

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Funktionelle Charakterisierung des Komplexes aus
Ornithin-Decarboxylase, Antizym und Antizym-Inhibitor
sowie Identifikation einer Antizym-Inhibitor-
Spleißvariante durch Bindung an FK506**

Von
Ursula Mangold
aus Darmstadt
2002

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von PD Dr. Michael Meisterernst betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 05.04.2002

Ursula Mangold

| | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| Dissertation eingereicht am | 05.04.2002 |
| 1. Gutachter | PD Dr. Ekkehard Leberer |
| 2. Gutachter | PD Dr. Michael Meisterernst |
| Mündliche Prüfung am | 28.05.2002 |

Für meine Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1998 bis März 2002 unter Anleitung von PD Dr. Ekkehard Leberer am Center for Functional Genomics der Aventis Pharma GmbH in Martinsried durchgeführt. Die Arbeit wurde von PD Dr. Michael Meisterernst von der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München betreut.

Bisherige Veröffentlichungen:

Mangold U., Leberer E. (2001) Verfahren zur Bestimmung der Aktivität der Ornithin-Decarboxylase sowie zur Identifizierung von Effektoren der Ornithin-Decarboxylase-Aktivität. Deutsche Patentanmeldung - 101 61 412.8.

Mangold U., Musicki B., Ohage S., Wendler W., Kirschbaum B., Leberer E. (2000) Interaction of FK506 with antizyme inhibitor. *Mol Biol Cell* (supplement) 11(12): 242a

Mangold U., Dax C.I., Saar K., Schwab W., Kirschbaum B., Müllner S. (1999) Identification and characterization of potential new therapeutic targets in inflammatory and autoimmune diseases. *Eur J Biochem* 266(3):1184-91

Danksagung

PD Dr. Ekkehard Leberer danke ich sehr herzlich für die Vergabe des Themas und für das kontinuierliche Interesse am Fortgang dieser Arbeit. Besonders möchte ich mich für die exzellenten Arbeitsbedingungen, die große experimentelle Freiheit und nicht zuletzt für die Möglichkeit, an zahlreichen Kongressen teilnehmen zu können, bedanken.

PD Dr. Michael Meisterernst danke ich für die stete Unterstützung und insbesondere für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Betreuung an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwigs-Maximilians-Universität München durchführen zu können.

Dr. Branislav Musicki danke ich für die Synthese der synthetischen Hybride, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Prof. Dr. Nikolaus Seiler danke ich für die wissenschaftliche Unterstützung auf dem Gebiet der Polyamine, sowie für seine Betreuung bei Messungen der ODC-Aktivität. Sein Fachwissen auf diesem Gebiet war eine große Bereicherung für mich.

Bei Dr. Edmund Hoppe und Dr. Heike Schauerte möchte ich mich sehr herzlich für viele anregende wissenschaftliche Diskussionen sowie für die sorgfältige Durchsicht dieser Arbeit bedanken.

Dr. Susanne Ohage, Rosemarie Söllner und Dr. Wolfgang Wendler danke ich für die gute Zusammenarbeit am 3-Hybrid-Projekt.

Dr. Carlo Nesti danke ich für seine große Unterstützung bei bioinformatischen Fragen aller Art.

Bei Anja, Bernard, Bert, Rosi und Sébastien möchte ich mich insbesondere für das angenehme Arbeitsklima in unserem Großraumlabor sowie bei allen Mitarbeitern des Aventis Center for Functional Genomics für die stete Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | <i>Einleitung</i> | 1 |
| 1.1 | Der Metabolismus der Polyamine | 2 |
| 1.2 | Die physiologische Rolle der Polyamine | 3 |
| 1.2.1 | Die Interaktion der Polyamine mit Nukleinsäuren | 4 |
| 1.2.2 | Die Interaktion der Polyamine mit Proteinen | 4 |
| 1.2.3 | Polyamine als Vorläufer essentieller Moleküle | 6 |
| 1.3 | ODC als Schlüsselenzym der Polyaminbiosynthese | 7 |
| 1.3.1 | Transkriptionelle Regulation der ODC | 9 |
| 1.3.2 | Translationale Regulation der ODC | 10 |
| 1.3.3 | Posttranslationale Regulation der ODC | 10 |
| 1.4 | Die Regulation der ODC durch Antizym und Antizym-Inhibitor | 12 |
| 1.4.1 | Antizym und der proteasomale Abbau der ODC | 12 |
| 1.4.2 | Die Regulation der Antizym-Expression | 13 |
| 1.4.3 | Die Familie der Antizym-Gene | 14 |
| 1.4.4 | Der Polyamintransport und seine Regulation durch Antizym | 16 |
| 1.4.5 | Antizym-Inhibitor | 17 |
| 1.5 | Zielsetzung | 19 |
| | | |
| 2 | <i>Material</i> | 20 |
| 2.1 | Bakterienstämme | 20 |
| 2.2 | Hefestämme | 20 |
| 2.3 | Zelllinie | 21 |
| 2.4 | Oligonukleotide | 21 |
| 2.4.1 | ODC-spezifische Oligonukleotide | 21 |
| 2.4.2 | Antizym-spezifische Oligonukleotide | 21 |
| 2.4.3 | Antizym-Inhibitor-spezifische Oligonukleotide | 22 |
| 2.4.4 | Oligonukleotide für die PDR5-Deletion | 22 |
| 2.4.5 | Sonstige Oligonukleotide | 22 |
| 2.5 | cDNA-Genbanken und Poly(A)⁺ RNA | 22 |
| 2.6 | Plasmide | 23 |
| 2.7 | Antikörper | 23 |
| 2.7.1 | Primäre Antikörper | 23 |
| 2.7.2 | Sekundäre Antikörper | 24 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 2.8 | Enzyme | 24 |
| 2.9 | Standards und Kits | 24 |
| 2.10 | Chemikalien und Bioreagentien | 24 |
| 2.11 | Geräte | 26 |
| | | |
| 3 | Methoden | 27 |
| | | |
| 3.1 | Bakterienkultivierung | 27 |
| 3.1.1 | Anzucht auf Agarplatten | 27 |
| 3.1.2 | Vermehrung in Flüssigkultur | 27 |
| 3.1.3 | Stammhaltung | 28 |
| 3.2 | Hefekultur | 28 |
| 3.2.1 | Anzucht auf Agarplatten | 28 |
| 3.2.2 | Vermehrung in Flüssigkultur | 29 |
| 3.2.3 | Stammhaltung | 29 |
| 3.3 | Zellkultur | 30 |
| 3.3.1 | Anzucht von Zellen | 30 |
| 3.3.2 | Anlegen von Stammkulturen | 30 |
| 3.4 | Transformation von <i>E. coli</i> | 31 |
| 3.4.1 | Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen | 31 |
| 3.4.2 | Transformation chemisch-kompetenter Zellen mittels KCM-Puffer | 31 |
| 3.5 | Isolierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i> | 32 |
| 3.5.1 | Plasmidisolierung mittels alkalischer Lyse | 32 |
| 3.5.2 | Präparative Plasmidisolierung über Anionenaustausch-Chromatographie | 32 |
| 3.5.3 | Präparation von Plasmid-DNA über CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation | 33 |
| 3.6 | Transformation von Hefezellen | 34 |
| 3.6.1 | Herstellung von Carrier-DNA | 34 |
| 3.6.2 | Transformation von Hefen | 34 |
| 3.7 | Geninaktivierung in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 35 |
| 3.7.1 | Herstellung der Deletionskassette | 35 |
| 3.7.2 | Hefetransformation der Deletionskassette | 35 |
| 3.7.3 | Präparation genomischer DNA aus Hefe | 36 |
| 3.7.4 | Entfernung der loxP-kanMX-loxP-Kassette durch die <i>Cre</i> -Rekombinase | 36 |
| 3.8 | Bestimmung der β-Galaktosidaseaktivität von transformierten Hefen | 37 |
| 3.8.1 | Qualitativer Farbttest auf X-Gal-haltigen Indikatorplatten | 37 |
| 3.8.2 | Analyse der β -Galaktosidaseaktivität in Flüssigkultur (CPRG-Assay) | 37 |
| 3.9 | Transfektion von Säugerzellen | 38 |
| 3.9.1 | Calcium-Phosphat-Transfektion von HEK 293-Zellen | 38 |
| 3.9.2 | Bestimmung der Transfektionseffizienz | 39 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 3.10 | Durchführung des 3-Hybrid-Assays | 39 |
| 3.10.1 | Large Scale-Transformation des Hefestammes EGY48 | 39 |
| 3.10.2 | Sammeln der transformierten Hefen | 40 |
| 3.10.3 | Induktion der Genbankexpression und 3-Hybrid-Interaktionsscreening | 40 |
| 3.10.4 | Isolation von Plasmiden aus Hefezellen | 41 |
| 3.10.5 | Transformation der Genbankplasmide in <i>E. coli</i> KC8 | 41 |
| 3.11 | Auftrennung, Reinigung und Konzentrationsmessung von DNA | 42 |
| 3.11.1 | Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von DNA | 42 |
| 3.11.2 | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose | 43 |
| 3.11.3 | Konzentrationsbestimmung von DNA | 43 |
| 3.12 | Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren | 44 |
| 3.12.1 | Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen | 44 |
| 3.12.2 | Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden mit Klenow-Fragment | 44 |
| 3.12.3 | Dephosphorylierung von Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase | 44 |
| 3.12.4 | Ligation von DNA-Enden | 45 |
| 3.12.5 | Klonierung von PCR-Produkten | 45 |
| 3.13 | PCR-Techniken | 46 |
| 3.13.1 | Standard-PCR | 46 |
| 3.13.1 | Reverse Transkription | 47 |
| 3.13.2 | Sequenzierung von Plasmid-DNA | 47 |
| 3.14 | Markierung und Hybridisierung von Nukleinsäuren | 49 |
| 3.14.1 | Fluoreszenzmarkierung von Nukleinsäuren | 49 |
| 3.14.2 | Hybridisierung filtergebundener Nukleinsäuren | 49 |
| 3.14.3 | Detektion der Fluoreszenz-markierten Sonde im Northern-Blot | 50 |
| 3.15 | Proteinchemische Methoden | 50 |
| 3.15.1 | Bestimmung der Proteinkonzentration | 50 |
| 3.15.2 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 51 |
| 3.15.3 | Coomassie-Färbung | 52 |
| 3.15.4 | Silberfärbung | 52 |
| 3.15.5 | Präparation von Hefezelleextrakten | 53 |
| 3.15.6 | Präparation von HEK 293-Zelleextrakten | 54 |
| 3.16 | Immunologische Arbeitstechniken | 54 |
| 3.16.1 | Western-Blot | 54 |
| 3.16.2 | Immunpräzipitation | 55 |
| 3.17 | Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen | 55 |
| 3.17.1 | Induktion der Proteinexpression und Aufschluß der Bakterien | 55 |
| 3.17.2 | Reinigung über Glutathion Sepharose | 56 |
| 4 | Ergebnisse | 57 |
| 4.1 | Etablierung des auf Hefe-basierenden 3-Hybrid-Systems | 57 |
| 4.1.1 | Das Prinzip des 3-Hybrid-Systems | 57 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 4.1.2 | Die synthetische Komponente des 3-Hybrid-Systems | 58 |
| 4.1.3 | Die Glukokorticoidrezeptor-Konstrukte | 60 |
| 4.1.4 | Expression der Glukokorticoidrezeptor-Konstrukte | 62 |
| 4.1.5 | Test auf Aktivierbarkeit der Glukokorticoidrezeptor-Konstrukte | 62 |
| 4.1.6 | Optimierung des Hefestammes EGY48 für das 3-Hybrid-System | 64 |
| 4.1.7 | Funktionelle Validierung der PDR5-Deletion | 66 |
| 4.1.8 | Validierung des 3-Hybrid-Systems mit FKBP12 als Beuteprotein | 67 |
| 4.2 | Hefe-3-Hybrid-Screen für FK506-bindende Proteine | 68 |
| 4.2.1 | Durchführung des 3-Hybrid-Screens | 68 |
| 4.2.2 | Charakterisierung der isolierten FKBP12-Klone | 71 |
| 4.2.3 | Charakterisierung des isolierten Antizym-Inhibitor-Klons | 72 |
| 4.3 | Die Interaktion von Antizym-Inhibitor mit FK506 in Hefe | 73 |
| 4.3.1 | Spezifität der Interaktion von Antizym-Inhibitor mit FK506 im Hefesystem | 73 |
| 4.3.2 | Klonierung des vollständigen Antizym-Inhibitor-Gens sowie seiner Spleißvariante | 75 |
| 4.3.3 | Eingrenzung der FK506-Bindungsdomäne von Antizym-Inhibitor | 76 |
| 4.4 | Charakterisierung der Spleißvarianten von Antizym-Inhibitor | 78 |
| 4.4.1 | Nachweis der Spleißvarianten durch RT-PCR | 78 |
| 4.4.2 | Nachweis der Spleißvarianten mittels Datenbankrecherche | 80 |
| 4.4.3 | Genomische Organisation von Antizym-Inhibitor | 81 |
| 4.4.4 | Expressionsanalyse von Antizym-Inhibitor | 82 |
| 4.5 | Interaktion von Antizym-Inhibitor mit Antizym | 84 |
| 4.5.1 | Klonierung der Antizyme 1 – 4 | 84 |
| 4.5.2 | Klonierung von ODC | 86 |
| 4.5.3 | 2-Hybrid-Assay für ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor | 86 |
| 4.5.4 | Die Antizym-Bindungsdomäne von Antizym-Inhibitor | 88 |
| 4.5.5 | Der Einfluß von FK506 auf die Interaktion von Antizym 1 mit Antizym-Inhibitor | 88 |
| 4.6 | Funktionelle Expression des ODC / Antizym / Antizym-Inhibitor-Komplexes in der Hefe | 90 |
| 4.6.1 | Komplementation der Hefe <i>spe1</i> -Deletion durch humane ODC | 90 |
| 4.6.2 | Funktionelle Expression der Antizyme 1 - 4 in Hefe | 93 |
| 4.6.3 | Immunologischer Nachweis der Expression von Antizym 1 – 4 | 96 |
| 4.6.4 | Funktionelle Expression von Antizym-Inhibitor in Hefe | 98 |
| 4.6.5 | Immunologischer Nachweis der Expression von OAIFL und OAISP-1 | 100 |
| 4.7 | Der Proteinkomplex aus ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor | 101 |
| 4.7.1 | 3-Hybrid-System für den Proteinkomplex aus ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor | 101 |
| 4.7.2 | Expression von ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor im Säugersystem | 103 |
| 4.7.3 | Immunpräzipitation von Antizym-bindenden Proteinen | 105 |
| 4.8 | Ein Screen für ODC-Inhibitoren | 106 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 5 | <i>Diskussion</i> | 108 |
| 5.1 | Das Hefe-3-Hybrid-System | 109 |
| 5.1.1 | Möglichkeiten und Einschränkungen des Hefe-3-Hybrid-Systems | 109 |
| 5.1.2 | Worauf ist bei der Durchführung des Hefe-3-Hybrid-Systems zu achten? | 111 |
| 5.1.3 | Optimierung des Hefe-3-Hybrid-Systems: die Hormonbindungsdomäne des Glukokorticoidezeptors | 113 |
| 5.2 | FK506 und die physiologische Rolle der FKBP | 114 |
| 5.2.1 | Der Wirkmechanismus von FK506 und die physiologische Rolle von FKBP12 | 114 |
| 5.2.2 | Warum wurden außer FKBP12 keine anderen FKBP im Hefe-3-Hybrid-System gefunden? | 117 |
| 5.3 | Regulationsmechanismen der ODC-Aktivität | 118 |
| 5.3.1 | FK506 beeinflusst die ODC-Aktivität | 118 |
| 5.3.2 | Die Interaktion von FK506 mit Antizym-Inhibitor | 118 |
| 5.3.3 | Charakterisierung der alternativen Spleißformen von Antizym-Inhibitor | 119 |
| 5.3.4 | Charakterisierung der Antizym-Bindungsdomäne von Antizym-Inhibitor | 122 |
| 5.3.5 | Antizym-Inhibitor ist ein genereller Inaktivator der Antizyme | 123 |
| 5.3.6 | Charakterisierung von Antizym 4 | 123 |
| 5.3.7 | Gibt es Antizym und Antizym-Inhibitor in der Hefe | 125 |
| 5.3.8 | Die in der Hefe gewonnenen Daten lassen sich auf höhere Organismen übertragen | 126 |
| 6 | <i>Zusammenfassung</i> | 127 |
| 7 | <i>Literaturverzeichnis</i> | 129 |
| 8 | <i>Anhang</i> | 142 |
| 8.1 | Abkürzungsverzeichnis | 142 |
| | Lebenslauf | 144 |

1 Einleitung

Die Zellen aller Organismen, angefangen von Prokaryoten wie Bakterien bis hin zu Eukaryoten wie Pilze, Pflanzen und Tiere, enthalten in millimolarer Konzentration eine besondere Gruppe von organischen Kationen, sogenannte Polyamine. Hierzu zählen Putrescin, Spermin und Spermidin (siehe Abbildung 1.1), die wichtige Modulatoren vieler zellulärer Prozesse sind. Polyamine sind von essentieller Bedeutung für das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und die Proteinbiosynthese. Aufgrund ihrer positiven Ladung haben sie eine hohe Affinität für Nukleinsäuren, so daß die freie Konzentration der Polyamine innerhalb der Zelle wesentlich geringer ist als ihre absolute Konzentration (Igarashi and Kashiwagi, 2000). Die Namen Putrescin, Spermin und Spermidin zeugen von der historischen Entdeckung dieser Substanzen in Samenflüssigkeit und verwesstem Gewebe. Die Biosynthese der Polyamine beginnt mit der enzymatischen Decarboxylierung von Ornithin zu Putrescin. Das Enzym, das diese Reaktion katalysiert, heißt Ornithin-Decarboxylase (ODC, EC 4.1.1.17) und ist eines der Schlüsselenzyme der Polyaminbiosynthese.

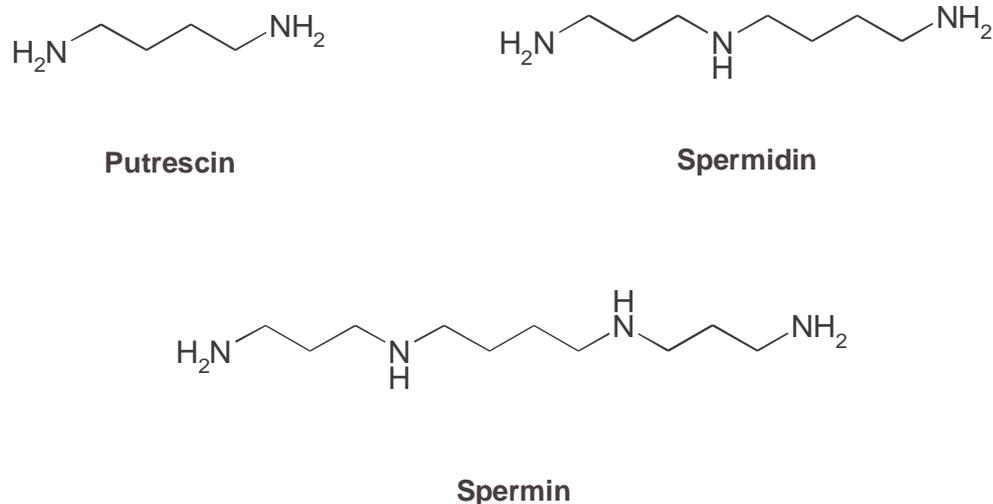


Abbildung 1.1: **Putrescin, Spermidin und Spermin**

Chemische Struktur der Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin. Unter physiologischen Bedingungen sind die Polyamine an ihren Stickstoffpositionen protoniert. Dies bedeutet, daß Putrescin zwei, Spermidin drei und Spermin vier positive Ladungen trägt.

Die Polyaminkonzentrationen innerhalb der Zelle sind genauestens reguliert. Durch ein aktives Transportsystem steht der intrazelluläre Polyamingehalt in ständigem Austausch mit der zellulären Umgebung (Seiler *et al.*, 1996). Der Polyaminbedarf der Zelle wird zum einen durch die *de novo* Synthese von Polyaminen aus den Aminosäuren Ornithin, Methionin bzw.

Arginin und zum anderen durch die Aufnahme von Polyaminen aus der Umgebung gedeckt. In nicht-proliferierenden Zellen und Geweben ist die ODC-Aktivität relativ niedrig. Schnell teilende Zellen, wie z.B. embryonale Zellen oder Tumorzellen, benötigen dagegen eine besonders hohe Polyaminkonzentration. Diese Zellen decken ihren Polyaminbedarf vorwiegend über die *de novo* Synthese von Putrescin (Seiler *et al.*, 1998). So wurde z.B. eine erhöhte ODC-Aktivität in fast allen Tumorzellen festgestellt und gezeigt, daß die Überexpression von ODC zu einer neoplastischen Transformation führt (Auvinen *et al.*, 1997). Aus diesem Grund sind Substanzen, die in den Polyaminstoffwechsel eingreifen, von besonderem Interesse für das Gebiet der Zellzyklusregulation und der Onkologie. Bei dem bekannten ODC-Inhibitor Difluoromethylornithin (DFMO) handelt es sich um einen irreversiblen Inhibitor der Ornithin-Decarboxylase, der jedoch nur in sehr hohen, millimolaren Konzentrationen wirksam ist (Seiler *et al.*, 1998). DFMO wird z. Z. als Therapeutikum zur Behandlung der afrikanischen Schlafkrankheit entwickelt, die durch *Trypanosoma brucei gambiense* ausgelöst wird (Schechter and Sjoerdsma, 1986). Durch die Hemmung der parasitären ODC wird unter anderem die Synthese des für Trypanosomen essentiellen Antioxidants Trypanothion verhindert (Augustyns *et al.*, 2001).

1.1 Der Metabolismus der Polyamine

Der Polyamin-Metabolismus besteht aus einer zyklischen Reaktionsabfolge (siehe Abbildung 1.2). Ausgehend von den Aminosäuren Arginin und Methionin werden die Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin gebildet. Im Harnstoffzyklus wird aus Arginin zunächst Ornithin gebildet und aus Methionin entsteht in einer ATP-abhängigen Reaktion S-Adenosylmethionin (AdoMet). Die Biosynthese der Polyamine beginnt mit der enzymatischen Decarboxylierung von Ornithin zu Putrescin durch die Ornithin-Decarboxylase (ODC) und der Decarboxylierung von S-Adenosylmethionin zu dAdoMet durch die S-Adenosylmethionin-Decarboxylase (AdoMetDC). Die Spermidinsynthase überträgt dann eine Propylaminogruppe von dAdoMet auf Putrescin, wodurch Spermidin entsteht. In dem nächsten Reaktionsschritt überträgt die Sperminsynthase eine weitere Propylaminogruppe von dAdoMet auf Spermidin, wodurch Spermin gebildet wird. Putrescin kann neben der Decarboxylierung von Ornithin aber auch als Abbauprodukt von Spermidin über N¹-Acethylspermidin gebildet werden, wodurch sich der Kreis schließt.

Schlüsselenzyme des Polyaminstoffwechsels sind die Ornithin-Decarboxylase (ODC), die S-Adenosylmethionin-Decarboxylase (AdoMetDC) und die zytosolische Acetyltransferase (SSAT), die den Abbauweg der Polyamine einleitet. Neben der posttranslationalen Kontrolle ist auch die Transkription und die Translation dieser Enzyme genauestens reguliert. Spermidinsynthase, Sperminsynthase und Polyamin-Oxidase sind dagegen im Überschuß in

der Zelle vorhanden und nicht geschwindigkeitsbestimmend unter physiologischen Bedingungen.

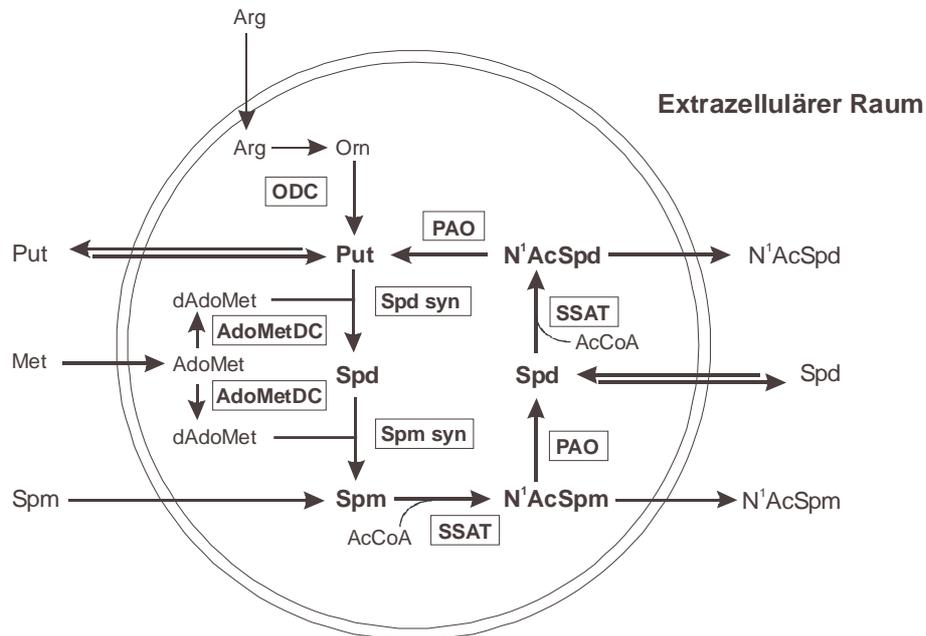


Abbildung 1.2: **Polyamin-Metabolismus und Polyamintransport**

Polyamin-Metabolismus und Polyamintransport zwischen intrazellulärem und extrazellulärem Raum. (Modifiziert nach Seiler *et al.*, 1998). Arg (L-Arginin), Met (L-Methionin), Orn (L-Ornithin), AdoMet (S-Adenosyl-L-Methionin), dAdoMet (Decarboxylierungsprodukt von AdoMet), Put (Putrescin), Spd (Spermidin), Spm (Spermin), N¹AcSpd (N¹-Acethylspermidin), N¹AcSpm (N¹-Acethylspermin), ODC (Ornithin-Decarboxylase), AdoMetDC (S-Adenosyl-L-Methionin-Decarboxylase), Spd syn (Spermidinsynthase), Spm syn (Sperminsynthase), SSAT (AcethylCoA: Spermidin / Spermin N¹-Acethyltransferase), PAO (Polyamin-Oxidase, FAD-abhängig).

1.2 Die physiologische Rolle der Polyamine

Unter physiologischen Bedingungen sind die Polyamine an ihren Stickstoffpositionen protoniert. Dies bedeutet, daß Putrescin zwei, Spermidin drei und Spermin vier positive Ladungen trägt. Dies macht die Polyamine besonders geeignet für die Interaktion mit negativ geladenen Makromolekülen wie Nukleinsäuren, Phospholipiden und Phosphoproteinen. Die komplexe, physiologische Rolle der Polyamine ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Eine Annahme ist, daß Polyamine sich ähnlich wie mehrwertige positive Ionen (z.B. Mg²⁺) verhalten (Seiler *et al.*, 1996). In diesem Fall wären Polyamine Kationen, die je nach Bedarf synthetisiert und abgebaut werden können und die eine Ladungsverteilung besitzen, die ihnen die Interaktion mit ihren Zielmolekülen ermöglicht.

1.2.1 Die Interaktion der Polyamine mit Nukleinsäuren

In der Zelle befinden sich die Polyamine vorwiegend komplexiert mit RNA (Igarashi and Kashiwagi, 2000). Durch diese Bindung wird die Sekundärstruktur von der mRNA, tRNA und rRNA beeinflusst. Aufgrund dieser Interaktion besitzen die Polyamine eine wichtige physiologische Rolle im Bereich der Translation und sind in der Lage, die Proteinbiosynthese zu stimulieren. Darüber hinaus interagieren Polyamine aber auch mit DNA. Es wurde gezeigt, daß Polyamine in der Lage sind, die Sekundärstruktur von DNA zu beeinflussen, so z.B. den Übergang von der B-Form zur Z-DNA. Aber auch der Übergang von der B-Form zur A-Form wird in Gegenwart von Polyaminen erleichtert (van Dam *et al.*, 2002). Außerdem wurde gezeigt, daß Polyamine auch an der *in vitro* Oligomerisierung von Nukleosomen beteiligt sind und daß diese Polyamin-bedingte Chromatin-Kondensation durch Histon-Hyperacetylierung verhindert werden kann (Pollard *et al.*, 1999).

1.2.2 Die Interaktion der Polyamine mit Proteinen

Neben ihrer Bindung an Nukleinsäuren interagieren Polyamine aber auch mit Proteinen. Diese Interaktion erfolgt nicht nur unspezifisch aufgrund ihrer positiven Ladung, sondern es existieren auch definierte Polyamin-Bindungsstellen. Ein Beispiel hierfür ist die Casein Kinase II (CK2), eine ubiquitäre Serin / Threonin-Kinase. CK2 besitzt eine konservierte Polyamin-Bindungsstelle, die in der regulatorischen β -Untereinheit der Kinase liegt (Chantalat *et al.*, 1999). Unter den Substraten von CK2 finden sich Proteine, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, wie Myc, Fos und p53, aber auch die zytosolische Acetyltransferase (SSAT), die den Abbau der Polyamine Spermidin und Spermin einleitet (Xu *et al.*, 1999; Bordin *et al.*, 1996).

Andere Proteine mit bekannten Polyamin-Bindungsstellen sind Membranproteine, insbesondere Ionenkanäle und Rezeptoren. Spermin und zu einem geringeren Umfang auch Spermidin können eine Vielzahl von Ionenkanälen blockieren und modulieren (Williams, 1997). Eine Gruppe von K^+ -Kanälen, sogenannte Kir-Kanäle (K^+ inward rectifier, einwärts Gleichrichter), wird neben Mg^{2+} auch durch Polyamine reguliert (siehe Abbildung 1.3). Kir-Kanäle sind im allgemeinen für die Aufrechterhaltung des Ruhepotentials verantwortlich und kontrollieren die Aktivierbarkeit von Neuronen und Muskelzellen. Zwei Moleküle Spermin können theoretisch innerhalb der Ionenkanal-Pore binden und den Strom der K^+ -Ionen unterbinden. Diese Polyamin-bedingte Hemmung der Kir-Kanäle kann durch Inhibitoren der Polyaminbiosynthese wie DFMO beeinflusst werden. Eine Abnahme der intrazellulären Polyaminkonzentration führt bei Kir-Kanälen zu einem verstärkten K^+ -Ionenausstrom und damit zu einer geringeren Erregbarkeit der Zelle (Shyng *et al.*, 1996).

Neben dem Einfluß der Polyamine auf Kir-Kanäle werden auch einige Ca^{2+} -permeable α -Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazol-4-Propionsäure (AMPA)- und Kainat-Rezeptoren durch

Polyamine reguliert (Williams, 1997). Intrazelluläres Spermin kann innerhalb der Ionenkanal-Pore binden und so den Kanal blockieren (siehe Abbildung 1.3). AMPA- und Kainat-Rezeptoren werden im depolarisierten Zustand durch intrazelluläres Spermin gehemmt. Im hyperpolarisierten Zustand wird diese Blockade gelöst und Spermin nach innen in das Zytoplasma freigesetzt. Spermin hat auf diese Weise einen Einfluß auf den Na^+ - und Ca^{2+} -Einstrom und die Aktivierbarkeit dieser Rezeptoren. Im extrem depolarisierten Zustand kann Spermin aber auch in das extrazelluläre Medium freigesetzt werden.

N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren werden durch extrazelluläres Spermin reguliert. Je nach Zusammensetzung der Rezeptor-Untereinheiten kann diese Regulation inhibitorisch oder stimulatorisch ausfallen (Williams, 1997). So kann Spermin die Affinität des Rezeptors für Glycin erhöhen oder bei gesättigten Glycin-Konzentrationen die NMDA-Ströme noch weiter verstärken (Lerma, 1992). Inhibition durch extrazelluläres Spermin ist dagegen strikt spannungsabhängig. NMDA-Rezeptoren können bei negativem Membranpotential durch Spermin blockiert werden. Bei einem extrem negativen Membranpotential kann Spermin den Kanal sogar passieren und in die Zelle gelangen (siehe Abbildung 1.3).

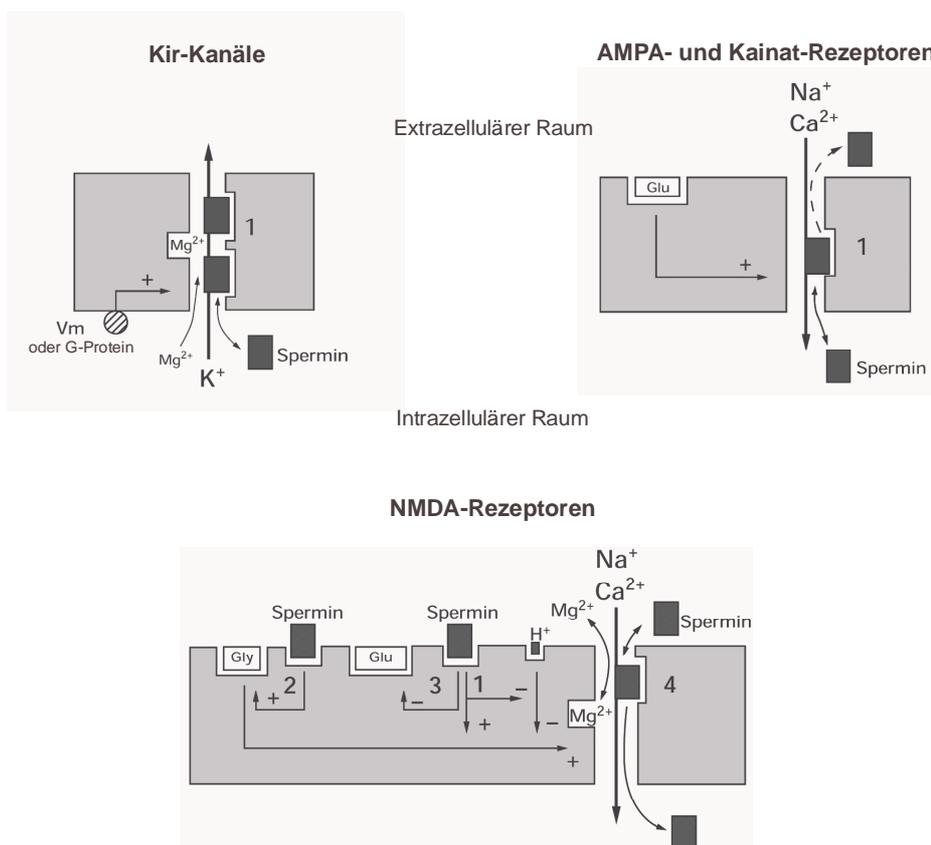


Abbildung 1.3: **Regulation von Kanälen und Rezeptoren durch Spermin**

Schematische Darstellung der Blockierung von Kir-Kanälen und AMPA-, Kainat-Rezeptoren durch intrazelluläres Spermin sowie der Modulation und Blockade von NMDA-Rezeptoren durch extrazelluläres Spermin. Große graue Rechtecke repräsentieren die Ionenkanäle. Kleine dunkle Rechtecke stehen für Spermin. Auswärtsströme der K^+ -Ionen durch die Kir-Kanäle, Einwärtsströme der Na^+ -Ionen und in manchen Fällen der Ca^{2+} -Ionen durch die Glutamat-Rezeptoren. Gly (Glycin), Glu (Glutamat). (Modifiziert nach Williams, 1997).

Es wurden jedoch auch inhibitorische und modulatorische Einflüsse von Polyaminen auf andere Kationen-Kanäle beobachtet. So kann der Ryanodin-Rezeptor durch intrazelluläres Spermin blockiert werden (Uehara *et al.*, 1996) und extrazelluläres Spermin moduliert muskuläre Acetylcholin-Rezeptoren (Hsu, 1994). Obwohl die Polyamin-bedingten Effekte vorrangig auf *in vitro* Studien beruhen, läßt sich aus diesen Ergebnissen doch eine Aussage über die Funktion, Struktur und Regulation vieler Ionenkanäle ableiten.

Neben ihrem Einfluß auf Ionenkanäle haben Polyamine aber auch einen modulatorischen Einfluß auf G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Auch hier üben sie eine ähnliche Wirkung wie Mg^{2+} -Ionen aus. So wird beispielsweise der A1-Adenosin-Rezeptor durch Spermin reguliert, indem dieses die Affinität des Rezeptors für den Agonisten erhöht (Wasserkort *et al.*, 1991).

1.2.3 Polyamine als Vorläufer essentieller Moleküle

Neben den bereits beschriebenen Funktionen, werden Polyamine auch als Vorläufer für die Biosynthese essentieller Moleküle verwendet. So dient Spermidin bei Eukaryoten und Archaeobakterien als Ausgangsmolekül für die Synthese von Hypusin. Trypanosomen nutzen Spermidin für die Synthese von Trypanothion.

Der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF-5A) enthält als einziges bekanntes Protein eine posttranslationale Hypusin-Modifikation (Cooper *et al.*, 1983). Diese Reaktion wird durch die Deoxyhypusin Synthase sowie durch die Deoxyhypusin Hydrolase katalysiert (siehe Abbildung 1.4). Der erste Schritt der Hypusin-Modifikation ist der NAD-abhängige Transfer einer 4-Aminobutyl-Gruppe von Spermidin zu einem spezifischen Lysinrest von eIF-5A. Diese komplexe Reaktion wird durch die Deoxyhypusin Synthase katalysiert. Der zweite Schritt ist die Hydroxylierung des modifizierten Lysinrestes durch die Deoxyhypusin Hydrolase. Sowohl eIF-5A als auch die Hypusin-Modifikation sind essentiell für das eukaryotische Zellwachstum (Park *et al.*, 1997). Hefezellen sind nicht überlebensfähig, wenn die beiden Gene für eIF-5A fehlen (Schnier *et al.*, 1991), der Hypusin-spezifische Lysinrest mutiert ist, oder wenn die Deoxyhypusin Synthase nicht vorhanden ist (Park *et al.*, 1998). Die exakte *in vivo* Funktion von eIF-5A ist jedoch noch nicht geklärt. Ursprünglich wurde eIF-5A als ein Initiationsfaktor beschrieben, der bei der Translation die Bildung der ersten Peptidbindung fördert (Kyrpides and Woese, 1998). Da in Abwesenheit von eIF-5A die Proteinbiosynthese jedoch nur leicht reduziert ist (~25%), werden noch andere Funktionen vermutet. So wurde gezeigt, daß eIF-5A in Hefe am Abbau von mRNA beteiligt ist (Zuk and Jacobson, 1998). Außerdem ist eIF-5A ein essentieller Kofaktor für das Rev-Protein des humanen Immundefizienz Virus Typ I (HIV-1) (Ruhl *et al.*, 1993), das am Export viraler mRNA aus dem Zellkern beteiligt ist.

Trypanosomen fehlen die meisten Enzyme, die bei anderen Organismen für die Abwehr von oxidativem Stress und für die Aufrechterhaltung einer reduzierenden Umgebung

verantwortlich sind, wie z.B. Katalase, Glutathion Peroxidase und Glutathion Reduktase (Mehlotra, 1996). Stattdessen besitzen sie eine Trypanothion Reduktase, die Trypanothion als Kofaktor verwendet (Dumas *et al.*, 1997). Trypanothion wird aus zwei Molekülen Glutathion und einem Molekül Spermidin synthetisiert. Die Synthese wird in zwei aufeinanderfolgenden Schritten durchgeführt, die von der Glutathionylspermidin Synthase und der Trypanothion Synthase katalysiert werden. Eine Hemmung der Polyaminbiosynthese beeinflusst somit auch die Trypanothion-Synthese und ist deshalb ein guter Ansatz für anti-trypanosomal wirkende Medikamente.

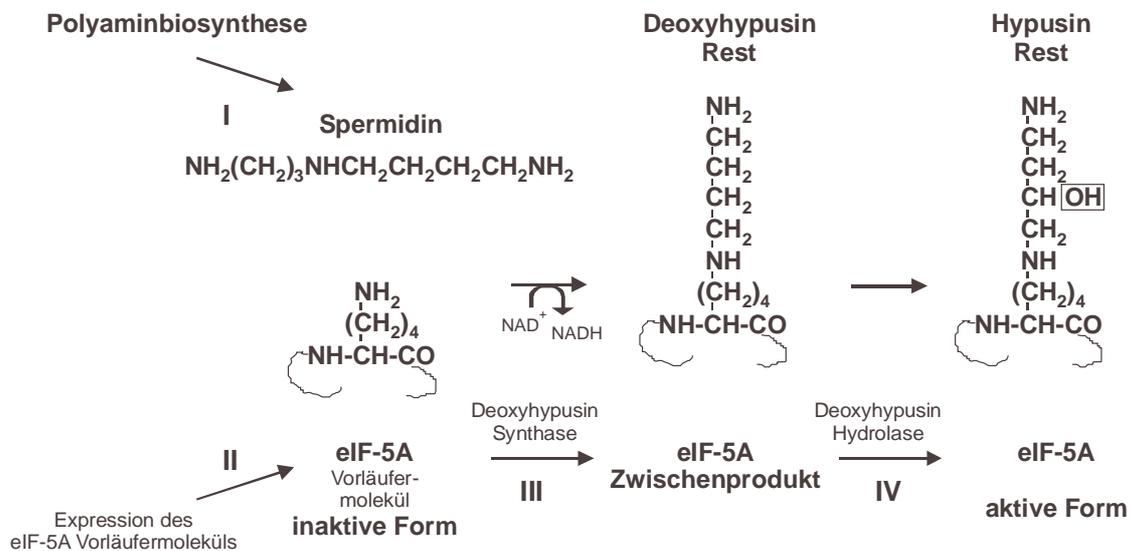


Abbildung 1.4: Die Hypusin-Modifikation von eIF-5A

Biosynthese des Hypusin-modifizierten eIF-5A. Die Struktur der Seitenkette des spezifischen Lysinrestes in eIF-5A und seine Modifikation sind schematisch dargestellt. (Modifiziert nach Park *et al.*, 1993).

1.3 ODC als Schlüsselenzym der Polyaminbiosynthese

Die Aktivität der Ornithine Decarboxylase (ODC) wurde erstmals 1968 beschrieben (Raina and Jänne, 1968; Russell and Snyder, 1968; Pegg and Williams-Ashman, 1968). Seitdem wurden eine Vielzahl von Artikeln veröffentlicht, die Funktion, Struktur und Regulation dieses Schlüsselenzyms der Polyaminbiosynthese beschreiben.

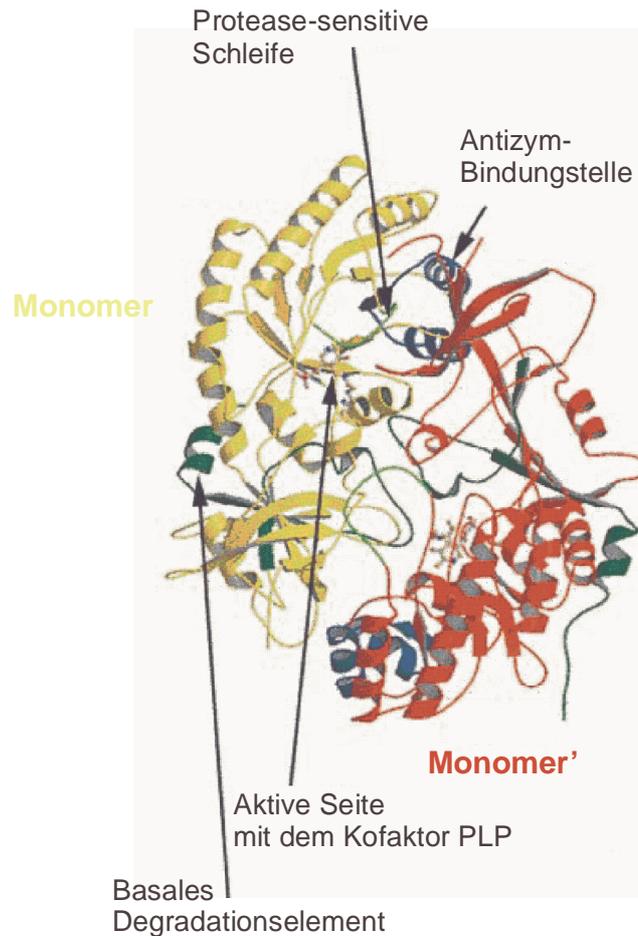


Abbildung 1.5: **Die Kristallstruktur von humaner ODC**

Kristallstruktur von Ornithin-Decarboxylase aus humaner Leber. Die beiden ODC-Untereinheiten sind in gelb und rot dargestellt, mit jeweils einem Molekül Pyridoxal-5-Phosphat (PLP), gebunden an Lysin 69. Die potentiellen Antizym-Bindestellen sind blau markiert, die basalen Degradationselemente sind dunkelgrün eingezeichnet. (Modifiziert nach Almrud *et al.*, 2000)

Die aktive Ornithin-Decarboxylase ist ein Homodimer, das aus zwei identischen Untereinheiten zusammengesetzt ist (siehe Abbildung 1.5). Das Enzym enthält pro Untereinheit ein Molekül Pyridoxal-5-Phosphat (PLP) als Kofaktor. Die ODC befindet sich stets in einem Gleichgewicht zwischen der monomeren inaktiven Form und der dimeren aktiven Form. Die Kristallisierung der humanen ODC ergab, daß der C-Terminus mit den basalen Degradationselementen (PEST-Region), nicht in dem Homodimer verborgen liegt, wie zunächst vermutet wurde (Almrud *et al.*, 2000). Aus dem Vergleich mit der ODC der Maus und der von *Trypanosoma brucei* konnte außerdem die Lage der potentiellen Antizym-Bindungsstelle ermittelt werden, die für die Inaktivierung und den proteolytischen Abbau der ODC von großer Bedeutung ist.

1.3.1 Transkriptionelle Regulation der ODC

Die Regulation der ODC-Aktivität ist ein wichtiger Mechanismus, um die Polyaminkonzentrationen in der Zelle zu kontrollieren. So ist ein Anstieg der ODC-Aktivität notwendig, damit ruhende Zellen wieder in den Zellzyklus eintreten können, und eine erhöhte ODC-Aktivität wird mit fast allen Tumorvarianten in Verbindung gebracht. Die Aktivität der ODC wird daher während des normalen Zellwachstums und der Differenzierung strengstens reguliert. Es ist bekannt, daß viele Wachstumsfaktoren einen raschen und starken Anstieg der ODC-Aktivität auslösen, der zunächst einmal auf einer verstärkten Transkription beruht. Hormone, aktivierte Onkogene und Mitogene können diese Induktion der ODC bewirken. So führt z.B. eine Aktivierung der Proteinkinase C durch Phorbolster und eine damit verbundene Aktivierung des MAPK-Signalweges zu einem Anstieg der ODC-Aktivität (Flamigni *et al.*, 2001). Inhibitoren des MAPK-Signalweges bewirken eine Reduktion der ODC mRNA (Flamigni *et al.*, 1999). Auch eine Aktivierung der Proteinkinase A durch Forskolin führt zu einem Anstieg der ODC-mRNA (Hurta and Wright, 1994)

Die Promotorregion von Ratte, Maus und humaner ODC besitzt viele Bindungsstellen für Wachstums-relevante Transkriptionsfaktoren. Einige Transkriptionsfaktoren, die an der basalen sowie an der stimulierten Transkription der ODC beteiligt sind, wurden identifiziert. So besitzt der ODC-Promotor mehrere Bindungsstellen für den basalen Transkriptionsfaktor Sp1 und zwei Bindungsstellen für Mitglieder der CREB / ATF Familie von Transkriptionsfaktoren (Law *et al.*, 1998).

Die Promoterregion des ODC-Gens besitzt einige GC-reiche Boxen. Neben dem basalen Transkriptionsfaktor Sp1 binden hier auch inhibitorisch wirkende Transkriptionsfaktoren wie ZBP-89 (früher bekannt als NF-ODC₁) und das verwandte ZBP-99 (Law *et al.*, 1998; Law *et al.*, 1999). Diese Faktoren wurden in einem Hefe-1-Hybrid-System identifiziert, wobei ein GC-reiches ODC-Promotorelement als Target verwendet wurde.

Auch der Wilms' Tumor Suppressor WT1 bindet an mehrere GC-reiche Stellen innerhalb des ODC-Promotors und hemmt die Transkription der ODC (Moshier *et al.*, 1996). Es konnte gezeigt werden, daß neben Syndecan-1 und dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGR) auch die Ornithin-Decarboxylase ein transkriptionelles *in vivo* Target des Tumorsuppressors WT1 ist (Li *et al.*, 1999). Ein Aktivitätsverlust des Transkriptionsfaktors WT1 ist an der Entstehung des Wilms' Nephroblastoma beteiligt. Dabei handelt es sich um einen embryonalen Tumor, der durch die maligne Transformation von renalen Stammzellen entsteht. Dies ist interessant im Hinblick darauf, daß während der Embryonalentwicklung die Polyaminkonzentrationen besonders hoch sind.

ODC wurde außerdem als eines der ersten Gene identifiziert, die durch den onkogenen Transkriptionsfaktor c-Myc reguliert werden (Bello-Fernandez *et al.*, 1993). Mutationen, die zu einer Überexpression von c-Myc führen, findet man bei vielen Krebsarten. Insgesamt weisen die ODC-Gene von Maus und Mensch mehrere Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor c-Myc auf. So enthält das humane ODC-Gen drei perfekte c-Myc

Bindungsstellen, eine im ODC-Promotor und zwei weitere in Intron 1. Zellen, die eine homozygote Deletion von c-Myc aufweisen, sind jedoch noch in der Lage, ODC zu exprimieren (Bush *et al.*, 1998). Dies bedeutet, daß c-Myc für die ODC-Expression nicht essentiell ist, sondern während Phasen der verstärkten Zellproliferation die ODC-Expression zusätzlich stimuliert.

1.3.2 Translationale Regulation der ODC

Die Schlüsselenzyme der Polyaminbiosynthese wie ODC und AdoMetDC werden ebenfalls auf der Ebene der Translation reguliert. Die 5'UTR-Sequenzen von ODC und AdoMetDC sind beide äußerst lang (~300 Nukleotide), hochstrukturiert und enthalten kleine interne offene Leserahmen (Shantz and Pegg, 1999). Die Regulation der Translation der beiden Enzyme ist jedoch recht verschieden. So hängt die Translation der ODC stärker von der Sekundärstruktur ihrer mRNA ab und ist auf die intrazelluläre Verfügbarkeit des Initiationsfaktors eIF-4E angewiesen.

Der eukaryotische Initiationsfaktor eIF-4E ist die α -Untereinheit des Initiationsfaktors eIF-4F. Hierbei handelt es sich um einen Komplex, der bei der Initiation der Translation für die Entwindung von RNA-Sekundärstrukturen verantwortlich ist. eIF-4E bindet an die 7-Methylguanosin-Kappe von mRNA und wird deshalb auch als „cap binding protein“ bezeichnet. Die Überexpression von eIF-4E führt bei NIH-3T3 Zellen (pMV7-4E Zellen) zu neoplastischer Transformation (Lazaris-Karatzas *et al.*, 1990), die mit einer Überexpression der ODC einhergeht. Es wurde gezeigt, daß die Expression einer dominant-negativen ODC-Mutante die eIF-4E induzierte Zelltransformation verhindern kann (Shantz *et al.*, 1996).

Die Translation der Ornithin-Decarboxylase erreicht während des Zellzyklus zweimal einen Höchststand, nämlich während des G1/S- und des G2/M-Übergangs. Die ODC-Induktion während des G1/S-Übergangs ist eindeutig „cap“-abhängig. Obwohl in der Phase des G2/M-Übergangs die „cap“-abhängige Initiation der Translation blockiert ist, findet hier trotzdem eine Translation der ODC-mRNA statt. Es konnte gezeigt werden, daß die ODC-mRNA eine „cap“-unabhängige interne ribosomale Einstiegsstelle (IRES) besitzt, die ausschließlich auf den G2/M-Übergang beschränkt ist (Pyronnet *et al.*, 2000). Dies gewährleistet, daß während dieser Phase des Zellzyklus auch ausreichende Mengen an Polyaminen zur Verfügung stehen, die für die Spindelformation und Chromatinkondensation benötigt werden.

1.3.3 Posttranslationale Regulation der ODC

Es wurde beschrieben, daß Polyamine aufgrund eines Rückkopplungs-Mechanismus in der Lage sind, die Translation der Schlüsselenzyme der Polyaminbiosynthese zu regulieren

(Shantz and Pegg, 1999). Inwieweit diese Regulation auf der Ebene der Translation abläuft, ist jedoch umstritten. Es wird allgemein vermutet, daß die Polyamin-bedingte Regulation der ODC vorwiegend posttranslational geschieht und das Resultat eines Polyamin-induzierten ODC-Abbaus ist. Diese Vermutung beruht zum einen darauf, daß Polyamine eine Abnahme der ODC-Aktivität nicht aber der β -Galaktosidase-Aktivität induzieren, wenn beide Enzyme abwärts von dem 5'UTR des ODC-Promotors exprimiert werden und zum anderen darauf, daß eine Regulierung der ODC-Aktivität durch Polyamine auch in Abwesenheit des 5'UTRs von ODC beobachtet werden kann (van Daalen Wetters *et al.*, 1989).

Schon 1976 beschrieben Canellakis und Mitarbeiter das Erscheinen eines ODC-inhibierenden Proteins nach Zugabe von Putrescin zum Medium (Heller *et al.*, 1976). Sie schlugen vor, dieses Protein aufgrund seiner Funktion Antizym zu nennen. Die Existenz dieses Proteins wurde jedoch lange in Frage gestellt. Erst 1990 gelang es Hayashi und Mitarbeitern mit Hilfe von monoklonalen Antizym-Antikörpern (Matsufuji *et al.*, 1990a) ein aminoterminal verkürztes Fragment von Antizym (Z1) aus einer Lambda (λ gt11) Rattenleber cDNA-Bank zu isolieren (Matsufuji *et al.*, 1990b). Das gereinigte rekombinante Z1-Protein war in der Lage, die ODC-Aktivität *in vitro* zu inhibieren.

Vorangegangene Studien hatten außerdem gezeigt, daß Antizym nicht nur die ODC-Aktivität inhibiert, sondern auch an dem proteolytischen Abbau des Enzyms beteiligt ist (Murakami and Hayashi, 1985). Diese Beobachtung konnte mit der isolierten Z1-Antizym-cDNA bestätigt werden. Hierfür wurden Hepatoma-Zellen mit einem Dexamethason induzierbaren Z1-Konstrukt transfiziert. Nach Zugabe von Dexamethason konnte eine starke Abnahme der ODC-Aktivität und des Proteins nachgewiesen werden (Murakami *et al.*, 1992b).

Die Säuger-ODC wurde schon lange als ein sehr labiles Protein beschrieben, das nur eine geringe Halbwertszeit besitzt. Demgegenüber ist die ODC aus *Trypanosoma brucei* äußerst stabil. Der C-Terminus der Säuger-ODC enthält ein destabilisierendes Degradationselement, eine sogenannte PEST-Region, wohingegen trypanosomaler ODC diese Region fehlt. PEST-Regionen sind reich an Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) und dienen bei vielen rasch abgebauten Proteinen wie fos oder $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ als proteolytisches Signal (Rechsteiner and Rogers, 1996). Die Deletion der PEST-Region der ODC der Maus durch eine C-terminale Verkürzung des Proteins, führt zu einer deutlichen Stabilisierung der ODC (Ghoda *et al.*, 1989). Es konnte jedoch gezeigt werden, daß nicht die komplette PEST-Region für den raschen proteolytischen Abbau der ODC verantwortlich ist. So führt der Austausch einer einzigen Aminosäure innerhalb der PEST-Region (Cys441 - Trp) zu einer starken Stabilisierung des Proteins (Miyazaki *et al.*, 1993). Auch die Entfernung der letzten fünf Aminosäuren vor dem C-Terminus (außerhalb der PEST-Region) stabilisiert das Protein (Ghoda *et al.*, 1992).

Insgesamt konnte gezeigt werden, daß mehrere Strukturelemente der ODC am Abbau beteiligt sind. Wird der C-terminale Bereich der murinen ODC an die äußerst stabile trypanosomale ODC kloniert, so wird dieses Hybridprotein instabil und infolgedessen rasch abgebaut (Ghoda

et al., 1990). Dieser Abbau ist jedoch konstitutiv und nicht Polyamin-bedingt. Vergleichende Untersuchungen zwischen trypanosomaler und Säuger-ODC ergaben, daß der C-Terminus von ODC essentiell ist, sowohl für den konstitutiven als auch für den Antizym-abhängigen Abbau. Darüber hinaus ist eine interne Region für die Antizym-Bindung und den Polyamin-bedingten Abbau entscheidend. Die ODC der Maus besitzt außerdem noch eine weitere interne PEST-Region, die keinen Einfluß weder auf den konstitutiven noch auf den Polyamin-induzierten ODC-Abbau hat.

Die komplexe Rolle von Antizym am Abbau von ODC sowie der Mechanismus der Antizym-Expression und Regulation werden im nächsten Kapitel ausführlich diskutiert.

1.4 Die Regulation der ODC durch Antizym und Antizym-Inhibitor

Die Antizym-vermittelte posttranslationale Regulation der ODC beinhaltet eine Reihe von spezifischen Mechanismen.

- 1 Die Stabilität der Ornithin-Decarboxylase nimmt stark ab, wenn der Polyaminspiegel steigt.
- 2 Antizym fördert den Abbau der ODC durch das 26S-Proteasom ohne Ubiquitinierung.
- 3 Die Antizym-Synthese wird durch einen einzigartigen ribosomalen Leseraster-Wechsel reguliert.
- 4 Antizym besitzt selbst einen Antizym-Inhibitor.

1.4.1 Antizym und der proteasomale Abbau der ODC

Antizym bindet ODC mit hoher Affinität und bildet Antizym / ODC-Heterodimere. Hierdurch wird die ODC inhibiert und der proteolytische Abbau gefördert. Neben dem C-Terminus ist dabei auch eine interne ODC-Region für den Antizym-vermittelten Abbau der ODC verantwortlich. Für die ODC der Maus wurde gezeigt, daß die Antizym-Bindungsdomäne die Aminosäuren 117-140 umfaßt (Li and Coffino, 1992). Diese Erkenntnis beruht auf dem Vergleich mit trypanosomaler ODC, die nicht in der Lage ist, Antizym zu binden. Die interne Region der Antizym-Bindung ist bei allen Spezies hochkonserviert, die einen Antizym-abhängigen ODC-Abbau aufweisen. Es wird davon ausgegangen, daß die Bindung von Antizym eine Konformationsänderung der ODC bewirkt, die den proteolytischen Abbau begünstigt (Li and Coffino, 1993). Der proteolytische Abbau der ODC wird hierbei durch das Proteasom vermittelt (Murakami *et al.*, 2000). Proteasom-Inhibitoren wie Lactacystin hemmen den Abbau fast völlig.

Proteasome sind multimere Proteinkomplexe, die aus einer zentralen Proteinase (dem 20S-Proteasom) und zwei flankierenden regulatorischen Subkomplexen bestehen, die als PA700

(19S-Komplex) und PA28 (11S-Regulator) bezeichnet werden (Ferrell *et al.*, 2000). Die ODC wird *in vitro* in Anwesenheit von ATP und Antizym rasch durch das 26S, aber nicht durch das 20S-Proteasom abgebaut (Murakami *et al.*, 1992a). Das 26S-Proteasom besteht aus dem 20S-Proteasom flankiert von zwei PA700-Subkomplexen. Der Abbau der ODC erfolgt ohne Ubiquitinierung und stellt diesbezüglich eine Besonderheit dar (Murakami *et al.*, 1992a). In der Regel ist das 26S-Proteasom für den Abbau ubiquitiniertes Proteine verantwortlich. Hierbei kann es sich um Zellzyklusproteine handeln, wie Cycline oder p53, um defekte Proteine, oder um die Prozessierung von Peptiden für die Antigenpräsentation von MHC Klasse I Molekülen (Jentsch and Schlenker, 1995). ODC repräsentiert das am besten charakterisierte System für einen Ubiquitin-unabhängigen proteasomalen Abbau (Murakami *et al.*, 2000). Antizym spielt hierbei eine zentrale Rolle, denn die Inaktivierung von Antizym durch Antizym-Inhibitor hemmt den proteasomalen Abbau der ODC fast völlig (Murakami *et al.*, 1993).

Was Antizym betrifft, so wurde gezeigt, daß der C-terminale Bereich von Antizym für die Bindung und Inhibierung der ODC ausreichend ist. Um den proteasomalen Abbau zu stimulieren ist jedoch auch ein interner Bereich von Antizym entscheidend (Li *et al.*, 1996). Für den N-terminalen Bereich ist die biochemische Funktion bislang nicht bekannt. Ähnlich wie Ubiquitin wird auch Antizym wiederverwertet, einige Moleküle Antizym können den Abbau einer großen Anzahl von ODC-Molekülen fördern (Tokunaga *et al.*, 1994).

1.4.2 Die Regulation der Antizym-Expression

Polyamine induzieren die Expression von Antizym, die Konzentration der Antizym-mRNA bleibt davon weitgehend unverändert. Dies ließ vermuten, daß die Regulation der Antizyme durch Polyamine vorwiegend auf posttranslationaler Ebene geschieht. Hinzu kommt, daß der Antizym-Promoter sehr stark ist und die Antizym-mRNA eine sehr lange Halbwertszeit aufweist (Miyazaki *et al.*, 1992). Im Einklang damit steht, daß der Inhibitor der Proteinbiosynthese Cycloheximid die Antizym-Expression verhindert, wohingegen der Transkriptioninhibitor Actinomycin D darauf keinen Einfluß hat (Matsufuji *et al.*, 1990a).

