively. Where both are identical, the original sequence contains dots instead of nucleotides ('.'). Where the original sequence was locked against editing, it contains underscores ('\_'). The names of the restriction enzymes start at the first nucleotide after the restriction cut in the forward strand.

```

      5    10    15    20    25    30    35    40    45    50
ORF:  M  G  V  N  I  T  F  V  R  A  N  G  D  K  I  K
Org:  . . . . .
Opt:  CC ATG GGT GTT AAC ATC ACC TTC GTA CGT GCT AAT GGG GAC AAG ATT AAG
      NcoI

      55    60    65    70    75    80    85    90    95
ORF:  T  S  G  E  V  G  D  S  L  L  D  V  V  V  N  N
Org:  . . . . .
Opt:  ACG TCA GGT AAA GTG GGT GAT TCC TTG CTG GAC GTA GTG GTC AAC AAC

    100   105   110   115   120   125   130   135   140   145
ORF:  N  V  D  L  D  G  F  G  A  C  E  G  T  L  T  C
Org:  . . . . .
Opt:  AAT GTT GAT CTC GAT GGG TTT GGT GCA TGT GAA GGC ACG TTA ACC TGT

    150   155   160   165   170   175   180   185   190
ORF:  S  T  C  R  L  I  F  E  T  S  D  F  E  K  L  P
Org:  TCC .C . . . . .
Opt:  AGT ACT TGC CAC CTG ATC TTC AAG ACC AGC GAT TTC GAG AAA CTT CCG

    195   200   205   210   215   220   225   230   235   240
ORF:  D  K  P  G  D  E  E  L  D  M  L  D  L  A  Y  E
Org:  . . . . .
Opt:  GAC AAA CCT GGT GAT GAG GAA CTG GAC ATG CTT GAC TTG GCG TAT GAG

    245   250   255   260   265   270   275   280   285   290
ORF:  L  T  D  T  S  R  L  G  C  Q  I  T  L  S  K  D
Org:  . . . . .
Opt:  CTG ACT GAT ACA TCG CGC CTG GGT TGC CAG ATT ACG CTT AGC AAG GAT

    295   300   305   310   315   320   325   330   335
ORF:  M  E  G  L  E  V  H  V  P  S  T  I  N  D  A  R
Org:  . . . . .
Opt:  ATG GAA GGC TTA GAA GTC CAT GTG CCA TCT ACC ATC AAC GAT GCA CGT

    340   345   350
ORF:  A  A  )
Org:  . . . . .
Opt:  GCC GCG TAA AAGCT T
      HindIII

```

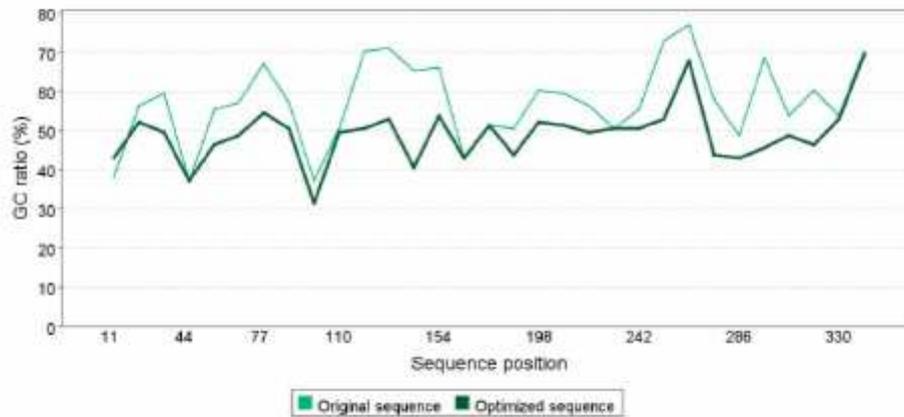
## GC-Distribution

GC ratio:

Original sequence: 56.94% (0.00% - 10,000.00%)

Optimized sequence: 49.01% (29.05% - 68.96%)

The number indicate the average GC content. The values in brackets indicate the interval containing 95% of all nucleotides if the GC content is averaged over a window of 11 nucleotides.

