

**Etablierung eines Zwei-Hybrid-Screening-Systems
zur Suche und Charakterisierung von Ras/Raf-Effektoren**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim
Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Anke Friese
aus Wickede (Ruhr)

Frankfurt, 2002
(DF1)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. W. Müller

1. Gutachter: Prof. Dr. Th. Dingermann

2. Gutachter: Prof. Dr. D. Steinhilber

Datum der Disputatio: 23. Mai 2002

meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1. Einleitung	1
1.1 Die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade.....	2
1.2 Ras als molekularer Schalter.....	5
1.3 Struktur und Regulierung der Raf-Kinase	11
1.4 Beeinflussung der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade.....	15
1.4.1 Pflanzliche Extrakte.....	18
1.5 Das Zwei-Hybrid-System zur Untersuchung von Proteininteraktionen	19
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	23
2. Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.1.1 Chemikalien, Geräte und ihre Bezugsquelle.....	24
2.1.2 Allgemeine Puffer und Lösungen	27
2.1.3 Medien	29
2.1.4 Synthetische Oligonukleotide	30
2.1.4.1 Primer für die Polymerasekettenreaktion.....	31
2.1.4.2 Hybridisier- und Mutageneseprimer	31
2.1.4.3 Sequenzierprimer	31
2.1.5 Verwendete Organismen.....	32
2.1.6 Vektoren und Plasmide	33
2.2 Molekularbiologische Methoden	36
2.2.1 Hybridisierungsmethoden.....	36
2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	37
2.2.3 Einzelstrang-DNA für die Mutagenese.....	38
2.2.4 <i>In-vitro</i> -Mutagenese (<i>dut⁻/ung⁻</i> -Methode)	39
2.3 Proteinchemische Methoden	39

2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
2.3.2	Färbung mit Coomassie Brillant Blue R250	41
2.3.3	Western Blot.....	41
2.3.4	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	42
2.3.5	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA.....	43
2.4	Arbeiten mit Bakterien	43
2.4.1	Transformation von CaCl ₂ -kompetenten Bakterien.....	43
2.4.2	Transformation von Bakterien durch Elektroporation	43
2.5	Arbeiten mit Hefen	44
2.5.1	Herstellung kompetenter Hefen.....	44
2.5.2	Transformation von Hefezellen.....	45
2.5.3	Anlegen von Hefe-Stocks.....	45
2.5.4	Herstellung von Hefeextrakten für SDS-Page.....	45
2.5.5	Plasmidisolierung aus Hefe	46
2.5.6	Durchführung des Hefe-Zwei-Hybrid-Assays	47
2.6	Arbeiten mit Säugerzellen	50
2.6.1	Zellkulturbedingungen	50
2.6.2	Bestimmung der Zelldichte	50
2.6.3	Anlegen von DMSO-Stocks.....	50
2.6.4	Rekultivierung von DMSO-Stocks	50
2.6.5	MTT-Assay von Säugerzellen.....	51
2.6.6	Durchführung des Säugerzellassays für Western Blots	51
2.7	Chromatographische Methoden.....	52
2.7.1	Dünnschichtchromatographie.....	52
2.7.2	Niederdruck-Flüssigchromatographie.....	52
3.	Ergebnisse.....	53
3.1	Aufbau des Zwei-Hybrid-Systems	53
3.1.1	Test- und Kontrollstämme.....	53
3.1.2	Optimierung der Methode in Microtiterplatten	55
3.1.2.1	Quantifizierung des β -Galactosidase-Assays	56
3.1.2.2	Zellaufschluss der Hefen	56
3.1.2.3	Einfluss der Ausgangszelldichte	57
3.1.3	β -Galactosidase-Assay und Berechnung der Enzymaktivität	58

3.2	Screening-Ergebnisse von pflanzlichen Inhaltsstoffen und Extrakten.....	61
3.2.1	Arnika-Extrakt und -Tinktur	61
3.2.2	Isovaleriansäure und Analoga.....	66
3.2.3	Weitere pflanzliche Proben.....	68
3.3	Chemisch-synthetische Substanzen	69
3.3.1	T-Substanzen	69
3.3.2	JS-Substanzen	72
3.3.3	HM70	75
3.3.4	Kombinationsversuche der aktiven Verbindungen.....	76
3.4	Ausbau des Testsystems.....	78
3.4.1	Varianten des Ras-Proteins	78
3.4.2	Varianten des Raf-Proteins	79
3.4.3	Umklonierung der Multiple Cloning Site (MCS).....	80
3.4.4	Änderung des bakteriellen Selektionsmarkers.....	81
3.4.5	p53/SV40-Kontrollkonstrukte	81
3.4.6	Übersicht über die neuen Hefestämme im Zwei-Hybrid-System	82
3.4.7	Vergleich der Interaktionsstärken der Fusionsproteine	85
3.5	Ergebnisse mit dem modifizierten Testsystem	87
3.5.1	Arnika-Extrakt und -Tinktur	87
3.5.2	Isovaleriansäure und Analoga.....	88
3.5.3	T-Substanzreihe	89
3.5.4	JS-Substanzen	89
3.5.5	HM-Substanzreihe	90
3.6	Ergebnisse der Säugerzellversuche.....	95
3.6.1	Aufbau der Methode	95
3.6.2	MTT-Assay.....	96
3.6.3	MEK-Assay	98
3.7	Getestete Extrakte, Naturstoffe und Substanzen.....	102
4.	Diskussion.....	107
4.1	Ras und Raf als Zielstrukturen für neue Wirkstoffe	107
4.2	Das Zwei-Hybrid-System als Screening-Methode	111
4.2.1	Das Hefe-Zwei-Hybrid-System: Modifikationen und Grenzen.....	111
4.2.2	Das Zwei-Hybrid-System als High-Throughput-Screening	114

4.2.3	Einfluss des verwendeten Hefestamms	119
4.3	Identifizierung von Ras/Raf-Effektoren mit dem Zwei-Hybrid-System.....	120
4.3.1	Beurteilung der unterschiedlichen Ergebnisse der Vektor-Systeme	120
4.3.2	Potentielle Ras/Raf-Effektoren aus Pflanzenextrakten	124
4.3.3	Effekte der T-Substanzen	125
4.3.4	Effekte der JS-Substanzen.....	126
4.3.5	HM-Substanzen als Ras/Raf-Effektoren	127
4.4	Methoden für ein weitergehendes Screening.....	130
4.4.1	Der Ras/Raf/MEK/ERK-Assay in Säugerzellen	130
4.4.2	Alternativen zu dem verwendeten Säugerzellassay	131
5.	Zusammenfassung	135
6.	Literaturverzeichnis	137
7.	Lebenslauf und Publikationen.....	147

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1-1: Die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade
- Abb. 1.2-1: Ras als molekularer Schalter
- Abb. 1.2-2: Interaktionen von Ras mit Effektorproteinen in Säugerzellen
- Abb. 1.2-3: Dreidimensionale Struktur von Ras
- Abb. 1.2-4: Schematische Darstellung von Ras
- Abb. 1.3-1: Schematische Darstellung von Raf
- Abb. 1.3-2: Dreidimensionale Struktur von RafRBD
- Abb. 1.3-3: Schematische Darstellung der Kontaktfläche zw. Ras und RafRBD
- Abb. 1.4-1: Struktur von Sulindac und Sulindacsulfid
- Abb. 1.5-1: Funktion des Transkriptionsfaktors Gal4
- Abb. 1.5-2: Das Zwei-Hybrid-System
- Abb. 2.1-1: Übersicht über die Positionen der synthetischen Oligonukleotide
- Abb. 2.1-2: Schematische Darstellung von pPC97 und pPC86
- Abb. 2.1-3: Schematische Darstellung von pAD und pBD
- Abb. 2.5-1: Darstellung der ersten Seite der verwendeten Excel-Arbeitsmappe
- Abb. 3.1-1: Western Blot Analyse der Test- und Kontrollstämme
- Abb. 3.1-2: Einfluss der Ausgangszelldichte im Zwei-Hybrid-System
- Abb. 3.2-1: Effekt von Arnika-Tinktur und -Extrakt
- Abb. 3.2-2: Effekt von verschiedenen Fraktionen von Arnika-Tinktur nach LPLC
- Abb. 3.2-3: Auftrennschema von Arnika-Tinktur nach AG Becker
- Abb. 3.2-4: Beeinflussung der β -Galactosidase-Aktivität durch Kestosen
- Abb. 3.2-5: Beeinflussung der Enzymaktivität durch verschiedene Säuren
- Abb. 3.2-6: Effekt von Isovaleriansäure auf Enzymaktivität und Hefewachstum
- Abb. 3.2-7: Strukturen von Isovaleriansäure und verwandten Substanzen
- Abb. 3.2-8: Effekt von Baldrian-Wasserextrakt auf die β -Galactosidase-Aktivität
- Abb. 3.3-1: Strukturformeln einiger Benzimidazole von Dr. L. Hahn
- Abb. 3.3-2: Effekte von verschiedenen Benzimidazolen auf die Enzymaktivität
- Abb. 3.3-3: Strukturformeln verschiedener JS-Substanzen
- Abb. 3.3-4: Änderung der Enzymaktivität durch verschiedene JS-Substanzen
- Abb. 3.3-5: Einfluss auf das Hefewachstum von verschiedenen JS-Substanzen
- Abb. 3.3-6: Strukturformeln von Valproinsäure, 2-Propyl-2-pentensäure und HM70
- Abb. 3.3-7: Effekt von HM70 auf die verschiedenen Hefestämme
- Abb. 3.3-8: Kombinationen von HM70, T129 und Isovaleriansäure

- Abb. 3.4-1: Übersicht über die neuen Ras-Konstrukte
- Abb. 3.4-2: Übersicht über die neuen Raf-Konstrukte
- Abb. 3.4-3: Unterschiede in der MCS von pPC- und Stratagene-Vektoren
- Abb. 3.4-4: Neue Stratagene-Konstrukte mit der MCS aus den pPC-Vektoren
- Abb. 3.4-5: Western Blot Analyse der Test- und Kontrollstämme
- Abb. 3.4-6: Vergleich der basalen β -Galactosidase-Aktivität verschiedener Stämme
- Abb. 3.5-1: Einfluss von LPLC-Fraktionen auf verschiedene Hefestämme
- Abb. 3.5-2: Einfluss von Isovaleriansäure auf verschiedene Hefestämme
- Abb. 3.5-3: Änderung der β -Galactosidase-Aktivität der Hefestämme durch T129
- Abb. 3.5-4: Änderung der Enzymaktivität durch Inkubation mit JS-Substanzen
- Abb. 3.5-5: Einfluss von HM70 auf die Test- und Kontrollstämme
- Abb. 3.5-6: Effekt der verschiedenen Analoga bei einer Konzentration von 50 μ M
- Abb. 3.5-7: Strukturanaloga von HM70
- Abb. 3.5-8: Einfluss von HM 70/ 80/ 81/ 82/ 83/ 87 auf das Hefewachstum
- Abb. 3.5-9: Beeinflussung der Enzymaktivität durch HM70 bei Variante A und B
- Abb. 3.5-10: Beeinflussung des Hefewachstums durch HM70 bei Variante A und B
- Abb. 3.6-1: Inkubation von HL60- und T24- Zellen mit 0-500 μ M HM101a
- Abb. 3.6-2: Effekt von HM101a auf HL60- und T24-Zellen in Medium +/- FCS
- Abb. 3.6-3: Einfluss von unterschiedlichen Konzentrationen DMSO auf T24-Zellen
- Abb. 3.6-4: Inkubation von T24-Zellen mit 100 nM PMA
- Abb. 3.6-5: Inkubation von HL60-Zellen mit 100 nM PMA
- Abb. 3.6-6: Inkubation von T24-Zellen mit unterschiedlichen HM-Substanzen
- Abb. 3.6-7: Inkubation von HL60-Zellen mit unterschiedlichen Substanzen
- Abb. 3.6-8: Inkubation von HeLa-Zellen mit DMSO und HM79

Tabellenverzeichnis

- Tab. 2.1-1: Unterschiede der verwendeten pPC- und Stratagene-Vektoren
- Tab. 2.5-1: Vor- und Nachteile der verwendeten β -Galactosidase-Substrate
- Tab. 3.1-1: Erste Teststämme für das Zwei-Hybrid-System
- Tab. 3.1-2: Übersicht und Ergebnisse der verschiedenen Zellaufschlussarten
- Tab. 3.4-1: Übersicht über Hefestämme im Zwei-Hybrid-System
- Tab. 3.4-2: Übersicht über die Größe der exprimierten Fusionsproteine
- Tab. 3.8.1: Übersicht über die getesteten Extrakte, Naturstoffe und Substanzen

Abkürzungsverzeichnis

A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm und 1 cm Schichtdicke
Abb.	Abbildung
AA	Antibiotics/Antimycotics
ABTS	2,2-Azino-di-[3-ethyl-benzthiazolinsulfonat(6)]
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
Akt	Serin-Threonin-Kinase = PKB
Amp	Ampicillin
APOD	Ammoniumperoxodisulfat
ARS	autonom replizierende Sequenz
AS	Aminosäure(n)
3-AT	3-Aminotriazol
ATP	Adenosintriphosphat
β-Gal	β-Galactosidase
β-ME	β-Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
CaaX	Konsensusmotiv für die Farnesylierung von Ras
Cam	Chloramphenicol
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEN	Centromer
CPRG	Chlorophenolrot-β-D-galactopyranosid
CR1, CR2, CR3	Bezeichnung für die drei konservierten Bereiche von Raf
CREB	cAMP-Responseelement bindendes Protein
C-Terminus	Carboxyende einer Polypeptidkette
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
DTT	D,L-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
ERK	extrazelluläre, signalregulierte Kinase = MAPK
ERK1	= p44 MAPK
ERK2	= p42 MAPK
FCS	fötales Kälberserum

FTase	Farnesyl-Transferase
g	Erdbeschleunigung
Gal4-AD	Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors Gal4
Gal4-BD	DNA-bindende Domäne des Transkriptionsfaktors Gal4
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Austauschfaktor (<i>Guanin nucleotide exchange factor</i>)
GGTase I	Geranyl-Geranyl-Transferase I
GMP	Guanosinmonophosphat
Grb2	Adaptorprotein (<i>Growth factor receptor binding</i>)
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	GTP-hydrolysierendes Protein
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
<i>HIS3</i>	Gen für die Imidazol-Glycerolphosphat-Dehydratase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LPLC	Niedrigdruckflüssigkeitschromatographie
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Kinase = ERK
MAPKK	Mitogen-aktivierte Kinase Kinase = MEK
MCS	multiple Klonierungsstelle
Mdm2	Onkogen (<i>murine double-minute 2</i>)
MEK	Mitogen-aktivierte Kinase = MAPKK
MG	Molekulargewicht
MKP	MAP-Kinasen-Phosphatasen
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MTT	(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NGF	neuronaler Wachstumsfaktor (<i>Neuronal Growth Factor</i>)
NLS	Kernlokalisierungssequenz
NSAR	nicht steroidales Antirheumatikum
N-Terminus	Aminoende einer Polypeptidkette
OD	optische Dichte
o/n	über Nacht
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung

PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PI3K	Phosphatidyl-3-kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Meerrettich-Peroxidase
PVP	Polyvinylpyrrolidon
Ras	Protoonkogen (Name abgeleitet von <i>Rat adeno sarcoma</i>)
Raf	Protoonkogen (Name abgeleitet von <i>Rapid fibrosarcoma</i>)
REM	GEF-Domäne (<i>Ras exchange motif</i>)
Rin1	Ras-interagierendes/-interferierendes Gen 1
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RSK	MAPK-aktivierte Proteinkinase 1 = MAPKAP-K1
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SAP	alkalische Phosphatase aus Krabben
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase = SEK
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC-Medium	synthetisches Hefemedium ohne Leucin, Histidin, Tryptophan
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH2	Proteinmodul (<i>Src Homolgy 2</i>)
SOS	Guaninnucleotid-Austauschfaktor (<i>son-of-sevenless</i>)
Spred	Ras/Raf-Suppressor (<i>Sprouty-related protein with EVH1 domain</i>)
ssDNA	Einzelstrang-DNA
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit der enzymatischen Aktivität
UAS _G	stromaufwärts liegende Aktivierungssequenz
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen

wt	Wildtyp
XCFE	Xylencyanol FF
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
ZF	Zinkfinger
% (V/V)	Volumenprozent
% (W/V)	Gewichtsprozent

Drei- und Einbuchstabencode für Aminosäuren

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

1. Einleitung

Membranen sind wichtige Strukturen, die jedes Lebewesen begrenzen und als Barrieren, aber auch als Vermittler zur Außenwelt dienen. Je nach Zelltyp können sie zahlreiche Funktionen übernehmen wie osmotische Regulation, Stoffaustausch, Atmung, Photosynthese, Erregungsbildung, Diffusionsbarriere, Reizleitung, Enzym-Träger und viele mehr. In eukaryontischen Zellen trennen biologische Membranen außerdem verschiedene Zellkomponenten voneinander ab, sodass hochstrukturierte Kompartimente mit unterschiedlichen Aufgabengebieten entstehen. Die Funktionen der Membranen sind für die Zelle lebenswichtig; eine Zerstörung oder Verletzung der Membran führt meistens zum Zelltod.

Zellen oder Zellkompartimente müssen aber andererseits auch in der Lage sein, miteinander zu kommunizieren, d.h. die Wege von Membran zu Membran bzw. durch eine Membran müssen für bestimmte Botenstoffe passierbar sein. Normalerweise ist die Kommunikation sowohl bei Ein- als auch bei Mehrzellern zwischen und innerhalb der Organismen strikt kontrolliert: vor allen Dingen während Zellteilung und Entwicklung muss ein geregeltes Wachstum gewährleistet sein. Durch mehrere unabhängige Mutationsereignisse in Protoonkogenen oder Tumorsuppressorgenen kann jedoch die Kommunikation gestört oder verändert sein, sodass die Zelle in einem mehrstufigen Prozess transformiert und in eine Tumorzelle übergeht (Vogelstein, B. et al., 1993).

Die Kommunikation zwischen den Zellen erfolgt über interzelluläre Signalüberträger wie Insulin, Stickstoffmonoxid, Wachstumsfaktoren oder Neurotransmitter. Sie werden von einer Zelle abgegeben und von einer anderen über membrangebundene Rezeptoren oder Effektormoleküle empfangen. Diese leiten die Signale nun über intrazelluläre Wege an die entsprechenden Zielelemente in den verschiedenen Kompartimenten weiter. Beispiele für intrazelluläre Kaskaden sind mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskaden, auch MAPK-Kaskaden genannt, die eine essentielle Rolle bei vielen fundamentalen Prozessen in der Zelle spielen. Bisher sind sechs MAPK-Module bekannt, die strukturell ähnliche Komponenten aufweisen, jedoch unterschiedliche biologische Funktionen erfüllen. Sie bestehen jeweils aus drei Proteinkinasen und einem vorgeschalteten G-Protein, wodurch nicht nur eine Signalverstärkung, sondern auch eine Modulation der Kinetik, der Dauer und der Amplitude ermöglicht wird. Eine der bisher bekannten MAPK-Kaskaden ist die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade, auf die nun in den folgenden Kapiteln näher eingegangen wird.

1.1 Die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade

Die Raf/MEK/ERK-Kaskade wurde bereits in den frühen neunziger Jahren durch Studien an Säugetier-Zelllinien, sowie an *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* entdeckt und dient als Paradigma für biologische Signaltransduktion. Sie ist an der Weiterleitung eines extrazellulären Signals in den Zellkern beteiligt, wo letztendlich bestimmte Transkriptionsfaktoren mobilisiert und verschiedene Gene reguliert werden. Entgegen der früheren Ansicht eines linearen Signalweges weisen die Forschungsergebnisse der letzten Jahre jedoch auf eine weit höhere Komplexität hin, die immer noch nicht vollständig verstanden ist.

Die Aktivierung der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade erfolgt als Antwort auf verschiedene extrazelluläre Signale wie Wachstumsfaktoren, Cytokinen, Hormonen oder Neurotransmittern (Campbell, S.L. et al., 1998). Aber auch Glucose, Viren, NO oder Lipopolysaccharide können die Kaskade aktivieren (Bandyopadhyay, G. et al., 2000; Deora, A.A. et al., 2000; Luo, S.F. et al., 2000). Eine vereinfachte Darstellung der Kaskade mit einigen Verzweigungen und Funktionen zeigt Abb. 1.1-1.

Als Beispiel für ein Signal zur Aktivierung der Kaskade dient der epidermale Wachstumsfaktor EGF. Durch die Bindung von EGF an die extrazellulären Domänen seines Rezeptors dimerisieren die intrazellulären Bereiche und Tyrosinseitenketten werden durch die Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) phosphoryliert. Diese Phosphorylierung aktiviert den Rezeptor, sodass spezifische Adaptorproteine mit SH2-Domänen wie Grb2 oder Shc (Pawson, G. et al., 1997) an den Rezeptor binden und über ihre SH3-Domänen den Rezeptor mit einer Prolin-reichen Region des Guaninnukleotid-Austauschfaktors SOS verknüpfen (Li, N. et al., 1993). Durch die Translokation von SOS zur Plasmamembran wird Ras durch GDP/GTP-Austausch aktiviert und kann mit nachgeschalteten Effektoren wechselwirken.

Aktiviertes Ras interagiert u.a. mit der Serin/Threonin-Kinase Raf (Moodie, S.A. et al., 1993; Vojtek, A.B. et al., 1993; Warne, P.H. et al., 1993; Zhang, X. et al., 1993), wodurch diese zur Plasmamembran rekrutiert wird. Die Translokation von Raf ist zur Aktivierung seiner Kinase-Domäne essentiell und wird daher als Hauptfunktion von Ras angesehen. Der Mechanismus ist noch nicht vollständig verstanden, aber wahrscheinlich spielen sowohl allosterische Regulationen als auch Beteiligungen weiterer Kinasen sowie regulatorischer Proteine wie 14-3-3 eine Rolle. Aktiviertes Raf kann nun eigenständig die nachgeschalteten Kinasen MEK 1/2 an je zwei Serinen phosphorylieren und aktivieren (Ahn, N.G. et al., 1991; Crews, C. et al., 1992; Nakielny, S. et al., 1992). Diese wiederum aktivieren die

Proteinkinasen ERK 1/2 durch Phosphorylierung von Threonin- und Tyrosinresten (Boulton, T.G. et al., 1991; Marais, R. et al., 1996).

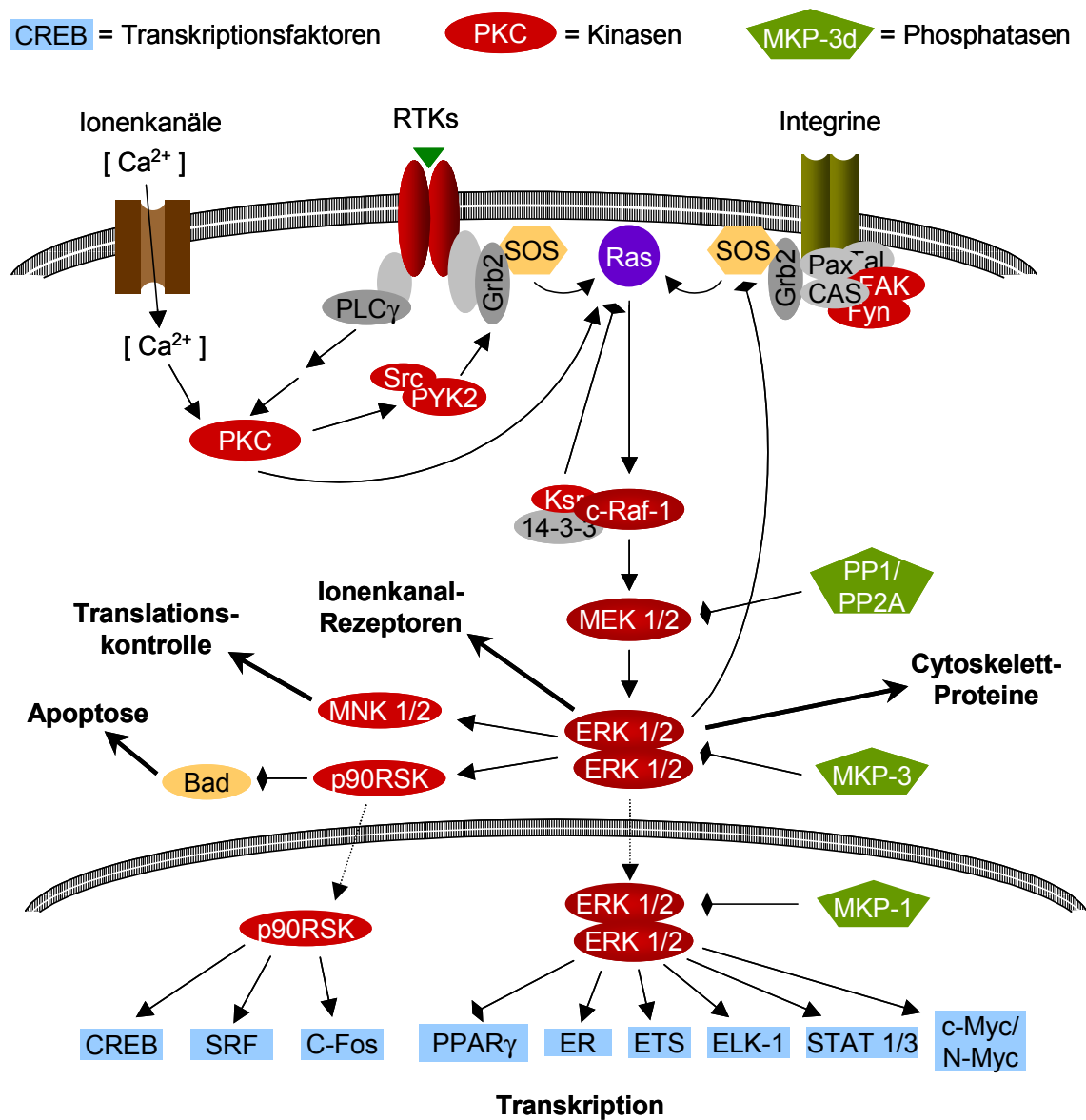


Abb. 1.1-1: Die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade

Ein Pfeil mit Spitze weist auf eine direkte Stimulierung hin, ein Pfeil mit Raute auf eine Inhibierung. Gestrichelte Linien zeigen eine Translokation an.

Die Phosphorylierung von ERK bewirkt eine Homodimerisierung (Khokhlatchev, A.V. et al., 1998), wobei sowohl das Phosphorylierungsmuster als auch der Dimerstatus, jedoch nicht die eigentliche Kinaseaktivität die subzelluläre Lokalisation beeinflussen. Im Gegensatz zu vielen anderen MAP-Kinasen, die im Zellkern nach Aktivierung kumulieren, liegt ERK auch in stimulierten Zellen zu 50% an Microtubuli im Cytoplasma gebunden vor (Reszka, A.A. et al., 1995). Da ERK durch Mitogene aktiviert werden kann, ist seine Beteiligung an Proliferationsprozessen nicht verwunderlich. Eine Aktivierung der Ras/Raf/MEK/ERK-

1. Einleitung

Kaskade ist z.B. bei der experimentellen Heilung von Magengeschwüren beobachtet worden (Pai, R. et al., 1999). Andererseits ist die Aktivierung von ERK zur Transformation von Fibroblasten ausreichend (Mansour, S.J. et al., 1994; Robinson, M.J. et al., 1998). Darüber hinaus ist ERK jedoch auch in Neuronen zu finden, die teilungsunfähige, ausdifferenzierte Zellen darstellen. Anscheinend spielt die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade hier eine Rolle bei der synaptischen Plastizität und dem Lernvorgang (Sweatt, J.D., 2001; Mazzucchelli, C. et al., 2000). Insgesamt sind bisher mehr als 50 Substrate von ERK bekannt, die an Apoptose, Zelldifferenzierung, Wachstum und Entwicklung beteiligt sind. Ein Beispiel ist die 90 kDa, ribosomale S6-Kinase p90RSK. Sie wurde als eines der ersten Substrate von ERK entdeckt und besitzt vielfältige Funktionen wie Regulierung der Genexpression durch Interaktion mit c-Fos, Estrogenrezeptoren, NF κ B/I κ B α und CREB, sowie der Feedback-Hemmung der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade durch Phosphorylierung von SOS (Frodin, M. et al., 1999). Die Inaktivierung aller MAP-Kinasen erfolgt mit Hilfe verschiedener MAP-Kinasen-Phosphatasen (MKPs) durch Dephosphorylierung (Zheng, C.-F. et al., 1993; Ward, Y. et al., 1994).

Die drei Kinasen Raf, MEK und ERK werden zum sogenannten MAP-Kinase-Modul zusammengefasst (Block, C. et al., 1995). Raf tritt in diesem Modul in viel geringeren Konzentrationen auf als MEK, wodurch eine Signalverstärkung zu ERK ermöglicht wird. Im Gegensatz dazu liegt ERK in ähnlicher oder sogar geringerer Konzentration im Vergleich zu MEK vor. Da MEK jedoch zur vollständigen Aktivierung von ERK zwei Aminosäuren phosphorylieren muss, entsteht kein linearer Zusammenhang, sondern eine Schwellenschwelle mit einer schnellen Aktivierungskinetik (Ferrel, J.E.J., 1996; Huang, C.-Y.F. et al., 1996). Die Aufgabe des MAP-Kinase-Moduls besteht demnach nicht nur darin, Signale zum Zieleffektor weiterzuleiten, sondern auch in der Koordination eintreffender Signale aus parallelen Wegen, in der Signalverstärkung und Schwellenbildung, sowie der Steuerung der Signalinaktivierung über viele verschiedene Mechanismen (Cobb, M.H., 1999). Den Einfluss der Signaldauer verdeutlichen die unterschiedlichen Wirkungen von EGF und NGF. EGF aktiviert kurzfristig die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade und induziert die Proliferation von PC12-Zellen, wohingegen NGF mit einer langanhaltenden Aktivierung zur Differenzierung führt (Qiu, M.S. et al., 1992). Den Einfluss der Signalamplitude konnten verschiedene Gruppen am Beispiel von Raf zeigen. Ein konstitutiv niedriges Signal von Raf bewirkt Zellproliferation, ein sehr hohes Signal hingegen einen Stopp im Zellzyklus durch Expression von p21^{cip1} (Sewing, A. et al., 1997; Woods, D. et al., 1997; Kerkhoff, E. et al., 1998). Wie unglaublich verzweigt das

Netzwerk zur Kontrolle von Proliferation und Differenzierung ist, verdeutlicht z.B. auch die Tatsache, dass der Tumorsuppressor p53 die MAPK-Kaskade aktivieren kann und zwar oberhalb von Ras (Lee, S.W. et al., 2000). Andererseits fördert eine Aktivierung der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade die Degradierung von p53 durch Mdm2, womit die gesteigerte Resistenz Ras-transformierter Zellen vor p53-abhängiger Apoptose erklärt werden könnte (Ries, S. et al., 2000).

1.2 Ras als molekularer Schalter

Das Protein Ras gehört zu einer Superfamilie von kleinen GTP-bindenden Proteinen mit einem Molekulargewicht zwischen 20-25 kDa. Das erste *ras*-Gen wurde ursprünglich als Onkogen des „Harvey und Kirsten Sarkomvirus“ in Ratten entdeckt (Ellis, R.W. et al., 1981), woher sich auch die Bezeichnung H-Ras als **H**arvey **r**at **a**deno **s**arcom ableitet. Insgesamt gibt es drei humane *ras*-Gene: *H-*, *N-* und *K-Ras*. Letzteres codiert für die Proteine K-Ras4a und K-Ras4b: zwei Spleißvarianten, die sich nur in den letzten 25 Aminosäuren des C-Terminus unterscheiden. Die ersten 85 Aminosäuren der hochkonservierten katalytischen G-Domäne der Ras-Proteine sind identisch, die Homologie der folgenden 80 Aminosäuren beträgt 95 %. Die größte Varianz findet sich in den C-terminalen Aminosäuren 166-189, die posttranslational verändert werden und bis auf das Farnesylierungsmotiv CAAX weniger als 15 % konserviert sind (Yan, J. et al., 1998). Trotz der Homologie weisen die vier Ras-Proteine verschiedene Eigenschaften auf z.B. bei der Raf-Aktivierung (K-Ras4b > K-Ras4a >>> N-Ras > H-Ras), bei der Focus-Formation (H-Ras ≥ K-Ras4a >>> N-Ras = K-Ras4b), bei der Kontaktinhibition (K-Ras4a ≥ N-Ras >>> K-Ras4b = H-Ras = kein Wachstum) sowie bei der Zellmigration (K-Ras4b >>> H-Ras > N-Ras = K-Ras4a = keine Migration) (Voice, J.K. et al., 1999). Die meisten Untersuchungen und Studien wurden bisher mit H-Ras durchgeführt, welches auch in dieser Arbeit verwendet wurde und daher einfachheitshalber mit Ras bezeichnet wird.

Ras übernimmt in der Zelle die Rolle eines molekularen Schalters, da es in zwei verschiedenen Zuständen vorliegen kann. Es wechselt zwischen einer inaktiven GDP-gebundenen Form und einer aktiven GTP-gebundenen Form (s. Abb. 1.2-1). Durch die Wechselwirkung mit Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) kann GDP von Ras dissoziieren. Die Affinität von GDP-gebundenem Ras zu den GEFs ist dabei relativ gering

($K_d > 10 \mu\text{M}$), wird jedoch durch die GDP-Abgabe stark erhöht (K_d 4-5 nM). Dieser Komplex wäre relativ stabil, jedoch weisen Nukleotide wie GTP, die in millimolaren Konzentrationen innerhalb der Zelle vorliegen, eine noch höhere Affinität zu Nukleotid-freiem Ras auf als GEFs (K_d 10^{-11} M) (Lenzen, C. et al., 1998).

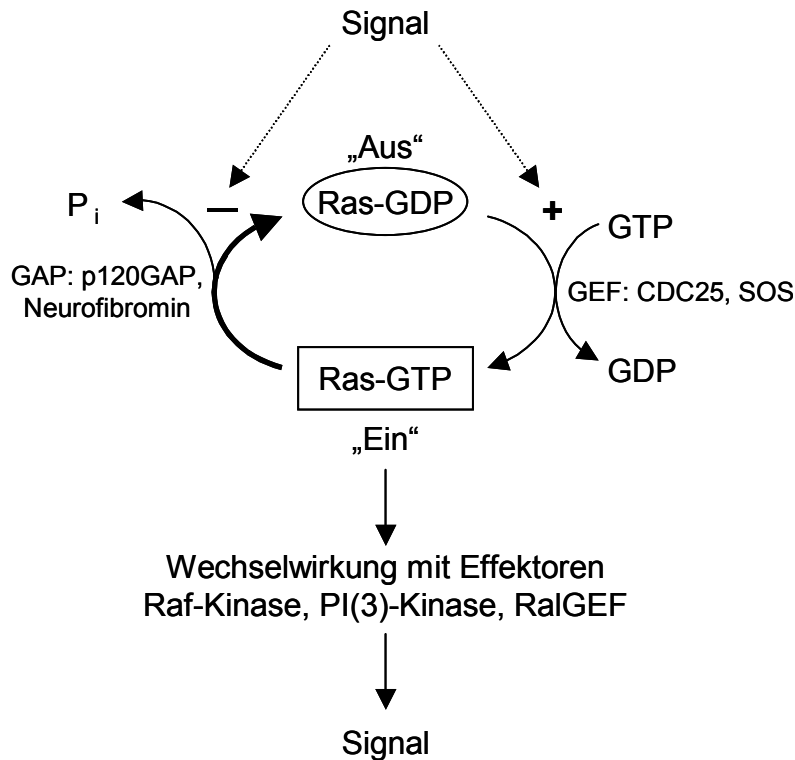


Abb. 1.2-1: Ras als molekularer Schalter

Zu den GEFs zählt das schon oben erwähnte SOS, welches durch Bindung an Tyrosinphosphorylierte Rezeptoren aktiviert wird, sowie weitere Proteine, die zur Aktivierung an sekundäre Botenstoffe binden (Downward, J., 1996). Gemeinsamer Bestandteil der GEFs ist eine CDC25-Domäne (Lenzen, C. et al., 1998), die zuerst im Hefeprotein Cdc25 gefunden wurde, und eine REM-Domäne (Fam, N.P. et al., 1997), die sich in variabler Nähe zur CDC25-Domäne befindet. Aktiviertes, GTP-gebundenes Ras wechselwirkt mit verschiedenen Effektoren wie z.B. Raf; seine Inaktivierung erfolgt durch die Ras-eigene GTPase-Aktivität, die durch Ras-spezifische GTPase-aktivierenden Proteine (GAPs) beschleunigt wird.

Die besondere Bedeutung von Ras als Signalüberträger zeigt nicht nur die anfangs beschriebene hohe Konservierung der Aminosäuresequenz, sondern auch die Tatsache, dass in bis zu 30 % aller menschlichen Tumore ein mutiertes Ras-Onkogen vorhanden ist

(Barbacid, M., 1987). Punktmutationen führen dabei zum Austausch einer Aminosäure in den Positionen Glycin-12, Glycin-13 oder Glutamin-61 (Reddy, E.P. et al., 1982; Tabin, C.J. et al., 1982), sodass Ras nicht mehr inaktiviert werden kann und ein konstitutives Signal über die oben beschriebene Kaskade weiterleitet. Für K-Ras beträgt die Inzidenz einer Mutation bei Colonkarzinomen 30-60 %, bei Tumoren des Pankreas bis zu 90 %. Interessanterweise korreliert die Häufigkeit einer K-Ras-Mutation bei Pankreaskrebs nicht nur mit dem Alter, dem Geschlecht, dem Nikotin- und Alkoholgenuss des Patienten, sondern auch mit dessen Kaffeekonsum (Porta, M. et al., 1999). N-Ras-Mutationen sind häufig mit Leukämien assoziiert (25 %), H-Ras-Mutationen eher mit Hautkrebs (30 %). Darüber hinaus sind viele Krebsarten, die kein mutiertes Ras-Gen tragen, von Ras-regulierten Signalwegen und Ras-Effektoren abhängig. Überexpression von oder Mutationen in Wachstumsrezeptoren sowie eine abnormale Tyrosinkinase-Aktivität finden sich in zahlreichen menschlichen Tumoren (Huang, H.S. et al., 1997; Kolibaba, K.S. et al., 1997). Onkogenes Ras spielt jedoch nicht nur bei der Krebsentstehung eine wichtige Rolle, sondern auch bei der Erhaltung des Tumors. Die Down-Regulierung von Ras in einem induzierbaren Maus-Melanommodell bewirkte eine klinische und histologische Regression von Früh- und Spätstadien des Tumors, die mit einer gesteigerten Apoptoserate einherging (Chin, L. et al., 1999).

Die verschiedenen biologischen Funktionen von Ras lassen sich nicht alleine dem „upstream“ Element eines einzigen linearen Signalweges bestehend aus Raf, MEK und ERK zuschreiben, sondern es kann eine Verzweigung des ankommenden Signals auf allen Ebenen der Kaskade stattfinden. Obwohl bereits seit zwanzig Jahren intensiv an Ras geforscht wird, wächst die Anzahl der gefundenen Effektoren ständig und immer wieder werden Verknüpfungen zu anderen Signalwegen neu entdeckt. Allgemein akzeptiert ist inzwischen die Tatsache, dass Ras mehr als einen Signalweg aktiviert (White, M.A. et al., 1995; Joneson, T. et al., 1996; Marshall, C.J., 1996). Eine Übersicht über mögliche Interaktionspartner von Ras und deren Funktion ist in Abb. 1.2-2 dargestellt.

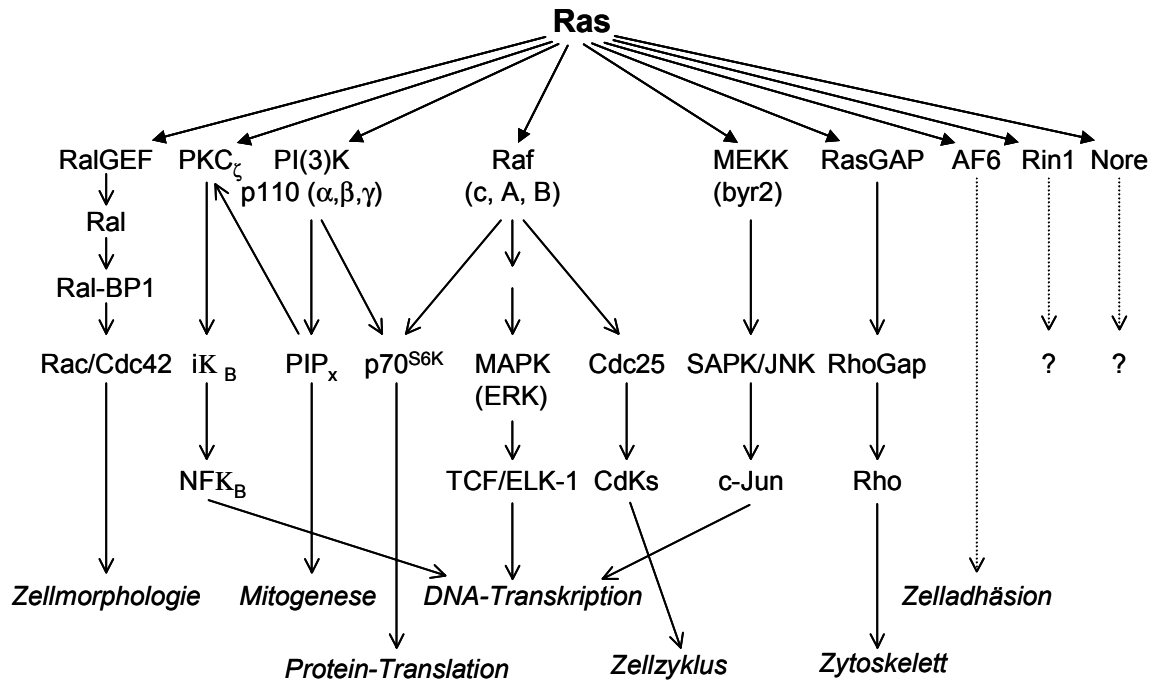


Abb. 1.2-2: Interaktionen von Ras mit Effektorproteinen in Säugerzellen

Die nachgeschalteten Signalwege sind, soweit bekannt, angegeben, wobei jedoch kein Anspruch auf Vollständigkeit besteht.

Ras als 21 kDa Protein besteht aus 189 Aminosäuren. Die dreidimensionale Struktur wurde bisher nur mit verkürzten Mutanten bis einschließlich Aminosäure 166 (Pai, E.F. et al., 1989; Pai, E.F. et al., 1990) bzw. 171 (Milburn, M.V. et al., 1990; Privé, G.G. et al., 1992) bestimmt. Demnach enthält die Struktur von Ras sechs β -Faltblätter und fünf α -Helices, die durch zehn Loops voneinander getrennt sind (s. Abb.1.2-3). Dieser Aufbau findet sich in vielen weiteren GTP-bindenden Proteinen wieder, einschließlich der heterotrimeren G-Proteine, weshalb man diese Struktur auch als G-Domänen-Faltung bezeichnet.

Loop 1, auch P-loop genannt, umfasst Aminosäure 10-15 und ist an der Bindung der geladenen Phosphatgruppen beteiligt. Aufgrund eines dominant konservierten Lysinrestes bildet er eine Schleife aus, die sich eng um das β -Phosphat von GDP/GTP windet. In diesem loop befindet sich die Aminosäure Glycin-12, die eine wichtige Rolle bei der onkogenen Aktivierung von Ras spielt.

Zwei Bereiche innerhalb der G-Domäne ändern aufgrund des GDP/GTP-Austausches ihre Konformation (Milburn, M.V. et al., 1990) und werden daher auch als switch 1 bzw. switch 2 bezeichnet. Die switch 1-Region (AS 30-37) beginnt in loop 2 und ragt bis in das β_2 -Faltblatt hinein, wohingegen switch 2 (AS 60-76) innerhalb von loop 4 und der α_2 -Helix liegt. Beide Regionen sind an der Bindung des γ -Phosphates durch die hochkonservierten Aminosäuren

Threonin-35 und Glycin-60 beteiligt (Wittinghofer, A. et al., 1991). Durch die Abspaltung des Phosphates während der Hydrolyse entspannen sich diese Bereiche und ändern ihre Konformation. Glutamin-61 innerhalb von switch 2 ist außerdem die zweite, für die Onkogenität wichtige Aminosäure von Ras.

In biologischen Systemen sind Übertragungen von Phosphatgruppen sehr stark von der Anwesenheit von Mg^{2+} abhängig. Die essentielle Bindung von Mg^{2+} erfolgt über die Hydroxylseitenketten von Serin-17 und Threonin-35, sowie über zwei Wassermoleküle, die von Aspartaten in Position 33 und 57 gebunden sind.

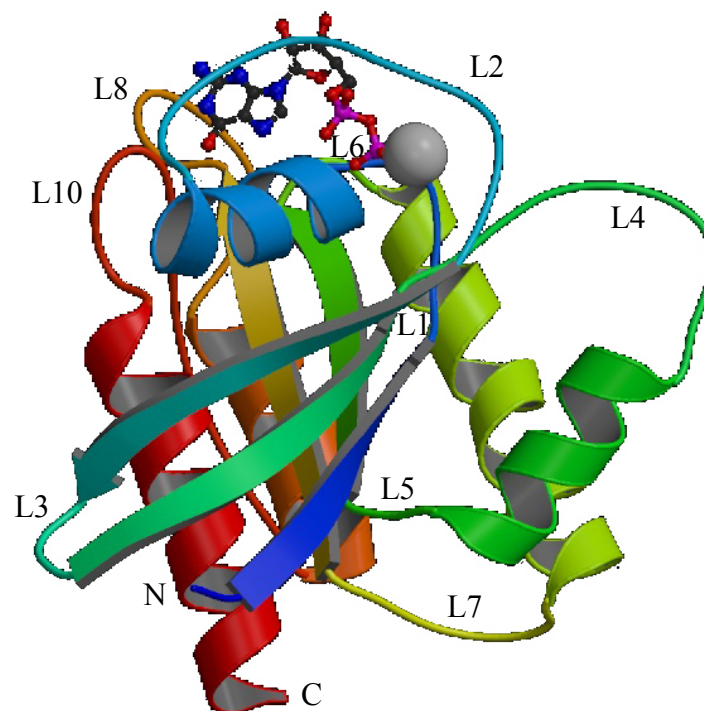


Abb. 1.2-3: Dreidimensionale Struktur von Ras

Die dreidimensionale Struktur von Ras ist im Komplex mit Mg^{2+} und GDP dargestellt. Die zehn Loops, die die sechs β -Faltblätter und die fünf α -Helices verbinden, sind nummeriert.



Abb. 1.2-4: Schematische Darstellung von Ras

Die arabischen Zahlen indizieren Aminosäuren von Ras; die römischen Ziffern markieren die switch-1- und switch-2-Region.

Die ersten 166 Aminosäuren, die die hochkonservierte katalytische G-Domäne umfassen, sind für die biochemischen Eigenschaften von Ras ausreichend. Der C-Terminus ist allein für die Membranlokalisierung notwendig und wechselwirkt auch nicht mit anderen Proteinen

(John, J. et al., 1989); die Verankerung von Ras in der Plasmamembran ist jedoch für die biologische Funktion absolut notwendig (Hancock, J.F. et al., 1990). In einer ersten posttranslationalen Modifikation spaltet dabei eine Farnesyltransferase das Cystein des hochkonservierten Farnesylierungsmotivs CAAX ab, wobei A für eine aliphatische und X für eine beliebige Aminosäure steht. Bei H- und N-Ras werden außerdem weitere Cysteine in der Nähe der CAAX-Sequenz palmitoyliert, was für die volle biologische Aktivität wichtig ist. Neuere Ergebnisse lassen außerdem eine Dimerisierung von Ras nach Membranlokalisation vermuten, die für die Raf-Aktivierung wesentlich, aber nicht allein ausreichend ist (Inouye, K. et al., 2000). Diese Vorstellung würde elegant das sterische Dilemma lösen, wie die relativ kleine Effektor-Domäne von Ras mit zwei verschiedenen Domänen von Raf gleichzeitig wechselwirken kann.

Die zweideutige Rolle von Ras in der Regulierung von Apoptose wird weiterhin kontrovers diskutiert (Downward, J., 1998). Onkogenes Ras induziert in verschiedenen Studien Apoptose (Kauffman-Zeh, A. et al., 1997), wobei der Mechanismus noch nicht vollständig geklärt ist. Der Zelltod führte nicht zu einer Aktivierung von Caspasen und konnte auch nicht durch Überexpression von Bcl-2 inhibiert werden (Chi, S.J. et al., 1999). Ras kann andererseits über verschiedene Effektoren ein Überlebenssignal vermitteln. Die Aktivierung der PI(3)K durch Ras führt zu einer Aktivierung von Akt, welche direkt Caspase 9, sowie die Glycogensynthase-Kinase 3 und das pro-apoptotische Protein Bad inhibiert. Weiterhin kann über die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade p90RSK aktiviert werden, welche einerseits ebenfalls Bad hemmen kann, andererseits CREB aktiviert und damit die Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-XL und Bcl-2 induziert. Bcl-XL und Bcl-2 schützen die Integrität der Mitochondrienmembran und verhindern so eine Cytochrom-C-Freisetzung und die Aktivierung von Caspase 9. Weitere Experimente, bei denen Raf durch einen artifiziellen Transport als Fusionsprotein oder durch Co-Expression mit Bcl-2 zur Mitochondrienmembran dirigiert wurde, konnten darüber hinaus zeigen, dass Raf nach Translokation Apoptose wirkungsvoll unterdrückt (Wang, H.G. et al., 1996; Salomoni, P. et al., 1998). Dies beruht wahrscheinlich nicht auf der Phosphorylierung von Bad und der Wiederherstellung der Bcl-2-Funktion, sondern auf einem Bcl-2 unabhängigen Signalweg, bei dem die Funktion von Bcl-2 nur in der Rekrutierung von Raf zur Mitochondrienmembran liegt (Zhong, J. et al., 2001).

1.3 Struktur und Regulierung der Raf-Kinase

Als erster direkter Effektor von Ras wurde 1993 die Serin-/Threonin-spezifische Kinase Raf entdeckt, wobei sich die Bezeichnung „Effektor“ zum einen über die höhere Affinität zu GTP-gebundenem, also aktiviertem Ras und zum anderen über die direkte Interaktion mit der Ras-Effektorregion definiert (Koide, H. et al., 1993; Moodie, S.A. et al., 1993; Van Aelst, L. et al., 1993; Vojtek, A.B. et al., 1993; Warne, P.H. et al., 1993; Zhang, X. et al., 1993).

Der erste Raf-Gen *v-raf* wurde bereits 1983 als Onkogen des akut transformierenden Maussarkom-Virus 3611 identifiziert (Rapp, U.R. et al., 1983a), woher sich auch der Name ableitet (**R**apid **f**ibrosarcoma). Im Gegensatz zum zellulären Protein c-Raf-1 ist beim *v-raf*-codierten Protein jedoch die N-terminale Region durch eine virale gag-Sequenz ersetzt (Rapp, U.R. et al., 1983b; Schultz, A.M. et al., 1985). Das Fehlen der Autoinhibition der Kinaseaktivität durch den N-terminalen Bereich führt zur konstitutiven Aktivierung der Kinase und somit zu den transformierenden Eigenschaften von *v-raf*.

Die Raf-Familie besteht aus drei Isoformen: A-Raf, B-Raf und c-Raf-1, die eine unterschiedliche Gewebeverteilung aufweisen. Alle Raf-Proteine besitzen drei hochkonservierte Regionen, die als CR1, CR2 und CR3 bezeichnet werden. Innerhalb einer Species liegt die Homologie für die gesamte Proteinsequenz bei circa 75 %, für die hochkonservierte Kinasedomäne jedoch bei knapp 90 % (Yurvey, A. et al., 1998). In dieser Arbeit wurde mit dem ubiquitär exprimierten Protein c-Raf-1 gearbeitet, über das die meisten Studien vorliegen, welches jedoch auch am wenigsten verstanden ist. Knock-out-Versuche und Expressionsdaten deuten auf spezielle Funktionen von A-Raf und B-Raf hin, wogegen c-Raf-1 eine generelle Rolle in der Entwicklung zeigt. Ein Knock-out des c-Raf-1 Gens führt bei Mäusen zum Tod während der Embryonalentwicklung, sowie zu vaskulären Defekten in der Plazenta und einer gesteigerten Apoptose im embryonalen Gewebe. Die Zellproliferation erscheint dagegen nicht beeinflusst. Verantwortlich für diese Effekte ist wahrscheinlich nicht der Verlust der MEK-Aktivierung durch c-Raf-1, sondern eher die fehlende c-Raf-1-Schutzfunktion vor Apoptose (Huser, M. et al., 2001). c-Raf-1 wird im folgenden kurz als Raf bezeichnet.

Raf ist ein 74 kDa Protein aus 648 Aminosäuren, das in der inaktiven Form in der Zelle in einem 300-500 kDa Multi-Protein-Komplex vorliegt. Bisher sind über 35 Proteine aus verschiedensten Gruppen (G-Proteine, Adaptoren, Cytoskelettproteine, Chaperone, Phosphatasen, Kinasen, Rezeptoren) bekannt, für die eine Interaktion mit Raf *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen wurde (Kolch, W., 2000). Raf kann strukturell in zwei funktionelle

1. Einleitung

Domänen aufgeteilt werden: die N-terminale regulatorische Domäne, die CR1 und CR2 beinhaltet, und die C-terminale Kinasedomäne mit CR3 (s. Abb. 1.3-1).



Abb. 1.3-1: Schematische Darstellung von Raf

Die Ziffern indizieren die Aminosäuren von Raf. Die konservierten Bereiche CR1, CR2 und CR3 sind hervorgehoben. Ebenfalls eingezeichnet sind die Ras-bindende Domäne RBD und die Cystein-reiche Domäne CRD innerhalb von CR1.

Die regulatorische Domäne (AS 1-275) besteht aus verschiedenen Modulen, die auch zwei Ras-Bindungsstellen innerhalb von CR1 umfassen. Die erste Bindungsstelle, die als Ras-bindende Domäne RBD bezeichnet wird, erstreckt sich von Aminosäuren 51-131 (Vojtek, A.B. et al., 1993) und wechselwirkt mit Ras-GTP im hochaffinen Bereich (Herrmann, C. et al., 1995). Die Struktur wurde NMR-spektroskopisch (Emerson, S.D. et al., 1995) bzw. im Komplex mit dem Ras-homologen Protein Rap1A röntgenkristallographisch (Nassar, N. et al., 1995) gelöst. Sie stellt eine eigenständig stabil-faltende Domäne dar aus fünf β -Faltblättern (B1-B5), einer α -Helix (A1) und zwei kleinen 3_{10} -Helices (A2, A3). Der Aufbau ähnelt der Struktur von Ubiquitin, obwohl keinerlei Sequenzhomologien zu finden sind.

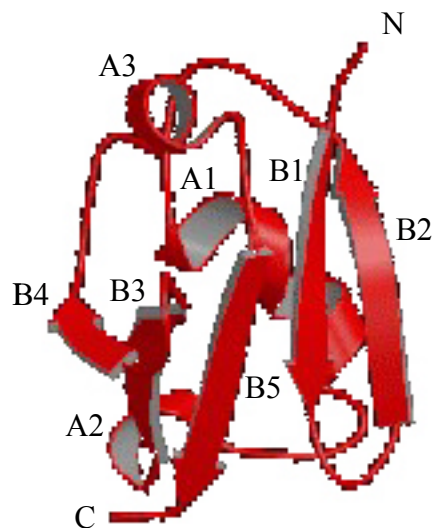


Abb. 1.3-2: Dreidimensionale Struktur von RafRBD

Die fünf β -Faltblättern (B1-B5) und die drei Helices (A1-A3) sind in der dreidimensionalen Struktur von RafRBD gekennzeichnet.

Die an der Bindung zu Ras beteiligten Aminosäuren sind schematisch in Abb. 1.3-3 dargestellt. Zwischen den beiden Proteinen bildet sich ein Inter- β -Faltblatt aus jeweils zwei antiparallelen Strängen und Aminosäuren der α -Helix von RafRBD aus. Durch

Punktmutationen konnte der Beitrag von einzelnen Aminosäuren zur Affinität der Ras/Raf-Interaktion aufgeklärt werden (Block, C. et al., 1996). Dabei wurde deutlich, dass die Affinität der Ras/Raf-Wechselwirkung mit der Stärke der Raf-Aktivierung korreliert, welches eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung dieser Arbeit war. Die Aminosäuren Gln⁶⁶, Lys⁸⁴, Arg⁸⁹, Arg⁵⁹, Asn⁶⁴, Arg⁶⁷ und Thr⁶⁸ stehen in direktem Kontakt mit Ras, wobei die ersten drei genannten den Hauptanteil der Bindungsaffinität tragen. Arg⁸⁹ ist besonders wichtig für die Bindung *in vivo* und *in vitro*, wohingegen Lys⁸⁴ für die Effektorspezifität verantwortlich ist. Arg⁵⁹ kann zwischen den Isozymen A-Raf und c-Raf-1 diskriminieren.

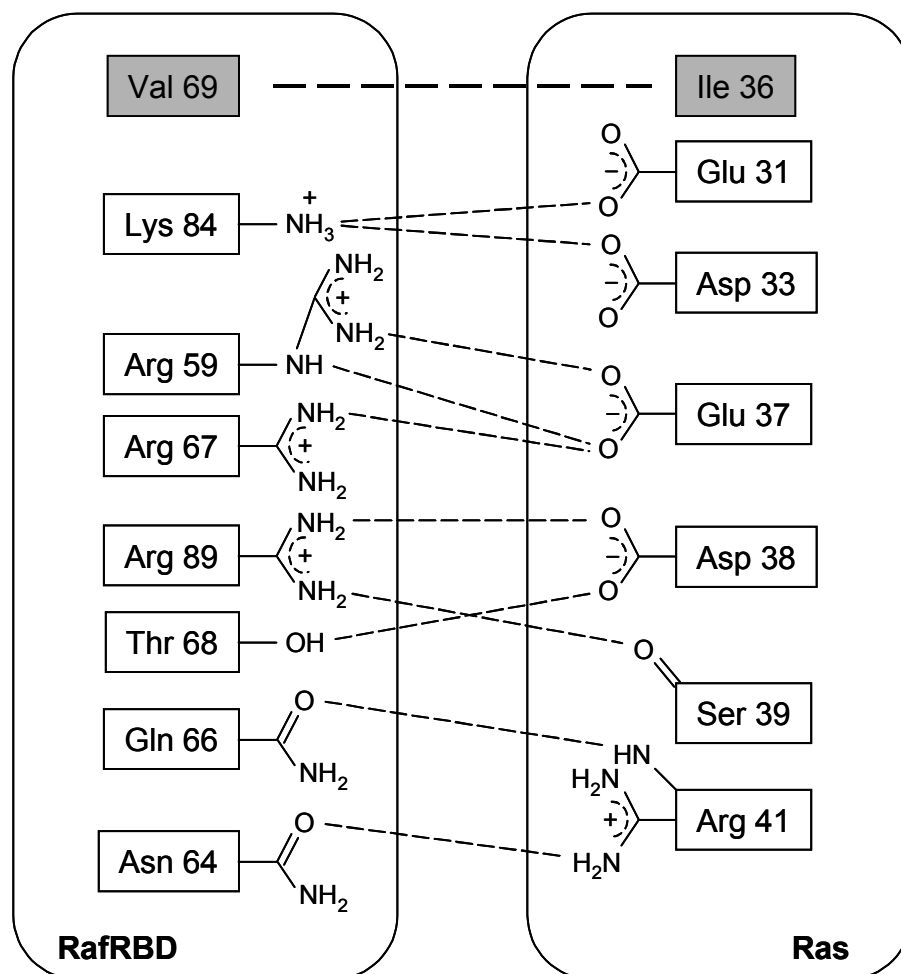


Abb. 1.3-3: Schematische Darstellung der Kontaktfläche zwischen Ras und RafRBD

Die hydrophoben Aminosäuren Isoleucin und Valin sind mit einem grauen Kasten versehen, die polaren Aminosäuren dagegen nur mit einem Rahmen. Die Interaktion zwischen Val 69 und Ile 36 wird durch ein Wassermolekül vermittelt (Block, C. et al., 1996) (Jaitner, B.K. et al., 1997).

Fridman et al. konnten darüber hinaus durch Mutationsanalysen in der RafRBD zeigen, dass der Austausch der Aminosäuren Asn⁶⁴ und Ala⁸⁵ zu Lysin bzw. von Val⁸⁸ zu Arginin die Wechselwirkung zwischen Ras-GTP und RBD noch verstärken kann. Keine dieser Aminosäuren wurde bisher mit der Interaktion in Verbindung gebracht. Den größten Effekt

zeigt die Mutante A85K-RBD, die die Bindung um das 6-9fache verstärkte (Fridman, M. et al., 2000).

Die zweite Ras-Bindungstelle ist die Cystein-reiche Domäne CRD (AS 139-184), deren Struktur ebenfalls NMR-spektroskopisch gelöst wurde (Mott, H.R. et al., 1996). Sie koordiniert mit Hilfe von sechs Cysteinen und zwei Histidinen zwei Zinkionen und wird daher auch als Zinkfinger bezeichnet. Der strukturelle Aufbau gleicht der Phorbol ester-Bindungsstelle der Proteinkinase C, wobei jedoch in den ungefalteten loop-Regionen große Unterschiede zu finden sind. Durch Mutationsstudien sind verschiedene Epitope entdeckt worden, die die Ras-abhängige Raf-Aktivierung kontrollieren. Das Epitop aus S177, T182 und M183 beeinflusst stark die Ras/Raf-Bindungsenergie und stellt die wahrscheinliche Bindestelle dar. Eine komplette Hemmung der Raf-Aktivierung konnte durch die Doppelmutation K144A und L160A innerhalb der CRD erreicht werden. Dadurch wurde belegt, dass die korrekte RafCRD-Funktion für die Ras-abhängige Raf-Aktivierung absolut notwendig ist (Daub, M. et al., 1998). Die Interaktion zwischen RafCRD und Ras ist wahrscheinlich unabhängig von dem gebundenen Guaninnukleotid, jedoch wird sie verstärkt durch posttranslationale Modifikationen an Ras (Williams, J.G. et al., 2000).

Ein drittes Modul der regulatorischen Domäne umfasst CR2: eine Serin/Threonin-reiche Region aus 15 Aminosäuren, deren Struktur noch nicht gelöst wurde. Die Cystein-reiche Domäne CRD kann nicht mehr an Ras binden, wenn sie gemeinsam mit CR2 exprimiert wird. Insofern wird vermutet, dass CR2 CRD maskiert und somit an der Kontrolle der Raf-Aktivierung beteiligt ist (Sendoh, H. et al., 2000).

