



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 31 960 T2 2005.12.15**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 929 691 B1**

(51) Int Cl.⁷: **C12Q 1/00**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 31 960.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/17159**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 944 430.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/013513**

(86) PCT-Anmeldetag: **24.09.1997**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **02.04.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.07.1999**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **15.12.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.12.2005**

(30) Unionspriorität:

718910 **24.09.1996** **US**

851469 **05.05.1997** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

Cadus Pharmaceutical Corp., Tarrytown, N.Y., US

(72) Erfinder:

**TRUEHEART, Joshua, South Nyack, US; PAUL, I.,
Jeremy, South Nyack, US; FUERNKRANZ, A.,
Hans, Cupertino, US; NATHAN, Debra, Mt. Kisco,
US; HOLMES, Scott, Ridgefield, US**

(74) Vertreter:

**Patentanwälte Wallach, Koch & Partner, 80339
München**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN UND ZUSAMMENSETZUNGEN FÜR DIE IDENTIFIZIERUNG VON RECEPTOR EFFECTOREN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Ausgangspunkt der Erfindung

[0001] Die Identifizierung einer biologischen Aktivität bzw. Wirksamkeit in neuen Molekülen wurde historisch durch Verwendung von in vitro-Assays oder ganzer Tiere erreicht. Intakte biologische Einheiten, entweder Zellen oder ganze Organismen, wurden zum Screenen nach antibakteriellen, antifungalen, antiparasitären und antiviralen Mitteln in vitro verwendet. Kultivierte Säugetierzellen wurden ebenfalls in Screenings verwendet, die zum Nachweis potentieller therapeutischer Verbindungen entwickelt wurden. Eine Vielzahl von Bioassay-Endpunkten wurde in Zellscreenings verwendet, einschließlich der Stimulation des Wachstums oder der Differenzierung von Zellen, Veränderungen der Zellmotilität, der Produktion spezieller Metaboliten, der Expression spezieller Proteine innerhalb von Zellen, der veränderten Proteinfunktion und veränderter Leitfähigkeits-Eigenschaften. Zytotoxische Verbindungen, die in der Krebstherapie verwendet werden, wurden durch ihr Vermögen identifiziert, das Wachstum von Tumorzellen in vitro und in vivo zu hemmen. Zusätzlich zu Kulturen dispergierter Zellen wurde Gesamtgewebe in Bioassays genauso wie in solchen, die auf der Kontraktilität von Muskeln basierten, verwendet.

[0002] Das in vitro-Testen ist dahingehend eine bevorzugte Methodik, als sie die Entwicklung von Screenings mit hohem Durchlauf (high-throughput screenings) ermöglicht: Kleine Mengen großer Anzahlen an Verbindungen können in einer kurzen Zeitspanne und zu niedrigen Kosten getestet werden. Optimalerweise sind Tiere für die letzten Stadien der Produktevaluation vorgesehen und werden in der Entdeckungsphase nicht verwendet; die Verwendung ganzer Tiere ist arbeitsintensiv und extrem teuer.

[0003] Die Suche nach Agonisten und Antagonisten für zelluläre Rezeptoren war ein intensives Forschungsgebiet, das die Arzneistoffentdeckung aufgrund der eleganten Spezifität dieser Molekültargets zurückzuführen war. Das Arzneistoffscreening wurde unter Verwendung von Ganzzellen durchgeführt, die funktionelle Rezeptoren exprimieren (Manfredi, J-P. et al., (1996), Molecular and Cellular Biology 16(9): 4700–4709) und kürzlich wurden Bindungsassays entwickelt, die Membranfraktionen oder gereinigte Rezeptoren verwenden, um nach Verbindungsbibliotheken für kompetitive bzw. Konkurrenz-Liganden zu screenen.

[0004] Die heterologe Expression rekombinanter Säugetier-G-Protein-gekoppelter Rezeptoren in Säugetierzellen, die normalerweise solche Rezeptoren nicht exprimieren, wurde als Mittel zum Studieren der Rezeptorfunktion zum Zweck des Identifizierens von Agonisten und Antagonisten dieser Rezeptoren beschrieben. Beispielsweise wurde der humane Muscarin-Rezeptor (HM1) funktionell in Mauszellen exprimiert (Harpold et al., US-Patent Nr. 5 401 629). Es hat sich herausgestellt, dass der Ratten-V1b-Vasopressin-Rezeptor die Phosphatidylinositol-Hydrolyse und die intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung in chinesischen Hamster-Ovarzellen nach Agonisten-Stimulation stimuliert (Lolat et al. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6783–6787). Diese Typen von ektopischen Expressionsstudien haben es Forschern möglich gemacht, die Rezeptorsignalabgabemechanismen zu untersuchen und Mutagenese-Studien durchzuführen, die bei der Identifizierung von Anteilen von Rezeptoren von Nutzen waren, die für die Ligandenbindung oder die Signalweiterleitung entscheidend sind.

[0005] Es wurden ebenfalls Experimente durchgeführt, um funktionellen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in Hefezellen zu exprimieren. Beispielsweise beschreibt das US-Patent Nr. 5 482 835 auf den Namen King et al. eine transformierte Hefezelle, die nicht dazu in der Lage ist, eine Hefe-G-Protein- α -Untereinheit zu erzeugen, die jedoch so hergestellt wurde, dass sie sowohl eine Säugetier-G-Protein- α -Untereinheit als auch einen Säugetierrezeptor produziert, der an die vorher erwähnte Säugetier-G-Protein- α -Untereinheit „gekoppelt“ ist (d. h. mit dieser interagiert). Insbesondere berichtet das US-Patent Nr. 5 482 835 von der Expression des humanen Beta-2-adrenergen Rezeptors (β 2AR), einem Sieben-Transmembran-Rezeptor (STR) in der Hefe unter der Kontrolle des GAL1-Promotors, wobei das β 2AR-Gen durch Ersetzen der ersten 63 Basenpaare der codierenden Sequenz durch 11 Basenpaare einer nicht-codierenden und 42 Basenpaare einer codierenden Sequenz aus dem STE2-Gen modifiziert wurde (STE2 codiert den Hefe- α -Faktor-Rezeptor). Die Duke-Forscher haben herausgefunden, dass das modifizierte β 2AR funktionell in die Membran integriert war, wie es durch Studien der Fähigkeit isolierter Membranen gezeigt wurde, in geeigneter Weise mit verschiedenen bekannten Agonisten und Antagonisten von β 2AR zu interagieren. Die Ligandenbindungsaffinität für Hefe-exprimiertes β 2AR wurde als nahezu identisch mit derjenigen angenommen, die für natürlich produziertes β 2AR zu beobachten war.

[0006] US-Patent Nr. 5 482 835 beschreibt die Coexpression von Ratten-G-Protein- α -Untereinheit in denselben Zellen, Hefestamm 8C, dem verwandtes Hefeprotein fehlt. Die Ligandenbindung hatte eine G-Protein-ver-

mittelte Signalweiterleitung bzw. -transduktion zur Folge. US-Patent 5 482 835 lehrt, dass diese Zellen im Screening von Verbindungen nach der Fähigkeit verwendet werden können, die Dissoziationsrate von $G\alpha$ von $G\beta\gamma$ in einer Zelle zu beeinflussen. Zu diesem Zweck enthält die Zelle weiterhin einen Pheromon-responsiven Promotor (beispielsweise BAR1 oder FUS1), gebunden an ein Indikatorgen (beispielsweise HIS3 oder LacZ). Die Zellen werden in Multititerplatten angeordnet und verschiedene Verbindungen werden in jedem Well angeordnet. Die Kolonien werden dann bezüglich ihrer Expression des Indikatorgens gescored.

Zusammenfassung der Erfindung

[0007] Die vorliegende Erfindung betrifft neue, rasche, zuverlässige und effektive Assays zum Screenen und Identifizieren pharmazeutisch wirksamer Verbindungen, die speziell mit der Aktivität eines zellulären Rezeptors oder Ionenkanals einer Zelle interagieren und diese modulieren.

[0008] Die vorliegende Erfindung stellt die Verwendung jedes Zelltyps in den gegenständlichen Assays bereit, gleichgültig ob prokaryontische oder eukaryontische Zelle. In bevorzugten Ausführungsformen sind die Zellen der vorliegenden Erfindung eukaryontisch. In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen sind die Zellen Säugetierzellen. In anderen bevorzugten Ausführungsformen der Zellen sind die Zellen Hefezellen, wobei Zellen aus den Gattungen *Saccharomyces* oder *Schizosaccharomyces* bevorzugt sind. Die Wirtszellen können aus primären Zellen oder transformierten und/oder immortalisierten Zelllinien abgeleitet sein.

[0009] Die gegenständlichen Assays stellen ein Mittel zum Nachweis der Fähigkeit von Verbindungen bereit, die Signalweiterleitungsaktivität des Zielrezeptors zu modulieren, durch Scoren nach einer Nach-oben- oder Nach-unten-Regulation eines Detektionssignales bereit. Die Signaltransduktion kann auf einer Vielzahl von Wegen gemessen werden. Beispielsweise kann die endogene Second-Messenger-Erzeugung in der Hefe (beispielsweise GTP-Hydrolyse, Kalzium-Mobilisierung oder Phospholipid-Hydrolyse) oder die erhöhte Transkription eines endogenen Gens direkt nachgewiesen werden. Alternativ kann die Verwendung eines Reporter- oder Indikator-Gens eine bequeme Ablesung bereitstellen. Egal durch welche Mittel gemessen, kann eine Veränderung (beispielsweise eine statistisch signifikante Veränderung) im Detektionssignal dazu verwendet werden, die Isolierung solcher Zellen aus dem Gemisch zu erleichtern, die über einen Targetrezeptor ein Signal empfangen haben, und können somit dazu verwendet werden, neue Verbindungen zu identifizieren, die als Rezeptoragonisten oder -antagonisten funktionieren.

[0010] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung exprimieren die Reagenzzellen den Rezeptor von Interesse endogen. In anderen Ausführungsformen sind die Zellen so technisch bzw. gentechnisch verändert, dass sie ein heterologes Rezeptorprotein exprimieren. In jeder dieser Ausführungsformen kann es wünschenswert sein, ein oder mehrere endogene Gene der Wirtszellen zu inaktivieren. Beispielsweise verwenden bestimmte bevorzugte Ausführungsformen, bei denen ein heterologer Rezeptor bereitgestellt wird, Wirtszellen, in denen das Gen für den homologen Rezeptor inaktiviert wurde. Desgleichen können andere Proteine, die in das Transduzieren von Signalen aus dem Target-Rezeptor involviert sind, inaktiviert oder mit einem Autolog oder Paralog aus einem anderen Organismus komplementiert werden, beispielsweise Hefe-G-Protein-Untereinheiten können durch Säugetier-G-Protein-Untereinheiten in Hefezellen komplementiert werden, die so gentechnisch verändert wurden, dass sie Säugetier-G-Protein-gekoppelten Rezeptor exprimieren.

[0011] Weitere Komplementierungen schließen beispielsweise die Expression heterologer MAP-Kinase und erk-Kinasen, MEKs oder MKKs (MAP-Kinase-Kinasen), MEKKs (MEK-Kinasen), ras, raf, STATs, JAKs und dergleichen ein.

[0012] In einer Ausführungsform kann das Assay der vorliegenden Erfindung zum Screenen nach Verbindungen verwendet werden, die den Zellen exogen zugesetzt werden, um potentielle Rezeptoreffektor-Verbindungen zu identifizieren.

[0013] In einer anderen Ausführungsform ermöglichen die vorliegenden Assays ein rasches Screening großer Mengen an Polypeptiden in einer Bibliothek, die in der Zelle exprimiert wird, um solche Polypeptide zu identifizieren, die eine Rezeptorbioaktivität agonisieren oder antagonisieren, die ein autokrines System erzeugt. Der autokrine Assay ist durch Verwendung einer Bibliothek rekombinanter Zellen gekennzeichnet, wobei jede Zelle hiervon ein Target bzw. Ziel-Rezeptorprotein einschließt, dessen Signaltransduktionsaktivität durch Interaktion mit einem extrazellulären Signal moduliert werden kann, wobei die Transduktionsaktivität dazu in der Lage ist, ein nachweisbares Signal zu erzeugen, und ein exprimierbares rekombinantes Gen, das ein exogenes Testpolypeptid aus einer Polypeptidbibliothek codiert. Durch Verwendung einer Genbibliothek exprimiert das Gemisch von Zellen kollektiv eine Population von Testpolypeptiden. In bevorzugten Ausführungsformen

schließt die Polypeptidbibliothek zumindest 10^3 unterschiedliche Polypeptide, obwohl noch mehr bevorzugt zumindest 10^5 , 10^6 oder 10^7 unterschiedliche (variierte) Polypeptide, ein. Die Polypeptidbibliothek kann als Random bzw. zufallsbedingte Peptidbibliothek, als Semi-Random-Peptidbibliothek (beispielsweise basierend auf kombinatorischer Mutagenese eines bekannten Liganden) oder als cDNA-Bibliothek erzeugt werden.

[0014] In einer weiteren Ausführungsform des Assays kann der Assay, wenn eine Testverbindung nicht die Aktivität des Rezeptorproteins direkt zu induzieren scheint, wiederholt und durch Einführung eines Schrittes modifiziert werden, bei dem die Zelle zunächst mit einem bekannten Aktivator des Targetrezeptors in Berührung gebracht wird, um die Signalübertragungswege vom Rezeptor zu induzieren. Somit kann eine Testverbindung bezüglich ihrer Fähigkeit untersucht werden, die Aktivität des Aktivators zu antagonisieren, beispielsweise zu hemmen oder zu blockieren. Alternativ kann der Assay nach Verbindungen scoren, die die Induktionsreaktion, die durch Behandlung der Zelle mit einem bekannten Aktivator erzeugt wird, potenzieren. Wie hierin verwendet, betrifft ein „Agonist“ Mittel, die entweder die Aktivierung der Rezeptor-Signalstoff-Stoffwechselwege induzieren, beispielsweise durch Nachahmen eines Liganden für den Rezeptor, ebenso wie Mittel, die die Empfindlichkeit des Rezeptors gegenüber dem Liganden potenzieren, beispielsweise die Konzentrationen an Liganden senken, die zum Induzieren eines speziellen Niveaus einer Rezeptor-abhängigen Signalgebung erforderlich sind.

