

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**



***N*-Myristoyltransferase 2-abhängig induzierbare
Myristoylierung von PRS4, p22 und G_{αi2}**

**von Felix Dulich
München, April 2009**

**Helmholtz Zentrum München
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt
Institut für Toxikologie**

Dissertation eingereicht am: 30. April 2009

1. Gutachter: Prof. Dr. F. Eckardt-Schupp

2. Gutachter: Prof. Dr. S. Jentsch

Sondergutachter: Prof. Dr. M. Göttlicher

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Oktober 2009

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DER ARYL HYDROKARBONREZEPTOR AHR	1
1.2	DIOXINE	4
1.3	<i>N</i>-MYRISTOYLTRANSFERASEN	8
1.4	ISOFORMEN DER <i>N</i>-MYRISTOYLTRANSFERASEN	11
1.5	FUNKTION DER <i>N</i>-TERMINALEN MYRISTOYLIERUNG	11
1.5.1	PROTEIN-MEMBRAN-INTERAKTION	11
1.5.2	PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTION	12
1.5.3	CALCIUM-MYRISTOYL-SWITCH	13
1.5.4	KONSEQUENZEN UND PHÄNOTYPEN DER NMT-DEFIZIENZ	13
1.6	REGULATION DER <i>N</i>-MYRISTOYLTRANSFERASEAKTIVITÄT	14
1.7	<i>N</i>-MYRISTOYLTRANSFERASEN IN DER KANZEROGENESE	15
1.8	AUFGABENSTELLUNG	15
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	GERÄTE, ZUBEHÖR, VERBRAUCHSMATERIALIEN	16
2.2	CHEMIKALIEN	17
2.3	ENZYME UND KITS	19
2.4	PEPTIDE	19
2.5	PROTEASOM SUBSTRATE	19
2.6	BAKTERIENSTÄMME	20
2.7	EUKARYOTISCHE ZELLINIEN	20
2.8	VEKTOREN	20
2.9	OLIGONUKLEOTIDE	22
2.10	ANTIKÖRPER	23
2.10.1	PRIMÄRANTIKÖRPER	23
2.10.2	SEKUNDÄRANTIKÖRPER	23
2.11	PUFFER	24
2.11.1	RIPA-PUFFER	24
2.11.2	PBS	24
2.11.3	APS-LÖSUNG	24
2.12	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	25
2.12.1	ZELLZAHLBESTIMMUNG	25
2.12.2	KULTUR ADHÄRENTER ZELLEN	25

2.12.3	LAGERUNG DES ZELLVORRATS	25
2.12.4	TRANSIENTE TRANSFEKTION	26
2.12.4.1	Calciumphosphat-Methode	26
2.12.4.2	Lipofektion	26
2.12.5	TRITIUM-MARKIERUNG	27
2.12.6	KONFOKALE LASERMIKROSKOPIE	27
2.12.7	PRÄPARATION VON ZELLEXTRAKTEN	27
2.13	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	28
2.13.1	RT-PCR	28
2.13.2	PCR/REAL-TIME PCR/ (LIGHTCYLER)	28
2.13.3	AGAROSE GELELEKTROPHORESE	29
2.13.4	TBE-PAGE	29
2.13.5	HERSTELLUNG KOMPETENTER <i>E. COLI</i> -ZELLEN	30
2.13.6	TRANSFORMATION KOMPETENTER <i>E. COLI</i> -ZELLEN	30
2.13.7	ÜBERNACHTKULTUR	31
2.13.8	LAGERUNG VON <i>E. COLI</i> -STÄMMEN	31
2.13.9	DNA-AUFREINIGUNG	31
2.13.10	DNA/RNA-MENGENBESTIMMUNG	31
2.13.11	RESTRIKTIONSVERDAU	32
2.13.12	LIGATION	32
2.13.13	RNA-ISOLIERUNG AUS EUKARYOTISCHEN ZELLEN/GEWEBE	32
2.14	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	33
2.14.1	SDS-PAGE	33
2.14.2	WESTERN-BLOT	33
2.14.3	GEL-FÄRBUNG	34
2.14.3.1	Silberfärbung	34
2.14.3.2	Coomassie-Färbung	35
2.14.4	2D-GELELEKTROPHORESE	35
2.14.5	MASSENSPEKTROMETRIE	36
2.14.5.1	Allgemeines	36
2.14.5.2	Datenanalyse	36
2.14.5.3	Proteinidentifikation	37
2.14.5.4	Proteinverdau mit Trypsin	37
2.14.6	GEWEBEPROBEN AUS VERSUCHSTIEREN	38
2.14.7	HERSTELLUNG VON PROTEINEXTRAKTEN AUS GEWEBE	39
2.14.8	PROTEASOM AUFREINIGUNG AUS GEWEBE	39
2.14.9	PROTEASOM AKTIVITÄTSMESSUNG	40
2.14.10	DUAL LUZIFERASE REPORTERGEN-ASSAY	40

2.14.11	NMT-KINETIK	41
2.14.12	EXPRESSION REKOMBINANTER NMT-ISOFORMEN IN <i>E. COLI</i>	44
2.14.13	AUFREINIGUNG REKOMBINANTER NMT-ISOFORMEN	44
2.14.14	IMMUNPRÄZIPITATION	45
2.15	ABKÜRZUNGEN	46
3	ERGEBNISSE	48
3.1	KLONIERUNG DER CDNA DER N-MYRISTOYLTRANSFERASEN 1 UND 2 AUS 5L-ZELLEN	48
3.2	TCDD VERMITTELTE INDUKTION VON NMT2 mRNA UND PROTEIN	53
3.3	TCDD INDUZIERT DIFFERENTIELLE MYRISTOYLIERUNG IN 5L-ZELLEN	54
3.4	TRANSKRIPTIONELLE UND TRANSLATIONELLE REGULATION DER DIFFERENTIELL MYRISTOYLIIERTEN PROTEINE	58
3.5	SELEKTIVE ANTIKÖRPER GEGEN NICHT-MYRISTOYLIIERTES PRS4	61
3.6	ROLLE DER NMT2 UND DER NMT-AKTIVITÄT FÜR DIE TCDD-INDUZIERTE PROTEIN-MYRISTOYLIERUNG	63
3.6.1	PHARMAKOLOGISCHE INHIBITION DER NMT-AKTIVITÄT	64
3.6.2	INHIBITION DER DIFFERENTIELLEN MYRISTOYLIERUNG DURCH RNAI	65
3.6.3	NMT2-KNOCKDOWN INHIBIERT INDUZIERTE MYRISTOYLIERUNG ALLER IDENTIFIZIERTER ZIELPROTEINE	67
3.7	MYRISTOYLIERUNGSSTATUS <i>IN VIVO</i>	69
3.7.1	INDUZIERTER MYRISTOYLIERUNGSSTATUS DURCH TCDD <i>IN VIVO</i>	69
3.7.2	GEWEBESPEZIFISCHER MYRISTOYLIERUNGSSTATUS VON PRS4 <i>IN VIVO</i>	70
3.8	SUBSTRATSPEZIFITÄT DER NMT-ISOFORMEN.	73
3.8.1	REKOMBINANTE EXPRESSION DER NMTs IN <i>E. COLI</i>	73
3.8.2	BESTIMMUNG DER KINETISCHEN PARAMETER AUSGEWÄHLTER NMT-SUBSTRATE	76
3.9	FUNKTIONELLE KONSEQUENZ DER PRS4-MYRISTOYLIERUNG	79
3.9.1	SUBZELLULÄRE LOKALISATION	79
3.9.2	ZUSAMMENSETZUNG DES PROTEASOMS	81
3.9.3	PROTEOLYTISCHE AKTIVITÄT DES 26S PROTEASOMS	85
4	DISKUSSION	87
4.1	IDENTIFIKATION VON PROTEINEN MIT INDUZIERTER MYRISTOYLIERUNG	88
4.2	INDUZIERTE MYRISTOYLIERUNG IST ABHÄNGIG VON INDUKTION DER NMT-AKTIVITÄT	89

4.3	DIE FAMILIE DER N-MYRISTOYLTRANSFERASEN UND ANALYSE DER KINETIKPARAMETER AUSGEWÄHLTER SUBSTRATE	92
4.4	KONSEQUENZEN INDUZIERTER MYRISTOYLIERUNG	96
4.4.1	BID	96
4.4.2	NIBL	96
4.4.3	P22	97
4.4.4	G _{α2}	97
4.4.5	PRS4	98
4.5	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	103
5	ZUSAMMENFASSUNG	105
6	LITERATURVERZEICHNIS	107

1 EINLEITUNG

1.1 Der Aryl-Hydrokarbon-Rezeptor AHR

Der Aryl-Hydrokarbon-Rezeptor (AHR) ist ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor aus der Familie der basic-Helix-Loop-Helix/PER, ARNT, SIM (bHLH/PAS) Transkriptionsfaktoren (Burbach, 1992). Wie in Abbildung 1 gezeigt ist, führt die Bindung von 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzodioxin (TCDD) an den AHR zur Translokation in den Nukleus und dort zur transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen (Enan and Matsumura, 1996). Zusätzlich werden Funktionen des AHR außerhalb des Zellkerns z.B. durch Freisetzen des SRC Proteins aus dem zytosolischen AHR/HSP90/XAP2/SRC Komplex diskutiert.

Der AHR wurde zunächst auf Grund genetischer Evidenzen zur Reaktion von verschiedenen Zellen und Mäusestämmen auf polyzyklische aromatische und polychlorierte aromatische Kohlenwasserstoffe postuliert (Niwa, 1975), (Nebert, 1975). Der Proteinnachweis gelang 1976 durch Bindung von radioaktiv markiertem TCDD an zytosolische Extrakte aus Leber der Maus (Poland, 1976). Die für den AHR codierende cDNA wurde allerdings erst 1992 aus einer cDNA Bibliothek der Maus kloniert (Burbach, 1992) und bildet u.a. mit den Genen *Sim*, *Arnt*, *Hif1 α* , etc. (s. Tabelle 1) die genannte Familie der bHLH/PAS Transkriptionsfaktoren (Kewley, 2004).

Neben TCDD, das zu den polychlorierte Dibenzodioxinen (PCDD) gehört, gibt es eine ganze Reihe weiterer Fremdstoffe, die Liganden des AHRs darstellen. Das sind u.a. polychlorierte Dibenzofurane (PCDF), Benzo[a]pyren und polychlorierte Biphenyle (PCB) (Safe, 1985b), (Safe, 1985a).

Tabelle 1: bHLH Proteinfamilie - Mitglieder und deren Funktion

bHLH-Transkriptionsfaktor	Funktion
AHR	Entwicklung/ Vermittlung von Fremdstoff-Signalen
HIF1 α	Hypoxie
ARNT	Homo/Heterodimer Partner für bHLH-Proteine
SIM	ZNS Entwicklung
PER	Zirkadianer Rhythmus
BMAL1/BMAL2	Zirkadianer Rhythmus
MYOD	Myogenese
NEUROD	Neurogenese

Die Bedeutung des AHR zeigt sich v.a. in Studien zur Toxizität von TCDD mit *Ahr*^{-/-} Mäusen, die keinen funktionellen AHR exprimieren. Nach Exposition mit TCDD finden sich kaum noch Symptome der akuten TCDD-Toxizität (Auszehrsyndrom (*wasting Syndrome*), Lipid-Akkumulation, vereinzelte Nekrose und Hypertrophie der Leber (Fernandez-Salguero, 1996)) und Teratogenität (Thymusatrophie, Gaumenspalte, verkleinerte Nieren etc. (Peters, 1999), (Mimura, 1997)). Ebenso unterbleibt die Induktion klassischer Zielgene wie *Cyp1a1* (Cytochrom P450 1A1). (Fernandez-Salguero, 1996). In umgekehrter Weise wurden in genetisch veränderten Mäusen, die einen konstitutiv aktivierten AHR exprimieren, sehr ähnliche Effekte wie durch TCDD-Behandlung festgestellt (Brunnberg, 2006).

Zu den klassischen Zielgenen zählen neben *Cyp1a1* auch *Cyp1a2* sowie die *Gst-Yα* (kodiert für Glutathion-S-Transferase) und weitere Phase I und Phase II fremdstoffmetabolisierende Enzyme (Nebert, 1993). Daneben führt die Aktivierung des AHR zur Dysregulation einer Vielzahl weiterer Gene, die in der Kontrolle des Zellzyklus (*p27kip*, *Jun-B*) (Kolluri, 1999), (Puga, 1992), Apoptose (*Bax*) (Matikainen, 2001) oder Proliferation (*HES1*, *Il-2*) (Thomsen, 2004), (Jeon and Esser, 2000) eine Rolle spielen.

Darüber hinaus werden immer wieder neue Proteine identifiziert, deren Funktion bzw. Konsequenz der Dysregulation unbekannt ist. Beispielsweise wird VDAC2, ein Anionen-Kanal in der äußeren Mitochondrienmembran in 5L-Zellen (eine Hepatoma Zelllinie der Ratte) durch TCDD induziert (Sarioglu, 2008). In dieser Zelllinie und in Mäusen fanden Kolluri et al. die *N*-Myristoyltransferase 2 (*Nmt2*) als TCDD-induzierbares Gen. In HepG2 Zellen (eine humane Hepatoma Zelllinie) wurden mittels Microarray-Technik insgesamt 310 Gene gefunden, die durch TCDD dereguliert wurden (Puga, 2000).

Neben der Funktion als Transkriptionsfaktor wurde u.a. gezeigt, dass der aktivierte AHR in der Lage ist, den Östrogen-Signalweg zu beeinflussen, in dem es beispielsweise zur Transaktivierung von Östrogenrezeptor-(ER)-responsiven Genen kommt bzw. der ER durch Aktivierung des AHR vermehrt abgebaut wird (Wormke, 2000), (Ruegg, 2008), (Matthews and Gustafsson, 2006). In neueren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der AHR ein integraler Bestandteil eines Cullin-4B-Ubiquitin-Ligase-Komplexes ist. Dort fungiert der Liganden-aktivierte AHR als spezifisches Adaptormolekül, das Steroidhormon-Rezeptoren für gezielten Abbau bindet (Ohtake, 2007).

Trotz intensiver Forschung ist der kanzerogene Mechanismus von TCDD nicht genau geklärt. Auf Grund der Studien mit *Ahr*^{-/-} Mäusen geht man heute davon aus, dass fast alle toxischen Effekte von TCDD durch den AHR vermittelt werden (Fernandez-Salguero, 1996; Mimura, 1997).

Die Suche nach weiteren Zielgenen des AHR ist deshalb relevant zur Aufklärung der molekularen Mechanismen bei pathologischen Veränderungen durch Fehlen oder überschießende Aktivierung des AHR.

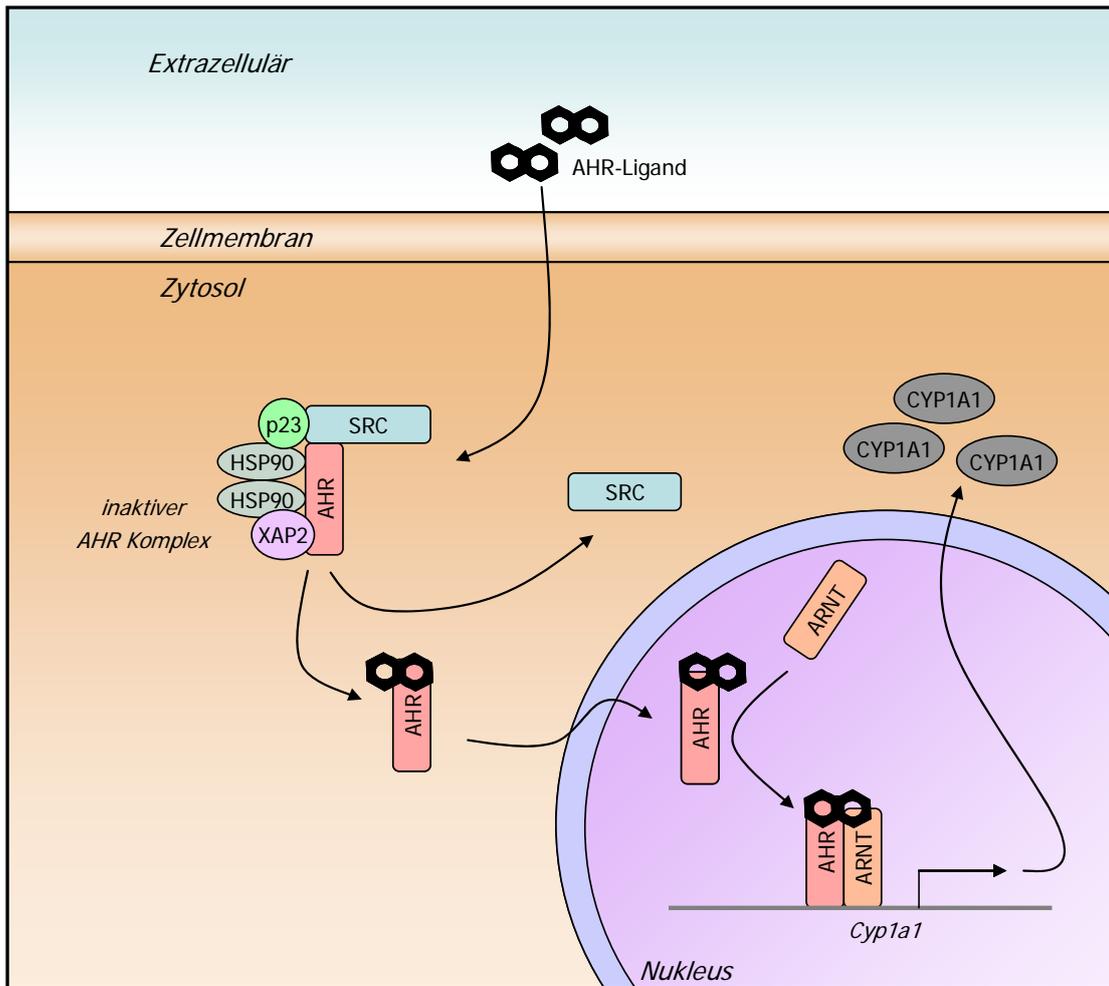


Abbildung 1: Schema der Signaltransduktion des Liganden-aktivierten AH-Rezeptors.

Nachdem ein AHR-Ligand (z.B. TCDD) die Zellmembran passiert hat, bindet er an den AHR, der im Zytosol in einem Komplex aus HSP90, XAP2, p23 und cSRC gebunden vorliegt. Nach Bindung dissoziiert der Liganden-gebundene AHR von dem Komplex ab und transloziert in den Zellkern. Dort heterodimerisiert er mit dem Partnerprotein ARNT (Ah-Receptor nuclear translocator) und bindet so an spezifische regulatorische Elemente der DNA, sog. XREs (Xenobiotic Response Elements, auch DREs - Dioxin Response Elements oder AhREs - AhR Response Elements genannt). Dabei wird die Transkription der entsprechenden Gene moduliert. Das klassische Zielgen ist Cyp1a1 (Abbildung nach Agostinis et al. (Agostinis, 2007)).

Die eigentliche physiologische Funktion des AHR ist zum derzeitigen Stand der Forschung nur ungenügend geklärt. Die parallel in verschiedenen Laboren generierten *Ahr*^{-/-} Mäuse (Mimura, 1997), (Fernandez-Salguero, 1996), (Schmidt, 1996), (Lahvis and Bradfield, 1998) zeigten u.a. eine beeinträchtigte Leberentwicklung, verminderte Fruchtbarkeit und den bereits angesprochenen Verlust der TCDD-induzierten Toxizität. Ein endogener Ligand, der Aufschluss über die physiologische Funktion geben könnte, wurde noch nicht identifiziert,

obwohl Studien auf einen solchen hindeuten. Neben Indigo und Indirubin (Adachi, 2001) wurde auch 7-Ketocholesterin (Savouret, 2001) als AHR-Ligand identifiziert. Darüber hinaus zeigten wieder aufgegriffene neuere Studien, dass FICZ (6-Formylindolo[3,2-b]carbazol, ein Tryptophan-Photoprodukt) in der Lage ist, den AHR zu aktivieren (Helferich and Denison, 1991), (Fritsche, 2007). Durch UVB-Strahlung kann die Aminosäure Tryptophan zu FICZ prozessiert werden. Die Aktivierung des AHR durch FICZ könnte somit eine Reaktion der Zellen auf UV-Strahlung sein, die diese Signale in den Zellkern weiterleitet (Wincent, 2009) (Fritsche, 2007), (Oberg, 2005), (Rannug and Fritsche, 2006). In diesem Zusammenhang wurde auch die Funktion des AHR in der Steuerung von zirkadianen Rhythmen diskutiert (Garrett and Gasiewicz, 2006; Mukai, 2008). Neueste funktionelle Untersuchungen kommen nun zu dem Ergebnis, dass die Aktivierung des AHR das Gleichgewicht zwischen regulatorischen T-Zellen (T_{reg} , Regulation der Autoimmunität) und proinflammatorischen T-Zellen (TH_{17}) beeinflussen kann, was im Mausexperiment zu einer Verschlechterung der sog. EAE (*experimental autoimmune encephalitis*) führte (Quintana, 2008), (Veldhoen, 2008).

1.2 Dioxine

Der affinste Ligand des AHR ist das TCDD, ein Mitglied aus der Gruppe der Dioxine. Obwohl Dioxine heute eher eine untergeordnete Rolle bei Umweltvergiftungen einnehmen, kommt es immer wieder zu Vorfällen, die auf Grund der hohen Giftigkeit dieser Stoffe nicht zu vernachlässigen sind. Dioxin in Mozzarella - EU droht mit Verbot – mit dieser Schlagzeile rief die Süddeutsche Zeitung der Bevölkerung das Umweltgift Dioxin und die daraus resultierenden Gefahren erneut ins Gedächtnis. Im vorliegenden Fall waren im April 2008 erhöhte Dioxin-Werte in italienischen Büffelmozzarella nachgewiesen worden (SZ, März 2008).

Traurige Berühmtheit erlangte das Dioxin TCDD (*Abbildung 2*) durch das Sevesounglück. Am 10. Juli 1976 kam es in der Firma Icmesa, mit Standort nahe der norditalienischen Gemeinde Seveso (nahe Mailand), zu einem Zwischenfall, in dessen Folge sich eines der schwersten Chemieunglücke Europas ereignete. In einem Reaktor zur Herstellung von Trichlorphenol, einer Vorstufe des Herbizids Trichlorphenoxyessigsäure, geriet die Synthesereaktion außer Kontrolle. Durch Überhitzung des Reaktors und so veränderter Reaktionsbedingungen konnte sich TCDD bilden. In der Folge kam es zur Explosion des Reaktors, wobei die Umgebung mit insgesamt ca. 2 kg TCDD kontaminiert wurde (Homberger, 1979), (Bertazzi, 2001), (Garattini, 1977).

Wenn umgangssprachlich und in der Presse von Dioxin gesprochen wird, ist oft TCDD gemeint. TCDD ist jedoch nur eines von 75 Kongeneren der Gruppe der polychlorierten Dibenzodioxine (PCDD). Aufgrund ihres ähnlichen Aufbaus werden die polychlorierten Dibenzofurane (PCDF) meist in einem Atemzug mit Dioxinen genannt. Die Gruppe der PCDFs umfasst 135 Kongenere. Abbildung 2 zeigt die Grundgerüste der PCDDs bzw. der PCDFs sowie die Strukturformel von TCDD (Safe, 2000).

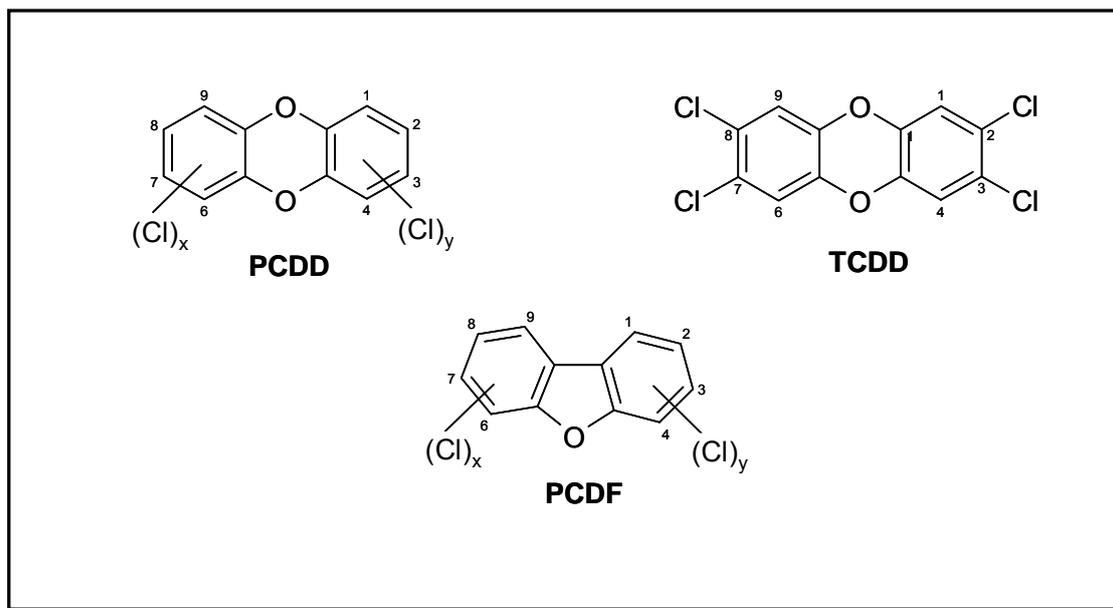


Abbildung 2: Allgemeine Strukturformeln der polychlorierten Dibenzodioxine (PCDD) bzw. Dibenzofurane (PCDF), sowie von 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzodioxin (TCDD) und deren systematische Nummerierung.

Die meisten der 210 PCDDs und PCDFs sind nicht natürlichen Ursprungs, sondern künstlich hergestellte Chemikalien. Sie können bei Verbrennungsprozessen organischer Verbindungen in Gegenwart von chlorhaltigen Materialien wie z.B. PVC entstehen (v.a. bei der Müllverbrennung). Aber auch bei Vulkanausbrüchen und Waldbränden wurde die Bildung von PCDDs nachgewiesen (Fiedler, 1996). Gleichzeitig sind sie aber auch unerwünschte Nebenprodukte chemischer Synthesen, wie bei der Herstellung von 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure, einem Bestandteil von Agent Orange. Letzteres wurde im Vietnamkrieg großflächig als Entlaubungsmittel eingesetzt, wodurch noch heute weite Flächen Vietnams mit Dioxin verseucht sind (Schechter, 1995).

TCDD ist die Modellverbindung der Dioxine und das potenteste und giftigste Kongener, welches ein weites Spektrum an toxischen Effekten verursacht. Epidemiologische Untersuchungen legen nahe, dass TCDD ein Kanzerogen für den Menschen ist. Sowohl die IARC (*International Agency for Research on Cancer*) als auch die in Deutschland bekannte

MAK-Kommission (MAK = maximale Arbeitsplatz Konzentration) haben TCDD als Humankanzerogen eingestuft (Bertazzi, 2001; Consonni, 2008) (IARC, 1997), (DFG, 2005).

Um die Belastung durch verschiedene PCDDs und PCDFs sowie komplexe Mischungen besser abschätzen zu können, wurde das Konzept der TEQ (*toxic equivalents*) eingeführt (Van den Berg, 1998).

Es basiert auf der Annahme, dass die einzelnen Kongenere der PCDDs/PCDFs bei gleichem Wirkmechanismus unterschiedliche Wirkstärken aufweisen. Als Referenz wird TCDD mit einem TEF (*toxic equivalent factor*) von 1 festgelegt. Die TEFs aller anderen Kongenere geben deren Giftigkeit relativ zu TCDD wieder. Dies ermöglicht die Giftigkeit der Kongenere untereinander zu vergleichen, aber auch komplexe Mischungen einzustufen. Zur Berechnung der toxischen Äquivalente (TEQ) einer Probe wird die in der Probe gefundene Konzentration jedes einzelnen Kongeners mit dem entsprechenden TEF multipliziert und die so erhaltenen Werte werden aufsummiert. Dieser Gesamt-TEQ Wert gibt ein Maß für die Giftigkeit einer Probe, als wäre es reines TCDD und ist so leicht mit anderen Proben vergleichbar.

In Tierversuchsstudien kommt es durch TCDD Exposition u.a. zu Fortpflanzungs- und Entwicklungsdefekten, Kachexie, Immuntoxizität, Hepatotoxizität, Thymusatrophie und Krebs (Pohjanvirta and Tuomisto, 1994). Die Effekte sind dabei abhängig von der Dosis und Behandlungszeit. Beispielsweise wird nur nach hohen Dosen eine Thymusatrophie oder Kachexie beobachtet, wogegen sich schon niedrige Dosen immunotoxisch auswirken können. Daneben können durch TCDD-Exposition teratogene Effekte ausgelöst werden. Die Nachkommen von TCDD-behandelten Mäusen leiden oftmals an einer Gaumenspalte und einer Hydronephrose (Birnbaum, 1997). Zusätzlich ist oft das Gewicht des Fötus verringert, die Sterblichkeit erhöht und eine Immunsuppression in den Nachkommen nachweisbar. In einer Studie zeigten Mocarelli et al., dass sich das Geschlechterverhältnis bei Kindern Dioxin-exponierter Männer zugunsten der Mädchen verschiebt (Mocarelli, 2000). Beim Menschen steht jedoch bei akuter Vergiftung die Ausbildung einer starken sog. Chlorakne (Attentat W. Juschtschenko) sowie Übelkeit und Bauchschmerzen im Vordergrund (Geusau, 2001).

Neben dosisabhängigen Effekten lassen sich speziesspezifische Unterschiede im Hinblick auf TCDD-Toxizität beobachten. So ist die LD₅₀ (letale Dosis 50%) bei Meerschweinchen ~1 µg/kg Körpergewicht (KG) und beim Hamster >1000 µg/kg KG, was eine Risikobewertung für den Menschen erschwert. Man geht jedoch davon aus, dass die LD₅₀ wesentlich höher als beim Meerschweinchen liegt. TCDD ist wie alle PCDDs und auch PCDFs stark lipophil und akkumuliert deshalb in der Nahrungskette. Die Halbwertszeit in Menschen beträgt zwischen 7 und 11 Jahren (Pirkle, 1989).

Seit in den 1970er Jahren festgestellt wurde, dass chlorierte organische Verbindungen stark giftig sind, ist die Umweltbelastung mit Dioxinen und PCBs aufgrund strenger Emissionsvorgaben rückläufig. Eine Risikobewertung durch die WHO zeigt, dass die Belastung der Bevölkerung durch Dioxine heutzutage sehr nahe der tolerierbaren täglichen Aufnahmemenge (TDI von engl. *tolerable daily intake*) von 1-4 pg TCDD/kg KG oder entsprechendem TEQ liegt (WHO, 2000).

Am 22. Mai 2001 wurde durch die Stockholmer Konvention (auch POP-Konvention von engl. *persistent organic pollutants*) sowohl die Herstellung als auch der Gebrauch von PCDDs, PCDFs, PCBs sowie weiterer zehn Stoffe (u.a. auch DDT, 1,1,1-Trichlor-2,2-bis(4-chlorphenyl)ethan) verboten bzw. stark eingeschränkt. Man bezeichnet diese Substanzen auch als das „dreckige Dutzend“. Mittlerweile wurde die Konvention von 152 Staaten unterzeichnet. Damit soll international die Emission dieser giftigen, persistenten Chemikalien weiter verringert werden. Denn im Gegensatz zu Industrieländern, in denen die Emission von PCDDs und PCDFs, beispielsweise von Müllverbrennungen, aufgrund strenger Grenzwertaufgaben kaum noch eine Rolle spielt, gelangen in vielen Entwicklungsländern Dioxine und Dibenzofurane oft ungefiltert in die Umwelt.

1.3 N-Myristoyltransferasen

Für die Steuerung aller zellulärer Prozesse eines Organismus sind Proteine mit unterschiedlichsten Funktionen (Transkriptionsfaktoren, Rezeptoren, modifizierende Enzyme etc.) verantwortlich. Nach der Transkription genomischer DNA in mRNA wird diese an den Ribosomen in Polypeptidketten translatiert, die sich dann zu Proteinen falten. Ein Organismus kann diese Proteine durch Modifikationen der Aminosäureseitenketten in ihrer Funktion modulieren, wobei diese Modifizierungen sowohl co- als auch posttranslational erfolgen können. Neben Glykosylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung u.a. gibt es die sog. Acylierung. Dieser meist cotranslationale Prozess stellt eine kovalente Modifikation von Proteinen mit langkettigen Fettsäureresten wie z.B. Palmitoyl-, Farnesyl-, Geranylgeranyl- und Myristoylresten dar (Resh, 2004).

Die Acylierung erfolgt katalysiert durch spezifische Enzyme, den Acyltransferasen. Zu ihnen gehören neben vielen anderen die Histon-Acetyltransferasen, Palmitoyltransferasen, Serotonin *N*-Acetyltransferasen und die *N*-Myristoyltransferasen.

Die *N*-Myristoyltransferasen (NMT) (E.C. 2.3.1.97) gehören zur sogenannten GNAT-Superfamilie (*Gcn5-related N-Acyltransferase*) von Acyltransferasen, die alle durch Coenzym A aktivierte Fettsäuresubstrate verwenden (Dyda, 2000). Die als Myristoylierung bezeichnete Reaktion ist die Übertragung von Myristat, einem C14-Fettsäurerest von Myristoyl-CoA auf ein *N*-terminales Glycin von Zielproteinen, unter Ausbildung einer stabilen Amidbindung (Abbildung 3).

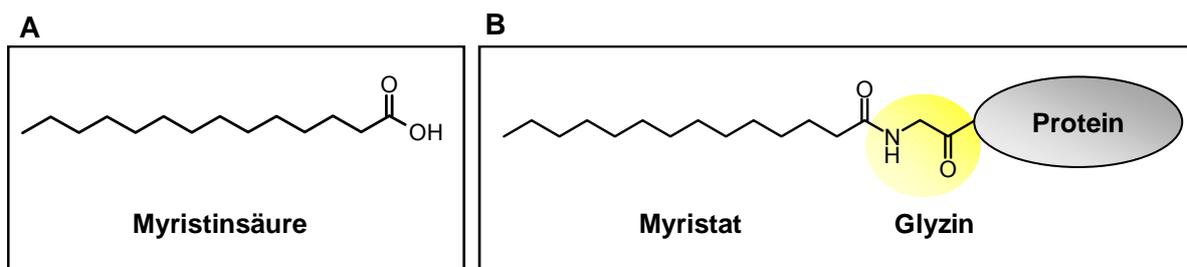


Abbildung 3: Struktur von Myristinsäure und myristoyliertem Protein

A Myristinsäure ist eine gesättigte C14-Fettsäure;

B durch die Myristoylierung wird die Myristinsäure auf ein *N*-terminales Glycin übertragen. Dies geschieht unter Ausbildung einer stabilen, kovalenten Amidbindung.

Untersuchungen an NMT aus *S. cerevisiae* (Bierhefe) haben gezeigt, dass die Myristoylierungsreaktion nach einem sogenannten Bi-Bi-Mechanismus abläuft, bei dem im ersten Schritt Myristoyl-CoA einen binären Komplex mit der NMT ausbildet. Dieser Komplex ist in der Lage, Zielproteine (Substrate) zu binden. Nach Übertragung des Myristoylrestes auf das *N*-terminale Glycin des Proteins verlassen anschließend nacheinander Coenzym A und

dann myristoyliertes Protein die Bindungstasche der NMT (Rudnick, 1991). Diese Reaktion ist relativ spezifisch für Myristoyl-CoA, wobei auch andere Fettsäuren oder Myristinsäurederivate als Substrate erkannt werden können (Pasha, 2004; Rundle, 2002).

In Säugerzellen werden nur wenige Proteine myristoyliert vor. Durch bioinformatische Analysen (Maurer-Stroh, 2002a), (Maurer-Stroh, 2002b), lässt sich abschätzen, dass nur ca. 0.7 % aller eukaryotischen Proteine myristoyliert sind; das sind 491 von 61577 Datenbankeinträgen (Proteinen) der Swiss-Prot Datenbank und 4409 Datenbankeinträge von 600916 der Genbank/NCBI Datenbank (Maurer-Stroh, 2002c). Folglich muss eine spezifische Aminosäuresequenz existieren, welche die Proteine von den NMTs als Zielproteine erkennen lässt. Untersuchungen an NMT aus *S. cerevisiae* zu einer solchen *Consensus-Sequenz*, also einer Sequenz die allen NMT Substratproteinen gleich bzw. sehr ähnlich ist, ergab eine sehr variable Abfolge der ersten zehn *N*-terminalen Aminosäuren eines Proteins. Die Sequenz **G¹X²X³X⁴S/T⁵X⁶X⁷X⁸X⁹** findet sich in vielen myristoylierten Proteinen wieder, wobei Glycin in Position 1 (nach Entfernen des Initiator Methionins durch Methionyl-Aminopeptidasen) entscheidend ist. Jede andere Aminosäure in dieser Position der Aminosäuresequenz bedeutet den Verlust der Myristoylierung (Towler, 1988b), (Johnson, 1994a). Jedoch führt eine *N*-terminale Methionin-Glycin Sequenz nicht immer zur Myristoylierung, da sich Proteine finden, die trotz Glycin in Position 1 nach Entfernung des Methionins nicht myristoyliert werden. Beispiele dafür sind Cytochrom C (GDIEKGKK) oder die Hämoglobin- γ -Kette (GHFTEEDK). Ebenso ist Serin oder Threonin in Position 5 nur bevorzugt aber nicht essentiell, da Proteine wie FYN (GCVQCKDK) und YRK (GCVHCKEK), zwei Mitglieder der SRC Tyrosin-Kinase-Familie, ebenso *in vivo* myristoyliert werden wie die Proteinkinase A (GNAAAkk) und weitere Proteine (Towler, 1988b) (Boutin, 1997), die keine der beiden Aminosäuren in dieser Position aufweisen. Des Weiteren sind Alanin, Glycin, Cystin und Asparagin in Position 5 erlaubt. Position 2 sollte kein Prolin oder eine Aminosäure mit geladener bzw. aromatischer Seitenkette enthalten. Ebenso ist Prolin in Position 6 verboten. Die Positionen 3 und 4 können durch jede Aminosäure besetzt werden. Neben den genannten Kinasen FYN, PKA, SRC oder YRK wurden Proteine aus den verschiedensten zellulären Funktionsbereichen als *N*-myristoyliert identifiziert. Folgende Tabelle (*Tabelle 2*) gibt hierzu einen Überblick:

Tabelle 2: N-myristoylierte Proteine zeigen unterschiedliche zelluläre Funktionen

Protein	Zelluläre Funktion
G-Protein α -Untereinheit, G_{α} (Sullivan, 1986)	Signalübermittlung
NADH Cytochrom β 5-Reduktase (Ozols, 1984)	Stoffwechsel
HIV-1 GAG (Ratner, 1985)	virales Protein
NO-Synthase, eNOS (Sessa, 1993)	Synthese von NO
virale Tyrosin-Kinase vSRC (Schultz, 1985)	Onkogen
ADP Ribosylierungsfaktor, ARF (Franco, 1995)	Regulation des vesikulären Transports
BH3 Interacting Domain, BID (Zha, 2000)	Apoptose

In den meisten Fällen ist die Myristoylierungsreaktion ein cotranslationaler Prozess. In einigen wenigen bisher bekannten Ausnahmen kann es jedoch zu einer posttranslationalen Myristoylierung zellulärer Proteine kommen, da zum einen einige Proteine sowohl in myristoylierter als auch unmyristoylierter Form in der Zelle vorliegen und zum anderen proteolytisch gespaltene Proteine an der Spaltstelle ein Myristoylierungsmotiv offenbaren. So wurde in Hefe eine unmyristoylierte Form der G_{α} -Untereinheit neben ihrer myristoylierten Form identifiziert (Dohlman, 1993). In den Flagellen der Spermien des Seesterns (*Strongylocentrotus purpuratus*) wurde myristoylierte Kreatin-Kinase neben unmyristoylierter gefunden (Quest, 1997) und Manenti isolierte 1993 unmyristoyliertes MARCKS Protein aus bovinem Gehirn (Manenti, 1993).

Einen wichtigen Prozess stellt die posttranslationale Myristoylierung von Proteinen dar, die durch Caspasen während der Apoptose proteolytisch gespalten werden. Durch Offenbarung eines Myristoylierungsmotivs an der Spaltstelle werden u.a. die Proteine BID, Gelsolin oder auch PAK2 (Zha, 2000), (Sakurai and Utsumi, 2006), (Vilas, 2006) posttranslational N-myristoyliert. Die Acylierung ist hierbei essentiell für die Funktion dieser Proteine.

1.4 Isoformen der *N*-Myristoyltransferasen

Bis heute ist die NMT aus der Hefe *S. cerevisiae* die am besten untersuchte *N*-Myristoyltransferase. Daneben wurde in vielen anderen untersuchten Eukaryoten *N*-Myristoyltransferase-Aktivität nachgewiesen bzw. *N*-Myristoyltransferasen identifiziert. Dazu gehören beispielsweise Säuger wie das Rind, die Ratte, die Maus oder der Mensch, aber auch Leishmanien, Pilze und Pflanzen wie *A. thaliana*. Im Gegensatz dazu haben Bakterien nach heutigem Wissenstand keine NMT (Duronio, 1990).

Anfänglich ging man davon aus, dass die NMT ein einzelnes, von einem Gen codiertes Enzym ist. Bei der chromatographischen Aufreinigung des Enzyms aus bovinem Gehirn und der murinen Zelllinie L1210 wurde jedoch in unterschiedlichen Isolierungsfractionen NMT-Aktivität nachgewiesen. Dies ließ die Autoren vermuten, dass es sich um Isoenzyme mit unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften handle (Boutin, 1993; Glover and Felsted, 1995).

Glover et al. konnten 1997 durch differentielle Zentrifugation von Zelllysaten und Immunoblot-Analysen zeigen, dass es wahrscheinlich eine Spleißvariante der ca. 60 kD großen, humanen NMT gibt oder, dass diese 60 kD NMT proteolytisch zu einer kleineren ~50 kD großen Form prozessiert wird (Glover, 1997). 1998 beschrieben McIlhinney et al., dass NMT durch verschiedene Translationsstarts in drei verschiedenen Varianten gebildet werden kann, welche als NMT1L, NMT1M und NMT1S bezeichnet wurden (McIlhinney, 1998). Im gleichen Jahr konnten Giang und Cravatt das Gen für *NMT2* aus einer humanen Leber-cDNA-Bibliothek klonieren und beschreiben (Giang and Cravatt, 1998). Humane NMT1 und NMT2 zeigten dabei eine Homologie in der Aminosäuresequenz von 77 %. Bei der Ratte beträgt die Übereinstimmung zwischen den Isoformen 80 %. Dies impliziert, dass NMT1 und NMT2 zwei Familien der *N*-Myristoyltransferasen repräsentieren.

1.5 Funktion der *N*-terminalen Myristoylierung

1.5.1 Protein-Membran-Interaktion

Viele myristoylierte Proteine liegen membrangebunden vor. Dies erscheint plausibel, da sich die hydrophobe Myristin-Kette gut in die Phospholipid-Doppelschicht einschieben und das Protein so in der Membran verankern kann. Allerdings haben biophysikalische Untersuchungen gezeigt, dass der Myristin-Anker eigentlich zu schwach ist, um das Protein an der Membran zu halten. Daher sind beispielsweise Lysin-reiche Regionen nahe des *N*-Terminus des Proteins nötig, die über elektrostatische Wechselwirkung mit den sauren Phospholipidgruppen der Zellmembran interagieren können, wie es u. a. für das

Protoonkogen cSRC oder das MARCKS Protein gezeigt werden konnte (Peitzsch and McLaughlin, 1993), (Zhou, 1994), (Murray, 1998), (Swierczynski and Blackshear, 1996).

Untersuchungen an vielen weiteren Proteinen zeigten außerdem, dass ein Verlust der Myristoylierung auch zum Verlust der Lokalisation an der Zellmembran führen kann, was wiederum in einigen Fällen mit einem Funktionsverlust des Proteins einhergeht. So verliert vSRC des Rous Sarkoma Virus die Lokalisation an der Membran und gleichzeitig auch seine transformierenden Eigenschaften, wenn die N-terminale Myristoylierung durch Mutation verhindert wird (Kamps, 1985), (Cross, 1984). In Zellen, in denen proapoptotische Signalwege aktiviert sind, kann das Protein BID proteolytisch durch Caspase 8 zu tBID gespalten werden. Dabei entsteht an der Spaltstelle (an Position 60 im BID Protein) ein Myristoylierungsmotiv, an dem tBID in der Folge myristoyliert wird. Zha et al. konnten durch Mutation von Glycin (60) zu Alanin zeigen, dass diese Myristoylierung ein Translokationssignal zur Mitochondrienmembran darstellt. Die Myristoylierung dient als Aktivierungsschalter, der die tBID-induzierte Freisetzung von Cytochrom C und somit den programmierten Zelltod (Apoptose) verstärkt (Zha, 2000).

