

Universität Ulm
Abteilung Pharmakologie und Toxikologie
Leiter: Prof. Dr. Peter Gierschik

**Klonierung, Expression und Charakterisierung
einer Epitop-markierten humanen Isoprenylcystein-
Carboxylmethyltransferase**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
(Dr. med.)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Kristina Radman
Ulm 2006

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. Klaudia Giehl

2. Berichterstatter: PD Dr. Andreas Menke

Tag der Promotion: 20.04.2007

Abkürzungen	
1 Einleitung	1
1.1 Allgemeine Einleitung	1
1.2 Isoprenylierung von monomeren GTP-bindenden Proteinen	2
1.2.1 Isoprenylierung.....	3
1.2.2 Proteolyse.....	4
1.2.3 Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase (Icmt).....	5
1.3 Biologische Bedeutung der posttranslationalen Modifikationen von Proteinen mit C-terminalem CAAX-Motiv	8
1.4 Fragestellung	11
2 Material	12
2.1 Chemikalien	12
2.2 Radioaktiv markierte Chemikalien	15
2.3 Prokaryontische und eukaryontische Zellstämme	15
2.4 Plasmide	16
2.5 Primer	16
2.6 Enzyme	17
2.7 Molekularbiologische Kits	17
2.8 Antikörper	18
2.9 Molekulargewichtsmarker für die Agarose-Gelelektrophorese	18
2.10 Molekulargewichtsmarker für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	19
2.11 Verbrauchsmaterial	20
2.12 Geräte	20
3 Methoden	22
3.1 Methoden der Mikrobiologie	22
3.1.1 Luria-Bertani (LB)-Medium.....	22
3.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien.....	23
3.1.3 Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA.....	23
3.1.4 Selektion von transformierten Bakterien.....	24
3.2 Methoden der Molekularbiologie	25
3.2.1 Präparation von Plasmid-DNA.....	25
3.2.2 Präparation von RNA.....	25
3.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	26
3.2.4 Phenolextraktion von DNA.....	26
3.2.5 Fällung von DNA.....	27
3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	27
3.2.7 Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	28
3.2.8 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	29
3.2.9 Modifizierung des Vektors pBluescript II SK(-) durch T-tailing.....	30
3.2.10 Ligation von DNA.....	30
3.2.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31
3.2.12 Automatisierte Fluoreszenz-DNA-Sequenzierung.....	33
3.3 Methoden der Zellkultur	34
3.3.1 Kultivierung von PANC-1-Zellen.....	34
3.3.2 Insektenzellkultur.....	35

3.4	Proteinexpression in Insektenzellen	36
3.4.1	Transfektion	37
3.4.2	Amplifikation der Baculoviren	38
3.4.3	Infektion von Insektenzellen	38
3.5	Proteinpräparation	39
3.6	Proteinbiochemie	41
3.6.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	41
3.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
3.6.3	Färbung von Polyacrylamidgelen	44
3.6.4	Immunoblotting von Proteinen (<i>Western-Blot</i>)	44
3.7	Nachweis der Methylierungsaktivität der Icmt	47
3.8	Statistik und Auswertung	48
3.9	Software	48
4	Ergebnisse	49
4.1	Klonierung der Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase	49
4.1.1	RNA-Isolierung und Synthese der Icmt-cDNA	49
4.1.2	Ligation der Icmt-cDNA in den Vektor pBluescript II SK/T-tail	51
4.1.3	Klonierung von pBluescript II KS/HA-Icmt	52
4.1.4	Klonierung von pVL1393/HA-Icmt	55
4.2	Expression von HA-Icmt in Baculovirus-infizierten Sf9-Zellen	57
4.2.1	Expression von HA-Icmt und Präparation von HA-Icmt-haltigen Zelllysaten	57
4.2.2	Nachweis der rekombinanten HA-Icmt in der partikulären Fraktion von Baculovirus-infizierten Sf9-Insektenzellen	58
4.3	Nachweis der Aktivität von HA-Icmt und funktionelle Charakterisierung des Enzyms	62
4.3.1	Nachweis der Methylierungsaktivität der partikulären HA-Icmt	63
4.3.2	Charakterisierung der Enzymreaktion	66
4.3.2.1	Methylierungsaktivität in Abhängigkeit von der HA-Icmt-Menge	67
4.3.2.2	Methylierungsaktivität der HA-Icmt in Abhängigkeit von der Reaktionszeit	69
4.3.2.3	Methylierungsaktivität in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur	71
4.3.2.4	Methylierungsaktivität der HA-Icmt in Abhängigkeit von der Substratkonzentration	75
5	Diskussion	79
5.1	Klonierung der HA-Icmt-cDNA	79
5.2	Expression der rekombinanten HA-Icmt in Sf9-Insektenzellen	81
5.3	Methylierungsreaktion durch HA-Icmt	83
5.4	Ausblick	88
6	Zusammenfassung	89
7	Literaturverzeichnis	91
8	Anhang	98

Abkürzungen

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
AcNPV	<i>Autographa californica nuclear polyhedrosis virus</i>
AdoMet	S-Adenosyl-L-methionin
[³ H]AdoMet	S-Adenosyl-L-[methyl- ³ H]methionin
AFC	N-Acetyl-S-trans,trans-L-farnesylcystein
AFC-Icmt	N-Acetyl-S-trans,trans-L-farnesylcystein- Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
Bq	Bequerel
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calciumionen
CAAX	Tetrapeptid mit einer Sequenz aus Cystein, zwei aliphatischen Aminosäuren, irgendeiner Aminosäure
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1- propansulfonat
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CMF-PBS	Calcium- und Magnesium-freie Phosphat- gepufferte Saline

Abkürzungen

CO ₂	Kohlendioxid
COS-1-Zellen	fibroblastäre Zelllinie von Affen der Familie der <i>Simiadae</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
Cu ²⁺	Kupferionen
CuSO ₄	Kupfer-II-sulfat
dA	Desoxyadenosin
DAG	Diacylglycerol
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleotid
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DTE	1,4-Dithioerythritol
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
E	L-Glutaminsäure
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis(-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FMLP	N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin
FPP	Farnesylpyrophosphat
FTase	Farnesyltransferase
g	Erdbeschleunigung (9.81 m/s ²)

Abkürzungen

G	Guanosin
β-Gal	β-Galaktosidase
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GDI	<i>GDP dissociation inhibitor</i>
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP-Icmt	<i>green fluorescent-protein-Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase-Fusionsprotein</i>
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GGTase	Geranylgeranyltransferase
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GST	Glutathion-S-transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	GTP-bindendes und –hydrolysierendes Protein
h	Stunde
H	L-Histidin
³ [H]	Tritium
³ [H]-AFC	³ [H]- <i>N-Acetyl-S-trans,trans-L-farnesylcystein</i>
HA	Influenzavirus-Hämagglutinin-Epitop
HA-Icmt	Hämagglutinin-Epitop-markierte Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase
HA-Icmt-cDNA	<i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure der Hämagglutinin-Epitop-markierten Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase
HCL	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HL-60-Zellen	humane promyeloische leukämische Zelllinie
HMW	<i>high molecular weight marker</i>
H ₂ O	Wasser
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
<i>hrce1</i>	<i>human ras and α-factor converting enzyme 1</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
I	L-Isoleucin

Abkürzungen

Icmt	Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase
Icmt ^{-/-}	Icmt-Gen-Defizienz
Icmt-cDNA	<i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure der Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase
Icmt-mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure der Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase
Icmt-PCR	<i>polymerase chain reaction</i> /Polymerase-Kettenreaktion der Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K _m	<i>Michaelis-Konstante</i>
lacZ	β -Galaktosidase-Gen
LB-Agarplatten	Luria-Bertani-Agarplatten
LB-Amp-Medium	Luria-Bertani-Medium mit Ampicillin
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LMW	<i>low molecular weight marker</i>
μ Ci	Mikrocurie
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromol
M	Mol pro Liter
mCi	Millicurie
MEK	<i>mitogen activated protein kinase kinase</i>
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesium-II-Chlorid
min	Minute
ml	Milliliter

Abkürzungen

mm	Millimeter
mM/mmol	Millimol
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
m/V	Masse pro Volumen
<i>myc</i>	Protoonkogen von <i>myelocytomatosis virus aviarius</i>
N	L-Asparagin
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotin-amid-adenin-dinucleotidphosphat-hydrid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
nM/nmol	Nanomol
OD	optische Dichte
P	L-Prolin
P100	partikuläre Fraktion entstanden aus Zellhomogenaten durch Zentrifugation bei 100 000 x g
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> / Phosphat-gepufferte Saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> /Polymerase-Kettenreaktion
PI-3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-kinase
PI-5-Kinase	Phosphatidylinositol-5-kinase
PLC	Phospholipase C
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pSK	pBluescript II-Vektor
pSK/HA	pBluescript II-Vektor mit Hämagglutinin-Epitop
PtdIns	Phosphatidylinositol
PtdIns P	Phosphatidylinositol-4-phosphat
PtdIns P_2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
pVL1393/HA-Icmt	Plasmid pVL1393, welches die DNA der Hämagglutinin-Epitop-markierten Isoprenylcystein Carboxylmethyltransferase trägt
Q	L-Glutamin

Abkürzungen

R	L-Arginin
Rab	<i>Ras-related GTPase</i>
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
Raf	<i>Serin/Threonin protein kinase</i>
Rap	<i>Ras-related oncogene</i>
Ras	<i>rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
<i>rce1</i>	<i>ras and α-factor converting enzyme 1</i>
Rho	<i>Ras-homologous protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukleinsäure-spaltendes Enzym
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transkriptase polymerase chain reaction/</i> Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
S100	lösliche Fraktion entstanden aus Zellhomogenaten durch Zentrifugation bei 100 000 x g
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>Sf9</i> -Zellen	Ovarialzellen von <i>Spodoptera frugiperda</i>
<i>ste14</i>	Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase-Gen in <i>Spodoptera frugiperda</i>
T	Temperatur
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TCM	Tris-Calcium-Magnesium
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
<i>T-tail</i>	Desoxythymidinrest
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-monolaurat

Abkürzungen

u	<i>unit</i>
UE	Untereinheit
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VF	Verdünnungsfaktor
Vol.	Volumen
VT	Volumenteil
V/V	Volumen pro Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp-Form
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktosid
Y	L-Tyrosin
Zn ²⁺	Zinkionen
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einleitung

In eukaryontischen Organismen werden viele Proteine nach ihrer Translation modifiziert und erlangen auf diese Weise oft erst ihre biologische Funktion. Zu den am besten untersuchten posttranslationalen Modifikationen zählen Lipid-Modifikationen, Glykosylierungen, Phosphorylierungen, Acetylierungen, Carboxylierungen und die Proteolyse von Proteinen.

Die kovalente Bindung von Lipiden an Proteine ist eine wichtige posttranslationale Modifikation, die bei zahlreichen Signaltransduktionsproteinen, z.B. γ -Untereinheiten von heterotrimeren G-Proteinen, monomeren GTP-bindenden Proteinen, Proteinkinasen oder Laminen zu beobachten ist (Clarke 1992, Casey *et al.* 1995 a, Rando 1996, Zhang und Casey 1996, Fu und Casey 1999, Sinensky 2000). Die Lipid-Modifikation von Proteinen wird nach der Art des angebrachten Lipids benannt und umfasst folgende Modifikationen: (i) die Palmitoylierung, bei der an einem Cystein-Rest des Proteins ein gesättigter C_{16} -Rest durch eine labile Thioester-Bindung angefügt wird, (ii) die Myristoylierung, bei der cotranslational eine Amidbindung zwischen einem N-terminalen Glycin und einem C_{14} -Rest entsteht, (iii) die Modifikation von Proteinen durch Glykosyl-Phosphatidylinositol-Anker und (iv) die Prenylierung. Bei der Prenylierung entsteht posttranslational eine stabile Thioether-Bindung zwischen einem C-terminalen Cystein und entweder einem C_{15} -Farnesyl-Isoprenoid oder einem C_{20} -Geranylgeranyl-Isoprenoid (Casey 1994, Casey *et al.* 1995 a; 1995 b, Casey und Seabra 1996, Zhang und Casey 1996, Fu und Casey 1999).

Die Mehrzahl der prenylierten Proteine gehört zu einer Gruppe von Proteinen mit einem C-terminalen CAAX-Motiv, welches als Signalsequenz für die Prenylierung dient. Das CAAX-Motiv beschreibt folgende Aminosäuresequenz: Cystein = C, zwei aliphatische Aminosäuren = A und eine beliebige Aminosäure = X (Adamson *et al.* 1992, Kato *et al.* 1992, Pillinger *et al.* 1994). Die Gruppe der prenylierten CAAX-Proteine umfasst eine Vielzahl von Molekülen, die hauptsächlich an zellulären Membranen lokalisiert sind, z.B. nukleäre Lamine, Proteine der Familie der heterotrimeren GTP-bindenden Proteine (G-Proteine), Proteine der Familie der monomeren GTP-bindenden Proteine, Proteinkinasen und Phosphatasen, sowie weitere Proteine, die an Signaltransduktionskaskaden beteiligt sind (Maltese 1990, Adamson *et al.* 1992, Clarke 1992, Casey 1994, Fu und Casey 1999).

Die Prenylierung an der Signalsequenz CAAX wird durch drei Enzyme katalysiert, die diese C-terminale Sequenz im Protein erkennen und die Modifikation in drei aufeinander folgenden Schritten katalysieren. Die Prenylierung im Zytosol erfolgt durch die Bindung eines Farnesyl-Restes oder eines Geranylgeranyl-Restes an Proteine. Diese Lipideinheit wird als *precursor* im Zytosol synthetisiert. Die Reaktion wird durch eine von zwei spezifischen CAAX-Prenyltransferasen (Farnesyltransferase, im folgenden als FTase bezeichnet, bzw. Geranylgeranyltransferase, im folgenden als GGTase bezeichnet) katalysiert. Nach Translokation der prenylierten Proteine an das endoplasmatische Retikulum (ER) werden in einem zweiten Schritt die drei C-terminalen Aminosäuren des Proteins durch die CAAX-spezifische Protease *ras and a-factor converting enzyme 1* (Rce 1) abgespalten und das prenylierte Cystein im dritten und letzten Schritt durch die Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase (Icmt) methyliert (Clarke 1992, Fu und Casey 1996, Dai *et al.* 1998, Romano *et al.* 1998, Kim *et al.* 1999, Otto *et al.* 1999, Chen *et al.* 2000).

1.2 Isoprenylierung von monomeren GTP-bindenden

Proteinen

Die posttranslationale Modifikation von Proteinen durch Isoprenylierung findet bei einer großen Zahl von Proteinen statt. Zu den am besten untersuchten Substraten der posttranslationalen Lipid-Modifikation gehören die GTP-bindenden und -hydrolysierenden Proteine (GTPasen), die in mehrere Subfamilien unterteilt werden (Bourne *et al.* 1991). Ein Beispiel sind Ras-Proteine. *Ras*-Gene sind ursprünglich als Onkogene in Virus-infizierten Sarkomen der Ratte gefunden und dort als tumorauslösendes Prinzip erkannt worden (Barbacid 1987). Die vier Produkte der drei funktionellen menschlichen *ras*-Gene, H-Ras, N-Ras, sowie K-Ras4A und K-Ras4B, die durch alternatives *RNA splicing* entstehen, sind Proteine mit einer Molekularmasse von ca. 21 kDa und gehören zur Familie der monomeren GTP-bindenden Proteine (Bourne *et al.* 1991). Wegen der funktionellen Bedeutung der Lipid-Modifikation dieser GTPasen, werden im folgenden die drei Schritte der posttranslationalen Lipid-Modifikation am Beispiel dieser Proteine vorgestellt.

1.2.1 Isoprenylierung

Bei dem ersten Schritt der Lipid-Modifikation monomerer GTPasen handelt es sich um eine Isoprenylierung, die durch eine Isoprenyltransferase katalysiert wird. Bei der Reaktion kommt es zur Bildung eines stabilen Thioethers zwischen der Sulfhydrylgruppe eines Cystein-Restes, welcher an Position -4 vom C-Terminus des Akzeptor-Proteins lokalisiert ist, und einem C₁₅-Farnesylisoprenoid oder einem C₂₀-Geranylgeranylisoprenoid. Es sind drei unterschiedliche Isoprenyltransferasen bekannt (Reiss *et al.* 1990, Yokoyama *et al.* 1992), die eine irreversible Prenylierung katalysieren und in zwei funktionelle Klassen eingeteilt werden können (Glomset und Farnsworth 1994, Zhang und Casey 1996):

1. Farnesyltransferase (FTase) und Geranylgeranyltransferase I (GGTaseI)
2. Geranylgeranyltransferase II (GGTaseII)

Die FTase transferiert einen Farnesyl-Rest eines Farnesylpyrophosphats (FPP) an den Cystein-Rest des CAAX-Motivs, wenn es sich bei dem X um Methionin, Serin, Alanin oder Glutamin handelt (Reiss *et al.* 1990, Casey *et al.* 1995 a; 1995 b, Zhang und Casey 1996, Sinensky 2000). Die GGTaseI transferiert einen Geranylgeranyl-Rest eines Geranylgeranylpyrophosphats (GGPP) an den Cystein-Rest des CAAX-Motivs, wenn das X Leucin oder Phenylalanin ist. Beide Enzyme erkennen das Substrat am C-terminalen CAAX-Motiv. Substrat der GGTaseII sind Proteine mit einem CC-, bzw. CXC-Motiv. Dazu gehören unter anderem die monomere GTPasen der Rab-Familie, die an den beiden Cystein-Resten geranylgeranyliert werden (Casey und Seabra 1996).

Die FTase und die GGTaseI haben eine ähnliche molekulare Struktur und ähnliche biochemische Eigenschaften (Casey *et al.* 1995 a, Fu und Casey 1999). Es handelt sich dabei um Heterodimere, bestehend aus einer α -Untereinheit und einer β -Untereinheit. Beiden Enzymen gemeinsam ist die 48 kDa große α -Untereinheit, die durch das Gen *ram2* kodiert wird. Sie unterscheiden sich aber in der β -Untereinheit, die bei der FTase 46 kDa und bei der GGTaseI 43 kDa groß ist. Die β -Untereinheit der FTase wird durch das Gen *ram1*, die β -Untereinheit der GGTaseI durch *cdc43* kodiert (Yokoyama *et al.* 1992, Casey und Seabra 1996, Fu und Casey 1999). FTase und GGTaseI benötigen für ihre Funktion Metallionen. Für die Funktion der FTase sind Zink- und Magnesiumionen, für die GGTaseI sind lediglich Zinkionen erforderlich (Casey und Seabra 1996, Zhang und Casey 1996, Sinensky 2000).

Die GGTaseII besteht ebenfalls aus zwei Untereinheiten, kodiert durch die Gene *bet4* und *bet2*. Die α -Untereinheit ist 60 kDa groß, die β -Untereinheit ist 38 kDa groß. Für die Aktivität der GGTaseII sind Magnesiumionen notwendig (Casey und Seabra 1996).

In eukaryotischen Zellen werden 70-80 % der prenylierten Proteine geranylgeranyliert (Clarke 1992, Zhang und Casey 1996). Substrate der FTase sind unter anderem monomere GTPasen der Ras-Familie, Lamin B, Pheromone und andere Signaltransduktionsproteine; die GGTaseI katalysiert Geranylgeranylierungen von γ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine, sowie von monomeren GTPasen der Ras- und Rac-/Rho-Familie (Fu und Casey 1999). Unter den Ras-Proteinen zeigt interessanterweise K-Ras4B eine 20-fach höhere Affinität zur FTase als H-Ras, K-Ras4A und N-Ras (Zhang und Casey 1996). Zwischen der FTase und der GGTaseI liegt eine Kreuzspezifität für das Substrat vor. So kann K-Ras4B, obwohl es als terminale Aminosäure ein Methionin besitzt, geranylgeranyliert werden, wenn die FTase durch Inhibitoren blockiert ist (Zhang und Casey 1996, Fu und Casey 1999). K-Ras4A und N-Ras sind bevorzugt Substrate der FTase, können aber *in vitro* auch Substrate der GGTaseI sein. Hier werden aber deutlich höhere K_m -Werte im Vergleich zu den K_m -Werten der FTase beobachtet (Zhang und Casey 1996, Fu und Casey 1999). Auch RhoB kann, trotz eines C-terminalen Leucins, sowohl farnesyliert als auch geranylgeranyliert werden (Fu und Casey 1999).

1.2.2 Proteolyse

Nach Translokation der prenylierten Proteine an das endoplasmatische Retikulum werden in einem zweiten Modifikationsschritt die drei terminalen Aminosäuren des CAAX-Motivs durch die CAAX-spezifische Thiolprotease abgespalten (Kim *et al.* 1999, Otto *et al.* 1999). Das kodierende Gen wird als *ras and a-factor converting enzyme 1* (Rce1) bezeichnet und wurde zum ersten Mal in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert (Otto *et al.* 1999). Bei dem humanen Homolog handelt es sich um das Gen *hrce1* (Otto *et al.* 1999). Das Expressionsprodukt hRce1 ist *ca.* 35 kDa groß und wird ubiquitär in allen Geweben exprimiert, mit besonders hoher Expression in kardialem Gewebe (Kim *et al.* 1999). Die Protease ist ein polytopes, integrales Membranprotein, welches an der zytosolischen Oberfläche des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist (Otto *et al.* 1999, Kim *et al.* 1999). Die hRce1 hydrolysiert irreversibel die terminalen drei Aminosäuren von Proteinen mit der CAAX-Sequenz. Es konnte gezeigt werden, dass Zn^{2+} für diese Aktivität

notwendig ist (Farh *et al.* 1995). Die Proteolyse durch die hRce1 ist spezifisch für prenylierte Proteine. Dabei werden sowohl farnesylierte, als auch geranylgeranylierte Proteine mit vergleichbaren K_m -Werten hydrolysiert (Otto *et al.* 1999). Zu der großen Anzahl an Substraten gehört farnesyliertes K-Ras, farnesyliertes N-Ras, farnesyliertes H-Ras, die farnesylierten und geranylgeranylierten γ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine, geranylgeranyliertes K-Ras und auch geranylgeranyliertes Rap16.

1.2.3 Isoprenylcystein-Carboxymethyltransferase (Icmt)

In einem dritten, reversiblen Modifikationsschritt wird das prenylierte und proteolysierte Protein an dem C-terminalen Cystein carboxymethyliert. Die Carboxymethylierung wird durch die Isoprenylcystein-Carboxymethyltransferase (Icmt) katalysiert (Philips *et al.* 1993, Volker und Stock 1995, Dai *et al.* 1998, Bergo *et al.* 2000 a; 2000 b). Die Icmt gehört zu einer von drei verschiedenen Klassen von Protein-Carboxymethyltransferasen, die eine Methylgruppe von *S*-Adenosyl-L-methionin (AdoMet) an eine freie Carboxylgruppe von Proteinen binden (Aswad 1989, Barten und O`Dea 1990). Diese Proteine wurden erstmals 1965 von Axelrod und Daly beschrieben (Barten und O`Dea 1990). Die erste Klasse der Protein-Carboxymethyltransferasen wurde in Bakterien identifiziert, die chemotaktisch aktiv sind. Diese Methyltransferase methyliert die γ -Carboxylgruppe spezifischer Glutamat-Reste von Chemorezeptoren, die mit Membranen assoziiert sind. Die zweite Klasse der Proteincarboxyl-Methyltransferasen konnte ubiquitär in eukaryontischen Gewebetypen und in Bakterien nachgewiesen werden (Aswad 1989, Barten und O`Dea 1990), und zeigt eine ausgeprägte Spezifität für L-Isoaspartat. Durch Modifikation der Seitenketten von Aspartat- oder Glutamat-Resten reguliert diese Methyltransferase die Aktivität von Proteinen (Aswad 1989, Barten und O`Dea 1990). Die dritte Klasse der Protein-Carboxymethyltransferasen wurde durch die Beteiligung an der Methylierung von carboxyterminalen Cystein-Resten bei Pheromonen von *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt (Dai *et al.* 1998, Romano und Michaelis 2001). Diese Isoprenylcystein-Carboxymethyltransferase (Icmt) ist das Enzym, welches den terminalen Schritt der Prenylierung von Proteinen mit CAAX-Motiv katalysiert.

Dai *et al.* klonierte 1998 (Dai *et al.* 1998) zum ersten Mal die cDNA einer Isoprenylcystein-Carboxymethyltransferase (Icmt) aus humanen myeloischen HL60-Zellen mit Hilfe von Primern, die auf der Sequenz des Gens *stel4* von *Saccharomyces*

cerevisiae basierten. Das Gen *ste14* kodiert für die Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase in dieser Hefe. Die Expression der humanen Icmt wurde durch Northernblot-Analysen verifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass HL60-Zellen zwei Icmt-mRNAs mit einer Größe von 3,6 kb und 5 kb exprimierten. Bei diesen zwei mRNAs soll es sich um die mRNAs verwandter Gene oder um mRNAs handeln, die durch alternatives RNA *splicing* entstehen (Dai *et al.* 1998). Beide Transkripte konnten ubiquitär in allen untersuchten humanen Geweben nachgewiesen werden (Dai *et al.* 1998). Die höchsten Konzentrationen wurden bei Säugern in neuronalen und endokrinen Geweben gemessen. Vor allem im Kleinhirn von Säugetieren konnte eine hohe Methyltransferase-Aktivität nachgewiesen werden (Pillinger *et al.* 1994). Mit Hilfe eines polyklonalen Antiserums wurde ein 33 kDa großes Protein detektiert. Durch Generierung eines *green fluorescent-protein* (GFP)-Icmt-Fusionsproteins und Nachweis der Lokalisation dieses Fusionsproteins und der endogenen Icmt wurde gezeigt, dass die Icmt ein integrales Membranprotein ist und in COS-1-Zellen an Membranen des ER, des Golgi-Apparates und des Zellkerns lokalisiert ist (Dai *et al.* 1998). Die intrazelluläre Lokalisierung der Icmt ist stets auf die membranäre Zellfraktion beschränkt, zeigt jedoch eine für verschiedene Gewebe typische Lokalisierung. Im ZNS und in der Leber ist sie am ER nachweisbar, wohingegen die Icmt in neutrophilen Granulozyten in der Plasmamembran der Zellen lokalisiert ist. Die Icmt ist auch im Nukleolus zu finden, jedoch nur bei noch undifferenzierten Zellen (Pillinger *et al.* 1994, Volker und Stock 1995).

Die ersten 65 der 284 Aminosäuren großen Icmt sind zu 36 % identisch mit den Aminosäuren 750 bis 821 des humanen *band 3 anion transporter*. Diese Aminosäuren (750-821) des *band 3 anion transporter* stellen die elfte und zwölfte von insgesamt vierzehn gut beschriebenen, in der Membran verankerten Protein-Domänen dar. Daraus lässt sich ableiten, dass die Icmt ein in der Membran verankertes Protein sein könnte. Diese Vermutung wird durch die Membranlokalisierung sowohl der humanen Icmt (Dai *et al.* 1998), als auch des homologen Proteins Icmt aus *Saccharomyces cerevisiae* (Romano und Michaelis 2001) am ER bestätigt.