[0015] Gemäß eines Aspektes betrifft die Erfindung einen Assay zum Identifizieren einer Verbindung, die einen heterologen Rezeptor moduliert, der durch eine Hefezelle exprimiert wird. Die vorliegenden Assays umfassen die folgenden Schritte: (i) Bereitstellen einer Hefezelle, bei der ein heterologer Rezeptor funktionell in einen endogenen Hefe-Signalstoff-Stoffwechselweg integriert ist; (ii) In-Berührung-Bringen der Hefezelle mit einer Testverbindung; und (iii) Nachweisen einer Veränderung in einem Signal, das durch den endogenen Hefe-Signalstoff-Stoffwechselweg erzeugt wird.

[0016] In bevorzugten Ausführungsformen ist der Signalstoff-Stoffwechselweg ein Hefepheromon-System-Weg.

[0017] In weiteren bevorzugten Ausführungsformen umfasst der Schritt des Nachweisens ein Messen der Transkription eines Gens, das ein endogenes Hefeprotein codiert. Die Transkription eines Gens kann direkt oder indirekt gemessen werden. Zusätzlich können in anderen Ausführungsformen die Menge oder Aktivität eines endogenen Hefeproteins untersucht werden.

[0018] Die in den vorliegenden Assays zu testenden Verbindungen können aus einer Vielzahl von Quellen abgeleitet bzw. gewonnen werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Testverbindung aus einer Peptidbibliothek abgeleitet. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Testverbindung aus einer Bibliothek von Nicht-Peptid-Verbindungen abgeleitet.

[0019] In den Ausführungsformen der vorliegenden Assays, bei denen die Aktivität eines endogenen Hefeproteins untersucht wird, kann das endogene Hefeprotein durch ein endogenes Hefe Gen codiert sein, das operativ an einen Promotor gebunden ist, der gegenüber Signalen responsiv ist, wie durch ein Hefepheromon-System erzeugt werden. In einer Ausführungsform kommt der Promotor natürlich vor. In einer noch weiteren Ausführungsform ist der Promotor nicht-natürlich vorkommend. Derartige nicht-natürlich vorkommende Promotoren können durch Modifizieren eines natürlich vorkommenden Promotors gewonnen werden, beispielsweise durch Mutieren eines natürlich vorkommenden Promotors. In noch weiteren Ausführungsformen des Assays ist der Promotor ein heterologer Promotor, der operativ an ein endogenes Hefe Gen gebunden ist.

[0020] In bevorzugten Ausführungsformen ist das zu untersuchende Hefe Gen das BAR1-Gen. In weiteren bevorzugten Ausführungsformen ist der Promotor, der die Expression des endogenen Hefe Gens reguliert, ein Pheromon-responsiver Promotor. Beispiele für bevorzugte Pheromon-responsive Promotoren schließen den Fus1-Promotor und den Fus2-Promotor ein, die, in bestimmten Ausführungsformen, operativ an ein heterologes endogenes Gen gebunden sind.

[0021] In einer noch weiteren Ausführungsform verwenden die vorliegenden Assays Hefezellen, die ein chimäres Nukleinsäurekonstrukt umfassen. Das chimäre Konstrukt codiert ein Fusionsprotein, das die Expression eines endogenen Gens moduliert, wobei die Expression untersuchbar ist. Die chimären Konstrukte der Erfindung umfassen ein erstes Segment, abgeleitet von einem ersten Gen, das ein Polypeptid codiert, das durch den Hefepheromon-System-Weg aktiviert wird, und ein zweites Segment, das ein Polypeptid codiert, das eine DNA-Sequenz im regulatorischen Bereich eines endogenen Gens von Interesse bindet. Solche Konstrukte machen das Gen von Interesse gegenüber einer Aktivierung durch den Hefepheromon-System-Weg responsiv

bzw. ansprechbar.

[0022] In bevorzugten Ausführungsformen codiert das erste Segment eines solchen Konstruktes Ste12. In weiteren bevorzugten Ausführungsformen codiert das zweite Segment Pho4 (oder eine DNA-bindende Domäne hiervon). In einer noch weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das zu untersuchende endogene Hefe Gen ein Pho5-Gen (das eine Pho4-bindende Stelle innerhalb seiner regulatorischen Region enthält). Somit bindet nach Expression des Ste12-Pho4-Fusionsproteins (dessen Expression Pheromon-responsiv ist) das Fusionsprotein an die Pho4-Stelle im Pho5-Gen, wodurch die Expression des Pho5-Genes aktiviert wird. Das Pho5-Gen codiert eine saure Phosphatase, deren Expression leicht untersuchbar ist. In einer speziell bevorzugten Ausführungsform codiert das erste Segment des chimären Konstruktes ein Polypeptid, das die Aminosäuren 1 bis 688 von Ste12 umfasst. In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform codiert das zweite Segment ein Polypeptid, das die Aminosäuren 227 bis 312 von Pho4 codiert. In einer noch weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst die im Assay zu verwendende Hefezelle eine Mutation in ihrem endogenen Pho4-Gen. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst der Nachweisschritt eines Assays der vorliegenden Erfindung ein Nachweisen der Aktivität von Pho5 saurer Phosphatase.

[0023] In einer noch weiteren Ausführungsform der vorliegenden Assays umfasst der Nachweisschritt ein Nachweisen einer Veränderung der Aktivität eines endogenen Enzyms, das von der Hefezelle in Reaktion auf ein Signal exprimiert wird, das durch den endogenen Hefe-Signalstoff-Stoffwechselweg erzeugt wird. Vorzugsweise ist der endogene Hefe-Signalstoff-Stoffwechselweg ein Hefepheromon-system-Weg. Eine Veränderung der Aktivität eines endogenen Enzyms kann beispielsweise durch Messen der Enzymaktivität des Enzyms nachgewiesen werden. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst der Assay den Nachweis der Aktivität der BAR1-Protease.

[0024] Die Aktivität der BAR1-Protease kann auf vielen Wegen nachgewiesen werden. Beispielsweise kann die Spaltung eines Substrats, das eine BAR1-Peptid-Erkennungssequenz aufweist, überwacht werden. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das BAR1-Substrat zumindest eine nachweisbare Markierung. In einer weiteren Ausführungsform kommt das Substrat natürlich vor. In einer noch weiteren Ausführungsform ist das Substrat nicht-natürlich vorkommend. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Substrat die Verbindung von SEQ ID NO: 4. In einer noch weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst das Substrat die Verbindung von SEQ ID NO: 5.

[0025] In einer noch weiteren Ausführungsform ist das Substrat ein chimäres Substrat, das ein erstes Polypeptid umfasst, das, nach Spaltung von BAR1, ein Amino-terminales Lys exponiert; und ein zweites Polypeptid, das an den Carboxy-Terminus des ersten Polypeptids gebunden ist. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst der Schritt des Nachweisens ein Messen der Stabilität des chimären Substrates.

[0026] Die BAR1-Aktivität kann ebenfalls durch Messen der Wirkung des Enzyms auf das Wachstum eines Testhefestamms nachgewiesen werden, der funktionelles BAR1-Enzym nicht exprimiert. Somit kann Medium aus BAR1-exprimierenden Zellen, die mit einer Testverbindung in Berührung gebracht wurden, mit dem Testhefestamm kultiviert werden, um dadurch das Vorhandensein einer BAR1-Aktivität im Medium nachzuweisen.

[0027] In einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung ein Assay zum Identifizieren einer Verbindung bereit, die einen Rezeptor in einer Zelle moduliert, umfassend die Schritte: (i) eine Zelle bereitzustellen, die einen Rezeptor exprimiert, der funktionell in einen endogenen Signalstoff-Stoffwechselweg der Zelle integriert ist; (ii) In-Berührung-Bringen der Zelle mit einer Bibliothek nicht-peptidischer Verbindungen; und (iii) Nachweisen einer Veränderung des Signals, das durch den endogenen Signalstoff-Stoffwechselweg produziert wird. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Zelle eine Hefezelle. In einer noch weiteren bevorzugten Ausführungsform ist der Signalstoff-Stoffwechselweg ein Hefepheromon-system-Weg bzw. -Stoffwechselweg. Der Schritt des Messens kann beispielsweise ein Messen der Transkription eines endogenen Genes oder der Aktivität eines endogenen Proteins in der Zelle umfassen.

[0028] In einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung einen Assay zum Identifizieren einer Verbindung bereit, die einen Rezeptor in einer Zelle moduliert, umfassend die Schritte: (i) eine Zelle bereitzustellen, die einen Rezeptor exprimiert, der funktionell in einen endogenen Signalstoff-Stoffwechselweg der Zelle integriert ist; (ii) die Zelle mit einer Bibliothek an Testpolypeptiden in Verbindung zu bringen, wobei die Bibliothek der Testpolypeptide durch die Zelle exprimiert wird; und (iii) eine Veränderung des Signales nachzuweisen, das durch den endogenen Signalstoff-Stoffwechselweg erzeugt wird. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Zelle eine Hefezelle. In einer noch weiteren bevorzugten Ausführungsform ist der Signalstoff-Stoffwechselweg ein Hefepheromon-system-Weg. Der Schritt des Messens kann beispielsweise ein Messen der Transkription eines en-

dogenen Genes oder der Aktivität eines endogenen Proteins in der Zelle umfassen.

[0029] In einem noch weiteren Aspekt stellt die Erfindung einen Assay zum Identifizieren einer Verbindung bereit, die ein Pheromonsystemprotein-Surrogat -bzw. -Ersatz in einer Hefezelle moduliert, umfassend die folgenden Schritte: (i) Bereitstellung einer Hefezelle, die ein Pheromonsystemprotein-Surrogat umfasst, das funktionell in einen endogenen Pheromonsystem-Signalstoff-Stoffwechselweg der Hefezelle integriert ist; (ii) In-Berührung-Bringen der Zelle mit einer Bibliothek nicht-peptidischer Verbindungen; und (iii) Messen einer Veränderung des Signals, das durch den endogenen Pheromon-Signalstoff-Stoffwechselweg der Hefezelle erzeugt wird.

[0030] In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst der Schritt des Messens ein Messen der Transkription eines endogenen Gens oder der Aktivität eines endogenen Proteins in der Zelle. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Pheromonsystemprotein-Surrogat, das untersucht werden soll, aus der Gruppe ausgewählt, die aus G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, G-Proteinen, Proteasen, Kinasen, Farnesyltransferasen, Carboxymethyltransferasen, ABC-Transportern und Cyclinen besteht.

[0031] In einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung einen Assay zum Identifizieren einer Verbindung bereit, die ein Pheromonsystemprotein-Surrogat in einer Hefezelle moduliert, umfassend die folgenden Schritte: (i) Bereitstellen einer Hefezelle, die ein Pheromonsystemprotein-Surrogat umfasst, das funktionell in einen endogenen Pheromonsystem-Signalstoff-Stoffwechselweg der Hefezelle integriert ist; (ii) In-Berührung-Bringen der Zelle mit einer Bibliothek von Testpolypeptiden, wobei die Bibliothek der Testpolypeptide von der Zelle exprimiert wird; und (iii) Messen einer Veränderung des durch den endogenen Pheromon-Signalstoff-Stoffwechselweg der Hefezelle erzeugten Signals.

[0032] In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst der Schritt des Messens ein Messen der Transkription eines endogenen Gens oder der Aktivität eines endogenen Proteins in der Zelle. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Pheromonsystemprotein-Surrogat, das untersucht werden soll, aus der Gruppe ausgewählt, die aus G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, G-Proteinen, Proteasen, Kinasen, Farnesyltransferasen, Carboxymethyltransferasen, ABC-Transportern und Cyclinen besteht.

[0033] Die Erfindung stellt weiterhin Substrate für ein BAR1-Enzym bereit. In bevorzugten Ausführungsformen umfasst das Substrat die Verbindung von SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 5.

[0034] Die Erfindung stellt weiterhin ein chimäres Substrat für ein BAR1-Enzym bereit, wobei das chimäre Substrat Folgendes umfasst: ein erstes Polypeptidsegment, gewonnen aus einem reifen Hefex-Faktor und ein zweites Polypeptidsegment, gewonnen von einem zweiten, unterschiedlichen Polypeptid, wobei nach Spaltung des ersten Polypeptidsegments durch BAR1 eine Veränderung der Stabilität des zweiten Polypeptidsegments nachweisbar ist.

[0035] In bevorzugten Ausführungsformen ist das zweite Polypeptidsegment von LacZ abgeleitet. In einer noch weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das zweite Polypeptidsegment von einem Protein abgeleitet, das für das Hefezellwachstum essentiell ist. In einer noch weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das zweite Polypeptidsegment von einem Heferepressorprotein gewonnen.

[0036] In einem noch weiteren Aspekt stellt die Erfindung ein chimäres Nukleinsäurekonstrukt bereit, das Folgendes umfasst: ein erstes Segment, das eine Nukleotidsequenz umfasst, die ein Polypeptid codiert, die durch ein Hefepheromonsystem-Weg aktiviert wird; und ein zweites Segment, das eine Nukleotidsequenz umfasst, die ein Pho4-Polypeptid codiert. In einer bevorzugten Ausführungsform codiert das erste Segment ein Ste12-Polypeptid.

[0037] Die Erfindung stellt weiterhin eine Hefezelle bereit, die ein chimäres Nukleinsäurekonstrukt der Erfindung umfasst.

[0038] Rezeptorproteine zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung können irgendein Rezeptor oder Ionenkanal sein, der mit einem extrazellulären Molekül wechselwirkt (d. h. Hormon, Wachstumsfaktor, Peptid, Ion), um ein Signal in der Zelle zu modulieren. Um den Rezeptor zu illustrieren, kann dieser ein Zelloberflächenrezeptor sein, oder er kann in anderen Ausführungsformen ein intrazellulärer Rezeptor sein. In bevorzugten Ausführungsformen ist der Rezeptor ein Zelloberflächenrezeptor wie beispielsweise: eine Rezeptortyrosinase-Kinase, beispielsweise ein EPH-Rezeptor; ein Ionenkanal; ein Cytokin-Rezeptor; ein Multiuntereinheits-Immunkennungsrezeptor, ein Chemokin-Rezeptor; ein Wachstumsfaktor-Rezeptor oder ein G-Prote-

in-gekoppelter Rezeptor, wie beispielsweise ein Chemoattractant Peptid-Rezeptor, ein Neuropeptid-Rezeptor, ein Lichtrezeptor, ein Neurotransmitter-Rezeptor oder ein Polypeptidhormon-Rezeptor.