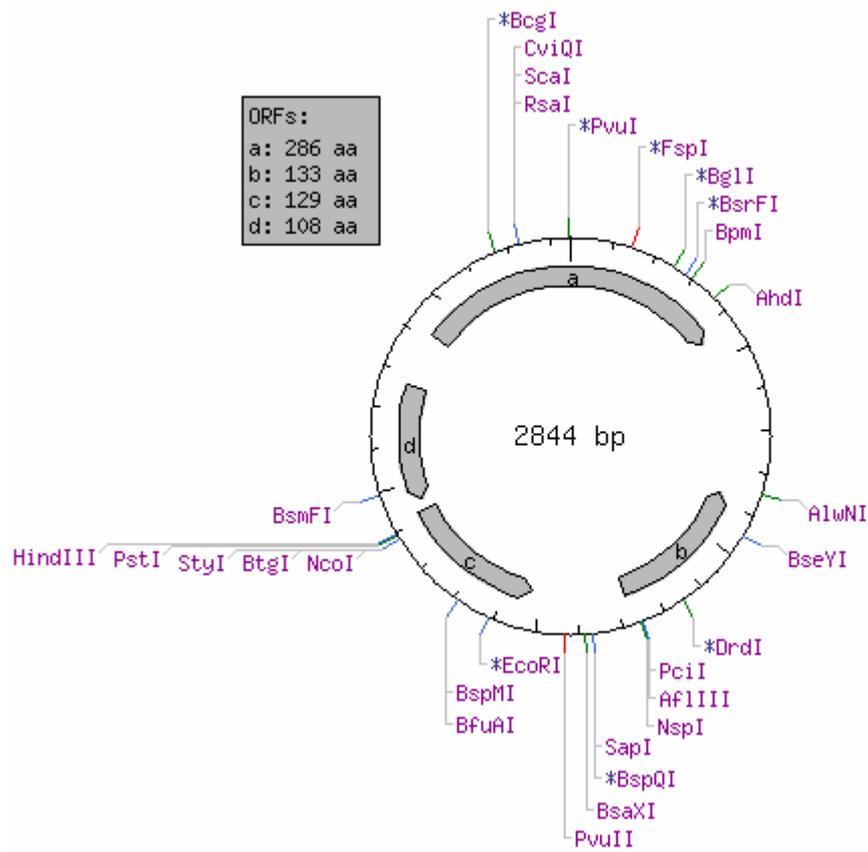


## Optimized sequence

This is the optimized sequence, ready for copying and pasting into other applications.

```
CCATG GGTGT TAACA TCAAC TTGGT ACGTG CTAAT GGGGA CAAGA TTAAG ACGTC AGGTA AAGTG
GGTGA TTCTT TGCTG GACGT AGTGG TCAAC AACAA TGTTG ATCTC GATGG GTTTG GTGCA TGTGA
AGGCA CGTTA AACTG TAGTA CTTGC CACCT GATCT TCAAG ACCAG CGATT TCGAG AAAC TCCGG
ACAAA CCTGG TGATG AGGAA CTGGA CATGC TTGAC TTGGC GTATG AGCTG ACTGA TACAT CGCGC
CTGGG TTGCC AGATT ACGCT TAGCA AGGAT ATGGA AGGCT TAGAA GTCCA TGTGC CATCT ACCAT
CAACG ATGCA CGTGC CGCGT AGAAG CTT
```

## E) Vektorkarte pKKHC-Expressionsvektor



## F) Veröffentlichungen

Derouet-Humbert, E., K. Roemer, et al. (2005).

« Adrenodoxin (Adx) and CYP11A1 (P450<sub>sc</sub>) induce apoptosis by the generation of reactive oxygen species in mitochondria .» Biol Chem 386(5): 453-61

Derouet-Humbert, E., Dragan, C.A ., et al. (2007).