Aus einem Vergleich mit der Membrantopologie von Ste14p aus Hefen konnten Rückschlüsse auf die Struktur der Icmt gezogen werden. Aufgrund der großen Homologie zu Ste14p ergab sich, dass die Icmt 6 hydrophobe Sequenzabschnitte besitzt, die die transmembranären Domänen darstellen und den 6 in der Membran verankerten Domänen von Ste14p entsprechen (Romano und Michaelis 2001). Ein weiteres Kennzeichen der Methyltransferasen sind zwei *hairpin loops*, die durch die Aminosäuren N191 und P192

induziert werden und zur Ausbildung zweier transmembranärer *Helices* führen. Weitere, für die Funktion der Icmt entscheidende Reste wurden durch Mutationsanalysen identifiziert. Zu ihnen gehören G31, G132, P173 und E213 (Dai *et al.* 1998, Bergo *et al.* 2000 b, Romano und Michaelis 2001). Bei dem Vergleich der Sequenzen von Icmt, Ste14p und anderen Icmt-Homologen konnte die Region RHPxY-EE am C-Terminus von Ste14p identifiziert werden. Dieser Bereich ist unter den Icmts konserviert. Mutationsanalysen zeigten, daß diese Region entscheidend für die Ste14p-Aktivität und vermutlich auch für die Aktivität der Icmt von Säugerzellen ist (Dai *et al.* 1998, Romano und Michaelis 2001). Eine Icmt-Aktivität kann in allen eukaryontischen Zellen nachgewiesen werden. Ungleich der bakteriellen Glutamat- und der bakteriellen bzw. eukaryontischen Isoaspartat-Carboxylmethyltransferase, die in der zytosolischen Fraktion zu finden sind, ist die Icmt in Hefen und Säugetierzellen an Membranen gebunden. Die Bindung an eine intakte Lipidmembran ist Bedingung für die enzymatische Aktivität (Philips *et al.* 1993, Pillinger *et al.* 1994). Interessant ist, dass aufgrund der hohen Spezifität der Icmt alternative Enzymwege eine Icmt-Defizienz nicht kompensieren können. Icmt-Defizienz führt bei Mäusen zur Letalität im frühen Embryonalstadium (Pillinger *et al.* 1994, Bergo *et al.* 2000 a; 2000 b).

Substrate der Icmt sind isoprenylierte und proteolytierte Proteine mit einem C-terminalen CAAX-Motiv. Dabei spielt es keine Rolle, ob es sich um farnesylierte oder geranylgeranylierte Proteine handelt (Clarke 1992, Pillinger *et al.* 1994, Bergo *et al.* 2002). Aufgrund von Sequenzübereinstimmungen zwischen dem Pheromon von *Saccharomyces cerevisiae* und Ras-Proteinen, die sowohl in Hefen, wie auch Säugetierzellen vertreten sind, wurde vermutet, dass auch Ras-Proteine und andere GTP-bindenden Proteine carboxymethyliert werden. Diese Methylierung spielt eine wichtige Rolle, da dadurch die Bindung von diesen Proteinen an die Plasmamembran und dadurch auch ihr Aktivitätszustand bestimmt wird (Parish und Rando 1996, Dai *et al.* 1998).

Die Proteine H-Ras, K-Ras4A und N-Ras werden zusätzlich in einem vierten und letzten Modifikationsschritt palmitoyliert. Die Palmitoylierung erfolgt bei H-Ras am C181 und C184, bei K-Ras4A am C180 und bei N-Ras am C181 (Hancock *et al.* 1989). Dabei handelt es sich um eine instabile Bindung zwischen dem Cystein und dem Palmitoyl-Rest (Nancy *et al.* 2002). Durch diese Modifikation kann H-Ras mit Membranen interagieren, die Isoprenylierung alleine ist dafür nicht ausreichend (Adamson *et al.* 1992, Siddiqui *et al.* 1998).

1.3 Biologische Bedeutung der posttranslationalen Modifikationen von Proteinen mit C-terminalem CAAX-Motiv

Die meisten prenylierten Proteine sind an der zytosolischen Seite der Plasmamembran und intrazellulärer Membranen lokalisiert und die Isoprenylierung ist essentiell für diese Membranbindung (Hancock *et al.* 1989, Hancock *et al.* 1991, Clarke 1992, Zhang und Casey 1996, Fu und Casey 1999). Durch Erhöhung der Hydrophobizität durch Prenylierung und Neutralisierung der negativen Ladung der C-terminalen Carboxylgruppe durch Methylierung des Cystein-Restes sind Interaktionen mit membranären Phospholipiden an der Membrannenseite möglich (Volker und Stock 1995, Rando 1996). Eine Analyse der einzelnen Schritte der C-terminalen Modifikation von K-Ras in Bezug auf die Membranbindung des Proteins zeigte, dass die Isoprenylierung durch die FTase zu einer 20 %igen Membranbindung führte. Eine zusätzliche Proteolyse durch die hRceI erhöhte die Bindung auf 40 % und erst eine zusätzliche Methylierung des prenylierten und proteolysierten K-Ras durch die Icmt führte zu einer 80-100 %igen Membranbindung (Zhang und Casey 1996). Im Gegensatz zu geranylgeranylierten Proteinen ist die zusätzliche Proteolyse und Methylierung für die Membranaffinität von farnesylierten Proteinen, z.B. Ras-Proteinen und bestimmte G-Protein- γ -Untereinheiten (γ_1 , γ_C , γ_{11}) von besonderer Bedeutung, da geranylgeranylierte Proteine auch in unmethyliertem Zustand eine höhere Bindungsfähigkeit an Membranen besitzen (Zhang und Casey 1996, Dai *et al.* 1998). Unklar ist allerdings, warum Ras-Proteine an der Plasmamembran lokalisiert sind, während andere monomere GTPasen, z.B. Rab-Proteine, die ebenfalls der C-terminalen Lipid-Modifikation unterliegen, an unterschiedlichen intrazellulären Membranen vorkommen (Fu und Casey 1999). Möglicherweise sind für die Erkennung und Spezifität der Bindung spezifische membranständige Rezeptoren verantwortlich, die weitere strukturelle Merkmale in den GTPasen erkennen (Thissen *et al.* 1997, Zhang und Casey 1996, Fu und Casey 1999). Eine andere Möglichkeit wäre die Interaktion mit Transportproteinen oder Elementen des Zytoskeletts (Fu und Casey 1999, Chen *et al.* 2000). Ein Indiz für die Gültigkeit dieser Hypothese ist, dass die Destabilisierung des Mikrotubuli-Netzwerkes durch Vinca-Alkaloide oder die Stabilisierung der Mikrotubuli durch Taxol zu einer Beeinträchtigung der morphologischen Veränderungen durch

onkogenes Ras führt (Fu und Casey 1999). Die Behandlung humaner leukämischer oder ovarieller Zellen mit Taxol führt zu einer Verminderung von K-Ras in der Zelle (Fu und Casey 1999). Prenyliertes K-Ras interagiert spezifisch mit Tubulin bzw. Mikrotubuli (Thissen *et al.* 1997, Fu und Casey 1999, Chen *et al.* 2000). Voraussetzung für diese Interaktion ist zum einen die Polylysin-Region am hypervariablen C-Terminus von Ras, zum anderen die Neutralisierung der negativen Ladung am C-Terminus bei der Carboxymethylierung durch die Bildung eines Methylesters. Die Bedeutung der Interaktion von K-Ras mit Mikrotubuli und die Bedeutung der Icmt-vermittelten Methylierung ist noch nicht geklärt. Eine mögliche Funktion könnte der Transport von vollständig modifiziertem K-Ras entlang von Mikrotubuli zur Plasmamembran sein. Da in Icmt-defizienten Zellen aber ein deutlicher Anteil von K-Ras an der Plasmamembran lokalisiert ist, werden durch die Bindung von K-Ras an Mikrotubuli möglicherweise weitere Prozesse, z.B. Signaltransduktionsprozesse, reguliert (Chen *et al.* 2000).

Neben der Veränderung der Hydrophobizität wird durch eine korrekte posttranslationale Isoprenylierung auch die Funktion von regulatorischen Proteinen beeinflusst, die beispielsweise an der Zellteilung, der hormonalen Sekretion oder der Chemotaxis beteiligt sind (Barten und O`Dea 1990, Parish und Rando 1994, Rando 1996, Chen *et al.* 2000, Kramer *et al.* 2003). Die meisten prenylierten Proteine spielen darüber hinaus eine wichtige Rolle in Signaltransduktionsprozessen (Rando 1996, Zhang und Casey 1996). Auch Rac1, welches durch die Superoxid-bildende NAD(P)H-Oxidase bei der Expression des *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) in endothelialen Zellen beteiligt ist, wird durch Icmt methyliert (Ahmad *et al.* 2002).

Die Proteolyse-Reaktion durch die Rce1 ist Voraussetzung für die folgende Carboxymethylierung. Über die molekularen Eigenschaften der Rce1 war lange Zeit wenig bekannt (Farh *et al.* 1995). Untersuchungen an Ras-Proteinen ergaben eine Fehllokalisierung der Proteine in der Zelle und somit eine Verminderung ihrer transformierenden Aktivität in Abwesenheit der Protease (Otto *et al.* 1998, Kim *et al.* 1999, Bergo *et al.* 2000 a; 2000 b). In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass eine Rce1-Defizienz bei Mäusen bei ungestörter Organentwicklung aufgrund von Störungen des zellulären Metabolismus zur Letalität im späten embryonalen Stadium führt (Kim *et al.* 1999, Bergo *et al.* 2000 a; 2000 b, Bergo *et al.* 2002, Lin *et al.* 2002). Interessanterweise zeigen dagegen homozygote Icmt-*knock-out*-Mäuse eine schwere Störung der intrauterinen Entwicklung, die schon im mittleren Gestationsalter bei ungestörter Hämatopoese und funktionierendem Herz-Kreislauf-System letal ist (Bergo *et al.* 2000 a). Darüber hinaus konnte gezeigt werden,

dass die Icm1-Proteinexpression in zerebralem, hepatischen, testikulärem und muskulärem Gewebe invers korreliert mit der Aktivität der Icm1 in diesem Gewebe und der Fähigkeit dieser Gewebstypen zur Organentwicklung bzw. zur Entwicklung von Organsystemen beizutragen (Bergo *et al.* 2000 a). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ektopisch in Icm1^{-/-} Stammzellen exprimierte GFP-K-Ras4A-Fusionsproteine nicht mehr an Membranen gebunden wurden, aber andere Ras-Isoformen noch mit der Membran interagierten (Bergo *et al.* 2000 b).

Die Methylierung ist der einzige reversible und somit dynamische Modifikationsschritt der posttranslationalen C-terminalen CAAX-Modifikation. Im Gegensatz dazu ist die Isoprenylierung und die Proteolyse irreversibel. Es ist anzunehmen, dass die Icm1 durch die dynamische Methylierung von isoprenylierten Proteinen an einer großen Zahl regulatorischer Vorgänge in der Zelle beteiligt ist (Volker und Stock 1995, Casey *et al.* 1995 a, Hancock 2003). Eine direkte Verbindung zwischen Rezeptoraktivierung und der Carboxymethylierung von Ras konnte in neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. In Gegenwart von *N*-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (FMLP), nimmt der Anteil carboxymethylierten und somit aktiven Ras zu (Philips *et al.* 1993, Lederer *et al.* 1994, Pillinger *et al.* 1994, Volker und Stock 1995). Andere methylierte Signaltransduktionsproteine spielen bei der endokrinen Funktion des Pankreas eine Rolle. So ist die reversible Methylierung von G-Protein- γ -Untereinheiten für die sekretorischen Prozesse des Pankreas erforderlich. Die Behandlung von frisch isolierten Zellen aus Pankreas-Azini von Ratten mit Ethionin, welches die zelluläre Methylierung hemmt, führt durch Inhibition der Amylase-Sekretion zur akuten hämorrhagisch-nekrotisierenden Pankreatitis (Capdevila *et al.* 1997).

1.4 Fragestellung

Die Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase (Icmt) katalysiert den dritten und letzten Schritt der posttranslationalen Lipid-Modifikation des C-terminalen CAAX-Motivs an Position -4 am Carboxyterminus von Proteinen mit einem CAAX-Motiv. Diese ist von entscheidender funktioneller Bedeutung für eine große Zahl von Proteinen, die an wichtigen regulatorischen Vorgängen in der Zelle beteiligt sind. Die Erforschung der funktionellen Bedeutung der posttranslationalen C-terminalen CAAX-Modifikation stellt eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansatzpunkte dar, da diese Modifikation entscheidend für die Funktion von Onkogenen und anderen krankheitsassoziierten Proteinen ist. In der vorliegenden Arbeit sollte die cDNA der humanen Icmt kloniert werden und das Protein als HA-Epitop-markiertes Protein in *Sf9*-Insektenzellen exprimiert werden. Im weiteren Verlauf sollte die rekombinante HA-Icmt auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, ein Substrat *in vitro* zu methylieren.

2 Material

2.1 Chemikalien

Acrylamidlösung 30 % (m/V)	Roth, Karlsruhe
AdoMet (<i>S</i> -Adenosyl-L-methionin)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
AFC (<i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> - <i>trans</i> , <i>trans</i> -L-farnesylcystein)	Calbiochem, La Jolla, USA
Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose, <i>molecular biology grade</i>	Eurobio, Raunheim
Ampicillin, Natriumsalz	Sigma, Taufkirchen
Aprotinin	Bayer, Leverkusen
APS (Ammoniumpersulfat)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
ATP (Dinatriumsalz)	Roche Diagnostics, Mannheim
Bacto-Tryptone	Difco, Detroit, USA
Bacto Yeast Extract	Difco, Detroit, USA
BCA-Protein Assay Reagent A	Pierce, Sankt Augustin
Bisacrylamidlösung 2 % (m/V)	Roth, Karlsruhe
2,3-Bisphosphoglycerat	Roche Diagnostics, Mannheim
Boviner IgG Proteinstandard	BioRad Laboratories GmbH, München
BSA (<i>bovine serum albumine</i>)	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliantblau R 250	Boehringer, Ingelheim
Dithioerythritol (DTE)	Boehringer, Ingelheim
Dithiothreitol (DTT)	Boehringer, Ingelheim
<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (DMEM)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
<i>donor calf serum</i> (Kälberserum)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
<i>Super Signal West Pico Chemiluminescence Substrate</i>	Pierce, Sankt Augustin
EDTA	Boehringer, Ingelheim
<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)	PAA Laboratories, Cölbe
EGTA	Sigma, Taufkirchen

Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Fungizone	Invitrogen, Groningen, Niederlande
<i>Gel blotting paper</i> GB 002	Schleicher & Schuell, Dassel
Gentamicin	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Glyzin	Merck, Darmstadt
<i>Grace`s Insect Medium</i>	Sigma, Taufkirchen
GDP	Roche Diagnostics, Mannheim
GTP	Roche Diagnostics, Mannheim
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Heptan	Merck, Darmstadt
HEPES	Boehringer, Ingelheim
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roche Diagnostics, Mannheim
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Kodak X-Omat AR Röntgenfilme	Sigma, Taufkirchen
Kupfer-(II)-sulfat	Sigma, Taufkirchen
Leupeptin	Boehringer, Ingelheim
L-Glutamin	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Lysozym	Sigma, Taufkirchen
Magermilchpulver	Nestlé, Frankfurt a.M.
Natriumacetat	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
Natriumchlorid	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Boehringer, Ingelheim
Natriumdeoxycholat	Serva-Bioproducts, Heidelberg
Natriumhydroxid	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
Natriumorthovanadat	Sigma, Taufkirchen
Nitrozellulose-Membranfilter (0,45 μ m)	Schleicher & Schuell, Dassel
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Roth, Karlsruhe
PCR Mineralöl	Serva-Bioproducts, Heidelberg

Penicillin / Streptomycin	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Pepstatin A	Serva, Heidelberg
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche Diagnostics, Mannheim
Polymax RT Entwickler/Fixierer (Kodak)	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Pluronic® F-68	Invitrogen, Groningen, Niederlande
<i>Scintillation high flash-point LSC cocktail</i>	Packard Bioscience, Groningen,
<i>Ultima Gold™</i>	Niederlande
Saccharose	Sigma, Taufkirchen
TEMED	Boehringer, Ingelheim
TNM-FH- <i>Insect Cell Medium</i>	Biowhittaker-Bioproductions, Heidelberg
Trichloressigsäure	Serva, Heidelberg
Triethanolamin	Merck, Darmstadt
Tris	USB, Cleveland, USA
Triton X-100	Boehringer, Ingelheim
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Trypsininhibitor aus Sojabohnen	Sigma, Taufkirchen
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
X-Gal	Roche Diagnostics, Mannheim

Alle weiteren und hier nicht aufgeführten Chemikalien und Lösungsmittel wurden in p.a.-Qualität von folgenden Firmen bezogen:

Merck, Darmstadt

Roth, Karlsruhe

Sigma, Taufkirchen

2.2 Radioaktiv markierte Chemikalien

[³H]AdoMet (*S*-Adenosyl-L-[methyl-³H]methionin) Amersham Pharmacia Biotech,
(555 GBq/mmol) Freiburg

2.3 Prokaryontische und eukaryontische Zellstämme

Prokaryontischer Zellstamm:

Escherichia coli DH5 α Clontech/TCC Biotechnology,
Heidelberg

Eukaryontischer Zellstamm:

PANC-1, humane Pankreaskarzinomzellen American Type Culture Collection,
Manassas, VA, USA, ATCC Nr. CRL-
1469

Bei PANC-1-Zellen handelt es sich um eine epitheliale Zelllinie, die aus einem humanen Pankreaskarzinom mit duktalem Ursprung generiert wurde. Das *K-ras*-Gen dieser Zellen weist eine Punktmutation im Kodon 12 auf, welche zum Austausch der Aminosäure Glyzin gegen Asparaginsäure (GGT \rightarrow GAT) führt. Die Folge dieser Punktmutation ist die Kodierung für konstitutiv aktive K-Ras-Proteine in PANC-1-Zellen.

Spodoptera frugiperda (*Sf9*)-Zellen Invitrogen, Groningen, Niederlande

Bei *Sf9*-Zellen handelt es sich um eine Insektenzelllinie, die aus Ovarialzellen von *Spodoptera frugiperda* gewonnen wurde.

2.4 Plasmide

pBluescript II SK(-)	Stratagene, Heidelberg
pCR 2.1 T-tailed	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pVL1393	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pBluescript II KS(-)/HA	PD Dr. K. Giehl

2.5 Primer

Die folgenden Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Hybaid Biotechnologies GmbH, Ulm, bezogen.

human Icmt-primer

5'-primer-antisense:

5' ATT CAT ATG GCG GGC TGC GCG GCG CGG 3' (27 bp)

3'-primer-sense:

5' AAG GAT CCT CAC AGG TCC ACC TTG ACC C 3' (28 bp)

Die folgenden Oligonukleotide für die DNA-Sequenzierung wurden von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, bezogen.

Universal 5'-primer, pBluescript

5' GGA AAC AGC TAT GAC CAT G 3' (19 bp)

Reverse 3'-primer, pBluescript:

5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG T 3' (22 bp)

2.6 Enzyme

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>)	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	AGS, Heidelberg Fermentas, St. Leon-Rot
RNase H	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq-Polymerasen	Roche Diagnostics, Mannheim AGS, Heidelberg Sigma, Taufkirchen
T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim

2.7 Molekularbiologische Kits

BaculoGold™ Baculovirus DNA cDNA-Synthese-Kit	Pharmingen, Hamburg Fermentas, St. Leon-Rot Invitrogen, Groningen, Niederlande
Nucleobond™ AX PC-Kit-100	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin™ -Kit	Macherey-Nagel, Düren
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
StrataPrep® EF Plasmid Midiprep Kit	Stratagene, Heidelberg
TriReagent™ RNA-Isolation Kit	Sigma, Taufkirchen

2.8 Antikörper

Primäre Antikörper:

anti-HA (12CA5)

Roche Diagnostics, Mannheim

Sekundäre Antikörper:

anti-Maus-IgG,

Sigma, Taufkirchen

horse radish peroxidase (HRP)-gekoppelt

2.9 Molekulargewichtsmarker für die Agarose-Gel- elektrophorese

Marker III, Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII*, AGS, Heidelberg

21226 bp

1904 bp

5148 bp

1584 bp

4973 bp

1375 bp

4268 bp

947 bp

3530 bp

831 bp

564 bp

125 bp

27 bp

2.10 Molekulargewichtsmarker für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Tab.1: *Low molecular weight marker* „Dalton Marker VII-L“, *Stock No.* SDS-7, Sigma, Taufkirchen

Proteine	Molekularmassen (kDa)
Rinderserumalbumin	66
Ovalbumin	45
Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase	36
Carboanhydrase, Rindererythrocyten	29
Trypsinogen, Rinderpankreas	24
Trypsininhibitor, Sojabohnen	20
α -Lactalbumin, Rind	14,2

Tab.2: *High molecular weight marker*, *Stock No.* SDS-6H, Sigma, Taufkirchen

Proteine	Molekularmassen (kDa)
Myosin, Kaninchenmuskel	205
β -Galactosidase, <i>E. coli</i>	116
Phosphorylase b, Kaninchenmuskel	97,4
Rinderserumalbumin	66
Ovalbumin	45
Carboanhydrase, Rindererythrocyten	29

2.11 Verbrauchsmaterial

Nitrozellulose Transfermembran

Protran BA85, 0,45 µm

Plastikmaterialien für Zellkulturarbeiten

Schleicher & Schuell, Dassel

Costar Corning Incorporated, New York, USA

Falcon/Becton-Dickinson, Heidelberg

Renner GmbH, Dannstadt

2.12 Geräte

Axiovert 25 Mikroskop

Brutschrank Kelvitron T

Beckman DU 640 Photometer

Beckman Zentrifuge J2-HS

Rotoren: JA10, JA20

Certomat BS-1 Schüttler

Carl Zeiss Jena GmbH, Jena

Kendro, Hanau

Beckman Instruments, München

Beckman Instruments, München

Braun Biotech International,

Melsungen

Concentrator 5301 Vakuumzentrifuge

DRI-Block[®] DB 2A

Flüssigszintillationszähler LSC 2200 CA

Gelelektrophoresekammer Dual Mini, 8 x 10 cm

Hera Safe Sicherheitswerkbank

Immunoblot Transferkammer

Milli-Q^{UF} PLUS

Minifuge GL

Megafuge 1.0 Sepatech

OptimaTM TLX Ultrazentrifuge

Rotor: TLA 45

pH-Meter P207

Semidry-Blotkammer ‚Sammy Dry‘

Eppendorf, Hamburg

Thermo-Dux, Wertheim

Canberra Packard, Dreieich

Sigma, Taufkirchen

Kendro, Hanau

Renner GmbH, Dannstadt

Millipore, Eschborn

Kendro, Hanau

Kendro, Hanau

Beckman Instruments, München

Consort, Turnhout, Belgien

Sigma, Taufkirchen

Sorvall Ultrazentrifuge OTD50B

Du Pont Instruments, Bad Nauheim

Rotor: TLA 45

Tischzentrifuge 5415 C

Eppendorf, Hamburg

3 Methoden

3.1 Methoden der Mikrobiologie

3.1.1 Luria-Bertani (LB)-Medium

Der *E. coli*-Stamm DH5 α wurde in Luria-Bertani (LB)-Medium kultiviert. Das Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur. Die Selektion transformierter Bakterien erfolgte durch Zugabe von Ampicillin (75 $\mu\text{g/ml}$) zum Medium. Um LB-Agarplatten zu erhalten, wurde das Agar-haltige Medium nach dem Autoklavieren auf *ca.* 50-60 $^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und dann in sterile Petrischalen gegossen. Diese wurden nach dem Erstarren des Agars bei 4 $^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zur Herstellung von Ampicillin-haltigen Agar-Platten wurde dem autoklavierten und abgekühlten Agar-haltigen Medium Ampicillin hinzugefügt. Das Medium wurde in sterile Petrischalen gegossen. Nach Erstarren des Agars erfolgte die Lagerung bei 4 $^{\circ}\text{C}$.

LB-Flüssigmedium: 1 % (m/V) Bacto-Tryptone
0,5 % (m/V) Hefeextrakt
1 % (m/V) NaCl
in ddH₂O, pH 7,5

LB-Agarplatten: 1 % (m/V) Bacto-Tryptone
0,5 % (m/V) Hefeextrakt
1 % (m/V) NaCl
in ddH₂O, pH 7,5
1,5 % (m/V) Agar

3.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Kompetente Bakterien besitzen die Fähigkeit, fremde DNA aufzunehmen. Die Effizienz der DNA-Aufnahme in Bakterien kann erhöht werden, indem sie durch Inkubation in CaCl_2 -Lösung transformationskompetent gemacht werden. Hierzu wurden 50 μl einer Gefrierkultur des Bakterienstammes DH5 α in 3-5 ml LB-Medium über Nacht unter Schütteln bei 220 rpm und 37 °C inkubiert. Von dieser Kultur wurden 500 μl in 100 ml LB-Medium überführt und die Bakterien bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,3-0,4 bei 220 rpm und 37 °C weiter kultiviert. Danach wurde die Bakterienkultur in sterilen Polypropylenröhrchen für 5 min bei 2500 x g und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 50 ml 100 mM CaCl_2 (4 °C) resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien für 1 h auf Eis inkubiert und für 5 min bei 2500 x g und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml 100 mM CaCl_2 mit 30 % (V/V) Glycerin (4 °C) resuspendiert und in Aliquots (200 μl) im Ethanol/Trockeneisbad schockgefroren und bei – 80 °C gelagert.

3.1.3 Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA

Das Einbringen von zirkulärer DNA in Bakterien wird als Transformation bezeichnet. Transformationskompetente DH5 α -Bakterien (200 μl) wurden auf Eis aufgetaut und sofort mit 0,1-0,5 μg Plasmid-DNA oder einem Ligationsansatz (siehe 3.2.10) und 100 μl TCM-Puffer (4 °C) versetzt. Nach kurzem Mischen folgte eine Inkubation auf Eis für 30 min. Der anschließende Hitzeschock bei 42 °C für 3 min ermöglichte die Aufnahme der Plasmid-DNA. Danach wurde die Bakterien suspension für 1 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 700 μl LB-Medium mit 10 mM Glukose erfolgte eine weitere Inkubation für 40 min bei 37 °C auf dem Schüttler, um die Expression des Ampicillin-Resistenzgens zu ermöglichen. Anschließend wurden 100-500 μl des Ansatzes auf eine zuvor getrocknete LB-Agarplatte mit zugesetztem Antibiotikum unter Zuhilfenahme eines Drygalsky-Spatels ausplattiert. Die ausplattierten Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

TCM-Puffer: 10 mM Tris/HCl, 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, pH 7,5

3.1.4 Selektion von transformierten Bakterien

Die Selektion von transformierten Bakterien erfolgte durch das Ausplattieren plasmidhaltiger Bakterien, die durch ein Amp-Resistenzgen gegenüber Ampicillin resistent waren, auf LB^{Amp⁺}-Platten und Inkubation über Nacht bei 37 °C. Die Selektion von Bakterien, die mit pBluescript-Vektoren transformiert worden waren, erfolgte durch das Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB^{Amp⁺}-Platten unter Zugabe von je 20 µl IPTG- und X-Gal-Lösung. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C im Brutschrank wurden weiße und blaue Kolonien sichtbar. Bakterienkolonien mit Plasmiden ohne rekombinante DNA färbten sich blau, da sie eine funktionsfähige β-Galaktosidase exprimierten, aufgrund einer Induktion der Expression des β-Galaktosidase-Gens (*lacZ*). Bei Bakterien mit rekombinanten Plasmiden verursachte die Insertion der fremden cDNA eine Inaktivierung des β-Galaktosidase-Gens. Die Kolonien blieben weiß.