[0039] Bevorzugte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren schließen Folgendes ein: α 1A-adrenerger Rezeptor, α 1B-adrenerger Rezeptor, α 2-adrenerger Rezeptor, α 2B-adrenerger Rezeptor, β 1-adrenerger Rezeptor, β 2-adrenerger Rezeptor, β 3-adrenerger Rezeptor, ml-Acetylcholin-Rezeptor (AChR), m2 AChR, m3 AChR, m4 AChR, m5 AChR, D1-Dopamin-Rezeptor, D2-Dopamin-Rezeptor, D3-Dopamin-Rezeptor, D4-Dopamin-Rezeptor, D5-Dopamin-Rezeptor, A1-Adenosin-Rezeptor, A2b-Adenosin-Rezeptor, 5-HT1a-Rezeptor, 5-HT1b-Rezeptor, 5-HT1-artiger Rezeptor, 5-HT1d-Rezeptor, 5-HT1d-artiger Rezeptor, 5-HT1d-Betarezeptor, Substanz K (Neurokinin A)-Rezeptor, fMLP-Rezeptor, fMLP-artiger Rezeptor, Angiotensin-II-Typ1-Rezeptor, Endothelin-ETA-Rezeptor, Endothelin-ETB-Rezeptor, Thrombin-Rezeptor, Wachstumshormonfreisetzungshormon(GHRH)-Rezeptor, vasoaktiver intestinaler Peptid-Rezeptor, Oxytocin-Rezeptor, Somatostatin-SSTR1 und SSTR2, SSTR3, Cannabinoid-Rezeptor, Follikel-stimulierendes-Hormon(FSH)-Rezeptor, Leutropin(LH/HCG)-Rezeptor, Thyroid-stimulierendes-Hormon(TSH)-Rezeptor, Thromboxan-A2-Rezeptor, Plättchen-aktivierender-Faktor(PAF)-Rezeptor, C5a-Anaphylatoxin-Rezeptor, Interleukin-8(IL-8), IL-8Ra, IL-8RB, Delta-Opioid-Rezeptor, Kappa-Opioid-Rezeptor, mip-1/RANTES-Rezeptor, Rhodopsin, Red Opsin, Green Opsin, Blue Opsin, metabotropisches Glutamat mGluR1-6, Histamin-H2-Rezeptor, ATP-Rezeptor, Neuropeptid-Y-Rezeptor, Amyloidproteinvorläufer-Rezeptor, Insulin-artiger-Wachstumsfaktor-II-Rezeptor, Bradykinin-Rezeptor, Gonadotropin-Freisetzungshormon-Rezeptor, Cholecystokinin-Rezeptor, Melanocyten-stimulierendes-Hormon-Rezeptor, Antidiuretisches-Hormon-Rezeptor, Glucagon-Rezeptor und Adrenocorticotropisches-Hormon-II-Rezeptor.

[0040] Bevorzugte EPH-Rezeptoren schließen eph, elk, eck, sek, mek4, hek, hek2, eek, erk, tyro1, tyro4, tyro5, tyro6, tyro11, cek4, cek5, cek6, cek7, cek8, cek9, cek10, bsk, rtk1, rtk2, rtk3, myk1, myk2, ehk1, ehk2, pagliaccio, htk, erk und nuk-Rezeptoren ein.

[0041] Zusätzlich kann der vorliegende Assay zum Identifizieren von Liganden für einen Orphan-Rezeptor verwendet werden, d. h. einen Rezeptor mit unbekanntem Ligand, unabhängig von der Klasse der Rezeptoren, zu der er gehört.

[0042] In solchen Ausführungsformen, in denen der Target-Rezeptor ein Zelloberflächen-Rezeptor ist und die Zelle eine Peptid-Bibliothek exprimiert, wird es in bestimmten Ausführungsformen wünschenswert sein, dass die Peptide in der Bibliothek eine Signalsequenz exprimieren, um sicherzustellen, dass sie im geeigneten sekretorischen Stoffwechselweg prozessiert werden und somit verfügbar sind, um mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu interagieren.

[0043] In anderen Ausführungsformen beherbergt die Wirtszelle ein Reporterkonstrukt, das ein Reportergen in operativer Bindung mit ein oder mehreren transkriptionsregulatorischen Elementen enthält, die auf die Signaltransduktionsaktivität des Rezeptorproteins ansprechen. Beispielhafte Reportergene schließen Enzyme ein, wie beispielsweise Luciferase, Phosphatase oder β -Galactosidase, die eine spektrometrisch aktive Markierung erzeugen können, beispielsweise Veränderungen der Farbe, der Fluoreszenz oder Lumineszenz, oder ein Genprodukt, das einen zellulären Phänotyp verändert, beispielsweise das Zellwachstum, Arzneistoffresistenz oder Auxotrophie. In bevorzugten Ausführungsformen codiert das Reportergen ein Genprodukt, ausgewählt aus der Gruppe, das aus Chloramphenicolacetyltransferase, β -Galactosidase und sezernierter alkalischer Phosphatase besteht. In noch weiteren Ausführungsformen codiert das Reportergen ein Genprodukt, das ein Wachstumssignal verleiht. In noch weiteren Ausführungsformen codiert das Reportergen ein Genprodukt zum Wachstum in Medien, die Aminotriazol oder Canavanin oder Cycloheximid enthalten.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0044] [Fig. 1](#) ist ein Sequenzalignment der N-terminalen Bereiche von α -Untereinheiten und von N-terminalen Sequenzen der GPA41- α -Hybridproteine.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0045] Die Proliferation, Differentiation und der Tod eukaryontischer Zellen werden durch eine Vielzahl extrazellulärer Signale kontrolliert, wie beispielsweise Hormone, Neurotransmitter und Polypeptid-Faktoren. Diese verstreubaren Liganden erlauben es den Zellen, Anhaltspunkte in der Umgebung zu beeinflussen und von diesen beeinflusst zu werden. Die Studie der Rezeptor-Liganden-Interaktion hat eine große Informationsmenge darüber erbracht, wie die Zellen auf externe Stimuli bzw. Reize reagieren, und dieses Wissen hat zur Entwick-

lung therapeutisch wichtiger Verbindungen geführt.

[0046] Die vorliegende Erfindung macht einen raschen, wirksamen Assay zum Screenen und zum Identifizieren pharmazeutisch wirksamer Verbindungen verfügbar, die spezifisch mit der Aktivität eines zellulären Rezeptors oder Ionenkanals interagieren und diese modulieren. Der vorliegende Assay ermöglicht ein rasches Screening großer Mengen an Verbindungen (einschließlich beispielsweise von Polypeptiden in einer Expressionsbibliothek), um Verbindungen zu identifizieren, die eine Rezeptorbioaktivität induzieren oder antagonisieren.

[0047] Im allgemeinen ist der Assay durch Anwendung eines Gemisches von Zellen charakterisiert, um eine Batterie von Verbindungen für Rezeptor/Kanalagonisten oder -antagonisten zu sammeln. Wie nachstehend ausführlicher beschrieben ist, exprimieren die Reagenz-Zellen ein Zielrezeptorprotein oder Ionenkanal, der zum Transduzieren eines nachweisbaren Signals in der Reagenzzelle in der Lage ist. Das Rezeptor/Kanalprotein kann entweder endogen oder heterolog sein. In Kombination mit den offenbarten Nachweismitteln wird eine Kultur der vorliegenden Reagenz-Zellen Mittel zum Nachweisen von Agonisten oder Antagonisten der Rezeptorfunktion bereitstellen.

[0048] In bestimmten Ausführungsformen wird eine Testverbindung exogen zugesetzt und deren Vermögen, die Aktivität des Targetrezeptors oder Ionenkanals zu modulieren, wird im Assay gescored. In anderen Ausführungsformen werden die Zellen so verändert, dass sie zusätzlich ein Testpolypeptid exprimieren, das bezüglich seiner Fähigkeit untersucht werden kann, mit dem Rezeptor oder Ionenkanal zu interagieren. In solchen Ausführungsformen stellt der Assay eine Population von Zellen bereit, die eine Bibliothek von Peptiden exprimieren, die potentielle Rezeptor/Kanaleffektoren einschließen und solche Peptide der Bibliothek, die entweder den Rezeptor oder die Kanalfunktion agonisieren oder antagonisieren können, ausgewählt und durch ihre Sequenz identifiziert werden.

[0049] Der Assay der vorliegenden Erfindung stellt ein bequemes Format zur Entdeckung von Arzneistoffen bereit, die zur Modulierung der zellulären Funktion von Nutzen sind, ebenso wie zum Verständnis der Pharmakologie von Verbindungen, die spezifisch mit zellulären Rezeptoren oder Ionenkanälen interagieren. Darüber hinaus ist der vorliegende Assay insbesondere zum Identifizieren von Liganden, gleich ob natürlich oder künstlich, für Rezeptoren und Ionenkanäle zugänglich.

I. Definitionen

[0050] Vor einer weiteren Beschreibung der Erfindung sind bestimmte Begriffe, die in der Beschreibung, den Beispielen und den beigefügten Ansprüchen verwendet werden, zur Übersicht hier zusammengestellt.

[0051] Wie hierin verwendet, schließt der Begriff „heterologe DNA“ oder „heterologe Nukleinsäuren“ DNA ein, die natürlich nicht als Teil des Genomes vorkommt, in dem sie vorhanden ist, oder die an einem Ort oder Orten im Genom zu finden ist, die sich von demjenigen, bei dem sie natürlich auftritt, unterscheiden. Heterologe DNA ist nicht-natürlich vorkommend in dieser Position oder ist nicht-endogen für die Zelle, in die diese eingebracht wird, sondern wurde von anderen Zellen gewonnen. Im Allgemeinen, obwohl nicht notwendigerweise, codiert eine solche DNA Proteine, die normalerweise nicht von der Zelle, in der sie exprimiert wird, produziert werden. Heterologe DNA kann auch von derselben Spezies sein, obwohl sie in bevorzugten Ausführungsformen von einer unterschiedlichen Spezies stammt. In besonders bevorzugten Ausführungsformen stammt sie vom Säuger, beispielsweise vom Menschen. Heterologe DNA kann ebenfalls als Fremd-DNA bezeichnet werden. Irgendeine DNA, die ein Fachmann auf dem Gebiet als heterolog oder für die Zelle, in der sie exprimiert wird, fremd erkannt oder betrachtet würde, wird hierin vom Begriff „heterologe DNA“ mitumfasst. Beispiele für heterologe DNA schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf, DNA, die Testpolypeptide, Rezeptoren, Reportergene, Transkriptions- und Translations-regulatorische Sequenzen oder selektierbare oder markierbare Markerproteine, beispielsweise ein Protein, das eine Arzneistoffresistenz überträgt, codiert.

[0052] Der Begriff „heterologes Protein“, „rekombinantes Protein“ und „exogenes Protein“ werden in der gesamten Beschreibung austauschbar verwendet und bezeichnen ein Polypeptid, das durch DNA-Rekombinationstechniken erzeugt wird, wobei im Allgemeinen DNA, die das Polypeptid codiert, in einen geeigneten Expressionsvektor eingeführt wird, der wiederum zum Transformieren einer Wirtszelle verwendet wird, um das heterologe Protein zu erzeugen. Das heißt, das Polypeptid wird aus einer heterologen Nukleinsäure exprimiert.

[0053] Wie hierin verwendet, schließen „rekombinante Zellen“ alle Zellen ein, die durch Einbringung heterologer DNA modifiziert wurden. Kontrollzellen schließen Zellen ein, die im Wesentlichen mit rekombinanten Zel-

len identisch sind, die jedoch ein oder mehrere der von der heterologen DNA codierten Proteine nicht exprimieren, beispielsweise das Reporter-gen-Konstrukt, den heterologen Rezeptor oder das Testpolypeptid nicht einschließen oder exprimieren.

[0054] Wie hierin verwendet, betrifft „Zelloberflächenrezeptor“ Moleküle, die auf der Oberfläche von Zellen auftreten, mit der extrazellulären Umgebung interagieren und die Information bezüglich der Umgebung intrazellulär in einer Art und Weise übertragen oder transduzieren, die intrazelluläre Zweite-Messenger-Aktivitäten oder die Transkription spezifischer Promotoren modulieren kann, was eine Transkription spezifischer bzw. spezieller Gene zur Folge hat. Ein „heterologer Rezeptor“ ist eine spezielle Ausführungsform eines „heterologen Proteins“, wobei der heterologe Rezeptor von heterologer DNA codiert wird, und, nach Expression dieser heterologen DNA in einer rekombinanten Zelle wird der heterologe Rezeptor in der rekombinanten Zelle exprimiert.

[0055] Wie hierin verwendet, soll der Begriff „extrazelluläres Signal“ Moleküle und Veränderungen in der Umgebung einschließen, die intrazellulär über Zelloberflächenproteine transduziert werden, die direkt oder indirekt mit dem extrazellulären Signal interagieren. Ein extrazelluläres Signal oder Effektormolekül schließt jede Verbindung oder Substanz ein, die in einer gewissen Weise die Aktivität eines Zelloberflächenproteins verändert. Beispiele für solche Signale schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf, Moleküle, wie beispielsweise Acetylcholin, Wachstumsfaktoren und Hormone, Lipide, Zucker und Nukleotide, die an die Zelloberfläche binden und/oder intrazelluläre Rezeptoren und Ionenkanäle, und modulieren die Aktivität solcher Rezeptoren und Kanäle. Der Begriff „extrazelluläres Signal“ schließt ebenfalls bis jetzt nicht identifizierte Substanzen ein, die die Aktivität eines zellulären Rezeptors modulieren und dadurch intrazelluläre Funktionen beeinflussen. Solche extrazellulären Signale sind potentielle pharmakologische Mittel, die dazu verwendet werden können, spezifische Krankheiten durch Modulieren der Aktivität spezifischer Zelloberflächenrezeptoren zu behandeln.