Es zeigte sich, daß Polyamine die korrekte Translation von Antizym-mRNA stimulieren. Dies wurde offensichtlich, als der erste Antizym cDNA-Klon (Z1) isoliert wurde. Die kodierende Sequenz dieses Klons besitzt einen offenen Leserahmen (ORF2), dem aber das Startkodon fehlt. Das erste mögliche Startkodon liegt dagegen in einem weiteren offenen Leserahmen (ORF1), der jedoch sehr kurz ist. Dieses Protein wäre vom Molekulargewicht viel niedriger als das native Antizym. Nur durch die Kombination beider Leserahmen und einem ribosomalen Leseraster-Wechsel um +1 läßt sich ein funktionsfähiges Antizym generieren (siehe Abbildung 1.6). Interessanterweise findet dieser Leseraster-Wechsel nur dann statt, wenn die Polyaminkonzentration hoch ist. Es handelt sich hier um das einzige Beispiel eines

Antizym (Antizym 2) identifiziert (Ivanov *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurde ein drittes, gewebsspezifisch exprimiertes Antizym (Antizym 3) charakterisiert (Ivanov *et al.*, 2000c) und aus einer Gehirn-cDNA-Bank ein EST-Klon isoliert, der ein potentielles viertes Antizym darstellt. Der phylogenetische Stammbaum der Antizyme (siehe Abbildung 1.7) zeigt, daß Antizym 3 als erstes von den anderen Antizymen abweicht. Antizym 2 besitzt eine größere Ähnlichkeit zu Antizym 1 (55% identische Aminosäuren) als zu Antizym 3 (29% identische Aminosäuren) und steht unter einem höheren evolutionären Druck. Dies läßt sich daran erkennen, daß Antizym 2 von Maus und Mensch eine größere Identität (99,5%) auf Aminosäureebene aufweisen, als es bei Antizym 1 der Fall ist (84%) (Ivanov *et al.*, 2000a).

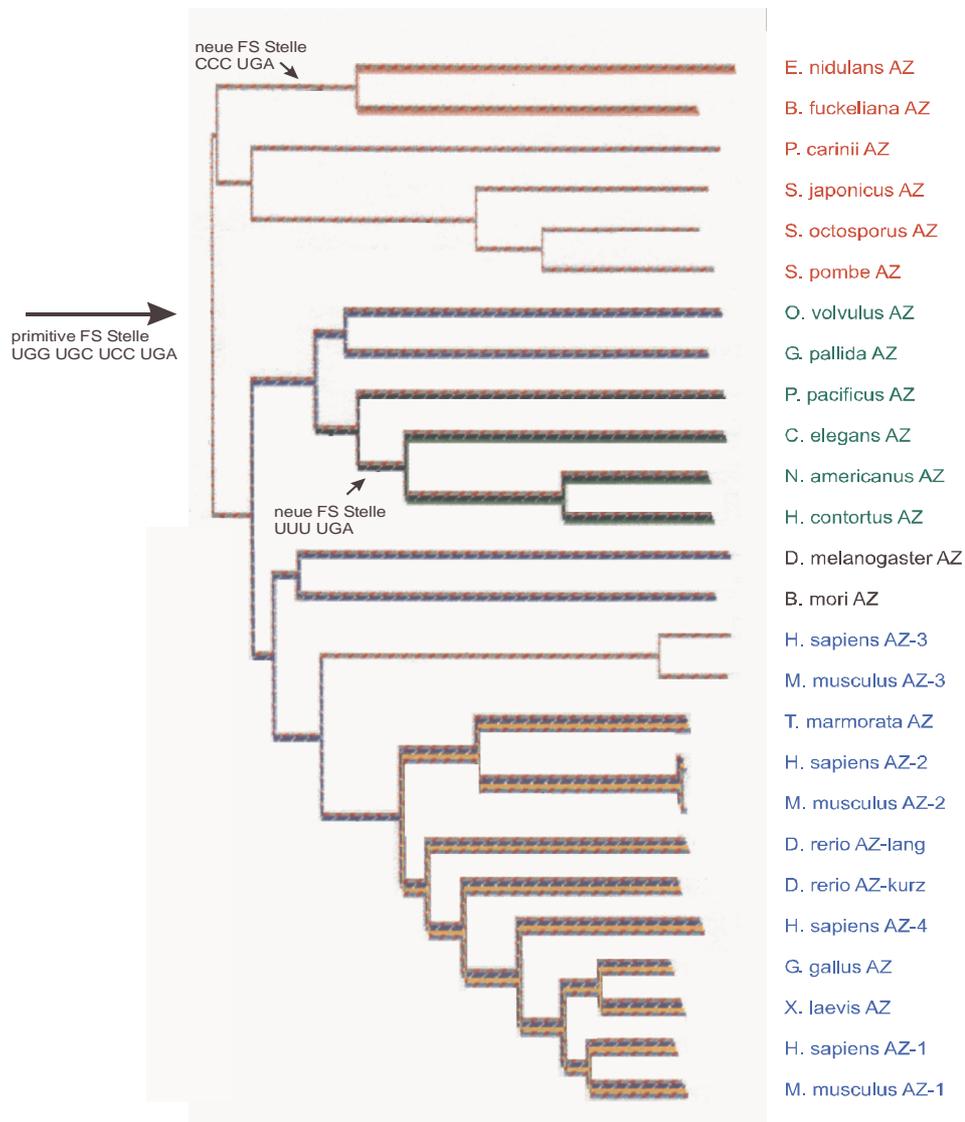


Abbildung 1.7: Der phylogenetische Stammbaum der Antizyme

Phylogenetischer Stammbaum der Antizyme basierend auf der Aminosäuresequenz von ORF1 und ORF2. Der Stammbaum wurde mit dem Programm Clustal X erstellt. Frameshift (FS) steht für Leseraster-Wechsel. (Modifiziert nach Ivanov *et al.*, 2000a)

Das zuerst entdeckte, ubiquitär exprimierte Antizym 1 besitzt mehrere Eigenschaften. Es hemmt die ODC, fördert den Abbau der ODC durch das 26S-Proteasom und reguliert den Polyamintransport. Es wurde außerdem beobachtet, daß eine gezielte Überexpression von Antizym 1 die Bildung von Hauttumoren unterdrückt (Feith *et al.*, 2001). Antizym 2-mRNA wird zwar ebenfalls ubiquitär exprimiert, kommt jedoch in der Zelle etwa 16mal weniger häufig vor (Ivanov *et al.*, 1998). Das Protein bindet ODC und hemmt die Enzymaktivität. Außerdem inhibiert Antizym 2 die Aufnahme von Spermidin aus dem Medium und fördert den proteolytischen Abbau der ODC, wenn man es in Insektenzellen zusammen mit ODC koexprimiert. Im Unterschied zu Antizym 1 kann in einem Retikulozytenlysat exprimiertes Antizym 2 *in vitro* den Abbau von ODC nicht stimulieren (Zhu *et al.*, 1999). Dasselbe ist der Fall für das zweite Zebrafisch-Antizym (auch bezeichnet als Antizym lang) (Saito *et al.*, 2000). Ein weiteres Mitglied der Antizym-Familie, Antizym 3, hemmt ebenfalls die Aktivität der ODC *in vitro*. Dieses Gen ist besonders interessant im Hinblick auf sein Expressionsmuster. Es wird fast ausschließlich im Hoden während der Spermatogenese gebildet und besitzt vermutlich deshalb eine wichtige Rolle bei der Fortpflanzung (Ivanov *et al.*, 2000c). Ob auch Antizym 3 die Aufnahme von Polyaminen hemmen kann, wurde noch nicht untersucht.

1.4.4 Der Polyamintransport und seine Regulation durch Antizym

Inhibitoren der Polyaminbiosynthese wie DFMO wurden schon vor einiger Zeit zur Behandlung von Krebs entwickelt. Obwohl sie erfolgversprechende Ergebnisse in Zellkultur zeigen, versagen diese Substanzen in der Regel bei *in vivo* Studien. Hierbei spielt die Aufnahme von Polyaminen aus der Umgebung eine entscheidende Rolle. Es hat sich gezeigt, daß Zellen ein sehr effektives System für den Transport von Polyaminen besitzen, das Tumorzellen vor Polyaminmangel und einer damit verbundenen Wachstumshemmung bewahren kann (Seiler *et al.*, 1996). Werden immundefiziente Mäuse mit der Leukämiezelllinie L1210 inokuliert, so entwickeln sie rasch eine Leukämie. Die Behandlung mit DFMO führt zu einer geringfügigen Verbesserung der Überlebensrate. Inokuliert man dagegen diese Mäuse mit einer mutierten Form der Leukämie-Zelllinie L1210, die einen Defekt im Polyamintransport aufweist, so erhöht sich die Überlebensrate. Behandelt man nun diese Mäuse zusätzlich mit DFMO, dem Inhibitor der Ornithin-Decarboxylase, so ist der therapeutische Effekt wesentlich höher als bei solchen, die mit der Ursprungszelllinie inokuliert wurden (Persson *et al.*, 1988). Der Transport der Polyamine ist Energie- und Temperatur-abhängig, was darauf hindeutet, daß ein Transportprotein daran beteiligt ist. Bis heute ist jedoch dieser Transporter weder identifiziert, kloniert noch ausreichend molekular charakterisiert. Wie bereits erwähnt, sind die Proteine der Antizym-Familie an der Polyaminaufnahme beteiligt. Transfiziert man Zellen mit einem induzierbaren Plasmid, daß

Antizym 1 oder 2 enthält, so führt dies zu einer Inhibition der Polyaminaufnahme (Mitchell *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1999). Die Antizym-Region, die für den Polyamintransport wichtig ist, überlappt dabei mit der Region, die an der Bindung von ODC und deren Abbau beteiligt ist (Sakata *et al.*, 1997). Darüber hinaus sind auch Proteoglycane an dem Polyamintransport beteiligt. Studien haben gezeigt, daß die Aufnahme der Polyamine von der Expression von Proteoglycanen abhängig ist, insbesondere solchen, die Heparansulfat enthalten (Belting *et al.*, 1999). Die negativ geladenen Carboxyl- und Sulfatgruppen der Glycosaminglycane binden sehr gut an die positiv geladenen Polyamine. Proteoglycane werden kontinuierlich internalisiert, zusammen mit daran gebundenen Liganden wie z.B. Wachstumsfaktoren. Aufgrund der hohen Transportgeschwindigkeit der Polyamine ist es jedoch fraglich, ob Endocytose der dominierende Aufnahmeweg ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß sowohl eine genetische wie auch eine pharmakologische Hemmung der Proteoglycansynthese die Zellen wesentlich empfindlicher für die Behandlung mit DFMO macht (Belting *et al.*, 2002). Auch *in vivo* Studien bestätigen diese Ergebnisse. Injiziert man immundefizienten Mäusen CHO-Zellen, so bilden sich solide Tumore mit Lungenmetastasen. Es konnte in diesem Maus-Model gezeigt werden, daß eine kombinierte Behandlung der Tiere mit DFMO und einem Inhibitor der Heparansulfatsynthese die Bildung von Lungenmetastasen drastisch reduziert (Belting *et al.*, 2002).

1.4.5 Antizym-Inhibitor

Schon 1982 war in Leberextrakten von Ratte ein makromolekularer Faktor entdeckt worden, der die Aktivität von Antizym inhibiert (Fujita *et al.*, 1982). Dieser Faktor wurde deshalb Antizym-Inhibitor genannt. Er war Hitze-instabil und von derselben molekularen Größe wie ODC. Dies führte lange zu der Vermutung, daß es sich nicht um ein neues Protein handelt, sondern um eine posttranslational modifizierte Form der ODC. Dagegen sprach, daß Antizym-Inhibitor kaum Kreuzreaktivität mit anti-ODC Antikörpern zeigte (Kitani and Fujisawa, 1989) und selbst keine ODC-Aktivität besaß (Fujita *et al.*, 1982). Ähnlich wie ODC, scheint auch Antizym-Inhibitor Homodimere zu bilden (Kitani and Fujisawa, 1989). Das Protein bindet mit hoher Affinität an Antizym 1 und ist in der Lage, aktive ODC aus dem Komplex mit Antizym wieder freizusetzen (Fujita *et al.*, 1982).

Die Klonierung des Antizym-Inhibitors der Ratte ergab, daß das Protein eine Homologie von circa 50% zur ODC der Ratte aufweist (Murakami *et al.*, 1996). Interessanterweise ist die Homologie zwischen diesen beiden Proteinen größer als die Homologie zwischen der ODC aus Ratte und der aus Hefe. Im Unterschied zur ODC besitzt Antizym-Inhibitor jedoch keine PEST-Sequenzen, trotzdem hat das Protein eine ähnlich kurze Halbwertszeit wie die ODC (Murakami *et al.*, 2000). Wie der proteolytische Abbau von Antizym-Inhibitor geregelt wird, ist aber noch unbekannt. Auch über die *in vivo* Regulation von Antizym-Inhibitor ist relativ

wenig bekannt. Bekannte Aktivatoren der ODC wie Thioacetamid und Isoprenalin erhöhen auch die Aktivität von Antizym-Inhibitor (Fujita *et al.*, 1982; Murakami *et al.*, 1996). Im Gegensatz zur ODC ist Antizym-Inhibitor jedoch nicht sehr empfänglich gegenüber einem erhöhten Polyamin-Spiegel (Murakami *et al.*, 1989).

Interessanterweise wurde Antizym-Inhibitor als ein Gen identifiziert, dessen Expression im Magengewebe von Magenkrebs-Patienten hochreguliert ist (Jung *et al.*, 2000). Da eine erhöhte ODC-Aktivität bei nahezu allen Krebsarten nachgewiesen wurde, kann man davon ausgehen, daß auch Antizym-Inhibitor hierzu beiträgt.

Berücksichtigt man zusammenfassend nun auch die Reaktivierung der ODC durch Antizym-Inhibitor, so ergibt sich insgesamt ein äußerst komplexes Bild der posttranslationalen Regulation der ODC, das in Abbildung 1.8 abschließend zusammengefaßt ist.

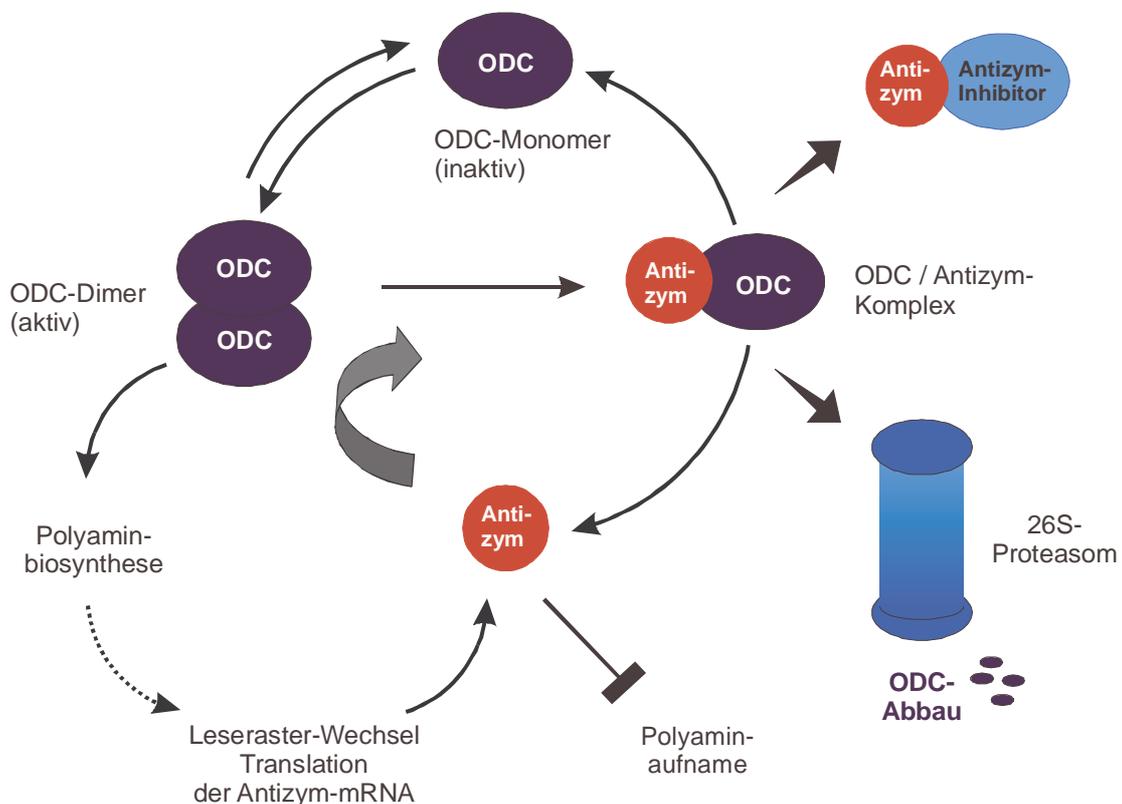


Abbildung 1.8: Die posttranslationale Regulation der ODC durch Antizym und Antizym-Inhibitor

Die Ornithin-Decarboxylase ist nur als Dimer aktiv. Antizym bindet an ODC und bildet ein ODC / Antizym-Heterodimer. Hierdurch wird die ODC-Aktivität gehemmt und der proteolytische Abbau der ODC durch das 26S-Proteasom eingeleitet. Darüber hinaus hemmt Antizym auch die Aufnahme der Polyamine aus der Umgebung. Antizym-Inhibitor kann ODC aus dem Komplex mit Antizym freisetzen, so daß das Enzym seine Aktivität wiedererlangt. Die Expression der Antizyme wird durch einen Polyamin-regulierten Leseraster-Wechsel gesteuert.

1.5 Zielsetzung

Die Mehrheit der zur Zeit verwendeten Pharmaka sind molekulare Agonisten oder Antagonisten ihrer Zielproteine. Aus diesem Grund ist die Identifizierung von spezifischen Liganden für die entsprechenden Enzyme oder Rezeptoren eine grundlegende Voraussetzung für die Medikamentenentwicklung. Der klassische Ansatz zur Entdeckung von Ligand-Rezeptor-Interaktionen beruht in erster Linie auf biochemischen *in vitro* Methoden wie radioaktiven Liganden-Bindungsstudien, Affinitätschromatographie und Photoaffinitätsmarkierung. Das von (Licitra and Liu, 1996) entwickelte Hefe-3-Hybrid-System ermöglicht dagegen die rasche *in vivo* Identifikation von Ligand-Rezeptor-Interaktionen und stellt eine Weiterentwicklung des klassischen Hefe 2-Hybrid-Systems von (Fields and Song, 1989) dar. Ziel dieser Arbeit war es, das Hefe-3-Hybrid-System im Labor zu etablieren, die Sensitivität des Systems zu verbessern und das Hefe-3-Hybrid-System zur Identifikation neuer Interaktionspartner für das Immunsuppressivum FK506 anzuwenden. Die aus diesem Screen isolierten Proteine sollten identifiziert und charakterisiert werden. Hierbei wurde unter anderem eine Spleißvariante von Antizym-Inhibitor als spezifischer Interaktor für FK506 isoliert. Für die weitere Charakterisierung dieses Proteins sollte in Hefe ein nicht-radioaktiver *in vivo* Test zur Funktionsanalyse von ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor aufgebaut werden. Anhand dieses Tests sollten die Aktivitäten der einzelnen am Komplex beteiligten Proteine untersucht werden. Im letzten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit sich die mit Hefe gewonnenen Daten auf höhere Organismen wie Säugerzellen übertragen lassen.

2 Material

2.1 Bakterienstämme

Der Stamm *E. coli* TOP10F' (Grant *et al.*, 1990) wurde von Invitrogen (Groningen, Niederlande) bezogen, der Stamm *E. coli* DH5 α (Hanahan, 1983) stammt von Clontech (Heidelberg). Die Bakterienstämme *E. coli* JM110 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) und *E. coli* KC8 (Zervos *et al.*, 1993) wurden der Stammsammlung des Arbeitskreises entnommen.

| | |
|--------------|--|
| TOP10F' | F' { <i>lacI^q</i> , Tn10(Tet ^R)}, <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i> |
| DH5 α | <i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169, ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, F', λ ⁻ |
| JM110 | <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>thi-1</i> , <i>lacY</i> , <i>galK</i> , <i>galT</i> , <i>ara</i> , <i>tonA</i> , <i>tsx</i> , <i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>supE44</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), F'[<i>tra</i> Δ 36, <i>proAB</i> ⁺ , <i>lacI^q</i> Δ M15] |
| KC8 | <i>hsdR</i> , <i>leuB600</i> , <i>trpC9830</i> , <i>pyrF::Tn5</i> , <i>hisB436</i> Δ <i>lacX74</i> , <i>strA</i> , <i>galU</i> , <i>galK</i> |

2.2 Hefestämme

Die *Saccharomyces cerevisiae* Stämme EGY48 und EGY188 (Zervos *et al.*, 1993) stammen aus dem DupLex-ATM Hefe-2-Hybrid-System von OriGene Technologies (Rockville, MD, USA). Der *S. cerevisiae* Stamm W303-1a (ATCC-Nr. 208352) wurde bei American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) bestellt. Der *S. cerevisiae* Stamm UC100 (Finegold *et al.*, 1990) wurde der Stammsammlung des Arbeitskreises entnommen. Die *S. cerevisiae* Stämme Y10000 und Y15034 wurden von Euroscarf (Frankfurt) bezogen.

| | |
|---------|--|
| EGY48 | MAT α , <i>trp1</i> , <i>his3</i> , <i>ura3</i> , <i>leu2::6 LexAop-LEU2</i> |
| EGY188 | MAT α , <i>trp1</i> , <i>his3</i> , <i>ura3</i> , <i>leu2::2 LexAop-LEU2</i> |
| W303-1a | MAT α , <i>ade2-1</i> , <i>ura3-1</i> , <i>his3-11</i> , <i>trp1-1</i> , <i>leu2-3</i> , 112, <i>can1-100</i> |
| UC100 | MAT α , <i>his3</i> Δ 1, <i>leu2</i> , <i>ura3</i> , <i>trp1</i> , <i>pep4::HIS3</i> , <i>prb1</i> |
| Y10000 | MAT α , <i>his3</i> Δ 1, <i>leu2</i> Δ 0, <i>lys2</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0 |
| Y15034 | MAT α , <i>his3</i> Δ 1, <i>leu2</i> Δ 0, <i>lys2</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0, YKL184w::kanMX4 |

2.3 Zelllinie

Es wurde die humane embryonale Nierenzelllinie HEK 293, American Type Culture Collection, CRL-1573 (Rockville, MD, USA) verwendet.

2.4 Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden von Metabion (Planegg-Martinsried) und von MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

2.4.1 ODC-spezifische Oligonukleotide

ODC1.For 5'-GGA GAA TTC ATG AAC AAC TTT GGT AAT GAA GAG TTT GAC TGC-3'
 ODC1.Rev 5'-TAG CTC GAG CTA CAC ATT AAT ACT AGC CGA AGC ACA GGC TGC-3'
 ODCSeq2.For 5'-TGA AAG TTG CCA GAG CAC ATC-3'

2.4.2 Antizym-spezifische Oligonukleotide

OAZ1.Start 5'-GAG GAA TTC ATG GTG AAA TCC TCC CTG CAG CG-3'
 OAZ1Δ.For 5'-GGT GCT CCT GTG CCC CTC ACC-3'
 OAZ1Δ.Rev 5'-GGT GAG GGG CAC AGG AGC ACC-3'
 OAZ1.Rev 5'-GCA CTC GAG CTA CTC CTC CTC CTC TCC CGA AGA CTC TCT C-3'
 OAZ1GFP.Rev 5'-GCA AAG CTT CTC CTC CTC CTC TCC CGA AGA CTC-3'
 HA.OAZ1.For 5'-GGA GAA TTC ATG TAC CCT TAT GAT GTG CCA GAT TAT GCC TCT
 GTG AAA TCC TCC CTG CAG CG-3'

OAZ2.Start 5'-GAG GAA TTC ATG ATA AAC ACC CAG GAC AGT AGT ATT TTG CC-3'
 OAZ2Δ.For 5'-GTG GTG CTC CGA TGC CCC TCA C-3'
 OAZ2Δ.Rev 5'-GTG AGG GGC ATC GGA GCA CCA C-3'
 OAZ2.Rev 5'-GCA CTC GAG TTA GTC CTC ATC GGA CAA GTT CTG GTC-3'
 OAZ2GFP.Rev 5'-GCA AAG CTT GTC CTC ATC GGA CAA GTT CTG GTC-3'
 HA.OAZ2.For 5'-GGA GAA TTC ATG TAC CCT TAT GAT GTG CCA GAT TAT GCC TCT
 ATA AAC ACC CAG GAC AGT AGT ATT TTG CC-3'

OAZ3.Start 5'-GAG GAA TTC ATG CTG CCT CGT TGT TAT AAA AGC ATC-3'
 OAZ3Δ.For 5'-TCC AGT GCT CTG AGT CCC TAG-3'
 OAZ3Δ.Rev 5'-CTA GGG ACT CAG AGC ACT GGA-3'
 OAZ3.Rev 5'-GCA CTC GAG TCA AGG AGG CTC ACT GGG CAG G-3'
 OAZ3GFP.Rev 5'-GCA AAG CTT AGG AGG CTC ACT GGG CAG-3'
 HA.OAZ3.For 5'-GGA GAA TTC ATG TAC CCT TAT GAT GTG CCA GAT TAT GCC TCT
 CTG CCT CGT TGT TAT AAA AGC ATC-3'

OAZ4Δ.For 5'-CGG TGG TGC TCT GAT GTC CCT-3'
 OAZ4Δ.Rev 5'-AGG GAC ATC AGA GCA CCA CCG-3'
 OAZ4.Rev 5'-GCA CTC GAG CTA GCC CTG CAG CGA GTA GG-3'
 OAZ4GFP.Rev 5'-GCA AAG CTT GCC CTG CAG CGA GTA GG-3'

2.4.3 Antizym-Inhibitor-spezifische Oligonukleotide

| | |
|--------------------------|--|
| OAI1.For | 5'-GGA GAA TTC ATG AAA GGA TTT ATT GAT GAT GCA AAC TAC TCC G-3' |
| OAI _{Spe1} .For | 5'-GGA ACT AGT ATG AAA GGA TTT ATT GAT GAT GCA AAC TAC TCC G-3' |
| OAI150.For | 5'-GAC GAA TTC AAG GTC TTA CTA CAT ATT GCA ACA GAA G-3' |
| OAI150.Rev | 5'-TTA CTC GAG CTA CTT GGC ATT TGG GTG ATT ACG TGC-3' |
| OAI300.For | 5'-GAC GAA TTC TCT GGA GTA GAA AAA ACC GGA AGT GAT G-3' |
| OAI300.Rev | 5'-GCA CTC GAG CTA AGA GGG AAA TTT ATC ATT TTC AAC AAC-3' |
| OAI448.Rev | 5'-TAG CTC GAG TTA AGC TTC AGC GGA AAA GCT GTC TTC TTG GC-3' |
| OAI _{SP} .Rev | 5'-GCA CTC GAG TAA GCT TCA GCG GAA AAG CTC AT-3' |
| OAI _{flRT} .Rev | 5'-GAA GCG TTA ATG CCT GTT TAA GC-3' |
| OAI _{spRT} .Rev | 5'-TAA GCT TCA GCG GAA AAG CTC AT-3' |
| OAI _{Seq1} .For | 5'-GGT GGA GGA TTC ACG GGA AC-3' |
| OAI _{Seq2} .For | 5'-AAG AAC TTC TTC TTT GTG CCT TC-3' |
| OAI _{Seq3} .For | 5'-CAA GGA AGA TGA GCC TCT GTT TAC-3' |
| HA.OAI.For | 5'-GGA ACT AGT ATG TAC CCT TAT GAT GTG CCA GAT TAT GCC TCT AAA GGA TTT ATT GAT GAT GCA AAC TAC TCC G-3' |
| Myc.OAI.For | 5'-GAT GGA TCC ATG GAA CAG AAG TTG ATT TCC GAA GAA GAC CTC ATG AAA GGA TTT ATT GAT GAT GCA AAC TAC TCC G-3' |

2.4.4 Oligonukleotide für die PDR5-Deletion

| | |
|-------------|--|
| PDR5.KO.For | 5'-TTC GAA AGA CTT TAG ACA AAA ATG CCC GAG GCC AAG CTT AAC AAT CAG CTG AAG CTT CGT ACG C-3' |
| PDR5.KO.Rev | 5'-ACC AAA TTC AAA ATT CTA TTA TTT CTT GGA GAG TTT ACC GTT CTT GCA TAG GCC ACT AGT GGA TCT G-3' |
| KanTef.For | 5'-CCT CGA CAT CAT CTG CCC-3' |
| KanTef.Rev | 5'-GGG GAT GTA TGG GCT AAA TG-3' |
| PDR5.For | 5'-TTG GCA ACT AGG AAC TTT CG-3' |
| PDR5.Rev | 5'-GTA CCG ATG AGA TAA CCT AG-3' |

2.4.5 Sonstige Oligonukleotide

| | |
|---------|--|
| SP6 | 5'-GGA TTT AGG TGA CAC TAT AG-3' |
| T7 | 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3' |
| BGH.Rev | 5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3' |
| M13.For | 5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3' |
| M13.Rev | 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3' |
| pEG.For | 5'-AGC AGA GCT TCA CCA TTG AAG GGC-3' |
| pJG.For | 5'-GAT GCC TCC TAC CCT TAT GAT GTG CC-3' |
| pJG.Rev | 5'-GGA GAC TTG ACC AAA CCT CTG GCG-3' |
| ADH.For | 5'-TGT TTC CTC GTC ATT GTT CTC G-3' |
| GPD.For | 5'-GAC GGT AGG TAT TGA TTG TAA TTC-3' |

2.5 cDNA-Genbanken und Poly(A)⁺ RNA

Für das 3-Hybrid-Screening wurde eine in pJG4-5 klonierte T-cell (Jurkat) cDNA-Bank verwendet. Die Bank wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Waldemar Kolanus (Genzentrum München) zur Verfügung gestellt. Es stand außerdem eine in pJG4-5 klonierte humane Leber

cDNA-Bank von OriGene Technologies (Rockville, USA) sowie eine in pPC86 klonierte humane Gehirn (adult) cDNA-Bank von Life Technologies (Karlsruhe) zur Verfügung. Das folgende Poly(A)⁺ RNA-Material wurde von Clontech bezogen:

| | |
|---------------------|--------------------------|
| Dünndarm (human) | Poly(A) ⁺ RNA |
| Gehirn (human) | Poly(A) ⁺ RNA |
| Leber (human) | Poly(A) ⁺ RNA |
| Lymphknoten (human) | Poly(A) ⁺ RNA |
| Magen (human) | Poly(A) ⁺ RNA |
| Milz (human) | Poly(A) ⁺ RNA |

2.6 Plasmide

| | |
|---|--|
| pEG202, pEG202-NLS, pSH18-34, pRB1840, pJG4-5 | DupLex-A TM Hefe Two-Hybrid System (OriGene Technologies, Rockville, USA) |
| pGilda | Clontech |
| pSH2-1 | Prof. R. Brent, MGH, Boston (Gyuris <i>et al.</i> , 1993) |
| p413ADH, p413GALL, p413GALS, p426ADH, p416GAL1, p426GAL1, p426GPD, p415ADH, p415GALL, p415GPD | Dr. Martin Funk, Universität Marburg (Mumberg <i>et al.</i> , 1994), (Mumberg <i>et al.</i> , 1995) |
| pYEX 4T-1 | Clontech |
| pcDNA3.1(+) | Invitrogen |
| pCMVβ | Clontech (MacGregor and Caskey, 1989) |
| p426GPD-yEGFP3 | Dr. Sabine Gratzner, Aventis Martinsried |
| pUG6 | Prof J.H. Hegemann, Universität Düsseldorf (Güldener <i>et al.</i> , 1996) |

2.7 Antikörper

2.7.1 Primäre Antikörper

| | | | |
|------------|-------------------|---|---------------------|
| anti-GST | Kaninchen | IgG, polyklonal | Sigma (Taufkirchen) |
| anti-HA | Maus (Klon 12CA5) | IgG _{2b,κ} monoklonal | Roche (Mannheim) |
| anti-HA | Ratte (Klon 3F10) | IgG _{1,κ} monoklonal, Peroxidase konjugiert | Roche |
| anti-LexA | Maus | IgG _{1,κ} monoklonal | Clontech |
| anti-c-Myc | Maus (Klon 9E10) | IgG _{1,κ} monoclonal Peroxidase konjugiert | Roche |
| anti-ODC | Kaninchen | IgG, polyklonal | Progen (Heidelberg) |

2.7.2 Sekundäre Antikörper

| | | |
|--------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L) | Peroxidase konjugiert | Pierce (Rockford, IL,USA) |
| Ziege anti-Maus IgG (H+L) | Peroxidase konjugiert | Pierce |

2.8 Enzyme

| | |
|-------------------------------|--|
| Lyticase | Sigma |
| <i>Pfu</i> DNA-Polymerase | Stratagene (Amsterdam, Niederlande) |
| Restriktionsendonukleasen | New England Biolabs (Frankfurt) |
| | Promega (Mannheim) |
| Shrimp alkalische Phosphatase | Amersham Pharmacia (Freiburg) |
| T4 DNA-Ligase | New England Biolabs |
| <i>Taq</i> DNA-Polymerase | Life Technologies (Karlsruhe) |
| Thrombin-Protease | Amersham Pharmacia |

2.9 Standards und Kits

| | |
|--|----------------------------------|
| 1Kb Plus DNA Leiter | Life Technologies |
| MultiMark™ Proteinstandard | Invitrogen |
| ABI Prism™ BigDye™ Terminator Sequencing Kit | Applied Biosystems (Weiterstadt) |
| Advantage™ RT-for-PCR Kit | Clontech |
| BCA Protein Assay Kit | Pierce |
| ECL Plus Western Blotting Detection System | Amersham Pharmacia |
| <i>Gene Images</i> ™ CDP- <i>Star</i> detection module | Amersham Pharmacia |
| <i>Gene Images</i> ™ random prime labelling module | Amersham Pharmacia |
| MicroSpin™ GST Purification Module | Amersham Pharmacia |
| PCR Purification Kit | Qiagen (Hilden) |
| Plasmid Purification Kits | Qiagen |
| Plusone Silver Staining Kit | Amersham Pharmacia |
| Rapid DNA Ligation Kit | Roche |
| TOPO TA Cloning® Kit | Invitrogen |

2.10 Chemikalien und Bioreagentien

| | |
|---|-------------------------------|
| Agarose | Life Technologies |
| Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄) | Sigma |
| Aminosäuren | Sigma |
| Ampicillin | Roth (Karlsruhe) |
| Auftragspuffer (Gel Loading Solution) | Sigma |
| Bacto Agar | Difco (Augsburg) |
| Bacto Pepton | Difco |
| Bacto Trypton | Difco |
| BES (C ₆ H ₁₄ NO ₅ SNa) | Sigma |
| 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid (X-Gal) | MBI Fermentas (St. Leon-Rot) |
| Bradford-Reagenzlösung | Bio-Rad (München) |
| Brilliant Blue R 250 | Sigma |
| BSA, Fraktion V | Roth |
| Calciumchlorid | Sigma |

| | |
|---|--------------------------------------|
| Carrier-DNA (Salmon Testes, Typ III) | Sigma |
| Complete | Roche |
| Chlorphenolrot- β -D-Galaktopyranosid (CPRG) | Roche |
| Concanavalin A | Sigma |
| Deoxyribonukleosidtriphosphate | MBI Fermentas |
| DL- α -Difluoromethylornithin (DFMO) | BACHEM (Heidelberg) |
| Digitonin | Sigma |
| Dimethylformamid (DMF) | Sigma |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma |
| Dulbecco's MEM Medium (high Glucose) | Life Technologies |
| Ethanol | Merck (Darmstadt) |
| Ethidiumbromid | Sigma |
| Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA) | Roche |
| Fötale Kälberserum (FKS) | Life Technologies |
| D-Galaktose | Sigma |
| D-Glukose | Difco |
| Glycerin | Sigma |
| Glycin | Sigma |
| Hefeextrakt | Difco |
| HEPES | Roth |
| Immobilon-P (PVDF Membran) | Millipore (Bedford, MA, USA) |
| Isopropanol | Merck |
| Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) | Roth |
| Kaliumchlorid | Sigma |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) | Sigma |
| di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4) | Sigma |
| Lactacystin | Sigma |
| Lithiumacetat | Sigma |
| Lithiumdodecylsulfat (LDS) | Sigma |
| Magermilchpulver | Heirler (Radolfzell) |
| Magnesiumchlorid | Sigma |
| Magnesiumsulfat (MgSO_4) | Sigma |
| Methanol | Merck |
| Minimal Agar nach Davis | Difco |
| 2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure (MES) | Sigma |
| 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS) | Sigma |
| Natriumchlorid (NaCl , 5M) | Biowhittaker (Walkersville, MD, USA) |
| tri-Natriumcitrat-Dihydrat | Sigma |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Sigma |
| di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | Roth |
| NuPAGE Bis-Tris Gele | Invitrogen |
| Penicillin/Streptomycin | Biochrom KG (Berlin) |
| Phenolrot | Sigma |
| Phosphate buffered saline (PBS, 10X) | Biowhittaker |
| ortho-Phosphorsäure (1N, 85%) | Merck |
| Polyethylenglykol (PEG) 3350 | Sigma |
| Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (Tween 20) | Sigma |
| Putrescin | Sigma |
| D-Raffinose | Sigma |
| Roti-Blue | Roth |
| Salzsäure (37%) | Merck |
| D-Sorbitol | Sigma |
| Thiaminhydrochlorid | Sigma |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) | Roth |
| Triton X-100 | Sigma |
| Trypsin/EDTA | Biochrom KG |
| Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids | Difco |

2.11 Geräte

| | | |
|------------------------------|----------------------------|--|
| Agarosegelkammern | EasyCast B1A, B2 | Peqlab (Erlangen) |
| Agarosegeldokumentation | Doc-Print | Vilber Lourmat (Marne-La-Vallée, Frankreich) |
| Autoklav | Fedegari FVS 3 | Integra (Fernwald) |
| BIAcore | BIAcore 3000 | Biacore (Uppsala, Schweden) |
| Brutschrank | B20 | Heraeus (Kendro, Hanau) |
| Durchflußzytometer | FACSCalibur™ | Becton Dickinson (Heidelberg) |
| Heizschüttler | Thermomixer compact | Eppendorf (Hamburg) |
| Imaging System | Storm 860 | Molecular Dynamics (Krefeld) |
| Lichtmikroskope | Axiocvert 25, Axioplan 2 | Zeiss (Jena) |
| Mikrotiterplatten Inkubator | THERMOstar | BMG (Offenburg) |
| PCR-Maschine | GeneAmp PCR System 2400 | Applied Biosystems |
| pH-Meter | MultiLab 540 | WTW (Ft. Myers, FL, USA) |
| Pipetten | Pipetman P2 bis P1000 | Gilson (Abimed, Langenfeld) |
| Photometer | SPECTRAMax PLUS | Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA) |
| Protein Minigel Apparatur | XCell II Mini-Cell EI9001 | NOVEX (Invitrogen) |
| Protein Elektrolot Apparatur | TE 70 Semi-Dry | Hofer (Amersham Pharmacia) |
| Rotoren | JS 4.3, JA 12, JA 25.50 | Beckman (München) |
| Schüttelinkubator | JLA 10.500 | |
| Schwingmühle | Innova 4230 | New Brunswick (USA) |
| Sequenzierer | MM200 | Retsch (Haan) |
| Spannungsgerät | ABI Prism 310 | Applied Biosystems |
| Speed Vac | Consort E 865 | Consort (Turnhout, Belgien) |
| Überkopfroter | Concentrator 5301 | Eppendorf |
| Vortex | REAX 2 | Heidolph (Schwabach) |
| Waagen | REAX Top | Heidolph |
| | BP 4100S | Sartorius (Göttingen) |
| | ISA 9001 | Sartorius |
| Zentrifugen | Biofuge pico | Heraeus |
| | Biofuge fresco | Heraeus |
| | Multifuge 3 _{S-R} | Heraeus |
| | Avanti J-20, J-25 | Beckman |

3 Methoden

3.1 Bakterienkultivierung

3.1.1 Anzucht auf Agarplatten

Bakterien aus einer Glycerin- oder Flüssigkultur wurden mit einer sterilen Impfföse auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert, so daß Einzelkolonien isoliert werden konnten. Zur Plasmidselektion wurde dem LB-Medium nach dem Autoklavieren das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Die Zugabe der Antibiotika erfolgte nach Abkühlen auf <55°C. Für die Blau-Weiß Selektion wurde den Platten IPTG und X-Gal zugegeben.

| | | |
|------------|-------|-----------------------------------|
| LB-Medium: | 1,0 % | Bacto Trypton |
| | 0,5 % | Hefeextrakt |
| | 1,0 % | NaCl |
| | | pH 7,0 (eingestellt mit 5 N NaOH) |

Für die Herstellung von LB-Agarplatten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % Bacto Agar zugesetzt.

| | | |
|------------------|-----------|---|
| Ampicillin: | 100 µg/ml | (Stammlösung 100 mg/ml in H ₂ O) |
| Kanamycin: | 50 µg/ml | (Stammlösung 10 mg/ml in H ₂ O) |
| Chloramphenicol: | 34 µg/ml | (Stammlösung 34 mg/ml in Ethanol) |

| | | |
|--------|----------|---|
| IPTG: | 100 µM | (Stammlösung 100 mM in H ₂ O) |
| X-Gal: | 40 µg/ml | (Stammlösung 100 mg/ml in Dimethylformamid) |

3.1.2 Vermehrung in Flüssigkultur

Die Vermehrung von Bakterienzellen in Flüssigkultur erfolgte durch Animpfen einer Einzelkolonie in LB-Medium, das gegebenenfalls mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt worden war. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C unter Schütteln (180-220 rpm) inkubiert. Die Bakteriendichte wurde photometrisch bei 600 nm nach der folgenden Formel bestimmt:

$$OD_{600} = 8 \times 10^8 \text{ Zellen/ml}$$

3.1.3 Stammhaltung

Mit Parafilm abgedichtete Agarplatten wurden bis zu drei Monate bei 4°C aufbewahrt. Die langfristige Aufbewahrung erfolgte in 50 % Glycerin, bei -80°C. Hierzu wurden Bakterien einer saturierten Übernachtskultur (4 ml) abzentrifugiert (4000 rpm, 5min), in 1 ml LB-Medium / Glycerin (1:1) resuspendiert und in einem Kryoröhrchen bei -80°C eingefroren.

3.2 Hefekultur

3.2.1 Anzucht auf Agarplatten

Hefezellen aus einer Flüssig- oder Glycerinkultur wurden mit einer sterilen Impföse auf YPD- bzw. Selektionsmedium ausgestrichen und 2 bis 5 Tage bei 30°C inkubiert. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Platten bei Bedarf mit Parafilm verschlossen. Durch das Weglassen von Aminosäuren bzw. Nukleosiden im Selektionsmedium (SC-Medium) wurde der Nachweis von Auxotrophien ermöglicht. Die jeweiligen Hefestämme können in den entsprechenden Minimal-Medien nicht wachsen. Es ließen sich nun Plasmide selektionieren, die entsprechende Markergene besitzen, welche eine Auxotrophie des Stammes komplementieren.

Zur Herstellung von YPD bzw. YPG wurde 2x YP-Medium mit dem gleichen Volumen an H₂O verdünnt und mit Glukose bzw. Galaktose versetzt (Endkonzentration 2 %). Für das Herstellen von YPD-Platten wurden gleiche Mengen an 2x Agar mit 2x YP vermischt und der entsprechende Zucker zugesetzt. Bei der Herstellung von SC-Medium bzw. SC-Platten (Selektionsplatten) wurde analog verfahren, wobei hier noch die entsprechenden Aminosäure- und Nukleosidzusätze hinzugegeben wurden.

| | | |
|---------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| 2x YP-Medium: | 2 % | Hefeextrakt |
| | 4 % | Bacto Pepton |
| 2x SC-Medium: | 1,34 % | Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids |
| | 0,4 % | Drop Out Mix, pH 5,6 |
| 2x Agar: | 4 % | Bacto Agar |
| D-Glukose: | 40 %ige Lösung, getrennt autoklaviert | |
| D-Galaktose: | 40 %ige Lösung, getrennt autoklaviert | |
| D-Raffinose: | 20 %ige Lösung, getrennt autoklaviert | |

Der Drop Out-Mix enthält die folgenden Aminosäure- und Nucleosidzusätze:

| | | | | | |
|--------|------------------|----------|--------|--------------------|----------|
| 2,0 g | L-Alanin | (A-5824) | 2,0 g | L-Isoleucin | (I-2752) |
| 2,0 g | L-Arginin | (A-5131) | 2,0 g | L-Methionin | (M-6039) |
| 2,27 g | L-Aspargin | (A-8824) | 0,20 g | p-Aminobenzolsäure | (A-9878) |
| 2,0 g | L-Asparaginsäure | (A-8949) | 2,0 g | L-Phenylalanin | (P-2126) |
| 2,60 g | L-Cystein | (C-4820) | 2,0 g | L-Prolin | (P-0380) |
| 2,0 g | L-Glutamin | (G-7029) | 2,0 g | L-Serin | (S-4500) |
| 2,0 g | L-Glutaminsäure | (G-6904) | 2,0 g | L-Threonin | (T-8625) |
| 2,0 g | Glycin | (G-7403) | 2,0 g | L-Tyrosin | (T-3754) |
| 2,0 g | Myo-Inositol | (I-5125) | 2,0 g | L-Valin | (V-0500) |

Die Aminosäure- und Nucleosidzusätze wurden gemörsert und der Drop Out-Mix bei 4°C aufbewahrt. In Klammern sind die Artikelnummern der Firma Sigma, Taufkirchen angegeben.

Zur Herstellung der verschiedenen SC-Medien wurden die folgenden Aminosäure- und Nucleosidzusätze bei Bedarf nach dem Autoklavieren hinzugegeben. Die Angaben beziehen sich auf 500 ml H₂O. Die Stammlösungen wurden nicht autoklaviert sondern steril filtriert.

| | | |
|------------|--------|----------|
| ADE (100x) | 2,76 g | (A-9126) |
| HIS (200x) | 6,29 g | (H-8125) |
| LEU (60x) | 6,56 g | (L-5652) |
| LYS (100x) | 9,13 g | (L-1262) |
| TRP (100x) | 4,08 g | (T-0254) |
| URA (100x) | 1,12 g | (U-0750) |

3.2.2 Vermehrung in Flüssigkultur

Die Vermehrung von Hefezellen in Flüssigkultur erfolgte durch Animpfen einer Einzelkolonie in 10-25 ml geeignetem Medium. Der Ansatz wurde über Nacht bei 30°C unter Schütteln (180-240 rpm) inkubiert. Ausgehend von einer Übernachtskultur wurde je nach Verwendung eine neue Kultur mit einer Anfangs-OD₆₀₀ von 0,1 bis 0,2 gestartet. Die Hefen wurden innerhalb ihrer logarithmischen Wachstumsphase, d.h. bei einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 1,0 geerntet. Eine Abschätzung der Zellzahl erfolgte photometrisch nach der folgenden Formel:

$$OD_{600} = 2 \times 10^7 \text{ Zellen/ml}$$

3.2.3 Stammhaltung

Für eine kurzfristige Lagerung von bis zu 2 Monaten wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und bei 4°C aufbewahrt. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden 500 µl einer Übernachtskultur mit 400 µl einer sterilen 50 %igen Glycerinlösung versetzt und bei -80°C eingefroren.

3.3 Zellkultur

3.3.1 Anzucht von Zellen

Die adhären wachsende Zelllinie HEK 293 wurde in Dulbecco's Modified Eagle Medium (high Glucose) kultiviert. Das verwendete Medium enthielt 4500 mg/l Glukose, Natriumpyruvat sowie GlutaMAX I. Hierbei handelt es sich um L-Analyt-L-Glutamin, ein stabiles Glutamin enthaltendes Dipeptid, das anstelle von L-Glutamin verwendet wurde. Dem Medium wurde außerdem 10 % fötales Kälberserum sowie die Antibiotika Penicillin und Streptomycin in Form von Penstrep (100 U / 100 µg/ml) zugesetzt. Zur Kultivierung wurden die Zellen bei 37°C im Brutschrank mit 5 % CO₂ gehalten. Das Passagieren der Zellen erfolgte jeden zweiten bis dritten Tag. Die adhären wachsenden Zellen wurden hierzu einmal mit PBS gewaschen. Eine 10 ml Kulturschale wurde für maximal 5min mit 5 ml Trypsin-EDTA Lösung (0,05 % Trypsin / 0,02 % EDTA in PBS, w/o Ca²⁺, Mg²⁺) inkubiert. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von Medium des gleichen Volumens gestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (1000 g / 5min) und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und die Zellen entsprechend der gewünschten Zelldichte verteilt.

3.3.2 Anlegen von Stammkulturen

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden die Zellen einer konfluenten 150 x 20 mm Gewebekulturschale durch Trypsinieren abgelöst, bei 4°C abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und in 2 ml kaltem DMEM aufgenommen. Von einer großen konfluenten Schale wurden 4 Aliquots angelegt. Hierfür wurden 0,5 ml der Zellsuspension in vorgekühlte Kryoröhrchen pipettiert und anschließend 0,5 ml eiskaltes Einfriermedium in 100 µl Schritten hinzugegeben. Dies soll gewährleisten, daß die DMSO-Konzentration nur langsam ansteigt. Vor der Überführung in flüssigen Stickstoff wurden die Kryoröhrchen 24h in einer Einfrierbox bei -80°C gelagert.

| | | |
|-----------------|------|---------|
| Einfriermedium: | 40 % | FKS |
| | 20 % | DMSO |
| | | in DMEM |

3.4 Transformation von *E. coli*

3.4.1 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Bakterien einer Übernachtskultur wurden 1:100 in 250 ml LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,6 vermehrt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (1000 g, 4°C, 10min). Das Zellpellet wurde auf Eis gestellt und vorsichtig in 25 ml eiskaltem TSB Puffer resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 1-2 Stunden auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen (10x) wurden in Aliquots zu 300 µl in flüssigem Stickstoff Schock-gefroren und bei -80°C gelagert.

| | | | |
|-------------|---|----|-------------------|
| TSB-Puffer: | 10 | % | PEG (3350) |
| | 5 | % | DMSO |
| | 20 | mM | MgCl ₂ |
| | in LB-Medium, pH 6,1 (steril filtriert) | | |

3.4.2 Transformation chemisch-kompetenter Zellen mittels KCM Puffer

Es wurden 100 µl chemisch kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut, die gemäß dem unter 3.4.1 beschriebenen Protokoll hergestellt worden waren. 1-20 µl DNA (z.B. ein Ligationsansatz) wurden mit 20 µl KCM-Puffer (5x) versetzt und mit dem entsprechenden Volumen an H₂O auf 100 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 100 µl kompetenter Zellen (10x) hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 10min auf Eis gestellt und dann für weitere 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 800 µl SOC-Medium hinzugefügt und die Bakterien unter Schütteln bei 37°C für 50min inkubiert. Dies gewährleistet, daß sich die Bakterien erholen und beginnen, die Antibiotika-Resistenz auszubilden. Anschließend wurden 100-200 µl Aliquots auf Antibiotika-haltigen LB-Platten mit sterilen Glaskugeln (Ø 4 mm) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

| | | | | | | |
|------------------|--|---|-------------------|-----|----|-------|
| KCM-Puffer (5x): | 0,5 | M | KCl | 5 | ml | (3 M) |
| | 0,15 | M | CaCl ₂ | 4,5 | ml | (1 M) |
| | 0,25 | M | MgCl ₂ | 7,5 | ml | (1 M) |
| | mit H ₂ O auf 30 ml auffüllen | | | | | |

| | | | |
|-------------|-----|-------------------------|--|
| SOC-Medium: | 20 | g | Bacto Trypton |
| | 5 | g | Hefeextrakt |
| | 4 | g | D-Glukose |
| | 2 | ml | NaCl (5 M) |
| | 2,5 | ml | KCl (1 M) |
| | 10 | ml | MgCl ₂ (1 M) |
| 10 | ml | MgSO ₄ (1 M) | mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen, pH 7,4 |

3.5 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*

3.5.1 Plasmidisolierung mittels alkalischer Lyse

Für die rasche Gewinnung bakterieller Plasmid-DNA aus einer 3 ml Übernachtskultur wurde eine als alkalischen Lyse bezeichnete Methode verwendet (Birnboim and Doly, 1979). Dabei wird das unterschiedliche Renaturierungs- und Löslichkeitsverhalten von zirkulär geschlossener DNA gegenüber chromosomaler DNA und Proteinen ausgenutzt. Eine 3 ml Übernachtskultur wurde abzentrifugiert (4500 rpm, 5min, RT). Das Pellet wurde in 250 µl P1-Puffer resuspendiert und zur Lyse der Zellen mit 250 µl P2-Puffer versetzt. Nach maximal 5-minütiger Inkubation mit dem Lysispuffer P2 wurde die Suspension mit 350 µl N3-Puffer (Qiagen) versetzt. Ausgefällene Zellbestandteile wie z.B. chromosomale DNA und Proteine wurden abzentrifugiert (13000 rpm, 10min) und der Überstand auf eine Silica-Minisäule gegeben. Die Säule wurde mit 750 µl PE-Puffer (Qiagen) gewaschen, der 80% Ethanol enthält. Zur restlosen Entfernung des Ethanols wurde ein zweites Mal abzentrifugiert. Die DNA wurde anschließend in 50 µl EB-Puffer eluiert. Für eine Restriktionsanalyse wurden 3 µl der auf diese Weise präparierten Plasmid-DNA eingesetzt.

| | | |
|------------|-----------|---------------------|
| Puffer P1 | 50 mM | Tris / HCl (pH 8,0) |
| | 10 mM | EDTA |
| | 100 µg/ml | RNase A |
| Puffer P2 | 200 mM | NaOH |
| | 1 % | SDS |
| Puffer EB: | 10 mM | Tris / HCl (pH 8,0) |

3.5.2 Präparative Plasmidisolierung über Anionenaustausch-Chromatographie

Plasmidisolierungen im präparativen Maßstab wurden mit Anionenaustauscher Säulen der Firma Qiagen durchgeführt. Die Bakterien wurden in TB-Medium kultiviert. Hierfür wurden 900 ml TB-Medium mit 100 ml Phosphatpuffer (Puffer PP, 10x) versetzt und das entsprechende Antibiotikum hinzugefügt. 150 ml einer Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (6000 g, 10min, 4°C) und die Bakterien mit je 10 ml P1- und 10 ml P2-Puffer aufgeschlossen. Anstelle von N3-Puffer wurde hier P3-Puffer (10 ml, 4°C) verwendet. Die Suspension wurde sorgfältig gemischt und in eine Filtereinheit überführt. Das Präzipitat, welches chromosomale DNA, Proteine und das Detergenz enthält, setzt sich nach oben ab und formt eine Schicht über der Lösung. Nach 10-minütiger Inkubation wurde das Lysat mit einem Stempel durch einen Filter gepresst und auf eine zuvor mit QBT-Puffer äquilibrierte Anionenaustauscher Säule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit 30 ml QC-Puffer

gewaschen und die Plasmid-DNA mit 15 ml QF-Puffer eluiert. Nach der Fällung mit 0,7 Volumenanteilen Isopropanol wurde die DNA abzentrifugiert (4600 rpm, 20min), mit 70 %igem Ethanol gewaschen und das Pellet an der Luft getrocknet. Die DNA wurde in 300 µl H₂O gelöst und die Plasmid-Präparation durch UV-Messung überprüft.

| | | | | | |
|----------------|---|---|-------------|--------|---------------------|
| TB-Medium: | 12 g | Bacto Trypton | QBT-Puffer: | 750 mM | NaCl |
| | 24 g | Hefeextrakt | | 50 mM | MOPS (pH 7,0) |
| | 8 ml | Glycerin (50%) | | 15 % | Ethanol |
| | mit H ₂ O auf 900 ml auffüllen | | | 0,15 % | Triton X-100 |
| 10x PP-Puffer: | 0,17 M | KH ₂ PO ₄ (11,57 g) | QC-Puffer: | 1 M | NaCl |
| | 0,72 M | K ₂ HPO ₄ (82,15 g) | | 50 mM | MOPS, (pH 7,0) |
| | mit H ₂ O auf 500 ml auffüllen | | | 15 % | Isopropanol |
| | mit Phosphorsäure auf pH 7,0 | | QF-Puffer: | 1,25 M | NaCl |
| P3-Puffer: | 3 M | Kaliumacetat (pH 5,5) | | 50 mM | Tris / HCl (pH 8,5) |
| | | | | 15 % | Isopropanol |

3.5.3 Präparation von Plasmid-DNA über CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation

Qualitativ hochwertige DNA in großer Menge wurde mittels alkalischer Lyse aus Bakterien isoliert und über eine CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigt. Zirkuläre Plasmid-DNA läßt sich mit diesem Verfahren von linearen Nukleinsäuremolekülen trennen, da diese sich aufgrund unterschiedlicher Ethidiumbromid-Inkorporation innerhalb verschiedener Schwebedichten im Caesiumchlorid Dichtegradienten verteilen. 250 ml einer Übernachtskultur wurden abzentrifugiert und in 10 ml P1-Puffer (ohne RNase) resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 10 ml P2-Puffer lysiert und unlösliche Bestandteile mit 10 ml P3-Puffer präzipitiert. Der Ansatz wurde 20min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,7 Volumenteilen Isopropanol versetzt und nach gründlicher Durchmischung der Lösung bei 5000 rpm abzentrifugiert (20min). Das entstandene Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die DNA wurde in ca 4 ml Lösung I resuspendiert (Endvolumen 4,4 ml) und diese mit 5,5 g CsCl₂ versetzt. Dabei ist darauf zu achten, daß das CsCl₂ vollständig in Lösung geht (Erwärmung im Wasserbad auf 37°C). Zu dem Ansatz wurden nun 400 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) pipettiert. Durch eine weitere Zentrifugation (10000 rpm, 5min) wurden unlösliche Bestandteile wie Lipide (oben) und Proteine (Pellet) abgetrennt. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde die klare DNA / Ethidiumbromid Lösung in ein QuickSeal-Ultrazentrifugenröhrchen überführt und dieses nach Austarieren verschweißt. Die Zentrifugation erfolgte bei 65000 rpm, 5h, 18°C. Zwei DNA-Banden sollten sichtbar sein, wobei die obere Bande aus linearer, chromosomaler DNA und die untere Bande aus geschlossener zirkulärer Plasmid-DNA besteht. Das Pellet enthält in der Regel Ethidiumbromid / RNA Komplexe. Anschließend wurde mit einer 5 ml

Spritze die Plasmidbande abgezogen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Das Ethidiumbromid wurde durch mehrmaliges Ausschütteln mit einer gesättigten NaCl (1 M) / n-Butanol-Lösung extrahiert. Die zwei Phasen wurden gründlich durchmischt und anschließend die obere Ethidiumbromid / n-Butanol Phase abgesaugt. Die DNA wurde mit einem Volumen Ammoniumacetat Lösung (1 M) und zwei Volumen 100 %igem Ethanol gefällt. Durch eine weitere Zentrifugation (10000 rpm, 10min) wurde die Plasmid-DNA pelletiert und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und dann in 500 – 1000 µl H₂O resuspendiert.

Lösung I: 10 mM EDTA, pH 8,0

3.6 Transformation von Hefezellen

3.6.1 Herstellung von Carrier-DNA

250 mg hochmolekulare Carrier-DNA (Salmon Testes, Typ III, Sigma D1626) wurden zu 50 ml TE-Puffer gegeben und über Nacht bei 4°C unter Rühren gelöst. Zur Denaturierung der gelösten DNA (5 µg/µl) wurden 500 µl Aliquots für 5-10min bei 99°C aufgekocht und im Eiswasserbad abgeschreckt. Die einzelsträngige Carrier-DNA wurde bei –20°C aufbewahrt und konnte ohne Effizienzverluste mehrmals aufgetaut und wieder eingefroren werden.

TE-Puffer: 10 mM Tris / HCl, pH 7,4
1 mM EDTA

3.6.2 Transformation von Hefen

Nach einer von (Gietz *et al.*, 1995) beschriebenen Methode wurden die Hefezellen mit Lithiumacetat (LiAc) kompetent gemacht. Hierzu wurden die Zellen in 10 ml YPD-Medium über Nacht angeimpft. Ausgehend von dieser Übernachtskultur wurde eine neue Kultur (100 ml) mit einer Anfangs-OD₆₀₀ von 0,1 bis 0,2 gestartet und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 vermehrt. Die Zellen wurden geerntet (4000 rpm, 8min, RT), in sterilem Wasser gewaschen und erneut pelletiert (4000 rpm, 5min, RT). Ausgehend von der Annahme, daß 50 ml einer Hefekultur mit einer OD₆₀₀ von 1,0 für 10 Transformationen ausreichen, wurde berechnet, wieviel ml der Hefesuspension für die jeweilige Anzahl an Transformationen benötigt werden. Die pelletierten Zellen wurden in 100 mM LiAc-Lösung (100 µl / Transformation) aufgenommen und erneut abzentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 100 mM LiAc-Lösung (50 µl / Transformation) resuspendiert. Pro Transformationsansatz wurden 50 µl dieser Suspension in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt

und abzentrifugiert. Nach dem Absaugen der LiAc-Lösung wurden nacheinander 240 µl PEG (50% w/v), 36 µl LiAc-Lösung (1 M), 10 µl Carrier-DNA (5 µg/µl) und zuletzt die in 65 µl H₂O verdünnte Plasmid-DNA (je 0,5 µg Plasmid) hinzupipettiert. Die Ansätze wurden für eine Minute gevortext und bei 30°C für 30min im Überkopffrotor inkubiert. Für den anschließenden Hitzeschock wurden die Zellen für 20min in ein 42°C heißes Wasserbad überführt. Die Zellen wurden dann pelletiert (6000 rpm, 2min) und in 600 µl sterilem H₂O resuspendiert. Anschließend wurden pro transformiertem Plasmid 100 µl Hefesuspension mit sterilen Glaskugeln auf Selektionsplatten ausgekugelt und für 4 Tage bei 30°C inkubiert.