IPTG-Lösung: 1 M in ddH₂O

X-Gal-Lösung: 4 % (m/V) in 100 % DMF

3.2 Methoden der Molekularbiologie

3.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA aus stationären *E. coli* DH5 α -Kulturen erfolgte für die Minipräparationen aus 1,5-3 ml Flüssigkulturen mit dem NucleospinTM-Kit, Macherey-Nagel, Düren, für die Midipräparationen aus 50 ml-Kulturen mit dem NucleobondTM AX PC-Kit-100, Macherey-Nagel, Düren. Die Präparationen wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zum Erreichen einer stationären Bakterienkultur wurden die Bakterien über Nacht bei 37 °C unter Schütteln bei 220 rpm in LB^{Amp⁺}-Medium kultiviert. Die Aufbewahrung der präparierten Plasmid-DNA erfolgte bei - 20 °C in dd H₂O oder TE-Puffer.

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

3.2.2 Präparation von RNA

Die Präparation der RNA wurde steril und RNase-frei durchgeführt. Für die Präparation von RNA aus PANC-1-Zellen wurden konfluent gewachsene Zellen in Zellkulturschalen (Durchmesser 10 cm) verwendet. Die RNA wurde mit dem TriReagentTM RNA-Isolations-Kit (Sigma, Taufkirchen), nach Angaben des Herstellers, gewonnen. Die Aufbewahrung der RNA erfolgte bei - 20 °C.

3.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in einer Lösung wurde mittels Spektralphotometrie durch die Messung der Extinktion der Lösung bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Dabei entspricht eine optische Dichte (1 OD) 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotide oder 40 µg/ml RNA. Die Konzentration für doppelsträngige DNA (in µg/µl) berechnet sich wie folgt :

$$\frac{\text{OD}_{260} \times 50 \mu\text{g} \times \text{VF}}{1000 \mu\text{l}} \quad (\text{VF} = \text{Verdünnungsfaktor})$$

Die Reinheit der DNA läßt sich über das Verhältnis der Extinktion der Lösung bei 260 nm und 280 nm ($\text{OD}_{260/280}$) bestimmen. Bei reiner DNA erhält man Werte zwischen 1,8 und 2,0; niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung durch Proteine oder Phenol hin.

3.2.4 Phenolextraktion von DNA

Um Proteine aus einer wässrigen DNA-Lösung zu entfernen, wurden diese mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25 VT/24 VT/1 VT) versetzt und nach gründlichem Durchmischen für 5 min bei 15800 x g und RT zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde abgenommen, mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt und wie oben zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA aus dem Überstand durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat, pH 7,0, und 2,5 Vol. 100 % Ethanol (- 20 °C) für mindestens 30 min bei - 20 °C gefällt. Danach wurde die DNA durch Zentrifugation bei 15800 x g für 30 min bei 4 °C sedimentiert, das Pellet zweimal mit 70 %igem (V/V) Ethanol (- 20 °C) gewaschen und nach jedem Waschschrift 5 min bei 15800 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend entweder im Heizblock (37 °C) oder in einem Vakuumkonzentrator (*speed vac*) getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5

3.2.5 Fällung von DNA

Für die Fällung von DNA wurde folgendes Verfahren eingesetzt: Das Volumen der DNA-Lösung wurde mit ddH₂O auf mindestens 100 µl aufgefüllt. Die Fällung erfolgte durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat, pH 4,5, und 2 Vol. 100 % Ethanol (- 20 °C) und Inkubation des Gemisches für 1 h bei - 80 °C, bzw. über Nacht bei - 20 °C. Nach Zentrifugation des Fällungsansatzes bei 15800 x g für 30 min, bei 4 °C, wurde die DNA mit 70 % (V/V) Ethanol (- 20 °C) gewaschen. Danach wurde das Gemisch erneut bei 15800 x g für 5 min zentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes im Vakuumkonzentrator getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in einem geeigneten Volumen HPLC-H₂O aufgenommen (Endkonzentration 0,5-2 µg DNA/µl).

3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA erfolgte entsprechend ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld in einer Horizontalgelapparatur. Die Konzentration der Agarose richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente (Sambrook und Gething 1989).

Tab.3: Trennbereich von Agarosegelen in Abhängigkeit von der Agarosegelkonzentration

Agarosekonzentration [% (m/V)]	linearer Trennbereich DNA (kb)
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer aufgekocht, auf 60 °C abgekühlt, mit 0,01 % (V/V) Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt und dann in eine Horizontalgelkammer (8,5 x 7,5 cm) mit Taschenkamm gegossen. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Probenpuffer im Verhältnis 6:1 (V/V) versetzt. Nach Erstarren des Gels wurden die DNA-Proben in die Taschen geladen. Zusätzlich wurden 4 µl (0,5 mg/ml) des Größenstandards (Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII*, Marker III) (AGS, Heidelberg) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V für 60 min. Die DNA-Banden wurden durch ultraviolettes Licht ($\lambda=312$ nm) auf einem Transilluminator (Bachofer, Reutlingen) sichtbar gemacht, da das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid nach Anregung mit UV-Licht eine orange Fluoreszenzstrahlung ($\lambda=560$ nm) emittierte. Die sichtbar gewordenen Banden wurden mit einem Videodokumentationssystem (Kappa Messtechnik GmbH, Gleichen) aufgenommen.

1 x TAE-Puffer:	40 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,1 % (V/V) Essigsäure
Ethidiumbromid:	10 mg/ml Ethidiumbromid in ddH ₂ O, dunkel gelagert
6 x DNA-Probenpuffer:	30 % (V/V) Glycerin, 0,25 % (m/V) Bromphenolblau, 0,25 % (m/V) Xylenecyanol FF

3.2.7 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurden zwei Verfahren verwendet. Dabei wurde das Gelstück mit der zu extrahierenden DNA-Bande nach Auftrennung der DNA im Agarosegel entweder mit Hilfe des *QIAquick Nucleotide Removal Kits*, Qiagen, Hilden, nach den Angaben des Herstellers aus dem Agarosegel eluiert, oder alternativ zu diesem Verfahren das Gelstück mit der zu extrahierenden DNA-Bande ebenfalls mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein mit einem Loch versehenes 0,5 ml Polypropylen-Gefäß, in das zuvor Glaswolle eingebracht worden war, überführt. Dieses Polypropylen-Gefäß wurde wiederum in ein größeres Polypropylen-Gefäß gestellt und dann für 20 min bei 6000 x g bei RT zentrifugiert. Das kleine Polypropylengefäß wurde verworfen, das große

Polypropylengefäß enthielt nun die aus dem Gel eluierte DNA. Der DNA wurde im folgenden 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat, pH 7,0, 2 Vol. 100 % Ethanol (- 20 °C) zugegeben und das Gemisch für 1 h bei - 80 °C inkubiert. Die DNA wurde anschließend für 20 min bei - 4 °C und 15800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, zu dem entstandenen Pellet wurde erneut 2 Vol. 70 % Ethanol (- 20 °C) zugegeben. Das Gemisch wurde für 5 min bei 15800 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgesaugt und das Pellet im Vakuumkonzentrator getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in einem geeigneten Volumen dd H₂O (10-50 µl) resuspendiert.

3.2.8 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Durch Restriktionsenzyme wird DNA an spezifischen Erkennungsstellen, sog. palindromischen Sequenzen, gespalten. Diese spezifische Spaltung ermöglicht die Entstehung von linearer DNA mit glatten oder einzelsträngigen überstehenden Enden.

Analytischer Spaltansatz mit Restriktionsenzymen

0,5-1 µg DNA

0,5 µl Restriktionsenzym (5–10 u/µl), (AGS, Heidelberg; Fermentas, St. Leon-Rot)

1 µl 10 x Restriktionspuffer (AGS, Heidelberg; Fermentas, St. Leon-Rot)

ad 10 µl mit ddH₂O

Präparativer Spaltansatz mit Restriktionsenzymen

Für präparative Spaltansätze zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden 5-10 µg DNA eingesetzt und die Menge an Restriktionsenzymen und Puffer entsprechend erhöht. Das Endvolumen des Ansatzes betrug 50 µl. Anschließend wurden die Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die DNA-Fragmente unter UV-Beleuchtung untersucht.

3.2.9 Modifizierung des Vektors pBluescript II SK(-) durch T-tailing

Zur Modifikation des Vektors pBluescript II SK(-) [pSK(-)] durch T-tailing wurde das von Marchuk *et al.* (1990) beschriebene Verfahren verwendet. Der Vektor pBluescript II SK(-) (10 µg) wurde mit 40 U des Restriktionsenzym *EcoRV* für 2 h bei 37 °C hydrolysiert. Nach Inaktivierung des Enzyms für 10 min bei 65 °C wurde die DNA mit Phenol extrahiert und mit Ethanol gefällt (siehe 3.2.4, 3.2.5). Der Vektor wurde dann mit 1 U/µg DNA terminaler Transferase (Roche Diagnostics, Mannheim) in Gegenwart von 2 mM dTTP für 2 h bei 70 °C inkubiert, um die DNA-Enden mit deoxy-Thymidin (T-tail) zu versehen. Das Volumen des Reaktionsansatzes betrug 200 µl und wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Nach der Inkubation wurde die Lösung einer Phenolextraktion (s. 3.2.4) unterzogen und die Vektor-DNA mit Ethanol gefällt. Der T-tail-Vektor konnte nun aufgrund seines T-Überhangs nicht religieren. Extrahierte PCR-Produkte, welche mit Taq-DNA-Polymerase hergestellt worden waren, konnten mit ihrem dA-Überhang direkt in den Vektor inkloniert werden.

3.2.10 Ligation von DNA

Die Ligation ist die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit Hilfe einer Ligase unter Bildung einer Phosphodiesterbindung. Die so entstandenen rekombinanten Plasmide können in kompetente Bakterien eingeschleust werden.

Standard-Ligationsansatz

2 µl 10 x Ligationspuffer (Roche Diagnostics, Mannheim)

1 µl Vektor (*ca.* 20 ng)

5 µl DNA-Fragment (*ca.* 100 ng)

2 µl T4-Ligase (1 U/µl) (Roche Diagnostics, Mannheim)

ad 20 µl mit ddH₂O

Inkubation : 16 h bei 15 °C

10 x Ligationspuffer: 660 mM Tris/HCl, 50 mM MgCl₂, 10 mM DTE, 10 mM ATP,
pH 7,5

Ready-to-go-Ligation

Bei dieser Ligation wurde die DNA zum fertigen, lyophilisierten Ligationsansatz (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gegeben. Nach Auffüllen mit ddH₂O auf 20 µl erfolgte die Ligation für 45 min bei 15 °C.

3.2.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die *polymerase chain reaction* (PCR) dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten. Als *primer* dienen synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die am 5'- und am 3'-Ende der zu vervielfältigenden DNA-Sequenz komplementär an die DNA-Matrize binden. Die Amplifikation der DNA-Matrize wird durch die thermostabile Taq-Polymerase, die zwischen den Oligonukleotiden liegende DNA-Sequenz amplifiziert ermöglicht. Das Grundprinzip der PCR basiert auf sich wiederholende Zyklen der DNA-Doppelstrang-Denaturierung (*denaturation*), der Anbindung beider Oligonukleotide an ihre jeweilige DNA-Matrize (*annealing*) und der Verlängerung der Komplementärstränge an der entsprechenden Matrize (*primer extension*) durch die thermostabile DNA-Polymerase.

Standardansatz:

1-2 µl DNA-Matrize (100-200 ng Plasmid-DNA)
1 µl dNTP (10 mM dNTP)
5 µl 10 x Taq-Puffer (Roche Diagnostics, Mannheim)
1 µl 5'-*primer* (20 pmol/µl)
1 µl 3'-*primer* (20 pmol/µl)
5 µl DMSO
1 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) (Roche Diagnostics, Mannheim)
ad 50 µl mit ddH₂O

10 x Taq-Puffer: 100 mM Tris/HCl, pH 8,3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂,
0,01 % (m/V) Gelatine (Roche Diagnostics, Mannheim)

Um das Verdunsten der Probe während der einzelnen Temperaturzyklen zu verhindern, wurde der Ansatz mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Die *annealing*-Temperatur wurde anhand der Oligonukleotidsequenz berechnet: Für jedes an den cDNA-Strang komplementär bindende A- und T-Nukleotid werden 2 °C, für jedes an den cDNA-Strang komplementär bindende G- und C-Nukleotid werden 4 °C berechnet (Nelson und Brutlag, 1979).

Im DNA-Thermocycler wurde folgender Zyklus 35-mal wiederholt:

Tab. 4: PCR-Zyklus

	<i>Denaturation</i>	<i>Annealing</i>	<i>Extension</i>
Start	5 min, 94 °C		
Zyklen 1-35	1 min, 94 °C	1 min, 65 °C	2 min, 72 °C
Ende			10 min, 72 °C

Vor dem Start des Zyklusprogramms wurden alle Matrizenstränge durch Erhitzen auf eine Temperatur von 94 °C denaturiert (Start); die Schlußextension (Ende) ermöglichte die Auffüllung unvollständig synthetisierter Stränge. Die Proben wurden anschließend auf 4 °C abgekühlt. Nach Beendigung der Amplifikation wurde die DNA mittels Agarosegelelektrophorese [1,5 % (m/V) Agarosegel in TAE] aufgetrennt (s. 3.2.6) und anschließend aus dem Gel extrahiert (s. 3.2.7).

3.2.12 Automatisierte Fluoreszenz-DNA-Sequenzierung

Die automatisierte Fluoreszenz-Sequenzierung wurde mit dem *Perkin Elmer ABI PRISM 310 Genetic Analyzer* sowie der zugehörigen Software von Frau Susanne Gierschik durchgeführt. In der Regel setzt sich ein Sequenzierungsansatz aus 200-400 ng DNA (*ca.* 2-5 μ l), 2,5 μ l *primer* (5 pmol) und 4 μ l *Perkin Elmer ABI PRISM DNA BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit Solution* zusammen.

3.3 Methoden der Zellkultur

3.3.1 Kultivierung von PANC-1-Zellen

Wachstumsmedium:

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, Groningen, Niederlande)
10 % (V/V) fötales Kälberserum, (FCS; Invitrogen, Groningen, Niederlande)
1 % (V/V) Penicillin/Streptomycin (10 000 IU/10 mg/ml PBS) (PAA Laboratories, Linz, Österreich)
1 % (V/V) L-Glutamin (200 mM) (PAA Laboratories, Linz, Österreich)

Kultivierung der PANC-1-Zellen:

Alle Arbeiten mit eukaryontischen Zellen wurden steril an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Das Medium wurde vor Gebrauch sterilfiltriert (Porengröße 0,22 µm). Die Kultivierung von adhärennten PANC-1-Zellen erfolgte bei 37 °C, 10 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit in einem CO₂-Inkubator (WTB Binder Labortechnik GmbH, Tuttlingen). Bis zum Erreichen eines konfluenten Zellrasens wurde das Medium alle 2-3 Tage gewechselt. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen auf neue Kulturschalen verteilt oder geerntet.

3.3.2 Insektenzellkultur

Medium für adhärenente *Sf9*-Zellkulturen:

450 ml TNM-FH-Insect-Medium (Bio Whittaker-Bioproductions, Heidelberg)

50 ml FCS (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

500 µl Gentamicin (50 mg/ml) (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

Medium für Suspensionskulturen:

Grace`s Insect Medium mit folgenden Zusätzen:

10 ml Pluronic® F-68 (10 % m/V) auf 500 ml Medium (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

5 ml Fungizone® (250 µg/ml) auf 500 ml Medium (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

Kultivierung der Insektenzellen:

Adhärenente Kultur

Die Kultivierung von *Spodoptera frugiperda* (*Sf9*)-Zellen erfolgte in 15 ml TNM-FH-Medium für adhärenente Kulturen bei 27 °C in 75 cm²-Zellkultur-Flaschen (Costar, Nürnbrecht). Zur Vermehrung der Zellen wurde von den konfluent gewachsenen Zellen (*ca.* 1-1,5 x 10⁷ Zellen) das verbrauchte Medium abgesaugt, 10 ml frisches Medium zugegeben und die Zellen mit dem Medium vom Boden der Kulturflasche ab gespült. Nun erfolgte die Überführung in neue Kulturflaschen in einer 1:2 oder 1:3 Verdünnung gegenüber der ursprünglichen Zelldichte.

Suspensionskultur

Für die Suspensionskultur wurden die Zellen von 15 Kulturflaschen mit konfluent gewachsenen Zellen mit Medium für Suspensionskultur ab gespült und in einen Fernbachkolben mit 170 ml Medium für Suspensionskulturen überführt. Pro ml Kultur im

Fernbachkolben wurden mindestens 5×10^5 bis maximal 3×10^6 Zellen eingesetzt. Die Kultur im Fernbachkolben wurde bei 27 °C und 80 rpm für 24 h geschüttelt. Die Verdopplungszeit der Zellen betrug *ca.* 36 h.

Zur Ermittlung der Zellzahl pro ml Medium wurden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblaulösung [0,5 % (m/V) in 0,85 %iger (m/V) NaCl-Lösung] verdünnt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert und die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Anzahl der Zellen in einem der großen Quadrate, die einem Volumen von 0,1 mm³ entsprachen, berechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl pro ml Medium}$$

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden zwei Quadrate ausgezählt und der Mittelwert berechnet.

3.4 Proteinexpression in Insektenzellen

Die Expression von rekombinanten Proteinen in Insektenzellen wurde mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems durchgeführt. Es handelt sich hierbei um ein eukaryontisches Expressionssystem, welches auch die Ausführung der meisten posttranslationalen Modifikationen der rekombinant exprimierten Proteine, u.a. die Isoprenylierung, Phosphorylierung und Methylierung, erlaubt. Die für die Virusproduktion verwendete Baculovirus-DNA ist eine modifizierte Form der DNA des *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV), die eine letale Deletion enthält. Durch homologe Rekombination mit einem entsprechenden Transfervektor (z.B. pVL1393 oder pVL1392) wird diese Deletion kompensiert. Die Proteinexpression wird bei Verwendung der Vektoren pVL1392 und pVL1393 zur Herstellung der rekombinanten Baculoviren durch den Promotor des Polyhedringens kontrolliert.

3.4.1 Transfektion

Die Transfektion der Insektenzellen erfolgte mittels der Calciumphosphat-Methode nach Graham und van der Eb (1973). Von der adhärenenten Insektenzellkultur (*ca.* $3\text{-}4 \times 10^6$ Zellen/ 75 cm^2 Zellkultur-Flaschen) wurde das Medium abgesaugt. Die Insektenzellen wurden in 15 ml Medium für adhärenente Zellkultur resuspendiert und je 5 ml suspendierte Zellkultur in drei 25 cm^2 Zellkultur-Flaschen (Corning, Costar, Nürnbrecht) überführt. Das Medium wurde nach *ca.* 30 min, d.h. nach Abheftung der Zellen am Flaschenboden, wiederum abgesaugt und durch 750 μl Medium für adhärenente Zellkultur ersetzt. Der Transfektionsansatz setzte sich aus 5-10 μg rekombinanter pVL1393-HA-Icmt-Plasmid-DNA und 0,5 μg Baculogold™ Baculovirus DNA (BD Biosciences, Heidelberg) in 750 μl Medium zusammen und wurde für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 750 μl Transfektionspuffer zugegeben und der Ansatz durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit einer Glaspipette gemischt. Der Ansatz wurde tropfenweise auf die Zellen gegeben. Durch die Zugabe von Calciumchlorid zu dem phosphatgepufferten Transfektionsansatz entsteht ein Calciumphosphatpräzipitat mit darin eingeschlossener DNA, das auf die Zellen absinkt und von diesen durch Endozytose aufgenommen wird.

Nach Inkubation für 4 h bei 27 °C wurde der Überstand abgenommen und 3 ml frisches Medium zugegeben. Danach erfolgte eine Inkubation der Zellen für 4 Tage bei 27 °C. Anschließend wurde das Medium, das nun die rekombinanten Viren enthielt, abgenommen. Der Überstand wurde zur Entfernung abgelöster Zellen für 3 min bei $250 \times g$ und RT zentrifugiert und bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt. Vor einer Infektion von Insektenzellen zur Proteinexpression wurde der Virustiter im Überstand durch zwei bis drei Amplifikationen verstärkt (siehe 3.4.2)

Transfektionspuffer: 25 mM HEPES/NaOH, pH 7,1, 125 mM NaCl, 125 mM CaCl_2

3.4.2 Amplifikation der Baculoviren

Für die Amplifikation der Baculoviren wurden *ca.* $3\text{-}5 \times 10^6$ Insektenzellen in eine 75 cm^2 Kulturflasche (Renner, Dannstadt) ausgesät. Nach dem Absetzen der Zellen (*ca.* 30 min) wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml Virus-haltigem Zellkulturüberstand (s. 3.4.1) für 1 h bei $27 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach Zugabe von 8 ml Medium für adhärente Zellkulturen wurden die Zellen für 3 Tage bei $27 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert.

3.4.3 Infektion von Insektenzellen

Um größere Mengen rekombinanten Proteins zu produzieren, wurden Suspensionskulturen (s. 3.3.2) von Insektenzellen mit den generierten Baculoviren infiziert. Hierzu wurden 50 ml Suspensionskultur (8×10^7 Sf9-Zellen) durch Zentrifugation bei $1350 \times g$ für 5 min sedimentiert, das Medium abgesaugt und die Zellen direkt in 20 ml Virussuspension der dritten Amplifikation im 50 ml-Röhrchen resuspendiert. Nach Inkubation für 1 h bei $27 \text{ }^\circ\text{C}$ wurden die Zellen in einen Fernbachkolben überführt und mit 800 ml frischem Medium auf eine Zellzahl von 2×10^6 Zellen/ml verdünnt.

3.5 Proteinpräparation

Zur Präparation des von den Baculovirus-infizierten Insektenzellen produzierten Proteins wurden zwei Methoden angewandt:

Methode 1

Die infizierten *Sf9*-Insektenzellen (s. 3.4.3) wurden vollständig vom Boden der 75 cm² Kulturflaschen abgespült, in 15 ml Röhrchen überführt und bei 1350 x g für 3 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde als Viruslösung für weitere Infektionen steril abgenommen und bei 4 °C lichtgeschützt gelagert. Die Zellen wurden auf Eis überführt und zweimal mit eiskaltem CMF-PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in RIPA-Puffer resuspendiert (250 µl Puffer pro 1,5 x 10⁶ Zellen) und durch sechsmaliges Auf- und Abziehen durch eine 0,5 x 23 mm (18 *gauge*) Kanüle lysiert und homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 15800 x g und 4 °C für 20 min wurde der Überstand in ein neues Polypropylen-Gefäß überführt. Der Proteingehalt wurde bestimmt (s. 3.6.1), die Lysate aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C gelagert.

RIPA-Puffer (Gardner *et al.* 1994):

50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,5 % (m/V) Natriumdeoxycholat, 1 % (V/V) Triton X-100, 0,1 % (m/V) SDS, 0,1 µM Aprotinin, 1 µM Leupeptin, 1 mM PMSF

Methode 2

Alternativ zur oben beschriebenen Präparation von RIPA-Lysaten wurde eine subzelluläre Fraktionierung zur Präparation von löslichen (zytosolischen) und partikulären (membranhaltigen) Fraktionen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen vom Boden der 75 cm² Kulturflaschen abgespült und bei 200 x g für 3 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde als Viruslösung für weitere Infektionen steril abgenommen und bei 4 °C lichtgeschützt gelagert. Wie im vorher beschriebenen Protokoll wurden die Zellen auf Eis überführt und zweimal mit eiskaltem CMF-PBS gewaschen. Die Zellen wurden in HEPES-Puffer resuspendiert (250 µl Puffer pro 1 x 10⁶ Zellen) und anschließend durch zehnmaliges Auf- und Abziehen durch eine 0,5 x 23 mm (18 gauge) Kanüle lysiert und homogenisiert. Um Zellkerne und Organellen abzutrennen erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 500 x g und 4 °C. Nach Überführung des Überstandes in ein Ultrazentrifugen-Gefäß und Zentrifugation für 1 h bei 100000 x g und 4 °C konnte die membranhaltige, partikuläre Fraktion der Zellen abgetrennt werden. Der Überstand stellte die lösliche, zytosolische Fraktion dar. Das Pellet, welches die membranäre, partikuläre Fraktion enthielt, wurde in 25 µl HEPES-Puffer resuspendiert. Nach Bestimmung des Proteingehaltes (siehe 3.6.1) wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C gelagert.

HEPES-Puffer: 50 mM HEPES/NaOH, pH 7,6 (4 °C), 8,6 % (m/V) Sucrose, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 mM PMSF, 40 µg/ml Leupeptin, 0,4 mg/ml Trypsin-Inhibitor, 40 µg/ml Pepstatin A, 1 mM ATP

3.6 Proteinbiochemie

3.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der colorimetrischen BCA-Methode (*bicinchoninic acid*) nach Smith *et al.* (1985). Diese Methode beruht auf der von der Proteinkonzentration abhängigen Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ , welches mit Bicinchoninsäure einen Komplex bildet, der bei 562 nm spektroskopisch nachweisbar ist. Die Erstellung einer Eichkurve erfolgte mittels einer BSA-Standardproteinlösung. Von der zu bestimmenden Proteinlösung wurden 5 μl und 10 μl eingesetzt. Alle Werte wurden durch Doppelbestimmung ermittelt.

Tab. 5: Eichgerade zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach der colorimetrischen BCA-Methode

Protein in der Standardlösung (μg)	Standardlösung (μl)	H_2O	BCA-Reagenz (ml)
0	0	50	1
20	10	40	1
40	20	30	1
60	30	20	1
80	40	10	1
100	50	0	1

BCA-Reagenz: 10 ml *BCA-Protein Assay Reagent A* (Pierce, Sankt Augustin)
 200 μl *BCA-Protein Assay Reagent B* (CuSO_4 -Lösung), (Pierce, Sankt Augustin)

Die Proben wurden mit H₂O auf ein Endvolumen von 50 µl gebracht und anschließend mit jeweils 1 ml BCA-Reagenz gemischt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C wurde die Extinktion bei 562 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Eichgeraden und durch lineare Regression mittels eines Computerprogramms ermittelt.

3.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gelelektrophorese wurde nach der Methode von Laemmli *et al.* (1970) durchgeführt. Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurde eine Mini-Gel-Vertikalapparatur für eine Gelgröße von 8 x 10 cm und einer Dicke von 1 mm (Sigma, Taufkirchen) verwendet. Zuerst wurde die Trenngellösung nach der in Tab. 5 angegebenen Zusammensetzung angesetzt und zwischen die mit Alkohol gereinigten und mit einer Gummidichtung versehenen Glasplatten gegossen. Die in der Tabelle für das Trenngel angegebenen Mengen sind ausreichend für 2 Gele. Die Trenngellösung wurde mit H₂O überschichtet und das Gel für mindestens 2 Stunden bei RT auspolymerisiert. Nach der vollständigen Polymerisation wurde das Wasser abgesaugt und das Trenngel nun mit der Sammelgel-Lösung überschichtet und ein Kamm zur Trennung einzelner Taschen eingesetzt.