Die regulatorische Domäne bewirkt eine Autoinhibition der Kinasedomäne, deren Mechanismus jedoch noch nicht vollständig geklärt ist. Raf liegt im inaktiven Zustand in Assoziation mit den regulatorischen Proteinen 14-3-3 vor, die eine wichtige Rolle bei intrazellulären Signalübertragungen spielen (Aitken, A., 1996). Sie sind wichtig für die effiziente Membranlokalisierung und Aktivierung von Raf, dissoziieren aber nach Bindung der RBD an Ras von der Phosphorylierungsstelle an Position Serin 259 ab, sodass die zweite Ras-Bindungstelle CRD freigelegt wird (McPherson, R.A. et al., 1999). Nach Bindung der CRD an Ras und einer Konformationsänderung innerhalb von Raf, wird die Kinasedomäne CR3 zugänglich. Oligomerisierung von Raf, Phosphorylierungen und die Beteiligung weiterer Proteine an der Aktivierung der Kinase werden ebenfalls diskutiert (Morrison, D. et al., 1997).

Vor kurzem wurde ein neuer Interaktionspartner von Ras und Raf entdeckt: Spred, ein Tyrosinkinase-Substrat, das ähnlich wie das verwandte Protein Sprouty in *Drosophila* die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade hemmt. Interessanterweise ist Spred konstitutiv mit Ras assoziiert, hemmt aber nicht die Ras-Aktivierung oder die Raf-Membranlokalisierung, sondern die Phosphorylierung und Aktivierung von Raf. Insofern stellt er eine neue Klasse von Proteinen dar, die die MAPK-Kaskade beeinflussen (Wakioka, T. et al., 2001).

1.4 Beeinflussung der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade

Aufgrund der wichtigen regulatorischen Rolle, die die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade bei onkogenen, mitogenen und entwicklungsabhängigen Signalwegen besitzt, stellt die Beeinflussung der Kaskade einen wichtigen Ansatz für die Arzneistoffentwicklung dar (Waddick, K.G. et al., 1998; Buolamwini, J.K., 1999). In der Wissenschaft werden zur Untersuchung der Funktion und Steuerung der Kaskade oft dominant negative bzw. konstitutiv aktive Ras-, Raf-, MEK- oder ERK-Mutanten exprimiert bzw. Knock-out-Versuche der entsprechenden Gene durchgeführt. Im Gegensatz dazu wurden zur therapeutischen Beeinflussung der Kaskade verschiedene Ansätze gewählt, die sich z. B. bei Ras aus dem Mechanismus der Aktivierung ergeben: Inhibierung der Verankerung an der Plasmamembran, Inhibierung des GDP/GTP-Austausches, Steigerung der GAP-Aktivität oder Inhibierung der Ras/Raf-Wechselwirkung.

Da die kovalente Anbindung von Lipiden für die Verankerung von Ras an der Plasmamembran und somit für die biologische Wirkung essentiell ist, wurden Ras-Farnesyltransferase-Inhibitoren entwickelt, die den ersten Schritt der posttranslationalen Modifikationen hemmen sollen (Leonard, D.M., 1997; Buolamwini, J.K., 1999). Die Farnesyltransferase (FTase) ist ein heterodimeres Protein mit einer α - und β -Untereinheit. Da sie mit der Geranyl-Geranyltransferase I (GGTase I) eng verwandt ist, müssen die Inhibitoren eine hohe Selektivität aufweisen. BMS214662 von Bristol-Myers Squibb und SCH66336 von Schering-Plough befinden sich beide bereits in der klinischen Phase II zur Therapie von soliden Tumoren. R115777 (Janssen Pharmaceutica) wurde in einer Phase I Studie erfolgreich an Patienten mit akuter Leukämie getestet.

Inhibitoren des GDP/GTP-Austausches wurden ebenfalls entwickelt, jedoch erscheint dieser Ansatz nur bei onkogenen Aktivierungen oberhalb von Ras sinnvoll, da onkogenes Ras in der Zelle bereits meist GTP-gebunden vorliegt. Zu dieser Gruppe gehören die Substanzen

SCH53870 und SCH54292 (Ganguly, A.K. et al., 1998), sowie einige GTP-Analoga (Noonan, T. et al., 1991).

Die Steigerung der GTPase-Aktivität von Ras ist ein relativ neuer Ansatz für die Entwicklung von Wirkstoffen. Onkogenes Ras kann GTP nicht hydrolysieren und auch GAP trägt nicht mehr zur Beschleunigung der Hydrolyse bei. Ein modifiziertes GTP-Analogon DABP-GTP wird jedoch effizienter von onkogenen Ras-Mutanten hydrolysiert als vom Wildtyp (Ahmadian, M.R. et al., 1999). Insofern könnte es möglich sein, niedermolekulare Substanzen mit reaktiven Gruppen zu entwickeln, die eine geeignete chemische Umgebung für eine GTP-Hydrolyse von onkogenem Ras schaffen.

Die Kinasedomäne von Raf stellt eine weitere Interaktionsmöglichkeit für Substanzen dar. Smith et al. (Smith, R.A. et al., 2001) konnten über eine kombinatorische Synthese eine neue Leitstruktur bei den heterocyclischen Harnstoffen entdecken, die die Raf-Kinase mit einer IC_{50} von 0,54 μ M hemmt. Lyons et al. (Lyons, J.F. et al., 2001) berichten über einen Inhibitor BAY 43-9006, der oral verfügbar ist und das Wachstum von Tumorzellen mit K-Ras-Mutation verhindert. Zur Zeit wird dieser Kinase-Inhibitor als Tablette in Krebspatienten untersucht (Strumberg, D. et al., 2001).

Ein weiterer Ansatz zur Hemmung von Ras und Raf befindet sich bereits in Phase II der klinischen Studien: Antisense-Oligonukleotide, die mit Codon 12 der H-Ras-mRNA bzw. dem 3'-untranslatierten Bereich der c-Raf-1-mRNA wechselwirken. Die Wirkung und Toxizität von den 20 Basen langen Phosphorothioaten ISIS 5132 gegen Raf, und ISIS2503 gegen Ras scheinen dabei sehr von dem Zeitplan der Administration abzuhängen (Casey, C. et al., 2001; Rudin, C.M. et al., 2001). Viele der Nebenwirkungen gehen wahrscheinlich auf das Phosphorothioat-Rückgrat zurück, sodass die zweite Generation der Antisense-Oligonukleotide hoffentlich bessere Aktivitäten und Verträglichkeiten liefern kann (Yuen, A.R. et al., 2000; Tamm, I. et al., 2001).

Die Wechselwirkung von Ras mit seinen verschiedenen Effektoren sollte für eine Minderung der Nebenwirkungen möglichst selektiv sein. Vergleicht man die Effektoren, fällt auf, dass zwar alle ein gemeinsames Strukturmotiv besitzen, jedoch keinerlei Sequenzhomologien aufweisen und auch andere Aminosäuren zur Interaktion mit Ras verwenden. Spezifische Inhibitoren müssten daher zu finden sein. Peptide, die einige für die Bindung wichtigen Bereiche von Ras und Raf nachahmten, konnten die Interaktion im mikromolaren Bereich hemmen (Barnard, D. et al., 1995; Clark, G. et al., 1996; Barnard, D. et al., 1998). Durch Computer unterstütztes Design konnte Zeng et al. weitere

Peptidinhhibitoren optimieren, die die Ras/Raf-Interaktion in ELISA, Radioassays und biologischen Assays hemmen (Zeng, J. et al., 2001).

Als einziger, nicht-peptidischer Inhibitor der Ras/Raf-Wechselwirkung wurde bisher Sulindacsulfid entdeckt, ein Metabolit des nicht-steroidalen Antirheumatikums Sulindac. Sulindacsulfid reduziert als Thioether das Ferrylloxoporphyrin-Radikalkation durch Bildung des Sulindacsulfoxids und verhindert so die Kopplung der Peroxidase- und Cyclooxygenase-Reaktion. Die Radikal-Bildung ist nicht mehr möglich, die Cyclooxygenase-Reaktion kann nicht aktiviert werden (Egan, R.W. et al., 1980).

Nach epidemiologischen Daten senken nicht-steroidale Antirheumatika das Risiko einer Krebserkrankung z.B. bei Mamma- oder Colonkarzinom, wahrscheinlich bedingt durch die Hemmung der Prostaglandinproduktion durch COX2 (Garcia-Rodriguez, L.A. et al., 2001; Khuder, S.A. et al., 2001). Eine präventive Einnahme ist jedoch bisher durch das hohe Nebenwirkungsrisiko begrenzt, weshalb sich Hoffnungen auf die neuen, selektiven COX2-Inhibitoren mit einem besseren Wirkprofil richten (Kalgutkar, A.S. et al., 2001). Sulindac selbst wird bereits bei Familiärer Adenomatöser Polyposis eingesetzt (Pasricha, P.J. et al., 1995; Winde, G. et al., 1995) und scheint gezielt gegen Tumore mit Ras-Onkogen zu wirken (Thompson, H.J. et al., 1997). Die Wirkung beruht jedoch wahrscheinlich nicht nur auf seiner COX2-Hemmung, sondern vor allen Dingen auch auf der direkten Blockierung der Ras/Raf-Interaktion durch den aktiven Metaboliten Sulindacsulfid (Herrmann, C. et al., 1998).

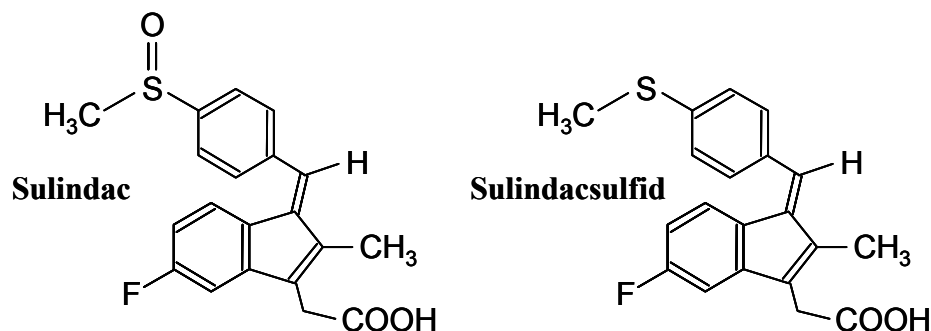


Abb.1.4-1: Struktur von Sulindac und Sulindacsulfid

Pharmakologische Inhibitoren des MAP-Kinase-Moduls wurden von verschiedenen Firmen gesucht. Die MEK-Inhibitoren PD98059 und PD184352 wurden bei Parke-Davis in einem direkten *in-vitro*-Screening nach Hemmstoffen der ERK-Aktivierung gefunden (Dudley, D.T. et al., 1995) PD184352 ist hochpotent, oral aktiv und führte zu einer Hemmung des Tumorwachstums von 80 % in Mäusen mit murinen oder menschlichen Colonkarzinomen (Sebolt-Leopold, J.S. et al., 1999). U0126, ebenfalls ein MEK-Inhibitor, wurde bei Dupont-Merck in einem Screening nach AP1-Inhibitoren entdeckt (Favata, M.F. et al., 1998).

Einen anderen Therapieansatz zur Hemmung von onkogenem Ras stellt die Immunisierung mit mutierten 13er Ras-Peptiden dar, bei der die Peptide individuell auf die Codon-12-Mutation der Patienten abgestimmt sind. Bei einigen Patienten konnten CD4⁺- und/oder CD8⁺-T-Zellen generiert werden, die spezifisch Zellen mit mutiertem Ras, aber nicht den Wildtyp lysierten (Khleif, S.N. et al., 1999).

1.4.1 Pflanzliche Extrakte

Die Natur stellt eine unerschöpfliche Quelle von biologisch aktiven Substanzen dar, die eine zentrale Rolle bei der Entwicklung neuer Arzneimittel als Arzneistoffe oder Modellsubstanzen spielen. Viele pflanzliche Extrakte und Pflanzeninhaltsstoffe werden traditionell in Gebieten eingesetzt, bei denen eine Beeinflussung der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade eine Rolle für die beobachtete Wirkung spielen könnte. Dazu gehören zum einen Extrakte mit antikarzinogener Wirkung, zum anderen Extrakte, die zur Förderung der Wundheilung eingesetzt werden. Viele Pflanzenstoffe und Extrakte zeigten bereits in Modellen eine krebshemmende Wirkung; zur Praxisrelevanz sind jedoch epidemiologische Studien wichtig, die einen Zusammenhang zwischen der Einnahme pflanzlicher Produkte und dem Rückgang in der Tumorfrequenz aufzeichnen (Hänsel, R., 1999). Knoblauch enthält z. B. Stoffe, welche die Häufigkeit von Colonkarzinomen um 35-50 % senken (Dorant, E. et al., 1993; Ballard-Barbash, H. et al., 1995). Auch für grünen Tee liegen Statistiken vor, dass die Einnahme beim Menschen das Krebsrisiko vermindern kann (Jankun, J. et al., 1997).

Zur Unterstützung der Wundheilung sowie bei Entzündungen der Schleimhäute werden traditionell z. B. Extrakte aus Schafgarbe, Calendula und Arnica angewandt. Als Stammpflanze der Arzneibuchdroge *Millefolii herba* ist *Achillea millefolium* zugelassen. Die entzündungshemmenden, spasmolytischen und antiödematösen Wirkungen der Schafgarbe beruhen vor allen Dingen auf dem enthaltenen, ätherischen Öl und den Sesquiterpenlactonen, insbesondere den Guajanolide (Kastner, U. et al., 1993; Sticher, O., 1999c).

Ringelblumenblüten, *Calendulae flos*, werden aus den Blüten von *Calendula officinalis* gewonnen. Die Droge enthält Triterpensaponine, zum Teil veresterte Triterpenalkohole, Flavonoide wie Quercetinglykoside, Carotinoide, Polysaccharide, ätherisches Öl vorwiegend mit Sesquiterpenen und ferner Cumarine, Phenolcarbonsäuren und Sterole (Sticher, O., 1999b). Bei lokaler Anwendung wird die Wundheilung gefördert und es zeigen sich entzündungshemmende und granulationsfördernde Effekte. Als Hauptwirkstoffe für die antiphlogistische Wirkung sind die freien und veresterten Triterpenalkohole verantwortlich, für die Wundheilung wahrscheinlich eher die Carotinoide (Isaac, O., 1994).

Als Stammpflanzen für die Arzneibuchdroge *Arnicae flos* sind die geschützte Art *Arnica montana* und die nordamerikanische Variante *Arnica chamissonis* ssp. *foliosa* zugelassen. Charakteristische Inhaltsstoffe von Arnikablüten sind die Sesquiterpenlactone vom Pseudogujanolid-Typ (Helenaline, Arnifoline, Chamissonolide), die in Konzentrationen zwischen 0,1-1,4 % vorhanden sind (Willuhn, G. et al., 1994). Außerdem sind in der Droge ca. 0,4-0,6 % Flavonoide, vor allem Flavone und Flavonole (Merfort, I. et al., 1990; Merfort, I., 1992b; Merfort, I. et al., 1992), 0,2-0,35 % ätherisches Öl mit ca. 40-50 % Fettsäuren und ca. 9 % *n*-Alkanen, sowie Phenolcarbonsäuren, Carotinoide, in Spuren nicht-toxische Pyrrolizinalkaloide (Paßreiter, C., 1992), Polyine und Polysaccharide enthalten (Merfort, I., 1992a). Arnikablüten werden zur Herstellung von wässrigen und öligen Auszügen sowie von Arnikatinktur nach DAB verwendet. Die extrahierte Menge an Sesquiterpenlactonen liegt bei ca. 92 % (Willuhn, G. et al., 1995) in der Tinktur, die die häufigste Anwendungsform darstellt und vor Gebrauch verdünnt werden muss. Die früher übliche orale Anwendung sollte wegen der cytotoxischen, kardiotonischen und atemanaleptischen Wirkungen der Helenaline und ihrer Ester vermieden werden. Zur äußerlichen Anwendung wird Arnika bei Verletzungs- und Unfallfolgen wie Prellungen, Quetschungen, Hämatomen, bei rheumatischen Muskel- und Gelenkbeschwerden, sowie bei Entzündungen im Mund- und Rachenraum eingesetzt (Merfort, I., 1992a). Als Hauptwirkstoffe gelten die Sesquiterpenlactone, die antibakteriell und antimykotisch mit MHK-Werten zwischen 10-100 µg/ml, konsekutiv analgetisch und antiphlogistisch wirken (Willuhn, G., 1991). Helenalin hemmt bereits in mikromolekularen Konzentrationen, das heißt in Konzentrationsbereichen, die auch bei topischer Anwendung von Arnikatinktur auftreten, die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB. Dadurch wird die Produktion von verschiedenen Cytokinen wie Interleukin-1 oder von Tumornekrosefaktor α, sowie die Synthese von Cyclooxygenase-2 vermindert und das Entzündungsgeschehen reduziert (Lyss, G. et al., 1997). Neben den Sesquiterpenlactonen tragen die Flavonoidverbindungen, das ätherische Öl und die Xantophylle ebenfalls zur antiphlogistischen Wirkung bei.

1.5 Das Zwei-Hybrid-System zur Untersuchung von Proteininteraktionen

Die Wechselwirkung zwischen Proteinen ist die Basis von fast allen biologischen Prozessen. Insofern ist ein wichtiger Aspekt bei der Erforschung der Regulation und Funktion eines Proteins die Identifizierung von Proteinen, die mit ihm interagieren. Zu den

verschiedenen biochemischen Techniken gehören z. B. das Crosslinking, die Coimmunopräzipitation oder die Cofraktionierung mit Hilfe der Chromatographie. In den späten 80er Jahren baute die Gruppe um Stanley Fields das Zwei-Hybrid-System in *Saccharomyces cerevisiae* auf, welches eine Untersuchung der Protein-Wechselwirkung *in vivo* ermöglicht (Fields, S. et al., 1989). Das System nutzt den modularen Aufbau vieler Transkriptionsfaktoren wie z. B. *lexA* oder *Gal4* aus zwei, physikalisch verschiedenen Domänen aus: der transkriptionsaktivierenden Domäne AD und der DNA-bindenden Domäne BD. Zwei Proteine werden in Fusion mit den beiden Domänen in einem Hefestamm, bei dem der ursprüngliche Transkriptionsfaktor deletiert wurde, exprimiert. Kommt es zu einer Wechselwirkung der Fusionsproteine, kann die räumliche Nähe der Domänen wiederhergestellt und die Transkription der dadurch kontrollierten Gene gestartet werden. Als Reportergene dienen dabei zum einen Auxotrophiemarker wie *His3* oder *Leu2*, zum anderen Enzymmarker wie *lacZ* oder *gusA*. Das Prinzip des Zwei-Hybrid-Systems liegt somit in der direkten Kontrolle bestimmter Gene durch die Wechselwirkung zweier Fusionsproteine. Die Enzymaktivitäten der Reporterproteine spiegeln dabei die *in vitro* bestimmten Affinitäten der fusionierten Proteine wider und lassen einen relativen Vergleich der Interaktionsstärke zu (Estojak, J. et al., 1995).

Die Idee, das Zwei-Hybrid-System nun zur Suche nach Ras/Raf-Effektoren einzusetzen, nutzt die Korrelation der Reportergenaktivität mit der Interaktionsstärke der beiden Fusionsproteine aus. Beeinflusst eine zugefügte Substanz die Wechselwirkung der beiden Fusionsproteine, sollte dies zu einer messbaren Änderung der Enzymaktivitäten der Reporterproteine führen.

Das in dieser Arbeit eingesetzte Zwei-Hybrid-System beruht auf dem modularen Aufbau des Transkriptionsfaktors *Gal4* (Keegan, L. et al., 1986; Ma, J. et al., 1987a). *Gal4* kontrolliert mit *Gal80* die Gene für den Galactose-Metabolismus und erkennt dabei mit seiner DNA-bindenden Domäne BD (AS 1-147) bestimmte *upstream activating sequences* UASs: cis-aktive Elemente und Bestandteile von Hefe-Promotoren mit einer oder mehreren konservierten, palindromischen Sequenzen. Interagiert die transkriptionsaktivierende Domäne AD (AS 768-881) von *Gal4* gleichzeitig mit dem RNA-Polymerase-Komplex, kann die Transkription der entsprechend kontrollierten Gene starten (Ma, J. et al., 1987b) (s. Abb. 1.5-1). Durch die strenge Kontrolle der Gal UASs durch *Gal4* ist eine Verwendung dieser *Enhancer* zur Expression von Reportergenen möglich. Allerdings muss der verwendete Hefestamm Deletionen in den *gal4*- und *gal80*-Genen aufweisen; ansonsten beeinflussen endogene *Gal4*- und *Gal80*-Proteine die Reportergenaktivität.

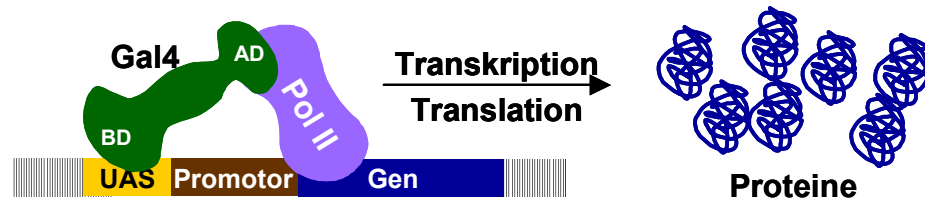


Abb.1.5-1: Funktion des Transkriptionsfaktors Gal4

Die beiden Domänen von Gal4 (BD und AD) sind innerhalb des Transkriptionsfaktors gekennzeichnet. Pol II steht für den RNA-Polymerase II-Komplex.

Die beiden Domänen von Gal4 müssen nicht auf einem Protein lokalisiert sein müssen, sondern die räumliche Nähe der Domänen kann auch durch die Interaktion zweier, mit den Domänen fusionierter Proteine z. B. Ras und Raf vermittelt werden. Wechselwirken die Fusionsproteine miteinander, wird die Transkription der Reportergene aktiviert und die entsprechenden Proteine gebildet. Die Sequenzen der Fusionsproteine sind auf zwei Plasmiden codiert, die über Doppeltransformation in die Hefen eingebracht werden (s. Abb. 1.5-2).

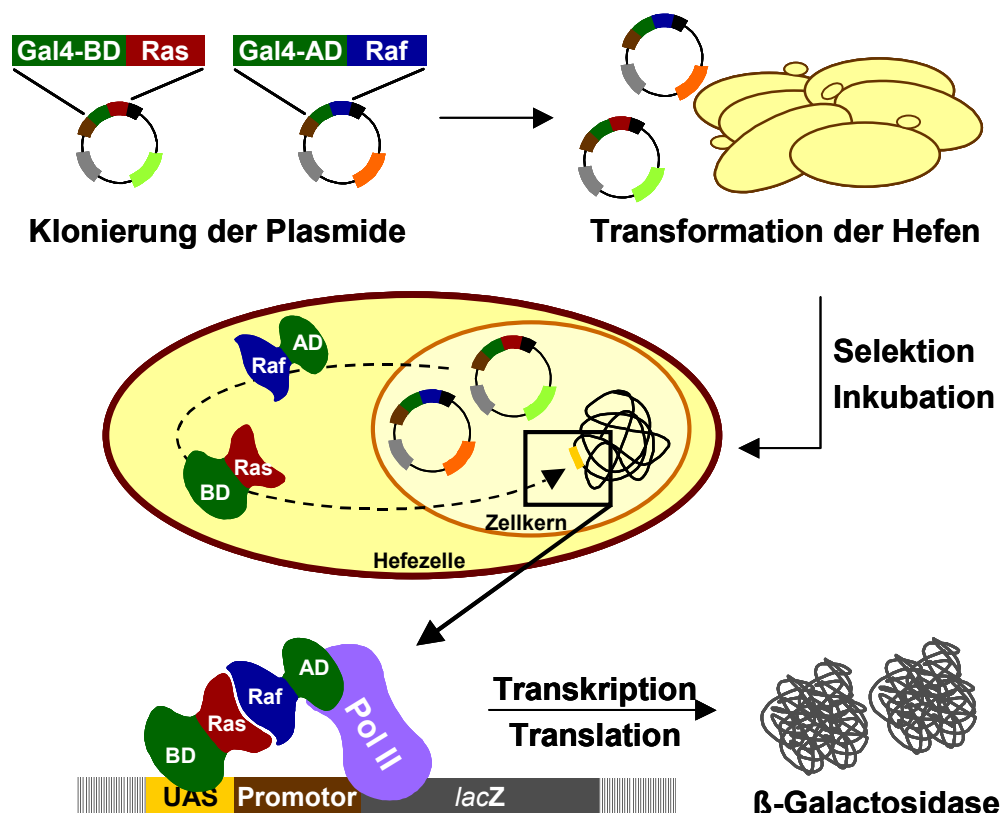


Abb. 1.5-2: Das Zwei-Hybrid-System

Die Sequenzen der Protein Ras und Raf werden in die entsprechenden Vektoren hinter die Gal4-Domänen kloniert. Nach Doppeltransformation der Plasmide werden in der Hefe die beiden Fusionsproteine BD-Ras und AD-Raf gebildet und zurück in den Zellkern transportiert. Durch die Interaktion von Ras und Raf werden die DNA-bindende Domäne BD und die transaktivierende Domäne AD von Gal4 wieder in räumliche Nähe gebracht, sodass die Transkription der von Gal4-kontrollierten Gene beginnen kann. In diesem Beispiel wurde als Reportergen *lacZ* gewählt, das für die bakterielle β -Galactosidase kodiert.

1. Einleitung

Die im Zwei-Hybrid-System verwendeten Hefestämme besitzen als Reportergene unter der Kontrolle von Gal4 zumeist *lacZ*, dessen Genprodukt β -Galactosidase leicht nachzuweisen ist, und *HIS3*, das eine Wachstumsselektion ermöglicht.

Ursprünglich wurde das Zwei-Hybrid-System zum Screening von cDNA-Banken nach einem möglichen Interaktionspartner eines bekannten Proteins entwickelt (Chien, C. et al., 1991). Es wurde in den letzten Jahren jedoch vielfältig modifiziert und weiterentwickelt, sodass es nun nicht nur zum Screening von cDNA-Bibliotheken, sondern auch als wichtiges Werkzeug in der Proteomforschung und bei der Arzneistoffsuche verwendet wird. Einige Probleme und Grenzen des „klassischen“ Zwei-Hybrid-Systems konnten dabei durch Variationen überwunden werden.

Um Mutationen innerhalb eines Proteins, die die Protein-Protein-Interaktion stören, oder inhibitorisch wirkende Peptide und Substanzen zu identifizieren, wurde von M. Vidal das Reverse-Zwei-Hybrid-System entwickelt, das die Selektionsstrategie des Zwei-Hybrid-Systems umdreht (Vidal, M. et al., 1996). Kommt es zu einer Interaktion der Fusionsproteine, wird das Reportergen *URA3* abgelesen und der Hefe-Metabolismus zur Synthese von Uracil durch das gebildete Enzym Orotidin-Phosphatdecarboxylase komplementiert. Extern zugefügtes 5-Fluorouracil (5-FU) wird von diesem Enzym zu einem giftig wirkendem Metaboliten umgewandelt, sodass die Hefezellen nicht mehr wachsen können. Nur wenn die Interaktion der Fusionsproteine gestört wird, ist ein Wachstum der Hefen in Anwesenheit von 5-FU möglich.

Falls ein Protein als Bestandteil eines größeren Komplexes nur mit schwacher Wechselwirkung an ein anderes Protein bindet, kann im Drei-Hybrid-System ein drittes, stabilisierendes Protein mitexprimiert werden. DNA-Protein-Interaktionen können mit dem Ein-Hybrid-System (Wilson, T.E. et al., 1991) oder dem Ein-Ein-Halb-Hybrid-System (Analogon zum Drei-Hybrid-System) (Dalton, S. et al., 1992) untersucht werden. Hierbei wird ein Fusionsprotein, bestehend aus der transkriptionsaktivierenden Domäne von Gal4 und dem zu untersuchenden Protein, von einem speziellen Ein-Hybrid-Vektor exprimiert. Der Vektor besitzt außerdem ein Reportergen, zumeist *lacZ*, unter der Kontrolle eines von Gal4-regulierten Promotors. Statt des „gal4-enhancer“-Elements wird jedoch eine kurze DNA-Sequenz inseriert, an die das Fusionsprotein binden und dadurch die Transkription des Reportergens aktivieren soll. Oft wird dieses Ein-Hybrid-System zur Suche nach DNA-Bindeproteinen eingesetzt, wobei eine cDNA-Bank „in frame“ mit der Sequenz für die Gal4AD-Domäne in den Vektor kloniert wird und somit viele Fusionsproteine nach

Transformation in den Hefen gebildet werden. Aufgrund des Reporterproteins β -Galactosidase können die positiven Transformanten relativ einfach z. B. mit X-Gal nachgewiesen werden.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der großen Bedeutung von Ras und Raf bei der Signalübertragung von verschiedensten Rezeptoren wird seit ihrer Entdeckung intensiv an den beiden Protoonkogenen geforscht. Die direkte Interaktion zwischen dem GTP-gebundenem aktiviertem Ras und der Proteinkinase Raf führt zur Rekrutierung und Aktivierung von Raf an der Plasmamembran und leitet die Raf/MEK/ERK-Kaskade ein. Insofern stellt dieser erste Schritt ein vielversprechendes Target zur Beeinflussung von Apoptose, Proliferation und Differenzierung der Zellen dar.

Da jedoch trotz der bekannten Proteinstruktur von Ras und Raf bisher nur wenige Stoffe gefunden wurden, die die Interaktion beeinflussen (s. 1.5), war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, ein Testsystem zu etablieren, mit dessen Hilfe Effektoren der Ras/Raf-Interaktion schnell und einfach identifiziert werden können. Bereits B. Jaitner (Jaitner, B.K. et al., 1997) benutzte zur Quantifizierung der Interaktionsstärke zwischen Ras und Raf das Zwei-Hybrid-System in Hefe. Aufbauend auf diesen Arbeiten sollte nun das System in Microtiterplatten etabliert werden, sodass gleichzeitig ein Screening von mehreren Substanzen möglich sei.

Durch Vorarbeiten von G. Hösch, S. Richter und I. Zündorf lagen Hinweise vor, dass eine Fraktion aus *Arnika montana* die Interaktion zwischen Ras und Raf verstärkt. Diese Vermutungen sollten weiter bestätigt und - falls möglich - der entsprechende Stoff identifiziert werden.

Bei Identifizierung aktiver Substanzen sollte darüber hinaus durch Expression verkürzter Ras- und Raf-Proteine im Zwei-Hybrid-System die essentiellen Proteinbereiche, die für die Wirkung notwendig sind, eingegrenzt werden.

Abschließend sollten die Effektoren der Ras/Raf-Wechselwirkung mit Hilfe eines zweiten unabhängigen Testsystems überprüft werden. Als Organismen wurden dabei statt *Saccharomyces-cerevisiae*-Stämmen verschiedene Säugerzelllinien gewählt, um die Ergebnisse besser auf eine mögliche pharmazeutische Anwendung übertragen zu können. Dieses zweite Testsystem beruhte auf der Aktivierung der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade und anschließendem Nachweis der phosphorylierten Proteine.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Geräte und ihre Bezugsquelle

Substanzen	Bezugsquellen
ABTS	Fa. Boehringer
Acrylamid	Fa. Roth
Agar	Fa. IMA
Agarose	Fa. AGS
Aminosäuremix ohne Leucin, Histidin, Tryptophan	Fa. BIO101
3-Aminotriazol	Fa. Sigma
Ampicillin	Fa. Roth
Anti-Mouse-Antikörper POD-Konjugat	Fa. Sigma
Anti-Rabbit-Antikörper POD-Konjugat	Fa. Sigma
APOD	Fa. Roth
Arnika-Tinktur	Fa. Dr. Hetterich
Bacto-Pepton	Fa. Unipath
Bacto-Trypton	Fa. Unipath
Bacto-Yeast	Fa. Unipath
Bicine	Fa. Sigma
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Fa. Perkin Elmer
Bisacrylamid	Fa. Roth
BSA	Fa. Roth
Chemikalien vom Reinheitsgrad „pro analysi“	Fa. Merck, Fa. Roth, Fa. Serva, Fa. Sigma
Coomassie Brilliant Blue R250	Fa. Roth
CPRG	Fa. Boehringer
DMEM	Fa. GibcoBRL
DMSO	Fa. Merck
dNTPs	Fa. Roth
Drop-out-Mix ohne Aminosäuren	Fa. Difco
DTT	Fa. Roth
ECL-Kit	Fa. Amersham
EDTA	Fa. Roth
Ethidiumbromid	Fa. Sigma
Ethylenglycol	Fa. Merck
FCS	Fa. Sigma
Ficoll	Fa. Sigma
Glutamax	Fa. GibcoBRL
Glycerin 86 % (technisch)	Fa. Roth

Glycin	Fa. Roth
HEPES	Fa. Roth
Hybond™-P	Fa. Amersham
IPTG	Fa. Saxon
Leupeptin	Fa. Merck
McCoy5a	Fa. GibcoBRL
MgCl ₂ (für PCR)	Fa. USB
β-Mercaptoethanol	Fa. Roth
Molekulargewichtsmarker für SDS-Gele	Fa. Sigma
MTT	Fa. Merck
ONPG	Fa. Merck
PEG 1000	Fa. Merck
PEG 3550/6000/8000	Fa. Sigma
Penicillin/Streptomycin (100x)	Fa. PAA Laboratories
Ponceau S	Fa. Sigma
Röntgen-Fixierlösung	Fa. Tetenal
Röntgen-Rapid-Entwickler	Fa. Tetenal
RPMI	Fa. GibcoBRL
Na-Sarcosyl-laureat = N-Lauroyl-sarcosine	Fa. Sigma
SDS	Fa. Biomol
Sorbitol	Fa. Sigma
TEMED	Fa. Serva
Tetracyclin	Fa. Sigma
Triton-X100	Fa. Sigma
Trypsin/EDTA	Fa. PAA Laboratories
Trockenmilch	Fa. Frema Reform
Trypan Blue Stain 0,4 %	Fa. GibcoBRL
Tween 20	Fa. Roth
X-Gal	Fa. Roth
Yeast Extract	Fa. Unipath
Yeast Nitrogen Base w/o amino acids	Fa. Difco
[α ³² P]-dATP (10mCi/ml, 3000 Ci/mmol)	Fa. Amersham
[γ ³² P]-dATP (10mCi/ml, 3000 Ci/mmol)	Fa. Amersham

Chromatographiezubehör**Bezugsquellen**

Kieselgel 60 F ₂₅₄ Glas-Fertigplatten, 20x20 cm	Fa. Merck
Kieselgel 60 F ₂₅₄ Alufolienplatten, 20x20 cm	Fa. Merck
Lobar-Fertigsäule LiChrorep RP-18 (40-63µm)	Fa. Merck
LC-Pumpe Duramat 80	Fa. Chemie und Filter GmbH
RP-18 F _{254S} Glas-Fertigplatten, 20x20 cm	Fa. Merck

2. Material und Methoden

Geräte	Hersteller
Abi Prism 310 Genetic Analyzer	Fa. Perkin Elmer
Analysenwaage Sartorius MC1	Fa. Sartorius
Blotting-Apparatur für Western Blots	Fa. Fröbel
Brutschrank	Fa. Heraeus
Elisa-Reader MR5000	Fa. Dynatech
Fraktionssammler Advantec SF-210	Fa. Gynkotec
Geltrockner	Fa. Fröbel
GeneAmp PCR System 9600	Fa. Perkin Elmer
Gene Pulser™	Fa. Bio Rad
Gene Quant RNA/DNA-Calculator	Fa. Pharmacia
LaminAir™ HB2472	Fa. Heraeus
Mikroskop	Fa. Nikon
Mini Protean II	Fa. Bio Rad
Netzgerät	Fa. Consort
pH-Meter mit Einstabmesskette SenTix	Fa. WTW
Polaroidkamera DS-34	Fa. Polaroid
Rotationsschüttler	Fa. Infors
Rotationsverdampfer:	
Büchi Rotavapor Re111	Fa. Büchi
Büchi 461 Wasserbad	Fa. Büchi
Vacuubrand Membranpumpe MZ2c	Fa. Vacuubrand
Speed Vac Concentrator	Fa. Heraeus
Spektralphotometer Hitachi U 2000	Fa. Colora
SterilGard Hood	Fa. Labotect
Thermocycler Hybaid Omn-E	Fa. MWG Biotech
Tiefkühlschrank	Fa. Forma Scientific
Trockenschrank	Fa. Ehret
Ultraschallbad Sonorex Super RK255H	Fa. Bandelin
Ultraschallgerät Sonoplus HD-70	Fa. Bandelin
UV-Schirm	Fa. Fröbel
Vortex Reax 2000	Fa. Heidolph
Vortex Genie 2	Fa. Scientific Industries
Wasserbad	Fa. Julabo
Zählkammer	Fa. Brand Neubauer
Zellkulturinkubator	Fa. Forma Scientific
Sonstiges Material	Bezugsquellen
3MM Chromatographiepapier	Fa. Whatman
BCA Protein Assay Kit	Fa. Pierce
Dialyseschläuche Visking	Fa. Roth

Gal4 Two Hybrid Phagemid Vector Kit	Fa. Stratagene
GenePulser Cuvettes	Fa. Eurogentec
Hybond-N Membran	Fa. Amersham
Mehrkanalpipette	Fa. Brand
Microtiterplatten	Fa. Greiner
Nitrocellulosemembran BA85	Fa. Schleicher & Schüll
pGem-T Vector System I	Fa. Promega
Polaroidfilme Typ 667	Fa. Polaroid
Qiagen PCR Purification Kit	Fa. Qiagen
Qiagen Gel Extraction Kit	Fa. Qiagen
Qiaprep Spin Plasmid Kit	Fa. Qiagen
Röntgenfilme X-Omat AR™	Fa. Kodak
Sterilfilter 0,2 µm	Fa. Schleicher & Schüll

Zentrifugen

J2-HS, J6-HC
Rotixa/P
Tischzentrifuge 5415C
Ultrazentrifuge L-70

Hersteller

Fa. Beckman
Fa. Hettich
Fa. Eppendorf
Fa. Beckman

Enzyme

Restriktionsendonukleasen, Polymerasen, DNA-Ligasen, T₄-Polynukleotidkinase, alkalische Phosphatase und pankreatische RNase wurden von den Firmen Roche Diagnostics (früher Boehringer Mannheim), GibcoBRL, New England Biolabs und Pharmacia bezogen, Lyticase von der Fa. Fluka.

Die in den Polymerasekettenreaktionen verwendete DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* wurde nach den Angaben von Pluthero (Pluthero, F.G., 1993) hergestellt und gereinigt.

2.1.2 Allgemeine Puffer und Lösungen**Puffer und Lösungen**

10 x β-ME

„Chloroform“

CPRG-Lösung

Zusammensetzung

60 mM β-Mercaptoethanol

Chloroform/Isoamylalkohol 24+1 (v/v)

0,2 mg CPRG

0,2 µl β-Mercaptoethanol

1 ml Immunologischer HEPES-Puffer

2. Material und Methoden

50 x Denhardt's	1 % BSA 1 % PVP 1 % Ficoll
DNA-Auftragspuffer (denaturierend)	95 % Formamid 10 mM EDTA 0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylencyanol FF
DNA-Auftragspuffer (nativ)	50 % Sucrose 0,1 M EDTA pH 8,0 0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylencyanol FF
DNA/RNA-Elutionspuffer	0,3 M NaCl 10 mM Tris (mit HCl auf pH 7,5) 1 mM EDTA 1 % (w/v) Phenol
50 x E-Puffer (HOAc pH 7,9)	2 M Tris 0,1 M EDTA 0,25 M Natriumacetat
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml Ethidiumbromid
Immunologischer HEPES-Puffer	100 mM HEPES pH 7,5 10 mM MgCl ₂ 150 mM NaCl 0,05 % Tween20
Low TE	10 mM Tris (mit HCl auf pH 8,0) 0,1 mM EDTA
2,5 x PBS	375 mM NaCl 75 mM KH ₂ PO ₄ 175 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
„Phenol“	80 % Phenollösung, mit Low TE gesättigt
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat

10 x TBS	100 mM Tris (mit HCl auf pH 7,5) 1,5 M NaCl
1 x TTBS	1 x TBS 0,1% Tween 20
X-Gal-Lösung	1 mg X-Gal 50 µl DMF
10 x YTBE	1 M Tris 20 mM EDTA 0,5 M H ₃ BO ₃
Z-Puffer	60 mM Na ₂ HPO ₄ 40 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM KCl 1 mM MgSO ₄

Enzymatische Inkubationspuffer wurden nach Herstellerangaben oder nach Sambrook (Sambrook, J. et al., 1989) verwendet.

2.1.3 Medien

Medien für <i>E. coli</i>	Zusammensetzung
YT-Medium	1 % Bacto Trypton 0,5 % Yeast Extract 0,5 % NaCl
YT-Agar	YT-Medium mit 1,2 % Agar
YT/amp-Medium	YT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin
YT/cam-Medium	YT-Medium mit 20 µg/ml Chloramphenicol
Medien für <i>S. cerevisiae</i>	Zusammensetzung
SC ^{-Leu-Trp-His} -Medium = SC-Medium	6,7 g/l Drop-out-Mix ohne Aminosäuren 2 g/l Aminosäuremix 2 % Glucose
SC ^{-Leu-Trp} -Medium	SC-Medium mit 0,1 g/l Histidin

2. Material und Methoden

SC ^{-Leu} -Medium	SC-Medium mit 0,1 g/l Histidin und Tryptophan
SC ^{-Trp} -Medium	SC-Medium mit 0,1 g/l Histidin, 0,5 g/l Leucin
SC-Agar	SC-Medium mit 2 % Agar
YPD-Medium	1 % Bacto-Yeast 2 % Bacto-Pepton 2 % Glucose

2.1.4 Synthetische Oligonukleotide

Alle aufgeführten Oligonukleotide sind in 5' → 3'-Richtung dargestellt und wurden bei der Firma MWG Biotech (Ebersberg bei München) synthetisiert. Sie dienten als PCR-Starter zur Einführung benötigter Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen, als Mutagenese- und Sequenzierprimer, sowie nach Markierung mit [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP zum Nachweis von DNA und RNA. Bei dem Primer zur Mutagenese ist die Mutationsstelle durch Fettdruck hervorgehoben. Die Lage der Primer ist schematisch in Abbildung 2.1-1 wiedergegeben, die Bezeichnungen und Sequenzen der Primer sind in den Unterkapiteln aufgeführt.

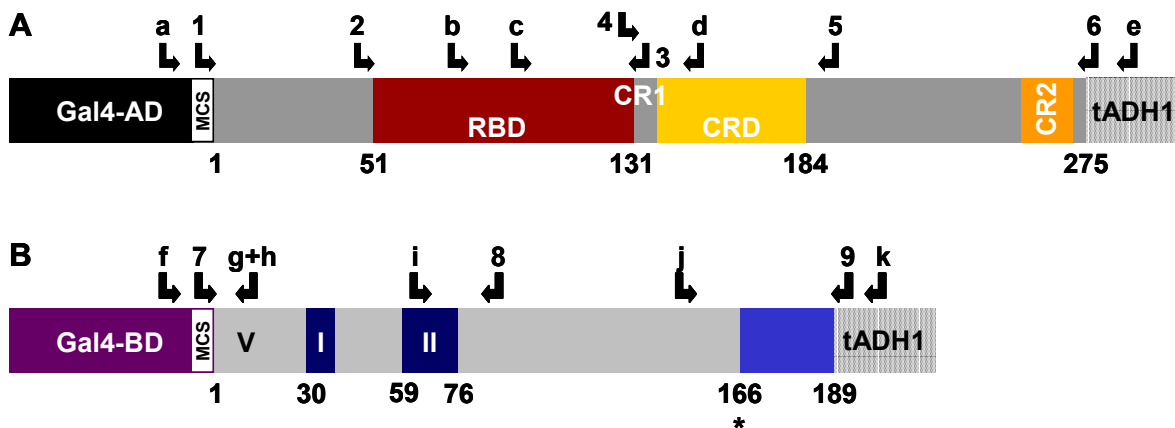


Abb. 2.1-1: Übersicht über die Positionen der synthetischen Oligonukleotide

- A** Übersicht über die Primer zur Klonierung von Raf (1-6), sowie Sequenzier- und Hybridisierprimer (a-e) für pPC86ssHCRC2Raf bzw. pAD. Die arabischen Zahlen unterhalb der Zeichnung beschreiben Aminosäuren von Raf, oberhalb die zur Klonierung verwendeten PCR-Primer.
- B** Übersicht über die Primer zur Klonierung von Ras (7-9), sowie Sequenzier-, Hybridisier- und Mutageneseprimer (f-k) für pPC97HrasG12Vverk bzw. pBD. Die arabischen Zahlen unterhalb der Zeichnung indizieren Aminosäuren von Ras, oberhalb die zur Klonierung verwendeten PCR-Primer. Die römischen Ziffern markieren die switch-1- und switch-2-Region, „*“ steht für ein Stopp-Codon innerhalb der Sequenz.

2.1.4.1 Primer für die Polymerasekettenreaktion

Die eingeführten Restriktionsschnittstellen sind durch Unterstreichung hervorgehoben und werden im Namen des Primers benannt (*EcoRI*, *SalI*, *XbaI*). „back“ und „for“ geben die Richtung des Primers wieder: die „back“ Primer binden am 5'-Ende, die „for“-Primer am 3'-Ende des Fragments.

Primer zur Klonierung von verkürzten Raf-Proteinen

Raf back Eco1N	1	GGG TAG <u>AAT TCC</u> AAA GAT CCA TGG
Raf back Eco50	2	CTC ACA <u>GAA TTC</u> TCT AAG ACA AGC AAC
RafCRD back Eco131	3	CTT CAA GTA <u>GAA TTC</u> CTA GAT CAT GTT C
RafRBD for Sal131	4	GAG GGG AAG <u>TCG ACC</u> CAG GAA ATC
Raf for Xba192	5	GAA TTT GGA <u>ATC TAG AAC</u> AAT TGT C
Raf for Xba275	6	GCG GCC GCT <u>CTA GAA</u> GTC GAC CGG

Primer zur Klonierung von verkürzten Ras-Proteinen

Ras back Eco1N	7	CGG <u>GAA TTC</u> CAG ATC AAT TCT ATG
RasRBD for Sal91	8	CCC <u>GTC GAC</u> ACT GGT GGA TGT CCT C
Ras for Sal190	9	GAG CTT <u>GGT CGA CGT</u> CAG GAG AG

2.1.4.2 Hybridisier- und Mutageneseprimer

c-Raf1-hyb	b	GGA ATG AGC TTG CAT GAC TC
Raf hyb113 back	c	GAT TGG AAT ACT GAT GCT GCG
Raf hyb147 for	d	CAG GAA CGT CTT CCG AGC
wt-Ras SgrAI	g	CCA CAC CGC CGG CGC C
H-Ras hyb	i	GAG TAC AGC GCC ATG CGG

2.1.4.3 Sequenzierprimer

5'-AD	a	GGG ATG TTT AAT ACC ACT AC
3'-AD	e	GCA CAG TTG AAG TGA ACT TG
pPC86 seq	e	GTG GAG ACT GAT ATG CCT C
pPC97BD seq = 5'-BD	f	GTG GAG ACT GAT ATG CCT C
Ras for BD seq	h	GAT CAG CTG GAT GGT CAG
pPC97Ras seq	j	GCC AAG ACC CGG CAG G

2. Material und Methoden

SV40seq	bindet als for-Primer innerhalb der SV40-Sequenz GGA GGA GTA GAA TGT TGA G (ca. 110bp nach <i>EcoRI</i> -Site)
Gal4BDseq	bindet als for-Primer innerhalb der DNA-bindenden Domäne von Gal4 GCC CTA GTC AGC GGA GAC (ca. 140bp nach Start-Codon)
p53seq	bindet als back-Primer innerhalb der p53-Sequenz GGA GAC AGC AGG GCT CAC (ca. 100bp vor Stopp-Codon)
RSP (rev)	bindet innerhalb von pGemT AAC AGC TAT GAC CAT G
SP3 (uni)	bindet innerhalb von pGemT GTT TTC CCA GTC ACG AC

2.1.5 Verwendete Organismen

Bakterienstämme

JM83	ara Δ (lac-proAB), <i>rspL</i> , ϕ 80lacZ Δ M15 (Yanish-Perron, C. et al., 1985)
JM109	<i>recA1</i> , <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>thi</i> , Δ (lac-proAB), F'[traD36, proAB ⁺ , lacI ^q lacZ Δ M15] (Yanish-Perron, C. et al., 1985)
JM110	<i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>thi</i> , <i>leu</i> , <i>rpsL</i> , <i>lacY</i> , <i>galK</i> , <i>galT</i> , <i>ara</i> , <i>tonA</i> , <i>thr</i> , <i>tsx</i> , Δ (lac-proAB), F'[traD36, proAB ⁺ , lacI ^q lacZ Δ M15] (Yanish-Perron, C. et al., 1985)
RZ1032	F'cat (=pCJ105; M13 ^s Cm ^r)/dut ung1 thi-1 relA1 spoT1 mcrA (Sambrook, J. et al., 1989)
TG1	F'traD36 lacI ^q Δ (lacZ)M15 proA ⁺ B ⁺ /supE Δ (<i>hsdM</i> - <i>mcrB95</i> (<i>r_k⁻m_k⁻McrB⁻</i>)) thi(lac-proAB) (Sambrook, J. et al., 1989)

Hefe-Stamm

y190	MATa, <i>leu2-3,112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>trp1-901</i> , <i>his3-Δ200</i> , <i>ade2-101</i> , Δ gal4 Δ gal80 URA3 GAL-lacZ, LYS GAL-His3, <i>cyh^r</i> (Harper, J. et al., 1993)
------	--

Säugerzelllinien

HL60	humane, promyeloische Leukämiezelllinie mit N-ras-Mutation im Codon 61 (Collins, S.J. et al., 1977; Collins, S.J., 1987)
T24	humane Blasenkarzinomzelllinie mit H-ras-Mutation im Codon 12 (Bubenik, J. et al., 1970; Bubenik, J. et al., 1973)
HeLa	humane Adeno- und Zervixkarzinomzelllinie (Gey, G.O. et al., 1952)

2.1.6 Vektoren und Plasmide

Bakterielle Vektoren

Bezeichnung	Kurzbeschreibung und Referenz
pET-22b	bakterieller Expressionsvektor mit N-terminalem pelB-Leaderpeptid und C-terminalem His ₆ -Tag, durch fl-ori zur Gewinnung von Einzelstrang-DNA geeignet (Fa. Novagen)
pGEM-T	Klonierungsvektor mit terminalem Überhang einer einzelnen Thymin-Base zur effizienten Ligation von PCR-Produkten (Fa. Promega)

Zwei-Hybrid-Vektoren

Bezeichnung	Kurzbeschreibung und Referenz
pAD	Shuttle-Vektor für das Zwei-Hybrid-System, trägt die Sequenz für die transkriptionsaktivierende Domäne von Gal4 vor der MCS (Fa. Stratagene)
pBD	Shuttle-Vektor für das Zwei-Hybrid-System, trägt die Sequenz für die DNA-bindende Domäne von Gal4 vor der MCS (Fa. Stratagene)
p53	Kontrollvektor für das Zwei-Hybrid-System, codiert für ein Fusionsprotein bestehend aus dem Tumorsuppressorprotein p53 und der transkriptionsaktivierenden Domäne von Gal4 (Fa. Stratagene)
pSV40	Kontrollvektor für das Zwei-Hybrid-System, codiert für ein Fusionsprotein bestehend aus dem großen T-Antigen des Simian Virus 40 und der DNA-bindenden Domäne von Gal4 (Fa. Stratagene)
pPC86	Shuttle-Vektor für das Zwei-Hybrid-System, trägt die Sequenz für die transkriptionsaktivierende Domäne von Gal4 vor der MCS (Chevray, P. et al., 1992)
pPC97	Shuttle-Vektor für das Zwei-Hybrid-System, trägt die Sequenz für die DNA-bindende Domäne von Gal4 vor der MCS (Chevray, P. et al., 1992)
pPC97HrasG12Vverk	Shuttle-Vektor für das Zwei-Hybrid System, codiert für ein Fusionsprotein bestehend aus der DNA-bindenden Domäne von Gal4 und dem um den C-Terminus verkürzten RasG12V (AS 1-166) (Jaitner, B.K. et al., 1997)
pPC86ssHCRC2Raf	Shuttle-Vektor für das Zwei-Hybrid System, codiert für ein Fusionsprotein bestehend aus der transkriptionsaktivierenden Domäne von Gal4 und der regulatorischen Domäne von c-Raf-1 (AS 1-275) (Jaitner, B.K. et al., 1997)

2. Material und Methoden

pPC86ssRafRBD Shuttle-Vektor für das Zwei-Hybrid System, codiert für ein Fusionsprotein bestehend aus der transkriptionsaktivierenden Domäne von Gal4 und der Ras-bindenden Domäne von c-Raf-1 (AS 51-131) (Jaitner, B.K. et al., 1997)

Da der Aufbau der Zwei-Hybrid-Vektoren pAD/pBD bzw. pPC97/pPC86 von besonderer Bedeutung ist, wird hier im Gegensatz zu den anderen Vektoren ausführlicher darauf eingegangen. Die Vektoren pAD und pPC86 beinhalten das 451bp große Genfragment der transaktivierenden Domäne von Gal4, das mit einer Kernlokalisierungssequenz (NLS) in den Vektor inseriert wurde. Die NLS gewährleistet die nukleäre Lokalisation des transaktivierenden Fusionsproteins. Die 356bp lange Sequenz der DNA-bindenden Domäne von Gal4 besitzt bereits eine NLS und findet sich auf den Plasmiden pBD und pPC97. In allen Vektoren folgt auf die Gal4-Sequenz eine multiple Klonierungsstelle (MCS) ohne Transkriptionsstart oder Stoppssequenzen, sodass die an dieser Stelle eingebrachte DNA gemeinsam mit der Gal4-DNA transkribiert wird. Abschließend ist allen Vektoren der ADH1-Terminator nachgeschaltet. Unterschiede der einzelnen Vektoren abgesehen von der MCS sind in Tabelle 2.1-1 und in den Abbildungen 2.1-1 und 2.1-2 dargestellt.

	pPC97	pPC86	pBD	pAD
bakt. Replikationsursprung	ColE1	ColE1	ColE1	ColE1
bakt. Selektionsmarker	Amp ^r	Amp ^r	Cam ^r	Amp ^r
Replikationsursprung für Hefe	ARSH4Cen6	ARSH4Cen6	2μ	2μ
Hefe-Selektionsmarker	Leu2	Trp1	Trp1	Leu2
Promotor (Länge)	ADH1 (1500bp)	ADH1 (1500bp)	ADH1 (404bp)	ADH1 (404bp)
Replikationsursprung für filamentöse Phagen	---	---	f1 ori	f1 ori

Tab. 2.1-1: Unterschiede der verwendeten pPC- und Stratagene-Vektoren

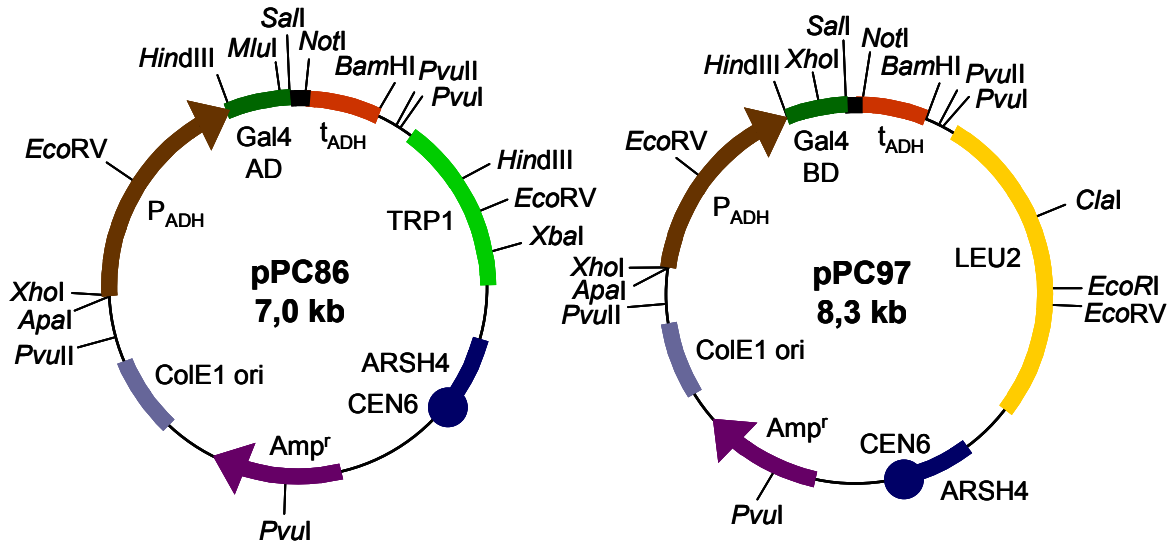


Abb. 2.1-2: Schematische Darstellung von pPC86 und pPC97

Das Schema entspricht bis auf wenige Restriktionsstellen dem Originalzitat (Chevray, P. et al., 1992). Die Sequenz der beiden Vektoren ist nicht vollständig bekannt.

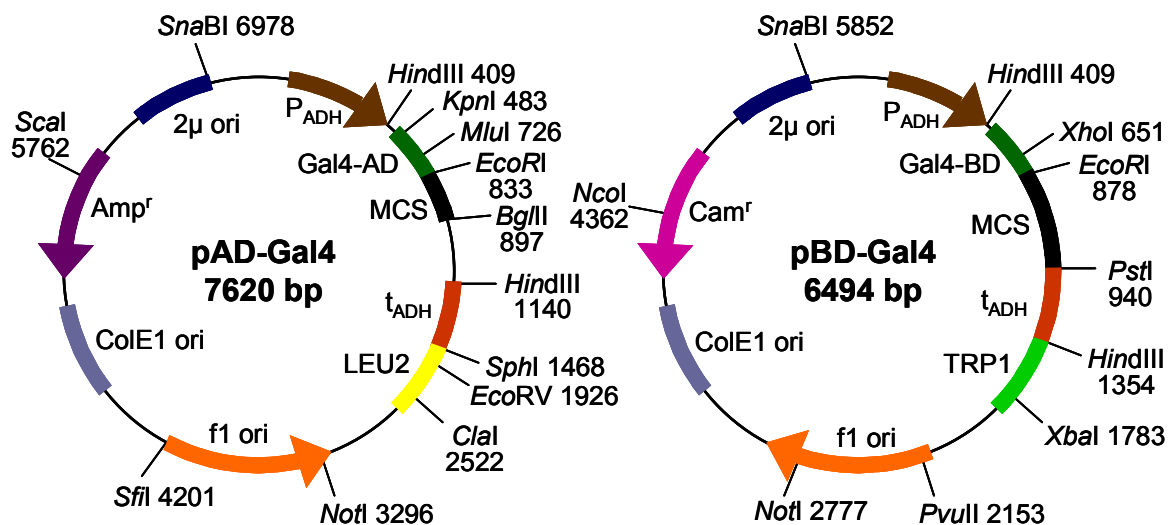


Abb. 2.1-3: Schematische Darstellung von pAD und pBD

Die Zeichnung entspricht bis auf wenige Restriktionsstellen dem Schema der Fa. Stratagene. Die Sequenz der Vektoren ist im Internet frei verfügbar.

Die Vektoren pPC97/pPC86 besitzen einen ARSH4CEN-Replikationsursprung und werden daher als zentromere Vektoren (YCp) bezeichnet. Sie werden wie Chromosomen nach den Mendelschen Regeln auf nachfolgende Generationen vererbt. Die Transformanten sind extrem stabil und tragen 1-5 Plasmide pro Zelle, wodurch eine annähernd gleiche Proteinexpression der beiden Fusionsproteine erreicht wird. Bedingt durch den vollständigen ADH1-Promotor ist die Expression relativ hoch, allerdings wird der Promotor in der späten log-Phase durch entstehenden Ethanol reprimiert.

Im Gegensatz zu den pPC-Vektoren besitzen die Stratagene-Vektoren pAD und pBD einen 2 μ -Replikationsursprung, der für eine autonome Replikation der Plasmide sorgt, sodass 50-100 Kopien in der Zelle vorkommen können. Diese Plasmide werden als episomale Plasmide (YEp) bezeichnet. Die Transformanden sind ebenfalls sehr stabil, allerdings kann die Expressionsrate der beiden Fusionsproteine aufgrund der variablen Kopienzahl der Plasmide in der Hefe sehr unterschiedlich sein. Der verkürzte ADH1-Promotor bewirkt allgemein eine geringe, aber konstitutive Proteinexpression, die jedoch nur schwer im Western Blot nachzuweisen ist (Clontech-Laboratories, 2000; James, P., 2001).

2.2 Molekularbiologische Methoden

Die allgemein gebräuchlichen, molekularbiologischen Methoden wurden, soweit nicht im einzelnen erwähnt, nach Maniatis (Sambrook, J. et al., 1989) durchgeführt und sind daher hier nicht oder nur kurz beschrieben.

2.2.1 Hybridisierungsmethoden

Puffer	Zusammensetzung
Oligohybridisierungspuffer	4 x SSC 1 x Denhardt's 0,1 % SDS 0,1 % Natriumpyrophosphat

Durch Hybridisierung mit komplementären, radioaktiv markierten Nukleinsäureproben können membrangebundene Nukleinsäuren analysiert und identifiziert werden. Je nach Art der radioaktiven Probe muss auf verschiedene Vorhybridisierungs-, Hybridisierungs- und Waschbedingungen geachtet werden, wobei in der Regel die Temperatur während der Vorhybridisierung und Hybridisierung 42 °C beträgt.

Zur Hybridisierung mit Oligonukleotiden wird die Membran in Oligohybridisierungspuffer für mindestens 15 min vorhybridisiert und anschließend im gleichen Puffer unter Zugabe des radioaktiv-markierten Primers über Nacht hybridisiert. Das Waschen der Membran erfolgt zuerst 10 min bei Raumtemperatur in 4 x SSC mit 0,1 % SDS, dann 10 min bei 2 °C unterhalb der stringenten Bindungstemperatur des Primers in 4 x SSC. Zur Berechnung der stringenten Temperatur gehen unter den aufgeführten Salzbedingungen für den Energiebetrag einer A-T-

Bindung 2 °C bzw. einer G-C-Bindung 4 °C ein. Fehlpaarungen sowie die Energiebeträge der benachbarten Basenpaare werden von der Gesamtsumme abgezogen.

2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Puffer	Zusammensetzung
10 x Taq-Puffer	500 mM KCl 100 mM Tris (mit HCl auf pH 8,3) 1 % Triton X-100
Taq-Verdünnungspuffer	50 mM Tris (mit HCl auf pH 7,9) 50 mM KCl 1 mM DTT 0,5 mM PMSF 0,1 mM EDTA 50 % Glycerin

Zur Amplifikation der verschieden langen *ras*- und *raf*-Gene aus den pPC-Vektoren wurde die nach Pluthero hergestellte Taq-DNA-Polymerase (Pluthero, F.G., 1993) für die Polymerasekettenreaktion verwendet. Mit Hilfe entsprechender Oligonukleotide (s. 2.1.4.1) können Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen in die DNA-Fragmente eingebracht werden, sodass eine gezielte Klonierung in Vektoren möglich ist. Da die Bedingungen bei jedem Ansatz neu optimiert werden müssen, wird hier nur ein Standardansatz mit dem dazu gehörigen Protokoll kurz beschrieben.