3.7 Geninaktivierung in *Saccharomyces cerevisiae*

3.7.1 Herstellung der Deletionskassette

Zur Geninaktivierung in *Saccharomyces cerevisiae* wurde die auf homologer Rekombination basierende Methode von (Wach *et al.*, 1994) durchgeführt. Diese verwendet ein *kanMX*-Modul, welches aus dem *E. coli* Kanamycin-Resistenzmarker besteht, der von Promotor- und Terminatorsequenzen des TEF-Gens aus dem Pilz *Ashbya gossypii* flankiert wird. In diesem Fall wurde eine PCR-Deletionskassette verwendet, die außerdem flankierende *loxP*-Bereiche (*loxP-kanMX-loxP*) aus dem Rekombinationssystem des Bakteriophagen P1 aufwies (Güldener *et al.*, 1996). Dies hat den Vorteil, daß die Kanamycinkassette durch die Cre-Rekombinase wieder ausgeschnitten werden kann und der Marker für weitere Anwendungen zur Verfügung steht. Für die PCR wurde der Vektor pUG6, der die *loxP-kanMX-loxP* Kassette trägt, als Template verwendet. Für die Deletion des PDR5-Gens in *Saccharomyces cerevisiae* wurden Primer konzipiert, die 45 bp Homologie zu einem Bereich um das Start- bzw. Stoppkodon von PDR5 aufwiesen und daran anschließend 19 bp (PDR5.KO.For) bzw. 22 bp (PDR5.KO.Rev) Homologie zu der *loxP*-Seite besaßen. Es wurde ein 10facher PCR-Ansatz angesetzt (35 Zyklen, 48°C, *Pfu*-Polymerase, PCR-Bedingungen siehe Kapitel 3.13.1). Jeweils zwei Ansätze wurden vereinigt und anschließend im Agarosegel analysiert. Das gewünschte 1,6 kb große Fragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und die DNA in 150 µl TE-Puffer vereinigt.

3.7.2 Hefetransformation der Deletionskassette

Es wurde eine Hefetransformation, wie sie in Kapitel 3.6.2 beschrieben ist, durchgeführt. Anstelle von 65 µl verdünnter Plasmid-DNA wurden 5 µg des gereinigten PCR-Fragmentes, in 65 µl H₂O verdünnt, eingesetzt. Die Transformanden wurden nach dem Hitzeschritt in 200 µl H₂O resuspendiert und der gesamte Ansatz auf YPD / G418-Platten ausplattiert. Die

Geneticinkonzentration (G418, Life Technologies) der Platten betrug 200 µg/ml. Die Platten wurden bei 30°C inkubiert, bis Kolonien sichtbar waren. Um den Hintergrund zu reduzieren, wurden die Hefen auf frische YPD / G418 Platten replica plattiert. Von dieser Platte wurden die deutlich wachsenden Kolonien gepickt und nochmals auf YPD / G418-Platten ausgestrichen.

3.7.3 Präparation genomischer DNA aus Hefe

Für die Analyse der transformierten Hefen wurde zunächst genomische DNA präpariert. Hierfür wurde eine Übernachtkultur in 10 ml YPD angesetzt. Diese wurde am nächsten Tag abzentrifugiert (5min, 4000 rpm, RT) und das Pellet in 500 µl Sorbitol (1 M) / EDTA (0,1 M, pH 8) resuspendiert. Anschließend wurden 50 µl Zymolase (5 mg/ml) hinzugefügt und der Ansatz 1h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde abzentrifugiert (1min, 6000 rpm, RT) und das Zellpellet in 500 µl Tris (50 mM) / EDTA (20 mM) resuspendiert. Zu der Suspension wurden nun 50 µl SDS (10%) hinzupipettiert und der Ansatz gut gemischt. Die Suspension wurde nun für 30min auf 65°C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Kaliumacetatlösung (5 M) hinzupipettiert und der Ansatz für 1h auf Eis gestellt. Danach wurde abzentrifugiert (1min, 6000 rpm, RT), der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und ein Volumen Isopropanol hinzupipettiert. Die Lösung wurde vorsichtig geschwenkt, wobei fädige DNA-Moleküle sichtbar wurden. Mit einem dünnen Glasstäbchen wurde die DNA aufgespult, das Stäbchen kopfüber in ein Eppendorfgefäß gestellt und die DNA im Heizblock bei 50°C getrocknet. Anschließend wurden 200 µl TE-Puffer (Kapitel 3.6.1) hinzupipettiert und die DNA vorsichtig gelöst. Abschließend wurden 10 µl RNase (1 mg/ml) hinzugefügt und der Ansatz bei 37°C für 30min inkubiert. Mit Hilfe Kanamycin- und PDR5- spezifischer Primer wurde zum Nachweis der Integration der Deletionskassette eine diagnostische PCR durchgeführt (PCR-Bedingungen siehe Kapitel 3.13.1).

3.7.4 Entfernung der *loxP-kanMX-loxP*-Kassette durch die *Cre*-Rekombinase

Hefeklone, bei denen der Einbau der *loxP-kanMX-loxP*-Kassette durch eine diagnostische PCR nachgewiesen werden konnte, wurden mit dem Plasmid pSH47 (*Cre*-Rekombinase) transformiert (Kapitel 3.6.2). Das Plasmid pSH47 besitzt einen Ura-Marker und kann später durch Counterselektion mit 5-Fluoro Orotatsäure (5-FOA) wieder entfernt werden (Boeke *et al.*, 1984). Da die Expression der *Cre*-Rekombinase unter Kontrolle des *GALI*-Promotors steht, wurden die Klone zunächst auf Ura⁻, Galaktose Selektionsplatten ausgestrichen, um die Expression der *Cre*-Rekombinase zu induzieren. Von dieser Platte wurden vier Klone gepickt und zur Counterselektion auf einer 5-FOA-Platte ausgestrichen. Klone dieser Platte wurden

auf eine weitere 5-FOA-Platte replica plattiert. Von dieser Platte wurden Klone gepickt und auf einer Ura- Glucose Selektionsplatte sowie auf einer YPD/G418-Platte reanalysiert. Bei erfolgreicher Entfernung des Plasmides pSH47 sowie der *loxP-kanMX-loxP*-Kassette wachsen auf beiden Platten keine Klone mehr.

| | | |
|----------------|--------|---------------------------------------|
| 5-FOA-Platten: | 4 g | Yeast Nitrogen Base |
| | 1,25 g | Drop Out Mix (Kapitel 3.2.1) |
| | 12 g | Glukose |
| | 0,3 g | Uracil |
| | 0,5 g | 5-FOA |
| | 6 ml | ADE (100x) (Kapitel 3.2.1) |
| | 3 ml | HIS (200x) (Kapitel 3.2.1) |
| | 6 ml | LYS (100x) (Kapitel 3.2.1) |
| | 10 ml | LEU (60x) (Kapitel 3.2.1) |
| | 6 ml | TRP (100x) (Kapitel 3.2.1) |
| | 6 ml | URA (100x) (Kapitel 3.2.1) |
| | | mit 300 ml H ₂ O auffüllen |

3.8 Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität von transformierten Hefen

3.8.1 Qualitativer Farbtest auf X-Gal-haltigen Indikatorplatten

Zur Analyse der β -Galaktosidaseaktivität wurden entsprechend transformierte Hefeklone gepickt, in 8-15 μ l 25 %igem Glycerin resuspendiert und auf X-Gal-haltige Selektionsplatten überstempelt. Die Platten wurden für 2-5 Tage bei 30°C inkubiert. Es wurden jeweils drei- bis fünffach Bestimmungen durchgeführt, sowie eine Positiv- und Negativkontrolle mitgetestet, um die verschiedenen Farbintensitäten der einzelnen Kolonien vergleichen zu können.

| | |
|-------------------------|--|
| X-Gal Indikatorplatten: | Selektionsplatten (Kapitel 3.2.1) mit 1x BU-Salze und 100 μ g/ml X-Gal. Die BU-Salze wurden getrennt autoklaviert und zusammen mit dem X-Gal unmittelbar vor dem Gießen der Platten zugesetzt. |
|-------------------------|--|

| | |
|---------------|--|
| 10x BU-Salze: | 250 mM Na ₂ HPO ₄ 250 mM NaH ₂ PO ₄ |
|---------------|--|

3.8.2 Analyse der β -Galaktosidaseaktivität in Flüssigkultur (CPRG-Assay)

Zur Analyse der β -Galaktosidaseaktivität in Flüssigkultur (CPRG-Assay (Olesnicky *et al.*, 1999) wurden jeweils 3-4 Einzelklone in 10 ml Selektionsmedium angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Die Übernachtskulturen wurden mit Selektionsmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,05-0,1 verdünnt und in sterilen Mikrotiterplatten (Costar) mit je 100 μ l / well gestartet. Die Inkubation erfolgte in einem Mikrotiterplatten-Schüttler bei 700 rpm, 30°C für 5-6h. Zum Starten der Farbreaktion wurden dem Ansatz 50 μ l des Assay-Mix hinzupipettiert und die

Mikrotiterplatte im Schüttler für weitere 3-24h inkubiert (30°C). Bei dem CPRG-Assay kann die Substratumsetzung anhand eines Farbumschlages von gelb zu dunkelrot verfolgt werden. Dem Assay-Mix wurde außerdem Digitonin beigelegt, um die Permeabilität der Zellmembran für den Farbstoff zu erhöhen. Sobald der optimale Farbumschlag erreicht war, wurde im Photometer die Absorption bei 574 nm gemessen. Es wurde jeweils eine Mehrfachbestimmung durchgeführt und eine Positiv- bzw. Negativkontrolle mitgetestet, um die Farbintensitäten vergleichen zu können.

| | | | |
|-------------------|---|--------------------------------------|---------------|
| Assay Mix pro ml: | 30 μ l | Digitonin | (5 mg/ml) |
| | 30 μ l | CPRG | (10 mg/ml) |
| | 300 μ l | NaPi | (1 M), pH 6,7 |
| | 640 μ l | des entsprechenden Selektionsmediums | |
| 1 M NaPi, pH 6,7: | aus 1 M Na ₂ HPO ₄ und 1 M NaH ₂ PO ₄ Verhältnis nach Maniatis (Sambrook <i>et al.</i> , 1989) | | |

3.9 Transfektion von Säugerzellen

3.9.1 Calcium-Phosphat-Transfektion von HEK 293-Zellen

Für die transiente Proteinexpression in HEK 293-Zellen wurde die Calcium-Phosphat-Methode von (Chen and Okayama, 1987) verwendet. Die adhären wachsenden Zellen wurden 6h bis 8h vor der Transfektion je nach Konfluenz 1:4 bis 1:20 gesplittet. Für eine 6 well Platte mit je 3 ml Volumen wurden pro Transfektionsansatz 300 μ l angesetzt. Die Transfektions-Lösung betrug somit 1/10 des Mediums, wobei die DNA-Konzentration bei 20-25 μ g/ml lag. Für eine 3 ml Petrischale wurden 6 μ g DNA (1 μ g/ μ l) mit 130 μ l sterilem H₂O vermischt. Wurden mehrere Konstrukte gleichzeitig verwendet, so wurde darauf geachtet, daß jeweils die gleiche Menge an DNA transfiziert und gegebenenfalls mit Leervektor aufgefüllt wurde. Unter sterilen Bedingungen wurden zunächst 15 μ l CaCl₂ (2,5 M) und anschließend 150 μ l BBS-Puffer hinzupipettiert. Der Ansatz wurde sofort gründlich durchmischt und bei Raumtemperatur für 20-30min inkubiert. Die Mischung wurde anschließend tropfenweise zu den Zellen pipettiert. Die Ansätze wurden über Nacht bei 3 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Die Zellen wurden für weitere 24h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Je nach Bedarf wurde der Proteasom-Inhibitor Lactacystin (Sigma) eingesetzt. Hiervon wurde eine 8 mM Stammlösung (in DMSO) präpariert und im Verhältnis 1:1000 16h vor dem Ernten der transfizierten Zellen hinzupipettiert (Endkonzentration im Medium 8 μ M).

| | | | |
|-----------|----------|------------------|--|
| BBS (2x): | 280 mM | 8,18 g | NaCl |
| | 1,5 mM | 1,33 mg | Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O |
| | 50 mM | 5,33 g | BES (Sigma B-2891) ad 500 ml H ₂ O |
| | mit NaOH | pH 6,95 bei 20°C | |

3.9.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit dem Plasmid pCMV β transfiziert. Erfolgreich transfizierte Zellen exprimieren β -Galaktosidase und lassen sich mit einer X-Gal Lösung blau anfärben. Die Färbung erfolgte 48h nach der Transfektion. Hierzu wurden die adhären wachsenden HEK 293-Zellen einmal mit PBS (Phosphate buffered saline) gewaschen und anschließend in der Petrischale fixiert. Die Zellen wurden vollständig mit Fixierlösung bedeckt und 5min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann die X-Gal-Lösung hinzugegeben. Der Ansatz wurde 24h bei 37°C inkubiert. In der Regel war eine Blaufärbung der erfolgreich transfizierten Zellen bereits nach 1h sichtbar.

| | | |
|---------------|---------|---|
| Fixierlösung: | 2 % | Formaldehyd (v/v) |
| | 0,2 % | Glutaraldehyd (v/v) |
| | | in PBS |
| X-Gal-Lösung: | 5 mM | K ₄ [Fe(CN) ₆] (Stammlösung 100 mM in PBS) |
| | 5 mM | K ₃ [Fe(CN) ₆] (Stammlösung 100 mM in PBS) |
| | 2 mM | MgCl ₂ (Stammlösung 1 M) |
| | 1 mg/ml | X-Gal (Stammlösung 40 mg/ml in DMSO) |
| | | in PBS |

3.10 Durchführung des 3-Hybrid-Assays

3.10.1 Large Scale-Transformation des Hefestammes EGY48

Der Hefestamm EGY48 wurde wie unter 3.6.2 beschrieben mit dem Plasmid pEG202 GKR-Typ II und dem Reporterplasmid pSH18-34 transformiert. Eine Einzelkolonie wurde in Ura⁻, His⁻-Flüssigselektionsmedium über Nacht angeimpft und anschließend mit der in pJG4-5 klonierten T-Zell cDNA-Bank transformiert. Hierfür wurde eine Large Scale Transformation (24x) angesetzt und mit 0,5 μ g DNA / Ansatz transformiert. Die Zellen wurden für eine bessere Transformationseffizienz in YPD-Medium gestartet. Das Zellpellet wurde am Ende der Transformation in 25 ml H₂O aufgenommen. Pro große Platte (24 x 24 cm) wurde 1 ml Zellsuspension auf Ura⁻ His⁻ Trp⁻ (UHW) Glukose Selektionsmedium ausplattiert. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und für drei Tage bei 30°C inkubiert. Zur Berechnung der Transformationseffizienz wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt. Hierfür wurden die Zellen in 10er Schritten verdünnt und ein entsprechendes Aliquot auf UHW-Selektionsplatten (\varnothing 10 cm) ausplattiert. Unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren konnte die Transformationseffizienz berechnet werden.

3.10.2 Sammeln der transformierten Hefen

Die dicht bewachsenen Hefepetten wurden zum Härten des Agars für mehrere Stunden bei 4°C gelagert. Anschließend wurden die Hefen (insgesamt ca $1,4 \times 10^5$ Klone) mit einer sterilen Glasplatte abgeschabt. Die Hefen wurden in 100 ml Selektionsmedium resuspendiert und 1h bei 25°C geschüttelt (300 ml Erlenmeyerkolben). Anschließend wurde die Hefesuspension abzentrifugiert (3000 rpm, 10min, RT). Der Überstand wurde verworfen und auf dem Pellet befindliche Agarreste mit Selektionsmedium abgespült. Abschließend wurde das Hefepellet mit einem Volumen Aufbewahrungspuffer versetzt, sorgfältig gevortext und in 2 ml Aliquots bei -80°C eingefroren.

| | | | |
|----------------------|----|----|--------------------|
| Aufbewahrungspuffer: | 10 | mM | Tris / HCl, pH 7,5 |
| | 10 | mM | MgCl ₂ |
| | 50 | % | Glycerin |

3.10.3 Induktion der Genbankexpression und 3-Hybrid-Interaktionsscreening

Von den gesammelten Hefetransformanten wurde ein 2 ml Aliquot aufgetaut und davon 200 µl in 20 ml YPG für 5h inkubiert. Durch die Übertragung in Galaktose-haltiges Medium wurde die Expression der Genbank induziert. Die Zellen wurden geerntet und ein Aliquot von 4 ml mit sterilen Glaskugeln auf die folgenden Platten (24 x 24 cm) verteilt:

| | |
|--|--|
| UHWL, X-Gal, Galaktose: | Genbankexpression induziert |
| UHWL, X-Gal, Galaktose, 1 µM Dex-FK506 | 3-Hybrid Interaktionsscreening, Genbankexpression induziert |
| UHWL, X-Gal, Glukose: | Negativkontrolle (Genbankexpression reprimiert) |

Die Platten wurden für 5-7 Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Klone analysiert. Hierfür wurden von der Interaktionsplatte (UHWL, X-Gal, Galaktose, 1 µM Dex-FK506) mehrere hundert blau gefärbte Hefeklone gepickt und auf Selektionsplatten überstempelt. Für die Analyse wurden sterile 384er Mikrotiterplatten verwendet. Pro „well“ wurden jeweils 8 µl 25 %ige Glycerinlösung vorgelegt. Die Klone wurden einzeln gepickt und in der Glycerinlösung resuspendiert. Mit einem sterilen 384er Stempel wurden die Klone auf die folgenden Selektionsplatten übertragen und bei 30°C inkubiert:

Selektionsplatten für die Reanalyse der potentiellen 3-Hybrid-Interaktoren

| | |
|--|--|
| UHW, Glukose | Masterplatte (Plasmidselektion) |
| UHWL, Glukose | keine spezifische FK506-Interaktion möglich |
| UHWL, Galaktose | keine spezifische FK506-Interaktion möglich |
| UHWL, Galaktose, 1 µM Dex-Linker | keine spezifische FK506-Interaktion möglich |
| UHWL, Galaktose, 1 µM Dex-FK506 | Wachstum der spezifischen FK506-Interaktion |
| UHWL, Galaktose, 1 µM Dex-FK506 + FK506 (10 µM) | kein Wachstum der spezifischen FK506- Interaktion |

| | |
|--|--|
| UHW, X-Gal, Glukose | keine spezifische FK506-Interaktion möglich |
| UHW, X-Gal, Galaktose | keine spezifische FK506-Interaktion möglich |
| UHW, X-Gal, Galaktose, 1 μ M Dex-Linker | keine spezifische FK506-Interaktion möglich |
| UHW, X-Gal, Galaktose, 1 μ M Dex-FK506 | Blaufärbung der spezifischen FK506-Interaktion |
| UHW, X-Gal, Galaktose, 1 μ M Dex-FK506 + FK506 (10 μ M) | keine Blaufärbung der spezifischen FK506- Interaktion |

Ziel war es, diejenigen Interaktoren zu identifizieren, die eine FK506-spezifische Blaufärbung sowie einen FK506-abhängigen Wachstumsphänotyp aufwiesen.

3.10.4 Isolation von Plasmiden aus Hefezellen

Zur Isolation der Genbankplasmide aus EGY48 wurden 10 ml Trp^- -Selektionsmedium mit einem Einzelklon angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 1,0 bei 30°C vermehrt. Dieser Schritt führt zu einer Anreicherung des Genbank-Plasmides gegenüber den beiden anderen Plasmiden. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (4000 rpm, 5min, RT) und in 500 μ l H_2O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 500 μ l Puffer A resuspendiert und 30min bei RT inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation (13000 rpm, 1min, RT) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 200 μ l Puffer B aufgenommen und für 60min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 20 μ l 10%ige SDS zugegeben und die Suspension für 10min auf 65°C erhitzt. Die Proteine wurden durch Zugabe von 100 μ l 5 M Kaliumacetat-Lösung für 30min auf Eis gefällt und anschließend pelletiert (13000 rpm, 10min, RT). Der plasmidhaltige Überstand wurde mit einem Volumen Isopropanol bei RT gefällt und kurz abzentrifugiert (13000 rpm, 5min, RT). Das DNA-Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 20 μ l H_2O gelöst.

Puffer A: 100 mM Tris/HCl (pH 7,5)
 10 mM EDTA
 100 mM β -Mercaptoethanol

Puffer B: 100 mM Tris / HCl (pH 7,5)
 10 mM EDTA
 0,5 U/ μ l Lyticase

Lyticase: 5 U/ μ l in 100 mM Tris/HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA; in Aliquots bei -20°C gelagert

3.10.5 Transformation der Genbankplasmide in *E. coli* KC8

Für die Transformation der aus Hefen isolierten Genbankplasmide wurde der *E. coli*-Stamm KC8 verwendet. Er besitzt unter anderem eine *trpC*-9830 Mutation, die durch das Hefe *TRP1*-Gen komplementiert werden kann. Hierdurch kann der Genbankvektor pJG4-5 in diesem

E. coli-Stamm auf tryptophandefizientem, ampicillinhaltigem Medium (KC8-Medium) selektiert werden. Von der in Kapitel 3.10.4 beschriebenen Plasmidlösung wurden 5 µl für die Transformation der chemisch kompetenten KC8-Bakterien verwendet (Kapitel 3.4.1 und 3.4.2). Die Bakterien wurden anschließend zwei Tage auf KC8-Platten bei 37°C inkubiert. Die erhaltenen Kolonien wurden in LB-Amp-Medium vermehrt und die Plasmide, wie unter Kapitel 3.5.1 beschrieben, präpariert. Durch einen geeigneten Restriktionsverdau (*Hind*III, Kapitel 3.12.1) wurde überprüft, ob das gewünschte Genbankplasmid isoliert wurde.

| | | |
|--------------|--------|--|
| 5x Salz-Mix: | 52,5 g | K ₂ HPO ₄ |
| | 22,5 g | KH ₂ PO ₄ |
| | 5 g | (NH ₄) ₂ SO ₄ |
| | 2,5 g | Na ₃ Citrat x 2H ₂ O |
| | | ad 1 l H ₂ O |
| KC8-Medium | 15 g | Difco Minimal Agar Davis |
| | | ad 600 ml H ₂ O, getrennt autoklavieren, dann Zusatz von: |
| | 200 ml | 5 x Salz-Mix |
| | 1 ml | MgSO ₄ (0,2 g/ml) |
| | 10 ml | Ura-Lösung (2,5 mg/ml, in H ₂ O, steril filtriert) |
| | 10 ml | His-Lösung (2,5 mg/ml, in H ₂ O, steril filtriert) |
| | 3,5 ml | Leu Lösung (7 mg/ml, in H ₂ O, steril filtriert) |
| | 5 ml | 40 % Glukose |
| | 375 µl | Ampicillin (100 mg/ml) |
| | 0,5 ml | 1-%iges Thiaminhydrochlorid in H ₂ O (frisch angesetzt) |

3.11 Auftrennung, Reinigung und Konzentrationsmessung von DNA

3.11.1 Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von DNA

DNA bewegt sich aufgrund der negativen Ladungen der Phosphodiester-Gruppen in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode. Hierbei werden die DNA-Moleküle ihrer Länge nach aufgetrennt. Durch den Vergleich mit bekannten DNA-Längenstandards kann die Größe eines DNA-Moleküls ermittelt werden. Zur Sichtbarmachung der DNA wird dem Gel Ethidiumbromid zugesetzt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und kann durch UV-Licht (Wellenlänge 366 nm) zur Fluoreszenz angeregt werden. Für die DNA-Gelelektrophorese wurden 0,8-1,0 %ige Agarosegele verwendet. Nach dem Abkühlen der Gelflüssigkeit auf ca 60°C wurde Ethidiumbromid zugesetzt (Endkonzentration 0,3 µg/ml). Sowohl für die Gele wie auch für den Laufpuffer wurde 1x TBE-Puffer benutzt. Je nach Größe des Agarosegels wurde eine Spannung von 80-120 V angelegt.

| | | |
|-----------------|--------|-------------------------------|
| 10x TBE-Puffer: | 0,89 M | Tris |
| | 0,89 M | Borsäure |
| | 0,02 M | EDTA/Na ₂ – Lösung |
| | | pH 8,3 |

| | | |
|-----------------|--------|----------------------|
| Auftragspuffer: | 0,05 % | Bromphenolblau (w/v) |
| | 40 % | Sucrose (w/v) |
| | 0,1 M | EDTA, pH 8,0 |
| | 0,5 % | SDS (w/v) |

1 kb Plus DNA Leiter: 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 650 bp, 850 bp, 1000 bp, 1650 bp, 2000 bp, 3000 bp, 4000 bp, 5000 bp, 6000 bp, 7000 bp, 8000 bp, 9000 bp, 10000 bp, 11000 bp, 12000 bp

3.11.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten der Größenordnung 70 bp – 10 kb aus Agarose wurde der QIAquick Gel Extraktions Kit von Qiagen verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die gewünschten Fragmente unter UV-Licht ($\lambda = 366 \text{ nm}$) aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstück wurde gewogen und mit dem dreifachen Volumen (100 mg ~ 100 μl) an QG-Puffer versetzt. Optimale DNA-Adsorption an die Silica-Gel-Membran ist nur bei einem pH-Bereich von $\leq 7,5$ gegeben. Der QG-Puffer ist daher mit einem pH-Indikator versehen und weist bei einem pH-Wert von 7,5 eine gelbe Farbe auf. Der Ansatz wurde unter Schütteln für 10min auf 50°C inkubiert, um das Agarose-Gelstück komplett in QG-Puffer zu lösen. Anschließend wurde die Lösung über eine Silica Gel Membran (Qiaquick Säulchen) gereinigt. Es wurde mit 750 μl PE-Puffer (Qiagen) gewaschen. Da der PE-Puffer 80 % Ethanol enthält, wurde zur restlosen Entfernung des Ethanols ein zweites Mal abzentrifugiert. Die DNA wurde anschließend in 50 μl EB-Puffer (Kapitel 3.5.1) eluiert.

3.11.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration einer wäßrigen DNA-Lösung wurde in Quarzküvetten durch Messung der Absorption bestimmt. Die Messung bei 260 nm erlaubt die Berechnung der DNA-Konzentration in der Probe. Eine Absorption von 1 korrespondiert mit ca 50 $\mu\text{g/ml}$ für doppelsträngige DNA, 40 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngige DNA und RNA und 20 $\mu\text{g/ml}$ für einzelsträngige Oligonukleotide. Reine DNA-Lösungen besitzen einen A_{260}/A_{280} Koeffizienten von 1,8. Liegt dieser Koeffizient unter 1,6 handelt es sich um deutliche Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenol. Das Verhältnis A_{230}/A_{260} sollte zwischen 0,3 und 0,9 liegen. Ein Wert über 0,9 weist auf einen hohen Salzgehalt der Lösung hin.

Für die Konzentrationsbestimmung kürzerer Oligonukleotide wurde zunächst der millimolare Extinktionskoeffizient des Oligonukleotides (ϵ) nach folgender Formel berechnet:

$$\epsilon = (15,2) \times A + (12,01) \times G + (8,4) \times T + (7,05) \times C$$

Dabei sind A, G, C und T die Anzahl der jeweiligen Basen im Oligonukleotid. Die Nummern in den Klammern sind die molaren Extinktionskoeffizienten jedes Deoxynukleotides bei pH 8,0. Die Konzentration der unverdünnten Oligonukleotid-Lösung wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$c = (A_{260}) \times \text{Verdünnungsfaktor} / \epsilon$$

3.12 Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren

3.12.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Gereinigte DNA wurde mit kommerziell erhältlichen Restriktionsendonukleasen gespalten. Dabei wurden die vom Hersteller mitgelieferten 10x Restriktionspuffer verwendet. Die Menge der DNA-Probe betrug für analytische Spaltungen 0,2-2 µg, für präparative Zwecke je nach Verwendung 1-5 µg Plasmid-DNA. Die DNA wurde mit 1-5 Units pro µg DNA 1-2h bei 37°C inkubiert. Bei Bedarf wurde 1 / 100 Volumen einer 100x BSA-Stammlösung hinzugegeben.

3.12.2 Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden mit Klenow-Fragment

Nach enzymatischer Spaltung von DNA entstehen in der Regel einzelsträngige überhängende DNA-Enden. 5'-überhängende DNA-Enden können für darauffolgende Klonierungen mit Klenow-Polymerase aufgefüllt werden. Bei der Klenow-Polymerase handelt es sich um ein Fragment der *E. coli*-Polymerase I, dessen 5' → 3' Exonuklease-Aktivität entfernt wurde. Der „Klenow Fill in“ kann direkt an einen Restriktionsverdau angeschlossen werden. Pro 10 µl Verdau wurden 2 µl dNTPs (je 5 mM) und 0,2 µl Klenow-Fragment (5 U/µl = 1 U) hinzupipettiert und für 30min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch 20 minütiges Erhitzen bei 75°C gestoppt. Durch unvollständiges Auffüllen mit definierten dNTPs („Two Gap Fill in“) konnten mit dieser Methode nicht-kompatible Schnittstellen kompatibel gemacht werden, z.B. *HindIII* und *SpeI*.

3.12.3 Dephosphorylierung von Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase

Vor der Ligation wurde in der Regel die 5'-Phosphatgruppe eines mit Restriktionsenzymen linearisierten Vektors entfernt, um die Wahrscheinlichkeit der Vektor-Rezirkularisierung zu reduzieren. Dies ist vor allem dann notwendig, wenn der Vektor nach der Spaltung

komplementäre Enden aufweist. Nach der Linearisierung der Vektor-DNA wurde dem Restriktionsansatz 1 µl alkalischer Phosphatase (Shrimp) zugegeben und anschließend 1h bei 37°C inkubiert. Die Reinigung der so behandelten Vektor-DNA erfolgte mittels präparativer Agarosegel-Elektrophorese.

3.12.4 Ligation von DNA-Enden

Für die Ligation wurde dephosphorylierte Vektor-DNA mit einem dreifachen molaren Überschuß an DNA-Insert ligiert. Die Ligation erfolgte in einem Volumen von 20 µl, wobei das zu klonierende Insert mit 2 µl Ligase-Puffer (10x), 50 ng Vektor-DNA und 1 µl T4 DNA-Ligase versetzt wurde. Die Ansätze wurden über Nacht im Wasserbad bei 14°C inkubiert und danach in Bakterien transformiert (Kapitel 3.4.2)

| | | |
|----------------------|-----------|-------------------|
| Ligase-Puffer (10x): | 500 mM | Tris/HCl, pH 7,5 |
| | 100 mM | MgCl ₂ |
| | 100 mM | DTT |
| | 10 mM | ATP |
| | 250 µg/ml | BSA |

Alternativ wurde für die Ligation der „Rapid DNA Ligation Kit“ von Roche verwendet. Hierbei kann die Ligation in 5min durchgeführt werden. Auch hier wird mit T4 DNA-Ligase gearbeitet, die molaren Verhältnisse von Vektor-DNA und Insert sind analog. Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.

3.12.5 Klonierung von PCR-Produkten

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurden diese zunächst mit dem „PCR Purification Kit“ von Qiagen oder über ein Agarosegel aufgereinigt. Anschließend wurden die Fragmente mit den geeigneten Restriktionsendonukleasen behandelt und in die entsprechenden Vektoren ligiert (Kapitel 3.12.4). Alternativ wurden mit *Taq*-Polymerase amplifizierte DNA-Fragmente direkt in den Vektor pCR2.1[®]-TOPO (Invitrogen) kloniert. Für das sogenannte „TOPO TA Cloning[®]“ wurden die Angaben des Herstellers unverändert übernommen.

3.13 PCR-Techniken

3.13.1 Standard-PCR

Die PCR („polymerase chain reaction“) ist eine Methode zur enzymatischen Amplifikation von DNA-Fragmenten unter Verwendung spezifischer Primer, die von (Saiki *et al.*, 1985) entwickelt wurde. Durch den Einsatz der thermostabilen *Taq*-Polymerase (Saiki *et al.*, 1988) konnte das Verfahren wesentlich vereinfacht und automatisiert werden. Das Prinzip der PCR ist die exponentielle Amplifikation eines DNA-Abschnittes mittels hybridisierender Oligonukleotide (Primer), wobei das Produkt eines Reaktionszyklusses erneut als Substrat für die Polymerase fungieren kann. Bei einer Standard-PCR-Reaktion wurde genomische DNA, Plasmid-DNA oder cDNA in einem 50 µl Ansatz mit 5 µl Polymerase Puffer (10x), je 20 pmol der beiden Primer, 1 µl eines dNTP-Gemisches (je 10 mM) und 2,5 Units Polymerase auf Eis angesetzt. Es wurden in der Regel 30-35 Amplifikationszyklen durchgeführt, die aus je einem Denaturierungsschritt (45sec, 95°C), einem Annealingschritt (45sec, 1-3°C unterhalb der Primerschmelztemperatur) und einem Polymerisationsschritt (1-2min, 72°C) bestanden. Abschließend wurde für 10min bei 72°C inkubiert, um unvollständige Amplifikate zu ergänzen. Die Annealingtemperatur ist von der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide abhängig und wurde anhand einer von (Baldino, Jr. *et al.*, 1989) beschriebenen Formel berechnet (siehe unten). Die Schmelztemperaturen der beiden Oligonukleotide sollten möglichst eng beieinander liegen, um unspezifische Bindungen der Primer zu verhindern. Für Klonierungen wurde anstelle der *Taq*-Polymerase die *Pfu*-Polymerase verwendet, da dieses Enzym eine Lesekorrekture-Funktion besitzt und dadurch eine deutlich geringere Fehlerrate aufweist.

Formel zur Berechnung der Primerschmelztemperatur:

$$T_m \text{ (in } ^\circ\text{C)} = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log_{10}[\text{K}^+]) + 0,41 (\%[\text{G} + \text{C}]) - (675/\text{L})$$

[K⁺]: Konzentration monovalenter Kationen in Mol

%[G + C]: G/C – Gehalt des Oligonukleotides

L: Länge des Oligonukleotides

| | | |
|---------------------------|---------|---|
| <i>Taq</i> -Puffer (10x): | 200 mM | Tris/HCl (pH 8,4) |
| | 500 mM | KCl |
| MgCl ₂ : | 50 mM | MgCl ₂ |
| <i>Pfu</i> -Puffer (10x): | 200 mM | Tris/HCl (pH 8,8) |
| | 100 mM | KCl |
| | 100 mM | (NH ₄) ₂ SO ₄ |
| | 20 mM | MgSO ₄ |
| | 1 % | Triton X-100 |
| | 1 mg/ml | BSA (Nuklease frei) |

3.13.2 Reverse Transkription

Die Standard-PCR ist eine besonders gut geeignete Methode zur enzymatischen Amplifikation von DNA-Fragmenten, die in sehr niedriger Konzentration vorliegen. Sie kann jedoch auch dazu benutzt werden, cDNA zu amplifizieren, die revers aus RNA transkribiert wurde, um die Genexpression zu analysieren. Zur Herstellung der cDNA muß zunächst die Erststrang-Synthese aus Gesamtzell- oder Poly(A)⁺-RNA durchgeführt werden. Hierfür wurde der „Advantage™ RT-for-PCR“ Kit von Clontech verwendet. Für die reverse Transkription wurden 0,5 µg Poly(A)⁺-RNA aus Dünndarm, Gehirn, Leber, Lymphknoten, Magen und Milz (Clontech) sowie 0,5 µg Gesamtzell-RNA von HepG2-Zellen (freundlicherweise von Dr. Marcus Gassmann zur Verfügung gestellt) eingesetzt. Die in 12,5 µl H₂O verdünnte RNA wurde mit 20 pMol Oligo(dT)₁₈-Primer versetzt und denaturiert (70°C, 2min). Anschließend wurde der Reaktionsmix, der die MMLV-Reverse Transkriptase enthält, hinzugegeben und der Ansatz für 1h auf 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 94°C für 5min gestoppt. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Zugabe von Reverser Transkriptase gestartet.

| | | | | |
|---------------|--------|----------------------------|--------|-------------------|
| Reaktionsmix: | 4 µl | 5x Reaktion-Puffer | 250 mM | Tris/HCl, pH 8,3 |
| | | | 375 mM | KCl |
| | | | 15 mM | MgCl ₂ |
| | 1 µl | dNTP Mix | 10 mM | each |
| | 0,5 µl | RNase-Inhibitor | 40 | Units / µl |
| | 1 µl | MMLV-Reverse Transkriptase | 200 | Units / µl |

Die auf diese Weise hergestellte cDNA wurde nun für die PCR verwendet. Für eine 50 µl PCR-Reaktion wurden 5 µl der in 100 µl verdünnten cDNA eingesetzt. Es wurde die *Taq*-Polymerase mit dem dazugehörigen Puffer verwendet. Die Primerkonzentration lag wie bei der Standard-PCR bei 20 pMol. Zur Kontrolle wurde die Primermischung G3PDH (Clontech) eingesetzt, die eine Amplifikation der in Säugerzellen konstitutiv exprimierten Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase erlaubt. Die PCR-Produkte wurden anschließend im Agarosegel analysiert.

3.13.3 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Der Sequenzierung von Plasmid-DNA lag die Methode von (Sanger *et al.*, 1977) zugrunde, die auf dem Prinzip des Kettenabbruchs durch den Einbau von Dideoxynukleotiden beruht. Es stand ein ABI Prism 310 Sequenzierer zur Verfügung, der nicht-radioaktives automatisiertes Sequenzieren ermöglicht. Hierbei werden die DNA-Moleküle anstelle mit den traditionellen Radioisotopen mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert. Es wurde nach einer Methode sequenziert, die auf dem Dye Terminator System von (Lee *et al.*, 1992) beruht. Hierbei sind die fluoreszierenden Farbstoffe an die Dideoxynukleotide gekoppelt. Jedes der vier ddNTPs ist mit einem verschiedenen Farbstoff markiert. Es wurde der „BigDye™ Terminator

Sequencing Kit“ von PE Biosystems verwendet. Dieser enthält die AmpliTaq® DNA-Polymerase FS. Dieses Enzym ist eine Variante der *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase und besitzt eine Punktmutation, die den Einbau von ddNTPs erleichtert. Die Sequenzierreaktion kann mit jedem Primer ausgeführt werden und erlaubt eine große Zahl verschiedener Templates (einzelsträngige DNA, doppelsträngige DNA, PCR-Fragmente).

Zum Sequenzieren von Plasmid-DNA wurde der folgende Reaktionsansatz auf Eis angesetzt:

| | | |
|------------------|--|--------------------------------------|
| H ₂ O | 6 µl | |
| DNA-Template | 1 µl | (500 µg doppelsträngige Plasmid-DNA) |
| Primer | 1 µl | (10 pMol) |
| Premix | 2 µl | |
| Premix: | A-Dye Terminator markiert mit dichloro[R6G] C-Dye Terminator markiert mit dichloro[ROX] G-Dye Terminator markiert mit dichloro[R110] T-Dye Terminator markiert mit dichloro[TAMRA] Deoxynukleotide (dATP, dCTP, dITP, dUTP) AmpliTaq DNA-Polymerase, FS MgCl ₂ Tris/HCl Puffer, pH 9,0 | |

Es wurden nach folgendem PCR-Protokoll 25 Zyklen gefahren:

| | |
|----------------|-------------|
| Denaturierung: | 96°C, 10sec |
| Annealing: | 50°C, 10sec |
| Synthese: | 60°C, 4min |

Um die überschüssigen Nukleotide zu entfernen, wurde der Reaktionsansatz nun mittels einer Ethanol-fällung aufgereinigt. 90 µl H₂O, 10 µl 3 M NaAcetat-Lösung, pH 5,2 und 1 µl Dextranblau (50 mg/ml) wurden zu dem Reaktionsansatz hinzupipettiert. Die Lösung (111 µl) wurde nun in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 250 µl Ethanol (RT) versetzt. Der Ansatz wurde gut gemischt und anschließend abzentrifugiert (15min, 13000 rpm). Die DNA wurde mit 500 µl frischem 70 %igen Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert (5min, 13000 rpm). Das Pellet wurde für 5min in der Speed-Vac getrocknet, in 20 µl Template Suppression Reagent (TSR) aufgenommen und für 15min im Vibrax geschüttelt. Anschließend wurde die DNA-Lösung in Sequenzier-Röhrchen überführt und denaturiert (2min, 90°C). Kondensierte Wassertröpfchen wurden abzentrifugiert und der Ansatz in den Sequenzierer gestellt. Zum Sequenzieren wurde eine lange Sequenzier-Kapillare (61 cm x 50 µm ID) sowie das Performance Optimized Polymer 6 (POP-6) verwendet.

3.14 Markierung und Hybridisierung von Nukleinsäuren

3.14.1 Fluoreszenzmarkierung von Nukleinsäuren

Zur Fluoreszenzmarkierung von Nukleinsäuren wurde der „Gene Images™ random prime labelling Kit“ (Amersham Pharmacia) verwendet. In diesem Fall dienen Nonamere mit zufälliger Sequenz als Primer für die DNA-Polymerase (Klenow-Fragment). Fluorescein-11-dUTP (Fl-dUTP) ist im Nukleotidmix enthalten, so daß in einigen Fällen anstelle von dTTP das Fluoreszenz-markierte Nukleotid eingebaut wird und auf diese Weise eine Fluoreszenz-markierte Sonde erzeugt wird. Für die Markierung wurde das DNA-Fragment zunächst denaturiert (5min, 100°C) und sofort auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 50 ng denaturierter DNA mit 10 µl Nukleotidmix und 5 µl Primer versetzt. Der Ansatz wurde auf ein Volumen von 50 µl mit H₂O aufgefüllt und anschließend mit 5 Units Klenow-Fragment 1h bei 37°C inkubiert. Die Sonde wurde sofort zur Hybridisierung weiterverwendet.

| | |
|--------------------|--|
| Nukleotidmix (5x): | Fluorescein-11-dUTP (Fl-dUTP), dATP, dCTP, dGTP, dTTP in Tris/HCl, pH 7,8 2-Mercaptoethanol MgCl ₂ |
|--------------------|--|

Anhand des „Rapid Labelling Assays“ wurde anschließend überprüft, ob die Fluoreszenzmarkierung der Sonde funktioniert hat. Hierfür wurde der Nukleotidmix mit TE-Puffer in den Verdünnungen 1/5, 1/10, 1/50, 1/100, 1/250 und 1/500 angesetzt. 5 µl der markierten Sonde sowie 5 µl der 1/5 Verdünnung wurden auf eine Hybond N⁺-Membran aufgetropft und die Membran anschließend mit vorgewärmtem 2x SSC bei 60°C für 15min inkubiert. Fluoreszenz-markierte DNA sollte auf dieser Membran haften und durch den Waschschrift nicht entfernt werden können, wohingegen der Nukleotidmix gewaschen wird. Auf einem frischen Stück Membran wurden zur Referenz 5 µl der verschiedenen Nukleotidmix Verdünnungen aufgetropft und die beiden Proben miteinander verglichen. Eine erfolgreich markierte Sonde sollte im Bereich der 1/10 - 1/250 Verdünnung liegen.

| | |
|-------------------|--|
| SSC-Puffer (20x): | 0,3 M Na ₃ citrat 3 M NaCl |
|-------------------|--|

3.14.2 Hybridisierung filtergebundener Nukleinsäuren

Hierzu wurde der Hybridisierungs-Puffer auf 65°C vorgewärmt und der Blot darin in einem Volumen von 0,3 ml/cm² für 30min inkubiert. Die Fluoreszenz-markierte Sonde wurde denaturiert und anschließend hinzupipettiert (10 ng Sonde / ml Hybridisierungs-Puffer). Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C. Danach wurde die Hybridisierungs-Lösung

abgegossen und der Blot für je 15min bei 65°C in 1x SSC, 0,1 % (w/v) SDS und dann für 15min in 0,1x SSC 0,1 % (w/v) SDS gewaschen.

| | | |
|-------------------------|-------|---------------------|
| Hybridisierungs-Puffer: | 5x | SSC |
| | 0,1 % | SDS (w/v) |
| | 5 % | Dextransulfat (w/v) |

3.14.3 Detektion der Fluoreszenz-markierten Sonde im Northern Blot

Zur Detektion der Sonde im Northern Blot wurde der „Gene Images CDP Star Detektions Kit“ von Amersham Pharmacia verwendet. Der Kit beinhaltet einen anti-Fluorescein-Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist. Nach den unter Kapitel 3.14.2 beschriebenen Waschschrinen wurde der Blot für 1h in der Blocking-Lösung inkubiert („Liquid block“ 1/10 verdünnt in Puffer A). Der Fluorescein-Antikörper wurde 1/5000 in Puffer A plus 0,5 % (w/v) BSA verdünnt. Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte für 1h bei RT. Anschließend wurde dreimal für 10min mit 0,3 % (v/v) Tween 20 in Puffer A gewaschen. Zur Detektion wurde das CDP Star Detektions-Reagenz (30-40 µl per cm²) hinzupipettiert und die Signale nach Auflegen eines Film (X-Omat™ Blue XB-1, Kodak) sichtbar gemacht.

| | | |
|-----------|--------|--------------|
| Puffer A: | 100 mM | Tris/HCl |
| | 300 mM | NaCl, pH 9,5 |

3.15 Proteinbiochemische Methoden

3.15.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der BCA-Proteinassay von Pierce verwendet. Der Assay beruht auf der Reduktion von Cu⁺² zu Cu⁺¹ durch Proteine in alkalischem Medium (Biuret Reaktion) und der kolorimetrischen Detektion der Kupferionen (Cu⁺¹) in einem Reagenz das Bicinchoninic Acid (BCA) enthält (Smith *et al.*, 1985). Der Komplex aus zwei Molekülen BCA und einem Kupferion ergibt ein violettfarbenes Reaktionsprodukt, welches eine starke Absorption bei 562 nm aufweist. Da ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen der Absorption bei 562 nm und dem Proteingehalt der Lösung in einem Bereich von 20 µg/ml bis 2000 µg/ml besteht, kann durch Vergleich mit den Werten einer Eichkurve die Proteinkonzentration einer Probe ermittelt werden. Für die Eichkurve wurde BSA in einem Konzentrationsbereich von 25 µg/ml bis 2000 µg/ml verdünnt in H₂O angesetzt. Der Assay wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Es wurden 25 µl eines Standards oder einer Probe vorgelegt und mit 200 µl Working Reagent (WR)

versetzt. Das Working Reagent besteht aus 50 Teilen der BCA-haltigen Lösung A und einem Teil der Kupfer-haltigen Lösung B. Der Ansatz wurde für 30min bei 37°C inkubiert und anschließend die Absorption bei 562 nm gemessen. Unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren konnte nun die Proteinkonzentration anhand der Eichkurve bestimmt werden.

3.15.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit dieser von (Laemmli, 1970) beschriebenen Methode können Proteine anhand ihrer molekularen Masse aufgetrennt werden. Hohe SDS-Konzentrationen führen dabei zu einer vollständigen Denaturierung der Proteine und erzeugen einen negativen Ladungsüberschuß an der Proteinoberfläche, der proportional zum Molekulargewicht des Gesamtmoleküls ist. Die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld ist nun unabhängig von dem Einfluß unterschiedlicher Oberflächenladungen und wird alleine durch das Molekulargewicht eines unmodifizierten Proteins und den Vernetzungsgrad des Acrylamidgels bestimmt. Der Vernetzungsgrad eines Gels kann durch Verwendung verschiedener Mengen an Acrylamid/Bisacrylamid variiert werden. Durch ein vorangestelltes Sammelgel, das die negativ geladenen Protein/SDS Komplexe hinter einer Chloridionen-Lauffront akkumuliert, erreicht man eine Fokussierung der Proteinbanden. In diesem Fall wurden NuPAGE Bis-Tris Gele von Novex verwendet. Diese funktionieren analog der traditionellen Tris-Glycin Gele, weisen jedoch einen niedrigeren pH-Wert von Gel und Laufpuffer auf. Anstelle von Glycin wurde hier MES oder MOPS im Laufpuffer verwendet, je nachdem in welchem Molekulargewichtsbereich eine Auftrennung erzielt werden sollte.

| | | |
|----------------------------|---------|---|
| MES SDS-Laufpuffer (20x): | 97,6 g | MES |
| | 60,6 g | Tris Base |
| | 10 g | SDS |
| | 3 g | EDTA |
| | | mit H ₂ O auf 500 ml auffüllen, pH 7,3 |
| MOPS SDS-Laufpuffer (20x): | 104,6 g | MOPS |
| | 60,6 g | Tris Base |
| | 10 g | SDS |
| | 3 g | EDTA |
| | | mit H ₂ O auf 500 ml auffüllen, pH 7,7 |
| LDS-Probenpuffer (4x): | 4 g | Glycerin |
| | 0,682 g | Tris Base |
| | 0,666 g | Tris/HCl |
| | 0,8 g | LDS |
| | 0,006 g | EDTA |
| | 0,75 ml | Serva Blue G250 (1%ige Lösung) |
| | 0,25 ml | Phenolrot (1%ige Lösung) |
| | | mit H ₂ O auf 10 ml auffüllen |

Die Proben (4-15 µg Protein pro Tasche) wurden mit ¼ Volumen Auftragspuffer (4x) versetzt und unmittelbar vor dem Auftragen 10min bei 70°C erhitzt. Als Größenstandard wurde der mehrfarbige Proteinmarker MultiMark™ von Novex verwendet. Dieser enthält die folgenden Protein-Standards:

| | | |
|----------------------------|------------------------|---------|
| MultiMark Proteinstandard: | Myosin | 185 kDa |
| | Phosphorylase B | 98 kDa |
| | Glutamin Dehydrogenase | 52 kDa |
| | Carboanhydrase | 31 kDa |
| | Myoglobin rot | 19 kDa |
| | Myoglobin blau | 17 kDa |
| | Lysozym | 11 kDa |
| | Aprotinin | 6 kDa |
| | Insulin | 3 kDa |
| | in MES Laufpuffer | |

3.15.3 Coomassie-Färbung

Zur Anfärbung, der durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine, wurde das Gel für einige Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler in einer Coomassie-Färbelösung inkubiert. Der Farbhintergrund des Gels wurde durch über Nacht Inkubation mit Entfärbelösung entfernt. Zum Trocknen wurde das Gel zwischen zwei in H₂O/Glycerin (3 %) getränkte Zellophanfolien gelegt, luftblasenfrei in einem Rahmen eingespannt und an der Luft getrocknet.

| | | |
|------------------------|-------|--|
| Coomassie-Färbelösung: | 60 ml | H ₂ O mit |
| | 20 ml | Methanol mischen und unter Rühren |
| | 20 ml | Roti-Blue (Roth, vor Gebrauch gut schütteln) hinzugeben |
| Entfärbelösung: | 10 % | Essigsäure (v/v) |
| | 20 % | Isopropanol (v/v) |
| | 3 % | Glycerin (w/v) |

3.15.4 Silberfärbung

Mit einer Silberfärbung lassen sich Proteine noch im Nanogrammbereich nachweisen. Alle Arbeiten wurden mit Handschuhen und in sehr sauberen Plastikgefäßen durchgeführt. Es wurde mit dem „Silver staining Kit Plusone“ von Amersham Pharmacia gearbeitet, der auf der Methode von (Heukeshoven and Dernick, 1985) basiert. Das Gel wurde für 30min in 125 ml Fixierlösung und dann für 30min in 125 ml Sensibilisierungslösung inkubiert und anschließend dreimal für je 5min mit 100 ml H₂O gewaschen. Danach erfolgte die Färbung für 20min in 125 ml Silbernitratlösung. Anschließend wurde zweimal 1min mit 100 ml H₂O

gewaschen und das Gel dann in 125 ml Entwicklerlösung inkubiert. Bei Erreichen der gewünschten Farbintensität wurde die Reaktion mit 125 ml Stopplösung beendet.

| | | |
|--------------------------|----------|--------------------------------|
| Fixierlösung: | 50 ml | Ethanol |
| | 12,5 ml | Eisessig |
| | 62,5 ml | H ₂ O |
| Sensibilisierungslösung: | 37,5 ml | Ethanol |
| | 0,625 ml | Glutardialdehyd (25% w/v) |
| | 5 ml | Natriumthiosulfat (5% w/v) |
| | 8,5 g | Natriumacetat |
| | | ad 125 ml mit H ₂ O |
| Silbernitratlösung: | 12,5 ml | Silbernitratlösung (2,5% w/v) |
| | 50 µl | Formaldehyd (37% w/v) |
| | | ad 125 ml mit H ₂ O |
| Entwicklerlösung: | 3,15 g | Natriumcarbonat |
| | 25 µl | Formaldehyd (37% w/v) |
| | | ad 125 ml mit H ₂ O |
| Stopplösung: | 1,83 g | EDTA |
| | | ad 125 ml mit H ₂ O |

3.15.5 Präparation von Hefezelleextrakten

Für die Präparation von Hefezelleextrakten wurden 100 ml einer Hefekultur verwendet. Ausgehend von einer Übernachtskultur wurden die Zellen mit einer Anfangs-OD₆₀₀ von 0,1-0,2 gestartet. Die Hefen wurden innerhalb ihrer logarithmischen Wachstumsphase, d.h. bei einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 1,0 geerntet. Die Zellen wurden abzentrifugiert (8min, 4000 rpm, 4°C) und einmal mit eiskaltem Sorbitol (1 M) gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (8min, 4000 rpm, 4°C) wurden die Zellen in 1 ml Extraktionspuffer resuspendiert. In einem 2ml Eppendorfgefäß wurden 500 µl Glasbeads (Ø 425 - 600 µm, Sigma) vorgelegt und die in Extraktionspuffer resuspendierten Zellen hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen in einer Schwingmühle aufgeschlossen (10min, maximale Frequenz, 4°C). Die Zellsuspension oberhalb der Glasbeads wurde abgenommen und abzentrifugiert (10min, 13000 rpm, 4°C). Der klare Überstand wurde anschließend in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und eine Proteinbestimmung durchgeführt. Für die Analyse der Membranfraktion wurde das Zellpellet mit einem zweifachen Volumen an LDS-Probenpuffer (Kapitel 3.15.2) versetzt und mit einem Plastikpotter homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension erhitzt (10min, 70°C) und nach dem Abkühlen abzentrifugiert. Der Überstand wurde im Gel analysiert.

| | | |
|--------------------|------------|--|
| Extraktionspuffer: | 20 mM | Tris/HCl, pH 7,4 |
| | 100 mM | NaCl |
| | 1 % | Triton X-100 |
| | 1 mM | PMSF |
| | 1 Tablette | Complete (Protease Inhibitor Cocktail) |
| | | für 25 ml Extraktionspuffer |

3.15.6 Präparation von HEK 293-Zellextrakten

HEK 293-Zellen wurden für die Präparation zytosolischer Zellextrakte zwei Tage nach der Transfektion geerntet. Die adhärent wachsenden Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst und zusammen mit dem Überstand in ein Falconröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (5min, 1000 rpm, 4°C) und das Pellet anschließend mit 5 ml eiskaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 250 µl eiskaltem Lysispuffer resuspendiert und dann abzentrifugiert (10min, 13000 rpm, 4°C). Der Lysispuffer enthält 1 % Triton X-100, was zur Solubilisierung der Zellmembran führt. Der Überstand wurde abgenommen und eine Proteinbestimmung durchgeführt.

| | | | |
|--------------|-----|----------|---|
| Lysispuffer: | 50 | mM | Hepes, pH 7,4 |
| | 150 | mM | NaCl |
| | 1 | % | Triton X-100 |
| | 10 | % | Glycerin |
| | 1 | Tablette | Complete (Protease Inhibitor Cocktail) für 25 ml Lysispuffer |

3.16 Immunologische Arbeitstechniken

3.16.1 Western-Blot

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen wurden diese mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend mit einer Semi Dry Blot-Apparatur auf die Oberfläche einer PVDF-Membran (Immobilon™-P) transferiert. Hierzu wurde die auf Gelgröße ausgeschnittenen PVDF-Membran kurz mit Methanol benetzt und anschließend zusammen mit dem Gel in Transblot-Puffer inkubiert. Pro Gel wurden sechs Lagen Filterpapier verwendet, die ebenfalls mit Transblot-Puffer befeuchtet wurden. Auf drei Lagen Filterpapier wurde möglichst luftblasenfrei zunächst die Membran und dann das Gel aufgelegt und anschließend der Aufbau mit drei Lagen Filterpapier überschichtet. Die Proteine wurden innerhalb von 75min mit 150 mA ($\sim 1,5 \text{ mA/cm}^2$) aus dem Gel auf die Membran geblottet. Für den immunologischen Nachweis wurde die Membran zunächst in Blocking-Lösung überführt (1h bei RT oder über Nacht bei 4°C). Danach wurde die Membran mit dem primären Antikörper inkubiert (1h bei RT oder über Nacht bei 4°C) und anschließend dreimal je 10min mit TBST gewaschen. Der erste Antikörper wurde je nach Affinität 1:500 bis 1:10000 in 15 ml TBST verdünnt. War der primäre Antikörper bereits Peroxidase markiert konnte der Blot nach den Waschschrinen direkt mit dem Chemilumineszenzreagenz (ECL Plus) inkubiert werden. War dies nicht der Fall, wurde mit einem sekundären Peroxidase markierten Antikörper inkubiert (30min bis 1h bei RT). Dieser wurde in der Regel in einer Verdünnung von 1:10000 in TBST eingesetzt. Anschließend wurde wieder dreimal für 10min mit TBST gewaschen und der Blot dann entsprechend den Angaben des Herstellers mit dem

Chemilumineszenzreagenz inkubiert. Die Banden wurden mit Hilfe eines Storm Imagers sichtbar gemacht.

| | | |
|-------------------|--------|------------------------|
| Transblot-Puffer: | 48 mM | Tris Base |
| | 200 mM | Glycin |
| | 20 % | Methanol |
| | 0,04 % | SDS |
| TBST: | 50 mM | Tris/HCl (pH 7,4) |
| | 150 mM | NaCl |
| | 0,1 % | Tween 20 |
| Blocking-Lösung: | 8 % | Milchpulver in TBST |

3.16.2 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation Antizym-bindender Proteine wurde eine Anti-HA-Affinitätsmatrix verwendet. Hierbei ist der monoklonale anti-HA-Antikörper (Ratte, Klon 3F10) kovalent an eine Matrix (Agarose beads) gekoppelt. Pro Ansatz wurden 40 µl resuspendierte anti-HA-Affinitätsmatrix in ein Eppendorfgefäß vorgelegt, einmal mit 1 ml kaltem IP-Lysispuffer (Lysispuffer aus Kapitel 3.15.6 aber ohne Glycerin) gewaschen und abzentrifugiert (1min, 4°C, 1000 rpm). Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und 50 µg Gesamtprotein (Zytosolextrakte von HEK 293-Zellen) verdünnt in 500 µl IP-Lysispuffer hinzupipettiert. Der Ansatz wurde für 1h bei 4°C im Überkopffrotor inkubiert. Die Immunkomplexe wurden abzentrifugiert (1min, 1000 rpm, 4°C) und dreimal mit 1 ml kaltem IP-Lysispuffer gewaschen. Es wurde beim Abnehmen des Überstandes darauf geachtet, das Matrixpellet nicht zu verletzen. Anschließend wurden 40 µl LDS-Probenpuffer (Kapitel 3.15.2) hinzupipettiert und der Ansatz für 10min bei 70°C erhitzt. Der Überstand wurde abgenommen, im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend im Western-Blot analysiert.

3.17 Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen

3.17.1 Induktion der Proteinexpression und Aufschluß der Bakterien

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurden die entsprechenden Konstrukte in den bakteriellen Expressionsvektor pGEX-4T kloniert und in *E. coli* TOP10F' transformiert (Kapitel 3.4.2). Eine Einzelkolonie wurde in 5 ml LB-Amp Medium angeimpft und über

Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Übernachtskultur wurde 1:100 in frischen LB-Amp-Medium verdünnt (100 ml) und bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 vermehrt. Anschließend wurde die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,1 mM) gestartet und die Kultur für weitere 3h bei 30°C inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (10min, 4000 rpm, 4°C) und in 25 ml Tris/NaCl-Puffer gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (10min, 4000 rpm, 4°C) wurden die Zellen in 1,5 ml Lysispuffer aufgenommen und in flüssigem Stickstoff (N₂) Schock-gefroren. Anschließend wurden die Zellen auf Eis wieder aufgetaut und in 6 ml Falconröhrchen überführt. Auf Eis wurden die Proben fünfmal für 12sec sonifiziert wobei die Probe nach jeder Sonifikation kurz im Eisbad gekühlt wurde. Danach wurden die Proben abzentrifugiert und aufgrund des DTT-haltigen Lysispuffers eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

| | | |
|-------------------|------------|--|
| Tris/NaCl-Puffer: | 50 mM | Tris/HCl pH 7,4 |
| | 100 mM | NaCl |
| GST-Lysispuffer: | 50 mM | Hepes, pH7,4 |
| | 500 mM | NaCl |
| | 5 mM | DTT |
| | 1 % | Triton X-100 |
| | 1 Tablette | Complete (Protease Inhibitor Cocktail) |

3.17.2 Reinigung über Glutathion Sepharose

Zur Aufreinigung der GST-Fusionsproteine wurde der „MicroSpin™ GST Purification Kit“ von Amersham Pharmacia verwendet. Jedes Micro Spin Säulchen enthält 50 µl Glutathion Sepharose 4B in 600 µl PBS + 0,05 % Kathon® CG/ICP Biocide. Vor Gebrauch wurde die Glutathion Sepharose durch Vortexen resuspendiert. Der Plastikverschluß wurde entfernt, das Säulchen in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und das PBS abzentrifugiert (1min, 3000 rpm, 4°C). Danach wurden die Säulchen wieder mit dem Plastikverschluß abgedichtet. Zu jedem Säulchen wurden 600 µl der GST-Extrakte hinzupipettiert und der Ansatz für 30min bei 4°C im Überkopffrotor inkubiert. Anschließend wurde der Verschluß wieder entfernt, das ungebundene Material abzentrifugiert (1min, 3000 rpm, 4°C) und die Sepharose zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden 100-200 µl Glutathion-Elutionspuffer zu dem abgedichteten Säulchen hinzupipettiert, der Ansatz für 30min bei 4°C inkubiert und die eluierten Proteine durch Zentrifugation (1min, 3000 rpm, 4°C) gewonnen. Von jeder Fraktion (Durchfluß, Waschschritte und Elution) wurde Material entnommen und abschließend die Proben im SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

| | |
|-----------------|------------------------|
| Elutionspuffer: | 10 mM Glutathion |
| | 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 |

4 Ergebnisse

Ligand / Rezeptor-Interaktionen regulieren eine Vielzahl von fundamentalen Prozessen in der Biologie und formen die Basis für die pharmakologische Intervention bei humanen Erkrankungen. Traditionell basiert die Identifikation von Ligand / Protein-Interaktionen auf *in vitro* Studien wie Affinitätschromatographie, radioaktiven Liganden-Bindungsstudien oder Photoaffinitätsmarkierung. Das von (Licitra and Liu, 1996) entwickelte Hefe-3-Hybrid-System dagegen ermöglicht die *in vivo* Identifikation von Ligand / Rezeptor-Interaktionen. Dieses Testverfahren ist eine Weiterentwicklung des klassischen Hefe-2-Hybrid-Systems von (Fields and Song, 1989) und basiert auf dem Einsatz eines zusätzlichen Hybridmoleküls. Dieses wird *in vitro* synthetisiert und besteht aus einem Liganden, der mit einem bekannten Rezeptor interagiert und kovalent mit einem Molekül verbunden ist, für das der Interaktionspartner gesucht wird. Der feste Bestandteil des von (Licitra and Liu, 1996) vorgestellten Hybridmoleküls ist das Hormon Dexamethason, das über die Hormon-bindende Domäne des Glukokorticoidezeptors der Ratte in der Zelle verankert wird. Ziel dieser Arbeit war es, zunächst das Hefe-3-Hybrid-System im Labor zu etablieren und dieses System zur Identifikation neuer Interaktionspartner für das Immunsuppressivum FK506 zu verwenden. Der folgende Teil beschreibt die Klonierung und Charakterisierung einer Spleißvariante von Antizym-Inhibitor, die als spezifischer Interaktor für FK506 identifiziert werden konnte. Des weiteren wurde ein nicht-radioaktiver Test zur Funktionsanalyse des ODC / Antizym / Antizym-Inhibitor-Komplexes entwickelt, mit dem sich die Aktivitäten der genannten Proteine *in vivo* bestimmen ließen. Hierfür wurde die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus verwendet. Im letzten Teil der Arbeit wurde untersucht, inwieweit sich die mit Hefe gewonnenen Daten auf höhere Organismen wie Säugerzellen übertragen lassen.