Tab. 6: Trenn- und Sammelgellösungen zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

	10 %	12,5 %	Sammelgel
30 % (m/V) Acrylamidlösung	2,7 ml	3,37 ml	0,38 ml
2 % (m/V) Bisacrylamidlösung	1,08 ml	1,35 ml	0,15 ml
3 M Tris/HCl, pH 8,8	1 ml	1 ml	-
1 M Tris/HCl, pH 6.8	-	-	0,38 ml
10 % (m/V) SDS	0,08 ml	0,08 ml	0,03 ml
60 % (m/V) Saccharose	-	-	0,75 ml
H ₂ O	3,2 ml	2,16 ml	1,3 ml
TEMED	4 µl	4 µl	5 µl
10 % (m/V) APS	40 µl	40 µl	30 µl
Trennbereich	30-130 kDa	20-100 kDa	-

Die Proteinproben wurden mit mindestens 20 % (V/V) 5 x SDS-Probenpuffer versetzt, bei 95 °C für 5 min denaturiert und mit einer Hamilton-Spritze in die mit 1 x Laufpuffer gespülten Geltaschen geladen. Die Elektrophorese wurde in 1 x Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 100 V durchgeführt. Die Auftrennung wurde beendet, wenn der Farbmarker das Ende des Gels erreicht hatte.

5 x SDS-Probenpuffer: 200 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA, 1 M Saccharose, 2 % (m/V) SDS, 1 mM DTT, 0,1 % (m/V) Bromphenolblau, pH 8,8

5 x -Laufpuffer: 250 mM Tris, 2 M Glyzin, 0,5 % (m/V) SDS, pH 8,6

3.6.3 Färbung von Polyacrylamidgelen

Coomassie Blau-Färbung

Nach der Gelelektrophorese wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel über Nacht bei RT oder für *ca.* 30 min im Wasserbad bei 60 °C in Färbelösung inkubiert. Danach wurde das Gel zum Entfärben in die Entfärbelösung überführt und so lange entfärbt, bis sich die gefärbten Proteinbanden deutlich vom entfärbten Hintergrund abhoben.

Färbelösung: 25 % (V/V) Isopropanol
10 % (V/V) Eisessig
0,03 % (m/V) Coomassie Brilliantblau R 250

Entfärbelösung: 12,5 % (V/V) Isopropanol
10 % (V/V) Eisessig

3.6.4 Immunoblotting von Proteinen (*Western-Blot*)

Um den Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern durchführen zu können, wurde das Proteingemisch mittels SDS-PAGE aufgetrennt (s. 3.6.2) und die Proteinbanden anschließend aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran (Protran BA85, 0,45 µm, Schleicher & Schuell, Dassel) transferiert.

Semi-Dry-Blot

Nach der Gelelektrophorese wurden sowohl das Gel, als auch die Nitrozellulose-Membran kurz in Transferpuffer eingelegt. Anschließend wurden folgende, auf Gelgröße zugeschnittene Bestandteile, nach Äquilibrieren in Transferpuffer luftblasenfrei aufeinander auf die Graphitelektrode (130 x 125 mm Elektrodenoberfläche) der *Semi-Dry-Blot*apparat (Sammy Dry, Schleicher & Schuell, Dassel) gelegt: 2 Lagen Filter-Papier (GB002, Schleicher & Schuell, Dassel), Gel, Nitrozellulose-Membran, 2 Lagen Filter-Papier. Anschließend wurde die zweite Graphitelektrode aufgesetzt. Das Gel war der

Kathode, die Membran der Anode zugewandt, so dass die negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Membran transferiert wurden. Der Transfer der Proteine aus dem 12,5 %igen Gel auf die Membran erfolgte für 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 2,5 mA/cm².

Transferpuffer: 25 mM Tris/HCl, 0,1 % (m/V) SDS, 1,5 % (m/V) Glyzin,
20 % (V/V) Methanol, pH 8,3

Anfärben der Nitrozellulose-Membran mit Ponceau S

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran lassen sich diese unspezifisch und reversibel mit Ponceau S anfärben. Hierzu wurde die Nitrozellulose-Membran nach dem Transfer in H₂O gewaschen und in Ponceau S-Lösung [0,2 % (V/V) Ponceau S, 3 % (m/V) TCA, 3 % (V/V) Sulfosalicylsäure (Sigma, Taufkirchen)] für 2-3 min gefärbt. Die Membran wurde kurz mit H₂O gewaschen und der Proteinstandard markiert. Die Färbung ließ sich durch Waschen in 20 ml basischer CMF-PBS, der 50 µM Tris/HCl-Lösung, pH 9,5, zugesetzt worden war, entfernen.

Absättigen der Nitrozellulose-Membran und Bindung des primären Antikörpers

Um unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde die Membran für *ca.* 60 min bei RT in 1 x CMF-PBS mit 5 % (m/V) Magermilchpulver inkubiert. Die anschließende Inkubation mit dem primären Antikörper [anti-HA(12CA5)-Antikörper (Boehringer, Mannheim)], 4 ml einer 1:100 Verdünnung in 0,5 % (m/V) Magermilchpulver, wurde über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Nitrozellulose-Membran dreimal mit 0,5 % (m/V) Magermilchpulver in 1 x PBS für jeweils 10 min gewaschen. Danach folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper.

Immunochemischer Nachweis transferierter Proteine mittels HRP-gekoppelter Antikörper

Nach Zugabe von 4 ml einer 1:1000 Verdünnung des sekundären Antikörpers (Ziege-anti-Maus, HRP-gekoppelt, Sigma, Taufkirchen) in 0,5 % (m/V) Magermilchpulver, wurde der Blot für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal mit 0,5 % (m/V) Magermilchpulver in 1 x CMF-PBS und einmal mit 1 x CMF-PBS für je 10 min gewaschen. Da der 2. Antikörper *horse radish-peroxidase* (HRP)-gekoppelt war, konnten die Protein-Antikörper-Komplexe mit Hilfe des *Super Signal West Pico Chemiluminescence Substrate* (Pierce, Sankt Augustin) nachgewiesen werden. Die beiden *Chemiluminescence*-Lösungen 1 und 2 (Pierce, Sankt Augustin) wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Membran wurde in dieser Lösung für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde ein Röntgenfilm auf die mit einer Frischhaltefolie abgedeckte Membran aufgelegt. Der Film wurde nach der Exposition (30-360 s) entwickelt und fixiert.

1 x CMF-PBS: 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 2,6 mM KCl,
pH 7,2

Waschpuffer: 1 x CMF-PBS, 0,5 % (m/V) Milchpulver

3.7 Nachweis der Methylierungsaktivität der IcmT

Um die Methylierungsaktivität der Proteinpräparationen (s. 3.5) und damit der rekombinanten HA-IcmT zu bestimmen, wurde die Methode nach Phillips & Pillinger angewandt (Phillips und Pillinger, 1995). Dazu wurde als Methylgruppen-Donor [^3H]-markiertes *S*-Adenosyl-L-methionin (AdoMet) und als Akzeptor der Methylgruppen *N*-Acetyl-*S-trans,trans*-L-farnesylcystein (AFC) verwendet. Das Gesamtvolumen eines Probenansatzes betrug 50 μl , wobei 6 μl auf die verdünnte Proteinlösung und 44 μl auf das [^3H]AdoMet- und AFC-enhaltende Reaktionsgemisch entfielen. Zur Bestimmung der Methylierungsaktivität wurden die Protein-Präparationen in Tris/EDTA-Puffer, pH 8,0, mit 0,335 μM [^3H]AdoMet und mit 100 μM AFC in einem Polypropylen-Gefäß gemischt und die Mischungen für 30 min inkubiert. Zu den Ansätzen wurde 4,665 μM nicht-markiertes AdoMet hinzugefügt, um die restlichen Enzymbindungsstellen abzusättigen. Als Reaktionsprodukt entstand ein [^3H]-markierter AFC-Methylester. Die Reaktion wurde mit 50 μl 20 % (m/V) Trichloressigsäure gestoppt. Nach Zugabe von 400 μl Heptan zu den Ansätzen und Zentrifugation für 3 min bei 14000 x g entstanden 3 Phasen: das Pellet mit den Proteinen, eine wässrige Phase mit [^3H]-markiertem AdoMet und eine obere Phase mit [^3H]-markiertem AFC-Methylester in Heptan gelöst. Die Heptanphase wurde abgenommen und im Vakuum-Konzentrator getrocknet. Der getrocknete AFC-Methylester wurde in 100 μl NaOH gelöst und der Ansatz in dem Polypropylen-Gefäß in ein mit 8 ml organischer Szintillationsflüssigkeit (*Scintillation high flash-point LSC-cocktail Ultima Gold™*, Packard Bioscience, Groningen) gefülltes Szintillationsgefäß gestellt und verschlossen. Das Gemisch wurde für 24 h bei RT inkubiert. Durch alkalische Hydrolyse des Methylesters wurde flüchtiges [^3H]-markiertes Methanol frei und reicherte sich in der Szintillationsflüssigkeit an. Nach der Inkubation wurde die Radioaktivität in einem Flüssigszintillationszähler gemessen.

Jeder Wert wurde durch Doppelbestimmung ermittelt und die Gesamtmenge an eingesetzter Radioaktivität pro Probenansatz (*totals*) durch direktes Messen von 44 μl Reaktionsgemisch in 8 ml organischer Szintillationsflüssigkeit bestimmt.

Die Menge des entstandenen methylierten AFC in pmol/mg partikulärer Proteinfraction im Ansatz wurde wie folgt berechnet:

$$x \text{ (pmol)} = \frac{\text{cpm } [^3\text{H}]\text{Methanol} / [\text{cpm } [^3\text{H}]\text{AdoMet/AdoMet(pmol)}]}{0,75 \times 0,8 \times \text{partik. Protein (mg)} \times \text{Reaktionszeit (min)}}$$

Tris/EDTA-Puffer: 100 mM Tris/HCl, pH 8,0, 2 mM EDTA

Reaktionsgemisch: 25 μ l Tris/EDTA-Puffer, 100 μ M AFC (in 0,74 % (V/V) DMSO), 4,665 μ M AdoMet, 0,335 μ M S-Adenosyl-L-[methyl- ^3H]methionin

3.8 Statistik und Auswertung

Die enzymatischen Aktivitäten wurden aus jeweils drei unabhängigen, als Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen bestimmt. Aus diesen Werten wurde jeweils der arithmetische Mittelwert ermittelt.

Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt. Dabei ergaben sich ähnliche Ergebnisse. Die Ergebnisse von repräsentativen Experimenten sind dargestellt.

3.9 Software

GraphPad Prism [®]	Version 3.02, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA
Micrografx Designer 7.0	Micrografx Inc., München
Micrografx Picture Publisher 7.0	Micrografx Inc., München

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die cDNA der humanen Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase (Icmt) kloniert, das von dieser cDNA kodierte Protein in *Sf9*-Insektenzellen exprimiert und die Aktivität des Enzyms mittels eines spezifischen Aktivitätsassays charakterisiert. Mit Hilfe dieser Versuche wurde die Kinetik der Enzymreaktion, sowie die Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Enzymmenge, der Substratkonzentration und der Reaktionstemperatur bestimmt.

4.1 Klonierung der Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase

4.1.1 RNA-Isolierung und Synthese der Icmt-cDNA

Um die cDNA der humanen Icmt zu amplifizieren und zu klonieren wurde aus humanen PANC-1-Pankreaskarzinomzellen die Gesamt-RNA isoliert. Die Menge der Gesamt-RNA, die aus einem konfluent gewachsenen Zell-*monolayer* von PANC-1-Zellen einer 10 cm Kulturschale (5×10^6 Zellen) isoliert wurde, betrug *ca.* 200 µg. Für die cDNA-Synthese wurden 5 µg Gesamt-RNA aus PANC-1-Zellen mit Hilfe einer reversen Transkriptase und oligo(dT)₁₈-*primer* in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die Icmt-cDNA mittels einer *polymerase chain reaction* (PCR) mit den spezifischen, nachfolgend aufgeführten *primer* amplifiziert.

Sequenz der *primer* (nach Dai *et al.* 1998)

5' *primer-antisense*:

5' ATT CAT ATG GCG GGC TGC GCG GCG CGG 3' (27 bp)

3' *primer-sense*:

5' AAG GAT CCT CAC AGG TCC ACC TTG ACC C 3' (28 bp)

Diese *primer* enthielten vor dem Start- und nach dem Stop-Kodon der Icmt-cDNA spezifische Restriktionsenzymchnittstellen (kursiv dargestellt). Mittels des 5'-*primer* wurde vor dem Start-Kodon eine *NdeI*-Schnittstelle, und durch den 3'-*primer* nach dem Stop-Kodon eine *BamHI*-Schnittstelle in die amplifizierte DNA-Sequenz eingeführt. Für die Polymerasekettenreaktion wurden 100 ng cDNA und jeweils 20 pmol *primer* eingesetzt. Zusätzlich wurde dem PCR-Ansatz 1/10 Volumen DMSO zugesetzt um einer Aggregation der cDNA entgegenzuwirken und den DNA-Einzelstrang für die *primer* zugänglich zu machen. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und das Icmt-cDNA-Fragment mit einer Größe von 854 bp aus dem Gel extrahiert. Die nachfolgend durchgeführte Sequenzierung des Icmt-cDNA-Fragmentes und der Sequenzvergleich mit der Datenbank-Sequenz (*GenBank Accession no.* AF 064084) bestätigte eine mutationsfreie Amplifikation der Icmt-cDNA.

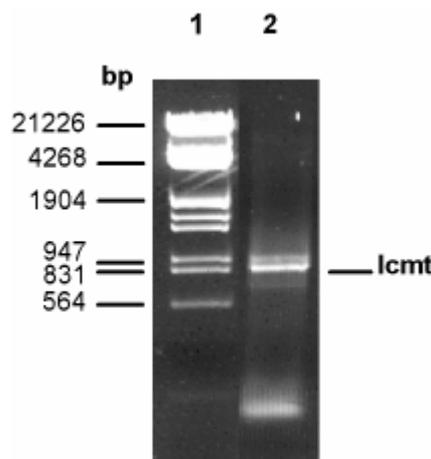


Abb. 1: Amplifikation der Icmt-cDNA aus PANC-1-Pankreaskarzinomzellen. Für die Amplifikation der Icmt-cDNA wurde die Gesamt-RNA aus PANC-1-Pankreaskarzinomzellen isoliert und mittels reverser Transkriptase und oligo(dT)₁₈-*primer* in cDNA umgeschrieben. Zur spezifischen Amplifikation der Icmt-cDNA wurden zwei spezifische Icmt-*primer* verwendet und die kodierende Icmt-Sequenz in einer PCR amplifiziert. Durch den 5'-*primer* wurde am Start-Kodon eine *NdeI*-Schnittstelle und durch den 3'-*primer* nach dem Stop-Kodon eine *BamHI*-Schnittstelle eingeführt. Die PCR-Produkte wurden in einem 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt (Spur 2) und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Positionen der in Spur 1 aufgetragenen Marker sind links gekennzeichnet. Abk.: *BamHI* = spezifisches Restriktionsenzym, bp = Basenpaar, cDNA = *complementary* Desoxyribonukleinsäure, dT = desoxyThymidin, Icmt = Isoprenylcystein-

Carboxylmethyltransferase, *NdeI* = spezifisches Restriktionsenzym, PCR = *polymerase chain reaction*, RNA = Ribonukleinsäure.

4.1.2 Ligation der Icmt-cDNA in den Vektor pBluescript II SK/T-tail

Um das Enzym Icmt als rekombinantes Protein in Baculovirus-infizierten *Sf9*-Insektenzellen zu exprimieren, wurde das Icmt-PCR-Produkt zunächst in den Klonierungsvektor pBluescript II SK(-) (pSK-T-tail) kloniert.

Das aus dem Agarosegel isolierte Icmt-PCR-Fragment wurde in die mit einem Deoxythymidin-Rest versehene *EcoRV*-Schnittstelle des Vektors pBluescript II SK(-)/T-tail ligiert. Die Einführung jeweils eines Desoxythymidinrestes an die freien DNA-Enden des *EcoRV*-hydrolysierten pBluescript II SK(-)-Vektors ermöglichte die ungerichtete Klonierung des Icmt-PCR-Produktes. Das Icmt-PCR-Produkt enthielt durch die Verwendung der thermostabilen Taq-Polymerase an den Enden jeweils ein Deoxyadenosin-Rest, der nun zur Ligation genutzt wurde.

Zum Nachweis des Icmt-DNA-Fragments im pBluescript II SK(-)-Vektor wurde die isolierte Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* gespalten. Zusätzlich wurde die Insertion und die Basensequenz der Icmt-cDNA durch DNA-Sequenzierung verifiziert.

Abb. 2 zeigt das Ergebnis der Restriktionsanalyse nach Auftrennen der DNA im Agarosegel. Das Icmt-Fragment konnte nachgewiesen werden.

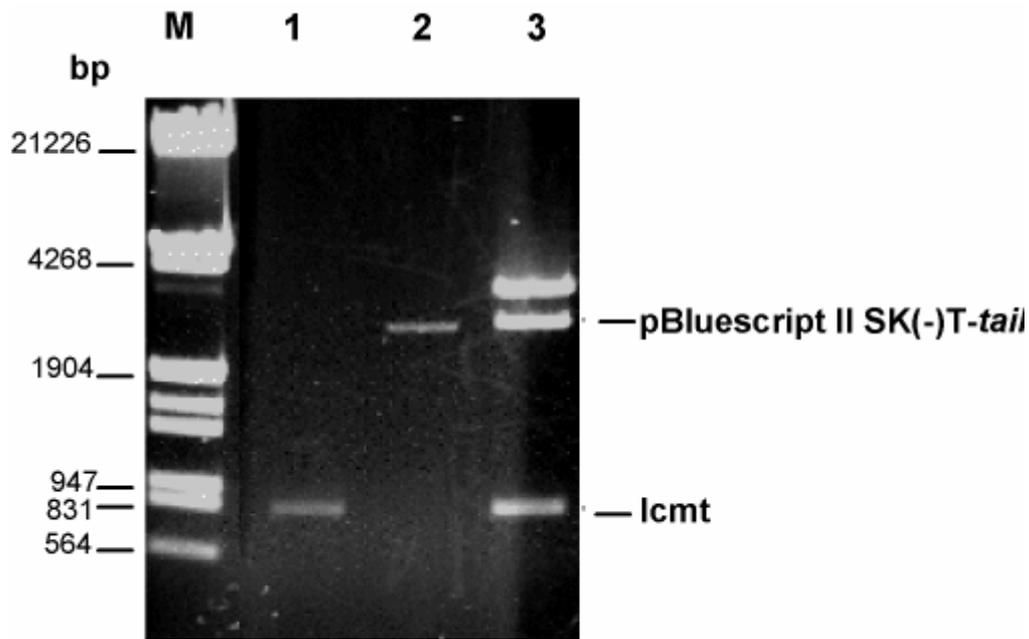


Abb. 2: Restriktionsanalyse von pBluescript II SK(-)/Icmt. Dargestellt ist die Restriktionsanalyse von pBluescript II SK(-)/Icmt. Für die Hydrolyse wurden 0,5-1 µg Plasmid-DNA für 1 h mit Restriktionsenzymen hydrolysiert und die Spaltansätze in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt. Spur 1: isoliertes Icmt-Fragment (854 bp); Spur 2: pBluescript II SK(-), linearisiert mit *SmaI* (2958 bp); Spur 3: pBluescript II SK(-)/Icmt nach Hydrolyse mit *NdeI/BamHI*: Icmt 854 bp, pBluescript II SK(-) 2958 bp; infolge einer unvollständigen Spaltung ist zusätzlich eine Bande bei ca. 3500 bp zu erkennen. Die Positionen des in Spur M aufgetrennten DNA-Größenstandards sind angegeben. Abk.: bp = Basenpaar, *BamHI* = spezifisches Restriktionsenzym, DNA = Desoxyribonukleinsäure, Icmt = Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase, *NdeI* = spezifisches Restriktionsenzym, pBluescript II SK(-) = Vektor, pBluescript II SK(-)/Icmt = Icmt in Vektor pBluescript II SK(-) ligiert, *SmaI* = spezifisches Restriktionsenzym, T-tail = Desoxythymidinrest.

4.1.3 Klonierung von pBluescript II KS/HA-Icmt

Im nächsten Klonierungsschritt wurde die Icmt-cDNA als *NdeI/BamHI*-Fragment in das Plasmid pBluescript II KS(-)/HA, welches ebenfalls durch *NdeI/BamHI* hydrolysiert worden war, ligiert. Das in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pBluescript II KS(-)

klonierte HA-Epitop ist für die Detektion des im Rahmen dieser Arbeit rekombinant exprimierten Icmt-Proteins in Immunoblot-Analysen notwendig, da gegen die Icmt für diese Analyse kein Antikörper zur Verfügung stand. Die Nukleinsäuresequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des HA-Epitops (fett gedruckt) lautet wie folgt:

DNA-Sequenz: *CTG CAG ATG TAT CCT TAT GAT GTT CCT GAT TAT GCC CAT*

Aminosäure-Sequenz: **Y P Y D V P D Y A**

Eine *Pst*I-Schnittstelle vor dem ATG ist kursiv dargestellt.

In Abb.3 ist schematisch die Anordnung der cDNA von Icmt im Vektor pBluescript II KS(-)/HA dargestellt.

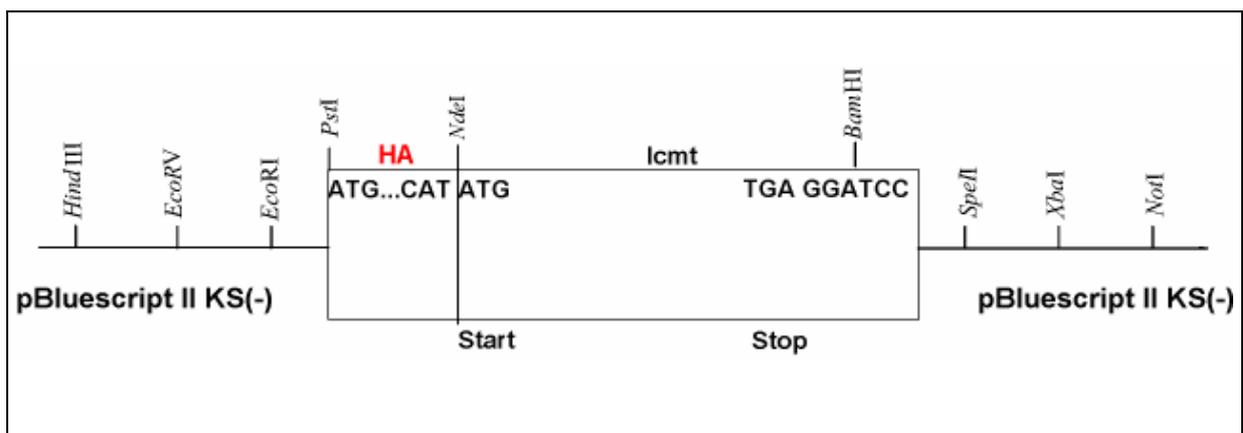


Abb. 3: Schematische Darstellung der Klonierung von pBluescript II KS(-)/HA-Icmt. Das Icmt-cDNA-Fragment wurde nach Hydrolyse von pBluescript II SK(-)/Icmt mit *Nde*I/*Bam*HI isoliert und in den Vektor pBluescript II KS(-)/HA ligiert. Über diese Ligation wurde die HA-Epitop-Sequenz im Leseraster an das 5'-Ende der Icmt-cDNA kloniert. In das HA-Epitop (33 bp) wurde über eine PCR unmittelbar vor dem Start-Kodon (ATG) eine *Pst*I-Schnittstelle eingeführt. Die Ligation führt die *Pst*I-Schnittstelle in das HA-Icmt-Klonierungsprodukt an seinem 5'-Ende ein. Abk.: *Bam*HI = spezifisches Restriktionsenzym, bp = Basenpaar, cDNA = *complementary* Desoxyribonukleinsäure, HA = Hämagglutinin-Epitop, HA-Icmt = Hämagglutinin-Epitop-markierte Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase, Icmt = Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase, *Nde*I = spezifische Restriktionsenzym, pBluescript II KS(-) = Vektor, PCR = *polymerase chain reaction*, *Pst*I = spezifisches Restriktionsenzym.

Der Nachweis des Icmt-Fragments im pBluescript II KS/HA-Plasmid erfolgte mittels einer Restriktionsanalyse mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *BamHI* sowie mit *PstI/BamHI*. Das Ergebnis der Restriktionsanalyse ist in Abb. 4 dargestellt. Die Hydrolyse mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *BamHI* lieferte das Icmt-Fragment (854 bp) ohne die HA-Epitop-kodierende Sequenz sowie den pBluescript II KS/HA-Vektor (3454 bp). Die Behandlung mit den Restriktionsenzymen *PstI* und *BamHI*, welche das HA-Icmt-Fragment am 5'-Ende vor dem Start-Kodon beziehungsweise an dessen 3'-Ende nach dem Stop-Kodon hydrolysieren, resultierte aufgrund einer internen *PstI*-Schnittstelle, in drei Fragmente mit Längen von 193 bp, 694 bp und 3421 bp (interne *PstI*-Schnittstelle in der Icmt-cDNA an Position 159 bp). Sowohl die Restriktionsanalyse als auch die anschließende Sequenzierung ergaben, dass die HA-Icmt-Sequenz erfolgreich und mutationsfrei kloniert worden war.

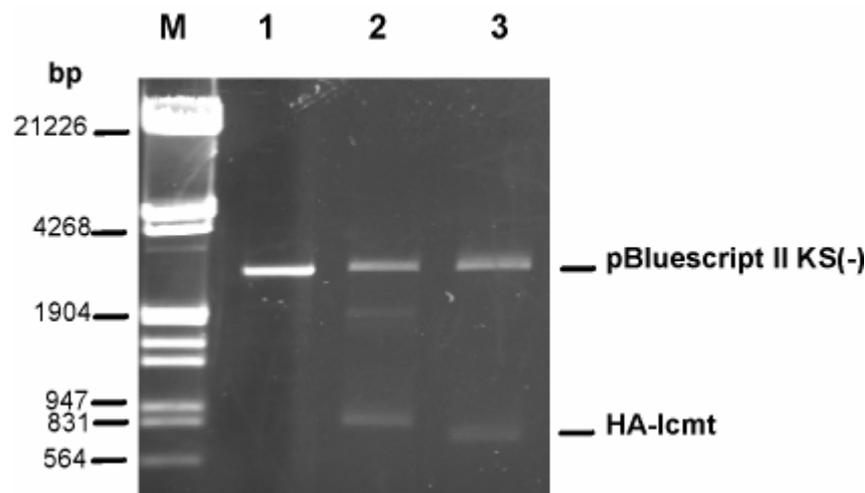


Abb. 4: Restriktionsanalyse von pBluescript II KS(-)/HA-Icmt. Für die Restriktionsanalyse von pBluescript II KS(-)/HA-Icmt wurde 0,5-1 µg Plasmid-DNA für 1 h mit den unten aufgeführten Restriktionsenzymen hydrolysiert und die Spaltansätze in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in Ethidiumbromid gefärbt. Spur 1: pBluescript II KS(-)/HA mit *NdeI/BamHI* hydrolysiert (3454 bp); Spur 2: pBluescript II KS(-)/HA-Icmt mit *NdeI/BamHI* hydrolysiert, die Bande bei 3454 bp entspricht pBluescript II KS(-), die Bande bei 854 bp entspricht dem Icmt-Fragment ohne HA-Epitop-Sequenz; Spur 3: pBluescript II KS(-)/HA-Icmt mit *PstI/BamHI* hydrolysiert, die Bande bei 3421 bp entspricht pBluescript II KS(-), die Bande bei 694 bp entspricht dem Icmt-Fragment (aufgrund einer internen *PstI*-Schnittstelle an Position 159

um 193 bp kleiner als die cDNA von HA-Icmt). Die Positionen des in Spur M aufgetrennten DNA-Größenstandards sind angegeben. Abk.: *Bam*HI = spezifisches Restriktionsenzym, bp = Basenpaar, cDNA = *complementary* Desoxyribonukleinsäure, HA = Hämagglutinin-Epitop, HA-Icmt = Hämagglutinin-Epitop-markierte Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase, Icmt = Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase, *Nde*I = spezifische Restriktionsenzym, pBluescript II KS(-) = Vektor, pBluescript II KS(-)/HA-Icmt = HA-Icmt in Vektor pBluescript II KS(-) ligiert, PCR = *polymerase chain reaction*, *Pst*I = spezifisches Restriktionsenzym.