Neben den genannten Beispielen kann die Myristoylierung auch bei der Aktivierung der Immunantwort auf mikrobielle Pathogene von Bedeutung sein. Das TRIF-verwandte (*Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta*) Adaptormolekül TRAM (*TRIF related adapter molecule*) ist ein myristoyliertes Protein, das an der Toll-like Rezeptor-vermittelten Aktivierung von NF- κ B involviert ist. Rowe et al. konnten zeigen, dass Rekonstitution TRAM-defizienter Macrophagen mit der Myristoylierungs-Mutante G2A-TRAM die NF- κ B-Aktivierung durch Lipopolysaccharid inhibiert. Die Autoren postulieren, dass TRAM zur Aktivierung von NF- κ B an der Zellmembran und/oder am Golgi-Apparat lokalisiert sein muss, was durch Inhibition der Myristoylierung verhindert wird (Rowe, 2006).

1.5.2 Protein-Protein-Interaktion

Im Vergleich zur häufig auftretenden Membranlokalisierung myristoylierter Proteine wurde eine myristoylierungsabhängige Protein-Protein Interaktion nur in wenigen Fällen beobachtet und ist physiologisch eher nicht relevant. Diese Ausnahmen sollen hier dennoch kurz genannt werden.

Die Kinase FYN (pp59^{fyn}) bindet myristoylierungsabhängig an die ζ -Kette von T-Zell-Rezeptor-Komplexen (van't Hof and Resh, 1999).

Calmodulin, ein 17.5 kD großes Calcium-bindendes Protein, bindet an CAP23/NAP22. Diese Interaktion ist von Calcium, aber auch von der Myristoylierung von CAP23/NAP22 abhängig. Durch Phosphorylierung von CAP23/NAP22 kann diese Protein-Protein-Interaktion gelöst werden und ist somit modulierbar (Taniguchi, 1999), (Hayashi, 2004).

Die geringe Anzahl an Beispielen für myristoylierungsabhängige Protein-Protein-Interaktionen zeigt, dass die Myristoylierung für die Bindung an Membranstrukturen wohl von größerer Bedeutung ist.

1.5.3 Calcium-Myristoyl-Switch

In diesem Zusammenhang ist ein weiterer Mechanismus zu erwähnen, bei dem die *N*-Myristoylierung eine wichtige Rolle spielt, der sog. Calcium-Myristoyl-Schalter. Er wurde zuerst für das Protein Recoverin beschrieben, findet sich aber auch bei anderen Calcium Sensor Proteinen (Beven, 2001). Recoverin ist ein 23 kD großes, *N*-myristoyliertes Protein, das eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion von Licht im Auge bzw. bei der Adaption des Auges an Dunkelheit spielt. Es wird dabei durch Calcium aktiviert bzw. verliert durch Absinken der intrazellulären Calciumkonzentration seine Inhibitorische Wirkung. Im Calcium-freien Zustand nimmt Recoverin eine Konformation ein, in welcher die C14-Kette der Myristinsäure in einer hydrophoben Tasche des Proteins versteckt liegt. Durch Bindung von zwei Calciumionen verändert Recoverin seine Konformation derart, dass der Myristinanker nach außen klappt und so exponiert wird. In der Folge kann das Protein an die Membran translozieren und dort die Rhodopsinkinase hemmen. Dieser Prozess ist durch Absenken der intrazellulären Calciumkonzentration reversibel (Dizhoor, 1992), (Zozulya and Stryer, 1992), (Ames, 1997), (Tanaka, 1995).

1.5.4 Konsequenzen und Phänotypen der NMT-Defizienz

Wie wichtig die *N*-Myristoyltransferasen sind, lässt sich an der Vielzahl ihrer Zielproteine ermesen, die ohne Myristoylierung teilweise ohne Funktion sind.

Obwohl Säugetiere zwei Isoformen der NMT besitzen, ist der *knockout* von *Nmt1* (*Nmt1*^{-/-}) in Mäusen bereits in der Embryonalphase letal (Yang, 2005). Yang et al. vermuten, dass NMT2 den Verlust von NMT1 nicht kompensieren kann, weil die Expression von *Nmt2* in der frühen Phase der Embryogenese deutlich niedriger als die der *Nmt1* ist und die Enzymkapazität bei Verlust von NMT1 somit nicht ausreicht. Die Autoren schließen, dass NMT1 das „Haupt“-NMT Enzym ist. Diese Meinung wird auch von M. Pierre et al. vertreten, die *Nmt-knockout* in *A. thaliana* untersuchten und feststellten, dass der Phänotyp der *Nmt1-knockout* Mutante dem der *Nmt1/Nmt2-knockout* Mutante sehr ähnlich ist (Pierre, 2007).

Wie in Mäusen kann der Verlust der NMT auch in Lebewesen, die nur eine NMT-Form exprimieren, drastische Folgen haben. In Hefe wird der *knockout* der *Nmt* ebenfalls als letal beschrieben (Duronio, 1989). In *Drosophila* führt der *knockout* zu multiplen Defekten (Ntwasa, 2001). *Nmt2*^{-/-} Mäuse sind in der Literatur bis jetzt nicht beschrieben.

Obwohl im allgemein davon ausgegangen wird, dass die beiden in Säugern vorhandenen Isoformen NMT1 und NMT2 sehr ähnliche Substratspezifität haben, gibt es auch Hinweise, die dies in Frage stellen, bzw. nach weiteren Funktionen der NMT fragen lassen.

Ducker et al. konnten mit RNAi-Experimenten zeigen, dass durch den *knockdown* von *Nmt2* mit siNMT2 (siRNA gegen *Nmt2*) die Apoptoserate in SK-OV-3 Zellen um 20 % erhöht wurde, wogegen *siNMT1* nur zu einer Erhöhung von ca. 8 % führte. Molekulare Analysen zeigten, dass durch siNMT2 u.a. die Proteinspiegel von BCLXL und MCL1 (2 Mitglieder der BCL2-Familie antiapoptotischer Proteine) stark reduziert wurden, wogegen siNMT1 hier kaum einen Effekt hatte. Im umgekehrten Fall führte siNMT1 zu einer reduzierten Phosphorylierung der MAP-Kinasen pMEK1/2, pMAPK und pELK, wogegen der *knockdown* mit siNMT2 keinen Einfluss auf die Phosphorylierung dieser Proteine hatte (Ducker, 2005).

NMT-Deletionen in *A. thaliana* sind von M. Pierre et. al. beschrieben. Dabei zeigte der *knockdown* von *Nmt1* u.a. schwere Defekte in der Entwicklungsphase der Triebe der Pflanze. Die Überexpression von *Nmt2* konnte dabei diesen Phänotyp nicht kompensieren, auch dann nicht, wenn die Überexpression von *Nmt2* unter der Kontrolle des *Nmt1*-Promotors erfolgte (Pierre, 2007). Die Ursache konnte von den Autoren nicht abschließend geklärt werden, jedoch wurde von ihnen vermutet, dass eine differentielle Substratspezifität von NMT1 und NMT2 dafür verantwortlich sein könnte.

1.6 Regulation der N-Myristoyltransferaseaktivität

Bei einem Enzym wie der N-Myristoyltransferase ist die zelluläre Gesamtaktivität u.a. von der absoluten Menge an vorhandenem Enzym abhängig. Folgt das Enzym der Kinetik nach Michaelis-Menten, so ist die Produktbildung, also die Bildung von myristoyliertem Protein, direkt proportional zur Enzymmenge. Dazu erwähnte Boutin (Boutin, 1997) in einem Review unpublizierte Daten aus seinem Labor, wonach erhöhte NMT-Aktivität in Lebern von 3-Methylcholanthren (3-MC)-behandelten Ratten gefunden wurde. Dieses Ergebnis könnte in Zusammenhang mit der Tatsache stehen, dass *Nmt2* in Lebern von TCDD-behandelten Mäusen transkriptionell induziert wird, da 3-MC ebenso wie TCDD ein Agonist des AHR ist (Kolluri, 2001).

Die Gruppe von R. K. Sharma hatte zudem zwei Modulatoren der NMT-Aktivität aus bovinem Gehirn isoliert. NIP71 (*NMT Inhibitor Protein 71*) ist ein kompetitiver Inhibitor der NMT. In den Untersuchungen hatte NIP71 den gleichen inhibitorischen Effekt auf alle verschiedenen NMT Isoformen aus bovinem Gehirn (King and Sharma, 1993), (King and Sharma, 1994). NIP71 konnte später als HSC70 (*heat shock cognate protein 70*) identifiziert werden (Selvakumar, 2004). Im Gegensatz dazu stellt das ebenfalls aus bovinem Gehirn isolierte NAF45 (*NMT activating factor 45*) einen Aktivator der NMT dar, der jedoch nicht auf alle isolierten Formen

aus bovinem Gehirn gleichsam wirkt. NAF45 konnte bis heute nicht identifiziert bzw. einem bekannten Protein zugeordnet werden.

1.7 N-Myristoyltransferasen in der Kanzerogenese

Dass die Verringerung der NMT-Proteinspiegel sich auf das zelluläre Gleichgewicht auswirken kann, zeigten Ducker et al. durch RNAi-Experimente (s. 1.5.4). Was passiert jedoch, wenn die NMT-Proteinspiegel und somit die NMT-Aktivität in der Zelle gesteigert werden? Die Gruppe um R.K. Sharma beschrieb erhöhte NMT-Aktivität in Geweben verschiedener Krebsarten im Vergleich zu normalem (gesundem) Gewebe, so z. B. in Tumoren des Colons beim Menschen sowie in Tumoren des Colons der Ratte, induziert durch Azoxymethan (Magnuson, 1995). NMT1 wurde in Gehirntumoren und im Karzinom der Gallenblase in erhöhten Proteinspiegeln gefunden, wie Immunoblot und immunohistologische Untersuchungen zeigten (Lu, 2005; Rajala, 2000b). 2006 zeigten Selvakumar et al., dass NMT2 in humanem Colonkarzinom erhöht ist. Dabei waren die NMT2-Spiegel in 90 % der Tumorbiopsien signifikant erhöht. Darüber hinaus fanden die Autoren, dass NMT1 und NMT2 differentiell mit verschiedenen Signalproteinen interagieren können. Durch Co-Immunpräzipitation zeigten die Autoren, dass NMT2 mit Caspase3 und BCL2 interagiert, NMT1 dagegen nicht. Welche Funktion dieser differentiellen Interaktion zu Grunde liegt bzw. welche Konsequenzen sich daraus ergeben, ist jedoch bisher ungeklärt (Selvakumar, 2006).

1.8 Aufgabenstellung

Die Arbeit baut auf den Vorarbeiten auf, nach denen die TCDD -Behandlung von 5L-Zellen die *Nmt2*-Expression transkriptionell induziert und bei *in vitro* Markierung mittels radioaktiver Myristinsäure zu wenigen Proteinbanden mit höherer Radioaktivität bei 1-dimensionaler elektrophoretischer Trennung führt (Kolluri, 2001).

Die Aufgabenstellungen waren:

- eines oder mehrere dieser induzierbar myristoylierten Proteine zu identifizieren;
- zu überprüfen, ob der Myristoylierungsgrad dieser Proteine induziert wird;
- die Ursache zu finden, warum nur einige Proteine induzierbar myristoyliert werden, während andere konstitutiv myristoyliert werden;
- molekulare Konsequenzen, die sich aus einem erhöhten Myristoylierungsstatus ergeben, zu untersuchen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Geräte, Zubehör, Verbrauchsmaterialien

Zweistrahl Photospektrometer	Unvikon 941plus, Kontron Instruments
Mikroskop	Zeiss LSM 510 META
Photometer	Bio Photometer, Eppendorf
PCR Maschine	GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems
Platereader	Synergy2, Biotek; Software: GenAmp
Chromatographiesystem	Äkta Purifier, Amersham Biosystems. Software: Unicorn 5.10, GE Company.
2D-Gelelektrophorese	Multiphor II, Pharmacia
Geldokumentation	Epi-Chemi Darkroom, UVP-Laboratory Products. Software: Labworks-Image Acquisition and Analysis Software
Immunoblot Dokumentation	Night Owl, EG&G Berthold Molecular Light Imaging. Software: WinLight32, Perkin Elmer-Berthold.
Film Entwickler	Kodak
SDS-PAGE Kammer	NOVEX, Invitrogen
Blot Modul für NOVEX	Invitrogen
Luminometer	DLRready, Berthold
PVDF-Membran	Carl-Roth GmbH
GST-FF Säulen	GE-Healthcare
Zellkulturschalen	Nunc (Nunclon)
Filterpapier für Western-Blot	Biorad
Gel Kassetten	Invitrogen
Sterile Einmalpipetten	Costar
Pipettenspitzen	Greiner BioOne
Vakuum Zentrifuge, Univapo 100H	UNIEQUIP
Sterilbank	BDK
Zellkultur Inkubator	Heraeus Instruments
Ultra-Turrax (T5-FU)	IKA
Gewebe-Potter	B. Braun

2.2 Chemikalien

1 kB Ladder	Invitrogen
³ H-Myristinsäure	Amersham Bioscience
Acrylamid-Lsg. (37.5 : 1)	Carl-Roth GmbH
Agarose	Carl-Roth GmbH
Ampizillin	Carl-Roth GmbH
APS	Carl-Roth GmbH
Bradford Reagenz	Carl-Roth GmbH
BSA-Standard	Pierce
CHAPS	Sigma-Aldrich
Chloramphenicol	Carl-Roth GmbH
Cycloheximide	Sigma-Aldrich
Deoxycholat	Sigma-Aldrich
DMEM Zellkulturmedium	Biochrom
DMSO	Sigma-Aldrich
dNTP-Mix	Fermentas
DTE	Merck
DTT	Merck
Essigsäure (100 %)	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	Carl-Roth GmbH
FCS	Biochrom
Glukose	Sigma-Aldrich
Glutathion	Sigma-Aldrich
Glycerin	Sigma-Aldrich
Harnstoff	Sigma-Aldrich
Hoechst Farbstoff 33342	Sigma-Aldrich
IPG-Strips	GE Healthcare
Kanamyzin	Carl-Roth GmbH
LB-Medium	Carl-Roth GmbH
Lipofectamin 2000	Invitrogen
Luminollösung	Pierce
Milchpulver	Carl-Roth GmbH
Myristoyl-CoA	Sigma-Aldrich
NaCl	Carl-Roth GmbH
Natriumacetat	Sigma-Aldrich
NP-40	Fluka

MATERIAL UND METHODEN

NZYM-Medium	Fluka
OptiMEM	Invitrogen
PBS (1 ×) für Zellkultur	Biochrom
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich
Proteinmarker (gefärbt)	NEB
Pyruvat Dehydrogenase (PDH)	Sigma-Aldrich
Random-Hexamer Primer	Fermentas
SDS	Carl-Roth GmbH
TCDD	Ökometric
TEMED	Carl-Roth GmbH
Thioharnstoff	Invitrogen
Tris-HCl	UPS
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA	Biochrom
Tween 20	Sigma-Aldrich

2.3 Enzyme und Kits

Agarose Gel Extraktion	QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen
Aufreinigung von PCR-Fragmenten	PCR-Wizard, Promega
DNA (präparativer Maßstab)	Plasmid Purification Maxi Kit, Qiagen
RNA Isolation (Zelllinien)	High Pure RNA Isolation Kit, Roche
RNA Isolation (Gewebe)	High Pure Tissue RNA Isolation Kit, Roche
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs Fermentas
T4-DNA Ligase	Invitrogen
Thrombin	Amersham Bioscience
BCA-KIT	Pierce

2.4 Peptide

Peptide wurde HPLC aufgereinigt (Reinheit > 90 %) bei PSL (Peptide Speciality Laboratory) in Heidelberg bestellt.

vSRC	GSSKSKPKDP
tBID	GSNKSKPKDA
MARCKS	GAQFSKTAAK
PRS4	GQSQSGGHGP
rLCK	GCVCSSNPED
p22	GSRASTLLRD
G _{αi2}	GCTVSAEDKA
vSRC(G2A)	ASSKSKPKDP

2.5 Proteasom Substrate

Suc-LLVY-AMC	Biomol
Bz-VGR-AMC	Bachem
Z-LLE-AMC	Bachem

2.6 Bakterienstämme

DH5 α	Invitrogen
TOP10	Invitrogen
BL21(DE3)	Stratagene
BL21(DE3) Rosetta	Merck

2.7 Eukaryotische Zelllinien

5L-Zellen: Von H4IIEC3 abstammende dedifferenzierte Ratten-Hepatoma-Zelllinie (Gottlicher, 1990; Gottlicher and Wiebel, 1991; Wiebel, 1991).

HEK293-Zellen: Humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie (ATCC: CRL-1573)

2.8 Vektoren

pcDNA3.1(+)HA

pcDNA3.1(+)-Vektor von Invitrogen mit *N*-terminalem HA-Tag. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Göttlicher

pcDNA-HA-NMT1

Schrittweise Klonierung von *Nmt1*-cDNA aus 5L-Zellen in TOPO2.1 und anschließender BamHI/EcoRI-Klonierung in pcDNA3.1(+)HA.

TOPO-NMT1_for	5'- atg gcg gat gag agt gag ac
TOPO-NMT1_rev	5'- tta ctg taa cac caa ccc aac c
pcDNA-NMT1_for	5'- gat tga att ctt atg gcg gat gag agt
pcDNA-NMT1_rev	5'- gca tct cga gct ttt act gta aca cca a

pcDNA HA -NMT2S / pcDNA-HA -NMT2L

Schrittweise Klonierung von *Nmt2*-cDNA aus 5L-Zellen in TOPO2.1 und anschließender BAMHI/EcoRI-Klonierung in pcDNA3.1(+)HA

TOPO-NMT2_for	5'-5'-atg gcg gag gac agc gag
TOPO-NMT2_rev	5'- cta ctg tag aac aag tcc
pcDNA-NMT2_for	5'- gat tga att ctt atg gcg gag gac agc
pcDNA-NMT2_rev	5'- gca tct cga gct tct act gta gaa caa g

pGEX-GSTNMT1

Sall/NotI Klonierung *Nmt1*, amplifiziert aus pcDNA-NMT1-HA

pGEX-NMT1_for	5'-agt cga ctg cgg at gaga gtg aga cag
pGEX-NMT1_rev	5'-att acg ccg gcg tta ctg taa cac caa ccc aac

pGEX-GSTNMT2S / pGEX-GSTNMT2L

Sall/NotI Klonierung *Nmt2S* und *Nmt2L*, amplifiziert aus pcDNA-HA-NMT2S, pcDNA-HA-NMT2L

pGEX-NMT2_for 5'-att agg atc cgc gga gga cag cga
pGEX-NMT2_rev 5'-att act cga gct act gta gaa caa gtc caa gtc caacct cct t

pQEtri-PRS4HIS, pQEtri-PRS4(G2A)HIS

Blunt/EcoRI-Klonierung der cDNA *Psmc1* (PRS4) aus 5L-Zellen in pQE-tri (Qiagen), C-terminales Epitop 6 × HIS; bzw. Mutante mit Punktmutation im Protein G2A

pQEtri-PRS4-for 5'- ggt caa agt cag agt ggt ggc
pQEtri-PRS4mut_for 5'- gct caa agt cag agt ggt ggc
pQEtri-PRS4_rev 5'- att act cga gat aca gcc cct c

pEYFP-PRS4/ pECFP-PRS4, pEYFP-PRS4(G2A)/ pECFP-PRS4(G2A)

NheI/XmaI-Klonierung der cDNA *Psmc1* (PRS4) wildtyp (bzw. mit Punktmutation im Protein G2A) aus 5L-Zellen in pEYFP/pECFP, C-terminales Epitop.

YFP-PRS4_for 5'- att gct agc acc atg ggt caa agt cag agt ggt
YFP-PRS4(G2A)_for 5'- att gct agc acc atg gct caa agt cag agt ggt
YFP-PRS4_rev 5'- taa tcc cgg gcg aga tac agc ccc tca ggg gt

HES1-pGL3

Luziferase-Gen unter der Kontrolle eines 350 BP Fragments (-200 bis +150 vom Transkriptionsstart) der *Hes1* Promotorregion (Maus). Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von E. Hol, Amsterdam (Fischer, 2005)

CA-Notch GFP

Konstitutiv aktiver Notch 1 Rezeptor der Maus; ab Aminosäure 1741 des Notch 1 Rezeptors kloniert in einen bizistronischen GFP-Vektor.
Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von E. Hol, Amsterdam (Fischer, 2005)

DN-Notch GFP

Dominant-negativ Notch 1 Rezeptor der Maus; Aminosäure 1-1741 des Notch 1 Rezeptors kloniert in einen bizistronischen GFP-Vektor.
Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von E. Hol, Amsterdam (Fischer, 2005)

Ubi-Renilla

pGL3basic mit Luziferase aus *Renilla Reformis* unter der Kontrolle des Ubiquitinpromotors; Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Göttlicher (Kassel, 2004).

2.9 Oligonukleotide

PCR-Primer

NMT2_for (S-, M-, L- Form)	5'-ccc agg aga tta aga ttc agc a
NMT2_rev (universal)	5'-act ggc tgt gtg tcc cag aa
NMT2S_for (spezifisch)	5'-gca atc ttc taa aaa tcc cac cat
NMT2M_for (spezifisch)	5'-agc cat gga atc cca cca tc
NMT2L_for (spezifisch)	5'-gga agg tga atg gat aga ttt aag aat

Light cycler Primer

NMT1_for	5'-cct gag cag aaa cat gac ca
NMT1_rev	5'-cgg aat gtc ctt ctt ttc ca
NMT2S_for	5'-gtc ttc taa aaa tcc cac cat cc
NMT2S_rev	5'-gtg gcc tca atg ttc ct
NMT2L_for	5'-gga agg tga atg gat aga ttt aag aat
NMT2L_rev	5'-act ggc tgt gtg tcc cag aa
BID_for	5'-ggc ttt ctc cga aac aat gac
BID_rev	5'-ctg gca atg ttg tgg atg act
GNAI2_for	5'-agt aca cag ggg cca aca ag
GNAI2_rev	5'-aa ggc gac aca gaa gat ga
PRS4_for	5'-gaa atc cag cgg aca atg tt
PRS4_rev	5'-agg ggt gcc ttc ttg ttt tt
HMBS_for	5'-gct gag aac ctg ggc atc ag
HMBS_rev	5'-agg agc aca ggg cac ttg ac
p22_for	5'-aca aag ggg aga acg gaa ct
p22_rev	5'-ggc act gtc tcc atc ttg gt
NIBL_for	5'-ctg tct ccc tct tca aca gca
NIBL_rev	5'-tca tac agc acc agc cca tag

siRNA:

siNMT2-525, (siNMT2) sense:	5'-aga caa uau ccg cca gga att
antisense:	5'-uuc cug gcg gau auu guc utt
siLuziferase, (siLuz) sense:	5'-cgu acg cgg aau acu ucg att
antisense:	5'-ucg aag uau ucc gcg uac gtt

2.10 Antikörper

2.10.1 Primärantikörper

NMT2	Abgent BD Bioscience Santa Cruz Biotech
NMT1	BD Bioscience Santa Cruz Biotech
β-AKTIN	Santa Cruz Biotech
PRS4	Biomol Alexa
GFP	Roche Santa Cruz Biotech
G _{αi2}	Santa Cruz Biotech
BID	Santa Cruz Biotech
HSC70	Santa Cruz Biotech
8A1 (anti non-Myr PRS4)	Kooperation Fr. Kremmer
6G4 (anti non-Myr PRS4)	Kooperation Fr. Kremmer
HA-Probe	Santa Cruz Biotech

2.10.2 Sekundärantikörper

anti-Maus	Pierce
anti-Kaninchen	Pierce
anti-Ratte	Jackson ImmunoResearch
anti-Ziege	Santa Cruz Biotech

2.11 Puffer

Zur Herstellung und Verdünnung aller Puffer wurde H₂O aus einer Millipore Anlage verwendet.

2.11.1 RIPA-Puffer

PBS (1 ×), NP 40 (1 % v/v), Natriumdeoxycholat (0.5 % g/v), SDS (0.1 % g/v). Vor Verwendung wurde Protease Inhibitor-Cocktail frisch zugegeben (1/100 v/v).

2.11.2 PBS

(1 ×): NaH₂PO₄ (9.1 mM), Na₂HPO₄ (1.7 mM), NaCl (150 mM), pH 7.4

2.11.3 APS-Lösung

Ammoniumpersulfat (10 % g/v) in H₂O

2.12 Zellbiologische Methoden

Die Kultivierung aller verwendeten Zelllinien erfolgte in einem Inkubator, der konstante Umgebungsbedingungen (37 °C, 10 % CO₂, 90 % Luftfeuchtigkeit) gewährleistet. Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

2.12.1 Zellzahlbestimmung

Um bei Experimenten eine definierte Anzahl an Zellen in die Kulturschalen aussäen zu können, wurde zuvor die Zellzahl bestimmt. Dafür wurde ein Coulter Counter der Firma Coulter-Beckman verwendet.

2.12.2 Kultur adhärenter Zellen

Die Zelllinien HEK293 und 5L wurden auf 60 mm oder 100 mm Zellkulturschalen unter Verwendung von Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, komplementiert mit 10% fötalem Kälber Serum (FCS), 1 % Penizillin/Streptomycin und 1 % Glutamin) kultiviert. Durch Passagieren im Abstand von zwei bis drei Tagen wurden die Zellen in einem Konfluenzbereich zwischen 50 % und 90 % gehalten. Vor dem Passagieren wurden die Zellen mit PBS gewaschen, durch drei-minütige Inkubation in 1 ml Trypsin/EDTA (0.5% Trypsin/0.5% EDTA in PBS) von der Platte abgelöst und in 10 ml frischem Kulturmedium aufgenommen, um das Trypsin zu inaktivieren. Nach erneutem Abzentrifugieren und adäquater Verdünnung mit Kulturmedium wurde die Zellsuspension erneut ausplattiert.

2.12.3 Lagerung des Zellvorrats

Zur langfristigen Lagerung von eukaryotischen Zellen wurden gewöhnlich 1×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium (DMEM mit 10 % FCS (v/v) und 10 % DMSO (v/v)) aufgenommen und die Zellsuspension in ein Kryoröhrchen überführt. Dieses wurde anschließend langsam in einer Einfrierbox der Firma Nalgene („Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container“) auf -80 °C heruntergekühlt und weitere 24 h bei -80 °C gehalten. Die endgültige Lagerung erfolgte in speziellen Stickstoff-Containern bei -196 °C.

2.12.4 Transiente Transfektion

2.12.4.1 Calciumphosphat-Methode

HBS (2 × HEPES Buffered Saline)

25 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1.2 mM Na₂HPO₄

Calciumchlorid

2.5 M CaCl₂ in H₂O

Calciumphosphat-Kristalle können während des Kristallwachstums in der Lösung enthaltene Plasmid-DNA einschließen. Zellen wiederum sind in der Lage, diese Kristalle aufzunehmen und exprimieren daraufhin die Plasmid-kodierten Proteine (ektopische Expression). Für die Transfektion einer 100 mm Kulturschale mit HEK293-Zellen wurden folgende Lösungen verwendet:

- Lösung 1: 10 µg Gesamt-DNA
 50 µl 2.5 M CaCl₂-Lösung (RT)
 mit H₂O (RT) auf 500 µl auffüllen
- Lösung 2: 500 µl 2 × HBS (pH 7.1; RT)

HEK293-Zellen wurden 24 h vor Transfektion durch Passagieren so verdünnt, dass bei Zugabe der Transfektionslösung eine maximale Konfluenz von 40 % erreicht war. Zur Herstellung der Transfektionslösung wurde Lösung 2 in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. Unter kontinuierlichem Mischen wurde Lösung 1 tropfenweise zugegeben. Nach 1-minütiger Inkubation bei RT wurde die Mischung gleichmäßig ins Medium der zu transfizierenden Zellen gegeben. Innerhalb weiterer 30 Minuten wurden unter dem Lichtmikroskop kleine Kristalle erkennbar. Für weiterführende Analysen wurden die Zellen mindestens 24 h im Brutschrank kultiviert.

2.12.4.2 Lipofektion

5L-Zellen wurden durch Lipofektion mit Lipofectamin2000TM transient transfiziert. Dabei wurden die adhärennten Zellen zuvor nicht ausplattiert, sondern in Suspension mit der Transfektionslösung (Lipofectamin2000TM + DNA bzw. siRNA) gemischt und anschließend ausgesät (reverse Transfektion). Für die Transfektion einer 60 mm Schale wurden Plasmid-DNA (8.0 µg) bzw. siRNA (200 pmol) in 0.5 ml OptiMEM Medium (ohne Serum, ohne Antibiotikum) in einem Eppendorfreaktionsgefäß vorgelegt. Gleichzeitig wurde ein zweites Reaktionsgefäß mit 0.5 ml OptiMEM und Lipofectamin2000TM (20 µl für DNA bzw. 10 µl für

siRNA) vorbereitet. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurden die beiden Lösungen vereinigt und für weitere 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Transfektionslösung zu 9×10^5 Zellen in 5 ml DMEM gegeben, vorsichtig gemischt und diese Suspension anschließend in 60 mm Kulturschalen ausgesät.

2.12.5 Tritium-Markierung

Zur Identifizierung von Zielproteinen der *N*-Myristoyltransferasen wurden Zellen für 18 h in DMEM mit ^3H -Myristinsäure metabolisch markiert. Die zum Medium gegebene ^3H -markierte Myristinsäure wird dabei von den Zellen aufgenommen, zu ^3H -Myristoyl-CoA konvertiert und als Substrat für die NMT eingesetzt. Für die Standardprozedur wurde 24 h nach Aussaat von 9×10^5 Zellen in 60 mm Schalen das Medium auf 2 ml reduziert und mit 925×10^3 Bq (25 μCi) ^3H -Myristinsäure für 18 h markiert. Anschließend wurden die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen und anschließend je nach weiterführender Analyse in 2D-Harnstoffpuffer oder RIPA-Puffer lysiert.

2.12.6 Konfokale Lasermikroskopie

Zur Untersuchung der Lokalisierung chimärer GFP-Proteine wurden 1×10^4 HEK293-Zellen auf 4-Loch Glasobjektträgern (BD-Bioscience) ausgesät und 24 h später durch Lipofektion mit den entsprechenden GFP-Konstrukten transfiziert. Weitere 24 h später wurden die Zellen durch Cyto-Fix/Cyto-Perm (BD Bioscience) nach Herstellerangaben fixiert und nach Entfernen der Kammern ein Deckglas auf den Objektträger aufgebracht. Färbung der Zellkerne erfolgte durch den Hoechst-Farbstoff 33342.

Die Analyse erfolgte am Institut für Pathologie (Hr. Hutzler) mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop LSM510meta der Firma Zeiss. Die Anregung der PRS4-CFP Proteine erfolgte bei 458 nm, die der PRS4-YFP-Proteine bei 514 nm mit einem Argonlaser. Die Anregung des Farbstoffs Hoechst 33342 erfolgte mit einem 5 Watt gepumpten Titan-Saphir Laser bei 633 nm durch 2-Photonen-Absorption.

2.12.7 Präparation von Zellextrakten

Um zelluläre Proteine biochemischen Analyseverfahren zugänglich zu machen, wurden Zellen oder Gewebe unter Verwendung spezieller Puffer aufgeschlossen. Für Immunpräzipitationen und für allgemeine proteinbiochemische Analysen wurde RIPA-Puffer verwendet. Adhärente Zellen wurden in der Kulturschale mit PBS gewaschen, mit bis zu 1 ml RIPA-Puffer lysiert, abgeschabt und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Danach wurden die Zellen zur vollständigen Lyse 30 min auf Eis inkubiert und anschließend zum

Abtrennen unlöslicher Zellbestandteile bei 25000 g für 10 min zentrifugiert. Das überstehende Lysat wurde für weitergehende Untersuchungen verwendet.

2.13 Molekularbiologische Methoden

2.13.1 RT-PCR

Zur Klonierung und für die Analyse des Expressionsniveaus bestimmter Gene mittels LightCycler, muss die aus Zellen oder Geweben isolierte einsträngige mRNA in doppelsträngige cDNA transkribiert werden (Reverse Transkription). Diese cDNA kann dann in einer PCR weiter amplifiziert werden. Für die Reverse Transkription wurde das System Superscript II der Firma Invitrogen unter Berücksichtigung der Herstellerangaben verwendet. Gewöhnlich wurden 2-5 µg gesamt RNA pro Reaktion eingesetzt. Als Primer wurden *random-hexamer* Primer der Firma Fermentas verwendet.

2.13.2 PCR/Real-Time PCR/ (LightCycler)

Die Amplifikation von DNA-Sequenzen zur Klonierung erfolgte mit Pfu-Polymerase, einer Polymerase die *blunt-ends* erzeugt und deren Fehlerrate im Vergleich zur herkömmlichen Taq-Polymerase deutlich kleiner ist. Pro Reaktion wurde 1 µg Gesamt-cDNA als Matrize eingesetzt. (Lag die zu amplifizierende cDNA bereits kloniert in einem Vektor vor, wurden 200 ng des entsprechenden Plasmids eingesetzt.)

Für 1000 Bp wurden 2 min Extensionszeit in der PCR kalkuliert. Bei 1500 Bp wurden zur Sicherheit 4 min Extensionszeit eingestellt.

PCR-Programm:	95° C	5 min	(initialer heiß-Start)	1 Zyklus
	95° C	1 min		34 Zyklen
	56° C	1 min		
	72° C	4 min		
	72° C	10 min		

Nach der PCR wurden die DNA-Fragmente über Agarose Gelelektrophorese/Gel-Extraktion gereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -20° C aufbewahrt.

Für gewöhnliche PCR Reaktionen, d.h. zur initialen Überprüfung der Genexpression, wurde das *One-Step Kit* der Firma Qiagen verwendet. Dieses vollzieht die reverse Transkription und die Amplifikation einer klassischen PCR in einem Schritt dadurch, dass für die reverse Transkription und die anschließende PCR das gleiche Primerpaar verwendet wird.

PCR-Programm:	56 °C	30 min	1 Zyklus (initialer heiß-Start)
	95° C	5 min	
	95° C	45 sek	34 Zyklen
	56° C	45 sek	
	72° C	1 min	
	72° C	10 min	1 Zyklus

Die Analyse durch *real-time* PCR erfolgte in einem LightCycler der Firma Roche nach Herstellerangaben in entsprechenden Glaskapillaren. Durch Einbau eines DNA-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR-Green) während der PCR Reaktion lässt sich die Menge an amplifizierter DNA nach jedem PCR-Zyklus online verfolgen.

Die Auswertung der Daten erfolgte nach einem von Pfaffl et al. entwickelten System mit dem Programm REST2005 (Pfaffl, 2002). Als Normalisierungskontrolle wurde die Expression der *Hmbs* (Porphobilinogen Deaminase) analysiert.

2.13.3 Agarose Gelelektrophorese

Laufpuffer (1 ×TAE)

Tris pH 8.3 (40 mM), Essigsäure (20 mM), EDTA (10 mM)

DNA Ladepuffer (10 ×)

0.25 g Xylenecyanol, 0.25 g Bromphenolblau, 30 ml Glycerin, 70 ml H₂O

Zur Analyse und Aufreinigung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurde eine Agarose Gelelektrophorese in 1-1.5 %igen (g/v) TAE-Agarose Gelen durchgeführt. Den Gelen wurde vor dem Gießen der DNA-interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0.5 µg/ml zugefügt um spätere Visualisierung der DNA-Banden zu ermöglichen. Die Proben wurden mit 10 × Ladepuffer gemischt und parallel mit einem DNA-Größenstandard (*1 kb ladder*, Invitrogen), zur Abschätzung der Fragmentgröße, auf das Gel aufgetragen und bei 100 V aufgetrennt. Die Visualisierung erfolgte in einer UV-Kammer bei Licht mit der Wellenlänge 302 nm.

2.13.4 TBE-PAGE

TBE-PAGE Laufpuffer

Tris pH 8.3 (89 mM), EDTA (Na₂-Salz, 2 mM), Borsäure (89 mM)

Zur Auftrennung kleiner DNA-Fragmente und Quantifizierung von PCR-Reaktionen wurde eine TBE-PAGE durchgeführt. Die Proben wurden dazu auf 5 %igen TBE-Acrylamid Gelen bei 80 V aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele für 20 min in 50 ml TBE-Puffer mit SYBR-Green (0.01 %, v/v) inkubiert und in einer UV-Kammer bei 302 nm und entsprechendem Filter visualisiert.

2.13.5 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Damit Bakterienzellen Plasmid-DNA aufnehmen können (kompetente Zellen), müssen diese einer speziellen Behandlung unterzogen werden. Zur Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien wurde die CaCl₂-Methode verwendet. Hierzu wurden 20 ml LB-Medium aus einem Glycerin-Stock mit naiven Zellen (BL21, TOP10, DH5α) angeimpft und über Nacht bei 37° C im Schüttelinkubator angezogen. Am nächsten Morgen wurde die Kultur 1:20 in frisches LB-Medium (500 ml) verdünnt und dann weiter bis zu einer OD₆₀₀ von 0.35-0.45 angezogen. Anschließend wurde die Zellsuspension für 15 min auf Eis inkubiert und die Zellen durch Zentrifugation bei 3000 rpm für 15 min bei 4 °C geerntet. Das resultierende Pellet wurde in halbem Volumen der Originalkultur (250 ml) vorsichtig in eiskaltem CaCl₂ (100 mM) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 3000 rpm und 4 °C für 10 min erneut geerntet und das resultierende Zellpellet in 1/25 des ursprünglichen Volumens in eiskaltem CaCl₂ (100 mM) mit Glycerin (10 % v/v) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde weitere 3-4 h auf Eis inkubiert und anschließend Aliquots von je 100 µl in Eppendorfreaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.13.6 Transformation kompetenter *E. Coli*-Zellen

Kompetente Bakterien wurden durch Hitzeschock-abhängige DNA-Aufnahme transformiert. Hierfür wurden 100 µl kompetenter Bakteriensuspension mit 50-500 ng Plasmid-DNA gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (2 min) im Wasserbad bei 37 °C und anschließender Eiskühlung (2 min) wurden 900 µl LB-Medium zum Transformationsansatz gegeben. Anschließend wurden die Zellen 1 h bei 37 °C in einem Schüttler inkubiert und die Zellsuspension zur Selektion transformierter Klone auf entsprechendem Antibiotikum-enthaltenden LB-Agar ausgestrichen.

2.13.7 Übernachtkultur

Transformierte Bakterien wurden entsprechend der Plasmid-kodierten Resistenz in Antibiotikum-haltigem LB-Medium über Nacht bei 37 °C in einem Inkubationsschüttler kultiviert. Zur Selektion resistenter Klone wurden Ampizillin (50 µg/ml) bzw. Kanamycin (30 µg/ml) verwendet.

2.13.8 Lagerung von *E. coli*-Stämmen

Zur langfristigen Lagerung wurden charakterisierte *E. coli* Klone bei –80 °C aufbewahrt. Dazu wurde von den entsprechenden Klonen Übernachtkulturen angezogen. 500 µl der Kultur wurden mit 500 µl LB-Medium (50 % Glycerin (v/v)) vermischt und in einem Kryoröhrchen bei –80 °C gelagert.

2.13.9 DNA-Aufreinigung

Für die Aufreinigung kleiner Mengen DNA nach einer PCR oder Agarose-Gelelektrophorese wurden DNA-Aufreinigungs Kits je nach Anwendung und Vorschrift des Herstellers verwendet.

Für die Aufreinigung größerer Mengen DNA wurde das Plasmid Purification Maxi Kit der Firma Qiagen verwendet. Hierfür wurden 300 ml bakterielle Übernachtkultur zur Plasmid-DNA Reinigung über tip500 Anionentauscher Säulen nach Vorschrift des Herstellers eingesetzt. Die gereinigte DNA wurde in H₂O zu einer Konzentration von 1 µg/µl aufgenommen.

Zum Screenen von Bakterienkolonien wurden Plasmid Mini-Präparationen mit Alkohol-Fällung bakterieller Plasmid DNA durchgeführt.

Bakterien einer Übernachtkultur (1 ml) wurden durch Zentrifugation für fünf Minuten bei 14000 rpm pelletiert und nach Vorschrift des QiaPrep Spin Mini-Kits aufgenommen und lysiert. Zur Präzipitation der DNA wurde dem Lysat dann die doppelte Menge an gekühltem Isopropanol (-20 °C) zugesetzt. Die präzipitierte DNA wurde durch 10-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm abgetrennt, einmalig ohne Resuspendierung mit 70 %igem Ethanol (RT) gewaschen, getrocknet und in H₂O aufgenommen.

2.13.10 DNA/RNA-Mengenbestimmung

Nukleinsäuren besitzen ein charakteristisches Absorptionsmaximum im UV-Bereich bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD₂₆₀). Daher kann die Konzentration der sich in Lösung

befindenden DNA/RNA photometrisch leicht bestimmt werden. Verunreinigungen durch Proteine, deren Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm liegt (OD_{280}), können durch Bestimmung des OD-Quotienten abgeschätzt werden. Hierbei gilt:

1. OD_{260} von 1 entspricht 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ doppelsträngiger DNA, bzw. 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ einzelsträngiger DNA oder RNA.
2. der OD-Quotient OD_{260}/OD_{280} nicht kontaminierter doppelsträngiger DNA liegt bei ca. 1.8.

2.13.11 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die in der Lage sind doppelstränge DNA sequenzspezifisch zu schneiden. Dies bildet die Grundlage für molekularbiologische Klonierungsarbeit. Die Endonukleasen erkennen palindromische Sequenzen der DNA und „zerschneiden“ den DNA Doppelstrang durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen. Dabei erzeugen sie sog. „*sticky ends*“ (5'-bzw. 3'-Überhänge) oder „*blunt ends*“ (glatte Enden). Für den Restriktionsverdau wurden variable Mengen an DNA (Plasmid oder PCR-Produkt) mit 1 - 10 U Restriktionsenzym eingesetzt. Unter Berücksichtigung der Herstellerangaben wurden Einzel- bzw. Doppelrestriktionen über Nacht durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Gelaufreinigung der DNA über Agarose Gelelektrophorese beendet und die DNA-Fragmente durch Gelextraktion zurückgewonnen.

2.13.12 Ligation

Zur Ligation von linearisiertem Vektor und DNA-Fragmenten wurde das T4-Ligase System der Firma Invitrogen verwendet. Dabei wurden Vektor und DNA-Fragment im molaren Verhältnis 1 : 5 – 1 : 10 in einem Gesamtansatz von 20 μl gemischt und über Nacht bei 16 °C inkubiert. 10 μl des Reaktionsansatzes wurden direkt zur Transformation kompetenter *E. coli* Zellen verwendet.

2.13.13 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen/Gewebe

Zur Untersuchung der transkriptionellen Regulation verschiedener Gene und für Klonierungsarbeiten kann RNA getrennt von DNA aus Zellen isoliert werden. Dies erfolgte mit Hilfe des *high pure RNA isolation Kit* der Firma Roche. Je nach Zelltyp wurden $4-8 \times 10^5$ Zellen in 6-Loch Platten ausgesät und nach erfolgtem Experiment die Gesamt-RNA den Herstellerangaben entsprechend isoliert. Die isolierte RNA wurde auf 100 ng/ μl verdünnt und bei -80 °C aufbewahrt.

2.14 Proteinbiochemische Methoden

2.14.1 SDS-PAGE

SDS-PAGE Laufpuffer

Tris pH 7.3 (25 mM), Glycin (192mM), SDS (0.1 % g/v)

4× Probenpuffer

TRIS pH 6.8 (125 mM), Glycerin (50 % v/v), SDS (6 % g/v), Bromphenolblau (0.01 % g/v), β-ME (10 % v/v)

Proteine einer Probe wurden auf SDS-Polyacrylamid Gelen aufgetrennt. Dabei fand das System nach Lämmli mit Sammel- und Trenngel Verwendung (Laemmli, 1970).

Die Gelstärke wurde durch Variation des Acrylamidanteils den individuellen Erfordernissen angepasst. Die Proteinproben wurden in 4× Probenpuffer aufgenommen und vor dem Auftragen bei 95 °C (5 min) denaturiert.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer NOVEX™ Gelkammer bei 200 V für 1 h.