Ein typischer Ansatz enthält 0,25 mM dNTPs, 1 x Taq-Puffer, 1,5 mM MgCl₂ und 50 pmol der jeweiligen Oligonukleotide. Die Menge der eingesetzten Matrizen-DNA ist variabel: Für eine Fragment-Amplifikation ausgehend von Plasmid-DNA reichen 10 ng meistens aus.

Ein typisches Programm hat folgenden Verlauf: Zu Beginn wird der Ansatz für 5 min bei 95 °C denaturiert. Während eines „Hold“-Schritts werden 0,5 µl Taq-Polymerase (Verdünnung 1:10) zugegeben. Der 30malige Temperatur- und Zeitzyklus beginnt mit dem Annealing der Primer an die Matrizen-DNA für 1 min bei einer Temperatur, die 2-4 °C unterhalb der stringenten Temperatur der Oligonukleotide liegt. Der neue DNA-Strang wird von der Taq-Polymerase bei 72 °C für 2 min synthetisiert, woran sich ein Denaturierungsschritt von 1 min bei 94 °C anschließt. Beim letzten Zyklus entfällt der Denaturierungsschritt und der letzte Syntheseschritt wird auf 10 min ausgedehnt. Die erhaltenen DNA-Fragmente werden mittels Gelelektrophorese untersucht und bei Bedarf mit dem Qiagen PCR Purification Kit aufgereinigt.

2.2.3 Einzelstrang-DNA für die Mutagenese

Puffer	Zusammensetzung
Präzipitationslösung	3,5 M NH ₄ Ac 20 % PEG 6000 - 8000
Hochsalzpuffer	0,3 M NaCl 0,1 M Tris (mit HCl auf pH 8,0) 1 mM EDTA

Einzelstrang-DNA wird unter Benutzung des Helferphagen „M13 K07“ hergestellt und für die *in-vitro*-Mutagenese eingesetzt. Voraussetzung für die Einzelstrangpräparation ist, dass die doppelsträngige DNA-Sequenz, in die eine Mutation eingeführt werden soll, in einem M13-Vektor oder in einem Phagemid-Vektor vorliegt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Phagemid pET-22b verwendet, in das die Sequenz für RasG12V aus pBDRasG12V1-166 nach Restriktion mit *EcoRI/SalI* ligiert wurde.

Das entsprechende Phagemid wird zunächst in den *E.-coli*-Stamm „RZ1032“, der die Mutation *dut⁻/ung⁻* trägt, transformiert. Durch die Eliminierung sowohl der dUTPase (*dut⁻*) als auch der Uracil-N-Glykosylase (*ung⁻*) wird anstelle des Thymins Uracil in die Einzelstrang-DNA eingebaut. Mit 1 ml einer stationär gewachsenen Kultur der Transformanden werden 50 ml YT/amp-Medium beimpft und bei 37 °C kultiviert. Bei einer optischen Dichte der Kultur von 0,3 werden 150 µl der Helferphagen-Suspension „M13 K07“ zugegeben, die auf eine „multiplicity of infection“ von 20 titriert wurden. Eine Stunde später komplementiert man das Kulturmedium mit 350 µl Kanamycin (10 mg/ml). Der Helferphage vermittelt eine Kanamycin-Resistenz, sodass nicht infizierte Zellen durch das kanamycinhaltige Medium im Wachstum unterdrückt werden. Die Kultur wird über Nacht bei 37 °C geschüttelt und am nächsten Tag durch 20-minütiges Zentrifugieren bei 9.000 x g (Beckman J2-HS, Rotor JA-20) bei 4 °C pelletiert. Den Überstand inkubiert man mit 50 µl RNase (10 mg/ml) 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend werden die Phagen für 30 min auf Eis mit 0,25 Volumen der Präzipitationslösung gefällt, bei 9.000 x g für 20 min abzentrifugiert und in 400 µl Hochsalzpuffer resuspendiert. Aus den Phagenpartikeln wird die einzelsträngige DNA durch Behandlung mit Phenol/Chloroform und nachfolgender Chloroform-Extraktion gereinigt. Nach Natriumacetat/Ethanol-Präzipitation wird die DNA in 50 µl LowTE resuspendiert und die Konzentration durch Messung der OD bei 260 nm bestimmt (1 OD = 40 µg ssDNA).

2.2.4 *In-vitro*-Mutagenese (*dut*⁻/*ung*⁻-Methode)

Puffer	Zusammensetzung
5 x Annealing-Puffer	200 mM Tris (mit HCl auf pH 8,0) 250 mM NaCl
10 x Elongationspuffer	100 mM MgCl ₂ 10 mM ATP 10 mM DTT

Bei der *dut*⁻/*ung*⁻-Methode zur *in-vitro*-Mutagenese (Kunkel, T.A., 1985; Kunkel, T.A. et al., 1987) selektiert man gegen Uracil-haltige DNA und erhöht damit die Ausbeute an positiven Transformanden. Die über Methode 2.2.2 erhaltene Einzelstrang-DNA enthält Uracil anstelle von Thymin. Mit Hilfe eines Oligonukleotids, das die gewünschte Mutation trägt, wird *in vitro* ein komplementärer, Thymin-haltiger DNA-Strang synthetisiert. Transformiert man dieses Hybrid aus Uracil-haltiger DNA ohne Mutation und thyminhaltiger DNA mit Mutation in einen *ung*⁺-*E.-coli*-Stamm, so wird der Uracil enthaltende Einzelstrang degradiert und durch einen korrekten zweiten, Thymin-haltigen Strang ersetzt.

Zur Mutagenese werden 2 pmol Einzelstrang-DNA und 50 pmol des phosphorylierten Mutageneseprimers, in dieser Arbeit „wt-Ras SgrAI“, in 20 µl 1 x Annealing-Puffer 4 min bei 100 °C inkubiert. Nach Abkühlung des Ansatzes werden 4 µl 10 x Elongationspuffer, 2 µl 25 mM dNTPs, 1 µl T₇-DNA-Polymerase (10 U/µl), 3 µl T₄-DNA-Ligase (4 U/µl) und 10 µl Wasser hinzugefügt. Der Elongationsansatz inkubiert zunächst 5 min auf Eis, 5 min bei Raumtemperatur und danach 2 h bei 37 °C. Die DNA wird durch Natriumacetat/Ethanol-Präzipitation gewonnen und mittels Elektroporation in einen kompetenten *E.-coli*-Stamm transformiert. Positive Transformanden konnten durch Hybridisierung mit dem radioaktiv-markierten Mutageneseprimer „wt-Ras SgrAI“ und anschließender Restriktionsanalyse mit *SgrAI/XhoI* identifiziert werden.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) werden nach der Methode von Laemmli (Laemmli, U.K., 1970) durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben, werden 10-15-prozentige Gele und die Mini-Protean-II-Laufkammer verwendet.

2. Material und Methoden

Lösungen	Zusammensetzung
Trenngel (10 %)	2,3 ml 1,5 M Tris pH 8,8/ 0,4 % SDS 3,1 ml 30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid 3,9 ml H ₂ O 3,4 µl TEMED 34 µl 20 % APOD
Trenngel (15 %)	2,3 ml 1,5 M Tris pH 8,8/ 0,4 % SDS 4,7 ml 30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid 2,3 ml H ₂ O 3,4 µl TEMED 34 µl 20 % APOD
Sammelgel (3 %)	0,833 ml 0,5 M Tris pH 6,8/ 0,4 % SDS 0,433 ml 30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid 2 ml H ₂ O 3,4 µl TEMED 10 µl 20 % APOD
NEB-Probenpuffer	62,5 mM Tris (mit HCl auf pH 6,8) 2 % SDS 10 % Glycerol 50 mM DTT 0,1 % Bromphenolblau
10 x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris 1,9 M Glycin 1 % SDS

Die gewonnenen Säugerezellextrakte (s. 2.6.6) bzw. Hefeproteinextrakte (s. 2.5.4) werden mit NEB-Probenpuffer gemischt, für 5 min aufgekocht und nach Abkühlung in die Gel-Taschen aufgetragen. Als Größenstandard wird ein angefärbter Molekulargewichtsmarker von Fa. Sigma verwendet, der aus Aprotinin (6,5 kDa), Lysozym (16,5 kDa), β -Lactoglobulin (25 kDa), Triosephosphatisomerase (32,5 kDa), Aldolase (47,5 kDa), Glutamat-Dehydrogenase (62 kDa), MBP-Paramyosin (83 kDa) und MBP- β -Galactosidase (175 kDa) gemischt wurde. Die Elektrophorese wird bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA in 1 x SDS-Laufpuffer durchgeführt.

2.3.2 Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R250

Lösungen	Zusammensetzung
Coomassie-Färbelösung	0,1 % Coomassie Brilliant Blue R 250 25 % Isopropanol 10 % Essigsäure
Entfärber	10 % Methanol 7 % Essigsäure

Zur Detektion der Proteine nach einer SDS-PAGE wird das Gel mit Coomassie-Färbelösung für 0,5-2 h gefärbt. Die Proteinbanden werden nach einigen Stunden in Entfärberlösung und mehrmaligem Wechsel der Lösung sichtbar.

2.3.3 Western Blot

Puffer	Zusammensetzung
Anodenpuffer I	0,3 M Tris 20 % Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris 20 % Methanol
Kathodenpuffer	20 mM Tris 40 mM ϵ -Amino-n-Caprinsäure 20 % Methanol
Stripping-Puffer	0,2 M Glycin, pH 2,8 0,5 M NaCl

Beim Western Blot nach der „Semi-Dry“-Methode werden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mittels Elektroblob auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, auf der sie anschließend mit Hilfe der Immunfärbung charakterisiert werden können. Der Aufbau des Blots erfolgt in folgenden Schichten ausgehend von der Anodenseite der Blot-Apparatur:

- 6 Lagen 3MM-Papier, getränkt mit Anodenpuffer I,
- 3 Lagen 3MM-Papier, getränkt in Anodenpuffer II,
- die zuvor in Wasser eingelegte Nitrocellulosemembran,
- das zu blottende Gel,
- 6 Lagen 3MM-Papier getränkt mit Kathodenpuffer.

2. Material und Methoden

Der Transfer erfolgt bei ca. 7-8 V für 45-60 min. Die auf die Membran übertragenen Proteine werden mit Ponceau S (0,2 % in 3 % TCA) angefärbt und die Größenmarker wasserfest markiert. Nach Entfärbung der Membran durch Wasser oder TBS wird sie eine Stunde mit 5 % BSA in TBST bei Raumtemperatur blockiert. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper in einer geeigneten Verdünnung erfolgt in 5 % BSA/TBST über Nacht bei 4 °C und leichtem Schwenken. Nicht gebundene Antikörper werden am nächsten Tag durch dreimaliges Waschen in 1 x TBST entfernt. Nach einer kurzen Vorbehandlung mit 5 % Milchpulver/TBST erfolgt die Inkubation mit einem zweiten, Peroxidase-gekoppelten Antikörper in 5 % Milchpulver/TBST (Verdünnung 1:10.000) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wird die gebundene Peroxidaseaktivität über eine Chemilumineszens-Reaktion mittels ECL-Kit und anschließender Detektion mit einem Röntgenfilm nachgewiesen.

Falls die Membran ein weiteres Mal mit Antikörpern inkubiert werden soll, wird sie mit 20 ml Stripping-Puffer für 2-5 min unter leichtem Schwenken inkubiert. Danach wird NaOH bis zur Neutralisation der Lösung zugegeben und die Membran kurz in PBS gewaschen. Anschließend kann sie für längere Zeit gelagert oder nach obigem Protokoll wiederholt verwendet werden.

2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Lösungen	Zusammensetzung
Bradford-Reagenz	0,001 % Coomassie Brilliant Blue G250
	5 % Ethanol
	10 % Phosphorsäure 85 %

Die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, M.M., 1976) beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes „Coomassie Brilliant Blue G250“ von 465 nm nach 595 nm durch die Bindung an Protein. Das eingesetzte Probenvolumen richtet sich nach der zu erwartenden Proteinmenge und vorliegenden Störungsfaktoren wie z.B. hohe SDS-Konzentrationen. Eventuell muss mit einer 1:10-Verdünnung der Proteinlösung gearbeitet werden. Nach Auffüllen der Probenlösung auf 100 µl mit Wasser wird sie mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt, gevortext und nach 5 min bei 595 nm vermessen. Die Proteinkonzentration wird durch eine mitgeführte BSA-Eichgerade berechnet.

2.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA

Der BCA-Assay beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch Proteine im alkalischen Medium (Biuret Reaktion) und der kolorimetrischen Bestimmung des Kupfer-Kations durch Chelatierung mit zwei Bicinchoninsäure-Molekülen (Smith, P.K. et al., 1985). Der gebildete, wasserlösliche Komplex besitzt ein Absorptionsmaximum bei 562 nm, wobei jedoch auch Wellenlängen zwischen 540-590 nm zur Messung verwendet werden können.

Je 20 μl Probe bzw. 20 μl einer entsprechenden Verdünnung werden mit 200 μl frisch hergestelltem BCA-Reagenz (1:50) in je einer Vertiefung einer Microtiterplatte versetzt. Nach einer Inkubation für 30 min bei 37 °C werden die Lösungen am ELISA-Reader bei 550 nm vermessen und die Proteinkonzentrationen mit einer mitgeführten BSA-Eichgerade berechnet.

2.4 Arbeiten mit Bakterien

2.4.1 Transformation von CaCl_2 -kompetenten Bakterien

Puffer	Zusammensetzung
Transformationspuffer	10 mM Tris (mit HCl auf pH 7,5) 10 mM MgCl_2 10 mM CaCl_2

1-5 μl Plasmid DNA (50-500 ng) bzw. 10 μl eines Ligationsansatzes werden mit 100 μl Transformationspuffer und 200 μl CaCl_2 -kompetenten *E.-coli*-Zellen (Dagert, M. et al., 1979) 30 min bei 4 °C inkubiert. Durch einen raschen Temperaturwechsel zu 37 °C für 4 min und zu Raumtemperatur für 10 min wird die Aufnahme der DNA eingeleitet. Nach Zugabe von 500 μl YT-Medium wird der Transformationsansatz bei 37 °C inkubiert und nach 30 min auf eine YT-Agarplatte mit Selektionsantibiotikum ausplattiert. Falls aufgrund des verwendeten Plasmids eine Blau-Weiß-Selektion erfolgen kann, wird der Ansatz vor dem Ausplattieren mit 10 μl 0,1 M IPTG und 70 μl X-Gal-Lösung versetzt.

2.4.2 Transformation von Bakterien durch Elektroporation

Medium und Lösung	Zusammensetzung
SOC-Medium	20 g/l Bacto Trypton 5 g/l Yeast Extract 0,1 % Glucose

2. Material und Methoden

Regenerationssalzlösung	0,1 M MgCl ₂
	0,1 M MgSO ₄
	1 M NaCl

1-2 µl Plasmid DNA (50-500 ng) bzw. 5-10 µl eines Ligationsansatzes werden mit 50 µl salzfrei gewaschenen, elektrokompetenten *E.-coli*-Zellen in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,2 cm Elektrodenabstand) luftblasenfrei pipettiert und 1 min auf Eis inkubiert. Die Kapazität des Plattenkondensators wird auf 25 µF eingestellt und ein zusätzlicher paralleler Widerstand von 200 Ω angelegt. Durch Entladung des Plattenkondensators bei einer Spannung von 2,5 kV nehmen die Zellen die DNA auf. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium werden die Zellen in ein steriles Reagenzglas überführt, welches bereits 30 µl Regenerationssalzlösung enthält. Die Zellen regenerieren während einer Stunde bei 37 °C, bevor sie auf eine YT-Agarplatte mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert werden. Falls aufgrund des verwendeten Plasmids eine Blau-Weiß-Selektion möglich ist, wird der Ansatz vor dem Ausplattieren mit 10 µl 0,1 M IPTG und 70 µl X-Gal-Lösung versetzt.

2.5 Arbeiten mit Hefen

2.5.1 Herstellung kompetenter Hefen

Lösung	Zusammensetzung
SBEG	1 M Sorbitol
	10 mM Bicine pH 8,35
	3 % Ethylenglykol

Zur Herstellung kompetenter Hefen wurde das Protokoll von Klebe et al. (Klebe, R. et al., 1983) verwendet. Zu einer 5 ml Übernachtskultur in YPD-Medium vom Hefestamm y190 werden am folgenden Tag 50 ml frisches YPD-Medium gegeben. Hat die Kultur eine Zelldichte mit einer OD₆₀₀ von 0,6 erreicht, werden die Hefen 5 min bei 4 °C und 3.500 g abzentrifugiert, in 25 ml SBEG resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 1 ml SBEG aufgenommen. 100 µl-Aliquots der Zellsuspension werden auf Trockeneis für mindestens 15 min eingefroren und anschließend bis zur späteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.5.2 Transformation von Hefezellen

Puffer	Zusammensetzung
PEG-Puffer	40 % PEG 1000 20 mM Bicine pH 8,35
NB-Puffer	150 mM NaCl 10 mM Bicine pH 8,35

Zur Doppeltransformation wird jeweils 1 µg Vektor zu 100 µl Zellsuspension pipettiert und der Ansatz mit 750 µl PEG-Puffer gemischt. Nach einer einstündigen Inkubation der Zellen bei 30 °C erfolgt ein Hitzeschock von 5 min bei 45 °C, bevor die Hefen 2 min bei 4000 rpm in einer Eppendorf-Zentrifuge bei RT abzentrifugiert werden. Das Pellet wird in 1 ml NB-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wird bis auf ca. 100 µl verworfen und je 50 µl Zellen auf SC^{-Leu/Trp}-Platten ausplattiert. Nach Inkubation bei 30 °C für ca. 2-3 Tagen werden die Klone auf Histidin-Prototrophie und ihre β-Galaktosidaseaktivität hin untersucht.

2.5.3 Anlegen von Hefe-Stocks

Zur dauerhaften Lagerung von Hefetransformanten werden Glycerin-Stocks der Zellen angelegt. Dazu werden 500 µl einer dicht gewachsenen o/n-Kultur des entsprechenden Hefeklons mit 500 µl 30 % Glycerol versetzt und gevortext. Die cups werden auf Trockeneis für mindestens 15 min eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.5.4 Herstellung von Hefeextrakten für SDS-Page

Puffer	Zusammensetzung
PGSK-Puffer	4 mM NaH ₂ PO ₄ 50 mM Na ₂ HPO ₄ 50 mM NaCl 50 mM KCl 2,75 % Glucose
PGSK-Lysepuffer	0,9 ml PGSK 0,1 ml 20 % SDS 5,75 µl 0,1 M PMSF 0,2 µl 0,5 M EDTA 1,32 µl 1:100-verdünntes Leupeptin.

2. Material und Methoden

Eine Übernachtskultur wird mit dem entsprechendem Selektionsmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,15-0,2 verdünnt und anschliessend bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellen werden bei 3.000 rpm und 4 °C pelletiert und in 500 µl eiskaltem PGSK-Puffer resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation und Waschung mit PGSK-Puffer wird der Überstand mit einer Pasteurpipette abgezogen und das erhaltene Pellet o/n bei -80 °C eingefroren. Zum Zellaufschluss wird der PGSK-Lysepuffer, der mit verschiedenen Protease-Inhibitoren versetzt wurde, zunächst auf 60 °C erwärmt, bevor 100 µl schnell auf die tiefgefrorenen Zellen pipettiert und das Pellet darin resuspendiert werden. Nach Zugabe von Glassbeads (Durchmesser 0,25-0,5 mm) bis ungefähr zur Höhe des Meniskus wird die Zellsuspension 10 min in einem kochendem Wasserbad inkubiert und danach auf Eis erneut 1 µl 0,1 M PMSF zugegeben. Insgesamt fünfmal wird der Ansatz für je 30 sec auf höchster Stufe gevortext und anschließend für eine Minute auf Eis gestellt. Mit einer rotglühenden Kanüle (23g) bohrt man danach von unten ein Loch in das cup und überführt die Lösung in das sich darunter befindliche neue cup mittels Zentrifugation bei 4 °C und 3.000 rpm für 5 min. Der erhaltene Proteinextrakt wird zu je 20 µl portioniert und bei -20 °C gelagert. Aufgrund des gewählten schonenden Aufschlusses können die Ansätze auch zur 2D-Gelelektrophorese verwendet werden. Die Glassbeads werden nach mehrmaligem Waschen in 20 % TCA und anschließendem Trocknen wiederverwendet.

2.5.5 Plasmidisolierung aus Hefe

Lösungen	Zusammensetzung
Lyticase-Lösung	20 mg Lyticase 1 ml LowTE, pH 7,5
Lysepuffer	0,2 M NaOH 1 % SDS

2 ml Selektionsmedium werden mit dem gewünschten Klon im Reagenzglas angeimpft und o/n bei 30 °C und 200 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellen werden bei 6.000 rpm für 4 min bei RT pelletiert und nach Abkippen des Überstandes in der verbliebenen Flüssigkeit resuspendiert. Nach Zugabe von 15 µl Lyticase-Lösung inkubiert der Ansatz bei 37 °C für 90 min zur Ausbildung von Hefesphäroblasten, die anschließend mit 200 µl Lysepuffer lysiert und für weitere 5 min bei RT, sowie 5 min bei 4 °C inkubiert werden. Die erhaltene Zellsuspension wird für mindestens 7 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit 700 µl Phenol extrahiert, wobei die genomische DNA während des Vortexens bei der Phenol-Extraktion geschert wird. Aus der abgezogenen, wässrigen Phase fällt man die

DNA bei RT durch Zugabe von 1/10 Volumen NaOAc, pH 4,8 und 700 μ l 96 % EtOH aus. Nach Zentrifugation für 10 min bei 14.000 rpm wird das Pellet mit 300 μ l 70 % EtOH gewaschen und anschließend mittels SpeedVac getrocknet. Der Ansatz wird in 10 μ l MilliQ-Wasser aufgenommen und in CaCl₂-kompetente Bakterienzellen transformiert. Nach Inkubation bei 37 °C wird je eine Hälfte der Transformationssuspension auf die entsprechenden Selektionsplatten (YT/amp bzw. YT/cam) ausgebracht.

2.5.6 Durchführung des Hefe-Zwei-Hybrid-Assays

Durch die Protein-Protein-Wechselwirkung im verwendeten Hefe-Zwei-Hybrid-Assays entsteht β -Galactosidase, deren Aktivität über die Umsetzung verschiedener Substrate nachgewiesen werden kann. In dieser Arbeit wurden CPRG, das zu dem roten Chlorophenolrot umgesetzt wird, ONPG, welches ein gelbliches Produkt bildet, und Galacton Star, ein Chemilumineszenz-Substrat verwendet. Die Vor- und Nachteile der verschiedenen Substrate sind in Tabelle 2.5-1 aufgeführt.

Die Etablierung des Testsystems wird ausführlich im Ergebnisteil 3.1 beschrieben, daher wird hier nur kurz das resultierende Protokoll aufgeführt.

Substrat	Eigenschaften
CPRG	<ul style="list-style-type: none"> • preiswerter als Galacton, teurer als ONPG • 10-fach sensitiver als ONPG • aufgrund der schnellen Reaktionsrate evt. für stark positive Kolonien schlechter reproduzierbar
ONPG	<ul style="list-style-type: none"> • preiswerter als CPRG und Galacton • evt. nicht sensitiv genug, um schwache Interaktionen zu quantifizieren
Galacton Star	<ul style="list-style-type: none"> • relativ teuer • sensitivstes β-Galactosidase-Substrat, kann jedoch zu hoher Backgroundstrahlung führen • erfordert Luminometer oder Scintillationszähler

Tab. 2.5-1: Vor- und Nachteile der verwendeten β -Galactosidase-Substrate

Zunächst werden 5 ml SC-Medium mit den gewünschten Hefestämmen angeimpft und o/n bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Die Hefesuspensionen werden am nächsten Tag auf die gleiche Zelldichte mit SC-Medium verdünnt (ca. 1:4 - 1:11), sodass die OD₆₃₀ von 140 μ l am Elisa-Reader zwischen 0,12 und 0,14 liegt bzw. am Photometers von 1 ml eine OD₆₀₀ von ca. 0,5 gemessen wird. Pro Vertiefung werden 140 μ l der eingestellten Suspensionen in eine 96-

2. Material und Methoden

well-Microtiterplatte vorgelegt und entsprechend des Versuchsplanes 10-20 µl Probe bzw. Lösungsmittel dazupipettiert. Zum Mischen der Lösungen wird die Platte kurz gevortext (Vortex-Genie Stufe 1-2 Vortex) und dann bei 30 °C und 200rpm o/n inkubiert. Um gefärbte Verbindungen zu entfernen, werden die Zellen zweimal nach folgendem Ablauf gewaschen: Zentrifugation bei 2.000 rpm für 5 min bei RT, Abziehen des Überstandes mit einer Mehrkanalpipette, Zugabe von 150 µl Z-Puffer, Resuspendieren der Zellen durch Vortexen der Platte und Messung der OD₆₃₀ am Elisa-Reader (Bezeichnung der Werte: „1. Waschen“ bzw. „2. Waschen“). Nach einer dritten Zentrifugation werden die Zellen ohne Überstand bei -80 °C für 15 min eingefroren. Nach Auftauen bei RT resuspendiert man sie mit 90 µl Z-Puffer und vermisst die Platte erneut am Elisa-Reader (Bezeichnung: „90 µl“). Die Zellen werden durch Zugabe von 4 µl 1 % SDS und 6 µl Chloroform lysiert und inkubieren nach kurzem Mischen erneut für 10 min bei 30 °C. Zum eigentlichen Start des Assays werden zum Zeitpunkt t_0 pro well 100 µl CPRG-Lösung bzw. 20 µl ONPG-Lösung (4 mg/ml) zugesetzt. Nach Inkubation bei 30 °C bis zur Rot-Orange- (CPRG) bzw. Gelbfärbung (ONPG) wird die Platte erneut zentrifugiert und 100 µl Überstand in eine neue Microtiterplatte überführt. Die Messung zur Endzeit t_1 erfolgt am Elisa-Reader bei 550 nm (CPRG) bzw. 405 nm (ONPG) gegen eine Referenzwellenlänge von 630nm (Bezeichnung: „CPRG“ bzw. „ONPG“).

Die β -Galactosidase-Aktivität wurde in Anlehnung an die Berechnung nach Miller (Miller, J.H., 1972) nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Units} = \frac{\text{OD}_{550/630} \text{ „CPRG“} \cdot 1000}{\text{OD}_{630} \text{ „90 } \mu\text{l“} \cdot t \cdot V}$$

mit t = Inkubationszeit in Minuten bis zur Messung (= t_0 - t_1), V = Ansatzvolumen des Assays in Millilitern, „90 µl“ = Messung der OD₆₃₀ nach Resuspension der Zellen in 90 µl Z-Puffer, „CPRG“ = Messung der OD_{550/630} nach Inkubation mit CPRG bzw. ONPG.

Die Quantifizierung der Enzymaktivität erfolgte durch Bezug auf die Zelldichte, die durch die OD₆₃₀-Messung der Zellen in 90µl Z-Puffer („90µl“) ermittelt wurde. Diese Messung wurde ebenfalls zur Beurteilung der Cytotoxizität der Proben verwendet. Die Bestimmung der OD₆₃₀ nach dem ersten und zweiten Waschen dienen der internen Kontrolle des Pipettierens und gingen nicht in die eigentliche Aktivitätsberechnung ein.

Zum besseren Vergleich der Versuche an verschiedenen Tagen wird jeweils nur die bezogen auf die Änderung mit reinem Lösungsmittels angegeben. Diese Änderung berechnet sich für die Enzymaktivität, bezeichnet als „relative Änderung der β -Gal-Aktivität“, und für das Wachstum, bezeichnet als „relative Änderung des Wachstums“, folgendermaßen:

$$\text{relative Änderung der } \beta\text{-Gal-Aktivität} = \frac{\beta\text{-Galactosidase-Aktivität}_{\text{Probe}}}{\beta\text{-Galactosidase-Aktivität}_{\text{Lösungsmittel}}}$$

$$\text{relative Änderung des Wachstum} = \frac{\text{OD}_{630} \text{ „90 } \mu\text{l“}_{\text{Probe}}}{\text{OD}_{630} \text{ „90 } \mu\text{l“}_{\text{Lösungsmittel}}}$$

Zur Erleichterung der Auswertung der einzelnen Platten wurde ein Excel-Programm geschrieben, sodass die entsprechenden Daten vom Elisa-Reader sowie die genaue Inkubationszeit nur noch in die entsprechende Arbeitsmappe eingegeben und direkt die erhaltenen Werte graphisch aufbereitet ausgegeben wurden.

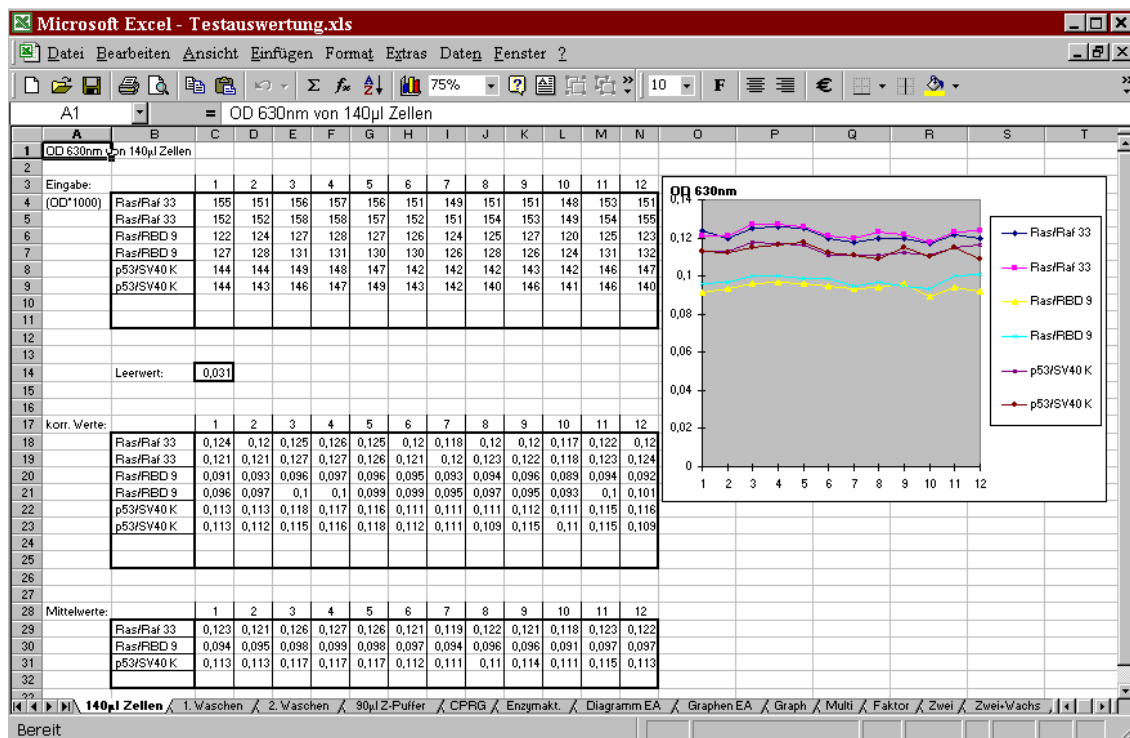


Abb. 2.5-1: Darstellung der ersten Seite der verwendeten Excel-Arbeitsmappe

Die Messungen am Elisa-Reader werden auf den zugehörigen Seiten („140 µl Zellen“, „1. Waschen“, „2. Waschen“, „90 µl Z-Puffer“, „CPRG“) als ganze Zahlen eingegeben; das Programm rechnet die Werte nach Abzug des Leerwertes in die korrekten Werte um. Auf der Seite „Enzymaktivität“ wird die Inkubationsdauer in Minuten, sowie das Testvolumen in µl eingegeben. Je nach Einstellung berechnet das Programm die Graphen automatisch bzw. nach Aufforderung durch Drücken der Taste „F9“.

2.6 Arbeiten mit Säugerzellen

2.6.1 Zellkulturbedingungen

Die Suspensionszelllinie HL60 wird RPMI-Medium unter Zusatz von 10 % foetalem Kälberserum (FCS) und 2 % Penicillin/Streptomycin (5000 U/ml) inkubiert. HeLa-Zellen werden in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM, 1 g/l Glucose) mit 10 % FCS und 2 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Das Medium McCoy5a wird unter Zusatz von 10 % FCS, 2 % Penicillin/Streptomycin und 2 mM Glutamax für die adhärenenten T24-Zellen verwendet.

Alle verwendeten Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und in der Regel zweimal pro Woche passagiert. Die adhärenenten Zellen HeLa und T24 wurden dabei vorher einmal mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA von der Petrischale abgelöst. Alle drei Zelllinien wurden bei 600-800 rpm für 4 min pelletiert und in einer Verdünnung von ca. 1:10 wieder ausgesät.

2.6.2 Bestimmung der Zelldichte

Zur Bestimmung der Zelldichte werden gleiche Volumina Zellsuspension und Trypanblau-Lösung gemischt und 20 µl in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellzahl ergibt sich aus folgender Formel: Zellzahl = „Anzahl“ x 2 x 10⁴ [Zellen/ml]

2.6.3 Anlegen von DMSO-Stocks

Ca. 2-4 x 10⁶ Säugerzellen werden bei 800 rpm für 4 min abzentrifugiert und das Pellet in 900 µl Medium resuspendiert. Nach Überführung in ein vorgekühltes Kryoröhrchen werden 100 µl DMSO zugegeben, die Lösungen gut gemischt und zügig in Stickstoffdampf eingefroren. Am nächsten Tag kann die dauerhafte Lagerung durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff erfolgen.

2.6.4 Rekultivierung von DMSO-Stocks

Die Zellsuspension im Kryoröhrchen wird vorsichtig in einem 37 °C-Wasserbad angetaut und schnell mit 1 ml vorgewärmten Medium in ein Falcon Tube, in dem sich bereits 5 ml Medium zur Verringerung der DMSO-Konzentration befinden, überführt. Die Zellen werden bei 600-800 rpm für 4 min pelletiert und anschließend in frischem Medium ausgesät.

2.6.5 MTT-Assay von Säugerzellen

Lösungen	Zusammensetzung
MTT-Reagenzlösung	25 mg MTT 10 ml PBS, pH7,4
Isoprop/HCl	Isopropanol mit 0,04 M HCl

Der MTT-Test ermöglicht die kolorimetrische Bestimmung der Zellzahl über eine Messung der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen, die den wasserlöslichen gelben Farbstoff MTT zu einem wasserunlöslichen blauen Formazan umsetzen. Da die Aktivität dieser Enzyme von dem physiologischen Status der Zellen abhängt, kann zudem eine Aussage über die Zellvitalität getroffen werden (Mosmann, T., 1983; Vistica, D.T. et al., 1991).

Für den eigentlichen MTT-Test in 96-well-Platten werden die PBS-gewaschenen Säugerzellen mit 100 µl frischem Medium, das je nach Versuchsaufbau mit einer Testsubstanz versetzt wurde, für die gewünschte Zeitdauer inkubiert. Anschließend gibt man das gleiche Volumen an frischem Medium, sowie 50 µl MTT-Reagenzlösung in das Vertiefung hinzu. Nach Inkubation für 2 h bei 37 °C wird das Medium abgezogen und die Zellen mit 100 µl Isoprop/HCl lysiert. Nachdem sich die gebildeten Formazankristalle aufgelöst haben, erfolgt die Messung am ELISA-Reader bei 550 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm.

2.6.6 Durchführung des Säugerzellassays für Western Blots

Lösungen	Zusammensetzung
Lysispuffer	20 mM Tris (mit HCl auf pH 8,0) 2 mM EDTA 5 % SDS 10 % 2-Mercaptoethanol

Nach Waschung der Zellen mit PBS wird die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen werden mit 1 x PBS, 0,1 % Glucose auf eine Zelldichte von 4-6 x 10⁷/ml bei HL60, bzw. auf 0,6-1 x 10⁷/ml bei T24 und HeLa eingestellt. Pro Testansatz werden bei 37 °C im Wasserbad 2,5 µl 1 M CaCl₂ mit 47 µl 1 x PBS, 0,1 % Glucose gemischt und 50 µl der entsprechenden Zellsuspension, das entspricht 2-3 x 10⁶ HL60-Zellen bzw. 3-5 x 10⁵ adhärenente Zellen, dazupipettiert. Je nach Versuchsgestaltung werden die Ansätze für die gewünschte Inkubationsdauer (0,5-30 min) mit 0,5 µl Testsubstanz bzw. Lösungsmittel

versetzt und kurz gevortext. Die Zugabe von 100 µl Lysispuffer beendet die Reaktion und die Ansätze werden bis zum weiteren Arbeiten auf Eis gehalten. Nach 5-minütigem Kochen im Wasserbad und anschließender Homogenisierung mittels Ultraschall erfolgt die Lagerung bei -20 °C bis zur späteren Verwendung für SDS-PAGE und Western Blot (s. Kap. 2.3.1, 2.3.3).

2.7 Chromatographische Methoden

2.7.1 Dünnschichtchromatographie

Zur analytischen Dünnschichtchromatographie diente als stationäre Phase RP-18-Alufolien mit Fluoreszenzmarker (254 nm) und einer Schichtdicke von 0,2 mm.

Zur präparativen Dünnschichtchromatographie wurden RP-18- sowie Kieselgel-60-Fertigplatten mit Fluoreszenzmarker (254 nm), Schichtdicke 0,25 mm, 20x20 cm als stationäre Phase verwendet. Die zu untersuchenden Extrakte bzw. Fraktionen werden bandenförmig aufgetragen; als Laufmittel dienen meist Methanol/Wasser-Gemische (30-70 % MeOH). Nach der Chromatographie wird das Kieselgel von verschiedenen Banden mit einem Spatel abgekratzt und mit Methanol extrahiert. Durch Abnutschen der Lösungen durch eine Fritte wird das Kieselgel abgetrennt. Die erhaltenen Lösungen werden anschließend am Rotationsverdampfer einrotiert und der Rückstand in Wasser bzw. 70 % Ethanol aufgenommen.

2.7.2 Niederdruck-Flüssigchromatographie

Zur Auftrennung von Arnika-Tinktur bzw. -Extrakt wurden Niederdruck-Flüssigchromatographien an einer RP-18-Fertigsäule durchgeführt. Als Lösungsmittel dient 20 % Methanol, das vorher mittels Ultraschall entgast wurde. Die Säule wird mindestens zwei Stunden bei einem Druck von max. 5 bar vorkonditioniert, bevor 2-3 ml Probe aufgebracht werden. Nach weiteren zwei Stunden werden alle 5-10 min die Fraktionen im Reagenzglas gesammelt und abhängig vom Volumen mittels Rotationsverdampfer oder SpeedVac bis zur Trockne einrotiert. Die Fraktionen werden entweder in 200 µl 70 % Ethanol gelöst und vor der Testung mit weiteren 200 µl Wasser verdünnt oder direkt in 400 µl Wasser aufgenommen. Die Reinigung der Säule erfolgt mit reinem Methanol als Fließmittel über mehrere Stunden.

3. Ergebnisse

3.1 Aufbau des Zwei-Hybrid-Systems

Um ein Screening von Effektoren der Ras/Raf-Wechselwirkung zu ermöglichen, sollte mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems ein einfaches, schnelles und quantifizierbares Testsystem aufgebaut werden. Sowohl Block et al. (Block, C. et al., 1996) als auch Jaitner et al. (Jaitner, B.K. et al., 1997) konnten bereits zeigen, dass die quantitativ messbare β -Galactosidase-Aktivität durch Wechselwirkung von zwei Proteinen die *in vitro* bestimmten Affinitäten dieser Proteine widerspiegeln. Jedoch ist keine direkte Korrelation zwischen der β -Galactosidase-Aktivität und den K_d -Werten einer Protein-Protein-Interaktion möglich, sondern nur der relative Vergleich der Interaktionsstärke (Estojak, J. et al., 1995). Eine Beeinflussung der β -Galactosidase-Aktivität durch eine bestimmte Substanz sollte somit auf eine Änderung der Interaktionsstärke der Proteine hindeuten. Da jedoch trotz mitgeführter Kontrollen nicht mit Gewissheit davon ausgegangen werden kann, dass jede Änderung der β -Galactosidase-Aktivität durch eine Beeinflussung der Ras/Raf-Wechselwirkung zustande kommt, wird bei der Beschreibung der Effekte nur die Beeinflussung der Enzymaktivität (Steigerung bzw. Hemmung) angegeben.

3.1.1 Test- und Kontrollstämme

Zum Aufbau des Testsystems wurden zuerst Expressionskonstrukte, die freundlicherweise vom AK Wittinghofer, MPI für Biophysik, Dortmund zur Verfügung gestellt wurden, verwendet. Hierbei handelt es sich um die Vektoren pPC97HrasG12Vverk, pPC86ssHCRC2Raf und pPC86ssHCRC2Raf (s. 2.1.6). Die zwei Hefestämme, die mit den entsprechenden Konstrukten doppeltransformiert wurden (Tab. 3.1-1), stellten die ersten Teststämme für das Zwei-Hybrid-System dar.

Als Kontrollstamm K dienten Hefen, die mit den Stratagene-Plasmiden p53 und pSV40 transformiert wurden (Tab. 3.1-1). Diese Transformanden exprimieren nicht Ras und Raf als Fusionsproteine mit den Gal4-Domänen, sondern das Tumorsuppressorprotein p53 und das große T-Antigen des Simian Virus 40 (SV40). Ein Effekt auf die Ras/Raf-Wechselwirkung galt dann als spezifisch, wenn sich nach Inkubation mit einer Testsubstanz nur die β -Galactosidase-Aktivität des Teststammes änderte, nicht aber des Kontrollstammes. Zeigte sich auch eine Änderung der Enzymaktivität bei dem Kontrollstamm, war von einer

3. Ergebnisse

unspezifischen Wechselwirkung der Substanz z. B. an der Polymerase oder an Translationsfaktoren auszugehen.

Hefen	Plasmid mit Gal4-BD	Plasmid mit Gal4-AD	Exprimiertes Proteinpaar (AS)
Teststamm 3.3 „Ras/Raf 3.3“	pPC97HrasG12Vverk	pPC86ssHCRC2Raf	BD-RasG12V (1-166) AD-Raf (1-275)
Teststamm 9 „Ras/RBD 9“	pPC97HrasG12Vverk	pPC86ssHCRC2Raf	BD-RasG12V (1-166) AD-Raf RBD (51-131)
Kontrollst. K „p53/SV40 K“	p53	pSV40	BD-p53 (72-390) AD-SV40 (84-708)

Tab. 3.1-1: Erste Teststämme für das Zwei-Hybrid-System

Aufgeführt sind die Hefebezeichnungen nach Transformation mit den angegebenen Plasmiden sowie das exprimierte Proteinpaar.

Beide Teststämme exprimieren die verkürzte, konstitutiv aktive Mutante RasG12V in Fusion mit der DNA-bindenden Domäne (BD) von Gal4. Ras ist in der verwendeten Form am C-Terminus um den Bereich des Farnesylierungsmotiv CAAX verkürzt, der normalerweise für die Membranlokalisierung von Ras notwendig und verantwortlich ist (Choy, E. et al., 1999). Für das Zwei-Hybrid-System wäre dieser Bereich jedoch hinderlich, da das Fusionsprotein im Kern und nicht in der Zellmembran lokalisiert sein muss. Die beiden Teststämme „Ras/Raf 3.3“ und „Ras/RBD 9“ unterscheiden sich in der Länge des exprimierten Raf-Proteins, welches mit der transaktivierenden Domäne (AD) fusioniert ist: Beim Teststamm „Ras/Raf 3.3“ wird die vollständige regulatorische Domäne von Raf exprimiert (AS 1-275), hingegen beim Teststamm „Ras/RBD 9“ nur die Ras-bindende Domäne von Raf (AS 51-131).

Um die korrekte Transformation der Stämme zu bestätigen, wurden die eingebrachten Plasmide wieder aus den Hefen isoliert (s. Kap. 2.5.5), nach CaCl₂-Transformation in Bakterien vermehrt und mittels Restriktionsanalyse mit *EcoRI/SacI* bei den pPC-Vektoren und *HindIII* bei den Kontrollplasmiden überprüft. Da die pPC-Vektoren im Gegensatz zu den Stratagene-Vektoren auf beiden Plasmiden den gleichen Selektionsmarker für Bakterien (Amp^r) besitzen, mussten hierbei bis zur Bestätigung mehrere Klone untersucht werden. Als weitere Kontrolle wurden die exprimierten Fusionsproteine in Western Blots mit Antikörpern gegen die entsprechenden Gal4-Domänen nachgewiesen. Leider konnte mit dem Antikörper

gegen die DNA-bindende Domäne bei den Stämmen 9 und K nur eine sehr schwache Bande erhalten werden (s. Abb. 3.1-1A). Das Fusionsprotein BD-RasG12V1-166 ist bei den beiden Teststämmen gleich groß (36 kDa), die Größe des Kontrollproteins BD-p53 beträgt 52,1 kDa. Mit dem Antikörper gegen die transaktivierende Domäne wurde bei den Teststämmen 3.3 und 9 eine relativ starke Expression der AD-Raf-Fusionsproteine nachgewiesen, wohingegen das 84 kDa große Protein AD-SV40 beim Kontrollstamm K nur ganz schwach exprimiert wird (s. Abb. 3.1-1B/C). Die Größe des AD-Raf-Proteins liegt im Teststamm 3.3 bei 46,9 kDa, beim Stamm 9 bei 26 kDa.

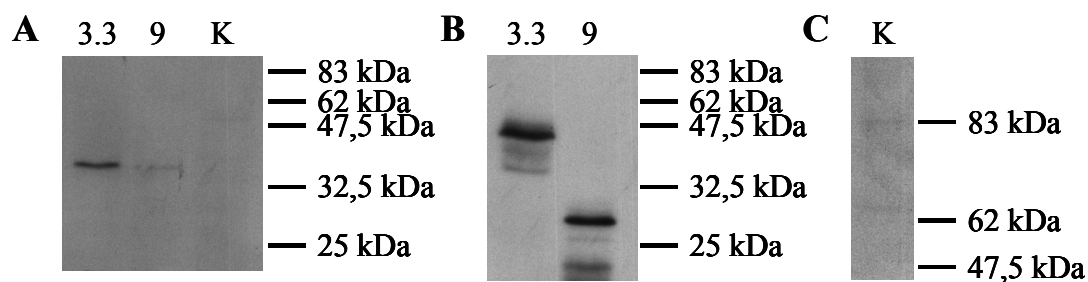


Abb. 3.1-1: Western Blot Analyse der Test- und Kontrollstämmen

Aufgetragen sind jeweils ungefähr gleiche Proteinmengen (s. Kap. 2.3.1 und 2.5.4). Der erste Antikörper wurde entsprechend dem Stratagene-Protokoll eingesetzt, der zweite Antikörper (anti-Maus-IgG-POD) in einer Verdünnung 1:10.000 (s. Kap. 2.3.3).

A: 15 %-iges Gel; 1. Antikörper: anti-Gal4-BD (Stratagene); Entwicklung des Filmes nach 3h

B: 15 %-iges Gel; 1. Antikörper: anti-Gal4-AD (Stratagene); Entwicklung des Filmes nach 3h

C: 10 %-iges Gel; 1. Antikörper: anti-Gal4-AD (Stratagene); Entwicklung des Filmes nach 4h

3.1.2 Optimierung der Methode in Microtiterplatten

Bereits Dr. B. Jaitner hatte den β -Galactosidase-Aktivitätstest mit flüssigen Hefekulturen nach Miller zu einer quantitativen Bestimmung der Zwei-Hybrid-Wechselwirkung abgewandelt. (Miller, J.H., 1972; Jaitner, B., 1997). Dieser modifizierte β -Galactosidase-Test erfolgte jedoch im Reagenzglas und ist somit für ein schnelles, paralleles Screening von vielen Substanzen nicht geeignet. Zu Beginn dieser Arbeit sollte daher ein Protokoll zur Durchführung eines quantifizierbaren Tests in Microtiterplatten etabliert werden. Als β -Galactosidase-Substrate dienten einerseits CPRG, das zu dem roten Chlorphenolrot umgesetzt wird, ONPG, welches ein gelbliches Produkt bildet, und Galacton Star, ein Chemilumineszenz-Substrat.

3.1.2.1 Quantifizierung des β -Galactosidase-Assays

Als Bezugsgröße zur Quantifizierung der Enzymaktivität in Microtiterplatten standen zunächst zwei Alternativen zur Auswahl: die Proteinmenge oder die Zelldichte pro well. Beide Ansätze wurden zu Beginn dieser Arbeit verfolgt. Relativ schnell zeigte sich jedoch, dass die Messung der Zelldichte der Bestimmung der Proteinmenge in Bezug auf Reproduzierbarkeit, Schnelligkeit und Einfachheit der Durchführung überlegen war. Außerdem lieferte diese Messung noch zusätzliche Daten über eine eventuelle Cytotoxizität der untersuchten Probe, da ein direkter Vergleich zwischen Lösungsmiteleinfluss und Probeneinfluss auf das Wachstum der Zellen möglich war. Die Zelldichte wurde dabei über die optische Dichte nach Resuspendieren des eingefrorenen Zellpellets in 90 μ l Z-Puffer bei einer Wellenlänge von 630nm bestimmt: OD₆₃₀ „90 μ l“.

3.1.2.2 Zellaufschluss der Hefen

Für aussagekräftige und reproduzierbare Werte der Enzymaktivität ist ein möglichst kompletter Aufschluss der Hefezellen nötig. Da Hefen aufgrund ihrer Zellmembran schlecht lysierbar sind, wurden zunächst verschiedene Lyse-Methoden ausprobiert. Da eine enzymatische Lyse der Hefen für ein Hochdurchsatzscreening zu teuer und eine mechanische Lyse mit Glassbeads in Microtiterplatten nicht möglich ist, wurde auf verschiedene chemische und physikalische Methoden zurückgegriffen. Das Einfrieren und Wiederauftauen der Hefen wurde dabei als eine schnelle und effektive Zellaufschlussmethode, die eine akkurate Quantifizierung der β -Galactosidase-Aktivität ermöglicht, schon beschrieben (Schneider, S. et al., 1996).

Für einen Vergleich dieser Methoden wurden Pellets gleicher Zelldichte jeweils für 15 min bei -80°C in einer Microtiterplatte eingefroren und anschließend in 90 μ l Z-Puffer resuspendiert. Je nach Ansatz A-J erfolgte eine Inkubation mit 10 μ l verschiedener Reagenzien in einem Endvolumen von 100 μ l für mindestens 10 min bei 30°C . Nach kurzem Vortexen wurden 100 μ l CPRG-Lösung hinzugefügt und 2 h später das gebildete Produkte photometrisch bestimmt. Als Ergebnis wurde die relative Änderung der OD_{550/630} bezogen auf Ansatz A berechnet, d.h. einem Zellaufschluss nur durch Einfrieren bei -80°C . Die verschiedenen Ansätze und Ergebnisse sind in Tab. 3.1-2 dargestellt.

Wie zu erkennen, wurden die besten Ergebnisse durch Zusatz von 4 μ l 0,1 % SDS und 6 μ l Chloroform zu 90 μ l Zellsuspension erhalten, daher wurde diese Kombination für alle folgenden Versuche übernommen.

Ansatz	SDS [0,1 %]	Chloro- form	Triton X-100 [0,1 %]	Sarcosyl- laureat [0,2 %]	Z-Puffer	Relative Änderung
A	---	---	---	---	10µl	1
B	2µl	---	---	---	8µl	1,7
C	4µl	---	---	---	6µl	2
D	8µl	---	---	---	2µl	3
E	---	3µl	---	---	7µl	2,4
F	---	6µl	---	---	4µl	2,3
G	2µl	3µl	---	---	5µl	4,1
H	4µl	6µl	---	---	---	5,4
I	---	---	10µl	---	---	3,5
J	---	---	---	10µl	---	5

Tab. 3.1-2: Übersicht und Ergebnisse der verschiedenen Zellaufschlussarten

Nach Einfrieren und Resuspendieren der Zellen in 90 µl Z-Puffer wurden auf ein Endvolumen von 100 µl je nach Ansatz verschiedene Lösungen zur Lyse hinzugefügt. 2 h nach CPRG-Zugabe wurde das gebildete Chlorophenolrot photometrisch bei OD_{550/630} vermessen. Die relative Änderung der Chlorophenolrot-Menge wurde berechnet als OD „Testansatz“ / OD „Ansatz A“ (=Lyse nur durch Einfrieren der Zellen).

3.1.2.3 Einfluss der Ausgangszelldichte

Testsubstanzen, die im Zwei-Hybrid-System an der Ras/Raf-Interaktion wirken sollen, müssen zunächst in die Zelle und in den Zellkern gelangen, weshalb die Substanzen mit den Hefesuspensionen inkubiert werden. Für eine Inkubation über Nacht in der Microtiterplatte musste daher zunächst die optimale Ausgangszelldichte ermittelt werden. Dazu wurden die Hefen auf eine Zelldichte von $7,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt und verschiedene Verdünnungen dieser Stammsuspension in Microtiterplatten ausgesät. Über Nacht schüttelten die Platten bei 30 °C, die Zelldichte wurde am nächsten Tag nach Einfrieren und Resuspendieren in 90 µl Z-Puffer bestimmt (OD „90 µl“). Die Lyse erfolgte nach Kap. 3.1.2.2 mit SDS/Chloroform. Nach einer zweistündigen Inkubation mit CPRG-Lösung wurde das entstandene Chlorophenolrot photometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm gegen 630 nm bestimmt: OD „CPRG“ = OD_{550/630}. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.1-2 dargestellt.

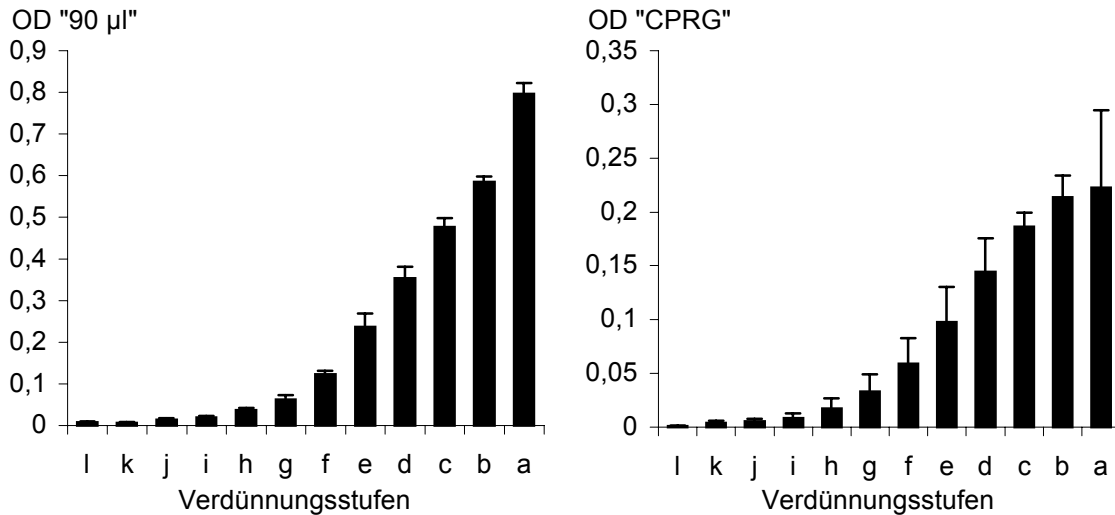


Abb. 3.1-2: Einfluss der Ausgangszellichte im Zwei-Hybrid-System

Ungefähr gleiche Zellzahlen (ca. $7,5 \times 10^6$ Z/ml) von zwei verschiedenen Hefestämmen wurden in einer 96-well-Microtiterplatte ausgesät. Die Verdünnungsstufen wurden jeweils von den vorausgehenden Zellsuspensionen in folgenden Verhältnissen hergestellt: a=Orig., b=1:3 von Orig., c=1:1 von b, d=1:1 von c, usw. In Bezug auf die Ausgangssuspension ergaben sich daher folgende Verdünnungen: a=Orig., b=1:4, c=1:8, d=1:16, e=1:32, f=1:64, g=1:128, h=1:256, i=1:512, j=1:1028, k=1:2056, l=1:4112. Die erhaltenen OD-Werte bei 630nm (OD „90 µl“) bzw. bei 550/630nm (OD „CPRG“) der zwei Hefestämme wurden gemittelt.

Wie zu erwarten, führte die konzentrierteste Zellsuspension a sowohl zur höchsten OD bei der Messung in 90 µl Z-Puffer, als auch bei der CPRG-Messung. Im Gegensatz zu einer 1:3-Verdünnung der eingestellten Zellsuspension (Ansatz b) zeigte sie aber ein schlechteres Verhältnis von Zellzahl zu gemessener Chlorophenolrot-Menge. Dies kann z. B. an einer zu geringen Menge der Aufschlussmittel liegen, wodurch aufgrund der hohen Zelldichte nicht alle Zellen adäquat aufgeschlossen wurden. Bei der Aussaat der Zellen konnte außerdem nur bei den Suspensionen a und b eine OD_{630} oberhalb des Hintergrundes am Elisa-Reader gemessen werden. Als Standardprotokoll für die folgenden Versuche wurde daher eine ungefähre Zelldichte von 6×10^6 Zellen/ml eingestellt, was bei 140 µl Zellsuspension einer OD_{630} von 0,12-0,14 gemessen am Elisa-Reader bzw. bei 1 ml Zellsuspension am Photometer einer OD_{600} von 0,5 entspricht.

3.1.3 β-Galactosidase-Assay und Berechnung der Enzymaktivität

Die Durchführung eines Zwei-Hybrid-Screenings erfolgte unter Berücksichtigung der obigen Punkte nach folgendem Protokoll:

1. Tag:
- 5 ml SC-Medium^{-Leu-Trp-His} werden mit den Hefestämmen angeimpft
 - Inkubation der Kolben über Nacht bei 30 °C und 200 rpm

-
2. Tag:
- Einstellung der Hefestämme auf die gleiche Zelldichte, sodass sich folgende ODs ergeben: am Elisa-Reader: OD₆₃₀ von 140 µl Suspension ≈ 0,12-0,14, am Photometer: OD₆₀₀ von 1 ml Zellsuspension ≈ 0,5.
 - zu 140 µl Hefesuspension werden pro Vertiefung 10-20 µl Proben bzw. Lösungsmittel pipettiert und die Platte auf der Stufe „Vortex 1-2“ kurz geschüttelt
 - Inkubation der Platte über Nacht bei 30 °C und 200 rpm
3. Tag:
- die Platte wird zweimal nach folgendem Schema gewaschen:
 - Zentrifugation der Platte bei 2.000 rpm für 5 min
 - Abziehen des Überstandes mit einer Mehrkanalpipette (150-160 µl)
 - Zugabe von 150 µl Z-Puffer in jede Vertiefung
 - Resuspendieren der Zellen durch Vortexen
 - Messung der OD₆₃₀ am Elisa-Reader: Bezeichnung des Ausdrucks als „1. Waschen“ bzw. „2. Waschen“
 - Zentrifugation der Platte bei 2.000 rpm für 5 min
 - Abziehen des Überstandes mit der Mehrkanalpipette (150 µl)
 - Einfrieren der Platte bei -80 °C für 15 min, anschließend Auftauen bei RT
 - Resuspendieren der Zellen mit 90 µl Z-Puffer pro well durch Vortexen
 - Messung der OD₆₃₀ am Elisa-Reader: Bezeichnung des Ausdrucks: „90 µl“
 - Zelllyse durch Zusatz von 4 µl 0,1 % SDS und 6 µl Chloroform
 - Inkubation der Sphäroblasten nach kurzem Mischen für 10 min bei 30 °C
 - Zugabe von 100 µl CPRG-Lösung oder 20 µl ONPG-Lösung (4 mg/ml), Startzeit des Assay nehmen (t₀)
 - Inkubation nach kurzem Mischen für ca. 2h bei 30 °C bis zur Rot-Orange- (CPRG) bzw. Gelbfärbung (ONPG); Abstoppen der ONPG-Reaktion durch Zugabe von 50 µl 1 M Na₂CO₃
 - Zentrifugation der Platte bei 2.000 rpm für 5 min
 - Überführung von 100 µl Überstand in eine neue Microtiterplatte
 - Messung der OD_{550/630} der neuen Platte am Elisa-Reader (t₁)

3. Ergebnisse

Die β -Galactosidase-Aktivität wird in Anlehnung an die Berechnung nach Miller (Miller, J.H., 1972) nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Units} = \frac{\text{OD}_{550/630} \text{ „CPRG“} \cdot 1000}{\text{OD}_{630} \text{ „90 } \mu\text{l“} \cdot t \cdot V}$$

mit t = Inkubationszeit in Minuten bis zur Messung (= $t_1 - t_0$), V = Ansatzvolumen des Assays in Millilitern, $\text{OD}_{630} \text{ „90 } \mu\text{l“}$ = Messung der OD_{630} nach Resuspension des Zellpellets in 90 μl Z-Puffer, $\text{OD}_{550/630} \text{ „CPRG“}$ = Messung der $\text{OD}_{550/630}$ von 100 μl Überstand nach Inkubation mit CPRG.

Die Enzymaktivität wird durch Bezug auf die Zelldichte quantifiziert, die durch die OD_{630} -Messung der Zellen in 90 μl Z-Puffer („90 μl^{c} “) ermittelt wird. Diese Messung wird ebenfalls zur Beurteilung der Cytotoxizität der Proben verwendet. Die Bestimmung der OD_{630} nach dem ersten und zweiten Waschen dienen der internen Kontrolle des Pipettierens und gehen nicht in die eigentliche Aktivitätsberechnung ein.

Zum besseren Vergleich der Versuche an verschiedenen Tagen wird jeweils nur die relative Änderung der Enzymaktivität bzw. des Wachstums durch die Probe bezogen auf die Änderung mit reinem Lösungsmittels angegeben. Diese Änderung berechnet sich für die Enzymaktivität, bezeichnet als „relative Änderung der β -Gal-Aktivität“, und für das Wachstum, bezeichnet als „relative Änderung des Wachstums“, folgendermaßen:

$$\text{relative Änderung der } \beta\text{-Gal-Aktivität} = \frac{\beta\text{-Galactosidase-Aktivität}_{\text{Probe}}}{\beta\text{-Galactosidase-Aktivität}_{\text{Lösungsmittel}}}$$

$$\text{relative Änderung des Wachstum} = \frac{\text{OD}_{630} \text{ „90 } \mu\text{l“}_{\text{Probe}}}{\text{OD}_{630} \text{ „90 } \mu\text{l“}_{\text{Lösungsmittel}}}$$

Zur Erleichterung der Auswertung der einzelnen Platten wurde ein Excel-Programm geschrieben, sodass die entsprechenden Daten vom Elisa-Reader sowie die genaue Inkubationszeit nur noch in die entsprechende Arbeitsmappe eingegeben und direkt die erhaltenen Werte graphisch aufbereitet ausgegeben wurden (s. Abb. 2.5-1).