4.1.4 Klonierung von pVL1393/HA-Icmt

Um die HA-Icmt-cDNA in den Baculovirus-Transfervektor pVL1393 zu inserieren, wurde pBluescript II KS(-)/HA-Icmt mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Not*I hydrolysiert und das 887 bp große HA-Icmt-Fragment isoliert. Nach Auftrennung des Spaltansatzes im Agarosegel wurde die der HA-Icmt-cDNA entsprechende Bande (887 bp) aus dem Gel extrahiert und gereinigt. Anschließend erfolgte die Ligation des isolierten Fragmentes in den mit *Eco*RI/*Not*I hydrolysierten Baculovirus-Transfervektor pVL1393.

Die Kontrollspaltungen von 6 Klonen mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Not*I bzw. *Nde*I und *Bam*HI zeigten bei elektrophoretischer Auftrennung im 1%igen Agarosegel eine korrekte Insertion des HA-Icmt-Fragmentes. Durch Hydrolyse mit *Nde*I und *Bam*HI wurde das Klonierungsprodukt pVL1393/HA-Icmt in drei DNA-Fragmente gespalten: Das Icmt-cDNA-Fragment (854 bp) entstand durch Spaltung mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Bam*HI, der Vektor pVL1393 wurde aufgrund einer internen *Nde*I-Schnittstelle in 2 Fragmente (5255 bp und 4384 bp) gespalten. Eine weitere Kontrollspaltung mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Not*I zeigte im Agarosegel 2 Banden. Aus der Spaltung geht HA-Icmt (887 bp) hervor. Der Vektor pVL1393 (9639 bp) ist als einzelne Bande zu erkennen. Die Ergebnisse dieser Restriktionsanalyse sind in Abb. 5 dargestellt.

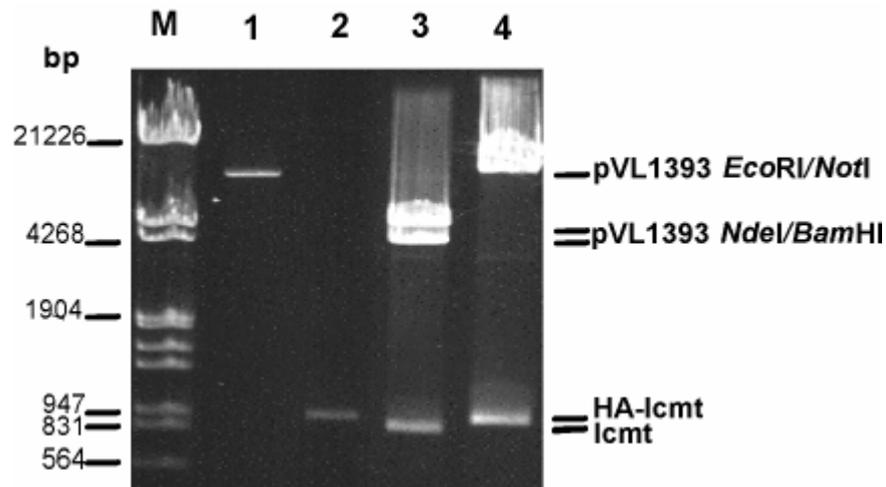


Abb. 5: Restriktionsanalyse von pVL1393/HA-Icmt. Für die Restriktionsanalyse von pVL1393/HA-Icmt wurden 0,5-1 μ g Plasmid-DNA mit den unten angegebenen Restriktionsenzymen für 1 h hydrolysiert und die Spaltansätze in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt. Spur 1: pVL1393, Hydrolyse mit *EcoRI/NotI* entspricht 9639 bp; Spur 2: isoliertes HA-Icmt-Fragment nach Hydrolyse mit *EcoRI/NotI*, entspricht 897 bp; Spur 3: pVL1393/HA-Icmt nach Hydrolyse mit *NdeI/BamHI*: pVL1393 entspricht 5255 bp und 4384 bp, Icmt-cDNA entspricht 854 bp (ohne HA-Epitop); Spur 4: pVL1393/HA-Icmt nach Hydrolyse mit *EcoRI/NotI*: pVL1393 entspricht 9639 bp, HA-Icmt-cDNA entspricht 897 bp. Die Positionen des in Spur M aufgetrennten DNA-Größenstandards sind angegeben. Abk.: *BamHI* = spezifisches Restriktionsenzym, bp = Basenpaar, cDNA = *complementary* Desoxyribonukleinsäure, DNA = Desoxyribonukleinsäure, *EcoRI* = spezifisches Restriktionsenzym, HA = Hämagglutinin-Epitop, HA-Icmt = Hämagglutinin-Epitop-markierte Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase, Icmt = Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase, *NdeI* = spezifisches Restriktionsenzym, *NotI* = spezifisches Restriktionsenzym, pVL1393 = Vektor, pVL1393/HA-Icmt = HA-Icmt in Vektor pVL1393 ligiert.

4.2 Expression von HA-Icmt in Baculovirus-infizierten *Sf9*-Zellen

Die Expression der mit dem HA-Epitop markierten Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase (HA-Icmt) in *Sf9*-Zellen wurde mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems durchgeführt. Dieses eukaryontische Expressionssystem ermöglicht die rekombinante Expression posttranslational modifizierter Proteine, da die verwendeten Insektenzellen die meisten Modifikationen, wie die Isoprenylierung, die Phosphorylierung und die Methylierung durchführen.

Die Transfektion der Insektenzellen mit 10 µg pVL1393/HA-Icmt und 0,5 µg Baculogold™ Baculovirus DNA erfolgte mittels der Calciumphosphat-Methode. Anschließend wurde der virushaltige Überstand der transfizierten Zellkulturen für die weitere Infektion von *Sf9*-Insektenzellen und damit die Amplifikation des Virus verwendet. Die Zellzahl betrug pro Infektionsansatz 3-4 x 10⁶. Der Virustiter im Zellkulturüberstand wurde durch 3-4 weitere Amplifikationen verstärkt. Dabei wurden 3-4 x 10⁶ *Sf9*-Zellen mit ca. 2 ml des virushaltigen Überstandes der transfizierten *Sf9*-Insektenzellen für 48 h bei 27°C inkubiert. Die Inkubationszeit belief sich initial auf 96 h bei 27 °C; in späteren Versuchen wurde aufgrund des Zeitverlaufs der Icmt-Expression, die Inkubationszeit auf 48 h verkürzt.

4.2.1 Expression von HA-Icmt und Präparation von HA-Icmt-haltigen Zelllysaten

Um zu prüfen, ob die *Sf9*-Insektenzellen, die mit HA-Icmt-kodierenden Baculoviren infiziert worden waren, das Enzym auch exprimieren, wurden Zelllysate hergestellt. Hierzu wurden die infizierten Zellen nach einer Inkubationszeit von 96 h nach der Infektion geerntet, in RIPA-Puffer lysiert und unlösliche Zellbestandteile abzentrifugiert. Die löslichen Proteine im Überstand wurden in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Als Kontrolle wurden nicht-infizierte *Sf9*-Insektenzellen verwendet. Zusätzlich wurden Immunoblot-Analysen mit anti-HA Antikörpern

durchgeführt. Weder nach Coomassie-Blau Färbung noch im Immunoblot konnte eine Expression von HA-Icmt unter diesen Bedingungen nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

4.2.2 Nachweis der rekombinanten HA-Icmt in der partikulären Fraktion von Baculovirus-infizierten Sf9-Insektenzellen

Wie in der Einleitung dargestellt ist die Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase in eukaryontischen Zellen im ER lokalisiert. Um zu überprüfen, ob das rekombinante HA-Icmt-Protein in Baculovirus-infizierten Sf9-Insektenzellen möglicherweise ebenfalls in einem membranhaltigen Kompartiment, zum Beispiel im ER, lokalisiert ist, wurde eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt.

Hierzu wurden Sf9-Insektenzellen mit HA-Icmt-kodierenden Baculoviren aus der vierten Amplifikation infiziert, die Zellen 96 h nach der Infektion geerntet und in detergenzienfreiem HEPES-Puffer lysiert. Anschließend wurde die Proteinlösung mittels Zentrifugation bei 100000 x g in eine lösliche, zytosolische bzw. eine membranhaltige, partikuläre Fraktion getrennt. Die lösliche Fraktion, mit den löslichen Proteinen entsprach dem 100000 x g-Überstand (S100). Das Pellet stellt die partikuläre, membranhaltige Fraktion dar (P100). Um eine Aggregation von Proteinen zu verhindern, wurden die einzelnen Fraktionen zusätzlich mit 2 M Harnstoff versetzt. Als Kontrollen dienten Lysate von nicht-infizierten Sf9-Insektenzellen, die wie der infizierte Ansatz präpariert wurden, sowie Lysate von β -Galaktosidase-exprimierenden Insektenzellen, die freundlicherweise von Dr. Frieder Schwald (Abteilung Pharmakologie und Toxikologie, Universität Ulm) zur Verfügung gestellt worden waren.

Die Expression der HA-Icmt in der löslichen und partikulären Fraktion wurde durch SDS-PAGE und Immunoblot-Verfahren untersucht. Die Abb. 6 zeigt einen Immunoblot zum Nachweis von HA-Icmt in der löslichen und partikulären Fraktion von HA-Icmt-infizierten Sf9-Zellen und Kontrollzellen. Hierzu wurden Sf9-Insektenzellen 96 h nach Infektion mit Viren aus der 4. Amplifikation geerntet und Lysate in HEPES-Puffer hergestellt. Nach der subzellulären Fraktionierung wurden jeweils 15 μ g Protein der jeweiligen Fraktion in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die Proteine auf Nitrozellulose

übertragen. Der Nachweis der HA-Icmt erfolgte mittels anti-HA Antikörper und ECL-Entwicklung.

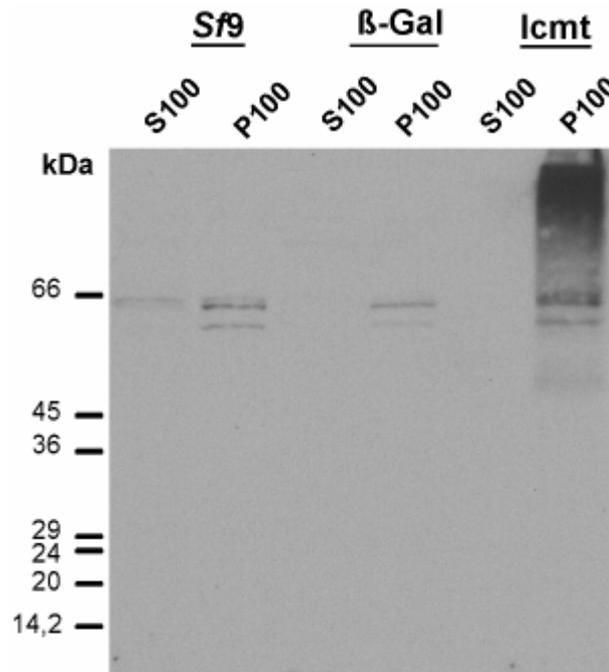


Abb. 6: Immunoblot-Analyse der Expression von HA zur Ermittlung der Icmt in subzellulären Fraktionen von Sf9-Insektenzellen. Zum Nachweis der Expression und subzellulären Lokalisation der HA-Icmt wurden Immunoblot-Analysen durchgeführt. Hierzu wurden Sf9-Insektenzellen mit HA-Icmt-exprimierenden Baculoviren infiziert, die Zellen 96 h nach der Infektion lysiert und durch subzelluläre Fraktionierung lösliche (S100) und partikuläre (P100) Proteinfractionen hergestellt. Nicht-infizierte Sf9-Insektenzellen und Sf9-Insektenzellen, die mit β-Galaktosidase (β-Gal)-kodierenden Baculoviren infiziert worden waren, dienten als Kontrolle. Je 15 µg Protein der beiden Fraktionen wurden in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulose transferiert. Zum Nachweis der exprimierten HA-Icmt wurde der Blot mit anti-HA Antikörpern und HRP-markierten anti-Maus Antikörpern und ECL-Reagenz behandelt. Spur 1 und 2: nicht-infizierte Sf9-Zellen; Spur 3 und 4: β-Galaktosidase (β-Gal)-exprimierende Sf9-Zellen; Spur 5 und 6: HA-Icmt-exprimierende Sf9-Zellen. Die Positionen der Molekulargewichtstandards sind angegeben. Abk.: ECL = *enhanced chemiluminescence*, HA = Hämagglutinin-Epitop, HA-Icmt = Hämagglutinin-Epitop-markierte Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase, HRP = *horse radish peroxidase*, kDA = Kilodalton,

Icmt = Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase, SDS = Natriumdodecylsulfat, *Sf9* = *Spodoptera frugiperda*.

Der in Abb. 6 dargestellte Immunoblot zeigt keine spezifischen immunreaktiven Banden in den Fraktionen der mit HA-Icmt-Baculoviren infizierten Insektenzellen. Zu erwarten wäre eine Bande bei 33 kDa, welches dem putativen Molekulargewicht der HA-Icmt entspricht. Die Banden bei 66 kDa und 60 kDa sind durch unspezifische Antikörperreaktionen erklärbar.

Um zu überprüfen, ob die fehlende HA-Icmt-Proteinexpression möglicherweise auf die lange Expressionszeit von 96 h nach der Infektion zurück zu führen ist, wurde die Expressionszeit variiert. Hierzu wurden die Zellen für 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Infektion geerntet und jeweils lösliche und partikuläre Fraktionen präpariert. Der Nachweis der HA-Icmt-Expression erfolgte mittels Immunoblot mit HA-spezifischen Antikörpern. Abb. 7 zeigt einen Immunoblot von Proteinlysaten, die 48 h nach Infektion von *Sf9*-Insektenzellen mit HA-Icmt-exprimierenden Baculoviren hergestellt worden waren. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte *Sf9*-Zellen, die wie die infizierten *Sf9*-Zellen behandelt worden waren. Von den jeweiligen S100- und P100-Fraktionen wurden jeweils 15 µg pro Spur in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Immunoblot-Analyse mit HA-spezifischen Antikörpern zeigt in der partikulären Fraktion HA-Icmt-infizierter *Sf9*-Insektenzellen eindeutig eine spezifische Bande bei ca. 30 kDa. Das aufgrund der Aminosäuresequenz errechnete Molekulargewicht beträgt 33 kDa. Die Spezifität der Antikörperreaktion zeigt sich insbesondere im Vergleich mit den Kontrollen, da bei diesen keine Banden in diesem Molekulargewichtsbereich detektierbar waren. Somit konnte die Expression von HA-Icmt in Baculovirus-infizierten *Sf9*-Insektenzellen in der partikulären Fraktion nachgewiesen werden. Die Banden bei ca. 66 und 60 kDa sind auf eine unspezifische Antikörperreaktion zurückzuführen. Die Analyse der Expressionskinetik zeigte ausserdem, dass das Expressionsmaximum der HA-Icmt nach 48 h Expressionszeit erreicht wurde (Ergebnisse nicht gezeigt).

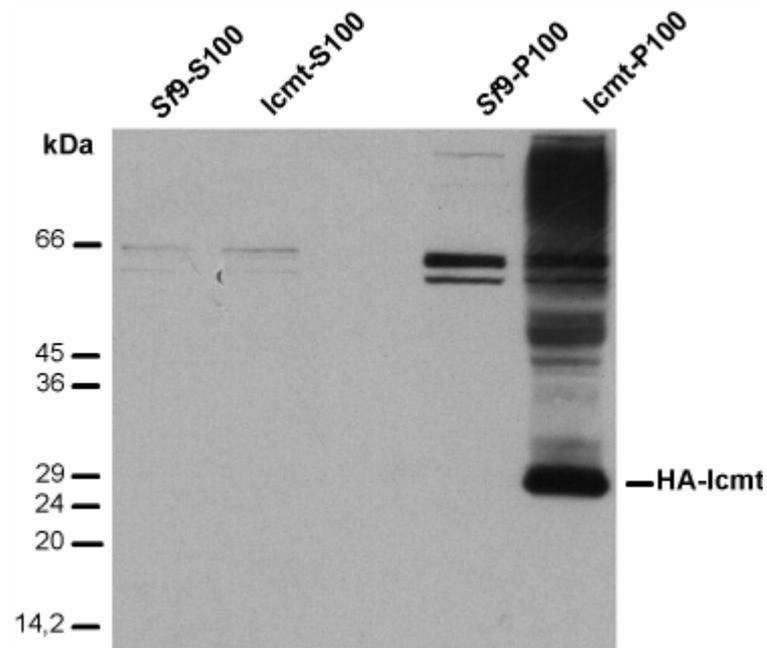


Abb. 7: Nachweis der HA-Icmt-Expression in infizierten *Sf9*-Insektenzellen 48 h nach Infektion. Für den Nachweis der Lokalisation der HA-Icmt in der partikulären Fraktion von *Sf9*-Lysaten 48 h nach Infektion wurden Immunoblot-Analysen mit anti-HA-Antikörpern und ECL-Entwicklung durchgeführt. Von der löslichen (S100) und partikulären (P100) Proteinfraction nicht-infizierter *Sf9*-Insektenzellen und HA-Icmt-infizierter *Sf9*-Zellen wurden jeweils 15 µg Proteinextrakt in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Der Nachweis der exprimierten HA-Icmt erfolgte mit anti-HA Antikörpern und HRP-markierten anti-Maus-Antikörpern und ECL-Entwicklung. Spur 1: lösliche Fraktion nicht-infizierter *Sf9*-Insektenzellen (*Sf9*-S100); Spur 2: lösliche Fraktion HA-Icmt-infizierter *Sf9*-Insektenzellen (Icmt-S100); Spur 3: partikuläre Fraktion nicht-infizierter *Sf9*-Insektenzellen (*Sf9*-P100); Spur 4: partikuläre Fraktion HA-Icmt infizierter *Sf9*-Insektenzellen (Icmt-P100). Die Positionen der Molekulargewichtstandards sind angegeben. Abk.: ECL = *enhanced chemiluminescence*, HA = Hämagglutinin-Epitop, HA-Icmt = Hämagglutinin-Epitop-markierte Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase, HRP = *horse radish peroxidase*, kDa = Kilodalton, Icmt = Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase, SDS = Natriumdodecylsulfat, *Sf9* = *Spodoptera frugiperda*.

4.3 Nachweis der Aktivität von HA-Icmt und funktionelle Charakterisierung des Enzyms

Zur Charakterisierung der Aktivität der in *Sf9*-Insektenzellen exprimierten HA-Icmt wurde die Methylierungsaktivität der partikulären Zellfraktionen unter verschiedenen Bedingungen bestimmt. Mit diesen Versuchen sollte zunächst der Nachweis erbracht werden, dass die rekombinante, Epitop-markierte Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase enzymatisch aktiv ist. Nachfolgend sollte das Enzym näher funktionell charakterisiert werden. Als Kontrolle für diese Experimente dienten die löslichen und partikulären Fraktionen von nicht-infizierten *Sf9*-Zellen. Die Expression der HA-Icmt wurde in allen verwendeten Präparationen durch Immunoblot-Analysen nachgewiesen. Der Nachweis der Methylierungsaktivität und auch die Charakterisierung der Enzymaktivität erfolgte in allen Experimenten nach der Methode von Phillips und Pillinger (1995). In dieser *in vitro*-Methylierungsreaktion liefert der Methylgruppendonor *S*-Adenosyl-L-[methyl-³H]-methionin (³H]AdoMet) die für die Methylierung durch HA-Icmt notwendige, radioaktiv-markierte Methylgruppen. Der Methylgruppenakzeptor *N*-Acetyl-*S-trans,trans*-L-Farnesylcystein (AFC) wird an seiner Carboxylgruppe methyliert und es entsteht ein radioaktiv-markierter Methylester. Dieser Ester wird mittels Heptan aus dem Ansatz extrahiert und nach Zugabe von Natronlauge (NaOH) hydrolysiert, wobei [³H]-markiertes Methanol frei wird, welches nach 24 h quantifiziert wird. *N*-Acetyl-*S*-Farnesyl-L-Cystein bleibt als Reaktionsrest übrig. Das Prinzip der Methylierungsreaktion wird in Abb. 10 im Anhang zusammenfassend dargestellt.

Die Quantifizierung der Enzymreaktion erfolgte durch Umrechnung der gezählten radioaktiven Zerfälle [*counts per minute* (cpm)] des in der Reaktion entstandenen [³H]-markierten Methanols anhand folgender Formel aus Phillips und Pillinger (1995):

$$V = \frac{n_1 \times n_3}{n_2 \times F \times E \times P \times t}$$

Parameter	Einheit	Kommentar
V	pmol/mg x min	spezifische Aktivität der Icmt
n_1	cpm	gemessene Stoffmenge von [^3H]Methanol
n_2	cpm	gemessene Stoffmenge von <i>S</i> -Adenosyl-L-[methyl- ^3H]methionin
n_3	pmol	Stoffmenge des Substrats; Summe aus den Stoffmengen von AdoMet und [^3H]AdoMet
F	dimensionslos	zur Messung verwendeter Anteil der Heptanschicht
E	dimensionslos	Effizienz der Partition von [^3H]Methanol von der wässrigen Phase in die Szintillationsflüssigkeit
P	mg	Proteinmenge
t	min	Reaktionszeit

Da zur Messung der gebildeten Stoffmenge von [^3H]Methanol 0,3 ml der Heptanschicht mit einem Volumen von 0,4 ml verwendet wurden, hat F einen Wert von 0,75. Die Effizienz der Partition von [^3H]Methanol von der wässrigen Phase in die Szintillationsflüssigkeit ist 0,8 (Volker und Stock 1990).

4.3.1 Nachweis der Methylierungsaktivität der partikulären HA-Icmt

Zum Nachweis der Methylierungsaktivität wurde jeweils 1 μg lösliche oder partikuläre Proteinfraction von HA-Icmt-exprimierenden *Sf9*-Zellen und von nicht-infizierten *Sf9*-Zellen mit 0,0667 μM [^3H]AdoMet und 100 μM AFC bei 37 °C für 30 min inkubiert und die Methylierungsaktivität wie in Kapitel 3.7 beschrieben nachgewiesen. Die Berechnung der Methylierungsaktivität erfolgte nach der in Kapitel 3.7 beschriebenen Formel und wurde als methyliertes AFC angegeben.

Die Abb. 8 zeigt die in einem repräsentativen Versuch erhaltenen Ergebnisse.

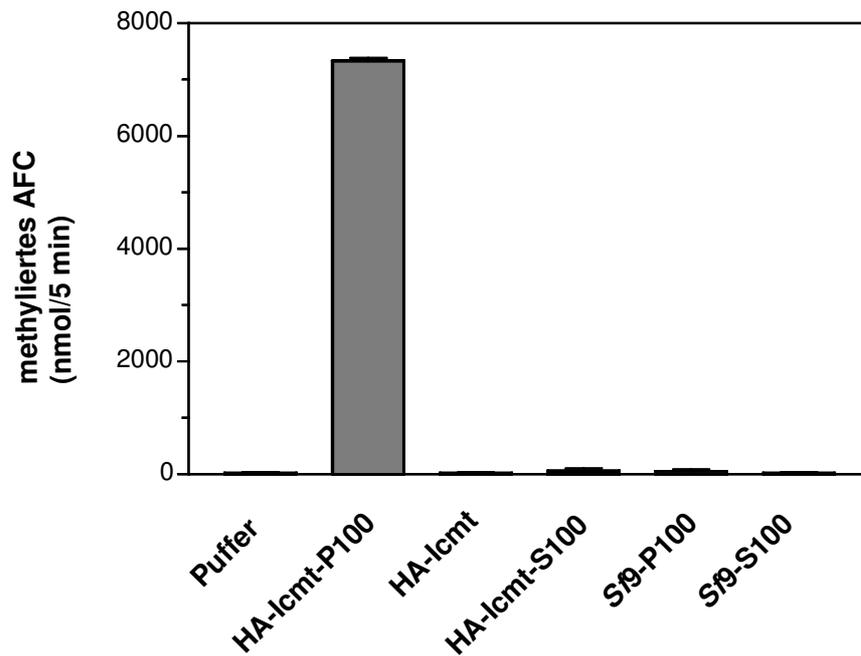


Abb. 8: Nachweis der Methylierungsaktivität der HA-Icmt in *Sf9*-Zelllysaten. Zur Bestimmung der Methylierungsaktivität wurden je 1 μg der löslichen (S100) oder der partikulären (P100) Fraktion eingesetzt. Gezeigt ist die Methylierungsaktivität in Lysaten von HA-Icmt-exprimierenden *Sf9*-Zellen (HA-Icmt-P100; HA-Icmt-S100) und von nicht-infizierten *Sf9*-Zellen (*Sf9*-P100; *Sf9*-S100). Als Kontrolle wurde eine Probe der partikulären Fraktion von HA-Icmt-exprimierenden *Sf9*-Insektenzellen für 5 min bei 95 °C denaturiert (HA-Icmt), sowie ein Ansatz verwendet, dem kein Protein zugegeben worden war (Puffer). Die Methylierungsreaktion erfolgte für 5 min bei 37 °C. An der Ordinate ist die Menge des methylierten AFC in nmol/5 min angegeben. Abk.: AFC = *N*-Acetyl-*S-trans,trans*-L-Farnesylcystein, HA = Hämagglutinin-Epitop, HA-Icmt = Hämagglutinin-Epitop-markierte Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase, Icmt = Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase, *Sf9* = *Spodoptera frugiperda*.

Für die in Abb. 8 dargestellten Experimente betrug die maximale Methylierungsaktivität der partikulären Fraktion von HA-Icmt-exprimierenden *Sf9*-Insektenzellen 7330 nmol methyliertes AFC/mg Protein, für die denaturierte Präparation HA-Icmt 28 nmol methyliertes AFC/mg Protein, für die lösliche Fraktion von HA-Icmt-exprimierenden *Sf9*-Insektenzellen 62,4 nmol methyl. AFC/mg Protein. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich eine deutliche enzymatische, methylierende Aktivität in der partikulären Fraktion HA-Icmt-exprimierender *Sf9*-Insektenzellen im Vergleich zur Kontrolle mit Lysaten von nicht-infizierten *Sf9*-Insektenzellen, die kaum Methylierungsaktivität zeigen. Die durch Kochen denaturierte partikuläre Fraktion von HA-Icmt-exprimierenden Zellen zeigte eine noch geringere Methylierungsaktivität als die Kontrollen von nicht-infizierten *Sf9*-Insektenzellen. Die lösliche Fraktion der HA-Icmt-exprimierenden Zellen zeigte keine spezifische Methylierungsaktivität. Ebenso verhielt es sich mit der löslichen Fraktion nicht-infizierter *Sf9*-Insektenzellen.