2.14.2 Western-Blot

Western-Blot Transferpuffer

Tris (50 mM), Glycin (40 mM), Methanol (20 % v/v), SDS (0.025 % g/v)

Western-Blot Strippingpuffer

Tris pH 6.8 (62.5 mM), SDS (2 % g/v), β-ME (100 mM)

Western-Blot Waschpuffer (TBST-Tris Buffered Saline Tween)

Tris pH 8.0 (10 mM), NaCl (150 mM), Tween-20 (0.05 % v/v)

Western-Blot Blockpuffer (TBST-5 % Milch)

Tris (10 mM), NaCl (150 mM), Tween-20 (0.05 %), Milchpulver (5 % g/v), pH 8.0

Antikörper-Puffer (TBST + 1.5 % BSA)

Tris pH 8.0 (10 mM), NaCl (150 mM), Tween-20 (0.05 % v/v), BSA (Fraction V, 1.5 % g/v)

Für die immunologische Detektion der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine, wurden diese auf eine PVDF-Membran mittels Elektrotansferverfahren transferiert (Western-Blot).

Die PVDF-Membran wurde dazu für 5 min in Methanol (100 %) aktiviert und anschließend das Transfersandwich wie folgt aufgebaut:

[Anode-Schwamm-Filterpapier-PVDF-Membran-Gel-Filterpapier-Schwamm-Kathode]. Der Transfer erfolgte in einem NOVEXTM Blot-Modul in Transferpuffer bei 30 V für 1 h. Nach Ende des Transfers wurde die Membran kurz in H₂O gewaschen und dann in TBST-5 % Milch für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit TBST gewaschen und mit dem entsprechenden Primärantikörper in TBST-1.5 % BSA über Nacht bei 4 °C oder 2 h bei RT inkubiert.

Nach Beendigung dieser Inkubationsphase wurde die Membran 3 × 5 min mit TBST gewaschen und für 1 h mit Sekundärantikörper in TBST-5 % Milch bei RT inkubiert.

Anschließend wurde die Membran in TBST für 3 × 5 min gewaschen. Die Detektion erfolgte durch Benetzen der Membran mit einer Lösung aus Luminol/H₂O₂ und Auflegen von Röntgenfilmen bzw. durch Inkubation in einem *Molecular Light Imager* (Night-Owl).

2.14.3 Gel-Färbung

Proteine, die durch SDS-PAGE aufgetrennt wurden, können durch direkte Färbung im Gel sichtbar gemacht werden. Dazu wurden zwei unterschiedlich sensitive Verfahren verwendet: die Coomassie-Färbung und die sensitivere Silber-Färbung.

2.14.3.1 Silberfärbung

Fixierlösung

Eisessig (10 % v/v), Ethanol p.A. (40 % v/v)

Sensibilisierer

Ethanol p.A. (30 % v/v), Natrium-Thiosulfat (0.8 mM), Natriumacetat (830 mM)

Silberlösung

Silbernitrat (12 mM)

Entwickler:

Natriumcarbonat (470 mM), Formaldehyd 37 %ig (0.04 % v/v)

Stopplösung

Glycin (67 mM)

Aufbewahrungslösung

Ethanol p.a. (60 %v/v), Glycerin (4 %v/v)

Die SDS-PAGE Gele wurden 2 × 15 min in Fixierlösung fixiert und anschließend in Sensibilisierer für 30 min inkubiert. Danach wurden die Gele 6 × 5 min mit H₂O gewaschen

und 20 min mit Silberlösung behandelt. Anschließend wurden die Gele durch Inkubation im Entwickler bis zum Erscheinen der Proteinbanden langsam geschwenkt. Um eine Überfärbung zu verhindern, wurde der Entwickler dann durch Stopplösung ersetzt. Zur Aufbewahrung wurden die Gele anschließend mit Aufbewahrungslösung in Plastikfolie eingeschweißt.

2.14.3.2 Coomassie-Färbung

Coomassie-Färbelösung

Coomassie G250 (0.025 %, g/v), EtOH (40 % v/v), AcOH (10 % v/v)

Entfärber

EtOH (40 % v/v), AcOH (10 % v/v)

SDS-PAGE Gele wurden 30 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Zum Sichtbarmachen der Proteinbanden wurden die Gele durch mehrmaliges Waschen in Coomassie-Entfärber partiell entfärbt.

2.14.4 2D-Gelelektrophorese

RH-Puffer (Rehydratisierungspuffer)

Eine Lösung aus Harnstoff 6 M + Thioharnstoff 2 M wurde hergestellt. Diese wurde durch Zugabe von Serdolit MB-1 (1 % g/v) und Rühren für 20 min behandelt. Anschließend wurde das Serdolit durch Filtration entfernt und es folgte Zugabe von CHAPS (1 %, g/v), IPG Puffer (0.2 % v/v), DeStreak™ (15 mg/ml).

Reduktions-Lösung

Tris pH 6.8 (50 mM), Harnstoff (6 M), Glycerin (30 % v/v), SDS (2% w/v), DTE (1 % g/v)

Alkylierungs-Lösung

Tris pH 6.8 (50 mM), Harnstoff (6 M), Glycerin (30% v/v) and SDS (2% w/v), Iodoacetamid (4 % w/v)

2-D Gelelektrophorese wurde nach Görg et al. (Görg, 2004) durchgeführt. Dabei wurden die Proteine in der ersten Dimension durch isoelektrische Fokussierung in einer Multiphor II (Amersham Bioscience) auf IPG-Streifen (Amersham Bioscience) aufgetrennt. Zuvor wurden die IPG-Streifen mit RH-Puffer über Nacht in einer Kammer rehydratisiert. Die Proteine (ca. 400-800 µg) wurden durch sog. „Cup-Loading“ an den Enden auf die jeweiligen Streifen

aufgebracht. Die Isoelektrische Fokussierung (IEF) erfolgte bei RT und 40 kVh (pH 3-10) bzw. 60 kVh (pH 4-7). Nach Beendigung der IEF wurden die IPG-Streifen 15 min in Reduktionslösung und anschließend 15 min in Alkylierungslösung inkubiert, um die aufgetrennten Proteine zu alkylieren. Anschließend erfolgte SDS-PAGE auf 12 %igen Gelen in einer Ettan DALT II Apparatur bei 80 V über Nacht. Die fertigen Gele wurden zur weiteren Analyse entweder gefärbt (Coomasie- bzw. Silber-Färbung; siehe dort) oder mit einem Gelrockner auf Filterpapier getrocknet und die markierten Proteine durch Autoradiographie visualisiert.

2.14.5 Massenspektrometrie

2.14.5.1 Allgemeines

Für die massenspektrometrische Analyse stand ein Massenspektrometer (Proteomic Analyzer 4700) der Firma Applied Biosystems zur Verfügung. Messungen wurden mit einem Nb:YAG Laser bei 355 nm in *positive reflector mode* mit einer Beschleunigungsenergie von 20 kV aufgenommen. Für jedes MS- und MS/MS-Spektrum wurden 3000 Schuss in einem m/z Bereich von 800-4000 aufaddiert. Für eine hohe Massengenauigkeit wurden sowohl interne als auch externe Peptidstandards verwendet. Als interner Standard wurden Peptide der Masse 2163.05 Da bzw. 2211.10 Da (Autoproteolyse von Trypsin), als externer Standard wurde ein Kalibrierungs-Kit der Firma Bruker verwendet. Für die Probenvorbereitung wurden 0.5 µl des tryptischen Verdau einer Probe zusammen mit 0.5 µl der Matrix-Lösung auf eine Target-Platte aufgebracht. Die für die Analyse verwendeten Peaks wurden von der Software (4000 series explorer software Version 3.6, Applied Biosystems) automatisch bestimmt. Neben *peptide-mass fingerprint* Spektren wurden die sechs intensivsten Peaks eines jeden Spektrums mit einem Signal/Rausch Verhältnis > 70 für MS/MS Fragmentierung ausgewählt.

2.14.5.2 Datenanalyse

Die Analyse der gemessenen Spektren erfolgte mit Hilfe des Programms GPS Explorer (Vers. 3.6, Applied Biosystems). Die kombinierten Daten der MS und MS/MS Spektren wurden mit der Mascot Suchmaschine (Matrix Science Ltd. London, UK) gegen Swiss-Prot und NCBI nr Datenbank verglichen. Dabei wurden folgende Einstellungen verwendet: Eine Fehlsplaltung (miss-cleavage) wurde zugelassen; als Taxon wurde *Rattus norvegicus* ausgewählt, das verwendete Spaltenzym war Trypsin. Carbamidomethylierung der Cysteinreste wurde als fixe Modifikation angenommen. Oxidation der Methionine wurde als

variable Modifikation verwendet. Die zulässige Fehlertoleranz bei Precursormassen wurde auf 100 ppm festgesetzt.

2.14.5.3 Proteinidentifikation

Zur zuverlässigen Identifizierung der Proteine erhält man drei verschiedene scores mit der GPS Explorer Software. Den Mascot *best ion score* (die höchste Punktzahl eines einzelnen Peptids), den *total ion score* (die Summe aller *peptid scores* eines Proteins) und den *Protein-score* (besteht aus score für *peptide mass fingerprint* und dem *total ion score*). Als signifikant wurden Ergebnisse angesehen deren *peptide score* >20 und Protein Score >40-50 ist. Da unterschiedliche Datenmengen zur Suche herangezogen werden und die Datenbanken unterschiedliche Größen aufweisen, errechnet das Programm Wahrscheinlichkeiten, mit der das Protein identifiziert wurde um Ergebnisse vergleichbar zu machen. Das *Confident-intervall* wurde auf 95 % gesetzt. Ein Protein wurde als identifiziert betrachtet, wenn folgende Kriterien erfüllt waren: der *MOWSE Score* des Proteins lag im Signifikanzbereich der entsprechenden Datenbanksuche; die identifizierten Peptidmassen wurden im Spektrum wieder gefunden, der isoelektrische Punkt und die molekulare Masse des Proteins konnten mit den experimentellen Parametern der 2D-Gele in Einklang gebracht werden und das Protein wies ein *N*-terminales Myristoylierungsmotiv auf.

2.14.5.4 Proteinverdau mit Trypsin

ABC-Puffer

Ammoniumhydrogencarbonat (50 mM), Acetonitril (30 % v/v)

Spaltpuffer

Ammoniumhydrogencarbonat (10 mM)

Silber-Entfärber

Lösung I Kaliumhexacyanoferrat(III) (30 mM)

Lösung II Natriumthiosulfat (100 mM)

Lösung I und Lösung II vor Gebrauch im Verhältnis 1 : 1 mischen.

Alkylierungslösung I

Iodacetamid (100 mM)

Alkylierungslösung II

DTT (45 mM)

Trypsin-Lösung

Trypsin (0.03 µg/µl) in Spaltpuffer

Elutionspuffer:

Acetonitril (80 %), TFA (0.1 %)

MALDI-Matrix:

α -Cyano-4-hydroxy Zimtsäure (2 mg/ml) in Acetonitril (70 % v/v) mit TFA (0.1 % v/v)

Um Proteine aus SDS-Page Gelen mittels Massenspektrometrie analysieren zu können, müssen sie durch bestimmte Enzyme (z.B. Trypsin) in die für sie charakteristischen Peptide „zerschnitten“ werden.

Ausgangsmaterialien waren Coomassie- bzw. Silber-gefärbte Proteinbanden oder 2D-Spots aus 1D-PAGE/2D-PAGE Gelen. Zu analysierende Proteinbanden/-Spots wurden aus den Gelen ausgeschnitten bzw. mit Hilfe von Pipettenspitzen ausgestanzt, in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und mit $3 \times 100 \mu\text{l}$ ABC-Puffer gewaschen. Silber-gefärbte Gele wurden durch zusätzliche Inkubation mit einer 1 : 1 Mischung aus Silber-Entfärber I und II für 15 min bei RT entfärbt.

Anschließend wurde wiederum mit $3 \times 100 \mu\text{l}$ ABC-Puffer gewaschen. Proben aus 1D-PAGE Gelen wurden zusätzlich alkyliert, indem die Gelstücke zuerst bei $55 \text{ }^\circ\text{C}$ für 15 min in Alkylierungslösung I und anschließend bei RT für 15 min in Alkylierungslösung II inkubiert wurden. Die Gelstücke wurden danach je 5 min mit $3 \times 100 \mu\text{l}$ ABC-Puffer gewaschen und durch Zugabe von $2 \times 100 \mu\text{l}$ Acetonitril (100 %) für je 15 min geschrumpft, um sie für eine bessere Aufnahme des Trypsin-Puffers vorzubereiten. Anschließend wurde das restliche Acetonitril bei RT verdampft und je Probe 2-4 μl des Trypsin-Puffers direkt auf das Gelstück gegeben. Nach 5 min wurde das Gelstück mit Spaltpuffer überschichtet und für den tryptischen Verdau über Nacht bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert.

Zur Elution der tryptischen Peptide wurde evtl. vorhandener Spaltpuffer in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das jeweilige Gelstück in $20 \mu\text{l}$ Elutionspuffer aufgenommen und 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Dieser Vorgang wurde $2 \times$ wiederholt, die Eluate vereinigt und anschließend in einer beheizten Vakuumzentrifuge (Speed-Vac) bis fast zur vollkommenen Trockenheit eingengt. Die Peptide wurden in Acetonitril (5 %)/TFA (0.1 %) aufgenommen und bis zur weiteren Analyse bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

2.14.6 Gewebeproben aus Versuchstieren

Tiere wurden im Einklang mit den geltenden Tierschutzbestimmungen gehalten. Ebenso wurden Tierversuche nach geltenden Bestimmungen durchgeführt. Alle Arbeiten geschahen unter Aufsicht bzw. durch eine für Tierversuche autorisierte Person.

Die Isolierung von Geweben erfolgte nach Narkose der Tiere mit Et₂O und anschließender Luxation der Halswirbelsäule. Organe wurden sofort nach Entnahme auf Eis gehalten und weiterverarbeitet.

Für die Gewebeproben wurden ausschließlich Organe von Tieren verwendet, die aus bestehender Zucht ausgemustert waren bzw. Organe aus Wildtypen bzw. Kontrolltieren die in anderen Experimenten keine Verwendung fanden.

Rattenstamm: LPP ^{+/-}, heterozygot, gesund (Samreen 2005)

Mäusestamm: C57/BL6

2.14.7 Herstellung von Proteinextrakten aus Gewebe

TH-Puffer (Gewebe Homogenisierungspuffer)

Tris pH 7.5 (50 mM), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM β-ME

Entnommene Gewebeproben wurden in 4-fachem Gewichtsvolumen TH-Puffer aufgenommen und mit einem Ultra-Thurax auf Eis (20000 rpm, 2 × 1 min) homogenisiert. Anschließend wurden durch Zentrifugation (30000 × g, 30 min, 4 °C) unlösliche Bestandteile abgetrennt. Das überstehende Lysat wurde abgenommen und für weitere Untersuchungen verwendet.

2.14.8 Proteasom Aufreinigung aus Gewebe

PH-Puffer (Proteasom Homogenisierungspuffer)

Tris pH 7.5 (50 mM), ATP (2 mM), MgCl₂ (5 mM), DTT (1 mM), Protease Inhibitor Cocktail 1/100 (Sigma-Aldrich)

Die Aufreinigung des 26S Proteasoms aus Gewebe erfolgte durch differentielle Zentrifugation nach einem Protokoll von Gomes et al. (Gomes, 2006)

Dazu wurde Gehirn bzw. Leber einer Ratte in 4-fachem Gewichtsvolumen in PH-Puffer mit einem Teflon Potter (700 rpm) für 3-5 min auf Eis homogenisiert.

Die Gewebesuspension wurde 1 h bei 100000 × g zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Das resultierende Pellet wurde verworfen und der Überstand erneut für 6 h bei 80000 × g zentrifugiert, um das Proteasom zu pelletieren. Das Pellet wurde anschließend in PH-Puffer aufgenommen und durch Zentrifugation (100000 × g, 22 h) über einen linearen Glyceringradienten (10-40 % in PH-Puffer) weiter gereinigt. Nach Beendigung der

Zentrifugation wurden 0.5 ml Fraktionen gesammelt, die auf proteasomale Peptidaseaktivität untersucht wurden.

Zusätzlich wurden die Proteasom-enthaltenden Fraktionen durch Western-Blot mit einem anti-PRS4 Antikörper identifiziert.

2.14.9 Proteasom Aktivitätsmessung

Proteasompuffer

Tris pH 7.5 (50 mM), ATP (2 mM), EDTA (2 mM)

Das 26S Proteasom ist in der Lage Proteine in kurze Peptidfragmente proteolytisch zu spalten. Die verschiedenen Peptidaseaktivitäten der 20S Proteasom Untereinheiten β 1, β 3 und β 5 lassen sich experimentell ermitteln. Dazu werden kurze Peptide, die an ein Fluorophor (2-Aminomethylcoumarin) gekoppelt sind, mit Proteasom enthaltenden Lysaten/Fraktionen inkubiert. Das durch Proteolyse freigesetzte Coumarin fluoresziert durch Anregung mit Licht von 340 nm bei 380 nm.

Zur Bestimmung der Peptidaseaktivität der Proteasom enthaltenden Fraktionen wurden 2 μ l je Fraktion in 97 μ l Proteasompuffer in schwarzen 96 Loch-Platten vorgelegt und bei 37° C 15 min in einem Fluorometer inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Substrat (Suc-LLVY-AMC, Bz-VGR-AMC, Z-LLE-AMC, 1 μ l in DMSO, 5 mM) gestartet und für 30 min verfolgt. Dabei wurde jede Minute ein Datenpunkt aufgezeichnet. Zur Bestimmung der jeweiligen Peptidaseaktivität, wurde durch lineare Regression die Steigung jeder Reaktion bestimmt und diese im Verhältnis zur Kontrollreaktion (meist DMSO) gesetzt.

Zur Bestimmung der 26S Proteasom enthaltenden Fraktionen bei der Aufreinigung über Glyceringradienten wurde der absolute Fluoreszenzwert nach 30 min Reaktionszeit verwendet.

2.14.10 Dual Luziferase Reportergen-Assay

Renilla-Puffer

pH 5.0, 1.1 M NaCl, 2.2 mM EDTA(Na₂), 220 mM K₂HPO₄, 0.44 mg/ml BSA, 1.3 mM NaN₃, 1.43 μ M Coelenterazin (aus 500 μ M (MeOH) Stammlsg. frisch zugeben)

Firefly-Puffer

470 μ M D-Luziferin, Coenzyme A 270 μ M, DTT 33.3 mM, ATP 530 μ M, (MgCO₃)₄Mg(OH)₂ × 5 H₂O 1.07 mM MgSO₄ × 7 H₂O 2.67 mM, Tricin 20 mM, 0.1 mM EDTA.

Die Aktivität eines Promotors kann mit Hilfe eines Reportergens untersucht werden. Als Reportergene bezeichnet man artfremde Gene, die für gut detektierbare, bzw. quantifizierbare Produkte, wie z. B. Luziferase codieren. In einem geeigneten Vektor wird das Gen, das der Transkriptionsregulation des zu untersuchenden Promotors unterliegt, durch ein Reporter gen ersetzt. Nach Transfektion des Promotor-Reporter genkonstruktes in die Zielzellen, reguliert der zu untersuchende Promotor die Transkription des Reporter gens. Der Nachweis der Reporter gen Expression geschieht über Biolumineszenz, wobei die detektierte Signalstärke ein Maß für die Promotoraktivität darstellt.

Als Transfektionskontrolle wurde ein konstitutiv expremierendes Renilla Luziferase-Konstrukt co-transfiziert. Beide Luziferase Aktivitäten lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Substratspezifität in einer sequentiellen Analyse direkt hintereinander in einem Reaktionsgefäß bestimmen. Dazu werden die zu untersuchenden Proben in 96 Loch Platten vorgelegt und durch aufeinanderfolgende Zugabe von Renilla-Puffer und Luziferase Puffer die Promotoraktivitäten bestimmt.

Zur Bestimmung der HES1-Promotoraktivität wurde 1.5×10^5 HEK293 Zellen 24 h vor Transfektion in 6 Loch Platten ausgesät. Die Transfektion erfolgte nach der Kalziumphosphat Methode mit 3-4 µg Gesamt-DNA. Das Medium wurde 4 h nach Transfektion durch neues Medium mit 25 % FCS bzw. 25 % FCS mit 300 µM 2-OH-Myristat ersetzt und die Zellen für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in PLB (*passive lysis buffer*) von PromegaTM unter Berücksichtigung der Herstellerangaben lysiert. 5-10 µl des Lysats wurden anschließend zur weiteren Analyse eingesetzt.

Die Analyse erfolgte in einem Bio-Luminometer der Firma Berthold. Durch automatische Zugabe von 100 µl Renilla- bzw. Firefly-Puffer wurden beide Luziferase-Aktivitäten hintereinander bestimmt. Die Software ermittelte dabei automatisch den Quotient aus Firefly- und Renilla-Luziferaseaktivität. Dieser Wert stellt ein um die Transfektionseffizienz korrigiertes Maß für die Hes1-Promotoraktivität dar.

2.14.11 NMT-Kinetik

Um die enzymespezifischen Parameter wie z.B. die Michealis-Menten Konstante (K_M) der *N*-Myristoyltransferasen zu untersuchen, wurde eine Methode von B. Boisson und T. Meinnel (Boisson and Meinnel, 2003) verwendet. Diese verfolgt die Myristoylierungsreaktion indirekt durch eine an Pyruvatdehydrogenase (PDH) gekoppelte Reaktion. Wie in Gleichung (I) zu sehen ist, wird ein Substratpeptid (Peptid) durch die NMT mit Myristoyl-CoA in das myristoylierte Peptid (Myristoyl-Peptid) überführt. Das dabei freigesetzte CoASH wird in einer parallel schneller ablaufenden Reaktion (II) durch Pyruvatdehydrogenase (PDH) mit Pyruvat

zu Acetyl-CoA oxidiert, wobei NAD^+ zu NADH reduziert wird. Da NADH im Vergleich zu NAD^+ eine zusätzliche Absorptionsbande bei 340 nm aufweist, lässt sich diese Reaktion in einem Photospektrometer stetig verfolgen. Da Reaktion (II) (*Abbildung 4*) die schneller ablaufende der beiden ist, bildet die Myristoylierung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dieser Reaktionssequenz.

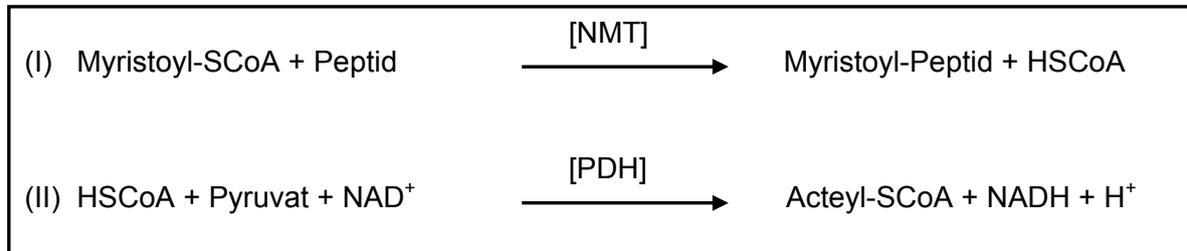


Abbildung 4: Schema der an PDH-gekoppelten NMT-Reaktion.

Reaktion I: Umsatz von Myristoyl-CoA und Substratpeptid mit NMT u.a. zu freiem CoA.

Reaktion II: Bildung von AcetylCoA unter Reduktion von NAD zu NADH durch PDH.

Die eingesetzten Dekapeptide repräsentieren dabei die 10 N-terminalen Aminosäuren verschiedener Zielproteine der NMT.

Der Reaktionsansatz einer Messung enthielt 50 mM Tris pH 8.0, 1 mM MgCl_2 , 0.2 mM EGTA, 0.32 mM Dithiothreitol, 0.2 mM Thiaminpyrophosphat, 2 mM Pyruvat, 0.1 mg/ml BSA, 0.1 % Triton X-100, 2.5 mM NAD^+ , 0.125 U/ml PDH, 5-800 μM Substrat-Peptid, und NMT). Der Ansatz wurde in einem Photospektrometer bei 30° C vorinkubiert bis die Basislinie bei 340 nm stabil war. Daraufhin wurde die Reaktion durch Zugabe von Myristoyl-CoA (40 μM , aus einem Stock von 400 μM in Na-Acetat (pH 6.5, Triton-X 100 (1 % v/v)) gestartet und für 2-10 min verfolgt. Dabei wurde alle 3 Sek. ein Datenpunkt aufgenommen. Das Gesamtvolumen pro Reaktion betrug 300 μl .

Die Anfangsgeschwindigkeit (v_0) der Reaktion wurde durch lineare Regression der ersten Reaktionsminute ermittelt. Zur Umrechnung der Geschwindigkeit in $\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ wurden die Werte von $A_{340} \cdot \text{min}^{-1}$ durch den molaren Extinktionskoeffizienten ϵ von NADH ($6300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und die Länge der Küvette (1 cm) dividiert und anschließend mit dem Reaktionsvolumen (300 μl) multipliziert.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad (Prism Software). Dieses berechnet mit den experimentell bestimmten v_0 -Werten, die gegen die entsprechende Substratkonzentration aufgetragen werden, eine Michaelis-Menten Kurve und errechnet daraus die Michaelis-Menten Konstante K_M und die maximale Geschwindigkeit der Reaktion V_{max} .

Die Parameter lassen sich durch Betrachten folgender Reaktionsgleichungen ableiten:

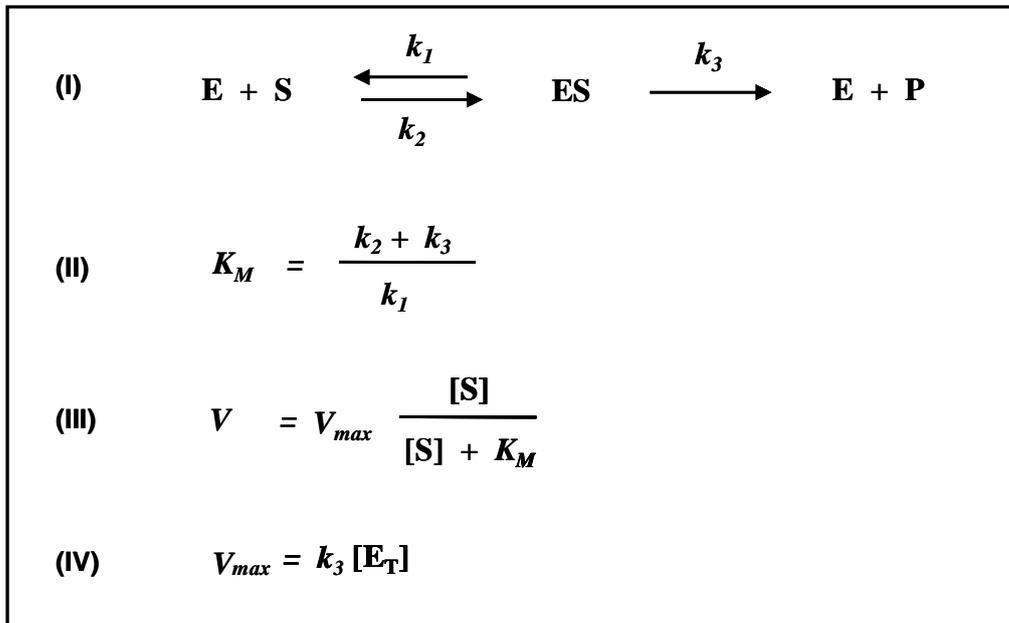


Abbildung 5: Verkürzte Herleitung zur Michaelis-Menten Kinetik.

Dabei entspricht E dem Enzym, S dem Substrat; P ist das gebildete Produkt und ES der intermediär auftretende Enzym-Substrat-Komplex. k_1 , k_2 und k_3 stellen die Geschwindigkeitskonstanten der Teilreaktionen dar. V ist die Geschwindigkeit, V_{max} die maximale Geschwindigkeit der Reaktion und $[E_T]$ die Konzentration des Enzyms. Durch Definition einer Konstante K_M (II) und aus den aus Gleichung (I) hervorgehenden Teilreaktionen ergibt sich die Gesamtgeschwindigkeit der Reaktion zu (III). Diese Gleichung sagt letztendlich aus, dass bei sehr kleinen Substratkonzentrationen $[S]$, V proportional zu $[S]$ ist. Bei hohen Werten für $[S]$ wird $V=V_{max}$ und ist dann unabhängig von $[S]$. Auch lässt sich die oft beschriebene Definition für K_M aus (III) ableiten. Bei $[S]=K_M$ ist $V=V_{max}/2$. K_M entspricht also der Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit gerade die Hälfte des Maximalwertes erreicht.

Dabei bedeutet ein niedriger K_M -Wert eine hohe Affinität des Substrates zum Enzym, ein hoher K_M -Wert eine niedrige Affinität.

(IV) Bei Bekanntsein der Menge an eingesetztem Enzym $[E_T]$ kann die Wechselzahl k_{cat} berechnet werden. Sie entspricht hier k_3 und sagt aus, wie viele Substratmoleküle pro Sekunde von einem katalytischen Zentrum des Enzyms umgesetzt werden.

2.14.12 Expression rekombinanter NMT-Isoformen in *E. coli*

Die Expression der rekombinanten *N*-Myristoyltransferasen erfolgte in *E. coli* BL21(DE3) Rosetta. Aus Glycerinstocks entsprechender *E. coli* Klone wurden 10 ml NZYM-Medium für eine Übernachtskultur angeimpft. Am nächsten Tag wurden 2 ml davon in 400 ml NZYM-Medium verdünnt und die Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von ~0.7-0.8 bei 37 °C angezogen. Durch Zugabe von IPTG (0.2 mM Endkonzentration) wurde die Proteinexpression induziert und die Kultur 12 h über Nacht bei 21 °C im Schüttler inkubiert.

2.14.13 Aufreinigung rekombinanter NMT-Isoformen

GST-Puffer

TRIS pH 7.5 (50 mM), NaCl (150 mM), EDTA (1 mM), DTT (1 mM)

Die Aufreinigung der exprimierten NMTs erfolgte mit einem Chromatographiesystem der Firma Amersham (Äkta Purifier). Da die *N*-Myristoyltransferasen mit einem *N*-terminalen GST-Tag exprimiert wurden, lassen sie sich leicht durch Glutathion-Sepharose aufreinigen. Die Bakterienzellen der induzierten Kultur wurden dazu durch Zentrifugation (5000 × g, 15 min) pelletiert und in GST-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden durch Sonifizierung auf Eis (6 × 30 s mit jeweils 60 s Pause, Amplitude 50 %) lysiert. Anschließend wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (30 min, 21000 × g) abgetrennt und der Überstand durch einen Spritzenfilter (0.22 µm) weiter gereinigt. Das so erhaltene Lysat wurde mit einer Flussrate von 0.5 ml/min über eine 5 ml GST-FF Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule mit GST-Puffer solange gewaschen bis keine ungebundenen Proteine mehr von der Säule eluierten. Die Säule wurde daraufhin mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend manuell mit 100 U/ml Thrombin in 5 ml PBS beladen. Das Thrombin spaltet den GST-Tag von der NMT ab indem es eine speziell eingefügte Sequenz [LVPR|GS] erkennt und hydrolysiert. Nach 12 h Inkubation bei RT wurden die Enzyme mit PBS von der Säule eluiert und in Fraktionen gesammelt. Durch SDS-PAGE und Coomassie Färbung wurden die Fraktionen auf ihren NMT-Gehalt untersucht, die entsprechenden Fraktionen vereinigt und durch Zentrifugation in einer Amiconsäule (MWCO: 30 kD) aufkonzentriert. Anschließend wurde Glycerin (10 % v/v) zugegeben und Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Die Quantifizierung der NMT-Enzyme erfolgte über Abgleich mit parallel im Gel aufgetragenem BSA Standard und Coomassie-Färbung mit densitometrischer Auswertung.

2.14.14 Immunpräzipitation

Immunpräzipitationen werden zur Untersuchung von Protein-Modifikationen oder Protein-Protein-Wechselwirkungen durchgeführt. Grundlage dieser Analyse ist der Einsatz eines Protein-spezifischen Antikörpers, der die selektive Abtrennung des zu untersuchenden Proteins aus einem Zelllysat unter Verwendung von Immunglobulin-bindender Sepharose per Fällung erlaubt.

Zelllysate wurden wie beschrieben (2.12.7) unter Verwendung von RIPA-Puffer angefertigt. Zur Abtrennung unspezifisch bindender Komponenten wurde das Lysat ohne Zugabe des Antikörpers 1 h bei 4° C mit 20 µl Protein A/G-Sepharose Suspension (1:1 in PBS) inkubiert. Die Sepharose wurde anschließend durch Zentrifugation (1 min, 1000 rpm, 4 °C) pelletiert und verworfen. Die eigentliche Immunpräzipitation wurde nach Zugabe von bis zu 2 µg Antikörper zum gereinigten Lysat über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Zur Isolation des Antikörper/Protein-Komplexes wurden am nächsten Tag 30 µl Protein A/G-Sepharose Suspension zugegeben. Nach 1 h Inkubation bei 4 °C wurde der Sepharose-Antikörper-Komplex durch Zentrifugation (5 min, 1000 rpm, 4 °C) vom restlichen Lysat abgetrennt und mit eiskaltem RIPA-Puffer gewaschen (3 × 600 µl). Um konstante und möglichst kleine Auftragsvolumina zu erhalten, wurde die Sepharose anschließend unter Verwendung einer feinen Pipettenspitze trocken gesaugt, in 30 µl SDS-Probenpuffer (1×) aufgenommen und für 3 min auf 95 °C erhitzt. Die erhaltenen Proben wurden weiterführend durch SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

2.15 Abkürzungen

% g/v	% Gewicht/Volumen
% v/v	% Volumen/Volumen
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
AcOH	Essigsäure
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
β-ME:	beta-Mercaptoethanol
BSA	Bovines Serum Albumin
CFP	Cyan Fluorescent Protein
CHX	Cycloheximid
CoASH	Koenzym A
DDT	Dichlorodiphenyltrichlor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxy Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
Et ₂ O	Diethylether
g	Erdschwerebeschleunigung; (~9.81 m×s ⁻²)
GFP	green fluorescent protein
GST	Glutathion-S-Transferase
G _{αi2}	Guanine Nucleotide Binding protein G(i) alpha 2 Untereinheit
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
KG	Körpergewicht
L	Liter
LD ₅₀	Letale Dosis 50 % (die Dosis bei der 50 % der Versuchstiere sterben)
M	molar
MAK	Maximale Arbeitsplatz Konzentration
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MeOH	Methanol
min	Minute
ml	Milliliter
mM	milliomolar
MWCO	molecular weight cut-off (Ausschlussgröße einer semipermeablen Membran)
NAD ⁺	Nikotin Adenin Dinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nikotin Adenin Dinukleotid (reduzierte Form)
NMT	N-Myristoyltransferase
non-Myr	nicht-myristoyliert
Hmbs	Porphobilinogen Deaminase (Pbdg)
PCDD	polychlorierte Dibenzodioxine
PCDF	polychlorierte Dibenzofurane
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

MATERIAL UND METHODEN

sek	Sekunde
TAE	Tris Acetat EDTA
TCDD	2,3,7,8 Tetrachloro Dibenzodioxin
TDI	Tolerable daily intake (zumutbare tägliche Aufnahmemenge)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TOF	Time of Flight
Tris	Tris Base (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol)
U	Unit/Enzymeinheit
V	Volt
YFP	Yellow Fluorescent Protein

3 ERGEBNISSE

3.1 Klonierung der cDNA der *N*-Myristoyltransferasen 1 und 2 aus 5L-Zellen

Zu Beginn der Untersuchungen sollten die cDNAs der *N*-Myristoyltransferasen 1 und 2 der Ratte kloniert werden, da die Sequenzen noch nicht bekannt waren. RNA aus 5L-Zellen, eine Hepatozyten Zelllinie der Ratte, wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Zur Amplifikation der codierenden Sequenzen wurden die PCR-Primer entsprechend der Datenbankeinträge für *Nmt1* (NM_148891) und *Nmt2* (NM_207590) der Maus so gewählt, dass sie ausgehend vom 5'-Startcodon bis zum 3'-Stopcodon den kompletten Leserahmen der Enzyme amplifizieren lassen sollten. Im ersten Schritt wurden die amplifizierten cDNA-Fragmente in TOPO2.1 Vektor kloniert. Bei Sequenzanalysen verschiedener Klone fanden sich überraschenderweise zwei verschiedene Formen der *Nmt2*. Eine entsprechend der Datenbanksuche vermutete Form (*Nmt2l*) und eine um 93 Bp verkürzte Form der *Nmt2* der Ratte, hier als *Nmt2s* bezeichnet (*Abbildung 6*).

Durch Sequenzanalyse mehrerer Klone und Amplifikation interner Fragmente des initialen PCR Produktes wurden verschiedene mRNAs identifiziert (*Abbildung 7 C/D*). Neben den bereits gefundenen *Nmt2s* und *Nmt2l* konnte eine weitere, als *Nmt2m* bezeichnete Variante, bei der Exon 5 fehlt, identifiziert werden (*Abbildung 7 A*). Bei dieser kommt es jedoch durch das alternative Spleißen zu einer Verschiebung des Leserasters, die zu einem Translationsstop nach 375 Bp und so zu einem stark verkürzten, unfunktionellen Enzym führt (*Abbildung 7 B*).

Um zu überprüfen, ob die gefundenen Klone der *Nmt1*, *Nmt2s* und *Nmt2l* in Proteine translatierbar sind, wurden sie in pcDNA3.1-Vektor subkloniert und für Transkriptions-/Translations-Reaktionen in Gegenwart von ³⁵S eingesetzt. Die so markierten Proteine wurden nach elektrophoretischer Auftrennung mittels Autoradiographie visualisiert. Alle Enzyme, NMT1, NMT2S und NMT2L, zeigen genau ein Produkt in dem Bereich des erwarteten Molekulargewichts. NMT1, mit einer berechneten Masse von 57 kD, zeigt jedoch etwas langsames Laufverhalten in der SDS-PAGE als erwartet. Es migriert in etwa mit der 60 kD schweren NMT2L. Die 56 kD schwere NMT2S läuft dagegen, dem Masseunterschied zu NMT2L entsprechend, schneller (*Abbildung 7 E*).

Nmt1 und *Nmt2*, in den Varianten *Nmt2l* und *Nmt2s*, wurden auf mRNA Ebene in 5L-Zellen gefunden. Ein Vergleich von NMT2L und NMT2S der Ratte mit bekannten Sequenzen der humanen und murinen NMT2 zeigt, dass die humane Variante um 31 Aminosäuren gegenüber der murinen Variante verkürzt ist. Das in der bekannten humanen Sequenz

fehlende Fragment, entspricht genau jenem, das der gefundenen NMT2S im Vergleich mit der NMT2L aus der Ratte fehlt (*Abbildung 6*).

Während des Verlaufs dieser Untersuchung wurde die Klonierung von *Nmt1* und *Nmt2* aus Rattengewebe von Rioux et al. (Rioux, 2006) publiziert. Jedoch wurde dort nur die *Nmt2l* (die der NMT2 dort entspricht) beschrieben und nicht die hier ebenfalls zusätzlich gefundene Spleißvariante *Nmt2s*.

ERGEBNISSE

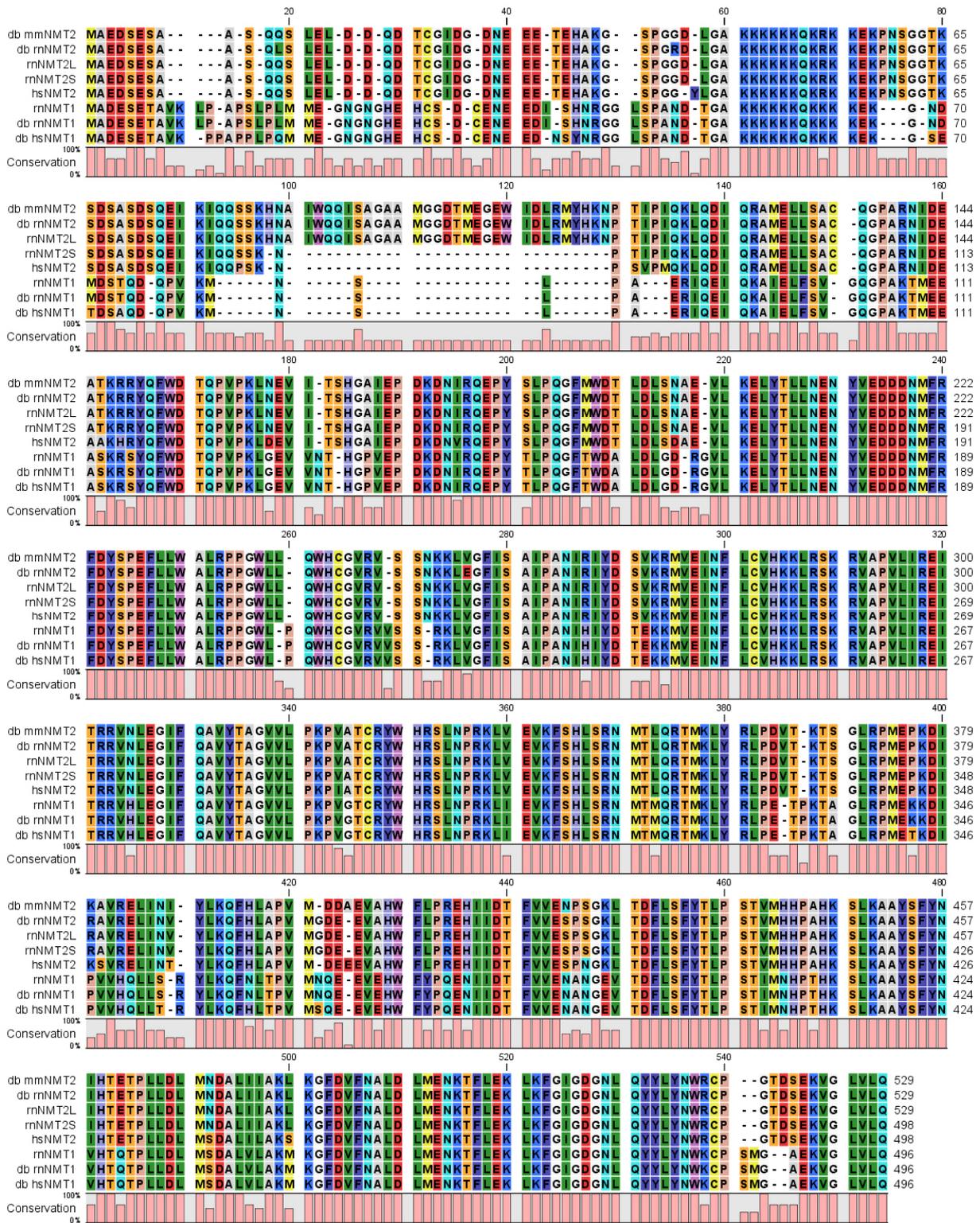


Abbildung 6: Vergleich der kodierten Proteinsequenzen der aus 5L-Zellen klonierten NMT2 Varianten NMT2L und NMT2S sowie NMT1 mit bereits bekannten Sequenzen der NMT.

Nukleotidsequenzen der *Nmt2l* und *Nmt2s* Klone wurden *in silico* in Aminosäuresequenzen übersetzt und mit Sequenzen von *Nmt1* und *Nmt2* der NCBI Datenbank abgeglichen. (h.s.: homo sapiens (*Nmt1*: P30419, *Nmt2*: O60551), r.n.: rattus norvegicus (*Nmt1*: Q8K1Q0, *Nmt2*: Q700Q7), m.m.: mus musculus (*Nmt1*: O70130, *Nmt2*: O70311)); db: Datenbank.