3.2 Screening-Ergebnisse von pflanzlichen Inhaltsstoffen und Extrakten

In dieser Arbeit wurden insgesamt 469 Proben in verschiedenen Konzentrationen im Zwei-Hybrid-System getestet. Davon waren 95 pflanzliche Extrakte, 98 Naturstoffe und 276 chemisch synthetisierte Substanzen. Die meisten Proben zeigten keinen spezifischen Effekt auf die Ras/Raf-Interaktion und sind am Ende des Ergebnisteils in Kapitel 3.7 tabellarisch aufgeführt. Im folgendem wird nur auf die Proben genauer eingegangen, die konzentrationsabhängig und spezifisch zu einer Änderung der β -Galactosidase-Aktivität geführt haben.

3.2.1 Arnika-Extrakt und -Tinktur

Vorarbeiten von Sabine Richter gaben bereits Hinweise auf eine Verstärkung der Ras/Raf-Wechselwirkung durch wässrige Extrakte der Arzneibuchdroge *Arnicae flos* bzw. Arnika-Tinktur. Diese Ergebnisse konnten unter Verwendung der neu aufgestellten Methode in Microtiterplatten bestätigt werden (s. Abb 3.2-1). Da Arnika-Tinktur mit 70 % Ethanol für die Hefen cytotoxisch ist, wurde 1 ml bei 70° C am Heizblock eingedampft und der Rückstand in 1 ml Wasser aufgenommen. Arnika-Extrakt (2-10 mg/ml) und vorbehandelte Arnika-Tinktur wurden in verschiedenen Verdünnungen mit den beiden Teststämmen „Ras/Raf 3.3“ und „Ras/RBD 9“ und dem Kontrollstamm „p53/SV40 K“ inkubiert.

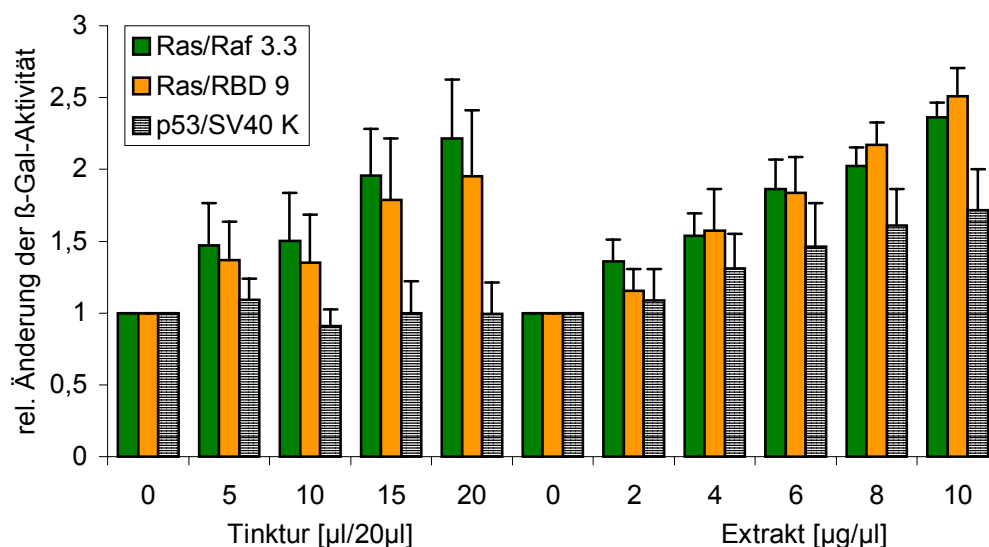


Abb. 3.2-1: Effekt von Arnika-Tinktur und -Extrakt

20 μ l der Verdünnungen der vorbereiteten Tinktur bzw. 10 μ l der Extrakt-Konzentrationsreihe (2-10 μ g/ μ l) wurden mit 140 μ l Hefesuspension inkubiert. Als Lösungsmittel diente Wasser.

Sowohl in der Tinktur als auch im Extrakt scheinen ein oder mehrere Stoffe vorhanden zu sein, die konzentrationsabhängig zu einer Steigerung der β -Galactosidase-Menge der Teststämme führen und somit die Interaktion zwischen den Fusionsproteinen BD-Ras und AD-Raf verstärkt haben. Auch die Enzymaktivität des Teststammes „Ras/RBD 9“, der nur die Ras-bindende Domäne von Raf in Fusion mit AD exprimiert, wird durch Substanzen aus Arnika gesteigert. Anscheinend sind in Arnika Inhaltsstoffe vorhanden, die nicht nur die Interaktion zwischen Ras und Raf verstärken, sondern denen auch das verkürzte Raf-Protein in Kombination mit Ras ausreicht, um den Effekt zu vermitteln. Die β -Galactosidase-Menge des Kontrollstamm wird ebenfalls, allerdings nicht so ausgeprägt wie die der Teststämme beeinflusst, was durch die Verwendung eines Gemisches aus inaktiven und aktiven, spezifischen und unspezifischen Substanzen zu erklären wäre. Das Wachstum der Zellen bleibt durch die Inkubation mit den Proben unverändert.

Um das verwendete Gemisch aufzureinigen und den aktiven Stoff zu isolieren, wurden verschiedene Verfahren verwendet. Flavonoide und Sesquiterpenlactone, extrahiert nach Merfort et al. (Merfort, I., 1984) bzw. Malarz et al. (Malarz, J. et al., 1992) aus *Arnica montana* und *Arnica chamissonis*, zeigten ebenso wie die präzipitierten Polysaccharide eines Wasserauszuges keinen spezifischen Effekt im Zwei-Hybrid-System. Die deglykosylierte Fraktion des Wasserauszuges führte jedoch spezifisch zu einer Aktivitätssteigerung der β -Galactosidase, die auch durch längeres Kochen der Fraktion vor dem Zwei-Hybrid-Test nicht vermindert wurde. Aufgrund von Dialyseversuchen muss das Molekulargewicht der aktiven Substanzen unterhalb von 1000 g/mol liegen.

Zur dünn-schichtchromatographischen Untersuchung (s. Kap. 2.7.1) wurden die gewonnenen Extrakte zuerst analytisch, dann präparativ auf DC-Platten aufgetragen. Verschiedene Kombinationen an mobiler und stationärer Phase wurden getestet, jedoch keinerlei mit der aktiven Fraktion korrelierende Fluoreszenz bzw. Fluoreszenz-Löschung auf den DC-Platten dabei beobachtet. Auf einer Kieselgel-60-Glasplatte mit einem Laufmittelgemisch aus 65 T Ethylacetat, 15 T Ameisensäure und 20 T Wasser zeigte die aktive Fraktion nur einen R_f -Wert von 0-0,15. Um eine bessere Auftrennung der polaren Substanzen zu erreichen, wurde daher für die folgenden Versuche eine unpolare stationäre Phase (RP-18-Platten) mit einem polaren Laufmittel verwendet. Mit 30 % Methanol als mobiler Phase fanden sich die aktiven Substanzen in der Fraktion $R_f = 0,64-1$, bei einem Gemisch aus 10 T Methanol, 10 T Acetonitril und 80 T Wasser steigerte die Fraktion mit $R_f = 0,89-0,94$ die β -Galactosidase-Aktivität am stärksten.

Da mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie nur eine geringe Ausbeute an aktiven Fraktionen erreicht werden kann, wurden Arnika-Tinktur bzw. -Extrakt über Niederdruck-Flüssigchromatographie (s. Kap. 2.7.2) getrennt. Ein typisches Ergebnis der Fraktionierung an einer RP-18-Fertigsäule mit 20 % Methanol als mobile Phase zeigt Abb. 3.2-2.

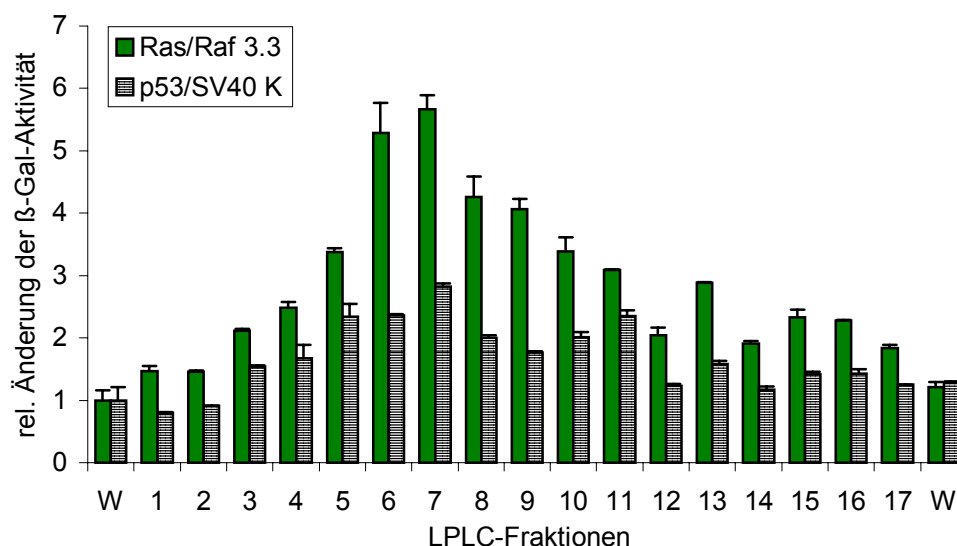


Abb. 3.2-2: Effekt von verschiedenen Fraktionen von Arnika-Tinktur nach LPLC

2 ml Arnika-Tinktur wurden chromatographisch aufgetrennt und die gesammelten Fraktionen nach Einrotieren am Rotationsverdampfer in 400 μ l Wasser aufgenommen. 140 μ l Hefesuspension wurden mit je 20 μ l der einzelnen Fraktionen o/n inkubiert. W = Inkubation mit 20 μ l Wasser.

Die aktiven Fraktionen durchlaufen die Säule aufgrund ihrer Polarität sehr schnell, sodass unpolare Substanzen abgetrennt werden können. Zur weiteren Auftrennung wurden die aktiven Fraktionen nach der LPLC vereinigt und erneut dünnschichtchromatographisch getestet. Auf einer Kieselgel-60-Platte mit einem Gemisch aus 65 T Ethylacetat, 25 T Methanol und 25 T Wasser als Laufmittel verstärkten die Fraktionen mit einem R_f -Wert von 0-0,4 die β -Galactosidase-Aktivität, was auf eine gesteigerte Interaktion zwischen Ras und Raf hindeutet.

Die LPLC führte zwar zu einer deutlichen Verbesserung der Trennung, jedoch reichte die Kapazität der Säule nicht für eine Aufreinigung großer Mengen aus. Weitere Untersuchungen erfolgten daher durch Dr. Frank Cullmann am Institut für Pharmakognosie und analytische Phytochemie der Universität des Saarlandes unter Leitung von Prof. Becker. Ausgehend von 11 Arnika-Tinktur wurde die Trennung und Weiterverarbeitung der Fraktionen „activity guided“ durchgeführt. Die Aufreinigung ist schematisch in Abb. 3.2-3 zusammengefasst.

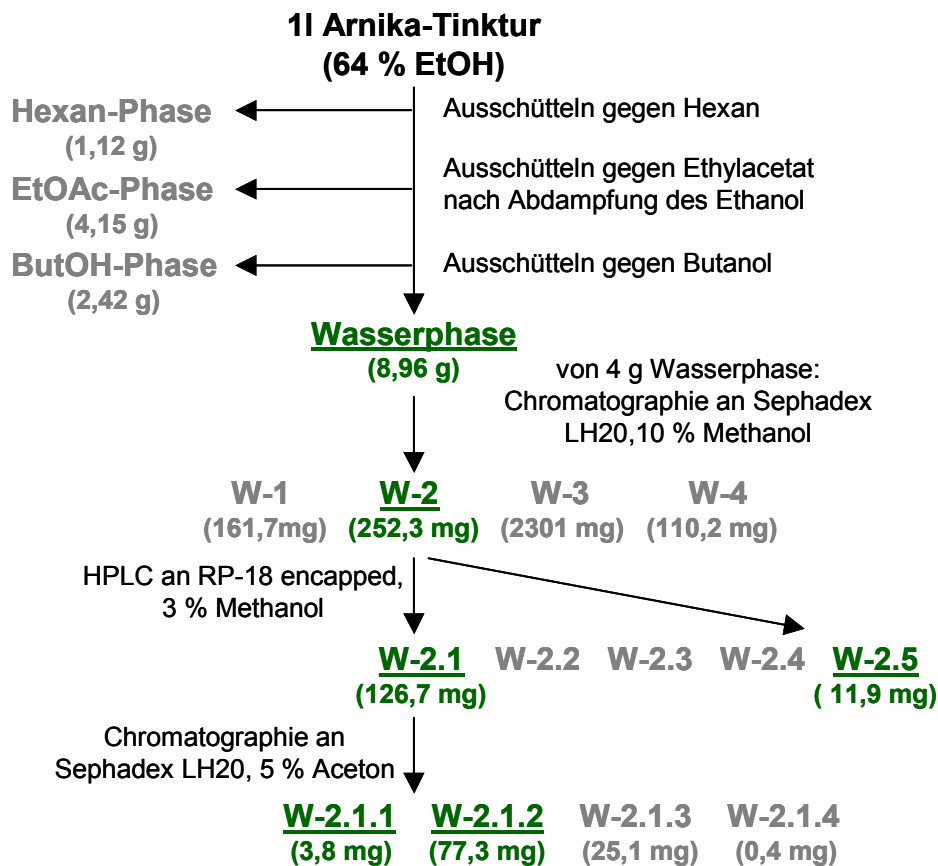


Abb. 3.2-3: Auftrennschema von Arnika-Tinktur nach AG Becker

Ausgehend von 1 l Arnika-Tinktur wurden verschiedene Extraktionen und chromatographische Methoden zur Aufreinigung in Saarbrücken verwendet. Die Fraktionen wurden gefriergetrocknet verschickt und in Wasser resuspendiert. 10-20 µl einer Testkonzentration von 5-10 mg/ml wurden jeweils mit 140 µl Zellen o/n inkubiert. Die aktiven Fraktionen sind im Schema unterstrichen dargestellt. Angegeben sind die Ausbeuten der einzelnen Fraktionen; von der Wasserphase wurde zuerst nur eine Hälfte (ca. 4 g) aufgereinigt.

Bei der Fraktion W-2.5 handelt es sich nach ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren um eine Einzelverbindung und zwar um die 1,1,1,1,1-Kestoheptaose, ein Heptaglycosid. Es wurde bereits aus *Platycodon grandiflorum* isoliert (Oka, M. et al., 1992) und ist ein Inulin-Heptamer aus einer Glucose- und sechs Fructose-Einheiten (GF_6). Sein Molekulargewicht beträgt $\text{MW}=1153$ g/mol, die chemische Zusammensetzung lautet $\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{36}$.

Dank freundlicher Unterstützung von Dr. Stefan Marx, Lehrstuhl für Biotechnologie, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, der mit Hilfe der Levansucrase, einer bakteriellen Fructosyltransferase Oligosaccharide synthetisiert, konnten außerdem 1-Kestotriose, 1,1-Kestotetraose und 1,1,1-Kestopentaose getestet werden. Keine von diesen Substanzen erwies sich jedoch in unserem Zwei-Hybrid-Testsystem als aktiv (s. Abb. 3.2-4). Nur Kestoheptaose steigert spezifisch und konzentrationsabhängig die β -Galactosidase-Menge des Teststammes „Ras/Raf 3.3“, was auf eine verstärkte Wechselwirkung der Fusionsproteine BD-Ras und AD-Raf hindeutet. Da der Teststamm „Ras/RBD 9“ kaum

beeinflusst wird, scheint die vollständige regulatorische Domäne von Raf für die Interaktion mit der Substanz notwendig zu sein. In Analogie zur Zusammensetzung von Kestoheptaose wurden verschiedenste Zucker und Zuckerderivate untersucht (s. Kap. 3.7), die aber ebenfalls keinen spezifischen Effekt auf die Ras/Raf-Interaktion zeigten.

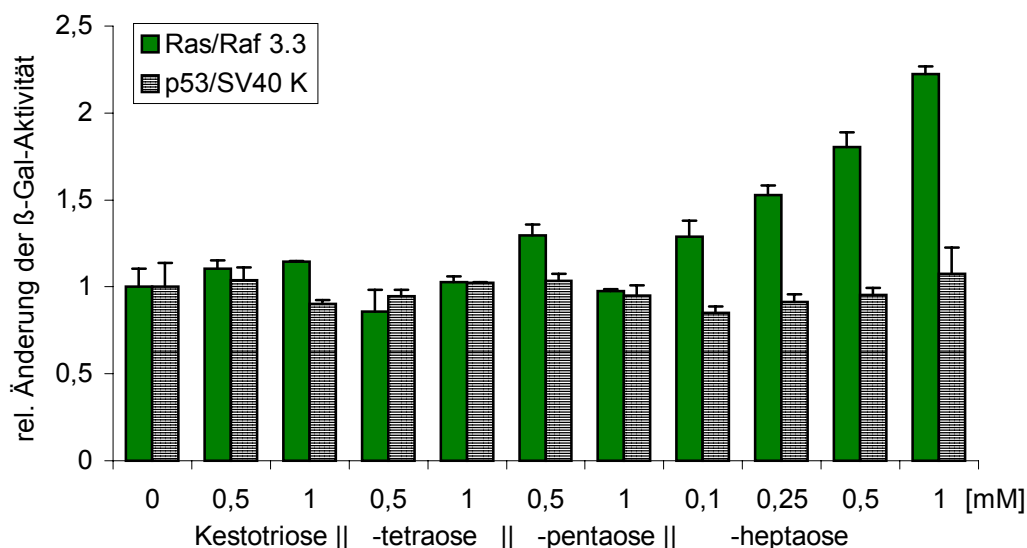


Abb. 3.2-4: Beeinflussung der β -Galactosidase-Aktivität durch Kestosen

Unterschiedliche Konzentrationen (1,5-15 mM) der verschiedenen Kestosen wurden mit den Hefen o/n inkubiert, sodass sich Endkonzentrationen zwischen 0,1 und 1 mM ergaben. Als Lösungsmittel diente Wasser.

Große Schwierigkeiten bereitete die Aufreinigung der Fraktion W-2.1. Nach Inkubation führte sie zu einer stärkeren Enzymsteigerung beim Teststamm „Ras/Raf 3.3“ als die Fraktion W-2.5=Kestoheptaose, außerdem beeinflusste sie die β -Galactosidase-Aktivität beider Teststämme 3.3 und 9 und besitzt somit wahrscheinlich einen anderen Angriffspunkt als Kestoheptaose. Hauptbestandteile der Fraktionen W-2.1.1 und W-2.1.2 scheinen Zitronen- und Äpfelsäure, sowie evt. eine Aminosäure zu sein. Daraufhin wurden diese und weitere kleine Säuren bzw. Aminosäuren im Zwei-Hybrid-System getestet. Überraschenderweise zeigte nur Isovaleriansäure einen Einfluss auf die Enzymaktivität (s. Kapitel 3.2.2), alle anderen Substanzen waren in den getesteten Konzentrationen inaktiv. Aufgrund der jedoch bereits im Ansatz vorhandenen NMR-Daten der aktiven Fraktion konnte Isovaleriansäure als die gesuchte Substanz von *Arnica montana* ausgeschlossen werden. Bisher konnten leider die verbliebenen Fraktionen nicht vollständig aufgereinigt werden, da sich aufgrund ihrer hohen Polarität die Analytik und Trennung äußerst schwierig gestaltet. Eine Strukturaufklärung der aktiven Substanz bzw. Substanzen war daher noch nicht möglich.

3.2.2 Isovaleriansäure und Analoga

Während der Suche nach den aktiven Substanzen aus *Arnica montana* gerieten organische Säuren ins Blickfeld des Interesses. Verschiedene Säuren wurden daraufhin im Zwei-Hybrid-System getestet, von denen alleine Isovaleriansäure einen spezifischen Effekt auf die Wechselwirkung zwischen den Fusionsproteinen BD-Ras und AD-Raf hatte (s. Abb. 3.2-5 und 3.2-6).

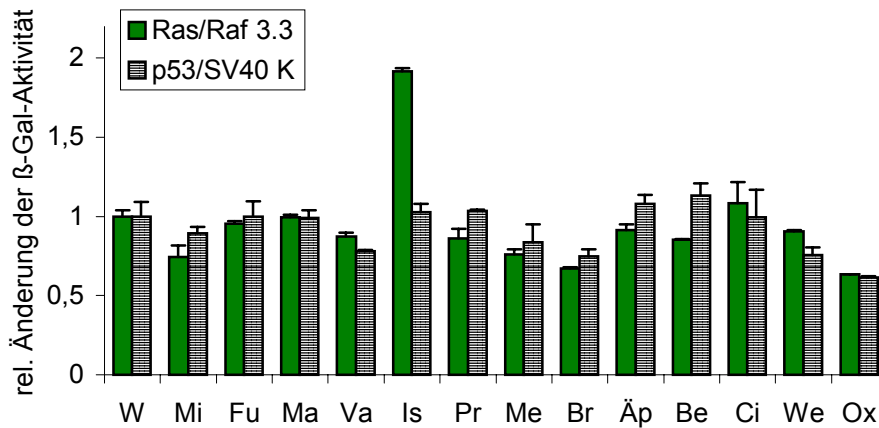


Abb. 3.2-5: Beeinflussung der Enzymaktivität durch verschiedene Säuren

10 μ l der entsprechenden Säure in einer Konzentration von 5 mg/ml wurden mit 140 μ l Hefesuspension o/n inkubiert und die Effekte auf die β -Galactosidase-Aktivität, bezogen auf das Lösungsmittel Wasser, berechnet. Die verwendeten Abkürzungen stehen für: W=Wasser als Lösungsmittel, Mi=Milchsre., Fu=Fumarsre., Ma=Malonsre., Va=Valeriansre., Is=Isovaleriansre., Pr=Propionsre., Me=Mevalonsäure-lacton, Br=Brenztraubensre., Äp=Äpfelsre., Be=Bernsteinsre., Ci=Citronensre., We=Weinsre. und Ox=Oxalsre.

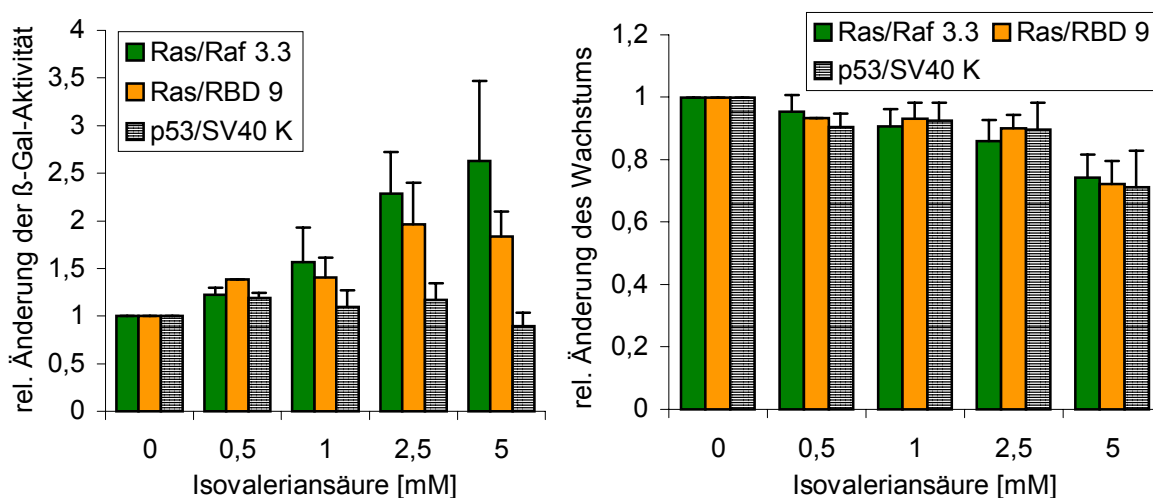


Abb. 3.2-6: Effekt von Isovaleriansäure auf Enzymaktivität und Hefewachstum

Die angegebenen Hefestämme wurden mit Isovaleriansäure in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert, sodass die angegebene Endkonzentration erreicht wird. Als Lösungsmittel diente Wasser.

Die Inkubation mit Isovaleriansäure steigerte konzentrationsabhängig die Enzymaktivität der β -Galactosidase der Teststämme, aber nicht des Kontrollstammes „p53/SV40 K“. Wie bei Arnika-Tinktur wurde nicht nur der Stamm „Ras/Raf 3.3“ beeinflusst, sondern ebenfalls in etwas schwächerem Ausmaß der Teststamm „Ras/RBD 9“. Für den Angriffspunkt der Substanz scheint somit die Interaktion zwischen Ras und der Ras-bindenden Domäne von Raf ausreichend zu sein. Durch steigende Konzentrationen an Isovaleriansäure wurde jedoch das Hefewachstum im Vergleich zum Leerwert gehemmt: Bei Endkonzentrationen von 5 mM auf ca. 75 %. Konzentrationen über 5 mM wurden daher nicht getestet.

Um für den Effekt wichtige Strukturmerkmale der Isovaleriansäure zu finden, wurden verschiedene Analoga getestet, die in Abb. 3.2-7 zusammengefasst sind.

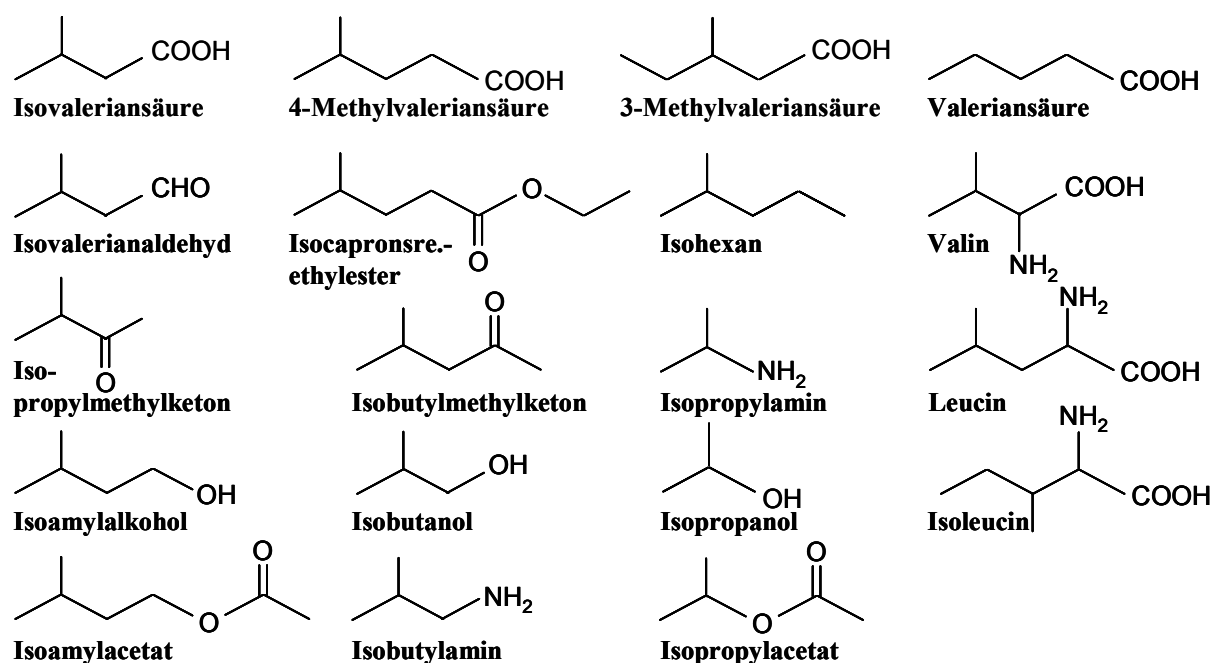


Abb. 3.2-7: Strukturen von Isovaleriansäure und verwandten Substanzen

Der Einfluss der Strukturanaloga auf die Ras/Raf-Interaktion und das Hefewachstum wurde in Endkonzentrationen von 0,1-5 mM an den verschiedenen Hefestämmen untersucht. Als Lösungsmittel diente soweit wie möglich Wasser, ansonsten 50 % Ethanol, 50 % Methanol oder reines Ethylacetat. Von den getesteten Strukturanaloga bewirkte nur eine Inkubation mit Isovaleriansäure, 3-Methyl- und 4-Methylvaleriansäure eine spezifische und konzentrationsabhängige Steigerung der β -Galactosidase-Aktivität der Teststämme, welche auf eine Verstärkung der Ras/Raf-Wechselwirkung hindeutet. Dabei erwiesen sich die Substanzen als unterschiedlich potent: Die Inkubation mit 2 mM Isovaleriansäure steigerte die β -Galactosidase-Aktivität in vergleichbarem Ausmaß wie 1 mM 3-Methyl- oder

3. Ergebnisse

4-Methylvaleriansäure. Die Säurefunktion scheint dabei für den Effekt ebenso essentiell zu sein wie eine Kettenverzweigung, da sowohl die entsprechenden Aldehyde und Alkohole (z.B. Isovalerianaldehyd, Isoamylalkohol) als auch die unverzweigten Säuren (Valeriansäure) inaktiv sind. Isocaprinsäureethylester führte erst nach Verseifung mit NaOH zu 4-Methylvaleriansäure zu einer Erhöhung der β -Galactosidase-Aktivität.

Während die meisten der getesteten Substanzen in Konzentrationen bis 20 mM keinerlei Einfluss auf das Hefewachstum zeigten, führten Isobutylamin und Isopropylamin ab einer Konzentration von 2 mM zu einer drastischen Wachstumshemmung. Ähnliches war nach Inkubation mit 3-Methyl- und 4-Methylvaleriansäure zu beobachten, die daher nicht in Konzentrationen über 1 mM in vergleichenden Versuchen eingesetzt wurden.

3.2.3 Weitere pflanzliche Proben

Isovaleriansäure ist in größeren Mengen in der Baldrianwurzel enthalten. Deshalb wurde ein Wasserextrakt aus *Valeriana radix* getestet, der von S. Smietana im Rahmen ihrer Promotion am Institut für Pharmazeutische Biologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt hergestellt worden war (Smietana, S., 2000).

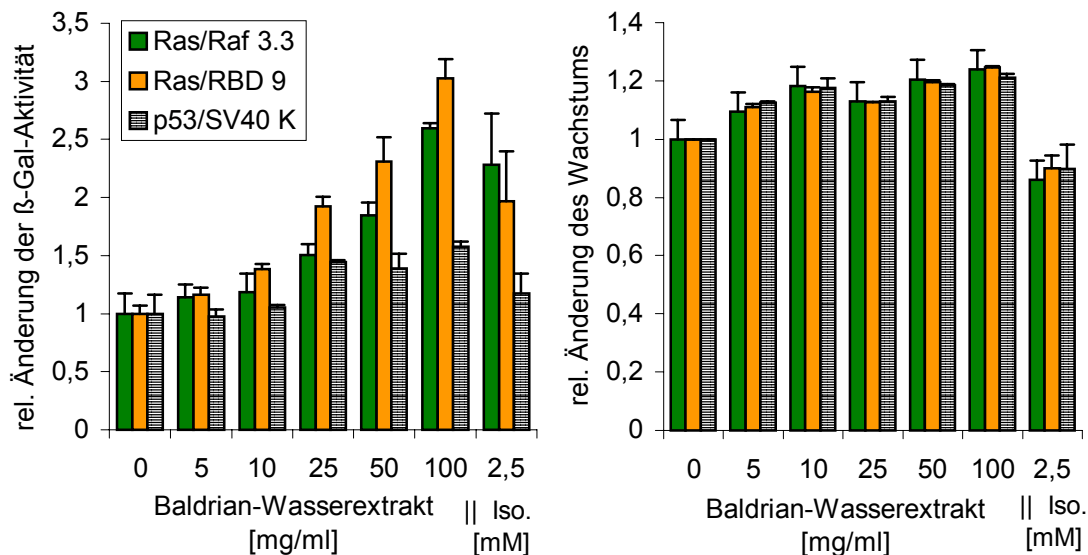


Abb. 3.2-8: Effekt von Baldrian-Wasserextrakt auf die β -Galactosidase-Aktivität

10 μ l Baldrian-Extrakt der Konzentrationen 5-100 mg/ml wurden mit 140 μ l Hefesuspension der verschiedenen Stämme inkubiert. Als Positivkontrolle diente Isovaleriansäure, die in einer Endkonzentration von 2,5 mM eingesetzt wurde, als Lösungsmittel Wasser.

Der gewonnene Extrakt aus Baldrianwurzel steigerte nach Inkubation ähnlich wie Isovaleriansäure konzentrationsabhängig die β -Galactosidase-Aktivität der Teststämme „Ras/Raf 3.3“ und „Ras/RBD 9“. Auch beim Kontrollstamm „p53/SV40 K“ führte die Inkubation zu einer leichten Steigerung der Enzymaktivität, was durch weitere Inhaltsstoffe des Extraktes hervorgerufen sein kann. Laut Literatur besitzt Baldrianwurzel einen ätherischen Öl-Gehalt von 0,5-2 %, wobei die Zusammensetzung sehr stark von der Herkunft des Pflanzenmaterials sowie der Gewinnungsmethode abhängt (Sticher, O., 1999a). Insgesamt sind bis zu 150 Substanzen nachgewiesen worden. Obwohl bei dem Versuch die Hefen mit sehr hohen Extrakt-Konzentrationen inkubiert wurden (bis zu 1 mg pro Ansatz), könnten Konzentrationen von 2,5 mM Isovaleriansäure pro Ansatz nur bei einem Isovaleriansäure-Anteil von 0,3 % des Gesamtextraktes erreicht worden sein, was eher unwahrscheinlich ist. Die Steigerung der β -Galactosidase-Aktivität wird daher wahrscheinlich durch das Zusammenspiel vieler Inhaltsstoffe bewirkt.

3.3 Chemisch-synthetische Substanzen

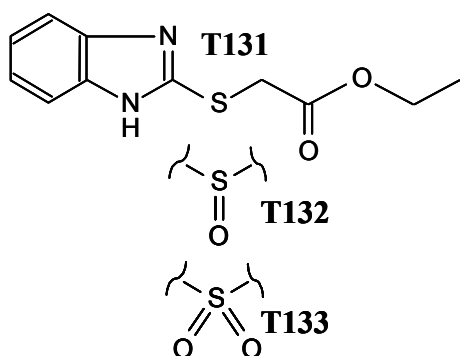
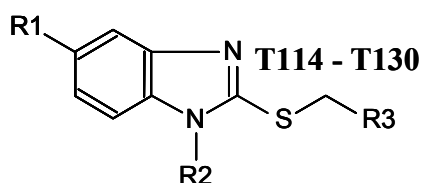
Insgesamt wurden mehr als 270 synthetisierte Substanzen aus verschiedenen Arbeitskreisen im Zwei-Hybrid-System getestet. Die meisten Proben zeigten keinen spezifischen Effekt auf die Ras/Raf-Wechselwirkung und sind in Kapitel 3.7 tabellarisch aufgeführt. Aus dem Arbeitskreis von Prof. Dannhardt, Institut für Pharmazeutische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz stammten über 185 Substanzen, die alle im Zwei-Hybrid-System in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht wurden. Einige wenige Substanzen fielen dabei durch eine spezifische Steigerung der Ras/Raf-Interaktion auf, auf die nun in den folgenden Kapiteln näher eingegangen wird. Teilweise konnten außerdem Strukturanaloga getestet werden, sodass eine Aussage für den beobachteten Effekt über wichtige chemische Gruppen möglich war. Die meisten Substanzen wurden in einem 1:1-Gemisch (V/V) aus DMSO und Wasser eingesetzt, wobei sie zuerst in DMSO gelöst und dann kurz vor der Zugabe zu den Hefesuspensionen mit Wasser verdünnt wurden.

3.3.1 T-Substanzen

Dr. Linda Hahn synthetisierte während ihrer Promotion am Institut für Pharmazeutische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz im Arbeitskreis von Prof. Dannhardt verschiedene, nicht steroidale Antiinflammatorika, die sowohl eine duale Hemmung der

3. Ergebnisse

COX-1/COX-2 als auch der Lipxygenase bewirken sollten. Insgesamt wurden 50 Substanzen verschiedener Strukturen im Zwei-Hybrid-System getestet, von denen die Inkubation mit einigen Benzimidazol-Derivaten zu einer gesteigerten β -Galactosidase-Aktivität der Ras/Raf-Teststämme führten.



Substanz	R1	R2	R3
T114	H	H	Phenyl
T118	H	H	4'-Methoxyphenyl
T120	H	H	4'-Hydroxyphenyl
T121	H	H	2-Pyridyl
T123	H	H	2-Chinolyl
T124	H	Acetyl	2-Chinolyl
T127	Methoxy	H	Phenyl
T128	Methoxy	Acetyl	Phenyl
T129	Methoxy	H	4'-Fluorphenyl
T130	Methoxy	Acetyl	4'-Fluorphenyl

Abb. 3.3-1: Strukturformeln einiger Benzimidazole von Dr. L. Hahn

Die Bezeichnung z. B. T129 wurde dabei derjenigen aus der Doktorarbeit von Dr. Linda Hahn (Hahn, L., 1999) angepasst, die ursprüngliche Bezeichnung der Substanzen lautete z. B. LF52.

Die Methoxygruppe am Phenylring bei Substanz T118 bewirkt im Gegensatz zu einer Hydroxygruppe bei T120 bzw. keiner Substitution bei T114 eine Erhöhung der β -Galactosidase-Aktivität des Teststammes „Ras/Raf 3.3“, welche vielleicht auf die Erhöhung der Lipophilie und damit eventuell einer besseren Zellgängigkeit der Verbindung zurückzuführen ist (s. Abb. 3.3-2). Der Ersatz des Phenylrings durch einen Pyridylring bei T121 resultiert nur in einer schwachen Aktivität; wird jedoch ein Chinolylrest eingebaut wie bei T123 führt die Inkubation mit der Substanz zu einer deutlichen Steigerung. Ein größerer, lipophiler Substituent am Schwefel scheint somit von Vorteil zu sein. Eine Substitution des Stickstoffs im Benzimidazol hemmt jedoch den Effekt stark: T124 ist im Gegensatz zu T123 fast inaktiv.

Bei den Verbindungen mit einer Methoxygruppe in Position 5 des Benzimidazols (T127-T130) führt nur T129 zu einer Steigerung der β -Galactosidase-Aktivität. Die Substitution des Phenylrings mit Fluor in Position 4 scheint dabei von besonderer Bedeutung zu sein (Vergleich T127 mit T129). Die Lipophilie innerhalb dieses Strukturbereiches wird dadurch

noch erhöht. Der Stickstoff darf, wie schon bei den anderen Verbindungen gezeigt, nicht substituiert sein, ansonsten ist die Verbindung inaktiv (T130).

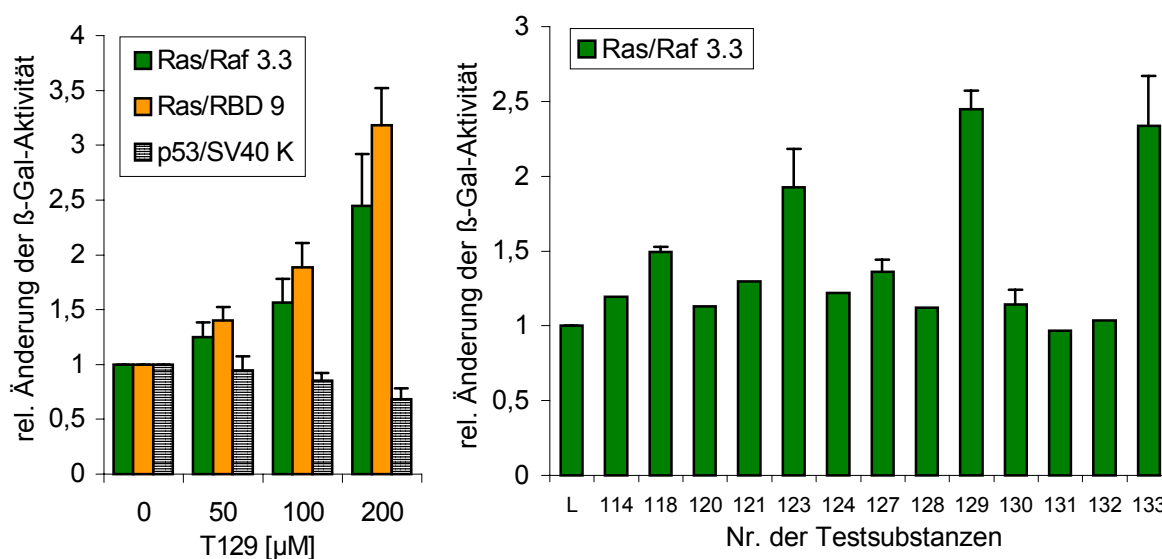


Abb. 3.3-2: Effekt von verschiedenen Benzimidazolen auf die Enzymaktivität

Die Verbindungen wurde zuerst in DMSO gelöst und anschließend mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt, sodass bei Zugabe von 10 μ l dieser Lösung zu 140 μ l Hefesuspension die im Diagramm angegebene Endkonzentration in den 150 μ l enthalten war.

Die Verbindungen T131, T132 und T133 tragen keinen aromatischen Rest am Schwefel wie die Substanzen T114-T130, sondern eine polarere Ethylacetylgruppe. Sie unterscheiden sich untereinander nur in der Oxidationsstufe des Schwefels. Während das Sulfid (T131) und das Sulfoxid (T132) inaktiv sind, steigert die Inkubation mit dem Sulfon T133 interessanterweise die β -Galactosidase-Aktivität fast so stark wie die Substanz T129.

Für die beste Verbindung T129 sind die Aktivitäten an allen drei Hefestämmen ebenfalls in Abb. 3.3-2 aufgeführt: Die Inkubation mit T129 bewirkt eine gesteigerte β -Galactosidase-Aktivität vor allen Dingen beim Teststamm „Ras/RBD 9“, was auf eine verstärkte Interaktion zwischen Ras und der Ras-bindenden Domäne von Raf hindeutet. Das Hefewachstum wurde durch die angegebenen Verbindungen kaum beeinflusst: Im Vergleich zur Inkubation mit dem reinen Lösungsmittel (1:1 DMSO/Wasser (V/V)) sank das relative Wachstum bei einer Endkonzentration von 200 μ M im Mittel auf ca. 93 %.

3.3.2 JS-Substanzen

Ziel der Promotionsarbeit von Dr. Johannes Schweppenhäuser im Arbeitskreis von Prof. Dannhardt war es, selektive COX-2- bzw. duale COX-1- und COX-2-Inhibitoren zu synthetisieren, *in vitro* zu testen und Struktur-Wirkungsbeziehungen zu erstellen (Schweppenhäuser, J., 1999). Von den insgesamt 71 Substanzen, die im Zwei-Hybrid-System untersucht wurden, bewirkten einige nach Inkubation mit dem Teststamm „Ras/Raf 3.3“ eine schwache Steigerung der β -Galactosidase-Aktivität (s. Abb. 3.3-4). Die Enzymaktivität des zweiten Teststammes „Ras/RBD 9“ wurde nach Inkubation mit den aktiven Substanzen ebenfalls leicht gesteigert, wohingegen die des Kontrollstammes „p53/SV40 K“ gar nicht beeinflusst oder bei einigen Verbindungen verringert wurde. Aufgrund der systematischen Substanzreihen (s. Abb. 3.3-3) konnten darüber hinaus einige Strukturmerkmale für eine Änderung der β -Galactosidase-Aktivität bestimmt werden.

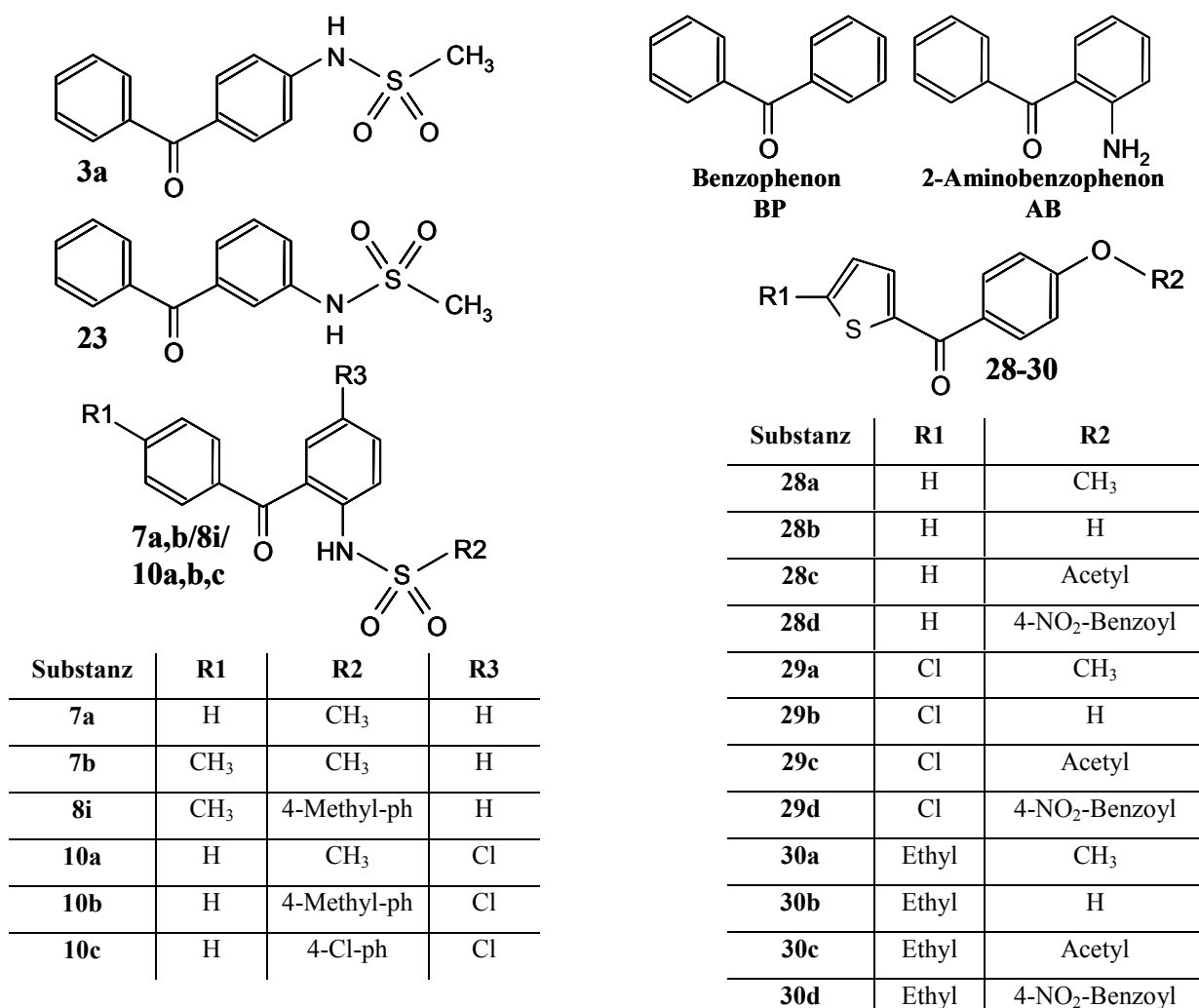


Abb. 3.3-3: Strukturformeln verschiedener JS-Substanzen

Die Bezeichnung der Substanzen entspricht dabei derjenigen aus der Doktorarbeit von Dr. J. Schweppenhäuser (Schweppenhäuser, J., 1999).

Zur ersten Gruppe der N-(Benzoylphenyl)sulfonamide gehören die aufgeführten Substanzen 3a, 7a/b, 8a-j, 10a-c und 23, wobei 3a über Position 4, 23 über Position 3 und die Substanzgruppen 7, 8 und 10 über die Position 2 des Aromaten mit der Sulfonamidgruppe verknüpft sind. Die Verknüpfungsposition besitzt bei ansonsten gleichen Strukturen keinen großen Einfluss auf die Änderung der β -Galactosidase-Aktivität (Vergleich 3a, 7a und 23). Im Gegensatz zu 7a besitzt 7b eine Methylgruppe in Position 4'; die Enzymaktivität wird nach Inkubation des Teststammes mit 7b deutlich steigert. Die Arylsulfonyl-Derivate (8a-j) sind alle nur schwach aktiv bzw. inaktiv, was auch die Einführung einer Methylgruppe in Position 4' wie bei 7b nicht ändert (s. Substanz 8i). Der negative Effekt einer Arylsubstitution an der Sulfonamidgruppe zeigt sich auch bei der Substanzklasse 10, der N-(2-Benzoyl-4-chlorphenyl)sulfonamiden. Das Methansulfonamid 10a wirkt ähnlich wie das unchlorierte Derivat 7a, die Arylsulfonamide 10b und 10c sind jedoch inaktiv.

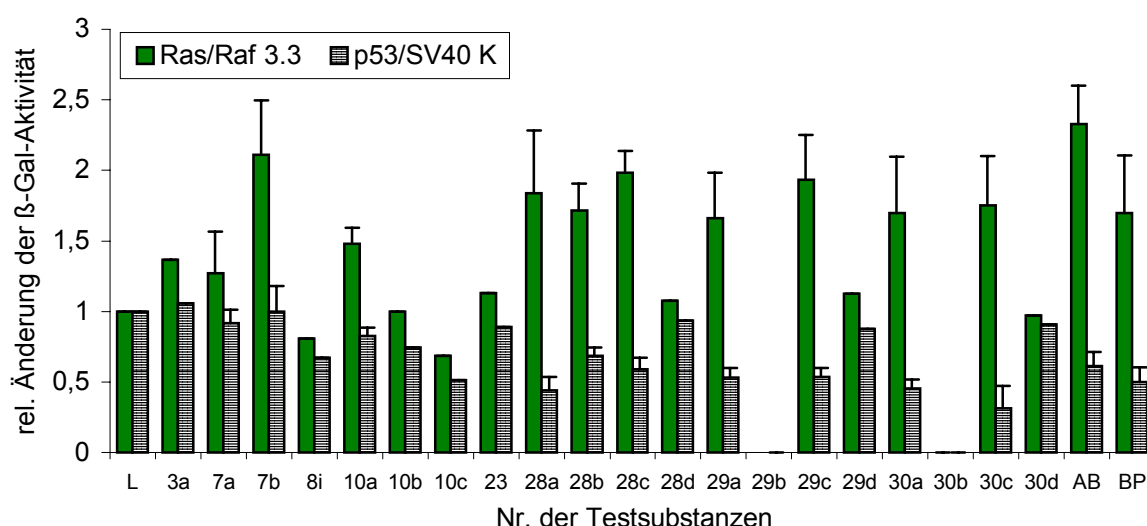


Abb. 3.3-4: Änderung der Enzymaktivität durch verschiedenen JS-Substanzen

Die Substanzen wurden in einer Endkonzentration von 200 μ M mit dem Teststamm „Ras/Raf 3.3“ und dem Kontrollstamm „p53/SV40 K“ o/n inkubiert. Als Lösungsmittel (L) diente ein DMSO/Wasser-Gemisch (1:1 V:V).

Zur zweiten Gruppe der (4-Hydroxyphenyl)(2-thienyl)methanone gehören die Substanzreihen 28-30, die sich jeweils in den beiden Resten R1 und R2 unterscheiden. Die Substitution des Thienylrings (R1) bei den Reihen 29 und 30 bewirkt in den Hefen eine ähnliche Enzymaktivität wie die unsubstituierten Verbindungen (Substanzreihe 28). Der Methylether 28a zeigt einen vergleichbaren Effekt wie das Phenol-Derivat 28b, jedoch sind die Phenole der Reihen 29 und 30 für die Hefen stark toxisch, sodass keine Enzymaktivitäten

3. Ergebnisse

bestimmt werden konnte. Die Acetat-Reihe (28c, 29c, 30c) stellt die aktivsten Verbindungen dieser Gruppe dar, sämtliche Nitrobenzoate (28d, 29d, 30d) sind dagegen im Zwei-Hybrid-System inaktiv. Auch Benzophenon und 2-Aminobenzophenon, die zur Synthese verwendet wurden, führten interessanterweise zu einer Steigerung der β -Galactosidase-Aktivität im Teststamm. Der Effekt von 2-Aminobenzophenon ist dabei ähnlich ausgeprägt wie bei den aktiven Verbindungen 7b und 28c. Die Enzymaktivität des Kontrollstammes K wird durch die Inkubation mit einigen Verbindungen bei einer Endkonzentration von 200 μ M ebenfalls beeinflusst. Diese Verminderung lässt auf eine unspezifische Interaktion der Substanzen mit den Hefestämmen schließen.

Alle aktiven Verbindungen beeinflussen außerdem leicht das Hefewachstum. Im Mittel sinkt das relative Wachstum bezogen auf eine Inkubation mit dem Lösungsmittel auf ca. 80 %. Vor allen Dingen nach einer Inkubation mit den Substanzreihen 28-30 sowie mit AB und BP wird die Wachstumsrate auf ca. 60 % reduziert bezogen auf eine Inkubation mit dem Lösungsmittel (s. Abb. 3.3-5).

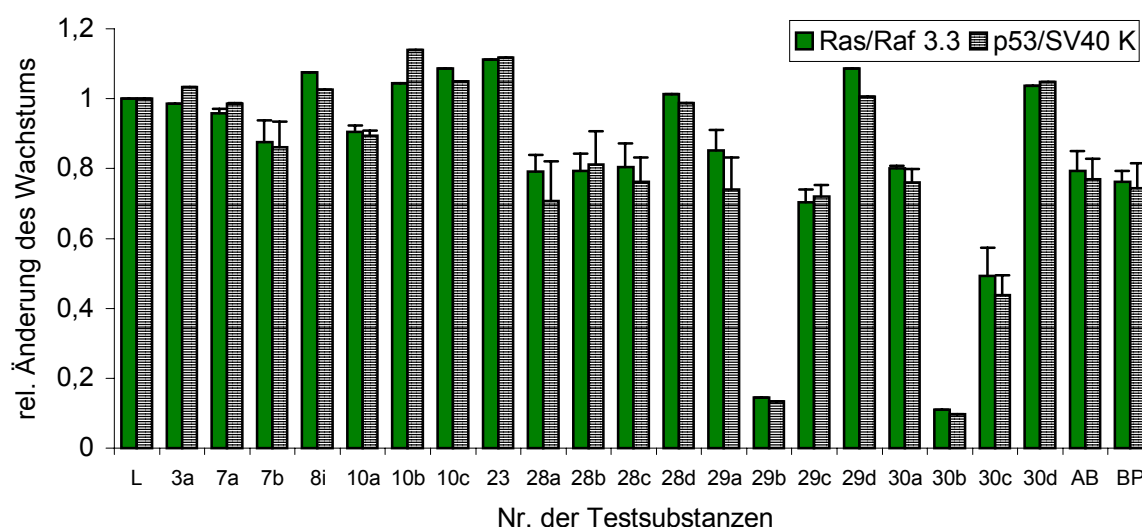


Abb. 3.3-5: Einfluss auf das Hefewachstum von verschiedenen JS-Substanzen

Die Substanzen wurden in einer Endkonzentration von 200 μ M mit dem Teststamm „Ras/Raf 3.3“ und dem Kontrollstamm „p53/SV40 K“ o/n inkubiert. Als Lösungsmittel (L) diente ein DMSO/Wasser-Gemisch (1:1 V:V).

3.3.3 HM70

HM70, Cyclohexyliden-2-propionsäure ist von Dr. Katja Hell-Momeni während ihrer Promotion am Institut für Pharmazeutische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz als ein cyclisches Derivat der 2-Propyl-2-pentensäure synthetisiert worden (Hell-Momeni, K., 2000). Ziel ihrer Arbeit war es, potente Antiepileptika mit geringerem Nebenwirkungspotential als Valproinsäure zu finden. 2-Propyl-2-pentensäure, ein Metabolit der Valproinsäure, diente dabei als Leitstruktur, da es eine vergleichbare Wirkung wie die Muttersubstanz aufweist, jedoch nicht deren Nebenwirkungen (Löscher, W., 1992).

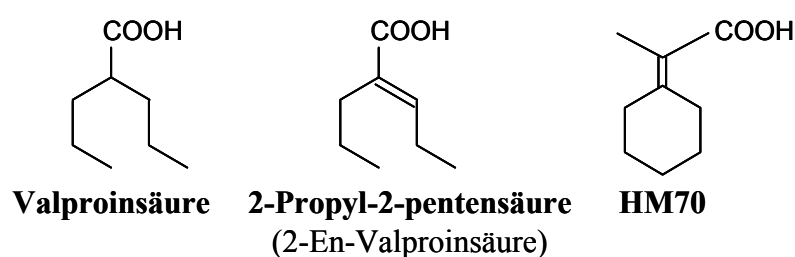


Abb. 3.3-6: Strukturformeln von Valproinsäure, 2-Propyl-2-pentensäure und HM70

HM70 wurde ebenso wie T129 zufällig beim Screening im Zwei-Hybrid-System entdeckt. Es steigert konzentrationsabhängig und spezifisch die β -Galactosidase-Aktivität des Teststammes „Ras/Raf 3.3“, jedoch nicht des Teststammes „Ras/RBD 9“ und des Kontrollstammes „p53/SV50 K“ (s. Abb. 3.3-7). Das bis auf die Ras-bindende Domäne verkürzte Raf im Teststamm „Ras/RBD 9“ besitzt offensichtlich die Bindungsstelle für die Substanz HM70 nicht mehr, wohl aber die für T129. Die beiden Substanzen unterscheiden sich somit deutlich in ihren Interaktionen mit den Proteinen. HM70 beeinflusst das Hefewachstum ähnlich schwach wie T129; es wurde trotzdem nicht in Konzentration über 200 μ M verwendet.

Da sich HM70 strukturell von der Valproinsäure ableitet, wurde diese ebenfalls im Zwei-Hybrid-System getestet. Nach Inkubation steigerte sie die β -Galactosidase-Aktivität des Teststammes „Ras/Raf 3.3“ bei einer Endkonzentration von 100 μ M um den Faktor 2 und ist somit deutlich schwächer wirksam als HM70. Der aktive Metabolit 2-Propyl-2-pentensäure wurde aufgrund fehlendem Materials in diesem System nicht getestet.

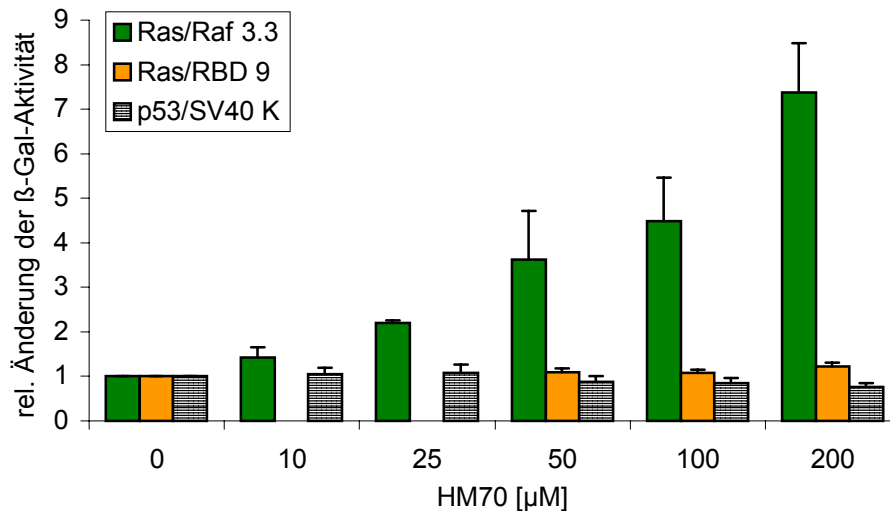


Abb. 3.3-7: Effekt von HM70 auf die verschiedenen Hefestämme

HM70 wurde in verschiedenen Endkonzentrationen von 10-200 µM mit den Hefestämmen o/n inkubiert. Die Substanz wurde zuerst in DMSO gelöst und anschließend mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt, sodass bei Zugabe von 10 µl dieser Lösung zu 140 µl Hefesuspension die im Diagramm angegebene Endkonzentration in den 150 µl enthalten war.

Effektoren der Ras/Raf-Wechselwirkung müssen nicht nur in die Hefezelle, sondern auch in den Zellkern der Hefen eindringen. Unter diesem Aspekt lag die Frage nahe, ob die Hefen je nach Wachstumsphase unterschiedlich empfindlich auf die zugegebenen Testsubstanzen reagieren oder ob die Testsubstanzen ab einer bestimmten Zelldichte ausgedünnt werden. Exemplarisch wurde das mit der Substanz HM70 und dem Teststamm „Ras/Raf 3.3“ untersucht. Die Ausgangszellsuspension mit einer OD₆₃₀ von 140 µl von ca. 0,130 wurde bis zu einer 1:1-Verdünnung mit SC-Medium versetzt (130 µl + 10 µl, 120 µl + 20 µl, ..., 70 µl + 70 µl) und die jeweiligen Verdünnungsstufen o/n mit 10-100 µM HM70 inkubiert. Die Auswertung der β-Galactosidase-Aktivität am folgenden Tag zeigte keinen Einfluss der Ausgangszelldichte in den verwendeten Verdünnungen auf die Wirkung von HM70: Alle Verdünnungsstufen zeigten bei der gleichen Endkonzentration von HM70 annähernd identische Effekte.

3.3.4 Kombinationsversuche der aktiven Verbindungen

Die bisher gefundenen Substanzen zeigten zum Teil unterschiedliche Effekte auf die beiden Teststämme „Ras/Raf 3.3“ und Ras/RBD 9“, was auf andere Interaktionsflächen der Substanzen mit den Proteinen schließen lässt. Um zu klären, in wie weit sich der Einfluss der verschiedenen Strukturen zu additiven oder inhibitorischen Effekten kombinieren lassen,

wurden die Hefen mit HM70, T129 oder Isovaleriansäure und entweder zusätzlich mit Lösungsmittel oder einer anderen Substanz inkubiert.