Die Methylierungsaktivität wurde in mindestens drei verschiedenen, unabhängig voneinander hergestellten Protein-Präparationen bestimmt und jeweils mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Die Mengen an AFC und AdoMet waren in allen Experimenten identisch. Ein Vergleich dieser verschiedenen Präparationen im Immunoblot und im Methylierungsexperiment zeigte einen deutlichen Unterschied bezüglich der Menge an exprimiertem HA-Icmt, sodass bei konstanter Menge Gesamtprotein im Methylierungsexperiment zwischen 7330 nmol methyliertes AFC/mg Protein und 2196 nmol methyliertes AFC/mg Protein gebildet worden waren. Die endogene Methylierungsaktivität nicht-infizierter *Sf9*-Zellen war sehr gering und betrug im Durchschnitt nicht mehr als 27 nmol methyliertes AFC/mg Protein.

Durch diese Versuche konnte der Nachweis erbracht werden, dass die in Baculovirus-infizierten *Sf9*-Insektenzellen exprimierte HA-Icmt als Methyltransferase aktiv ist.

4.3.2 Charakterisierung der Enzymreaktion

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die HA-Icmt in der partikulären Fraktion HA-Icmt-exprimierender *Sf9*-Insektenzellen zur Methylierung eines synthetischen Substrats fähig ist, wurde in den folgenden Versuchen untersucht, wie sich die Veränderung verschiedener Versuchsparameter auf die Methylierungsaktivität der partikulären Fraktion von infizierten Zellen auswirkt. Alle Versuche wurden mit mindestens drei verschiedenen und unabhängig voneinander gewonnenen Protein-Präparationen durchgeführt und jeweils mindestens dreimal wiederholt.

Da in der vorliegenden Arbeit kein Abgleich der Protein-Präparationen auf die HA-Icmt-Konzentration stattfand, ist auch ein Vergleich der verschiedenen Protein-Präparationen nur begrenzt möglich. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse ist nur möglich, wenn für die einzelnen Versuche der Methylierungsaktivität die gleiche Enzym-Präparation verwendet wurde.

4.3.2.1 Methylierungsaktivität in Abhängigkeit von der HA-Icmt-Menge

Um zu untersuchen, ob sich eine Änderung der eingesetzten Proteinmenge und damit der HA-Icmt-Enzymkonzentration auf die Methylierungsaktivität auswirkt, wurde für die folgenden Versuche die Menge der partikulären Fraktionen von HA-Icmt exprimierenden *Sf9*-Insektenzellen verändert und die Menge an methyliertem AFC in nmol bestimmt.

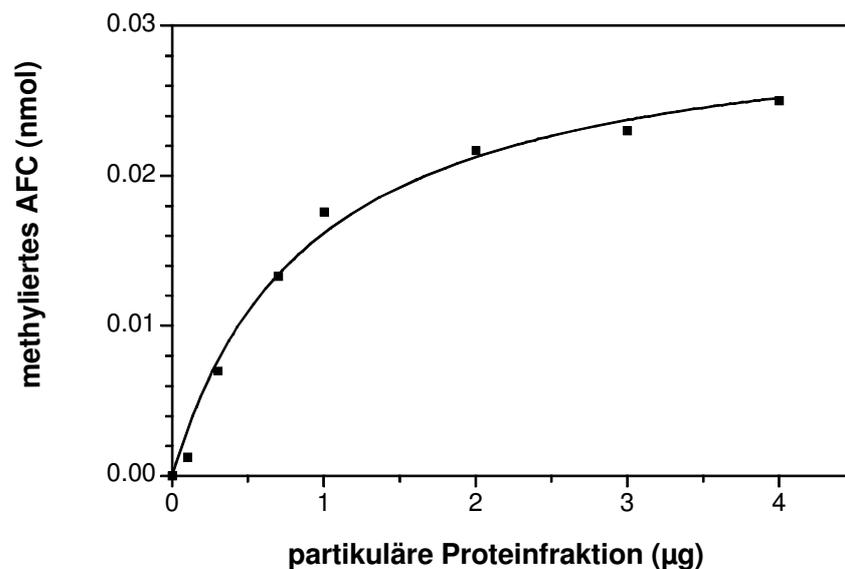


Abb. 9: Methylierungsaktivität in Abhängigkeit von der Enzymmenge. Zur Bestimmung der Methylierungsaktivität in Abhängigkeit von der Enzymmenge wurden steigende Mengen der partikulären Fraktion HA-Icmt-exprimierender *Sf9*-Zellen eingesetzt. Die AFC-Konzentration betrug in allen Ansätzen 100 µM, die AdoMet-Konzentration 4,665 µM. Die Reaktion erfolgte für 30 min bei 37 °C; die Menge an methyliertem AFC nmol/Ansatz partikulärer Fraktion wurde durch Messung des freigesetzten [³H]Methanols bestimmt. Die Darstellung der Methylierungsaktivität erfolgte in Form einer durch nicht-lineare Regression gewonnenen Kurve, die an die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen angepasst worden war. Abk.: Adomet = *S*-Adenosyl-L-methionin, AFC = *N*-Acetyl-*S*-*trans,trans*-L-Farnesylcystein, HA = Hämagglutinin-Epitop, HA-Icmt = Hämagglutinin-Epitop-markierte Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase, Icmt = Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase, *Sf9* = *Spodoptera frugiperda*.

Die Abb. 9 zeigt, dass sich die enzymatische Aktivität bei einer Gesamtproteinmenge von 4 μg partikulärer Fraktion HA-Icmt-exprimierender *Sf9*-Zellen einem Sättigungsbereich nähert. Die hier verwendete partikuläre Fraktion von HA-Icmt-exprimierenden *Sf9*-Insektenzellen methyliert bei einer Konzentration von 4 μg Gesamtprotein 0,025 nmol AFC. Darüber hinaus zeigt die Graphik, dass bis zu einer Proteinmenge von 1 μg eine annähernd lineare Abhängigkeit zwischen der Proteinmenge und der Menge an methyliertem Substrat besteht. Da bei der in diesem Versuch maximal eingesetzten Gesamtmenge an partikulärem Protein (4 μg) das Maximum der Enzymreaktion noch nicht erreicht worden war, wurde in den folgenden Versuchen die eingesetzte Proteinmenge weiter erhöht.

Die Abb. 10 zeigt die Auswertung des gleichen Versuches mit zwei weiteren Präparationen. Die maximal eingesetzte Gesamtmenge an partikulärer Fraktion HA-Icmt-exprimierender *Sf9*-Insektenzellen betrug 6 μg Protein.

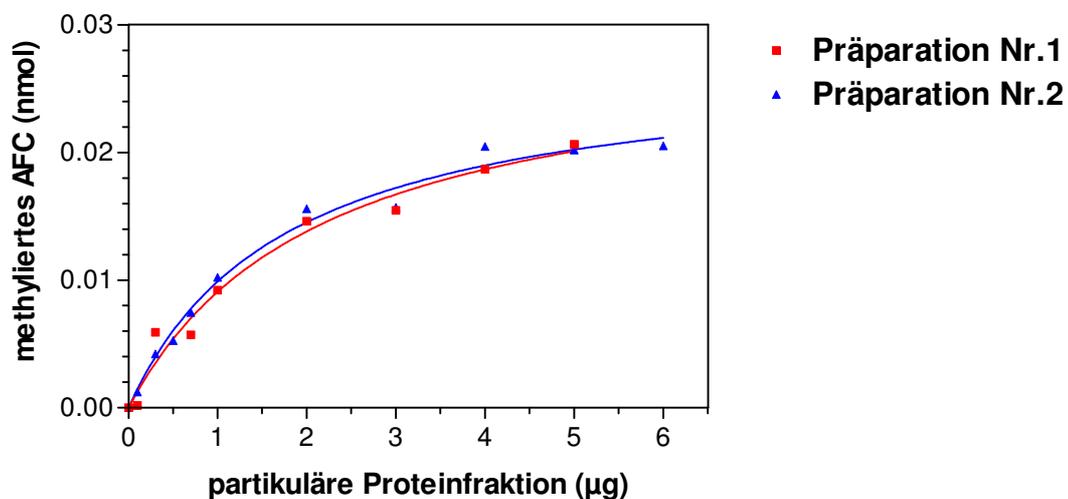


Abb. 10: Methylierungsaktivität in Abhängigkeit von der Menge an partikulärem Protein. Gezeigt ist die Änderung der Methylierungsaktivität in Abhängigkeit von der Menge an partikulärem Protein in zwei Präparationen aus HA-Icmt-exprimierenden *Sf9*-Zellen (Präparation Nr. 1 und Nr. 2). Die Reaktion wurde für 30 min bei 37 °C in Gegenwart von 100 μM AFC und 4,665 μM AdoMet durchgeführt. Die Methylierungsaktivität wurde anhand der Menge an methyliertem AFC bestimmt. Die Darstellung der Methylierungsaktivität erfolgte in Form einer

durch nicht-lineare Regression gewonnenen Kurve, die an die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen angepasst worden war. Abk.: Adomet = *S*-Adenosyl-L-methionin, AFC = *N*-Acetyl-*S-trans,trans*-L-Farnesylcystein, HA = Hämagglutinin-Epitop, HA-Icmt = Hämagglutinin-Epitop-markierte Isoprenylcystein-Carboxymethyltransferase, Icmt = Isoprenylcystein-Carboxymethyltransferase, *Sf9* = *Spodoptera frugiperda*.

Die in Abb. 10 dargestellten Kurven zeigen einen annähernd linearen Anstieg der Menge an methyliertem Substrat bei 0,1-2 µg partikulärer Fraktion HA-Icmt-exprimierender *Sf9*-Insektenzellen. Bei 2 µg Protein der Präparation Nr. 1 entstanden 0,015 nmol methyliertes AFC, bei 2 µg der Präparation Nr. 2 entstanden 0,016 nmol methyliertes AFC. Bei weiter steigenden HA-Icmt-Mengen flacht die Kurve bei beiden Präparationen weiter ab und zeigt ein Maximum der methylierten AFC-Menge bei 5 µg Protein. Dieses entspricht bei der Präparation Nr. 1 0,021 nmol methyliertes AFC und bei der Präparation Nr. 2 0,020 nmol methyliertes AFC. Eine weitere Erhöhung der Proteinmenge führte zu keiner weiteren Aktivitätszunahme. Ein Vergleich der HA-Icmt-Expression der beiden Präparationen Nr. 1 und Nr. 2 in Immunoblot-Analysen zeigt, dass Präparation Nr. 2 etwa doppelt soviel HA-Icmt enthielt (Ergebnisse nicht dargestellt). Bei der Auswertung der Graphiken konnte aber nur ein geringer nicht signifikanter Unterschied in der Enzymaktivität der beiden Präparationen festgestellt werden.

Diese Versuche machen deutlich, dass die Aktivität der rekombinanten HA-Icmt unter den verwendeten Bedingungen bei *ca.* 5 µg partikulärem Protein eine Sättigung zeigt.

4.3.2.2 Methylierungsaktivität der HA-Icmt in Abhängigkeit von der Reaktionszeit

Um den Zeitverlauf der Methylierung näher zu analysieren, wurde die Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten nach Reaktionsbeginn durch Präzipitation der Proteine mit 20% TCA gestoppt. Pro Ansatz wurden 5 µg Protein aus der partikulären Fraktion HA-Icmt-exprimierender *Sf9*-Insektenzellen eingesetzt. Die AFC-Konzentration betrug 100 µM, die Konzentration des eingesetzten AdoMet 4,665 µM. Die Reaktion wurde bei 37 °C durchgeführt. Unter diesen Bedingungen ist die Methylierungsaktivität maximal und das

gesamte AFC wird umgesetzt. Die Abb. 11 zeigt exemplarisch das Ergebnis eines Versuches.

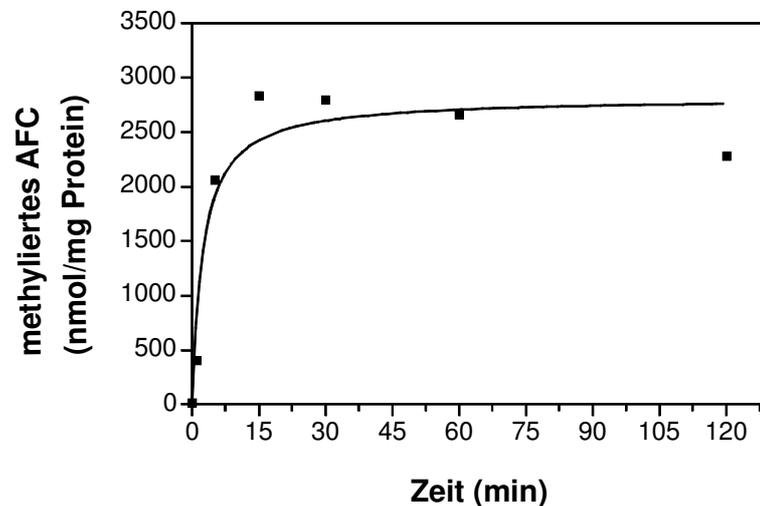


Abb. 11: Methylierungsaktivität der HA-Icmt in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. Zum Nachweis der Methylierungsaktivität wurde 5 μg Protein aus der partikulären Fraktion eingesetzt. Die Reaktion wurde bei 37 °C in Gegenwart von 4,665 μM AdoMet und 100 μM AFC durchgeführt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1 min, 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min) abgestoppt. Die Methylierungsaktivität wurde anhand der Menge des methylierten AFC in nmol/mg Protein bestimmt. Die Darstellung der Methylierungsaktivität erfolgte in Form einer durch nicht-lineare Regression gewonnenen Kurve, die an die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen angepasst worden war. Abk.: Adomet = S-Adenosyl-L-methionin, AFC = N-Acetyl-S-trans,trans-L-Farnesylcystein, HA = Hämagglutinin-Epitop, HA-Icmt = Hämagglutinin-Epitop-markierte Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase, Icmt = Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase, Sf9 = *Spodoptera frugiperda*.

Die Analyse der Reaktionskinetik zeigte eine initial schnelle Zunahme der Menge methyliertem Substrat in den ersten 15 min. Das Maximum der Methylierung des AFC durch die HA-Icmt-enthaltende partikuläre Protein-Präparation wurde nach 15 min erreicht. Danach kam es zu keiner weiteren Zunahme der methylierten AFC-Menge. Wenn die Inkubationszeiten länger als 15 min waren, dann nahm die Menge an methyliertem

AFC leicht ab. Bei der in Abb. 11 verwendeten Präparation betrug das Maximum an methyliertem AFC bei einer Reaktionszeit von 15 min 2835 nmol/mg Protein.

Die Analyse der Reaktionskinetik wurde mit drei verschiedenen Präparationen und für jede Präparation mindestens drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt. Alle diese Versuche zeigten bezüglich des Zeitverlaufs ähnliche Ergebnisse. Das Maximum der Methylierung des AFC durch die verschiedenen HA-Icmt-enthaltenden partikulären Protein-Präparationen wurde in allen Versuchen nach 10-15 min erreicht. Die Versuche unterschieden sich aber in der maximalen Menge an methyliertem Substrat. Die in Immunoblot-Analysen nachgewiesene Expression der HA-Icmt in den drei Präparationen korreliert mit den erreichten maximalen Mengen an methyliertem Substrat.

4.3.2.3 Methylierungsaktivität in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur

Da die Geschwindigkeit einer Enzymreaktion meist von der Reaktionstemperatur abhängig ist, wurde die Methylierungsaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt.

In den folgenden Versuchsansätzen wurde die Methylierung des AFC nach unterschiedlichen Reaktionszeiten gestoppt. Folgende Reaktionszeiten wurden verwendet: 30 sec, 1 min, 3 min, 5 min, 10 min, 15 min und 30 min. nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Methylierungsreaktion durch Präzipitation der Proteine mit 20 % TCA gestoppt. Die Quantifizierung des methylierten AFC erfolgte nach Bestimmung der Menge des methylierten AFC in nmol/mg Protein aus der partikulären Fraktion. Die Versuche wurden unter den oben beschriebenen Bedingungen mit 5 µg Protein aus der partikulären Fraktion HA-Icmt-exprimierender *Sf9*-Insektenzellen, 4,665 µM AdoMet und 100 µM AFC bei 37 °C, 30 °C und 25 °C durchgeführt. Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse je eines repräsentativen Experiments. In allen Experimenten wurde die gleiche Protein-Präparation verwendet, sodass die Ergebnisse direkt miteinander verglichen werden können.

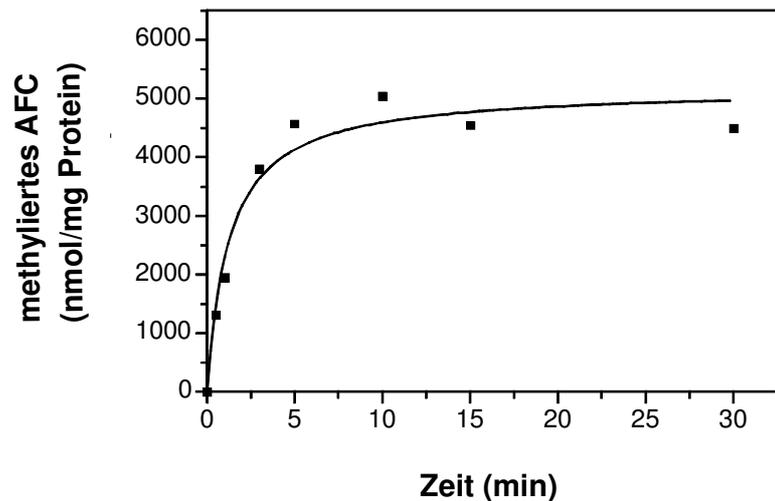


Abb. 12: Methylierungsaktivität der HA-Icmt bei 37 °C: Zum Nachweis der Methylierungsaktivität wurde 5 µg Protein aus der partikulären Fraktion HA-Icmt-exprimierender *Sf9*-Insektenzellen mit 4,665 µM AdoMet und 100 µM AFC bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde nach den angegebenen Zeiten durch Zugabe von 20 % TCA beendet. Die Menge an methyliertem AFC nmol/mg Protein aus der partikulären Fraktion wurde durch Messung des freigesetzten [³H]Methanols zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Reaktionsbeginn bestimmt. Die Darstellung der Methylierungsaktivität erfolgte in Form einer durch nicht-lineare Regression gewonnenen Kurve, die an die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen angepasst worden war. Abk.: Adomet = *S*-Adenosyl-L-methionin, AFC = *N*-Acetyl-*S*-*trans,trans*-L-Farnesylcystein, HA = Hämagglutinin-Epitop, HA-Icmt = Hämagglutinin-Epitop-markierte Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase, Icmt = Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase, *Sf9* = *Spodoptera frugiperda*, TCA = Trichloressigsäure.

Die in Abb. 12 dargestellten Ergebnisse zeigen einen initial steilen, schnellen Anstieg der Kurve, dem ein leichter Abfall der Kurve nach 10-15 min Reaktionszeit folgt. In dem dargestellten Versuch konnte ein Maximum der Methylierungsaktivität der rekombinanten HA-Icmt bei 37 °C von 5042 nmol methyliertem AFC/mg Protein nach einer Reaktionszeit von *ca.* 10 min gemessen werden.

Abb. 13 zeigt die gleiche Präparation in der Methylierungsreaktion bei 30 °C. Auch in diesem Versuch wurde die Reaktion nach unterschiedlichen Reaktionszeiten durch Präzipitation mit 20 % TCA gestoppt.

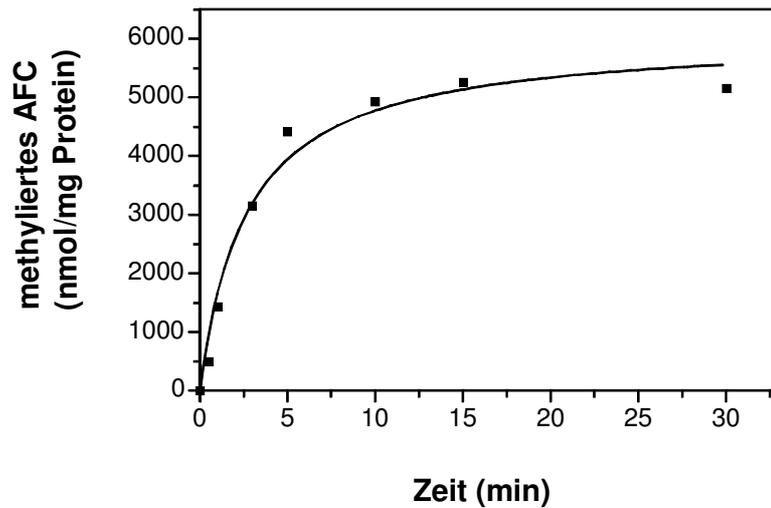


Abb. 13: Methylierungsaktivität der HA-Icmt bei 30 °C. Zum Nachweis der Methylierungsaktivität wurde 5 µg Protein aus der partikulären Fraktion HA-Icmt-exprimierender *Sf9*-Insktenzellen mit 4,665 µM AdoMet und 100 µM AFC inkubiert. Die Reaktion wurde bei 30 °C durchgeführt und zu den angegebenen Zeitpunkten durch Zugabe von 20 % TCA gestoppt. Die Methylierungsaktivität wurde als Menge an methyliertem AFC in nmol/mg Protein aus der partikulären Fraktion angegeben. Die Darstellung der Methylierungsaktivität erfolgte in Form einer durch nicht-lineare Regression gewonnenen Kurve, die an die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen angepasst worden war. Abk.: Adomet = *S*-Adenosyl-*L*-methionin, AFC = *N*-Acetyl-*S-trans,trans*-*L*-Farnesylcystein, HA = Hämagglutinin-Epitop, HA-Icmt = Hämagglutinin-Epitop-markierte Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase, Icmt = Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase, *Sf9* = *Spodoptera frugiperda*, TCA = Trichloressigsäure.

Auch bei einer Reaktionstemperatur von 30 °C zeigte sich eine Zunahme der enzymatischen Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit. Im Gegensatz zur Reaktion bei 37 °C nimmt die Enzymaktivität initial aber langsamer zu, was durch den etwas flacheren Kurvenverlauf verdeutlicht wird. Die maximale Menge an methyliertem AFC die in den beiden Versuchen bei 37 °C und mit der gleichen Präparation bei 30 °C erreicht wurde ist vergleichbar (5258 nmol methyliertes AFC bei 30 °C), allerdings wird die maximale Menge an methyliertem AFC erst nach 15 min und nicht wie bei 37 °C nach 10 min erreicht.

Um zu untersuchen, wie sich eine weitere Temperatursenkung auf die Kinetik der Enzymreaktion auswirkt, wurde die Enzymaktivität bei einer Temperatur von 25 °C analysiert. Die Bedingungen und die Menge an eingesetztem Enzym entsprachen den in Abb. 12 und Abb. 13 dargestellten Experimenten (5 µg Protein aus der partikulären Fraktion HA-Icmt-exprimierender *Sf9*-Insektenzellen, 4,665 µM AdoMet und 100 µM AFC).

In Abb. 14 sind die Ergebnisse eines exemplarischen Versuches dargestellt.

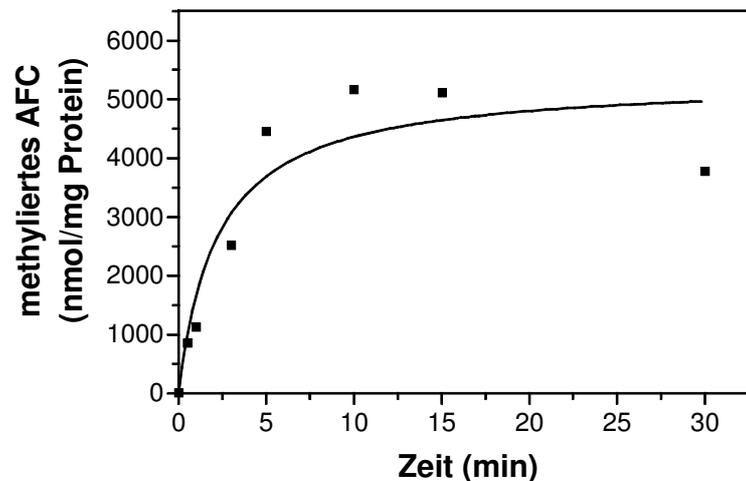


Abb. 14: Methylierungsaktivität der HA-Icmt bei 25 °C. Nachweis der Methylierungsaktivität mit 5 µg Protein aus der partikulären Fraktion bei 25 °C. Der Versuch wurde in Gegenwart von 4,665 µM AdoMet und 100 µM AFC durchgeführt und die Reaktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten gestoppt. Die Methylierungsaktivität wurde als Menge an methyliertem AFC in nmol/mg Protein aus der partikulären Fraktion angegeben. Die Darstellung der Methylierungsaktivität erfolgte in Form einer durch nicht-lineare Regression gewonnenen Kurve, die an die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen angepasst worden war. Abk.: Adomet = *S*-Adenosyl-L-methionin, AFC = *N*-Acetyl-*S*-*trans,trans*-L-Farnesylcystein, HA = Hämagglutinin-Epitop, HA-Icmt = Hämagglutinin-Epitop-markierte Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase, Icmt = Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase, *Sf9* = *Spodoptera frugiperda*.

Die Auswertung des in Abb. 14 dargestellten Experiments zeigte, dass die Erniedrigung der Reaktionstemperatur auf 25 °C bei der für die Ergebnisse in Abb. 14 verwendeten

Präparation im Vergleich zu den Versuchen bei 37 °C zu einem verzögerten initialen Kurvenanstieg führt. Der Anstieg der Methylierungsaktivität ist mit dem bei 30 °C beobachteten Anstieg vergleichbar. Dabei zeigte sich bei einer Reaktionstemperatur von 25 °C eine maximale Methylierungsaktivität der rekombinanten HA-Icmt von 5170 nmol methyliertes AFC 10 min nach Reaktionsbeginn. Danach nimmt die Aktivität wieder leicht ab. Auch bei einer Temperatur von 30 °C wird die maximale Enzymaktivität nach 10-15 min Reaktionszeit erreicht. Die maximale Menge an methyliertem AFC, die mit der gleichen HA-Icmt-Präparation bei 25 °C, 30 °C und 37 °C durchgeführt wurden, ist mit 5043 nmol methyliertes AFC bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C, 5258 nmol methyliertes AFC bei 30 °C und 5171 nmol AFC bei einer Reaktionstemperatur von 25 °C vergleichbar.

Alle Versuche wurden mit mindestens drei verschiedenen, voneinander unabhängig hergestellten Protein-Präparationen durchgeführt und in mindestens drei, ebenfalls voneinander unabhängigen Versuchen wiederholt. In allen Versuchen ergab die Auswertung eine ähnliche Enzymkinetik. Die maximale Menge an methyliertem AFC wurde in allen Versuchen nach 10-15 min erreicht. Allerdings zeigten sich Unterschiede in der maximalen Methylierungsaktivität, die auf die unterschiedliche HA-Icmt-Expression in den verschiedenen Präparationen zurückzuführen ist.