4.1 Etablierung des auf Hefe-basierenden 3-Hybrid-Systems

4.1.1 Das Prinzip des 3-Hybrid-Systems

Das 3-Hybrid-System der Hefe (siehe Abbildung 4.1) basiert auf dem Hormon Dexamethason als festem Bestandteil des synthetischen Hybridmoleküls. Das Hormon wird über die Hormon-bindende Domäne des Glukokorticoidezeptors der Ratte in der Zelle verankert und ist kovalent mit einem Molekül X verknüpft, für das der Interaktionspartner gesucht wird. Für die Validierung des 3-Hybrid-Systems ist als Molekül X das Immunsuppressivum FK506 beschrieben, welches mit hoher Affinität an das FK506-Bindeprotein FKBP12 bindet (Schreiber, 1991). Es wurde zunächst die Hormon-bindende Domäne des

Glukokorticoidrezeptors der Ratte mit der DNA-bindenden Domäne des *E. coli* Transkriptionsfaktors LexA fusioniert (Ankerprotein). Das FK506-bindende Protein FKBP12 wurde in den Genbankvektor pJG4-5 kloniert (Beuteprotein). Dieser besitzt ein Kernlokalisationsignal, das Hämagglutinin-Epitop und die B42-Aktivierungsdomäne (Acidic Blob Domain (Ma and Ptashne, 1987)). Das Fusionsprotein des Genbankvektors wird unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors induziert. Werden beide Fusionsproteine in der Hefe exprimiert, so findet nur dann eine transkriptionelle Aktivierung der Reportergene statt, wenn das Heterodimer aus Dexamethason und FK506 (Köder) vorhanden ist. Hierdurch werden Aktivierungsdomäne und DNA-bindende Domäne in räumliche Nähe gebracht und ein vollständiger Transkriptionsfaktor entsteht. Dies führt zur Expression der Reportergene *LEU2* und *lacZ*, infolgedessen die Hefezellen auf Leucin-freiem Medium wachsen und sich auf X-Gal-haltigen Selektionsplatten blau färben.

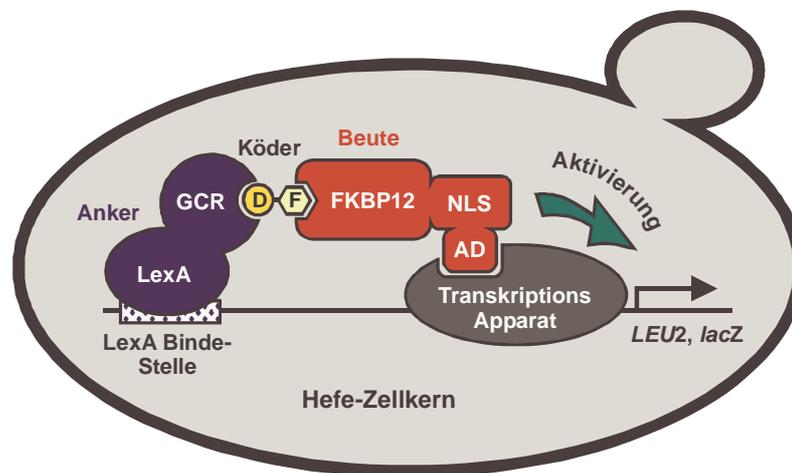


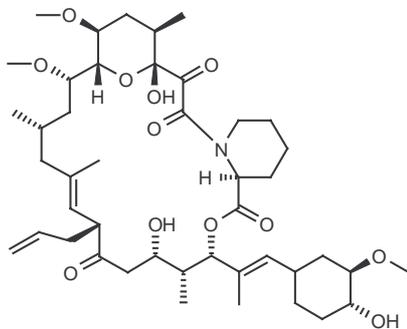
Abbildung 4.1: Das Prinzip des Hefe-3-Hybrid-Systems mit FK506 als Ködermolekül

Für die Etablierung des 3-Hybrid-Systems wurde die Hormon-bindende Domäne des Glukokorticoidrezeptors der Ratte (GCR) mit der DNA-bindenden Domäne des *E. coli*-Transkriptionsfaktors LexA fusioniert (Anker). Das FK506-bindende Protein FKBP12 wurde in den Genbankvektor pJG4-5 kloniert (Beute). Dieser besitzt ein Kernlokalisationsignal (NLS), das Hämagglutinin-Epitop und die B42-Aktivierungsdomäne (AD). Werden beide Hybridproteine in der Hefe exprimiert, so findet nur dann eine transkriptionelle Aktivierung der Reportergene statt, wenn das synthetische Heterodimer aus Dexamethason (D) und FK506 (F) (Köder) vorhanden ist. Hierdurch werden Aktivierungsdomäne und DNA-bindende Domäne in räumliche Nähe gebracht und ein vollständiger Transkriptionsfaktor entsteht. Dies führt zur Expression der Reportergene *LEU2* und *lacZ*.

4.1.2 Die synthetische Komponente des 3-Hybrid-Systems

Das Makrolid-Antibiotikum FK506 wurde ursprünglich aus dem Bodenpilz *Streptomyces tsukubaensis* isoliert. FK506 besitzt eine stark immunsuppressive Wirkung und wird zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen eingesetzt (Fung and Starzl, 1995). Am besten charakterisiert ist die Hemmung der T-Zellproliferation durch

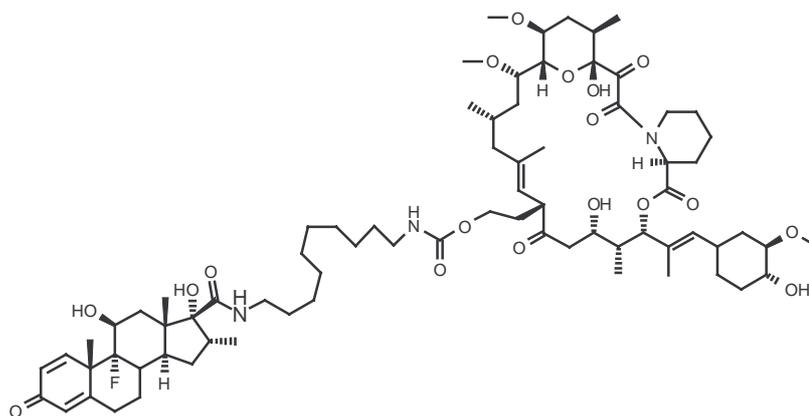
FK506. Der Komplex aus FK506 und FKBP12 bindet an die Phosphatase Calcineurin (Liu *et al.*, 1991). Hierdurch wird die Phosphatase gehemmt, die Signalkaskade, die zur Induktion von Interleukin 2 führt, blockiert und infolgedessen die T-Zellproliferation inhibiert. Für FK506 ist bekannt, welche Domäne des Moleküls für die Bindung an FKBP12 verantwortlich ist (Schreiber, 1991). Die Kopplungsstelle konnte also so gewählt werden, daß die Aktivität des Moleküls durch die Verknüpfung an den Dexamethason-Linker nicht zerstört wird. Es wurde ein Dexamethason-FK506 Heterodimer synthetisiert, das von der Struktur her mit dem für das 3-Hybrid-System beschriebenen Molekül übereinstimmt (Licitra and Liu, 1996) (Abbildung 4.2). Die Synthese des Dexamethason-FK506 Heterodimers wurde von Dr. Branislav Musicki (Romainville, Aventis Pharma Frankreich) durchgeführt.



FK506 (C₄₄H₆₉NO₁₂)
Molekulargewicht = 804,1 Da



Dexamethason (C₂₂H₂₉FO₅)
Molekulargewicht = 392,5 Da



Dexamethason-FK506 (C₇₅H₁₁₆FN₃O₁₈)
Molekulargewicht = 1366,77 Da

Abbildung 4.2: **Die synthetische Komponente des Hefe-3-Hybrid-Systems**

Das Steroidhormon Dexamethason wurde über eine Kohlenwasserstoffkette kovalent mit dem Immunsuppressivum FK506 verknüpft.

4.1.3 Die Glukokorticoide-Rezeptor-Konstrukte

Für das 3-Hybrid-System wurde der C-terminale Bereich des Glukokorticoide-Rezeptors der Ratte von Glycin⁵²⁵ bis Lysin⁷⁹⁵ verwendet. Er umfasst die Transaktivierungsdomäne 2 (Valin⁵²⁶ bis Glutamat⁵⁵⁵), die Hormonbindungsdomäne (Prolin⁵⁴⁰ bis Lysin⁷⁹⁵) und eine HSP90-Kontaktregion (Serin⁵⁶⁸ bis Valin⁶¹⁶). Zu Beginn dieser Arbeit standen vier verschiedene Versionen der Hormonbindungsdomäne des Glukokorticoide-Rezeptors der Ratte zur Verfügung, die sich durch insgesamt vier Punktmutationen unterschieden (siehe Abbildung 4.3). Um die Interaktion zwischen der Hormonbindungsdomäne des Glukokorticoide-Rezeptors und dem Dexamethason-Anteil des Hybridliganden zu optimieren, wurden zwei von (Licitra and Liu, 1996) beschriebene Mutationen eingefügt. Die Punktmutation Cystein⁶⁵⁶ zu Glycin erhöht die Affinität von Dexamethason für die Hormonbindungsdomäne (Chakraborti *et al.*, 1991). Die Mutation von Phenylalanin⁶²⁰ zu Serin steigert die Aktivierbarkeit des Glukokorticoide-Rezeptors in der Hefe (Garabedian and Yamamoto, 1992). Darüber hinaus gibt es verschiedene Angaben zur Sequenz der Hormonbindungsdomäne: Die von (Miesfeld *et al.*, 1986) publizierte Sequenz weist an den Aminosäurepositionen 600 und 602 ein Leucin auf (GenBank-Zugangsnummer M14053), wohingegen andere Datenbankeinträge an Position 600 ein Prolin und an Position 602 ein Phenylalanin beschreiben (GenBank-Zugangsnummer Y12264, SWISS-PROT Zugangsnummer P06537). Für die Etablierung des 3-Hybrid-Systems standen die folgenden Glukokorticoide-Rezeptor-Konstrukte zur Verfügung:

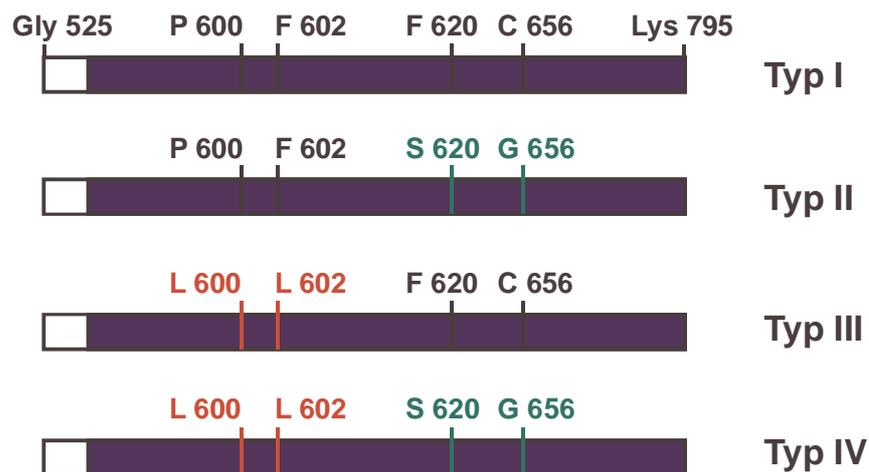


Abbildung 4.3: Die vier Glukokorticoide-Rezeptor-Varianten

Für das 3-Hybrid-System wurde der C-terminale Bereich des Glukokorticoide-Rezeptors der Ratte (Glycin⁵²⁵ bis Lysin⁷⁹⁵) verwendet. Typ II und Typ IV enthalten die Mutationen Phenylalanin⁶²⁰ zu Serin (S) und Cystein⁶⁵⁶ zu Glycin (G), welche die Aktivierbarkeit des Rezeptors in Hefe steigern sowie die Affinität von Dexamethason für den Rezeptor erhöhen. Typ I und Typ II besitzen an Position 600 ein Prolin (P) und an Position 602 ein Phenylalanin (F). Typ III und Typ IV haben an diesen Positionen ein Leucin (L).

Die vier Glukokortikoidrezeptor-Varianten (Typ I bis Typ IV) wurden über die *EcoRI* / *XhoI*- bzw. *SallI*-Restriktionsstellen in die vier 2-Hybrid-Expressionsvektoren pSH2-1, pEG202, pEG202-NLS und pGilda kloniert (Abbildung 4.4). Dies ergibt insgesamt 16 Konstrukte.

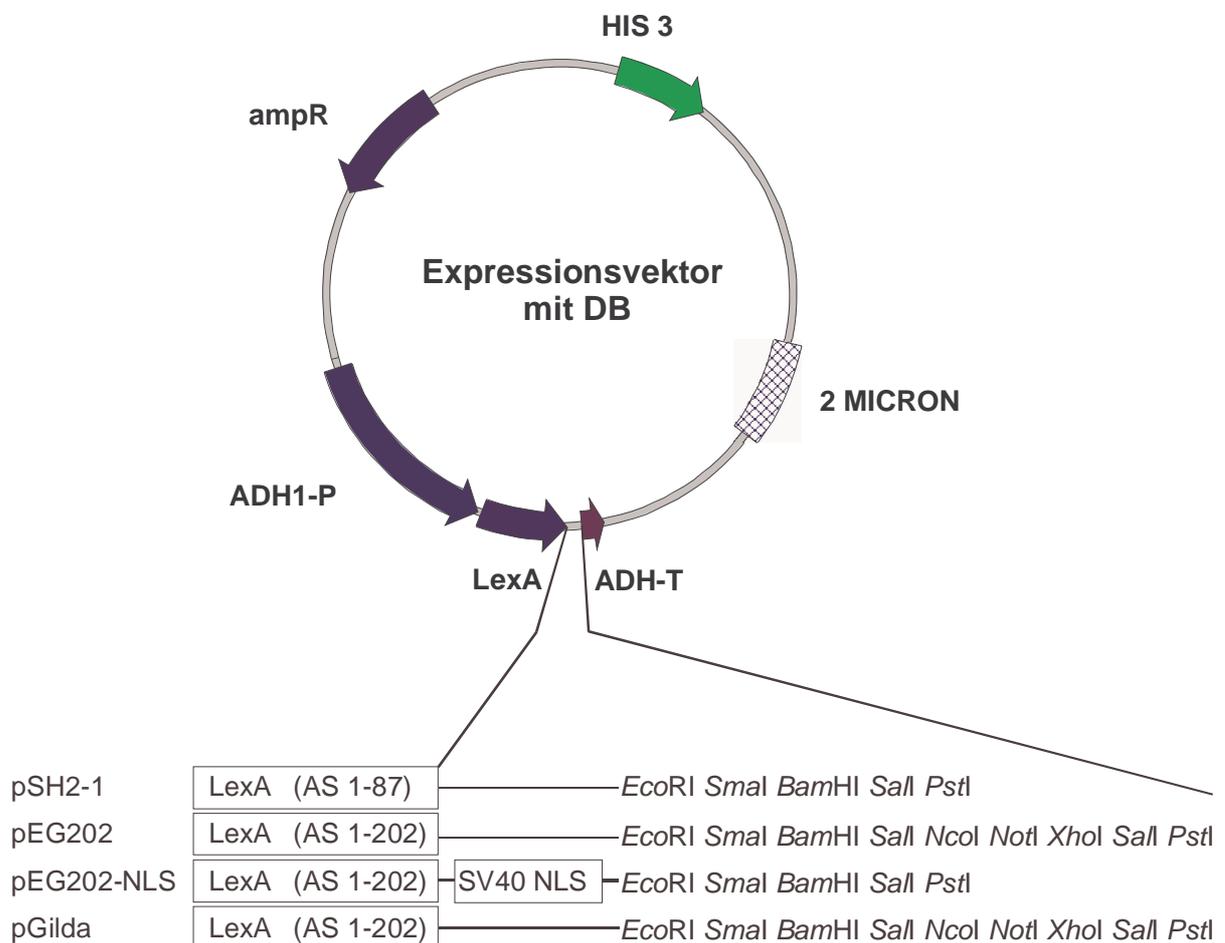


Abbildung 4.4: Die im 3-Hybrid-System verwendeten Expressionsvektoren mit DNA-Bindungsdomäne

Die Plasmide pSH2-1, pEG202 und pEG202-NLS enthalten den konstitutiven *ADH*-Promotor (*ADH*-P) sowie den *ADH*-Terminator (*ADH*-T) der Alkohol-Dehydrogenase. Das Plasmid pGilda besitzt anstelle des *ADH*-Promotors den induzierbaren *GALI*-Promotor und einen *CEN*-Replikationsursprung zur Vermehrung in Hefe. Zwischen Promotor- und Terminatorsequenz befindet sich die DNA-Bindungsdomäne des bakteriellen Repressors LexA sowie eine anschließende Polylinkerregion, die die Klonierung von LexA-Fusionsproteinen ermöglicht. pSH2-1 hat eine LexA-Bindungsdomäne (AS 1-87), pEG202, pEG202-NLS und pGilda besitzen außer der Bindungsdomäne auch eine LexA-Dimerisierungsdomäne (AS 1-202). Das Plasmid pEG202-NLS weist darüber hinaus noch eine SV40-Kernlokalisations-Sequenz (SV40 NLS) auf. Das *HIS3*-Gen und der 2 Micron-Replikationsursprung dienen der Selektion und Vermehrung in Hefe. In *E. coli* werden die Vektoren über das Ampicillinresistenzgen (*ampR*) selektiert und über den pBR322-Replikationsstart (nicht eingezeichnet) vermehrt.

4.1.4 Expression der Glukokorticoidezeptor-Konstrukte

Es wurde zunächst überprüft, ob alle 16 Glukokorticoidezeptor-Konstrukte in der Hefe exprimiert werden. Hierfür wurden die Rezeptorkonstrukte in den Hefestamm EGY48 transformiert und auf Histidin-defizienten Platten selektiert. Die Expression der LexA-Fusionsproteine wurde im Western-Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen den konstanten LexA-Anteil nachgewiesen. Wie in Abbildung 4.5 gezeigt, werden alle Fusionsproteine etwa gleich stark exprimiert. Interessanterweise erkennt der monoklonale Antikörper nicht das verkürzte LexA-Protein des Leervektors pSH2-1. Die pSH2-1 Fusionsproteine wurden jedoch alle erkannt.

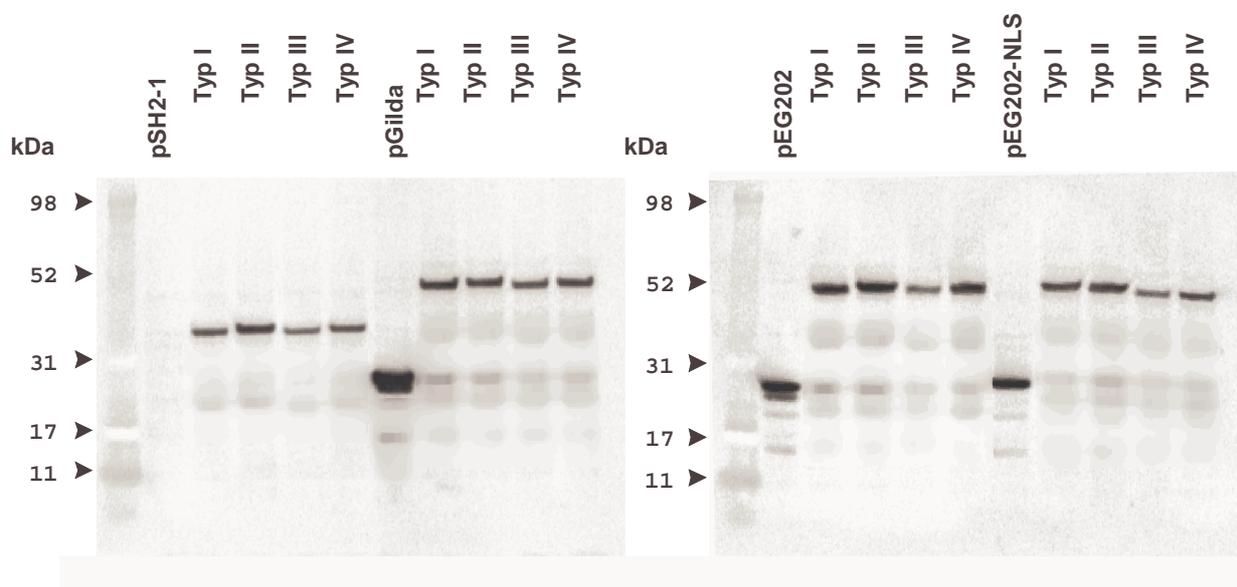


Abbildung 4.5: **Western-Blot Analyse der Glukokorticoidezeptor-Konstrukte**

Im Western-Blot wurde mit einem monoklonalen anti-LexA Antikörper (Maus) und mit einem sekundären Peroxidase-markierten Antikörper (Ziege, anti-Maus) die Expression der 16 Glukokorticoidezeptor-Konstrukte nachgewiesen. Die Signaldetektion wurde mit dem ECL-Verfahren durchgeführt. Pro Spur wurden 15 µg Gesamtprotein eines Hefeextraktes aufgetragen. Das Molekulargewicht von pSH2-1 LexA (AS 1-87) liegt bei 10 kDa, das Molekulargewicht der übrigen LexA-Konstrukte (AS 1-202) liegt bei etwa 25 kDa. Die Glukokorticoidezeptor-Konstrukte alleine haben ein Molekulargewicht von circa 30 kDa. Das Molekulargewicht der daraus resultierenden LexA-Fusionsproteine liegt für den Vektor pSH2-1 bei 40 kDa und für die übrigen Vektoren pEG202, pEG202-NLS und pGilda bei etwa 52 kDa.

4.1.5 Test auf Aktivierbarkeit der Glukokorticoidezeptor-Konstrukte

Die Glukokorticoidezeptor-Konstrukte wurden zusammen mit einem *lacZ*-Reporterplasmid in den *S. cerevisiae* Stamm EGY48 transformiert und mit Hilfe eines von (Brent and Ptashne, 1985) entwickelten Transkriptionsassays auf ihre Fähigkeit getestet, die Expression der Reportergene zu stimulieren (Abbildung 4.6). Bei dem Hefestamm EGY48 ist die „upstream

activating sequence“ (UAS) des endogenen *LEU2*-Gens gegen sechs LexA-Bindestellen ausgetauscht. Außerdem wurde das sensitive Reporterplasmid pSH18-34 verwendet, das acht LexA-Bindestellen vor dem *lacZ*-Reporter gen aufweist und einen 2 Mikron-Replikationsursprung besitzt. Wie in Kapitel 4.1.4 gezeigt werden alle Fusionsproteine exprimiert. Unterschiede in der Aktivierbarkeit sind demnach auf die Aminosäuresequenz der verschiedenen Glukokorticoide-Rezeptor-Konstrukte zurückzuführen.

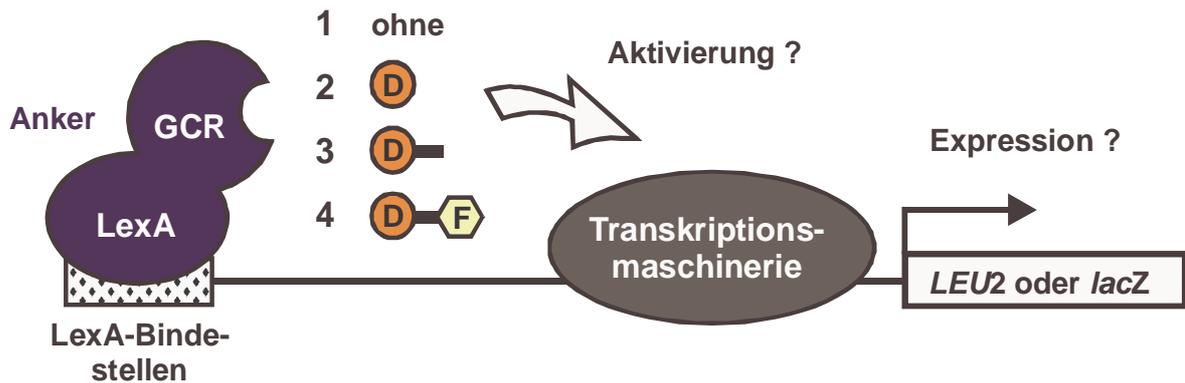


Abbildung 4.6: **Prinzip des Transkriptionsassays**

In Hefe (EGY48) exprimierte LexA Glukokorticoide-Rezeptor-Varianten binden über den LexA-Anteil an die LexA-Bindestellen des Reportergens. In Abhängigkeit von dem Aktivierungspotential des Rezeptors exprimieren die Hefezellen eine bestimmte Menge an β -Galaktosidase (*lacZ*) bzw. Isopropylmalat-Dehydrogenase (*LEU2*). Die Aktivität der β -Galaktosidase kann auf X-Gal-haltigen Indikatorplatten über eine Blaufärbung der Hefekolonien nachgewiesen werden. Die Expression der Isopropylmalat Dehydrogenase kann durch Wachstum auf Leucin-defizienten Indikatorplatten überprüft werden. Es wurde geprüft, ob der C-terminale Bereich des Glukokorticoide-Rezeptors alleine (1), in Gegenwart von Dexamethason (2), von Dexamethason-Linker (3) oder von Dexamethason-FK506 (4) in der Lage ist, die Transkription der Reportergene zu aktivieren.

Es zeigte sich, daß der C-terminale Bereich des Glukokorticoide-Rezeptors alleine nicht in der Lage war, die RNA-Polymerase II vermittelte Transkription zu stimulieren. In Gegenwart von Dexamethason waren die Konstrukte vom Typ II (Pro⁶⁰⁰, Phe⁶⁰², Ser⁶²⁰ und Gly⁶⁵⁶) ab einer bestimmten Konzentration jedoch aktivierbar. Dies zeigte sich im Wachstumstest ab einer Konzentration von 10 μ M Dexamethason und im β -Galaktosidasetest ab einer Konzentration von 1 μ M Dexamethason (Tabelle 4.1). Der C-terminale Bereich des Glukokorticoide-Rezeptors umfaßt eine Transaktivierungsdomäne (Valin⁵²⁶ bis Glutamat⁵⁵⁵). Diese überlappt mit der Hormonbindungsdomäne und trägt zur Aktivierbarkeit des Rezeptorfragmentes bei. Neben Typ II zeigte auch Typ I (Pro⁶⁰⁰, Phe⁶⁰², Phe⁶²⁰ und Cys⁶⁵⁶) bei einer hohen Hormonkonzentration (10 μ M Dexamethason) Aktivität im β -Galaktosidasetest. Im Gegensatz dazu konnten die Konstrukte vom Typ III und Typ IV (Leu⁶⁰⁰, Leu⁶⁰², Phe⁶²⁰ und Cys⁶⁵⁶ bzw. Leu⁶⁰⁰, Leu⁶⁰², Ser⁶²⁰ und Gly⁶⁵⁶) unter diesen Bedingungen nicht aktiviert

werden. Diese Ergebnisse erlauben den Rückschluß, daß die Aminosäurepositionen 600 und 602 äußerst wichtig sind bezüglich der Affinität von Dexamethason für die Hormonbindungsdomäne und die Aktivierbarkeit des Rezeptors.

| Hormonkonzentration | Aktivierbarkeit | Glukokorticoidezeptor-Variante |
|--|-----------------------------------|---|
| 1. ohne Hormon | nein | |
| 2. Dexamethason (0,1 μ M-10 μ M) | $\geq 10 \mu$ M | Typ I (β -Gal) |
| | $\geq 1 \mu$ M $\geq 10 \mu$ M | Typ II (β -Gal) Typ II (Wachstum) |
| 3. Dexamethason-Linker (0,1 μ M-10 μ M) | nein | |
| 4. Dexamethason-FK506 (0,1 μ M-10 μ M) | nein | |

Tabelle 4.1: **Aktivierbarkeit der Glukokorticoidezeptor-Varianten**

Die Aktivierbarkeit der Glukokorticoidezeptor-Varianten in Abhängigkeit von der Hormonkonzentration. Spalte 1 beschreibt die verwendeten Hormonkonzentrationen, Spalte 2 führt an, ob die Konstrukte aktivierbar sind und ab welcher Hormonkonzentration eine Aktivität festgestellt wurde. Spalte 3 beschreibt, welche Glukokorticoidezeptor-Variante eine Aktivität im β -Galaktosidase-Assay (β -Gal) oder im Wachstumstest zeigt.

Es wurde außerdem getestet, ob auch die Substanzen Dexamethason-Linker (Dex-Linker) und Dexamethason-FK506 (Dex-FK506) in der Lage sind, die Transkription zu aktivieren. Dabei zeigte sich, daß selbst bei einer sehr hohen Konzentration an Dex-Linker bzw. Dex-FK506 (10 μ M) keine Aktivierbarkeit festgestellt werden konnte (Tabelle 4.1). Das Hefe-3-Hybrid-System wird, wie von (Licitra and Liu, 1996) beschrieben, bei einer Konzentration von 1 μ M Dex-FK506 durchgeführt. Da weder Dex-Linker noch Dex-FK506 den Glukokorticoidezeptor in diesem Konzentrationsbereich aktivieren, ist das Problem der Eigenaktivierung für das 3-Hybrid-System nicht gegeben. Die Versuche lassen aber insgesamt darauf schließen, daß die Konstrukte vom Typ II in der Hefe besonders gut das Hormon Dexamethason binden und für das 3-Hybrid-System am besten geeignet sind.

4.1.6 Optimierung des Hefestammes EGY48 für das 3-Hybrid-System

Das Hefe-3-Hybrid-System basiert auf einer *in vivo* Protein / Molekül-Interaktion, d.h. kovalent an das Hormon Dexamethason gekoppelte Moleküle müssen die Zellmembran der Hefe passieren und in den Zellkern gelangen. In Hefezellen ist insbesondere der ABC-Transporter Pdr5 (siehe Abbildung 4.7) für den Export von Steroiden wie z.B. Dexamethason

verantwortlich (Kralli *et al.*, 1995). ABC- (ATP binding cassette) Transporter binden ATP und nutzen die Energie aus der ATP-Hydrolyse, um eine Vielzahl von Molekülen sowohl über die Plasmamembran als auch über die intrazellulären Membranen des endoplasmatischen Retikulums, der Peroxisomen und Mitochondrien zu transportieren (Bauer *et al.*, 1999).

Um das Hefe-3-Hybrid-System sensitiver zu gestalten, wurde der ABC-Transporter PDR5 in dem Hefestamm EGY48 deletiert. Neben Steroiden wie z.B. Dexamethason werden durch diesen Transporter eine Vielzahl verschiedener Molekülen transportiert u.a. die Zytostatika Vinblastin, Vincristin, Taxol und Farbstoffe wie Rhodamin 6G und Rhodamin 123 (Kolaczkowski *et al.*, 1996). Darüber hinaus gibt es noch einen Grund, den ABC-Transporter PDR5 speziell für das Hefe-3-Hybrid-System zu deletieren: Es ist bekannt, daß in der Hefe der Pdr5-Transporter durch das Immunsuppressivum FK506 gehemmt wird (Kralli and Yamamoto, 1996). Dies führt dazu, daß bei gleichzeitiger Gabe von Dexamethason und FK506 die Wirkung des Steroids verstärkt wird. Es ist also denkbar, daß das Hefe-3-Hybrid-System nur für das synthetische Hybridmolekül aus Dexamethason und FK506 funktioniert, da der FK506-Anteil des Moleküls den ABC-Transporter Pdr5 hemmt und hierdurch die Konzentration von Dexamethason-FK506 in der Hefezelle ansteigt. Da das Hefe-3-Hybrid-System in Zukunft aber auch für andere an Dexamethason gekoppelte Substanzen eingesetzt werden soll, war dies ein zusätzlicher Grund, den Transporter zu deletieren.

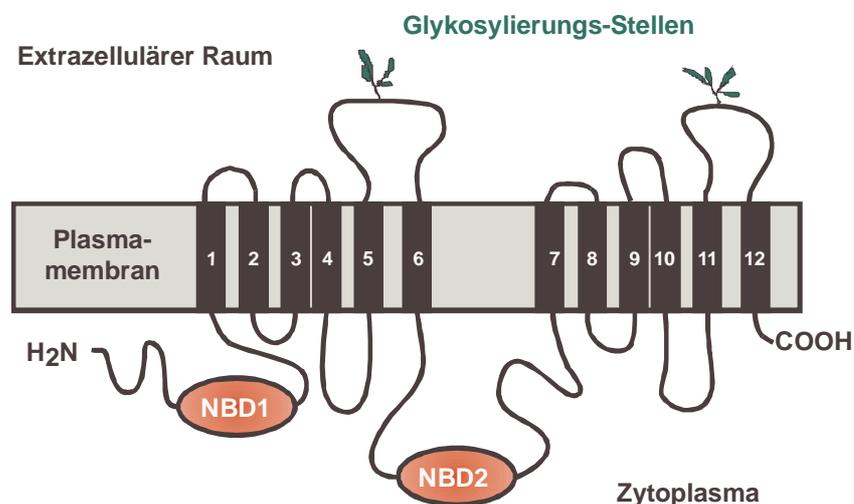


Abbildung 4.7: Schematische Darstellung von Pdr5

Der Pdr5-Transporter (Pleiotropic drug resistance) gehört zur Familie der ABC-Transporter. Diese bestehen aus ATP-bindenden Domänen (Nucleotide binding domain, NBD) und Transmembrandomänen (TM), die in der Regel sechs die Membran-durchspannende α -Helices aufweisen. ABC-Transporter sind entweder nur aus einer Transmembrandomäne und einer ATP-bindenden Domäne aufgebaut, oder sie besitzen die vollständige Struktur aus zwei ATP-bindenden Domänen und zwei Transmembrandomänen. Pdr5 zählt zu den vollständigen ABC-Transportern mit der Struktur NBD-TM-NBD-TM. Die Überexpression dieses Transporters führt zur Resistenz gegenüber einer Vielzahl toxischer Substanzen. Der PDR5-Transporter befindet sich auf dem Chromosom XV, die Größe des Gens liegt bei 4,5 kb.

Für die Deletion von PDR5 wurde die auf homologer Rekombination basierende Methode von (Wach *et al.*, 1994) verwendet (siehe Methoden, Kapitel 3.7). Diese benutzt ein *kanMX*-Modul, welches aus dem *E. coli* Kanamycin-Resistenzmarker besteht, der von Promotor- und Terminatorsequenzen des *TEF*-Gens aus dem Pilz *Ashbya gossypii* flankiert wird. In diesem Fall wurde eine PCR-Deletionskassette verwendet, die außerdem flankierende *loxP*-Bereiche (*loxP-kanMX-loxP*) aus dem Rekombinationssystem des Bakteriophagen P1 aufweist (Güldener *et al.*, 1996). Dies hat den Vorteil, daß die Kanamycinkassette durch die *Cre*-Rekombinase wieder ausgeschnitten werden kann und der Marker für weitere Anwendungen zur Verfügung steht. Mit Hilfe von Kanamycin- und PDR5-spezifischen Primern wurde zum Nachweis der Integration der Deletionskassette genomische DNA präpariert und eine diagnostische PCR durchgeführt.

4.1.7 Funktionelle Validierung der PDR5-Deletion

Der PDR5-Deletionsstamm ist nicht in der Lage, Fluoreszenz-Farbstoffe wie Rhodamin 123 oder Rhodamin 6G so effizient aus der Zelle zu entfernen wie der entsprechende Wildtypstamm (Kolaczowski *et al.*, 1996). Die Unterschiede in der Akkumulation von Rhodamin 123 zwischen EGY48 und EGY48 Δ PDR5 wurden mit dem Durchflußzytometer bestimmt (Egner *et al.*, 1998).

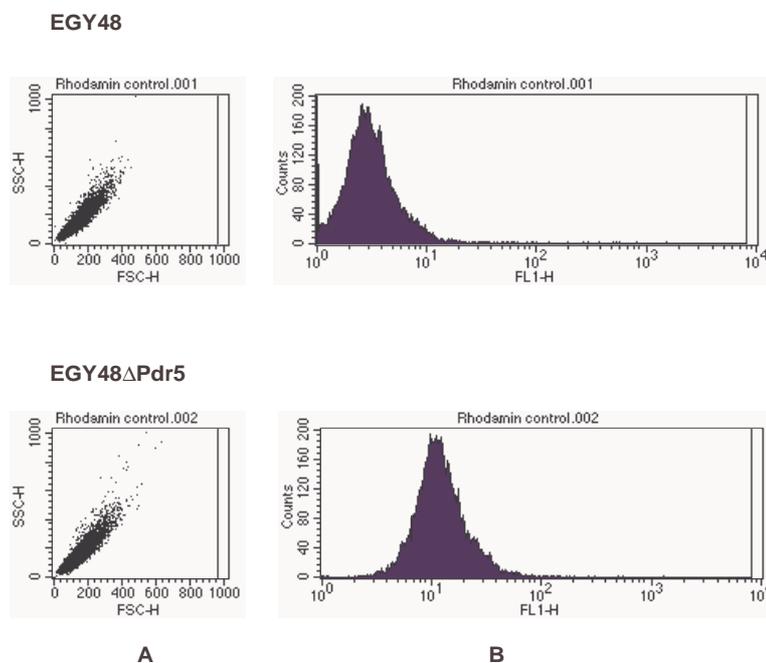


Abbildung 4.8: Funktionelle Validierung der PDR5-Deletion

Durchflußzytometer (FACSCalibur™): Anregungswellenlänge 488 nm, Emissionswellenlänge 515-575 nm. A: Darstellungsform Dot-Plot. B: Darstellungsform Histogramm. Hefezellen wurden in SC-Medium kultiviert, bei einer OD_{600} von 1,0 wurde Rhodamin 123 zugesetzt (Endkonzentration 2,5 μ g/ml Hefesuspension). Inkubation für 1h bei 30°C, dann wurden die Zellen 1:10 in eiskaltem Wasser verdünnt und die Fluoreszenz im Durchflußzytometer bestimmt (Egner *et al.*, 1998).

Wie aus Abbildung 4.8 ersichtlich, ist bei dem PDR5-Deletionsstamm das Maximum der Lichtintensität nach rechts verschoben, er weist demnach eine höhere Akkumulation von Rhodamin 123 auf als der Wildtypstamm. Darüber hinaus wurde im Transkriptionsassay beobachtet, daß im Vergleich zum Wildtypstamm die Aktivierbarkeit des Glukokorticoidezeptors durch Dexamethason im PDR5-Deletionsstamm etwa um den Faktor 10 zunimmt. Außerdem konnte die Glukokorticoidezeptorvariante vom Typ II nun auch von Dex-Linker (ab 10 µM) aktiviert werden, was für den Wildtypstamm nicht nachgewiesen werden konnte. Dies bedeutet, daß auch chemisch modifizierte Steroidhormone wie beispielsweise Dexamethason-Linker über Pdr5 transportiert werden. Für die folgenden Assays sowie für den 3-Hybrid-Screen wurde daher der PDR5-Deletionsstamm EGY48ΔPDR5 verwendet.

4.1.8 Validierung des 3-Hybrid-Systems mit FKBP12 als Beuteprotein

Für die Validierung des Hefe-3-Hybrid-Systems wurden die in Kapitel 4.1.3 beschriebenen 16 LexA-Glukokorticoidezeptor-Konstrukte zusammen mit dem sensitiven *lacZ*-Reporterplasmid pSH18-34 und dem in pJG4-5 klonierten FKBP12 in den *S. cerevisiae* Stamm EGY48ΔPDR5 transformiert und auf den entsprechenden Selektionsplatten analysiert. Wie aus Abbildung 4.9 ersichtlich, war nur bei Expression beider Fusionsproteine sowie in Anwesenheit von Dex-FK506 eine Induktion der Reportergene zu beobachten.

Dabei wurde gezeigt, daß nur die Konstrukte vom Typ II für das Hefe-3-Hybrid-System geeignet sind. Wie schon in Kapitel 4.1.5 beschrieben ist hier die Affinität von Dexamethason für den Rezeptor bzw. die Aktivität des Rezeptors in Hefe am größten. Generell war zu beobachten, daß die 3-Hybrid Interaktion FK506 - FKBP12 sowohl im β-Galaktosidase- wie auch im Wachstumstest einen schwächeren Phänotyp aufwies als die 2-Hybrid-Positivkontrolle. Innerhalb der vier Konstrukte vom Typ II war das Konstrukt pSH2-1 am wenigsten sensitiv. Der Vektor pSH2-1 besitzt nur eine LexA-Bindungsdomäne, ihm fehlt die LexA-Dimerisierungsdomäne. Für dieses Konstrukt war nur im β-Galaktosidase- und nicht im Wachstumstest eine spezifische Interaktion nachzuweisen. Die anderen Konstrukte, die sich in den Vektoren pEG202, pEG202-NLS und pGilda befanden, unterschieden sich jedoch nicht bezüglich ihrer Aktivität. Da die SV40-NLS Sequenz für die Kernlokalisierung des Glukokorticoidezeptors nicht essentiell war und eine konstitutive Expression des Rezeptors in der Hefe nicht toxisch ist, wurde für den Hefe-3-Hybrid-Screen das Konstrukt pEG202 GKR-Typ II ausgewählt.

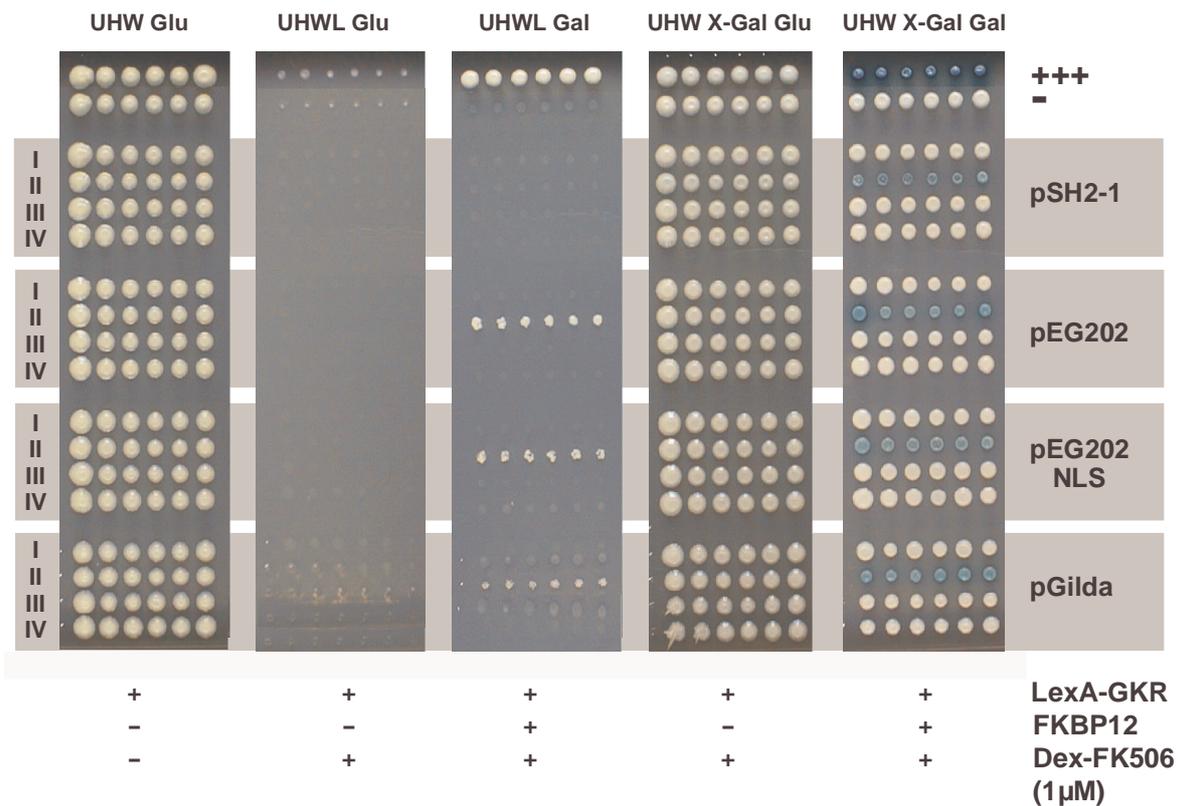


Abbildung 4.9: Validierung des 3-Hybrid-Systems

Der Hefestamm EGY48 Δ PDR5 wurde mit dem Reporterplasmid pSH18-34, dem Beuteplasmid pJG-FKBP12 sowie den 16 Glukokorticoide-rezeptor-Konstrukten, fusioniert an LexA, transformiert. Es wurden jeweils sechs Einzelkolonien gepickt und auf Leucin-defizienten bzw. X-Gal-haltigen Selektionsplatten reanalysiert. Durch den Wechsel von Glukose- zu Galaktose-haltigen Platten wurde die Expression des Beuteproteins FKBP12 induziert. Als Positivkontrolle (+++) diente die im DupLEX-A 2-Hybrid-System mitgelieferte 2-Hybrid Interaktion von pEG202-TGF β -Rezeptor (pBait) und pJG-FKBP12 (pTarget), als Negativkontrolle (-) wurde der pJG4-5 Leervektor verwendet. Nur bei Expression beider Fusionsproteine sowie in Anwesenheit von Dex-FK506 ist eine Expression der Reportergene zu beobachten. Die Platten wurden für 5 Tage bei 30°C inkubiert.

4.2 Hefe-3-Hybrid-Screen für FK506-bindende Proteine

4.2.1 Durchführung des 3-Hybrid-Screens

Der Hefestamm EGY48 Δ PDR5 wurde mit dem Vektor pEG202 GKR-Typ II und dem Reporterplasmid pSH18-34 transformiert. Von dieser Transformation wurde eine Einzelkolonie in Ura⁻, His⁻-Flüssigselektionsmedium angeimpft und anschließend mit der in pJG4-5 klonierten T-Zell cDNA-Bank (Jurkat) im Rahmen einer großen Transformation (24facher Ansatz) transformiert. Für eine bessere Transformationseffizienz wurde die Transformation in YPD-Medium durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen auf 24 große (24 x 24 cm) Ura⁻, His⁻, Trp⁻ (UHW)-Glukose-Selektionsplatten verteilt und diese für drei

Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Primärtransformanden (insgesamt ca. $1,4 \times 10^5$ Klone) vereinigt. Zur Induktion der Genbank wurde ein Aliquot der gepoolten Primärtransformanden in Galaktose-haltigem Medium angeimpft und anschließend auf die folgenden Selektionsplatten verteilt:

| | |
|---|--|
| UHWL, X-Gal, Galaktose | Genbankexpression induziert |
| UHWL, X-Gal, Galaktose, 1 μ M Dex-FK506 | 3-Hybrid Interaktionsscreening, Genbankexpression induziert |
| UHWL, X-Gal, Glukose | Negativkontrolle (Genbankexpression reprimiert) |

Die Platten wurden für 5-7 Tage bei 30°C inkubiert. Dabei ist zu berücksichtigen, daß 3-Hybrid-Interaktionen einen schwächeren Wachstumsphänotyp aufweisen als normale 2-Hybrid-Interaktionen (siehe Abbildung 4.9). Die lange Inkubationszeit von bis zu sieben Tagen war daher notwendig, um FK506-abhängige Interaktoren zu identifizieren. Dies hatte jedoch zur Folge, daß der Hintergrund unspezifisch wachsender Klone recht hoch war. Es wurde deshalb dazu übergegangen, einen doppelten Selektionstest (Wachstum- und Blau-Weiß-Selektion) für das Interaktionsscreening zu verwenden. Auf der Glukose-haltigen Platte war so gut wie kein Hefewachstum vorhanden, auf den beiden Galaktose-haltigen Platten war bereits nach drei Tagen das Wachstum einzelner Hefeklone zu beobachten. Dabei ist zu berücksichtigen, daß nicht nur Interaktoren für FK506, sondern auch solche Proteine, die direkt mit dem LexA - Glukokorticoidezeptor-Fusionsprotein interagieren, ein Hefewachstum ermöglichen (Griffith *et al.*, 2000). Eine solche 2-Hybrid-Interaktion besitzt in der Regel einen stärkeren Wachstumsphänotyp als eine 3-Hybrid-Interaktion. Darüber hinaus werden auch solche Interaktoren eine Induktion der Reportergene erlauben, die in Dexamethason-abhängiger Weise an den Glukokorticoidezeptor binden. Für die Identifikation FK506-spezifischer Liganden wurden von der Interaktionsplatte (UHWL, X-Gal, Galaktose, 1 μ M Dex-FK506) mehrere hundert blau gefärbte Klone mittlerer Größe isoliert und auf ausgewählten Selektionsplatten reanalysiert. Hierfür wurden 384er Mikrotiterplatten verwendet. Die Klone wurden einzeln gepickt, in einer Glycerinlösung resuspendiert und mit einem 384-Stempel auf die folgenden Selektionsplatten überstempelt: Ziel dieser Tests war zum einen der Nachweis der Galaktose-abhängigen Induktion der Reportergene sowie die Bestätigung, daß die Interaktion Dex-FK506 spezifisch und nicht Dex-Linker abhängig war. Zusätzlich wurde getestet, ob die spezifische FK506-Interaktion durch einen Überschuß an freiem FK506 (10 μ M) inhibiert werden konnte. Abbildung 4.10 zeigt ein Beispiel für die Reanalyse der untersuchten Klone. Die meisten Klone zeigten, wie auch schon von (Licitra and Liu, 1996) beschrieben, einen FK506-unabhängigen Phänotyp. Von einer Mikrotiterplatte mit 384 analysierten Klonen reagierten im Durchschnitt etwa 5-10 Klone FK506-spezifisch.

UHW, Glukose

UHWL, Glukose
 UHWL, Galaktose
 UHWL, Galaktose, 1 μ M Dex-Linker
 UHWL, Galaktose, 1 μ M Dex-FK506
 UHWL, Galaktose, 1 μ M Dex-FK506
 + FK506 (10 μ M)

UHW, X-Gal, Glukose
 UHW, X-Gal, Galaktose
 UHW, X-Gal, Galaktose, 1 μ M Dex-Linker
 UHW, X-Gal, Galaktose, 1 μ M Dex-FK506
 UHW, X-Gal, Galaktose, 1 μ M Dex-FK506
 + FK506 (10 μ M)

Masterplatte (Plasmidselektion)

keine spezifische FK506-Interaktion möglich
 keine spezifische FK506-Interaktion möglich
 keine spezifische FK506-Interaktion möglich
 Wachstum der spezifischen FK506-Interaktion
 kein Wachstum der spezifischen FK506-Interaktion

keine spezifische FK506-Interaktion möglich
 keine spezifische FK506-Interaktion möglich
 keine spezifische FK506-Interaktion möglich
 Blaufärbung der spezifischen FK506-Interaktion
 keine Blaufärbung der spezifischen FK506-Interaktion

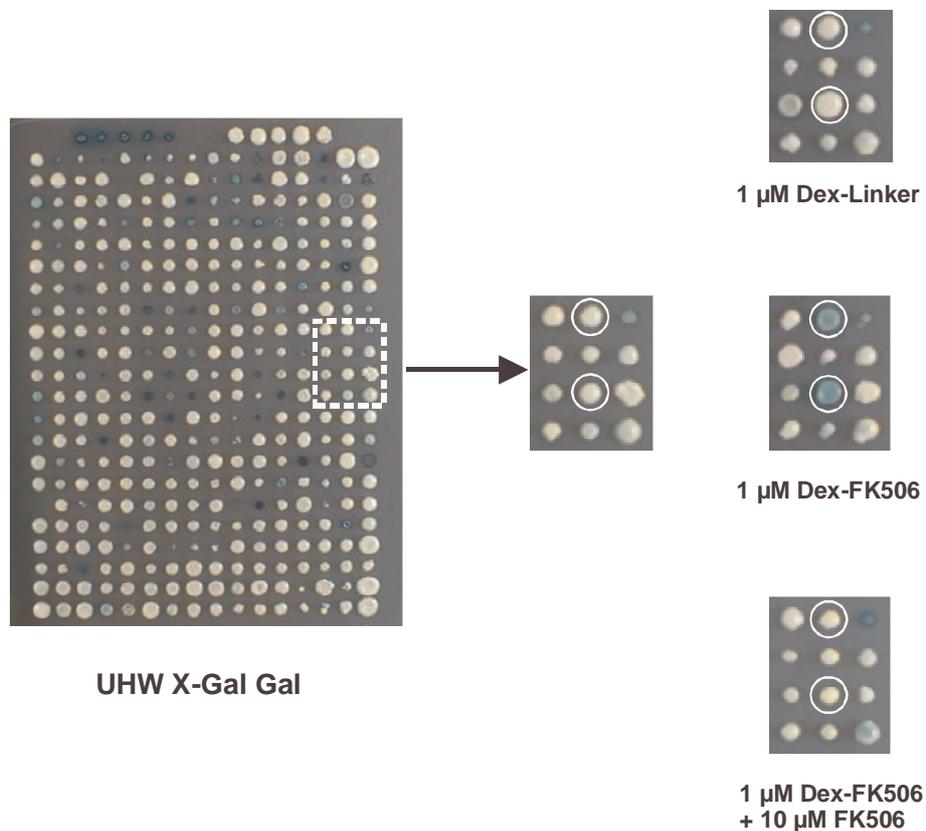


Abbildung 4.10: **Reanalyse der potentiellen FK506-Interaktoren**

Die Hefeklone einer 384er Mikrotiterplatte wurden auf speziellen Selektionsplatten reanalysiert. Bei Klonen, die nach Induktion der Genbank und in Abwesenheit von FK506 (UHW, X-Gal, Gal) bereits blau gefärbt sind, handelt es sich um potentielle 2-Hybrid-Interaktoren für das Glukokorticoidezeptor - LexA-Fusionsprotein. Der Ausschnitt (durch eine weiße Umrandung markiert) zeigt ein Beispiel für die Identifikation von zwei Klonen, die FK506-spezifisch sind. In der Vergrößerung ist erkennbar, daß sich die Klone auf einer Platte mit Dex-Linker (1 μ M Dex-Linker) nicht blau färben. In Anwesenheit von FK506 (1 μ M Dex-FK506) erfolgt eine spezifische Blaufärbung, die sich durch einen Überschuß an freiem FK506 verdrängen läßt (1 μ M Dex-FK506 + 10 μ M FK506).

Von den als FK506-spezifisch eingestuften Klonen wurde die Gesamt-DNA präpariert und in den *E. coli* Stamm KC8 transformiert, um das Genbankplasmid zu isolieren. Die potentiellen Interaktoren wurden anschließend zusammen mit dem Plasmid pEG202 GKR-Typ II und dem Reporterplasmid pSH18-34 in den Hefestamm EGY48 Δ PDR5 retransformiert. Die Transformanten wurden wiederum auf den beschriebenen Selektionsplatten (Seite 70) analysiert. Von den 20 potentiellen Interaktoren konnten nach diesem weiteren Spezifitätstest nur 15 als eindeutig FK506-abhängig identifiziert werden. Von den FK506-spezifischen Klonen wurden die cDNA Inserts mit dem Primer pJG.For ansequenziert und mit Hilfe des Computer Programms BLAST mit Einträgen in den Datenbanken verglichen. Dabei wurde neben FKBP12 noch ein weiteres Protein, Antizym-Inhibitor, als Interaktor für FK506 identifiziert.

| Anzahl der insgesamt analysierten Klone | Potentielle Interaktoren | FK506-spezifische Klone | | |
|---|--------------------------|-------------------------|-----------------------------|---|
| | | Name | Anzahl der isolierten Klone | Anzahl der verschiedenen 5'-Startpunkte |
| 1152 | 20 | FKBP12 | 13 | 3 |
| | | Antizym-Inhibitor | 2 | 1 |

Tabelle 4.2: **FK506-spezifische Klone**

Von 1152 analysierten Klonen wurden zunächst 20 Klone als potentielle FK506-Interaktoren eingestuft. Nach der Retransformation zeigten nur 15 Klone einen eindeutig FK506-abhängigen Phänotyp. Hiervon war FKBP12 13mal vertreten, Antizym-Inhibitor zweimal.

4.2.2 Charakterisierung der isolierten FKBP12-Klone

Insgesamt wurden mit FK506 im 3-Hybrid-Screen 13 FKBP12-Klone aus einer Jurkat cDNA-Bank isoliert (Tabelle 4.2). Diese Klone wiesen drei verschiedene 5'-Startpunkte auf und entsprachen je nach Größe ihres Inserts Datenbankeinträgen mit den GenBank-Zugangsnummern X55741 und M34539. Der FKBP12-Klon (Typ I) mit dem kürzesten Insert war am häufigsten vertreten, d.h. insgesamt siebenmal. Er war am Anfang drei Aminosäuren kürzer als das vollständige FKBP12-Protein. Die beiden anderen Klone besaßen ein zusätzliches Fragment aus dem 5'-untranslatierten Bereich (5'-UTR) von FKBP12 von 10 Aminosäuren (Typ II) bzw. 24 Aminosäuren (Typ III). Diese beiden Klone waren jeweils dreimal vertreten. Das im 3-Hybrid-Screen isolierte FKBP12 ist die häufigste Isoform der FK506-bindenden Proteine (FKBPs) und besitzt die höchste Affinität für FK506 (Licitra and Liu, 1996).

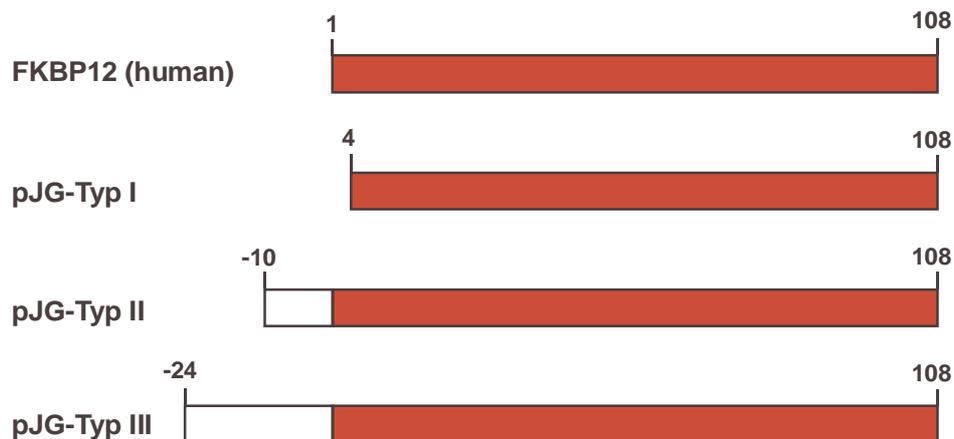


Abbildung 4.11: Die FKBP12 cDNA-Varianten

Die Abbildung zeigt die im 3-Hybrid-Screen aus einer Jurkat cDNA-Bank isolierten FKBP12 cDNA-Varianten. Die kürzeste Variante (pJG-Typ I) war am häufigsten repräsentiert (siebenmal). Sie ist am Anfang um drei Aminosäuren kürzer als FKBP12. Die beiden längeren Varianten (pJG-Typ II und Typ III) waren jeweils dreimal vorhanden. Sie besitzen ein zusätzliches Fragment aus dem 5'-UTR von FKBP12, das 10 bzw. 24 Aminosäuren umfaßt.

4.2.3 Charakterisierung des isolierten Antizym-Inhibitor-Klons

Neben FKBP12 wurde im 3-Hybrid-Screen Antizym-Inhibitor als neuer Interaktor für FK506 identifiziert (siehe Abbildung 4.12). Der isolierte Klon korrespondiert mit der GenBank-Zugangsnummer D88674. Bei Antizym-Inhibitor handelt es sich um ein Protein, das an der Regulation der Polyaminbiosynthese beteiligt ist und eine hohe Homologie zu dem Enzym Ornithin-Decarboxylase (ODC, EC 4.1.1.17) aufweist. Die Sequenzierung des pJG-cDNA-Inserts ergab, daß der Antizym-Inhibitor-Klon am N-Terminus um 132 bp verkürzt ist. Hierdurch fehlen dem daraus resultierenden Protein die ersten 44 Aminosäuren. Die vollständige Sequenzierung mittels Gen-spezifischer Primer ergab außerdem, daß 248 bp kurz vor dem C-Terminus fehlen. Dies deutet darauf hin, daß es sich um eine Spleißvariante von Antizym-Inhibitor handelt. Durch diese Deletion ändert sich das Leseraster des Proteins ab der Position Leu³⁶¹, so daß sich nach zwei weiteren Aminosäuren ein neues, vorgezogenes Stoppkodon ergibt. Durch einen *EcoRI*/*XhoI*-Kontrollverdau wurde ermittelt, daß die komplette Größe des cDNA Inserts etwa 2 kb beträgt. Der offene Leserahmen von Antizym-Inhibitor ist aber insgesamt nur 1347 Nukleotide groß. Dies bedeutet, daß ein großer Bereich des cDNA-Inserts aus dem 3'-UTR von Antizym-Inhibitor besteht.