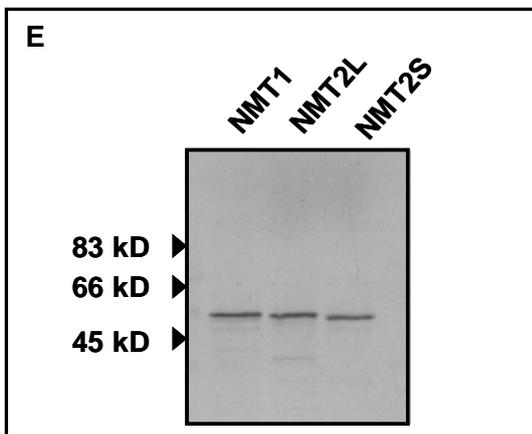
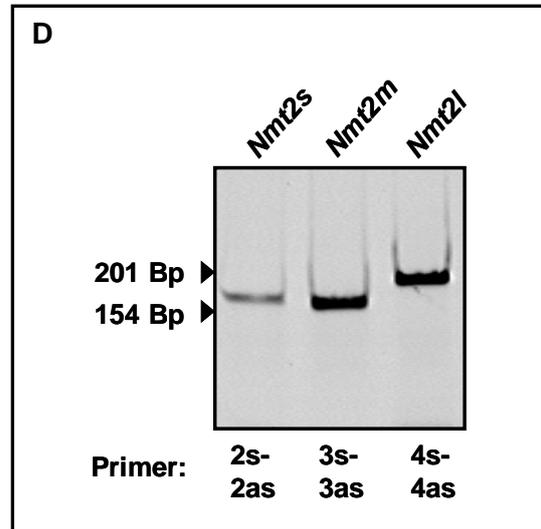
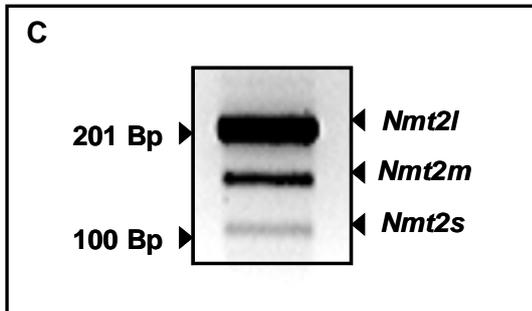
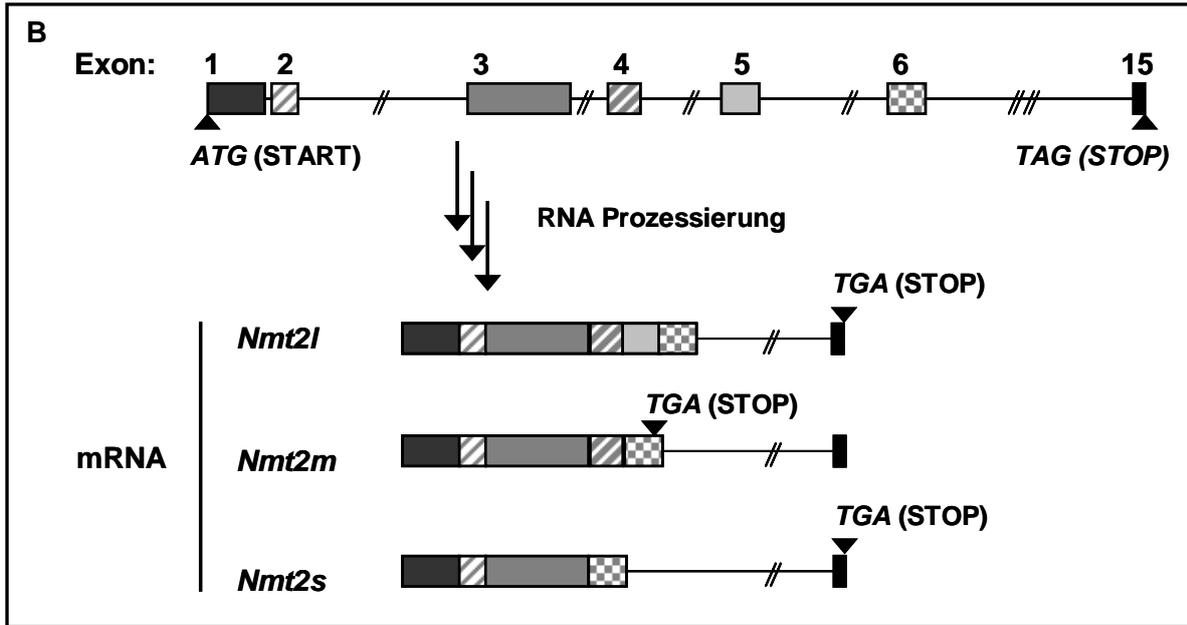
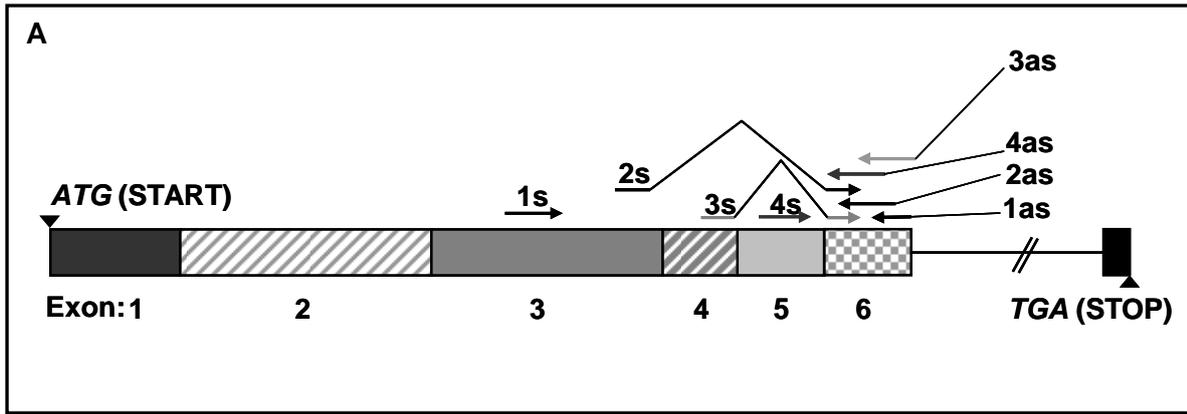


Abbildung 7: NMT2 wird in mindestens 2 Spleißvarianten in 5L-Zellen exprimiert.

A Schematische Darstellung der 5'-Region von NMT2 aus *R. norvegicus*. Durch Pfeile sind die Positionen der verwendeten PCR-Primer angedeutet, wobei bei den Exon-überlappenden Primern der sense-Primer 2s das Ende von Exon 3 und Anfang von Exon 6 umspannt und somit spezifisch für Nmt2s ist; sowie sense-Primer 3s das Ende von Exon 4 und den Anfang von Exon 6 umspannt und somit spezifisch für Nmt2m ist. **B** Illustration der möglichen Bildung der 3 Spleißvarianten der Nmt2. Durch Ausschluss von Exon 4+5 bildet sich die 93 BP verkürzte Nmt2s; durch Ausschluss von Exon 5 bildet sich Nmt2m wobei durch einen Leserasterschub ein Stopcodon nach 375 BP entsteht. **C** PCR-Amplifikation von Gesamt-RNA aus 5L-Zellen mit einem Primersatz der die Region von Exon 3 bis Exon 6 umspannt. Drei unterschiedliche PCR-Produkte zeigen das Vorhandensein dreier unterschiedlicher Spleißvarianten an. In **D** wurde eine PCR mit spezifischen Primern für die vermuteten Spleißvarianten durchgeführt, wobei die verwendeten Primerpaare, 2s-2as, 3s-3as und 4s-4as, die jeweiligen Exons, wie in A illustriert, überlappen. Spezifische Produkte aller PCR Reaktionen mit genannten Primerpaaren zeigen die Existenz der 3 Spleißvarianten an. **E** Autoradiogramm einer *in vitro* Nmt1 sowie Nmt2I und Nmt2L in Retikulozytenlysat translatiert. Die Abbildung zeigt ein Autoradiogramm von durch SDS-PAGE aufgetrennten ³⁵S markierten NMT1, NMT2S und NMT2L Proteinen.

3.2 TCDD vermittelte Induktion von NMT2 mRNA und Protein

Grundlage für diese Arbeit waren Vorarbeiten von Kolluri et al. (Kolluri, 2001), in der die transkriptionelle Induktion von *Nmt2*, in der Hepatomazelllinie 5L aus der Ratte, durch den AHR-Agonisten TCDD beschrieben wurde. Um zu untersuchen, ob beide gefundenen *Nmt2*-Varianten transkriptionell induziert werden, wurden 5L-Zellen für 24 h mit TCDD behandelt. Die Analyse der mRNA Expressionsniveaus von *Nmt1* als auch *Nmt2s* bzw. *Nmt2l* wurden durch *real-time* PCR im LightCycler durchgeführt. Beide *Nmt2*-Varianten werden relativ zum *house-keeping* Gen *Hmbs* (Porphobilinogen Deaminase) durch TCDD induziert (*Nmt2l*: 5.4 fach, *Nmt2s*: 5.7 fach). NMT1 wird nicht induziert, was im Einklang mit früheren Beobachtungen von Kolluri et al. steht. Western-Blot-Analysen mit anti-NMT1 und anti-NMT2 Antikörpern bestätigen, dass die Induktion auf mRNA Ebene auch zu erhöhten Proteinspiegeln führt. Der Western-Blot zeigt eine ca. 2.8-fache Induktion an NMT2 Protein (Abbildung 8 B).

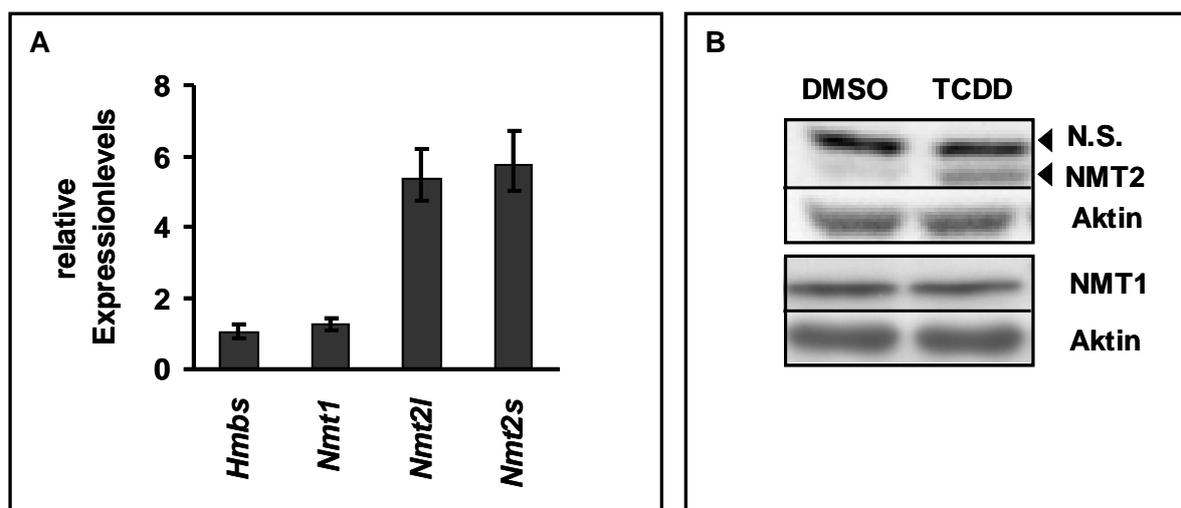


Abbildung 8: mRNA und Proteinspiegel von NMT2 werden in 5L-Zellen durch TCDD induziert.

Gesamt-RNA und Proteine wurden aus 5L-Zellen isoliert, die 24 h mit TCDD (1 nM) oder Lösungsmittelkontrolle DMSO behandelt wurden.

A. mRNA Expressionsniveaus von *Nmt1* sowie *Nmt2l* und *Nmt2s* wurden mittels LightCycler (ROCHE) *real-time* PCR analysiert. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten (LightCycler Analysen wurden je Probe mindestens zweimal wiederholt).

B Western-Blot-Analyse der Proteinextrakte erfolgte mit AK gegen NMT1, NMT2 oder Aktin als Kontrolle. N.S. bezeichnet eine vermeintlich unspezifische Kreuzreaktion des Antikörpers. Pro Spur wurden 50 µg Proteinextrakt geladen. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen.

Hier konnte jedoch nicht geklärt werden, welche der beiden gefundenen NMT2-Varianten im Blot erkannt wird und ob beide Varianten aus Zellextrakten überhaupt getrennt werden könnten. Die RT-PCR Experimente zeigen an, dass NMT2L stärker exprimiert wird (Daten nicht gezeigt). Daher handelt es sich bei dem nachgewiesenen Protein am wahrscheinlichsten um die NMT2L.

3.3 TCDD induziert differentielle Myristoylierung in 5L-Zellen

Kolluri et al. stellten bei ihren Untersuchungen auch fest, dass es in der Folge der TCDD-Behandlung von 5L-Zellen zu verstärktem Einbau von ^3H -markierter Myristinsäure in einige Proteine kam. Zum damaligen Zeitpunkt konnte jedoch die Identität dieser Proteine nicht geklärt werden. Mögliche Kandidatenproteine aus der SRC-Kinase-Familie wurden als myristoyliert nachgewiesen, aber nicht als induziert myristoylierbar gefunden.

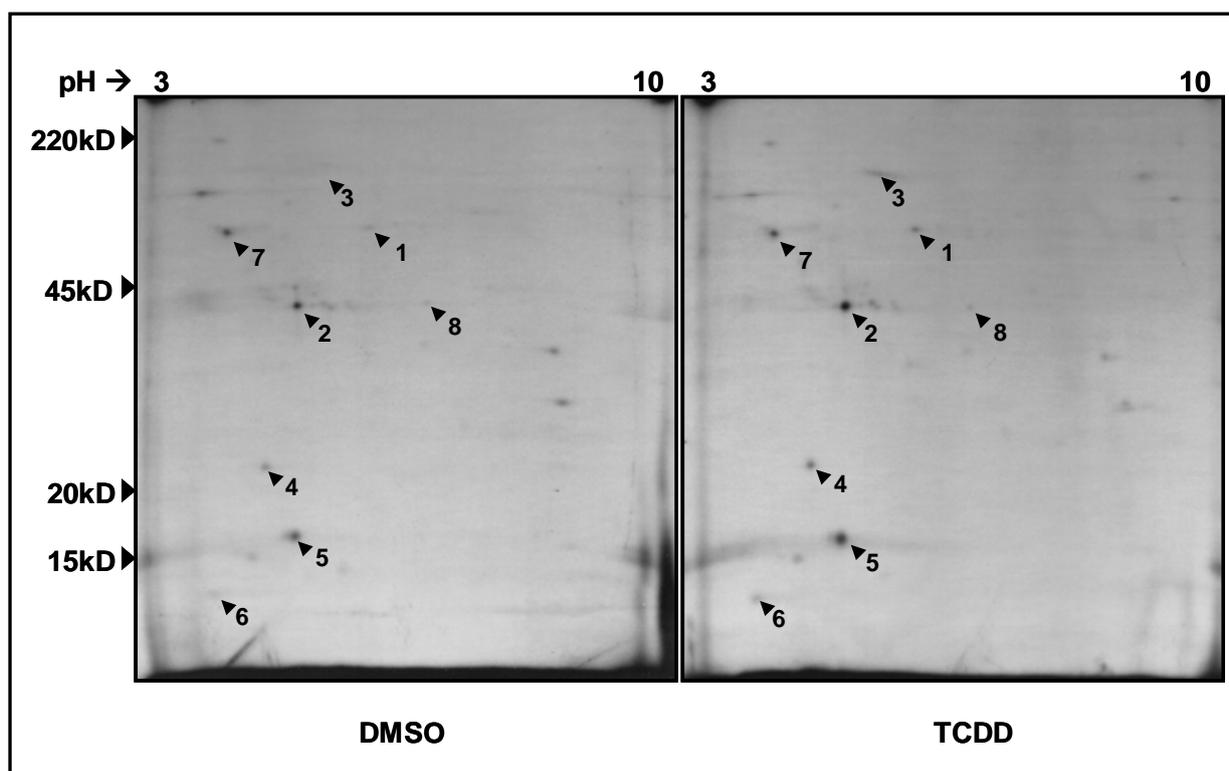


Abbildung 9: 2D-Autoradiogramme von metabolisch mit ^3H -Myristinsäure markierten Proteinen aus TCDD-behandelten oder Kontrollzellen.

5L-Zellen wurden 12 h mit TCDD (1 nM) oder mit DMSO als Lösungsmittelkontrollen behandelt und anschließend für 16 h mit ^3H -Myristinsäure metabolisch markiert. Nach Zellyse wurden die Proteine auf IPG-Streifen (pH 3-10) zuerst ihrem IP (isoelektrischen Punkt) entsprechend und anschließend nach ihrem Molekulargewicht durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Trocknen der Gele erfolgte die Analyse mittels Autoradiographie (4-6 Wochen/-80 °C). Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Paar von Autoradiogrammen von 4 verschiedenen Experimenten mit ähnlichem Ergebnis.

Die nach TCDD-Behandlung induziert myristoylierten Proteine sollten mittels 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie (MS) identifiziert werden. Dabei konnte in diesem ersten Schritt nicht unterschieden werden, ob die gefundenen Proteine in ihrer absoluten Menge induziert werden, oder ob deren Myristoylierungsstatus bei unveränderter Gesamtmenge des Proteins induziert war. Im Folgenden wird der Ausdruck „differentielle Myristoylierung“ für den Fall verwendet, dass bei unveränderter Gesamtmenge eines Proteins dessen Myristoylierungsstatus, z.B. im Vergleich zweier Proben, verändert ist.

Nach Behandlung mit TCDD oder DMSO und radioaktiver Markierung der Zellen mit ³H-Myristinsäure wurden die Proteine durch 2D SDS-PAGE nach ihrem isoelektrischen Punkt (IP) und ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Durch Autoradiographie wurden die markierten Proteine visualisiert (*Abbildung 9*). Dabei ist auffällig, dass insgesamt nur sehr wenige Proteine in 5L-Zellen mit nachweisbarer Intensität markiert werden. Einige der markierten Proteine zeigen induzierten ³H-Myristat Einbau (Spots 1-5) durch TCDD Behandlung, andere zeigen keine Induktion der Intensität der Proteinspots durch TCDD (Spots 6-8).

Durch Massenspektrometrische Analyse (MS und Tandem MS) konnten die Proteine No. 1-4 (*Abbildung 9 / Tabelle 3*) identifiziert werden. Die Proteine No. 5-8 konnten nicht identifiziert werden.

Tabelle 3: Identifizierte Proteine aus 5L-Zellen mit induziertem ³H-Myristat Einbau.

Protein-name 1)	Spot-Nr.	Swiss-Prot oder NCBI Acc. Nr.	MW _{beob./theor.} 2)	IP _{beob./theor.} 3)	Protein-Score 4)	Total Ion-score 5)
PRS4	1	P62193	60/49	~6/5.87	67	17
G _{ai2}	2	P04897	40/41	~5/5.23	84	21
NIBL	3	NP_001103355	100/87	~5.5/5.67	79	36
P22	4	P61023	22/22	4.7/4.97	42	8
BID		Q9JLT6	16/22		72	

1) Die Proteine wurden mittels MS MALDI-TOF/TOF auf mindestens 3 unterschiedlichen Gelen identifiziert. Ausnahme: BID wurde nur einmalig identifiziert.

2) gibt die beobachtete Größe im Gel sowie die theoretische Größe des Proteins in kD an;

3) abgeschätzter und theoretischer IP der Proteinspots;

4) der bei der Identifizierung durch MASCOT (siehe 2.14.5.3) bestimmte Score als Maß für die signifikante Identifizierung eines Proteins durch Massen der tryptischen Peptide und der sequenzierten Peptide;

5) der bei der Identifizierung durch MASCOT bestimmte Score als Maß für eine signifikante Identifizierung eines Peptids durch MS/MS Sequenzierung.

PRS4 oder 26S S4 Protein ist eine ATPase Untereinheit des 19S Aktivatorkomplexes des 26S Proteasoms. Die Myristoylierung war bis jetzt nur für das PRS4-Homologe RPT2 aus *S. cerevisiae* bekannt. In Säugerzellen wurde die Myristoylierung während der Laufzeit dieser Arbeit durch Gomes et al. in aufgereinigtem 26S Proteasom aus Mäuseherzen nachgewiesen (Gomes, 2006).

G_{αi2} ist ein Mitglied der heterotrimeren G-Protein Familie (Guanidin-Nukleotid-bindende Proteine). Durch Myristoylierung transloziert G_{αi2} an die Plasmamembran und kann dort nach Aktivierung durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren Adenylatcyclasen inhibieren (Migeon, 1994).

Das NIBL (NIBAN-like) Protein ist ein bisher nicht als myristoyliert bekanntes Protein, dessen Funktion weitgehend unbekannt ist. Durch Vorhandensein einer PH-Domäne (*plextrin homology domain*) könnte es in zelluläre Signalprozesse involviert sein (Pawson, 1995), (Mayer, 1993).

P22 bzw. CHP1 (*calciumbinding homologous protein*) ist ein myristoyliertes Calcium-Sensor-Protein. Diese Proteine zeichnen sich oft durch den in der Einleitung beschriebenen Calcium-Myristoyl-Schalter aus, der in ähnlicher Funktionalität auch für p22 beschrieben ist (Timm, 1999).

Einmalig konnte BID als differentiell myristoyliertes Protein identifiziert werden. Sehr wahrscheinlich handelt es sich um tBID (p15), das während der Apoptose durch proteolytische Spaltung von BID durch Caspase 3 entsteht und myristoyliert wird (Yin, 2006; Zha, 2000) (Anm.: Das Autoradiogramm in *Abbildung 9* zeigt BID nicht).

Durch Quantifizierung mehrerer Autoradiogramme wurde der Grad der induzierbaren Myristoylierung aller identifizierten Proteine bestimmt. BID wurde aufgrund nur einmaliger Identifizierung nicht ausgewertet.

Die Vergrößerung der 2D-Autoradiogramme der Proteine No. 1 - 4 zeigt eine deutliche Zunahme der Radioaktivität was sich in intensiverer Schwärzung des Röntgenfilms zeigt. Während bei PRS4 das ³H-Myristat-Signal um etwa 250 % und bei NIBL fast 400 % induziert ist, beträgt die Zunahme bei G_{αi2} nur etwa 150 % und bei p22 175 %.

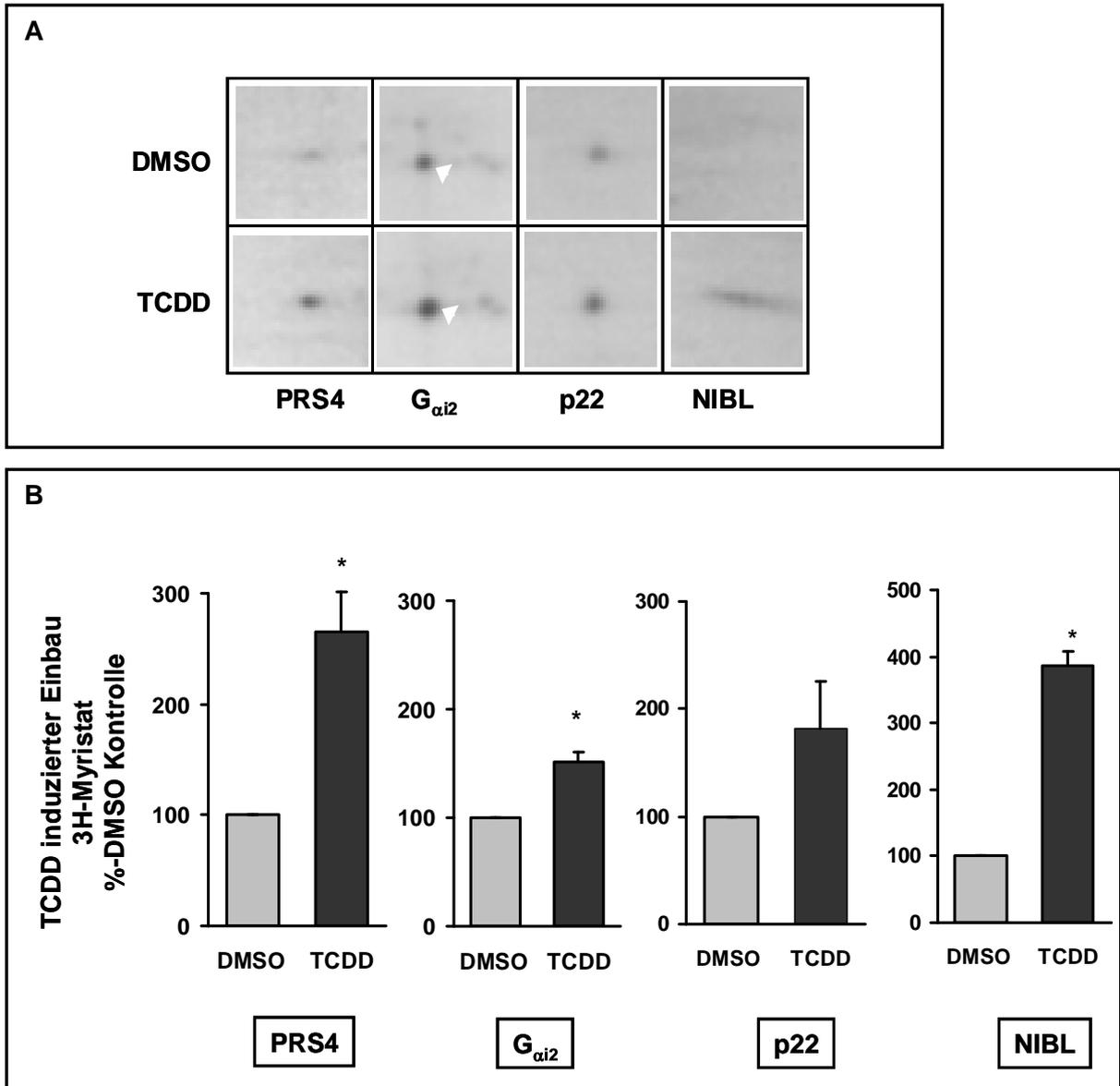


Abbildung 10: Myristoylierung von PRS4, $G_{\alpha i2}$, p22 und NIBL wird durch TCDD induziert.

Vergrößerte Ausschnitte mit ausgewählten Proteinspots der 2D-Autoradiogramme aus Abbildung 9.

A zeigt jeweils einen repräsentativen Ausschnitt der sich in mindestens 3 unabhängigen Experimenten jeweils ähnlich darstellte.

B Für die Balkendiagramme wurde die Zunahme der Spotintensitäten des jeweiligen Proteinspots im Autoradiogramm unter TCDD Einfluss relativ zu denen von mit DMSO behandelter Kontrollzellen in mindestens 3 unabhängigen Experimenten bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte mittels Image J Software. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardfehler (* $P < 0.05$).

3.4 Transkriptionelle und translationelle Regulation der differentiell myristoylierten Proteine

Durch 2D-Gelelektrophorese ^3H -Myristat-markierter Proteinextrakte und anschließender massenspektrometrischer Analyse konnten vier Proteine identifiziert werden, die unter TCDD Einfluss induzierten Einbau von Radioaktivität gegenüber der Kontrolle zeigen.

Um auszuschließen, dass die verstärkten Signale im Autoradiogramm lediglich durch induzierte Proteinspiegel begründet ist, wurden die mRNA-Expressionsniveaus und die Proteinspiegel der identifizierten Zielgene/-proteine analysiert. Nach 24-stündiger Behandlung mit TCDD oder Lösungsmittelkontrolle DMSO wurde Gesamt-RNA aus 5L-Zellen durch *real-time* PCR analysiert. Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, sind die relativen mRNA Expressionsniveaus TCDD/DMSO von *Psmc1* (PRS4), *Gnai2* ($G_{\alpha i2}$) und *p22* (p22) nicht verändert. *Nibl* mRNA dagegen wird durch TCDD stark induziert (7.1 fach).

Weitere Analysen durch Western-Blot bestätigen die Ergebnisse der *real-time* PCR (Abbildung 11). Sowohl PRS4 als auch $G_{\alpha i2}$ werden durch TCDD auf Proteinebene ebenfalls nicht induziert. Da für p22 und NIBL keine kommerziell erhältlichen Antikörper zur Verfügung standen, konnte keine Western-Blot-Analyse durchgeführt werden. Sehr wahrscheinlich würden diese aber die PCR Ergebnisse ebenfalls bestätigen. Insbesondere würde eine Induktion von NIBL auf Proteinebene zu erwarten sein.

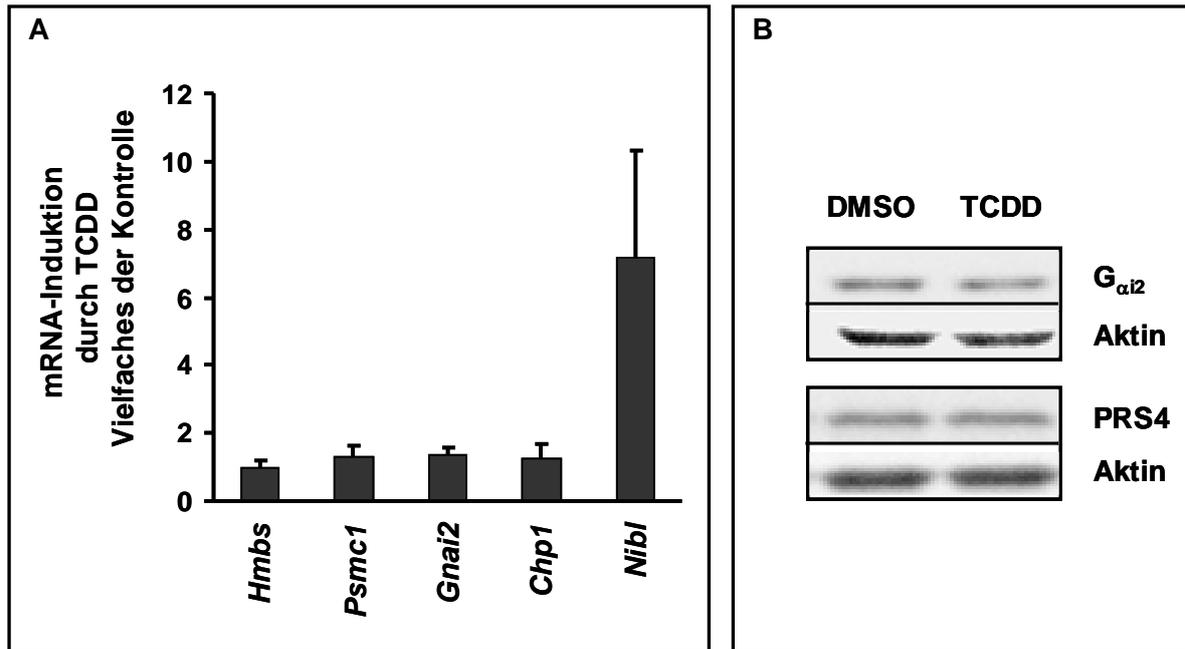


Abbildung 11: mRNA und Proteinspiegel myristoylierter Proteine unter TCDD-Behandlung.

Gesamt-RNA und Proteine wurden aus 5L-Zellen isoliert, die 24 h mit TCDD (1 nM) oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt wurden.

A Die Analyse der relativen mRNA-Expressionsniveaus von *Psmc1*, *Gnai2*, *p22* und *Nibl* erfolgte durch „real-time“ PCR im LightCycler. Als Normalisierungskontrolle wurde das Expressionsniveau des „housekeeping“ Gens *Hmbs* bestimmt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten (LightCycler Analysen wurden je Probe mindestens zweimal wiederholt).

B Western-Blot-Analyse der Proteinextrakte erfolgte durch Antikörper gegen $G_{\alpha i2}$ und PRS4. Aktin wurde als Ladungskontrolle verwendet; pro Spur wurden 50 μ g Proteinextrakt geladen. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot von mindestens 3 unterschiedlichen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen.

Durch Identifizierung der Proteine mit induziertem Einbau von ^3H -Myristat in Kombination mit den Analysen der mRNA Expressionsniveaus und Proteinspiegeln kann festgestellt werden, dass NIBL im genannten Sinne kein differentiell myristoyliertes Protein ist. Im Gegensatz dazu zeigen die Proteine PRS4, $G_{\alpha i2}$ und vermutlich p22 keine Veränderung der Gesamtproteinspiegel, während im Autoradiogramm induzierter Einbau von ^3H -Myristat beobachtet wird.

Ausgehend von diesen Ergebnissen muss postuliert werden, dass in unbehandelten bzw. mit DMSO behandelten Zellen Zielproteine in myristoylierter und nicht-myristoylierter Form nebeneinander vorkommen.

Die grundsätzliche N-terminale Myristoylierung für $G_{\alpha i2}$ (Jones, 1990) und p22 (Barroso, 1996) konnte bereits experimentell gezeigt werden. Im Gegensatz dazu wurde die

Myristoylierung von PRS4 zum Zeitpunkt der Untersuchung aufgrund der *N*-terminalen Sequenz vermutet, war aber noch nicht experimentell bewiesen (Eisenhaber, 2003). Die *N*-terminale Myristoylierung von NIBL wurde demgegenüber bisher gar nicht diskutiert.

Obwohl das Vorliegen myristoylierter und nicht-myristoylierter Form von $G_{\alpha i2}$ Analogen in Hefe diskutiert wurde (Dohlman, 1993), kann hier zum ersten Mal die Induzierbarkeit des Myristoylierungsstatus von $G_{\alpha i2}$ sowie von PRS4 und p22 gezeigt werden.

Um auszuschließen, dass es sich um eine falsch positive Identifizierung oder unspezifische Bindung der Radioaktivität an die Proteine handelt, wurde zum eindeutigen Nachweis der *N*-terminalen Myristoylierung von PRS4 und NIBL diese ektopisch in HEK293-Zellen exprimiert und die Myristoylierung von Wildtyp und *N*-terminal-mutiertem Protein bestimmt. Die cDNA von *Psmc1* und *Nibl* wurde in einen pEYFP-Vektor kloniert, wobei ektopische Expression Chimären aus PRS4 bzw. NIBL mit C-terminalem YFP-Protein bildet. Zur Überprüfung der *N*-terminalen Myristoylierung wurde eine Mutation eingeführt, die zum Aminosäure-Austausch Glycin nach Alanin in Pos. 2 (G2A) des entsprechenden Proteins führt. Proteine von PRS4-/NIBL-YFP transfizierten HEK293-Zellen wurden durch ^3H -Myristinsäure metabolisch markiert. Durch autoradiographische Analyse von immunpräzipitiertem PRS4-YFP/PRS4(G2A)-YFP (*Abbildung 12 A*) bzw. NIBL-YFP/NIBL(G2A)-YFP (*Abbildung 12 B*) kann bewiesen werden, dass durch Mutation des *N*-terminalen Glycins sowohl bei PRS4 als auch bei NIBL die kovalente Bindung von ^3H -Myristinsäure unterbleibt, während eine parallele Western-Blot-Kontrolle nachweist, dass sowohl Wildtyp als auch G2A-Mutante der entsprechenden Proteine präzipitiert wurden. Sowohl PRS4 als auch NIBL werden exklusiv am *N*-terminalen Glycin myristoyliert.

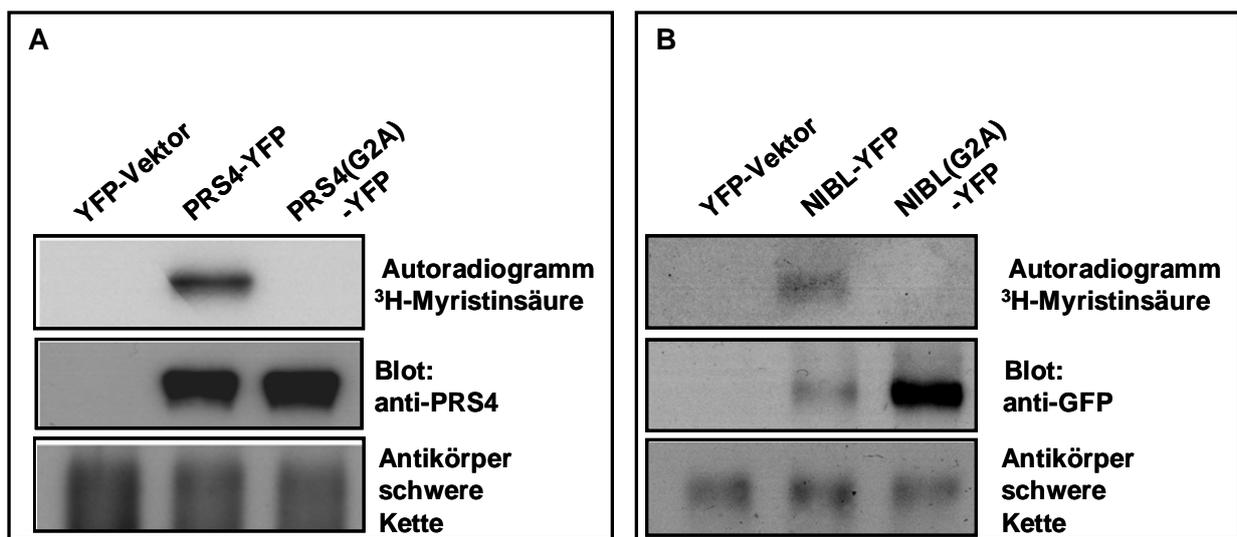


Abbildung 12: Die Proteasomale Untereinheit PRS4 und NIBL-Protein sind exklusiv am N-terminalen Glycin myristoyliert.

HEK293-Zellen wurden mit YFP-Leervektor oder PRS4-YFP bzw. dessen Mutante PRS4(G2A)-YFP (**A**) oder NIBL-YFP bzw. dessen Mutante NIBL(G2A)-YFP (**B**) transfiziert. 6 h nach Transfektion wurde das Medium gewechselt und ³H-Myristinsäure in DMSO 925×10^3 Bq/ml Medium (25 μ Ci/ml Medium) zugegeben. 24 h später wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in RIPA-Puffer lysiert. Proteine wurden mit einem anti-GFP Antikörper immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel getrocknet und die markierten Proteine durch Autoradiographie visualisiert. 10 % des Präzipitats wurde für Western-Blot-Analyse mit einem anti-PRS4 bzw. anti-GFP Antikörper verwendet.

3.5 Selektive Antikörper gegen nicht-myristoyliertes PRS4

Die radioaktive Markierung mit Myristinsäure ist auf Dauer kostenintensiv und auf Experimente mit stabilen Zelllinien beschränkt. Um ein breiteres Feld an biologischen Proben, einschließlich Proben aus Versuchstieren, untersuchen zu können, sollten in einer Kooperation mit Frau Dr. Kremmer (Institut für molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München) monoklonale Antikörper generiert werden, die entweder ausschließlich nicht-myristoyliertes PRS4 bzw. ausschließlich myristoyliertes PRS4 erkennen können. Zum Screenen der Hybridoma-Seren durch Western-Blot-Analyse wurden Proteinextrakte transfizierter HEK293-Zellen verwendet. Expression von PRS4-GFP in Anwesenheit des NMT-Inhibitors 2-Hydroxymyristat (2-OH-Myristat) führt dabei zu einem Pool nicht-myristoyliertem PRS4 Protein. 2-OH-Myristat ist ein Inhibitor der NMT mit einem K_i von $\sim 200 \mu$ M. Er wird in der Zelle zu 2-OH-Myristoyl-CoA transformiert, wobei der K_i auf 45μ M sinkt (Paige, 1990). Aus 2 Hybridoma-Klonen (8A1 bzw. 6G4) konnten Kulturüberstände mit monoklonalen Antikörpern isoliert werden, die präferentiell das nicht-myristoylierte PRS4 erkennen.

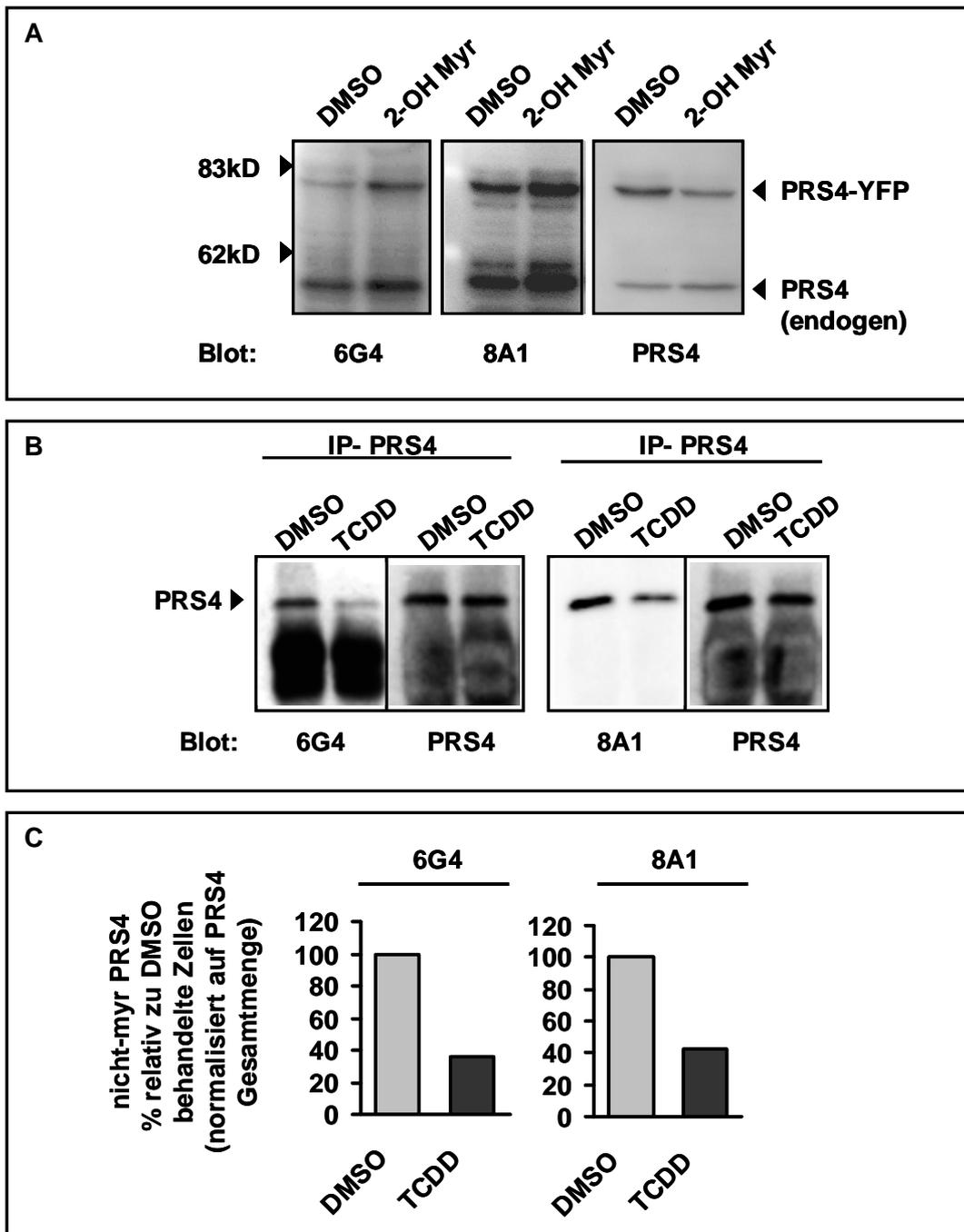


Abbildung 13: Selektive Antikörper gegen nicht-myristoyliertes PRS4.

A HEK293-Zellen wurden mit PRS4-YFP Vektor transfiziert und 4 h später das Medium gewechselt. Neues Medium enthielt DMSO als Lösungsmittelkontrolle oder 300 μ M 2-OH-Myristat in DMSO. Nach 36 h wurden die Zellen lysiert und Proteinextrakte durch Western-Blot mit Seren von Antikörper Hybridomazellen (Klone 6G4, 8A1) analysiert.

B 5L-Zellen wurden 36 h mit TCDD (1 nM) oder mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. PRS4 wurde mit einem anti-PRS4 Antikörper immunpräzipitiert und durch Western-Blot-Analyse mit Antikörper-Seren gegen nicht-myristoyliertes PRS4 (Klon 6G4, 8A1) nachgewiesen. Als Ladungskontrolle wurden Gesamtspiegel an PRS4 bestimmt. (n=2)

(C) Densitometrische Quantifizierung der Western-Blots (von B) von immunpräzipitiertem nicht-myristoyliertem PRS4 aus TCDD und DMSO behandelten 5L-Zellen.

Wie Abbildung 13 A zeigt, führt die Behandlung der Zellen mit NMT-Inhibitor zu einem verstärkten Signal mit 8A1 und 6G4 Antikörpern im Western-Blot gegenüber den unbehandelten Zellen. Der Effekt der NMT-Inhibition auf die Myristoylierung von PRS4 ist sowohl an endogenem als auch ektopisch exprimiertem PRS4 nachweisbar.

Antikörper gegen myristoyliertes PRS4 zu generieren gelang nicht, da alle Hybridomazellen, die nach Immunisierung mit N-terminalem myristoyliertem PRS4-Peptid angelegt wurden, zugrunde gingen (Kommunikation Fr. Kremmer). Dies könnte evtl. auf eine Interaktion der Antikörper mit myristoylierten Proteinen hinweisen, die für das Überleben der Hybridomazellen essentiell sind.