Zusammenfassend zeigen die Versuche, dass die Reaktionstemperatur keinen erheblichen Einfluss auf den Zeitverlauf der Methylierungsreaktion hat.

4.3.2.4 Methylierungsaktivität der HA-Icmt in Abhängigkeit von der Substratkonzentration

Um zu untersuchen, inwieweit die Substratkonzentration einen Einfluss auf die Enzymreaktion hat und bei welcher Konzentration eine Sättigung der HA-Icmt erreicht wird, wurde die Menge an AFC von 0 - 100 µM variiert und die Aktivität in methyliertem AFC in nmol/mg Protein aus der partikulären Fraktion HA-Icmt-exprimierender *Sf9*-Insektenzellen bestimmt. Die Reaktionstemperatur betrug 37 °C. Nach 5 min Reaktionszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 % TCA gestoppt. Es wurde 5 µg Protein aus der partikulären Fraktion HA-Icmt-exprimierender *Sf9*-Insektenzellen eingesetzt. Die Konzentration des Methylgruppendonors AdoMet betrug 4,665 µM.

Die Abb. 15 zeigt das Ergebnis zweier voneinander unabhängiger Versuche, die mit zwei verschiedenen HA-Icmt-Präparationen durchgeführt wurden.

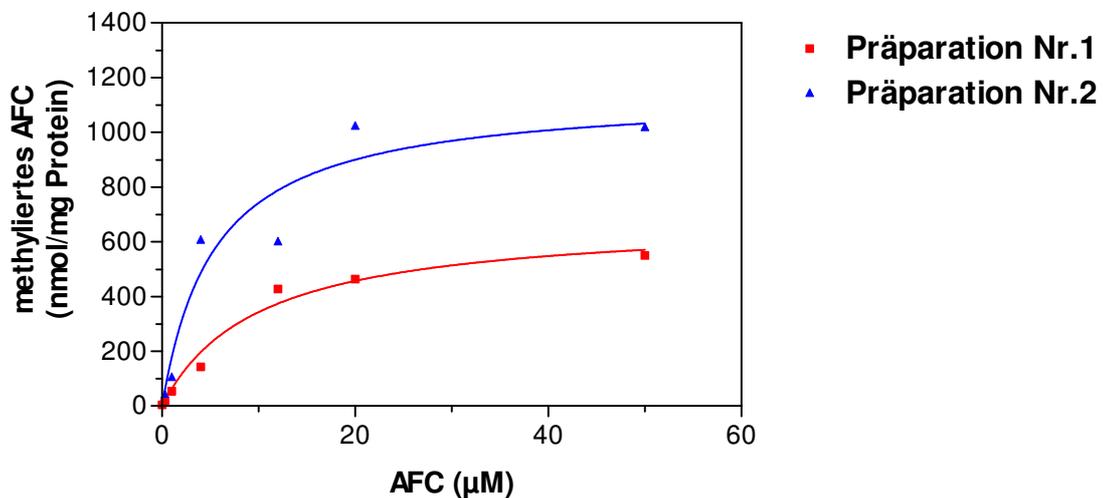


Abb. 15: Methylierungsaktivität der HA-Icmt in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Zum Nachweis der Methylierungsaktivität wurde 5 µg Protein aus der partikulären Fraktion HA-Icmt-exprimierender *Sf9*-Insektenzellen mit ansteigenden Konzentrationen AFC in Gegenwart von jeweils 4,665 µM AdoMet bei 37 °C für 5 min inkubiert. Die Methylierungsaktivität wurde als Menge an methyliertem AFC in nmol/mg Protein aus der partikulären Fraktion angegeben. Die Darstellung der Methylierungsaktivität erfolgte in Form einer durch nicht-lineare Regression gewonnenen Kurve, die an die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen angepasst worden war. Abk.: Adomet = S-Adenosyl-L-methionin, AFC = N-Acetyl-S-trans,trans-L-Farnesylcystein, HA = Hämagglutinin-Epitop, HA-Icmt = Hämagglutinin-Epitop-markierte Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase, Icmt = Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase, *Sf9* = *Spodoptera frugiperda*.

Die Abb. 15 zeigt, dass sich die zwei verwendeten Präparationen in ihrer initialen enzymatischen Aktivität unterscheiden. Präparation Nr. 2 weist eine deutlich höhere Enzymaktivität auf als Präparation Nr. 1. Aus 12 µM AFC werden von Präparation Nr. 2 602 nmol methyliertes AFC/mg Protein aus der partikulären Fraktion HA-Icmt exprimierender *Sf9*-Zellen gebildet, wohingegen von Präparation Nr. 1 nur 427 nmol

methyliertes AFC/mg Protein aus der partikulären Fraktion gebildet werden. Aus beiden Kurven ergibt sich außerdem ein unterschiedliches Aktivitätsmaximum der Methylierung: bei Präparation Nr. 2 liegt dieses bei 1020 nmol methyliertes AFC/mg partikuläre Fraktion HA-Icmt; bei Präparation Nr. 1 liegt das Methylierungsmaximum bei 550 nmol methyliertes AFC/mg partikuläre Fraktion HA-Icmt. Die maximale Aktivität wird bei beiden Präparationen bei einer Substratkonzentration von 50 μ M AFC erreicht. Das heißt, dass bei beiden Präparationen eine Konzentration von AFC von 50 μ M zu einer Enzymsättigung führte. Die unterschiedlichen Maxima der Enzymaktivität lassen sich durch eine unterschiedlich starke Expression und einen unterschiedlichen Gehalt an aktiver HA-Icmt in den einzelnen, voneinander unabhängig gewonnenen Präparationen infizierter *Sf9*-Insektenzellen erklären.

Zusammenfassend zeigen die zur Charakterisierung der rekombinanten, in Baculovirus-infizierten *Sf9*-Insektenzellen exprimierten HA-Icmt durchgeführten Versuche folgende Ergebnisse:

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine aktive rekombinante HA-Icmt in *Sf9*-Insektenzellen exprimiert werden und in der partikulären Fraktion der Baculovirus-infizierten Zellen nachgewiesen werden. Durch Etablierung eines spezifischen Methylierungsassays konnte die Aktivität der HA-Icmt in partikulären Protein-Präparationen nachgewiesen werden.

Die Analyse der enzymatischen Eigenschaften zeigt, dass die Methylierungsaktivität unter den in den durchgeführten Experimenten gewählten Versuchsbedingungen, von verschiedenen Faktoren abhängig ist:

1. Die Menge anmethyliertem Substrat ist von der HA-Icmt-Konzentration abhängig. Bei 5 μ g HA-Icmt-haltigem Protein aus der partikulären Fraktion und einer Substratkonzentration von 100 μ M AFC bzw. einer Konzentration des Methylgruppendonors AdoMet von 4,665 μ M wird das Maximum der methylierten AFC-Menge erreicht.
2. Das Ausmaß der Methylierung ist von der Reaktionszeit abhängig. Es erreicht nach 10-15 min sein Maximum.
3. Die Methylierungsaktivität ist nur wenig von der Reaktionstemperatur abhängig. Ein Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeit und der maximalen Enzymaktivität bei 37 °C, 30 °C und 25 °C zeigt, dass eine niedrigere Reaktionstemperatur nur zu einer geringfügigen Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit führt.

-
4. Die Methylierungsaktivität ist abhängig von der Substratkonzentration. Bei Verwendung von 5 μg Protein aus der partikulären Fraktion HA-Icmt-exprimierender Sf9-Insektenzellen, einer Reaktionszeit von 5 min und einer Reaktionstemperatur von 37 °C tritt ab einer Konzentration von 50 μM AFC eine Enzymsättigung ein.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die cDNA der humanen Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase (Icmt) aus PANC-1-Pankreaskarzinomzellen kloniert und das durch diese cDNA kodierte Protein in *Sf9*-Insektenzellen als HA-Epitop-markiertes Protein exprimiert. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion, die durch die rekombinant exprimierte HA-Icmt katalysiert wird, nachgewiesen und charakterisiert.

Die Methyltransferase wurde als Enzym der posttranslationalen Lipidmodifikation in verschiedenen Geweben und Zelltypen von Säugern, unter anderem in der Retina von Rindern, in der Leber von Ratten, im ZNS von Kaninchen, aber auch in humanen neutrophilen Granulozyten identifiziert (Philips *et al.* 1995, Zhang und Casey 1996, Dai *et al.* 1998). Eine besonders hohe Icmt-Protein Expression findet man bei Mammaliern im zentralen Nervensystem, in der Leber und in den Testes (Barten und O`Dea 1990, Volker und Stock 1995). In humanen Geweben ist die Expression ubiquitär (Dai *et al.* 1998) und trägt in unterschiedlichem Maße zur Gewebs- (Bergo *et al.* 2000 a; 2000 b, Kramer *et al.* 2003) und Organbildung (Bergo *et al.* 2000 a; 2000 b, Lin *et al.* 2002) bei. Eine Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase-Aktivität wurde in den meisten eukaryontischen Zellen, nicht aber in Prokaryonten (Pillinger *et al.* 1994, Desrosiers *et al.* 1999) nachgewiesen.

5.1 Klonierung der HA-Icmt-cDNA

Die cDNA, die für die humane Icmt kodiert, wurde erstmals 1998 von Dai und Mitarbeiter aus humanen myeloischen HL60-Zellen kloniert (Dai *et al.* 1998). Für die cDNA-Amplifikation wurden *primer* verwendet, die auf Grund einer partialen murinen cDNA-Sequenz (*GenBank accession no.* AA022288) ausgewählt worden waren. Diese cDNA zeigte hohe Sequenzübereinstimmung mit Ste14p. Bei Ste14p handelt es sich um das zur Icmt korrespondierende Protein aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, das Produkt des Gens *STE14*. Ste14p war bis zu diesem Zeitpunkt die einzige Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase, die auf molekularer Ebene charakterisiert worden war (Sapperstein *et al.* 1994).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Icmt-cDNA aus der mRNA von PANC-1-Pankreaskarzinomzellen amplifiziert und kloniert. Dazu wurde die RNA aus PANC-1-Zellkulturen isoliert und die komplette humane Icmt-cDNA mittels RT-PCR amplifiziert. In der Agarosegel-Elektrophorese konnte ein 854 bp großes DNA-Fragment dargestellt werden, welches der Icmt-cDNA entsprach. Die Größe des gesamten Icmt-Gens beträgt 3597 bp, die Größe der kodierenden Sequenz der Icmt 854 bp (Dai *et al.* 1998). Die Sequenzierung des klonierten Icmt-cDNA-Fragments wies keine Mutationen auf und war somit mit der publizierten Sequenz identisch (*GenBank Accession no.* AF 064084, Dai *et al.* 1998).

Die Amplifizierung der gesamten humanen Icmt-cDNA war nur unter Zugabe von DMSO zum RT-PCR-Ansatz möglich. Die Guanosin- und Cytosin-reiche Icmt-mRNA bildet Sekundärstrukturen, die durch DMSO aufgelöst werden konnten. Bei der Klonierung der Icmt-cDNA wurde an das 5'-Ende der cDNA eine Sequenz eingefügt, die ein Epitop für einen anti-HA Antikörper kodiert. Die Epitop-Markierung ermöglicht die Detektion des im Rahmen dieser Arbeit rekombinant exprimierten Icmt-Proteins auf Immunoblots und damit die Analyse der subzellulären Lokalisierung der rekombinant exprimierten Icmt. Ein spezifischer anti-Icmt Antikörper stand für diese Untersuchungen nicht zur Verfügung. Für die Epitop-Markierung wurde der N-Terminus des Proteins gewählt, da ein Vergleich der Proteinsequenz der humanen Icmt mit verwandten Sequenzen in Datenbanken das höchste Maß an Divergenzen im N-terminalen Drittel des Moleküls erkennen ließ, so dass die katalytische Domäne der Icmt höchstwahrscheinlich am C-Terminus lokalisiert ist (Dai *et al.* 1998, Romano und Michaelis 2001). Andererseits zeigten Studien von Dai *et al.*, dass die Fusionierung von Icmt mit GFP oder die Markierung des Proteins mit einem Epitop für anti-Myc Antikörper am C-Terminus die Icmt-Lokalisation und Funktion nicht beeinflussten (Dai *et al.* 1998). Bei Untersuchungen von Romano *et al.* konnte festgestellt werden, dass HA-Epitope an Position Q3 bzw. I239 von Ste14p dazu führen, dass Ste14p nicht mehr im endoplasmatischen Retikulum (ER), sondern im Golgi-Apparat lokalisiert ist (Romano *et al.* 1998), hingegen führte die Einführung von Myc-Epitopen an diesen Positionen nicht zu einer Mislokalisierung des Proteins (Romano und Michaelis 2001). Die Gründe für das unterschiedliche Verhalten der HA- bzw. Myc-markierten Ste14p-Proteine sind unklar.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Immunoblot-Analysen zur Charakterisierung der Expression von HA-Icmt in *Sf9*-Insektenzellen zeigten, dass die HA-markierte Icmt in *Sf9*-Insektenzellen in der partikulären Fraktion lokalisiert ist. Die funktionellen Untersuchungen machten darüber hinaus deutlich, dass das in dieser Fraktion vorhandene Protein aktiv ist. Ob diese Epitop-Markierung am N-Terminus einen Einfluß auf die Enzymaktivität hat, müsste durch vergleichende Studien mit nicht-markierter Icmt untersucht werden.

5.2 Expression der rekombinanten HA-Icmt in *Sf9*-Insektenzellen

Im Verlauf der Arbeit wurde die Expression der rekombinanten HA-Icmt in *Sf9*-Insektenzellen mit Hilfe des Baculovirus-Transfervektors pVL1393 durchgeführt. Die Expression erfolgte in einem eukaryontischen Expressionssystem, da dieses die Expression rekombinanter, posttranslational modifizierter Proteine ermöglicht. Die hierfür verwendeten *Sf9*-Insektenzellen führen die meisten Protein-Modifikationen, wie Isoprenylierung, Phosphorylierung und Methylierung, durch (O'Reilly *et al.* 1992). Für das humane Rce1 ist eine heterologe Expression in *Sf9*-Insektenzellen beschrieben (Otto *et al.* 1999). Icmt wurde bisher in *E. coli*-Zellen (Desrosiers *et al.* 1999) und heterolog in COS-1-Zellen (Dai *et al.* 1998) exprimiert. Im Gegensatz zur Expression in kultivierten Säugetierzellen ermöglicht die heterologe ektopische Expression in *Sf9*-Insektenzellen eine hohe Ausbeute rekombinanter Proteine (Zhang und Casey 1996). Ein weiterer Vorteil ist, dass es hier im Gegensatz zur Expression in prokaryontischen Expressionssystem nicht zu einer Ausbildung von *inclusion bodies* kommt, aus denen Proteine kaum in aktiver Form isoliert werden können.

Die Expression der HA-Icmt erfolgte in der vorliegenden Arbeit für 48 h nach Infektion, da nach dieser Zeit ein Expressionsmaximum für HA-Icmt in den infizierten *Sf9*-Insektenzellen nachgewiesen werden konnte. Durch Fraktionierung der Zelllysate konnte HA-Icmt in der partikulären, membranhaltigen Fraktion nachgewiesen werden. Unter denaturierenden Bedingungen wurde die HA-Icmt durch SDS-Polyacrylamid-

Gelelektrophorese und Immunoblotting mit einem anti-HA-Antikörper als 30 kDa großes Protein detektiert. Das Laufverhalten der rekombinanten HA-Icmt im Blot stimmt annähernd mit dem publizierten Laufverhalten im SDS-Polyacrylamidgel überein. In frühen molekularen Charakterisierungen des Enzyms findet man unterschiedliche Größenangaben, mit Molekulargewichten zwischen 24 bis 30 kDa (Barten und O`Dea 1990). Aus der Aminosäure-Sequenz mit einer Größe von 284 AS ergibt sich ein Molekulargewicht von 31938 Da (Desrosiers *et al.* 1999, Lin *et al.* 2002). Publikationen, in denen Icmt mit einer Größe von 98 kDa angegeben wird, deuten auf die Bildung multimerer Komplexe aus den 32 kDa großen Monomeren der Icmt hin, die in Abhängigkeit von Zinkionen gebildet werden (Desrosiers *et al.* 1999).

Der Nachweis der HA-Icmt gelang in der Immunoblot-Analyse lediglich in der partikulären P100-Fraktion. Entsprechende Angaben über die Lokalisation der Icmt im membranären Kompartiment verschiedener Zelltypen und Geweben, beispielsweise in humanen neutrophilen Granulozyten, humanen myeloischen HL60-Zellen, renalem Gewebe von Ratten oder in embryonalen Stammzellen von Mäusen, findet man in Pillinger *et al.* 1994, Dai *et al.* 1998, Desrosiers *et al.* 1999, Chen *et al.* 2000, Bergo *et al.* 2000 a; 2000 b, Romano und Michaelis 2001. Mittels eines *green fluorescent-Icmt-Fusionsproteins* konnte im Rahmen von Fluoreszenzuntersuchungen gezeigt werden, dass die Icmt in Zellen von Mammaliern vorwiegend im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist (Dai *et al.* 1998, Desrosiers *et al.* 1999, Bergo *et al.* 2000 a; 2000 b). Strukturanalysen von Ste14p, dem Icmt-Homolog von Hefen, unterstützen die Angaben über eine Lokalisation in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (Romano und Michaelis 2001). In Untersuchungen zur Membrantopologie von Ste14p wurden von Romano und Mitarbeiter 6 hydrophobe Domänen identifiziert, die eine Verankerung im endoplasmatischen Retikulum vermitteln. Zwei kurze *hairpin loops*, die jeweils durch die Aminosäuren N191 und P192 induziert werden, sind in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums exponiert. Die hydrophilen Anteile des Proteins, sowie der N- und C-Terminus sind zum Zytosol hin gerichtet (Romano und Michaelis 2001). Die große Sequenzübereinstimmung zwischen Icmt und Ste14p und die Analysen zur Hydrophobizität von Ste14p lassen vermuten, dass dessen Membrantopologie auch in den eukaryontischen Methyltransferasen erhalten ist, obwohl die Icmt höherer Organismen zwei zusätzliche putative membranäre Domänen am N-Terminus enthält (Romano und Michaelis 2001). Da diese Domänen bei Ste14p fehlen und eine hohe Divergenz verwandter Icmt-Sequenzen im N-terminalen

Drittel des Moleküls zu finden ist, liegt die Vermutung nahe, dass der N-Terminus für die enzymatische Funktionalität nicht entscheidend ist und die katalytische Domäne der Icmt am C-Terminus lokalisiert ist (Dai *et al.* 1998). Durch Mutationsanalysen konnten wichtige Aminosäuren für die Enzymaktivität der Icmt identifizieren werden: G31, G132, P173 und E213 (Romano und Michaelis 2001). Eine unter allen Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferasen am C-Terminus konservierte Region ist RHPxY-EE. Diese Region ist entscheidend für die Aktivität der Ste14p und vermutlich auch für die Aktivität der Icmt (Romano und Michaelis 2001).

5.3 Methylierungsreaktion durch HA-Icmt

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methylierungsaktivität der HA-Icmt nachgewiesen und die Enzymkinetik in Abhängigkeit von verschiedenen Reaktionsbedingungen charakterisiert. Hierzu wurden aus Homogenaten HA-Icmt-exprimierender *Sf9*-Insektenzellen mittels Zentrifugation bei 100 000 x g lösliche S100-Fractionen und partikuläre P100-Fractionen hergestellt. Die S100- und die P100-Fraktion wurde jeweils auf ihre Fähigkeit hin untersucht, eine Methylierungsreaktion zu katalysieren. Anschließend wurde die Methylierungsaktivität unter verschiedenen Reaktionsbedingungen näher charakterisiert.

In den zum Nachweis der Methylierungsaktivität der rekombinant exprimierten HA-Icmt durchgeführten *in vitro* Assays, die in Anlehnung an die von Philips und Pillinger (1995) publizierte Methode durchgeführt wurden, wurde das Farnesylcystein-Analogon *N*-acetyl-*S-trans,trans*-L-farnesylcystein (AFC) als Substrat (Methylakzeptor) verwendet. Radioaktiv-markiertes *S*-Adenosyl-L-[methyl-³H]methionin (³H]AdoMet) diente als Methylgruppendonator. Durch alkalische Hydrolyse des in der Reaktion entstehenden [³H]AFC-Methylesters und Quantifizierung des dabei entstandenen volatilen [³H]Methanol konnte eine Methylierungsaktivität der in *Sf9*-Insektenzellen rekombinant exprimierten HA-Icmt nachgewiesen werden. Die Kontrollpräparationen aus Proteinfractionen nicht-infizierter *Sf9*-Insektenzellen und β -Galaktosidase-infizierter *Sf9*-Insektenzellen zeigten in parallel durchgeführten Experimenten keine Methylierungsaktivität. Bei den zum Nachweis der Methylierungsaktivität durchgeführten Versuchen wurden mit

unterschiedliche Präparationen HA-Icmt-exprimierender *Sf9*-Insektenzellen verschiedene Mengen methylierten AFCs gemessen. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Präparationen unterschiedliche Mengen HA-Icmt enthielten, die durch unterschiedliche Infektionseffizienzen bei der Infektion von *Sf9*-Insektenzellen mit HA-Icmt-exprimierenden Viren oder auch unterschiedlich hohe Virustiter der Virussuspensionen verursacht wurden. Eine durch *Sf9*-Insektenzellen ausgelöste Methylierungsreaktion konnte durch die Ergebnisse der Kontrollversuche mit Lysaten von nicht-infizierten-*Sf9*-Insektenzellen ausgeschlossen werden, da diese keine Methylierungsaktivität zeigten.

Bei der Untersuchung des Einflusses verschiedener Reaktionsparameter auf die Methylierungsreaktion konnte festgestellt werden, dass die Methylierung des Substrates AFC durch die rekombinant exprimierte HA-Icmt bei steigender Enzymmenge eine Sättigung zeigt. Ab einer Enzymmenge, die in 5 µg membranärer Präparation HA-Icmt-exprimierender *Sf9*-Insektenzellen enthalten ist, kam es bei konstanter AFC- und AdoMet-Konzentration zu keiner weiteren Zunahme an methyliertem AFC. Ebenso wurde ab einer Substratkonzentration von 50 µM AFC eine Sättigung festgestellt, wenn die Gesamtproteinmenge 5 µg und die AdoMetkonzentration 4,665 µM betrug. Untersuchungen zur Reaktionsgeschwindigkeit zeigten, dass die maximale Menge an methyliertem Substrat nach einer initial schnellen Zunahme der Aktivität 10-15 min nach Reaktionsbeginn gemessen werden konnte. Um die Abhängigkeit der Enzymreaktionen von der Reaktionstemperatur zu untersuchen, wurde die Methylierungsaktivität bei 37 °C, 30 °C und 25 °C bestimmt. Die Veränderung der Reaktionstemperatur führte aber im verwendeten Temperaturbereich zu keiner wesentlichen Beeinflussung der Methylierungsreaktion.

Bei einer Reihe von Publikationen wurde die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode zum Nachweis der Methylierungsaktivität der Icmt angewandt (Philips und Pillinger 1995, Dai *et al.* 1998, Desrosiers *et al.* 1999, Bergo *et al.* 2000 a; 2000 b). Das Substrat AFC wird als Prenylcysteinanalogon carboxymethyliert und eignet sich dabei sehr gut für die *in vitro* durchgeführte Methylierungsreaktion. Außerdem lässt sich AFC mit Trichloressigsäure und Heptan aus einem Proteingemisch extrahieren und somit spezifisch nachweisen. Nachteilig ist, dass AFC in Konzentrationen über 200 µM die Carboxylmethylierung hemmt und die Funktionen der Icmt beeinträchtigen kann (Philips und Pillinger 1995, Volker und Stock 1995, Kramer *et al.* 2003). Derart hohe AFC-

Konzentrationen wurden in den durchgeführten Methylierungsversuchen nicht eingesetzt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass es in den durchgeführten Experimenten zu keiner Beeinträchtigung der Enzymaktivität und Enzymkinetik gekommen ist. Die Versuche zum Nachweis der Methylierungsreaktion durch HA-Icmt wurden in der vorliegenden Arbeit bei pH 8 durchgeführt. Untersuchungen durch Philips und Pillinger, bzw. Volker und Stock zeigen, dass pH-Werte über 10 zu einer Hydrolyse des Carboxymethylesters führen (Philips und Pillinger 1995, Volker und Stock 1995) und somit die enzymatische Reaktion auf jeden Fall unterhalb dieses pH-Bereichs durchgeführt werden sollte.

Sowohl die Versuche der zitierten Publikationen, wie auch die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden mit Icmt-haltigen Zellfraktionen und nicht mit gereinigtem Protein durchgeführt. Um die Eigenschaften des Enzyms und die Enzymreaktion genauer zu charakterisieren, sollte versucht werden, die Icmt in gereinigter Form zu gewinnen um dann Methylierungsversuche mit aktiver gereinigter Icmt durchzuführen. Hierzu ist jedoch anzumerken, dass nach heutigem Wissensstand die Aktivität der Icmt von einer Membranbindung abhängig ist (Philips *et al.* 1993, Pillinger *et al.* 1994, Volker und Stock 1995, Dai *et al.* 1998, Bergo *et al.* 2000 a; 2000 b, Romano und Michaelis 2001). Eine Extraktion und Reinigung einer aktiven Icmt aus Membranen ist bis heute noch nicht gelungen (Pillinger *et al.* 1994, Dai *et al.* 1998, Desrosiers *et al.* 1999, Romano und Michaelis 2001). Dies läßt auf eine hohe Empfindlichkeit des Enzyms gegenüber verschiedenen Faktoren, beispielsweise Detergentien schließen (Romano und Michaelis 2001). Die Behandlung membranärer Präparationen, die rekombinant exprimierte Icmt enthielten, mit CHAPS, Octyl- β -Glucosid, Triton-X 100 oder auch Natriumdeoxycholat resultierten in einem vollständigen Verlust der Carboxymethyltransferase-Aktivität. Eine Wiederherstellung der Funktion gelang nur in Gegenwart von Phospholipiden durch Ausbildung von Liposomen (Pillinger *et al.* 1994). Die Beeinflussung der Interaktion mit Membranlipiden durch verschiedene Detergentien können zu einer Störung der Membranverankerung der Icmt und damit der Tertiärstruktur des Enzyms führen (Romano und Michaelis 2001). Darüber hinaus konnten Volker und Stock zeigen, dass die Zugabe von EDTA zu Icmt-enthaltenden Präparationen zu keinem Aktivitätsverlust der Icmt führt (Volker und Stock 1995), was darauf schließen läßt, dass divalente Kationen, wie Ca^{2+} und Mg^{2+} nicht für die Funktion von Icmt notwendig sind. Im Gegensatz zu früheren Vorstellungen, dass die Icmt ein von Metallionen unabhängiges Enzym ist (Volker und Stock 1995), weiß man heute allerdings, dass insbesondere Zinkionen zur Aktivität und

Stabilisierung der Struktur der IcmT essentiell sind (Desrosiers *et al.* 1999). Sie spielen eine Rolle bei der Bildung multimerer, aktiver Komplexe der IcmT. Metallionen, wie Zinkionen, stabilisieren die IcmT in der Membran und schützen das Enzym vor Proteasen. Desrosiers *et al.* wies durch Einsatz des Chelators 1,10-Phenanthrolin, welcher eine hohe Affinität für Zinkionen aufweist, nach, dass die Methylierungsaktivität der IcmT in Präparationen aus Zellen von Rattennieren von Zinkionen abhängig ist und der Verlust von Zink zu einer irreversiblen Hemmung der katalytischen Aktivität der IcmT führt (Desrosiers *et al.* 1999).