« Mitochondrial ROS production by adrenodoxin does not cause apoptosis in fission yeast.» (eingereicht)

Derouet-Humbert, E., Müller, U., et al. (2007).

« Benoni – a new 2-Fe-2-S ferredoxin from *D. melanogaster*.» (in Vorbereitung)

## 8. DANKSAGUNG

Bei Herrn PD Dr. M. Bureik möchte ich mich für die interessante Fragestellung des Themas, die ständige Diskussionsbereitschaft und das große Interesse am Fortgang der Arbeit bedanken.

Frau Prof. Dr. R. Bernhardt danke ich für die wertvollen Diskussionen und Anregungen für die Arbeit, sowie für das ebenfalls große Interesse am Fortgang der Arbeit.

Bei der Marianne und Dr. Fritz Walter Fischer Stiftung möchte ich mich für die Bewilligung zur Förderung meines Projektes bedanken.

Ich danke Herrn Professor Dr. U. Müller für seine Bereitschaft, als Zweitkorrektor zu agieren, sowie für die Kooperationsarbeiten im Benoni-Projekt (hier sei insbesondere Herrn Dr. M. Schwärzel zu danken).

Unseren Kooperationspartnern Herrn PD Dr. K. Roemer und Herrn Prof. Dr. E. Meese sei ebenfalls für die freundliche Unterstützung, ständige Diskussionsbereitschaft und das Interesse an der Arbeit gedankt.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Reinhard Kappl für die ESR-Messungen bedanken, die trotz der zeitlichen Begrenzung so erfolgreich durchgeführt wurden.

Ich danke Herrn Dr. Frank Hannemann, Herrn Dr. Andy Zöllner und Frau Diplom Biologin Kerstin Ewen, die mir in Sachen Proteinreinigung & Charakterisierung stets mit Rat zur Seite standen.

Herrn Dr. Johannes Schmitt sei besonders für seine freundschaftliche Unterstützung in allen Lebenslagen gedankt. Dein offenes Ohr war mir eine große Hilfe und unsere Gespräche haben mir viel Freude bereitet.

Ein besonderer Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. Andreas Bichet für seine stete wissenschaftliche wie private Unterstützung, die Aufmunterungen während der Arbeit und das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Herrn Walter Klose und Herrn Wolfgang Reinle danke ich für die Bereitstellung und die hervorragende Reinigung der verwendeten Proteine, sowie für die Hilfe bei technischen Fragen und Problemen. Ihr wart mir mit euren Ratschlägen eine sehr große Hilfe.

Frau Diplom-Chemikerin Anja Berwanger danke ich für die Unterstützung bei Fragen und Problemen bezüglich der HPLC-Messung, besonders bei Problemen mit dem HPLC-Gerät und ihre beruhigende Ausstrahlung ;-).

Ein besonderes Dankeschön gilt Frau Katharina Bompais und Frau Nathalie Lenz für die Hilfe und die wertvollen Tipps bei der Laborarbeit und für die Sequenzierarbeiten.

Anja, Kerstin und Janine, euch danke ich außerdem für die weit über das Berufliche hinausreichende Unterstützung und eure Freundschaft. Wir hatten eine Menge Spaß in den letzten 3 Jahren.

Frau Gabi Schon danke ich für die Gespräche eher privater Natur und für ihre unermüdliche Hilfe bei meinem Kampf mit dem Fax-Gerät

Ich möchte auch allen übrigen (middleweile) Post-Doc´s und Doktoranden, besonders Susanne, Sylvia, Cornelia, Tarek und Calin für die geselligen Abende danken.

Allen Mitgliedern des Labors 346, den Mitgliedern der Außenstelle und allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe sei darüber hinaus für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit gedankt

Michi, danke dass es dich gibt und du es mit mir aushältst !

**Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt meinen  
Eltern Christiane und Robert Derouet,  
die immer für mich da waren.**