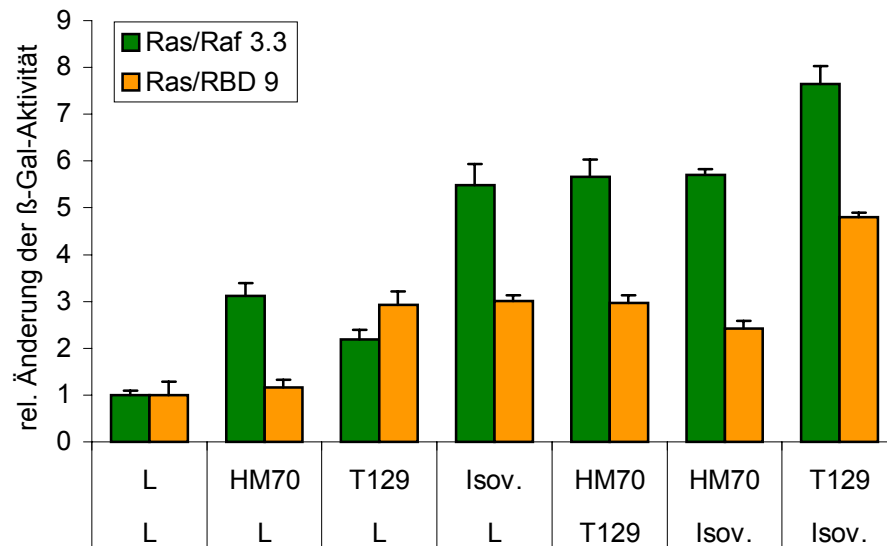


Abb. 3.3-8: Kombinationen von HM70, T129 und Isovaleriansäure

140 μ l der beiden Teststämme wurden mit 10 μ l Probe und weiteren 10 μ l Probe oder Lösungsmittel versetzt und o/n inkubiert. Als Bezug diente die Enzymaktivität, die durch Inkubation mit 20 μ l Lösungsmittel, einem 1:1-Gemisch (V/V) von DMSO und Wasser, erhalten wurde. Die Endkonzentration im Ansatz waren für HM70 50 μ M, für T129 200 μ M und für Isovaleriansäure 5 mM.

Wie schon bei früheren Versuchen beobachtet, führt eine Inkubation mit HM70 im Gegensatz zu Isovaleriansäure und T129 nur zu einer Steigerung der Enzymaktivität des Teststammes „Ras/Raf 3.3“, nicht aber von „Ras/RBD 9“. Die kombinierte Inkubation von HM70 und T129 steigert daher nicht die β -Galactosidase-Aktivität von „Ras/RBD 9“ über das Maß von T129 hinaus. Die Enzymaktivität von „Ras/Raf 3.3“ jedoch entspricht fast genau der Addition der beiden einzelnen Aktivitäten. Die beiden Substanzen greifen daher wahrscheinlich an unterschiedlichen Regionen der Fusionsproteine an und verstärken sich in ihren Effekten. Eine Inkubation der Hefen mit Isovaleriansäure und zusätzlich HM70 zeigt keine große Änderung der Enzymaktivität im Vergleich zu einer Inkubation nur mit Isovaleriansäure. Anscheinend führt diese Kombination nicht zu additiven Effekten, was vielleicht durch eine Konkurrenz der Substanzen an den Bindungsstellen zu erklären ist. T129 und Isovaleriansäure verstärken nach Inkubation die Enzymaktivität beider Teststämme – sowohl einzeln als auch in Kombination. Auch hierbei entspricht der resultierende Steigerungsfaktor fast genau der Addition der einzelnen Faktoren. T129 scheint somit eine andere Proteinregion zu beeinflussen als Isovaleriansäure oder HM70 und kann daher diese beiden in ihrer Wirkung verstärken.

3.4 Ausbau des Testsystems

Nachdem aus vorherigen Experimenten bekannt war, dass die aktiven Substanzen an verschiedene Bereiche von Ras und Raf binden, sollten über unterschiedlich lange Ras- und Raf-Fusionsanteile die Bindungsdomänen der Substanzen näher charakterisiert werden. Dies führte zu einer Umstellung des Testsystems auf Zwei-Hybrid-Plasmide von Stratagene, da die bisher verwendeten pPC-Zwei-Hybrid-Vektoren zum einen in ihrer Sequenz nicht vollständig bekannt waren und sich zum anderen aufgrund ihrer Größe Probleme beim Klonieren ergaben. Ein Vergleich des Aufbaus der pPC- und Stratagene-Vektoren findet sich in Kapitel 2.1.6.

3.4.1 Varianten des Ras-Proteins

Aus dem Vektor pPC97HrasG12Vverk vom MPI, Dortmund, wurden zwei Ras-Sequenzen mittels PCR amplifiziert und nach Restriktion mit *EcoRI/SalI* in den Stratagene-Vektor pBD ligiert. Das erste PCR mit dem Primerpaar „Ras back Eco1N“ und „RasRBD for Sal91“ umfasst die Sequenz, die für die ersten 95 Aminosäuren von RasG12V codiert. Die zweite, mit den Primern „Ras back Eco1N“ und „Ras for Sal190“ amplifizierte Sequenz entspricht dem vollständigen RasG12V-Gen, wobei jedoch von Dr. B. Jaitner durch eine Punktmutation ein zusätzliches Stopp-Codon eingeführt worden war. Nach Translation ist das Ras-Protein C-terminal verkürzt und weist nur eine Länge von 166 Aminosäuren auf.

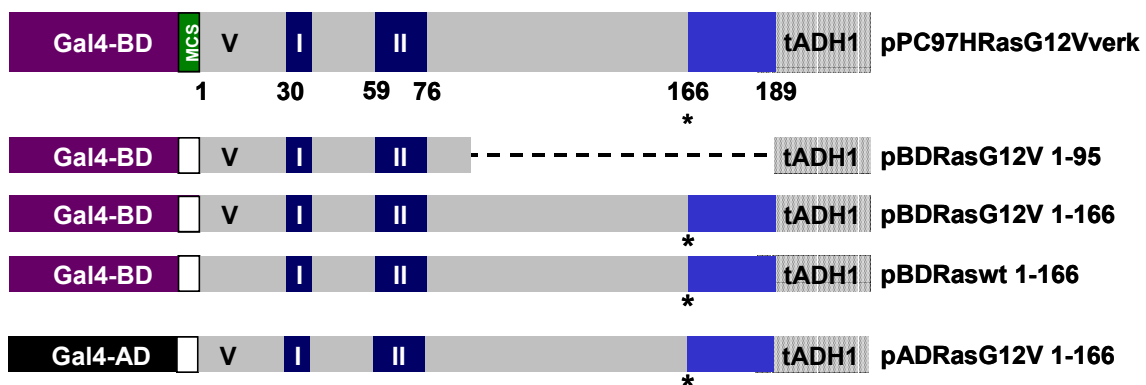


Abb. 3.4-1: Übersicht über die neuen Ras-Konstrukte

Ausgehend von pPC97HrasG12Vverk wurden verschiedene Sequenzen in die Stratagene-Vektoren pBD und pAD kloniert, sodass sich die dargestellten Ras-Konstrukte ergeben. Die arabischen Zahlen indizieren Aminosäuren von Ras; die römischen Ziffern markieren die switch-1- und switch-2-Region, „*“ steht für ein Stopp-Codon innerhalb der Sequenz.

Zusätzlich wurde das Ras-Konstrukt aus pBDRasG12V1-166 in den Vektor pAD nach *EcoRI/SalI*-Restriktion ligiert, sodass Ras (AS 1-166) in Fusion sowohl mit der DNA-

bindenden Domäne (BD) als auch mit der transkriptionsaktivierenden Domäne (AD) in Hefe exprimiert werden konnte. Durch eine *in-vitro*-Mutagenese (s. Kap. 2.2.3-2.2.4) wurde außerdem die Punktmutation, die zur konstitutiv aktiven Mutante RasG12V führt, verändert, sodass nun auch die Sequenz für das Wildtyp-Ras-Protein zur Verfügung stand. Diese wurde mittels *EcoRI/SalI*-Restriktion aus dem Phagemid-Vektor pET-22b in den Stratagene-Vektor pBD ligiert.

Alle neuen pBD-Konstrukte wurde mit Hilfe der Sequenzierprimer „pPC97BD seq“, „h-ras-hyb“ oder „pPC97Ras seq“, das pAD-Konstrukt mit den Primern „5'-AD“ und „3'-AD“ sequenziert und die korrekte Ligation bestätigt.

3.4.2 Varianten des Raf-Proteins

Mittels PCR wurden die Raf-Gene aus dem Vektor pPC86ssHCRC2Raf amplifiziert und nach Restriktion mit *EcoRI/SalI* bzw. *EcoRI/XbaI* in den Stratagene-Vektor pAD ligiert. Die verwendeten Primer sind in Kap. 2.1.4 in einer Skizze eingezeichnet und wurden wie folgt zur Klonierung der neuen Konstrukte eingesetzt:

Vektorname	back-Primer	for Primer
pADRaf 1-131	„Raf back Eco1N“ (1)	„RafRBD for Sal131“ (4),
pADRaf 51-131	„Raf back Eco50“ (2)	„RafRBD for Sal131“ (4),
pADRaf 1-194	„Raf back Eco1N“ (1)	„Raf for Xba192“ (5),
pADRaf 51-194	„Raf back Eco50“ (2)	„Raf for Xba192“ (5),
pADRaf 1-275	„Raf back Eco1N“ (1)	„Raf for Xba275“ (6),
pADRaf 51-275	„Raf back Eco50“ (2)	„Raf for Xba275“ (6),
pADRaf 131-194	„RafCRD back Eco131“ (3)	„Raf for Xba192“ (5).

Ähnlich wie bei den Ras-Konstrukten wurde außerdem die regulatorische Domäne von Raf (AS 1-275) aus pADRaf1-275 über *EcoRI/PstI*-Restriktion in den pBD-Vektor zu pBDRaf1-275 kloniert, um Raf sowohl in Fusion mit der transaktivierenden als auch mit der DNA-bindenden Domäne exprimieren zu können.

Alle neuen Raf-Konstrukte in den Stratagene-Vektoren wurden mit Hilfe der Primer „5'-AD“, „3'-AD“, „Rafhyb113back“, „Rafhyb147for“ oder „pPC97BD seq“ sequenziert und die korrekte Sequenz bestätigt.

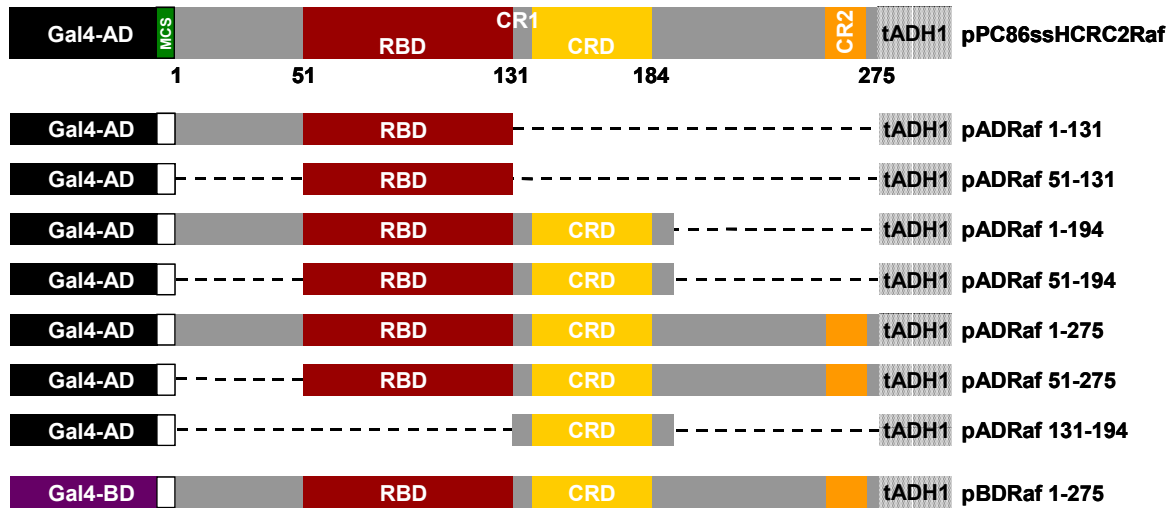


Abb. 3.4-2: Übersicht über die neuen Raf-Konstrukte

Ausgehend von pPC86ssHCRC2Raf wurden verschiedene Sequenzen in die Stratagene-Vektoren pAD und pBD kloniert, sodass sich die dargestellten Raf-Konstrukte ergeben. Die arabischen Zahlen stehen für Aminosäuren von Raf.

3.4.3 Umklonierung der Multiple Cloning Site (MCS)

Die bisher verwendeten pPC-Vektoren unterscheiden sich in einigen Plasmid-Anteilen von den Stratagene-Vektoren. Einer der unterschiedlichen Bereiche ist die Multiple Cloning Site (MCS), sodass sich je nach verwendetem Vektor andere Aminosäuren innerhalb der Fusionsproteine zwischen der verwendeten Gal4-Domäne und Ras bzw. Raf befinden, was eventuell eine neue Bindungsstelle für die Testsubstanzen ausbilden könnte. Die Unterschiede sind in Abb. 3.4-3 dargestellt.

	Gal4AD	MCS	1 Raf
pAD Raf 1-	P K K E	<u>I E F Q R S</u>	M E H I
pPC86ssHCRC2 Raf	P K K E	<u>G G S N N P G R I Q R S</u>	M E H I
	Gal4AD	MCS	51 RBD
pAD Raf 51-	P K K E	<u>I E F</u>	S K T S
pPC86ssRafRBD	P K K E	<u>G G S N N P G R I Q R S D P</u>	S K T S
	Gal4BD	MCS	1 Ras
pBDRasG12V 1-	L T V S	<u>P E F Q I N S</u>	M T E Y
pPC97HRasG12Vverk	L T V S	<u>S R S T P G I Q I N S</u>	M T E Y

Abb. 3.4-3: Unterschiede in der MCS von pPC- und Stratagene-Vektoren

Angegeben sind jeweils die letzten Aminosäuren der Gal4-Domäne (bis AS 881=E bei AD bzw. AS 147=S bei BD), die Aminosäuren der MCS (unterstrichen) und die ersten vier Aminosäuren von Raf, RafRBD oder Ras. Die fettgedruckten Zahlen kennzeichnen die Aminosäuren in den vollständigen Raf- bzw. Ras-Proteinen.

Die Vektoren pPC86ssHCRC2Raf und pAD86Raf1-275 wurden innerhalb der transkriptionsaktivierenden Domäne mit *MluI* und innerhalb der Raf-Sequenz mit *SalI* geschnitten und das Fragment von pPC86ssHCRC2Raf, in dem sich auch die MCS befindet, in den verbliebenen Teil von pAD86Raf1-275 ligiert.

Das neue Konstrukt „pBD97RasG12V1-166“ wurde nach *HpaI/NarI*-Restriktion von pBDRasG12V1-166 und pPC97HrasG12Vverk und anschließender Ligation des Fragmentes aus pPC97HrasG12Vverk in den Restvektor pBDRasG12V1-166 erhalten.



Abb. 3.4-4: Neue Stratagene-Konstrukte mit der MCS aus den pPC-Vektoren

Die neuen Vektoren pBD97RasG12V1-166 und pAD86Raf1-275 wurden mit Hilfe einer Restriktionsanalyse und durch Sequenzieren mit den Primern „pPC97BD seq“, „RasforBD seq“ bzw. „5'-AD“ überprüft.

3.4.4 Änderung des bakteriellen Selektionsmarkers

Der pBD-Vektor von Stratagene vermittelt als einziger der verwendeten Vektoren den Bakterien eine Chloramphenicol-Resistenz. Sie beruht auf der Expression einer Acetyltransferase, die Chloramphenicol acetyliert und damit die Inhibierung der Peptidyltransferase der großen Untereinheit der Prokaryonten-Ribosomen verhindert. Um einen möglichen Einfluss dieses Enzyms auf die Testsubstanzen bzw. auf die Fusionsproteine auszuschließen, wurde die Selektionskassette von pAD, die eine Ampicillin-Resistenz vermittelt, in pBD umkloniert. Durch Restriktion der Vektoren pBDRasG12V1-166 und p53 mit den Enzymen *SnaBI* und *NotI*, die im Hefe- bzw. Bakterien-Replikationsursprung schneiden, wurden Fragmente erhalten, die nach Ligation das neue Konstrukt pBDampRasG12V1-166 ergaben. Zur Kontrolle wurde eine Restriktionsanalyse mit Hilfe der Enzyme *HindIII*, *SnaBI/NotI* und *NarI/PvuI* durchgeführt.

3.4.5 p53/SV40-Kontrollkonstrukte

Die bisher verwendeten Kontrollkonstrukte p53 und pSV40 stammten von der Firma Stratagene, das heißt der Vektoraufbau entsprach den pAD- und pBD-Vektoren, nicht aber

3. Ergebnisse

den pPC-Vektoren. Um nun auch eine passende Kontrolle für die ursprünglichen Plasmide zu haben, sollte die Sequenz des Tumorsuppressorproteins p53 in den Vektor pPC97 und die Sequenz für das große T-Antigen des Simian Virus 40 in den Vektor pPC86 ligiert werden.

Da die Sequenz des Vektors pPC97 nicht genau bekannt war, wurde schließlich eine *HindIII/SalI*-Restriktion gewählt, wobei die Sequenz für die DNA-bindende Gal4-Domäne und für das Tumorsuppressorprotein aus dem Vektor p53 herausgeschnitten und in den linearisierten Vektor pPC97 ligiert wurde. Da Start- und Stopp-Codon innerhalb dieses Fragmentes liegen, ist trotz unbekannter Sequenz kein Frameshift zu erwarten. Das neue Konstrukt pPC97p53 wurde mit Hilfe der Primer „Gal4BDseq“ und „p53seq“ sequenziert.

Das Konstrukt pPC86SV40 wurde durch *MluI/SalI*-Restriktion der Vektoren pPC86 und pSV40 und anschließender Ligation der entsprechenden Fragmente erhalten. Durch die Verwendung des Plasmids pPC86 statt pPC86ssHCRC2Raf konnte eine Restriktionsanalyse mit *EcoRI*, sowie die Sequenzierung mit den Primern „SV40seq“ und „pPC86seq“ zur Kontrolle durchgeführt werden.

3.4.6 Übersicht über die neuen Hefestämme im Zwei-Hybrid-System

Eine Übersicht über die neuen Test- und Kontrollstämme nach Doppeltransformation der verschiedenen Konstrukte ist in Tab. 3.4-1 zusammengestellt. Eine Kombination aus pPC-Vektor und Stratagene-Vektor zur Transformation war dabei aufgrund der Selektionsmarker leider nicht möglich.

Hefen	Plasmid mit Gal4-BD	Plasmid mit Gal4-AD	Exprimiertes Proteinpaar (AS)
Teststamm A “Ras/Raf1-131”	pBDRasG12V1-166	pADRaf1-131	BD-RasG12V (1-166) AD-Raf (1-131)
Teststamm B “Ras/Raf51-131”	pBDRasG12V1-166	pADRaf51-131	BD-RasG12V (1-166) AD-Raf (51-131)
Teststamm C “Ras/Raf1-194”	pBDRasG12V1-166	pADRaf1-194	BD-RasG12V (1-166) AD-Raf (1-194)
Teststamm D “Ras/Raf51-194”	pBDRasG12V1-166	pADRaf51-194	BD-RasG12V (1-166) AD-Raf (51-194)
Teststamm E “Ras/Raf1-275”	pBDRasG12V1-166	pADRaf1-275	BD-RasG12V (1-166) AD-Raf (1-275)
Teststamm F “Ras/Raf51-275”	pBDRasG12V1-166	pADRaf51-275	BD-RasG12V (1-166) AD-Raf (51-275)

Teststamm CRD "Ras/Raf131-194"	pBDRasG12V1-166	pADRAF131-194	BD-RasG12V (1-166) AD-Raf (131-194)
Teststamm M "Ras95/Raf1-131"	pBDRasG12V1-95	pADRAF1-131	BD-RasG12V (1-95) AD-Raf (1-131)
Teststamm N "Ras95/Raf51-131"	pBDRasG12V1-95	pADRAF51-131	BD-RasG12V (1-95) AD-Raf (51-131)
Teststamm O "Ras95/Raf1-194"	pBDRasG12V1-95	pADRAF1-194	BD-RasG12V (1-95) AD-Raf (1-194)
Teststamm P "Ras95/Raf51-194"	pBDRasG12V1-95	pADRAF51-194	BD-RasG12V (1-95) AD-Raf (51-194)
Teststamm Q "Ras95/Raf1-275"	pBDRasG12V1-95	pADRAF1-275	BD-RasG12V (1-95) AD-Raf (1-275)
Teststamm R "Ras95/Raf51-275"	pBDRasG12V1-95	pADRAF51-275	BD-RasG12V (1-95) AD-Raf (51-275)
Teststamm W "Raswt/Raf1-275"	pBDRaswt1-166	pADRAF1-275	BD-Raswt (1-166) AD-Raf (1-275)
Teststamm EU "Raf1-275/Ras"	pBDRaf1-275	pADRasG12V1-166	BD-Raf (1-275) AD-RasG12V (1-166)
Teststamm 86 "Ras/Raf 86"	pBDRasG12V1-166	pAD86Raf1-275	BD-RasG12V (1-166) AD-MCS86-Raf (1-275)
Teststamm 97 "Ras97/Raf"	pBD97RasG12V1-166	pADRAF1-275	BD-MCS97-RasG12V (1-166) AD-Raf (1-275)
Teststamm Z "Ras97/Raf 86"	pBD97RasG12V1-166	pAD86Raf1-275	BD-MCS97-RasG12V (1-166) AD-MCS86-Raf (1-275)
Teststamm AmpC "Ras/Raf1-194 Amp"	pBDAMPRasG12V1-166	pADRAF1-194	BD-RasG12V (1-166) AD-Raf (1-194)
Teststamm AmpE "Ras/Raf1-275 Amp"	pBDAMPRasG12V1-166	pADRAF1-275	BD-RasG12V (1-166) AD-Raf (1-275)
Kontrollst. KpPC „p53/SV40 KpPC“	pPC97p53	pPC86SV40	BD-p53 (72-390) AD-SV40 (84-708)

Tab. 3.4-1: Übersicht über Hefestämme im Zwei-Hybrid-System

Angegeben sind die verwendete Hefebezeichnung für Excel-Graphen, die zur Transformation eingesetzten Plasmide sowie die exprimierten Fusionsproteine.

Nicht aufgeführt sind die Kontroll-Transformation von „pAD/pBD“, „pAD/pBDRasG12V1-166“, „pADRAF1-275/pBD“, „pADRAF1-275/pBDRaf1-275“, „pADRasG12V1-166/pBDRasG12V1-166“ und „pADRaswt1-166/pBDRasG12V1-166“, die alle zu keiner detektierbaren β -Galactosidase-Aktivität der resultierenden Transformanden führten.

3. Ergebnisse

Die korrekte Transformation der Stämme A-F, W, EU, 86, 97, Z und KpPC wurde durch Isolierung der Plasmide aus den Hefen und anschließender Restriktionsanalyse mit *HindIII* bzw. bei KpPC mit *EcoRI/SacI* bestätigt. Außerdem sollten die exprimierten Fusionsproteine mittels Western Blot nachgewiesen werden. Die Größe der Fusionsproteine ist in Tab. 3.4-2 zusammengefasst.

Gal4-	Bezeichnung der Hefestämme											
AK	A	B	C	D	E	F	86	97	Z	EU	W	KpPC
BD	35,5	35,5	35,5	35,5	35,5	35,5	35,5	36	36	47,4	35,5	52,1
AD	30,3	24,3	37,3	31,3	46,2	40,1	46,9	46,2	46,9	34,3	46,2	84

Tab. 3.4-2: Übersicht über die Größe der exprimierten Fusionsproteine in kDa

Die Größe der Fusionsproteine mit der DNA-bindenden (BD) bzw. der transkriptionsaktivierenden Domäne (AD) sind für die jeweiligen Hefestämme in kDa angegeben.

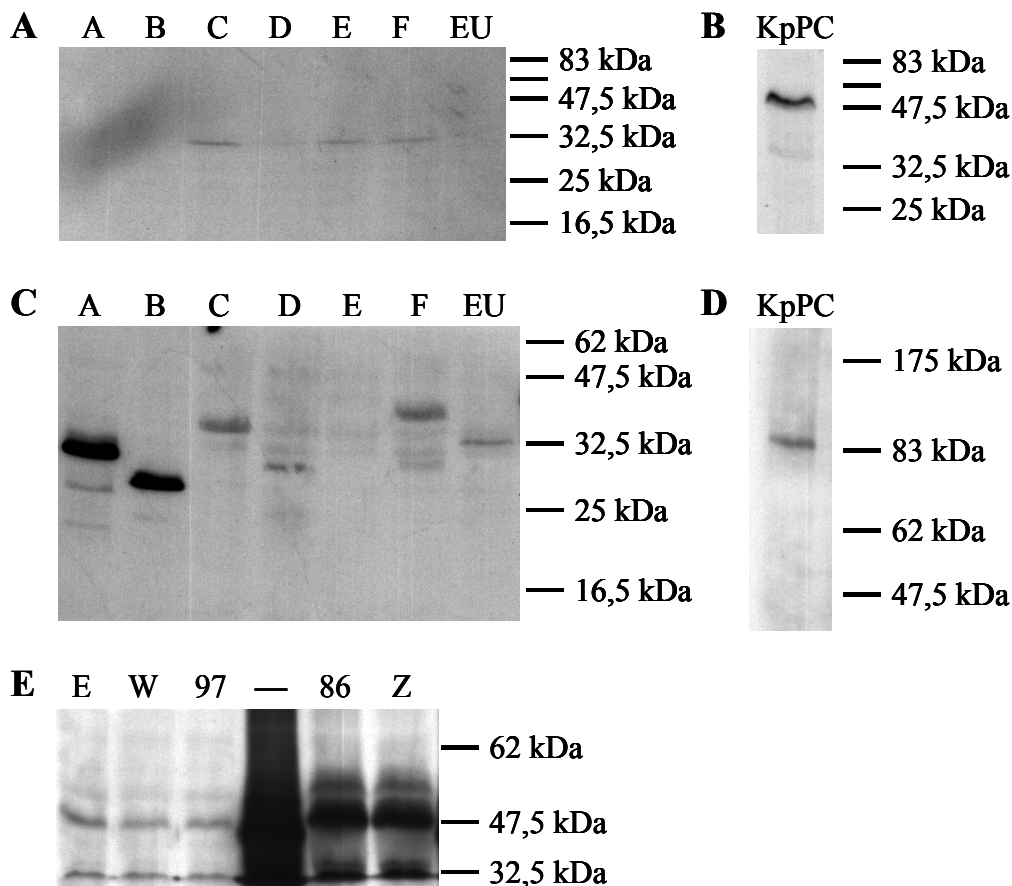


Abb. 3.4-5: Western Blot Analyse der Test- und Kontrollstämme

Aufgetragen sind jeweils ungefähr gleiche Proteinmengen (s. Kap. 2.3.1 und 2.5.4). Der erste Antikörper wurde entsprechend dem Stratagene-Protokoll eingesetzt, der zweite Antikörper (anti-Maus-IgG-POD) in einer Verdünnung 1:10.000 (s. Kap. 2.3.3).

A: 15 %-iges Gel; 1. Antikörper: anti-Gal4-BD (Stratagene); Entwicklung des Filmes nach 3h

B: 10 %-iges Gel; 1. Antikörper: anti-Gal4-BD (Stratagene); Entwicklung des Filmes nach 4h

C: 15 %-iges Gel; 1. Antikörper: anti-Gal4-AD (Stratagene); Entwicklung des Filmes nach 3h

D: 10 %-iges Gel; 1. Antikörper: anti-Gal4-AD (Stratagene); Entwicklung des Filmes nach 4h

E: 15 %-iges Gel; 1. Antikörper: anti-Gal4-AD (Stratagene); Entwicklung des Filmes nach 4h

Leider konnte mit dem Gal4BD-Antikörper nur bei dem Kontrollstamm KpPC ein deutliches Signal erhalten werden (s. Abb. 3.4-5A/B). Die Expression der AD- und BD-Fusionsproteine ausgehend von den Stratagene-Vektoren ist aufgrund des verkürzten Promotors niedriger als bei den pPC-Vektoren und im Western zum Teil nur schwer nachzuweisen. Nur die AD-Fusionsproteine der Stämme A, B, 86 und Z werden deutlich besser exprimiert (s. Abb. 3.4-5C/D/E).

3.4.7 Vergleich der Interaktionsstärken der Fusionsproteine

Die verschiedenen Stämme besitzen je nach Interaktionsstärke der Fusionsproteine und in Abhängigkeit von deren Expressionsrate unterschiedliche β -Galactosidase-Grundaktivitäten (s. Abb. 3.4-6), die sich folgendermaßen beschreiben und vergleichen lassen:

- Die Teststämme, die das verkürzte Ras-Protein bis zu Aminosäure 95 exprimieren (Teststamm M-R), zeigten keinerlei Grundaktivität der β -Galactosidase. Anscheinend kann diese Mutante nicht mehr mit Raf interagieren, vielleicht weil entweder für die Bindung wichtige Bereiche fehlen oder weil keine korrekte Proteinstruktur mehr ausgebildet werden kann.
- Die Aktivität des Teststammes „Ras/Raf CRD“ konnte selbst über das sehr sensitive Chemilumineszenz-Substrat Galacton Star nicht bestimmt werden. Die Ras-bindende Domäne (AS 51-131) von Raf, die in dieser Mutante fehlt, ist offensichtlich essentiell für eine Interaktion mit Ras und somit für eine messbare β -Galactosidase-Aktivität.
- Die pPC-Konstrukten weisen aufgrund des vollständigen ADH1-Promotors im Vergleich zu den Stratagene-Vektoren eine deutlich höhere Grundaktivität bei gleichen Interaktionspartnern auf: Vergleich der Stämme 3.3 mit E (RasG12V1-166 und Raf1-275), 9 mit B (RasG12V1-166 und RafRBD=Raf51-131), K mit KpPC (p53 und SV40).
- Einige Protein-Protein-Interaktionen sind im Zwei-Hybrid-System von der Konstruktion der Fusionsproteine abhängig, das heißt sie führen nur bei einer der beiden Fusionsalternativen zu einer β -Galactosidase-Aktivität (Estojak, J. et al., 1995). Der Teststamm E „Ras/Raf1-275“ und der Teststamm EU „Raf1-275/Ras“ weisen jedoch eine ähnliche Aktivität auf. Somit ist die Interaktion zwischen Ras und Raf unabhängig vom Aufbau der Fusionsproteine.

3. Ergebnisse

- Der Austausch einer der beiden Multiple Cloning Sites zwischen der Sequenz für die Gal4-Domäne und für Ras bzw. Raf wie bei den Teststämmen 97 und 86 führt zu einer erstaunlich großen Änderung der Interaktionsstärke der Fusionsproteine, die wahrscheinlich durch Abwandlungen der Proteinstruktur durch die verbindenden Aminosäuren bedingt ist. Die Aktivität des Teststammes Z, der beide Fusionsproteine mit der entsprechenden MCS aus den pPC-Vektoren exprimiert, ist im Vergleich zum Teststamm E nur leicht verändert.
- Die Erhöhung der β -Galactosidase-Aktivität durch die Expression der ersten 51 Aminosäuren (Vergleich A mit B) von Raf wurde bereits von B. Jaitner beobachtet (Jaitner, B., 1997), die dies als eine bewegliche Schanierregion deutet, die die Interaktion mit Ras erleichtert.
- Die Interaktion der regulatorischen Domäne von Raf (AS 1-275) mit dem Wildtyp Ras-Protein ist deutlich schwächer als mit der konstitutiv aktiven Ras-Mutante RasG12V (Vergleich der Teststämme E und W).
- Der Änderung des Selektionsmarkers in pBD hat keinen Einfluss auf die Stärke der Interaktion der Fusionsproteine: Teststamm C und AmpC, sowie E und AmpE zeigen ähnliche Aktivitäten.

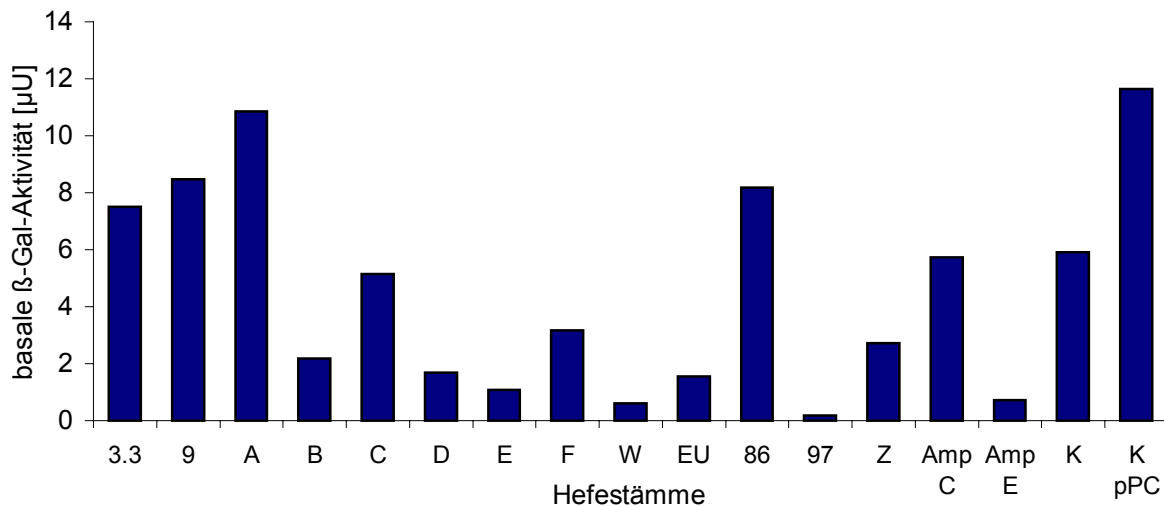


Abb. 3.4-6: Vergleich der basalen β -Galactosidase-Aktivitäten verschiedener Stämme

Angegeben sind die Grundaktivitäten der verschiedenen Test und Kontrollstämmen, deren genaue Bezeichnung und Beschreibung der Fusionsproteine in Tabelle 3.4-1 zu finden ist.

3.5 Ergebnisse mit dem modifizierten Testsystem

3.5.1 Arnika-Extrakt und -Tinktur

Arnika-Extrakt und -Tinktur wurden in verschiedenen Konzentrationen in diesem modifizierten Testsystem getestet. Ein Beispiel dieser Ergebnisse zeigt Abb. 3.5-1, bei dem der Einfluss verschiedener LPLC-Fractionen von Arnika-Tinktur auf die verschiedenen Test- und Kontrollstämme dargestellt ist.

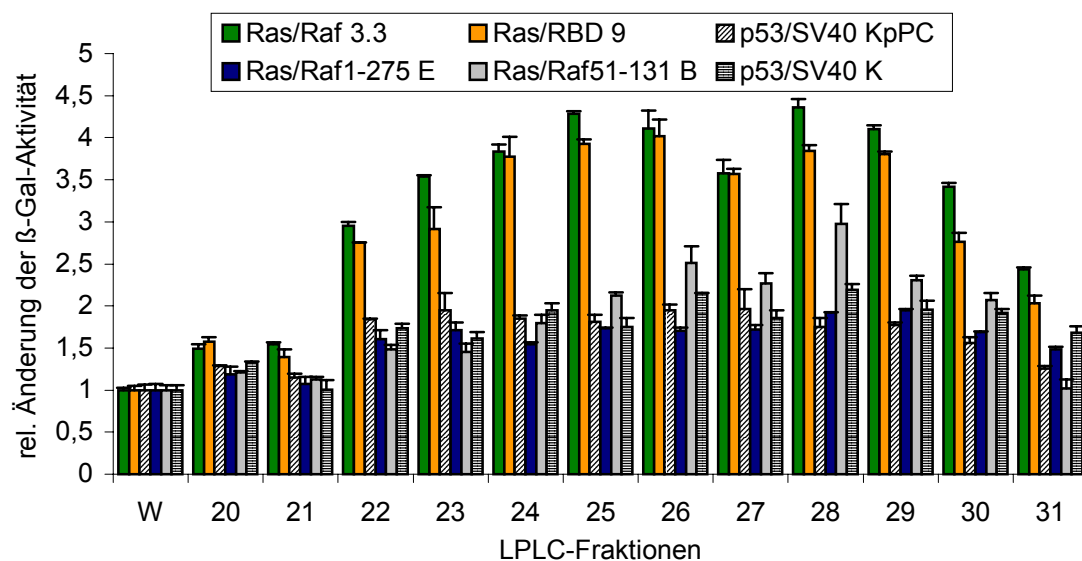


Abb. 3.5-1: Einfluss von LPLC-Fractionen auf verschiedene Hefestämme

Die gesammelten LPLC-Fractionen wurden mittels SpeedVac einrotiert und in 200 μ l Wasser aufgenommen. Je 10 μ l Fraktion wurden anschließend mit 140 μ l der Hefestämme o/n inkubiert und die Aktivität bestimmt. Wasser (W) diente dabei als Lösungsmittel.

Erstaunlicherweise führten die Fraktionen nach Inkubation nur bei den Teststämmen „Ras/Raf 3.3“ und „Ras/RBD 9“ zu einer Steigerung der β -Galactosidase-Aktivität, nicht jedoch bei den Stämmen, die die entsprechenden Fusionsproteine von den Stratagene-Vektoren aus exprimieren. Hier war die β -Galactosidase-Aktivität denen der Kontrollstämme vergleichbar.

Auch bei den Teststämmen 86, 97 und Z, die die Plasmide mit der ausgetauschten Multiple Cloning Site tragen, hatte die Inkubation mit den Arnika-Fractionen keinen Einfluss auf die β -Galactosidase-Aktivität. Ebenso wenig war ein Effekt der Arnika-Fractionen bei den Hefestämmen AmpC und AmpE zu beobachten, deren Zellen die Konstrukte mit den ausgetauschten Resistenzmarkern tragen.

Kestoheptaose konnte aufgrund fehlenden Materials leider nicht an den verschiedenen Hefestämmen getestet werden.

3.5.2 Isovaleriansäure und Analoga

Isovaleriansäure wurde in verschiedenen Konzentrationen an allen Test- und Kontrollstämmen eingesetzt: einen Auszug aus den Ergebnissen zeigt Abb. 3.5-2. Ähnlich wie bei Arnika zeigte sich nach Inkubation keine konzentrationsabhängige Steigerung der β -Galactosidase-Aktivität bei den Teststämmen E und B, die analoge Fusionsproteine exprimieren wie die Teststämme 3.3 und 9.

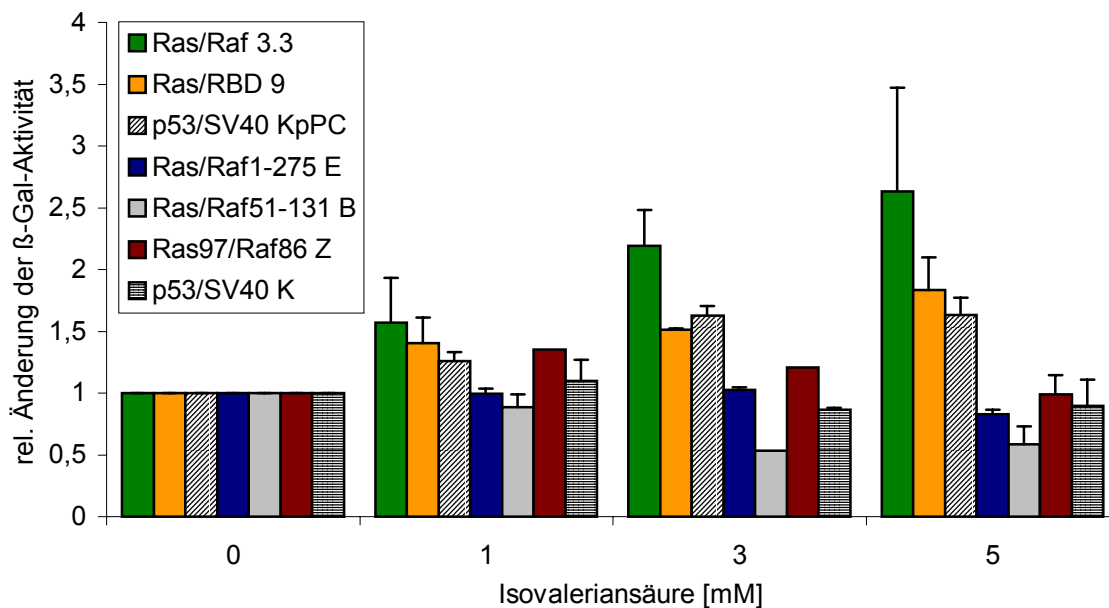


Abb. 3.5-2: Einfluss von Isovaleriansäure auf verschiedene Hefestämme

Verschiedene Test- und Kontrollstämmen wurden mit Isovaleriansäure in den Endkonzentration von 1-5 mM o/n inkubiert und die relative β -Galactosidase-Aktivität in Bezug auf das Lösungsmittel Wasser bestimmt.

Dagegen führt jedoch die Inkubation mit Isovaleriansäure in ähnlichem Ausmaß wie beim Teststamm 9 zu einer konzentrationsabhängig Steigerung der Enzymaktivität im Hefestamm KpPC, der die Kontrollproteine in Fusion mit den Gal4-Domänen der pPC-Vektoren exprimiert. Der Kontrollstamm K, der mit den Stratagene-Kontrollplasmiden transformiert wurde, wird dagegen nicht beeinflusst. Auch der Austausch der MCS bei den Plasmiden im Stamm Z sowie die Änderung des Selektionsmarkers führten zu keiner Beeinflussung der Enzymaktivität. Der Effekt von Isovaleriansäure ist demnach vom Aufbau der pPC-Vektoren abhängig und insofern nicht Ras/Raf-spezifisch.

3.5.3 T-Substanzreihe

Ähnliches wie mit den Arnika-Proben war leider auch mit sämtlichen T-Verbindungen von Dr. L. Hahn zu beobachten: Die β -Galactosidase-Aktivität der Stratagene-Vektoren tragenden Teststämme wurde durch die Inkubation nicht beeinflusst. Als Beispiel sind einige Ergebnisse der Substanz T129 in Abb. 3.5-3 aufgeführt. Nur die Enzymaktivitäten der pPC-Teststämme 3.3 und 9 wurden durch Inkubation mit T129 gesteigert; sämtliche Stratagene-Teststämme zeigten keine Steigerung der β -Galactosidase-Aktivität. Die Aktivitäten der Kontrollstämme KpPC und K wurden durch Zugabe von T129 nicht konzentrationsabhängig beeinflusst. Insofern scheint hier wiederum ein anderer Mechanismus vorzuliegen als bei der Inkubation mit Isovaleriansäure.

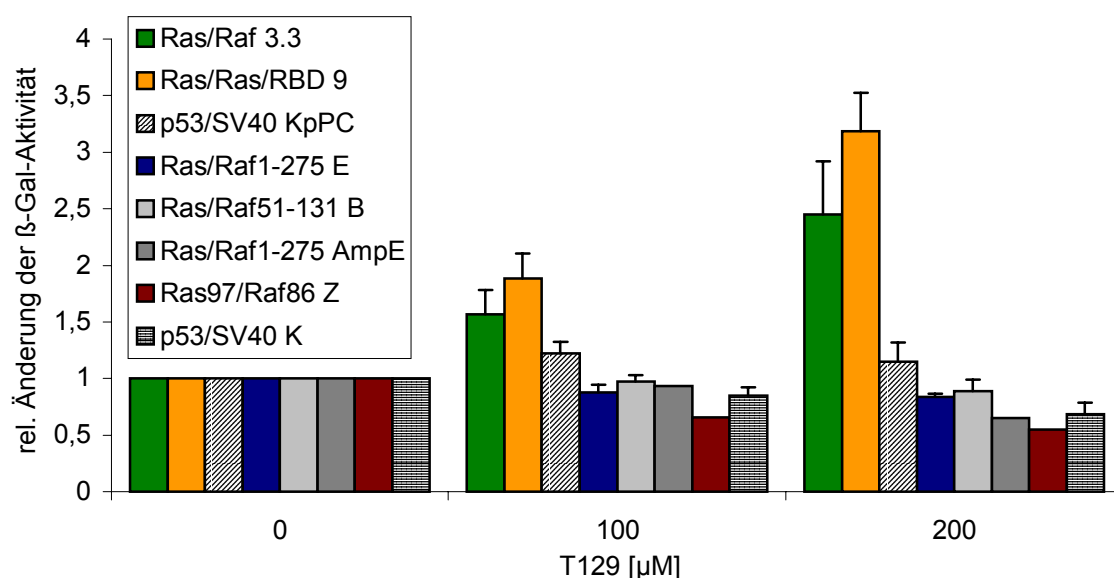


Abb. 3.5-3: Änderung der β -Galactosidase-Aktivität der Hefestämme durch T129

Die angegebenen Hefestämme wurden mit T129 in einer Endkonzentration von 100 oder 200 μ M o/n inkubiert und der Effekt auf die β -Galactosidase-Aktivität durch Vergleich mit der Inkubation mit Lösungsmittel (1:1 DMSO/Wasser (V/V)) berechnet.

3.5.4 JS-Substanzen

Auch bei den JS-Substanzen von Dr. Schweppenhäuser zeigte sich im Gegensatz zu einer Inkubation mit den pPC-Teststämmen „Ras/Raf 3.3“ und „Ras/RBD 9“ keine Steigerung der β -Galactosidase-Aktivität mit den Stratagene-basierten Teststämmen. Die Enzymaktivität des pPC-Kontrollstammes KpPC wurde nicht beeinflusst. Die Interaktionsmechanismen der JS-Substanzen bleibt somit unklar.

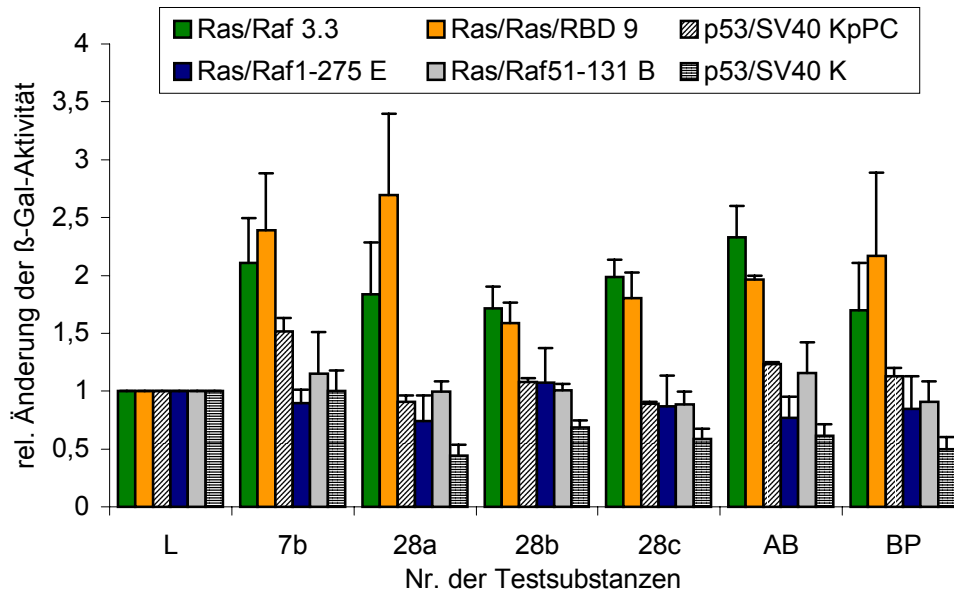


Abb. 3.5-4: Änderung der Enzymaktivität durch Inkubation mit JS-Substanzen

Die verschiedenen Hefestämme wurden mit 200 μM der angegebenen Substanzen o/n inkubiert und die relative Änderung der β -Galactosidase-Aktivität im Vergleich mit dem Lösungsmittel (1:1 DMSO/Wasser (V/V)) bestimmt.

3.5.5 HM-Substanzreihe

HM70 wurde ebenfalls an allen neuen Test- und Kontrollstämmen getestet. Im Gegensatz zu den bisher aufgeführten Substanzen führte die Inkubation mit HM70 auch zur Steigerung der β -Galactosidase-Aktivität einiger neuer Teststämmen (s. Abb. 3.5-5), sodass sich der mögliche Interaktionsbereich genauer definieren lässt.

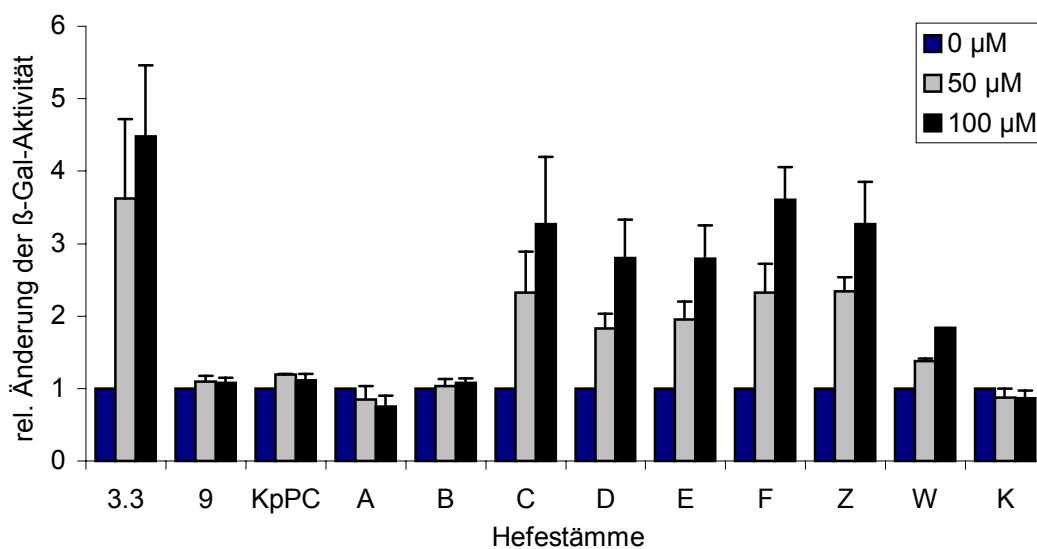


Abb. 3.5-5: Einfluss von HM70 auf die Test- und Kontrollstämmen

Verschiedene neue und alte Teststämmen wurden mit HM70 in Endkonzentration von 50-100 μM o/n inkubiert und die relative β -Galactosidase-Aktivität in Bezug auf das Lösungsmittel (1:1 DMSO/Wasser (V/V)) bestimmt.

Wie schon in Kap. 3.3-3 beschrieben, steigerte eine HM70-Inkubation konzentrationsabhängig und spezifisch nur die β -Galactosidase-Aktivität des Teststammes „Ras/Raf 3.3“, jedoch nicht des Teststammes „Ras/RBD 9“. In Übereinstimmung dazu scheint HM70 nur die Ras/Raf-Interaktion bei den Stämmen C-F, nicht jedoch bei A und B zu festigen, die ein verkürztes Raf-Protein bis zur AS 131 in Fusion mit der transaktivierenden Domäne exprimieren. Da jedoch eine Inkubation von HM70 mit den Stämmen C und D, die eine Raf-Mutante bis zur AS 194 herstellen, zu einer gesteigerten β -Galactosidase-Aktivität führte, scheint HM70 mit dem Bereich AS 131-194 von Raf zu interagieren. Diese als CRD bezeichnete Domäne konnte leider nicht alleine im Zwei-Hybrid-System getestet werden, da ihre Interaktion mit RasG12V ohne die Ras-bindende Domäne (AS 51-131) zu schwach war. Durch einzelne Aminosäureaustausche könnte in weiterführenden Experimenten der genaue Interaktionsbereich aufgeklärt werden.

Die Interaktion zwischen dem Wildtyp-Ras-Protein und der regulatorischen Domäne von Raf wurde ebenfalls konzentrationsabhängig durch HM70 verstärkt - jedoch in einem geringeren Ausmaß als die Wechselwirkung mit RasG12V (Stamm W im Vergleich zu E).

Um wichtige Strukturmerkmale dieser Substanzklasse und potentere Effektoren zu finden, wurden auch hier - ähnlich wie bei Isovaleriansäure - verschiedene Analoga getestet, die ebenfalls von Dr. Hell-Momeni synthetisiert wurden. Dabei wurde sowohl die Säurefunktion variiert, als auch die Ringgröße sowie die Verzweigung mit verschiedenen Substituenten. Die untersuchten Analoga sind in Abb. 3.5-6 mit Effekt auf die β -Galactosidase-Aktivitäten und in Abb 3.5.-7 mit ihren Strukturformeln aufgeführt.

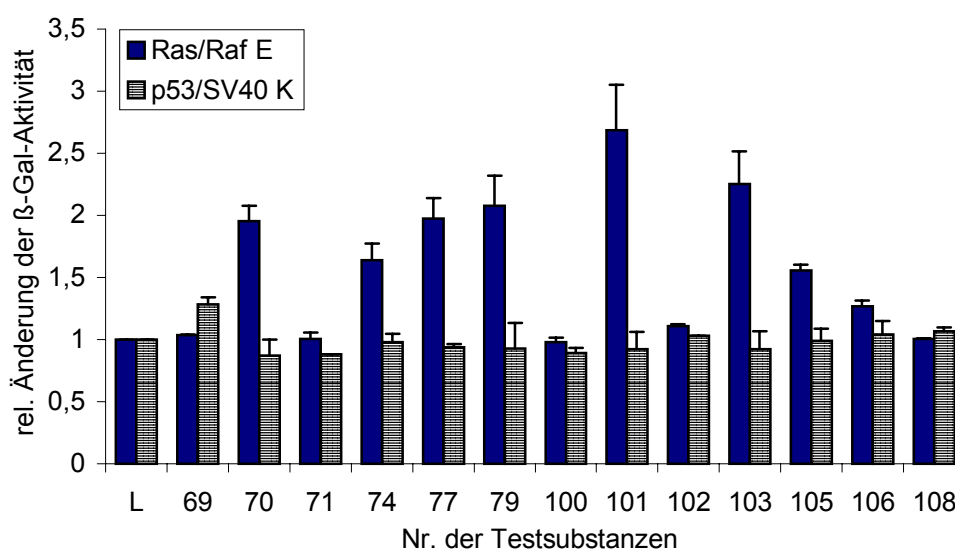
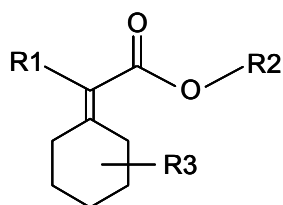
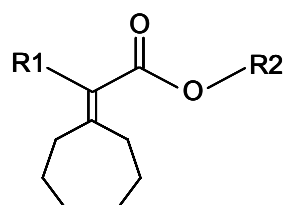


Abb.3.5-6: Effekt der verschiedenen Analoga bei einer Endkonzentration von 50 μ M

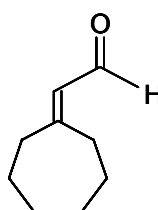
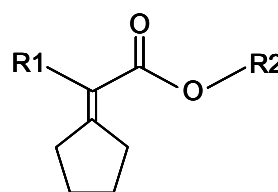
Die verschiedenen HM-Substanzen wurden in einer Endkonzentration von 50 μ M mit den Hefen o/n inkubiert und die Aktivität bezogen auf die Inkubation mit Lösungsmittel (L=1:1 DMSO/Wasser (V/V)) berechnet.

**HM69 bis HM87**

Substanz	R1	R2	R3
HM69	CH ₃	C ₂ H ₅	H
HM70	CH ₃	H	H
HM71	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
HM74	C ₂ H ₅	H	H
HM77	CH ₃	H	3'-Methyl
HM79	CH ₃	H	4'-Methyl
HM80	CH ₃	H	4'-Ethyl
HM81	CH ₃	H	4'-Propyl
HM82	CH ₃	H	4'-Isobutyl
HM83	CH ₃	H	4'-Phenyl
HM87	CH ₃	H	4'--(4-Methoxy)-phenyl

**HM100 bis HM103**

Substanz	R1	R2
HM100	CH ₃	C ₂ H ₅
HM101	CH ₃	H
HM102	H	C ₂ H ₅
HM103	H	H

**HM105****HM106/HM108**

Substanz	R1	R2
HM106	CH ₃	H
HM108	H	H

Abb. 3.5-6: Strukturanaloga von HM70

In Bezug auf die Aktivität der zuerst gefundenen Substanz HM70 können die Strukturanaloga grob in drei Gruppen eingeteilt werden:

1. Modifikationen, die zu einer moderaten Änderung der Aktivität führten:

Die Inkubation mit der Substanz HM76 mit einer Substitution in Position 3' hatte keinen signifikanten Effekt auf die β -Galactosidase-Aktivität, wohingegen eine Methylgruppe in Position 4' wie bei HM79 einen leichten Anstieg der Aktivität bewirkte.

2. Modifikationen, die die Enzymaktivität steigerten:

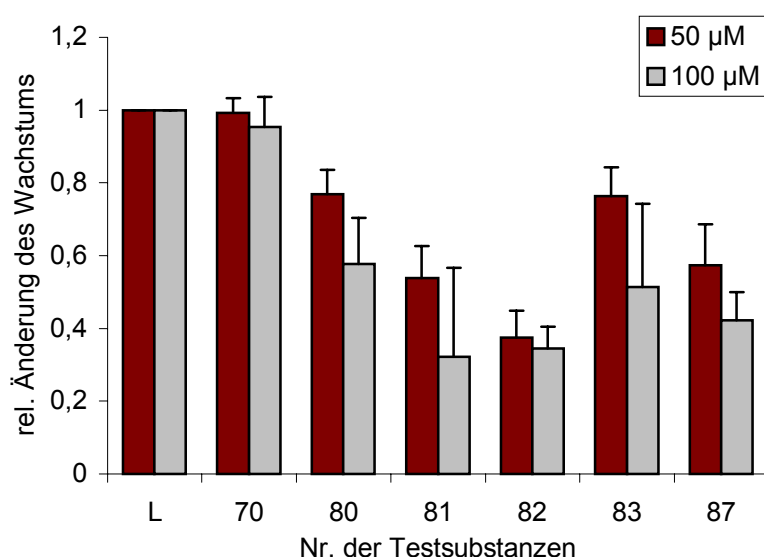
Die Vergrößerung des Alkyllinges zu Cycloheptanen bei den Substanzen HM101 und HM103 steigerte die β -Galactosidase-Aktivität in Bezug auf HM70 mit einem Cyclohexanring. Das beste Ergebnis erzielte HM101, welches sich durch die Länge der Säurekette von HM103 unterscheidet.

3. Modifikationen, die zu einer Verminderung der Aktivität führten:

Die Verlängerung der Propansäure in HM70 zu Butansäure in HM74 führte nach Inkubation der Substanzen mit den Hefen nur zu einer kleinen Änderung der

Enzymaktivität, jedoch ist bei Verringerung der Ringgröße zu Cyclopentanen bei HM106 und HM108 ein kompletter Verlust der Wirkung zu beobachten. Um den Einfluss der semicyclischen Doppelbindung zu überprüfen, wurde HM70 als ein 1:1-Gemisch aus dem semicyclischen und endocyclischen Isomer getestet. Auch hierbei wurde nach Inkubation eine starke Verminderung der β -Galactosidase-Aktivität gemessen. Der Austausch der Säurefunktion bei der Substanzen HM103 zu einer Aldehydfunktion in HM105 senkte signifikant den Einfluss auf die Ras/Raf-Interaktion. Sämtliche Ester aktiver Verbindungen (HM69 von HM70, HM71 von HM74, HM100 von HM101, HM102 von HM103) waren inaktiv. Die Säurefunktion scheint daher ebenso wie die semicyclische Doppelbindung ein wichtiger Strukturbestandteil für die Wirkung dieser Substanzreihe zu sein.

Aufgrund der Beobachtung, dass sowohl Substitutionen in 4'-Position als auch Ringvergrößerungen zu potenteren Effektoren führten, wurden die Substanzen HM80, HM81, HM82, HM83 und HM87 synthetisiert. Diese neue Gruppe von Cyclohexylidencarbonsäuren zeigte jedoch im Gegensatz zu HM70 starke, cytotoxische Effekte bei den Hefestämmen, sodass keine Aussage über die Wirkung auf die Ras/Raf-Interaktion möglich war.



Substanz	IC ₅₀
HM70	> 500 µM
HM80	125 µM
HM81	74 µM
HM82	81 µM
HM83	143 µM
HM87	130 µM

Abb. 3.5-8: Einfluss von HM 70/ 80/ 81/ 82/ 83/ 87 auf das Hefewachstum

Die Substanzen wurden in 50 µM Endkonzentration mit unterschiedlichen Hefestämmen o/n inkubiert und das relative Wachstum bezogen auf das Lösungsmittel (1:1 DMSO/Wasser (V/V)) berechnet. Die so bestimmten Werte aller Stämme wurden gemittelt. Die angegebenen IC₅₀-Werte wurden aus Konzentrationsreihen an verschiedenen Stämmen berechnet.

Eine Verlängerung des Substituenten in 4'-Position von einer Ethylgruppe in HM80 zu einer Propylgruppe in HM81 resultierte in einer stärkeren Hemmung des Hefewachstums.

3. Ergebnisse

HM82 mit einer Isobutyl-Gruppe in 4'-Position zeigte einen ähnlichen Effekt wie HM81. Die Korrelation zwischen größeren Substituenten und Wachstumshemmung wurde auch bei dem Vergleich von HM83 und HM87 gefunden, die sich durch eine Methoxygruppe unterscheiden (s. Abb. 3.5-8).

An den Test- und Kontrollstämmen 3.3, E, KpPC und E sollte außerdem geklärt werden, wie lange eine Inkubation der Hefen mit HM70 dauern muss, um einen Effekt zu beobachten. Dabei wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt:

- Variante **A**: HM70 wurde zum gleichen Zeitpunkt zu den Hefen pipettiert und die Inkubation nach unterschiedlichen Zeiten gestoppt.
- Variante **B**: HM70 wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu den Hefen gegeben und die Enzymaktivität aller Inkubationen gleichzeitig bestimmt.

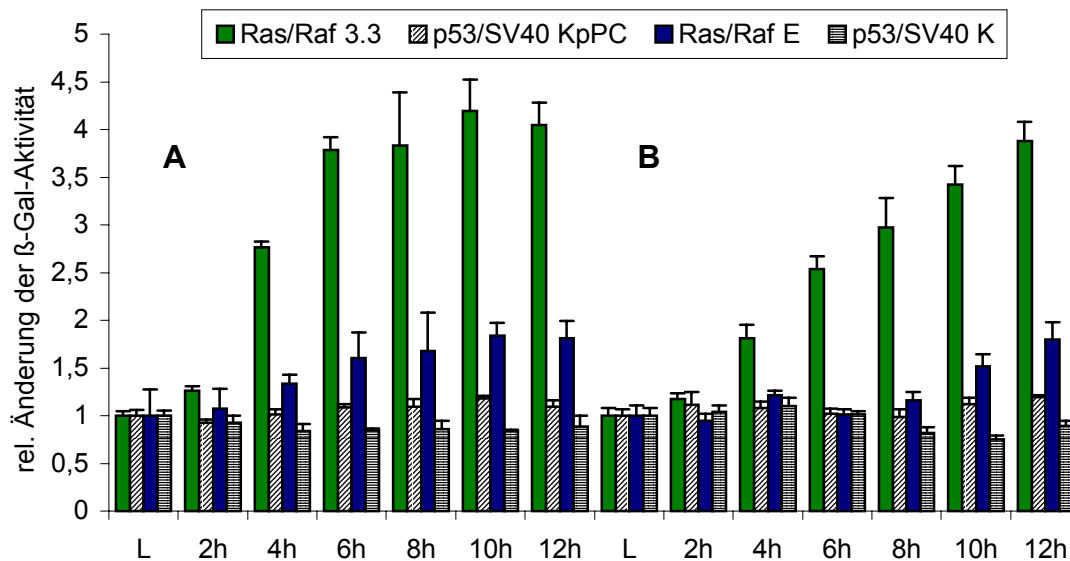


Abb. 3.5-9: Beeinflussung der Enzymaktivität durch HM70 bei Variante A und B

HM70 wurde in einer Endkonzentration von 100 μM für den angegebenen Zeitraum mit den Hefen inkubiert und die Enzymaktivität in Bezug auf das Lösungsmittel (L = 1:1 DMSO/Wasser (V/V)) anschließend als Faktor berechnet.