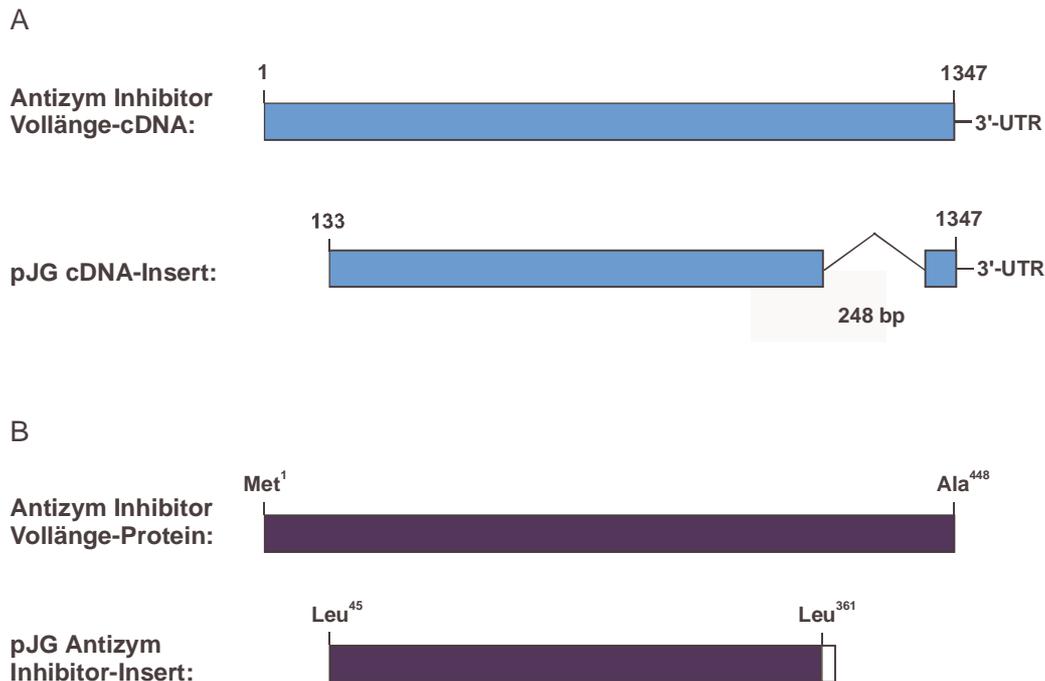


Abbildung 4.12: Der im 3-Hybrid-Screen isolierte Klon von Antizym-Inhibitor

Neben FKBP12 wurde Antizym-Inhibitor als ein weiterer Interaktor für FK506 identifiziert. Abbildung (A) beschreibt das cDNA Insert dieses Klons, Abbildung (B) stellt das daraus resultierende Protein dar. Dem isolierten Klon fehlen 248 Nukleotide kurz vor dem C-Terminus (A). Hierdurch ändert sich das Leseraster des Proteins ab der Position Leu³⁶¹, wodurch sich kurz darauf ein neues Stoppkodon ergibt. Des Weiteren ist der isolierte Klon am Anfang um 132 Nukleotide verkürzt. Dem daraus resultierenden Protein fehlen somit die ersten 44 Aminosäuren (B).

4.3 Die Interaktion von Antizym-Inhibitor mit FK506 in Hefe

4.3.1 Spezifität der Interaktion von Antizym-Inhibitor mit FK506 im Hefesystem

Um die Spezifität der Wechselwirkung von FK506 mit dem humanen Protein Antizym-Inhibitor (OAI) zu untersuchen, wurde der im 3-Hybrid-Screen isolierte Interaktor pJG-OAI zusammen mit dem Reporterplasmid pSH18-34 und dem Glukokorticoidrezeptor-Konstrukt pEG202 GKR-Typ II in den Hefestamm EGY48 Δ PDR5 transformiert. Als Positivkontrolle für den 3-Hybrid-Assay wurde pJG-FKBP12 verwendet. Eine weitere Kontrolle war die im DupLex-A System mitgelieferte 2-Hybrid-Interaktion pBait - pTarget. Hierbei handelt es sich um die Interaktion zwischen der cytoplasmatischen Domäne des TGF β -Rezeptors Typ I (pBait) und FKBP12 (pTarget) (Wang *et al.*, 1996). In Abwesenheit von Dex-FK506 und bei Induktion des Genbankplasmides (UHW, X-Gal, Gal) reagiert nur die 2-Hybrid-Kontrolle positiv. Schon bei einer Konzentration von 0,1 μ M Dex-FK506 ist eine spezifische

Interaktion von pJG-OAI zu beobachten, die in etwa gleich stark ist wie die Interaktion von FKBP12 mit FK506 (siehe Abbildung 4.13). Durch einen Überschuß an freiem FK506 (10 μM) läßt sich die 3-Hybrid Interaktion verdrängen. In der Literatur ist beschrieben, daß die Protein / Protein-Interaktion zwischen dem cytoplasmatischen Teil des TGF β -Rezeptors und FKBP12 durch FK506 inhibiert werden kann (Okadome *et al.*, 1996). Dies erklärt, warum durch freies FK506 nicht nur die beiden 3-Hybrid Interaktionen, sondern auch die Interaktion der 2-Hybrid-Positivkontrolle unterbrochen wird. Mit dem Dex-Linker-Anteil alleine wurde keine 3-Hybrid-Wechselwirkung beobachtet. Darüber hinaus wurden anstelle von Dex-FK506 noch vier andere, an Dexamethason gekoppelte Liganden, getestet, die man in diesem Fall als „false baits“ bezeichnen kann. Hierbei handelt es sich um Moleküle, die keine strukturelle Ähnlichkeit mit FK506 aufweisen, aber kovalent an denselben Dex-Linker-Anteil gekoppelt sind. Die Synthese dieser Moleküle wurde ebenfalls innerhalb von Aventis durchgeführt. Sofern der Interaktor spezifisch mit FK506 reagiert, sollte er mit diesen Hybridmolekülen nicht interagieren. Die Wechselwirkung von pJG-OAI erwies sich als spezifisch für FK506, da keine Kreuzreaktionen mit diesen sogenannten „false baits“ beobachtet werden konnten.

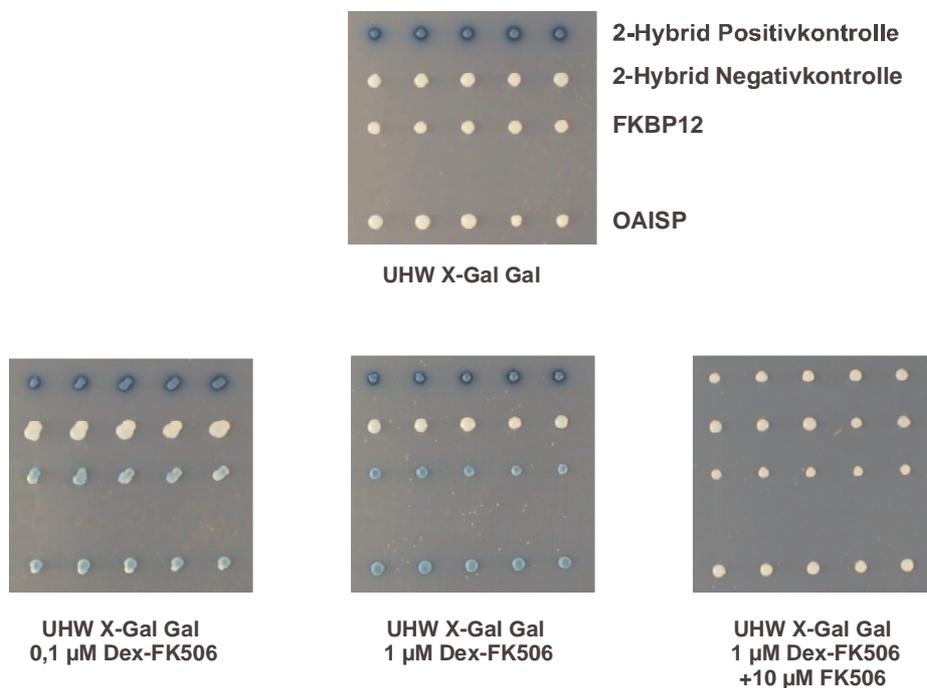


Abbildung 4.13: Vergleich von FKBP12 und Antizym-Inhibitor

Im β -Galaktosidase- sowie im Wachstumstest (Daten nicht gezeigt) wurde untersucht, ob Antizym-Inhibitor genauso spezifisch mit FK506 reagiert wie FKBP12. In Abwesenheit von Dex-FK506 und bei Induktion des Genbankplasmides (UHW, X-Gal, Gal) reagiert nur die 2-Hybrid-Kontrolle positiv. Schon bei einer Konzentration von 0,1 μM Dex-FK506 ist eine spezifische Interaktion von pJG-OAI zu beobachten, die in etwa gleich stark ist wie die Interaktion von FKBP12 mit FK506. Durch einen Überschuß an freiem FK506 (10 μM) läßt sich die 3-Hybrid-Interaktion verdrängen.

4.3.2 Klonierung des vollständigen Antizym-Inhibitor-Gens sowie seiner Spleißvariante

Das 3-Hybrid-System selektiert auf Protein / Ligand-Wechselwirkungen. Da für eine solche Interaktion bereits Proteindomänen ausreichen, werden bei Genbank-Screens häufig Interaktoren isoliert, die nicht für das gesamte Protein kodieren. So ist in diesem Fall davon auszugehen, daß die ersten 44 Aminosäuren von Antizym-Inhibitor für die Interaktion mit FK506 nicht von Bedeutung sind. Es sollte jedoch getestet werden, ob auch das vollständige Protein in der Lage ist, an FK506 zu binden.

Aus einer humanen Leber cDNA wurde mit Hilfe der Primer OAI1.For und OAI448.Rev das vollständige Gen für Antizym-Inhibitor isoliert. Die Primer wurden so ausgewählt, daß vor dem Startkodon eine *EcoRI* und nach dem Stoppkodon eine *XhoI*-Schnittstelle lag (siehe Material, Kapitel 2.4.3). Hierdurch konnte das Antizym-Inhibitor-Fragment in den Genbankvektor pJG4-5 kloniert werden (pJG-OAIFL). Des Weiteren wurde aus einer humanen Gehirn cDNA-Bank mit Hilfe der Primer OAI1.For und OAISP.Rev ein Antizym-Inhibitor-Fragment amplifiziert, das im C-Terminus der im 3-Hybrid-Screen isolierten Spleißform entsprach. Über die entsprechenden Schnittstellen konnte auch dieses Fragment in den Genbankvektor pJG4-5 kloniert werden (pJG-OAISP).

Diese beiden Konstrukte wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit getestet, an FK506 zu binden, (siehe Abbildung 4.14). Hierfür wurde der im 3-Hybrid-Screen isolierte Interaktor pJG-OAI sowie die beiden Konstrukte pJG-OAIFL und pJG-OAISP jeweils mit dem Reporterplasmid pSH18-34 und dem Glukokorticoidrezeptor-Konstrukt pEG202 GKR-Typ II in den Hefestamm EGY48 Δ PDR5 transformiert. Die Fähigkeit dieser Konstrukte im Rahmen eines 3-Hybrid-Assays an FK506 zu binden, wurde mit der Interaktion von FKBP12 verglichen. Wie aus Abbildung 4.14 ersichtlich, bindet die vollständige Form von Antizym-Inhibitor nicht an FK506, wohingegen die Spleißform (pJG-OAISP) sowie die im 3-Hybrid-Screen isolierte, verkürzte Form (pJG-OAI) in einem ähnlichen Affinitätsbereich mit FK506 interagieren wie FKBP12. Dies deutet darauf hin, daß der C-terminale Bereich von Antizym-Inhibitor die FK506-Bindungsdomäne verdeckt bzw. eine solche Konformationsänderung bewirkt, daß eine Interaktion nicht mehr möglich ist. Der N-terminale Bereich von Antizym-Inhibitor (Aminosäure 1-44) ist für die Interaktion mit FK506 nicht von Bedeutung.

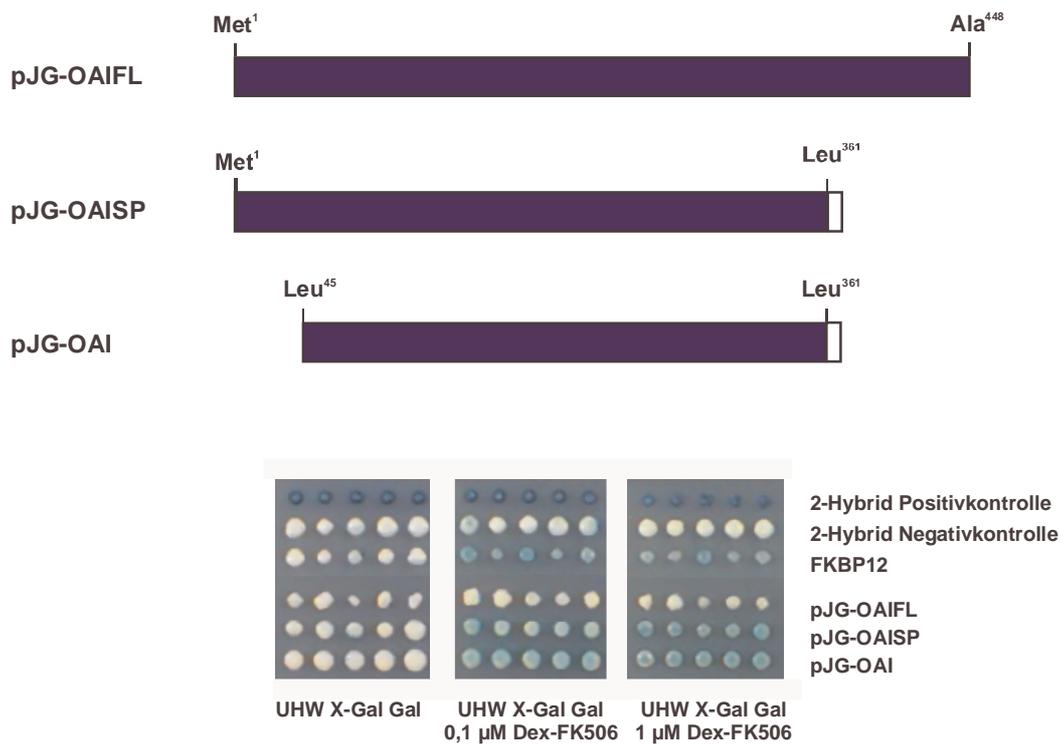


Abbildung 4.14: Vergleich der verschiedenen Antizym-Inhibitor-Formen

Der obere Teil der Abbildung beschreibt die verschiedenen Antizym-Inhibitor-Konstrukte, vollständige Form (pJG-OAIFL), Spleißform (pJG-OAISP) und der im 3-Hybrid-Screen isolierte Klon (pJG-OAI). Der untere Teil der Abbildung zeigt die 3-Hybrid-Interaktion der Konstrukte mit FK506. Hierfür wurden der im 3-Hybrid-Screen isolierte Interaktor pJG-OAI sowie die beiden Konstrukte pJG-OAIFL und pJG-OAISP jeweils mit dem Reporterplasmid pSH18-34 und dem Glukokorticoidezeptor-Konstrukt pEG202 GKR-Typ II in den Hefestamm EGY48ΔPDR5 transformiert. Die Fähigkeit dieser Konstrukte im Rahmen eines 3-Hybrid-Assays an FK506 zu binden, wurde mit der Interaktion von FKBP12 verglichen.

4.3.3 Eingrenzung der FK506-Bindungsdomäne von Antizym-Inhibitor

Um den Bereich einzugrenzen, der für die Bindung von Antizym-Inhibitor an FK506 essentiell ist, wurden sieben verschiedene Deletionskonstrukte hergestellt. Durch Kombination der in Tabelle 4.3 aufgelisteten Primer wurden die Konstrukte OAI-1 bis 7 amplifiziert. Diese wurden in den Genbankvektor pJG4-5 kloniert und jeweils zusammen mit dem Reporterplasmid pSH18-34 und dem Glukokorticoidezeptor-Konstrukt pEG202 GKR-Typ II in den Hefestamm EGY48ΔPDR5 transformiert. Anschließend wurden die Konstrukte im 3-Hybrid-System getestet, wobei die Interaktion der Fusionsproteine mit FK506 mit der Interaktion von OAISP, OAI und FKBP12 verglichen wurde. Von den sieben Konstrukten war nur die Variante OAI-1 in der Lage, an FK506 zu binden. Diese Bindung lag im gleichen Affinitätsbereich ($\geq 0,1 \mu\text{M}$ Dex-FK506) wie die der bekannten Interaktionspartner FKBP12, OAISP und OAI. Das Konstrukt OAI-1 endet bei der Aminosäure Serin³⁰⁰. Da der im 3-Hybrid-Screen isolierte Klon mit der Aminosäure Leucin⁴⁵ beginnt, bedeutet dies, daß ein

Bereich von 256 Aminosäuren (Leucin⁴⁵ bis Serin³⁰⁰) für die Bindung an FK506 ausreichend ist. Der gesamte C-Terminus von Glycin³⁰¹ bis zum Stoppkodon ist für die Bindung nicht notwendig, bzw. sogar hinderlich.

| Primer vorwärts | Primer revers | Konstrukt |
|-----------------|---------------|-----------|
| OAI1.For | OAI300.Rev | OAI-1 |
| OAI1.For | OAI150.Rev | OAI-2 |
| OAI150.For | OAI448.Rev | OAI-3 |
| OAI150.For | OAI300.Rev | OAI-4 |
| OAI300.For | OAI448.Rev | OAI-5 |
| OAI150.For | OAIISP.Rev | OAI-6 |
| OAI300.For | OAIISP.Rev | OAI-7 |

Tabelle 4.3: **Sieben verschiedene Antizym-Inhibitor-Deletionskonstrukte**

In den Spalten 2 und 3 sind die entsprechenden Oligonukleotide aufgeführt, die für die Konstruktion der Deletionsvarianten von Antizym-Inhibitor verwendet wurden. Primersequenzen siehe Material, Kapitel 2.4.3

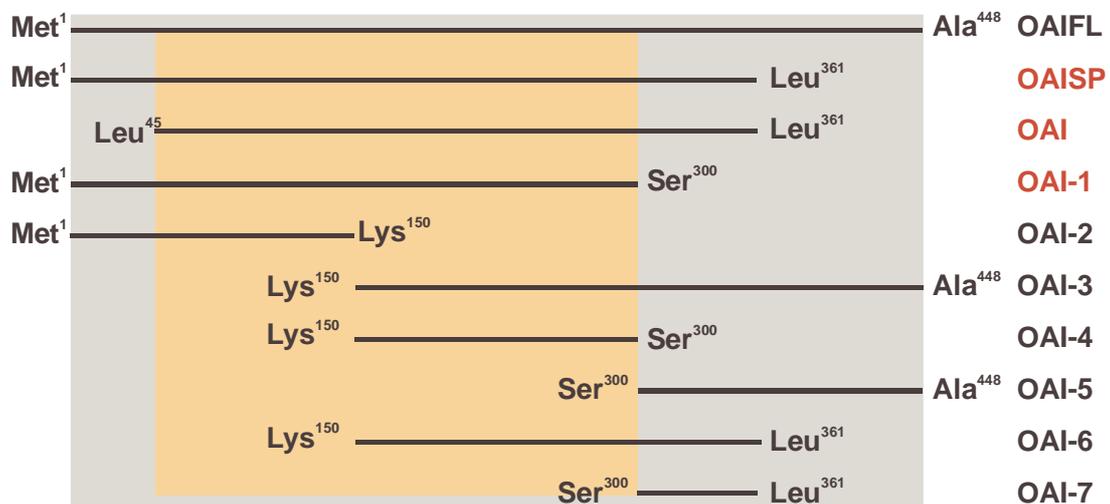


Abbildung 4.15: **Charakterisierung der FK506-Bindungsdomäne von Antizym-Inhibitor**

Durch Kombination der in Tabelle 4.3 erwähnten Primer wurden die Konstrukte OAI-1 bis 7 amplifiziert. Diese wurden in den Genbankvektor pJG4-5 kloniert und jeweils zusammen mit dem Reporterplasmid pSH18-34 und dem Glukokorticoidezeptor-Konstrukt pEG202 GKR-Typ II in den Hefestamm EGY48ΔPDR5 transformiert. Nur die Konstrukte OAISP, OAI und OAI-1 binden FK506. Der Aminosäurebereich von Leu⁴⁵ bis Ser³⁰⁰, der für die Bindung an FK506 notwendig ist, wurde hellrot unterlegt.

4.4 Charakterisierung der Spleißvarianten von Antizym-Inhibitor

4.4.1 Nachweis der Spleißvarianten durch RT-PCR

Es wurde überprüft, ob sich die im 3-Hybrid-Screen isolierte Spleißform von Antizym-Inhibitor durch Auswahl geeigneter Primer mit Hilfe von RT-PCR in verschiedenen Geweben nachweisen läßt. Als Ausgangsmaterial wurde Poly(A)⁺ RNA (Clontech) aus Dünndarm, Gehirn, Leber, Lymphknoten, Magen und Milz sowie Gesamt-RNA aus der Leberzelllinie HepG2 verwendet. Die RNA wurde mit Oligo(dT)₁₈-Primer versetzt und anschließend die MMLV-Reverse Transkriptase hinzugegeben. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Zugabe von Reverser Transkriptase gestartet. Die auf diese Weise hergestellte cDNA wurde nun für verschiedene PCR-Ansätze verwendet.

Zur Identifikation der im 3-Hybrid-Screen isolierten Spleißform von Antizym-Inhibitor wurde der Primer OAIspRT.Rev konzipiert, der spezifisch für diese Variante von Antizym-Inhibitor ist. Das reverse Oligonukleotid beginnt im Bereich um das Stoppkodon von Antizym-Inhibitor und endet einige Nukleotide nach der potentiellen Spleißstelle. Dabei wurde berücksichtigt, daß für die spezifische Bindung des Primers an die DNA (Annealing) die ersten zwei bis drei Nukleotide des jeweiligen Primers entscheidend sind (Sommer and Tautz, 1989). Durch Kombination der Primer OAIspRT.Rev und OAI1.For ließ sich die gespleißte Form von Antizym-Inhibitor (OAISP-1) amplifizieren, die im 3-Hybrid-Screen isoliert worden war. Die vollständige Form von Antizym-Inhibitor (OAIFL) ergab sich durch Kombination der Primer OAI1.For und OAIFLRT.Rev (siehe Abbildung 4.16.1). Der Primer OAIFLRT.Rev beginnt vor dem Stoppkodon von Antizym-Inhibitor und endet einige Nukleotide vor der potentiellen Spleißstelle. Hierdurch kann theoretisch neben der vollständigen Form auch die gespleißte Form von Antizym-Inhibitor amplifiziert werden. Für die mengenmäßige Standardisierung der synthetisierten cDNA wurde die Primermischung G3PDH (Clontech) verwendet, die eine Amplifikation der in Säugerzellen konstitutiv exprimierten Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) erlaubt. Die PCR-Produkte wurden anschließend durch Gelelektrophorese analysiert. Wie aus Abbildung 4.16.2 ersichtlich ist, wird die vollständige Form von Antizym-Inhibitor ubiquitär in allen getesteten Geweben exprimiert. Neben der vorherrschenden vollständigen Form wurde mit der Primerkombination OAI1.For / OAIFLRT-Rev auch ein DNA-Fragment amplifiziert, das von der Größe her exakt mit der im 3-Hybrid-Screen isolierten gespleißten Form (OAISP-1) übereinstimmt. Darüber hinaus war eine zweite Bande kurz unterhalb der vollständigen Form von Antizym-Inhibitor erkennbar. Hierbei handelt es sich um eine weitere potentielle Spleißvariante von Antizym-Inhibitor (OAISP-2). In einer zweiten PCR-Reaktion konnte die im 3-Hybrid-Screen isolierte Spleißvariante (OAISP-1) mit den hierfür spezifischen Primern amplifiziert werden. Sie ist in allen getesteten Geweben ubiquitär vorhanden, eine besonders starke Expression findet man in Gehirn, Magen, Lymphknoten und in der Zelllinie HepG2.

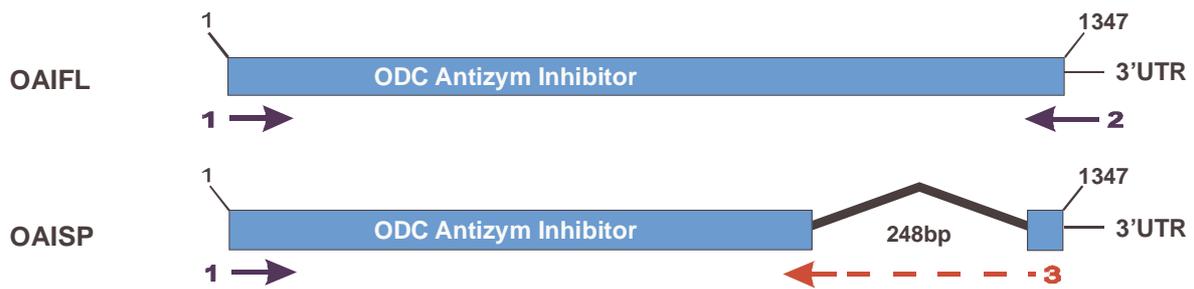


Abbildung 4.16.1: **PCR-Primer für die Detektion der verschiedenen Antizym-Inhibitor-Varianten**

Zum Nachweis der verschiedenen Antizym-Inhibitor-Varianten wurden Primer entworfen (als Pfeile dargestellt), die spezifisch die Spleißvariante und die vollständige Form amplifizieren. Primer 2 (OAIFLRT.Rev) beginnt im 3'-UTR von Antizym-Inhibitor und endet kurz vor der potentiellen Spleißstelle. Primer 3 (OAISPRT.Rev) beginnt am Stoppkodon von Antizym-Inhibitor, überspringt die 248 bp und endet kurz nach der potentiellen Spleißstelle. Primersequenzen siehe Material, Kapitel 2.4.3.

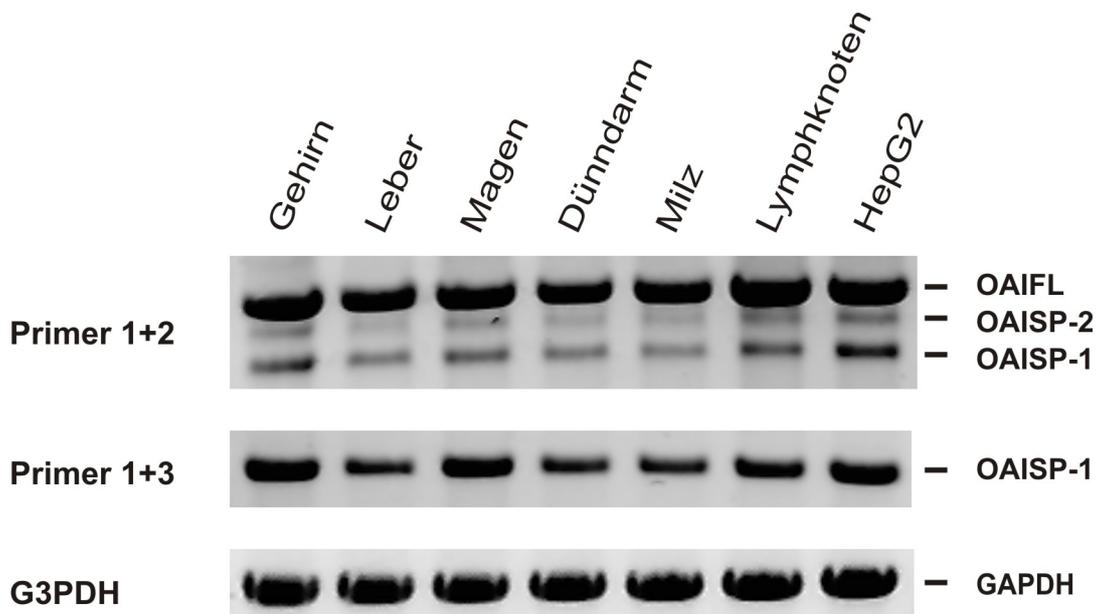


Abbildung 4.16.2: **RT-PCR**

Zeile 1 zeigt das Ergebnis einer RT-PCR mit den Primern OAI1.For (1) und OAIFLRT.Rev (2), die die vollständige Form sowie die Spleißvariante von Antizym-Inhibitor amplifizieren. Zeile 2 zeigt das Ergebnis der Primerkombination OAI1.For (1) und OAISPRT.Rev (3), die ausschließlich die Spleißvariante amplifizieren. Zeile 3 zeigt die GAPDH-Amplifikate. Die für die PCR verwendete cDNA entstammt den aufgeführten Geweben sowie der Leberzelllinie HepG2.

Wie in Abbildung 4.16.2 erwähnt, wurden mit der Primerkombination (1) und (2) neben der vollständigen Form von Antizym-Inhibitor noch zwei weitere PCR-Banden generiert. Die beiden mit *Taq*-Polymerase amplifizierten DNA-Fragmente wurden aus dem Gel aufgereinigt (Ansatz Gehirn) und direkt in den Vektor pCR2.1[®]-TOPO (Invitrogen) kloniert (TOPO TA

Cloning[®]). Die Sequenzierung der Fragmente ergab, daß es sich bei der unteren Bande wie erwartet um die im 3-Hybrid-Screen isolierte Spleißvariante von Antizym-Inhibitor (OAISP-1) handelt. Bei der zweiten schwächer exprimierten Bande, die im Gel kurz unterhalb der vollständigen Form läuft, handelt es sich um eine weitere potentielle Spleißvariante von Antizym-Inhibitor (OAISP-2). Bei dieser Variante fehlt ein 135 bp großes Fragment aus dem mittleren Bereich von Val¹⁵¹ bis Lys¹⁹⁵.

4.4.2 Nachweis der Spleißvarianten mittels Datenbankrecherche

Mit den für die beiden Spleißvarianten spezifischen Sequenzbereichen wurde eine Datenbankrecherche (GenBank, LifeSeq Gold, Incyte, Version 5.1) durchgeführt. Dabei wurden für die im 3-Hybrid-Screen isolierte Spleißvariante OAISP-1 drei humane EST-Einträge (GenBank-Zugangsnummer AW884549, LifeSeq Gold Sequenz-ID Nummer 8621073J1 und 8621165J1) und zwei Maus EST-Klone (GenBank-Zugangsnummer AI386447 und AA162795) gefunden. Mit dem Computerprogramm AlignX wurde die Homologie zwischen der humanen und der Maus-Sequenz von Antizym-Inhibitor überprüft. Dabei ergab sich für den kodierenden Bereich (CDS) auf Nukleotidebene eine Identität von 93,5%. Da für die Spleißvariante OAISP-1 auch zwei Maus-Einträge existieren, war davon auszugehen, daß es sich nicht ausschließlich um eine für den Menschen spezifische Spleißform handelt, sondern um eine evolutionär konservierte Variante. Für die Spleißvariante OAISP-2 wurde zwar zum Zeitpunkt der Recherche (Anfang 2002) kein humaner Eintrag in den Datenbanken gefunden. Es existiert jedoch ein entsprechender Maus-EST-Klon mit der GenBank-Zugangsnummer BI440453. Dies erlaubt den Rückschluß, daß es auch eine humane Sequenz gibt, für die noch kein Datenbankeintrag besteht.

| | EST-Eintrag (human) | EST-Eintrag (Maus) |
|----------------|---|--|
| OAISP-1 | <ul style="list-style-type: none"> • AW884549 (GenBank) Eierstock, adult • 8621073J1 (LifeSeq Gold, Incyte), Gehirn, fötal • 8621165J1 (LifeSeq Gold, Incyte), Gehirn, fötal | <ul style="list-style-type: none"> • AI386447 (GenBank) Milz, fötal • AA162795 (Genbank) Milz, fötal |
| OAISP-2 | <ul style="list-style-type: none"> • kein Datenbankeintrag | <ul style="list-style-type: none"> • BI440453 (GenBank) Bauchspeicheldrüse, adult |

Tabelle 4.4: Nachweis der Spleißvarianten mittels Datenbankrecherche

Für die im 3-Hybrid-Screen isolierte Spleißvariante OAISP-1 wurden drei humane EST-Klone und zwei Maus EST-Klone in den Datenbanken gefunden. Für die Spleißvariante OAISP-2 wurde kein humaner Klon sondern nur ein entsprechender Maus-EST-Klon gefunden.

4.4.3 Genomische Organisation von Antizym-Inhibitor

Seit der vollständigen Sequenzierung des menschlichen Genoms sind die Daten online über das National Center for Biotechnology Information (NCBI) zugänglich <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/> (Jang *et al.*, 1999). Eine Suche nach Antizym-Inhibitor (GenBank-Zugangsnummer D88674) ergab, daß das Gen auf Chromosom 8 liegt und insgesamt 10 Exons aufweist. Es wurde überprüft, ob die Spleißstellen mit den Exon - Intron Übergängen zusammentreffen, oder sich an einer anderen Stelle befinden. Für die Spleißvariante OAISP-2 ergab die Sequenzierung, daß das Exon 4 komplett fehlt, wobei das Leseraster der anschließenden Sequenzbereiche beibehalten wird. Für OAISP-1 ist die Situation komplexer. Hier liegen die Spleißstellen nicht an einem Exon – Intron Übergang, sondern innerhalb von Exon 9 und 10 (Abbildung 4.17.1). Die detaillierte Ansicht von OAISP-1 zeigt, daß die fünf Nukleotide AGCTT im Bereich der Spleißstelle sowohl in Exon 9 wie auch in Exon 10 vorhanden sind (siehe Abbildung 4.17.2). Für die 5'- und 3'-Spleißstellen höherer eukaryotischer pre-mRNAs gibt es jedoch Konsensus-Sequenzen (Padgett *et al.*, 1986). So endet ein Intron in der Regel auf die beiden Nukleotide AG. Wendet man diese Regel auf die im 3-Hybrid-Screen isolierte Spleißvariante an, so kann davon ausgegangen werden, daß das Exon 9 der Spleißvariante OAISP-1 auf AG endet und die Sequenz mit den Nukleotiden CTT von Exon 10 fortfährt (siehe Abbildung 4.17.2).

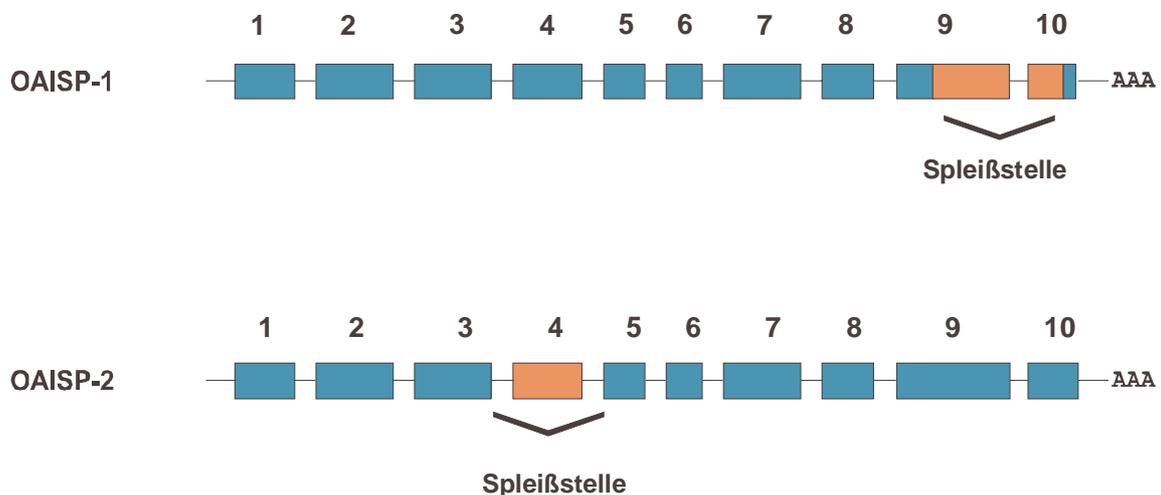


Abbildung 4.17.1: Darstellung der beiden Spleißvarianten von Antizym-Inhibitor

Das Gen für Antizym-Inhibitor besteht aus 10 Exons. Die Bereiche, die bei den Spleißvarianten OAISP-1 und OAISP-2 nicht vorhanden sind, wurden hellrot markiert. Bei OAISP-1 fehlen Bereiche aus Exon 9 und 10, bei OAISP-2 fehlt das Exon 4.

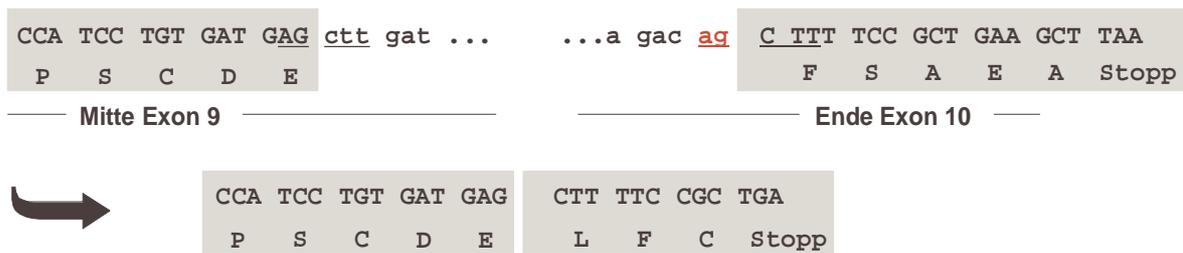


Abbildung 4.17.2: **Detaillierte Ansicht der Spleißstelle von OAISP-1**

Die Sequenzen von Exon 9 und 10, die in der Spleißvariante OAISP-1 enthalten sind, wurden hellgrau hinterlegt. Die potentiellen Intronsequenzen sind mit kleinen Buchstaben dargestellt. Die fünf Nukleotide AGCTT, die sowohl in Exon 9 als auch in Exon 10 vorhanden sind, wurden unterstrichen. Die beiden Nukleotide AG am Ende des potentiellen Introns wurden rot markiert. Die darunterliegende Zeile zeigt die daraus resultierende Aminosäuresequenz (Einbuchstabencode). Durch das Spleißen verschiebt sich das Leseraster des Proteins um -1. Dies führt zu dem vorgezogenen Stoppkodon TGA.

4.4.4 Expressionsanalyse von Antizym-Inhibitor

Für die Expressionsanalyse von Antizym-Inhibitor stand ein Northern-Blot mit Gesamt-RNA der humanen Zelllinie HeLa zur Verfügung (Dr. Detlev Kozian, Aventis). Die Zellen waren entweder unter normalen Serum-Bedingungen mit 10 % FKS kultiviert worden, oder durch Kultivierung in Gegenwart von 0,1 % FKS in einen Hungerzustand versetzt worden. Pro Spur wurden 100 µg Gesamt-RNA aufgetragen. Durch einen *Bgl*III / *Ssp*I-Restriktionsverdau von Antizym-Inhibitor wurde ein 351 bp großes DNA-Fragment generiert (Sonde 1), das mit dem N-terminalen Bereich des Gens hybridisiert. Unter Verwendung des „Gene Images™ random prime labelling Kits“ wurde die Sonde mit fluoreszierenden Nukleotiden markiert und anschließend mit dem Blot hybridisiert (Methoden, Kapitel 3.14). Diese Sonde erkennt sowohl die vollständige Form von Antizym-Inhibitor als auch die beiden Spleißvarianten. Die Detektion erfolgte nicht-radioaktiv unter Verwendung eines anti-Fluorescein-Antikörpers (siehe Methoden, Kapitel 3.14.3). Wie aus Abbildung 4.18 ersichtlich, zeigt der Northern-Blot mit Sonde 1 eine große Bande bei 4,5 kb und eine diffuse Bande im Bereich von 2,4 kb bis 2,8 kb, die aus mehreren Transkripten besteht. Dieses Muster läßt sich durch alternatives Spleißen des Primärtranskriptes sowie durch die Verwendung verschiedener Polyadenylierungssignale erklären. Interessanterweise ist die Transkription von Antizym-Inhibitor unter Nährstoffmangel (0,1 % FKS) im Vergleich zu normalen Kultivierungsbedingungen (10 % FKS) erhöht. Für Ratte wurden in verschiedenen Geweben durch Northern-Blot-Analysen drei Antizym-Inhibitor-Transkripte in der Größe von 2,2 kb, 2,6 kb und 3,7 kb beschrieben (Murakami *et al.*, 1996). Fibroblasten der Maus zeigen in einem Antizym-Inhibitor Northern-Blot zwei Banden im Bereich von 4,5 kb und 2,8 kb (Nilsson *et al.*, 2000). Für humanes Lebergewebe wurden ebenfalls zwei Banden beschrieben

(Koguchi *et al.*, 1997). Diese Beobachtungen zusammen mit den hier vorgestellten Ergebnissen, lassen darauf schließen, daß für Antizym-Inhibitor Spezies-übergreifend mehrere Spleißvarianten existieren. Darüber hinaus wurde eine Sonde konzipiert, die mit einem Bereich hybridisiert, der in der Spleißvariante OAISP-1 fehlt. Hiermit sollte getestet werden, ob sich eine Veränderung im Northern-Blot Signal ergibt, d.h. eine Bande womöglich verschwindet. Durch einen *BclI* / *XhoI*-Restriktionsverdau wurde ein 264 bp großes Fragment generiert, das mit dem C-terminalen Bereich von Antizym-Inhibitor hybridisiert. Dieser Bereich stimmt mit dem Fragment überein, das bei der im 3-Hybrid-Screen isolierten Form fehlt. Der Northern-Blot mit Sonde 2 ergab in etwa dasselbe Muster wie der vorangegangene Blot mit Sonde 1. Aufgrund des schwachen Signals der kürzeren Sonde 2 ließ sich nicht eindeutig sagen, ob ein Transkript im Bereich der diffusen Bande verschwindet.

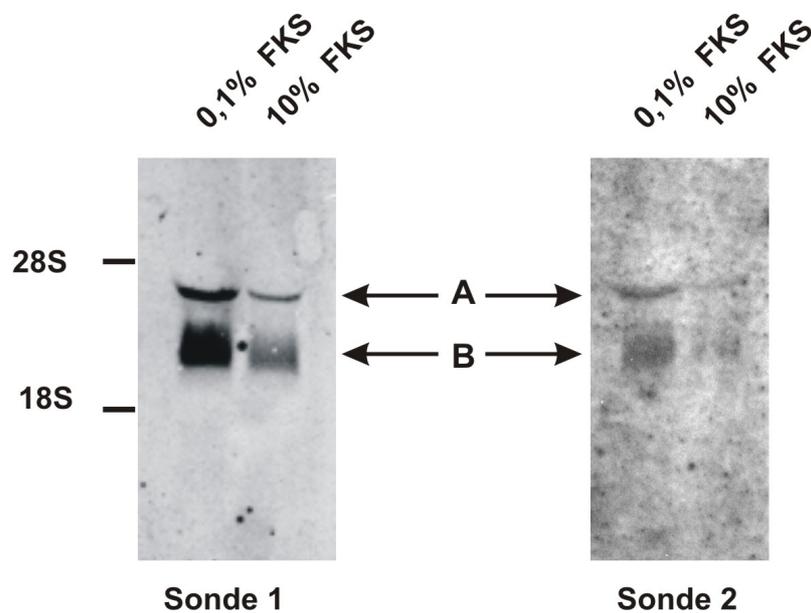


Abbildung 4.18: Northern-Blot mit Antizym-Inhibitor

Aufgetragen wurden jeweils 100 µg Gesamt-RNA isoliert aus der Zelllinie HeLa. Die Zellen wurden entweder unter Normalbedingungen (10 % FKS) oder unter Mangelbedingungen (0,1 % FKS) kultiviert. Der linke Blot wurde mit Sonde 1 hybridisiert, der rechte Blot wurde mit Sonde 2 hybridisiert. Das Transkript A ist in etwa 4,5 kb groß, die diffuse Bande von Transkript B besteht vermutlich aus mehreren Transkripten in der Größenordnung von 2,4 kb bis 2,8 kb. Die Positionen der 26S und 18S rRNA dienen als molekulare Marker.

4.5 Interaktion von Antizym-Inhibitor mit Antizym

Ornithin-Decarboxylase (L-Ornithin-Carboxy-Lyase, ODC, EC 4.1.1.17) ist ein Schlüsselenzym der Polyaminbiosynthese. Polyamine spielen für das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und die Proteinbiosynthese eine essentielle Rolle. Die Aktivität der ODC wird auf vielen Ebenen kontrolliert. Auf Proteinebene wird die Aktivität sowie die Stabilität der ODC durch Antizym reguliert (Coffino, 2001). Dabei handelt es sich um eine Proteinfamilie, die aus bislang vier verschiedenen Mitgliedern besteht, von denen Antizym 1 und 2 am besten charakterisiert sind. Antizyme binden an ODC, und bilden ein Antizym – ODC Heterodimer. Dies führt zur Inaktivierung der ODC, da das Enzym nur als Homodimer aktiv ist. Darüber hinaus fördern Antizyme den proteolytischen Abbau der gebundenen ODC *in vivo* über das 26S-Proteasom und sind außerdem an der Kontrolle des Polyamintransports über die Zellmembran beteiligt (Hayashi *et al.*, 1996). Antizym-Inhibitor besitzt selbst keine enzymatische Aktivität, obwohl das Protein eine große Homologie zur ODC aufweist. Der Inhibitor ist jedoch indirekt an der Regulation der Polyaminbiosynthese beteiligt, indem er Antizym kontrolliert. So ist beispielsweise die Bindung von Antizym-Inhibitor an Antizym 1 stärker als die Bindung von ODC an Antizym (Kitani and Fujisawa, 1989). Hierdurch wird ODC aus dem ODC / Antizym-Komplex freigesetzt und ist wieder funktionsfähig.

4.5.1 Klonierung der Antizyme 1 - 4

Bei den Antizymen handelt es sich um eine Proteinfamilie, die bislang aus vier Mitgliedern besteht (GenBank-Zugangsnummern D87914, AF057297, AF175296, AF293339). Um die Funktion der identifizierten Antizym-Inhibitor-Spleißvarianten zu charakterisieren, soll ihre Interaktion mit den verschiedenen Antizymen untersucht werden. Die Expression der Antizyme wird durch einen interessanten ribosomalen Leseraster-Wechsel gesteuert. Bei hohen Polyaminkonzentrationen wird bei der Translation der Antizyme ein Nukleotid übersprungen. Hierdurch wird ein Stoppkodon vermieden und ein funktionsfähiges Antizym gebildet (Ivanov *et al.*, 2000b). Um die Proteine funktionell in Hefe exprimieren zu können, mußte bei der Klonierung der Antizyme dieses Nukleotid deletiert werden. Durch Kombination der Primer OAZ.Start/OAZΔ.Rev und OAZΔ.For/OAZ.Rev (siehe Materiel, Kapitel 2.4.2) wurden mittels PCR zwei überlappenden Antizym-Fragmente A und B amplifiziert, denen das Antizym-typische Nukleotid fehlt (siehe Abbildung 4.19). Die beiden Fragmente A und B wurden nun als Vorlage für eine weitere PCR mit den Primern OAZ.Start und OAZ.Rev verwendet, wobei ein vollständiges Antizym amplifiziert wurde. Antizym 1 und 2 konnten mittels PCR aus einer humanen Leber cDNA-Bank isoliert werden. Zur Amplifikation von Antizym 3 und Antizym 4 wurden bei Incyte Genomics (Palo Alto, USA) entsprechende Klone bestellt und diese als Vorlage für die Antizym-spezifische

PCR verwendet. Aufgrund der hohen Homologie von Antizym 1 und Antizym 4 im N-terminalen Bereich konnte der Primer OAZ1.Start für beide Antizyme verwendet werden. Die resultierenden PCR-Fragmente wurden *EcoRI*/*XhoI* verdaut und anschließend in die Hefe-2-Hybrid-Expressionsvektoren pEG202 und pJG4-5 kloniert.

Leseraster-Wechsel von Antizym 1:

```

Cys Ser Stopp
UGC UCC UG(A)U GCC CCU CAC CCA CCC
          Cys  Ala  Pro  His  Pro  Pro
  
```

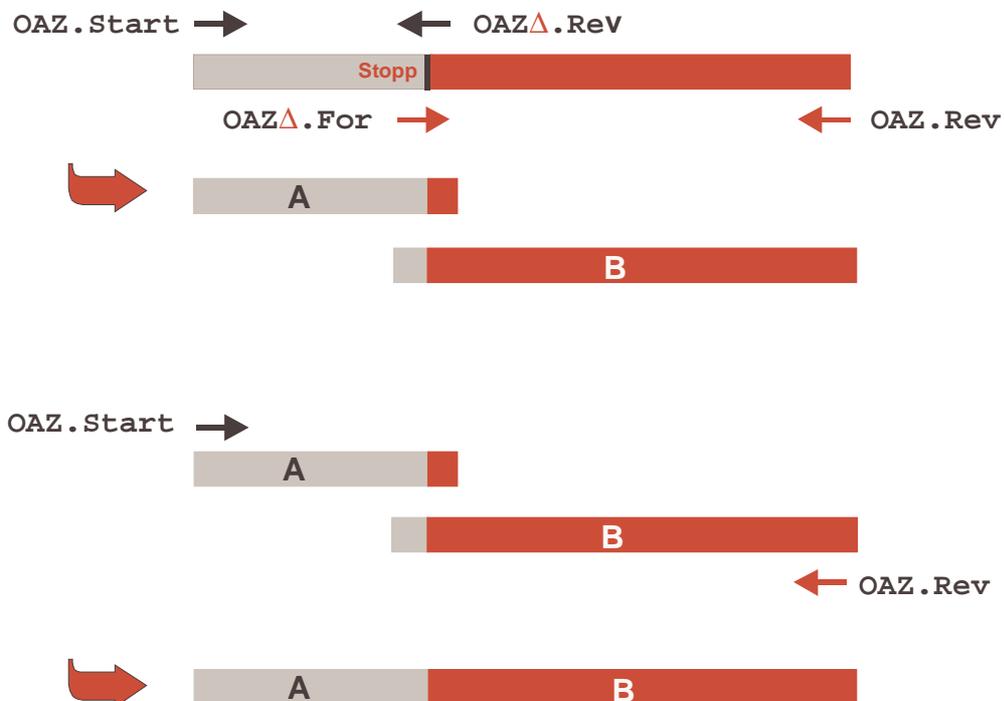


Abbildung 4.19: **Klonierung von Antizym 1 - 4**

Der obere Teil der Abbildung zeigt den Bereich des Leseraster-Wechsels von Antizym 1. Durch Überspringen des rotmarkierten Nukleotids (A) wird das Stoppcodon TGA vermieden und das Leseraster um +1 verschoben. Der untere Teil der Abbildung beschreibt die Klonierungsstrategie für die Proteine der Antizym-Familie. Die Primer OAZΔ.For und OAZΔ.Rev hybridisieren mit demselben DNA-Bereich, sind aber komplementär. Ihnen fehlt das Antizym-typische Nukleotid. Es wurden in einer ersten PCR-Runde mit Hilfe dieser Primer die Fragmente A und B amplifiziert. Diese wurden anschließend als Vorlage für eine zweite PCR mit den Primern OAZ.Start und OAZ.Rev verwendet, wobei das vollständige Antizym entsteht.

4.5.2 Klonierung von ODC

Damit ODC aus dem ODC / Antizym-Komplex freigesetzt werden kann, muß die Bindung von Antizym-Inhibitor an Antizym stärker sein als die Bindung von ODC an Antizym. Um entsprechende Versuche durchführen zu können, wurde das Gen für die ODC mit Hilfe der Primer (ODC1.FOR / ODC1.REV) aus einer humanen Leber cDNA Bank isoliert. Durch Einfügen der Schnittstellen *EcoRI* / *XhoI* konnte das Fragment in die Hefe-2-Hybrid-Expressionsvektoren pEG202 und pJG4-5 kloniert werden. Mit biochemischen Methoden (Affinitätschromatographie) war die Bindung von ODC an Proteine der Antizym-Familie bereits gezeigt worden (Zhu *et al.*, 1999). Ziel war es, diese Interaktionen mit Hilfe des 2-Hybrid-Systems nachzuvollziehen. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob sich auch die 2-Hybrid-Interaktion von Antizym-Inhibitor mit Proteinen der Antizym-Familie nachweisen läßt. Wenn möglich sollen beide Interaktionen miteinander verglichen werden.

4.5.3 2-Hybrid-Assay für ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor

Zunächst wurde überprüft, ob die in den 2-Hybrid-Vektor pEG202 klonierten Antizym-Konstrukte eigenaktiv sind. Hierfür wurden die Konstrukte pEG202-Antizym 1 - 4 jeweils zusammen mit dem Leervektor pJG4-5 und einem Reporterplasmid (pRB1840) in den 2-Hybrid-Hefestamm EGY48 transformiert. Die Ergebnisse zeigten, daß alle vier Antizym-Konstrukte nicht eigenaktiv sind (siehe Abbildung 4.20, Zeile 1). Auch ODC alleine besaß keine Eigenaktivität, wohingegen Antizym-Inhibitor, kloniert in pEG202, also in Verbindung mit der DNA-bindenden Domäne, sehr stark eigenaktiv war (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, daß Antizym-Inhibitor in der Lage ist, die RNA-Polymerase II vermittelte Transkription zu stimulieren. Obwohl ODC und Antizym-Inhibitor eine hohe Homologie besitzen, reagieren sie interessanterweise in diesem Transkriptionsassay völlig unterschiedlich. Für den 2-Hybrid-Assay wurden die Konstrukte pEG202-Antizym 1 - 4 jeweils zusammen mit den in pJG4-5 klonierten Konstrukten ODC, OAIFL, OAISP-1 und OAISP-2 sowie dem Reporterplasmid pRB1840 in den Hefestamm EGY48 transformiert und auf den entsprechenden Selektionsplatten analysiert.

Die 2-Hybrid-Ergebnisse zeigen, daß Antizym-Inhibitor Vollänge (OAIFL) sehr stark mit allen vier Proteinen der Antizym-Familie interagiert (siehe Abbildung 4.20, Zeile 3). Dabei sollte berücksichtigt werden, daß das Reporterplasmid pRB1840 nur eine LexA-Bindestelle aufweist und weniger sensitiv ist als das im 3-Hybrid-System verwendete Reporterplasmid pSH18-34. Die Interaktion von Antizym-Inhibitor mit Antizym war außerdem wesentlich stärker als die Interaktion zwischen ODC und Antizym (siehe Abbildung 4.20, vergleiche Zeile 2 und 3).

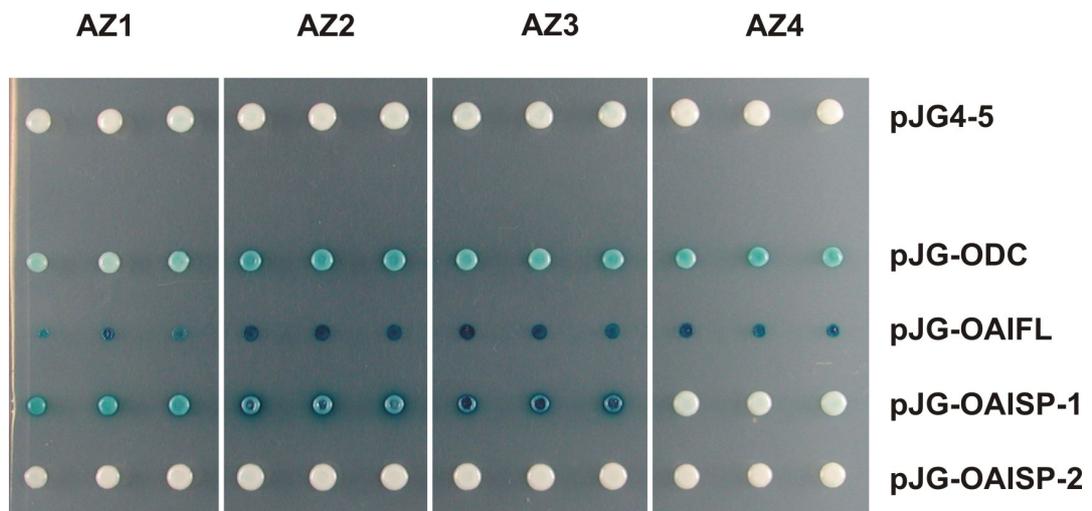


Abbildung 4.20: **2-Hybrid-Assay mit ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor**

Die Antizyme (AZ) 1 - 4 wurden jeweils zusammen mit dem Leervektor pJG4-5 (Kontrolle, Zeile 1) und dem Reporterplasmid pRB1840 in den Hefestamm EGY48 transformiert. Die Aktivierung des *lacZ*-Reportergens wurde auf UHW, X-Gal, Galaktose-Selektionsplatten getestet. Für die 2-Hybrid-Interaktionsstudien wurden die Konstrukte pEG202 AZ 1 - 4 jeweils zusammen mit pJG-ODC (Zeile 2), pJG-OAIFL (Zeile 3), pJG-OAISP-1 (Zeile 4) bzw. pJG-OAISP-2 (Zeile 5) sowie dem Reporterplasmid pRB1840 in Hefe transformiert und auf derselben Selektionsplatte analysiert.

In der Literatur wurde bislang nur die Interaktion zwischen Antizym-Inhibitor-Volllänge und Antizym 1 beschrieben (Murakami *et al.*, 1996). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch, daß Antizym-Inhibitor in der Lage ist, mit gleicher Affinität an alle Proteine der Antizym-Familie zu binden. Für ODC war bekannt, daß ihre Aktivität durch Antizym 1, 2 und 3 inhibiert wird. Diese 2-Hybrid-Daten zeigen, daß auch Antizym 4 in der Lage ist, an ODC zu binden. Da Bindung die Voraussetzung für eine Inhibition ist, kann daraus geschlossen werden, daß auch Antizym 4 die ODC-Aktivität hemmt. Die im 3-Hybrid-Screen isolierte Spleißvariante OAISP-1 interagiert mit Antizym 1, 2 und 3, bindet jedoch nicht an Antizym 4. Verglichen mit Antizym-Inhibitor-Volllänge war die Interaktion insgesamt etwas schwächer. Es sollte daher überprüft werden, ob diese Spleißvariante noch in der Lage ist, ODC aus dem ODC / Antizym-Komplex freizusetzen. Für OAISP-2 wurde keine Interaktion mit den Proteinen der Antizym-Familie beobachtet. Dieser Spleißvariante fehlt das Exon 4, also ein Fragment aus dem mittleren Bereich des Proteins, das für die Interaktion mit den Antizyminen besonders wichtig zu sein scheint. Da die Spleißvariante OAISP-2 nicht in der Lage war, an eines der Antizyme zu binden, wurden die folgenden Aktivitätsstudien und Bindungsassays ausschließlich mit der Spleißvariante OAISP-1 durchgeführt.

4.5.4 Die Antizym-Bindungsdomäne von Antizym-Inhibitor

Die in Kapitel 4.3.3 beschriebenen Antizym-Inhibitor-Fragmente wurden auf ihre Fähigkeit getestet, in einem 2-Hybrid-Assay an Antizym 1 bzw. Antizym 2 zu binden. Hierfür wurden jeweils die in pJG4-5 klonierten Konstrukte OAI-1 bis OAI-7 (siehe Tabelle 4.3) zusammen mit dem Reporterplasmid pRB1840 und pEG202 Antizym 1 bzw. 2 in den Hefestamm EGY48 transformiert. Es zeigte sich, daß von den sieben Konstrukten nur das Fragment OAI-1 in der Lage war, an Antizym 1 und 2 zu binden. Dies deutet darauf hin, daß die Antizym-Bindungsdomäne mit der Bindungsdomäne für FK506 überlappt. Für Antizym-Inhibitor ist der Bereich, welcher für die Antizym-Bindung wichtig ist, bislang noch nicht charakterisiert. Aufgrund der großen Homologie zwischen ODC und Antizym-Inhibitor wurde davon ausgegangen, daß der Bereich, welcher für die ODC / Antizym-Interaktion wichtig ist, auch die Antizym / Antizym-Inhibitor-Bindung bestimmt (Murakami *et al.*, 1996). Für die ODC der Maus ist bekannt, daß die Antizym-Bindungsdomäne die Aminosäuren 117-140 umfaßt. Diese Erkenntnisse beruhen auf dem Vergleich zwischen der murinen ODC, welche Antizym bindet und der trypanosomalen ODC, die nicht in der Lage ist, Antizym zu binden. Wie die Kartierungsstudien sowie die Ergebnisse mit den Spleißvarianten jedoch zeigen, geht für Antizym-Inhibitor der Aminosäurebereich, der für die Antizym-Bindung entscheidend ist, über Aminosäure 140 hinaus. Das Fragment 2, welches die Aminosäuren Met¹ bis Lys¹⁵⁰ umfaßt, ist nicht in der Lage, an Antizym 1 und 2 zu binden. Auch die Spleißvariante OAISP-2, der die Aminosäuren Val¹⁵¹ bis Lys¹⁹⁵ fehlen, bindet nicht mehr an eines der Antizyme. Zusätzlich beeinflusst auch der C-Terminus die Bindung an die Antizyme, wie die Ergebnisse mit der Spleißvariante OAISP-1 zeigen.

4.5.5 Der Einfluß von FK506 auf die Interaktion von Antizym 1 mit Antizym-Inhibitor

Da die Ergebnisse der Bindungsstudien darauf hindeuten, daß sich die Bindungsdomänen für Antizym 1 und FK506 überlappen, wurde getestet, ob FK506 in der Lage ist, die Antizym / Antizym-Inhibitor-Interaktion zu unterbinden. Für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität wurde diesmal ein β -Gal-Flüssigassay (siehe Methoden, Kapitel 3.8.2, CPRG-Assay) verwendet. Hierfür wurden die entsprechenden 2-Hybrid-Konstrukte in Hefe transformiert (siehe Tabelle 4.5). Von den transformierten Zellen wurde jeweils ein Klon in Selektionsmedium über Nacht angeimpft und am nächsten Tag mit einer OD₆₀₀ von 0,05 gestartet. Dem Selektionsmedium wurde FK506 in einer Konzentration von 5 μ M, 25 μ M oder 50 μ M (gelöst in DMSO) zugesetzt. Nach sechs Stunden Inkubation wurde der CPRG-Reaktionsmix hinzugefügt und nach weiteren 24 Stunden der Farbumschlag im Photometer bei 574 nm gemessen. Bei dem CPRG-Assay läßt sich die Substratumsetzung anhand eines Farbumschlages von gelb zu dunkelrot verfolgen.