Zur weiteren Verifizierung der Selektivität der Antikörper 6G4 und 8A1 wurde endogenes PRS4 durch anti-PRS4 Antikörper aus Proteinextrakten von TCDD-behandelten 5L-Zellen immunpräzipitiert und die präzipitierten Proteine durch Western-Blot mit den beiden non-Myr (nicht-myristoyliert) PRS4 Antikörpern nachgewiesen. Beide Antikörper erkennen immunpräzipitiertes PRS4, wobei der Anteil an nicht-myristoyliertem Protein durch TCDD erwartungsgemäß verringert wird (*Abbildung 13 B*). Um zu gewährleisten, dass äquivalente Mengen an PRS4 präzipitiert wurden, erfolgte ein immunologischer Nachweis der PRS4-Gesamtmenge durch einen kommerziell erhältlichen anti-PRS4 Antikörper. Nach Quantifizierung ergab sich eine Verringerung an nicht myristoyliertem PRS4 in TCDD-behandelten 5L-Zellen von >50% gegenüber DMSO-behandelten Kontrollzellen (*Abbildung 13*). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der radioaktiven Markierungsexperimente, wo ein induzierter Einbau von ³H-Myristat von 250 % gefunden wurde (s. *Abbildung 10*).

In weiteren Versuchen wurde darüber hinaus festgestellt, dass der 8A1-Klon deutlich besser für Proteinextrakte aus Geweben der Maus zu und Proteinextrakte stabiler Zelllinien zu verwenden war, wogegen der 6G4-Klon, zumindest in 5L-Zellen, nur für Proteinextrakte aus Zellkultur zu verwenden war.

3.6 Rolle der NMT2 und der NMT-Aktivität für die TCDD-induzierte Protein-Myristoylierung

Die Myristoylierung wird in erster Linie als cotranslationaler Prozess verstanden. Dabei ist nicht bekannt, ob sich eine veränderte NMT-Aktivität auf den Myristoylierungsstatus von Zielproteinen auswirken kann. Es sollte überprüft werden, welche Rolle die NMT-Aktivität, insbesondere der durch TCDD induzierte NMT2-Proteinspiegel, für den Myristoylierungsgrad der identifizierten, differentiell myristoylierten, Proteine spielt. Dabei wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen kann durch Einsatz von 2-OH-Myristat die gesamte zelluläre NMT-

Aktivität in DMSO- und TCDD-behandelten Zellen inhibiert werden. Zum anderen kann durch spezifischen *knockdown* von NMT2 mittels RNAi-Technik dessen Funktion bei der Induktion des Myristoylierungsstatus unter TCDD-Einfluss in 5L-Zellen untersucht werden.

3.6.1 Pharmakologische Inhibition der NMT-Aktivität

Die Induktion von NMT2 und die induzierte Myristoylierung von PRS4 legen den Schluss nahe, dass NMT2 für die Myristoylierung von PRS4 verantwortlich ist. Daher sollte experimentell geprüft werden, ob andere Mechanismen zusätzlich eine Rolle spielen.

Durch 250 μM des NMT-Inhibitors 2-OH-Myristat wurde die zelluläre NMT-Aktivität gehemmt. Die Auswertung der Western-Blot-Analysen mit anti-PRS4 und anti-non-Myr PRS4 Antikörper zeigte, dass die Myristoylierung von PRS4 unter TCDD induziert bzw. der relative Anteil an nicht-myristoyliertem PRS4 reduziert wird. 2-OH-Myristat verhindert die Induktion der Myristoylierung durch TCDD vollständig.

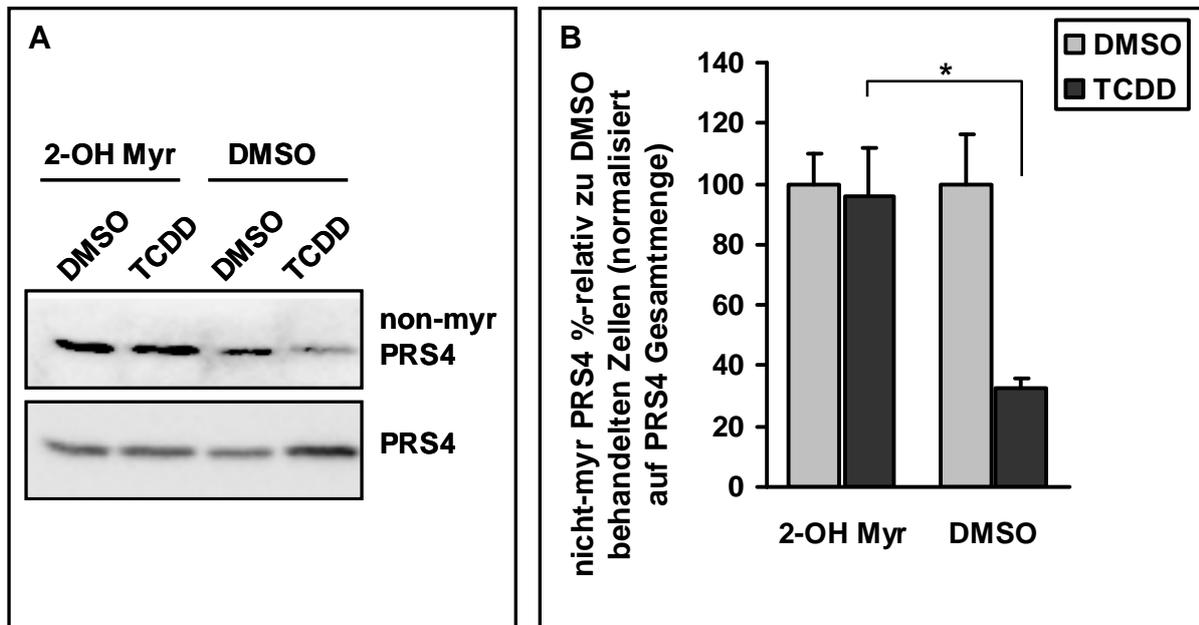


Abbildung 14: Induktion des Myristoylierungsstatus von PRS4 durch TCDD kann durch pharmakologische Inhibition der NMT-Aktivität verhindert werden.

A 5L-Zellen wurden 40 h mit TCDD (nM) bzw. mit NMT-Inhibitor 2-OH-Myristat (250 μM in DMSO) oder mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Western-Blot-Analyse der Proteinextrakte erfolgte durch anti-PRS4 bzw. anti-non-Myr PRS4 Antikörper.

B Quantifizierung der Western-Blots erfolgte durch Image J. Software. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardfehler (n=3), *P < 0.05.

Dies legt nahe, dass TCDD die NMT-Aktivität, wahrscheinlich durch Induktion der NMT2 Proteinspiegel derart beeinflusst, dass es zu einer Induktion der Myristoylierung von PRS4 kommt.

3.6.2 Inhibition der differentiellen Myristoylierung durch RNAi

Da TCDD eine Vielzahl von zellulären Prozessen und Signalwegen beeinflussen kann (vgl. Einleitung), sollte zusätzlich ausgeschlossen werden, dass neben der Induktion von *Nmt2* keine weiteren TCDD-induzierten Mechanismen die Myristoylierung von PRS4 verändern können.

Durch die RNAi Technik kann die mRNA eines Zielgens in der Zelle spezifisch reduziert werden, was in der Folge zu ebenfalls reduzierter Expression des entsprechenden Proteins führt. Die Proteinexpression der NMT2 wurde gezielt durch siNMT2 reduziert. Zellen ohne siRNA (-siRNA) bzw. mit unspezifischer siRNA (siLuz) transfiziert zeigen niedrige basale Spiegel an NMT2 (DMSO-Kontrolle). Durch TCDD wird NMT2 stark induziert, wobei sich gleichzeitig die erwartete Reduktion an nicht-myristoyliertem PRS4 im Immunoblot nachweisen lässt (*Abbildung 15 A*). Durch siNMT2 lassen sich die NMT2-Spiegel reduzieren. Unter TCDD-Einfluss ist keine Induktion der NMT2 mehr nachweisbar.

Gleichzeitig wird durch diese Unterdrückung der NMT2-Induktion auch der TCDD-Effekt auf den Myristoylierungsgrad von PRS4 unterdrückt. Dieser spezifische *knockdown* zeigt, dass ausschließlich NMT2 bzw. die durch TCDD stimulierte Induktion von NMT2 für die durch TCDD veränderte Myristoylierung von PRS4 verantwortlich ist (*Abbildung 15*).

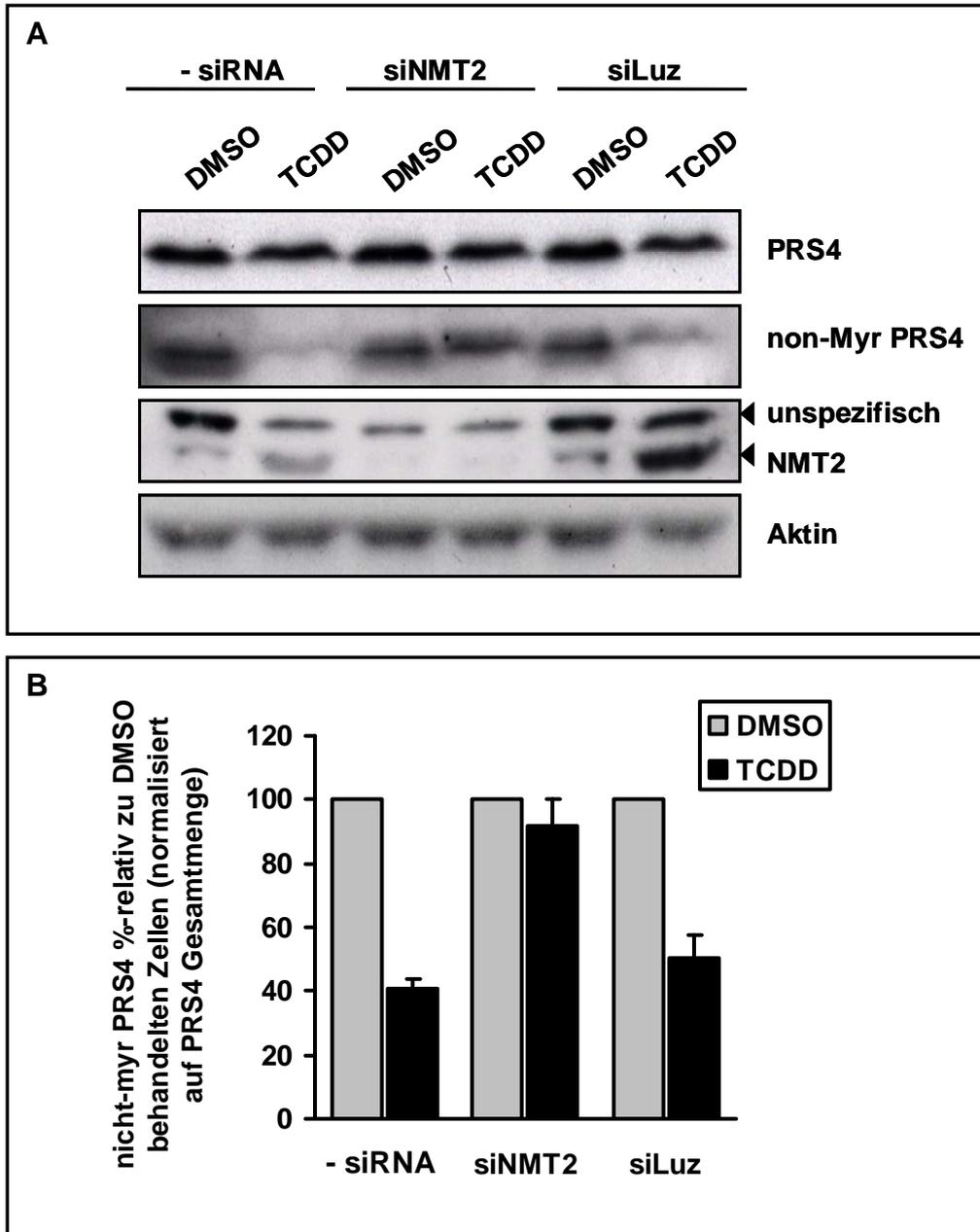


Abbildung 15: Die differentielle Myristoylierung von PRS4 unter TCDD-Einfluss ist von Induktion der NMT2 abhängig.

5L-Zellen wurden mit Nmt2 siRNA (siNMT2), Luziferase siRNA (siLuz) oder nur Lipofektamin ohne siRNA (- siRNA.) transfiziert und für 40 h mit TCDD (1 nM) oder mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt.

A Western-Blot-Analyse der Proteinextrakte erfolgte mit anti-non-Myr PRS4 und anti-PRS4 Antikörper bzw. anti-NMT2 und anti-Aktin Antikörper. **B** Quantifizierung der Western-Blots von A erfolgte mit Image J. Software; gezeigt ist Mittelwert \pm Standardfehler (n=3, * P < 0.05).

3.6.3 NMT2-*knockdown* inhibiert induzierte Myristoylierung aller identifizierter Zielproteine

Da mehrere Proteine als differentiell myristoyliert identifiziert wurden, stellte sich die Frage, ob die NMT2 Induktion der generelle zugrunde liegende Mechanismus für alle identifizierten Zielproteine ist. Da durch die Western-Blot-Analyse lediglich die Abhängigkeit der differentiellen Myristoylierung von NMT2 für PRS4 gezeigt werden konnte, sollte dies durch weitere Markierungsexperimente mit ^3H -Myristinsäure und siNMT2 geklärt werden. 5L-Zellen wurden unter siNMT2-*knockdown* Bedingungen (siLuz als Kontrolle) mit DMSO und TCDD behandelt und mit ^3H -Myristinsäure metabolisch markiert. Die Analyse der markierten Proteine durch Autoradiographie zeigt, dass nicht nur die bereits nachgewiesene TCDD-induzierte differentielle Myristoylierung für PRS4 inhibiert wird, sondern auch für die Proteine p22 und G_{αi2} nicht mehr nachgewiesen werden kann. Der *knockdown* von NMT2 führt somit bei allen identifizierten Zielproteinen zur Inhibition der durch TCDD-induzierten differentiellen Myristoylierung.

Zusätzlich wurde die Funktionalität der siNMT2 und die äquivalente Beladung der Gele durch Western-Blot mit anti-NMT2 und anti-PRS4 Antikörpern überprüft (*Abbildung 16 C*).

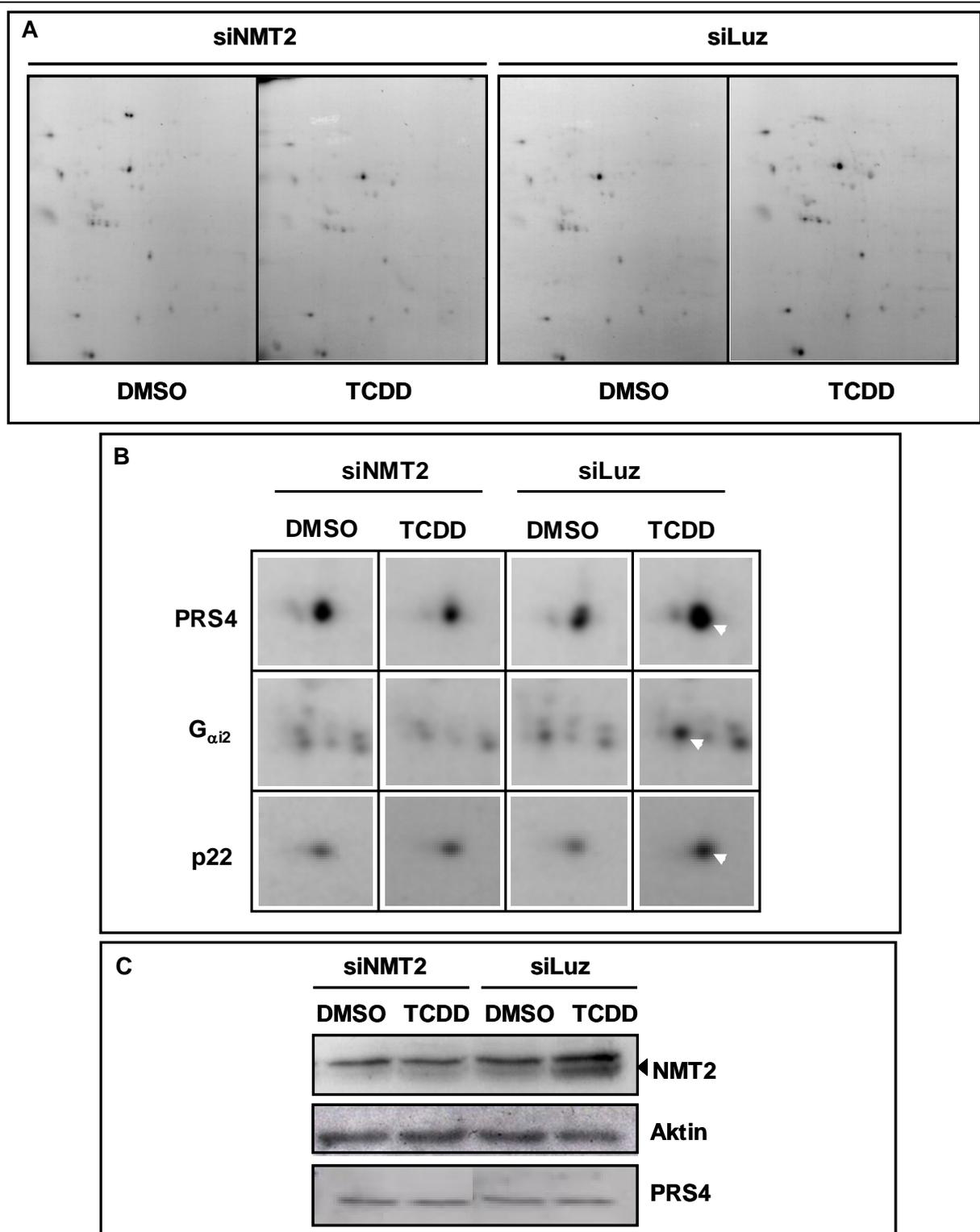


Abbildung 16: Differentielle N-Myristoylierung durch TCDD ist abhängig von NMT2-Induktion
 5L-Zellen wurden mit unspezifischer siRNA (siLuz) und siRNA gegen NMT2 (siNMT2) transfiziert und mit TCDD (1 nM) bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt und anschließend mit ³H-Myristinsäure (925x10⁻³ Bq/ml Medium (25 µCi/ml)) metabolisch markiert. Die Proteine wurden nach Zellyse durch 2D-PAGE separiert und die Gele anschließend getrocknet. **A** Autoradiogramme der 2D-Gele. **B** Relevante Proteinspots sind vergrößert dargestellt. **C** Western-Blot-Kontrolle der NMT2-Induktion durch TCDD, NMT2-knockdown durch siNMT2 sowie Ladungskontrolle der 2D-Gele durch PRS4 Western-Blot. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot von zwei mit ähnlichem Ergebnis.

3.7 Myristoylierungsstatus *in vivo*

3.7.1 Induzierter Myristoylierungsstatus durch TCDD *in vivo*

Mit den Antikörperseren gegen nicht-myristoyliertes PRS4 bestand nun die Möglichkeit zu überprüfen, ob die TCDD-induzierte differentielle Myristoylierung auch *in vivo* beobachtet werden kann. Durch eine Kooperation mit einer Arbeitsgruppe vom Karolinska Institut in Stockholm (H. Hakansson) standen Leberproben TCDD behandelter Mäuse zur Verfügung. Durch Western-Blot-Analyse der Proteinextrakte wurden sowohl die Spiegel an nicht-myristoyliertem als auch die Gesamtproteinmenge von PRS4 bestimmt (Abbildung 17 A). Die Normalisierung gegen PRS4-Gesamtproteinmenge zeigt, dass sich die Spiegel an nicht-myristoyliertem PRS4 unter TCDD um etwa 40 % gegenüber der Kontrollgruppe verringern (Abbildung 17 B). TCDD induziert den Myristoylierungsstatus von PRS4 nicht nur in einer proliferierenden Hepatoma Zelllinie wie den 5L-Zellen, sondern auch im *in vivo* Experiment in Mäusen.

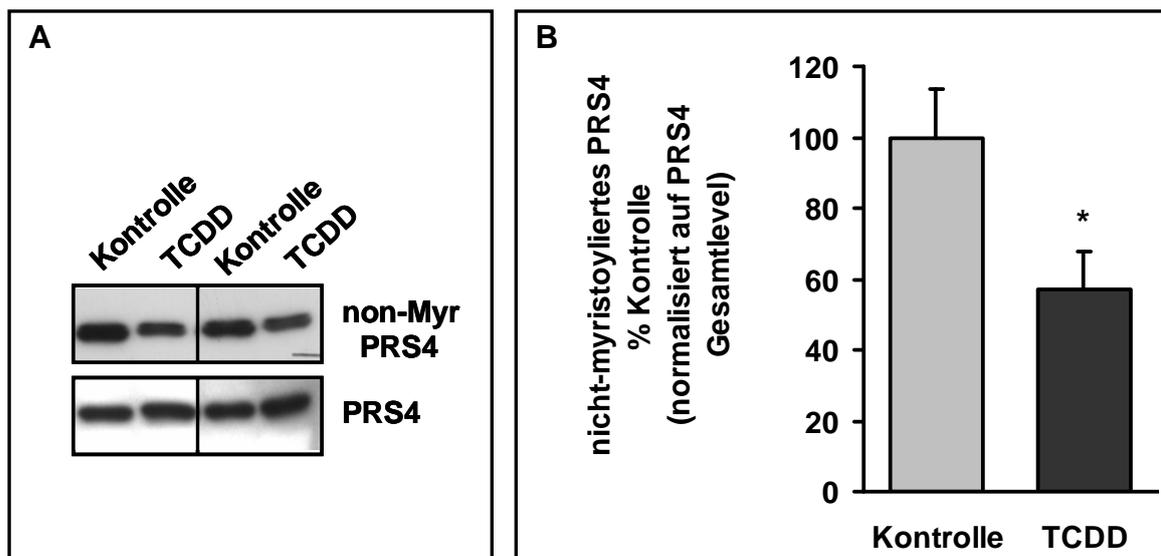


Abbildung 17: Induzierter Myristoylierungsstatus von PRS4 durch TCDD *in vivo*.

C57BL6 Mäuse wurden durch einmalige Injektion mit TCDD in Maiskeimöl (200 µg/kg KG) oder nur Maiskeimöl als Vehikelkontrolle für 7 Tage behandelt. Aus Proben der tief gefrorenen Leber wurden in TH-Puffer Proteinextrakte präpariert. Für die Western-Blot-Analysen wurden je 40 µg dieser Extrakte pro Spur aufgetragen und nicht-myristoyliertes bzw. Gesamt-PRS4 im Immunoblot nachgewiesen. **A** zeigt zwei repräsentative Paare (Kontrolle/TCDD) von fünf Paaren mit ähnlichem Ergebnis. **B**. Quantifizierung erfolgte mit Image J Software; gezeigt ist der Mittelwert ± Standardfehler (n = 5, * P < 0.05)

3.7.2 Gewebespezifischer Myristoylierungsstatus von PRS4 *in vivo*

Die bisher dargestellten Ergebnisse zeigen, dass ausschließlich die durch TCDD bedingte Induktion von NMT2 für einen veränderten Myristoylierungsstatus von PRS4 in 5L-Zellen und sehr wahrscheinlich auch in der Leber TCDD-behandelter Mäuse verantwortlich ist. Aus publizierten Quellen geht zusätzlich hervor, dass die NMT-Aktivität zwischen verschiedenen Geweben einer Spezies stark variieren kann (Raju, 1997b), (McIlhinney and McGlone, 1990a), wobei alle Quellen in der Leber die geringste und im Gehirn die höchste NMT-Aktivität der jeweiligen Spezies beschrieben haben. Da wahrscheinlich die NMT2-Induktion durch TCDD auch zu einer induzierten Gesamt-NMT Aktivität führt, leitet sich daraus die Hypothese ab, dass unterschiedliche NMT-Aktivitäten auch unterschiedliche Myristoylierungsgrade von PRS4 zur Folge haben könnten.

Mit den beschriebenen Antikörpern konnte dies experimentell überprüft werden.

Neben Proteinextrakten aus Leber und Gehirn, wurden Milz, Niere, Thymus und die Mucosa von Dünndarm und Colon aus der Maus untersucht. Dabei fanden sich im Vergleich der Gewebe deutliche Unterschiede im Myristoylierungsstatus von PRS4. Während im Gehirn kaum nicht-myristoyliertes PRS4 nachgewiesen werden konnte, war die Leber neben der Niere das Organ mit den höchsten Spiegeln an nicht-myristoyliertem PRS4. Somit ist die Menge an nicht-myristoyliertem PRS4 umgekehrt mit den in Gewebe bekannten NMT-Aktivitäten korreliert. Daneben zeigten Milz, Thymus sowie Mucosa aus Dünndarm und Colon nur sehr niedrige Spiegel an nicht-myristoyliertem PRS4 (*Abbildung 18 A*).

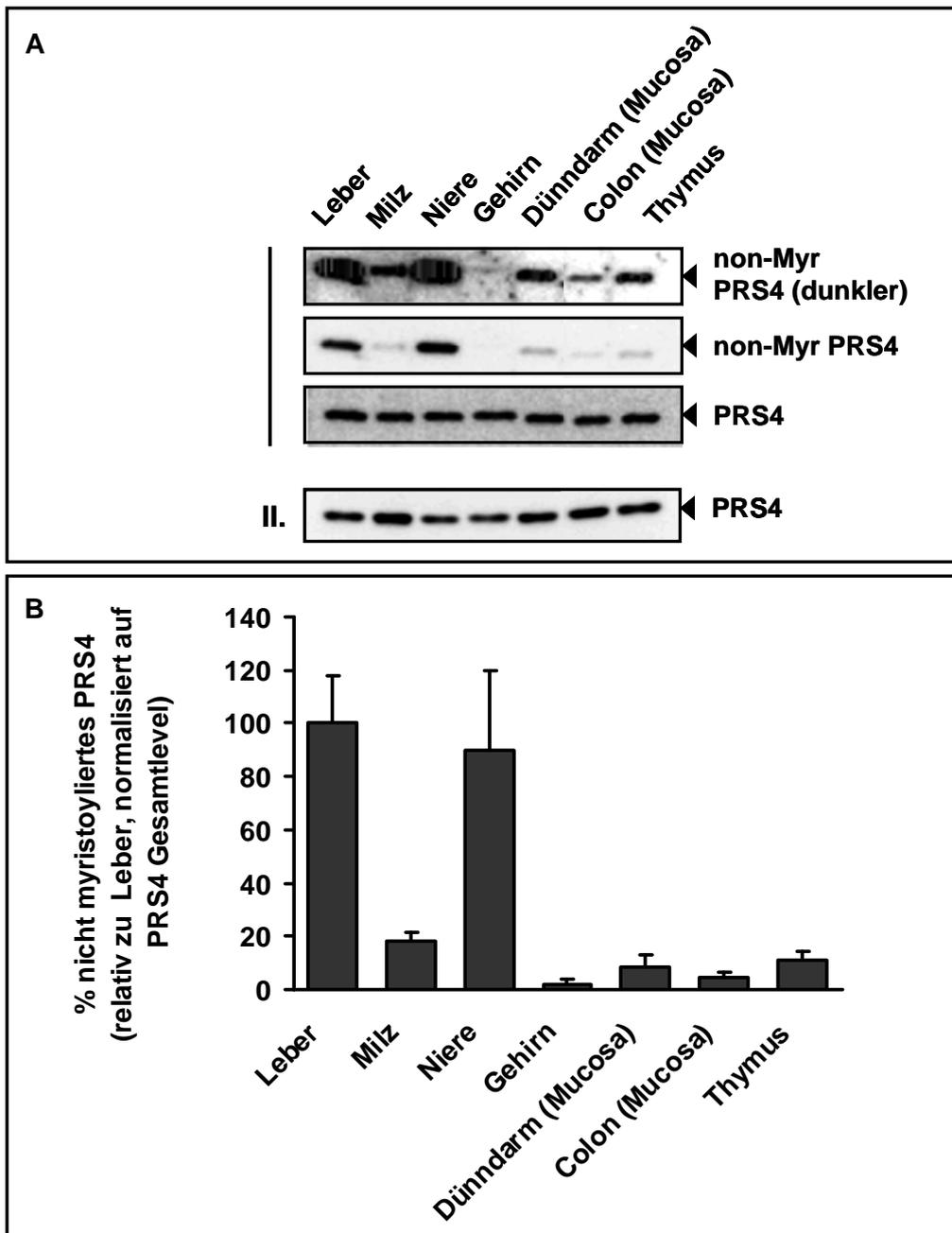


Abbildung 18: Der Myristoylierungsstatus von PRS4 variiert stark im Vergleich unterschiedlicher Gewebe der Maus.

A Gewebe verschiedener Organe der Maus wurden mit einem Ultra-Turrax auf Eis homogenisiert und anschließend unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt. In Western-Blot-Analysen wurden nicht-myristoyliertes PRS4 Protein (non-Myr PRS4) und Gesamt-PRS4 Protein (PRS4) nachgewiesen. Western-Blots wurden durch Auftragen variabler Mengen an Proteinextrakt je Gewebe auf gleiche Spiegel an PRS4 eingestellt. Die Blots mit non-Myr PRS4 sind mit unterschiedlichen Expositionszeiten dargestellt. Zum Vergleich wurden 40 µg Proteinextrakt je Gewebe aufgetragen und die Menge an Gesamt-PRS4 durch Western-Blot bestimmt (II).

B Quantifizierung des Myristoylierungsstatus von PRS4 in verschiedenen Geweben der Maus. Banden der Western-Blots aus A wurden mit Image J. Software quantifiziert. Nicht-myristoyliertes PRS4 (non-Myr PRS4) wurde gegen Gesamtspiegel PRS4 Protein normalisiert. (Werte geben relative Niveaus an nicht-myristoyliertem Protein verglichen mit der Leber wieder (n = 5)).

Um festzustellen, ob die Proteinmengen der NMT-Proteine mit dem Myristoylierungsstatus von PRS4 in den jeweiligen Geweben korrelieren, wurden durch Western-Blot-Analysen die Proteinextrakte auf ihren Gehalt an NMT1 und NMT2 untersucht (*Abbildung 19*). Dabei fiel besonders die starke Bande für NMT1 bei ~55 kD im Gehirn auf. Eine NMT1-Form dieser Größe zeigte sich noch in geringeren Mengen in der Milz und im Dünndarm sowie deutlich schwächer in Niere, Colon und Thymus. Die 60 kD Form der NMT1 fand sich in den meisten Geweben etwa ähnlich stark exprimiert, allerdings nur in geringen Mengen im Dünndarm. Eine weitere, deutlich kleinere immunoreaktive NMT1-Bande von ~48 kD, fand sich ebenfalls in allen Geweben wieder, wobei in Leber und Milz verringerte Proteinspiegel nachgewiesen wurden. Dabei war die stärkste Bande in der Leber ca. ~52 kD groß, wobei sich diese Form sonst nur noch in Niere und Dünndarm fand. Die Analyse mit einem NMT2-Antikörper zeigte eine prominente immunoreaktive Bande bei ca ~64 kD. Auffällig waren die im Vergleich zu den anderen Organen niedrigen Spiegel in Gehirn und Dünndarm.

Da die NMT-Aktivität u.a. durch Inhibitoren beeinflusst werden kann, wurden zusätzlich die Proteinspiegel des bekannten NMT-Inhibitor-Proteins HSC70 analysiert. Im Gegensatz zu NMT1 und NMT2 zeigten sich bei HSC70 kaum Unterschiede der Expressionsniveaus im Vergleich der unterschiedlichen Gewebe.

Insgesamt bestätigt sich das in der Literatur diskutierte Bild. Je nach verwendeten Antikörpern gegen NMT1 und NMT2 zeigen sich unterschiedliche Spiegel an NMT-Protein in den verschiedenen Geweben. Die Proteinmuster sind komplex, was vermutlich auf alternatives Spleißen und möglicherweise posttranslationalen Modifikationen beruht. Es ist nicht möglich, eine einfache Korrelation zwischen immunologisch nachweisbaren NMT-Spiegeln und der in der Literatur beschriebenen gewebs- bzw. zellspezifischen NMT-Aktivität bzw. dem Grad der PRS4 Myristoylierung herzustellen.

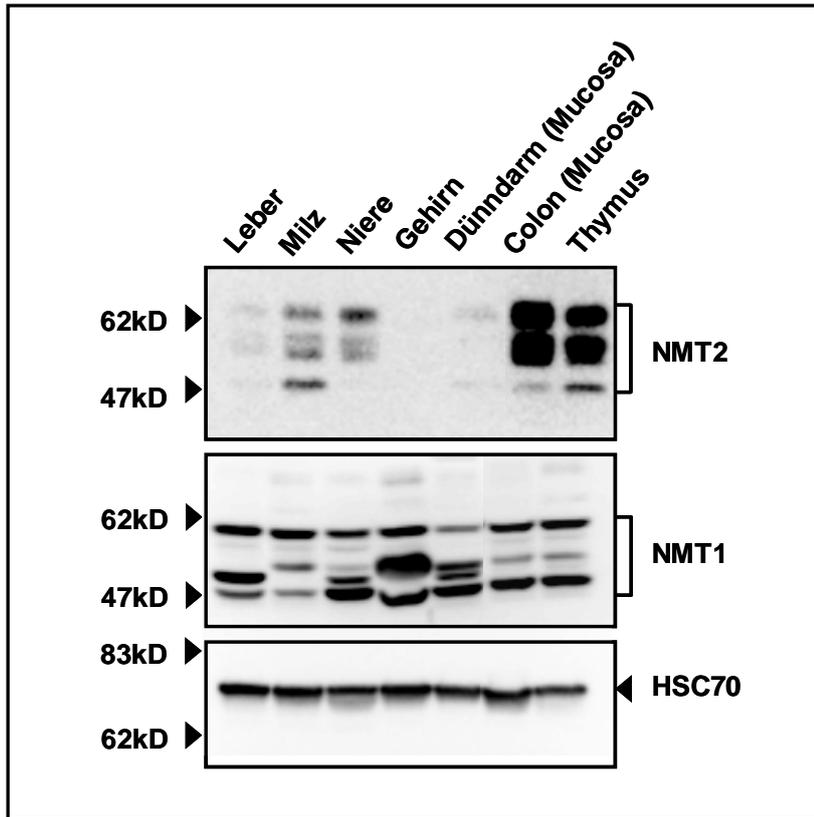


Abbildung 19: Expression von NMT1, NMT2 und NMT-Inhibitor-Protein HSC70 in verschiedenen Geweben der Maus.

Die Western-Blot-Analyse der Proteinextrakte (40 µg je Spur) unterschiedlicher Mausgewebe wurde mit verschiedenen spezifischen Antikörpern gegen NMT1 (oberes Panel) und NMT2 (mittleres Panel) sowie gegen das NMT Inhibitor Protein HSC70 (unteres Panel) durchgeführt. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot aus fünf unterschiedlichen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen.

3.8 Substratspezifität der NMT-Isoformen.

3.8.1 Rekombinante Expression der NMTs in *E. coli*

Im vorangehenden Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die mit der Regulation der NMT2-Menge einhergehende Veränderung der NMT-Aktivität für die differentielle Myristoylierung ausgewählter Substratproteine verantwortlich ist. Offen ist die Frage, warum dies nur einige wenige myristoylierte Proteine betrifft.

Eine mögliche Ursache für diesen Befund könnte eine unterschiedliche Affinität dieser Substratproteine bzw. Zielproteine gegenüber den Isoenzymen NMT1 und NMT2 sein. Durch enzymkinetische Analyse sollte untersucht werden, ob diese differentiell myristoylierten Proteine Substrate darstellen, die präferentiell von NMT2 myristoyliert werden.

Dekapeptide, die den *N*-Terminus einiger bekannter myristoylierter Proteine repräsentieren, wurden mit rekombinanten NMT-Isoformen der Ratte (NMT1 und NMT2S) *in vitro* myristoyliert. NMT1 und NMT2S konnten in ausreichender Menge isoliert werden, wogegen die Aufreinigung der NMT2L Form nicht erreicht wurde.

Die NMT Isoformen NMT1 und NMT2S wurden in pGEX 4T-2-Vektor kloniert und zur Amplifikation der Plasmid-DNA in *E. coli* DH5 α transformiert. Nach Sequenzanalyse positiver Klone wurden sie in *E. coli* BI21(DE3) transformiert, in welchen die Expression der Enzyme als *N*-terminale GST-Fusionsproteine erfolgte. Die exprimierten Proteine wurden über eine GST-FF Säule aufgereinigt. Die Proteinbande bei ~84-85 kD im Coomassie gefärbten Gel war in der vor dem Auftragen des *E. coli* Lysats auf die GST-Affinitätsäule entnommenen Probe deutlich stärker vorhanden als im Durchlauf, was eine Bindung des Proteins an die Säulenmatrix anzeigt (*Abbildung: 20 A Spur 3 vs. 4 bzw. 7 vs. 8*). Durch Elution der GST-NMT Proteine von der Säule (*Abbildung: 20 A, Spur 5 bzw. 9*) wurden die Enzyme bereits aufgereinigt erhalten. Um aber eine mögliche Interferenz des GST-Tags bei der Substratbindung bzw. Substraterkennung auszuschließen, wurde der GST-Tag durch die Protease Thrombin von der NMT abgespalten und NMT1 bzw. NMT2S in guter Reinheit isoliert (*Abbildung: 20 A Spur 6 und 10*).

Um die bei den kinetischen Messungen eingesetzten Mengen an NMT-Protein zu bestimmen, erfolgte eine Quantifizierung durch Vergleich mit BSA (*bovine serum albumin*) als Standardprotein auf einem Coomassie SDS-PAGE. Das Verhältnis von aufgetragener Menge BSA zu Bandenstärke im gefärbten Gel (AUC, *area under the curve*, bei densitometrischer Auswertung) ist dabei im Bereich von 100 bis 600 ng linear (*Abbildung: 20 B*).

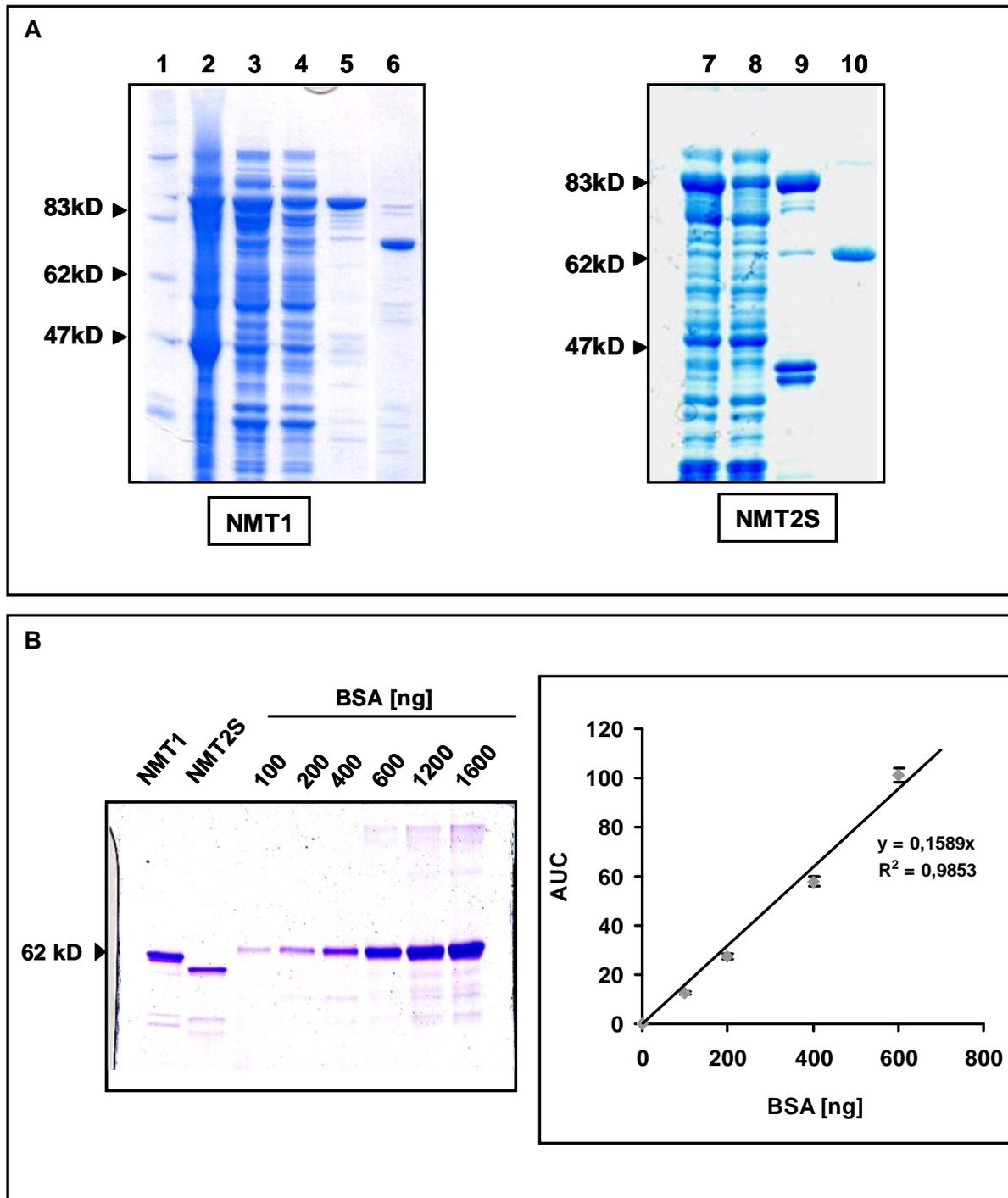


Abbildung: 20 Expression und Quantifizierung der rekombinanten NMT1 und NMT2S

A. NMT1 und NMT2S wurden in *E. coli* BL21(DE3) als GST-Fusionsproteine exprimiert. Spur 2: unlösliche Bestandteile nach Sonifizierung der *E. coli* Zellen und Zentrifugation von NMT1. Spur 3/7: lösliche Proteine des *E. coli* Lysats vor GST-Affinitätssäule; Spur 4/8: nichtbindende Proteine der *E. coli* Lysate; Spur 5/9: eluierte Fusionsproteine GST-NMT1/GST-NMT2S; Spur 6/10: NMT1/NMT2S nach proteolytischer Abspaltung des GST-Tags durch Thrombin.

B. 2 µl Aliquots der rekombinanten NMT1 und NMT2S wurden parallel mit BSA-Standard (100-1600 ng) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung visualisiert. Quantifizierung der gefärbten Proteinbanden erfolgte densitometrisch mittels Image J. Software.

3.8.2 Bestimmung der kinetischen Parameter ausgewählter NMT-Substrate

Die Bestimmung der Kinetikparameter wie K_M (Michaelis-Menten-Konstante) und V_{max} (maximale Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion bei definierter Enzymmenge) erfolgte nach einer Methode von Boisson und Meinel (Boisson and Meinel, 2003).

Die Messung beruht auf einer an Pyruvatdehydrogenase (PDH) gekoppelten Reaktion bei der NADH gebildet wird. Der Fortschritt einer Reaktion lässt sich bei 340 nm im Photometer verfolgen. Abbildung 21 zeigt exemplarisch drei Messkurven, die bei der Myristoylierungsreaktion des tBID-Peptids (mit den Konzentrationen 3 μM , 66 μM und 660 μM) aufgenommen wurden. Durch Auftragen von v_0 gegen die Substratkonzentration $[S]$ ergibt sich eine Michaelis-Menten Kurve (vgl. *Abbildung 21 B*) aus der sich die Parameter K_M und V_{max} bestimmen lassen. Neben den identifizierten, differentiell myristoylierten Proteinen PRS4, $G_{\alpha i2}$ und p22 wurden das in der Literatur oft als Standard verwendete vSRC-Peptid und die Peptide der *N*-Termini von MARCKS, LCK und tBID untersucht. Als Negativkontrolle diente das vSRC-Peptid dessen *N*-Terminus die Mutation G2A trägt, welche eine Myristoylierung durch NMT verhindert (*Tabelle 4*).

Dabei zeigt sich, dass die beiden differentiell myristoylierten Proteine PRS4 und $G_{\alpha i2}$ eher schlechte Substrate, sowohl der NMT1 als auch der NMT2S sind. Für PRS4 wurde ein K_M von 352 μM für NMT1 bzw. 461 μM für NMT2S ermittelt. $G_{\alpha i2}$ stellte sich als noch schlechteres Substrat in den Untersuchungen dar, da für NMT1 ein K_M von ca. 880 μM und für NMT2S ein K_M von ca. 1370 μM bestimmt wurde. Neben dem K_M , der die Affinität eines Substrats zum Enzym beschreibt (je kleiner K_M desto größer die Affinität) ist der V_{max}/K_M (oft auch k_{cat}/K_M) ein wichtiger Parameter beim Vergleich von Enzymen, da er ein Maß für die katalytische Effizienz darstellt. Betrachtet man diese Werte, so sind PRS4 und $G_{\alpha i2}$ die beiden am uneffizientesten myristoylierten Substrate der NMTs mit einem relativen Werten von V_{max}/K_M für PRS4 von 46 (NMT1) bzw. 31 (NMT2S) und für $G_{\alpha i2}$ von 29 (NMT1) bzw. 7 (NMT2S).