In beiden Varianten zeigte sich ein Effekt von HM70 auf den Teststamm 3.3 erst nach einer Mindestinkubationsdauer von 4h, auf den Stamm E sogar erst nach 6-10h. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Grundaktivitäten der Teststämme zurückzuführen: Die exprimierte β -Galactosidase-Menge liegt bei E bei kürzeren Inkubationsdauern unterhalb der Nachweisgrenze.

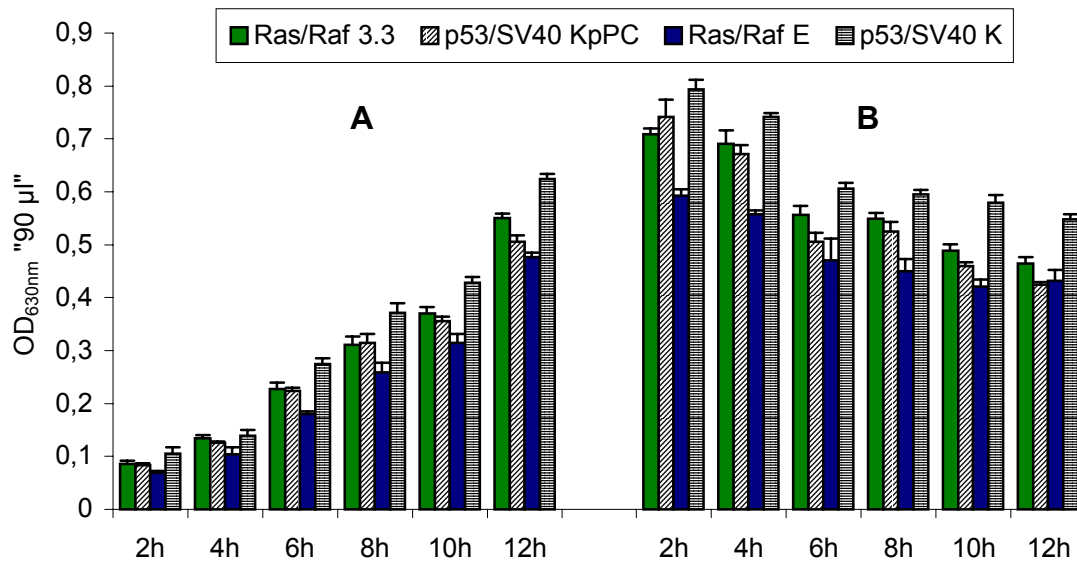


Abb. 3.5-10: Beeinflussung des Hefewachstums durch HM70 bei Variante A und B

HM70 wurde in einer Endkonzentration von 100 μM für den angegebenen Zeitraum mit den Hefen inkubiert. Angegeben ist die OD_{630} der Messung in 90 μl Z-Puffer. Als Lösungsmittel diente ein 1:1 Gemisch aus DMSO und Wasser (V/V).

Die ansteigenden Werte der OD_{630} "90 μl "-Messung in Variante A, bei der HM70 zum gleichen Zeitpunkt zu den Hefen pipettiert und die Inkubation nach unterschiedlichen Zeiten gestoppt wurde, entspricht ungefähr einer typischen Wachstumskurve, da das Wachstum nach 2h, 4h, ..., 12h gemessen wird. Bei Variante B können alle Hefen 12h lang wachsen. Sie werden jedoch unterschiedlich lange dabei mit HM70 bzw. dem Lösungsmittel inkubiert. Insofern sind absteigende OD_{630} "90 μl "-Werte bei der Zeitreihe 2h bis 12h zu beobachten, da das Lösungsmittel, ein DMSO/Wasser-Gemisch das Hefewachstum je nach Inkubationsdauer leicht beeinflusst. Eine Inkubation mit reinem Lösungsmittel für die gleichen Zeiträume zeigt bei beiden Varianten ähnliche Wachstumsgraphen; die beobachteten Effekte sind somit auf den Einfluss des Lösungsmittels und nicht auf HM70 zurückzuführen.

3.6 Ergebnisse der Säugerzellversuche

3.6.1 Aufbau der Methode

Die Ergebnisse des Zwei-Hybrid-Systems zeigen bereits erste Hinweis auf eine Verstärkung der Ras/Raf-Wechselwirkung. Dennoch handelt es sich dabei um ein artifizielles System, dessen Aussagekraft der Ergebnisse in einem zweiten unabhängigen Testsystem zusätzlich überprüft werden sollte. Als Organismen wurden dabei nicht *Saccharomyces*-

3. Ergebnisse

cerevisiae-Stämme, sondern im Hinblick auf einen möglichen pharmazeutischen Einsatzbereich verschiedene Säugerzelllinien gewählt. In diesem zweiten Testsystem sollten die im Zwei-Hybrid-System gefundenen, aktiven Ras/Raf-Effektoren die Interaktion der zelleigenen Ras- und Raf-Proteine verstärken und somit eine Aktivierung der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade bewirken. Eine Inkubation der Säugerzellen z. B. mit den HM-Substanzen sollte somit zu einer gesteigerten Phosphorylierung der nachgeschalteten Kinasen MEK und ERK führen, die sich durch spezifische phospho-MEK- bzw. phospho-ERK-Antikörper im Western Blot nachweisen lassen.

3.6.2 MTT-Assay

Vor der eigentlichen Testung wurde die Toxizität der HM-Substanzen während einer Inkubation mit den Säugerzellen mit Hilfe des MTT-Testes untersucht. Dieser Test beruht auf der Umsetzung des wasserlöslichen gelben Farbstoffes MTT durch Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien zu einem wasserunlöslichen blauen Formazan und ist somit ein Maß für die Vitalität der Zellen. Abgestorbene Zellen können die Reaktion nicht mehr durchführen. Das gebildete Formazan wird nach der Lyse der Zellen in saurem Milieu gelöst und photometrisch bestimmt. Die gemessene Extinktion bei 530nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630nm ist dabei direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen.

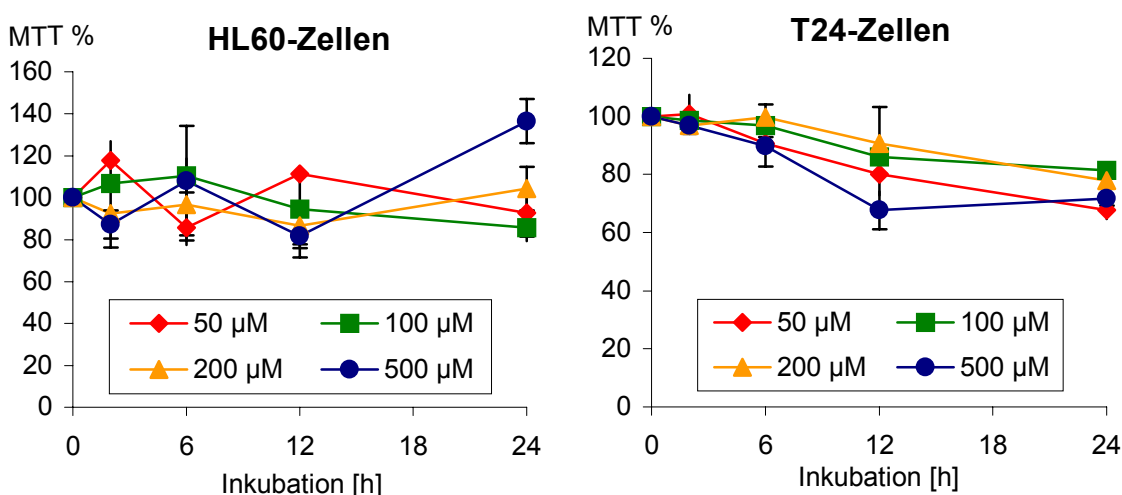


Abb. 3.6-1: Inkubation von HL60- und T24- Zellen mit 0-500 µM HM101a

HL60- ($1,2 \times 10^6$ Z/ml) und T24-Zellen (5×10^4 Z/ml) wurden mit unterschiedlichen Endkonzentrationen von HM101a (0-500 µM) für 2-24h inkubiert und das gebildete Formazan nach Lyse der Zellen photometrisch bestimmt. Angegeben sind die Prozentwerte bezogen auf eine Inkubation mit dem reinen Lösungsmittel Wasser (100 %) zum Zeitpunkt 0h. Zur besseren Darstellung des Verlaufs der Inkubation wurde ein verbundenes Punkte-Diagramm gewählt und nicht die übliche Säulendarstellung.

Für die Versuche wurde das Natrium-Salz der Substanz HM101a, das im Gegensatz zur Säure HM101 wasserlöslich ist, und die Zelllinien HL60, eine humane, promyeloische Leukämiezelllinie mit N-ras-Mutation im Codon 61 (Collins, S.J. et al., 1977; Collins, S.J., 1987) und T24, eine humane Blasenkarzinomzelllinie mit H-ras-Mutation im Codon 12 (Bubenik, J. et al., 1970; Bubenik, J. et al., 1973) verwendet. Die Inkubation mit HM101a beeinflusst das Wachstum der HL60-Zellen nicht, wohingegen die T24-Zellen eine Abnahme ihrer Vitalität nach 12-24h zeigen (s. Abb. 3.6-1).

Da die Zellen später sowohl in serumhaltigem als auch in serumfreiem Medium inkubiert werden sollten, wurde außerdem der Einfluss von HM101a auf die Vitalität der Zellen in An- und Abwesenheit von FCS getestet (s. Abb. 3.6-2). Bei den adhärennten T24-Zellen konnte die FCS-Konzentration auf 0,5 % gesenkt werden, während sie in serumfreiem Medium nicht in den 24well-Schalen anwuchsen. Die Endkonzentration von HM101a wurde mit 10 μ M deutlich geringer gewählt als bei den ersten Versuchen.

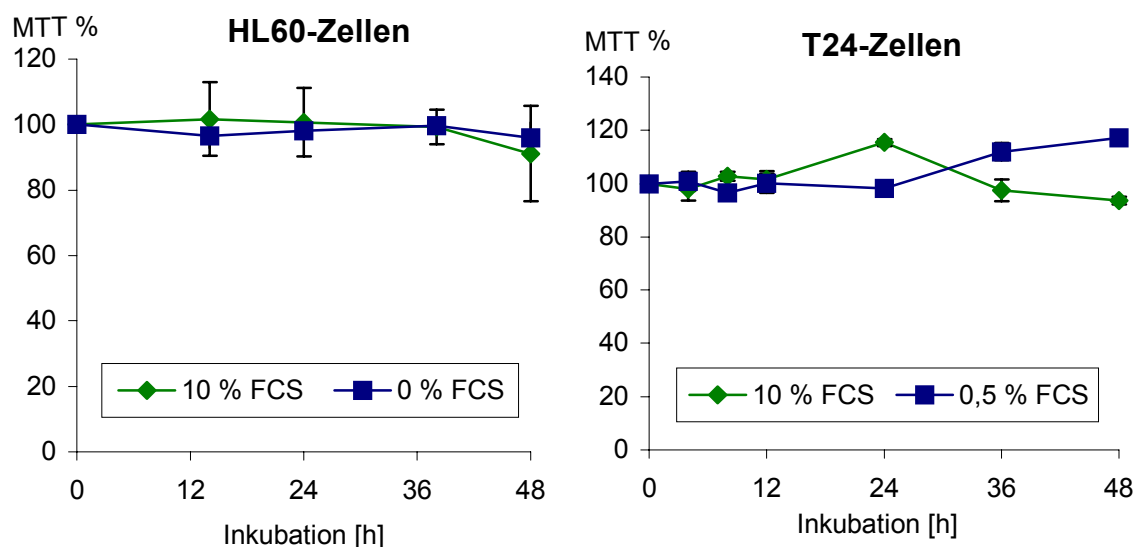


Abb. 3.6-2: Effekt von HM101a auf HL60- und T24-Zellen in Medium +/- FCS

HL60-Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^5 Z/ml in Medium mit 10 % FCS oder ohne FCS ausgesät und mit 10 μ M HM101a (Endkonzentration) für die angegebenen Zeiträume inkubiert. T24-Zellen (3×10^4 Z/ml) wurden mit 10 % FCS- oder 0,5 % FCS-Medium ausgesät und ebenfalls mit 10 μ M HM101a (Endkonzentration) für 4-48h inkubiert. Als Lösungsmittel für HM101a diente Wasser.

Die Zellen wuchsen in FCS-haltigem Medium deutlich besser. Eine Inkubation mit 10 μ M HM101a hatte in beiden Zelllinien keinen Einfluss auf die Vitalität im Vergleich zu einer Inkubation mit dem Lösungsmittel. Die MTT-Werte der Referenz zu den angegebenen Zeitpunkten wurde jeweils auf 100 % gesetzt. Eine Endkonzentration von 10 μ M HM101a scheint somit für die Zellen gut verträglich zu sein.

3. Ergebnisse

Da die anderen HM-Substanzen nicht als Salz vorlagen und somit nicht wasserlöslich sind, wurde der Einfluss von DMSO auf das Wachstum der Zelllinien untersucht (s. Abb. 3.6-3). T24-Zellen wurden mit 0,1 % bzw. 0,5 % DMSO für 2-24h inkubiert und der Anteil lebender Zellen mittels MTT-Test ermittelt. Dabei zeigte sich, dass DMSO in einer Endkonzentration von 0,5 % das Zellwachstum nicht beeinflusst: Alle MTT-Werte stiegen in den angegebenen Zeiträumen in ähnlichem Ausmaß an.

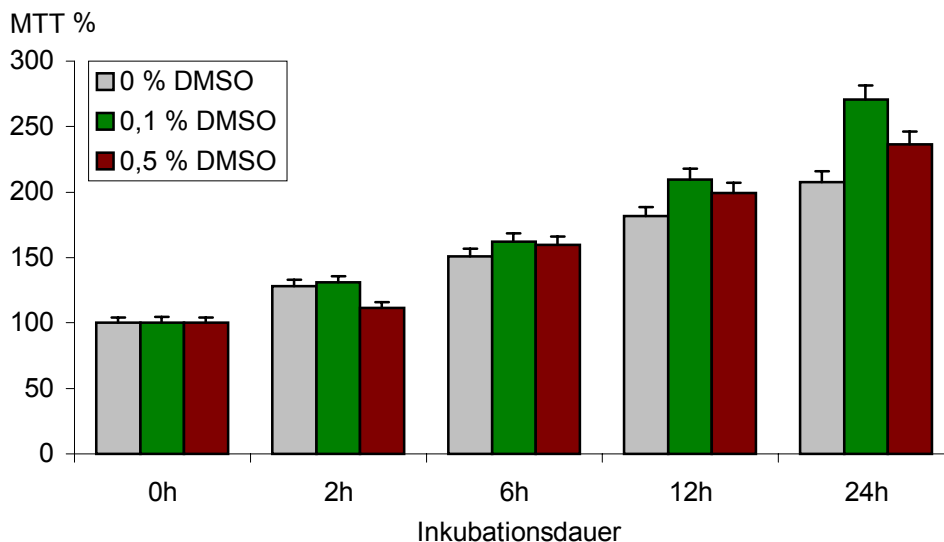


Abb. 3.6-3: Einfluss von unterschiedlichen Konzentrationen DMSO auf T24-Zellen

T24-Zellen (2×10^4 Z/ml) wurden in serumhaltigem Medium mit 0-0,5 % DMSO in 24well-Platten für 2-24h inkubiert und die MTT-Werte in Bezug auf den Nullwert (0h = 100 %) berechnet.

Eine Inkubation der Zellen mit HM-Substanzen in einer Endkonzentration von 10 μ M und falls nötig mit 0,5 % DMSO war somit möglich, ohne dass sich ein Einfluss auf die Zellvitalität zeigte.

3.6.3 MEK-Assay

Für die eigentliche Messung der MEK-Aktivierung wurden die Säugerzellen zunächst über 2h bis 48h mit den Ras/Raf-aktiven HM-Substanzen inkubiert und anschließend der Phosphorylierungsgrad von MEK im Western Blot bestimmt. Leider zeigte sich hierbei keine Änderung der Menge an phosphoryliertem Enzym im Vergleich zu einer Inkubation mit dem Lösungsmittel. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass sich die aus der Literatur übernommenen Inkubationszeiten auf Hemmung und Regulierung eines Proteins und nicht auf die Aktivierung der Signalkaskade bezogen und diese deshalb zu lang waren.

Dana Albert und Dr. Oliver Werz, aus dem Arbeitskreis von Prof. Steinhilber, Institut für Pharmazeutische Chemie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, konnten bei der Aktivierung der 5-Lipoxygenase zeigen, dass Inkubationszeiten von 0,5-30 min ausreichen, um die Signalkaskade zu aktivieren. Deshalb wurden die Zellen in den weiteren Versuchen wesentlich kürzer mit den Substanzen inkubiert.

Als Positivkontrolle diente PMA, ein Phorbolster, der an Proteinkinase C bindet, die Calcium-Affinität dieser Kinase steigert und somit das Enzym aktiviert. Die aktivierte Proteinkinase C kann nun sowohl Ras-abhängig, als auch Ras-unabhängig zu einer Phosphorylierung von MEK führen. Bei einigen Versuchen wurde daher eine duale Aktivierung von MEK durch PMA beobachtet: Nach 10-15 min nahm die Bandenstärke deutlich ab, bevor sie wieder auf ihr vorheriges Phosphorylierungsniveau anstieg.

Bei den adhärennten T24-Zellen führte eine PMA-Inkubation erst nach ca. 2¹/₂ min, bei den HL60-Zellen bereits nach 1 min zu einer deutlich sichtbaren phospho-MEK-Bande (s. Abb. 3.6-4 und 3.6-5). Allerdings musste der Röntgenfilm für diese Ergebnisse relativ lange (ca. 1h) aufgelegt werden, da ansonsten die Banden nicht detektierbar waren. Eine Inkubation der Zellen in serumhaltigem (10 % FCS) oder serumfreiem Medium zeigte auf die PMA-Wirkung keinen Einfluss (s. Abb. 3.6-4 A/B).

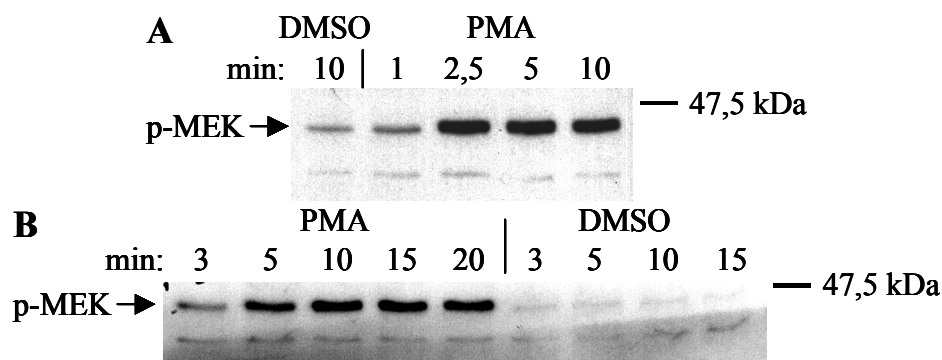


Abb. 3.6-4: Inkubation von T24-Zellen mit 100 nM PMA

A: T24-Zellen wuchsen o/n in Medium mit 10 % FCS, bevor sie geerntet (s. Kap. 2.6.6) und für 1-10 min mit PMA bzw. für 10 min mit DMSO inkubiert wurden.

B: T24-Zellen wurden o/n in Medium mit 0,5 % FCS gehalten, bevor sie mehrmals mit PBS gewaschen und in serumfreiem Medium o/n inkubiert wurden. Anschließend wurden sie für den Assay verwendet (s. Kap. 2.6.6).

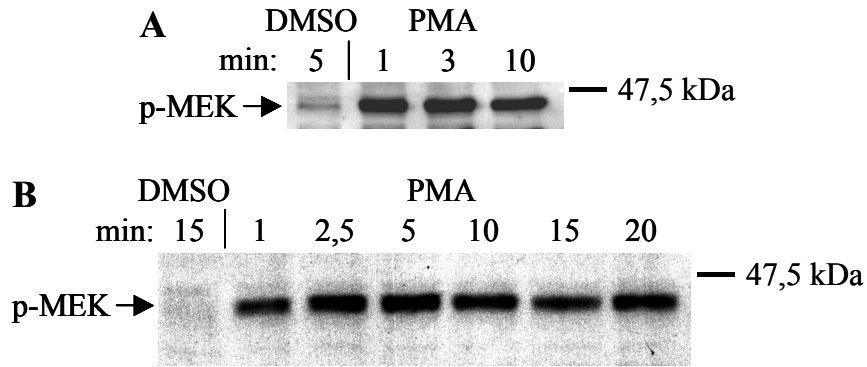


Abb. 3.6-5: Inkubation von HL60-Zellen mit 100 nM PMA

A: Nach Ernte aus serumhaltigem Medium wurden HL-60 Zellen mit PMA für 1-10 min bzw. mit DMSO für 5 min inkubiert.
 B: HL-60 Zellen wurden nach Ernte aus serumhaltigem Medium mit PMA für 1-10 min inkubiert. Als Kontrolle diente eine Inkubation mit DMSO als Probe für 15 min.

Inkubationen der Säugerzellen mit den HM-Substanzen lieferten leider nicht so klare Ergebnisse wie bei der Positivkontrolle PMA. Obwohl auch hier in einigen Versuchen eine gesteigerte Phosphorylierung von MEK beobachtet wurde, waren nicht alle Experimente so eindeutig auszuwerten wie bei PMA. Dies kann zum einen an der schwächeren Aktivierung von MEK liegen – die Röntgenfilme lagen zur Detektion der Banden zwischen 2h und 6h auf der vorbehandelten Membran – , zum anderen an den noch nicht optimierten Testbedingungen dieses Assays. Einige Ergebnisse sind in Abb. 3.6-6 und Abb. 3.6-7 zusammengefasst.

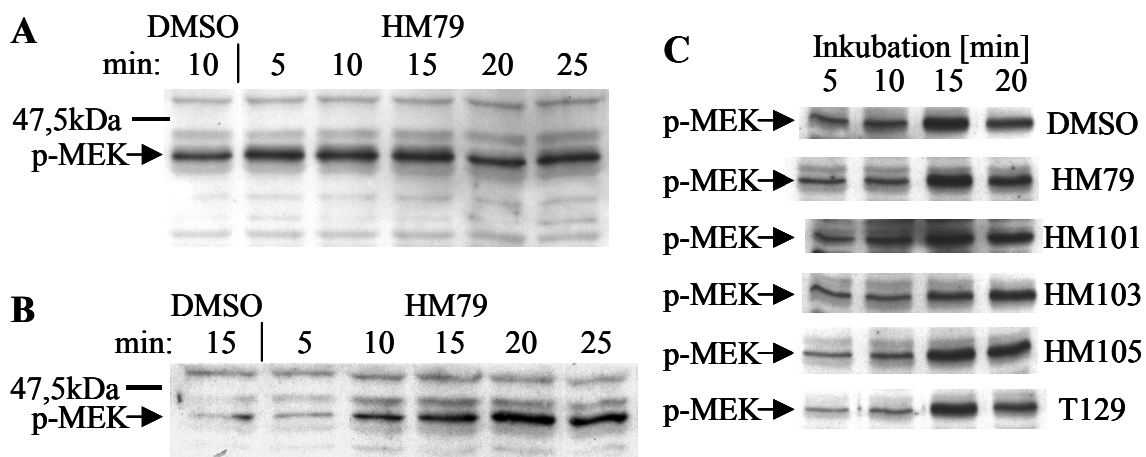


Abb. 3.6-6: Inkubation von T24-Zellen mit unterschiedlichen HM-Substanzen

A: Die Ernte der T24-Zellen erfolgte nach Wachstum in Medium mit 10 % FCS. HM79, in DMSO gelöst, wurde in einer Endkonzentration von 10 μ M eingesetzt. Als Kontrolle diente eine Inkubation mit der entsprechenden Menge DMSO für 10 min.
 B: HM79 wurde in einer Endkonzentration von 10 μ M für 5-25min mit den aus serumhaltigem Medium geernteten T24-Zellen inkubiert. Als Lösungsmittel diente DMSO, das 15 min auf die Zellen einwirkte.
 C: T24-Zellen aus serumhaltigem Medium wurden mit je 10 μ M (Endkonzentration) HM79, HM101, HM103, HM105 und T129 für 5-20 min inkubiert. Als Kontrolle diente eine Inkubation mit DMSO. Die Proben wurden alle am selben Tag gesammelt, gemeinsam aufgearbeitet und die Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm detektiert.

Die Inkubation von T24-Zellen mit 10 μM HM79 führte in mehreren unabhängigen Versuchen (s. Abb. 3.6-6A/B) nach ca. 5 min zu einer gesteigerten Phosphorylierung von MEK, die jedoch deutlich schwächer war als nach Behandlung mit 100 nM PMA. Ein Vergleich der verschiedenen HM-Substanzen und T129 mit DMSO zeigte in anderen Experimenten dagegen nur einen geringen Einfluss (s. Abb. 3.6-6C). Nur nach 20 min konnte dort eine etwas stärkere Bande als nach Inkubation mit dem Lösungsmittel DMSO detektiert werden.

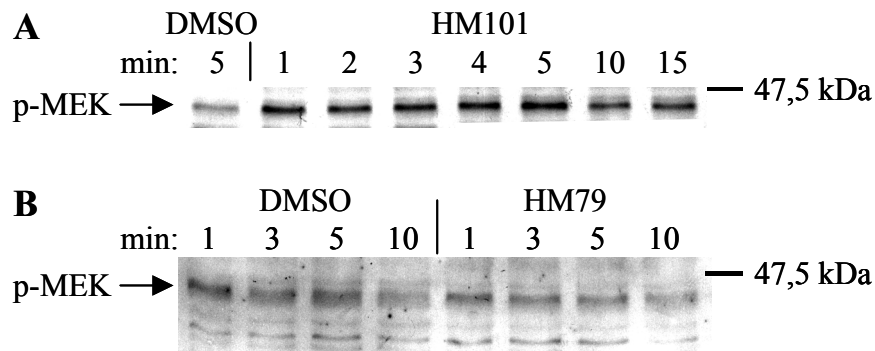


Abb. 3.6-7: Inkubation von HL60-Zellen mit unterschiedlichen Substanzen

A: HL60-Zellen aus serumhaltigem Medium wurden für 1-15 min mit HM101 in einer Endkonzentration von 10 μM inkubiert. Als Lösungsmittel diente DMSO, welches für 5 min mit den Zellen inkubierte.

B: Nach Inkubation o/n in Medium mit 0,5 % FCS wurden die HL60-Zellen mit 10 μM HM79 für 1-10 min versetzt. Als Lösungsmittel diente DMSO, welches auch für 1-10 min mit den Zellen inkubierte.

Auch in HL60-Zellen aus serumhaltigem Medium nahm die beobachtete phospho-MEK-Bande nach einer Inkubation mit HM101 zu (s. Abb. 3.6-7A). Wie bei PMA zeigte sich bereits nach einer einminütigen Inkubation ein Effekt, wohingegen bei den adhärennten T24-Zellen meist erst nach Inkubationszeiten von 5 min eine Wirkung zu sehen war. Bei Zellen, die nur in Medium mit 0,5 % FCS gehalten worden waren, fiel der Einfluss deutlich schwächer aus (s. Abb. 3.6-7B).

Sowohl HL60- als auch T24-Zellen besitzen eine Mutation im *ras*-Gen, die zu konstitutiv aktiven Ras-Varianten führen und somit die Kaskade ständig aktivieren. Um die Wirkung der HM-Substanzen auf eine Zelllinie ohne Ras-Mutation zu testen, wurden zusätzlich HeLa-Zellen mit HM79 inkubiert. HM79 bewirkte im Zwei-Hybrid-System nach Inkubation mit dem Teststamm W, der im Gegensatz zu den anderen Teststämmen das Wildtyp-Ras-Protein in Fusion mit der DNA-bindenden Domäne exprimiert, ebenfalls eine gesteigerte β -Galactosidase-Aktivität. Dies deutet auf eine verstärkte Interaktion zwischen dem Wildtyp-Ras-Protein und der regulatorischen Domäne von Raf hin: Ein Effekt auf die Signalkaskade

3. Ergebnisse

der HeLa-Zellen war deshalb zu erwarten. Allerdings erfolgte die Aktivierung von MEK auch bei diesen Zellen nicht eindeutig (s. Abb. 3.6-8).

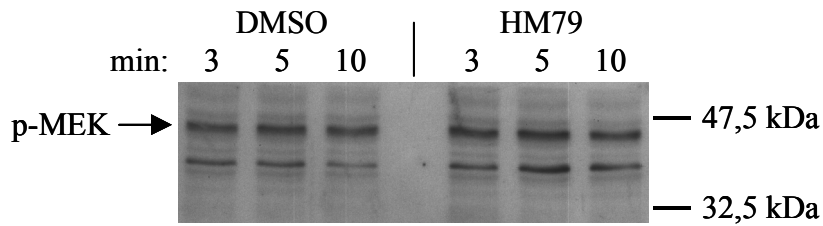


Abb. 3.6-8: Inkubation von HeLa-Zellen mit DMSO und HM79

HeLa-Zellen wurden nach Inkubation o/n in Medium mit 0,5 % FCS mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend für den Assay (s. Kap. 2.6.6) verwendet. Als Probe diente HM79 in einer Endkonzentration von 10 μ M, als Lösungsmittel DMSO.

3.7 Getestete Extrakte, Naturstoffe und Substanzen

In dieser Arbeit wurden insgesamt 469 Proben in verschiedenen Konzentrationen im Zwei-Hybrid-System getestet. Davon waren 95 pflanzliche Extrakt, 98 Naturstoffe und 276 chemisch synthetisierte Substanzen. Die meisten Proben zeigten keinen spezifischen Effekt auf die Ras/Raf-Interaktion und sind daher in diesem Kapitel nur tabellarisch aufgeführt. Bei den chemisch synthetischen Substanzen entspricht die Bezeichnung der Proben der Codierung, unter der sie während dieser Arbeit getestet wurden.

A. Einzelverbindungen und Naturstoffe

Acetylsalicylsäure	AdC	AKBA	Äpfelsäure
Arabinose	Arginin	Ascorbinsäure	Asparaginsäure
Bernsteinsäure	Betain	Brenztraubensäure	Chinasäure
Chlorogensäure	Citronensäure	Cnicin	Cynarin
Cystein	2-Desoxiribose	Didrovaltrat	Dihydrokaffeesäure
Erythrit	Fructose	Fumarsäure	Galactose
Glucose	Glutaminsäure	Glycin	Histidin
Inosit	Isoamylacetat	Isoamylalkohol	Isobutanol
Isobutylamin	Isobutylmethylketon	Isocaprinsäureethylester	Isochlorogensäure
Isohexan	Isoleucin	Isopropanol	Isopropylacetat
Isopropylamin	Isopropylmethylketon	Isovaleraldehyd	Kaffeesäure
KBA	Kestopentaose	Kestotetraose	Kestotriose

Lactose	Leucin	Lysin	Malonsäure
Maltose	Mannitol	Methionin	Mevalonsäurelacton
Milchsäure	Na-arsenit	Na-citrat	NF272
Oxalsäure	Phenylalanin	Prolin	Propionsäure
Raffinose	Rhamnose	Ribose	Saccharose
Sorbitol	Sulindac	Sulindacsulfid	Suramin
Threonin	Trehalose	Trichostatin	Tryptophan
Tyrosin	Valeriansäure	Valin	Weinsäure
Xylose			

B. Substanzen aus dem Arbeitskreis von Prof. Dannhardt, Mainz

Synthese von:	getestete Substanzen					
	DM1	DM2	DM3	DM4	DM5	DM6
DM	DM1	DM2	DM3	DM4	DM5	DM6
GK	GK119	GK176A	GK179	GK188	GK207	GK243
	GK245	GK304	GK359	GK385A	GK76	
HE	He106	He108	He113	He114	He13	He15
	He187	He193	He23	He26	He33	He35
	He38	He39	He40	He42b	He43	He71
	He74	He75	He78	He80	He95	He96
HU	HU12	HU13	HU25	HU27	HU3	HU30
	HU4	HU45	HU49	HU5	HU54	HU63
	HU67	HU68	HU75	HU76	HU77	HU83
	HU9	HU92	HU93			
JS	JS11	JS176	JS183	JS203	JS207	JS222
	JS263	JS268	JS303	JS304	JS314	JS317
	JS318	JS323	JS333	JS345	JS346	JS364
	JS374	JS383	JS389	JS391	JS393	JS394
	JS398	JS399	JS400	JS405	JS412	JS414
	JS417	JS431	JS438	JS439	JS440	JS442
	JS444	JS447	JS449	JS452	JS455	JS46

	JS460	JS462	JS465	JS467	JS468	JS469
	JS475	JS477	JS478	JS479	JS48	JS51
	JS54	JS58	JS59	JS86		
LF	LF12	LF128	LF140	LF183	LF185	LF187
	LF191	LF193	LF201	LF202	LF206	LF21
	LF211	LF216	LF217	LF221	LF228	LF229
	LF23	LF231	LF238	LF239	LF253	LF258
	LF26	LF269	LF27	LF278	LF28	LF30
	LF31	LF32	LF33	LF35	LF37	LF38
	LF44	LF49	LF50	LF51	LF53	LF54
	LF58	LF62	LF63	LF72	LF92	
B. Kohl	C1BG1	147A	DC1B-COOH		R- β -Ala-BOC	
	C1B-COOH		C1BG1-BOC		NB-COOH	

C. Pflanzliche und synthetische Proben aus verschiedenen Arbeitskreisen

AK Becker, Institut für Pharmakognosie und analytische Phytochemie, Universität des Saarlandes, Saarbrücken

- MeOH-, Wasser/MeOH- und DCM-Extrakt aus Blüte und Stengel von *Acmella oleracea*
- NSD: 1, 15, 16, 18, 22, 24, 36, 51, 67, 79, 81, 82, 83, 94

AK Bucar, Institut für Pharmakognosie, Karl-Franzens-Universität, Graz

- Heißwasserextrakte von *Combretum molle* (Äthiopien), *Melilotus elegans* (Äthiopien), *Biophytum sensitivum* (Indien), *A-B* (Äthiopien, noch nicht botanisch identifiziert)

AK Dingermann, Institut für Pharmazeutische Biologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt

- MeOH- und Wasserextrakte von *Calendulae herba*, *Crataegi fol. c. fl.*, *Millefolii herba*, *Senecionis herba*, *Tiliae flos*, *Vincae herba*

AK Heinrich, Institut für Pharmazeutische Biologie, Albert-Ludwig-Univ. Freiburg

- 7 verschiedene, kodierte Pflanzenextrakte
- Parthenolid (Sesquiterpenlacton)

AK Hensel, Lehrstuhl für Pharmaz. Biologie, Friedrich-Alexander-Univ., Erlangen• *Digitalis purpureae fol.:*

Wasser-, Na₂CO₃-, 1N KOH- und 4 N KOH-Extrakte (EtOH-Präzipitate)

DP1/Wasser/Neutral (Neutralfrak. aus Wasserextrakt, neutrales Arabinogalactan)

DP1/0,5 M NaPP/Sauer (saure Frak. aus Wasserextrakt, saures Glucomannan)

DP3/Wasser/Neutral (Neutralfrak. aus 1 N KOH-Extrakt)

DP3/0,1 M NaPP/Sauer (saure Frau. aus 1 N KOH-Extrakt, saure Xylane)

• Wasserextrakt (EtOH-Präzipitat) und Gesamtpolysaccharide aus *Fucus vesiculosus*• Wasserextrakt aus *Crataegi fol. c. fl.* (EtOH-Präzipitat)

• Carragenan, Galactomannan, Fucoidan

• Xyloglucan aus *Tropaeolum majus*

• Zitruspektin Esterifizierung 70 %

• γ -Propoxy-Sulfo-Lichenin (partialsynthetisches Derivat aus *Lichen islandicus*)• Puffer-Extrakte aus *Fagopyri herba*, pH 4,8/ pH 6,0/ pH 7,4• Gesamtpolysaccharide aus: *Foenugraeci semen*, *Tiliae flos*, *Farfarae flos*, *Altheae radix***AK Houghton, Department of Pharmacy, King's College, London**

• Villalstonin, o-Methylmacralstonin

AK Jurenitsch, Institute of Pharmacognosie, Universität, Wien• Fraktionen aus *Achillea pratensis*: III+IV mit SG18, VI mit SG14A/B und SG19**AK Kayser, Institut für Pharmazie II, Freie Universität, Berlin**

• Forskolin, Aphidicolin, OK6302

AK König, Institut für Pharmaz. Biologie, Technische Universität, Braunschweig

• Ethylacetat-Extrakte kultivierter Pilze aus dem Meer:

H6-9MS, H6-51, 293K9, H8-54, 193H60, MS195-43, H8-57, H8-42, 193H39,

K14MS, 193-H3, H5-80, MSH471, 195-40, 193H15, H5-28

• MeOH- und DCM-Extrakte von Bryozoen aus der Nordsee:

Electra pilosa, *Flustra foliacea*, *Botryllus schlosseri*, *Ascidella aspersa*

• DCM-, MeOH- und Wasser-Extrakte afrikanischer Heilpflanzen:

Cissampelos mucronata, *Myrianthus arboreus*, *Rubus rigidus*, *Polyeias fulva*,

Otiophora pauciflora, *Celosia trygina*, *Amorphophallus sp.*, XX (Pflanzenspecies

noch nicht bestimmt)

AK Kubeczka, Abt. Pharmazeutische Biologie, Universität Hamburg

- ätherisches Öl aus der Wurzel von *Eryngium campestre*
- MeOH-Extrakt aus *Sanguisorba minor*

AK Laufer, Institut für Pharmazeutische Chemie, Eberhard-Karls-Univ., Tübingen

- Proben von Gerd Wagner: Wn24, Wn58, Wn76, Wn147, Wn149, Wn229, Wn273, Wn291, Wn296, Wn347, Wn450, Wn460, Wn484, Wn529, SP30
- Proben von Dunja Kotschenreuther: Ko1 bis Ko11

AK Prathanturarug, Department of Pharmaceutical Biology, University of Basel

- Blätter von *Andrographis paniculata* Nees

AK Schlitzer, Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität, Marburg

- SCH-454, 505, 508, 534, 543, 565, 580, 591, 592, 600, 604, 683, 704, 705, 711, 823, 826, 832

AK Wurm, Institut für Pharmazeutische Chemie, Freie Universität, Berlin

- 25 1,4-Naphthochinon-Derivate: 1-23, 24A, 24B

Tab. 3.8-1: Übersicht über die getesteten Extrakte, Naturstoffe und Substanzen

- A. Einzelverbindungen und Naturstoffe, die käuflich zu erwerben sind.
- B. Chemisch-synthetische Verbindungen aus dem Arbeitskreis von Prof. Dannhardt, Mainz
- C. Pflanzliche Extrakte sowie synthetisierte Substanzen aus verschiedenen Arbeitsgruppen. Die Bezeichnungen der Proben entsprechen den Angaben der jeweiligen Arbeitskreise, von denen die Anschrift zum Zeitpunkt der Testung aufgeführt ist.

4. Diskussion

4.1 Ras und Raf als Zielstrukturen für neue Wirkstoffe

Obwohl die Protoonkogene Ras und Raf seit 20 Jahren bekannt sind und ihr Zusammenspiel seit knapp 10 Jahren intensiv erforscht wird, sind viele Zusammenhänge und Funktionen immer noch unklar, was die große Bedeutung dieser Proteine bei der Regulation von Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose und Zellzyklus widerspiegelt. Ras übernimmt in der Zelle die Rolle eines molekularen Schalters, der unter vielen anderen Funktionen durch die Interaktion mit Raf die nachgeschaltete MAPK-Kaskade bestehend aus Raf, MEK und ERK aktiviert (Cobb, M.H., 1999). Die Dauer eines von Ras weitergeleiteten Signals wird dabei durch die Halbwertszeit der aktiven, GTP-gebundenem Form bestimmt. Die künstliche Verlängerung dieses Signals z. B. durch Mutationen führt zu einer unregulierten, biologischen Antwort und zu dramatischen Konsequenzen in der Zelle. Heute wird angenommen, dass bis zu 30 % aller menschlichen Tumore über ein mutiertes Ras-Onkogen verfügen, zumeist N-Ras oder K-Ras (Bos, J.L., 1989). Darüber hinaus können weitere Faktoren wie die Überexpression von Wachstumsfaktorrezeptoren, die Reduktion der Expression oder Aktivität des NF1-Proteins oder die Hochregulierung des Grb2-Adaptorproteins ebenfalls zu erhöhten Mengen an aktiviertem Ras führen (Weiss, B. et al., 1999).

Die vier humanen Proteine H-Ras, N-Ras, K-Ras4a und K-Ras4b sind hochkonserviert und unterscheiden sich vor allen Dingen in den C-terminalen Aminosäuren. Die ersten 85 Aminosäuren der hochkonservierten katalytischen G-Domäne sind identisch, die Homologie der folgenden 80 Aminosäuren beträgt 95 %. Die C-terminalen Aminosäuren 166-189, die posttranslational verändert werden, sind bis auf das Farnesylierungsmotiv CAAX dagegen weniger als 15 % konserviert (Yan, J. et al., 1998). In dieser Arbeit wurde im Zwei-Hybrid-System nur das H-Ras-Protein exprimiert. Aufgrund der C-terminalen Verkürzung bis einschließlich Aminosäure 166 wird nur der hochkonservierte Bereich der Ras-Proteine in Fusion mit den Gal4-Domänen exprimiert: Die Wahrscheinlichkeit einer Kreuzwechselwirkung der gefundenen H-Ras/Raf-Effektoren mit K-Ras bzw. N-Ras und Raf im Zwei-Hybrid-System ist somit relativ hoch.

H-Ras und K-Ras besitzen unterschiedliche Verteilungen an den Microdomänen der Plasmamembran, wobei schon länger bekannt ist, dass der C-terminale Anker der Proteine für diese Lokalisierung verantwortlich ist. Neuere Ergebnisse von Jaumot et al. (Jaumot, M. et al., 2002) weisen darauf hin, dass die Interaktion von Ras mit den Lipidbereichen durch die GTP-Beladung moduliert wird. Dieser Mechanismus ist erstaunlicherweise von der

hypervariablen Region von Ras abhängig. Aktivierte Ras-Mutanten, bei denen die Aminosäuren 166-172 oder 173-179 deletiert wurden, können nicht aus den „lipid rafts“ freigesetzt werden. Ein Ersatz der Aminosäuren 173-179, nicht jedoch der AS 166-172 durch Alanin führte wieder zur Wildtyp-Microlokalisierung. Anscheinend interagieren spezifische N-terminale Sequenzen der Linkerregion (AS 166-172) gemeinsam mit C-terminalen Bereichen zur Regulation der Ras-Lipid-Assoziation. Ras-Proteine, die durch Mutationen in der Linkerregion nicht mehr aus den Lipidbereichen freigesetzt werden können, verhindern die Raf-1-, PI3K- und Akt-Aktivierung und inhibieren die Differenzierung von PC12-Zellen. Die Linkerregion stellt somit eine bisher wenig beachtete Interaktionsmöglichkeit für neue Ras-modulierende Substanzen dar.

Der für das Ras/Raf-Zwei-Hybrid-System verwendete Organismus *Saccharomyces cerevisiae* besitzt ebenfalls zwei endogene Ras-Proteine: Raspl und Rasp2, allerdings kein Raf-Homolog. Die Ras-Proteine übernehmen wie in anderen Organismen die Rolle eines molekularen Schalters, der zwischen einem inaktiven, GDP-gebundenen und einem aktiven, GTP-gebundenen Zustand wechselt. GTP-gebundenes, aktiviertes Ras stimuliert die Adenylatcyclase, was zu einem intrazellulären cAMP-Anstieg führt (Toda, T. et al., 1985; DeVendittis, E. et al., 1986). Die einzige, bisher bekannte Funktion dieses cAMP-Anstieg besteht in der Freisetzung der katalytischen Untereinheit von der regulatorischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA). Aktivierte PKA kann verschiedene Proteine phosphorylieren, die die Transkription, den Energiemetabolismus, den Zellzyklus und die Akkumulation von Glucose und Trehalose beeinflussen (Jiang, Y. et al., 1998). Testsubstanzen, die mit den hefeeigenen Ras-Proteinen interagieren und über diesen Weg die β -Galactosidase-Aktivität im Zwei-Hybrid-System beeinflussen, sollten sowohl bei den Test- als auch bei den Kontrollstämmen zu einer Änderung der Enzymaktivität führen. Sie werden somit bei der Auswertung der Ergebnisse nicht berücksichtigt.

Eine mögliche Beeinflussung der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade durch die Expression dominant-negativer oder -positiver Mutanten der Proteine, sowie durch Peptide und Substanzen wurde bereits in der Einleitung aufgeführt (s. Kap. 1.4). Standen in den ersten Jahren der Entdeckung von Ras und Raf vor allen Dingen Inhibitoren der Kaskade zur Tumorchemmung im Vordergrund, so eröffnen sich aufgrund neuerer Ergebnisse zur Bedeutung dieses Signalwegs auch andere Einsatzmöglichkeiten. ERK ist z. B. auch in Neuronen zu finden, die teilungsunfähige, ausdifferenzierte Zellen darstellen. Anscheinend

spielt die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade hier eine Rolle bei der synaptischen Plastizität und dem Lernvorgang (Mazzucchelli, C. et al., 2000). Yuan et al. konnten im August 2001 zeigen, dass Valproinsäure in therapeutischen Konzentrationen (0,4-1 mM) den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg in Neuroblastomazellen aktiviert und diese Aktivierung für mehrere Tage anhält (Yuan, P.X. et al., 2001). Außerdem steigerte Valproinsäure konzentrations- und zeitabhängig das Längenwachstum und das Überleben von Neuriten. Auch die Norepinephrin-Aufnahme und Abgabe der Neuroblastomazellen wurde durch eine Inkubation gefördert, was auf eine gesteigerte Funktionalität und Vitalität hindeutet. Diese neurotrophen Effekte können eine wichtige Rolle bei einer Langzeittherapie spielen, denn oft besitzen Patienten mit neurologischen und psychischen Störungen morphologische Änderungen der Gehirngewebe, die auf Zellverlust und Atrophien hindeutet (Drevets, W.C. et al., 1997) (Ongur, D. et al., 1998) (Manji, H.K. et al., 2000). Eine Aktivierung der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade durch spezifische Substanzen könnte somit zu einer Steigerung der kognitiven Fähigkeiten, sowie zu einer Erhöhung der Neuroplastizität und Cytoprotektion beitragen.

Neuere Ergebnisse lassen außerdem vermuten, dass die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade an der Regulation des pre-mRNA-Splicings beteiligt ist. Alternative Splice Stellen in der pre-mRNA werden unter Einfluss von verschiedenen Entwicklungsstadien, zur Unterscheidung des Geschlechts oder der Gewebespezifität verwendet (Lopez, A.J., 1998) (Smith, C.W. et al., 2000). Unterschiedliche Genexpressionen sind somit entscheidend für verschiedene physiologische und pathologische Zustände. Die Aktivierung von B- und T-Lymphozyten während der Immunantwort sorgt z. B. für die Expression von verschiedenen Varianten des Oberflächenproteins CD44 durch alternatives pre-mRNA-Splicing. Weg-Remers et al. konnten zeigen, dass das Splicing von CD44-mRNA durch die Aktivierung der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade, nicht aber durch den p38 MAPK-Signalweg beeinflusst wird (Weg-Remers, S. et al., 2001). Dabei ist das Splicing und „exon usage“ als Reaktion auf das gleiche extrazelluläre Signal sehr spezifisch. Die Stimulierung des T-Zell-Rezeptors führt z. B. zu einem alternativen Splicing sowohl bei CD44- als auch bei CD45-pre-mRNA, wobei jedoch nur bei CD44 bestimmte Exons eingeschlossen werden. Beide Splicearten involvieren dabei Proteinkinase C und Ras. Die Signaltransduktion in T-Zellen scheint also zu einer spezifischen Änderung der Splicefaktor-Aktivität für den Gebrauch bestimmter Exons zu führen und nicht zu einer unspezifischen Erhöhung der gesamten Aktivität des Splice-Komplexes. Eine Hochregulierung von CD44-Varianten ist in vielen epithelialen und hämatopoetischen Tumoren gefunden worden, was mit einer schlechten Prognose einhergeht

(Stauder, R. et al., 1995). Auch konstitutiv-aktives Ras spielt bei epithelialen und hämatopoetischen Krankheiten und Tumoren eine wichtige Rolle (Weijzen, S. et al., 1999). Die Autoren vermuten daher, dass onkogenes Ras über den MAPK-Signalweg zu einer Hochregulierung der CD44-Varianten in Lymphoma- und anderen Tumorzellen führt und dadurch die Metastasenbildung fördert. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass eine hochkonservierte Signalkaskade wie die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade extrazelluläre Signale mit der Regulation des Splicings verbindet und damit eine Möglichkeit der Zelltyp- und Entwicklungs-spezifischen Expression der Varianten durch eine gezielte Beeinflussung der Kaskade eröffnet.

Diese Beispiele der Funktionen der MAPK-Kaskade (s. auch Kap. 1.1) verdeutlichen, dass Ras/Raf-Effektoren sowohl als Inhibitoren als auch als Aktivatoren der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade interessant sind: Zum einen in der Wissenschaft zur gezielten Steuerung und Erforschung von Proliferations-, Differenzierungs- oder Apoptoseprozessen, zum anderen in der pharmazeutisch-medizinischen Anwendung bei Tumoren, Wundheilungsstörungen oder neuronalen Krankheiten. Die besondere Schwierigkeit einer Therapie wird wahrscheinlich in der Selektivität liegen. Die Funktion des MAP-Kinase-Moduls besteht nicht nur darin, Signale zum Zieleffektor weiterzuleiten, sondern auch in der Koordination eintreffender Signale aus parallelen Wegen, in der Signalverstärkung und Schwellenbildung, sowie der Steuerung der Signalinaktivierung über viele verschiedene Mechanismen (Cobb, M.H., 1999). EGF aktiviert z. B. kurzfristig die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade und induziert die Proliferation von PC12-Zellen, wohingegen NGF mit einer langanhaltenden Aktivierung zur Differenzierung führt (Qiu, M.S. et al., 1992). Ein konstitutiv niedriges Signal von Raf bewirkt Zellproliferation, ein sehr hohes Signal hingegen einen Stopp im Zellzyklus durch Expression von p21^{cip1} (Sewing, A. et al., 1997; Woods, D. et al., 1997; Kerkhoff, E. et al., 1998). Ein bestimmtes extrazelluläres Signal kann so in verschiedenen Zellen zu unterschiedlichen Zellantworten führen, während andere Signale in differenten Zellen gleiche Effekte induzieren. Würde man nun einen Wirkstoff applizieren, der die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade beeinflusst, käme es in verschiedenen Zellen zu sehr pleiotropen Effekten. Die Beeinflussung dieser hochkonservierten Kaskade muss demnach sehr spezifisch in Bezug auf die gewünschte Wirkung sein. Dies könnte durch ein gezieltes Zelltargeting, sowie durch spezifische Substanzentwicklungen möglich sein, die über die Dauer und Stärke der Aktivierung der Kaskade zu dem gewünschten Effekt führen.

Die Suche nach Ras/Raf-Effektoren ist vor diesem Hintergrund weiterhin sehr interessant und wird intensiv erforscht. In der Literatur wurden jedoch bisher bis auf Sulindacsulfid (Herrmann, C. et al., 1998) und den in dieser Arbeit beschriebenen HM-Substanzen (Friese, A. et al., 2002) keine weiteren direkten Effektoren beschrieben.

4.2 Das Zwei-Hybrid-System als Screening-Methode

4.2.1 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System: Modifikationen und Grenzen

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde ursprünglich von S. Fields und O. Song entwickelt, um vermutete Protein-Protein-Interaktionen zu bestätigen („A novel genetic system to detect protein-protein interactions“, (Fields, S. et al., 1989). Innerhalb der letzten 12 Jahre seit seiner Erfindung wurde es jedoch mehrfach modifiziert und re-modifiziert, sodass die biologischen und technologischen Einsatzbereiche stark erweitert wurden. Inzwischen dient es nicht nur zum Aufspüren neuer Interaktionspartner, sondern auch als Werkzeug in der Proteomforschung sowie zur Entdeckung von neuen biologischen und pharmazeutischen Wirkstoffen. Die Vorteile liegen in der relativ einfachen Identifizierung der DNA-Sequenz des interagierenden Proteins beim Screening von cDNA-Banken, der höheren Sensitivität im Vergleich mit anderen biochemischen Methoden, der Fähigkeit, schwache oder kurzlebige Interaktionen bis zu einer K_{dS} von 10-50 μ M aufzuspüren, und in der Anwendung *in vivo*, sodass die Wahrscheinlichkeit einer nativen Proteinkonformation relativ groß ist. Die Bedeutung des Zwei-Hybrid-Systems in der Wissenschaft spiegelt z. B. die Anzahl der Veröffentlichungen wider, die diese Methode zitieren: Waren es insgesamt bis 1992 nur 10 Zitate, stieg die Anzahl nach Einführung eines zweiten Reportergens, des Auxotrophie-Markers *HIS3* oder *LEU2*, exponentiell an: im Jahr 1993 bereits 20, 1994 80, 1996 335 und im Jahr 2001 über 1100. Die Gesamtzahl aller Zitate bis Januar 2002 erreichte knapp 5000.

Ab 1995 wurde das Zwei-Hybrid-System vor allen Dingen eingesetzt, um die verschiedensten Interaktionspartner eines Proteins mit bekannter Aktivität zu finden. Dabei zeigten sich bereits die ersten Tücken dieser Methode, denn Membranproteine, transkriptionsaktivierende Proteine und Proteine, die bei Überexpression den Hefe-Metabolismus stören, neigen dazu, falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse zu liefern, sodass ein zweites Screening nötig wird. Die Interaktionsflächen der zu untersuchenden Proteine darf nicht durch die fusionierten Domänen verdeckt oder gestört werden: andererseits müssen die BD-Fusionsproteine noch in der Lage sein, Dimere für eine DNA-Bindung zu

bilden. Weitere Probleme können die stabile Expression, die korrekte Proteinfaltung und die notwendige nukleäre Lokalisation der Fusionsproteine darstellen. In dem hier angewandten Zwei-Hybrid-System wurde daher eine C-terminal verkürzte Mutante des membranständigen Proteins Ras (AS 1-166) eingesetzt. Dieser Mutante fehlt das Farnesylierungsmotiv, das zur Membranlokalisierung notwendig ist (Hancock, J.F. et al., 1990): ein Transport des Fusionsproteins in den Zellkern ist somit möglich. Raf ist nicht membranlokalisiert, sondern wird erst durch die Aktivierung von Ras zur Membran rekrutiert. Eine Verkürzung oder Änderung der Aminosäuresequenz von Raf ist somit nicht nötig. Die Kernlokalisation der Zwei-Hybrid-Fusionsproteine wird durch entsprechende Signalpeptide (NLS) vermittelt: die DNA-bindende Domäne besitzt per se eine NLS, bei der transaktivierenden Domäne wurde die NLS des großen T-Antigens des SV40 vorgeschaltet.

Einige Protein-Protein-Interaktionen sind außerdem von post-translationalen Modifikationen abhängig, die von der Hefe gar nicht oder nicht in ausreichender Menge ausgeführt werden können wie z. B. Tyrosin-Phosphorylierungen. Darüber hinaus kann die Überexpression einiger Fusionsproteine für Hefezellen toxisch sein, sodass eventuell auf Plasmide mit einer geringen Kopienzahl oder einem schwachen oder induzierbaren Promotor zurückgegriffen werden muss. In den hier verwendeten Zwei-Hybrid-Systemen wurden die Fusionsproteine sowohl von den pPC-Vektoren mit vollständigem ADH1-Promotor bei geringer Kopienzahl sehr stark, als auch von den Stratagene-Vektoren mit verkürztem ADH1-Promotor bei hoher Kopienzahl eher schwach exprimiert. Beidesmal zeigten sich während der Expression der unterschiedlichen Fusionsproteine keine toxischen Effekte bei den Hefen.

Einige der aufgeführten Probleme konnten mit Erweiterungen des „klassischen“ Zwei-Hybrid-Systems gelöst werden. Falls ein Protein als Bestandteil eines größeren Komplexes nur mit schwacher Wechselwirkung an ein anderes Protein bindet, kann im Drei-Hybrid-System ein drittes, stabilisierendes Protein mitexprimiert werden. Mit Hilfe dieses Systems wurde z. B. die Interaktion zwischen dem EGF-Rezeptor, Grb2 und SOS entdeckt (Zhang, J. et al., 1996). Das Problem der fehlenden Tyrosin-Phosphorylierung in Hefen konnte im Tribid-System durch eine Überexpression einer Tyrosinkinase gelöst werden, die das Köderprotein in einem ausreichendem Maße phosphorylierte und zur Interaktion befähigte (Osborne, M. et al., 1995). Um Membran-assoziierte Proteine untersuchen zu können, wurde das SOS-Recruitment-System (Aronheim, A. et al., 1997; Broder, Y.C. et al., 1998) entwickelt, bei dem das eine Protein mit einem Myristylanker an der Membran lokalisiert ist und das andere Protein in Fusion mit SOS exprimiert wird. Nur wenn eine Interaktion der

Proteine an der Membran stattfindet, kann dort über SOS ein Signalweg aktiviert werden, der das Zellwachstum der Hefen induziert.

Zusätzliche Modifikationen des Zwei-Hybrid-Systems erweitern die möglichen Interaktionspartner eines Proteins auf DNA, RNA, Peptide und Substanzen. DNA-Protein-Interaktionen können mit dem Ein-Hybrid-System (Wilson, T.E. et al., 1991) (Li, J.J. et al., 1993) oder dem Ein-Ein-Halb-Hybrid-System (Analogon zum Drei-Hybrid-System) (Dalton, S. et al., 1992) untersucht werden, Protein-RNA-Interaktionen mit einer Drei-Hybrid-Anker-Köder-Variante (Putz, U. et al., 1996; SenGupta, D.J. et al., 1996).

Um Mutationen innerhalb eines Proteins, die die Protein-Protein-Interaktion stören, oder inhibitorisch wirkende Peptide und Substanzen zu identifizieren, wurde von M. Vidal das Reverse-Zwei-Hybrid-System entwickelt, das die Selektionsstrategie des Zwei-Hybrid-Systems umdreht (Vidal, M. et al., 1996). Dieses System wurde auch am Anfang dieser Doktorarbeit zu einem Screening nach Inhibitoren der Ras/Raf-Wechselwirkung eingesetzt. Allerdings erwies sich dieses System in Microtiterplatten zur Untersuchung einer Interaktionshemmung als schwierig, da die Hefen durch 5-FU nicht sterben, sondern nur in ihrer Teilungsaktivität inhibiert werden. Die Unterscheidung der Effekte zwischen einer Inkubation mit Lösungsmittel bzw. mit Probe ist daher nicht so einfach wie die kolorimetrische Bestimmung eines umgesetzten Farbstoffes im Forward-Zwei-Hybrid-System. Auch nach Inkubation der Hefezellen mit Sulindacsulfid, das nach Hermann et al. die Interaktion zwischen Ras und Raf hemmen soll (Herrmann, C. et al., 1998), wurde kein eindeutiger Effekt beobachtet. Dies mag zum einen an einer mangelnden Optimierung des Reverse-Zwei-Hybrid-Systems liegen, zum anderen an der leichten Oxidation des Sulfids zum unwirksamen Sulfon während der langen Inkubationszeit mit den Hefen. Hermann et al. benutzten kein Zwei-Hybrid-System zur Detektion von Sulindacsulfid als Ras/Raf-Effektor, sondern Transaktivierungsversuche mit Luciferase als Reportergeräten (s. Kap. 4.4.2), Bindungsstudien und Transformationsassays.

Als Verbesserung zum verwendeten Reverse-Zwei-Hybrid-System könnte ein von Young et al. entwickeltes, gegenselektives Zwei-Hybrid-System dienen (Young, K. et al., 1998). Dabei kontrollieren die Fusionsproteine direkt die Transkription von *CYH2*, dessen Genprodukt die Zellen für Cycloheximid anfällig macht. Nur wenn die Proteininteraktion durch Zusatz von inhibitorisch wirkenden Substanzen oder Peptiden gehemmt wird, sind die Hefezellen auf Cycloheximid-haltigem Medium lebensfähig. Allerdings ist es fraglich, ob schwache Proteinwechselwirkungen und geringe Änderungen der Interaktionsstärke damit detektierbar sind.

4.2.2 Das Zwei-Hybrid-System als High-Throughput-Screening

Grundlegende Überlegungen

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System bietet sich für eine effektive Suche nach inhibitorischen oder aktivierenden Substanzen an, allerdings muss es dafür als High-Throughput-Screening etabliert werden. Konnten zu Beginn 1990, als der Ausdruck „High-Throughput-Screening“ geprägt wurde, 20 Leute ca. 1,5 Millionen Substanzen pro Jahr untersuchen, so können mit automatisierten High-Throughput-Screenings zur Zeit ca. 100.000 Substanzen pro Tag untersucht werden. Durch die Miniaturisierung, z. B. von Microtiterplatten mit 96 Vertiefungen auf 384 oder 1536 Vertiefungen bei gleicher Plattengröße, konnten die Screening-Kosten erheblich gesenkt werden. Das Assayvolumen pro Vertiefung nimmt dabei von 100 µl in einer 96-well Platte, über 20 µl in einer 384er-Platte bis hin zu 2 µl in einer 1536-well-Platte stetig ab. Berg et al. entwickelten bereits einen Transkriptionsassay für ein Screening nach Liganden des humanen Progesteronrezeptors, der erfolgreich mit Hefezellen in Microtiterplatten mit 96, 384 und 1536 Vertiefungen durchgeführt wurde (Berg, M. et al., 2000). Die Qualität der Ergebnisse hängt dabei sehr stark von dem eingesetzten Assay und seiner Reagenzien ab. Einige Punkte, die bei einer Entwicklung eines automatisierten High-Throughput-Screening berücksichtigt werden sollten (Mellor, G. et al., 1997), sind z. B.:

- Reagenzien: Die benötigten Reagenzien müssen in ausreichender Menge und gleichbleibender Qualität jederzeit verfügbar sein. Außerdem sollten die Verbindungen mindestens 24h unter Versuchsbedingungen stabil sein, da automatisierte Systeme oft über Nacht arbeiten. Nicht nur aus Kosten-, sondern auch aus Sicherheitsgründen sollte die verwendete Menge der Reagenzien möglichst gering gehalten werden.
- Lösungsmittel: Viele organische Testverbindungen sind in Lösungsmitteln gelöst, die den Versuch stören. Bei *in-vitro*-Assays wird daher oft auf ein DMSO/Wasser-Gemisch zurückgegriffen, was jedoch bei *in-vivo*-Testsystemen mit ganzen Zellen zu starken Problemen führen kann.
- Technische Anforderungen: Je nach verwendetem Gerät können eventuell nicht alle Anforderungen des entwickelten Assays umgesetzt werden, da z. B. Mixen und Kühlen auf 4 °C nicht gleichzeitig möglich sind.
- Logistische Anforderungen: Alle benötigten Reagenzien und Zubehör wie Platten, Proben und Puffer, sowie freie Versuchszeit an dem gewünschten Gerät müssen zum richtigen Zeitpunkt verfügbar sein.