[0056] Der Begriff „Signaltransduktion“ soll die Prozessierung bzw. Verarbeitung physikalischer oder chemischer Signale aus der extrazellulären Umgebung durch die Zellmembran und in die Zelle umfassen und kann durch ein oder mehrere Mechanismen auftreten, beispielsweise einer Aktivierung/Inaktivierung von Enzymen (beispielsweise Proteasen oder anderen Enzymen, die Phosphorylierungsmuster oder andere posttranslationale Modifikationen verändern), eine Aktivierung von Ionenkanälen oder intrazellulären Ionen speichern, Effektorenzymaktivierung über Guanin-Nukleotidbindungsproteinintermediate, Bildung von Inositolphosphat, Aktivierung oder Inaktivierung von Adenylylcyclase, direkte Aktivierung (oder Hemmung) eines Transkriptionsfaktors und/oder eine Aktivierung. In „Signalstoff-Stoffwechselweg“ betrifft die Bestandteile, die in die „Signalübertragung“ eines speziellen Signals in eine Zelle involviert sind. Der Begriff „endogener Signalweg“ zeigt, dass einige oder alle der Bestandteile des Signalstoff-Stoffwechselwegs natürlich vorkommende Bestandteile der Zelle sind. Ein Beispiel für einen solchen Weg ist der endogene Pheromonsystemweg der Hefe.

[0057] Der Begriff „funktionell integriert“ (wie in einem Rezeptor, der „funktionell in einen Signalweg in einer Zelle integriert ist“ oder „funktionell in einen endogenen Hefe-Signalstoff-Stoffwechselweg integriert ist“) soll die Fähigkeit des Rezeptors betreffen, an der Oberfläche der Zelle exprimiert zu werden und die Fähigkeit des exprimierten Rezeptors, an Modulatoren zu binden (beispielsweise einen Liganden des Rezeptors) und Signale in der Zelle über Bestandteile eines Signalstoff-Stoffwechselwegs der Zelle zu transduzieren. Beispielsweise wird ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR), der funktionell in einen endogenen Pheromon-Reaktionsweg einer Hefezelle integriert wird, auf der Oberfläche der Hefezelle exprimiert, koppelt an G-Protein des Pheromon-Reaktionsweges innerhalb der Hefezelle und transduziert ein Signal in dieser Hefezelle nach Bindung eines Modulators an den Rezeptor.

[0058] Der Begriff „endogenes Gen“ soll ein Gen in einer Zelle betreffen, das natürlicherweise ein Teil des Genoms der Zelle ist und das am meisten bevorzugt in seinem natürlichen Ort im Genom vorliegt (im Gegensatz zu „heterologer“ DNA, die in der Zelle transduziert wurde).

[0059] Desgleichen soll der Begriff „endogenes Protein“ Proteine einer Zelle einschließen, die durch endogene Gene der Zelle codiert werden.

[0060] Ein endogenes Gen kann die natürlichen regulatorischen Elemente des Gens umfassen (beispielsweise die nativen Promotor/Enhancer-Elemente, die natürlicherweise die Expression des Gens regulieren) oder das endogene Gen kann „operativ gebunden werden an“ (d. h. funktionell gekoppelt werden an) einen „heterologen Promotor“ oder ein anderes heterologes regulatorisches Element). Ein „heterologer Promotor“ betrifft einen Promotor, der nicht natürlicherweise das Gen reguliert, an das der heterologe Promotor operativ gebunden ist. Beispielsweise wird ein endogenes Hefe Gen, das nicht normalerweise Pheromon-responsiv ist, ope-

rativ an einen heterologen Promotor gebunden, der gegenüber Signalen responsiv ist, die durch das Hefepheromonsystem erzeugt werden, um dadurch eine Pheromon-Reaktivität auf das endogene Hefe Gen zu übertragen (nachstehend ausführlicher beschrieben).

[0061] Der Begriff „Nachweis einer Veränderung in einem Signal, das durch einen endogenen Signalstoff-Stoffwechselweg erzeugt wird“ (beispielsweise ein endogener Hefe-Signalstoff-Stoffwechselweg) soll den Nachweis von Veränderungen in den endogenen Second-Messengern, die nach Aktivierung von Bestandteilen des endogenen Signalstoff-Stoffwechselweges erzeugt werden, Veränderungen in der endogenen Gentranskription, induziert nach Aktivierung von Bestandteilen des endogenen Signalstoff-Stoffwechselweges und/oder Veränderungen in der Aktivität eines endogenen Proteins (von endogenen Proteinen) nach Aktivierung von Bestandteilen des endogenen Signalstoff-Stoffwechselweges umfassen. Der Begriff „Nachweis einer Veränderung in einem Signal, erzeugt durch einen endogenen Signalstoff-Stoffwechselweg“ soll jedoch nicht das Nachweisen von Veränderungen der Expressionsstärke eines exogenen Rezeptorgens umfassen, das in die Zelle eingebracht wurde, oder die Aktivität des Rezeptorgenproduktes. Überdies soll der Begriff „Nachweisen einer Veränderung in einem Signal, erzeugt durch einen endogenen Signalstoff-Stoffwechselweg“, nicht die Untersuchung allgemeiner, globaler Veränderungen in der Zelle umfassen, wie beispielsweise Veränderungen des Zellwachstums oder der Morphologie. Eher zeigt dieser Begriff, dass ein spezifisches Signal, das mit dem endogenen Signalstoff-Stoffwechselweg assoziiert ist, untersucht wird.

[0062] Der Begriff „Modulation“ wie in „Modulation eines (heterologen) Rezeptors“ und „Modulation einer Signaltransduktionsaktivität eines Rezeptorproteins“ soll in seinen verschiedenen grammatikalischen Formen die Induktion und/oder Potenzierung ebenso wie die Hemmung und/oder Nach-unten-Regulation der Rezeptoraktivität und/oder einer oder mehrerer Signalübertragungswege stromabwärts eines Rezeptors umfassen.

[0063] Der Begriff „Verbindung“, wie hierin verwendet (beispielsweise wie in „Testverbindung“) soll sowohl exogen zugesetzte Testverbindungen als auch Peptide einschließen, die endogen aus einer Peptid-Bibliothek exprimiert werden. Beispielsweise produziert in bestimmten Ausführungsformen die Reagenz-Zelle die Testverbindung, die gescreent wird. Beispielsweise kann die Reagenzzelle beispielsweise ein Testpolypeptid, eine Testnukleinsäure und/oder ein Testkohlenhydrat erzeugen, das auf sein Vermögen hin gescreent wird, die Rezeptor/Kanalaktivität zu modulieren. In solchen Ausführungsformen wird eine Kultur solcher Reagenzzellen kollektiv eine Bibliothek potentieller Effektormoleküle bereitstellen und solche Elemente der Bibliothek, die entweder den Rezeptor oder Ionenkanalfunktion agonisieren oder antagonisieren, können ausgewählt und identifiziert werden. Überdies ist offensichtlich, dass die Reagenzzelle zum Nachweis von Mitteln verwendet werden kann, die ein Signal über den Rezeptor oder Kanal von Interesse transduzieren.

[0064] In weiteren Ausführungsformen ist die Testverbindung exogen zugesetzt. In solchen Ausführungsformen wird die Testverbindung mit der Reagenz-Zelle in Berührung gebracht. Beispielhafte Verbindungen, die bezüglich einer Aktivität gescreent werden können, schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf Peptide, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate, kleine organische Moleküle und natürliche Produktextraktbibliotheken. In solchen Ausführungsformen können sowohl Verbindungen, die die Rezeptor- oder Kanal-vermittelte Signalgebungsfunktion agonisieren oder antagonisieren, ausgewählt und identifiziert werden.

[0065] Der Begriff „Nicht-Peptid-Verbindung“ soll Verbindungen umfassen, die zumindest teilweise molekulare Strukturen umfassen, die von natürlich vorkommenden L-Aminosäureresten verschieden sind, die durch natürliche Peptidbindungen verbunden sind. Jedoch sollen „Nicht-peptidische-Verbindungen“ Verbindungen einschließen, die ganz oder teilweise aus peptidomimetischen Strukturen zusammengesetzt sind, wie beispielsweise D-Aminosäuren, nicht-natürlich vorkommende L-Aminosäuren, modifizierte Peptid-Grundgerüste und dergleichen, ebenso wie Verbindungen, die ganz oder teilweise aus Molekularstrukturen zusammengesetzt sind, die mit den natürlich vorkommenden L-Aminosäureresten, gebunden durch natürliche Peptidbindungen, nicht verwandt sind. „Nicht-peptidische Verbindungen“ sollen ebenfalls natürliche Produkte einschließen.

[0066] Der Begriff „chimäre Nukleinsäurekonstrukt“ soll ein Nukleinsäuremolekül, vorzugsweise, DNA, betreffen, die zumindest aus zwei verschiedenen Segmenten zusammengesetzt ist, ein erstes Segment, abgeleitet von einem ersten Gen, und ein zweites Segment, abgeleitet von einem zweiten Gen. Der Begriff „abgeleitet von“ bzw. „gewonnen aus“ soll anzeigen, dass die ersten und zweiten Segmente dieselbe oder eine im Wesentlichen homologe Nukleotidsequenz aufweisen, als Gesamtheit oder Teil der ersten bzw. zweiten Gene. Jedes der ersten und zweiten Segmente codiert ein funktionelles Polypeptid und ist operativ gebunden, derart, dass nach Expression des Konstruktes ein Fusionsprotein erzeugt wird, wobei das Fusionsprotein ein erstes Polypeptid umfasst, das durch das erste Segment codiert ist, und ein zweites Polypeptid, das durch das zweite Segment codiert ist. In einer bevorzugten Ausführungsform codiert das erste Segment des chimären Konstruk-

tes einen Hefetranskriptionsfaktor, der auf Signale responsiv ist, die über den Pheromonsystem-Weg transduziert werden, und das zweite Segment codiert ein DNA-bindendes Protein, das an eine DNA-Sequenz in der regulatorischen Region eines endogenen Gens von Interesse bindet.

[0067] Ein „chimäres Substrat“ (wie in einem „chimären Substrat“ eines BAR1-Enzyms) bedeutet ein Substrat, das aus zwei getrennten Polypeptiden zusammengesetzt ist, die aneinander gebunden sind, wobei zumindest eines der Polypeptide durch BAR1 spaltbar ist. Vorzugsweise exponiert das erste Polypeptid der chimären Substrate einen N-terminalen Lysin-Rest nach Spaltung durch BAR1 und das zweite Polypeptid ist am C-Terminus des ersten Polypeptids gebunden. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das erste Polypeptid ein Hefe-A-Faktor-Polypeptid.

[0068] Der Begriff „Pheromonsystemprotein-Surrogat“ (abgekürzt als „PSP-Surrogat“) soll ein heterologes Protein in einer Hefezelle bedeuten, das funktionell mit einem Hefeprotein des Pheromonsystem-Weges homolog ist (d. h., das PSP-Surrogat ist funktionell in den Hefepheromonsystem-Weg integriert). Beispiele für PSP-Surrogate und Verfahren zur Herstellung von Hefezellen, die solche PSP-Surrogate umfassen, sind ausführlich in der PCT-Veröffentlichung WO 94/23025 beschrieben. Bevorzugte PSP-Surrogate schließen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, G-Proteine, Proteasen, Kinasen, Farnesyltransferasen, Carboxymethyltransferasen, ABC-Transporter und Cyclyne ein.

[0069] Der Begriff „Rezeptoreffektor“ soll Agonisten und Antagonisten einschließen, die die Signaltransduktion über einen Rezeptor modulieren. Rezeptoreffektormoleküle sind dazu in der Lage, an den Rezeptor zu binden, obwohl nicht notwendigerweise an der Bindungsstelle des natürlichen Liganden. Rezeptoreffektoren können die Signaltransduktion modulieren, wenn sie alleine verwendet werden, d. h. können Surrogat-Liganden sein, oder können die Signaltransduktion in Gegenwart des natürlichen Liganden verändern, entweder um die Signalgebung durch die natürlichen Liganden zu verstärken oder zu hemmen. Beispielsweise sind „Antagonisten“ Moleküle, die die Signaltransduktionsaktivität des Rezeptors blockieren oder senken, sie können beispielsweise die Signaltransduktion vom Rezeptor kompetitiv, nicht-kompetitiv und/oder allosterisch hemmen, wohingegen „Agonisten“ die Signaltransduktionsaktivität eines Rezeptors potenzieren bzw. verstärken, induzieren oder in anderer Weise erhöhen. Die Begriffe „Rezeptoraktivator“ und „Surrogatligand“ betreffen einen Agonisten, der die Signaltransduktion von einem Rezeptor induziert.

[0070] „Orphan-Rezeptor“ ist eine Bezeichnung, die Rezeptoren verliehen wird, für die bis jetzt keine spezifischen natürlichen Liganden beschrieben wurden und/oder für die keine Funktion bestimmt wurde.

[0071] Der Begriff „Indikatorgen“ betrifft allgemein eine exprimierbare (beispielsweise transkribierbare) und (wahlweise translaterbare) DNA-Sequenz, die in Reaktion auf einen Signalübertragungsweg exprimiert wird, der durch einen Target-Rezeptor oder Ionenkanal moduliert wird. Beispielshafte Indikatorgene schließen unmodifizierte endogene Gene der Wirtszelle, modifizierte endogene Gene oder ein Reporter-gen eines heterologen Konstruktes ein, beispielsweise als Teil eines Reporter-gen-Konstruktes.

[0072] Wie hierin verwendet, ist ein „Reporter-gen-Konstrukt“ eine Nukleinsäure, die ein „Reporter-gen“ operativ zumindest an eine transkriptionale regulatorische bzw. eine Transkriptionsregulationssequenz gebunden einschließt. Die Transkription des Reporter-genes wird durch diese Sequenzen, an die sie gebunden sind, kontrolliert. Die Aktivität zumindest einer oder mehrerer diese Kontrollsequenzen ist direkt oder indirekt durch das Targetrezeptorprotein reguliert. Beispielshafte Transkriptionskontrollsequenzen sind Promotorsequenzen. Ein Reporter-gen soll ein Promotor-Reporter-gen-Konstrukt einschließen, das heterolog in einer Zelle exprimiert wird.