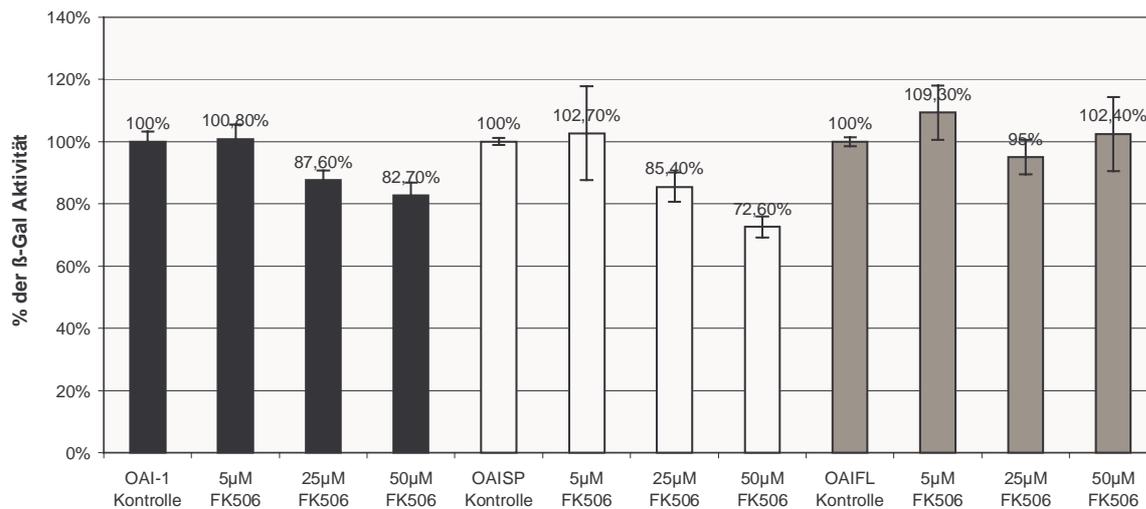


Abbildung 4.21: **Einfluß von FK506 auf die Antizym 1 / Antizym-Inhibitor-Interaktion**

OAI-1 (schwarz), OAISP-1 (weiß) und OAIFL (grau) interagieren mit Antizym 1. FK506 wurde in den Konzentrationen 5 μM, 25 μM oder 50 μM (gelöst in DMSO) zugesetzt. Als Kontrolle wurde DMSO alleine verwendet. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Substratumsetzung konnte anhand eines Farbumschlages von gelb zu dunkelrot verfolgt werden. Im Photometer wurde die Absorption bei 574 nm gemessen und die Kontrolle ohne FK506 auf 100% gesetzt.

| Vektor mit Aktivierungsdomäne | Vektor mit DNA-Bindungsdomäne | Reporterplasmid |
|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|
| pJG-OAI-1 | pEG202-Antizym 1 | pRB1840 |
| pJG-OAISP-1 | pGilda-Antizym 1 | pRB1840 |
| pJG-OAIFL | pGilda-Antizym 1 | pRB1840 |

Tabelle 4.5: **2-Hybrid-Konstrukte für die Antizym 1 / Antizym-Inhibitor-Interaktion**

In Spalte 1 sind die Konstrukte mit der Aktivierungsdomäne, in Spalte 2 die Konstrukte mit der DNA-bindenden Domäne und in Spalte 3 das Reporterplasmid aufgeführt.

Die Ergebnisse des CPRG-Assays zeigen, daß die Interaktion von Antizym 1 mit dem Inhibitor-Fragment OAI-1 bzw. der Spleißvariante OAISP-1 durch FK506 gehemmt werden kann (siehe Abbildung 4.21). Die Interaktion von Antizym mit Antizym-Inhibitor-Volllänge (OAIFL) wurde von FK506 nicht beeinflusst. Dies war zu erwarten, da die vollständige Form von Antizym-Inhibitor auch nicht in der Lage ist, FK506 zu binden. Das Ergebnis läßt darauf schließen, daß es sich hier um einen spezifischen Effekt von FK506 handelt und nicht um einen generellen Einfluß von FK506 auf Protein / Protein-Interaktionen. Allerdings sind die FK506-Konzentrationen ($\geq 25 \mu\text{M}$ FK506), bei denen ein hemmender Effekt nachgewiesen werden konnte, recht hoch.

4.6 Funktionelle Expression des ODC / Antizym / Antizym-Inhibitor-Komplexes in der Hefe

2-Hybrid-Daten liefern zwar Aussagen über Protein / Protein-Interaktionen, über die daraus resultierenden Enzymaktivitäten lassen sich jedoch nur Vermutungen anstellen. Da für 2-Hybrid-Daten auch andere Faktoren wie die Expressionstärke eines Proteins, oder die Lokalisation eine Rolle spielen, sollten 2-Hybrid-Ergebnisse in der Regel noch mit anderen Methoden verifiziert werden. Normalerweise wird die Aktivität von Antizym-Inhibitor anhand seiner Fähigkeit bestimmt, ODC aus dem Komplex mit Antizym freizusetzen. Die freigesetzte ODC-Aktivität gibt somit indirekt Auskunft über die Antizym-Inhibitor-Aktivität. Die ODC-Aktivität wird dabei anhand der Decarboxylierung von L-[1-¹⁴C]-Ornithin zu Putrescin bestimmt, wobei radioaktives ¹⁴CO₂ entsteht (Coleman and Pegg, 1998). Hierbei handelt es sich um ein zellfreies System, ein *in vivo* Assay zur Bestimmung der Antizym-Inhibitor-Aktivität existiert bislang nicht. Ziel war es deshalb, einen nicht-radioaktiven *in vivo* Aktivitätsassay für ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor zu entwickeln. Hierfür wurde die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus ausgewählt. Die Idee bestand darin, humane ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor funktionell in der Hefe zu exprimieren und die Aktivitäten der genannten Proteine anhand des Hefewachstums zu verfolgen. Durch Verwendung eines Polyamin-freien Mediums sollte sich die ODC-Aktivität in An- und Abwesenheit von exogenen Polyaminen anhand des Zellwachstums bestimmen lassen.

4.6.1 Komplementation der Hefe *spe1*-Deletion durch humane ODC

Eine Komplementation liegt dann vor, wenn das Fehlen eines Gens durch Anwesenheit eines gleichartigen intakten Gens aufgehoben wird, das die Funktion des fehlenden Gens übernimmt. In Polyamin-freiem Medium führt die Deletion der Hefe-ODC ($\Delta spe1$) zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase und damit zu einem Wachstumsstopp. Im Mikroskop betrachtet, erscheinen die Hefezellen groß und mißgestaltet (Schwartz *et al.*, 1995). In den folgenden Versuchen wurde überprüft, ob sich durch Komplementation eines solchen Deletionsstammes mit humaner ODC, die Polyamindepletion aufheben und die Enzym-Aktivität anhand des Hefewachstums bestimmen läßt. Bislang war beschrieben, daß ODC aus *Candida albicans* sowie ODC aus dem Nematoden *Haemonchus contortus* in Hefe die *spe1*-Deletion komplementieren können (McNemar *et al.*, 1997; Klein *et al.*, 1997).

Für die Komplementation der *spe1*-Deletion mit humaner ODC wurde der entsprechende Hefe-Deletionsstamm Y15034 (MAT α , *his3* Δ 1, *leu2* Δ 0, *lys2* Δ 0, *ura3* Δ 0, YKL184w::kanMX4) von Euroscarf (Frankfurt) bezogen. Bei diesem haploiden Stamm ist das Hefe-Gen für die ODC durch eine Kanamycin-Kassette ersetzt. Darüber hinaus stand auch der entsprechende Wildtypstamm Y10000 (MAT α , *his3* Δ 1, *leu2* Δ 0, *lys2* Δ 0, *ura3* Δ 0) zur Verfügung. Der Stamm Y15034 wächst auf Polyamin-haltigem YPD-Medium ebensogut wie

der entsprechende Wildtypstamm Y10000. Auf Polyamin-freiem Medium stellt sich jedoch nach einigen Zellteilungen ein vollständiger Wachstumsstopp ein. Für die Komplementation wurde die humane ODC über die *EcoRI*/*XhoI*-Schnittstellen aus dem 2-Hybrid-Vektor pEG202 in die Hefe-Expressionsvektoren p413ADH, p413GalL und p413GalS umklontiert, die den Hefe-Selektionsmarker *HIS3* besitzen und über einen CEN-Replikationsursprung vermehrt werden. Der Stamm Y15034 wurde mit dem Plasmid p413ADH bzw. mit p413ADH-hODC transformiert, der Wildtypstamm Y10000 wurde zur Kontrolle ebenfalls mit dem Leerplasmid p413ADH transformiert. Das Wachstum der transformierten Hefezellen wurde in Polyamin-freiem Selektionsmedium untersucht. Unter Polyamin-freiem Medium ist Synthetic Complete (SC)-Medium zu verstehen, das nicht autoklaviert, sondern steril filtriert wurde, um Polyaminkontaminationen beim Autoklavieren zu vermeiden. Dem Medium wurden anschließend die entsprechenden Mengen an Aminosäuren und Zucker zugesetzt. Für die Bestimmung der ODC-Aktivität wurden die Hefekulturen über Nacht in Polyamin-freiem Medium angeimpft und am nächsten Tag mit einer OD_{600} von 0,1 gestartet. Wie aus Abbildung 4.22 ersichtlich, ist humane ODC in der Lage, die Deletion der endogenen Hefe-ODC zu komplementieren. Das Hefewachstum entspricht dem des entsprechenden Wildtypstammes.

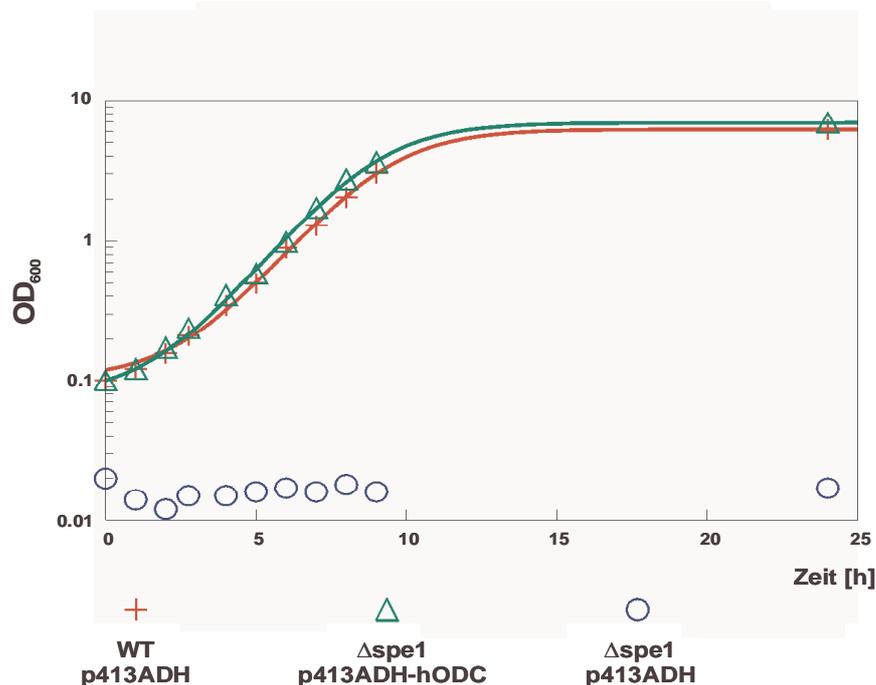


Abbildung 4.22: **Komplementation der *spe1*-Deletion mit humaner ODC**

Die Hefezellen wurden in Polyamin-freiem Selektionsmedium kultiviert (His^+ , Glukose). Das Wachstum des Wildtypstammes Y10000 (WT), des *spe1*-Deletionsstammes Y15034 ($\Delta spe1$) sowie des *spe1*-Deletionsstammes komplementiert mit humaner ODC ($\Delta spe1$ + p413ADH-hODC) wurde durch Messung der Absorption bei OD_{600} verfolgt.

Wie bereits erwähnt, zeigen Hefezellen unter Polyaminmangel einen ausgeprägten Phänotyp. Unter dem Lichtmikroskop betrachtet erscheinen die Zellen groß und mißgeformt. Dies konnte auch für den *spe1*-Deletionsstamm beobachtet werden. Werden die Zellen mit humaner ODC komplementiert, so verändert sich dieses Erscheinungsbild und die Zellen entsprechen ihrem Äußeren nach wieder normalen Wildtypzellen (Daten nicht gezeigt).

Da ODC die Decarboxylierung von Ornithin zu Putrescin katalysiert, führt die *spe1*-Deletion zunächst zu einem Putrescin-Mangelzustand und infolgedessen zu einer Polyamindepletion. Durch Zugabe von Putrescin zu dem Medium ($7,5 \mu\text{M}$) sollte es deshalb möglich sein, die Polyamin-bedingte Wachstumshemmung wieder aufzuheben. Die Zellen wurden hierfür in einem Polyamin-freien Selektionsmedium über Nacht angeimpft und am nächsten Tag auf Putrescin-haltigen Selektionsplatten aufgetropft. Beginnend mit einer OD_{600} von 3,0 wurden die Zellen in 10er Schritten herunterverdünnt, wovon jeweils $2 \mu\text{l}$ aufgetragen wurden. Zum Verfestigen der Platten wurde Agarose verwendet, da auch Agar Polyamine enthält, die das Ergebnis verfälschen könnten. Wie aus Abbildung 4.23 ersichtlich, wächst der *spe1*-Deletionsstamm (Y15034) auf Polyamin-freiem Medium überhaupt nicht. In Gegenwart von Putrescin beginnen die Zellen wieder zu wachsen. Dieses Wachstum ist etwas zeitverzögert, da die Zellen erst Putrescin aus dem Medium aufnehmen müssen, um daraus die Polyamine Spermin und Spermidin zu synthetisieren.

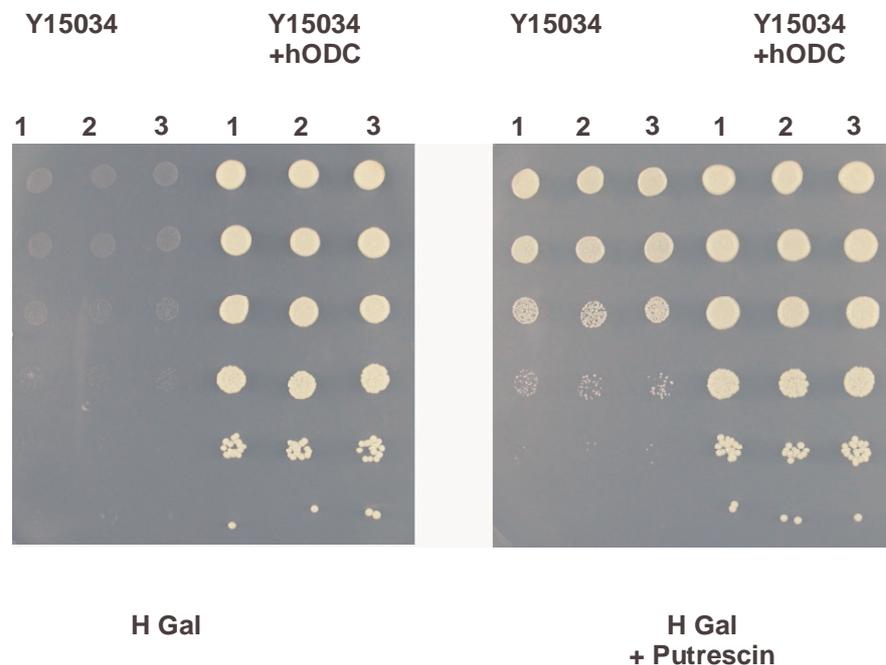


Abbildung 4.23: **Beseitigung der Polyamindepletion durch Zugabe von Putrescin**

Die Transformanten wurden in An- oder Abwesenheit von Putrescin ($7,5 \mu\text{M}$) auf Polyamin-freiem Histidin-defizientem, Galaktose-Selektionsmedium (H, Gal) kultiviert. Spur 1-3: Y15034 transformiert mit p413ADH, p413GALL, p413GALS, Spur 4-6: Y15034 transformiert mit p413ADH-hODC, p413GALL-hODC, p413GALS-hODC. Beginnend mit einer OD_{600} von 3,0 wurden die Zellen in 10er Schritten herunterverdünnt, wovon jeweils $2 \mu\text{l}$ aufgetragen wurden.

Die Ergebnisse verdeutlichen, daß die Zellen nicht absterben, sondern bei Polyaminmangel in einem Zellzyklusarrest verharren, der durch Zugabe von Putrescin wieder aufgehoben werden kann. Abbildung 4.23 zeigt außerdem einen Vergleich der drei Expressionsvektoren p413ADH, p413GALL und p413GALS. Bei den Galaktose-induzierbaren Promotoren *GALL* und *GALS* handelt es sich um verkürzte Formen des *GALI*-Promotors. Den Deletionsvarianten fehlt entweder eine oder anderthalb der drei „Upstream Activator Sequences“ (UAS) des *GALI*-Promotors (Mumberg *et al.*, 1994). Sie sind in Glukosehaltigem Medium vollständig reprimiert und lassen sich durch Galaktose induzieren, haben aber eine wesentlich schwächere Expressionsrate als der starke *GALI*-Promotor. Wie aus Abbildung 4.23 ersichtlich, besteht zwischen den drei getesteten Promotoren kein Unterschied im Wachstumsverhalten der mit humaner ODC komplementierten Hefen. Da ODC ein Enzym mit einer sehr hohen katalytischen Aktivität ist, reicht eine niedrige ODC-Expression aus, um den Polyaminmangel zu beseitigen.

4.6.2 Funktionelle Expression der Antizyme 1 - 4 in Hefe

Wie in Kapitel 4.6.1 beschrieben, war humane ODC in der Lage, die *spe1*-Deletion zu komplementieren. Es wurde nun als nächstes überprüft ob humanes Antizym 1 funktionell in der Hefe exprimiert werden kann und in der Lage ist, die Aktivität der ODC zu hemmen. Eine solche Hemmung sollte zu einem Putrescin-Mangel führen und damit verbunden zu einem verminderten Wachstum in Polyamin-freiem Medium. Der *spe1*-Deletionsstamm wurde hierfür mit ODC und Antizym 1 kotransformiert. Hierfür wurde Antizym 1 über die *EcoRI*/*XhoI*-Schnittstellen aus dem 2-Hybrid-Vektor pEG202 in die Hefe-Expressionsvektoren p426ADH, p426GAL1 und p426GPD umklontiert, die den Hefe-Selektionsmarker *URA3* besitzen und über den 2 Micron-Replikationsursprung vermehrt werden. Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei ODC um ein Enzym mit einer sehr hohen katalytischen Aktivität. Damit der wachstumshemmende Effekt von Antizym sichtbar wird, mußte eine Balance zwischen der Expressionstärke von ODC und der von Antizym gefunden werden. Es zeigte sich, daß eine starke (konstitutive) Antizym-Expression (p426GAL1, p426GPD) und eine induzierbare schwache ODC-Expression (p413GALL) das beste Ergebnis liefert. So kann theoretisch jedes neu synthetisierte ODC-Molekül sofort von einem Antizym-Molekül abgefangen werden. Das Plasmid p413GALL-hODC wurde zusammen mit den Plasmiden p426ADH-AZ1, p426GAL1-AZ1 bzw. p426GPD-AZ1 sowie den entsprechenden Leerplasmiden in den Hefestamm Y15034 transformiert und die Plasmide auf UH⁻, Glukose selektiert. Von den transformierten Zellen wurden Klone gepickt und über Nacht in Polyamin-freiem Medium angeimpft. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf UH⁻, Galaktose-Selektionsplatten aufgetropft. Es wurde wiederum mit einer OD₆₀₀ von 3,0 begonnen und in 10er Schritten herunterverdünnt.

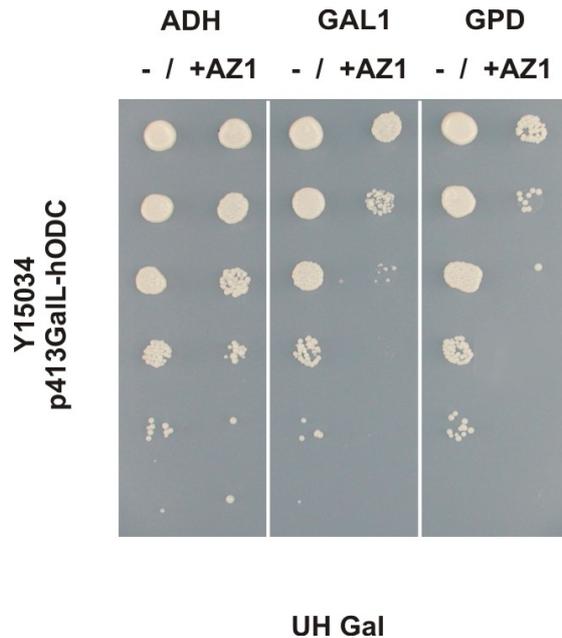


Abbildung 4.24: **Funktionelle Expression von Antizym 1**

p413GALL-hODC wurde jeweils zusammen mit p426ADH-AZ1 (ADH / +AZ1), p426GAL1-AZ1 (GAL1 / +AZ1) und p426GPD-AZ1 (GPD / +AZ1) sowie den entsprechenden Leerplasmiden in den Hefestamm Y15034 transformiert. Die Transformanden wurden auf Polyamin-freiem Selektionsmedium (UH, Gal) analysiert. Beginnend mit einer OD_{600} von 3,0 wurden die Zellen in 10er Schritten herunterverdünt und davon jeweils 2 μ l auf die Selektionsplatte aufgetropft.

Wie aus Abbildung 4.24 ersichtlich, ist Antizym 1 in der Lage, die Aktivität der humanen ODC in Hefe zu hemmen. Zellen, die humane ODC und Antizym 1 koexprimieren, wachsen signifikant schlechter als Hefezellen, die ODC alleine exprimieren. Das Ausmaß der Hemmung ist abhängig von der Stärke des Promotors unter dem Antizym 1 exprimiert wird. Wie aus Abbildung 4.25 ersichtlich, kann die Antizym 1-bedingte Wachstumshemmung durch Zugabe von Putrescin wieder aufgehoben werden. Dies beweist, daß die Überexpression von Antizym 1 in *S. cerevisiae* zu einem Polyaminmangel führt und die Wachstumshemmung nicht auf toxische Effekte einer Antizym-Expression zurückzuführen ist. Aus den Ergebnissen läßt sich demnach schließen, daß humanes Antizym 1 funktionell in der Hefe *S. cerevisiae* exprimiert werden kann, obwohl im Gegensatz zu *Schizosaccharomyces pombe* für *Saccharomyces cerevisiae* bislang kein Antizym-Homolog nachgewiesen wurde (Zhu *et al.*, 2000). In Säugerzellen ist Antizym 1 auch an der Regulation des Polyamintransportes beteiligt (Mitchell *et al.*, 1994). Inwieweit dies auch in der Hefe der Fall ist, kann mit diesem System jedoch nicht beantwortet werden.

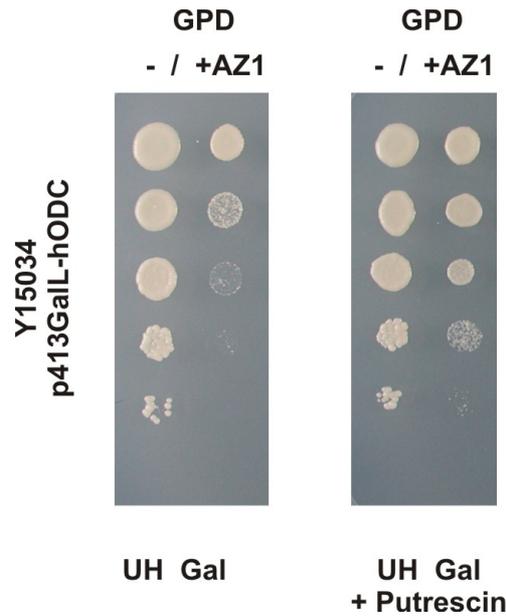


Abbildung 4.25: **Aufhebung der Antizym-bedingten Wachstumshemmung durch Putrescin**

p413GALL-hODC wurde zusammen mit p426GPD-AZ1 (GPD / +AZ1) bzw. dem entsprechenden Leerplasmid p426GPD (GPD / -) in den Hefestamm Y15034 transformiert. Die Transformanten wurden auf Polyamin-freiem Selektionsmedium (UH, Galaktose) in An- und Abwesenheit von Putrescin kultiviert. Die Putrescin-Konzentration in der Platte betrug 7,5 μ M.

Funktionelle Expression von Antizym 2, 3 und 4 in der Hefe

Als nächstes wurde getestet, ob auch die anderen Mitglieder der Antizym-Familie funktionell in der Hefe exprimiert werden können. Hierfür wurden die Antizyme 2, 3 und 4 ebenfalls über die *EcoRI* / *XhoI*-Schnittstellen aus dem 2-Hybrid-Vektor pEG202 in die Hefe-Expressionsvektoren p426ADH, p426GAL1 und p426GPD umkloniert. Analog dem vorangegangenen Versuch wurden die Antizym-Konstrukte zusammen mit p413GALL-hODC in den Hefestamm Y15034 transformiert und auf den entsprechenden Selektionsplatten analysiert. Wie aus Abbildung 4.26 ersichtlich, waren alle Antizym-Proteine in der Lage, die Aktivität der ODC zu hemmen. Dies war besonders interessant im Hinblick auf Antizym 4, dessen Fähigkeit, ODC zu inhibieren, bislang noch nicht beschrieben ist. Die Antizym-bedingte Hemmung der ODC führte in allen Fällen zu einem Polyamin-bedingten Wachstumsstopp, der durch Zugabe von Putrescin wieder aufgehoben werden konnte (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus fiel auf, daß die Expression von Antizym 2 bereits unter dem schwächeren *ADH*-Promotor eine Wachstumshemmung bewirkt. Dies könnte bedeuten, daß Antizym 2 ein stärkerer Inhibitor der ODC-Aktivität ist als andere Proteine der Antizym-Familie, oder daß das Protein in Hefe besonders gut exprimiert wird. Um dies zu überprüfen, wurde die Expression der Antizym-Konstrukte im Western-Blot untersucht.

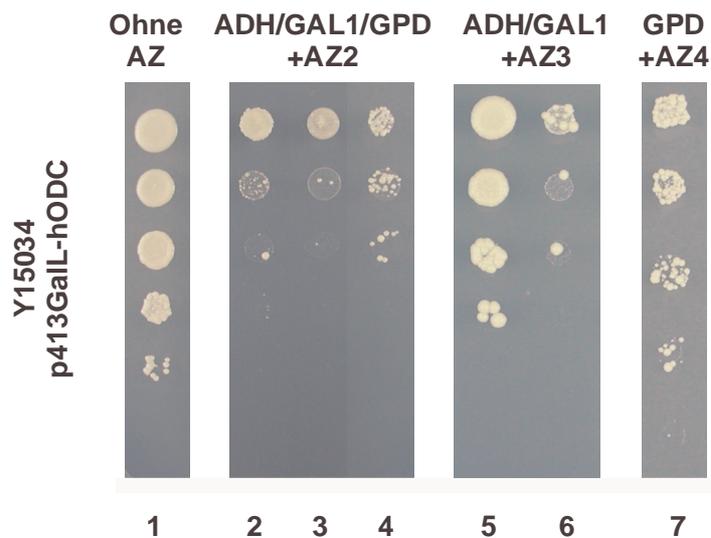


Abbildung 4.26: Funktionelle Expression von Antizym 2, 3 und 4

Spur 1: Y15034 komplementiert mit humaner ODC (p413GALL-hODC). Spur 2-4 (Antizym 2): p413GALL-hODC kotransformiert mit p426ADH-AZ2 (ADH / +AZ2), p426GAL1-AZ2 (GAL1 / +AZ2) oder p426GPD-AZ2 (GPD / +AZ2). Spur 5 und 6 (Antizym 3): p413GALL-hODC kotransformiert mit p426ADH-AZ3 (ADH / +AZ3) bzw. p416GAL1-AZ3 (GAL1 / +AZ3). Spur 7 (Antizym 4): p413GALL-hODC kotransformiert mit p426GPD-AZ4 (GPD / +AZ4). Die Transformanten wurden auf Polyamin-freiem Selektionsmedium (UH Gal) analysiert.

4.6.3 Immunologischer Nachweis der Expression von Antizym 1 - 4

Da für die Proteine der Antizym-Familie kein kommerziell erhältlicher Antikörper existiert, mußten die Antizyme mit einem entsprechenden Tag markiert werden (Epitop-tagging). Hierfür wurde der HA-Tag ausgewählt. Bei dem HA-Tag handelt es sich um ein Epitop aus dem Hämagglutinin-Protein des humanen Influenzavirus. Es wurde ein Primer konzipiert, der die Aminosäuresequenz YPYDVPDYA des Hämagglutinin-Epitops vor dem Startkodon der Antizyme einführt (HA.OAZ.For, siehe Material 2.4.2). Unter Verwendung der Primer HA.OAZ.For / OAZ.Rev wurde jedes Antizym mit einem N-terminalen HA-Tag versehen. Dabei wurden die Konstrukte pEG202-AZ1 - 4 als Vorlage für die PCR verwendet. Zunächst wurde mit dem in Kapitel 4.6.2 beschriebenen Assay die Funktionalität der HA-markierten Antizyme untersucht und ihre Aktivität mit den unmarkierten Proteinen verglichen. Hierbei konnten keine Unterschiede bezüglich der Fähigkeit, ODC zu hemmen, festgestellt werden. Für die Expression der Antizym-Proteine wurde der Hefestamm UC100 ausgewählt. In diesem Hefestamm sind die Gene für die beiden Vakuole-spezifischen Proteasen *PEP4* und *PRB1* deletiert, wodurch die allgemeine Protein-Degradation reduziert ist. Um eine gleiche Expressionsstärke zu gewährleisten, wurden die HA-markierten Antizyme über die *EcoRI* / *XhoI*-Schnittstellen in den Hefeexpressionsvektor p416GPD kloniert, der einen CEN-Replikationsursprung besitzt. Der UC100-Stamm wurde mit den Plasmiden p416GPD-

HA.AZ1 - 4 transformiert und auf den entsprechenden Platten selektioniert. Für die Präparation der Hefezelleextrakte wurden 100 ml einer Hefekultur verwendet. Die Zellen wurden in ihrer logarithmischen Wachstumsphase geerntet und mit Glaskügelchen aufgeschlossen (Methoden, Kapitel 3.15.5). Die zytosolischen Proteinextrakte wurden im Gel aufgetrennt und die Expression der Antizyme im Western-Blot mit einem Peroxidase-konjugierten anti-HA-Antikörper (anti-HA-Peroxidase, Klon 3F10, Roche) nachgewiesen.

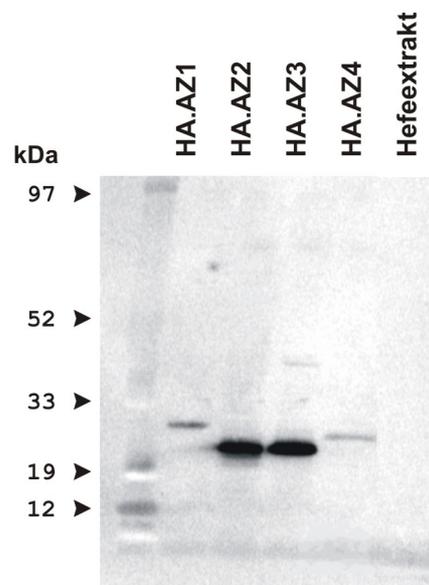


Abbildung 4.27: **Expression von HA-Antizym 1, 2, 3 und 4**

NuPAGE 4-12%, Laufpuffer MOPS. Pro Spur wurden 20 µg des zytosolischen Hefeextraktes aufgetragen. Primärantikörper: anti-HA, Peroxidase-konjugiert (Klon 3F10, Roche) 1:500. Die Signaldetektion erfolgte mit ECL Plus. Von links nach rechts wurden aufgetragen: HA.AZ1 - 4 und eine Hefeextrakt-Kontrolle (UC100).

Wie aus Abbildung 4.27 ersichtlich, wurden alle vier Antizyme exprimiert. Die Größe der Banden entsprach dem erwarteten Molekulargewicht: Antizym 1: 25kDa, Antizym 2: 21kDa, Antizym 3: 21kDa und Antizym 4: 24kDa. Die Expressionsstärke der vier Antizyme war jedoch sehr unterschiedlich. Dabei sollte berücksichtigt werden, daß die Expression der Proteine auch durch ihre Stabilität beeinflusst wird. So wurden Antizym 1 und Antizym 4 nur sehr schwach exprimiert, wohingegen die Expression von Antizym 2 und 3 sehr viel stärker war. GFP-markierte Antizym-Konstrukte bestätigten die Proteinexpressions-Daten. Diese Ergebnisse erklären, warum die Antizyme 1 und 4 nur unter Kontrolle des starken *GPD*-Promotors in der Lage waren, die Aktivität der ODC zu inhibieren und Antizym 2 schon unter Kontrolle des schwächeren *ADH*-Promotors eine deutliche Wachstumshemmung hervorrief. Antizym 3 wurde in der Hefe ebenfalls sehr gut exprimiert. Für eine Wachstumshemmung war jedoch der *ADH*-Promotor nicht ausreichend. Dies deutet darauf hin, daß Antizym 3 im Vergleich zu Antizym 2 in der Hefe eine geringere Aktivität besitzt, ODC zu inhibieren.

4.6.4 Funktionelle Expression von Antizym-Inhibitor in Hefe

In dem vorangegangenen Kapitel 4.6.2 wurde gezeigt, daß die Antizyme funktionell in der Hefe exprimiert werden können. Darüber hinaus wurde ermittelt, welche Expressionsstärke für die verschiedenen Mitglieder der Antizym-Familie notwendig war, damit eine ausreichende Hemmung der ODC-Aktivität entsteht. Es wurde nun getestet, ob auch Antizym-Inhibitor bzw. die Spleißvariante OAISP-1 funktionell in der Hefe exprimiert werden können. Ein funktioneller Antizym-Inhibitor sollte in der Lage sein, die Antizym-bedingte Wachstumshemmung wieder aufzuheben. Für die Expression von Antizym-Inhibitor wurden die Hefevektoren p415GALL und p415GPD verwendet, die einen *LEU2*-Selektionsmarker besitzen und über einen CEN-Replikationsursprung vermehrt werden. Hierfür konnte Antizym-Inhibitor nicht über die *EcoRI*/*XhoI*-Schnittstellen aus einem 2-Hybrid-Vektor umklontiert werden, da die Vektoren der p415-Serie eine *EcoRI*-Schnittstelle im *LEU2*-Gen besitzen. Es wurde deshalb ein neuer Primer konzipiert (OAIS_{Spe1}.FOR), der eine *Spe1*-Schnittstelle vor dem Startkodon von Antizym-Inhibitor einführt. Zusammen mit den Primern OAI.448.Rev und OAISP.Rev wurden zwei PCR-Fragmente generiert (Vorlage pJG-OAIFL und pJG-OAISP-1) und in die Hefeexpressionsvektoren p415GALL und p415GPD kloniert. Zusammen mit ODC und Antizym 1 wurden Antizym-Inhibitor-Volllänge (OAIFL) und die Spleißvariante (OAISP-1) jeweils in den *spe1*-Deletionsstamm Y15034 kotransformiert.

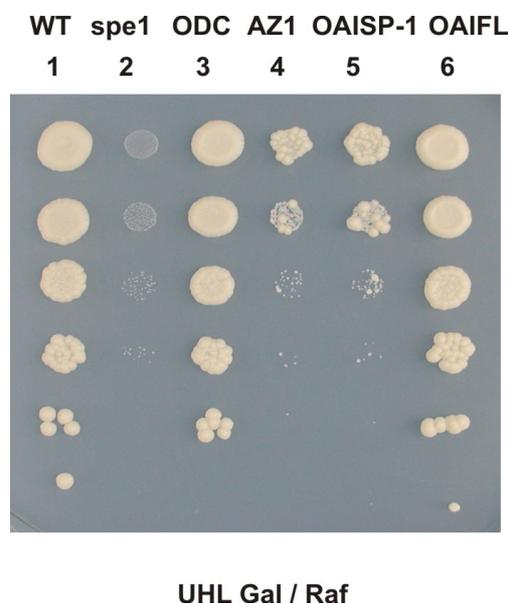


Abbildung 4.28: Funktionelle Expression von Antizym-Inhibitor

Spur 1: Wildtypstamm Y10000 (WT), Spur 2: *spe1*-Deletionsstamm Y15034 (*spe1*), Spur 3: Y15034 transformiert mit p413GALL-hODC (ODC), Spur 4: Y15034 transformiert mit p413GALL-hODC und p426GPD-AZ1 (AZ1), Spur 5: Y15034 transformiert mit p413GALL-hODC, p426GPD-AZ1 und p415GALL-OAISP-1 (OAISP-1), Spur 6: Y15034 transformiert mit p413GALL-hODC, p426GPD-AZ1 und p415GALL-OAIFL (OAIFL). Die Klone wurden auf UHL, Galaktose / Raffinose (Gal / Raf)-Selektionsplatten analysiert.

Wie aus Abbildung 4.28 ersichtlich, konnte die vollständige Form von Antizym-Inhibitor (OAIFL) funktionell in Hefe exprimiert werden. OAIFL vermag die Antizym-bedingte Wachstumshemmung vollständig aufzuheben, so daß kein Unterschied im Wachstumsverhalten zum Wildtypstamm Y10000 mehr festgestellt werden konnte. Weitere Versuche ergaben, daß OAIFL ebenfalls in der Lage war, die durch Antizym 2, 3 (siehe Abbildung 4.29) und 4 (Daten nicht gezeigt) -bedingte Wachstumshemmung aufzuheben. In allen Fällen war die Verwendung des schwachen induzierbaren *GALL*-Promotors ausreichend, um den spezifischen Effekt von Antizym-Inhibitor zu detektieren. Die Spleißvariante OAISP-1 konnte die Antizym 1-bedingte Hemmung dagegegen nicht aufheben, obwohl das Protein in der Lage war, an Antizym 1 zu binden (siehe Abbildung 4.20). Auch die Verwendung eines stärkeren Promotors (*GPD*-Promotor) führte zu keiner Verbesserung. Diese Ergebnisse ließen daher vermuten, daß OAISP-1 trotz Bindung nicht in der Lage war, ODC aus dem Komplex mit Antizym 1 zu verdrängen.

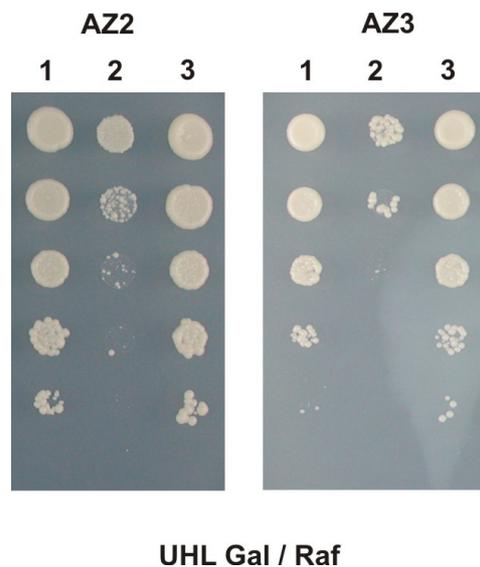


Abbildung 4.29: **Antizym-Inhibitor inaktiviert Antizym 2 und 3**

Linke Seite, Antizym 2 (AZ2). Spur 1: Y15034 transformiert mit p413GALL-hODC, Spur 2 Y15034 transformiert mit p413GALL-hODC und p426ADH-AZ2, Spur 3 Y15034 transformiert mit p413GALL-hODC, p426ADH-AZ2 und p415GALL-OAIFL. Rechte Seite, Antizym 3 (AZ3). Spur 1: Y15034 transformiert mit p413GALL-hODC, Spur 2 Y15034 transformiert mit p413GALL-hODC und p416GAL1-AZ3, Spur 3 Y15034 transformiert mit p413GALL-hODC, p416GAL1-AZ3 und p415GALL-OAIFL. Die Klone wurden auf UHL, Galaktose / Raffinose (Gal / Raf)-Selektionsplatten analysiert.

Es wurde außerdem getestet, ob die Spleißvariante OAISP-1 in der Lage ist, die Antizym 2 und 3-bedingte Wachstumshemmung wieder aufzuheben. Für Antizym 2 konnte kein Effekt beobachtet werden, für Antizym 3 war unter Verwendung des starken *GPD*-Promotors ein schwacher Effekt zu sehen. Dies stimmt mit der 2-Hybrid-Beobachtung überein, daß die Spleißvariante OAISP-1 besonders gut an Antizym 3 bindet (Abbildung 4.20). Da im 2-Hybrid-Assay keine Bindung von OAISP-1 an Antizym 4 nachgewiesen werden konnte, war ein Effekt hier generell nicht zu erwarten.

4.6.6 Immunologischer Nachweis der Expression von OAIFL und OAISP-1

Die Ergebnisse in Kapitel 4.6.4 haben gezeigt, daß die Spleißvariante OAISP-1 nicht in der Lage war, die Antizym-bedingte Hemmung der ODC aufzuheben. Da nicht auszuschließen war, daß die Spleißvariante in Hefe gar nicht oder nur sehr viel schlechter als die Volllänge Form von Antizym-Inhibitor exprimiert wird, wurde die Expression von Antizym-Inhibitor im Western-Blot überprüft. Auch für Antizym-Inhibitor existiert kein kommerziell erhältlicher Antikörper. Das Protein wurde deshalb ebenfalls mit einem HA-Epitop markiert. Für die Expression der Antizym-Inhibitor-Proteine wurde wiederum der Hefestamm UC100 verwendet. Es wurde ein Primer konzipiert, der die Aminosäuresequenz YPYDVDPDYA des Hämagglutinin-Epitops vor dem Startkodon von Antizym-Inhibitor einführt (HA.OAI.FOR, siehe Material 2.4.3). Dieser Primer wurde mit den Primern OAI.448.Rev und OAISP.Rev kombiniert und die amplifizierten Konstrukte in die Hefeexpressionsvektoren p415ADH und p415GPD kloniert.

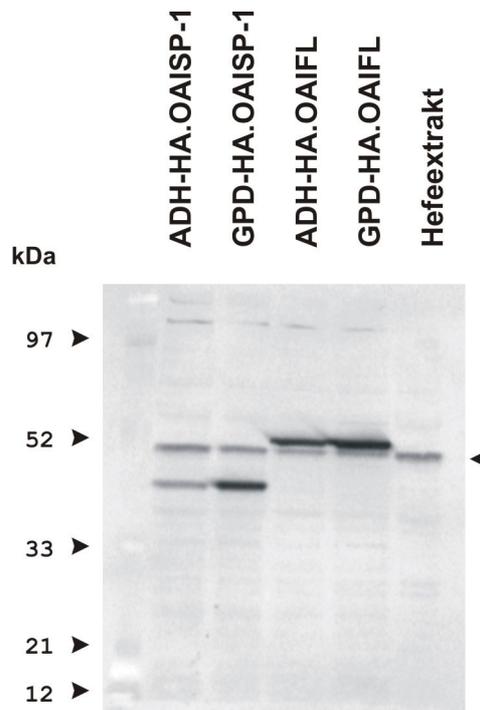


Abbildung 4.30: Expression von HA-OAIFL und HA-OAISP-1

NuPAGE 10%, Laufpuffer MOPS. Pro Spur wurden 40 µg eines zytosolischen Hefeextraktes aufgetragen. Primärantikörper: anti-HA (Maus, Klon 12CA5), 1:500; Sekundärantikörper anti-Maus Peroxidase-konjugiert 1:10000. Die Signaldetektion erfolgte mit ECL Plus. Von links nach rechts wurden aufgetragen: ADH-HA.OAISP-1, GPD-HA.OAISP-1, ADH-HA.OAIFL, GPD-HA.OAIFL und eine Hefeextrakt-Kontrolle (UC100). Der Pfeil deutet auf eine zusätzliche Bande bei 50kDa, die von diesem anti-HA-Antikörper in Hefeextrakten detektiert wird.

Wie aus Abbildung 4.30 ersichtlich ist, wurden die Proteine OAISP-1 und OAIFL in der Hefe exprimiert. Die Expression der Spleißvariante war nur geringfügig schwächer als die Expression von OAIFL. Dieses Ergebnis zeigt, daß nicht die fehlende Expression dafür verantwortlich ist, daß OAISP-1 die Antizyme nicht inaktivieren kann.

Parallel zu den in der Hefe gewonnenen Daten wurde außerdem mit einem radioaktiven *in vitro* Assay unter Verwendung von aufgereinigtem Antizym 1 und Antizym-Inhibitor (OAISP-1) (siehe Methoden, Kapitel 3.17 Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen) gezeigt, daß OAISP-1 nicht in der Lage ist, die Antizym-bedingte Hemmung der ODC wieder aufzuheben (Prof. Seiler, Straßburg).

Die Ergebnisse legen insgesamt die Vermutung nahe, daß OAISP-1, aufgrund der schwächeren Bindung an Antizym, nicht fähig ist, ODC aus dem Antizym-Komplex zu verdrängen. Um diese Hypothese zu testen, wurde ein Hefe-3-Hybrid-Assay auf Proteinbasis entwickelt, der es erlaubt, die Fähigkeit von Antizym-Inhibitor zu untersuchen, ODC aus dem Antizym-Komplex freizusetzen.

4.7 Der Proteinkomplex aus ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor

4.7.1 3-Hybrid-System für den Proteinkomplex aus ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor

Für den Proteinkomplex aus ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor soll ein 3-Hybrid-Assay aufgebaut werden, der es erlaubt, zu untersuchen, ob ein zusätzlich exprimiertes drittes Protein fähig ist, eine bestehende 2-Hybrid-Interaktion zwischen zwei Proteinen zu unterbinden. Bislang ist ein solches 3-Hybrid-System nur als Kompetitionsassay beschrieben. Protein A, fusioniert an die DNA-bindende Domäne, interagiert mit Protein B, fusioniert an die Aktivierungsdomäne. Wird Protein B zusätzlich im Überschuß exprimiert, so wird aufgrund von Konkurrenz die Formierung eines Transkriptionsfaktors verhindert (Tirode *et al.*, 1997). In diesem speziellen Fall soll jedoch getestet werden, ob ein drittes Protein C die Interaktion zwischen zwei bekannten Partnern A und B unterbinden kann. Wie aus Kapitel 4.6.2 ersichtlich, interagieren alle vier Mitglieder der Antizym-Familie mit ODC. Wird Antizym-Inhibitor koexprimiert, so sollte dies zur Hemmung der 2-Hybrid-Interaktion zwischen ODC und Antizym führen. Dies setzt voraus, daß Antizym-Inhibitor ODC aus dem Komplex verdrängt und keinen ternären Komplex mit Antizym bildet. Wird ODC verdrängt, so kann sich kein transkriptioneller Aktivator bilden und die Aktivierung der Reportergene unterbleibt (siehe Abbildung 4.31). Ein solches System erfordert die Verwendung von vier Selektionsmarkern für die beiden 2-Hybrid-Vektoren, das Reporterplasmid und für einen zusätzlichen Hefeexpressionsvektor. Der 2-Hybrid Hefestamm EGY48 besitzt jedoch nur drei

freie Selektionsmarker und kann für dieses System nicht verwendet werden. Aus diesem Grund wurde der Hefestamm W303-1a (siehe Material, Kapitel 2.2) eingesetzt, der weitere Selektionsmarker besitzt.

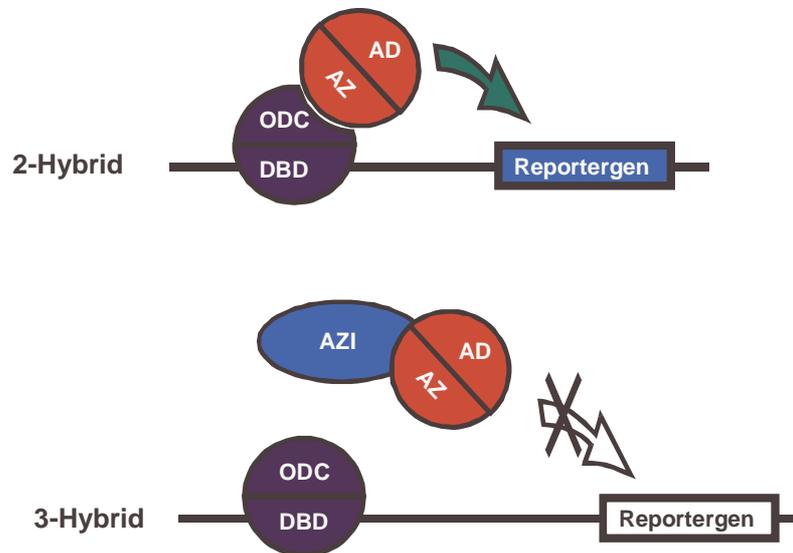


Abbildung 4.31: **3-Hybrid-System für den Komplex aus ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor**

Eine 2-Hybrid-Interaktion zwischen ODC und Antizym führt zur Aktivierung eines Reportergens. Die Koexpression von Antizym-Inhibitor unterbindet diese Interaktion. Die Aktivierung des Reportergens unterbleibt.

Für diesen 3-Hybrid-Assay wurden pEG202-hODC und pJG4-5 Antizym1 - 4 zusammen mit dem *lacZ*-Reporter pRB1840 in den Hefestamm W303-1a transformiert. Zusätzlich wurden die vollständige Form von Antizym-Inhibitor (p415GPD-OAIFL), die Spleißvariante OAISP-1 (p415GPD-OAISP-1) und das entsprechende Leerplasmid p415GPD in den Hefestamm W303-1a kotransformiert. Die Transformanden wurden auf UHWL, Glukose-Platten selektiert. Ausgehend von einer Übernachtskultur wurden die Zellen mit einer OD_{600} von 0,1 gestartet. Nach 7,5h wurde der CPRG-Reaktionsmix hinzugefügt und nach weiteren 24h wurde die Absorption bei 574 nm gemessen. Da bei dem CPRG-Assay die Substratumsetzung anhand eines Farbumschlages von gelb nach dunkelrot verfolgt werden kann, ist die Absorption bei 574nm das Maß für die Stärke der β -Galaktosidase-Aktivität.

Wie in Abbildung 4.32 gezeigt, war OAIFL in der Lage, ODC aus dem Komplex mit Antizym zu verdrängen. Das Signal für die β -Galaktosidase-Aktivität wurde in Gegenwart von OAIFL nahezu vollständig unterdrückt. Die Spleißvariante OAISP-1 war dazu jedoch nicht in der Lage. Hier blieb das Signal unverändert, teilweise war sogar eine geringfügige Signalverstärkung zu beobachten. Dies bedeutet, daß sich die folgende Hypothese bestätigt: OAISP-1 bindet zwar an Antizym, ist aber nicht in der Lage, ODC aus dem Komplex mit Antizym zu verdrängen.

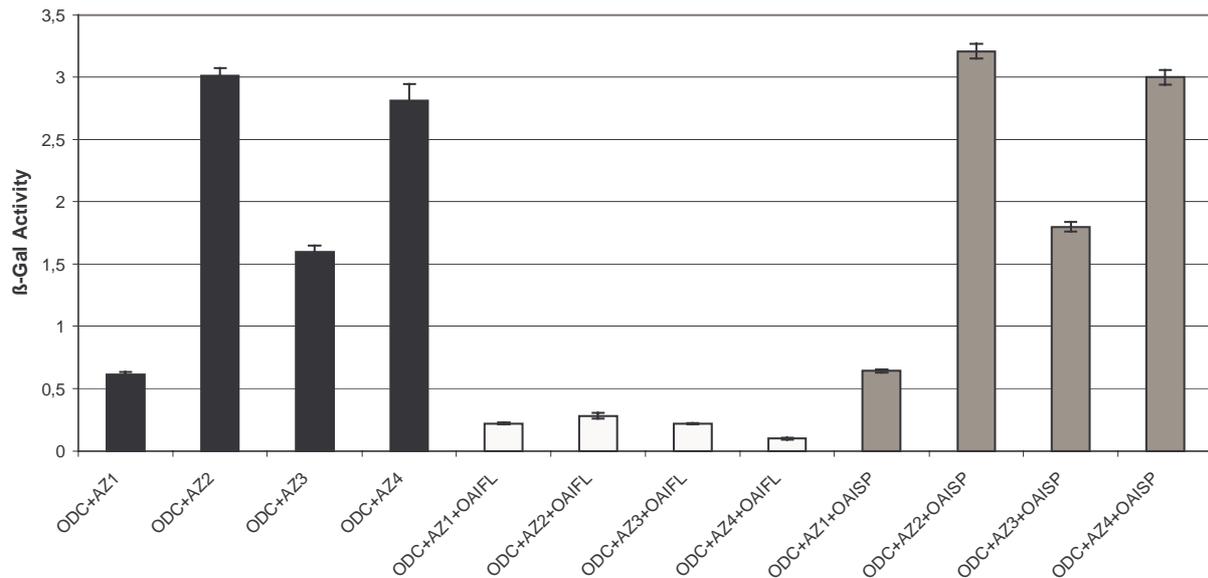


Abbildung 4.32: CPRG-Assay für das System aus ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor

CPRG-Assay: Anfangs-OD₆₀₀ 0,1 in UHWL, Gal, Selektionsmedium, Zugabe von CPRG nach 7,5 Stunden, Messung der Absorption (574 nm) nach 24h. Interaktion von humaner ODC (p413GALL) mit AZ1 - 4 (schwarze Balken), Koexpression der vollständigen Form von Antizym-Inhibitor (OAI FL) verhindert die Interaktion (weiße Balken), Koexpression der Spleißvariante (OAI SP-1) führt zu keiner Signalreduktion (graue Balken).

4.7.2 Expression von ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor im Säugersystem

Bei den hier vorgestellten Ergebnissen handelt es sich bislang um Daten, die in der Hefe *S. cerevisiae* gewonnen wurden. Für die Relevanz der Ergebnisse ist es jedoch wichtig, daß die Daten im Säugersystem bestätigt werden können. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob sich der Komplex aus ODC und Antizym mit Immunpräzipitation nachweisen läßt und ob diese Komplexbildung durch Antizym-Inhibitor verhindert werden kann. Für die transiente Expression von ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor wurde die humane embryonale Nierenzelllinie HEK 293 ausgewählt. ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor wurden in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) kloniert. Das Enzym konnte über die *EcoRI/XhoI*-Schnittstelle in den Vektor pcDNA3.1 umklont werden. Für Antizym wurden die HA-markierten Konstrukte HA-AZ1 - 4 (Kapitel. 4.6.4) ebenfalls über die *EcoRI/XhoI*-Schnittstelle in den Vektor pcDNA3.1(+) umklont. Antizym-Inhibitor mußte noch mit einem geeigneten Epitop versehen werden. Hierfür wurde der Myc-Tag ausgewählt. Es wurde ein Primer konzipiert, der die Aminosäuresequenz EQKLISEEDL des Myc-Epitops vor dem Startkodon von Antizym-Inhibitor einführt (Myc.OAI.For, siehe Material 2.4.3). Dieser Primer wurde mit den Primern OAI.448.Rev und OAI SP.Rev kombiniert und die amplifizierten Konstrukte über die *BamHI/XhoI*-Schnittstellen in den Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert. Parallel hierzu wurde auch ein HA-markiertes Antizym-Inhibitor-

Konstrukt hergestellt. Die Konstrukte wurden transient in HEK 293-Zellen transfiziert und zunächst die Expression der Proteine im Western-Blot überprüft. ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor konnten alle in HEK 293-Zellen exprimiert werden. Die Expression wurde jedoch stark davon beeinflusst, ob die Proteine alleine oder in Kombination mit einem anderen Protein koexprimiert werden. Um die Komplexbildung untersuchen zu können, war jedoch eine gleichmäßige Expression der drei Proteine ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor in einem Extrakt besonders wichtig. Von ODC war bekannt, daß das Enzym sehr instabil ist und über das 26S Proteasom abgebaut wird. Aus diesem Grund wurde der Effekt des Proteasom-Inhibitors Lactacystin getestet. Dabei wurde festgestellt, daß die Expression der drei Konstrukte durch Zugabe von Lactacystin (8 μ M) enorm stabilisiert werden konnte (siehe Abbildung 4.33).

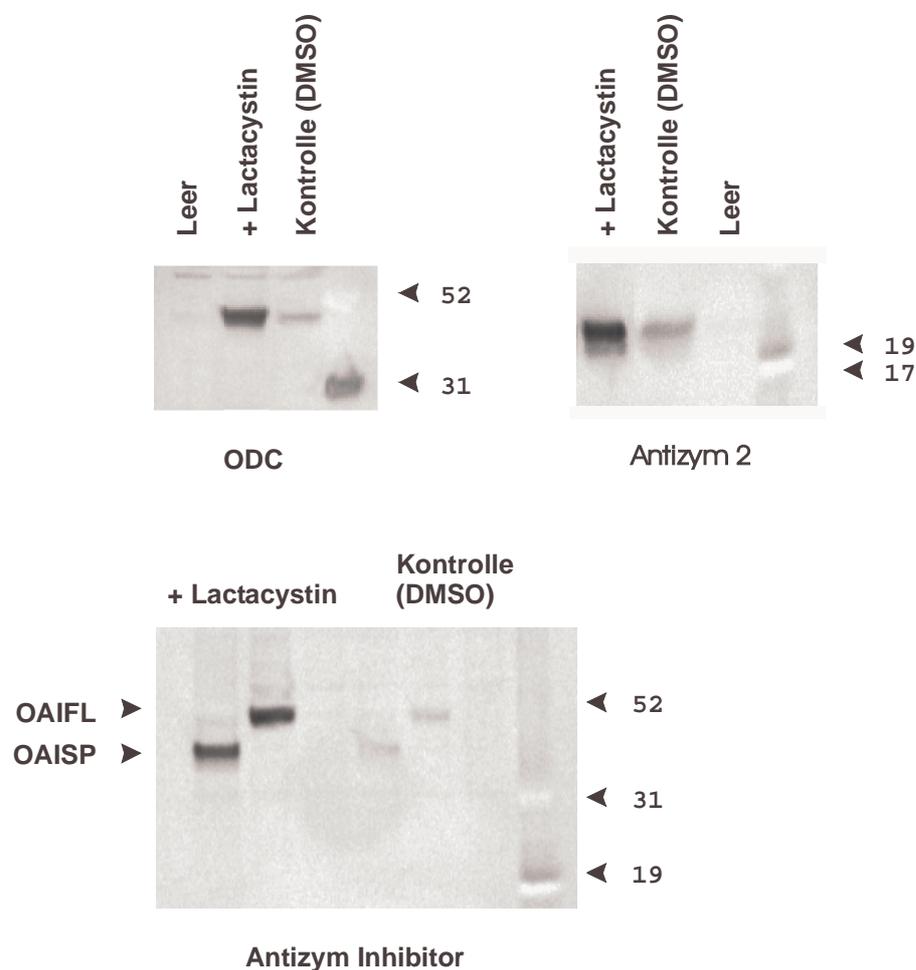


Abbildung 4.33: **Effekt von Lactacystin**

(a) ODC, (b) HA-Antizym 2 und (c) Antizym-Inhibitor (HA-markiert) wurden transient in HEK 293-Zellen exprimiert. Stabilisierung durch Zugabe von 8 μ M Lactacystin (+ Lactacystin) im Vergleich zur Kontrolle (DMSO). Leer: Transfektion mit dem Leervektor pcDNA3.1(+). NuPAGE 12%, MES Laufpuffer. Detektion mit anti-HA-Antikörper, Peroxidase-konjugiert (Ratte, Klon 3F10), oder mit anti-ODC-Antikörper (Kaninchen, polyklonal) und einem sekundären Peroxidase-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper. Die Signaldetektion erfolgte mit ECL Plus.

4.7.3 Immunpräzipitation von Antizym-bindenden Proteinen

Für die Immunpräzipitation Antizym-bindender Proteine wurde eine anti-HA-Affinitätsmatrix verwendet. Hierbei ist der monoklonale anti-HA-Antikörper (Ratte, Klon 3F10) bereits kovalent an die Matrix (Agarose beads) gekoppelt. Ziel war es, HA-markiertes Antizym an diese Matrix zu binden und immunologisch die Komplexbildung mit ODC nachzuweisen. Koexprimierter Antizym-Inhibitor sollte in der Lage sein, diese Komplexbildung zu verhindern. Es wurde in diesem Zusammenhang untersucht, ob Antizym-Inhibitor ODC lediglich aus dem Komplex mit Antizym verdrängt, oder ob das Protein anstelle von ODC an Antizym bindet. Exemplarisch wurde Antizym 2 ausgewählt, da für dieses Mitglied der Antizym-Familie mit biochemischen Methoden bislang keine Bindung an Antizym-Inhibitor gezeigt worden war. Zunächst wurde getestet, ob ODC oder OAIFL unspezifisch in Abwesenheit von HA-Antizym an die Affinitätsmatrix binden. Dabei wurde für ODC und OAIFL keine unspezifische Bindung festgestellt. Anschließend wurde ODC zusammen mit HA-Antizym 2 oder in Kombination mit HA-Antizym 2 und Myc-OAIFL in HEK 293-Zellen transfiziert. Zellextrakte wurden präpariert und die Immunpräzipitation durchgeführt (siehe Methoden, Kapitel 3.15.6 und 3.16.2).