- **Gerätereinigung:** Durch die Miniaturisierung der Versuche werden die verwendeten Geräte diffiziler und auch schwieriger zu reinigen. Je kleiner das Probenvolumen, desto gravierender wirken sich jedoch Kontaminationen aus.

Ein Zwei-Hybrid-High-Throughput-Screening ist jedoch immer nur als ein erstes Screening nach Effektoren einer Protein/Protein-Wechselwirkung sinnvoll, da es sich hierbei um ein artifizielles System handelt: Die interagierenden Proteine werden – zum Teil verkürzt – als Fusionsproteine und nicht in ihren normalen Zellkompartimenten exprimiert. Außerdem können Substanzen, die aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften nicht in den Zellkern gelangen, oder Verbindungen, die für Hefen cytotoxisch sind, in diesem System gar nicht getestet werden. Allerdings bereiten Verbindungen mit Permeabilitätsproblemen in Hefen oft auch beim Menschen Schwierigkeiten, sodass diese Substanzen selten weiter erforscht werden. Nach Schätzungen von Serebriiskii et al. (Serebriiskii, I. et al., 2001a) sind ungefähr 10 % aller Testsubstanzen für die Hefen toxisch, was jedoch gleichzeitig bedeutet, dass ein wesentlich höherer Prozentsatz der Substanzen in die Hefe gelangt. Dies ist nicht allzu erstaunlich, da das mittlere Molekulargewicht der Testverbindungen meist unterhalb von 500 Da liegt. Die Hit-Rate in einem Zwei-Hybrid-basierten High-Throughput-Screening für Substanzen mit inhibitorischem Effekt liegt bei ungefähr 0,01 %, von denen wiederum 50-75 % den gewünschten biologischen Effekt nach weiterer Validierung zeigen (Serebriiskii, I. et al., 2001a).

Umsetzung der verwendeten Methode für ein High-Throughput-Screening

Für ein maschinell durchgeführtes High-Throughput-Screening sollten so wenig Schritte wie möglich durchgeführt werden. Außerdem sind bestimmte Schritte wie Zentrifugationen nur schwer umsetzbar. Um das in dieser Arbeit etablierte Zwei-Hybrid-System in Microtiterplatten auf ein High-Throughput-Screening umzustellen, müsste das Protokoll in einigen Punkten optimiert werden.

- Als Vektoren für ein Zwei-Hybrid-System sind die pPC-Vektoren mit dem vollständigen ADH1-Promotor den Stratagene-Vektoren mit dem verkürzten ADH1-Promotor als Expressionskontrollelement für die Fusionsproteine vorzuziehen. Mit den Hefen, die mit den pPC-Vektoren transformiert wurden, lässt sich schneller und einfacher ein High-Throughput-Screening durchführen, da die Inkubation mit den Testsubstanzen bei diesen Hefestämmen auf 4-6 Stunden verkürzt werden kann, wie die Versuche

mit der aktiven Verbindung HM70 belegen (s. Kap 3.5.5). Dies spart vor allen Dingen Zeit und verkürzt die Beanspruchung der Maschinen erheblich.

- Die Waschschritte zur Entfernung gefärbter Verbindungen könnten bei einem High-Throughput-Screening ebenfalls entfallen, da die positiven Verbindungen hinsichtlich ihrer Struktur und physikochemischen Eigenschaften nochmals geprüft werden müssen und außerdem ein zweites Screening nachgeschaltet ist.
- Der Aufschluss mit Chloroform und SDS ist aufgrund der Schaumbildung und des Anätzens der Platte nicht geeignet. Besser wäre daher der Zellaufschluss mit Sarcosyllaureat, der ähnlich gute Werte liefert (s. Kap. 3.1.2.2) und keine weitere Überführung der Lösungen in eine neue Microtiterplatte fordert.
- Als Substrat für die β -Galactosidase ist ONPG dem in dieser Doktorarbeit hauptsächlich benutzten CPRG vorzuziehen. Dies ist zum einen günstiger als CPRG, zum anderen kann die Reaktion durch Zugabe von 1 M Na_2CO_3 gestoppt werden, was für eine längere Versuchszeit von Vorteil wäre. Allerdings ist dieses Substrat ca. 10-fach unsensitiver als CPRG.
- Die Ausgangszelldichte sollte so gewählt werden, dass einerseits nach Inkubation detektierbare Mengen an β -Galactosidase gebildet werden, andererseits jedoch das Verhältnis von Zellzahl zur Konzentration der Testsubstanz bzw. der Aufschlussreagenzien nicht zu groß ist. Wie in Abb. 3.1-2 zu erkennen, nimmt bezogen auf die Werte mit der ersten Verdünnungsstufe b die OD „CPRG“ der Ausgangssuspension a im Verhältnis zur OD „90 μl “ als Maß für die Zelldichte deutlich ab. Dies könnte auf einen unvollständigen Zellaufschluss hindeuten, sodass die Zelldichte beim Aussäen für die weiteren Versuche gesenkt wurde. Eine Inkubation von HM70 mit dem Teststamm „Ras/Raf 3.3“ in verschiedenen Ausgangszelldichten, die bis zu einer 1:1 Verdünnung der Ausgangssuspension reichten, (s. Kap. 3.3.3) führte zu annähernd identischen β -Galactosidase-Aktivitäten. Bei allen eingesetzten Ausgangszelldichten waren somit ausreichende Mengen sowohl an Aufschlussreagenzien als auch an Testsubstanz vorhanden.

Einsatz geeigneter Kontrollen

Um die Aussagekraft des Testsystems - in diesem Fall die Spezifität der Beeinflussung der Protein/Protein-Interaktion durch eine Testsubstanz - im Zwei-Hybrid-System abschätzen zu können, sollte bei einem Screening ein Kontrollstamm mitgeführt werden, der ein anderes, unabhängiges Proteinpaar exprimiert. Viele Verbindungen bewirken unspezifisch eine

Änderung der β -Galactosidase-Aktivität der Hefestämme, in dem sie z. B. direkt die Enzymaktivität beeinflussen oder den Hefe-Metabolismus stören. So hemmte z. B. eine Inkubation mit Acetylsalicylsäure die β -Galactosidase-Aktivität aller in dieser Arbeit verwendeten Test- und Kontrollstämme ohne das Hefewachstum zu beeinträchtigen.

Zusätzlich ist zu bedenken, dass die wenigsten Proteine und damit auch die im Zwei-Hybrid-System exprimierten Fusionsproteine einzeln vorliegen, sondern sie sind Bestandteile von Multiproteinkomplexen. Raf z. B. liegt inaktiv in der Zelle in einem 300-500 kDa Multiproteinkomplex vor. Bisher sind über 35 Proteine aus verschiedensten Gruppen (G-Proteine, Adaptoren, Cytoskelettproteine, Chaperone, Phosphatasen, Kinasen, Rezeptoren) bekannt, für die eine Interaktion mit Raf *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen wurde (Kolch, W., 2000). Gavin et al. konnten in einer aufsehenerregenden Arbeit mit Hilfe von Tandem-Affinitätsreinigungen (TAP) und Massenspektroskopie 232 Multiproteinkomplexe aus *Saccharomyces cerevisiae* identifizieren und zeigen, dass sie zum Teil aus über 40 Proteinen bestehen (Gavin, A.-C. et al., 2002). Übertragen auf das Zwei-Hybrid-System kann somit eine Änderung der β -Galactosidase-Aktivität nach Inkubation der Hefen mit Testsubstanzen auch durch eine unspezifische Interaktion mit Proteinen bedingt sein, die ihrerseits mit den Fusionsproteinen assoziiert sind. Falls diese Proteine auch mit den Kontroll-Fusionsproteinen interagieren, kann durch einen entsprechenden Kontrollstamm dieses falsch-positive Ergebnis ebenfalls detektiert und ausgeschlossen werden. Interagieren diese Proteine jedoch spezifisch nur mit den Test-Fusionsproteinen, kann die falsch-positive Änderung der Enzymaktivität auch nicht durch einen Kontrollstamm entdeckt werden. Ein zweites unabhängiges Screening ist somit erforderlich.

Alternativen zu der in dieser Arbeit verwendeten Kombination von Test- und Kontrollstämmen könnten die relativ neuen „Zwei-Köder-“ (*two-bait*) bzw. „Doppel-Köder-“ (*dual bait*) Zwei-Hybrid-Systeme darstellen (Serebriiskii, I. et al., 1999). Bei diesen Systemen werden zwei unterschiedliche „Köderproteine“ in Fusion mit zwei verschiedenen DNA-bindenden Domänen und ein „Beuteprotein“, fusioniert mit der transkriptionsaktivierenden Domäne, exprimiert. Da die beiden Ansätze unterschiedliche Reportergene kontrollieren (β -Galactosidase und β -Glucuronidase), können unterschiedliche Interaktionen und Interaktionsstärken der Proteine ermittelt werden. Dies wurde bisher eingesetzt, um z. B. die Interaktionspartner von einem Wildtyp-Protein und einer Mutante (Serebriiskii, I. et al., 2001b) oder von sehr nah verwandten Proteinen einer Familie (Reeder, M. et al., 2001) zu untersuchen. Dabei konnte zwischen Proteininteraktionen mit hoher bzw. niedriger Affinität klar unterschieden werden. Die Expression des Beuteproteins („*prey*“) wird dabei durch den

Gall-Promotor über ein Wachstum in Galactose-haltigem Medium induziert und sollte für die Interaktion mit den beiden Köderproteinen ausreichend hoch sein. Für ein Screening nach Ras/Raf-Effektoren könnte man in dem speziellen Hefestamm SKY191 z. B. Ras und Rap in Fusion mit der DNA-bindenden Domäne und Raf bzw. verkürzte Varianten von Raf in Fusion mit der transaktivierenden Domäne exprimieren. Nur wenn die Inkubation mit einer Substanz zu einer unterschiedlichen Expression der beiden Reportergene *lacZ* und *gusA* führt, kann je nach Muster eine Ras/Raf- bzw. Rap/Raf-spezifische Interaktion der Substanz vorliegen.

Soft-Agar-Screening

Khazak et al. von der Firma *Small Molecular Technologies* stellten auf der CHI Konferenz im Jahr 2000 ein Zwei-Hybrid-System für ein High-Throughput-Screening nach Ras/Raf-Inhibitoren aus kombinatorischen Bibliotheken vor, das ähnlich aufgebaut ist wie das hier verwendete Zwei-Hybrid-System (Serebriiskii, I. et al., 2001a). Insgesamt 77.000 Substanzen wurden parallel an einem Ras/Raf-Teststamm und einem Kontrollstamm mit einem anderen Proteinpaar getestet. Der Teststamm exprimierte die Ras-Mutante cI-H-RasC186G mit einem zerstörtem Farnesylierungsmotiv in Fusion mit der DNA-bindenden Domäne und das Protein c-Raf, fusioniert mit der transaktivierenden Domäne. Die Hefezellen wurden zunächst in Soft-Agar ausgesät und die Substanzen als kleiner Tropfen, der zu einem Hof diffundiert, auf diese Platten gegeben. Substanzen, die die β -Galactosidase-Aktivität des Teststammes, aber nicht des Kontrollstammes blockierten, wurde in einem zweiten Screening an Säugerzellen getestet. Dieser Assay beruhte - ebenfalls wie das in dieser Arbeit beschriebene Screening - auf der Beeinflussung des MAPK-Signalweges, jedoch wurde der Effekt über den Einfluss auf das MAPK-abhängige cFos-Luciferase-Reportergen ermittelt. Drei strukturell verwandte Substanzen, die unabhängig voneinander in dem ersten Zwei-Hybrid-Screening gefunden worden waren, führten hierbei zu einer Hemmung der Luciferase-Aktivität. Diese Substanzen inhibierten außerdem in serum-induzierten CHO-Zellen den MAPK-Signalweg mit einer IC_{50} von 6-17 μ M ohne dabei die p38-Kinase zu beeinflussen. Zur Zeit werden diese Substanzen auf ihren Einfluss auf die transformierenden Eigenschaften von Ras untersucht.

Der bei diesem System verwendete Soft-Agar-Assay kann allerdings nicht mit den beiden hier eingesetzten Zwei-Hybrid-Systemen durchgeführt werden, da der Assay für Transformanden eines Gal4-basierten Zwei-Hybrid-Systems zu wenig sensitiv ist. Er ist nur für LexA-Transformanden geeignet, bei denen das Reportergen auf autonom replizierenden Plasmiden verbleibt (Gyuris, J. et al., 1993).

4.2.3 Einfluss des verwendeten Hefestamms

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden alle mit dem Hefestamm y190 an einem Gal4-basierten Zwei-Hybrid-System durchgeführt. Dies ist insofern wichtig, da die quantitativen Daten zwischen verschiedenen Hefestämmen mit unterschiedlichen *lacZ*-Reporterkonstrukten nicht verglichen werden können. Die relative Stärke einer Protein-Protein-Interaktion kann in einigen Hefestämmen wie z. B. y190 oder y187 quantifiziert werden, jedoch nicht in Stämmen wie CG-1945 oder HF7c.

Die Bindung der DNA-bindenden Domänen von Transkriptionsfaktoren, sowie die Höhe der Gen- und Proteinexpression können durch Unterschiede in den Hefe-Promotoren bzw. anderen regulatorisch wirkenden *cis*-Elemente beeinflusst werden (Guthrie, C. et al., 1991). Ein Hefe-Promotor umfasst dabei im weiteren Sinne nicht nur die TATA-Box, sondern auch die damit verbundenen *cis*-regulatorischen Elemente, die im Gegensatz zu multizellulären Eukaryonten bei Hefen relativ nah mit der TATA-Box assoziiert sind (Yocum, R.R., 1987). Die TATA-Box ähnelt funktionell der Pribnow-Box von Prokaryonten, jedoch ist sie erstens nicht so hochkonserviert und zweitens können mehrere TATA-Boxen vor einem Gen vorhanden sein. Eine Gruppe von regulatorisch wirkenden *cis*-Elementen stellt die „upstream activating sequence“ UAS dar. In Gal4-basierten Zwei-Hybrid-Systemen werden meistens entweder die native Gal1-UAS oder ein synthetisches UAS-17-mer (Heslot, H. et al., 1992) als Bindestelle für die DNA-bindenden Domäne von Gal4 verwendet.

Der Galactose-Metabolismus wird in Hefen sowohl von den regulatorischen Proteinen Gal4 und Gal80, als auch durch die vorhandene Kohlenstoffquelle im Medium gesteuert. In Anwesenheit von Galactose bindet Gal4 an die Gal4-Response-Elemente innerhalb der UAS und aktiviert die Transkription, wohingegen in Abwesenheit von Galactose Gal80 an Gal4 bindet und somit die Transkription blockiert. In Anwesenheit von Glucose wird die Transkription der Gene des Galactose-Metabolismus sofort unterdrückt. Um Störungen durch endogene Gal4- und Gal80-Proteine zu vermeiden, müssen die im Zwei-Hybrid-System verwendeten Hefestämme *gal4*- und *gal80*-Gen-Deletionen tragen. Eine Nährstoffregulation bzw. Galactose-Induktion ist bei Gal4-basierten Zwei-Hybrid-Systemen daher nicht mehr möglich.

Der verwendete Hefestamm y190 besitzt für das *lacZ*-Reporter gen einen intakten Gal1-Promotor mit einer Gal1-UAS und einer Gal1-TATA-Box, der zu einer streng regulierten, hohen Expression von β -Galactosidase bei einer positiven Zwei-Hybrid-Interaktion führt. Im Gegensatz zu anderen Zwei-Hybrid-Hefestämmen steht das *HIS3*-Reporter gen jedoch unter der Kontrolle der Gal1-UAS und beiden *HIS3*-TATA-Boxen, TR und TC. TR wird durch

einen Transkriptionsfaktor reguliert, wohingegen TC schwach konstitutiv aktiv ist (Mahadevan, S. et al., 1990; Iyer, V. et al., 1995). Insofern kommt es zu einer hohen Histidin-Expression bei einer positiven Zwei-Hybrid-Interaktion aufgrund von Gal1-UAS, aber auch zu einer geringen konstitutiven Expression aufgrund von TC. In Bezug auf eine Histidin-Selektion ist dieser Hefestamm nicht so spezifisch wie andere Stämme und für ein Screening von cDNA-Bibliotheken nur schlecht geeignet. In diesem Fall wäre z.B. der Hefestamm PJ69-4A vorzuziehen, der drei verschiedene Reportergene besitzt, die alle von unterschiedlichen Gal4-Promotoren induziert werden (James, P., 2001). Ein Screening vieler Transformanden sowie der Ausschluss von falsch-positiven Klonen ist somit schnell und gut möglich. Da jedoch bei dem in dieser Arbeit verwendeten Zwei-Hybrid-System die Änderung der β -Galactosidase-Aktivität durch die Inkubation mit verschiedenen Substanzen im Vordergrund stand, war eine hohe β -Galactosidase-Expression wichtiger als eine strenge Wachstumsselektion.

4.3 Identifizierung von Ras/Raf-Effektoren mit dem Zwei-Hybrid-System

4.3.1 Beurteilung der unterschiedlichen Ergebnisse der Vektor-Systeme

In dieser Arbeit wurden knapp 470 Substanzen, Extrakte und Naturstoffe mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems auf ihren Einfluss auf die Ras/Raf-Wechselwirkung getestet. Zwei verschiedene Vektor-Systeme wurden dabei etabliert, die sich vor allen Dingen in der Art der verwendeten Expressionskassetten unterscheiden. Die Hefestämme, die mit den pPC-Vektoren transformiert wurden, weisen allgemein eine höhere Expression der Fusionsproteine auf als die Stämme, die die Stratagene-Vektoren tragen. Wie bei den meisten Zwei-Hybrid-Systemen kontrolliert ein ADH1-Promotor die Expression der Fusionsproteine: In den pPC-Vektoren befindet sich der vollständige ADH1-Promotor (~ 1500 bp), wohingegen in den Stratagene-Vektoren eine verkürzte Variante (~ 410 bp) zu finden ist (s. Kap. 2.1.6). Der vollständige Promotor führt zu einer hohen Expression während des logarithmischen Wachstums der Hefen, jedoch wird die Transkription in der späten log-Phase durch Ethanol, der im Medium als ein Nebenprodukt des Hefe-Metabolismus akkumuliert, gehemmt. Die verkürzte Promotor-Variante bewirkt eine konstitutiv niedrige Expression der Fusionsproteine (Ruohonen, L. et al., 1995). Die Proteine, die ausgehend von den Stratagene-Vektoren exprimiert werden, sind dadurch auch nur schwach bzw. gar nicht im Western Blot (s. Kap. 3.1.1 und 3.4.6) nachweisbar (James, P., 2001).

Bei beiden Vektorsystemen sind die Proteine, die mit der DNA-bindenden Domäne von Gal4 fusioniert wurden (Ras, Raf, p53), schwerer nachweisbar als diejenigen, die mit der transaktivierenden Domäne fusioniert sind (Ras, Raf, SV40). Dies kann an unterschiedlichen Expressionsraten, an der schlechteren Bindung des anti-Gal4BD-Antikörpers oder an den Eigenschaften der Fusionsproteine an sich liegen. Da jedoch der gleiche Promotor innerhalb eines Systems den Sequenzen für die verschiedenen Fusionsproteine vorgeschaltet ist und auch die Fusion der DNA-bindenden Domäne mit anderen Proteinen als z. B. Ras (Raf, SV40) keine Verbesserung der Detektion bewirkt, ist eine schlechtere Spezifität des anti-Gal4BD-Antikörpers im Vergleich mit dem anti-Gal4AD-Antikörper wahrscheinlich.

Bei den Teststämmen A, B, 86 und Z ist die Expression der AD-Fusionsproteine gegenüber den anderen Stämmen deutlich gesteigert, wobei die Expressionsrate der Fusionsproteine nicht mit der beobachteten Grundaktivität der Hefestämme (s. Abb. 3.4-6) korreliert. Von den Vektorkombinationen A und B wurden daraufhin je fünf verschiedene Klone einer Transformation untersucht. Bei allen lag eine höhere Expression im Vergleich zu den anderen Teststämmen vor. Wahrscheinlich ist die erhöhte Expressionsrate daher nicht durch Schwankungen zwischen den einzelnen Transformanden z. B. aufgrund einer unterschiedlichen Kopienzahl der Plasmide bedingt, sondern durch die besonderen Eigenschaften wie Stabilität und Struktur der Fusionsproteine. Die AD-Fusionsproteine der Stämme 86 und Z (AD-MCS86-Raf1-275) unterscheiden sich nur in den Aminosäuren der MCS von dem Fusionsprotein des Stammes E (AD-Raf1-275). Hierbei wurde allerdings nur je ein Transformand mittels Western Blot charakterisiert, sodass diese Beobachtung sowohl auf klonale Schwankungen als auch auf die Eigenschaften der Proteine zurückgeführt werden kann.

Die Inkubation einiger der getesteten Verbindungen führte erstaunlicherweise zu einer gesteigerten β -Galactosidase-Aktivität der beiden Teststämmen mit pPC-Vektoren (Stamm „Ras/Raf 3.3“ und „Ras/RBD 9“), nicht jedoch bei den entsprechenden Analoga mit Stratagene-Vektoren (Stamm „Ras/Raf1-275 E“ und „Ras/Raf51-131 B“) (s. Kap. 3.5.1-3.5.3). Um eine Bindestelle der Proben an der Multiple Cloning Site auszuschließen, in der sich die Vektoren und dadurch auch die exprimierten Fusionsproteine unterscheiden, wurden diese Sequenzen aus den pPC-Vektoren in die Stratagene-Vektoren eingebaut. In den neu entstandenen Stämmen 86, 97 und Z zeigte sich nach Inkubation jedoch kein Effekt der bei pPC-Teststämmen aktiven Verbindungen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Kontrollfusionsproteine BD-p53 und AD-SV40 ebenfalls in beide Vektoren kloniert, sodass

eine Expression sowohl von den pPC-, als auch von den Stratagene-Vektoren möglich war. Eine Inkubation mit Isovaleriansäure führte auch bei den Kontrollfusionsproteinen zu einer gesteigerten Enzymaktivität, wenn sie ausgehend von den pPC-Vektoren exprimiert wurden (s. Kap. 3.5.2). Der beobachtete Effekt von Isovaleriansäure ist demnach nicht Ras/Raf-spezifisch, sondern offensichtlich vom Aufbau der pPC-Vektoren abhängig. Eventuell bindet Isovaleriansäure als kurzkettige Fettsäure an bestimmte Promotorregionen der pPC-Vektoren, die bei den Stratagene-Konstrukten fehlen, und steigert so die Expression der Fusionsproteine und dadurch die β -Galactosidase-Aktivität. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass Isovaleriansäure den Hefe-Metabolismus beeinflusst, sodass in der späten Wachstumsphase keine Repression durch Ethanol stattfindet und die Zellen somit im Vergleich zu einer Inkubation mit reinem Lösungsmittel eine höhere Enzymaktivität aufweisen.

Durch eine Inkubation der anderen, nur an pPC-Teststämmen aktiven Proben wie Arnika-Tinktur, T129 oder JS7b wird die Enzymaktivität der Kontrollkonstrukte jedoch nicht beeinflusst. Der beobachtete Effekt könnte auf verschiedene Weisen erklärt werden:

- Ein hefeeigenes Protein X z. B. ein Chaperon bindet spezifisch an die exprimierten Ras- bzw. Raf-Fusionsproteine und verhindert so eine Interaktion der Testverbindungen mit den Proteinen. Bei den pPC-Teststämmen, bei denen die Fusionsproteine aufgrund des vollständigen ADH1-Promotors in größerer Menge exprimiert werden als bei den Stratagene-Teststämmen, könnte nun die in der Hefe vorhandene Menge an X-Protein erschöpft sein, bevor alle Fusionsproteine gebunden wurden. Die hinzugefügten Testsubstanzen sind daher in der Lage spezifisch mit den noch freien Ras- oder Raf-Fusionsproteinen zu interagieren. Bei den Kontrollfusionsproteinen entfällt dieser Effekt wegen der fehlenden Bindung an das Protein X.
- Die Substanzen binden an ein hefeeigenes Protein Y, welches nur bei den hoch-exprimierenden pPC-Teststämmen zusätzlich zu anderen Proteinen zur Stabilisierung der Ras- und Raf-Fusionsproteine benötigt wird. Bei den schwach-exprimierenden Stratagene-Stämmen wechselwirken die Substanzen zwar auch mit dem Protein Y, dieses ist jedoch nicht an der Stabilisierung der Fusionsproteine beteiligt. Durch die Interaktion zwischen dem Protein Y und der Testsubstanz wird die Wechselwirkung der Ras/Raf-Fusionsproteine beeinflusst, sodass im Vergleich zu einer Inkubation mit dem Lösungsmittel, als auch im Vergleich mit dem Kontrollstamm eine angeblich spezifische Änderung der Enzymaktivität zu beobachten ist.

Als ein Beispiel für eine mögliche falsche Interpretation einer Interaktionshemmung im Zwei-Hybrid-System ist die Substanz Radicicol zu nennen. Radicicol ist ein Antimycotikum,

das von dem Pilz *Neocosmospora tenuicristata* produziert wird (Delmotte, P. et al., 1953). Es hemmte konzentrationsabhängig die Interaktion der Fusionsproteine in einem Zwei-Hybrid-Screening, bei dem die konstitutiv aktive Mutante RasG12V in Fusion mit der DNA-bindenden Domäne von LexA und das vollständige Raf-Protein in Fusion mit der V16-transaktivierenden Domäne exprimiert wurden. Als Kontrolle diente ein Stamm, der statt Raf den Guaninnucleotid-Austauschfaktor CDC25 in Fusion mit der V16-Domäne exprimierte. Weitere Zwei-Hybrid-Versuche, bei denen einige verkürzte Raf-Mutanten exprimiert wurden, zeigten, dass sowohl die Serin/Threonin-reiche Domäne (CR2) als auch die C-terminale Kinasedomäne (CR3) für einen Effekt von Radicol erforderlich sind. Radicol (0,1-1 µg/ml) blockierte außerdem in Immunopräzipitationsversuchen mit einem Anti-Ras-Antikörper die Ras/Raf-Wechselwirkung, jedoch nicht die Interaktion zwischen Ras und der Ras-bindenden Domäne von Raf (RBD) (Ki, S.W. et al., 1998). Zu dem Zeitpunkt war bereits bekannt, dass Radicol nach einer ca. 16-stündigen Inkubation in Konzentrationen von 50-100 ng/ml die Differenzierung von HL60-Zellen zu Macrophagen-ähnlichen Zellen induziert (Shimada, Y. et al., 1995), sowie reversibel und dosisabhängig die Transformation durch Ras und Mos in NIH3T3-Zellen unterdrückt (Zhao, J.F. et al., 1995). Außerdem führte eine Inkubation von Radicol mit v-Ha-ras-transformierten NIH3T3-Zellen, sowie mit T24-Zellen, die eine konstitutiv aktive Ras-Mutante exprimieren, zu einer Reversion der Morphologie u. a. durch Wiederherstellung des Aktin-Netzwerks. Die Menge an aktiviertem, GTP-gebundenen Ras, sowie seine Lokalisation wurde jedoch nicht verändert (Kwon, H.J. et al., 1995). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Radicol die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade durch eine Interaktionshemmung von Ras und Raf inhibiert, wahrscheinlich durch einen direkten oder indirekten Angriff am C-terminalen Bereich des Raf-Proteins.

Schulte et al. (Schulte, T.W. et al., 1999) und Soga et al. (Soga, S. et al., 1998) konnten den Mechanismus genauer aufklären. Sie zeigten, dass Radicol spezifisch an das Heat-Shock-Protein 90 (Hsp90) sowohl von Säugern als auch von Hefen bindet. Die Bindungsstelle scheint spezifisch und hochkonserviert zu sein, ist jedoch nicht in anderen Chaperonen mit Nucleotid-Bindungsstelle vorhanden. Die beobachtete Hemmung der Kaskade beruht wahrscheinlich auf einer Bindung von Radicol an und daraus folgender Inhibierung von Hsp90, sodass dieses Chaperon nicht mehr zur Stabilisierung der Raf-Kinase zur Verfügung steht. Raf wird in seiner Proteinstruktur destabilisiert und somit die verfügbare Kinaseaktivität verringert. Die beobachtete Interaktionshemmung im Hefe-Zwei-Hybrid-System beruht daher nicht auf einer direkten Wechselwirkung von Radicol mit Ras oder Raf, sondern auf der Destabilisierung von Raf durch die Inhibierung von Hsp90.

4.3.2 Potentielle Ras/Raf-Effektoren aus Pflanzenextrakten

Arnika wird traditionell äußerlich bei Verletzungs- Unfallfolgen wie Prellungen, Quetschungen, Hämatomen, bei rheumatischen Muskel- und Gelenkbeschwerden, sowie bei Entzündungen im Mund- und Rachenraum angewendet (Merfort, I., 1992a). In einer Vorab-Testung war sowohl mit Arnika-Tinktur als auch mit wässrigem Extrakt aus Arnika nach Inkubation mit den Ras/Raf-Teststämmen eine gesteigerte β -Galactosidase-Aktivität zu sehen (s. Kap. 3.2.1). Die nach Merfort et al. (Merfort, I., 1984) bzw. Malarz et al. (Malarz, J. et al., 1992) aus *Arnica montana* und *Arnica chamissonis* isolierten Flavonoide und Sesquiterpenlactone zeigten jedoch in dem in dieser Arbeit verwendeten Zwei-Hybrid-System keinen spezifischen Effekt auf die Ras/Raf-Wechselwirkung. Eine detaillierte Auftrennung von 1 l Arnika-Tinktur (s. Kap. 3.2.1) erfolgte „activity guided“ und führte zur aktiven Verbindung 1,1,1,1,1-Kestoheptaose. Diese Substanz steigerte nach Inkubation schwach die β -Galactosidase-Aktivität des Teststamms „Ras/Raf 3.3“, nicht jedoch des Stamms „Ras/RBD 9“. Die Enzymaktivität des Kontrollstamms „p53/SV40 K“ wurde dabei nicht beeinflusst. Die bei diesen Versuchen eingesetzten Kestoheptaose-Konzentrationen von 0,1-1 mM waren jedoch nicht vergleichbar mit den Werten von Arnika-Tinktur oder Extrakt. Inkubiert man die Hefen mit 20 μ l Arnika-Tinktur entspricht das einer Kestoheptaose-Konzentration von ungefähr 3 μ M pro Vertiefung. Diese Substanz ist somit nicht für die beobachtete Wirkung der Arnika-Extrakte verantwortlich. Da aus 1 l Arnika-Tinktur nur ca. 25 mg Kestoheptaose isoliert wurden, konnten die Zwei-Hybrid-Versuche erstens nur in geringer Anzahl und zweitens nur mit den pPC-transformierten und nicht mit den Stratagene-basierten Teststämmen durchgeführt werden. Eine Aussage über die Wirkung an den Stratagene-Teststämmen ist somit nicht möglich.

Leider konnten die verbliebenen Arnika-Fractionen bisher nicht vollständig aufgereinigt werden. Sie führten nach Inkubation mit den pPC-transformierten Teststämmen zu einer stärkeren Aktivitätssteigerung als Kestoheptaose und beeinflussten ebenfalls wie der Ausgangsextrakt beide Teststämme „Ras/Raf 3.3“ und „Ras/RBD 9“. Diese Fractionen zeigten jedoch keinen Effekt an den Stratagene-transformierten Teststämmen „Ras/Raf1-275 E“ und „Ras/Raf51-131 B“. Aufgrund ihrer hohen Polarität gestaltet sich die weitere Auftrennung und Analytik als äußerst schwierig. Eine Strukturaufklärung der aktiven Substanz bzw. Substanzen war daher noch nicht möglich. Eine bessere Auftrennung könnte die Verwendung der HPLC-Säule „Aqua“ bringen, die besonders für polare Verbindungen, die sich typischerweise nicht mit herkömmlichen C18-Säulen retinieren lassen, geeignet ist. Aufgrund des polaren Endcappings der C18-Phase kann die Säule auch mit stark wässrigen

mobilen Phasen und sogar mit 100 % Wasser bei ständigem Arbeiten betrieben werden (Fa. Phenomenex).

Weitere getestete Pflanzenextrakte wie MeOH- oder Wasserextrakte von *Tiliae flos*, *Calendulae herba*, *Millefolii herba*, *Senecionis herba*, *Vincae herba* bewirkten in diesem Zwei-Hybrid-System keine spezifische und konzentrationsabhängige Änderung der β -Galactosidase-Aktivität der Teststämme.

4.3.3 Effekte der T-Substanzen

Dr. Linda Hahn synthetisierte während ihrer Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dannhardt verschiedene, nicht steroidale Antiinflammatorika, die sowohl eine duale Hemmung der COX-1/COX-2 als auch der Lipoxygenase bewirken sollten (Hahn, L., 1999). Insgesamt wurden 50 Substanzen verschiedener Strukturen im Zwei-Hybrid-System getestet, von denen einige Benzimidazol-Derivate nach Inkubation zu einer gesteigerten β -Galactosidase-Aktivität der pPC-Teststämme führten. Da die Promotionsarbeit von Dr. L. Hahn nicht öffentlich zugänglich ist, können leider keine Korrelationen zu ihren Testergebnissen diskutiert werden. Die Struktur-Wirkungsbeziehungen sind bereits in Kap. 3.3.1 diskutiert worden, daher wird hier nur die aktivste Verbindung T129 vorgestellt. Sie besitzt einen sehr lipophilen Rest am Schwefel, wobei die Fluorierung des Phenylrings stark zur Wirkung beiträgt. Essentiell ist außerdem der unsubstituierte Stickstoff im Benzimidazol, wohingegen die Substitution mit einer Methoxygruppe den Effekt nicht wesentlich beeinflusst. Alle T-Substanzen besitzen im Gegensatz zu den aktiven HM-Substanzen keine Säurefunktion, was einen anderen Wirkmechanismus nahe legt.

Eine Inkubation mit T129 führte im Gegensatz zu HM70 zu einer Steigerung der β -Galactosidase-Aktivität sowohl beim Teststamm 3.3, als auch beim Teststamm 9, der nur die Ras-bindende Domäne von Raf (AS 51-131) in Fusion mit AD exprimiert. T129 scheint also mit der RBD von Raf zu interagieren und somit die Interaktion zwischen Ras und Raf positiv zu beeinflussen. Drei Aminosäuren innerhalb der RBD konnten von Fridman et al. identifiziert werden, die nach Austausch zu Aminosäuren mit basischen Resten die Bindung zwischen Ras und der RBD verstärkten (Fridman, M. et al., 2000): Asn⁶⁴, Ala⁸⁵ und Val⁸⁸. Der beste Effekt wurde bei der Mutante RBDA85K beobachtet, die eine ca. 6-9-fach stärkere Bindung an Ras aufwies und ca. 5-mal mehr Ras-GTP aus Säugerzellen präzipitierte als das Wildtypprotein RBD. Der Wechsel von Lysin (A85K) zu Arginin (A85R) steigerte ebenfalls die Ras/Raf-Bindung, jedoch in einem schwächeren Ausmaß: ca. 3-fach. Eine längere Seitenkette als Alanin, aber kürzer als Arginin scheint ebenso wie die Einführung einer

basischen Aminogruppe für die Wirkung der Mutante verantwortlich zu sein. Eine Verstärkung der Ras/Raf-Wechselwirkung durch T129 könnte z. B. auf der Einlagerung der Substanz in der Nähe von Aminosäure A85 beruhen, in dem sie durch den basischen Stickstoff des Benzimidazols einen ähnlichen Effekt vermittelt wie die Mutante A85K.

Wie Kombinationsversuche zeigten (s. Kap. 3.3.4), interagiert T129 mit einer anderen Proteinregion als HM70 oder Isovaleriansäure. Der Effekt von Isovaleriansäure beruht wahrscheinlich auf der Wechselwirkung mit der ADH1-Promotorregion (s. Kap. 3.5.2). Insofern sind additive Effekte bei den Enzymaktivitäten nicht verwunderlich. HM70 und T129 fordern ebenfalls unterschiedliche Proteinvoraussetzungen für eine Wirkung. Ein additiver Effekt bei der Inkubation könnte auch hier erklärbar sein, allerdings zeigten die T-Substanzen ähnlich wie Arnika-Extrakte keine Steigerung an den Stratagene-Teststämmen, im Gegenteil: Die Inkubation führte eher zu einer Verringerung der Aktivität. Die β -Galactosidase-Aktivität des Kontrollstammes KpPC wurde ebenso wie das Wachstum aller Hefestämme durch eine Inkubation dagegen nicht oder nur leicht beeinflusst. Der Wirkmechanismus von T129 bleibt somit unklar. Er kann je nach Sichtweise (s. Kap. 4.3.1) Ras/Raf-spezifisch oder unspezifisch sein. Zur genaueren Abklärung sollten die Substanzen an einem zweiten unabhängigen Testsystem untersucht werden (s. Kap. 4.4).

4.3.4 Effekte der JS-Substanzen

Ziel der Promotionsarbeit von Dr. Johannes Schweppenhäuser im Arbeitskreis von Prof. Dannhardt war es, selektive COX-2- bzw. duale COX-1- und COX-2-Inhibitoren zu synthetisieren, *in vitro* zu testen und Struktur-Wirkungsbeziehungen zu erstellen (Schweppenhäuser, J., 1999). Von den insgesamt 71 getesteten Verbindungen konnten einige aktive Verbindungen identifiziert werden, die eine Steigerung der β -Galactosidase-Aktivität bei den pPC-transformierten Teststämmen bewirkten, nicht jedoch bei dem Kontrollstamm KpPC. Aufgrund der systematischen Substanzreihen konnten darüber hinaus einige Strukturmerkmale für eine Ras/Raf-Wirkung bestimmt werden (s. Kap. 3.3.2). Zwischen den von Dr. J. Schweppenhäuser ermittelten IC_{50} -Werten für eine COX-1-Hemmung und den beobachteten Effekten im Zwei-Hybrid-System konnte jedoch keine Korrelation ermittelt werden. Die Substanz 7b war von den N-(Aroylphenyl)sulfonamiden zwar in beiden Systemen die aktivste Verbindung mit einem IC_{50} von 0,05 μ M an der COX-1, jedoch zeigte sich bei den anderen Testsubstanzen keine Gemeinsamkeit der gemessenen Werte.

Im Gegensatz zu den aktiven HM-Substanzen tragen die JS-Verbindungen keine freie Säurefunktion, allerdings können sowohl JS7b als auch 2-Aminobenzophenon (AB)

Wasserstoffbrücken zwischen der Sulfonamidgruppe und dem Sauerstoff des Benzophenons ausbilden. Die eher schlechtere Wirkung der N-(Benzoylphenyl)methansulfonamide im Vergleich zu 2-Aminobenzophenon wird bei der Substanz JS7b durch die Substitution mit einer Methylgruppe in Position 4' ausgeglichen. Anscheinend sind unpolare, größere Reste an dieser Stelle von Vorteil. Von den (4-Hydroxyphenyl)(2-thienyl)methanonen waren die Verbindungen JS28a-c am besten, die mit dem Thienylring einen sehr elektronenreichen Substituenten am Methanon tragen. Weitere Substitutionen des Thienylrings führten zur Abnahme der Aktivität. Ebenso darf der Hydroxyphenylring keine zu großen Reste in Position 4' besitzen.

Leider führen die JS-Verbindungen ähnlich wie die T-Substanzen von Dr. L. Hahn nur bei einer Inkubation mit den pPC-Teststämmen zu einer gesteigerten β -Galactosidase-Aktivität, nicht jedoch mit den Stratagene-Teststämmen. Darüber hinaus senken sie in einer Konzentrationen von 200 μ M nach Inkubation das Hefewachstum auf ca. 80 % bezogen auf eine Inkubation mit Lösungsmittel (s. Abb. 3.3-5), was auf eine Ras/Raf-unspezifische Beeinflussung des Hefe-Metabolismus hindeutet. Die β -Galactosidase-Aktivität des Kontrollstammes K (s. Abb. 3.3-4) und auch der Stratagene-Teststämme A-F wird durch Inkubation mit den aktiven JS-Verbindungen ebenfalls erniedrigt. Die Enzymaktivität des Kontrollstammes KpPC wird dagegen nicht beeinflusst (s. Abb. 3.5-4). Diejenigen JS-Verbindungen, die an den pPC-Teststämmen zu einer gesteigerten β -Galactosidase-Aktivität geführt haben, erniedrigen also nach Inkubation die Enzymaktivitäten der mit Stratagene-Vektoren transformierten Stämme. Eine mögliche Erklärung wäre die Ausbildung eines „Stress-Faktors“ durch die Wachstumsbeeinträchtigung bei den Hefen, sodass Metabolismus und Proteinexpression reduziert werden. Bei den pPC-Stämmen reicht die Expression für eine messbare und positiv-beeinflussbare Enzymaktivität noch aus, wohingegen bei den Stratagene-basierten Stämmen die β -Galactosidase-Aktivität unter die basale Aktivität der Hefen fällt. Der Wirkmechanismus der JS-Verbindungen beruht daher wahrscheinlich nicht nur auf einer Ras/Raf-spezifischen Änderung der Enzymaktivität, sondern es werden auch andere Faktoren beeinflusst, die zu den beobachteten Effekten führen. Die Testung an einem zweiten unabhängigen Screening-System wäre daher notwendig.

4.3.5 HM-Substanzen als Ras/Raf-Effektoren

Die untersuchten HM-Substanzen, alles Cycloalkylidene, wurden von Dr. Katja Hell-Momeni während ihrer Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dannhardt in Mainz synthetisiert als Derivate eines aktiven Metaboliten von Valproinsäure, der 2-Propyl-2-pentensäure. Dieser

Metabolit soll ähnlich wirken wie Valproinsäure, jedoch weniger Nebenwirkungen aufweisen (Löscher, W., 1992). Die teratogene Wirkung von Valproinsäure und Analoga ist an bestimmte Strukturanforderungen verknüpft: Ein tetrahedrales α -C-Atom muss an eine freie Carboxylgruppe, an zwei Alkylgruppen und an ein Wasserstoff gebunden sein (Nau, H. et al., 1991). Diese Voraussetzungen sind weder bei dem Metaboliten 2-Propyl-2-pentensäure noch bei den untersuchten HM-Substanzen gegeben. Im Herbst 2001 konnten zwei verschiedene Gruppen zeigen, dass Valproinsäure ein direkter Inhibitor von Histondeacetylasen ist, nicht jedoch 2-Methyl-2-propylpentensäure und andere nicht-teratogene Analoga (Phiel, C.J. et al., 2001) (Göttlicher, M. et al., 2001). Histondeacetylasen (HDACs) regulieren gemeinsam mit Histonacetyltransferasen (HATs) die post-translationalen Modifikationen der N-terminalen Enden von Histonen. Acetylierungen führen dabei zu einer relaxten Chromatinstruktur, die eine Transkription ermöglicht; Deacetylierung bewirkt dagegen durch eine Kondensierung der Chromatinstruktur eine Repression der Transkription. Dieser „Histon-Code“ reguliert somit Aktivität und Expression von wichtigen Genen (Strahl, B.D. et al., 2000): eine teratogene Wirkung von HDAC-Inhibitoren wie Valproinsäure ist somit nicht verwunderlich.

Bei den HM-Substanzen konnte in pharmakologischen Untersuchungen weder eine Bindung der HM-Substanzen an die Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors, noch eine Affinität zum GABA_A-Rezeptor festgestellt werden. Auch im i.v. PTZ-Test an Mäusen (Swinyard, E.A., 1973) zeigten die Cycloalkylidene keine antikonvulsive Wirkung (Hell-Momeni, K., 2000). Aufgrund des „zufälligen“ Treffers HM70 als Ras/Raf-Effektor im Zwei-Hybrid-System wurden jedoch weitere Analoga synthetisiert und untersucht (s. Kap. 3.5.5).

Die potenteste Verbindung HM101 besitzt die essentielle Säurefunktion und semicyclische Doppelbindung, sowie einen unsubstituierten Cycloheptanring. Weitere Struktur-Wirkungsbeziehungen wurden bereits in Kapitel 3.5.5 diskutiert.

Die aktiven HM-Verbindungen sind die einzigen Substanzen, die sowohl die β -Galactosidase-Aktivität der pPC- als auch der Stratagene-Teststämme beeinflussen. Die Aktivitäten der Kontrollstämme K und KpPC werden nicht verändert. Auch das Wachstum der Hefen wird nur bei Inkubationen mit den Substanzen HM80, HM81, HM82, HM83 und HM87 beeinflusst, wohingegen der IC₅₀-Wert von HM70 bei über 500 μ M liegt (s. Kap. 3.5.5). Die beobachtete Steigerung der β -Galactosidase-Aktivität scheint somit Ras/Raf-spezifisch und nicht von äußeren Faktoren wie Zellwachstum oder dem Vektoraufbau abhängig zu sein.

Die Kombination einer Inkubation mit Isovaleriansäure und HM70 führte allerdings nicht zu einer Steigerung der Enzymaktivität beim Teststamm 3.3 (s. Kap. 3.3.4). Dies ist insofern

erstaunlich, da Isovaleriansäure wahrscheinlich die Promotorregion beeinflusst und somit einen anderen Wirkmechanismus als HM70 besitzen sollte. Vielleicht war jedoch die Menge an HM70 nicht ausreichend, um alle exprimierten Fusionsproteine zu beeinflussen, sodass nur der ohnehin schon starke Isovaleriansäure-Effekt beobachtet werden konnte. Die Kombinationsversuche sollten daher auch an den Stratogene-Test- und Kontrollstämmen wiederholt werden, um eine klarere Aussage treffen zu können.

Über die Expression von verkürzten Raf-Mutanten (s. Kap. 3.4.2) konnte der essentielle Proteinbereich für eine Wirkung der HM-Substanzen eingegrenzt werden. Um eine Steigerung der β -Galactosidase-Aktivität beobachten zu können, müssen das Protein RasG12V1-166 und mindestens die Aminosäuren 51-194 von Raf in Fusion mit den Gal4-Domänen exprimiert werden. Da die Expression der Ras-bindenden Domäne von Raf als AD-Fusionsprotein für einen Effekt von HM70 nicht ausreicht, ist von einer Wechselwirkung mit der Cystein-reichen Region (CRD) von Raf (AS 131-194) auszugehen. Die CRD ist neben der RBD eine zweite Bindungsstelle von Raf an Ras und stellt ein Strukturhomolog zur Phorbolster-Bindungsdomäne der Proteinkinase C dar (s. Kap. 1.3) (Ichikawa, S. et al., 1995; Mott, H.R. et al., 1996). Daub et al. konnten sechs Aminosäuren innerhalb der CRD identifizieren, die nach Austausch zu Alanin zu einer Verminderung der Ras/Raf-Aktivierung führten, jedoch elf Mutationen, die die Interaktion verstärkten. Der Austausch der Aminosäuren T145, Q156, K157, Q166, T167, K171 oder H175 zu Alanin führte in einem Transaktivierungsassay (Block, C. et al., 1996) zu einer 1,5-2,5-fachen Steigerung der basalen Raf-Aktivität; der Austausch in Positionen N140 und R143 brachte bereits einen 4-5-fachen Anstieg. Die besten Ergebnisse wurden durch die Mutationen F151A bzw. D153A erzielt, die die Raf-induzierte Transaktivierung auf das 15-20-fache der basalen Aktivierung steigern konnten (Daub, M. et al., 1998). Eine Steigerung der Interaktionsstärke von Ras und Raf durch Beeinflussung der CRD durch eine zugefügte Testsubstanz erscheint vor diesem Hintergrund als durchaus möglich.

Valproinsäure, die „Muttersubstanz“ der synthetisierten HM-Verbindungen, führte nach Inkubation zu einer deutlichen Steigerung der β -Galactosidase-Aktivität des Teststammes 3.3, die jedoch schwächer ausfiel als mit HM70 in der gleichen Konzentration. Ebenso wie HM70 beeinflusste eine Inkubation mit Valproinsäure die Enzymaktivität des Teststammes 9, der nur die Ras-bindende Domäne von Raf als AD-Fusionsproteine exprimiert, nicht. An den Stratogene-Teststämmen, sowie an den beiden Kontrollstämmen zeigte die Substanz keine Wirkung. Der Wirkmechanismus im Zwei-Hybrid-System ist somit, ähnlich wie bei den T- und JS-Verbindungen, unklar.

4.4 Methoden für ein weitergehendes Screening

4.4.1 Der Ras/Raf/MEK/ERK-Assay in Säugerzellen

Die Ergebnisse des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems deuten auf eine Verstärkung der Ras/Raf-Wechselwirkung durch verschiedene Substanzen hin. Wie einige Punkte aus den vorherigen Kapiteln jedoch belegen, ist ein zweites Screening zur Bestätigung bzw. zur Erklärung der zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse unbedingt notwendig. Dieser zweite Assay sollte nicht in *Saccharomyces-cerevisiae*-Stämmen, sondern im Hinblick auf einen möglichen pharmazeutischen Einsatzbereich in verschiedenen Säugerzelllinien durchgeführt werden. Eine Inkubation der Säugerzellen mit den im Zwei-Hybrid-System gefundenen, aktiven Ras/Raf-Effektoren wie den HM-Substanzen sollte durch die verstärkte Interaktion zwischen Ras und Raf eine Aktivierung der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade bewirken und zu einer gesteigerten Phosphorylierung von MEK führen, die sich durch spezifische phospho-MEK-Antikörper im Western Blot nachweisen lassen. Der Einfluss einer Inkubation mit HM-Substanzen auf das Wachstum und die Vitalität verschiedener Zelllinien wurde mit Hilfe des MTT-Tests überprüft (s. Kap. 3.6.2). Dabei zeigte sich, dass eine Inkubation in einer Endkonzentration von 10 μ M in Medium mit 10 % bzw. ohne FCS, sowie falls nötig mit 0,5 % DMSO für 48h möglich war, ohne dass sich ein Einfluss auf die Zellvitalität zeigte.

Bei den adhärenenten T24-Zellen führte eine Inkubation mit der Positivkontrolle PMA nach ca. 2^{1/2} min zu einer deutlich sichtbaren phospho-MEK-Bande, bei der Suspensionszelllinie HL60 bereits nach 1 min. Eine Inkubation der Zellen in serumhaltigem (10 % FCS) oder serumfreiem Medium zeigte auf die PMA-Wirkung keinen Einfluss. Die Inkubationen mit den HM-Substanzen lieferten leider keine so klaren Ergebnisse (s. Kap. 3.6.3). Es konnte zwar in unterschiedlichen, unabhängigen Versuchen eine gesteigerte Phosphorylierung von MEK detektiert werden, jedoch war die Bande deutlich schwächer als bei der Positivkontrolle und nicht immer eindeutig. Dies könnte auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein:

- Die im Zwei-Hybrid-System aktiven Substanzen wirken nicht in diesem Säugerzellassay, da sie falsch-positiv sind, ein häufiges Phänomen bei Zwei-Hybrid-Screenings. Sie beeinflussen nicht die Ras/Raf-Interaktion, sondern führten unspezifisch zu den beobachteten β -Galactosidase-Änderungen in den Hefestämmen. Diese Deutung ist trotz der beiden verwendeten Zwei-Hybrid-Systeme (pPC und Stratagene) und trotz der Kontrollkonstrukte (p53/SV40) nicht ganz auszuschließen, da bei beiden der gleiche Hefestamm y190 und auch die gleichen bzw. ähnliche Promotoren für die Fusionsproteine und Reportergene benutzt wurden.

- Die HM-Substanzen gelangen nicht oder nur schlecht in die Säugerzellen und zeigen deshalb keinen eindeutigen Effekt. Diese Vermutung ist relativ unwahrscheinlich, da sie erstens in einigen Versuchen zu einer gesteigerten MEK-Phosphorylierung geführt und zweitens bei den Hefen bereits ihre Zellgängigkeit bewiesen haben, wobei jedoch die Permeabilität von Hefen zu Säugerzellen nicht zu 100 % identisch ist.
- Die Menge an phosphoryliertem MEK-Protein ist in dem verwendeten Assay zu gering und daher nur schwer nachweisbar. Der Röntgenfilm musste für die Ergebnisse mit der Positivkontrolle PMA bereits ca. 1h und für die Versuche mit den HM-Substanzen zwischen 2h und 6h aufgelegt werden, da ansonsten die Banden nicht detektierbar waren. Vielleicht könnte eine größere Zellzahl pro Ansatz verwendet werden, wobei jedoch dabei die Beladung des Proteingels bzw. der Nitrocellulosemembran limitierend wirkt, oder das phosphorylierte Protein könnte über gezielte Fraktionierung bzw. Anreicherung stärker in dem Ansatz konzentriert werden.
- Die Testbedingungen waren noch nicht optimal eingestellt, was aufgrund der geringen Menge an phosphoryliertem MEK-Protein zu den zweideutigen Ergebnissen führte. Besonders im Hinblick auf die Kultivierung der Zellen vor der Ernte – mit oder ohne FCS -, sowie der Zugabe von Calcium könnte das Protokoll optimiert werden.
- Die Versuche mit den Säugerzelllinien ohne Ras-Mutation sollten wiederholt bzw. unter veränderten Bedingungen durchgeführt werden, da bei diesen Zellen der Unterschied zwischen dem Normalzustand und einer Aktivierung der Kaskade deutlicher zu beobachten sein sollte als bei den hauptsächlich verwendeten T24- und HL60-Zellen mit konstitutiv aktivem Ras. Außerdem ist die Verwendung von differenzierten HL60-Zellen den in dieser Arbeit undifferenzierten HL60-Zellen vorzuziehen, da nach Erfahrungen von Dr. Oliver Werz, Institut für Pharmazeutische Chemie, Frankfurt hierbei eine stärkere und reproduzierbare Aktivierung der Kaskade durch extrazelluläre Stimuli zu erwarten ist.

4.4.2 Alternativen zu dem verwendeten Säugerzellassay

Als eine Methode zur Überprüfung der in der Hefe gewonnenen Ergebnisse kann ein Säugerzell-basiertes Zwei-Hybrid-System dienen, das von Dang et al. entwickelt wurde (Dang, C.V. et al., 1991). Das Köderprotein wird dabei in Fusion mit der DNA-bindenden Domäne von Gal4 und das Beuteprotein mit der VP16-Aktivierungsdomäne exprimiert. Die Interaktion der beiden Fusionsproteine bewirkt die Transkription des CAT-Reportergens. Säuger-Zwei-Hybrid-Systeme sind besonders geeignet für Proteine, die in Hefezellen

wahrscheinlich nicht in ihrer nativen Konformation oder Modifikation vorliegen, oder um falsch-positive Ergebnisse aus einem Hefe-Zwei-Hybrid-System zu eliminieren (Wu, L.C. et al., 1996). Änderungen des ursprünglichen Systems führten ein Luciferase-Reportergen ein, das eine hohe Sensitivität und eine lineare Reaktion über ein breites Spektrum beibehält (DeWet, J.R. et al., 1987). Da jedoch dieser Assay auf einem ähnlichem Testansatz beruht wie das Hefe-Zwei-Hybrid-System, wäre ein anderes, unabhängiges Testsystem dem Säuger-Zwei-Hybrid-System vorzuziehen. Für ein erstes High-Throughput-Screening ist der Assay nicht geeignet, da er dafür zu aufwendig ist.

Torrance et al. entwickelten einen Ansatz für ein Screening nach tumorspezifisch wirksamen Inhibitoren. Oft fehlen bei Säugerzellassays geeignete Zellkontrollen, denn viele Substanzen sind toxisch für Krebszellen – jedoch oft auch für andere, wachsende Zellen! Ihre Strategie verwendet daher isogene Krebszelllinien, bei denen das Ziel-Onkogen z. B. K-Ras durch gezielte homologe Rekombination eliminiert wurde (Torrance, C.J. et al., 2001). Durch die Expression unterschiedlicher fluoreszierender Proteine (YFP bzw. BFP) in den Zellen mit bzw. ohne K-Ras-Allel konnten bei gemeinsamer Kultivierung relativ leicht die Substanzen identifiziert werden, die eine selektive Toxizität gegenüber der K-Ras-Mutante aufweisen. Die Hit-Rate betrug für ein erstes Screening von 30.000 Substanzen mit dieser Methode ungefähr 0,6 %. Ein neues Cytidin-Analogon wurde dabei entdeckt, welches eine selektive und konzentrationsabhängige *In-vitro*-Aktivität in diesem Assay aufweist und darüber hinaus *in vivo* das Tumorwachstum von Krebszellen mit K-Ras-Mutation inhibiert. Mit diesem System lassen sich gut Ras/Raf-Inhibitoren überprüfen, da es vor allen Dingen für Krebszellen cytotoxisch wirkende Substanzen detektiert. Für eine Überprüfung der in dieser Arbeit erhaltenen Ras/Raf-Aktivatoren ist es dagegen nur bedingt geeignet.

Für ein Screening nach Effektoren der direkten Ras/Raf-Wechselwirkung könnte auch ein von Becker et al. entwickeltes Fluoreszenzsystem verwendet werden (Becker, C.F. et al., 2001). Die Ras-bindende Domäne von c-Raf-1 wurde unter Einbau von zwei fluoreszierenden Aminosäure aus zwei Peptidsequenzen durch chemische Ligationen aufgebaut. Außerdem erfolgte die Einführung eines C-terminalen His₆-Tags, sodass das Protein an einer Nickel-NTA-Säule immobilisiert werden konnte. Die K_D -Werte für eine Bindung dieser modifizierten RBD-Mutante an GTP-gebundenes Ras sind vergleichbar mit dem unveränderten Protein. Da inaktives, GDP-gebundenes Ras nicht an die immobilisierte Mutante bindet, kann das modifizierte RBD-Protein als Biosensor zur Detektion von aktiviertem Ras eingesetzt werden. Außerdem können Substanzen, die als Ras/Raf-Inhibitoren wirken, aufgrund der Fluoreszenzänderung leicht detektiert werden.

Block et al. entwickelten einen Transaktivierungsassay in RK13-Zellen, bei dem das Reportergen Luciferase unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktor Ets steht. Drei E74-Bindungsstellen, zu denen Ets eine sehr hohe Affinität besitzt, wurden dabei vor das Reportergen kloniert, sodass durch die Aktivierung der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade die Expression des Reportergens induziert wird (Block, C. et al., 1996).

Ein ähnliches System stellt das käuflich erwerbliche „PathDetect *Trans*-Reporting-System“ der Fa. Stratagene dar. Von einem *trans*-Aktivatorvektor wird ein chimäres Protein bestehend aus der DNA-bindenden Domäne von Gal4 und der transaktivierenden Domäne eines bestimmten Transkriptionsfaktors exprimiert. Dieses Protein wird bei Aktivierung einer bestimmten Signalkaskade z. B. durch ein exprimiertes Gen oder eine zugefügte Testsubstanz phosphoryliert und induziert damit die Expression des Reportergens. In Bezug auf Ras/Raf-Effektoren würde man das Elk1-*Trans*-Reporting-System verwenden, bei dem die Aktivierung des MAPK-Signalwegs zu einer Phosphorylierung der transaktivierenden Domäne von Elk1 führt. Der Transkriptionsfaktor Elk1 ist Bestandteil eines ternären Komplexes, der das Serum-Response-Element (SRE) bindet und verschiedene Genaktivitäten in Reaktion auf Wachstums- und Serumsfaktoren reguliert. Die Phosphorylierung der Aminosäure Serin383 ist dabei essentiell, wobei die Kinetik der Elk1-Phosphorylierung und Aktivierung mit der MAPK-Aktivität korreliert (Marais, R. et al., 1993). Für die *Trans*-Reporting-Systeme können unterschiedliche Reporterproteine verwendet werden, die verschiedene Vor- und Nachteile bieten: das fluoreszierende hrGFP, die einfach messbare β -Galactosidase, Chloramphenicol-Acetyltransferase mit einer langen Halbwertszeit (50h) für die Messung dynamischer Prozesse, sekretorische alkalische Phosphatase, die ohne Zelllyse bestimmbar ist, oder die sehr sensitive Luciferase. Das Elk1-*Trans*-Reporting-System wird in stabil transfizierten HLR-Zellen angeboten, die nach Inkubation mit MAPK-Aktivatoren als Positivkontrolle einen deutlichen Anstieg der Luciferase-Aktivität zeigen: mit EGF (100 ng/ml) um das 5-fach, mit PMA (60 ng/ml) sogar um das 50-fache (Fa. Stratagene). Mit Hilfe von MEK-Inhibitoren wie U0126 (Favata, M.F. et al., 1998) oder PD98059 (Dudley, D.T. et al., 1995) sowie unter Verwendung der anderen, angebotenen *Trans*-Reporting-Systeme wie das c-Jun-, CREB- oder CHOP-System (Fa. Stratagene) kann außerdem die Spezifität der Aktivierung der MAPK-Signalkaskade festgestellt werden. Verstärken die HM-Substanzen die Ras/Raf-Interaktion, sollte keine Luciferase-Aktivität nach Behandlung der Zellen mit MEK-Inhibitoren bzw. mit den anderen *Trans*-Reporting-Systemen messbar sein.