[0073] Der Begriff „im Wesentlichen homolog“, wenn er in Verbindung mit Aminosäuresequenzen verwendet wird, betrifft Sequenzen, die im Wesentlichen in ihrer Sequenz identisch oder ähnlich sind, wodurch sich eine Homologie in ihrer Konformation und somit eine ähnliche biologische Aktivität ergibt. Der Begriff schließt nicht eine gemeinsame Evolution der Sequenzen ein.

[0074] Typischerweise sind „im Wesentlichen homologe“ Sequenzen zumindest 50%, besonders bevorzugt zumindest 80% in ihrer Sequenz identisch, zumindest über irgendwelche Regionen, von denen bekannt ist, dass sie in die erwünschte Aktivität miteinbezogen sind. Am meisten bevorzugt sind nicht mehr als 5 Reste, nicht an den Termini, verschieden. Vorzugsweise liegt die Divergenz der Sequenz zumindest in den vorher erwähnten Regionen in Form von „konservativen Modifikationen“ vor.

[0075] Der Begriff „autokrine Zelle“, wie hierin verwendet, betrifft eine Zelle, die eine Substanz produziert, die einen an oder in derselben Zelle wie derjenigen, die die Substanz produziert, befindlichen Rezeptor stimulieren

kann. Beispielsweise sind Wildtype für MATa und MATa-Zellen nicht autokrin. Jedoch ist eine Hefezelle, die sowohl einen a-Faktor als auch einen a-Faktorrezeptor oder sowohl einen a-Faktor als auch einen a-Faktorrezeptor in funktioneller Form erzeugt, autokrin. Als Erweiterung werden Zellen, die ein Peptid erzeugen, das auf sein Vermögen zur Aktivierung eines Rezeptors (beispielsweise durch Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors) gescrönt wird und ebenfalls den Rezeptor exprimiert, „autokrine Zellen“ genannt. In einigen Fällen können solche Zellen als „putative autokrine Zellen“ bezeichnet werden, weil einige der Zellen Peptide aus der Bibliothek exprimieren werden, die den Rezeptor, der exprimiert wird, nicht aktivieren werden. In einer Bibliothek solcher Zellen, in denen eine Vielzahl unterschiedlicher Peptide erzeugt wird, ist es wahrscheinlich, dass ein oder mehrere der Zellen „autokrin“ in einer engeren Bedeutung des Begriffes sein werden.

II. Allgemeiner Überblick über den Assay

[0076] Wie oben dargelegt, betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zum Identifizieren von Effektoren eines Rezeptorproteins oder Komplexes hiervon. Im Allgemeinen ist der Assay durch Verwendung einer Testzelle charakterisiert, die einen Target-Rezeptor oder ein Ionenkanalprotein einschließt, deren Signaltransduktionsaktivität durch Interaktion mit einem extrazellulären Signal moduliert werden kann, wobei die Transduktionsaktivität dazu in der Lage ist, ein nachweisbares Signal zu erzeugen. In bevorzugten Ausführungsformen schließt die Zelle ebenfalls ein nachweisbares Mittel ein, beispielsweise ein Reporterogen oder ein Indikatorgen, zum Nachweisen von Signalen, die vom Rezeptor erzeugt werden. In den am meisten bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung wird eine Veränderung des Signals, das durch einen endogenen Signalstoff-Stoffwechselweg der Zelle erzeugt wird, nachgewiesen.

[0077] Die Fähigkeit spezieller Verbindungen, die Signaltransduktionsaktivität eines Target-Rezeptors oder Kanals zu modulieren, kann durch Nachweisen einer Nach-oben- oder Nach-unten-Regulierung eines endogenen Nachweissignales gescrönt werden. Beispielsweise kann die zweite Messenger-Erzeugung (beispielsweise die GTPase-Aktivität, Phospholipidhydrolyse oder Proteinphosphorylierungsmuster als Beispiele) direkt gemessen werden. In anderen Ausführungsformen wird die Transkription eines endogenen Gens oder die Aktivität eines endogenen Proteins als nachweisbare Ablesung verwendet.

[0078] Alternativ kann die Verwendung eines Indikatorgenes einen geeigneten Read-out bzw. Ablesung bereitstellen. In weiteren Ausführungsformen besteht ein Nachweismittel aus einem Reportergen. In jedem Falle kann eine statistisch signifikante Veränderung des Nachweissignales dazu verwendet werden, die Identifizierung von Verbindungen zu erleichtern, die Rezeptor- oder Ionenkanalaktivitäten modulieren.

[0079] Durch dieses Verfahren können Verbindungen, die einen Signalweg von einem speziellen Rezeptor oder Kanal induzieren, identifiziert werden. Wenn eine Testverbindung die Aktivität des Rezeptor/Kanalproteins nicht zu induzieren scheint, kann der Assay wiederholt und durch Einbringung eines Schrittes modifiziert werden, bei dem die Reagenz-Zelle zunächst mit einem bekannten Aktivator des Target-Rezeptors/Kanals in Berührung gebracht wird, um eine Signaltransduktion zu erzeugen, und die Testverbindung kann auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, die aktivierten Rezeptoren/Kanäle zu hemmen, beispielsweise um Antagonisten zu identifizieren. In noch weiteren Ausführungsformen können Batterien von Verbindungen nach Mitteln gescrönt werden, die die Reaktion auf einen bekannten Aktivator des Rezeptors potenzieren bzw. vermehren.

[0080] Bei der Entwicklung der vorliegenden Assays wurde erkannt, dass eine häufige Folge Rezeptor-vermittelter Reaktionen bzw. Antworten auf extrazelluläre Signale, die transkriptionelle Aktivierung oder Inaktivierung spezieller Gene nach Exposition des bekannten Rezeptors gegenüber einem extrazellulären Signal war, dass eine solche Aktivität induziert. Eine solche Transkription von Genen, kontrolliert durch Rezeptor-responsive transkriptionelle Elemente, widerspiegelt oftmals die Aktivität des Oberflächenproteins mittels Transduktion eines intrazellulären Signals. Um dies zu veranschaulichen, kann das intrazelluläre Signal, das transduziert wird, durch spezifische Interaktion eines extrazellulären Signales initiiert werden, insbesondere eines Liganden, mit einem Zelloberflächenrezeptor auf der Zelle. Die Interaktion löst die Bewegung einer Kaskade intrazellulärer Ereignisse aus, deren letztendliche Folge eine rasche und nachweisbare Veränderung der Transkription oder Translation eines Gens ist. Durch Auswahl transkriptioneller regulatorischer Sequenzen, die gegenüber transduzierten intrazellulären Signalen responsiv sind und die die ausgewählten Promotoren operativ an Indikatorgene binden, deren Transkription oder Translation einfach nachweisbar und messbar ist, stellt ein Transkriptions-basiertes Assay eine rasche Indikation bzw. Hinweis bereit, ob ein spezifischer Rezeptor oder Ionenkanal mit einer Testverbindung auf irgendeine Art und Weise interagiert, die die intrazelluläre Transduktion moduliert. Die Expression des Indikatorgens stellt somit ein wertvolles Screening-Werkzeug zur Entwicklung von Verbindungen bereit, die als Agonisten oder Antagonisten eines Zellrezeptors oder Ionenkanals dienen.

[0081] Indikator- oder Reporter-gen-basierte Assays dieser Erfindung messen das Endstadium der oben beschriebenen Kaskade von Ereignissen, beispielsweise eine transkriptionelle Modulation. Demgemäß wird bei der Ausübung einer Ausführungsform des Assays ein Reporter-gen-Konstrukt in die Reagenz-Zelle eingebracht, um ein Nachweissignal zu erzeugen, das von der Rezeptorsignalgebung abhängig ist. Typischerweise wird das Reporter-gen-Konstrukt ein Reporter-gen in operativer Bindung mit ein oder mehreren transkriptionellen regulatorischen Elementen einschließen, die gegenüber der Signaltransduktionsaktivität des Target-Rezeptors responsiv sind, wobei die Expressionsstärke des Reporter-gens das Rezeptor-abhängige Nachweissignal bereitstellt. Wie unten beschrieben, können bestimmte endogene Gene ein nachweisbares Signal in Reaktion auf eine Signaltransduktion von einem Rezeptor oder Ionenkanal bereitstellen, d. h. als Indikator-gene dienen. In jeder Ausführungsform kann die Menge der Transkription aus dem Indikator-gen unter Verwendung irgendeines Verfahrens gemessen werden, das dem Fachmann auf dem Gebiet als geeignet bekannt ist. Beispielsweise kann eine spezifische mRNA-Expression unter Verwendung von Northern Blots nachgewiesen werden, oder ein spezifisches Proteinprodukt kann durch eine charakteristische Färbung oder eine intrinsische Aktivität identifiziert werden.

[0082] In bevorzugten Ausführungsformen wird das Genprodukt des Indikator- oder Reporter-genes durch eine intrinsische Aktivität nachgewiesen, die mit diesem Produkt in Verbindung steht. Beispielsweise kann das Indikator-gen ein Genprodukt codieren, das beispielsweise durch enzymatische Aktivität, ein Detektionssignal, basierend auf beispielsweise Farbe, Fluoreszenz oder Lumineszenz, entstehen lässt.

[0083] Die Expressionsmenge bzw. -stärke vom Indikator-gen wird dann mit der Expressionsmenge in entweder derselben Zelle in Abwesenheit der Testverbindung verglichen oder sie kann mit der Menge der Transkription in einer im Wesentlichen identischen Zelle verglichen werden, der die spezifischen Rezeptoren fehlen. Eine Kontrollzelle kann aus derselben Zelle abgeleitet werden, aus der die Testzelle hergestellt wurde, die jedoch nicht mit der Verbindung behandelt wurde. Alternativ kann sie eine Zelle sein, bei der der Rezeptor von Interesse entfernt wurde. Jede statistisch oder in anderer Weise signifikante Differenz der Transkriptionsmenge zeigt, dass die Testverbindung in einer gewissen Weise die Aktivität des speziellen Rezeptors oder Ionenkanals verändert hat.

[0084] In weiteren bevorzugten Ausführungsformen stellt das Indikator-gen ein Selektionsverfahren derart bereit, dass bei den Zellen eine Aktivierung (oder Inaktivierung) eines oder mehrerer Signalwege eines Rezeptors oder Ionenkanals einen Wachstumsvorteil für die behandelte Zelle bereitstellt. Beispielsweise könnte die Expression des Indikator-genes die Zellebensfähigkeit verbessern, ein Ernährungserfordernis der Zelle abbauen und/oder eine Resistenz gegenüber einem Arzneistoff bereitstellen.

[0085] In weiteren Ausführungsformen können Veränderungen der intrazellulären zweiten Messenger-Wege eher biochemisch als biologisch nachgewiesen werden. Beispielsweise können Veränderungen des intrazellulären Ca^{2+} , der Phosphorylierungszustände von Proteinen, die Aktivitäten von intrazellulären Enzymen und dergleichen nachgewiesen werden. Noch weitere Nachweistekniken schließen mikrophysiometrische Vorrichtungen ein, die den Nachweis kleiner Veränderungen beispielsweise bei den Ionen oder intrazellulären pH ermöglichen.

[0086] Bezüglich des Rezeptors oder der Ionenkanals kann dieser endogen durch die Wirtszelle exprimiert werden, oder sie kann aus einem heterologen Gen exprimiert werden, das in die Zelle eingebracht wurde. Verfahren zum Einbringen von heterologer DNA in eukaryontische Zellen sind in der Technik wohl bekannt und jedes derartige Verfahren kann verwendet werden. Zusätzlich ist DNA, die verschiedene Rezeptorproteine codiert, dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt oder kann durch irgendein Verfahren kloniert werden, das dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt ist. In bestimmten Ausführungsformen, beispielsweise wenn ein exogener Rezeptor exprimiert wird, kann es wünschenswert sein, einen homologen Rezeptor, der in der Zelle vorliegt, beispielsweise durch Deletion zu inaktivieren.

[0087] Der vorliegende Assay ist zum Identifizieren von Verbindungen von Nutzen, die mit irgendeinem Rezeptorprotein interagieren, dessen Aktivität letztendlich eine Signaltransduktionskaskade in der Wirtszelle induziert, die dazu verwendet werden kann, ein nachweisbares Signal zu erzeugen. Insbesondere können die Assays dazu verwendet werden, funktionelle Liganden-Rezeptor- oder Liganden-Ionenkanal-Interaktionen für Zelloberflächen-lokalisierte Rezeptoren und Kanäle zu testen und ebenfalls für zytoplasmatische und Kernrezeptoren. Wie ausführlich unten beschrieben ist, kann der vorliegende Assay zum Identifizieren von Effektoren verwendet werden, beispielsweise von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, Cytokin-Rezeptoren und Ionenkanälen, ebenso wie von Steroidhormonen oder anderen Kernrezeptoren. In bestimmten Ausführungsformen wird das hierin beschriebene Verfahren zum Identifizieren von Liganden für „Or-

phan-Rezeptoren" verwendet, für das kein Ligand bekannt ist.

[0088] In Ausführungsformen, die eine „autokrine Zelle“ der vorliegenden Erfindung verwenden, und bei denen die Zelloberflächenrezeptoren die Assay-Targets sind, wird es für jedes der Peptide der Peptid-Bibliothek wünschenswert sein, eine Signalsequenz zur Sekretion einzuschließen. In bestimmten Ausführungsformen kann die Expression einer solchen Signalsequenz den geeigneten Transport des Peptides zum endoplasmatischen Reticulum, dem Golgi und letztendlich zur Zelloberfläche sicherstellen. Wenn eine Hefezelle die Wirtszelle ist, wird in bestimmten Ausführungsformen die Signalsequenz Peptide zum periplasmatischen Raum transportieren, jedoch kann ein solcher Transport nicht notwendig sein, um eine autokrine Stimulation zu erreichen.