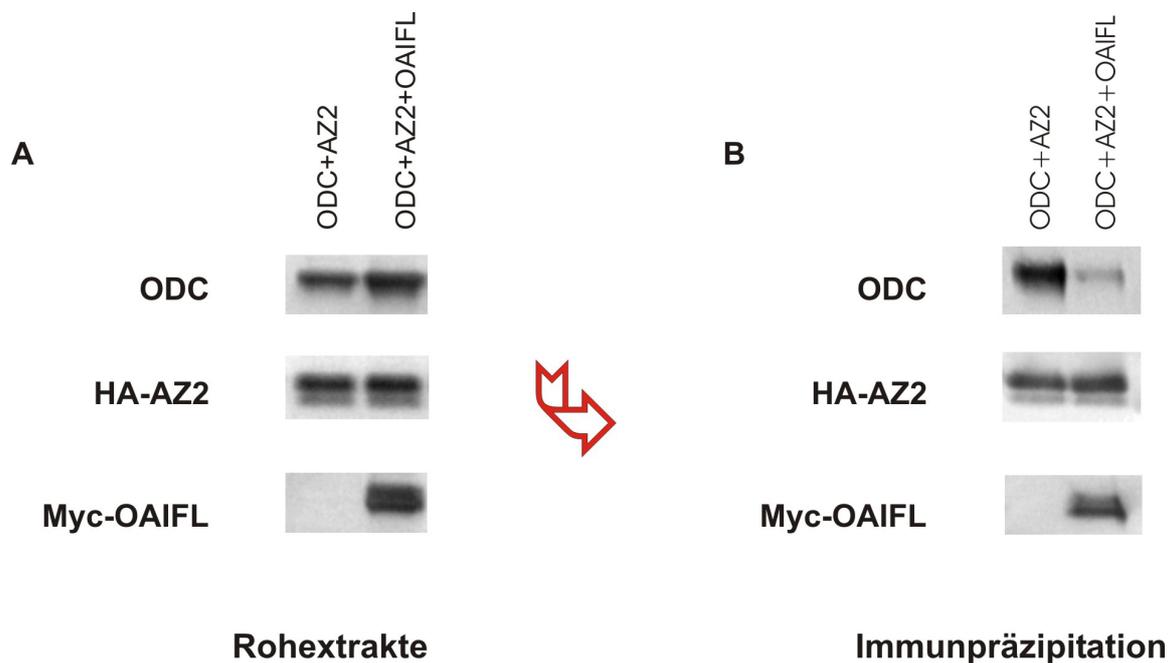


Abbildung 4.34: **Immunpräzipitation mit Antizym 2**

ODC wurde zusammen mit HA-Antizym 2 oder in Kombination mit HA-Antizym 2 und Myc-OAIFL in HEK 293-Zellen transfiziert. (A) Nachweis der Proteine im Rohextrakt, (B) Nachweis der Proteine nach der Immunpräzipitation. Detektion mit anti-HA-Antikörper, Peroxidase-konjugiert (monoklonal Klon 3F10), mit anti-Myc-Antikörper, Peroxidase-konjugiert (Maus, Klon 9E10), oder mit anti-ODC-Antikörper (Kaninchen, polyklonal) und einem sekundären Peroxidase-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper. Die Signaldetektion erfolgte mit ECL Plus.

Wie aus Abbildung 4.34 ersichtlich, werden ODC und Antizym 2 im Rohextrakt gleich stark exprimiert, unanhängig davon, ob Antizym-Inhibitor (OAIFL) koexprimiert wird. Die Immunpräzipitation zeigt, daß ODC an die Antizym-Affinitätsmatrix bindet. Dieses Signal verschwindet jedoch fast vollständig, wenn im Extrakt neben ODC auch Antizym-Inhibitor vorhanden ist. Statt ODC bindet nun Antizym-Inhibitor an die Antizym-Affinitätsmatrix. Die Menge an gebundenem Antizym bleibt dabei unverändert. Dies beweist, daß Antizym-Inhibitor ODC aus dem Komplex mit Antizym 2 verdrängt und stattdessen selbst einen Komplex mit Antizym bildet. Diese Ergebnisse bestätigen die zuvor in Hefe gewonnenen Daten und zeigen, daß sich die mit Hefe erzielten Erkenntnisse für das System aus ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor auch auf das Säugersystem übertragen lassen.

Zusätzliche Versuche ergaben, daß wie erwartet auch Antizym 1 und Antizym 3 in der Lage waren, im Rahmen einer Immunpräzipitation an ODC zu binden (Daten nicht gezeigt).

4.8 Ein Screen für ODC-Inhibitoren

Wie in Kapitel 4.6.1 beschrieben, konnte humane ODC die *spe1*-Deletion in der Hefe komplementieren. Dies ermöglichte es, diesen genetisch modifizierten Hefestamm für einen ODC-Inhibitor Screen einzusetzen. ODC ist ein anerkanntes Target auf dem Gebiet der Zellzyklusregulation und der Onkologie. So wurde z.B. eine erhöhte ODC-Aktivität in fast allen Tumorzellen festgestellt und die Überexpression von ODC kann zu neoplastischer Transformation führen (Auvinen *et al.*, 1997). Der existierende ODC-Inhibitor DFMO (Difluoromethylornithin) hat den Nachteil, daß die Substanz nur in sehr hohen millimolaren Konzentrationen wirksam ist. Bei dieser Substanz handelt es sich um einen spezifischen und irreversiblen Inhibitor der Ornithin-Decarboxylase. Die Substanz wird gegenwärtig als Therapeutikum zur Behandlung der afrikanischen Schlafkrankheit entwickelt, die durch *Trypanosoma brucei gambiense* ausgelöst wird. Durch die Hemmung der parasitären ODC wird unter anderem die Synthese des für Trypanosomen essentiellen Antioxidantiums Trypanothion verhindert (Augustyns *et al.*, 2001). Für den DFMO-Assay wurde der *spe1*-Deletionsstamm Y15034 mit p413GALL-hODC transformiert. Die Transformanden wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,05 in Polyamin-freiem Medium angeimpft. Dem Medium wurde DFMO (20 mM) oder DFMO (20 mM) + Putrescin (2,5 µM) zugesetzt und das Wachstum der Zellen mit dem normalen Wachstum in einem Polyamin-freien Medium verglichen.

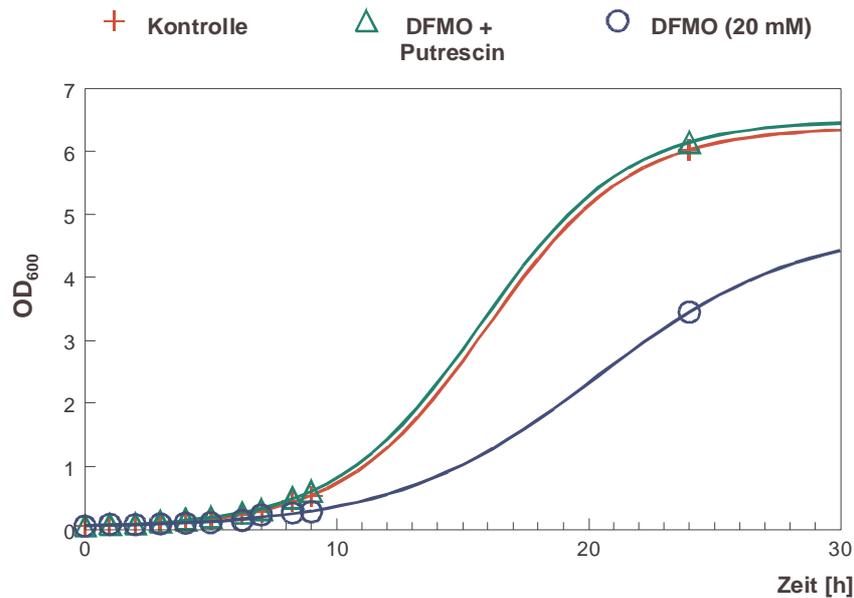


Abbildung 4.35: **DFMO-Assay**

Für den DFMO-Assay wurde der *spe1*-Deletionsstamm Y15034 mit dem Plasmid p413GALL-hODC transformiert. Die Transformanten wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,05 in Polyamin-freiem Medium angeimpft. Dem Medium wurde DFMO (20 mM) oder DFMO (20 mM) + Putrescin (2,5 µM) zugesetzt und das Wachstum der Zellen mit dem normalen Wachstum (Kontrolle) in einem Polyamin-freiem Medium verglichen.

Wie aus Abbildung 4.35 ersichtlich, wird das Hefezellwachstum durch DFMO gehemmt. Die Zellen wachsen in Gegenwart von DFMO deutlich schlechter als in normalem Polyamin-freiem Medium. Wird jedoch DFMO + Putrescin zugesetzt, so ist kein Unterschied mehr im Zellwachstum im Vergleich zur Kontrolle feststellbar. Dies bedeutet, daß es sich nicht um einen allgemein toxischen Effekt von DFMO auf Hefezellen handelt, sondern daß hier eine spezifische Hemmung der ODC vorliegt. Hierdurch entsteht ein Putrescin-Mangel, der durch Zugabe von Putrescin im Medium wieder aufgehoben werden kann. Ein solcher nicht-radioaktiver Assay ist für das Hochdurchsatzscreening (HTS) geeignet, er ist einfach zu handhaben und kostengünstig. Da auch die Proteine Antizym und Antizym-Inhibitor funktionell in der Hefe exprimiert werden können, läßt sich mit diesem Ansatz auch ein Screen für Effektoren von Antizym und Antizym-Inhibitor durchführen. Dies ist besonders interessant im Hinblick darauf, daß Antizyme auch den Transport von Polyaminen über die Zellmembran reguliert. Ein Aktivator für Antizym, hierbei könnte es sich beispielsweise auch um einen Inhibitor von Antizym-Inhibitor handeln, würde somit nicht nur die ODC-Aktivität direkt hemmen, sondern auch die Aufnahme von Polyaminen aus der Umgebung blockieren.

5 Diskussion

Die Mehrheit der zur Zeit verwendeten Pharmaka sind molekulare Agonisten oder Antagonisten ihrer Zielproteine. Aus diesem Grund ist die Identifizierung von spezifischen Liganden für die entsprechenden Enzyme oder Rezeptoren eine grundlegende Voraussetzung für die Medikamentenentwicklung. Molekulare Liganden üben ihren Effekt meist durch eine nichtkovalente Interaktion mit dem spezifischen Zielprotein aus und blockieren so die Funktion dieses Gens auf Proteinebene. Aufgrund dieser Eigenschaft sind molekulare Liganden sehr wertvoll für die Aufklärung von Regulationsmechanismen vieler zellulärer Prozesse, angefangen von der Transkription bis hin zur Signaltransduktion. Der Einsatz der Kombinatorik in der Chemie schafft innerhalb kürzester Zeit Millionen neuer Substanzen mit verschiedenen chemischen Strukturen. Zusätzlich sind durch die Identifizierung des humanen Genoms sowie durch weitere Genomprojekte, die cDNA-Sequenzen der meisten Gene zugänglich. Diese Fortschritte sowohl auf chemischer wie auch auf biologischer Ebene haben in den letzten Jahren zu einem massiven Wissenszuwachs geführt und verstärken das Bedürfnis nach einfachen und schnellen Methoden zur Identifikation von Ligand / Rezeptor-Interaktionen.

Der klassische Ansatz zur Entdeckung von Ligand / Rezeptor-Interaktionen beruht in erster Linie auf biochemischen *in vitro* Methoden wie radioaktiven Liganden-Bindungsstudien, Affinitätschromatographie und Photoaffinitätsmarkierung. Diese Methoden verlangen jedoch die Anreicherung und Aufreinigung ausreichender Mengen eines Rezeptors aus einer komplexen Mischung zellulärer Proteine. Das Protein muß anschließend sequenziert und die entsprechende cDNA kloniert werden. Auch für klassische *in vitro* Verfahren, bei denen es um die Identifizierung von Substanzen geht, die die Aktivität eines bekannten Zielproteins hemmen, muß dieses Protein zunächst exprimiert und in ausreichender Menge aufgereinigt werden. Nicht alle Leitstrukturen, die in einem *in vitro* Ansatz identifiziert werden, erweisen sich später als geeignet für die Medikamentenentwicklung. Dies kann durch eine fehlende Zellpermeabilität, mangelnde Stabilität innerhalb der Zelle, oder aufgrund ihrer Toxizität begründet sein. Daher ist die Entwicklung des Hefe-3-Hybrid-Systems ein wichtiger Schritt für die schnelle Aufdeckung von Ligand-Protein-Interaktionen *in vivo*.

5.1 Das Hefe-3-Hybrid-System

5.1.1 Möglichkeiten und Einschränkungen des Hefe-3-Hybrid-Systems

Das von (Licitra and Liu, 1996) entwickelte Hefe-3-Hybrid-System stellt eine Weiterentwicklung des klassischen 2-Hybrid-Systems von (Fields and Song, 1989) dar. Das Hefe-3-Hybrid-System ist dabei nicht auf die Identifizierung unbekannter Rezeptoren für einen bekannten Liganden beschränkt. Das System läßt sich auch dazu verwenden, Rezeptordomänen oder Aminosäurepositionen zu identifizieren, die für eine Ligand / Rezeptor-Interaktion besonders wichtig sind. Analog hierzu können auch auf Molekülebene modifizierte Liganden getestet werden. Auf diese Weise können Strukturelemente eines chemischen Moleküls (Pharmakophore) identifiziert werden, die für die Interaktion mit dem Zielprotein essentiell sind. Ähnlich wie das 2-Hybrid-System kann das 3-Hybrid-System auch für einen reversen Ansatz verwendet werden. Bei dem reversen 2-Hybrid-System führt eine Protein / Protein-Interaktion zur Expression eines für die Hefe toxischen Produktes. Die Unterbrechung der Protein-Interaktion ermöglicht dagegen das Hefewachstum. Dies kann durch Mutation des Zielproteins, durch die Koexpression eines dritten Proteins oder durch ein chemisches Molekül, das die Interaktion verhindert, erzielt werden (Vidal *et al.*, 1996; Young *et al.*, 1998). Für das 3-Hybrid-System bedeutet dies, daß sich Verdrängungsstudien durchführen lassen. So können Moleküle identifiziert werden, die eine bestehende Ligand / Rezeptor-Interaktion unterbinden und die aufgrund dieser Eigenschaft in einem reversen Screen das Hefewachstum ermöglichen. Auf diese Weise können Leitstrukturen optimiert und spezifischere Liganden identifiziert werden. Alternativ kann der synthetische Hybridligand beibehalten und Mutationsanalysen für das Rezeptorprotein durchgeführt werden. Ein solches genetisches Testverfahren ermöglicht es, schnell diejenigen Aminosäuren zu identifizieren, die für die Interaktion mit dem Liganden besonders wichtig sind. Steht eine an Dexamethason gekoppelte Molekülbank zur Verfügung, so kann das 3-Hybrid-System außerdem für die Identifikation unbekannter molekularer Liganden für ein bekanntes Zielprotein genutzt werden. Aufgrund seiner Vielseitigkeit besitzt das Hefe-3-Hybrid-System somit viele Anwendungsmöglichkeiten gegenüber den traditionellen biochemischen Methoden.

Neben den beschriebenen Vorteilen besitzt das Hefe-3-Hybrid-System jedoch auch einige Einschränkungen. So können mit diesem 3-Hybrid-System gegenwärtig nur hochaffine Ligand / Rezeptor-Interaktionen mit einem K_D -Wert bis zu 10 nM untersucht werden (Griffith *et al.*, 2000). Dabei sollte berücksichtigt werden, daß bei dem Hefe-3-Hybrid-System zwei Ligand / Protein-Interaktionen stattfinden müssen im Vergleich zu einer einzigen Protein / Protein-Interaktion bei einem normalen Hefe-2-Hybrid-Assay. Problematisch ist auch, daß unter Screeningbedingungen nicht nur Interaktoren für den Molekülliganden sondern auch solche Proteine isoliert werden, die direkt mit dem LexA -

Glukokorticoidrezeptorprotein interagieren (Griffith *et al.*, 2000). Da eine solche 2-Hybrid-Interaktion einen stärkeren Wachstumsphänotyp besitzt als die gewünschte 3-Hybrid-Interaktion, ist der Hintergrund von unspezifisch wachsenden Klonen relativ hoch. Es ist deshalb besonders wichtig, entsprechende Sekundärassays durchzuführen, um zu klären, ob die Interaktion tatsächlich Liganden-abhängig ist (siehe Ergebnisse, Kapitel 4.2.1).

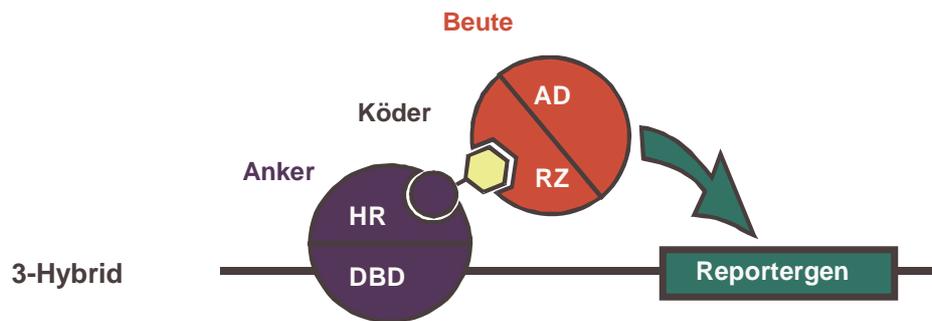


Abbildung 5.1: Das Hefe-3-Hybrid-System

Das 3-Hybrid-System der Hefe basiert auf dem Hormon Dexamethason als festem Bestandteil des synthetischen Hybridmoleküls. Das Hormon wird über die Hormon-bindende Domäne (HR) des Glukokorticoidrezeptors der Ratte in der Zelle verankert und ist kovalent mit einem Liganden X (gelb) verknüpft, für den der Rezeptor (RZ) gesucht wird. Die Hormon-bindende Domäne des Glukokorticoidrezeptors ist mit einer DNA-bindenden Domäne (DBD) verknüpft, der gesuchte Rezeptor ist mit einer Aktivierungsdomäne (AD) verknüpft.

Um die 3-Hybrid-Methode insgesamt effizienter zu gestalten, sollten Verbesserungen vorgenommen werden, die die Anzahl der unspezifischen 2-Hybrid-Interaktionen reduzieren. Steroidhormonrezeptoren haben generell den Nachteil, daß sie in der Zelle mit einer Vielzahl von Proteinen interagieren (z.B. HSP90, HSP70) und Proteinkomplexe bilden (Pratt and Toft, 1997). Wird der Rezeptor in der Hefe exprimiert, so bindet das endogene Hefe-HSP90 (HSP82) zusammen mit den dazugehörigen Hefe-Cyclophilinen Cpr6 und Cpr7 an den Rezeptor (Mayr *et al.*, 2000). Für das System aus Steroidhormon und Hormonrezeptor ist daher der Hintergrund an unerwünschten Protein/Protein-Interaktionen sehr hoch. Problematisch ist auch die schwache Interaktion der Steroidhormone an den Glukokorticoidrezeptor in der Hefe. *In vitro* Bindungsstudien haben gezeigt, daß Dexamethason eine wesentlich geringere Affinität für den Glukokorticoidrezeptor hat, wenn dieser in der Hefe exprimiert wird (Garabedian and Yamamoto, 1992). Um das Hefe-3-Hybrid-System sensitiver zu gestalten, sollte daher in Betracht gezogen werden, den festen Bestandteil dieses Systems aus Glukokorticoidrezeptor und Dexamethason durch eine andere Interaktion zu ersetzen. Ein solches Paar sollte idealerweise aus einem kleinen, in der Hefe gut exprimierbaren Protein und einem hochaffinen Liganden bestehen. Die Struktur des Liganden sollte nicht zu komplex sein, damit chemische Kopplungen problemlos möglich sind.

5.1.2 Worauf ist bei der Durchführung des Hefe-3-Hybrid-Systems zu achten?

Für die erfolgreiche Durchführung des Hefe-3-Hybrid-Systems müssen einige grundlegende Aspekte berücksichtigt werden, wie z.B. die Aktivität des synthetischen Hybridmoleküls. Es sollte überprüft werden, ob der synthetisierte Hybridligand verglichen mit dem ungekoppelten Liganden seine biologische Aktivität in dem ursprünglichen Assay beibehält. Auch wenn Strukturdaten vermuten lassen, daß der Hybridligand theoretisch aktiv ist, sollte unbedingt überprüft werden, ob die Kopplung an Dexamethason nicht die *in vivo* Aktivität beseitigt. Eine geringfügige Abnahme der Aktivität ist tolerierbar, aber Ligand / Rezeptor-Interaktionen mit Dissoziationskonstanten über 10 nM können mit dem gegenwärtigen System nicht detektiert werden.

Ein weiterer Aspekt ist die Stabilität des Hybridliganden im Hefemedium. So wurde beispielsweise festgestellt, daß Dexamethason-FK506 in normalem Hefemedium relativ instabil ist (Griffith *et al.*, 2000). Eine Verbesserung wurde erzielt, wenn der pH-Wert der Hefeplatte mit Phosphatpuffer auf pH 6,5 eingestellt wurde. Verschiedene Hybridliganden besitzen in der Regel eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber sauren oder basischen Bedingungen. Aus diesem Grund sollte die Stabilität des Hybridliganden in flüssigem Hefemedium beispielsweise durch HPLC oder andere, vergleichbare Methoden überprüft werden.

Darüber hinaus sollte immer getestet werden, ob der verwendete Hybridligand in der Lage ist, in die Hefezelle zu gelangen. Präzise Regeln für die Permeabilität von kleinen Molekülen in Hefe existieren leider nicht. Allgemein läßt sich sagen, daß kleine, eher hydrophobe Substanzen die Zellmembran besser passieren, trotzdem können auch kleine hydrophobe Substanzen nicht membrangängig sein. Die Membrangängigkeit eines Hybridliganden kann durch Kompetitionsstudien überprüft werden. Dabei wird getestet, ob das synthetische Hybridmolekül in der Lage ist, eine bekannte Interaktion, wie beispielsweise die Interaktion von Dex-FK506 mit FKBP12, zu unterbinden. Für ein unbekanntes Molekül sollte dies immer geklärt werden.

Um das Hefe-3-Hybrid-System sensitiver zu gestalten, sollte außerdem die Zellmembran für chemische Moleküle permeabler gemacht werden. Ein erster Schritt hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit mit der Deletion des ABC-Transporters PDR5 in dem Hefe-3-Hybrid-Stamm EGY48 gemacht (Kapitel 4.1.6). Im Vergleich zum Wildtypstamm war im PDR5-Deletionsstamm die Aktivierbarkeit des Glukokorticoidezeptors durch Steroidhormone um den Faktor 10 stärker (Kapitel 4.1.7). Dabei konnte gezeigt werden, daß nicht nur das freie Steroidhormon, sondern auch an Dexamethason gekoppelte Moleküle wie z.B. Dex-Linker durch diesen Transporter transportiert werden. Da in der Hefe mehrere Transporter mit unterschiedlicher Substrataffinität existieren, wäre es sinnvoll zusätzlich zu PDR5 noch weitere Transporter zu deletieren.

Darüber hinaus ist auch die Qualität sowie die Auswahl der verwendeten cDNA-Banken äußerst wichtig. Es sollte das für die Anwendung geeignete cDNA-Material ausgewählt werden. Ist unklar, in welchem Gewebe die erwartete Ligand / Rezeptor-Interaktion stattfindet, sollte eine normalisierte cDNA-Bank, die alle Gewebe repräsentiert, verwendet werden.

Alternativen zu dem Hefe-3-Hybrid-System

Da das Hefe-3-Hybrid-System einige Einschränkungen besitzt, sollten auch andere Methoden, die eine schnelle *in vivo* Ligand / Rezeptor-Interaktion erlauben, in Betracht gezogen werden. In der Literatur sind hierzu sogenannte Proteinsensoren beschrieben. Sie basieren auf der Beobachtung, daß die Bindung eines Liganden zur Stabilisierung einer Proteindomäne führt, die sich in Folge auf angrenzende Proteindomänen überträgt. So können Hybridproteine, die GFP oder das Enzym Dihydrofolat Reduktase enthalten, durch die Bindung eines Liganden stabilisiert werden (Tucker and Fields, 2001; Baird *et al.*, 1999). Für die Dihydrofolat-Reduktase sieht das wie folgt aus: das Enzym kann in zwei Fragmente unterteilt werden, die wieder ein aktives Enzym bilden, wenn sie in räumliche Nähe zueinander gebracht werden. In der Hefe ist die Deletion der Dihydrofolat Reduktase lethal. Das fehlende Enzym kann durch die DHFR der Maus funktionell komplementiert werden. Es wurden nun Insertionen (z.B. FKBP12 oder die Hormon-bindende Domäne des Östrogenrezeptors) in die DHFR der Maus eingefügt, die zu einer temperatursensitiven Destabilisierung der DHFR bei 38,5°C führen (Tucker and Fields, 2001). Nach Zugabe eines Liganden, der für das Insert spezifisch ist (FK506 oder Östrogen) wird das Hybridenzym stabilisiert und die Hefezellen wachsen besser. Dieser Wachstumphänotyp ist generell aber sehr schwach. So wurde für den hochaffinen Liganden FK506 nach 38h eine Verdopplung der OD₆₀₀ von 0,1 auf 0,2 beobachtet. Die Autoren schlagen vor, daß anstelle von FKBP12 auch eine cDNA-Bank in die DHFR eingefügt werden kann, um so für einen bekannten Liganden den unbekanntem Rezeptor zu identifizieren. Allerdings führt nicht jede Insertion zu der gewünschten Liganden-abhängigen Destabilisierung. In diesem Zusammenhang wurde diskutiert, daß letztendlich nur eine zusätzliche Mutation innerhalb des FKBP12-Inserts die gewünschte Destabilisierung der DHFR bewirkt. Ein Vorteil dieses Systems besteht darin, daß der Ligand nicht modifiziert werden muß, sondern ungekoppelt getestet werden kann. Problematisch ist jedoch, daß auch Substanzen, die nicht an den Rezeptor binden, sondern die DHFR selbst stabilisieren, ein falsch-positives Signal ergeben. Da auch dieses System einige gravierende Einschränkungen besitzt und ebenfalls nur für hochaffine Liganden geeignet ist, stellt es im Moment keine Alternative zu dem gegenwärtigen Hefe-3-Hybrid-System dar.

5.1.3 Optimierung des Hefe-3-Hybrid Systems: die Hormonbindungsdomäne des Glukokorticoidezeptors

Für das Hefe-3-Hybrid-System wurde der C-terminale Bereich des Glukokorticoidezeptors der Ratte von Glycin⁵²⁵ bis Lysin⁷⁹⁵ verwendet. Er umfaßt die Transaktivierungs-Domäne 2 (Valin⁵²⁶ bis Glutamat⁵⁵⁵), die Hormonbindungsdomäne (Prolin⁵⁴⁰ bis Lysin⁷⁹⁵) und eine HSP90-Kontaktregion (Serin⁵⁶⁸ bis Valin⁶¹⁶). Bislang konnte nicht geklärt werden, ob, wie von (Miesfeld *et al.*, 1986) publiziert, Leucin an Position 600 und 602 der Hormonbindungsdomäne die Wildtypsequenz darstellt, oder ob Prolin und Phenylalanin hier korrekt sind. Um die Interaktion zwischen der Hormonbindungsdomäne des Glukokorticoidezeptors und dem Dexamethason-Anteil des Hybridliganden zu optimieren, wurden darüber hinaus zwei von (Licitra and Liu, 1996) beschriebene Mutationen eingefügt. Die Punktmutation Cystein⁶⁵⁶ zu Glycin erhöht die Affinität von Dexamethason für die Hormonbindungsdomäne (Chakraborti *et al.*, 1991). Die Mutation von Phenylalanin⁶²⁰ zu Serin steigert die Aktivierbarkeit des Glukokorticoidezeptors in Hefe (Garabedian and Yamamoto, 1992).

Die in Kapitel 4.1.5 und 4.1.8 gezeigten Ergebnisse lassen darauf schließen, daß neben den von (Licitra and Liu, 1996) beschriebenen Mutationen die Aminosäurepositionen 600 und 602 für die Aktivierbarkeit des Glukokorticoidezeptors äußerst wichtig sind. Im Transkriptionsassay Kapitel 4.1.5 wurde gezeigt, daß neben den Konstrukten vom Typ II (Pro⁶⁰⁰, Phe⁶⁰², Ser⁶²⁰ und Gly⁶⁵⁶) auch die Konstrukte vom Typ I bei einer hohen Hormonkonzentration (10 µM Dexamethason) eine Aktivität im β-Galaktosidasetest zeigen. Die Konstrukte vom Typ I besitzen nicht die von (Licitra and Liu, 1996) beschriebenen Mutationen Phenylalanin⁶²⁰ zu Serin und Cystein⁶⁵⁶ zu Glycin, haben aber an Position 600 ein Prolin und an Position 602 ein Phenylalanin. Konstrukte vom Typ IV zeigen bei dieser Hormonkonzentration keine Aktivität, obwohl sie die von (Licitra and Liu, 1996) beschriebenen Mutationen Phenylalanin⁶²⁰ zu Serin und Cystein⁶⁵⁶ zu Glycin haben. An Position 600 und 602 tragen sie jedoch ein Leucin. Dies bedeutet, daß die Aminosäurepositionen 600 und 602 insbesondere für die Interaktion von Dexamethason mit dem Glukokorticoidezeptor wichtiger sind als die publizierten Positionen 620 und 656. Kombiniert man alle vier Mutationen miteinander, wie dies bei Typ II der Fall ist, so erzielt man einen additiven Effekt und die Aktivierbarkeit des Rezeptors wird insgesamt stark verbessert. Für das Hefe-3-Hybrid-System wurde deshalb diese Variante des Glukokorticoidezeptors verwendet. Interessanterweise liegen die Aminosäurepositionen 600 und 602 in einer Region, die als HSP90-Kontaktregion beschrieben wurde (Howard *et al.*, 1990). Die Interaktion mit HSP90 ist für die Funktionalität des Rezeptors essentiell. Der Glukokorticoidezeptor muß mit dem HSP90-Komplex interagieren, damit eine Konformationsänderung eintritt, die es dem Rezeptor ermöglicht, das Steroidhormon zu binden (Pratt and Toft, 1997). Wird der Rezeptor in der Hefe exprimiert, so bindet das

endogene Hefe-HSP90 (HSP82) an den Rezeptor und ermöglicht so die Aktivierbarkeit in Hefe (Mayr *et al.*, 2000). Welchen Beitrag die Aminosäureposition 600 oder 602 im einzelnen zur Aktivierbarkeit des Rezeptors beitragen und ob diese Positionen besonders für die Aktivierbarkeit des Glukokortikoidrezeptors in der Hefe eine Rolle spielen, sollte in zukünftigen Experimenten geklärt werden.

5.2 FK506 und die physiologische Rolle der FKBP

5.2.1 Der Wirkmechanismus von FK506 und die physiologische Rolle von FKBP12

Für den 3-Hybrid-Screen wurde das Makrolid-Antibiotikum FK506 als Ligand verwendet. FK506 ist eine immunsuppressive Substanz, die mit hoher Affinität an eine Klasse von Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerasen (PPIasen) bindet, die dementsprechend als FK506-bindende Proteine (FKBPs) bezeichnet werden. Der Name der einzelnen FKBP entspricht ihrem Molekulargewicht. Der Komplex aus FK506 und FKBP12 bindet die Phosphatase Calcineurin und hemmt deren Aktivität (Liu *et al.*, 1991). Weder FKBP12 noch FK506 können allein an Calcineurin binden. Zu den Zielmolekülen von Calcineurin zählt unter anderem auch der Transkriptionsfaktor NF-AT („nuclear factor of activated T-cells“), der die Expression der Cytokine IL-2 und IL-4 reguliert. Hierauf wird die immunsuppressive Eigenschaft von FK506 begründet (Crabtree, 1999). Außer FKBP12 hat auch FKBP12.6 eine starke Affinität für FK506 und hemmt Calcineurin (Lam *et al.*, 1995). Zusätzlich zu seiner immunsuppressiven Wirkung hemmt FK506 auch die Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerase-Aktivität der FKBP. Diese beiden Mechanismen sind jedoch voneinander unabhängig. So wurden FK506-Derivate beschrieben, die die Rotamase-Aktivität von FKBP12 hemmen, ohne selbst immunsuppressiv zu sein (Dumont *et al.*, 1992).

Über die physiologische Rolle von FKBP12 ist bekannt, daß das Protein eine Komponente von intrazellulären Kanälen und Rezeptoren ist (siehe Abbildung 5.2). So bindet FKBP12 an Ca^{2+} -Kanäle des sarkoplasmatischen Retikulums wie z.B. den Ryanodin-Rezeptor und den 1,4,5-Trisphosphat Rezeptor (IP_3R) (Jayaraman *et al.*, 1992; Cameron *et al.*, 1997) und reguliert deren Aktivität. Die Interaktion von FKBP12 mit diesen Kanälen wird durch FK506 unterbunden. FKBP12-defiziente Mäuse haben dementsprechend Herzmuskel-Defekte und eine gestörte Ryanodin-Rezeptorfunktion (Shou *et al.*, 1998). Interessanterweise wird die Aktivität des Ryanodin-Rezeptors auch durch Spermin reguliert (Uehara *et al.*, 1996).

FKBP12 bindet außerdem an die zytoplasmatische Domäne des TGF β -Rezeptors Typ I (Aghdasi *et al.*, 2001). Diese Interaktion wird ebenfalls durch FK506 unterbrochen (Okadome *et al.*, 1996). Da FKBP12 normalerweise einen hemmenden Einfluß auf den TGF β -Rezeptor

hat, führt der Fehlen der Hemmung zu einem verstärkten TGF β -Signal und damit verbunden zu einer Wachstumshemmung. So konnte gezeigt werden, daß Fibroblasten von FKBP12-defizienten Mäusen ein verlangsamtes Wachstum und einen Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase aufweisen (Aghdasi *et al.*, 2001).

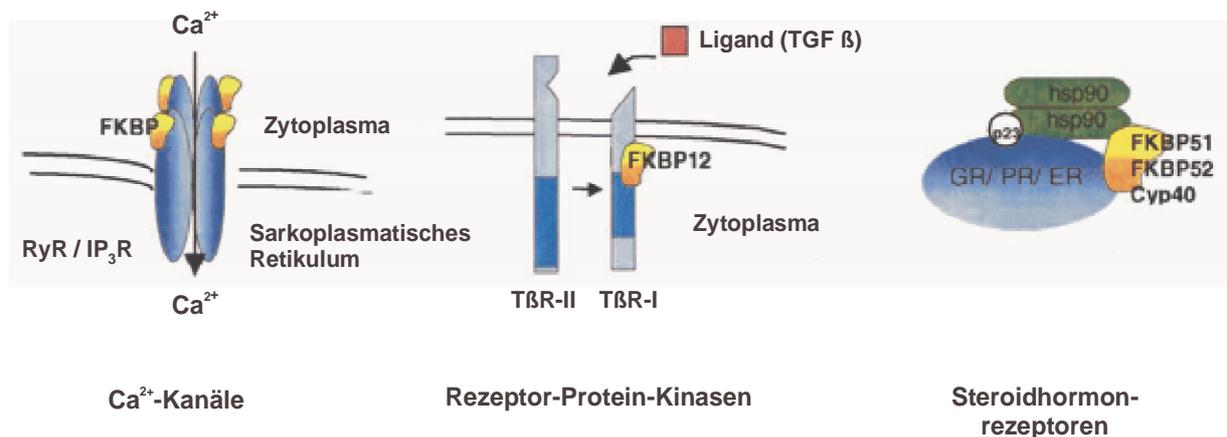


Abbildung 5.2: **Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerasen als Komponenten von Rezeptorkomplexen**

Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerasen sind Bestandteile von Ca²⁺-Kanälen, von Rezeptor Protein Kinasen und von Steroidhormonrezeptoren. Im Falle des Ryanodin-Rezeptors bindet jeweils ein Molekül FKBP12 pro Rezeptoruntereinheit. FKBP12 bindet außerdem an die zyttoplasmatische Domäne des TGF β -Rezeptors Typ I. FKBP51 und FKBP52 sind Bestandteile des HSP90-Steroidhormonrezeptor-Komplexes. (Modifiziert nach Schiene-Fischer and Yu, 2001).

Neben seiner immunsuppressiven Eigenschaft hat FK506 außerdem eine neurotrophe wie auch eine neuroprotektive Wirkung. Diese scheint jedoch unabhängig von FKBP12 und Calcineurin zu sein, da auch FK506-Derivate, die nicht immunsuppressiv sind, noch neurotroph wirken (Steiner *et al.*, 1997). Darüber hinaus können Hippocampus-Zellen von FKBP12-defizienten Mäusen durch FK506 im Wachstum stimuliert werden (Gold *et al.*, 1999). Für diese Eigenschaft von FK506 wird das Immunosuppressivum FKBP52 verantwortlich gemacht, das Bestandteil des Steroidhormonrezeptor-Komplexes ist (Gold *et al.*, 1999). Wie dieser Wirkmechanismus genau aussieht, ist jedoch noch nicht geklärt.

Zusammenfassend zeigt dies, daß FK506 in eine Vielzahl von zellulären Prozessen eingreift, die über die Hemmung von Calcineurin hinausgehen. Andere Substanzen, die ebenfalls immunsuppressiv wirken, haben zum Teil völlig andere Wirkmechanismen und Molekularstrukturen. Beispielhaft hierfür sollen die beiden Immunsuppressiva Rapamycin und 15-Deoxyspergualin vorgestellt werden:

Die Wirkmechanismen anderer Immunsuppressiva

Das strukturell mit FK506 engverwandte Rapamycin bindet ebenfalls an FKBP12. Der Komplex aus Rapamycin und FKBP12 interagiert jedoch nicht mit Calcineurin, sondern bindet an die Seronin / Threonin-Kinase mTOR („mammalian target of rapamycin“) (Sabers *et al.*, 1995). Hierdurch wird die Hyperphosphorylierung der an der an der Regulation der Translation beteiligten 4E-BPs („eIF4E – binding proteins“) verhindert und die Proteinbiosynthese gehemmt. Die Hyperphosphorylierung der 4E-BPs führt normalerweise zur Dissoziation dieser Faktoren von dem Initiationsfaktor eIF-4E und zur Stimulierung der „cap“-abhängigen Translation (Raught *et al.*, 2001). Es ist bekannt, daß Rapamycin auf diese Weise insbesondere die „cap-abhängige“ Translation der ODC hemmt. Interessanterweise führt eine Überexpression von eIF-4E bei NIH-3T3 Zellen zu einer erhöhten ODC-Aktivität, die mit einer neoplastischen Transformation einhergeht (Lazaris-Karatzas *et al.*, 1990). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, daß die Expression einer dominant-negativen ODC-Mutante die eIF-4E induzierte Zelltransformation verhindert (Shantz *et al.*, 1996).

Das Immunsuppressivum 15-Deoxyspergualin (DSG, Gusperimus) ist das synthetische Analogon des Antibiotikums Spergualin, das aus *Bacillus laterosporus* isoliert wurde (Nadler *et al.*, 1992). Interessanterweise ist 15-Deoxyspergualin strukturell mit Spermidin verwandt (siehe Abbildung 5.3).

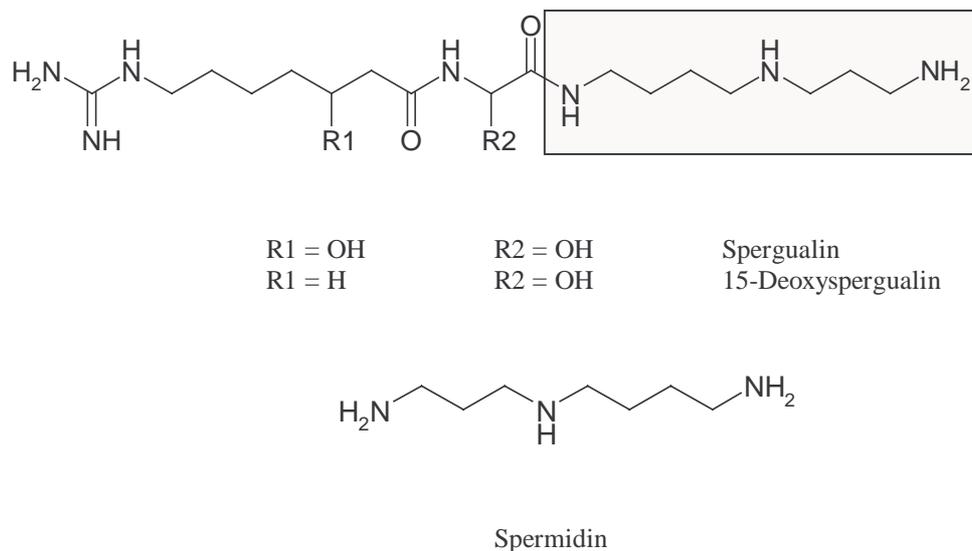


Abbildung 5.3: Die Molekularstrukturen von Spergualin, 15-Deoxyspergualin und von Spermidin

Die schematische Abbildung zeigt die Molekularstruktur von Spergualin, 15-Deoxyspergualin und von Spermidin. Der Spermidin-Anteil von Spergualin und 15-Deoxyspergualin ist durch einen Rahmen markiert.

Die Substanz wurde ursprünglich für die Krebstherapie entwickelt, da sie das Wachstum verschiedener Tumorzelllinien hemmt. 15-Deoxyspergualin besitzt jedoch auch eine starke immunsuppressive Wirkung und zeigt auch eine *in vivo* Aktivität bei verschiedenen Tiermodellen für die Organtransplantation sowie bei Autoimmunerkrankungen. Die immunsuppressive Eigenschaft ist mit der von Rapamycin und FK506 vergleichbar. Der Wirkmechanismus von DGS ist aber weitgehend unbekannt, eine Hemmung von Calcineurin oder mTOR liegt nicht vor. Bisher wurde gezeigt, daß DSG *in vitro* an die Hitzeschockproteine Hsc70 und HSP90 bindet (Nadler *et al.*, 1992; Nadeau *et al.*, 1994). Darüber hinaus wurde festgestellt, daß DSG *in vitro* einige Enzyme der Polyaminbiosynthese wie die Spermin Synthase, die Spermidin Synthase und die Polyamin Oxidase hemmt. Es wurde außerdem beobachtet, daß in DSG-behandelten Zellen sowohl die Polyaminkonzentrationen als auch die ODC-Aktivität erniedrigt sind (Hibasami *et al.*, 1991).

5.2.2 Warum wurden außer FKBP12 keine anderen FKBP's im Hefe-3-Hybrid-System gefunden?

Im Rahmen des Hefe-3-Hybrid Systems wurde von allen Mitgliedern der FKBP-Familie nur FKBP12 als Interaktor für FK506 gefunden, obwohl es sich bei den FKBP's um eine große Proteinfamilie handelt. Von allen Immunophilinen hat FKBP12 die höchste Affinität für FK506 ($K_D = 0,4 \text{ nM}$) (Lane *et al.*, 1991). Neben FKBP12 hat auch FKBP12.6 eine starke Affinität für FK506 (Lam *et al.*, 1995). Dieses Immunophilin wird jedoch wesentlich schwächer exprimiert als FKBP12. Die anderen, weniger gut charakterisierten Immunophiline FKBP13, FKBP25, FKBP60 und FKBP65 binden FK506 mit einer wesentlich geringeren Affinität als FKBP12 und sind nicht an der Hemmung von Calcineurin beteiligt (Galat *et al.*, 1992; Coss *et al.*, 1995; Shadidy *et al.*, 1999). FKBP51 und FKBP52 (auch bezeichnet als FKBP59 oder HSP56) sind Bestandteile des HSP90-Steroidhormonrezeptor-Komplexes (Nair *et al.*, 1997; Peattie *et al.*, 1992) und binden FK506 ebenfalls mit einer geringeren Affinität als FKBP12. Wie bereits erwähnt, können mit dem gegenwärtigen Hefe-3-Hybrid-System nur hochaffine Ligand / Rezeptor-Interaktionen mit einem K_D -Wert bis zu 10 nM nachgewiesen werden. Dies zusammen erklärt, warum in dem durchgeführten 3-Hybrid-Screen von allen Mitgliedern der FKBP-Familie nur FKBP12 isoliert wurde. Dabei sollte außerdem berücksichtigt werden, daß es auch in der Hefe FK506-bindende Proteine gibt, die um die FK506-Bindungsstelle des synthetischen Liganden konkurrieren. Bisher wurden in der Hefe vier FKBP's identifiziert. FPR1 ist das Homolog zu FKBP12, darüber hinaus gibt es FPR2, das zu dem humanen FKBP13 homolog ist sowie FPR3 und 4, die zu FKBP25 homolog sind (Dolinski *et al.*, 1997).

5.3 Regulationsmechanismen der ODC-Aktivität

5.3.1 FK506 beeinflusst die ODC-Aktivität

In der Literatur finden sich Hinweise darauf, daß FK506 unter bestimmten Versuchsbedingungen die ODC-Aktivität hemmt. Hierbei scheint es einen Unterschied zwischen dem Einfluß von FK506 auf die transiente Induktion der ODC-Aktivität und dem langfristigen antiproliferativen Einfluß von FK506 zu geben. So wurden intestinale IEC-6 Zellen für 24h unter Serumangel kultiviert und dann entweder Rapamycin oder FK506 hinzugefügt (Seidel and Ragan, 1997). Anschließend wurde mit Serum stimuliert und die ODC-Aktivität gemessen. Rapamycin hemmt unter diesen Bedingungen den transienten Anstieg der ODC-Aktivität um 50%, FK506 tut dies nicht.

(Elitsur *et al.*, 1995) beschreiben dagegen einen hemmenden Einfluß von FK506 auf die ODC-Aktivität. Lamina Propria Lymphocyten wurden unter normalen Serumbedingungen für fünf Tage in Gegenwart von FK506 kultiviert. Dabei wurde beobachtet, daß in diesen Zellen die ODC-Aktivität durch FK506 gehemmt wird und FK506 insgesamt einen antiproliferativen Effekt hat. Auch durch die Zugabe von IL-1, IL-2 oder IL-6 konnte der antiproliferative Effekt von FK506 nicht aufgehoben werden. Übereinstimmend damit wurde von (Richter *et al.*, 1995) beschrieben, daß der antiproliferative Effekt von FK506 unabhängig von der Calcineurin-Inhibition ist. Calcineurin-Inhibitoren wie Cypermethrin oder Fenvalerat waren nicht in der Lage, in vergleichbarer Weise das Zellwachstum zu hemmen wie FK506. Von (Jiang *et al.*, 1993) wurde der potentiell hemmende Einfluß von FK506 auf Hauttumore untersucht. Hierfür wurde die Haut von Mäusen mit FK506 vorbehandelt und dann auf diese Stellen Phorbol-12-myristat-13-acetat (TPA) aufgetropft. Normalerweise induziert TPA einen Anstieg der epidermalen ODC-Aktivität (siehe Einleitung, Kapitel 1.3.1). In Gegenwart von FK506 wurde dies dosisabhängig verhindert. Zusammengefaßt läßt sich also sagen, daß FK506 antiproliferativ wirkt und unter bestimmten Bedingungen einen hemmenden Einfluß auf die ODC-Aktivität hat. Der molekulare Mechanismus dieser Hemmung ist jedoch noch nicht geklärt.

5.3.2 Die Interaktion von FK506 mit Antizym-Inhibitor

Neben FKBP12 wurde im Hefe-3-Hybrid-Screen eine Spleißvariante von Antizym-Inhibitor als neuer Interaktor für FK506 identifiziert. Diese bindet die immunsuppressive Substanz mit vergleichbarer Affinität wie FKBP12. Die Interaktion war FK506-spezifisch, da keine Interaktion mit Dexamethason-Linker oder anderen an Dexamethason gekoppelten Liganden nachzuweisen war. Wie in Kapitel 4.3.2 gezeigt, war die vollständige Form von Antizym-Inhibitor jedoch nicht in der Lage, an FK506 zu binden. Dies deutet darauf hin, daß der C-

Terminus von Antizym-Inhibitor diese Interaktionsstelle verdeckt bzw. eine Konformationsänderung bewirkt, die eine Interaktion nicht mehr möglich macht. Der N-terminale Bereich von Antizym-Inhibitor (Aminosäure 1-44) war für die Interaktion mit FK506 nicht von Bedeutung, da kein Unterschied zwischen der Spleißvariante und einer am N-Terminus verkürzten Form festgestellt werden konnte. Durch verschiedene Deletionsanalysen konnte die FK506-Bindungsstelle auf einen Bereich von Leucin⁴⁵ bis Serin³⁰⁰ eingegrenzt werden (siehe Ergebnisse, Kapitel 4.3.3). Interessanterweise überlappt dieser Bereich mit der Antizym-Bindungsstelle von Antizym-Inhibitor. Dies führte zu der Annahme, daß FK506 die Interaktion von Antizym mit der Spleißvariante von Antizym-Inhibitor unterbindet. Wie in Kapitel 4.5.5 gezeigt, ist FK506 tatsächlich in der Lage, diese Interaktion zu inhibieren. Da dieser Effekt spezifisch für die Spleißvariante war, handelt es sich nicht um einen generellen Effekt von FK506 auf Protein-Protein-Interaktionen. Die für diesen Effekt benötigte FK506-Konzentration ($\geq 25 \mu\text{M}$) war allerdings recht hoch. Dabei sollte jedoch berücksichtigt werden, daß die Interaktion von Antizym mit Antizym-Inhibitor extrem stark ist und auch etablierte 2-Hybrid-Interaktionen, wie die im Duplex-System mitgelieferte Positivkontrolle, bei weitem übertrifft. Es wurde außerdem mit Hilfe von biochemischen Methoden untersucht, ob sich die Interaktion von Antizym-Inhibitor und FK506 *in vitro* nachvollziehen läßt. Hierfür wurde FK506 über den entsprechenden Linker-Anteil an Biotin gekoppelt (Dr. Branislav Musicki, Aventis Pharma Frankreich). Aufgrund dieser Kopplung konnte FK506 an die Oberfläche eines Streptavidin-BIAcore-Chips immobilisiert werden. Für aufgereinigtes FKBP12 wurde eine starke Bindung an diese Affinitätsmatrix festgestellt. Für Antizym-Inhibitor war jedoch *in vitro* keine signifikante Bindung feststellbar. Dies könnte mehrere Gründe haben: Für die Protein-Aufreinigung mußte Antizym-Inhibitor mit einem GST-Tag versehen werden, der möglicherweise für die Interaktion mit FK506 störend war. Die proteolytische Entfernung dieses GST-Tags erwies sich als problematisch, da auch Antizym-Inhibitor durch Thrombin angegriffen wurde. Außerdem könnte *in vitro* eine molekulare Komponente fehlen, die für die Interaktion von FK506 mit Antizym-Inhibitor entscheidend ist. Darüber hinaus wurde beobachtet, daß Antizym-Inhibitor nur in konzentrierter Form aktiv ist (J. Nilsson, persönliche Mitteilung) und aufgrund wichtiger Cysteinreste in oxidativer Umgebung rasch an Aktivität verliert. Dies zusammen könnte erklären, warum bei *in vitro* Experimenten die Spleißvariante von Antizym-Inhibitor bislang nicht als Interaktionspartner für FK506 gefunden wurde.

5.3.3 Charakterisierung der alternativen Spleißformen von Antizym-Inhibitor

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Spleißvarianten von Antizym-Inhibitor identifiziert. Genomweite Analysen haben ergeben, daß 40-60% aller humanen Gene alternative

Spleißformen besitzen (Modrek and Lee, 2002). Dies bedeutet, daß alternatives Spleißen an der Regulation der Hälfte aller Gene beteiligt ist und einen großen Beitrag zur Komplexität des humanen Genoms beiträgt. Die Spleißvariante OAISP-1 stammt aus dem 3-Hybrid-Screen und ist am C-Terminus um 248 bp verkürzt. Bei der Spleißvariante OAISP-2 fehlt ein 135 bp großes Fragment aus dem mittleren Bereich (Val¹⁵¹ bis Lys¹⁹⁵) von Antizym-Inhibitor. Für die Spleißvariante OAISP-2 ergab die Sequenzierung, daß das Exon 4 fehlt, wobei das Leseraster der anschließenden Sequenzbereiche beibehalten wird. Für OAISP-1 ist die Situation komplexer. Hier liegen die Spleißstellen nicht an einem Exon / Intron-Übergang, sondern innerhalb von Exon 9 und 10, wodurch ein vorgezogenes Stoppkodon entsteht (Abbildung 4.17.1 und 4.17.2). Durch RT-PCR wurde gezeigt, daß beide Spleißvarianten ubiquitär exprimiert werden. Northern-Blot-Daten, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden sowie Daten aus anderen Veröffentlichungen weisen auf die Existenz mehrerer Antizym-Inhibitor-Transkripte hin. Fibroblasten der Maus zeigen in einem Antizym-Inhibitor Northern-Blot zwei Banden im Bereich von 4,5 kb und 2,8 kb (Nilsson *et al.*, 2000). Für humanes Lebergewebe wurden ebenfalls zwei Antizym-Inhibitor-Banden beschrieben (Koguchi *et al.*, 1997). Diese Beobachtungen, zusammen mit den hier vorgestellten Ergebnissen, lassen darauf schließen, daß für Antizym-Inhibitor Spezies-übergreifend mehrere Spleißvarianten existieren. Datenbankrecherchen ergaben außerdem, daß beide Spleißvarianten evolutionär konserviert sind, da auch Homologe in der Maus identifiziert wurden. Obwohl die Spleißvarianten nicht in der Lage waren, ODC aus dem Komplex mit Antizym freizusetzen, lassen die Ergebnisse vermuten, daß beide Formen eine physiologische Funktion besitzen, die noch nicht geklärt ist. Interessanterweise wurde kürzlich ein Protein beschrieben, daß 54% Identität zur ODC aufweist und 45% Identität zu Antizym-Inhibitor. Für dieses ODC-ähnliche Protein wurden insgesamt acht alternative Spleißformen mit unbekannter Funktion beschrieben (Pitkanen *et al.*, 2001). Es wäre daher denkbar, daß die physiologische Bedeutung der verschiedenen Antizym-Inhibitor-Spleißformen mit der Funktion dieses ODC-ähnlichen Proteins verknüpft ist. Wie bereits erwähnt, wurde in der Literatur beschrieben, daß Antizym-Inhibitor in der Lage ist, Dimere zu bilden (Kitani and Fujisawa, 1989). Es sollte daher in Zukunft auch untersucht werden, ob es Heterodimere aus der vollständigen Form von Antizym-Inhibitor und den Spleißvarianten gibt.

Modell eines Wirkmechanismus von FK506 und Antizym-Inhibitor

Wie bereits erwähnt, wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, daß eine Spleißvariante von Antizym-Inhibitor an FK506 bindet. Da Polyamine für die Zellproliferation und die Proteinbiosynthese essentiell sind und FK506 sowohl die Aktivität der ODC hemmt, als auch einen antiproliferativen Effekt besitzt, könnte die Interaktion von FK506 mit Antizym-

Inhibitor zu dem Wachstums-hemmenden Effekt von FK506 beitragen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die FK506-Bindungsdomäne mit dem Bereich der Antizym-Bindungsstelle von Antizym-Inhibitor überlappt. FK506 ist in der Lage, die Interaktion der Antizym-Inhibitor-Spleißvariante mit Antizym zu inhibieren. Dies führt zu einer Freisetzung von Antizym, das die ODC-Aktivität hemmt und eine antiproliferative und Tumor-hemmende Wirkung besitzt (Feith et al., 2001).

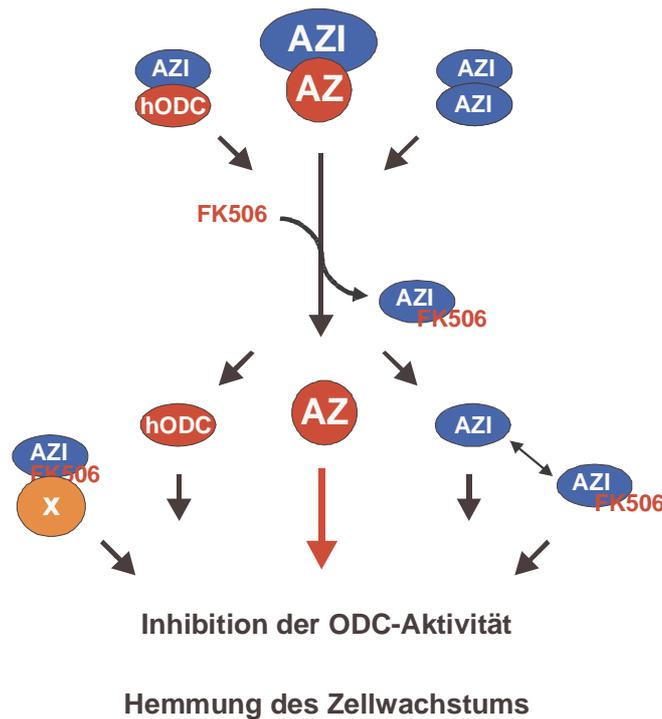


Abbildung 5.4: **Modell eines Wirkmechanismus von FK506 und Antizym-Inhibitor**

Die Spleißvariante von Antizym-Inhibitor ist als blaue Ellipse dargestellt (AZI), das ODC-ähnliche Protein ist als rote Ellipse dargestellt (hODC). Antizym (AZ) ist als roter Kreis markiert. FK506 setzt Antizym aus dem Komplex mit der Spleißvariante von Antizym-Inhibitor frei. Antizym hemmt die ODC-Aktivität und hat einen antiproliferativen Effekt. Darüber hinaus könnte FK506 aber auch die Dimerisierung sowie die Komplexbildung der Spleißvariante mit anderen Proteinen verhindern. Möglich wäre auch eine Komplexbildung aus FK506, der Spleißvariante von Antizym-Inhibitor und einem unbekanntem Protein X (orange dargestellt).

Es wäre außerdem denkbar, daß FK506 auch andere Protein-Protein-Interaktionen beeinflusst. Wie bereits erwähnt, bildet die vollständige Form von Antizym-Inhibitor Dimere (Kitani and Fujisawa, 1989). Zusätzlich wurde ein ODC-ähnliches Protein mit insgesamt acht alternativen Spleißformen beschrieben (Pitkanen et al., 2001). Im Gegensatz zur vollständigen Form, war die Spleißvariante nicht in der Lage, ODC aus dem Komplex mit Antizym freizusetzen. Die physiologische Bedeutung der FK506-bindenden Spleißvariante ist also noch nicht geklärt. Es wäre daher möglich, daß die physiologische Funktion der Antizym-Inhibitor-Spleißvariante

mit der Funktion dieses ODC-ähnlichen Proteins verknüpft ist. So könnten Heterodimere aus der vollständigen Form von Antizym-Inhibitor und der Spleißform, bzw. Heterodimere aus dem neuen ODC-ähnlichen Protein und Antizym-Inhibitor existieren. Unter diesen Umständen könnte FK506 diese Dimerisierung beeinflussen. Darüber hinaus wäre möglich, daß das ODC-ähnliche Protein ebenfalls an Antizym bindet und die Spleißform von Antizym-Inhibitor in der Lage ist, dieses Protein aus dem Komplex freizusetzen. Alternativ wäre auch denkbar, daß der Komplex aus FK506 und Antizym-Inhibitor an ein Protein X bindet, ähnlich wie dies bei Calcineurin der Fall ist und dieser Komplex letztendlich zu einer FK506-bedingten Wachstumshemmung beiträgt. Diese Überlegungen sind in der Abbildung 5.4 zusammengefaßt.

5.3.4 Charakterisierung der Antizym-Bindungsdomäne von Antizym-Inhibitor

Für Antizym-Inhibitor ist der Bereich, welcher für die Antizym-Bindung wichtig ist, bislang nicht charakterisiert. Aufgrund der großen Homologie zwischen ODC und Antizym-Inhibitor wurde der Schluß gezogen, daß der für die ODC / Antizym-Interaktion wichtige Bereich, auch die Antizym / Antizym-Inhibitor-Bindung bestimmt (Murakami et al., 1996). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Spleißvarianten von Antizym-Inhibitor identifiziert und auf ihre Bindung an die Proteine der Antizym-Familie hin untersucht. Darüber hinaus wurden sieben Antizym-Inhibitor-Fragmente hergestellt und ihre Bindung an die Antizyme 1 und 2 getestet. Aufgrund dieser Versuche konnte die Antizym-Bindungsdomäne von Antizym-Inhibitor charakterisiert werden. Für die ODC der Maus wurde gezeigt, daß die potentielle Antizym-Bindungsdomäne die Aminosäuren 117-140 umfaßt (Li and Coffino, 1992). Diese Erkenntnis beruht auf chimären Konstrukten zwischen der ODC der Maus, die Antizym bindet und der trypanosomalen ODC, die nicht in der Lage ist, Antizym zu binden. Wie die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kartierungsstudien sowie die Ergebnisse der Spleißvarianten jedoch zeigen, geht für Antizym-Inhibitor der Aminosäurebereich, der für die Antizym-Bindung wichtig ist, weit über die Aminosäureposition 140 hinaus. Das Antizym-Inhibitor-Fragment 2, welches die Aminosäuren Met¹ bis Lys¹⁵⁰ umfaßt, war nicht in der Lage, an die Antizyme 1 und 2 zu binden. Die Spleißvariante OAISP-2, der die Aminosäuren Val¹⁵¹ bis Lys¹⁹⁵ fehlen, bindet ebenfalls an kein Protein der Antizym-Familie.

Zusätzlich beeinflusst auch der C-Terminus die Bindung an die Antizyme. Die Spleißvariante OAISP-1, die am C-Terminus um 87 Aminosäuren verkürzt ist, konnte noch an die Antizyme 1 bis 3 binden, jedoch nicht mehr an Antizym 4. Die vollständige Form von Antizym-Inhibitor bindet dagegen an alle vier Antizym-Proteine. Zusammengefaßt bedeutet dies, daß sich die Antizym-Bindungsdomäne für die Antizyme 1 bis 3 auf einen Bereich von Leucin⁴⁵ bis Serin³⁰⁰ eingegrenzen ließ (siehe Ergebnisse, Kapitel 4.3.3) und daß für die

Bindung an Antizym 4 zusätzlich ein Bereich aus dem C-Terminus von Antizym-Inhibitor essentiell ist. Dabei sollte berücksichtigt werden, daß die Spleißvariante OAISP-1 zwar in der Lage war, an die Antizyme 1 bis 3 zu binden, im Gegensatz zur vollständigen Form konnte sie jedoch ODC nicht mehr aus dem Komplex mit Antizym freisetzen (siehe Ergebnisse, Kapitel 4.7). Interessanterweise war der C-Terminus alleine nicht in der Lage, an die Antizyme zu binden. Außerdem sollte erwähnt werden, daß die vollständige Form von Antizym-Inhibitor nicht an FK506 bindet, wohingegen die C-terminal verkürzte Spleißform an FK506 bindet (siehe Ergebnisse, Kapitel 4.3.2). Zusammengefaßt zeigt dies, daß der C-Terminus von Antizym-Inhibitor eine große Bedeutung für die Konformation des Proteins besitzt. Obwohl er nicht direkt an die Antizyme bindet, ist er für die Funktionalität von Antizym-Inhibitor äußerst wichtig und leistet einen großen Beitrag zur Stabilisierung der Antizym / Antizym-Inhibitor-Interaktion.