Im Gegensatz dazu steht allerdings, dass p22, das zwar unter TCDD induzierbar myristoyliert wird, trotzdem als gutes Substrat erscheint. Es weist nicht nur deutlich niedrigere K_M Werte auf, 144 μM für NMT1 bzw. 78 μM NMT2S, sondern wird in Form des Substratpeptides auch 6-10 mal effizienter myristoyliert verglichen mit dem Referenzpeptid vSRC; V_{max}/K_M von 254 (NMT1) bzw. 313 (NMT2S). Das Substrat mit der effizientesten Myristoylierungsreaktion aller untersuchten Substrate ist tBID mit V_{max}/K_M von 428 bzw. 597 (NMT1 bzw. NMT2S).

Eine Übersicht aller untersuchten Peptide zeigt *Tabelle 4*.

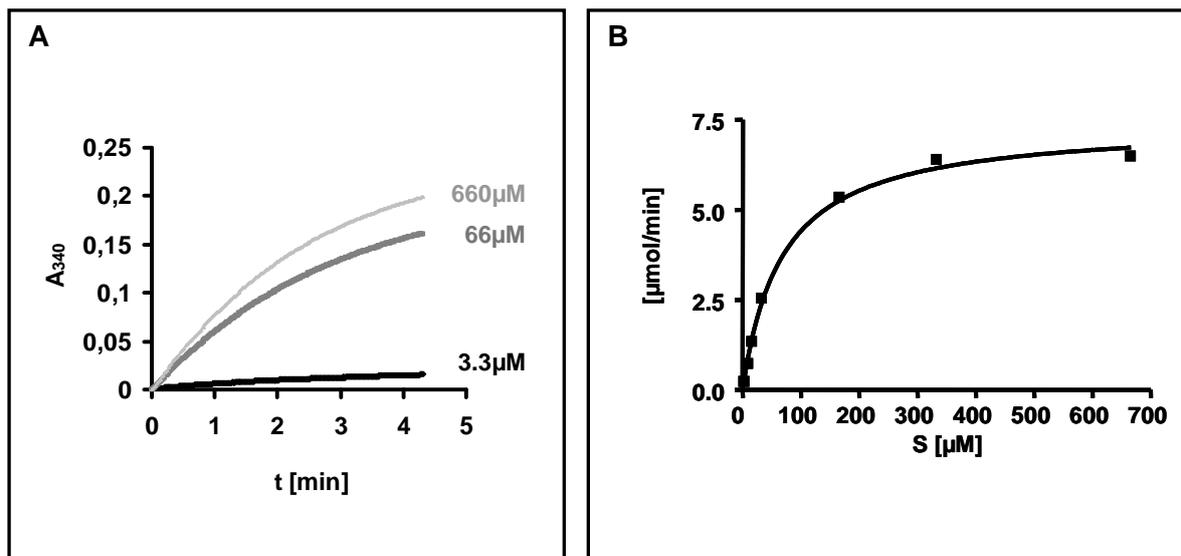


Abbildung 21: Exemplarische Darstellung zur Bestimmung der K_M und V_{max} -Werte der NMTs.

A Verschiedene Konzentrationen an tBID Peptid (3.3 µM, 66 µM und 660 µM) wurden durch NMT1 *in vitro* myristoyliert. Gezeigt ist der Reaktionsverlauf über mehrere Minuten.

B Zur Bestimmung der V_{max} - und K_M -Werte wurden je Substratpeptid mindestens 6 verschiedene Substratkonzentrationen über einen Bereich von mehr als zwei Größenordnungen gemessen. v_0 jeder Reaktion wurde durch Bestimmung der Steigung der Ausgleichsgeraden der ersten Reaktionsminute jeder Reaktion ermittelt. Auftragen von v_0 gegen jeweilige Substratkonzentration [S] ergibt eine Michaelis-Menten Kurve aus der K_M und V_{max} durch eine nichtlineare Regressionsanalyse berechnet wurden.

Tabelle 4: Übersichtstabelle der kinetischen Parameter von NMT1 und NMT2S mit verschiedenen Substratpeptiden.

N-Terminus	Protein	rnNMT1				rnNMT2s			
		K_M [μ M]	spez. Aktivität [nmol*min ⁻¹ *mg ⁻¹] (1)	k_{cat} [s ⁻¹]	relativer V_{max}/K_M (2)	K_M [μ M]	spez. Aktivität [nmol*min ⁻¹ *mg ⁻¹] (1)	k_{cat} [s ⁻¹]	relativer V_{max}/K_M (2)
GQSQSGGHGP	PRS4	352 ± 40	620 ± 33	0.59	46	461 ± 33	562 ± 10	0.54	31
GSSKSKPKDP	vSRC	114 ± 14	450 ± 20	0.43	100 (3)	66 ± 13	298 ± 20	0.28	116
ASSKSKPKDP	vSRC(G2A)	nm (4)	nm	nm	0	nm	nm	nm	0
GSRASTLLRD	P22 (CHP1)	144 ± 12	1430 ± 40	1.4	254	78 ± 3.7	947 ± 13	0.90	313
GCTVSAEDKA	G _{oi2}	767 ± 182	880 ± 116	0.84	29	1370 ± 370	375 ± 65	0.36	7
GAQFSKTAAK	MARCKS	11 ± 1.0	70 ± 1.0	0.07	169	3.2 ± 0.6	60 ± 2.3	0.06	485
GSRASRSFYHG	tBID	68 ± 7.8	1140 ± 35	1.1	428	30 ± 2.7	710 ± 19	0.68	597
GVCSSNPED	LCK	230 ± 23	700 ± 20	0.67	79	745 ± 147	510 ± 40	0.49	18

Die Konzentration der Enzyme im Assay war für NMT1: 114 pmol für NMT2S: 103 pmol) K_M und V_{max} Werte wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse berechnet (s. auch Abbildung 21)

1) V_{max} wurde zur besseren Vergleichbarkeit als spezifische Aktivität in nmol/min/mg Enzym angegeben.

2) Der Wert V_{max}/K_M ist ein Maß für die Substratspezifität bzw. die katalytische Effizienz.

3) Es wurde dem V_{max}/K_M des Referenzpeptids vSRC ein Wert von 100 zugewiesen.

4) Der G2A Austausch bei vSRC(G2A) führt zu einer nicht mehr messbaren Reaktionsgeschwindigkeit d.h. vSRC(G2A) ist kein Substrat mehr; (nm: nicht messbar).

3.9 Funktionelle Konsequenz der PRS4-Myristoylierung

In vielen Proteinen fungiert die *N*-terminale Myristoylierung als Signal für die Membranlokalisierung bzw. als Anker in der Zellmembran. Aus der Literatur sind bis heute keine Untersuchungen über die Funktion der Myristoylierung bei PRS4 bekannt. Als ATPase ist PRS4 ein essentieller Bestandteil des 26S Proteasom-Komplexes und kann daneben, zumindest in *Drosophila*, den Notch-Signalweg beeinflussen. Im Folgenden sind Untersuchungen beschrieben, die Aufschluss über die Funktion der Myristoylierung von PRS4 geben sollen.

3.9.1 Subzelluläre Lokalisation

Ob die Myristoylierung von PRS4 auch als Signal für die Lokalisation an die Zellmembran fungieren kann, sollte durch ektoische Expression von PRS4-GFP Chimären untersucht werden. HEK293-Zellen wurden mit Konstrukten transfiziert, die entweder PRS4 (wtPRS4, Wildtyp) oder die Myristoylierungsdefiziente Mutante PRS4(G2A) mit einem C-terminalen YFP/CFP Tag exprimieren. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Zellen zeigt eine starke Lokalisierung des wtPRS4 an der Plasma- und geringer an der Kernmembran (*Abbildung 22 A2/B3*). Interessanterweise findet sich die Myristoylierungsmutante PRS4(G2A) nicht im Zytosol, wie zum Beispiel für nicht-myristoyliertes vSRC wurde gezeigt, sondern hauptsächlich im Nukleus (*Abbildung 22 A3/B2*).

Durch Cotransfektion von PRS4(G2A)GFP kann die Lokalisierung von Wildtyp und Mutante gleichzeitig in einer Zelle beobachtet werden. Die Unterschiede in der Lokalisation können durch Überlappung der Bilder für CFP- und YFP-Konstrukte dargestellt werden, da beide Konstrukte, wtPRS4 (YFP-Tag) und PRS4(G2A) (CFP-Tag) gleichzeitig in der Zelle exprimiert werden (*Abbildung 22 B4*). Ein Vertauschen der GFP-Tags zu PRS4-CFP und PRS4(G2A)-YFP (*Abbildung 22 A*) führt zu gleichen Ergebnissen, sodass unterschiedliche Effekte der XFP-Tags ausgeschlossen werden können. Um auszuschließen, dass evtl. eine andere Modifikation außer der Myristoylierung am *N*-terminalen Glycin die Lokalisation an der Membran begünstigt, wurde die Lokalisation von PRS4-YFP in Gegenwart des NMT-Inhibitors 2-OH-Myristat untersucht. Dabei konnten ebenso wie im vorhergehenden Versuch beobachtet werden, dass wtPRS4 vornehmlich an der Zytoplasmamembran lokalisiert ist (*Abbildung 22 C*). Durch Cotransfektion von PRS4(G2A) und Behandlung der Zellen mit NMT-Inhibitor zeigt sich eine Colokalisation von PRS4(G2A) und nicht-myristoyliertem PRS4 im Nukleus. Dies ist durch ein gelbes Signal (*Abbildung 22 D4*) als Ergebnis der Überlagerung von grünem (PRS4 + 2-OH-Myr) und rotem (PRS4(G2A)) Kanal dargestellt. Pharmakologische Inhibition der NMT-Aktivität führt also ebenso wie die

Mutation des Myristoylierungsmotivs im PRS4-Protein zur Lokalisation im Zellkern. Der NMT-Inhibitor hat auf die Lokalisation von PRS4(G2A) keinen Einfluss.

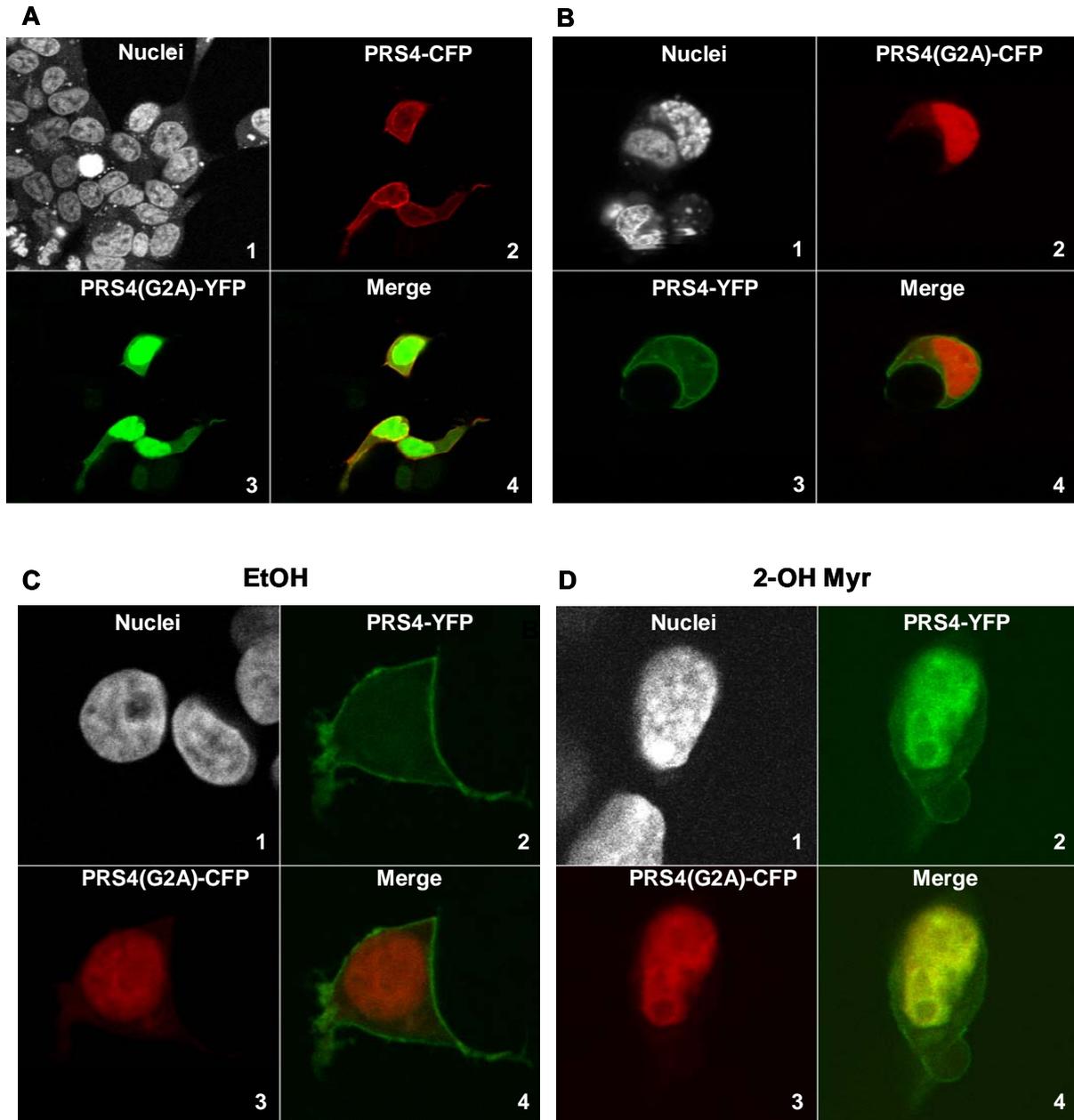


Abbildung 22: N-Myristoylierung reguliert die subzelluläre Lokalisation von PRS4.

HEK293-Zellen wurden auf Objektträgern ausgesät und 24 h später durch Lipofektion mit PRS4-YFP/PRS4(G2A)-CFP **A/C/D** bzw. PRS4-CFP/PRS4(G2A)-YFP **B** cotransfiziert.

In **C** und **D** wurde dem Medium 6 h nach Transfektion Ethanol (C) als Vehikelkontrolle oder 2-OH-Myristat in Ethanol (2-OH Myr, 100 μ M) (D) zugegeben und die Zellen über Nacht bei 37° C inkubiert. 24 h später wurden die Zellen mit Cytofix/Cytoperm (BD-Bioscience) fixiert und mittels konfokaler Lasermikroskopie analysiert.

Grüner Kanal: YFP-Chimäre; roter Kanal: CFP-Chimäre, weißer Kanal: Hoechst 33258 DNA-(Kern)-Färbung.

3.9.2 Zusammensetzung des Proteasoms

Als weitere mögliche Funktion der PRS4-Myristoylierung wurde getestet, ob es eine Präferenz für das myristoylierte bzw. nicht-myristoylierte Protein beim Aufbau des 26S Proteasom Komplexes gibt. In Gesamtzellextrakt fand sich, wie beschrieben, nach Exposition von 5L-Zellen mit TCDD eine Verringerung des nicht-myristoylierten PRS4 um ca. 50 %. Über einen Glyceringradienten (10-40 %) wurde das 26S Proteasom von TCDD behandelten bzw. mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelten 5L-Zellen aufgereinigt. Proteasom enthaltende Fraktionen wurden durch Proteolyse des Proteasomsubstrats Z-LLVY-AMC und Western-Blot-Analyse der Gradientenfraktionen mit anti-PRS4 Antikörper identifiziert (Abbildung 23).

Durch Western-Blot-Analyse wurden die Spiegel an nicht-myristoyliertem PRS4 im Proteasom bestimmt (Abbildung 24).

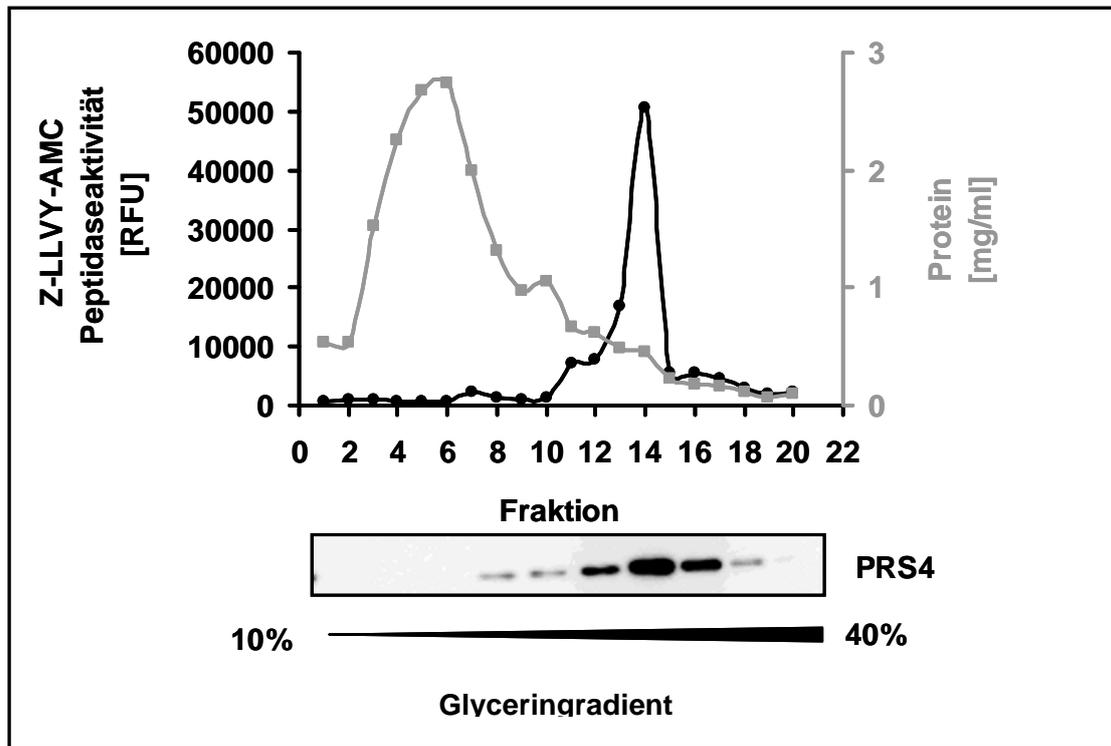


Abbildung 23: Aufreinigung des 26S Proteasoms aus 5L-Zellen über einen Glyceringradienten
 5L-Zellen wurden für 30 h mit TCDD (1nM) oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Nach Lyse der Zellen wurde das 26S Proteasom aus dem Proteinextrakt über einen Glyceringradienten (10-40 %) aufkonzentriert. 0.5 ml Fraktionen wurden von oben gesammelt und auf 26S-Peptidaseaktivität untersucht. Gezeigt ist der Verlauf der Proteinkonzentration und der Peptidaseaktivitäten über die gesammelten Fraktionen eines repräsentativen Gradienten. Die proteolytische Aktivität ist in RFU („relative fluorescence units“) angegeben. Western-Blot-Analyse erfolgte durch Auftragen von 10 µl Aliquots je Fraktion. Proteinmengen wurden aus 5 µl Aliquots je Fraktion durch Bradford-Test bestimmt.

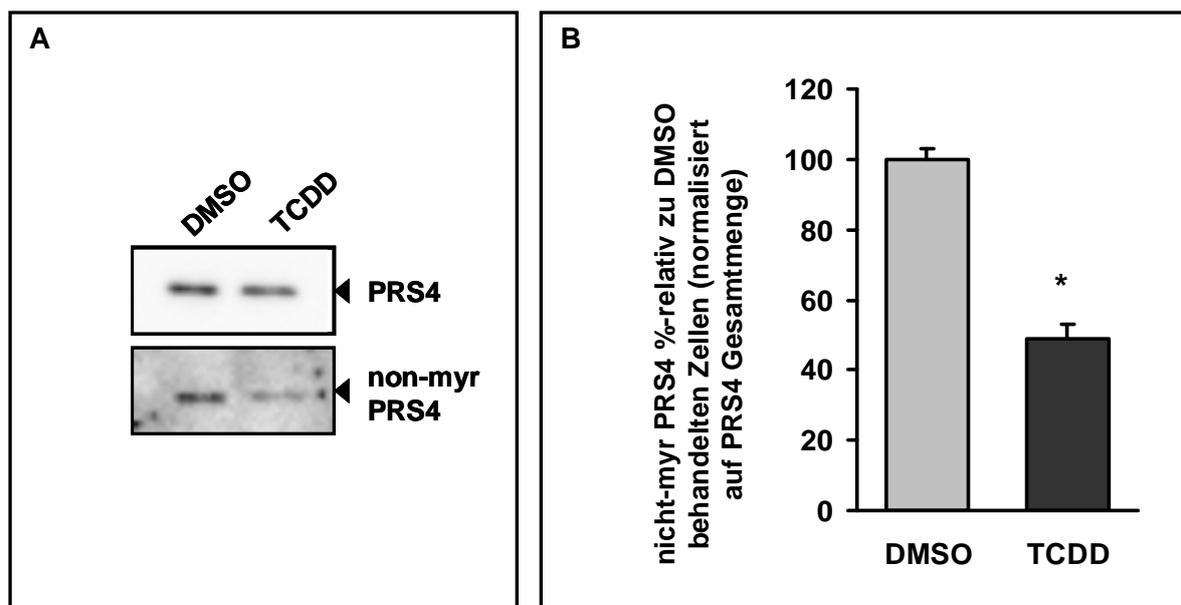


Abbildung 24: Nicht-myristoyliertes PRS4 ist Teil des 26S Proteasom Komplexes.

5L-Zellen wurden 40 h mit TCDD (1 nM) oder DMSO behandelt. Nach Zellyse wurde das 26S Proteasom über einen Glyceringradienten 10-40 % aufkonzentriert und 26S Fraktionen durch Z-LLVY-AMC Proteolyse identifiziert (s. Abb. 23). **A** Western-Blot des partiell aufgereinigten 26S Proteasoms von DMSO- und TCDD-behandelten Zellen mit anti-PRS4 bzw. anti-non-Myr PRS4 Antikörper und **B** Quantifizierung durch Image J. Software ($n=2$, * $P<0.05$).

Daneben zeigt sich, dass die im Gesamtzellextrakt gefundene Reduktion an nicht-myristoyliertem PRS4 von 50 % (relativ zur PRS4 Gesamtmenge) von TCDD-behandelten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen, sich auch im 26S Proteasom von 5L-Zellen wieder findet. Dies deutet darauf hin, dass sowohl myristoyliertes als auch nicht-myristoyliertes PRS4 in den Proteasomkomplex integriert werden.

In Zellextrakten verschiedener Gewebe der Maus war festgestellt worden, dass im Gehirn sehr niedrige Spiegel an nicht-myristoyliertem PRS4 nachweisbar waren, während z. B. in der Leber sehr hohe Spiegel an nicht-myristoyliertem PRS4 zu finden waren (vgl. *Abbildung 18*).

Um zu untersuchen ob *in vivo* eine Präferenz für die myristoylierte oder nicht-myristoylierte Form von PRS4 zum Einbau in das 26S Proteasom besteht, wurde, ähnlich wie bei den 5L-Zellen, das 26S Proteasom nach Pelletieren aus Zellysat, über einen Glyceringradienten (10 - 40 %) aufgereinigt. Da die aus dem Gehirn der Maus isolierbare Menge an Proteasom zu gering war, wurden hier zur Analyse die Organe, Leber und Gehirn, der Ratte verwendet. Proteasom-enthaltende Fraktionen des Gradienten wurden durch Hydrolyse des Proteasoms substrats Z-LLVY-AMC identifiziert. In beiden Gewebetypen findet sich die maximale Aktivität in Fraktion 17 wieder (*Abbildung 25*). Zusätzlich wurde durch Western-

Blot-Analyse das 26S Proteasom mit einem Antikörper gegen PRS4 in den entsprechenden Fraktionen identifiziert.

Im Western-Blot zeigt sich, dass sich PRS4 in geringen Mengen auch in Fraktionen außerhalb des 26S Proteasoms findet (Fraktion 6-12), während in denselben Fraktionen des Gehirns deutlich weniger PRS4 zu finden ist.

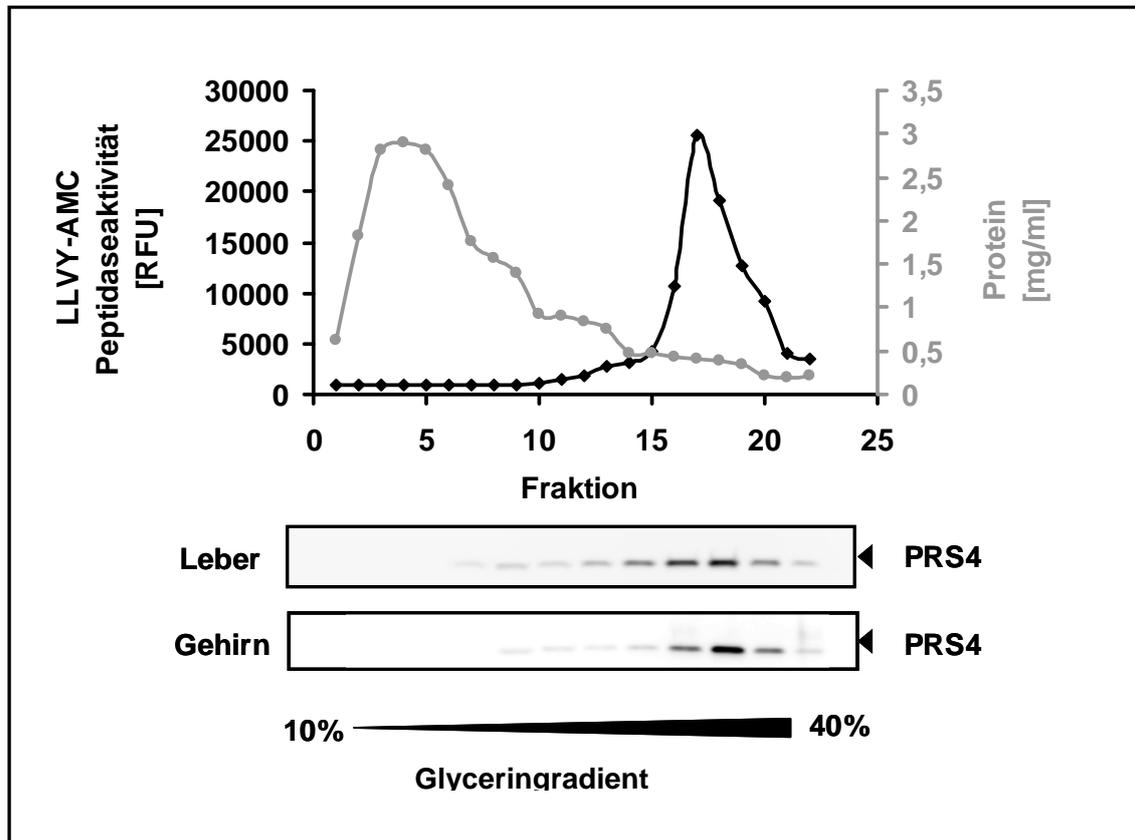


Abbildung 25: Aufreinigung von 26S Proteasom aus Leber- und Gehirngewebe der Ratte

Gehirn und Leber (aus Ratte) wurden in einem Potter in PH-Puffer homogenisiert und durch anschließende Zentrifugation unlösliche Bestandteile abgetrennt (1 h, 100000 × g). Danach wurde das 26S Proteasom durch Zentrifugation aus dem Gewebeextrakt pelletiert (6 h, 80000 × g) und nach Solubilisierung des Pellets über einen Glyceringradienten gereinigt. Die Abbildung zeigt einen (von 2) repräsentativen Gradienten zur Präparation des 26S Proteasoms von Gehirn und Leber der Ratte, analog Abbildung 23, mit ähnlichem Ergebnis.

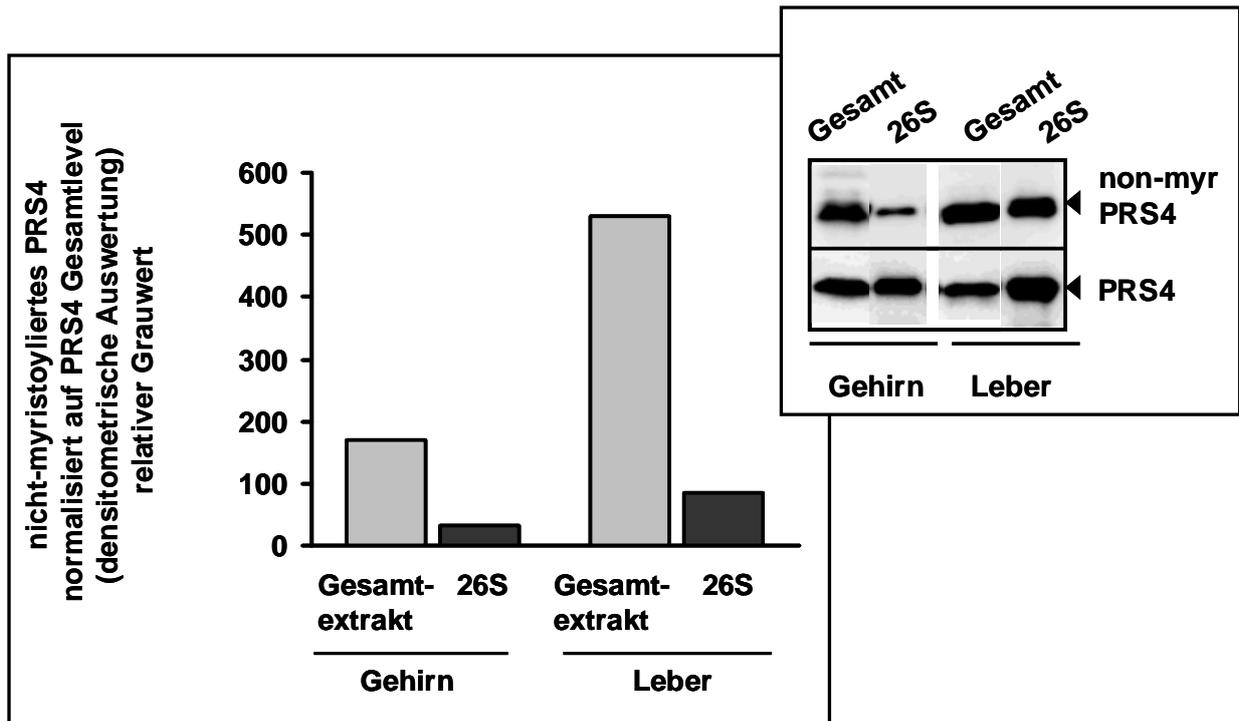


Abbildung 26: Der Anteil an nicht-myristoyliertem PRS4, relativ zu Gesamt-PRS4, ist *in vivo* im 26S Proteasom im Vergleich zum Gesamtzellextrakt verringert.

Proteinmenge von PRS4 und nicht-myristoyliertem PRS4 wurden in Gesamtzellextrakt und gepoolten Fraktionen des aufgereinigten 26S Proteasoms durch spezifische Antikörper im Western-Blot bestimmt. Densitometrische Quantifizierung erfolgte durch Image J Software. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot von zwei unabhängigen Experimenten mit ähnlichem Ergebnis.

Beim Vergleich der Mengen von nicht-myristoyliertem PRS4 im Gesamtzellextrakt aus Leber und Gehirn mit aufgereinigtem 26S Proteasom zeigt sich, dass in beiden Gewebetypen die Menge an nicht-myristoyliertem PRS4, relativ zur Gesamtmenge, im 26S Proteasom stark abgereichert ist. *In vivo* scheint die myristoylierte Form von PRS4 präferentiell in das 26S Proteasom integriert zu werden.

3.9.3 Proteolytische Aktivität des 26S Proteasoms

Da das nicht-myristoylierte PRS4 in das 26S Proteasom integriert wird und auch die differentielle Myristoylierung von PRS4 im 26S Proteasom nachweisbar ist, sollte untersucht werden inwieweit sich ein durch TCDD bzw. 2-OH-Myristat beeinflusster Myristoylierungsstatus auf die Aktivität des 26S Proteasoms auswirkt. Es werden drei voneinander unterschiedliche proteasomale Peptidaseaktivitäten unterschieden, die sog. *Trypsin-like*, *Chemotrypsin-like* und *Caspase-like* Aktivität. Die eigentliche proteolytische Aktivität geht dabei von den 20S Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 3$ und $\beta 5$ aus. In *in vitro* Experimenten kann demnach auch nur die proteolytische Aktivität des 20S-Komplexes gemessen werden. Diese bedarf jedoch der Aktivierung entweder durch den 19S Aktivator-Komplex in Anwesenheit von ATP (= Messung von 26S) oder die Anwesenheit von geringen Mengen SDS (=Messung von 20S auch ohne 19S Aktivator).

5L-Zellen wurden mit TCDD oder 2-OH-Myristat bzw. DMSO als Kontrolle behandelt. Messung der proteolytischen Aktivität zeigt, dass sowohl durch TCDD als auch 2-OH-Myristat die *Caspase-like* Aktivität um ca. 20 % erhöht wird. Dagegen ist die *Chemotrypsin-* bzw. *Trypsin-like* Aktivität durch TCDD leicht induziert und unwesentlich durch 2-OH-Myristat.

Obwohl TCDD und auch 2-OH-Myristat den Myristoylierungsstatus von PRS4 in 5L-Zellen beeinflussen können, hat diese Veränderung nur einen sehr geringen Einfluss auf die verschiedenen, *in vitro* messbaren, Peptidase-Aktivitäten des 26S Proteasoms. Zwar ist eine leichte Induktion aller Proteolyseaktivitäten durch TCDD zu beobachten. Wenn dies aber auf den veränderten PRS4-Myristoylierungsstatus zurückgeführt werden kann, müsste sich durch 2-OH-Myristat ein entgegengesetzter Effekt zeigen, was nicht der Fall ist. Damit ist ein Einfluss der PRS4-Myristoylierung auf die *in vitro* mit kleinen Substratpeptiden messbare Aktivität des Proteasoms nicht nachweisbar.

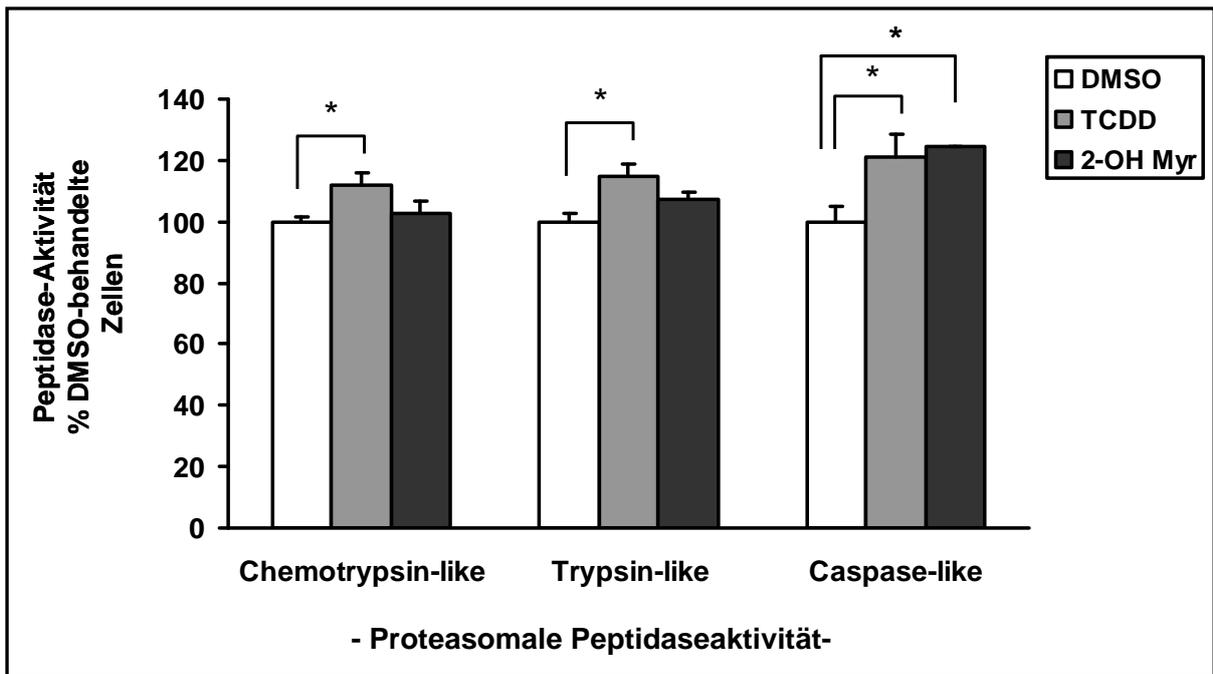


Abbildung 27: Modulation der proteasomalen Peptidaseaktivität durch 2-OH-Myristat und TCDD.

5L-Zellen wurden mit TCDD (1 nM) oder 2-OH-Myristat (300 µM) bzw. mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle für 36 h behandelt. Die proteasomale Peptidaseaktivität wurde pro mg Protein im Zelllysate bestimmt; (je 50 µM/Reaktion des AMC-Substrats wurden eingesetzt). Die angegebenen Werte sind relativ zu DMSO-behandelten Kontrollzellen. Gezeigt sind Mittelwerte von mindestens 3 unabhängigen Experimenten ± Standardfehler; *P<0.05.

4 DISKUSSION

Der Liganden-abhängige Transkriptionsfaktor AHR vermittelt fast alle toxischen Effekte von aromatischen Kohlenwasserstoffen wie beispielsweise Dioxinen. Obwohl der Rezeptor ubiquitär in Säugerzellen exprimiert ist, ist die eigentliche physiologische Funktion derzeit noch nicht eindeutig verstanden. Studien an *Ahr*^{-/-} Mäusen zeigen eine entscheidende Rolle in Dioxin-induzierter Toxizität. In Abwesenheit eines Liganden für den AHR ist darüber hinaus die Entwicklung der Leber in *Ahr*^{-/-} Mäusen gestört (Fernandez-Salguero, 1996), (Schmidt, 1996). Neueste Studien kommen nun zu dem Ergebnis, dass der AHR eine Rolle in der Entwicklung für Autoimmunerkrankungen spielen kann, indem er die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) und proinflammatorischen T-Zellen (speziell TH₁₇) beeinflusst (Quintana, 2008), (Veldhoen, 2008).

Auf der Suche nach Genen, welche für die Dioxin-Toxizität mitverantwortlich sind, konnten Kolluri et al. die *Nmt2* (kodiert für *N*-Myristoyltransferase 2) als ein neues Zielgen des AHR identifizieren, welches in Hepatomazellen und in der Leber der Maus durch TCDD transkriptionell induziert wird (Kolluri, 2001). Unabhängig von TCDD erhöhte NMT-Proteinspiegel und / oder erhöhte Gesamt-NMT-Aktivität wurden auch in humanem Colonkarzinomgewebe im Vergleich zu nicht verändertem Gewebe (Selvakumar, 2006), in Gehirntumoren (Lu, 2005) und auch in PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) sowie im Knochenmark von Colonkarzinompatienten (Lakshmikuttyamma, 2008) gefunden. Während keine dieser Arbeiten zelluläre Konsequenzen der induzierten NMT-Spiegel bzw. der erhöhten NMT-Aktivität beschreibt, konnte Kolluri bereits vermehrten Einbau von ³H-Myristat, in zu diesem Zeitpunkt noch nicht identifizierten Proteinen, als Folge der Behandlung der Zellen mit TCDD beobachteten (Kolluri, 2001).

Auch war nicht klar, ob dies in direktem Zusammenhang mit der Induktion der *Nmt2*-Genexpression steht, oder ob lediglich induzierte Proteinspiegel der myristoylierten Proteine für die verstärkten Signale verantwortlich sind, da eine Identifikation der Zielproteine zum damaligen Zeitpunkt nicht gelang. Wesentliche Aspekte der Arbeit, die diskutiert werden sollen, sind in folgendem Absatz zusammengefasst:

In der hier vorliegenden Arbeit kann zum ersten Mal gezeigt werden, welche Proteine durch TCDD in Hepatozyten-Kultur induzierte Myristoylierung zeigen und dass diese induzierte Myristoylierung direkt von der Induktion von NMT2 abhängt. Mehrere Zielproteine, die vermehrten Einbau von Myristat durch TCDD-Behandlung der Zellen zeigen, wurden identifiziert und es konnte nachgewiesen werden, dass bei einigen dieser Proteine der Grad der Myristoylierung bei gleich bleibender Gesamtproteinmenge induziert ist.

Die Ergebnisse, die bei der Bestimmung enzymkinetischer Parameter ausgewählter Zielproteine der NMT-Enzyme gewonnen wurden, deuten zudem darauf hin, dass die Substrataffinität eines Zielproteins ein Faktor sein könnte, der mitverantwortlich ist, ob ein Protein neben seiner myristoylierten Form auch nicht-myristoyliert in der Zelle vorliegen kann.

Darüber hinaus kann erstmalig für das genauer untersuchte Zielprotein PRS4, eine ATPase des 26S Proteasoms, nachgewiesen werden, dass der Grad der Myristoylierung *in vivo* stark zwischen verschiedenen Geweben (der Maus) variiert und dieser, neben anderen Faktoren, sehr wahrscheinlich von der Gesamt-NMT-Aktivität im entsprechenden Gewebe abhängig ist.

Durch funktionelle Analyse der Myristoylierung von PRS4 konnte nachgewiesen werden, dass diese die subzelluläre Lokalisation von PRS4 beeinflusst und dass die myristoylierte Form, nach den vorliegenden Ergebnissen, präferentiell in den 26S Proteasom-Komplex integriert wird. Dies ist das erste Beispiel für einen konditional regulierten Grad der Myristoylierung, und zwar abhängig von TCDD-Exposition oder vom Gewebetyp.

4.1 Identifikation von Proteinen mit induzierter Myristoylierung

TCDD-induzierbare myristoylierte Proteine konnten von Kolluri et al. 2001 mittels Immunpräzipitationen und 1D-Gelelektrophorese mit Antikörpern gegen Proteine der SRC-Kinase Familie nicht identifiziert werden. Zwar konnte bestätigt werden, dass die Proteine myristoyliert werden, aber deren Myristoylierungsgrad war nicht von TCDD-Vorbehandlung der Zellen abhängig (nicht publizierte Beobachtungen). In der vorliegenden Arbeit wurde ein 2D-Gelelektrophorese Ansatz verwendet, um ³H-Myristat-markierte Proteine zu separieren. Eine Identifikation erfolgte durch anschließende massenspektrometrische Analyse. Fünf Proteine, die in Proteinextrakten aus TCDD-behandelten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen induzierte Myristoylierung zeigten, konnten identifiziert werden. Dazu gehören das Calcium-bindende Protein p22, BID, die G-Protein alpha Untereinheit G_{αi2}, das Niban-like Protein NIBL und PRS4.

Durch Western-Blot-Analyse konnte für BID (Daten nicht gezeigt), G_{αi2} und PRS4 ausgeschlossen werden, dass deren Proteinmenge durch TCDD induziert wird und die verstärkten Myristoylierungssignale im 2D-Autoradiogramm nur auf erhöhte Mengen der jeweiligen Proteine hinweisen. Zusätzlich zeigten *real-time* PCR Analysen, dass die Gene *p22*, *Bid*, *Gnai2* (kodiert für G_{αi2}) und *Psmc1* (kodiert für PRS4) transkriptionell nicht durch TCDD induziert werden. Für p22 kann dies erst überprüft werden, wenn ein entsprechender Antikörper zur Verfügung steht. Im Gegensatz dazu zeigen die *real-time* PCR Ergebnisse

eine starke Induktion der mRNA für *Nib1*, die sich sehr wahrscheinlich auch auf Proteinebene wieder fände. In diesem Fall ist zu vermuten, dass das induzierte Myristoylierungssignal eine Folge induzierter Proteinspiegel ist.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es in 5L-Zellen einige myristoylierte Proteine gibt, u. a. die hier identifizierten, deren Myristoylierungsstatus durch TCDD induzierbar ist, während er bei anderen Proteinen unbeeinflusst bleibt. Da die Myristoylierung als kovalente und irreversible *N*-terminale Modifikation gilt, ist zu postulieren, dass diese Zielproteine sowohl in myristoylierter als auch nicht-myristoylierter Form in der Zelle vorliegen. In der Literatur sind dazu nur wenige Beispiele diskutiert. So konnten Dohlman et al. die Koexistenz von myristoyliertem und nicht-myristoyliertem *Gpa1p*, dem Homologen zu *Gnai2*, in *S. Cerevisiae*, nachweisen (Dohlman, 1993). Darüber hinaus ist ein nicht-myristoylierter Pool des MARCKS-Proteins im Gehirn der Ratte und des Rinds beschrieben (Manenti, 1993), (McIlhinney and McGlone, 1990b). Manenti et al. konnten zudem eine Demyristoylase-Aktivität in Synaptosomen aus dem Gehirn des Rinds nachweisen. *In vitro* demyristoyliertes MARCKS-Protein konnte durch NMT auch wieder remyristoyliert werden (Manenti, 1994), wobei nicht gezeigt wurde ob dieser Mechanismus auch *in vivo* eine Rolle spielt. Bisher erscheint dies als ein sehr spezieller Mechanismus für das aus Gehirn isolierte MARCKS-Protein, da keine Berichte für andere Proteine oder andere Gewebe vorliegen, die durch die aus Synaptosomen gefundene Demyristoylase-Aktivität demyristoyliert werden können.