[0089] Jede transfizierbare Zelle, die das erwünschte Zelloberflächenprotein in einer Art und Weise exprimieren kann, dass das Protein funktioniert, um intrazellulär ein extrazelluläres Signal zu transportieren, kann verwendet werden. In ähnlicher Weise kann jedes Zelloberflächenprotein, das dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt ist oder das vom Fachmann auf dem Gebiet identifiziert werden kann, im Assay verwendet werden. Das Zelloberflächenprotein kann endogen auf der ausgewählten Zelle exprimiert werden oder kann aus klonierter DNA exprimiert werden.

3. Wirtszellen

[0090] Geeignete Wirtszellen zur Erzeugung des vorliegenden Assays schließen Prokaryonten-, Hefe- oder höhere Eukaryontenzellen ein, einschließlich Pflanzen- und Tierzellen, insbesondere Säugetierzellen. Prokaryonten schließen Gram-negative oder Gram-positive Organismen ein. Beispiele für geeignete Säugetierwirtszelllinien schließen die COS-7-Linie der Affenierenzellen (ATCC CRL 1651) (Gluzman (1981), Cell 23: 175), CV-1-Zellen (ATCC CCL 70), L-Zellen, C127, 3T3, Chinesische-Hamster-Ovarzellen (CHO), HeLa, HEK-293, SWISS 3T3 und BHK-Zelllinien ein.

[0091] Wenn Hefezellen verwendet werden, kann die Hefe von irgendeiner Spezies sein, die kultivierbar ist und in der ein exogener Rezeptor hergestellt werden kann, um die geeignete Signaltransduktionsmaschinerie der Wirtszelle in Gang zu setzen. Geeignete Spezies schließen *Kluyverei lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* und *Ustilago maydis* ein; *Saccharomyces cerevisiae* ist bevorzugt. Andere Hefen, die in der Ausübung der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, sind *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Pichia pastoris*, *Candida tropicalis* und *Hansenula polymorpha*. Der Begriff „Hefe“ wie hierin verwendet, schließt nicht nur Hefe in einer strikt taxonomischen Bedeutung ein, d. h. einzellige Organismen, sondern auch hefeartige vielzellige Pilze oder filamentöse Pilze.

[0092] Die Auswahl der geeigneten Wirtszelle wird ebenfalls durch Auswahl des Nachweissignales beeinflusst werden. Beispielsweise können Reporterkonstrukte, wie unten beschrieben, ein selektierbares oder screenbares Merkmal nach transkriptioneller Aktivierung (oder Inaktivierung) in Reaktion auf einen Signaltransduktionsweg bereitstellen, der an einen Target-Rezeptor gekoppelt ist. Das Reporter-gen kann ein unmodifiziertes Gen sein, das bereits im Wirtszellstoffwechselweg vorliegt, wie beispielsweise die Gene, die für den Wachstumsstopp in der Hefe verantwortlich sind. Es kann ein Wirtszellgen sein, das operativ an einen „Rezeptor-responsiven“ Promotor gebunden ist. Alternativ kann es ein heterologes Gen sein (beispielsweise ein „Reporter-gen-Konstrukt“), das so verbunden wurde. Geeignete Gene und Promotoren werden unten diskutiert werden. Anderen Ausführungsformen kann die zweite Messenger-Erzeugung direkt im Nachweisschritt gemessen werden, wie beispielsweise die Mobilisierung des intrazellulären Kalzium- oder Phospholipid-Metabolismus können quantifiziert werden. In noch weiteren Ausführungsformen können Indikatorgene verwendet werden, um die Rezeptor-vermittelte Signalgebung nachzuweisen.

[0093] Es ist demgemäß verständlich, dass zum Erreichen einer Selektion oder eines Screenings die Wirtszelle einen geeigneten Phänotyp aufweisen muss. Beispielsweise würde die Erzeugung eines Pheromon-responsiven chimären HIS3-Gens in einer Hefe, die ein Wildtyp-HIS3-Gen aufweist, die genetische Selektion behindern. Somit wird zum Erreichen einer Nahrungs-bezogenen Selektion ein auxotropher Stamm bevorzugt.

[0094] Eine Vielzahl von Komplementierungen zur Verwendung im vorliegenden Assay kann konstruiert werden. Tatsächlich sind viele genetische Hefe-Komplementierungen mit Säugetiersignaltransduktionsproteinen in der Technik beschrieben worden. Beispielsweise demonstriert Mosteller et al. (1994), Mol. Cell. Biol. 14: 1104–1112, dass humane Ras-Proteine den Verlust von Ras-Mutationen in *S. cerevisiae* komplementieren bzw. ergänzen können. Darüber hinaus haben Toda et al. (1986), Princess Takamatsu Symp. 17: 253–60 gezeigt, dass humane Ras-Proteine den Verlust an Ras1- und Ras2-Proteinen in der Hefe komplementieren kön-

nen und daher funktionell homolog sind. Sowohl menschliche als auch Hefe-Ras-Proteine können die Magnesium- und Guanin-Nukleotid-abhängige Adenylatcyclase-Aktivität, die in Hefemembranen vorliegt, stimulieren. Ballester et al. (1989), *Cell* 59: 681–6, beschreiben einen Vektor, um das Säugetier-GAP-Protein in der Hefe *S. cerevisiae* zu exprimieren. Wenn GAP in der Hefe exprimiert wird, hemmt es die Funktion des humanen Ras-Proteins und komplementiert den Verlust an IRA1. IRA1 ist ein Hefe Gen, das ein Protein mit einer Homologie zu GAP codiert und stromaufwärts von Ras wirkt. Säugetier-GAP kann deswegen in der Hefe funktionieren und mit Hefe-Ras interagieren. Wie et al. (1994), *Gene* 151: 279–284 beschreiben, dass ein humaner Ras-spezifischer Guaninnukleotid-Austauschfaktore, Cdc25GEF, den Verlust der CDC25-Funktion in *S. cerevisiae* komplementieren kann. Martegani et al. (1992), *EMBO J.* 11: 2151–7 beschreibt das Klonieren durch funktionelle Komplementierung einer Maus-cDNA, die ein Homolog von CDC25 codiert, einen *Saccharomyces cerevisiae* Ras-Aktivator. Vojtek et al. (1993), *J. Cell Sci.* 105: 777–785 und Matviw et al. (1992), *Mol. Cell. Biol.* 12: 5033–5040, beschreiben, wie ein Maus-CAP-Protein, beispielsweise ein Adenylatcyclase-assoziiertes Protein, das mit der Ras-vermittelten Signaltransduktion assoziiert ist, Defekte in *S. cerevisiae* komplementieren kann. Pappasavvas et al. (1992), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184: 1378–1385, schlagen ebenfalls vor, dass inaktivierte Hefe-Adenylatcyclase durch ein Säugetier-Adenylatcyclase-Gen komplementiert werden kann. Hughes et al. (1993), *Nature* 364: 349–352, beschreiben die Komplementierung von *byr1* in Spaltheefe durch Säugetier-MAP-Kinasekinase (MEK). Parissenti et al. (1993), *Mol. Cell Endocrinol.* 98: 9–16 beschreibt die Rekonstitution von bovinem Proteinkinase C (PKC) in Hefe. Die Ca(2+)- und Phospholipid-abhängige Ser/Thr-Kinase-PKC spielt bedeutende Rollen bei der Transduktion zellulärer Signale in Säugetierzellen. Marcus et al. (1995) *PNAS* 92: 6180–4 schlägt die Komplementierung von *shk1*-Null-Mutationen in *S. pombe* entweder durch das strukturell verwandte *S. cerevisiae* *Ste20* oder durch Säugetier p6PAK-Protein-Kinasen vor.

[0095] „Inaktivierung“ bedeutet bezüglich der Gene der Wirtszelle, dass die Produktion eines funktionellen Genproduktes vermieden oder gehemmt wird. Eine Inaktivierung kann durch Deletion des Genes erreicht werden, durch Mutation des Promotors, so dass eine Expression nicht eintritt oder eine Mutation der codierenden Sequenz, so dass das Genprodukt inaktiv ist. Eine Inaktivierung kann teilweise oder vollständig erfolgen.

[0096] „Komplementierung“ bezüglich der Gene der Wirtszelle bedeutet, dass zumindest eine teilweise Funktion des inaktivierten Genes der Wirtszelle durch eine exogene Nukleinsäure ergänzt wird. Beispielsweise können Hefezellen durch Komplementierung von Rezeptor- und Signaltransduktionsproteinen mit Säugetierhomologen „mammalianisiert“ und sogar „humanisiert“ werden. Um dies zu veranschaulichen, kann die Inaktivierung von Hefe-*Byr2/Ste11*-Gen durch Expression eines humanen MEKK-Genes komplementiert werden.

IV. Expressionssysteme

[0097] Ein Ligieren einer Polynukleotid-codierenden Sequenz in ein Genkonstrukt, beispielsweise einen Expressionsvektor und ein Transformieren oder Transfizieren in Wirte, beispielsweise eukaryontische (Hefe, Vogel, Insekten oder Säugetier) oder prokaryontische (bakterielle) Zellen sind Standardverfahren, die in der Erzeugung weiterer wohlbekannter Proteine verwendet werden, einschließlich von Sequenzen, die exogenen Rezeptor und Peptid-Bibliotheken codieren. Ähnliche Verfahren oder Modifikationen hiervon können verwendet werden, um rekombinante Reagenz-Zellen der vorliegenden Erfindung durch Gewebs-Kulturtechnologie gemäß der vorliegenden Erfindung herzustellen bzw. zu präparieren.

[0098] Es ist im Allgemeinen wünschenswert, dass der Vektor dazu in der Lage ist, sich in der Wirtszelle zu replizieren. Er kann eine DNA sein, die in das Wirtsgenom integriert wird und danach als Teil der chromosomalen DNA repliziert wird, oder er kann DNA sein, die sich autonom repliziert, wie im Falle eines Plasmids. Im letzteren Falle wird der Vektor einen Replikationsursprung einschließen, der im Wirt funktionell ist. Im Falle eines Integrationsvektors kann der Vektor Sequenzen einschließen, die die Integration erleichtern, beispielsweise Sequenzen, die mit den Wirtsequenzen homolog ist, oder die Integrasen codieren.

[0099] Geeignete Klonierungs- und Expressionsvektoren zur Verwendung mit bakteriellen, Pilz-, Hefe- und Säugetier-zellulären Wirten sind in der Technik bekannt und beispielsweise bei Powels et al. (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, 1985) beschrieben. Säugetier-Expressionsvektoren können nicht-transkribierte Elemente, wie beispielsweise einen Replikationsursprung, einen geeigneten Promotor und Enhancer, gebunden an das zu exprimierende Gen, enthalten und weitere 5'- oder 3'-flankierende nicht-transkribierte Sequenzen und 5'- oder 3'-nicht-translatierte Sequenzen, wie beispielsweise notwendige Ribosomen-Bindungsstellen, eine Polyadenylierungsstelle, Spleiß-Donor- und Akzeptor-Stellen und transkriptionelle Terminationssequenzen.

[0100] Bevorzugte Säugetier-Expressionsvektoren enthalten sowohl prokaryontische Sequenzen, um die

Vermehrung des Vektors in den Bakterien zu erleichtern, als auch ein oder mehrere eukaryontische Transkriptionseinheiten, die in eukaryontischen Zellen exprimiert werden. Die pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo und pHyg-abgeleiteten Vektoren sind Beispiele für Säugetier-Expressionsvektoren, die zur Transfektion eukaryontischer Zellen in der Lage sind. Einige dieser Vektoren sind mit Sequenzen aus bakteriellen Plasmiden modifiziert, wie beispielsweise pBR322, um die Replikation und die Arzneistoffresistenzselektion sowohl in prokaryontischen als auch eukaryontischen Zellen zu erleichtern. Alternativ können Derivate von Viren, wie beispielsweise bovines Papilloma-Virus (BPV-1) oder Epstein-Barr-Virus (pHEBo, pREP-abgeleitet und p205) zur transienten Expression von Proteinen in eukaryontischen Zellen verwendet werden. Die verschiedenen in der Herstellung der Plasmide und der Transformation von Wirtsorganismen verwendeten Verfahren sind in der Technik wohl bekannt. Für weitere geeignete Expressionssysteme für sowohl prokaryontische als auch eukaryontische Zellen ebenso wie für allgemeine Rekombinationsverfahren siehe *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2. Ausg., hsg. von Sambrook, Fritsch und Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989), Kapitel 16 und 17.

[0101] Transkriptions- und Translationskontrollsequenzen und Expressionsvektoren, die beim Transformieren von Säugetierzellen verwendet werden, können durch virale Quellen bereitgestellt werden. Beispielsweise werden üblicherweise verwendete Promotoren und Enhancer von Polyoma, Adenovirus 2, Simian Virus 40 (SV40) und humanem Zytomegalie-Virus gewonnen. DNA-Sequenzen, die von dem SV40-Virusgenom abgeleitet sind, beispielsweise SV40 Origin, Early-and-late-Promotor, Enhancer, Spleiß- und Polyadenylierungsstellen können dazu verwendet werden, die anderen genetischen Elemente bereitzustellen, die für die Expression einer heterologen DNA-Sequenz erforderlich sind. Die frühen und späten (early and late) Promotoren sind insbesondere von Nutzen, weil beide einfach aus dem Virus als Fragment gewonnen werden, das ebenfalls den SV40-Virusreplikationsursprung enthält (Fiers et al. (1978), *Nature* 273: 111). Kleinere oder größere SV40-Fragmente können ebenfalls verwendet werden, vorausgesetzt, dass die ungefähr 250 bp-Sequenz, die sich von der HindIII-Stelle hin zum BglII-Ort erstreckt, der im viralen Replikationsursprung angeordnet ist, eingeschlossen ist. Beispielhafte Vektoren können wie von Okayama und Berg (1983, *Mol. Cell. Biol.* 3: 280) offenbart, konstruiert werden. Ein nützliches System zur stabilen Expression auf hohem Niveau von Säugetierrezeptor-cDNAs in C127 murinen Brustdrüsenepithelzellen kann im Wesentlichen wie von Cosman et al. (1986, *Mol. Immunol.* 23: 935) beschrieben, konstruiert werden. Weitere Expressionsvektoren zur Verwendung in Säugetierwirtszellen werden aus Retroviren gewonnen.