Die IcmT und die von ihr katalysierten Methylierungen scheinen für zelluläre Prozesse eine größere Bedeutung zu haben, als man bisher angenommen hat. Aktuelle Quellen weisen verstärkt auf die entscheidende Rolle der IcmT in vielen zellulären Prozessen hin. Sie ist sowohl an physiologischen Zellvorgängen (Barten und O`Dea 1990), wie der Apoptose (Kramer *et al.* 2003) und der Organentwicklung (Lin *et al.* 2002), als auch an der onkogenen Transformation, vor allem durch onkogene Ras-Proteine (Barten und O`Dea 1990, Philips *et al.* 1993, Lederer *et al.* 1994, Pillinger *et al.* 1994, Quian *et al.* 1997, Fu und Casey 1999, Kirschmeier *et al.* 2001, Bergo *et al.* 2002, Cox und Der 2003, Winter-Vann *et al.* 2003), beteiligt. Unter der großen Zahl onkogener Proteine spielen Ras-Proteine eine wichtige Rolle, da sie für die Entstehung zahlreicher, sowohl solider wie auch hämatologischer humaner Neoplasmen verantwortlich sind (Qian *et al.* 1997, Sebt und Adjei 2004). Es wurden zahlreiche Untersuchungen im Rahmen von klinisch evaluierten 'anti-Ras Strategien' durchgeführt, um die Wirksamkeit pharmakologischer Inhibitoren gegen onkogene Ras-Proteine zu überprüfen. Zu diesen Inhibitoren gehören Substanzen, die die Bindung von Ras-Proteinen mit der Plasmamembran hemmen (Farnesyltransferase-Inhibitoren), Signaltransduktionswege inhibieren (Raf- und MEK-Proteinkinase-Inhibitoren), autokrine Signale von Wachstumsfaktoren beeinflussen (EGF-Rezeptor-Inhibitoren) oder die Genexpression von H-*ras*- und c-*raf*-1 inhibieren (Quian *et al.* 1997, Fu und Casey 1999, Kirschmeier *et al.* 2001, Cox und Der 2003, Zhu *et al.* 2003). Vor allem Inhibitoren der FTase und der GGTaseI schienen vielversprechende Therapeutika in der antitumorösen Therapie zu sein, da sie nachweislich das Tumorwachstum reduzieren konnten (Qian *et al.* 1997, Fu und Casey 1999, Zhu *et al.* 2003). So konnte beispielsweise bei Mäusen, die ein pulmonales Adenokarzinom mit Mutation des Gens *K-ras* aufwiesen, durch die FTase-Inhibitoren FTI-276 und L778-123 eine signifikante Reduktion des Tumolvolumens erreicht werden (Zhang *et al.* 2003, Sebt und Adjei 2004). Die Effektivität solcher Substanzen scheint aber fraglich. Nicht in allen

Studien konnte eine Inhibition der transformierenden Wirkung von K-Ras erzielt werden. Ursache sind alternative Prenylierungen, bei denen K-Ras durch die GGTaseI posttranslational isoprenyliert wird (Fu und Casey 1999, Zhang und Casey 1996, Sebti und Adjei 2004). Auch bei transgenen Mäusen mit Mammakarzinom, welche onkogenes K-Ras4B oder wild-typisches N-Ras exprimierten, konnte durch FTase-Inhibitoren keine Tumorregression erreicht werden. Durch die FTase-Inhibitoren konnte in diesem Fall lediglich eine weitere Tumorprogression, möglicherweise durch die Induktion von Apoptosevorgängen, verhindert werden (Sebti und Adjei 2004). Aktuell befinden sich drei FTase-Inhibitoren (Lonafarnib, Tipifarnib und BMS-214662) in der klinischen Testphase. Bei Anwendung der drei genannten FTase-Inhibitoren zeigen sich bei humanen hämatologischen Malignomen unterschiedlich hohe Responderraten und unter den soliden Tumoren lediglich bei pulmonalen Karzinomen eine Regression (Sebti und Adjei 2004).

Obwohl die genannten Inhibitoren eine antitumoröse Aktivität in präklinischen Modellen gezeigt haben, zeigte sich in klinischen Phase I-III-Studien eine unerwartet hohe Komplexität ihrer Wirkungen aufgrund toxischer Nebenwirkungen (Barten und O`Dea 1990, Philips *et al.* 1993, Lederer *et al.* 1994, Pillinger *et al.* 1994, Quian *et al.* 1997, Fu und Casey 1999, Kirschmeier *et al.* 2001, Bergo *et al.* 2002, Cox *et al.* 2002). Zudem zeigten FTase-Inhibitoren keinen Effekt bei Karzinomen der Harnblase, Prostata, Kolon und Rektum oder Pankreas bezüglich der Tumorprogression (Sebti und Adjei 2004). Aufgrund der hohen Spezifität der Icmt für prenylierte Proteine scheint die Icmt möglicherweise ein besseres Ziel für die Entwicklung pharmakologischer Inhibitoren zur Beeinflussung der onkogenen Transformation zu sein als die FTase oder die GGTaseI. Die Kenntnisse der Regulation der Icmt-Aktivität könnten somit neue Strategien in der Behandlung und Prävention unterschiedlicher humaner Erkrankungen, nicht nur bei hämatologischen und soliden Malignomen, sondern auch bei pathophysiologischen Vorgängen, z.B. bei Entzündungserkrankungen, eröffnen (Casey 1994, Qian *et al.* 1997, Kim *et al.* 1999, Fu und Casey 1999, Bergo *et al.* 2000 a; 2000 b, Chen *et al.* 2000, Ahmad *et al.* 2002, Winter-Vann *et al.* 2003).

5.4 Ausblick

In der Vergangenheit wurde die Erforschung und klinische Etablierung von Pharmaka verfolgt, die als Inhibitoren der Enzyme der posttranslationalen Lipidmodifikation wirken. Diese Enzyme, welche die spezifischen Lipidmodifikationen von Proteinen mit einer CAAX-Sequenz katalysieren, ermöglichen den so modifizierten Proteinen die Bindung an zelluläre Membranen, die erst dadurch ihre potentiell onkogene Aktivität entfalten können. Eine bedeutende Rolle spielen diese Enzyme in der posttranslationalen Isoprenylierung, Proteolyse und Carboxymethylierung von wildtypischen und onkogenen Ras-Proteinen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung der Methylierungsreaktion der Lipidmodifikation durch die klonierte und rekombinant exprimierte HA-Epitop-markierte Icmt könnte zum besseren Verständnis der Enzymaktivität der Icmt beitragen und neue Erkenntnisse für die Entwicklung von Inhibitoren der posttranslationalen Methylierung im Rahmen der spezifischen posttranslationalen Lipidmodifikation liefern. Obwohl die Icmt ein Enzym ist, welches nur in Eukaryonten vorkommt, ist eine Expression in Prokaryonten, wie z.B. in *E. coli*, möglich. Interessant wäre hierbei zu klären, ob eukaryontische Proteine zur Faltung der Sekundär-/Tertiärstruktur notwendig sind und die Aktivität des Enzyms davon abhängig ist oder zumindest beeinflusst wird. Zukünftig sollte versucht werden, die Icmt in gereinigter Form zu gewinnen, um genauere Aussagen über die Enzymaktivität und die Struktur-Funktions-Beziehungen des Enzyms machen zu können, die Grundlage für die Entwicklung neuer Pharmaka wären.

6 Zusammenfassung

Die posttranslationale Lipid-Modifikation von Ras-Proteinen und anderen CAAX-Sequenz-enthaltenden Proteinen ist essentiell für die Bindung dieser Proteine an Membranen. Bei der CAAX-Sequenz handelt es sich um eine Aminosäuresequenz mit einem Cystein = C, zwei aliphatischen Aminosäuren = A und einer beliebigen Aminosäure = X. Die posttranslationale Lipid-Modifikation umfasst drei sequentiell an der carboxyterminalen CAAX-Sequenz ablaufende enzymatische Modifikationen. Die drei Modifikationsschritte umfassen eine Prenylierung des C-terminalen Cysteins des CAAX-Motivs durch eine Prenyltransferase, nämlich entweder die Farnesyltransferase (FTase) oder die GeranylgeranyltransferaseI (GGtaseI). Dieser folgt die Proteolyse der drei endständigen Aminosäuren –AAX durch die Protease *ras and a-factor converting enzyme 1* (Rce1). Zuletzt wird das prenylierte nun endständige C-terminale Cystein durch die Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase (Icmt) mit einem Methyl-Rest versehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die humane Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase rekombinant exprimiert und deren funktionelle Eigenschaften näher charakterisiert.

Die Icmt-cDNA wurde aus der mRNA humaner PANC-1-Pankreaskarzinomzellen amplifiziert und kloniert. Dabei wurde die cDNA am 5'-Ende mit der Epitopsequenz des Hämagglutinin-Antikörpers (HA-Epitop) versehen. Mit Hilfe eines Baculovirus-Expressionsvektors wurde die HA-Icmt-cDNA in Baculoviren transferiert und in *Spodoptera frugiperda* (*Sf9*)-Insektzellen exprimiert. Nach subzellulärer Fraktionierung der Lysate von mit HA-Icmt-kodierenden Baculoviren infizierten *Sf9*-Insektzellen in eine lösliche und partikuläre Fraktion konnte durch Immunoblot-Analysen nachgewiesen werden, dass die HA-Icmt in der partikulären Fraktion der HA-Icmt-infizierten *Sf9*-Zellen lokalisiert ist. Nach Etablierung eines *in vitro*-Icmt-Aktivitätsassays wurden die subzellulären Fraktionen auf ihre carboxylmethylierende Aktivität untersucht und eine Charakterisierung der Enzymeigenschaften der rekombinant-exprimierten HA-Icmt durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten, dass die Methylierungsaktivität von der HA-Icmt-Konzentration in der partikulären Fraktion abhängig ist und eine Sättigung zeigt. Die Steigerung der Substratkonzentration führt zu einer Enzymsättigung. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Methylierungsaktivität von der Reaktionszeit abhängig ist. Darüber hinaus konnte keine Abhängigkeit der Enzymaktivität von den in dieser Arbeit untersuchten Reaktionstemperaturen nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde somit die Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase aus humanen PANC-1-

Pankreaskarzinomzellen kloniert und aktiv in Sf9-Insektenzellen exprimiert. Durch den im Rahmen dieser Arbeit etablierten Aktivitätsassay zur Charakterisierung der Icmt wird eine weiterführende funktionelle Charakterisierung des Enzyms ermöglicht. Die genaue Kenntnis der Enzymeigenschaften könnte für die Aufklärung der Bedeutung dieses Enzyms für die Tumorgenese und die Entstehung anderer pathophysiologischer Prozesse relevant sein.

7 Literaturverzeichnis

Adamson P, Marshall ChJ, Hall A, Tilbrook PA: Post-translational modifications of p21^{rho} Proteins. *J Biol Chem* **267**: 20033-20038 (1992)

Ahmad M, Zhang Y, Papharalambus C, Alexander RW: Role of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase in tumor necrosis factor- α stimulation of expression of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**: 759-764 (2002)

Aswad DW: Protein carboxyl methylation in eukaryotes. *Curr Opin Cell Biol* **1**: 1182-1187 (1989)

Barbacid M.: Ras genes. *Annu Rev Biochem* **56**: 779-827 (1987)

Barten DM, O'Dea RF: The function of protein carboxymethyltransferase in eukaryotic cells. *Life Sci* **47**: 181-194 (1990)

Bergo MO, Ambroziak P, Gregory C, George A, Otto JC, Kim E, Nagase H, Casey PJ, Balmain A, Young SG: Absence of the CAAX Endoprotease Rce1: Effects on cell growth and transformation. *Mol Cell Biol* **22**: 171-181 (2002)

Bergo MO, Leung GK, Ambrozik P, Otto JC, Casey PJ, Gomes AQ, Seabra MC, Young SG: Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase deficiency in mice. *J Biol Chem* **276**: 5841-5845 (2000 a)

Bergo MO, Leung GK, Ambrozik P, Otto JC, Casey PJ, Young SG: Targeted inactivation of the isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase gene causes mislocalization of K-Ras in mammalian cells. *J Biol Chem* **275**: 17605-17610 (2000 b)

Bourne HR, Sanders DA, McCormick F: The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**: 117-127 (1991)

Capdevila A, Decha-Umphai W, Song Kyung-Hee, Borchardt RT, Wagner C: Pancreatic exocrine secretion is blocked by inhibitors of methylation. *Arch Biochem Biophys* **345**: 47-55 (1997)

Casey PJ: Lipid modifications of G proteins. *Curr Opin Cell Biol* **6**: 219-225 (1994)

Casey PJ: Mechanisms of protein prenylation and role in G protein function. *Biochem Soc Trans* **23**: 161-166 (1995a)

Casey PJ: Protein lipidation in cell signaling. *Science* **268**: 221-225 (1995b)

Casey PJ, Seabra MC: Protein prenyltransferases. *J Biol Chem* **271**: 5289-5292 (1996)

Chen Z, Otto JC, Bergo MO, Young SG, Casey PJ: The C-terminal polylysine region and methylation of K-Ras are critical for the interaction between K-Ras and microtubules. *J Biol Chem* **275**: 41251-41257 (2000)

Clarke S: Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu Rev Biochem* **61**: 355-386 (1992)

Cox AD, Der J: Ras family signaling: therapeutic targeting. *Cancer Biol Ther* **1**: 599-606 (2002)

Dai Q, Choy E, Chiu V, Romano J, Slivka SR, Steitz SA, Michaelis S, Philips MR: Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **273**: 15030-15034 (1998)

Desrosiers RR, Nguyen QT, Beliveau R: The carboxyl methyltransferase modifying G protein is a metalloenzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **261**: 790-797 (1999)

Farh L, Mitchell DA, Deschenes RJ: Farnesylation and proteolysis are sequential, but distinct steps in the CAAX box modification pathway. *Arch Biochem Biophys* **318**: 113-121 (1995)

Fu HW, Casey PJ: Enzymology and biology of CAAX protein prenylation. *Recent Prog Horm Res* **54**: 315-343 (1999)

Gardner DC, Lange-Carter CA, Vaillancourt RR, Johnson GL: Measuring activation of kinases in mitogen-activated protein kinase regulatory network. *Methods Enzymol* **238**: 258-270 (1994)

Glomset JA, Farnsworth CC: Role of protein modification reactions in programming interactions between ras-related GTPases and cell membranes. *Annu Rev Cell Biol* **10**: 181-205 (1994)

Graham FL, van der Erb AJ: A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**: 456-467 (1973)

Hancock JF: Ras proteins: different signals from different locations. *Mol Cell Biol* **4**: 373-385 (2003)

Hancock JF, Magee AI, Childs JE, Marshall J: All *ras* proteins are polyisoprenylated, but only some are palmitoylated. *Cell* **57**: 1167-1177 (1989)

Hancock JF, Cadwallader K, Paterson H, Marshall J: A CAAX or a CAAL motif and a second signal are sufficient for plasma membrane targeting of ras proteins. *EMBO J* **10**: 4033-4039 (1991)

Kato K, Cox AD, Hisaka MM, Graham SM, Buss JE, Der J: Isoprenoid addition to Ras protein is the critical modification for its membrane association and transforming activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **59**: 6403-6407 (1992)

Kim E, Ambroziak P, Otto JC, Taylor B, Ashby M, Shannon K, Casey PJ, Young SG: Disruption of the mouse *Rce1* gene results in defective Ras processing and mislocalization of Ras within cells. *J Biol Chem* **274**: 8383-8390 (1999)

Kirschmeier PT, Whyte D, Wilson O, Bishop WR, Pai JK: *In vivo* prenylation analysis of Ras and Rho proteins. *Methods Enzymol* **332**: 115-127 (2001)

Kramer K, Harrington EO, Lu Q, Bellas R, Newton J, Sheahan KL, Rounds S: Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase activity modulates endothelial cell apoptosis. *Mol Biol Cell* **14**: 848-857 (2003)

Laemmli UK, Beguin F, Gujer-Kellenberger G: A factor preventing the major head protein of bacteriophage T₄ from random aggregation. *J Mol Biol* **47**: 69-85 (1970)

Lederer ED, Jacobs AA, Hoffman JL, Harding GB, Robishaw JD, McLeish KR: Role of carboxymethylation in chemoattractant receptor-stimulated G protein activation and functional responses. *Biochem Biophys Res Commun* **200**: 1604-1614 (1994)

Lin X, Jung J, Kang D, Xu B, Zaret KS, Zoghbi H: Prenylcysteine carboxylmethyltransferase is essential for the earliest stages of liver development in mice. *Gastroenterology* **123**: 345-351 (2002)

Maltese WA: Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells. *FASEB J* **4**: 3319-3328 (1990)

Marchuk D, Drumm M, Saulino A, Collins FS: Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucl Acids Res* **19**: 1154 (1990)

Nancy V, Callebaut J, El Marjon A, de Gunzburg J: The delta subunit of retinal rod cGMP phosphodiesterase regulates the membrane association of Ras and Rap GTPases. *J Biol Chem* **277**: 15076-15084 (2002)

Nelson T, Brutlag D: Addition of homopolymers to the 3'-ends of duplex DNA with terminal transferase. *Methods Enzymol* **68**: 41-50 (1979)

O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA: Post-translational modification in baculovirus expression vectors. *Baculovirus Expression Vectors. A Laboratory Manual*, W.H. Freeman and Company, New York: 216-236 (1992)

Otto J, Kim E, Young SG, Casey PJ: Cloning and characterization of a mammalian prenyl protein-specific protease. *J Biol Chem* **274**: 8379-8382 (1999)

Parish CA, Rando RR: Functional significance of G Protein carboxymethylation. *Biochemistry* **33**: 9986-9991 (1994)

Parish CA, Rando RR: Isoprenylation/Methylation of proteins enhances membrane association by a hydrophobic mechanism. *Biochemistry* **35**: 8473-8477 (1996)

Philips MR, Pillinger MH: Prenylcysteine-directed carboxyl methyltransferase activity in human neutrophil membranes. *Methods Enzymol* **256**: 49-63 (1995)

Philips Mr, Pillinger MH, Staud R, Volker C, Rosenfeld MG, Weissmann G, Stock JB: Carboxyl methylation of Ras-related proteins during signal transduction in neutrophils. *Science* **259**: 977-980 (1993)

Philips MR, Staud R, Pillinger M, Feoktistov A, Volker C, Stock JB, Weissmann G: Activation-dependent carboxyl methylation of neutrophil G-protein γ subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 2283-2287 (1995)

Pillinger MH, Volker C, Stock JB Weissmann G, Philips MR: Characterization of a plasma membrane-associated prenylcysteine-directed α carboxyl methyltransferase in human neutrophils. *J Biol Chem* **269**: 1486-1492 (1994)

Qian Y, Sebti SM, Hamilton AD: Farnesyltransferase as a target for anticancer drug design. *Biopoly* **43**: 25-41 (1997)

Rando RR: Chemical biology of isoprenylation/methylation. *Biochem Soc Trans* **24**: 682-687 (1996)

Reiss Y, Goldstein JL, Seabra MC, Casey PJ, Brown MS: Inhibition of purified p21ras farnesyl: protein transferase by Cys-AAX tetrapeptides. *Cell* **62**: 81-88 (1990)

- Romano JD, Michaelis S: Topological and mutational analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Ste14p, founding member of the isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase family. *Mol Biol Cell* **12**: 1957-1971 (2001)
- Romano JD, Schmidt WK, Michaelis S: The *Saccharomyces cerevisiae* prenylcysteine carboxylmethyltransferase Ste 14p is in the endoplasmatic reticulum membrane. *Mol Biol Cell* **9**: 2231-2247 (1998)
- Sambrook J, Gething MJ: Chaperons, paperones. *Nature* **342**: 224-225 (1989)
- Sapperstein S, Berhower C, Michaelis S: Nucleotide sequence of the yeast STE 14 gene, which encodes farnesylcysteine carboxylmethyltransferase, and demonstration of its essential role in *a-factor* export. *Mol Biol Cell* **14**: 1438-1449 (1994)
- Sebti SM, Adjei AA: Farnesyltransferase inhibitors. *Sem Oncol* **31**: 28-39 (2004)
- Siddiqui AA, Garland JR, Dalton MB, Sinensky M: Evidence for a high affinity, saturable, prenylation-dependent p21 Ha-ras binding site in plasma membranes. *J Biol Chem* **273**: 3712-3717 (1998)
- Sinensky M: Recent advances in the study of prenylated proteins. *Biochem Biophys Acta* **1484**: 93-106 (2000)
- Smith PK, Krohn RJ, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goehe NM, Olson BJ, Klenk DC: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**: 76-85 (1985). Erratum in: *Anal Biochem* **153**: 279 (1985)
- Tschantz WR, Zhang L, Casey PJ: Cloning, expression, and cellular localization of a human prenylcysteine lyase. *J Biol Chem* **274**: 35802-35808 (1999)
- Volker C, Stock JB: Carboxyl methylation of Ras-related proteins. *Methods Enzymol* **255**: 65-82 (1995)

Winter-Vann AM, Kamen BA, BergoMO, Young SG, Melnyk S, James SJ, Casey PJ: Targeting Ras signaling through inhibition of carboxyl methylation: An unexpected property of methotrexate. *Cell Biol* **100**: 6529-6534 (2003)

Yokoyama K, Goodwin GW, Ghomashchi F, Glomset J, Gelb MH: Protein prenyltransferases. *Biochem Soc Trans* **20**: 489-493 (1992)

Zhu K, Hamilton AD, Sebti SM: Farnesyltransferase inhibitors as anticancer agents: current status. *Curr Opin Investig Drugs* **4**: 1428-1435 (2003)

Zhang FL, Casey PJ: Protein prenylation: molecular mechanism and functional consequences. *Annu Rev Biochem* **65**: 241-269 (1996)

Zhang Z, Wang Y, Lantry LE, Kastens E, Liu G, Hamilton AD, Sebti SM, Lubet RA, You M: Farnesyltransferase inhibitors are potent lung cancer chemopreventive agents in A/J mice with a dominant-negative p53 and/or heterozygous deletion of Ink4a/Arf. *Oncogene* **22**: 6257-6265 (2003)

8 Anhang

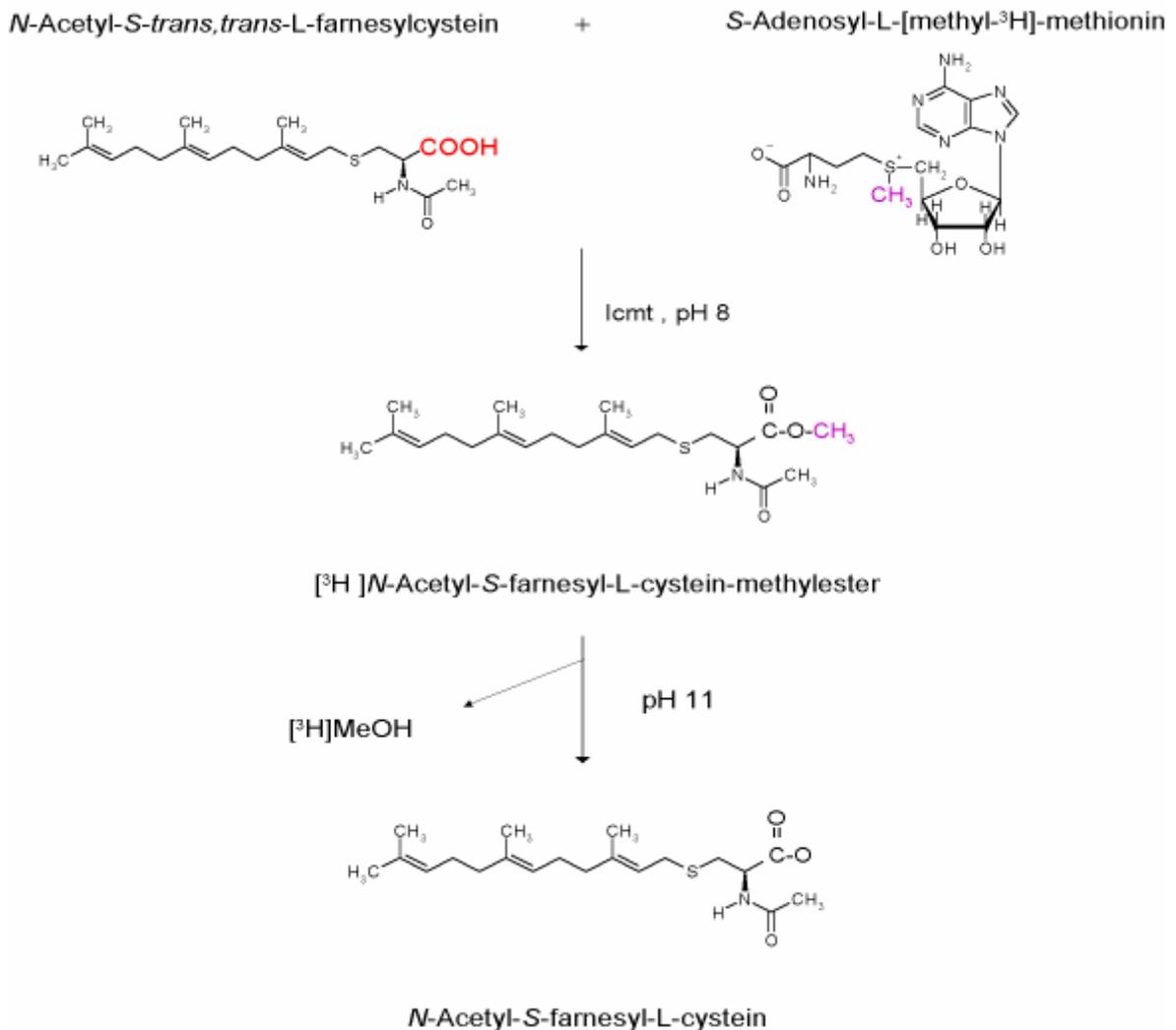


Abb. 10: Methylierung der Carboxylgruppe eines endständigen isoprenylierten Cysteins durch Icmt. Der Methylgruppendonor *S*-Adenosyl-L-[methyl-³H]-methionin ([³H]-AdoMet) liefert den für die Methylierung notwendigen, radioaktiv-markierten Methylgruppen-Rest (violett markiert). Der Methylgruppenakzeptor *N*-Acetyl-*S*-*trans,trans*-L-farnesylcystein (AFC) wird an seiner Carboxylgruppe (rot markiert) methyliert. Der Vorgang wird durch die Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase (Icmt) bei pH 8 katalysiert. Es entsteht ein radioaktiv-markierter Methylester ([³H]-*N*-Acetyl-*S*-farnesyl-L-cystein-methylester). Nach Extraktion des Esters mittels Heptan und nach Zugabe von Natriumhydroxid (NaOH) kommt es zur alkalischen Hydrolyse der Esterbindung. Dabei wird [³H]-Methanol ([³H]MeOH) frei. Dieses wird nach 24 h quantifiziert. Das *N*-Acetyl-*S*-farnesyl-L-cystein bleibt als Rest zurück.