Über die Abhängigkeit des Grades der Myristoylierung verschiedener Proteine vom Zelltyp oder von extrazellulären Signalen in höheren Organismen wurde bisher nichts berichtet. Lediglich eine Studie wurde unternommen, in der die myristoylierte Form der G-Protein α -Untereinheit (*Gpa1p* Genprodukt) in *S. cerevisiae* durch Behandlung der Zellen mit Pheromon α -Faktor stetig zunimmt, während die Menge an nicht-myristoylierter Form abnimmt (Dohlman, 1993).

Damit ist PRS4 das erste Beispiel für ein Protein in höheren Organismen, dessen Grad der Myristoylierung nachweislich konditionell und abhängig vom Gewebetyp reguliert wird.

4.2 Induzierte Myristoylierung ist abhängig von Induktion der NMT-Aktivität

Um die Hypothese zu beweisen, dass die bereits früher festgestellte Induktion von *Nmt2* durch TCDD den Grund für die induzierte Myristoylierung einiger Zielproteine darstellt, wurden mehrere Strategien verfolgt. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sowohl durch Inhibition der Gesamt-NMT-Aktivität mittels 2-OH-Myristat als auch nach *knockdown*

von *Nmt2* mittels RNAi, die Myristoylierung der identifizierten Zielproteine in 5L-Zellen nicht mehr durch TCDD induzierbar ist.

Der in Markierungsexperimenten festgestellte induzierte Einbau von ³H-Myristat konnte durch Western-Blot-Analyse mit einem speziell generierten Antikörper gegen nicht-myristoyliertes PRS4 bestätigt werden. Dies zeigt, dass der Myristoylierungsstatus von PRS4 durch TCDD induziert wird und dass keine Steigerung im Proteinumsatz von PRS4 bzw. im Umsatz der markierten Myristinsäure stattfindet.

In verschiedenen Systemen gibt es Hinweise auf zelltypspezifische Unterschiede in NMT-Expression und -Aktivität. Vor allem die Gruppe um R. K. Sharma hat in vielen Publikationen zeigen können, dass in verschiedenen humanen Tumoren die NMT-Aktivität oder die Proteinspiegel der NMTs erhöht sind (Lakshmikuttyamma, 2008), (Shrivastav, 2007), (Selvakumar, 2006), (Lu, 2005). Dabei wurde aber von dieser Gruppe keine Korrelation zu Veränderungen im Grad der Myristoylierung von Substratproteinen der NMTs gezeigt.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigen, dass TCDD nicht nur in Zellkultur sondern auch in der Leber der Maus den Grad der Myristoylierung von PRS4 beeinflusst. Das hängt mit hoher Wahrscheinlichkeit auch von der Induktion der NMT-Aktivität ab, da Kolluri et al. die Induktion von *Nmt2* in TCDD-behandelten Mäusen zeigen konnte und auch Boutin et al. erhöhte NMT-Aktivität in Lebern von , mit 3-MC-behandelten Ratten, feststellte (Boutin, 1997).

Aus der Literatur sind Hinweise bekannt, dass die NMT-Aktivität zwischen verschiedenen Geweben stark variiert. Mit Hilfe unseres Myristoylierungs-sensitiven Antikörpers wurde überprüft, ob entsprechend den Ergebnissen aus TCDD-behandelten 5L-Zellen und Mäuselebern, der Myristoylierungsstatus von PRS4 mit der Gesamt-NMT-Aktivität der entsprechenden Gewebe korreliert. Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse verschiedener Organe der Maus zeigen, dass in Leber und Niere große Mengen an nicht-myristoyliertem PRS4 nachgewiesen werden können, während sich in Lysaten von Milz, Thymus oder Mucosa aus Colon oder Dünndarm, nur geringe Mengen und im Gehirn kaum nicht-myristoyliertes PRS4 relativ zur Gesamtmenge an PRS4-Protein nachweisen lässt. Vergleicht man diese Ergebnisse mit publizierten Untersuchungen zur NMT-Aktivität in verschiedenen Geweben, so findet man eine deutliche Korrelation zwischen niedriger NMT-Aktivität und hohen Spiegeln an nicht-myristoyliertem PRS4. Drei unabhängige Studien zeigen, dass sich im Gehirn von Ratten die höchste NMT-Aktivität findet, wobei in anderen Organen wie Niere, Milz oder Herz nur moderate bis niedrige NMT-Aktivität nachweisbar ist. Von allen Organen zeigt die Leber übereinstimmend eine niedrige bzw. kaum messbare Aktivität (*Abbildung 28*) (McIlhinney and McGlone, 1990a), (Raju, 1997a), (Glover, 1988). Einzig für die Niere trifft die Korrelation der publizierten NMT-Aktivität und dem

Myristoylierungsstatus von PRS4 nicht genau zu. Für PRS4 wurden hier in der Niere ähnliche Proteinspiegel des nicht-myristoylierten Proteins wie in der Leber nachgewiesen (vgl. *Abbildung 18*). Die berichtete NMT-Aktivität (*Abbildung 28*) ist jedoch im Bereich von Milz oder Darm, für die niedrigere Proteinspiegel des nicht-myristoylierten PRS4 nachgewiesen wurden. Dies könnte eine Ursache in einer sehr ungleichen Verteilung der NMT-Aktivität auf verschiedene Zelltypen der Niere haben.

In der vorliegenden Arbeit kann zum ersten Mal in Zellen und Geweben bzw. Gewebeschnitten (Daten nicht gezeigt) gezeigt werden, dass eine veränderte zelluläre NMT-Aktivität mit einem veränderten Myristoylierungsstatus von PRS4 korreliert und diesen wahrscheinlich auch verursacht. Dies trifft nach vorliegender Datenlage vermutlich auch auf andere Zielproteine zu. Damit liegt die Vermutung nahe, dass auch eine veränderte NMT-Aktivität in Tumoren einen veränderten Myristoylierungsstatus zur Folge hat. Dies wäre in der Zukunft durch den Myristoylierungs-sensitiven Antikörper überprüfbar.

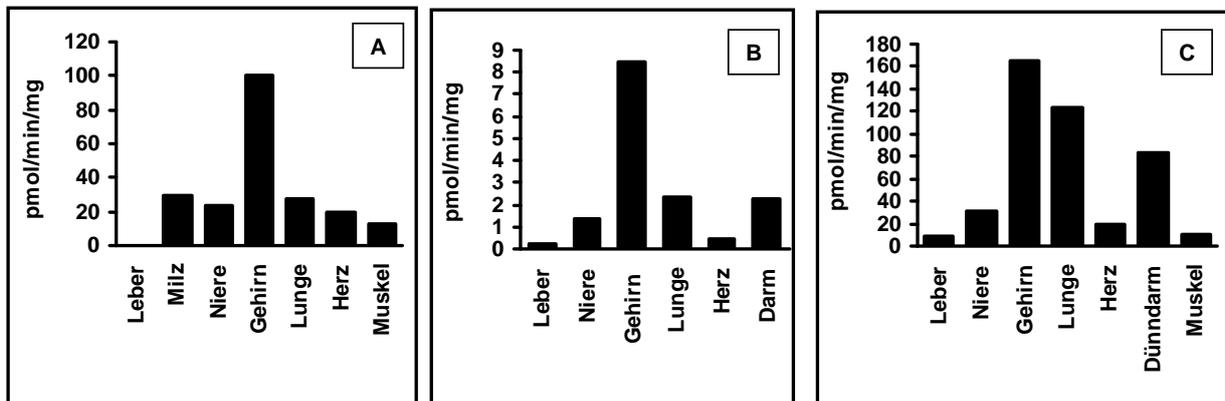


Abbildung 28: Gesamt-NMT-Aktivität in verschiedenen Geweben aus Kuh und Ratte

NMT-Aktivität wurde in bovinem Gewebe mit Peptid der cAMP-abhängigen Protein Kinase, GNAAAAKKRR **A** (Raju, 1997a), bzw. verschiedenen Geweben der Ratte mit vSRC Peptid, GSSKSKPKDPSQRRRY (McIlhinney and McGlone, 1990a) **B**, oder mit vSRC Peptid, GSSKSKPKDPSQRRR¹²⁵I]Y **C** (Glover, 1988) bestimmt.

Die Bestimmung von Gesamt-NMT-Aktivität oder Myristoylierungsstatus von Substratproteinen erscheint notwendig und nicht durch die Bestimmung der NMT-Spiegel ersetzbar, weil die Korrelation zwischen NMT-Menge und NMT-Aktivität schlecht ist. Rioux et al. konnten zum einen zeigen, dass die Expressionsniveaus der *Nmt* mRNA nicht zwangsläufig mit den gefundenen Proteinspiegeln korrelieren (Rioux, 2006). Darüber hinaus ist auch eine Korrelation der NMT-Proteinspiegel mit diskutierten Gesamt-NMT-Aktivitäten bestimmter Gewebe nicht einfach möglich, wie Rajala et al. zeigen konnten (Rajala, 2000a). Da auch die hier gefundenen Proteinspiegel der NMT1 und NMT2 nicht mit dem jeweils publizierten gewebespezifischen Myristoylierungsstatus von PRS4 korrelieren, scheint es

zusätzliche Regulationsmechanismen zu geben, die die zelluläre NMT-Aktivität modulieren können.

Hier ist ein bekannter Faktor das NMT-Inhibitor-Protein HSC70 (NIP71), das in der Lage ist beide Isoformen der *N*-Myristoyltransferasen dosisabhängig zu inhibieren. Durch Western-Blot-Analyse konnten jedoch keine entscheidenden Unterschiede in HSC70 Proteinspiegeln festgestellt werden. Weder scheint TCDD die HSC70-Spiegel (Daten nicht gezeigt) zu beeinflussen, noch zeigen die verschiedenen Organe deutliche Unterschiede in der Menge an HSC70, die die publizierten NMT-Aktivitäten (*Abbildung 28*) und die hier gezeigten Unterschiede im Myristoylierungsstatus von PRS4 erklären würden. Es muss spekuliert werden, ob evtl. weitere unbekannte Inhibitoren oder Aktivatoren differentiell in verschiedenen Geweben exprimiert werden oder subzelluläre Lokalisation der NMT-Enzyme bzw. Gewebetyp-abhängige differentielle Interaktion der NMT-Enzyme mit verschiedenen Proteinen die NMT-Aktivität beeinflussen. Es ist bekannt, dass NMT1 und NMT2 u.a. in HT29-Zellen mit p53 interagieren können (gezeigt durch Coimmunpräzipitation), während aber nur NMT1 mit mCalpain und nur NMT2 mit BCL2 und Caspase-3 immunpräzipitiert werden konnten (Selvakumar, 2006). Dies ist ein Hinweis auf unterschiedliche Interaktionspartner, die evtl. auch gewebeabhängig unterschiedlich sein können. Vermutlich ist ein Zusammenspiel vieler dieser Faktoren verantwortlich, wie hoch die Gesamt-NMT-Aktivität in der Zelle bzw. in einem bestimmten Gewebe ist, was jedoch abschließend nicht geklärt werden kann.

4.3 Die Familie der N-Myristoyltransferasen und Analyse der Kinetikparameter ausgewählter Substrate

In den publizierten Vorarbeiten und in dieser Arbeit fällt auf, dass lediglich eine kleine Anzahl an Proteinen in ihrem Myristoylierungsstatus verändert wird, während die meisten anderen myristoylierten Proteine unverändert bleiben. Gründe dafür sind nicht bekannt. Eine Hypothese ist, dass eben diese induzierbar myristoylierten Zielproteine eine höhere Substratspezifität gegenüber NMT2 als gegenüber NMT1 zeigen, da in 5L-Zellen lediglich *Nmt2* und nicht *Nmt1* durch TCDD induziert wird.

Die meisten Erkenntnisse im Hinblick auf Substratspezifität, Mechanismus und Struktur stammen aus Untersuchungen der NMT aus *S. cerevisiae* durch die Gruppe von J. Gordon (Johnson, 1994a) (vgl. 1.3). Während die Gene für humane und bovine *Nmt1* in unterschiedlichen Studien kloniert, rekombinant exprimiert und die Enzyme charakterisiert wurden (Raju, 1997a), (King and Sharma, 1991), (Glover, 1997), gibt es für NMT2 nur wenige Beispiele. Als Giang und Cravatt das Isoenzym NMT2 beschrieben, beschränkten sich die Analysen auf Überexpressions-Experimente der humanen *Nmt1* und *Nmt2* in

COS7-Zellen. Aus ihren Ergebnissen folgerten die Autoren, dass NMT2 das schwächere beider Isoenzyme sei (Giang and Cravatt, 1998). Dabei sei einschränkend erwähnt, dass dort lediglich drei verschiedene Substratpeptide für die Untersuchungen verwendet wurden. Sowohl die hier vorliegenden Daten als auch Studien von Pierre et al. (Pierre, 2007) zeigen, dass deutliche Unterschiede sowohl in der Effizienz der Myristoylierungsreaktion als auch in der Substrataffinität zwischen NMT1 und NMT2 bestehen können.

Die Überlegungen für diese Arbeit gingen von der Hypothese aus, dass verschiedene NMT-Enzyme unterschiedlich effizient gegenüber verschiedenen Substraten sind.

Aus 5L-Zellen konnten in der vorliegenden Arbeit die Gene *Nmt1* sowie *Nmt2* (*Nmt2l*), sowie eine um 93 Bp verkürzte Variante *Nmt2s* kloniert werden. Sequenzierung und *in silico* Translation der isolierten Klone zeigten 100 %ige Übereinstimmung der NMT1 mit der aus der Swiss-Prot Datenbank bekannten Aminosäure-Sequenz (Q8K1Q0) (vgl. *Abbildung 6* dbNMT1). Die gefundenen und klonierten NMT2-Varianten *Nmt2l* sowie *Nmt2s* weisen dagegen in drei Aminosäure-Positionen Unterschiede im Vergleich zur Datenbank (DB) Version (Q700Q7) auf: L12Q, R41G, E256V (jeweils DB vs. diese Arbeit). Ein Vergleich der NMT2L der Ratte mit NMT2 von Maus und Mensch zeigt jedoch, dass an diesen Positionen keine Unterschiede bestehen (siehe *Abbildung 6*). Dies könnte einerseits fehlerhafte Datenbankeinträge für die Sequenz aus der Ratte anzeigen, andererseits könnte es sich auch um einen Polymorphismus zwischen verschiedenen Rattenstämmen und davon abgeleiteten Zelllinien handeln.

Neben der *Nmt2l* wurde die verkürzte Variante *Nmt2s* in 5L-Zellen gefunden. Interessant ist, dass die Deletion von 31 Aminosäuren (Pos. 81-112) in NMT2S gegenüber NMT2L sich exakt an der Position befindet, an der in der humanen NMT2 ebenfalls 31 Aminosäuren im Vergleich zur bekannten NMT2 der Ratte fehlen. NMT2L der Ratte hat somit eine Sequenzhomologie von 90 % zur humanen NMT2 während NMT2S der Ratte 96 % Homologie gegenüber der humanen NMT2 aufweist. Demgegenüber findet sich beim Vergleich von NMT2 der Maus mit NMT2L der Ratte 99 % und mit NMT2S der Ratte nur 93 % Sequenzhomologie. Daten (nicht gezeigt) aus unserem Labor deuten daraufhin, dass die Deletion von 31 Aminosäuren nahe des *N*-Terminus im Hinblick auf subzelluläre Lokalisation nicht von Bedeutung ist.

Bei den Untersuchungen zur Substratspezifität der NMT-Isoformen konnte neben NMT1 nur die NMT2S aber nicht die NMT2L in ausreichender Menge rekombinant aus *E. coli* isoliert und für kinetische Analysen verwendet werden. Die Hypothese, dass eine differentielle Substratspezifität der NMT-Isoformen mit ursächlich dafür ist, welche Proteine in ihrem Myristoylierungsstatus induzierbar sind, konnte nur im Vergleich von NMT1 mit NMT2S durchgeführt werden.

Für das bei kinetischen Untersuchungen der NMT standardmäßig eingesetzte Peptid des vSRC *N*-Terminus wurde ein K_M -Wert von 114 μM für NMT1 bzw. 66 μM für NMT2S gefunden. Aus der Literatur sind für vSRC mit aufgereinigter NMT aus Rattengehirn 20 μM (McIlhinney and McGlone, 1989) bzw. 60 μM (Glover, 1988), für Rattenleber 19 μM (Towler, 1988a) und 40 μM für rekombinante humane NMT1 (Rocque, 1993) beschrieben, wobei diese Untersuchungen vor der Identifizierung der NMT2-Isoformen durchgeführt wurden. Somit sind diese Werte der aus Gewebe aufgereinigten NMTs wohl ein kombinierter Wert aus NMT1- und NMT2-Aktivität. Zusätzlich kann nicht ausgeschlossen werden kann, dass durch die rekombinante Expression in *E. coli* posttranslationale Modifikationen fehlen, die für die NMT-Aktivität wichtig sein könnten. Hinzu kommt, dass die deutlich häufiger eingesetzte Methode zur Bestimmung der Kinetikparameter von NMT-Substraten von King et al. (King and Sharma, 1991) im Vergleich zur hier verwendeten PDH-gekoppelten Reaktion etwa 50-70 % niedrigere Werte für K_M liefert (Boisson and Meinel, 2003). Die so angeglichenen K_M -Werte für vSRC würden also $\sim 57 \mu\text{M}$ (NMT1) bzw. $\sim 33 \mu\text{M}$ (NMT2S) betragen, was im Bereich der Literaturwerte liegt. Zusätzlich zeigt der Vergleich der V_{\max} -Werte von vSRC mit humaner NMT1 und NMT2 aus transfizierten COS7-Zellen, dass vSRC durch NMT2 etwas besser myristoyliert wird als durch NMT1 (Giang and Cravatt, 1998). Somit ist anzunehmen, dass zur Abklärung der differentiellen Substratspezifität relativ zuverlässige Werte für die verschiedenen Substrate bestimmt wurden.

Die für das MARCKS-Protein ermittelten K_M -Werte von 11 μM (NMT1) bzw. 3.2 μM (NMT2S) waren die niedrigsten aller untersuchten Substratpeptide. Raju et al. fanden für das humane MARCKS 50 μM mit NMT aus boviner Milz (Raju, 1994). Jedoch unterscheidet sich die dort verwendete Aminosäuresequenz von der des MARCKS aus Ratte (P30009) in den Positionen 9 und 10 (GAQFSKTAAK vs. GAQFSKTARR) (Raju, 1994). Wie groß allerdings der Einfluss dieser Aminosäuren auf die Substrataffinität ist, ist schwer zu beurteilen. Aus *S. cerevisiae* weiß man, dass sich generell kürzere Substrate weniger affin zeigen als längere. Diese Unterschiede betreffen jedoch Peptide mit einer Länge von sechs Aminosäuren vs. acht Aminosäuren, wobei der Unterschied im K_M -Wert aber mehr als eine Größenordnung betragen kann (Towler, 1987).

Die effizienteste und auch eine der schnellsten Myristoylierungsreaktionen wurde bei tBID beobachtet. Dies erscheint für die Funktion von tBID während der Apoptose wichtig; wird BID zu tBID gespalten, muss die Signalweiterleitung rasch erfolgen. Eine effiziente Myristoylierung ist hierfür also notwendig.

Die induziert myristoylierten Proteine $G_{\alpha i2}$ (K_M : 767 μM (NMT1), 1370 μM (NMT2S) und PRS4 (K_M : 352 μM (NMT1), 461 μM (NMT2S) haben im Vergleich zu vSRC deutlich höhere K_M -Werte. Zusätzlich liegt der relative V_{\max}/K_M für PRS4 bei 46 (NMT1) bzw. 31 (NMT2S) und für $G_{\alpha i2}$ bei 29 (NMT1) bzw. 7 (NMT2S). Dieser Wert beschreibt die Effizienz mit der ein

Enzym ein Substrat umsetzt, relativ zu vSRC (dessen V_{max}/K_M auf 100 festgesetzt wird). Für PRS4 liegen keine direkten Vergleichsdaten vor. Jedoch untersuchten Boisson et al. das Myristoylom von *A. thaliana* und ermittelten für das Homologe RPT2 einen K_M -Wert von 900 μM (Boisson, 2003). Dieser ist im Vergleich mit anderen Substraten der NMT1 aus *A. thaliana* relativ hoch. Dies ist auch für das $G_{\alpha i2}$ der Fall. Für $G_{\alpha i2}$ der Ratte wurde ein K_M -Wert von 290 μM (mit NMT aufgereinigt aus Rattenleber) (Towler, 1988a), für das Homologe GPA1 aus *A. thaliana* ein K_M -Wert von 500 μM (Pierre, 2007) und für GPA1P in *S. cerevisiae* ein K_M -Wert von 2100 μM (Johnson, 1994b) bzw. 1100 μM (Duronio, 1991) ermittelt.

Basierend auf den ermittelten Enzymparametern sind mögliche Erklärungen für die induzierbare Myristoylierung der identifizierten Proteine: eine geringe zelluläre NMT-Aktivität in Hepatozyten wird durch TCDD-induzierte NMT2-Proteinspiegel signifikant gesteigert. Schlechte Substrate mit hohen K_M - und niedrigen V_{max}/K_M -Werten können in Gegenwart geringer NMT-Aktivität unmyristoyliert in der Zelle vorliegen und werden durch gesteigerte Aktivität, wie hier durch NMT2 Induktion, (re-)myristoyliert.

Dies träfe besonders auf das sehr schlechte Substrat $G_{\alpha i2}$ zu. Das Homologe in *S. cerevisiae* (GPA1P) konnte durch Dohlman et al. bereits in nicht-myristoylierter Form in der Zelle nachgewiesen werden.

Bei PRS4 kommt zusätzlich zu einem niedrigen V_{max}/K_M -Wert die Möglichkeit einer Translokation der nicht-myristoylierten Form in den Nukleus (s.u.) in Betracht. Bis auf wenige Ausnahmen, wie beispielsweise nach kardialer Ischämie (Sharma, 2004), wurden NMTs nie im Nukleus nachgewiesen, was ein im Zellkern lokalisiertes nicht-myristoyliertes PRS4 vor posttranslationaler Myristoylierung schützen würde. Evtl. wird auch durch TCDD ein Export begünstigt, der in Kombination mit erhöhten NMT2-Spiegeln für die Myristoylierung der nicht-myristoylierten PRS4 Proteine sorgt.

Das ebenfalls als differentiell myristoyliert identifizierte p22 passt aufgrund seiner Kinetikparameter leider nicht in diese Hypothese. Mit K_M -Werten von 114 μM bzw. 78 μM für NMT1 und NMT2S sowie V_{max}/K_M -Werten von über 200 stellt es ein sehr affines und effizient myristoyliertes Substrat dar. Da aber bekannt ist, dass TCDD einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels in vielen Zelltypen verursacht (Monteiro, 2008), wäre vorstellbar, dass nicht-myristoyliertes p22 nach Translation gefaltet wird, und durch das Vorhandensein eines *Calcium-Myristoyl-Switches* der *N*-Terminus für posttranslationale Myristoylierung nicht mehr zugänglich ist. Eine sehr geringe NMT-Aktivität könnte hier auch die Bildung eines nicht-myristoylierten Pools an p22-Protein beeinflussen. Durch TCDD induzierte NMT2- und Ca^{2+} -Spiegel könnte ein nicht-myristoylierter *N*-Terminus von p22 zugänglich gemacht und anschließend myristoyliert werden. Dies ist jedoch vermutlich nur ein Teil der Erklärung, so dass weitere Mechanismen, wie zum Beispiel die in Ausnahmen

beschriebene Demyristoylierung eine Erklärung geben könnte, warum ein Zielprotein auch in nicht-myristoylierter Form in der Zelle vorliegen kann.

4.4 Konsequenzen induzierter Myristoylierung

Welche zellulären oder molekularen Konsequenzen sich aus einem induzierten Myristoylierungsstatus ergeben kann soll im Folgenden diskutiert werden. Dabei sind die Proteine BID und NIBL grundsätzlich von p22, G_{αi2} und PRS4 zu unterscheiden.

4.4.1 BID

BID selbst hat als komplexes Protein kein *N*-terminales Myristoylierungsmotiv. Es kann jedoch bei Induktion von Apoptose in einer Zelle durch Caspase-3 in zwei Fragmente P7 und P15 (tBID) proteolytisch gespalten werden, wobei ein Myristoylierungsmotiv am *N*-Terminus von P15 entsteht. Zha et al. konnten zeigen, dass diese Myristoylierung essentiell für die Translokation von tBID zur äußeren Mitochondrienmembran und für den weiteren Ablauf der Apoptose ist (Zha, 2000).

BID konnte in nur einer Probe als induzierbar myristoyliertes Protein identifiziert werden. Dies ist möglicherweise auf ein frühes Einsetzen von Apoptose in dieser einen Probe zurückzuführen. Da nur tBID myristoyliert werden kann und BID selbst nicht, unterscheidet sich dies im Mechanismus von den anderen identifizierten Proteinen mit induziertem Myristoylierungsstatus.

4.4.2 NIBL

Im Gegensatz zu tBID war für NIBL eine *N*-Myristoylierung nicht bekannt. NIBL konnte aus cDNA von 5L-Zellen kloniert und sequenziert werden. Durch PCR eingeführte G2A Mutation des *N*-Terminus und *in vivo* Markierungsexperimente mit ³H-Myristinsäure konnte gezeigt werden, dass NIBL ein Zielprotein der NMT ist, da die Myristoylierung exklusiv am *N*-terminalen Glycin stattfindet.

NIBL mRNA wird durch TCDD stark induziert, was vermuten lässt, dass auch das NIBL Protein unter TCDD vermehrt gebildet wird. Dies legt nahe, dass die gesteigerte Myristoylierung ebenfalls keine induzierte Myristoylierung ist, sondern lediglich auf insgesamt induzierte Proteinspiegel zurückzuführen ist.

Ob die Proteininduktion von NIBL zelluläre Effekte nach sich zieht, war nicht Gegenstand dieser Arbeit. Es sei jedoch erwähnt, dass sehr wenige Informationen zu NIBL bekannt sind. Ein weiteres Protein der NIBAN-Familie, NIBAN, wurde in erhöhten Spiegeln in renalen

Tumoren gefunden, wobei auch für dieses Protein bis jetzt keine spezifische Funktion nachgewiesen wurde (Adachi, 2004). Ob Proteine der NIBAN-Familie eine Rolle bei der Kanzerogenese spielen, ist somit völlig unbekannt. Jedoch könnte NIBL ein interessantes Protein für weiterführende Untersuchungen sein, da hier zum ersten Mal gezeigt werden konnte, dass es durch TCDD in 5L-Zellen induzierbar und dazu ein bis jetzt unbekanntes Zielprotein der NMT ist.

Im Gegensatz zu den genannten Substratproteinen ist der Myristoylierungsgrad der Proteine p22, $G_{\alpha i2}$ und PRS4 durch veränderte NMT-Aktivität induzierbar.

4.4.3 p22

p22 oder CHP1 (*calcineurin homologous protein 1*) ist ein Mitglied aus der EF-Hand Ca^{2+} -bindenden Proteinfamilie, wie auch Recoverin oder VILIP-1 (Barroso, 1996), das jedoch relativ wenig untersucht ist. Die Gruppe um Barroso konnte zeigen, dass p22 Ca^{2+} - und *N*-Myristoyl-abhängig an Membranen des endoplasmatischen Retikulums (ER) bindet. Zusätzlich kann p22 Ca^{2+} -unabhängig, aber *N*-Myristoyl-abhängig an Mikrotubuli binden, wobei myristoyliertes p22 die Bildung von Geflechten des ER und Mikrotubuli induzieren kann. Die Autoren beobachteten auch, dass eine Inkubation von Zellen mit einem anti-p22 Antikörper zu Depolymerisation der Mikrotubuli und Fragmentation des ER führte. Nicht-myristoyliertes p22 kann demnach weder an ER-Membran noch an Mikrotubuli binden (Barroso, 1996) (Timm, 1999) (Andrade, 2004). Es muss spekuliert werden, ob erhöhte Spiegel von myristoyliertem p22 zu einer zusätzlichen Stabilisation der Mikrotubuli beitragen. Dies kann nicht beantwortet werden und war im Detail nicht Teil der hier vorliegenden Arbeit.

4.4.4 $G_{\alpha i2}$

Dies gilt auch für die alpha-2 Untereinheit (UE) des GTP-bindenden inhibitorischen G-alpha Proteins. Dieses gehört zur Familie der heterotrimeren G-Proteine, die sich in G_{α} , G_{β} und G_{γ} Untereinheiten einteilen lassen. Die Gruppe der G_{α} -UE setzt sich wiederum aus Proteinen verschiedener Unterfamilien wie $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q/11}$, $G_{\alpha 12/13}$ zusammen. G-Proteine sind an verschiedene Rezeptoren, sog. GPCR (*G-protein coupled receptor*) gekoppelt, die durch Ligandenbindung eine Signalkaskade auslösen, in deren Folge sich die G_{α} -UE aus dem $G_{\alpha\beta\gamma}$ Heterotrimer löst und dann in der Lage ist, Adenylatcyclasen (AC; diese katalysieren die Umsetzung von ATP zu cAMP, einem *second messenger*) zu aktivieren ($G_{\alpha s}$) oder zu inhibieren ($G_{\alpha i}$). Beispiele für GPCR sind Adrenalinrezeptoren, Insulinrezeptoren oder auch Glutamatrezeptoren, die sich alle wiederum in verschiedene Untergruppen einteilen lassen.

Die Gruppe um Gilman (Taussig, 1993) konnte zeigen, dass die G_{α} -UE inhibitorisch auf Adenylatcyclasen wirken und dass dazu die Myristoylierung der G_{α} -Proteine notwendig ist. Neben der Myristoylierung werden die G_{α} -UE auch zusätzlich am Cystein 2 palmitoyliert, was die Membranbindung verstärkt. Diese Palmitoylierung ist im Gegensatz zur Myristoylierung reversibel, da es sich meistens um eine S-Acylierung handelt, wogegen die Myristoylierung eine N-Acylierung ist. Die Myristoylierung scheint in diesem Beispiel aber Voraussetzung für eine subsequentielle Palmitoylierung zu sein (Galbiati, 1994; Mumby, 1994). Darüber hinaus scheint die Myristoylierung ausreichend zu sein, das Protein an der Membran lokalisiert zu halten, da eine Depalmitoylierung nicht zum Verlust der Membranbindung führt (Huang, 1999).

Diese differentielle Myristoylierung bzw. die Verschiebung des Verhältnisses von myristoylierter/nicht-myristoylierter Form des $G_{\alpha i2}$ zu Gunsten des myristoylierten $G_{\alpha i2}$ könnte Folgen für die G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion haben. Da wohl nur myristoylierte G-alpha UE auch palmitoyliert wird, ist unmyristoyliertes $G_{\alpha i2}$ wahrscheinlich zytosolisch lokalisiert. Eine Zunahme an myristoyliertem $G_{\alpha i2}$ könnte zu einer verstärkten Kopplung an GPCR führen, was wiederum eine verstärkte Inhibition der Signalkaskade zur Folge hätte. Dafür spricht, dass in älteren Fischer Ratten im Vergleich zu jüngeren Tieren die Expression von $G_{\alpha i2}$ induziert ist, wobei sich das bei Rezeptoraktivierung in einer stärkeren Inhibition auf die Adenylatcyclasen auswirkt (Kilts, 2002). Zusätzlich konnten Rau et al. zeigen, dass eine moderate Überexpression von 150 % von $G_{\alpha i2}$ die GTP-induzierte Aktivierung der Adenylatcyclasen um 39% im Vergleich zur Kontrolle verringern konnte (Rau, 2003).

Wie groß die Bedeutung der Myristoylierung bzw. der induzierten Myristoylierung von $G_{\alpha i2}$ auf die Adenylatcyclasen wirklich ist und ob eine Induktion der Myristoylierung von $G_{\alpha i2}$ mit insgesamt erhöhten Proteinspiegeln von $G_{\alpha i2}$ und so ebenfalls erhöhten Spiegeln an myristoyliertem $G_{\alpha i2}$ vergleichbar ist, kann auch aus der Literatur nicht eindeutig beantwortet werden. Zwar wurde versucht, den Einfluss des NMT-Inhibitors 2-OH-Myristat auf die G-Protein-Signalkaskade zu untersuchen, jedoch wurde kein Effekt festgestellt (Cheng, 2003). Die eingesetzte Konzentration des Inhibitors von 20 μ M dürfte jedoch nach hier gemachter Erfahrung bei weitem nicht ausreichend gewesen sein, die NMT zu inhibieren.

4.4.5 PRS4

Das dritte identifizierte Protein ist das PRS4 (RPT2, *S. cerevisiae*), eine ATPase Untereinheit des 19S Komplexes, der wiederum einen Regulator des 20S Proteasoms darstellt und zusammen mit diesem das 26S Proteasom bildet (Abbildung 29).

Das 26S Proteasom ist ein essentieller Komplex, der für den proteolytischen Abbau fehlgefalteter, defekter und/oder poly-ubiquitinerter (zur Degradation markierter) Proteine

zuständig ist. Obwohl die eigentliche proteolytische Kapazität innerhalb des 20S Komplexes liegt (β -Untereinheiten) (Groll, 1997), bedarf dieser in der Zelle zum Abbau der Proteine der Aktivierung durch den 19S Komplex. Dieser ist v.a. bei der Erkennung ubiquitinerter Proteine und deren Entfaltung von Bedeutung, wobei er gleichzeitig die Öffnung der katalytischen 20S Pore steuert, wie Untersuchungen am 26S Homologen in Archaeobakterien zeigen (Smith, 2005). Gerade bei der 20S Porenöffnung hat die RPT2 Untereinheit eine entscheidende Funktion, wie A. Köhler et al. für Hefe nachweisen konnten (Köhler, 2001). Dabei zeigte sich auch, dass der C-Terminus der ATPase definierte Taschen im 20S blockieren kann und so die 20S Pore zu verschließen vermag. Darüber hinaus ist bekannt, dass PRS4 mit TBP (*TATA binding protein*) (Makino, 1999) und Ataxin7 (Matilla, 2001) sowie in *Drosophila* mit Hairless (Müller, 2006) interagieren kann, was eine zusätzliche Funktion von PRS4 außerhalb des 26S Proteasoms nahe legt. Während dieser Arbeit konnten Gomes et al. durch massenspektrometrische Untersuchungen die Myristoylierung für PRS4 nachweisen (Gomes, 2006), die auch hier durch metabolische Markierung von rekombinantem PRS4 und der Myristoylierungsmutante PRS4(G2A) mit ^3H -Myristinsäure bewiesen wurde.

Die Funktion der Myristoylierung von PRS4 ist bis jetzt noch nicht diskutiert worden. Aufgrund oben genannter Studien könnte vermutet werden, dass PRS4 neben der Funktion als ATPase im 26S Proteasom in anderen zellulären Prozessen involviert ist. Es sollte geklärt werden, in wie weit die Myristoylierung etwa die subzelluläre Lokalisation von PRS4 oder die Aktivität des 26S Proteasoms beeinflussen kann.

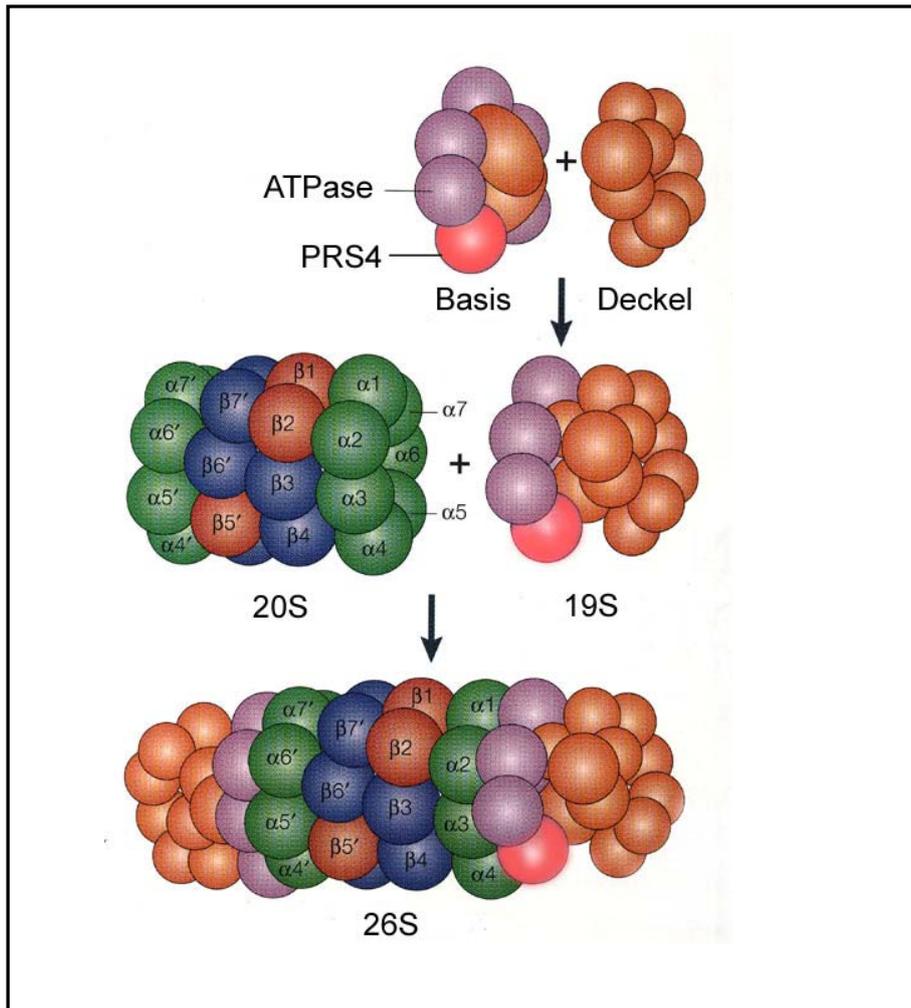


Abbildung 29: Aufbau des 26S Proteasoms

Das 26S Proteasom setzt sich aus einem 20S und zwei 19S Komplexen zusammen. Die beiden 19S Komplexe „verschließen“ den tonnenartigen 20S Komplex von oben und von unten wie ein Deckel. Der 19S Komplex selbst setzt sich aus einer aus sechs ATPasen bestehenden Basis und einem aus nicht-ATPasen bestehenden Deckel zusammen. 19S wird auch „regulatory particle“ bzw. „regulatory complex“ genannt. Rot markiert ist die PRS4 ATPase die zur Basis des 19S Komplexes gehört. (Abbildung aus (Kloetzel, 2001))

Für viele Proteine ist eine Membranlokalisierung durch Myristoylierung bekannt. Jedoch finden sich diese Proteine nach blockierter Myristoylierung fast ausschließlich im Zytosol. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass durch Expression von GFP-markiertem PRS4 bzw. PRS4(G2A) in HEK293-Zellen die Myristoylierung die subzelluläre Lokalisation von PRS4 stark beeinflusst. Während PRS4 stark an der Zellmembran akkumuliert, fand sich durch Mutation der Myristoylierungsmotivs (G2A) oder Inhibition der NMTs mit 2-OH-Myristat, PRS4 vorwiegend im Zellkern und auch zytosolisch. *In silico* Sequenzanalyse der Aminosäuresequenz von PRS4 ergab ein Kern-Lokalisationssignal (NLS; *nuclear localisation*

sequence) von Aminosäure 21-41 [KKKKYEPPVPTRVGKKKKKTK]. Die Kernlokalisierung von RPT2 wurde auch von Wendler et. al in *S. cerevisiae* nachgewiesen (Wendler, 2004). Jedoch scheint die subzelluläre Lokalisation auch vom untersuchten Zelltyp abhängig zu sein. Transiente Transfektion von T7-markiertem PRS4 (T7-PRS4) in MCF7-Zellen führte zur Lokalisation im Zytosol, während das 20S Proteasom nur im Nukleus nachgewiesen wurde. Da in diesem Fall PRS4 mit einem *N*-terminalem T7-Tag exprimiert wurde, sollte dies eine *N*-Myristoylierung verhindern (Barnes, 2005). Diese Studien in MCF7-Zellen stehen somit in klarem Gegensatz zu den hier gemachten Beobachtungen in HEK293-Zellen. Umgekehrt wiederum fanden Mantilla et al. bei Transfektion von COS7-Zellen mit FLAG-markiertem PRS4 (*N*-terminaler FLAG-Tag, verhindert ebenfalls Myristoylierung) dieses ausschließlich im Nukleus lokalisiert (Matilla, 2001) was den Ergebnissen dieser Arbeit entspricht. Ein immunzytochemischer Nachweis von endogenem PRS4 durch Nakagawa et al. fanden in den Zelllinien Hela, COS7 und NIH-3T3 eine partielle Colokalisation von PRS4 mit Mitochondrien, wobei in COS7- und NIH3T3-Zellen der größte Anteil von PRS4 im Nukleus festzustellen war. Dagegen war in Hela-Zellen PRS4 sowohl zytosolisch als auch nukleär lokalisiert. Die deutliche Akkumulation von PRS4 an der Zytoplasmembran ist so bis jetzt nicht beobachtet worden.

In Coimmunpräzipitations-Experimenten mit PRS4-YFP und PRS4(G2A)-YFP in transfizierten HEK293-Zellen konnten keine Unterschiede festgestellt werden, die auf eine differentielle Beteiligung der Myristoylierung bei Protein-Protein-Interaktionen schließen lassen (Daten nicht gezeigt).

Aber obwohl die Myristoylierung die subzelluläre Lokalisation von PRS4 beeinflussen kann, hat die induzierte Myristoylierung auf das 26S Proteasom anscheinend keinen Einfluss. Es konnte durch Aufreinigung des 26S Proteasom-Komplexes aus 5L-Zellen (behandelt mit DMSO oder TCDD) gezeigt werden, dass die festgestellte induzierte Myristoylierung auch im 26S Komplex repräsentiert ist. Messung der proteolytischen Aktivität des 26S Proteasoms aus 5L-Zellen zeigte, dass die unter TCDD Einfluss leicht gesteigerte proteolytische (*Caspase-like*) Aktivität in den mit 2-OH-Myristat behandelten Zellen ebenfalls erhöht ist. Würde die Myristoylierung hier eine definierte Rolle spielen, so hätte sich eine durch TCDD induzierte Aktivität durch 2-OH-Myristat verringern sollen. Allerdings bleibt unsicher, ob durch Messung der proteolytischen Aktivität des 26S Komplexes mit kurzen markierten Substratpeptiden (3-4 Aminosäuren Länge) die eigentliche Rolle des 19S Komplexes, nämlich u.a. Erkennung und Entfaltung ubiquitinerter Proteine, richtig bestimmt werden kann. Somit lässt sich ein eventueller Einfluss der Myristoylierung auf diese Funktionen nicht ganz ausschließen, aber auch nicht bestätigen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen in 5L-Zellen fand sich bei Aufreinigung des 26S aus Gehirn und Leber der Ratte eine Präferenz für die myristoylierte Form von PRS4 beim

Einbau in den 26S Komplex. Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil von nicht-myristoyliertem PRS4 im 26S Proteasom beider Gewebe, im Vergleich mit Gesamtzellextrakten, deutlich verringert ist. Da das 26S Proteasom aber ein hoch stöchiometrisch zusammengesetzter Komplex ist, bleibt fraglich, ob eine Verschiebung des Verhältnisses von myristoyliertem/nicht-myristoyliertem PRS4 die absolute Menge des 26S Proteasoms beeinflussen kann oder ob eine weitere Reduktion an nicht-myristoyliertem PRS4 im 26S Komplex die Aktivität weiter beeinflusst.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur proteolytischen Aktivität des 26S Proteasoms in 5L-Zellen zeigten, dass weder die induzierte Myristoylierung durch TCDD noch die Inhibition der Myristoylierung durch 2-OH-Myristat die verschiedenen untersuchten Aktivitäten deutlich beeinflussen konnte. Evtl. sind Untersuchungen mit vollständigen, ubiquitinierten Proteinen notwendig, um diese Funktion besser klären zu können.