Mit Hilfe des „PathDetect *Trans*-Reporting Systems“ konnte der Mechanismus, über den Valproinsäure AP-1 reguliert, aufgeklärt werden. Valproinsäure erhöht die DNA-bindende

Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 und steigert die Expression von AP-1-regulierten Genen (Ozaki, N. et al., 1997; Asghari, V. et al., 1998). Vier verschiedenen MAPK-Signalwege sind bekannt, die den AP-1-Transkriptionsfaktor regulieren: ERK, JNK, p38 und ERK5. Yuan et al. konnten im August 2001 zeigen, dass Valproinsäure in therapeutischen Konzentrationen (0,4-1 mM) den ERK-Signalweg aktiviert, das Zellwachstum und Überleben von Neuriten fördert und die Norepinephrin-Aufnahme und Abgabe steigert (Yuan, P.X. et al., 2001). MEK-Inhibitoren, sowie dominant-negative Ras- oder Raf-Mutanten blockierten den Valproinsäure-induzierten Effekt. Eine gesteigerte Luciferase-Aktivität wurde ab einer Inkubationszeit von 4h (0,5-fach) detektiert, die bis auf das 13-fache nach 24h-Inkubation anstieg. Die Phosphorylierung von ERK wurde jedoch erst nach einer längeren Inkubation (1-5 Tage) gesteigert, daher ist es unwahrscheinlich, dass Valproinsäure direkt mit einem Rezeptor z. B. dem ILGF-Rezeptor reagiert. Die Autoren vermuten, dass die Wirkung eher auf einer Beeinflussung der Phosphatidylcholin-Akkumulierung durch Aufnahme von Valproinsäure in die Zelle beruht. Phosphatidylcholin ist ein potenter und langanhaltender Aktivator des ERK-Signalweges. Interessanterweise sind die im Zwei-Hybrid-System aktiven HM-Substanzen als Strukturanaloga zu einem aktiven Metaboliten von Valproinsäure synthetisiert worden. Eine Untersuchung der Effekte sowohl von den HM-Substanzen als auch von den anderen Verbindungen wie T129 oder JS7b am „PathDetect *Trans*-Reporting-System“ wäre somit äußerst spannend.

Im Vergleich der hier aufgeführten Alternativen zu dem in dieser Arbeit verwendeten Säugerzellassay besitzt das „PathDetect *Trans*-Reporting-System“ als zweite Screening-Methode nach dem Hefe-Zwei-Hybrid-System die meisten Vorteile. Es beruht auf einem anderen Testsystem als das Zwei-Hybrid-System, es findet *in vivo* statt und ist einfach und schnell durchzuführen. Aufgrund der unterschiedlichen Reporter gene kann es ebenfalls als High-Throughput-Screening relativ einfach in Microtiterplatten mit β -Galactosidase als Reporterprotein durchgeführt werden. Um den Einfluss der HM-Substanzen auf die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade zu untersuchen, empfiehlt sich dagegen das Luciferase-Konstrukt, da es empfindlicher ist und auch geringe Beeinflussungen detektieren kann. Insofern könnte es den großen Nachteil einer zu geringen Sensitivität des in dieser Arbeit verwendeten Assays überwinden. Die Durchführbarkeit und Versuchsaufwand sind dabei mit dem phopho-MEK-Säugerzellassay vergleichbar. Allerdings müssen beim *Trans*-Reporting-System die Zelllinien erst stabil mit den entsprechenden Vektorkonstrukten transfiziert werden, was eine längere Vorlaufzeit vor dem eigentlichen Versuch erfordert.

5. Zusammenfassung

Die Protoonkogene Ras und Raf spielen eine wichtige Rolle bei der Übertragung eines extrazellulären Signals in den Zellkern. Die direkte Interaktion zwischen GTP-gebundenem, aktiviertem Ras und der Proteinkinase Raf führt zur Rekrutierung und Aktivierung von Raf an der Plasmamembran. Raf bildet mit den nachgeschalteten Kinasen MEK und ERK das MAP-Kinase-Modul, das Signale zum Zieleffektor weiterleitet, dabei aber auch eintreffende Signale aus parallelen Wegen koordiniert, Signale verstärkt, unterdrückt oder deren Inaktivierung steuert. Die besondere Bedeutung von Ras als molekularer Schalter der Signalübertragung zeigt nicht nur seine hohe Konservierung der Aminosäuresequenz, sondern auch die Tatsache, dass in bis zu 30 % aller menschlichen Tumore ein mutiertes Ras-Protein vorhanden ist. Aufgrund der wichtigen regulatorischen Rolle, die die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade bei onkogenen, mitogenen und entwicklungsabhängigen Signalwegen besitzt, stellt die Beeinflussung der Kaskade einen wichtigen Ansatz für die Arzneistoffentwicklung dar.

Trotz der bekannten Proteinstrukturen von Ras und Raf sind bisher nur wenige Stoffe gefunden worden, die die Interaktion direkt beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit sollte daher ein Testsystem beruhend auf dem Hefe-Zwei-Hybrid-System etabliert werden, mit dessen Hilfe Effektoren der Ras/Raf-Wechselwirkung schnell und einfach identifiziert werden können. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Der Zellaufschluss der Hefen, die Quantifizierung der β -Galactosidase-Aktivität und die Ausgangszelldichte im Zwei-Hybrid-Assays konnten so optimiert werden, dass eine Durchführung in 96-well-Microtiterplatten möglich ist. Außerdem wurde ein Excel-Programm zur Erleichterung der Auswertung der einzelnen Platten geschrieben.
- Die Sequenzen der zu untersuchenden Proteine wurden in Vektoren von zwei verschiedenen Zwei-Hybrid-Systemen kloniert (pPC- und Stratagene-Vektoren), sodass der Einfluss der Vektoreigenschaften wie Kopienzahl pro Zelle oder des Promotors auf die Ergebnisse untersucht werden konnte.
- Durch die Verwendung geeigneter Kontrollstämme, die zwei unterschiedliche, miteinander interagierende Proteine exprimieren, konnte außerdem eine Aussage über die Spezifität der Substanzinteraktion getroffen werden.
- Von den Ras- und Raf-Proteinen wurden außerdem verkürzte Mutanten als Fusionsproteine mit den Gal4-Domänen exprimiert, sodass für die beobachtete Änderung der β -Galactosidase-Aktivität wichtige Bereiche der Proteine identifiziert werden konnten.

- Insgesamt wurden 469 Proben in verschiedenen Konzentrationen im Zwei-Hybrid-Assay getestet. Davon waren 95 pflanzliche Extrakte und 374 Einzelmoleküle. Durch die Untersuchung systematischer Substanzreihen konnten außerdem bei einigen Substanzen Struktur-Wirkungsbeziehungen aufgestellt werden.

- Verschiedene Proben wie Arnika-Extrakt oder Verbindungen der JS- und T-Substanzreihe führten nach Inkubation nur zu einer Steigerung der β -Galactosidase-Aktivität der pPC-Teststämme, nicht jedoch der Stratagene-Teststämme. Die Beeinflussung scheint daher von der Expressionsrate der Fusionsproteine abhängig zu sein.

- Mit HM70 und verschiedenen Analoga wurden Substanzen identifiziert, die in beiden Zwei-Hybrid-Systemen nach Inkubation eine Steigerung der β -Galactosidase-Aktivität der Ras/Raf-Teststämme bewirkten. Durch die Expression verkürzter Ras- und Raf-Mutanten konnten der Bereich von AS 131-194 mit der Cystein-reichen Domäne von Raf als wahrscheinlicher Interaktionsbereich charakterisiert werden. Wichtige Strukturvoraussetzungen für einen Effekt stellten eine Carboxylgruppe, eine semicyclische Doppelbindung und ein Cyclohexan- bzw. Cycloheptanring dar.

Neben dem Zwei-Hybrid-System sollten die aktiven Verbindungen außerdem in einem zweiten, unabhängigen Testsystem untersucht werden, das auf der Aktivierung der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade und dem anschließendem Nachweis des phosphorylierten MEK-Proteins beruht. Aus den Versuchen waren folgende erste Ergebnisse zu erhalten:

- Die HM-Substanzen weisen während einer 48-stündigen Inkubation in einer Konzentration von 10 μ M keine Beeinflussung des Wachstums und der Vitalität von HL60- und T24-Zellen auf.

- Eine Inkubation mit der Positivkontrolle PMA führte nach 1 min in HL60-Zellen, sowie nach ca. 2^{1/2} min in T24-Zellen zu einer gesteigerten Phosphorylierung von MEK.

- Die Versuche mit den HM-Substanzen lieferten in beiden Zelllinien keine eindeutigen Ergebnisse. Zwar steigerten sie in einigen Experimenten die MEK-Phosphorylierung im Vergleich zum Lösungsmittel, jedoch war dieser Effekt nicht durchgängig reproduzierbar.

- Auch in HeLa-Zellen, die im Gegensatz zur HL60- und T24-Zelllinie keine Ras-Mutation tragen, konnte keine eindeutige Aktivierung der Kaskade beobachtet werden.

Mögliche Optimierungen der beiden verwendeten Testsysteme, sowie Alternativen, weitergehende Experimente und Einsatzgebiete von Ras/Raf-Effektoren werden abschließend diskutiert.

6. Literaturverzeichnis

- Ahmadian, M.R., T. Zor, D. Vogt, W. Kabsch, Z. Selinger, A. Wittinghofer, K. Scheffzek** 1999. "Guanosine triphosphatase stimulation of oncogenic Ras mutants." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7065-7070.
- Ahn, N.G., R. Seger, R.L. Bratlien, C.D. Diltz, N.K. Tonks, E.G. Krebs** 1991. "Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade: in vitro activation of a myelin based protein/microtubule-associated protein 2 kinase." *J. Biol. Chem.* 266: 4220-4227.
- Aitken, A.** 1996. "14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signalling pathways." *Trends Cell Biol.* 6: 341-347.
- Aronheim, A., E. Zandi, H. Hennemann, S.J. Elledge, M. Karin** 1997. "Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions." *Mol. Cell. Biol.* 17: 3094-3102.
- Asghari, V., J.F. Wang, J.S. Reich, L.T. Young** 1998. "Differential effects of mood stabilizers on Fos/Jun proteins and AP-1 DNA binding activity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells." *Brain Res. Mol. Brain Res.* 58: 95-102.
- Ballard-Barbash, H., S. Krebs-Smith, A.F. Subar** 1995. "Vegetables, fruit and colon cancer in the Iowa Women's Health Study." *Am. J. Epidemiol.* 141: 84-86.
- Bandyopadhyay, G., M.P. Sajan, Y. Kanoh, M.L. Standaert, T.R. Burke, M.J. Quon, B.C. Reed, I. Dikic, L.E. Noel, C.B. Newgard, et al.** 2000. "Glucose activates mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-regulated kinase) through proline-rich tyrosine kinase-2 and the Glut1 glucose transporter." *J. Biol. Chem.* 275: 40817-40826.
- Barbacid, M.** 1987. "ras genes." *Annu. Rev. Biochem.* 56: 779-827.
- Barnard, D., B. Diaz, L. Hettich, E. Chuang, X. Zhang, J. Avruch, M. Marshall** 1995. "Identification of the sites of interaction between c-Raf-1 and Ras-GTP." *Oncogene* 10: 1283-1290.
- Barnard, D., H. Sun, L. Baker, M. Marshall** 1998. "*In vitro* inhibition of Ras-Raf association by short peptides." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247: 176-180.
- Becker, C.F., C.L. Hunter, R.P. Seidel, S.B. Kent, R.S. Goody, M. Engelhard** 2001. "A sensitive fluorescence monitor for the detection of activated Ras: total chemical synthesis of site-specifically labeled Ras binding domain of c-Raf-1 immobilized on a surface." *Chem. Biol.* 8: 243-252.
- Berg, M., K. Undisz, R. Thiericke, T. Moore, C. Posten** 2000. "Miniaturization of a functional transcription assay in yeast (human progesteron receptor) in 384- and 1536-well plate format." *J. Biomol. Screening* 5: 71-76.
- Block, C., R. Janknecht, C. Herrmann, N. Nassar, A. Wittinghofer** 1996. "Quantitative structure-activity analysis correlating Ras/Raf interaction *in vitro* to Raf activation *in vivo*." *Nat. Struc. Biol.* 3: 244-251.
- Block, C., A. Wittinghofer** 1995. "Switching to Rac and Rho." *Structure* 3: 1281-1284.
- Bos, J.L.** 1989. "Ras oncogenes in human cancer: a review." *Cancer Res.* 49: 4682-4689.
- Boulton, T.G., S.H. Nye, D.J. Robbins, N.Y. Ip, E. Radziejewska, S.D. Morgenbesser, R.A. DePinho, N. Panayotatos, M.H. Cobb, G.D. Yancopoulos** 1991. "ERKs: a family of proteine-serine/threonine kinases that reactivated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF." *Cell* 65: 663-675.
- Bradford, M.M.** 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Broder, Y.C., S. Katz, A. Aronheim** 1998. "The Ras recruitment system, a novel approach to the study of protein-protein interactions." *Curr. Biol.* 8: 1121-1124.
- Bubenik, J., M. Baresova, V. Viklicky, J. Jakoubkova, H. Sainerova, J. Donner** 1973. "Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen." *Int. J. Cancer* 11: 765-773.
- Bubenik, J., P. Perlmann, K. Helmstein, G. Moberger** 1970. "Cellular and humoral immune responses to human urinary bladder carcinomas." *Int. J. Cancer* 5: 310-319.
- Buolamwini, J.K.** 1999. "Novel anticancer drugs." *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3: 500-509.
- Campbell, S.L., R. KhosraviFar, K.L. Rossman, G.J. Clark, C.J. Der** 1998. "Increasing complexity of Ras signaling." *Oncogene* 17: 1395-1413.
- Casey, C., J.T. Holmlund, R. Geary, T. Jesse, A. Dorr, J.F. Johnston, B.P. Monia, J. Nemunaitis** 2001. "A Phase I trial of h-ras antisense oligonucleotide ISIS 2503 administered as a continuous intravenous infusion in patients with advanced carcinoma." *Cancer* 92: 1265-1271.
- Chevray, P., D. Nathans** 1992. "Protein interaction cloning in yeast: Identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5789-5793.

- Chi, S.J., C. Kitanaka, K. Noguchi, T. Mochizuki, Y. Nagashima, M. Shirouzu, H. Fujita, M. Yoshida, W.B. Chen, A. Asai, et al.** 1999. "Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells." *Oncogene* 18: 2281-2290.
- Chien, C., P. Bartel, R. Sternglanz, S. Fields** 1991. "The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9578-9582.
- Chin, L., A. Tam, J. Pomerantz, M. Wong, J. Holash, N. Bardeesy, Q. Shen, R. OHagan, J. Pantginis, H. Zhou, et al.** 1999. "Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance." *Nature* 400: 468-472.
- Choy, E., V.K. Chiu, J. Silletti, M. Feoktistov, T. Morimoto, D. Michaelson, I.E. Ivanov, M.R. Philips** 1999. "Endomembrane trafficking of Ras: The CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi." *Cell* 98: 69-80.
- Clark, G., J. Drugan, R. Terrell, C. Bradham, C. Der, R. Bell, S. Campbell** 1996. "Peptides containing a consensus Ras binding sequence from Raf-1 and the GTPase activating protein NF1 inhibit Ras function." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1577-1581.
- Clontech-Laboratories** 2000. *Yeast Protocols Handbook*.
- Cobb, M.H.** 1999. "MAP kinase pathways." *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 71: 479-500.
- Collins, S.J.** 1987. "The HL-60 promyelotic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression." *Blood* 70: 1233-1244.
- Collins, S.J., R.C. Gallo, R.E. Gallagher** 1977. "Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture." *Nature* 270: 347-349.
- Crews, C., A. Alessandrini, R. Erikson** 1992. "The primary structure of MK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product." *Science* 258: 478-480.
- Dagert, M., S.D. Ehrlich** 1979. "Prolonged incubation in calcium chloride improves competence of *E. coli*." *Gene* 6: 23-28.
- Dalton, S., R. Treisman** 1992. "Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element." *Cell* 68: 597-612.
- Dang, C.V., J. Barrett, M. Villa-Garcia, L.M. Resar, G.J. Kato, E.R. Fearon** 1991. "Intracellular leucine zipper interactions suggest c-myc heterooligomerization." *Mol. Cell. Biol.* 11: 954-962.
- Daub, M., J. Jockel, T. Quack, C.K. Weber, F. Schmitz, U.R. Rapp, A. Wittinghofer, C. Block** 1998. "The RafC1 cysteine-rich domain contains multiple distinct regulatory epitopes which control Ras-dependent Raf activation." *Mol. Cell. Biol.* 18: 6698-6710.
- Delmotte, P., J. Delmotte-Plaquee** 1953. "A new antifungal substance of fungal origin." *Nature* 270: 347-349.
- DeVendittis, E., A. Vitelli, R. Zahn, O. Fasano** 1986. "Suppression of defective Ras1 and Ras2 functions in yeast by an adenylate cyclase activated by a single amino acid change." *EMBO J.* 5: 3657-3663.
- DeWet, J.R., K.V. Wood, M. DeLuca, D.R. Helsinki, S. Subramani** 1987. "Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells." *Mol. Cell. Biol.* 7: 725-737.
- Dorant, E., van den Brandt, R.A. Goldbohm, R.J.J. Hermus, F. Sturmans** 1993. "Garlic-its significance for the prevention of cancer in humans: a critical view." *Br. J. Cancer* 67: 424-429.
- Downward, J.** 1996. "Control of ras activation." *Cancer Surv.* 27: 87-100.
- Downward, J.** 1998. "Ras signalling and apoptosis." *Curr. Opin. Gen Dev.* 8: 49-54.
- Drevets, W.C., J.L. Price, J.R.J. Simpson, R.D. Todd, T. Reich, M. Vannier, M.E. Raichle** 1997. "Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders." *Nature* 386: 824-827.
- Dudley, D.T., L. Pang, S.J. Decker, A.J. Bridges, A.R. Saltiel** 1995. "A synthetic inhibitor of mitogen-activated protein kinase cascade." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7686-7689.
- Egan, R.W., P.H. Gale, W.J.A. VandenHeuvel, E.M. Baptista, F.A. Kuehl** 1980. "Mechanism of oxygen transfer by prostaglandin hydroperoxidase." *J. Biol. Chem.* 255: 323-326.
- Ellis, R.W., D. DeFeo, T.Y. Shih, M.A. Gonda, Y. H.A., N. Tsuchida, D.R. Lowy, E.M. Scolnick** 1981. "The p21 src genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes." *Nature* 292: 506-511.
- Emerson, S.D., V.S. Madison, R.E. Palermo, D.S. Waugh, J.E. Scheffler, K.-L. Tsao, S.E. Kiefer, S.P. Liu, D.C. Fry** 1995. "Solution structure of the Ras-binding domain of c-Raf-1 and identification of its Ras interaction surface." *Biochemistry* 34: 6911-6918.
- Estojak, J., R. Brent, E. Golemis** 1995. "Correlation of two hybrid affinity data with *in vitro* measurements." *Mol. Cell. Biol.* 15: 5820-5829.
- Fam, N.P., W.T. Fan, Z.X. Wang, L.J. Zhang, H. Chen, F. Moran** 1997. "Cloning and characterization of Ras-GRF2, a novel guanine nucleotide exchange factor for Ras." *Mol. Cell. Biol.* 17: 1396-1406.

- Favata, M.F., K.Y. Horiuchi, E.J. Manos, A.J. Daulerio, D.A. Stradley, W.S. Feeser, D.E. Vandyk, W.J. Pitts, R.A. Eart, F. Hobbs, et al.** 1998. "Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase." *J. Biol. Chem.* 273: 18623-18632.
- Ferrel, J.E.J.** 1996. "Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs." *TIBS* 21: 460-466.
- Fields, S., O. Song** 1989. "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." *Nature* 340: 245-246.
- Fridman, M., H. Maruta, J. Gonez, F. Walker, H. Treutlein, J. Zeng, A. Burgess** 2000. "Point mutants of c-Raf-1 RBD with elevated binding to v-Ha-Ras." *J. Biol. Chem.* 275: 30363-30371.
- Friese, A., K. Hell-Momeni, I. Zündorf, T. Winckler, T. Dingermann, G. Dannhardt** 2002. "Synthesis and biological evaluation of cycloalkylidene carboxylic acids as novel effectors of Ras/Raf interaction." *J. Med. Chem.* 45: 1535-1542.
- Frodin, M., S. Gammeltoft** 1999. "Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction." *Mol. Cell. Endocrinol.* 151: 65-77.
- Ganguly, A.K., Y.S. Wang, B.N. Pramanik, R.J. Doll, M.E. Snow, A.G. Taveras, S. Remiszewski, D. Cesarz, J. delRosario, B. Vibulbhan, et al.** 1998. "Interaction of a novel GDP exchange inhibitor with the Ras protein." *Biochemistry* 37: 15631-15637.
- Garcia-Rodriguez, L.A., C. Huerta-Alvarez** 2001. "Reduced risk of colorectal cancer among long-term users of aspirin and nonaspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs." *Epidemiology* 12: 88-93.
- Gavin, A.-C., M. Bösche, R. Krause, P. Grandi, M. Marzloch, A. Bauer, J. Schultz, J. Rick, et al.** 2002. "Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes." *Nature* 415: 141-147.
- Gey, G.O., W.D. Coffman, M.T. Kubicek** 1952. "Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium." *Cancer Res.* 12: 264-265.
- Göttlicher, M., S. Minucci, P. Zhu, O.H. Krämer, A. Schimpf, S. Giavara, J.P. Sleeman, F. Lo Coco, C. Nervi, P.G. Pelicci, et al.** 2001. "Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells." *EMBO J.* 20: 6969-6978.
- Guthrie, C., G.R. Fink** 1991. "Guide to yeast genetics and molecular biology." *Meth. Enzymol.* 194: 1-932.
- Gyuris, J., E. Golemis, H. Chertkov, R. Brent** 1993. "Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2." *Cell* 75: 791-803.
- Hahn, L.** 1999. "Entwicklung neuer Antiinflammatorika mit Imidazol-Teilstruktur sowie Modifikation eines *in-vitro*-Assays zur fluometrischen Quantifizierung der COX-1/TXA₂-Synthase-Inhibition". Institut für Pharmazie, Mainz, Johannes Gutenberg-Universität
- Hancock, J.F., H. Paterson, C.J. Marshall** 1990. "A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21 to the plasma membrane." *Cell* 63: 133-139.
- Hänsel, R.** 1999. "Wirkung, Wirksamkeit und Risiken pflanzlicher Arzneimittel". *Pharmakognosie-Phytopharmazie*. Hänsel, R., O. Sticher, E. Steinegger. Berlin Heidelberg, Springer Verlag. 6: 1189-1318.
- Harper, J., G. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, S. Elledge** 1993. "The p21 CDK-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases." *Cell* 75: 805-816.
- Hell-Momeni, K.** 2000. "Entwicklung und Testung von Wirkstoffen mit antikonvulsiver Potenz sowie von Modulatoren der Ras/Raf-Kopplung: Synthese, Analytik, Testung, Struktur-Wirkungs-Beziehungen". Institut für Pharmazie, Mainz, Johannes Gutenberg-Universität
- Herrmann, C., C. Block, C. Geisen, K. Haas, C. Weber, G. Winde, T. Moroy, O. Muller** 1998. "Sulindac sulfide inhibits Ras signaling." *Oncogene* 17: 1769-1776.
- Herrmann, C., G.A. Martin, A. Wittinghofer** 1995. "Quantitative analysis of the complex between p21^{ras} and the Ras-binding domain of the human Raf-1 protein kinase." *J. Biol. Chem.* 261: 9341-9347.
- Heslot, H., C. Gaillardin**, Ed. Eds. 1992. *Molecular biology and genetic engineering of yeasts*. Boca Raton, CRC Press.
- Huang, C.-Y.F., J.E.J. Ferrel** 1996. "Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10078-10083.
- Huang, H.S., M. Nagane, C.K. Klingbeil, H. Lin, R. Nishikawa, X.D. Ji, C.M. Huang, G.N. Gill, H.S. Wiley, W.K. Cavenee** 1997. "The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling." *J. Biol. Chem.* 272: 2927-2935.
- Huser, M., J. Luckett, A. Chiloeches, K. Mercer, M. Iwobi, S. Giblett, X.M. Sun, J. Brown, R. Marais, C. Pritchard** 2001. "MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function." *EMBO J.* 20: 1940-1951.

- Ichikawa, S., H. Hatanaka, Y. Takeuchi, S. Ohno, F. Inagaki** 1995. "Solution structure of cysteine-rich domain of protein kinase C α ." *J. Biochem.* 117: 566-574.
- Inouye, K., S. Mizutami, H. Koide, Y. Kaziro** 2000. "Formation of the Ras dimer is essential for Raf-1 activation." *J. Biol. Chem.* 275: 3737-3740.
- Isaac, O.** 1994. "Calendula officinalis L. - Die Ringelblume. Portrait einer Arzneipflanze." *Z. Phytother.* 16: 357-370.
- Iyer, V., K. Struhl** 1995. "Mechanism of differential utilization of the his3 TR and TC TATA elements." *Mol. Cell. Biol.* 15: 7059-7066.
- Jaitner, B.** 1997. "Die Raf-Kinase - Funktionelle Analyse ihrer Interaktion mit Ras und Regulation ihrer Kinaseaktivität". Abteilung Strukturelle Biologie, Dortmund, Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie
- Jaitner, B.K., J. Becker, T. Linnemann, C. Herrmann, A. Wittinghofer, C. Block** 1997. "Discrimination of amino acids mediating Ras binding from noninteracting residues affecting raf activation by double mutant analysis." *J. Biol. Chem.* 272: 29927-29933.
- James, P.** 2001. "Yeast Two-Hybrid Vectors and Strains". *Methods in Molecular Biology: Two-Hybrid Systems: Methods and Protocols*. MacDonald, P.N. Totowa, Humana Press Inc. 177: 41-65.
- Jankun, J., S.H. Selman, R. Swiercz** 1997. "Why drinking green tea could prevent cancer." *Nature* 387: 561.
- Jaumot, M., J. Yan, J. Clyde-Smith, J. Sluimer, J.F. Hancock** 2002. "The linker domain of the Ha-Ras hypervariable region regulates interactions with exchange factors, Raf-1 and phosphoinositide-3-kinase." *J. Biol. Chem.* 277: 272-278.
- Jiang, Y., C. Davis, J.R. Broach** 1998. "Efficient transition to growth on fermentable carbon sources in *Saccharomyces cerevisiae* requires signaling through the Ras pathway." *EMBO J.* 17: 6942-6951.
- John, J., M. Frech, J. Feuerstein, R.S. Goody, A. Wittinghofer** 1989. *Guanine-Nucleotide-Binding Proteins*. Bosch, L., B. Kraal, A. Partmeggiani. New York, Plenum: 209-214.
- Joneson, T., M.A. White, M.H. Wigler, D. Bar-Sagi** 1996. "Stimulation of membrane ruffling and MAP kinase activation by distinct effectors of Ras." *Science* 271: 810-812.
- Kalgutkar, A.S., Z. Zhao** 2001. "Discovery and design of selective cyclooxygenase-2 inhibitors as non-ulcerogenic, anti-inflammatory drugs with potential utility as anti-cancer agents." *Curr. Drug Targets* 2: 79-106.
- Kastner, U., S. Sosa, M. Wolf, et al** 1993. "Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen von Tees aus verschiedenen Taxa der *Achillea millefolium*-Gruppe." *Sci. Pharm.* 61: 47-54.
- Kauffman-Zeh, A., P. Rodriguez-Viciano, E. Ulrich, C. Gilbert, P. Coffey, J. Downward, G. Evan** 1997. "Suppression of c-myc-induced apoptosis by Ras signaling through PI(3)K and PKB." *Nature* 385: 544-548.
- Keegan, L., G. Gill, M. Ptashne** 1986. "Separation of DNA binding from the transcription-activating function of an eukaryotic regulatory protein." *Science* 231: 699-704.
- Kerkhoff, E., R. Houben, S. Löffler, J. Troppmair, J.E. Lee, U.R. Rapp** 1998. "Regulation by c-myc expression by Ras/Raf signalling." *Oncogene* 16: 211-216.
- Khleif, S.N., S.I. Abrams, J.M. Hamilton, E. Bergmann-Leitner, A. Chen, A. Bastian, S. Bernstein, Y.M. Chung, C.J. Allegra, J. Schlom** 1999. "A phase I vaccine trial with peptides reflecting ras oncogene mutations of solid tumors." *J. Immunother.* 22: 155-165.
- Khokhlatchev, A.V., B. Canagarajah, J. Wilsbacher, M. Robinson, M. Atkinson, E. Goldsmith, M.H. Cobb** 1998. "Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation." *Cell* 93: 605-615.
- Khuder, S.A., A.B. Mutgi** 2001. "Breast cancer and NSAID use: a meta-analysis." *Br. J. Cancer* 84: 1188-1192.
- Ki, S.W., K. Kasahara, H.J. Kwon, J. Eishima, K. Takesako, J.A. Cooper, M. Yoshida, S. Horinouchi** 1998. "Identification of radicicol as an inhibitor of *in vivo* Ras/Raf interaction with the yeast two-hybrid screening system." *J. Antibiot.* 51: 936-944.
- Klebe, R., J. Harriss, Z. Sharp, M. Douglas** 1983. "A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast." *Gene* 25: 333-341.
- Koide, H., T. Satoh, M. Nakafuku, Y. Kaziro** 1993. "GTP-dependent association of Raf-1 with H-Ras: Identification of Ras as a target downstream of Ras in mammalian cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8683-8686.
- Kolch, W.** 2000. "Meaningful relationship: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interaction." *Biochem. J.* 351: 289-305.
- Kolibaba, K.S., B.J. Druker** 1997. "Protein tyrosine kinases and cancer." *Biochim. Biophys. Acta* 1333: F217-248.

- Kunkel, T.A.** 1985. "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488-492.
- Kunkel, T.A., J.D. Roberts, R.A. Zakour** 1987. "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection." *Methods Enzymol.* 14: 367-382.
- Kwon, H.J., M. Yoshida, K. Muroya, S. Hattori, E. Nishida, Y. Fukui, T. Beppu, S. Horinouchi** 1995. "Morphology of ras-transformed cells becomes apparently normal again with tyrosine kinase inhibitors without a decrease in the ras-GTP complex." *J. Biochem. (Tokyo)* 118: 221-228.
- Laemmli, U.K.** 1970. "Cleavage of structure proteins during assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227: 680-685.
- Lee, S.W., L. Fang, M. Igarashi, T. Ouchi, K.P. Lu, S.A. Aaronson** 2000. "Sustained activation of Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase cascade by the tumor suppressor p53." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8302-8305.
- Lenzen, C., R.H. Cool, H. Prinz, J. Kuhlmann, A. Wittinghofer** 1998. "Kinetic analysis by fluorescence of the interaction between Ras and the catalytic domain of the guanine nucleotide exchange factor Cdc25Mm." *Biochemistry* 37: 7420-7430.
- Leonard, D.M.** 1997. "Ras farnesyltransferase: a new therapeutic target." *J. Med. Chem.* 40: 2971-2990.
- Li, J.J., I. Herskowitz** 1993. "Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex, by a one-hybrid system." *Science* 262: 1870-1874.
- Li, N., A. Batzer, R. Daly, V. Yajnik, E. Skolnik, P. Chardin, D. Bar-Sagi, B. Margolis, J. Schlessinger** 1993. "Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling." *Nature* 363: 85-88.
- Lopez, A.J.** 1998. "Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation." *Annu. Rev. Genet.* 32: 279-305.
- Löschner, W.** 1992. "Pharmacological, toxicological and neurochemical effects of $\Delta^{2(E)}$ -valproate in animals." *Pharm. Weekblad. Sci.* 14: 139-143.
- Luo, S.F., C.C. Wang, C.T. Chiu, C.S. Chien, L.D. Hsiao, C.H. Lin, C.M. Yang** 2000. "Lipopolysaccharide enhances bradykinin-induced signal transduction via activation of Ras/Raf/MEK/MAPK in canine tracheal smooth muscle cells." *Br. J. Pharmacol.* 130: 1799-1808.
- Lyons, J.F., S. Wilhelm, B. Hilbner, G. Bollag** 2001. "Discovery of a novel Raf kinase inhibitor." *Endocr. Relat. Cancer* 8: 219-225.
- Lyss, G., T. Schmidt, I. Merfort, H. Pahl** 1997. "Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from Arnica, selectively inhibits transcription factor NF-kB." *Biol. Chem.* 378: 951-961.
- Ma, J., M. Ptashne** 1987a. "Deletion analysis of Gal4 defines two transcriptional activating segments." *Cell* 48: 847-853.
- Ma, J., M. Ptashne** 1987b. "A new class of yeast transcriptional activators." *Cell* 51: 113-119.
- Mahadevan, S., K. Struhl** 1990. "Tc, an unusual promoter element required for constitutive transcription of the yeast HIS3 gene." *Mol. Cell. Biol.* 10: 4447-4455.
- Malarz, J., A. Stojakowska, B. Dohnal, W. Kisiel** 1992. "Helenalin acetate in *in vitro* propagated plants of Arnica montana." *Planta Med.* 59: 51-53.
- Manji, H.K., G.J. Moore, G. Rajkowska, G. Chen** 2000. "Neuroplasticity and cellular resilience in mood disorders." *Mol. Psychiatry* 5: 578-593.
- Mansour, S.J., W.T. Matten, A.S. Hermann, J.M. Candia, S. Rong, K. Fukasawa, G.F. Vande Woude, N.G. Ahn** 1994. "Transformation of mammalian cells by constitutive active MAP kinase kinase." *Science* 265: 966-970.
- Marais, R., C.J. Marshall** 1996. "Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf." *Cancer Surveys* 27: 101-125.
- Marais, R., J. Wynne, R. Treisman** 1993. "The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation." *Cell* 73: 381-393.
- Marshall, C.J.** 1996. "Ras effectors." *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 197-204.
- Mazzucchelli, C., R. Brambilla** 2000. "Ras-related and MAPK signalling in neuronal plasticity and memory formation." *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 604-611.
- McPherson, R.A., A. Harding, S. Roy, A. Lane, J.F. Hancock** 1999. "Interactions of c-Raf-1 with phosphatidylserine and 14-3-3." *Oncogene* 18: 3862-3869.

- Mellor, G., S. Fogarty, M. O'Brien, M. Congreve, M. Banks, K. Mills, B. Jefferies, J. Houston** 1997. "Searching for chemokine receptor binding antagonists by high throughput screening." *J. Biomol. Screening* 2: 153-157.
- Merfort, I.** 1984. "Methylierte Flavonoide aus *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*." *Planta Med.*: 107-108.
- Merfort, I.** 1992a. "Arnica". *Hagers Handbuch: Drogen*. Hänsel, R., K. Keller, H. Rimpler, G. Schneider, Springer Verlag.
- Merfort, I.** 1992b. "Caffeoylquininic acids from flowers of *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*." *Phytochemistry* 31: 2111-2113.
- Merfort, I., D. Wendisch** 1992. "New flavonoide glycosides from *Arnica flos* DAB 9." *Planta Med.* 58: 355-357.
- Merfort, I., G. Willuhn, C. Jerga** 1990. "Arnikablüten DAB 9 - Reinheitsprüfung." *DAZ* 18: 980-984.
- Milburn, M.V., L. Tong, A.M. DeVos, A. Brünger, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, S.-H. Kim** 1990. "Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins." *Science* 247: 939-945.
- Miller, J.H.** 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Moodie, S.A., B.M. Willumsen, M.J. EWeber, A. Wolfman** 1993. "Complexes of Ras-GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase." *Science* 260: 1658-1660.
- Morrison, D., R. Cutler** 1997. "The complexity of Raf-1 regulation." *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 174-179.
- Mosmann, T.** 1983. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J. Immunol. Methods* 65: 55-63.
- Mott, H.R., J.W. Carpenter, S. Zhong, S. Ghosh, R.M. Bell, S.L. Campbell** 1996. "The solution structure of the Raf-1 cysteine-rich domain: a novel Ras and phospholipid binding site." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8312-8317.
- Nakielnny, S., P. Cohen, J. Wu, T. Sturgill** 1992. "MAP kinase activator from insulin-stimulated skeletal muscle is a protein threonine/tyrosine kinase." *EMBO J.* 11: 2123-2130.
- Nassar, N., G. Horn, C. Herrmann, A. Scherer, F. McCormick, A. Wittinghofer** 1995. "The 2.2Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf-1 in complex with Rap1A and a GTP analogue." *Nature* 375: 554-560.
- Nau, H., R.S. Hauck, K. Ehlers** 1991. "Valproic acid-induced neural tube defects in mouse and human: aspects of chirality, alternative drug development pharmacokinetics and possible mechanisms." *Pharmacol. Toxicol.* 69: 310-321.
- Noonan, T., N. Brown, L. Dudycz, G. Wright** 1991. "Interaction of GTP derivatives with cellular and oncogenic ras-p21 proteins." *J. Med. Chem.* 34: 1303-1307.
- Oka, M., N. Ota, Y. Mino, T. Iwashita, H. Komura** 1992. "Studies on the conformational aspects of inulin oligomers." *Chem. Pharm. Bull* 40: 1203-1207.
- Ongur, D., W.C. Drevets, J.L. Price** 1998. "Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13290-13295.
- Osborne, M., S. Dalton, J.P. Kochan** 1995. "The yeast tribrid system: genetic detection of trans-phosphorylated ITAM-SH2 interactions." *Biotechnology* 13: 1474-1478.
- Ozaki, N., D.M. Chuang** 1997. "Lithium increases transcription factor binding to AP-1 and cyclic AMP-responsive element in cultured neurons and rat brain." *J. Neurochem.* 69: 238-245.
- Pai, E.F., W. Kabsch, U. Krengel, K.C. Holmes, J. John, A. Wittinghofer** 1989. "Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation." *Nature* 341: 209-214.
- Pai, E.F., U. Krengel, G.A. Petsko, R.S. Goody, W. Kabsch, A. Wittinghofer** 1990. "Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis." *EMBO J.* 9: 2351-2359.
- Pai, R., M.K. Jones, M. Tomikawa, A.S. Tarnawski** 1999. "Activation of Raf-1 during experimental gastric ulcer healing is Ras-mediated and protein kinase C-independent." *American J. Pathology* 155: 1759-1766.
- Pasricha, P.J., A. Bedi, K. O'Connor, A. Rashid, A.J. Akhtar, M.L. Zahurak, S. Piantadosi, S.R. Hamilton, F.M. Giardiello** 1995. "The effects of sulindac on colorectal proliferation and apoptosis in familial adenomatous polyposis." *Gastroenterology* 109: 994-998.

- Paßreiter, C.** 1992. "Co-occurrence of 2-pyrrolidineacetic acid with the pyrrolizidines tussilaginic acid and isotussilaginic acid and their 1-Epimers in Arnica species and Tussilago farfara." *Phytochemistry* 31: 4135-4137.
- Pawson, G., J.D. Scott** 1997. "Signaling through scaffold anchoring and adaptor proteins." *Science* 278: 2075-2080.
- Phiel, C.J., F. Zhang, E.Y. Huang, M.G. Guenther, M.A. Lazar, P.S. Klein** 2001. "Histone Deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen." *J. Biol. Chem.* 276: 36734-36741.
- Pluthero, F.G.** 1993. "Rapid purification of high activity Taq DNA polymerase." *Nucl. Acids Res.* 21: 4850-4851.
- Porta, M., N. Malats, L. Guarner, A. Carrato, J. Rifa, A. Salas, J.M. Corominas, M. Andreu, F.X. Real** 1999. "Association between coffee drinking and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer." *J. Epidemiology Comm. Health* 53: 702-709.
- Privé, G.G., M.V. Milburn, L. Tong, A.M. DeVos, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, S.-H. Kim** 1992. "X-ray crystal structures of transforming p21 ras mutants suggest a transition-state stabilization mechanism for GTP hydrolysis." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3649-3653.
- Putz, U., P. Skehel, D. Kuhl** 1996. "A tri-hybrid system for the analysis and detection of RNA-protein interactions." *Nucl. Acids Res.* 24: 4838-4840.
- Qiu, M.S., S.H. Green** 1992. "PC12 cell neuronal differentiation is associated with prolonged p21ras activity and consequent prolonged ERK activity." *Neuron* 9: 705-717.
- Rapp, U.R., M.D. Goldsborough, G.E. Mark, T.I. Bonner, J. Groffen, F.H.j. Reynolds, J.R. Stephenson** 1983a. "Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4218-4222.
- Rapp, U.R., F.H.j. Reynolds, J.R. Stephenson** 1983b. "New mammalian transforming retrovirus: demonstration of a polyprotein gene product." *J. Virol.* 45: 914-924.
- Reddy, E.P., R.K. Reynolds, E. Santos, M. Barbacid** 1982. "A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene." *Nature* 300: 149-152.
- Reeder, M., I. Serebriiskii, E. Golemis, J. Chernoff** 2001. "Analysis of small GTPase signaling pathways using Pak1 mutants that selectively couple to Cdc42." *J. Biol. Chem.* 276: 40606-40613.
- Reszka, A.A., R. Seger, C.D. Diltz, E.G. Krebs, E.H. Fischer** 1995. "Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8881-8885.
- Ries, S., C. Biederer, D. Woods, O. Shifman, S. Shirasawa, T. Sasazuki, M. McMahon, M. Oren, F. McCormick** 2000. "Opposing effects of Ras on p53: transcriptional activation of mdm2 and induction of p19ARF." *Cell* 103: 321-330.
- Robinson, M.J., S.A. Stippec, E. Goldsmith, M.A. White, M.H. Cobb** 1998. "Constitutively active ERK2 MAPkinase is sufficient for neurite outgrowth and cell transformation when targeted to the nucleus." *Curr. Biol.* 8: 1141-1150.
- Rudin, C.M., J. Holmlund, G.F. Fleming, S. Manoi, W.M. Stadtler, P. Schumm, B.P. Monia, J.F. Johnston, R. Geary, R.Z. Yu, et al.** 2001. "Phase I trial of ISIS 5132, an antisense oligonucleotide inhibitor of c-Raf-1, administered by 24-hour weekly infusion to patients with advanced cancer." *Clin. Cancer Res.* 7: 1214-1220.
- Ruohonen, L., M.K. Aalto, S. Keränen** 1995. "Modifications to the ADH1 promotor of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of heterologous proteins." *J. Biotechnology* 39: 193-203.
- Salomoni, P., M.A. Wasik, R.F. Riedel, K. Reiss, J.K. Choi, T. Skorski, B. Calabretta** 1998. "Expression of constitutively active Raf-1 in the mitochondria restores antiapoptotic and leukemogenic potential of a transformation-deficient BCR/Abl mutant." *J. Exp. Med.* 187: 1995-2007.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis** 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schneider, S., M. Burchert, C.M. Hovens** 1996. "An *in vitro* assay of β -galactosidase from yeast." *BioTechniques* 20: 960-962.
- Schulte, T.W., S. Akinaga, T. Murakata, T. Agatsuma, S. Sugimoto, H. Nakano, Y.S. Lee, B.B. Simen, Y. Argon, S. Felts, et al.** 1999. "Interaction of radicicol with members of the heat shock protein 90 family of molecular chaperones." *Mol. Endocrinol.* 13: 1435-1448.
- Schultz, A.M., G.E. Copeland, G.E. Mark, U.R. Rapp, S. Oroslan** 1985. "Detection of the myristylated gag-raf transforming protein with raf-specific antipeptide sera." *Virology* 146: 78-89.

- Schweppenhäuser, J.** 1999. "Selektive und duale COX-1/COX-2-Inhibitoren aus der Reihe der Methanone: Synthese, Testung, Struktur-Wirkungs-Beziehungen". Institut für Pharmazie, Mainz, Johannes Gutenberg-Universität
- Sebolt-Leopold, J.S., D.T. Dudley, R. Herrera, K. Van Becelaere, A. Wiland, R.C. Gowan, H. Teclé, S.D. Barrett, A.J. Bridges, S. Pryzbranowski, et al.** 1999. "Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors *in vivo*." *Nature Med.* 5: 810-816.
- Sendoh, H., C.D. Hu, D. Wu, C. Song, Y. Yamawaki-Kataoka, J. Kotani, T. Okada, F. Shima, K. Kariya, T. Kataoka** 2000. "Role of Raf-1 conserved region 2 in regulation of Ras-dependent Raf-1 activation." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271: 596-602.
- SenGupta, D.J., B. Zhang, B. Kraemer, P. Pochart, S. Fields, M. Wickens** 1996. "A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions *in vivo*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8496-8501.
- Serebriiskii, I., V. Khazak, E. Golemis** 2001a. "Redefinition of the yeast two-hybrid system in dialogue with changing priorities in biological research." *BioTechniques* 30: 634-655.
- Serebriiskii, I., V. Khazak, E.A. Golemis** 1999. "A two-hybrid dual bait system to discriminate specificity of protein interactions." *J. Biol. Chem.* 274: 17080-17087.
- Serebriiskii, I., O.V. Mitina, J. Chernoff, E. Golemis** 2001b. "Two-hybrid dual bait system to discriminate specificity of protein interactions in small GTPases." *Meth. Enzymol.* 332: 277-300.
- Sewing, A., B. Wiseman, A.C. Lloyd, H. Land** 1997. "High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1." *Mol. Cell. Biol.* 17: 5588-5597.
- Shimada, Y., T. Ogawa, A. Sato, I. Kaneko, Y. Tsujita** 1995. "Induction of differentiation of HL-60 cells by anti-fungal antibiotic, radicicol." *J. Antibiot. (Tokyo)* 48: 824-830.
- Smietana, S.** 2000. "Untersuchung von Arzneidrogen auf Thrombozytenaggregationshemmung und Isolierung aktiver Substanzen aus *Betulae folium*". Institut für Pharmazeutische Biologie, Frankfurt am Main, Johann Wolfgang Goethe-Universität
- Smith, C.W., J. Valcarcel** 2000. "Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control." *Trends Biochem. Sci.* 25: 381-388.
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk** 1985. "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Anal. Biochem.* 150: 76-85.
- Smith, R.A., J. Barbosa, C.L. Blum, M.A. Bobko, Y.V. Caringal, R. Dally, J.S. Johnson, M.E. Katz, et al.** 2001. "Discovery of heterocyclic ureas as a new class of raf kinase inhibitors: identification of a second generation lead by combinatorial chemistry approach." *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 2775-2778.
- Soga, S., T. Kozawa, H. Narumi, S. Akinaga, K. Irie, K. Matsumoto, S. Sharma, H. Nakano, T. Mizukami, M. Hara** 1998. "Radicicol leads to selective depletion of Raf kinase and disrupts K-Ras-activated aberrant signaling pathways." *J. Biol. Chem.* 273: 822-828.
- Stauder, R., W. Eisterer, J. Thaler, U. Günthert** 1995. "CD44 variant isoforms in non-Hodgkin's lymphoma: a new independent prognostic factor." *Blood* 85: 2885-2899.
- Sticher, O.** 1999a. "Baldrianwurzel". *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. Hänsel, R., O. Sticher, E. Steinegger. Heidelberg Berlin, Springer Verlag: 457-464.
- Sticher, O.** 1999b. "Ringelblumenblüte". *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. Hänsel, R., O. Sticher, E. Steinegger. Heidelberg Berlin: 524-526.
- Sticher, O.** 1999c. "Schafgarbe". *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. Hänsel, R., O. Sticher, E. Steinegger. Heidelberg Berlin, Springer: 483-486.
- Strahl, B.D., C.D. Allis** 2000. "The language of covalent histone modifications." *Nature* 403: 41-45.
- Strumberg, D., U. Schuehly, J.G. Moeller, D. Hedley, R. Hilger, W. Stellberg, H. Richly, R. Heinig, G. Ahr, G. Wensing, et al.** 2001. "Phase I clinical, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of the Raf kinase inhibitor BAY 43-9006 in patients with locally advanced or metastatic cancer". *Book of Abstracts 37th ASCO Meeting*. Poster 330.
- Sweatt, J. D.** 2001. "The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory" *J. Neurochem.* 76: 1-10
- Swinyard, E.A.** 1973. "Assay of antiepileptic drug activity in experimental animals: standard tests". *Anticonvulsant drugs*. Mercier. 1: 47-65.
- Tabin, C.J., S.M. Bradley, C.I. Bargmann, R.A. Weinberg, A.G. Papageorge, E.M. Scolnick, R. Dhar, D.R. Lowy, E.H. Chang** 1982. "Mechanism of activation of a human oncogene." *Nature* 300: 143-149.
- Tamm, I., B. Dorken, G. Hartmann** 2001. "Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea?" *Lancet* 358: 489-497.

- Thompson, H.J., C. Jiang, J. Lu, R.G. Mehta, G.A. Piazza, N.S. Paranka, R. Pamukcu, D.J. Ahnen** 1997. "Sulfone metabolite of sulindac inhibits mammary carcinogenesis." *Cancer Res.* 57: 267-271.
- Toda, T., I. Uno, T. Ishikawa, S. Powers, T. Kataoka, D. Broek, S. Cameron, J. Broach, K. Matsumoto, M.H. Wigler** 1985. "In yeast, Ras proteins are controlling elements of adenylate cyclase." *Cell* 40: 27-36.
- Torrance, C.J., V. Agrawal, B. Vogelstein, K.W. Kinzler** 2001. "Use of isogenic human cancer cells for high-throughput screenings and drug discovery." *Nat. Biotechnol.* 19: 919-920.
- Van Aelst, L., M. Barr, S. Marcus, A. Polverino, M. Wigler** 1993. "Complex formation between Ras and Raf and other protein kinases." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6213-6217.
- Vidal, M., P. Braun, E. Chen, J. Boeke, H. E.** 1996. "Genetic characterization of a mammalian protein-protein interaction domain by using a yeast reverse two-hybrid system." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10321-10326.
- Vistica, D.T., P. Skehan, D. Scudiero, A. Monks, A. Pittman, M.R. Boyd** 1991. "Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production." *Cancer Res.* 51: 2515-2520.
- Vogelstein, B., K.W. Kinzler** 1993. "The multistep nature of cancer." *Trends Genetics* 9: 138-141.
- Voice, J.K., R.L. Klemke, A. Le, J.H. Jackson** 1999. "Four human Ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility." *J. Biol. Chem.* 274: 17164-17170.
- Vojtek, A.B., S.M. Hollenberg, J.A. Cooper** 1993. "Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf." *Cell* 74: 205-214.
- Waddick, K.G., F.M. Uckun** 1998. "Innovative treatment programs against cancer - I. Ras oncoprotein as a molecular target." *Biochem. Pharmacol.* 56: 1411-1426.
- Wakioka, T., A. Sasaki, R. Kato, T. Shouda, A. Matsumoto, K. Miyoshi, M. Tsuneoka, S. Komiya, R. Baron, A. Yoshimura** 2001. "Spry is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling." *Nature* 412: 647-651.
- Wang, H.G., U.R. Rapp, J.C. Reed** 1996. "Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria." *Cell* 87: 629-638.
- Ward, Y., S. Gupta, P. Jensen, M. Wartmann, R.J. Davis, K. Kelly** 1994. "Control of MAP kinase activation by the mitogen-induced threonine/tyrosine phosphatase PAC1." *Nature* 367: 651-657.
- Warne, P.H., P.R. Vician, J. Downward** 1993. "Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 *in vitro*." *Nature* 364: 353-355.
- Weg-Remers, S., H. Ponta, P. Herrlich, H. Konig** 2001. "Regulation of alternative pre-mRNA splicing by the ERK MAP-kinase pathway." *EMBO J.* 20: 4194-4203.
- Weijzen, S., M.P. Velder, W.M. Kast** 1999. "Modulation of the immune response and tumor growth by activated Ras." *Leukemia* 13: 502-513.
- Weiss, B., G. Bollag, K. Shannon** 1999. "Hyperactive Ras as a therapeutic target in neurofibromatosis type 1." *American J. Med. Genetics* 89: 14-22.
- White, M.A., C. Nicolette, A. Minden, A. Polverino, L. Van Aelst, M. Karin, M.H. Wigler** 1995. "Multiple Ras functions can contribute to mammalian transformation." *Cell* 80: 533-541.
- Williams, J.G., J.K. Drugan, G.S. Yi, G.J. Clark, C.J. Der, S.L. Campbell** 2000. "Elucidation of binding determinants and functional consequences of Ras/Raf-cysteine-rich domain interactions." *J. Biol. Chem.* 275: 22172-22179.
- Willuhn, G.** 1991. "Arnica montana L. - Porträt einer Arzneipflanze." *PZ* 136: 2453-2468.
- Willuhn, G., W. Leven** 1995. "Qualität von Arnikazubereitungen." *DAZ* 21: 1939-1942.
- Willuhn, G., W. Leven, C. Luley** 1994. "Arnikablüten DAB 10." *DAZ* 42: 4077-4085.
- Wilson, T.E., T.J. Fahrner, M. Johnston, J. Milbrandt** 1991. "Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast." *Science* 252: 1296-1300.
- Winde, G., K.W. Schmid, W. Schlegel, R. Fischer, H. Osswald, H. Bunte** 1995. "Complete reversion and prevention of rectal adenomas in colectomized patients with familial adenomatous polyposis by rectal low-dose sulindac maintenance treatment. Advantages of a low-dose nonsteroidal anti-inflammatory drug regimen in reversing adenomas exceeding 33 months." *Disc. Col. Rect.* 38: 813-830.
- Wittinghofer, A., E. Pai** 1991. "The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch." *TIBS* 16: 382-387.
- Woods, D., D. Parry, H. Cherwinski, E. Bosch, E. Lees, M. McMahon** 1997. "Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1." *Mol. Cell. Biol.* 17: 5598-5611.

- Wu, L.C., Z.W. Wang, J.T. Tsan, M.A. Spillman, A. Phung, X.L. Xu, M.-C.W. Yang, L.-Y. Hwang, A.M. Bowcock, R. Baer** 1996. "Identification of a RING protein that can interact *in vivo* with the BRCA1 gene product." *Nature Genet.* 14: 430-440.
- Yan, J., S. Roy, A. Apolloni, A. Lane, J.F. Hancock** 1998. "Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase." *J. Biol. Chem.* 273: 24052-24056.
- Yanish-Perron, C., J. Vieira, J. Messing** 1985. "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors." *Gene* 33: 103-119.
- Yocum, R.R.** 1987. "The Gal1, 7 and 10 upstream activator sequences are not enhancers". *Biological research on Industrial Yeasts*. Stewart, G., I. Russel, R. Klein, R. Hiebsch. Boca Raton, CRC Press. 3: 61.
- Young, K., S. Lin, L. Sun, E. Lee, M. Modi, S. Hellings, M. Husbands, B. Ozenberger, R. Franco** 1998. "Identification of a calcium channel modulator using a high throughput yeast two-hybrid screen." *Nat. Biotechnol.* 16: 946-950.
- Yuan, P.X., L.D. Huang, Y.M. Jiang, J.S. Gutkind, H.K. Manji, G. Chen** 2001. "The mood stabilizer valproic acid activates mitogen-activated protein kinases and promotes neurite growth." *J. Biol. Chem.* 34: 31674-31683.
- Yuen, A.R., B.I. Sikic** 2000. "Clinical studies of antisense therapy in cancer." *Front. Biosci.* 5D: 588-593.
- Yurvey, A., L.P. Wennogle** 1998. "The RAF family: an expanding network of post-translational controls and protein-protein interactions." *Cell research* 8: 81-98.
- Zeng, J., T. Nheu, A. Zorzet, B. Catimel, E. Nice, H. Maruta, A. Burgess, H. Treutlein** 2001. "Design of inhibitors of Ras-Raf interaction using a computational combinatorial algorithm." *Protein Eng.* 14: 39-45.
- Zhang, J., S. Lautar** 1996. "A yeast three-hybrid method to clone ternary protein complex components." *Anal. Biochem.* 242: 68-72.
- Zhang, X., J. Settleman, J.M. LKyriakis, E. Takeuchi-Suzuki, S.J. Elledge, M.S. Marshall, J.T. Bruder, U.R. Rapp** 1993. "Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1." *Nature* 364: 308-313.
- Zhao, J.F., H. Nakano, S. Sharma** 1995. "Suppression of ras and mos transformation by radicicol." *Oncogene* 11: 161-173.
- Zheng, C.-F., K.-L. Guan** 1993. "Dephosphorylation and inactivation of the mitogen-activated protein kinase by a mitogen-induced Thr/Tyr protein phosphatase." *J. Biol. Chem.* 268: 16116-16119.
- Zhong, J., J. Troppmair, U.R. Rapp** 2001. "Independent control of cell survival by Raf-1 and Bcl-2 at the mitochondria." *Oncogene* 20: 4807-4816.

7. Lebenslauf und Publikationen

Persönliche Daten

Name: Anke Elisabeth Friese
Geboren am: 21.05.1973 in Wickede(Ruhr)

Schulbildung

1979 – 1983 kath. Grundschule, Fröndenberg
1983 – 1992 Walram-Gymnasium, Menden, Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium

1992 – 1996 Studium der Pharmazie an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg
09/1994 Erstes Staatsexamen
10/1996 Zweites Staatsexamen
12/1997 Drittes Staatsexamen und Erlangen der Approbation

Praktische Tätigkeiten

05/93 – 12/94 wissenschaftl. Hilfskraft, Lehrstuhl für Pharmaz. Technologie, Freiburg
03/1993 Famulatur in der Apotheke des Städt. Krankenhauses Hagen
08/1993 Famulatur in der Inselapotheke, Langeoog
03/95 – 04/95 Praktikum im Drug Information Center, Shands Hospitals, University of Florida, Gainesville, USA
11/96 – 02/97 Tätigkeit am Crosshouse Hospital, Kilmarnock, GB
02/97 – 05/97 Tätigkeit am Perth Royal Infirmary, Perth, GB
06/97 - 11/97 Tätigkeit in der Lahn-Apotheke, Marburg

Promotion

04/98 – 03/01 Stipendiatin des Graduiertenkollegs „Arzneimittel-Entwicklung und Analytik“ der DFG an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt unter der Leitung von Prof. Dr. Th. Dinger mann
seit 04/01 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Biologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt unter der Leitung von Prof. Dr. Th. Dinger mann

Akademische Lehrer

K. Aktories, K. H. Bauer, Th. Dinger mann, A. W. Frahm, L. Heide, H.-H. Otto, H. Rimpler, R. Schubert, K. Starke

Eigene Publikationen

M. Schlitzer, I. Sattler, A. Friese, I. Zündorf, Th. Dingermann:

“Synthesis of 4-(Acylaminomethyl)benzamides and their evaluation as potential anti-cancer agents”, 2000, *Anticancer Res.* 20(3A): 1723-1726

A. Friese, K. Hell-Momeni, I. Zündorf, T. Winckler, Th. Dingermann, G. Dannhardt

“Synthesis and biological evaluation of cycloalkylidene carboxylic acids as novel effectors of Ras/Raf interaction“, 2002, *J. Med. Chem.* 45(7): 1535-1542

Vorträge und Konferenzteilnahmen

„Suche nach Ras/Raf Effektoren mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems“, Poster bei der DPhG-Jahrestagung, Tübingen, 6.-8.11.1998

„Die Ras/Raf-Interaktion: ein interessantes Target für neue Arzneistoffe“, Vortrag innerhalb des Graduiertenkollegs, Biozentrum, Frankfurt, 23.11.1998

Teilnahme an der Tagung des Graduiertenkollegs, Erbsmühle, Weilrod, 9./10.1.1999

„Die Ras/Raf-Interaktion im Two-Hybrid-System“, Vortrag bei der DPhG-Doktorandentagung, Freiburg, 11.-13.3.1999

Teilnahme am Workshop „Arnika-Arzneipflanze mit Tradition und Zukunft“, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, 5.7.1999

„The Ras/Raf yeast two-hybrid-system: Effects of valerianic acid analogues“, Poster bei der DPhG-Jahrestagung, Frankfurt, 6.-9.10.1999

„Suche nach Interaktionspartnern der Onkogene Ras und Raf“, Vortrag innerhalb des Graduiertenkollegs, Biozentrum, Frankfurt, 25.11.1999

„Suche nach Interaktionspartnern der Onkogene Ras und Raf“, Vortrag beim AK Becker, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 13.1.2000

„β-Galactosidase-Komplementation durch Proteininteraktionen“, Vortrag bei der Wochenendtagung des Graduiertenkolleg, Erbsmühle, Weilrod, 29./30.1.2000

„Affecting the interaction of truncated Ras and Raf proteins“, Poster beim 2nd European Graduate Student Meeting, Frankfurt, 3.-5.3.2000

- „Effects on the interaction of truncated Ras and Raf proteins“, Poster bei der GA-Tagung, ETH Zürich, 3.-7.9.2000
- „Screening of Ras/Raf effectors using the yeast two-hybrid system“, Vortrag beim AK Karas, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt, 30.11.2000
- „Etablierung eines Hefe-Zwei-Hybrid-Systems – was sollte man beachten?“, Vortrag bei der Wochenendtagung des Graduiertenkollegs, Geisenheim, 12./13.1.2001
- „Screening and characterization of Ras/Raf effectors“, Vortrag beim 3rd European Graduate Student Meeting, Frankfurt, 23.-25.2.2001
- „Suche und Charakterisierung von Effektoren der Ras/Raf-Interaktion“, Vortrag beim Berichtssymposium des Graduiertenkollegs, Biozentrum, Frankfurt, 6.7.2001
- Teilnahme beim 4th European Graduate Student Meeting, Frankfurt, 2002

Danksagung

Ich danke allen ganz herzlich, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Prof. Dr. Theodor Dingermann für die Überlassung des interessanten und abwechslungsreichen Themas und für seine Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und Anregungen bei den vielen Vorträgen beim Arbeitsseminar und Graduiertenkolleg.

Prof. Dr. Dieter Steinhilber für die Begutachtung dieser Arbeit.

Dr. Ilse Zündorf für die gute Zusammenarbeit, die vielen Tips, Tricks und Ratschläge im Laboralltag, die interessanten Diskussionen und die schnelle und kritische Durchsicht dieser Arbeit. Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Thomas Winckler ganz herzlich für seine Hilfe im Labor und vor allen Dingen bei der Fertigstellung des Ras/Raf-Paper bedanken.

Allen Arbeitsgruppen, die mir Proben zur Testung überlassen haben, vor allen Dingen Prof. Dannhardt und seinem gesamten Arbeitskreis von der Universität Mainz, sowie Dr. Frank Cullmann und Prof. Dr. Becker von der Universität des Saarlandes für die Hilfe bei der Aufreinigung der Arnika-Tinktur. Mein besonderer Dank gilt dabei Dr. Katja Hell-Momeni für die Synthese der HM-Substanzen und der guten Zusammenarbeit bei dem Paper.

Meinen Kollegen für Tips und Tricks im Labor und die vielen netten Kaffeepausen zwischendurch, für die Hilfe bei diesen verflixten Computern und bei den Sorgen und dem Frust während der Promotionszeit: den "Alten Hasen" Uli Hentschel, Christine Kuschnick, Jochen Walter, Holger Kramm, Jens-Peter Horn und Thorsten Kohl, den "Rolfis" Heidi Bursen, Anne Gaußmann, Claus Meyer, Sven Moritz, Jürgen Zech und insbesondere Dorothe Schraets, den "Pflanzenspezialisten" Sabine Smietana, Jan Keller und Gabi Hösch, den "Didi-Leuten" Oliver Siol, Moni Baik und Peter Beck, dem "Antikörper-Fachmann" und klasse Laborkollegen Christian Klein, den super-mega-spitzen TAs Christin Neuhäuser, Melanie Seidel, Martina Berg und Chrissi Tschepke, den "Externen" oder "Außerbiologischen" Dr. Oliver Werz, Sascha Hövelmann, Tanja Paukert, Ingo Jennes, Jörg Weyermann, Kirstin Berger und vor allem Anke Rohmann für die vielen persönlichen Aufmunterungen. Mein ganz besonderer und herzlichster Dank gilt Dirk Lochmann.

Meinen Eltern, die mich das ganze Studium und darüber hinaus immer unterstützt haben und jederzeit für mich da waren.