[0102] In anderen Ausführungsformen kann die Verwendung einer viralen Transfektion stabil integrierte Kopien des Expressionsproduktes bereitstellen. Insbesondere wird die Verwendung von retroviralen, adenoviralen oder adeno-assoziierten viralen Vektoren als Mittel zur Bereitstellung einer stabil transfizierten Zelllinie betrachtet, die einen exogenen Rezeptor und/oder eine Polypeptid-Bibliothek exprimiert.

[0103] Es existieren mehrere Vektoren für die Expression rekombinanter Proteine in Hefe. Beispielsweise sind YEP24, YIP5, YEP51, YEP52, pYES2 und YRP17 Klonierungs- und Expressionsvehikel, die bei der Einbringung genetischer Konstrukte in *S. cerevisiae* von Nutzen sind (siehe beispielsweise Broach et al. (1983) in *Experimental Manipulation of Gene Expression*, Hsg. M. Inouye, Academic Press, S. 83, hierin durch Bezugnahme mit aufgenommen).

[0104] Diese Vektoren können sich in *E. coli* aufgrund des Vorhandenseins des pBR322 ori und in *S. cerevisiae* aufgrund der Replikationsdeterminante des Hefe2-Micronplasmids replizieren. Zusätzlich können Arzneistoffresistenzmarker, wie beispielsweise Ampicillin, verwendet werden. Überdies versteht sich, wenn Hefe als Wirtszelle verwendet wird, dass die Expression eines Genes in einer Hefezelle einen Promotor erfordert, der in Hefe funktionell ist. Geeignete Promotoren schließen die Promotoren für Metallothionein, 3-Phosphoglyceratkinase (Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.* 255, 2073 (1980) oder andere glycolytische Enzyme (Hess et al., *J. Adv. Enzyme Req.* 7, 149 (1968); und Holland et al., *Biochemistry* 17, 4900 (1978)), wie beispielsweise Enolase, Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase, Hexokinase, Pyruvatdecarboxylase, Phospho-fructokinase, Glucose-6-phosphatisomerase, 3-Phosphoglyceratmutase, Pyruvatkinase, Triosephosphatisomerase, Phospho-glucoseisomerase und Glucokinase ein. Geeignete Vektoren und Promotoren zur Verwendung in der Hefeexpression sind weiter in R. Hitzeman et al., EPO Veröffentlichungsnummer 73 657, beschrieben. Weitere Promotoren, die den zusätzlichen Vorteil einer durch Wachstumsbedingungen kontrollierten Transkription aufweisen, sind die Promotorregionen für Alkoholdehydrogenase 2, Isocytochrom C, saure Phosphatase, Abbauenzyme, die mit dem Stickstoffmetabolismus in Verbindung stehen und das vorher erwähnte Metallothionein und Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase, ebenso wie Enzyme, die für die Maltose- und Galactose-Verwertung verantwortlich sind. Zuletzt können Promotoren, die in nur einem der beiden haploiden Paar-Typen aktiv sind, in bestimmten Umständen geeignet sein. Unter diesen Haploid-spezifischen Promotoren sind die Pheromon-Promotoren MF α 1 und MF β 1 von besonderem Interesse.

[0105] Es kann in einigen Fällen wünschenswert sein, Insektenzellen als Wirtszellen zu verwenden. In solchen Ausführungsformen können rekombinante Polypeptide durch Verwendung eines Baculovirus-Expressionssystems exprimiert werden. Beispiele für solche Baculovirus-Expressionssysteme schließen pVL-abgeleitete Vektoren (wie beispielsweise pVL1392, pVL1393 und pVL941), pAcUW-abgeleitete Vektoren (wie beispielsweise pAcUW1) und pBlueBac-abgeleitete Vektoren (wie beispielsweise der β -gal-enthaltende pBlueBac III) ein.

[0106] Beim Konstruieren geeigneter Expressionsplasmide werden die mit diesen Genen oder mit anderen Genen, die effizient in Hefe exprimiert werden, assoziierten Terminationssequenzen ebenfalls in den Expressionsvektor 3' der heterologen codierenden Sequenz ligiert, um eine Polyadenylierung und Termination der mRNA bereitzustellen.

V. Periplasmatische Sekretion

[0107] In Ausführungsformen, in denen die Hefezellen als Wirtszelle verwendet werden und die Verbindungen, die getestet werden, endogen aus einer Bibliothek exprimiert werden, sei erwähnt, dass die Hefezelle durch eine Lipid-Doppelschicht gebunden ist, die Plasmamembran genannt wird. Zwischen dieser Plasmamembran und der Zellwand befindet sich der periplasmatische Raum. Peptide, die durch Hefezellen durch die Plasmamembran durch eine Vielzahl von Mechanismen hindurch sezerniert werden, treten dadurch in der periplasmatischen Raum ein. Die sezernierten Peptide sind dann frei, um mit anderen Molekülen zu interagieren, die im Periplasma vorliegen oder auf der äußeren Oberfläche der Plasmamembran gezeigt werden. Die Peptide machen dann entweder eine Wiederaufnahme in die Zelle durch, diffundieren durch die Zellwand in das Medium oder werden innerhalb des periplasmatischen Raums abgebaut.

[0108] Die Testpolypeptid-Bibliothek kann in das Periplasma durch mehrere beispielhafte Mechanismen sezerniert werden, abhängig von der Art des Expressionssystems, an das sie gebunden sind. In einer Ausführungsform kann das Peptid strukturell an eine Hefesignalsequenz gebunden sein, wie beispielsweise diejenige, die in einem α -Faktor-Vorläufer vorliegt, der die Sekretion durch das endoplasmatische Reticulum und den Golgi-Apparat leitet. Weil dies derselbe Weg ist, den das Rezeptorprotein in seiner Reise zur Plasmamembran folgt, existiert die Möglichkeit in Zellen, die sowohl den Rezeptor als auch die Peptid-Bibliothek für ein spezifisches Peptid erzeugen, mit dem Rezeptor während des Transits durch den sekretorischen Stoffwechselweg zu interagieren. Dies wurde als in Säugetierzellen auftretend postuliert, die eine autokrine Aktivierung zeigen. Eine solche Interaktion könnte eine Aktivierung des Reaktionswegs während des Transits ergeben, was noch die Identifizierung dieser Zellen, die einen Peptidagonisten exprimieren, ermöglichen würde. Für Situationen, in denen die Peptidagonisten gegen extern aufgebrauchte Rezeptoragonisten gesucht werden, würde dieses System noch effektiv sein, weil sowohl der Peptidantagonist als auch Rezeptor an die Außenseite der Zelle zusammen geliefert werden würde. Somit wären solche Zellen, die einen Antagonisten produzieren, selektierbar, weil der Peptidantagonist in geeigneter Weise und rechtzeitig angeordnet wird, um zu verhindern, dass der Rezeptor durch den extern aufgebrauchten Agonisten stimuliert wird.

[0109] Ein alternativer Mechanismus zur Abgabe bzw. zum Transport von Peptiden an den periplasmatischen Raum ist die Verwendung des ATP-abhängigen Transporters der STE6/MDR1-Klasse. Dieser Transportweg und die Signale, die ein Protein oder Peptid zu diesem Weg leiten, sind nicht genauso gut charakterisiert, wie es der endoplasmatische-Reticulum-basierte sekretorische Weg ist. Nicht desto trotz können diese Transporter offensichtlich bestimmte Peptide direkt durch die Plasmamembran hindurch exportieren, ohne dass die Peptide den ER/Golgi-Weg durchqueren müssen. Es wird angenommen, dass zumindest eine Untergruppe von Peptiden durch diesen Weg durch Exprimieren der Bibliothek im Kontext der α -Faktor pro Sequenz und des terminalen Tetrapeptids sezerniert werden können. Der mögliche Vorteil dieses Systems besteht darin, dass der Rezeptor und das Peptid nicht in Berührung kommen, bis beide an die Außenoberfläche der Zelle abgegeben werden. Somit ahmt das System strikt die Situation eines Agonisten oder Antagonisten nach, der normalerweise von außen in die Zelle geliefert wird. Die Verwendung jedes der beschriebenen Wege liegt innerhalb des Umfangs der Erfindung.

[0110] Die vorliegende Erfindung benötigt keine periplasmatische Sekretion oder, falls eine solche Sekretion vorgesehen ist, irgendein spezielles Sekretionssignal oder Transportweg.

VI. Rezeptoren

Cytokin-Rezeptoren

[0111] In einer Ausführungsform ist der Target-Rezeptor ein Cytokin-Rezeptor. Cytokine sind eine Familie löslicher Mediatoren der Zell-zu-Zell-Kommunikation, die Interleukine, Interferone und Kolonie-stimulierende Faktoren einschließt. Die meisten der Cytokin-Rezeptoren, die getrennte Superfamilien bilden, besitzen keine intrinsischen Proteintyrosin-Kinasedomänen, jedoch ruft eine Rezeptorstimulation gewöhnlich eine rasche Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine hervor, die die Rezeptoren selbst einschließen. Viele Elemente der Cytokin-Rezeptorsuperfamilie aktivieren die Jak-Protein-Tyrosin-Kinase-Familie mit einer sich ergebenden Phosphorylierung der STAT-Transkriptionsaktivatorfaktoren. IL-2, IL-7, IL-2 und Interferon α haben sich alle als Jak-Kinasen-aktivierend gezeigt (Frank et al. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7779–7783); Scharfe et al. (1995), Blood 86: 2077–2085); (Bacon et al. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7307–7311); und (Sakatsume et al. (1995), J. Biol. Chem. 270: 17528–17534). Ereignisse stromabwärts der Jak-Phosphorylierung wurden eben falls beleuchtet. Beispielsweise zeigte sich, dass eine Exposition von T-Lymphozyten gegenüber IL-2 zur Phosphorylierung von Signal-Transduktoren und Aktivatoren der Transkription (STAT) Proteinen STAT1 α , STAT2 β und STAT3 führt, ebenso wie von zwei STAT-verwandten Proteinen, nämlich p94 und p95. Es wurde herausgefunden, dass die STAT-Proteine zum Kern translozieren und an eine spezifische DNA-Sequenz binden, wodurch ein Mechanismus nahegelegt ist, durch den IL-2 spezifische Gene aktivieren kann, die in die Immunzellfunktion involviert sind (Frank et al., siehe oben). Jak3 ist mit der Gammakette der IL-2, IL-4 und IL-7 Cytokin-Rezeptoren assoziiert (Fuji et al. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 5482–5486) und (Musso et al. (1995), J. Exp. Med. 181: 1425–1431). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die Jak-Kinasen durch zahlreiche Liganden aktiviert werden, die Signale über Cytokin-Rezeptoren weiterleiten, wie beispielsweise Wachstumshormon und Erythropoietin und IL-6 (Kishimoto (1994), Stem cells Supp. 12: 37–44).

[0112] Die Signaltransduktion, die in den vorliegenden Assays nachgewiesen werden kann, schließt zusätzlich zum direkten Nachweis von zweiten Messengern (beispielsweise durch Messen von Veränderungen der Phosphorylierung) Reporterkonstrukte oder Indikatorgene ein, die Transkriptions-regulatorische Elemente einschließen, die auf die STAT-Proteine responsiv sind. Dies ist unten beschrieben.

Immunerkenungsrezeptor mit vielfachen Untereinheiten (Multisubunit Immune Recognition Receptor = MIRR)

[0113] In einer weiteren Ausführungsform ist der Rezeptor ein Multisubunit-Rezeptor. Rezeptoren können vielfache Proteine umfassen, die als Untereinheiten bzw. Subunits bezeichnet werden, von denen eine Kategorie, die als Multisubunit Rezeptor bezeichnet wird, ein Multiuntereinheits-Immunerkenungsrezeptor (MIRR) ist. MIRR schließen Rezeptoren mit vielen nicht kovalent gebundenen Untereinheiten ein und sind dazu in der Lage, mit src-Familien Tyrosin-Kinasen zu interagieren. MIRR können einschließen, sind jedoch nicht beschränkt auf, B-Zell-Antigenrezeptoren, T-Zell-Antigenrezeptoren, Fc-Rezeptoren und CD22. Ein Beispiel für ein MIRR ist ein Antigen-Rezeptor auf der Oberfläche einer B-Zelle. Um dies weiter zu veranschaulichen, umfasst der MIRR auf der Oberfläche einer B-Zelle Membran-gebundenes Immunglobulin (mig), gebunden mit den Untereinheiten Ig- α und Ig- β oder Ig- γ , die einen Komplex bilden, der zur Regulierung der B-Zell-Funktion in der Lage ist, wenn sie durch ein Antigen gebunden sind. Ein Antigen-Rezeptor kann funktionell an ein Amplifizier bzw. Amplifikations- bzw. Verstärkermolekül gebunden sein, in einer Weise, dass das Verstärkermolekül zur Regulierung der Gentranskription in der Lage ist.

[0114] src-Familiertyrosin-Kinasen sind Enzyme, die zur Phosphorylierung von Tyrosin-Resten eines Target-Moleküls in der Lage sind. Typischerweise enthält eine src-Familiertyrosin-Kinase ein oder mehrere Bindungsdomänen und eine Kinase-Domäne. Eine Bindungsdomäne einer src-Familiertyrosin-Kinase ist dazu in der Lage, an ein Target-Molekül zu binden, und eine Kinase-Domäne ist dazu in der Lage, ein Zielmolekül, das an die Kinase gebunden ist, zu phosphorylieren. Mitglieder der src-Familie der Tyrosin-Kinasen sind durch eine N-terminale einmal vorkommende bzw. einzigartige Region gekennzeichnet, gefolgt von drei Regionen, die unterschiedliche Homologiegrade unter all den Elementen der Familie enthalten. Diese drei Regionen werden als src-Homologieregion 1 (SH1), src-Homologieregion 2 (SH2) und src-Homologieregion 3 (SH3) bezeichnet. Sowohl die SH2- als auch die SH3-Domänen weisen angenommenerweise eine Proteinassoziationsfunktion auf, die für die Bildung der Signaltransduktions-Komplexe von Bedeutung ist. Die Aminosäuresequenz einer N-terminalen einmal vorkommenden Region variiert zwischen jeder src-Familie Tyrosin-Kinase. Eine N-terminale einmal vorkommende Region kann zumindest ungefähr die ersten 40 Aminosäurereste des N-Terminus einer src-Familiertyrosin-Kinase sein.