Da PRS4 nicht nur im 26S Proteasom gebunden vorkommt, könnte die subzelluläre Lokalisation von freiem PRS4 evtl. andere Funktionen, wie beispielsweise Regulation von Transkriptionsprozessen beeinflussen.

Müller et al. konnten zeigen, dass Hairless, ein Inhibitor des Notch-Signalwegs, mit PRS4 in *Drosophila* interagieren kann und PRS4 so in der Lage ist, Notch-abhängige Genexpression zu beeinflussen (Muller, 2006). Der Notch-Signalweg ist in höheren eukaryotischen Zellen u.a. für die Zell-Zell Kommunikation verantwortlich.

Bei Reportergergenversuchen wurde festgestellt, dass bei ektopischer Expression von PRS4 der *Hes1*-Promotor zusätzlich stimuliert werden kann (Daten nicht gezeigt). Jedoch waren die Ergebnisse, v.a. die der Kontrollexperimente nicht eindeutig interpretierbar, sodass evtl. Studien über mögliche, bisher unbekannte Interaktionspartner von PRS4 in Säugerzellen durchgeführt werden müssten, um weitere Aussagen machen zu können.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Myristoylierung anscheinend in der Lage ist, die subzelluläre Lokalisation von PRS4 zu beeinflussen. Ob die Myristoylierung von PRS4 die Funktion des 26S Proteasoms bzw. die Substraterkennung des 26S Proteasoms beeinflusst, kann nicht geklärt werden. Auch ist weiterhin unklar, welche Funktion PRS4 außerhalb des 26S Proteasoms hat und ob eine Veränderung des Verhältnisses von myristoylierter zu nicht-myristoylierter Form diese Funktion beeinflussen könnte.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass die Toxizität und Kanzerogenität von Dioxinen fast ausschließlich durch den AHR vermittelt wird. Welche Zielgene bzw. molekularen Mechanismen dem im Einzelnen zu Grunde liegen, ist nach heutigem Wissensstand nicht eindeutig geklärt. Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass in TCDD-behandelten Hepatozyten und auch in verschiedenen humanen Tumoren NMT2 in erhöhten Proteinspiegeln nachgewiesen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit, konnten die Proteine PRS4, $G_{\alpha 2}$ und p22 aus der Hepatomazelllinie 5L identifiziert werden, die NMT2-abhängig induziert myristoyliert werden. Aus den Ergebnissen der Analyse enzymkinetischer Parameter dieser Proteine ergaben sich Hinweise, dass dabei möglicherweise die Substrataffinität dieser Zielproteine eine Rolle spielt.

Durch Identifikation weiterer myristoylierter Proteine, die in ihrem Myristoylierungsstatus nicht induziert sind, könnte diese Hypothese gestützt werden.

Durch die Myristoylierungs-sensitiven Antikörper konnte in Proteinextrakten aus stabilen Zelllinien und aus Geweben der Myristoylierungsstatus von PRS4 relativ zu PRS4-Gesamtproteinspiegeln bestimmt werden. Für die Zukunft wäre es interessant, Gewebeschnitte von Tumoren, in denen NMT2-Proteinspiegel induziert sind, mit diesen Antikörpern immunhistologisch zu untersuchen, um festzustellen ob eine differentielle Myristoylierung von PRS4 in Tumoren, im Vergleich zu unverändertem Gewebe, nachgewiesen werden kann. Dies könnte möglicherweise parallele Mechanismen in der Dioxin-induzierten Kanzerogenese und der Entwicklung von Tumoren im Menschen aufzeigen.

Die funktionelle Analyse der induzierten Myristoylierung von PRS4 konnte bis jetzt keine eindeutigen Ergebnisse liefern. Zwar scheint die Myristoylierung in der Lage zu sein das Protein an die Zytoplasmamembran zu dirigieren, aber ob dies auf molekularer Ebene Konsequenzen hat und wenn ja welche, konnte nicht geklärt werden. Weiterführenden Studien zu Interaktionspartner von PRS4, die möglicherweise spezifisch im Nukleus oder an der Zytoplasmamembran an PRS4 binden bzw. Myristoylierungs-abhängig mit PRS4 interagieren, könnten weiteres Verständnis darüber geben.

Darüber hinaus könnten Studien zur proteasomalen Aktivität mit komplexen markierten und ubiquitinierten Proteinen darüber Aufschluss geben, ob die Myristoylierung von PRS4 bei Substraterkennung und Entfaltung für das 26S Proteasom eine Rolle spielt.

Daneben scheint weiterhin interessant zu sein, die induzierte Myristoylierung von $G_{\alpha i2}$ zu untersuchen. Durch Analyse der Aktivität von GPCRs könnte festgestellt werden, ob sich eine induzierte Myristoylierung von $G_{\alpha i2}$ inhibitorisch auf bestimmte GPCRs auswirkt oder ob $G_{\alpha i2}$ dafür auf Proteinebene induziert werden muss, wie bereits in anderen Studien beschrieben wurde.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Aryl-Hydrokarbon-Rezeptor (AHR) ist ein Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor, der durch Fremdstoffe wie aromatische Kohlenwasserstoffe, Dioxine wie 2,3,7,8,-Tetrachlorodibenzodioxin (TCDD) und natürliche Stoffe wie Aminosäureabbauprodukte oder Pflanzeninhaltsstoffe wie Flavonoide und Indole aktiviert wird. Die Aktivierung des AHRs führt zu einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Reaktionen, die die Induktion von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus, veränderte Zellzyklusprogression und Regulation von Apoptose, Rückbildung des Thymus (Thymusinvolution), Chlorakne und Tumorentstehung umfassen. Die Analyse von AHR-defizienten Mäusen weist darauf hin, dass der AHR für die richtige Entwicklung der Leber und der Haarfolikel sowie für das Immunsystem, das Herz und weitere Organe notwendig ist. Während die Kontrolle der Gene des Fremdstoffmetabolismus durch den AHR molekular gut verstanden ist, sind die Mechanismen der Entstehung der komplexen Phänotypen nach wie vor unzureichend aufgeklärt. Es ist vielfach nicht klar, welche Zielgene durch den AHR reguliert werden müssen, um die komplexen Phänotypen im Immunsystem, der Haut oder bei der Tumorentstehung zu vermitteln.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die funktionelle Relevanz eines neuen TCDD- und AHR-abhängig induzierten Gens und seines Proteinprodukts, der *N*-Myristoyltransferase 2, (NMT2) untersucht.

Die Induktion von NMT2-Proteinspiegeln führt in der Hepatomazelllinie 5L zu einer Induktion des Grades der *N*-terminalen Myristoylierung einer kleinen Gruppe von NMT-Zielproteinen. Zu dieser Gruppe zählen das Calcium-bindende Protein p22, die $G_{\alpha 12}$ -Untereinheit der trimeren G-Proteine und die ATPase PRS4 des 26S Proteasoms, wie durch Markierungsexperimente, 2-dimensionale Gelelektrophorese und darauffolgende massenspektrometrische Analyse nachgewiesen werden konnte. Diese Proteine können offensichtlich in myristoylierter und nicht-myristoylierter Form in der Zelle vorliegen.

Veränderte Mengen an NMT2 bzw. Veränderung der NMT2-Expression verschieben das Verhältnis zwischen myristoylierter und nicht-myristoylierter Form. Durch Antikörper, die entweder präferentiell das nicht-myristoylierte *N*-terminale Epitop von PRS4 oder das PRS4-Gesamtprotein erkennen, konnte nachgewiesen werden, dass TCDD-Behandlung von 5L-Zellen den Anteil an myristoyliertem PRS4 erhöht, ohne dabei die Gesamtmenge von PRS4 zu verändern. Durch pharmakologische Inhibition und RNAi-Experimente konnte auch gezeigt werden, dass die NMT2-Induktion durch TCDD exklusiv für die gesteigerte Myristoylierung der identifizierten Proteine p22, $G_{\alpha 12}$ und PRS4 verantwortlich ist. Durch die

Myristoylierungs-sensitiven Antikörper ließ sich ebenfalls nachweisen, dass die Menge von myristoyliertem PRS4 auch in der Leber Dioxin-behandelter Mäuse induziert wird.

Interessanterweise zeigte ein Vergleich unterschiedlicher Organe von unbehandelten Mäusen, dass der Myristoylierungsstatus von PRS4 stark gewebeabhängig ist und wahrscheinlich mit der gewebespezifischen NMT-Aktivität korreliert.

Die aminoterminalen Peptide von PRS4 und $G_{\alpha i2}$ sind relativ schlechte Substrate für die NMTs, wie enzymkinetische Analysen zeigten, so dass die NMT-Substrat-Affinität einer der Parameter sein kann, der komplett myristoylierte von partiell myristoylierten Substratproteinen unterscheidet.

Ektopische Expression mutierter PRS4 Proteine, sowie Hemmung der NMT-Aktivität, weisen darauf hin, dass PRS4 in unmyristoyliertem Zustand präferentiell im Zellkern und myristoyliertes PRS4 dagegen an der Zytoplasmamembran lokalisiert ist. In den 19S Regulatorkomplex des 26S Proteasoms wird nach bisher vorliegenden Ergebnissen präferentiell die myristoylierte Form integriert.

Die NMT2-abhängige Myristoylierung von PRS4 ist das erste Beispiel in höheren Organismen dafür, dass der Grad der Myristoylierung eines Proteins, je nach Organ unterschiedlich und unter bestimmten Bedingungen durch hormonartig wirkende Substanzen wie TCDD reguliert werden kann. Diese Arbeit weist darauf hin, dass die in bestimmten Tumoren gefundene erhöhte NMT-Aktivität für den Grad der Myristoylierung spezifischer Substratproteine und dadurch möglicherweise für die Kanzerogenese relevant sein kann.

6 Literaturverzeichnis

Adachi H, Majima S, Kon S, Kobayashi T, Kajino K, Mitani H, Hirayama Y, Shiina H, Igawa M and Hino O. (2004) Niban gene is commonly expressed in the renal tumors: a new candidate marker for renal carcinogenesis. *Oncogene*, **23**, 3495-3500.

Adachi J, Mori Y, Matsui S, Takigami H, Fujino J, Kitagawa H, Miller CA, 3rd, Kato T, Saeki K and Matsuda T. (2001) Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J Biol Chem*, **276**, 31475-31478.

Agostinis P, Garmyn M and Van Laethem A. (2007) The Aryl hydrocarbon receptor: an illuminating effector of the UVB response. *Sci STKE*, **2007**, pe49.

Ames JB, Ishima R, Tanaka T, Gordon JI, Stryer L and Ikura M. (1997) Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches. *Nature*, **389**, 198-202.

Andrade J, Zhao H, Titus B, Timm Pearce S and Barroso M. (2004) The EF-hand Ca²⁺-binding protein p22 plays a role in microtubule and endoplasmic reticulum organization and dynamics with distinct Ca²⁺-binding requirements. *Mol Biol Cell*, **15**, 481-496.

Barnes CJ, Li F, Talukder AH and Kumar R. (2005) Growth factor regulation of a 26S proteasomal subunit in breast cancer. *Clin Cancer Res*, **11**, 2868-2874.

Barroso MR, Bernd KK, DeWitt ND, Chang A, Mills K and Sztul ES. (1996) A novel Ca²⁺-binding protein, p22, is required for constitutive membrane traffic. *J Biol Chem*, **271**, 10183-10187.

Bertazzi PA, Consonni D, Bachetti S, Rubagotti M, Baccarelli A, Zocchetti C and Pesatori AC. (2001) Health effects of dioxin exposure: a 20-year mortality study. *Am J Epidemiol*, **153**, 1031-1044.

Beven L, Adenier H, Kichenama R, Homand J, Redeker V, Le Caer JP, Ladant D and Chopineau J. (2001) Ca²⁺-myristoyl switch and membrane binding of chemically acylated neurocalcins. *Biochemistry*, **40**, 8152-8160.

Birnbaum LaA, B. (1997) Effect of dioxin on growth factor and receptor expression in developing palate. *Methods in Developmental Toxicology and Biology* (eds. S. Klug & R. Thil), Blackwell Science, 51-63.

Boisson B, Giglione C and Meinel T. (2003) Unexpected protein families including cell defense components feature in the N-myristoylome of a higher eukaryote. *J Biol Chem*, **278**, 43418-43429.

Boisson B and Meinel T. (2003) A continuous assay of myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase for proteomic analysis. *Anal Biochem*, **322**, 116-123.

Boutin JA. (1997) Myristoylation. *Cell Signal*, **9**, 15-35.

Boutin JA, Ferry G, Ernould AP, Maes P, Remond G and Vincent M. (1993) Myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase activity in cancer cells. Purification and characterization of a cytosolic isoform from the murine leukemia cell line L1210. *Eur J Biochem*, **214**, 853-867.

Brunnberg S, Andersson P, Lindstam M, Paulson I, Poellinger L and Hanberg A. (2006) The constitutively active Ah receptor (CA-Ahr) mouse as a potential model for dioxin exposure--effects in vital organs. *Toxicology*, **224**, 191-201.

Burbach KM, Poland A and Bradfield CA. (1992) Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 8185-8189.

Cheng H, Straub SG and Sharp GW. (2003) Protein acylation in the inhibition of insulin secretion by norepinephrine, somatostatin, galanin, and PGE2. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **285**, E287-294.

Consonni D, Pesatori AC, Zocchetti C, Sindaco R, D'Oro LC, Rubagotti M and Bertazzi PA. (2008) Mortality in a population exposed to dioxin after the Seveso, Italy, accident in 1976: 25 years of follow-up. *Am J Epidemiol*, **167**, 847-858.

Cross FR, Garber EA, Pellman D and Hanafusa H. (1984) A short sequence in the p60src N terminus is required for p60src myristylation and membrane association and for cell transformation. *Mol Cell Biol*, **4**, 1834-1842.

DFG. (2005) *MAK- und BAT-Werte-Liste 2005, Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Mitteilung 41.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Dizhoor AM, Ericsson LH, Johnson RS, Kumar S, Olshevskaya E, Zozulya S, Neubert TA, Stryer L, Hurley JB and Walsh KA. (1992) The NH2 terminus of retinal recoverin is acylated by a small family of fatty acids. *J Biol Chem*, **267**, 16033-16036.

Dohlman HG, Goldsmith P, Spiegel AM and Thorner J. (1993) Pheromone action regulates G-protein alpha-subunit myristoylation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9688-9692.

Ducker CE, Upson JJ, French KJ and Smith CD. (2005) Two N-myristoyltransferase isozymes play unique roles in protein myristoylation, proliferation, and apoptosis. *Mol Cancer Res*, **3**, 463-476.

Duronio RJ, Jackson-Machelski E, Heuckeroth RO, Olins PO, Devine CS, Yonemoto W, Slice LW, Taylor SS and Gordon JI. (1990) Protein N-myristoylation in *Escherichia coli*: reconstitution of a eukaryotic protein modification in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 1506-1510.

Duronio RJ, Rudnick DA, Adams SP, Towler DA and Gordon JI. (1991) Analyzing the substrate specificity of *Saccharomyces cerevisiae* myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase by co-expressing it with mammalian G protein alpha subunits in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **266**, 10498-10504.

Duronio RJ, Towler DA, Heuckeroth RO and Gordon JI. (1989) Disruption of the yeast N-myristoyl transferase gene causes recessive lethality. *Science*, **243**, 796-800.

Dyda F, Klein DC and Hickman AB. (2000) GCN5-related N-acetyltransferases: a structural overview. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **29**, 81-103.

Eisenhaber F, Eisenhaber B, Kubina W, Maurer-Stroh S, Neuberger G, Schneider G and Wildpaner M. (2003) Prediction of lipid posttranslational modifications and localization signals from protein sequences: big-Pi, NMT and PTS1. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3631-3634.

Enan E and Matsumura F. (1996) Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway. *Biochem Pharmacol*, **52**, 1599-1612.

Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM and Gonzalez FJ. (1996) Arylhydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, **140**, 173-179.

Fiedler H. (1996) Sources of PCDD/PCDF and impact on the environment. *Chemosphere*, **32**, 55-64.

Fischer DF, van Dijk R, Sluijs JA, Nair SM, Racchi M, Levelt CN, van Leeuwen FW and Hol EM. (2005) Activation of the Notch pathway in Down syndrome: cross-talk of Notch and APP. *Faseb J*, **19**, 1451-1458.

Franco M, Chardin P, Chabre M and Paris S. (1995) Myristoylation of ADP-ribosylation factor 1 facilitates nucleotide exchange at physiological Mg²⁺ levels. *J Biol Chem*, **270**, 1337-1341.

Fritsche E, Schafer C, Calles C, Bernsmann T, Bernshausen T, Wurm M, Hubenthal U, Cline JE, Hajimiragha H, Schroeder P, Klotz LO, Rannug A, Furst P, Hanenberg H, Abel J and Krutmann J. (2007) Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 8851-8856.

Galbiati F, Guzzi F, Magee AI, Milligan G and Parenti M. (1994) N-terminal fatty acylation of the alpha-subunit of the G-protein Gi1: only the myristoylated protein is a substrate for palmitoylation. *Biochem J*, **303 (Pt 3)**, 697-700.

Garattini S. (1977) TCDD poisoning at Seveso. *Biomedicine*, **26**, 28-29.

Garrett RW and Gasiewicz TA. (2006) The aryl hydrocarbon receptor agonist 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters the circadian rhythms, quiescence, and expression of clock genes in murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Mol Pharmacol*, **69**, 2076-2083.

Geusau A, Abraham K, Geissler K, Sator MO, Stingl G and Tschachler E. (2001) Severe 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) intoxication: clinical and laboratory effects. *Environ Health Perspect*, **109**, 865-869.

Giang DK and Cravatt BF. (1998) A second mammalian N-myristoyltransferase. *J Biol Chem*, **273**, 6595-6598.

Glover CJ and Felsted RL. (1995) Identification and characterization of multiple forms of bovine brain N-myristoyltransferase. *J Biol Chem*, **270**, 23226-23233.

Glover CJ, Goddard C and Felsted RL. (1988) N-myristoylation of p60src. Identification of a myristoyl-CoA:glycylpeptide N-myristoyltransferase in rat tissues. *Biochem J*, **250**, 485-491.

Glover CJ, Hartman KD and Felsted RL. (1997) Human N-myristoyltransferase amino-terminal domain involved in targeting the enzyme to the ribosomal subcellular fraction. *J Biol Chem*, **272**, 28680-28689.

Gomes AV, Zong C, Edmondson RD, Li X, Stefani E, Zhang J, Jones RC, Thyparambil S, Wang GW, Qiao X, Bardag-Gorce F and Ping P. (2006) Mapping the murine cardiac 26S proteasome complexes. *Circ Res*, **99**, 362-371.

Gorg A, Weiss W and Dunn MJ. (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, **4**, 3665-3685.

Gottlicher M, Cikryt P and Wiebel FJ. (1990) Inhibition of growth by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in 5L rat hepatoma cells is associated with the presence of Ah receptor. *Carcinogenesis*, **11**, 2205-2210.

Gottlicher M and Wiebel FJ. (1991) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes unbalanced growth in 5L rat hepatoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, **111**, 496-503.

Groll M, Ditzel L, Lowe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD and Huber R. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, **386**, 463-471.

Hayashi N, Nakagawa C, Ito Y, Takasaki A, Jinbo Y, Yamakawa Y, Titani K, Hashimoto K, Izumi Y and Matsushima N. (2004) Myristoylation-regulated direct interaction between calcium-bound calmodulin and N-terminal region of pp60v-src. *J Mol Biol*, **338**, 169-180.

Helferich WG and Denison MS. (1991) Ultraviolet photoproducts of tryptophan can act as dioxin agonists. *Mol Pharmacol*, **40**, 674-678.

Homberger E, Reggiani G, Sambeth J and Wipf HK. (1979) The Seveso accident: its nature, extent and consequences. *Ann Occup Hyg*, **22**, 327-367.

Huang C, Duncan JA, Gilman AG and Mumby SM. (1999) Persistent membrane association of activated and depalmitoylated G protein alpha subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 412-417.

IARC. (1997) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Polychlorinated Dibenzo-Para-Dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans. Lyon, France, 4-11 February 1997. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, **69**, 1-631.

Jeon MS and Esser C. (2000) The murine IL-2 promoter contains distal regulatory elements responsive to the Ah receptor, a member of the evolutionarily conserved bHLH-PAS transcription factor family. *J Immunol*, **165**, 6975-6983.

Johnson DR, Bhatnagar RS, Knoll LJ and Gordon JI. (1994a) Genetic and biochemical studies of protein N-myristoylation. *Annu Rev Biochem*, **63**, 869-914.

Johnson DR, Cok SJ, Feldmann H and Gordon JI. (1994b) Suppressors of nmt1-181, a conditional lethal allele of the *Saccharomyces cerevisiae* myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase gene, reveal proteins involved in regulating protein N-myristoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 10158-10162.

Jones TL, Simonds WF, Merendino JJ, Jr., Brann MR and Spiegel AM. (1990) Myristoylation of an inhibitory GTP-binding protein alpha subunit is essential for its membrane attachment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 568-572.

Kamps MP, Buss JE and Sefton BM. (1985) Mutation of NH₂-terminal glycine of p60src prevents both myristoylation and morphological transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 4625-4628.

Kassel O, Schneider S, Heilbock C, Litfin M, Gottlicher M and Herrlich P. (2004) A nuclear isoform of the focal adhesion LIM-domain protein Trip6 integrates activating and repressing signals at AP-1- and NF-kappaB-regulated promoters. *Genes Dev*, **18**, 2518-2528.

Kewley RJ, Whitelaw ML and Chapman-Smith A. (2004) The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 189-204.

Kilts JD, Akazawa T, Richardson MD and Kwatra MM. (2002) Age increases cardiac Galpha(i2) expression, resulting in enhanced coupling to G protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, **277**, 31257-31262.

King MJ and Sharma RK. (1991) N-myristoyl transferase assay using phosphocellulose paper binding. *Anal Biochem*, **199**, 149-153.

King MJ and Sharma RK. (1993) Identification, purification and characterization of a membrane-associated N-myristoyltransferase inhibitor protein from bovine brain. *Biochem J*, **291 (Pt 2)**, 635-639.

King MJ and Sharma RK. (1994) Mechanisms of action of NIP71 on N-myristoyltransferase activity. *Mol Cell Biochem*, **141**, 79-86.

Kloetzel PM. (2001) Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 179-187.

Kohler A, Cascio P, Leggett DS, Woo KM, Goldberg AL and Finley D. (2001) The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell*, **7**, 1143-1152.

Kolluri SK, Balduf C, Hofmann M and Gottlicher M. (2001) Novel target genes of the Ah (dioxin) receptor: transcriptional induction of N-myristoyltransferase 2. *Cancer Res*, **61**, 8534-8539.

Kolluri SK, Weiss C, Koff A and Gottlicher M. (1999) p27(Kip1) induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells. *Genes Dev*, **13**, 1742-1753.

Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

Lahvis GP and Bradfield CA. (1998) Ahr null alleles: distinctive or different? *Biochem Pharmacol*, **56**, 781-787.

Lakshmikuttyamma A, Selvakumar P, Tucek J and Sharma RK. (2008) Myristoyltransferase and calcineurin: novel molecular therapeutic target for epilepsy. *Prog Neurobiol*, **84**, 77-84.

Lu Y, Selvakumar P, Ali K, Shrivastav A, Bajaj G, Resch L, Griebel R, Fourney D, Meguro K and Sharma RK. (2005) Expression of N-myristoyltransferase in human brain tumors. *Neurochem Res*, **30**, 9-13.

Magnuson BA, Raju RV, Moyana TN and Sharma RK. (1995) Increased N-myristoyltransferase activity observed in rat and human colonic tumors. *J Natl Cancer Inst*, **87**, 1630-1635.

Makino Y, Yoshida T, Yogosawa S, Tanaka K, Muramatsu M and Tamura TA. (1999) Multiple mammalian proteasomal ATPases, but not proteasome itself, are associated with TATA-binding protein and a novel transcriptional activator, TIP120. *Genes Cells*, **4**, 529-539.

Manenti S, Sorokine O, Van Dorsselaer A and Taniguchi H. (1993) Isolation of the non-myristoylated form of a major substrate of protein kinase C (MARCKS) from bovine brain. *J Biol Chem*, **268**, 6878-6881.

Manenti S, Sorokine O, Van Dorsselaer A and Taniguchi H. (1994) Demyristoylation of the major substrate of protein kinase C (MARCKS) by the cytoplasmic fraction of brain synaptosomes. *J Biol Chem*, **269**, 8309-8313.

Matikainen T, Perez GI, Jurisicova A, Pru JK, Schlezinger JJ, Ryu HY, Laine J, Sakai T, Korsmeyer SJ, Casper RF, Sherr DH and Tilly JL. (2001) Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nat Genet*, **28**, 355-360.

Matilla A, Gorbea C, Einum DD, Townsend J, Michalik A, van Broeckhoven C, Jensen CC, Murphy KJ, Ptacek LJ and Fu YH. (2001) Association of ataxin-7 with the proteasome subunit S4 of the 19S regulatory complex. *Hum Mol Genet*, **10**, 2821-2831.

Matthews J and Gustafsson JA. (2006) Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nucl Recept Signal*, **4**, e016.

Maurer-Stroh S. (2002c) <http://mendel.imp.ac.at/myristate/myrbase/>.

Maurer-Stroh S, Eisenhaber B and Eisenhaber F. (2002a) N-terminal N-myristoylation of proteins: refinement of the sequence motif and its taxon-specific differences. *J Mol Biol*, **317**, 523-540.

Maurer-Stroh S, Eisenhaber B and Eisenhaber F. (2002b) N-terminal N-myristoylation of proteins: prediction of substrate proteins from amino acid sequence. *J Mol Biol*, **317**, 541-557.

Mayer BJ, Ren R, Clark KL and Baltimore D. (1993) A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell*, **73**, 629-630.

McIlhinney RA and McGlone K. (1989) A simplified assay for the enzyme responsible for the attachment of myristic acid to the N-terminal glycine residue of proteins, myristoyl-CoA:glycylpeptide N-myristoyltransferase. *Biochem J*, **263**, 387-391.

McIlhinney RA and McGlone K. (1990a) Characterisation of a myristoyl CoA:glycylpeptide N-myristoyl transferase activity in rat brain: subcellular and regional distribution. *J Neurochem*, **54**, 110-117.

McIlhinney RA and McGlone K. (1990b) Evidence for a non-myristoylated pool of the 80 kDa protein kinase C substrate of rat brain. *Biochem J*, **271**, 681-685.

McIlhinney RA, Young K, Egerton M, Camble R, White A and Soloviev M. (1998) Characterization of human and rat brain myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase: evidence for an alternative splice variant of the enzyme. *Biochem J*, **333 (Pt 3)**, 491-495.

Migeon JC, Thomas SL and Nathanson NM. (1994) Regulation of cAMP-mediated gene transcription by wild type and mutated G-protein alpha subunits. Inhibition of adenylyl cyclase activity by muscarinic receptor-activated and constitutively activated G(o) alpha. *J Biol Chem*, **269**, 29146-29152.

Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda M, Katsuki M and Fujii-Kuriyama Y. (1997) Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells*, **2**, 645-654.

Mocarelli P, Gerthoux PM, Ferrari E, Patterson DG, Jr., Kieszak SM, Brambilla P, Vincoli N, Signorini S, Tramacere P, Carreri V, Sampson EJ, Turner WE and Needham LL. (2000) Paternal concentrations of dioxin and sex ratio of offspring. *Lancet*, **355**, 1858-1863.

Monteiro P, Gilot D, Le Ferrec E, Rauch C, Lagadic-Gossmann D and Fardel O. (2008) Dioxin-mediated up-regulation of aryl hydrocarbon receptor target genes is dependent on the calcium/calmodulin/CaMKIalpha pathway. *Mol Pharmacol*, **73**, 769-777.

Mukai M, Lin TM, Peterson RE, Cooke PS and Tischkau SA. (2008) Behavioral rhythmicity of mice lacking AhR and attenuation of light-induced phase shift by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Biol Rhythms*, **23**, 200-210.

Muller D, Nagel AC, Maier D and Preiss A. (2006) A molecular link A molecular link between Hairless and Pros26.4, a member of the AAA-ATPase subunits of the proteasome 19S regulatory particle in Drosophila. *J Cell Sci*, **119**, 250-258.

Mumby SM, Kleuss C and Gilman AG. (1994) Receptor regulation of G-protein palmitoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 2800-2804.

Murray D, Hermida-Matsumoto L, Buser CA, Tsang J, Sigal CT, Ben-Tal N, Honig B, Resh MD and McLaughlin S. (1998) Electrostatics and the membrane association of Src: theory and experiment. *Biochemistry*, **37**, 2145-2159.

Nebert DW, Puga A and Vasiliou V. (1993) Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. *Ann N Y Acad Sci*, **685**, 624-640.

Nebert DW, Robinson JR, Niwa A, Kumaki K and Poland AP. (1975) Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in the mouse. *J Cell Physiol*, **85**, 393-414.

Niwa A, Kumaki K, Nebert DW and Poland AP. (1975) Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in the mouse. Distinction between the "responsive" homozygote and heterozygote at the Ah locus. *Arch Biochem Biophys*, **166**, 559-564.

Ntwasa M, Aapies S, Schiffmann DA and Gay NJ. (2001) Drosophila embryos lacking N-myristoyltransferase have multiple developmental defects. *Exp Cell Res*, **262**, 134-144.

Oberg M, Bergander L, Hakansson H, Rannug U and Rannug A. (2005) Identification of the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole, in cell culture medium, as a factor that controls the background aryl hydrocarbon receptor activity. *Toxicol Sci*, **85**, 935-943.

Ohtake F, Baba A, Takada I, Okada M, Iwasaki K, Miki H, Takahashi S, Kouzmenko A, Nohara K, Chiba T, Fujii-Kuriyama Y and Kato S. (2007) Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature*, **446**, 562-566.

Ozols J, Carr SA and Strittmatter P. (1984) Identification of the NH₂-terminal blocking group of NADH-cytochrome b₅ reductase as myristic acid and the complete amino acid sequence of the membrane-binding domain. *J Biol Chem*, **259**, 13349-13354.

Paige LA, Zheng GQ, DeFrees SA, Cassady JM and Geahlen RL. (1990) Metabolic activation of 2-substituted derivatives of myristic acid to form potent inhibitors of myristoyl CoA:protein N-myristoyltransferase. *Biochemistry*, **29**, 10566-10573.

Pasha MK, Selvakumar P, Ashakumary L, Qureshi M, Guziec FS, Jr., Dimmock JR, Felsted RL, Glover CJ and Sharma RK. (2004) Lipidic inhibitors of human N-myristoyltransferase. *Int J Mol Med*, **13**, 557-563.

Pawson T. (1995) Protein modules and signalling networks. *Nature*, **373**, 573-580.

Peitzsch RM and McLaughlin S. (1993) Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry*, **32**, 10436-10443.

Peters JM, Narotsky MG, Elizondo G, Fernandez-Salguero PM, Gonzalez FJ and Abbott BD. (1999) Amelioration of TCDD-induced teratogenesis in aryl hydrocarbon receptor (AhR)-null mice. *Toxicol Sci*, **47**, 86-92.

Pfaffl MW, Horgan GW and Dempfle L. (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, **30**, e36.

Pierre M, Traverso JA, Boisson B, Domenichini S, Bouchez D, Giglione C and Meinel T. (2007) N-myristoylation regulates the SnRK1 pathway in Arabidopsis. *Plant Cell*, **19**, 2804-2821.

Pirkle JL, Wolfe WH, Patterson DG, Needham LL, Michalek JE, Miner JC, Peterson MR and Phillips DL. (1989) Estimates of the half-life of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Vietnam Veterans of Operation Ranch Hand. *J Toxicol Environ Health*, **27**, 165-171.

Pohjanvirta R and Tuomisto J. (1994) Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms, and animal models. *Pharmacol Rev*, **46**, 483-549.

Poland A, Glover E and Kende AS. (1976) Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J Biol Chem*, **251**, 4936-4946.

Puga A, Maier A and Medvedovic M. (2000) The transcriptional signature of dioxin in human hepatoma HepG2 cells. *Biochem Pharmacol*, **60**, 1129-1142.

Puga A, Nebert DW and Carrier F. (1992) Dioxin induces expression of c-fos and c-jun proto-oncogenes and a large increase in transcription factor AP-1. *DNA Cell Biol*, **11**, 269-281.

Quest AF, Harvey DJ and McIlhinney RA. (1997) Myristoylated and nonmyristoylated pools of sea urchin sperm flagellar creatine kinase exist side-by-side: myristoylation is necessary for efficient lipid association. *Biochemistry*, **36**, 6993-7002.

Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF, Bettelli E, Caccamo M, Oukka M and Weiner HL. (2008) Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, **453**, 65-71.

Rajala RV, Datla RS, Moyana TN, Kakkar R, Carlsen SA and Sharma RK. (2000a) N-myristoyltransferase. *Mol Cell Biochem*, **204**, 135-155.

Rajala RV, Radhi JM, Kakkar R, Datla RS and Sharma RK. (2000b) Increased expression of N-myristoyltransferase in gallbladder carcinomas. *Cancer*, **88**, 1992-1999.

Raju RV, Anderson JW, Datla RS and Sharma RK. (1997a) Molecular cloning and biochemical characterization of bovine spleen myristoyl CoA:protein N-myristoyltransferase. *Arch Biochem Biophys*, **348**, 134-142.

Raju RV, Kalra J and Sharma RK. (1994) Purification and properties of bovine spleen N-myristoyl-CoA protein:N-myristoyltransferase. *J Biol Chem*, **269**, 12080-12083.

Raju RV, Moyana TN and Sharma RK. (1997b) N-Myristoyltransferase overexpression in human colorectal adenocarcinomas. *Exp Cell Res*, **235**, 145-154.

Rannug A and Fritsche E. (2006) The aryl hydrocarbon receptor and light. *Biol Chem*, **387**, 1149-1157.

Ratner L, Haseltine W, Patarca R, Livak KJ, Starcich B, Josephs SF, Doran ER, Rafalski JA, Whitehorn EA, Baumeister K and et al. (1985) Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature*, **313**, 277-284.

Rau T, Nose M, Remmers U, Weil J, Weissmuller A, Davia K, Harding S, Peppel K, Koch WJ and Eschenhagen T. (2003) Overexpression of wild-type Galpha(i)-2 suppresses beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes. *Faseb J*, **17**, 523-525.

Resh MD. (2004) Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins. *Subcell Biochem*, **37**, 217-232.

Rioux V, Beauchamp E, Pedrono F, Daval S, Molle D, Catheline D and Legrand P. (2006) Identification and characterization of recombinant and native rat myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferases. *Mol Cell Biochem*, **286**, 161-170.

Rocque WJ, McWherter CA, Wood DC and Gordon JI. (1993) A comparative analysis of the kinetic mechanism and peptide substrate specificity of human and *Saccharomyces cerevisiae* myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase. *J Biol Chem*, **268**, 9964-9971.

Rowe DC, McGettrick AF, Latz E, Monks BG, Gay NJ, Yamamoto M, Akira S, O'Neill LA, Fitzgerald KA and Golenbock DT. (2006) The myristoylation of TRIF-related adaptor

molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 6299-6304.

Rudnick DA, McWherter CA, Rocque WJ, Lennon PJ, Getman DP and Gordon JI. (1991) Kinetic and structural evidence for a sequential ordered Bi Bi mechanism of catalysis by *Saccharomyces cerevisiae* myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase. *J Biol Chem*, **266**, 9732-9739.

Ruegg J, Swedenborg E, Wahlstrom D, Escande A, Balaguer P, Pettersson K and Pongratz I. (2008) The transcription factor aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator functions as an estrogen receptor beta-selective coactivator, and its recruitment to alternative pathways mediates antiestrogenic effects of dioxin. *Mol Endocrinol*, **22**, 304-316.

Rundle DR, Rajala RV and Anderson RE. (2002) Characterization of Type I and Type II myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferases with the Acyl-CoAs found on heterogeneously acylated retinal proteins. *Exp Eye Res*, **75**, 87-97.

Safe S, Bandiera S, Sawyer T, Robertson L, Safe L, Parkinson A, Thomas PE, Ryan DE, Reik LM, Levin W and et al. (1985a) PCBs: structure-function relationships and mechanism of action. *Environ Health Perspect*, **60**, 47-56.

Safe S, Bandiera S, Sawyer T, Zmudzka B, Mason G, Romkes M, Denomme MA, Sparling J, Okey AB and Fujita T. (1985b) Effects of structure on binding to the 2,3,7,8-TCDD receptor protein and AHH induction--halogenated biphenyls. *Environ Health Perspect*, **61**, 21-33.

Safe S, Wormke M and Samudio I. (2000) Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **5**, 295-306.

Sakurai N and Utsumi T. (2006) Posttranslational N-myristoylation is required for the anti-apoptotic activity of human tGelsolin, the C-terminal caspase cleavage product of human gelsolin. *J Biol Chem*, **281**, 14288-14295.

Samreen J, Jimo (2005) A new strain of rat for functional analysis of PINA. *Molecular Brain Research*, **137**, 63-69.

Sarioglu H, Brandner S, Habeger M, Jacobsen C, Lichtmannegger J, Wormke M and Andrae U. (2008) Analysis of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced proteome changes in 5L rat hepatoma cells reveals novel targets of dioxin action including the mitochondrial apoptosis regulator VDAC2. *Mol Cell Proteomics*, **7**, 394-410.

Savouret JF, Antenos M, Quesne M, Xu J, Milgrom E and Casper RF. (2001) 7-ketocholesterol is an endogenous modulator for the arylhydrocarbon receptor. *J Biol Chem*, **276**, 3054-3059.

Schechter A, Dai LC, Thuy LT, Quynh HT, Minh DQ, Cau HD, Phiet PH, Nguyen NT, Constable JD, Baughman R and et al. (1995) Agent Orange and the Vietnamese: the persistence of elevated dioxin levels in human tissues. *Am J Public Health*, **85**, 516-522.

Schmidt JV, Su GH, Reddy JK, Simon MC and Bradfield CA. (1996) Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6731-6736.

Schultz AM, Henderson LE, Oroszlan S, Garber EA and Hanafusa H. (1985) Amino terminal myristylation of the protein kinase p60src, a retroviral transforming protein. *Science*, **227**, 427-429.

Selvakumar P, Lakshmikuttyamma A, Pasha MK, King MJ, Olson DJ, Mori S, Ross AR, Hayashi K, Dimmock JR and Sharma RK. (2004) N-myristoyltransferase inhibitor protein is homologous to heat shock cognate protein 70. *J Cell Biochem*, **92**, 573-578.

Selvakumar P, Smith-Windsor E, Bonham K and Sharma RK. (2006) N-myristoyltransferase 2 expression in human colon cancer: cross-talk between the calpain and caspase system. *FEBS Lett*, **580**, 2021-2026.

Sessa WC, Barber CM and Lynch KR. (1993) Mutation of N-myristoylation site converts endothelial cell nitric oxide synthase from a membrane to a cytosolic protein. *Circ Res*, **72**, 921-924.

Sharma RK. (2004) Potential role of N-myristoyltransferase in pathogenic conditions. *Can J Physiol Pharmacol*, **82**, 849-859.

Shrivastav A, Sharma AR, Bajaj G, Charavaryamath C, Ezzat W, Spafford P, Gore-Hickman R, Singh B, Copete MA and Sharma RK. (2007) Elevated N-myristoyltransferase activity and expression in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, **18**, 93-97.

Smith DM, Kafri G, Cheng Y, Ng D, Walz T and Goldberg AL. (2005) ATP binding to PAN or the 26S ATPases causes association with the 20S proteasome, gate opening, and translocation of unfolded proteins. *Mol Cell*, **20**, 687-698.

Sullivan KA, Liao YC, Alborzi A, Beiderman B, Chang FH, Masters SB, Levinson AD and Bourne HR. (1986) Inhibitory and stimulatory G proteins of adenylate cyclase: cDNA and amino acid sequences of the alpha chains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 6687-6691.

Swierczynski SL and Blackshear PJ. (1996) Myristoylation-dependent and electrostatic interactions exert independent effects on the membrane association of the myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate protein in intact cells. *J Biol Chem*, **271**, 23424-23430.

SZ. (März 2008) Dürfen wir Morzarella noch essen? *Sueddeutsche Zeitung*, 28. März 2008.

Tanaka T, Ames JB, Harvey TS, Stryer L and Ikura M. (1995) Sequestration of the membrane-targeting myristoyl group of recoverin in the calcium-free state. *Nature*, **376**, 444-447.

Taniguchi H. (1999) Protein myristoylation in protein-lipid and protein-protein interactions. *Biophys Chem*, **82**, 129-137.

Taussig R, Iniguez-Lluhi JA and Gilman AG. (1993) Inhibition of adenylyl cyclase by Gi alpha. *Science*, **261**, 218-221.

Thomsen JS, Kietz S, Strom A and Gustafsson JA. (2004) HES-1, a novel target gene for the aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol*, **65**, 165-171.

Timm S, Titus B, Bernd K and Barroso M. (1999) The EF-hand Ca(2+)-binding protein p22 associates with microtubules in an N-myristoylation-dependent manner. *Mol Biol Cell*, **10**, 3473-3488.

Towler DA, Adams SP, Eubanks SR, Towery DS, Jackson-Machelski E, Glaser L and Gordon JI. (1987) Purification and characterization of yeast myristoyl CoA:protein N-myristoyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 2708-2712.

Towler DA, Adams SP, Eubanks SR, Towery DS, Jackson-Machelski E, Glaser L and Gordon JI. (1988a) Myristoyl CoA:protein N-myristoyltransferase activities from rat liver and yeast possess overlapping yet distinct peptide substrate specificities. *J Biol Chem*, **263**, 1784-1790.

Towler DA, Gordon JI, Adams SP and Glaser L. (1988b) The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Annu Rev Biochem*, **57**, 69-99.

van't Hof W and Resh MD. (1999) Dual fatty acylation of p59(Fyn) is required for association with the T cell receptor zeta chain through phosphotyrosine-Src homology domain-2 interactions. *J Cell Biol*, **145**, 377-389.

Van den Berg M, Birnbaum L, Bosveld AT, Brunstrom B, Cook P, Feeley M, Giesy JP, Hanberg A, Hasegawa R, Kennedy SW, Kubiak T, Larsen JC, van Leeuwen FX, Liem AK, Nolt C, Peterson RE, Poellinger L, Safe S, Schrenk D, Tillitt D, Tysklind M, Younes M, Waern F and Zacharewski T. (1998) Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect*, **106**, 775-792.

Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM, Buer J, Dumoutier L, Renauld JC and Stockinger B. (2008) The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature*, **453**, 106-109.

Vilas GL, Corvi MM, Plummer GJ, Seime AM, Lambkin GR and Berthiaume LG. (2006) Posttranslational myristoylation of caspase-activated p21-activated protein kinase 2 (PAK2) potentiates late apoptotic events. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 6542-6547.

Wendler P, Lehmann A, Janek K, Baumgart S and Enenkel C. (2004) The bipartite nuclear localization sequence of Rpn2 is required for nuclear import of proteasomal base complexes via karyopherin alphabeta and proteasome functions. *J Biol Chem*, **279**, 37751-37762.

WHO. (2000) Assessment of the health risk of dioxins: re-evaluation of the Tolerable Daily Intake (TDI), WHO Consultation May 25-29 1998, Geneva, Switzerland WHO European Centre for Environment and Health, International Programme. *Food Addit Contam*, **17**, 223-240.

Wiebel FJ, Klose U and Kiefer F. (1991) Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in vitro: H4IIEC3-derived 5L hepatoma cells as a model system. *Toxicol Lett*, **55**, 161-169.

Wincent E, Amini N, Luecke S, Glatt H, Bergman J, Crescenzi C, Rannug A and Rannug U. (2009) The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P450 substrate 6-formylindolo[3,2-b]carbazole is present in humans. *J Biol Chem*, **284**, 2690-2696.

Wormke M, Stoner M, Saville B and Safe S. (2000) Crosstalk between estrogen receptor alpha and the aryl hydrocarbon receptor in breast cancer cells involves unidirectional activation of proteasomes. *FEBS Lett*, **478**, 109-112.

Yang SH, Shrivastav A, Kosinski C, Sharma RK, Chen MH, Berthiaume LG, Peters LL, Chuang PT, Young SG and Bergo MO. (2005) N-myristoyltransferase 1 is essential in early mouse development. *J Biol Chem*, **280**, 18990-18995.

Yin XM. (2006) Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene*, **369**, 7-19.

Zha J, Weiler S, Oh KJ, Wei MC and Korsmeyer SJ. (2000) Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science*, **290**, 1761-1765.

Zhou W, Parent LJ, Wills JW and Resh MD. (1994) Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J Virol*, **68**, 2556-2569.

Zozulya S and Stryer L. (1992) Calcium-myristoyl protein switch. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 11569-11573.