5.3.5 Antizym-Inhibitor ist ein genereller Inaktivator der Antizyme

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, daß Antizym-Inhibitor in der Lage ist, an alle bislang bekannten Proteine der Antizym-Familie zu binden und diese zu inaktivieren (siehe Ergebnisse, Kapitel 4.5.3 und 4.7.1). Dieses Ergebnis erhöht die generelle Bedeutung von Antizym-Inhibitor im Hinblick auf die Regulierung der Polyaminbiosynthese. Die Fähigkeit von Antizym-Inhibitor, alle Antizyme zu inaktivieren, ist besonders interessant, da Antizyme nicht nur die ODC inaktivieren und den proteolytischen Abbau der ODC fördern, sondern auch den Transport der Polyamine regulieren. Interessanterweise wurde Antizym-Inhibitor als ein Gen identifiziert, dessen Expression im Vergleich von normalem Magengewebe und dem von Magenkrebs-Patienten hochreguliert ist (Jung *et al.*, 2000). Da eine erhöhte ODC-Aktivität bei nahezu allen Krebsarten nachgewiesen wurde, kann davon ausgegangen werden, daß auch Antizym-Inhibitor hierzu beiträgt. Dies läßt Antizym-Inhibitor als potentiell neues Onkogen erscheinen. Es wäre daher sinnvoll, antiproliferativ wirkende Substanzen zu entwickeln, die nicht nur die ODC-Aktivität, sondern auch die Antizym-Inhibitor-Aktivität hemmen. Für die Identifizierung solcher Substanzen würde sich der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Aktivitätsassay für ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor besonders gut eignen.

5.3.6 Charakterisierung von Antizym 4

Antizym 4 ist bislang lediglich als EST-Datenbankeintrag beschrieben (GenBank-Zugangsnummer AF293339). Aufgrund der großen Homologie zu Proteinen der Antizym-

Familie wurde jedoch vermutet, daß es sich um ein weiteres Antizym handelt. Proteine der Antizym-Familie sind dadurch charakterisiert, daß ihre Expression durch einen besonderen Leseraster-Wechsel reguliert wird. Sie binden an ODC, hemmen die Enzym-Aktivität und fördern den proteolytischen Abbau der ODC. Über Antizym 4 war nicht bekannt, ob es diese Eigenschaften besitzt. Wie in Kapitel 4.5.3 und 4.6.3 gezeigt, ist Antizym 4 in der Lage, an ODC zu binden und die Aktivität der ODC zu hemmen. Die Bindung zwischen Antizym 4 und ODC kann ebenfalls durch Antizym-Inhibitor unterbrochen werden (siehe Ergebnisse, Kapitel 4.7.1). Das Protein erfüllt also die wichtigsten Kriterien eines Antizyms. Inwieweit der proteolytische Abbau der ODC auch durch Antizym 4 gefördert wird, sollte jedoch noch gezeigt werden. Von allen Proteinen der Antizym-Familie hat Antizym 4 die größte Homologie zu Antizym 1 (siehe Abbildung 5.5.). Die Homologie ist besonders hoch im C-terminalen Bereich. Konserviert ist auch der Bereich von Aminosäure 60 bis 68, der den Leseraster-Wechsel von ORF1 zu ORF2 umfaßt. Auffällig ist jedoch, daß auch eine große Homologie im N-Terminus von Aminosäure 1 bis 23 existiert. Dieser Teil gehört zu dem offenen Leserahmen 1, über dessen Funktion bei Antizymen so gut wie nichts bekannt ist. Da der Bereich jedoch konserviert ist, scheint er für die Funktionalität von Antizym 1 und 4 sehr wichtig zu sein.

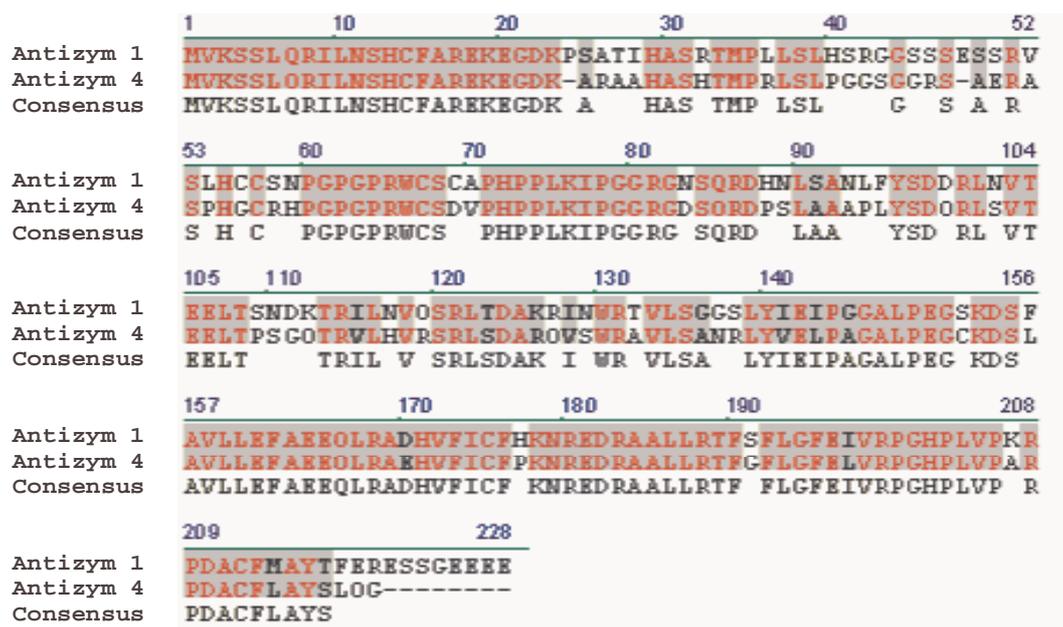


Abbildung 5.5: Die Homologie zwischen Antizym 1 und Antizym 4

Mit dem AlignX Algorithmus von Vector NTI wurde die Proteinsequenz von Antizym 1 mit der Proteinsequenz von Antizym 4 verglichen. Rot markiert sind identische Aminosäurepositionen, schwarz markiert und grau hinterlegt sind ähnliche Aminosäurepositionen. Die Homologie von Antizym 1 und Antizym 4 liegt bei 70%.

5.3.7 Gibt es Antizym und Antizym-Inhibitor in der Hefe?

Die Aktivität von Antizym-Inhibitor wird anhand seiner Fähigkeit bestimmt, ODC aus dem Komplex mit Antizym freizusetzen. Die freigesetzte ODC-Aktivität gibt indirekt Auskunft über die Antizym-Inhibitor-Aktivität. Die ODC-Aktivität wird üblicherweise anhand der Decarboxylierung von L-[1-¹⁴C]-Ornithin zu Putrescin bestimmt, wobei radioaktives ¹⁴CO₂ freigesetzt wird (Coleman and Pegg, 1998). Solch ein radioaktives Testverfahren erfordert jedoch besondere Sicherheitsvorkehrungen und ist nicht für das Hochdurchsatzscreening (HTS) geeignet. Außerdem handelt es sich um ein zellfreies System, ein *in vivo* Assay zur Bestimmung der Antizym-Inhibitor Aktivität existiert bislang nicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ein nicht-radioaktiver *in vivo* Aktivitätsassay für ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor entwickelt. Hierfür wurde die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus gewählt. Humane ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor konnten funktionell in der Hefe exprimiert werden (siehe Ergebnisse, Kapitel 4.6). Durch Verwendung eines Polyamin-freien Mediums konnte die ODC-Aktivität in An- oder Abwesenheit von exogenen Polyaminen anhand des Zellwachstums bestimmt werden. Dies ist ein wichtiger Vorteil des Hefesystems gegenüber der Zellkultur. Dabei sollte jedoch nicht außer acht gelassen werden, daß auch in der Hefe der Polyaminmetabolismus durch ein Protein der Antizym-Familie reguliert wird.

Für *Saccharomyces pombe* wurde ein solches Antizym-Homolog beschrieben. Die Zugabe von Spermidin beschleunigt den proteolytischen Abbau der Hefe-ODC. Dieser Abbau kann durch Proteasom-Inhibitoren oder durch die Deletion des Hefe-Antizyms verhindert werden (Chattopadhyay *et al.*, 2001). Interessanterweise führt die Expression von Säuger-Antizym 1 in *S. pombe* zu einem korrekten Leseraster-Wechsel von +1, wohingegen in *S. cerevisiae* ein fehlerhafter Leseraster-Wechsel von -2 entsteht. Dies deutet darauf hin, daß die Regulation der Polyaminbiosynthese in *S. pombe* dem Säuger-System näher steht, als es bei *S. cerevisiae* der Fall ist. Hinzu kommt, daß für *S. cerevisiae* bislang noch kein Antizym-Homolog identifiziert werden konnte (Zhu *et al.*, 2000). Es wurde jedoch beschrieben, daß auch bei *S. cerevisiae* Spermidin den proteolytischen Abbau der Hefe-ODC fördert. Dieser Abbau läßt sich durch Cycloheximid hemmen, was darauf hindeutet, daß hierfür die Synthese eines Proteins notwendig ist (Gupta *et al.*, 2001). Daraus läßt sich schließen, daß auch in *S. cerevisiae* ein Antizym-Homolog existiert, das bislang jedoch nicht identifiziert wurde. Hinweise zur Existenz eines Antizym-Inhibitors in der Hefe gibt es nicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, daß humane ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor funktionell in *S. cerevisiae* exprimiert werden können. Hierbei eignet sich das Hefe-System für die Untersuchung des ODC / Antizym / Antizym-Inhibitor-Komplexes besonders gut, da es dem Säuger-System ähnlich genug ist, damit die Proteine funktionell exprimiert werden können, aber nicht so komplex ist wie das Säuger-System, das eine ganze Familie von Antizymen und verschiedene Formen von Antizym-Inhibitor aufweist. Mit Hilfe des Hefe-Systems konnten

daher die Aktivitäten der einzelnen Antizyme sowie die verschiedenen Spleißvarianten von Antizym-Inhibitor getrennt voneinander untersucht werden.

5.3.8 Die in der Hefe gewonnenen Daten lassen sich auf höhere Organismen übertragen

Für die Relevanz der in Hefe gewonnenen Daten war es wichtig, zu zeigen, daß sich die Ergebnisse in einem Säugersystem bestätigen lassen. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob sich der Komplex aus ODC und Antizym mit Hilfe der Immunpräzipitation nachweisen läßt und ob diese Komplexbildung durch Antizym-Inhibitor verhindert werden kann. Hierfür wurden ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor transient in HEK 293-Zellen exprimiert. Dabei wurde festgestellt, daß die Expression der drei Konstrukte durch Zugabe des Proteasom Inhibitors Lactacystin enorm stabilisiert werden konnte (siehe Ergebnisse, Abbildung 4.33). Über ODC war bekannt, daß das Enzym sehr instabil ist und über das 26S Proteasom abgebaut wird. Über den proteasomalen Abbau der Antizyme sowie von Antizym-Inhibitor war jedoch zu diesem Zeitpunkt nichts bekannt. Eine kürzliche Veröffentlichung über den proteasomalen Abbau von Antizym 1 (Gandre *et al.*, 2002) bestätigt jedoch die Vermutung, daß alle an dem ODC / Antizym / Antizym-Inhibitor-Komplex beteiligten Proteine über das 26S Proteasom abgebaut werden. Inwieweit die Proteine für diesen proteasomalen Abbau ubiquitiniert werden müssen, sollte in weiteren Experimenten geklärt werden. Exemplarisch wurde im Rahmen dieser Arbeit für Antizym 2 gezeigt, daß das Protein *in vitro* an ODC bindet, und daß diese Komplexbildung durch Antizym-Inhibitor unterbunden werden kann. Dabei setzt Antizym-Inhibitor ODC aus dem Komplex frei und bindet stattdessen selbst an Antizym 2. Die Ergebnisse der Immunpräzipitationen bestätigen also insgesamt die in der Hefe gewonnenen Daten. Daraus läßt sich ableiten, daß das Hefe-System ein geeignetes *in vivo* Testmodell darstellt, mit dem die Funktionalität der an der Regulation der Polyaminbiosynthese beteiligten Proteine überprüft werden kann.

6 Zusammenfassung

Das von (Licitra and Liu, 1996) entwickelte Hefe-3-Hybrid-System ermöglicht die *in vivo* Identifikation von Ligand-Rezeptor-Interaktionen. Es ist eine Weiterentwicklung des klassischen Hefe-2-Hybrid-Systems und beinhaltet den Einsatz eines synthetischen Hybridmoleküls. Der feste Bestandteil dieses Hybridmoleküls ist das Hormon Dexamethason, das über die Hormon-bindende Domäne des Glukokorticoidezeptors in der Hefezelle verankert wird und kovalent mit einem Molekül verbunden ist, für das der Interaktionspartner gesucht wird. Ziel dieser Arbeit war es, das Hefe-3-Hybrid-System im Labor zu etablieren und das System zur Identifikation neuer Interaktionspartner für das Immunsuppressivum FK506 einzusetzen. Um das Hefe-3-Hybrid-System sensitiver zu gestalten, wurde zunächst der ABC-Transporter PDR5 deletiert, der an dem Export von Steroidhormonen beteiligt ist. Dabei wurde gezeigt, daß der Pdr5-Transporter auch chemisch modifizierte Steroidhormone wie beispielsweise Dexamethason-Linker transportiert. Darüberhinaus wurden zwei Aminosäurepositionen innerhalb der Hormon-bindenden Domäne des Glukokorticoidezeptors identifiziert, die entscheidend zur die Aktivierbarkeit des Rezeptors beitragen. Im Rahmen des durchgeführten 3-Hybrid-Screens wurde zusätzlich zu dem bekannten FK506-Bindeprotein, FKBP12, eine unbekannte, C-terminal verkürzte Spleißvariante von Antizym-Inhibitor als neuer Interaktor für FK506 identifiziert. Die Interaktion war FK506-spezifisch, da keine Interaktion mit anderen an Dexamethason gekoppelten Liganden nachzuweisen war. Die im 3-Hybrid-Screen isolierte Spleißvariante wurde zusätzlich über RT-PCR amplifiziert, wobei noch eine weitere Spleißform von Antizym-Inhibitor identifiziert werden konnte. Es wurde gezeigt, daß beide Formen ubiquitär exprimiert werden und Homologe in der Maus existieren.

Antizym-Inhibitor ist an der Regulation der Polyaminbiosynthese beteiligt. Polyamine spielen für das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und die Proteinbiosynthese eine essentielle Rolle. Die Aktivität von Antizym-Inhibitor wird anhand seiner Fähigkeit bestimmt, Ornithin-Decarboxylase (ODC, EC 4.1.1.17) aus dem inhibitorischen Komplex mit Antizym freizusetzen. Die freigesetzte ODC-Aktivität gibt somit Auskunft über die Antizym-Inhibitor-Aktivität. Bei den Antizymen handelt es sich um eine Proteinfamilie, die aus vier Mitgliedern besteht, deren Interaktion mit Antizym-Inhibitor bislang nur für Antizym 1 beschrieben ist. Für die Charakterisierung der Antizym-Inhibitor-Spleißvarianten, wurde ein nicht-radioaktiver Aktivitätsassay entwickelt, der auf der funktionellen Expression von humaner ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beruht. Dabei wurde gezeigt, daß humane ODC die Deletion der Hefe-ODC (Δ spe1) komplementiert und so das Hefezellwachstum auf Polyamin-freiem Medium ermöglicht. Dieser Assay erwies sich

auch als geeignet für ein Hochdurchsatzverfahren (HTS) zur Identifikation von ODC-Inhibitoren. Die Koexpression von Antizym führte zu einer Wachstumshemmung, die auf einem Polyaminmangel beruht und durch Zugabe von Putrescin, oder durch die zusätzliche Koexpression von Antizym-Inhibitor wieder aufgehoben werden konnte. Darüber hinaus wurde ein 3-Hybrid-Assay für den Proteinkomplex aus ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor entwickelt. Hiermit wurde untersucht, inwieweit Antizym-Inhibitor die Heterodimerisierung zwischen ODC und Antizym unterbindet. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte erstmals gezeigt werden, daß Antizym-Inhibitor in der Lage ist, an alle Proteine der Antizym-Familie zu binden und ODC aus dem Komplex mit Antizym 1, 2, 3 und 4 verdrängt. Bislang war dies nur für Antizym 1 beschrieben. Desweiteren wurde für das noch nicht charakterisierte Mitglied der Antizym-Familie, Antizym 4, gezeigt, daß auch dieses an ODC bindet und die Aktivität der ODC hemmt. Die C-terminal verkürzte Spleißvariante konnte zwar an die Antizyme 1, 2 und 3 binden, war jedoch nicht der Lage, ODC aus dem Komplex freizusetzen. Um die Antizym-Bindungsdomäne von Antizym-Inhibitor weiter zu charakterisieren, wurden Fragmente hergestellt mit deren Hilfe die Antizym-Bindungsdomäne auf einen Bereich von Leucin⁴⁵ bis Serin³⁰⁰ eingegrenzt werden konnte. Die Antizym-Bindungsdomäne überlappt dabei mit der FK506-Bindungsdomäne, die vollständige Form von Antizym-Inhibitor bindet interessanterweise nicht an FK506. Zusammengefaßt zeigt dies, daß der C-Terminus von Antizym-Inhibitor von großer Bedeutung für die Konformation des Proteins ist und einen wichtigen Beitrag zur Stabilisierung der Antizym / Antizym-Inhibitor-Interaktion leistet. Die Relevanz der in der Hefe gewonnenen Daten wurde abschließend mit HEK 293-Zellextrakten überprüft. Die Komplexbildung der transient exprimierten Proteine ODC, Antizym und Antizym-Inhibitor konnte durch Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Damit wurde gezeigt, daß die Hefe-Daten auf höhere Organismen übertragen werden können.

7 Literaturverzeichnis

- Aghdasi B., Ye K., Resnick A., Huang A., Ha H.C., Guo X., Dawson T.M., Dawson V.L. and Snyder S.H.** (2001) FKBP12, the 12-KDa FK506-Binding Protein, Is a Physiologic Regulator of the Cell Cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2425-2430.
- Almrud J.J., Oliveira M.A., Kern A.D., Grishin N.V., Phillips M.A. and Hackert M.L.** (2000) Crystal Structure of Human Ornithine Decarboxylase at 2.1 Å Resolution: Structural Insights to Antizyme Binding. *J Mol Biol* **295**: 7-16.
- Augustyns K., Amsoms K., Yamani A., Rajan P.K. and Haemers A.** (2001) Trypanothione As a Target in the Design of Antitrypanosomal and Antileishmanial Agents. *Curr Pharm Des* **7**: 1117-1141.
- Auvinen M., Laine A., Paasinen-Sohns A., Kangas A., Kangas L., Saksela O., Andersson L.C. and Holtta E.** (1997) Human Ornithine Decarboxylase-Overproducing NIH3T3 Cells Induce Rapidly Growing, Highly Vascularized Tumors in Nude Mice. *Cancer Res* **57**: 3016-3025.
- Baird G.S., Zacharias D.A. and Tsien R.Y.** (1999) Circular Permutation and Receptor Insertion Within Green Fluorescent Proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 11241-11246.
- Baldino F., Jr., Chesselet M.F. and Lewis M.E.** (1989) High-Resolution in Situ Hybridization Histochemistry. *Methods Enzymol* **168**: 761-777.
- Bauer B.E., Wolfger H. and Kuchler K.** (1999) Inventory and Function of Yeast ABC Proteins: About Sex, Stress, Pleiotropic Drug and Heavy Metal Resistance. *Biochim Biophys Acta* **1461**: 217-236.
- Bello-Fernandez C., Packham G. and Cleveland J.L.** (1993) The Ornithine Decarboxylase Gene Is a Transcriptional Target of C-Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 7804-7808.
- Belting M., Borsig L., Fuster M.M., Brown J.R., Persson L., Fransson L.A. and Esko J.D.** (2002) Tumor Attenuation by Combined Heparan Sulfate and Polyamine Depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 371-376.
- Belting M., Persson S. and Fransson L.A.** (1999) Proteoglycan Involvement in Polyamine Uptake. *Biochem J* **338** (Pt 2): 317-323.
- Birnboim H.C. and Doly J.** (1979) A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Boeke J.D., LaCroute F. and Fink G.R.** (1984) A Positive Selection for Mutants Lacking Orotidine-5'-Phosphate Decarboxylase Activity in Yeast: 5-Fluoro-Orotic Acid Resistance. *Mol Gen Genet* **197**: 345-346.
- Bordin L., Vargiu C., Colombatto S., Clari G., Testore G., Toninello A. and Grillo M.A.** (1996) Casein Kinase 2 Phosphorylates Recombinant Human Spermidine/Spermine N1-

Acetyltransferase on Both Serine and Threonine Residues. *Biochem Biophys Res Commun* **229**: 845-851.

Brent R. and Ptashne M. (1985) A Eukaryotic Transcriptional Activator Bearing the DNA Specificity of a Prokaryotic Repressor. *Cell* **43**: 729-736.

Bush A., Mateyak M., Dugan K., Obaya A., Adachi S., Sedivy J. and Cole M. (1998) C-Myc Null Cells Misregulate Cad and Gadd45 but Not Other Proposed C-Myc Targets. *Genes Dev* **12**: 3797-3802.

Cameron A.M., Nucifora F.C., Jr., Fung E.T., Livingston D.J., Aldape R.A., Ross C.A. and Snyder S.H. (1997) FKBP12 Binds the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor at Leucine-Proline (1400-1401) and Anchors Calcineurin to This FK506-Like Domain. *J Biol Chem* **272**: 27582-27588.

Chakraborti P.K., Garabedian M.J., Yamamoto K.R. and Simons S.S., Jr. (1991) Creation of "Super" Glucocorticoid Receptors by Point Mutations in the Steroid Binding Domain. *J Biol Chem* **266**: 22075-22078.

Chantalat L., Leroy D., Filhol O., Nueda A., Benitez M.J., Chambaz E.M., Cochet C. and Dideberg O. (1999) Crystal Structure of the Human Protein Kinase CK2 Regulatory Subunit Reveals Its Zinc Finger-Mediated Dimerization. *EMBO J* **18**: 2930-2940.

Chattopadhyay M.K., Murakami Y. and Matsufuji S. (2001) Antizyme Regulates the Degradation of Ornithine Decarboxylase in Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe*. Study in the Spe2 Knockout Strains. *J Biol Chem* **276**: 21235-21241.

Chen C. and Okayama H. (1987) High-Efficiency Transformation of Mammalian Cells by Plasmid DNA. *Mol Cell Biol* **7**: 2745-2752.

Coffino P. (2001) Regulation of Cellular Polyamines by Antizyme. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 188-194.

Coleman C.S. and Pegg A.E. (1998) Assay of Mammalian Ornithine Decarboxylase Activity Using [¹⁴C]Ornithine. *Methods Mol Biol* **79**: 41-44.

Cooper H.L., Park M.H., Folk J.E., Safer B. and Braverman R. (1983) Identification of the Hypusine-Containing Protein Hy⁺ As Translation Initiation Factor EIF-4D. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 1854-1857.

Coss M.C., Winterstein D., Sowder R.C. and Simek S.L. (1995) Molecular Cloning, DNA Sequence Analysis, and Biochemical Characterization of a Novel 65-KDa FK506-Binding Protein (FKBP65). *J Biol Chem* **270**: 29336-29341.

Crabtree G.R. (1999) Generic Signals and Specific Outcomes: Signaling Through Ca²⁺, Calcineurin, and NF-AT. *Cell* **96**: 611-614.

Dolinski K., Muir S., Cardenas M. and Heitman J. (1997) All Cyclophilins and FK506 Binding Proteins Are, Individually and Collectively, Dispensable for Viability in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13093-13098.

- Dumas C., Ouellette M., Tovar J., Cunningham M.L., Fairlamb A.H., Tamar S., Olivier M. and Papadopoulou B.** (1997) Disruption of the Trypanothione Reductase Gene of *Leishmania* Decreases Its Ability to Survive Oxidative Stress in Macrophages. *EMBO J* **16**: 2590-2598.
- Dumont F.J., Staruch M.J., Koprak S.L., Siekierka J.J., Lin C.S., Harrison R., Sewell T., Kindt V.M., Beattie T.R. and Wyvratt M.** (1992) The Immunosuppressive and Toxic Effects of FK-506 Are Mechanistically Related: Pharmacology of a Novel Antagonist of FK-506 and Rapamycin. *J Exp Med* **176**: 751-760.
- Egner R., Rosenthal F.E., Kralli A., Sanglard D. and Kuchler K.** (1998) Genetic Separation of FK506 ATP-binding Cassette Multidrug Resistance Transporter. *Mol Biol Cell* **9**: 523-543.
- Elitsur Y., Liu X., Dosesescu J. and Moshier J.A.** (1995) FK-506 and Cyclosporine A (CsA) Immunomodulation of the Human Gut Mucosal Immune System. *Dig Dis Sci* **40**: 1934-1940.
- Farabaugh P.J.** (1996) Programmed Translational Frameshifting. *Annu Rev Genet* **30**: 507-528.
- Feith D.J., Shantz L.M. and Pegg A.E.** (2001) Targeted Antizyme Expression in the Skin of Transgenic Mice Reduces Tumor Promoter Induction of Ornithine Decarboxylase and Decreases Sensitivity to Chemical Carcinogenesis. *Cancer Res* **61**: 6073-6081.
- Ferrell K., Wilkinson C.R., Dubiel W. and Gordon C.** (2000) Regulatory Subunit Interactions of the 26S Proteasome, a Complex Problem. *Trends Biochem Sci* **25**: 83-88.
- Fields S. and Song O.** (1989) A Novel Genetic System to Detect Protein-Protein Interactions. *Nature* **340**: 245-246.
- Finegold A.A., Schafer W.R., Rine J., Whiteway M. and Tamanoi F.** (1990) Common Modifications of Trimeric G Proteins and Ras Protein: Involvement of Polyisoprenylation. *Science* **249**: 165-169.
- Flamigni F., Facchini A., Capanni C., Stefanelli C., Tantini B. and Calderera C.M.** (1999) P44/42 Mitogen-Activated Protein Kinase Is Involved in the Expression of Ornithine Decarboxylase in Leukaemia L1210 Cells. *Biochem J* **341** (Pt 2): 363-369.
- Flamigni F., Facchini A., Giordano E., Tantini B. and Stefanelli C.** (2001) Signaling Pathways Leading to the Induction of Ornithine Decarboxylase: Opposite Effects of P44/42 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) and P38 MAPK Inhibitors. *Biochem Pharmacol* **61**: 25-32.
- Fujita K., Murakami Y. and Hayashi S.** (1982) A Macromolecular Inhibitor of the Antizyme to Ornithine Decarboxylase. *Biochem J* **204**: 647-652.
- Fung J.J. and Starzl T.E.** (1995) FK506 in Solid Organ Transplantation. *Ther Drug Monit* **17**: 592-595.
- Galat A., Lane W.S., Standaert R.F. and Schreiber S.L.** (1992) A Rapamycin-Selective 25-KDa Immunophilin. *Biochemistry* **31**: 2427-2434.

- Gandre S., Bercovich Z. and Kahana C.** (2002) Ornithine Decarboxylase-Antizyme Is Rapidly Degraded Through a Mechanism That Requires Functional Ubiquitin-Dependent Proteolytic Activity. *Eur J Biochem* **269**: 1316-1322.
- Garabedian M.J. and Yamamoto K.R.** (1992) Genetic Dissection of the Signaling Domain of a Mammalian Steroid Receptor in Yeast. *Mol Biol Cell* **3**: 1245-1257.
- Ghoda L., Phillips M.A., Bass K.E., Wang C.C. and Coffino P.** (1990) Trypanosome Ornithine Decarboxylase Is Stable Because It Lacks Sequences Found in the Carboxyl Terminus of the Mouse Enzyme Which Target the Latter for Intracellular Degradation. *J Biol Chem* **265**: 11823-11826.
- Ghoda L., Sidney D., Macrae M. and Coffino P.** (1992) Structural Elements of Ornithine Decarboxylase Required for Intracellular Degradation and Polyamine-Dependent Regulation. *Mol Cell Biol* **12**: 2178-2185.
- Ghoda L., van Daalen W.T., Macrae M., Ascherman D. and Coffino P.** (1989) Prevention of Rapid Intracellular Degradation of ODC by a Carboxyl-Terminal Truncation. *Science* **243**: 1493-1495.
- Gietz R.D., Schiestl R.H., Willems A.R. and Woods R.A.** (1995) Studies on the Transformation of Intact Yeast Cells by the LiAc/SS-DNA/PEG Procedure. *Yeast* **11**: 355-360.
- Gold B.G., Densmore V., Shou W., Matzuk M.M. and Gordon H.S.** (1999) Immunophilin FK506-Binding Protein 52 (Not FK506-Binding Protein 12) Mediates the Neurotrophic Action of FK506. *J Pharmacol Exp Ther* **289**: 1202-1210.
- Grant S.G., Jessee J., Bloom F.R. and Hanahan D.** (1990) Differential Plasmid Rescue From Transgenic Mouse DNAs into Escherichia Coli Methylation-Restriction Mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4645-4649.
- Griffith E.C., Licitra E.J. and Liu J.O.** (2000) Yeast Three-Hybrid System for Detecting Ligand-Receptor Interactions. *Methods Enzymol* **328**: 89-103.
- Gupta R., Hamasaki-Katagiri N., White T.C. and Tabor H.** (2001) Effect of Spermidine on the in Vivo Degradation of Ornithine Decarboxylase in Saccharomyces Cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10620-10623.
- Güldener U., Heck S., Fiedler T., Beinbauer J. and Hegemann J.H.** (1996) A New Efficient Gene Disruption Cassette for Repeated Use in Budding Yeast. *Nucleic Acids Res* **24**: 2519-2524.
- Gyuris J., Golemis E., Chertkov H. and Brent R.** (1993) Cdi1, a Human G1 and S Phase Protein Phosphatase That Associates With Cdk2. *Cell* **75**: 791-803.
- Hanahan D.** (1983) Studies on Transformation of Escherichia Coli With Plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Hayashi S., Murakami Y. and Matsufuji S.** (1996) Ornithine Decarboxylase Antizyme: a Novel Type of Regulatory Protein. *Trends Biochem Sci* **21**: 27-30.

- Heller J.S., Fong W.F. and Canellakis E.S.** (1976) Induction of a Protein Inhibitor to Ornithine Decarboxylase by the End Products of Its Reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**: 1858-1862.
- Heukeshoven J. and Dernick R.** (1985) Simplified Method for Silver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels and the Mechanism of Silver Staining. *Electrophoresis* **6**: 103-112.
- Hibasami H., Tsukada T., Suzuki R., Takano K., Takaji S., Takeuchi T., Shirakawa S., Murata T. and Nakashima K.** (1991) 15-Deoxyspergualin, an Antiproliferative Agent for Human and Mouse Leukemia Cells Shows Inhibitory Effects on the Synthetic Pathway of Polyamines. *Anticancer Res* **11**: 325-330.
- Howard K.J., Holley S.J., Yamamoto K.R., Distelhorst C.W.** (1990) Mapping the HSP90 binding region of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* **265**: 11928-35.
- Hsu K.S.** (1994) Modulation of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Channels by Spermine in *Xenopus* Muscle Cell Culture. *Neurosci Lett* **182**: 99-103.
- Hurta R.A. and Wright J.A.** (1994) Ornithine Decarboxylase Gene Expression Is Aberrantly Regulated Via the CAMP Signal Transduction Pathway in Malignant H-Ras Transformed Cell Lines. *J Cell Physiol* **161**: 383-391.
- Igarashi K. and Kashiwagi K.** (2000) Polyamines: Mysterious Modulators of Cellular Functions. *Biochem Biophys Res Commun* **271**: 559-564.
- Ivanov I.P., Gesteland R.F. and Atkins J.F.** (1998) A Second Mammalian Antizyme: Conservation of Programmed Ribosomal Frameshifting. *Genomics* **52**: 119-129.
- Ivanov I.P., Gesteland R.F. and Atkins J.F.** (2000a) Antizyme Expression: a Subversion of Triplet Decoding, Which Is Remarkably Conserved by Evolution, Is a Sensor for an Autoregulatory Circuit. *Nucleic Acids Res* **28**: 3185-3196.
- Ivanov I.P., Matsufuji S., Murakami Y., Gesteland R.F. and Atkins J.F.** (2000b) Conservation of Polyamine Regulation by Translational Frameshifting From Yeast to Mammals. *EMBO J* **19**: 1907-1917.
- Ivanov I.P., Rohrwasser A., Terreros D.A., Gesteland R.F. and Atkins J.F.** (2000c) Discovery of a Spermatogenesis Stage-Specific Ornithine Decarboxylase Antizyme: Antizyme 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4808-4813.
- Jang W., Chen H.C., Sicotte H. and Schuler G.D.** (1999) Making Effective Use of Human Genomic Sequence Data. *Trends Genet* **15**: 284-286.
- Jayaraman T., Brillantes A.M., Timerman A.P., Fleischer S., Erdjument-Bromage H., Tempst P. and Marks A.R.** (1992) FK506 Binding Protein Associated With the Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor). *J Biol Chem* **267**: 9474-9477.
- Jentsch S. and Schlenker S.** (1995) Selective Protein Degradation: a Journey's End Within the Proteasome. *Cell* **82**: 881-884.
- Jiang H., Yamamoto S., Nishikawa K. and Kato R.** (1993) Anti-Tumor-Promoting Action of FK506, a Potent Immunosuppressive Agent. *Carcinogenesis* **14**: 67-71.

- Jung M.H., Kim S.C., Jeon G.A., Kim S.H., Kim Y., Choi K.S., Park S.I., Joe M.K. and Kimm K.** (2000) Identification of Differentially Expressed Genes in Normal and Tumor Human Gastric Tissue. *Genomics* **69**: 281-286.
- Kitani T. and Fujisawa H.** (1989) Purification and Characterization of Antizyme Inhibitor of Ornithine Decarboxylase From Rat Liver. *Biochim Biophys Acta* **991**: 44-49.
- Klein R.D., Favreau M.A., Alexander-Bowman S.J., Nulf S.C., Vanover L., Winterrowd C.A., Yarlett N., Martinez M., Keithly J.S., Zantello M.R., Thomas E.M. and Geary T.G.** (1997) Haemonchus Contortus: Cloning and Functional Expression of a CDNA Encoding Ornithine Decarboxylase and Development of a Screen for Inhibitors. *Exp Parasitol* **87**: 171-184.
- Koguchi K., Kobayashi S., Hayashi T., Matsufuji S., Murakami Y. and Hayashi S.** (1997) Cloning and Sequencing of a Human CDNA Encoding Ornithine Decarboxylase Antizyme Inhibitor. *Biochim Biophys Acta* **1353**: 209-216.
- Kolaczkowski M., van der Rest M., Cybularz-Kolaczowska A., Soumillion J.P., Konings W.N. and Goffeau A.** (1996) Anticancer Drugs, Ionophoric Peptides, and Steroids As Substrates of the Yeast Multidrug Transporter Pdr5p. *J Biol Chem* **271**: 31543-31548.
- Kralli A., Bohlen S.P. and Yamamoto K.R.** (1995) LEM1, an ATP-Binding-Cassette Transporter, Selectively Modulates the Biological Potency of Steroid Hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 4701-4705.
- Kralli A. and Yamamoto K.R.** (1996) An FK506-Sensitive Transporter Selectively Decreases Intracellular Levels and Potency of Steroid Hormones. *J Biol Chem* **271**: 17152-17156.
- Kyrpides N.C. and Woese C.R.** (1998) Universally Conserved Translation Initiation Factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 224-228.
- Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lam E., Martin M.M., Timerman A.P., Sabers C., Fleischer S., Lukas T., Abraham R.T., O'Keefe S.J., O'Neill E.A. and Wiederrecht G.J.** (1995) A Novel FK506 Binding Protein Can Mediate the Immunosuppressive Effects of FK506 and Is Associated With the Cardiac Ryanodine Receptor. *J Biol Chem* **270**: 26511-26522.
- Lane W.S., Galat A., Harding M.W. and Schreiber S.L.** (1991) Complete Amino Acid Sequence of the FK506 and Rapamycin Binding Protein, FKBP, Isolated From Calf Thymus. *J Protein Chem* **10** : 151-160.
- Law D.J., Du M., Law G.L. and Merchant J.L.** (1999) ZBP-99 Defines a Conserved Family of Transcription Factors and Regulates Ornithine Decarboxylase Gene Expression. *Biochem Biophys Res Commun* **262**: 113-120.
- Law G.L., Itoh H., Law D.J., Mize G.J., Merchant J.L. and Morris D.R.** (1998) Transcription Factor ZBP-89 Regulates the Activity of the Ornithine Decarboxylase Promoter. *J Biol Chem* **273**: 19955-19964.

- Lazaris-Karatzas A., Montine K.S. and Sonenberg N.** (1990) Malignant Transformation by a Eukaryotic Initiation Factor Subunit That Binds to mRNA 5' Cap. *Nature* **345**: 544-547.
- Lee L.G., Connell C.R., Woo S.L., Cheng R.D., McArdle B.F., Fuller C.W., Halloran N.D. and Wilson R.K.** (1992) DNA Sequencing With Dye-Labeled Terminators and T7 DNA Polymerase: Effect of Dyes and DNTPs on Incorporation of Dye-Terminators and Probability Analysis of Termination Fragments. *Nucleic Acids Res* **20**: 2471-2483.
- Lerma J.** (1992) Spermine Regulates N-Methyl-D-Aspartate Receptor Desensitization. *Neuron* **8**: 343-352.
- Li R.S., Law G.L., Seifert R.A., Romaniuk P.J. and Morris D.R.** (1999) Ornithine Decarboxylase Is a Transcriptional Target of Tumor Suppressor WT1. *Exp Cell Res* **247**: 257-266.
- Li X. and Coffino P.** (1992) Regulated Degradation of Ornithine Decarboxylase Requires Interaction With the Polyamine-Inducible Protein Antizyme. *Mol Cell Biol* **12**: 3556-3562.
- Li X. and Coffino P.** (1993) Degradation of Ornithine Decarboxylase: Exposure of the C-Terminal Target by a Polyamine-Inducible Inhibitory Protein. *Mol Cell Biol* **13**: 2377-2383.
- Li X., Stebbins B., Hoffman L., Pratt G., Rechsteiner M. and Coffino P.** (1996) The N Terminus of Antizyme Promotes Degradation of Heterologous Proteins. *J Biol Chem* **271**: 4441-4446.
- Licitra E.J. and Liu J.O.** (1996) A Three-Hybrid System for Detecting Small Ligand-Protein Receptor Interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 12817-12821.
- Liu J., Farmer J.D., Jr., Lane W.S., Friedman J., Weissman I. and Schreiber S.L.** (1991) Calcineurin Is a Common Target of Cyclophilin-Cyclosporin A and FKBP-FK506 Complexes. *Cell* **66**: 807-815.
- Ma J. and Ptashne M.** (1987) A New Class of Yeast Transcriptional Activators. *Cell* **51**: 113-119.
- MacGregor G.R. and Caskey C.T.** (1989) Construction of Plasmids That Express E. Coli Beta-Galactosidase in Mammalian Cells. *Nucleic Acids Res* **17**: 2365.
- Matsufuji S., Kanamoto R., Murakami Y. and Hayashi S.** (1990a) Monoclonal Antibody Studies on the Properties and Regulation of Murine Ornithine Decarboxylase Antizymes. *J Biochem (Tokyo)* **107**: 87-91.
- Matsufuji S., Matsufuji T., Miyazaki Y., Murakami Y., Atkins J.F., Gesteland R.F. and Hayashi S.** (1995) Autoregulatory Frameshifting in Decoding Mammalian Ornithine Decarboxylase Antizyme. *Cell* **80**: 51-60.
- Matsufuji S., Miyazaki Y., Kanamoto R., Kameji T., Murakami Y., Baby T.G., Fujita K., Ohno T. and Hayashi S.** (1990b) Analyses of Ornithine Decarboxylase Antizyme mRNA With a cDNA Cloned From Rat Liver. *J Biochem (Tokyo)* **108**: 365-371.

- Mayr C., Richter K., Lilie H. and Buchner J.** (2000) Cpr6 and Cpr7, Two Closely Related Hsp90-Associated Immunophilins From *Saccharomyces Cerevisiae*, Differ in Their Functional Properties. *J Biol Chem* **275**: 34140-34146.
- McNemar M.D., Gorman J.A. and Buckley H.R.** (1997) Isolation and Sequence of the Gene Encoding Ornithine Decarboxylase, SPE1, From *Candida Albicans* by Complementation of a Spe1 Delta Strain of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Yeast* **13**: 1383-1389.
- Mehlotra R.K.** (1996) Antioxidant Defense Mechanisms in Parasitic Protozoa. *Crit Rev Microbiol* **22**: 295-314.
- Miesfeld R., Rusconi S., Godowski P.J., Maler B.A., Okret S., Wikstrom A.C., Gustafsson J.A. and Yamamoto K.R.** (1986) Genetic Complementation of a Glucocorticoid Receptor Deficiency by Expression of Cloned Receptor CDNA. *Cell* **46**: 389-399.
- Mitchell J.L., Judd G.G., Bareyal-Leyser A. and Ling S.Y.** (1994) Feedback Repression of Polyamine Transport Is Mediated by Antizyme in Mammalian Tissue-Culture Cells. *Biochem J* **299** (Pt 1): 19-22.
- Miyazaki Y., Matsufuji S. and Hayashi S.** (1992) Cloning and Characterization of a Rat Gene Encoding Ornithine Decarboxylase Antizyme. *Gene* **113**: 191-197.
- Miyazaki Y., Matsufuji S., Murakami Y. and Hayashi S.** (1993) Single Amino-Acid Replacement Is Responsible for the Stabilization of Ornithine Decarboxylase in HMOA Cells. *Eur J Biochem* **214**: 837-844.
- Modrek B. and Lee C.** (2002) A Genomic View of Alternative Splicing. *Nat Genet* **30**: 13-19.
- Moshier J.A., Skunca M., Wu W., Boppana S.M., Rauscher F.J., III and Dosescu J.** (1996) Regulation of Ornithine Decarboxylase Gene Expression by the Wilms' Tumor Suppressor WT1. *Nucleic Acids Res* **24**: 1149-1157.
- Mumberg D., Muller R. and Funk M.** (1994) Regulatable Promoters of *Saccharomyces Cerevisiae*: Comparison of Transcriptional Activity and Their Use for Heterologous Expression. *Nucleic Acids Res* **22**: 5767-5768.
- Mumberg D., Muller R. and Funk M.** (1995) Yeast Vectors for the Controlled Expression of Heterologous Proteins in Different Genetic Backgrounds. *Gene* **156**: 119-122.
- Murakami Y. and Hayashi S.** (1985) Role of Antizyme in Degradation of Ornithine Decarboxylase in HTC Cells. *Biochem J* **226**: 893-896.
- Murakami Y., Ichiba T., Matsufuji S. and Hayashi S.** (1996) Cloning of Antizyme Inhibitor, a Highly Homologous Protein to Ornithine Decarboxylase. *J Biol Chem* **271**: 3340-3342.
- Murakami Y., Matsufuji S., Hayashi S., Tanahashi N. and Tanaka K.** (2000) Degradation of Ornithine Decarboxylase by the 26S Proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* **267**: 1-6.

- Murakami Y., Matsufuji S., Kameji T., Hayashi S., Igarashi K., Tamura T., Tanaka K. and Ichihara A.** (1992a) Ornithine Decarboxylase Is Degraded by the 26S Proteasome Without Ubiquitination. *Nature* **360**: 597-599.
- Murakami Y., Matsufuji S., Miyazaki Y. and Hayashi S.** (1992b) Destabilization of Ornithine Decarboxylase by Transfected Antizyme Gene Expression in Hepatoma Tissue Culture Cells. *J Biol Chem* **267**: 13138-13141.
- Murakami Y., Matsufuji S., Nishiyama M. and Hayashi S.** (1989) Properties and Fluctuations in Vivo of Rat Liver Antizyme Inhibitor. *Biochem J* **259**: 839-845.
- Murakami Y., Matsufuji S., Tanaka K., Ichihara A. and Hayashi S.** (1993) Involvement of the Proteasome and Antizyme in Ornithine Decarboxylase Degradation by a Reticulocyte Lysate. *Biochem J* **295** (Pt 1): 305-308.
- Nadeau K., Nadler S.G., Saulnier M., Tepper M.A. and Walsh C.T.** (1994) Quantitation of the Interaction of the Immunosuppressant Deoxyspergualin and Analogs With Hsc70 and Hsp90. *Biochemistry* **33**: 2561-2567.
- Nadler S.G., Tepper M.A., Schacter B. and Mazzucco C.E.** (1992) Interaction of the Immunosuppressant Deoxyspergualin With a Member of the Hsp70 Family of Heat Shock Proteins. *Science* **258**: 484-486.
- Nair S.C., Rimerman R.A., Toran E.J., Chen S., Prapapanich V., Butts R.N. and Smith D.F.** (1997) Molecular Cloning of Human FKBP51 and Comparisons of Immunophilin Interactions With Hsp90 and Progesterone Receptor. *Mol Cell Biol* **17**: 594-603.
- Nilsson J., Grahn B. and Heby O.** (2000) Antizyme Inhibitor Is Rapidly Induced in Growth-Stimulated Mouse Fibroblasts and Releases Ornithine Decarboxylase From Antizyme Suppression. *Biochem J* **346 Pt 3**: 699-704.
- Okadome T., Oeda E., Saitoh M., Ichijo H., Moses H.L., Miyazono K. and Kawabata M.** (1996) Characterization of the Interaction of FKBP12 With the Transforming Growth Factor-Beta Type I Receptor in Vivo. *J Biol Chem* **271**: 21687-21690.
- Olesnický N.S., Brown A.J., Dowell S.J. and Casselton L.A.** (1999) A Constitutively Active G-Protein-Coupled Receptor Causes Mating Self-Compatibility in the Mushroom Coprinus. *EMBO J* **18**: 2756-2763.
- Padgett R.A., Grabowski P.J., Konarska M.M., Seiler S. and Sharp P.A.** (1986) Splicing of Messenger RNA Precursors. *Annu Rev Biochem* **55**: 1119-1150.
- Park M.H., Joe Y.A. and Kang K.R.** (1998) Deoxyhypusine Synthase Activity Is Essential for Cell Viability in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**: 1677-1683.
- Park M.H., Lee Y.B. and Joe Y.A.** (1997) Hypusine Is Essential for Eukaryotic Cell Proliferation. *Biol Signals* **6**: 115-123.
- Park M.H., Wolff E.C. and Folk J.E.** (1993) Is Hypusine Essential for Eukaryotic Cell Proliferation? *Trends Biochem Sci* **18**: 475-479.

- Peattie D.A., Harding M.W., Fleming M.A., DeCenzo M.T., Lippke J.A., Livingston D.J. and Benasutti M.** (1992) Expression and Characterization of Human FKBP52, an Immunophilin That Associates With the 90-KDa Heat Shock Protein and Is a Component of Steroid Receptor Complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 10974-10978.
- Pegg A.E. and Williams-Ashman H.G.** (1968) Biosynthesis of Putrescine in the Prostate Gland of the Rat. *Biochem J* **108**: 533-539.
- Persson L., Holm I., Ask A. and Heby O.** (1988) Curative Effect of DL-2-Difluoromethylornithine on Mice Bearing Mutant L1210 Leukemia Cells Deficient in Polyamine Uptake. *Cancer Res* **48**: 4807-4811.
- Pitkanen L.T., Heiskala M. and Andersson L.C.** (2001) Expression of a Novel Human Ornithine Decarboxylase-Like Protein in the Central Nervous System and Testes. *Biochem Biophys Res Commun* **287**: 1051-1057.
- Pollard K.J., Samuels M.L., Crowley K.A., Hansen J.C. and Peterson C.L.** (1999) Functional Interaction Between GCN5 and Polyamines: a New Role for Core Histone Acetylation. *EMBO J* **18**: 5622-5633.
- Pratt W.B. and Toft D.O.** (1997) Steroid Receptor Interactions with Heat Shock Protein and Immunophilin Chaperones. *Endocr. Rev* **18**: 306-60.
- Pyronnet S., Pradayrol L. and Sonenberg N.** (2000) A Cell Cycle-Dependent Internal Ribosome Entry Site. *Mol Cell* **5**: 607-616.
- Raina A. and Jänne J.** (1968) Biosynthesis of Putrescine: Characterization of Ornithine Decarboxylase From Regenerating Rat Liver. *Acta Chem Scand* **22**: 2375-2378.
- Raught B., Gingras A.C. and Sonenberg N.** (2001) The Target of Rapamycin (TOR) Proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 7037-7044.
- Rechsteiner M. and Rogers S.W.** (1996) PEST Sequences and Regulation by Proteolysis. *Trends Biochem Sci* **21**: 267-271.
- Richter A., Davies D.E. and Alexander P.** (1995) Growth Inhibitory Effects of FK506 and Cyclosporin A Independent of Inhibition of Calcineurin. *Biochem Pharmacol* **49**: 367-373.
- Rom E. and Kahana C.** (1994) Polyamines Regulate the Expression of Ornithine Decarboxylase Antizyme in Vitro by Inducing Ribosomal Frame-Shifting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 3959-3963.
- Ruhl M., Himmelpach M., Bahr G.M., Hammerschmid F., Jaksche H., Wolff B., Aschauer H., Farrington G.K., Probst H. and Bevec D.** (1993) Eukaryotic Initiation Factor 5A Is a Cellular Target of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Rev Activation Domain Mediating Trans-Activation. *J Cell Biol* **123**: 1309-1320.
- Russell D. and Snyder S.H.** (1968) Amine Synthesis in Rapidly Growing Tissues: Ornithine Decarboxylase Activity in Regenerating Rat Liver, Chick Embryo, and Various Tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **60**: 1420-1427.

- Sabers C.J., Martin M.M., Brunn G.J., Williams J.M., Dumont F.J., Wiederrecht G. and Abraham R.T.** (1995) Isolation of a Protein Target of the FKBP12-Rapamycin Complex in Mammalian Cells. *J Biol Chem* **270**: 815-822.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. and Erlich H.A.** (1988) Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA With a Thermostable DNA Polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. and Arnheim N.** (1985) Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Saito T., Hascilowicz T., Ohkido I., Kikuchi Y., Okamoto H., Hayashi S., Murakami Y. and Matsufuji S.** (2000) Two Zebrafish (*Danio Rerio*) Antizymes With Different Expression and Activities. *Biochem J* **345 Pt 1**: 99-106.
- Sakata K., Fukuchi-Shimogori T., Kashiwagi K. and Igarashi K.** (1997) Identification of Regulatory Region of Antizyme Necessary for the Negative Regulation of Polyamine Transport. *Biochem Biophys Res Commun* **238**: 415-419.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T.** (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R.** (1977) DNA Sequencing With Chain-Terminating Inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Schechter P.J. and Sjoerdsma A.** (1986) Difluoromethylornithine in the Treatment of African Trypanosomiasis. *Parasitology Today* **2**: 223-224.
- Schiene-Fischer C. and Yu C.** (2001) Receptor Accessory Folding Helper Enzymes: the Functional Role of Peptidyl Prolyl Cis/Trans Isomerases. *FEBS Lett* **495**: 1-6.
- Schnier J., Schwelberger H.G., Smit-McBride Z., Kang H.A. and Hershey J.W.** (1991) Translation Initiation Factor 5A and Its Hypusine Modification Are Essential for Cell Viability in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**: 3105-3114.
- Schreiber S.L.** (1991) Chemistry and Biology of the Immunophilins and Their Immunosuppressive Ligands. *Science* **251**: 283-287.
- Schwartz B., Hittelman A., Daneshvar L., Basu H.S., Marton L.J. and Feuerstein B.G.** (1995) A New Model for Disruption of the Ornithine Decarboxylase Gene, SPE1, in *Saccharomyces Cerevisiae* Exhibits Growth Arrest and Genetic Instability at the MAT Locus. *Biochem J* **312** (Pt 1): 83-90.
- Seidel E.R. and Ragan V.L.** (1997) Inhibition by Rapamycin of Ornithine Decarboxylase and Epithelial Cell Proliferation in Intestinal IEC-6 Cells in Culture. *Br J Pharmacol* **120**: 571-574.
- Seiler N., Atanassov C.L. and Raul F.** (1998) Polyamine Metabolism As Target for Cancer Chemoprevention (Review). *Int J Oncol* **13**: 993-1006.

- Seiler N., Delcros J.G. and Moulinoux J.P.** (1996) Polyamine Transport in Mammalian Cells. An Update. *Int J Biochem Cell Biol* **28**: 843-861.
- Shadidy M., Caubit X., Olsen R., Seternes O.M., Moens U. and Krauss S.** (1999) Biochemical Analysis of Mouse FKBP60, a Novel Member of the FKPB Family. *Biochim Biophys Acta* **1446**: 295-307.
- Shantz L.M., Coleman C.S. and Pegg A.E.** (1996) Expression of an Ornithine Decarboxylase Dominant-Negative Mutant Reverses Eukaryotic Initiation Factor 4E-Induced Cell Transformation. *Cancer Res* **56**: 5136-5140.
- Shantz L.M. and Pegg A.E.** (1999) Translational Regulation of Ornithine Decarboxylase and Other Enzymes of the Polyamine Pathway. *Int J Biochem Cell Biol* **31**: 107-122.
- Shou W., Aghdasi B., Armstrong D.L., Guo Q., Bao S., Charng M.J., Mathews L.M., Schneider M.D., Hamilton S.L. and Matzuk M.M.** (1998) Cardiac Defects and Altered Ryanodine Receptor Function in Mice Lacking FKBP12. *Nature* **391**: 489-492.
- Shyng S.L., Sha Q., Ferrigni T., Lopatin A.N. and Nichols C.G.** (1996) Depletion of Intracellular Polyamines Relieves Inward Rectification of Potassium Channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 12014-12019.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J. and Klenk D.C.** (1985) Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem* **150**: 76-85.
- Sommer R. and Tautz D.** (1989) Minimal Homology Requirements for PCR Primers. *Nucleic Acids Res* **17**: 6749.
- Steiner J.P., Hamilton G.S., Ross D.T., Valentine H.L., Guo H., Connolly M.A., Liang S., Ramsey C., Li J.H., Huang W., Howorth P., Soni R., Fuller M., Sauer H., Nowotnik A.C. and Suzdak P.D.** (1997) Neurotrophic Immunophilin Ligands Stimulate Structural and Functional Recovery in Neurodegenerative Animal Models. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 2019-2024.
- Tirode F., Malaguti C., Romero F., Attar R., Camonis J. and Egly J.M.** (1997) A Conditionally Expressed Third Partner Stabilizes or Prevents the Formation of a Transcriptional Activator in a Three-Hybrid System. *J Biol Chem* **272**: 22995-22999.
- Tokunaga F., Goto T., Koide T., Murakami Y., Hayashi S., Tamura T., Tanaka K. and Ichihara A.** (1994) ATP- and Antizyme-Dependent Endoproteolysis of Ornithine Decarboxylase to Oligopeptides by the 26 S Proteasome. *J Biol Chem* **269**: 17382-17385.
- Tucker C.L. and Fields S.** (2001) A Yeast Sensor of Ligand Binding. *Nat Biotechnol* **19**: 1042-1046.
- Uehara A., Fill M., Velez P., Yasukochi M. and Imanaga I.** (1996) Rectification of Rabbit Cardiac Ryanodine Receptor Current by Endogenous Polyamines. *Biophys J* **71**: 769-777.
- van Daalen Wetters T., Macrae M., Brabant M., Sittler A. and Coffino P.** (1989) Polyamine-Mediated Regulation of Mouse Ornithine Decarboxylase Is Posttranslational. *Mol Cell Biol* **9**: 5484-5490.

- van Dam L., Korolev N. and Nordenskiöld L.** (2002) Polyamine-Nucleic Acid Interactions and the Effects on Structure in Oriented DNA Fibers. *Nucleic Acids Res* **30**: 419-428.
- Vidal M., Brachmann R.K., Fattaey A., Harlow E. and Boeke J.D.** (1996) Reverse Two-Hybrid and One-Hybrid Systems to Detect Dissociation of Protein-Protein and DNA-Protein Interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 10315-10320.
- Wach A., Brachat A., Pohlmann R. and Philippsen P.** (1994) New Heterologous Modules for Classical or PCR-Based Gene Disruptions in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1793-1808.
- Wang T., Li B.Y., Danielson P.D., Shah P.C., Rockwell S. Lechleider R.J., Martin J., Manganaro T. and Donahoe P.K.** (1996) The Immunophilin FKBP12 Functions As a Common Inhibitor of the TGF Beta Family Type I Receptors. *Cell* **86**: 435-444.
- Wasserkort R., Hoppe E., Reddington M. and Schubert P.** (1991) Modulation of A1 Adenosine Receptor Function in Rat Brain by the Polyamine, Spermine. *Neurosci Lett* **124**: 183-186.
- Williams K.** (1997) Interactions of Polyamines With Ion Channels. *Biochem J* **325** (Pt 2): 289-297.
- Xu X., Landesman-Bollag E., Channavajhala P.L. and Seldin D.C.** (1999) Murine Protein Kinase CK2: Gene and Oncogene. *Mol Cell Biochem* **191**: 65-74.
- Yanisch-Perron C., Vieira J. and Messing J.** (1985) Improved M13 Phage Cloning Vectors and Host Strains: Nucleotide Sequences of the M13mp18 and PUC19 Vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Young K., Lin S., Sun L., Lee E., Modi M., Hellings S., Husbands M., Ozenberger B. and Franco R.** (1998) Identification of a Calcium Channel Modulator Using a High Throughput Yeast Two-Hybrid Screen. *Nat Biotechnol* **16**: 946-950.
- Zervos A.S., Gyuris J. and Brent R.** (1993) Mxi1, a Protein That Specifically Interacts With Max to Bind Myc-Max Recognition Sites. *Cell* **72**: 223-232.
- Zhu C., Karplus K., Grate L. and Coffino P.** (2000) A Homolog of Mammalian Antizyme Is Present in Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe* but Not Detected in Budding Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Bioinformatics* **16**: 478-481.
- Zhu C., Lang D.W. and Coffino P.** (1999) Antizyme2 Is a Negative Regulator of Ornithine Decarboxylase and Polyamine Transport. *J Biol Chem* **274**: 26425-26430.
- Zuk D. and Jacobson A.** (1998) A Single Amino Acid Substitution in Yeast EIF-5A Results in MRNA Stabilization. *EMBO J* **17**: 2914-2925.

8 Anhang

8.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

| | | | |
|----------------|---|------------|---|
| Ade | Adenin | Ig | Immunglobulin |
| ADH | Alkohol-Dehydrogenase | IL | Interleukin |
| AdoMet | S-Adenosylmethionin | IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid |
| Amp | Ampicillin | | |
| AZ | Antizym | kDa | Kilodalton |
| BSA | Rinderserum-Albumin | l | Liter |
| CK2 | Casein-Kinase 2 | LB | Luria-Bertani |
| CPRG | Chlorphenolrot- β -D-Galaktopyranosid | Leu | Leucin |
| DFMO | Difluoromethylornithin | Lys | Lysin |
| DHFR | Dihydrofolat-Reduktase | M | Mol/Liter |
| DMSO | Dimethylsulfoxid | nm | Nanometer |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure | OAI | Antizym-Inhibitor |
| dNTP | Desoxynukleosid-5'-triphosphat | OAIFL | vollständige Form von Antizym-Inhibitor |
| DSG | 15-Deoxyspergualin | OAISP | Spleißform von Antizym-Inhibitor |
| DTT | Dithiothreitol | OD | optische Dichte |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> | ODC | Ornithin-Decarboxylase |
| EDTA | Ethylendiaminotetraessigsäure | ORF | offener Leserahmen |
| EST | <u>Expressed Sequence Tag</u> | PAO | Polyamin-Oxidase |
| FKS | Fötales Kälberserum | PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| g | Gramm | PDR | <u>P</u> leiotropic <u>D</u> rug <u>R</u> esistance |
| Gal | Galaktose | PEG | Polyethylenglykol |
| Glu | Glukose | PKC | Protein Kinase C |
| GPD | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase | PLP | Pyridoxal-5-Phosphat |
| GST | Glutathion-S-Transferase aus <i>Schistosoma japonicum</i> | Raf | Raffinose |
| h | Stunde | rpm | Umdrehungen pro Minute |
| HA | Hämagglutinin | RNA | Ribonukleinsäure |
| His | Histidin | RT | Raumtemperatur |
| HTS | Hochdurchsatzscreening | SC | Synthetic Complete Hefe-Minimalmedium |
| | | <i>Taq</i> | <i>Thermus aquaticus</i> |

| | |
|-------|---|
| TPA | 12- <i>O</i> -Tetradecanoylphorbol- 13-acetat |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan |
| Trp | Tryptophan |
| U | Units |
| Ura | Uracil |
| UV | Ultraviolett |
| UTR | Untranslatierte Region |
| V | Volt |
| WT | Wildtyp |
| X-Gal | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galaktopyranosid |

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ursula Mangold geb. Krämer
 Geburtsdatum: 16.01.1968
 Geburtsort: Darmstadt

Ausbildung

| | |
|----------------------|---|
| 1974-1978 | Grundschule Nauheim |
| 1978-1980 | Förderstufe der Gerhart-Hauptmann-Schule, Königstädten |
| 1980-1987 | Immanuel-Kant-Gymnasium, Rüsselsheim |
| 1987-1988 | Akademie für Tonkunst Darmstadt |
| 1988-1992 | Studium der Musik, Hauptfach Querflöte, Hochschule für Musik München |
| 1992 | Diplom-Hauptprüfung in Musik |
| 1992-1994 | Studium der Biologie, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt |
| Sept. 1994 | Vordiplom in Biologie |
| 1994-1997 | Fortsetzung im Hauptstudium Biochemie, Johann-Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt |
| Jan. 1997-Sept. 1997 | Diplomarbeit bei Prof. Dr. Dr. H. Fasold, Institut für Biochemie, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt, durchgeführt in der DG Rheumatologie, Hoechst Marion Roussel AG, Wiesbaden Thema: „Identifizierung und Charakterisierung weiterer Leflunomid-bindender Proteine“ |
| Sept. 1997 | Diplom-Hauptprüfung in Biochemie |
| Sept. 1997-Dez. 1997 | Auslandspraktikum, Harvard Medical School, Boston, bei Prof. Dr. A.L. Goldberg Thema: “Role of molecular chaperones in the selective degradation of abnormal proteins in E.coli“ |
| 1998-März 2002 | Promotion bei PD Dr. Michael Meisterernst, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München, durchgeführt am Center for Functional Genomics der Aventis Pharma GmbH, Martinsried Thema: „Funktionelle Charakterisierung des Komplexes aus Ornithin-Decarboxylase, Antizym und Antizym-Inhibitor sowie Identifikation einer Antizym-Inhibitor-Spleißvariante durch Bindung an FK506“ |