[0115] syk-Familienkinasen sind Enzyme, die zur Phosphorylierung von Tyrosin-Resten eines Target-Moleküls in der Lage sind. Typischerweise enthält eine syk-Familienkinase ein oder mehrere Bindungsdomänen und eine Kinasedomäne. Eine Bindungsdomäne einer syk-Familie Tyrosin-Kinase ist dazu in der Lage, an ein Target-Molekül zu binden und eine Kinasedomäne ist dazu in der Lage, ein Target-Molekül, das an die Kinase gebunden ist, zu phosphorylieren. Elemente der syk-Familie von Tyrosin-Kinasen sind durch zwei SH2-Domänen für die Proteinbindungs- bzw. -assoziationsfunktion und eine Tyrosin-Kinasedomäne gekennzeichnet.

[0116] Ein primäres Zielmolekül ist dazu in der Lage, einen Signalweiterleitungsweg durch Modifizieren eines zweiten Messenger-Moleküles weiter zu verlängern. Primäre Ziel- bzw. Target-Moleküle können einschließen, sind jedoch nicht beschränkt auf, Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), P21^{ras}GAPase-aktivierendes Protein und assoziierte P190- und P62-Protein, Phospholipasen, wie beispielsweise PLC γ 1 und PLC γ 2, MAP-Kinase, Shc und VAV. Ein primäres Target-Molekül ist dazu in der Lage, zweite Messenger-Moleküle zu produzieren, die dazu in der Lage sind, ein transduziertes Signal weiter zu verstärken. Zweite Messenger-Moleküle schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf, Diacylglycerol und Inositol 1,4,5-Triphosphat (IP3). Zweite Messenger-Moleküle sind dazu in der Lage, physiologische Ereignisse zu initiieren, die zur Veränderungen in der Gentranskription führen können. Beispielsweise kann die Produktion von IP3 eine Freisetzung von intrazellulärem Kalzium zur Folge haben, was dann zur Aktivierung von Calmodulin-Kinase II führt, die dann zur Serinphosphorylierung eines DNA-Bindungsproteins führt, das als ets-1-Proto-Onco-Protein bezeichnet wird. Diacylglycerol ist dazu in der Lage, das Signaltransduktionsprotein, die Protein-Kinase C zu aktivieren, die die Aktivität des AP1 DNA-Bindungsproteinkomplexes beeinträchtigt. Die Signalübertragungswege können zur Transkriptionsaktivierung von Genen führen, wie beispielsweise c-fos, egr-1 und c-myc.

[0117] shc kann man sich als Adaptermolekül vorstellen. Ein Adaptermolekül umfasst ein Protein, das zwei anderen Proteinen ermöglicht, einen Komplex zu bilden (beispielsweise ein Drei-Molekül-Komplex). Das shc-Protein ermöglicht es, dass ein Komplex gebildet wird, der Grb2 und SOS einschließt. shc umfasst eine SH2-Domäne, die dazu in der Lage ist, sich mit der SH2-Domäne von Grb2 zu assoziieren.

[0118] Moleküle eines Signaltransduktionsweges können miteinander unter Verwendung von Erkennungssequenzen sich binden. Erkennungssequenzen ermöglichen die spezifische Bindung zwischen zwei Molekülen. Erkennungssequenzen können sich abhängig von der Struktur der Moleküle variieren, die miteinander binden. Ein Molekül kann ein oder mehrere Erkennungssequenzen aufweisen und kann als solches mit ein oder mehreren unterschiedlichen Molekülen assoziieren.

[0119] Signaltransduktionswege für MIRR-Komplexe sind dazu in der Lage, die biologischen Funktionen einer Zelle zu regulieren. Solche Funktionen schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf, auf die Fähigkeit einer Zelle zu wachsen, sich zu differenzieren und zelluläre Produkte zu sezernieren. MIRR-induzierte Signaltransduktionswege können die biologischen Funktionen spezieller Typen von Zellen, die in spezielle Antworten bzw. Reaktionen durch ein Tier involviert sind, regulieren, beispielsweise Immunreaktionen, Entzündungsreaktionen und allergische Reaktionen. Zellen, die in eine Immunreaktion involviert sind, können beispielsweise B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen und Plasmazellen einschließen. Zellen, die in entzündliche Reaktionen eingeschlossen sind, können beispielsweise Basophile, Mastzellen, Eosinophile, Neutrophile und Makrophagen einschließen. Zellen, die in allergische Reaktionen involviert sind, können beispielsweise Mastzellen, Basophile, B-Zellen, T-Zellen und Makrophagen einschließen.

[0120] In beispielhaften Ausführungsformen des vorliegenden Assays wird die Signaltransduktion durch Nachweisen eines zweiten Messengers, wie beispielsweise phosphoryliertem src-artigen Protein gemessen, und schließt Reporterstrukturen oder Indikatorgene ein, die Transkriptions-regulatorische Elemente einschließen, wie beispielsweise Serumresponseelement (SRE), 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat-Reaktionselement, zyklisches AMP-Reaktionselement, c-fos-Promotor oder ein CREB-responsives Element.

Kernrezeptoren

[0121] In einer weiteren Ausführungsform ist der Zielrezeptor ein Kernrezeptor. Die Kernrezeptoren können als Liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren betrachtet werden. Diese Rezeptoren stellen eine direkte Bindung zwischen den extrazellulären Signalen, hauptsächlich Hormonen und Transkriptionsreaktionen bereit. Deren Transkriptionsaktivierungsfunktion wird durch endogene kleine Moleküle bzw. Small Molecules reguliert, die beispielsweise Steroidhormone, Vitamin D, Ecdyson, Retinsäuren bzw. Retinoidsäuren und Schilddrüsenhormonen, die leicht durch die Plasmamembran hindurchgehen und an ihre Rezeptoren innerhalb der Zelle binden (Laudet und Adelmant (1995), Current Biology 5: 124). Die Hauptzahl dieser Rezeptoren scheint drei Domänen zu enthalten: eine variable Amino-terminale Domäne; eine hoch konservierte, DNA-bindende Domäne

ne und eine moderat konservierte Carboxy-terminale Ligandenbindungs-Domäne (Power et al. (1993), *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 499–544). Beispiele schließen die Östrogen-, Progesteron-, Androgen-, Schilddrüsenhormon- und Mineralocorticoid-Rezeptoren ein. Zusätzlich zu den bekannten Steroid-Rezeptoren wurden zumindest 40 Orphan-Mitglieder dieser Superfamilie identifiziert (Laudet et al. (1992), *EMBO J.* 11: 1003–1013). Es existieren zumindest vier Gruppen von Orphan-Kernrezeptoren, repräsentiert durch NGF 1, FTZ-F 1 Rev-erbs und RARs, die nach evolutionären Standards nur weitläufig miteinander verwandt sind (Laudet et al., siehe oben). Während die Steroidhormon-Rezeptoren ausschließlich als Homodimere an ein Palindrom ihres Hormon-responsiven Elementes binden, binden andere Kernrezeptoren als Heterodimere. Interessanterweise binden einige Orphan-Rezeptoren als Monomere an ähnliche Response-Elemente und erfordern für ihre Funktion ein spezifisches Motiv, das in basischen Amino-Säureresten reich ist und das Carboxy-terminal zur DNA-Bindungsdomäne angeordnet ist (Laudet und Adelmant, siehe oben).

[0122] In bevorzugten Ausführungsformen verwendet das vorliegende Assay ein Hormon-abhängiges Reporterkonstrukt zur Selektion. Beispielsweise können Glucocortikoid-Responseelemente (GREs) und Schilddrüsenhormon-Rezeptor Enhancer-artige DNA-Sequenzen (TREs) dazu verwendet werden, die Expression eines Reporterkonstruktes in Reaktion auf Hormonbindung an Hormon-Rezeptoren zu steuern. GREs sind Enhancer-artige DNA-Sequenzen, die eine Glucocortikoid-Ansprechbarkeit über eine Interaktion mit dem Glucocortikoid-Rezeptor verleihen. Siehe Payvar et al. (1983), *Cell* 35: 381 und Schiedereit et al. (1983) *Nature* 304. TREs sind GREs ähnlich, außer dass sie eine Schilddrüsenhormon-Ansprechbarkeit über eine Interaktion mit Schilddrüsenhormon-Rezeptor verleihen. Es ist bekannt, dass ein Steroid- oder Schilddrüsenhormon Zellen durch erleichterte Diffusion eindringt und an sein spezifisches Rezeptorprotein bindet, wodurch eine allosterische Veränderung des Proteins beginnt. Als Folge dieser Veränderung ist der Hormon-Rezeptorkomplex dazu in der Lage, an bestimmte spezifische Stellen auf Transkriptions-regulatorischen Sequenzen mit hoher Affinität zu binden.

[0123] Viele der primären Effekte der Steroid- und Schilddrüsenhormone schließen eine erhöhte Transkription einer Untergruppe von Genen in spezifischen Zelltypen ein. Überdies existieren Hinweise, dass eine Aktivierung der Transkription (und folglich der erhöhten Expression) von Genen, die gegenüber Steroid- und Schilddrüsenhormonen responsiv sind (durch Interaktion von Chromatin mit Hormonrezeptor/Hormonkomplex) durch Bindung des Komplexes an Enhancer bewirkt wird, die mit den Genen assoziiert sind.

[0124] Mehrere Steroidhormon- und Schilddrüsenhormon-responsiven Transkriptionskontrolleinheiten, von denen einige gezeigt haben, dass sie Enhancer einschließen, wurden identifiziert. Diese schließen den Maus-Brustdrüsen-Tumovirus 5'-long terminal repeat (MMTV LTR), responsiv gegenüber Glucocortikoid, Aldosteron und Androgenhormonen ein; die transkriptionellen Kontrolleinheiten für Säugetierwachstumshormongene, responsiv auf Glucocortikoide, Östrogene und Schilddrüsenhormone; die Transkriptionskontrolleinheiten für Säugetier-Prolaktinogene und Progesteron-Rezeptorgene, responsiv gegenüber Östrogenen; die Transkriptionskontrolleinheiten für Vogel-Ovalbumin-Gene, responsiv gegenüber Progesteronen; Säugetier-Metallothionein-Gentranskriptionskontrolleinheiten, responsiv gegenüber Glucocortikoiden; und Säugetier-Leber-alpha2u-Globulin-Gentranskriptionskontrolleinheiten, responsiv gegenüber Androgenen, Östrogenen, Schilddrüsenhormonen und Glucocortikoiden. Solche Steroidhormon- und Schilddrüsenhormon-responsiven Transkriptionskontrolleinheiten können dazu verwendet werden, Reporterkonstrukte oder Indikatorogene zu erzeugen, die gegenüber Agonisten und Antagonisten der Steroidhormon- oder Schilddrüsenhormonrezeptoren gegenüber empfindlich sind. Siehe beispielsweise die US-Patente 5 298 429 und 5 071 773, beide auf den Namen Evans et al. Darüber hinaus beschreibt der Stand der Technik die funktionelle Expression solcher Rezeptoren in Hefe. Siehe ebenfalls beispielsweise Caplan et al. (1995), *J. Biol. Chem.* 270: 5251–5; und Bani Ahmad et al. (1995), *Mol. Endokrinol.* 9: 34–43.

Rezeptortyrosin-Kinasen

[0125] In einer noch weiteren Ausführungsform ist der Zielrezeptor eine Rezeptortyrosin-Kinase. Die Rezeptortyrosin-Kinasen können in fünf Untergruppen auf Grundlage struktureller Ähnlichkeiten ihrer extrazellulären Domänen und der Organisation der Tyrosinkinase-katalytischen Region in ihren zytoplasmatischen Domänen unterteilt werden. Untergruppe I (epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) Rezeptor-artig), II (Insulin-Rezeptor-artig) und die eph/eck-Familie enthalten Cystein-reiche Sequenzen (Hirai et al. (1987), *Science* 238: 1717–1720 und Lindberg und Hunter (1990), *Mol. Cell. Biol.* 10: 6316–6324). Die funktionellen Domänen der Kinaseregion dieser drei Klassen von Rezeptortyrosin-Kinasen sind als eine benachbarte Sequenz codiert (Hanks et al. (1988), *Science* 141: 42–52). Untergruppen III (Plättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor (PDGF) Rezeptor-artig) und IV (die Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) Rezeptoren) sind insofern gekennzeichnet, als sie Immunglobulin (Ig)-artige Faltungen in ihren extrazellulären Domänen aufweisen, ebenso wie sie Kina-

sedomänen aufweisen, die in zwei Teilen aufgeteilt sind, durch einen variablen Streckenabschnitt nicht-verwandter Aminosäuren (Yanden und Ullrich (1988), siehe oben und Hanks et al. (1988), siehe oben).

[0126] Die Familie mit der mit Abstand größten Menge bekannter Mitglieder ist die EPH-Familie. Seit der Beschreibung des Prototyps, des EPH-Rezeptors (Hirai et al. (1987), *Science* 238: 1717–1730) wurde von Sequenzen für zumindest 10 Mitglieder dieser Familie berichtet, wobei offensichtlich autologe Rezeptoren nicht mitgezählt wurden, die in mehr als einer Spezies zu finden sind. Zusätzliche Teilsequenzen und die Geschwindigkeit, in der neue Mitglieder nach wie vor berichtet werden, legt nahe, dass diese Familie noch größer ist (Maisonpierre et al. (1993), *Oncogene* 8: 3277–3288; Andres et al. (1994), *Oncogene* 9: 1461–1467; Henkemeyer et al. (1994), *Oncogene* 9: 1001–1014; Ruiz et al. (1994), *Mech. Dev.* 46: 87–100; Xu et al. (1994), *Development* 120: 287–299; Zhou et al. (1994), *J. Neurosci. Res.* 37: 129–143; und Referenzen in Tuzi und Gullick (1994), *Br. J. Cancer* 69: 417–421). Bemerkenswerterweise wurden trotz der großen Anzahl der Elemente in der EPH-Familie all diese Moleküle als Orphan-Rezeptoren ohne bekannte Liganden identifiziert.

[0127] Die Expressionsmuster, die für einige der EPH-Familienrezeptoren bestimmt wurden, weisen darauf hin, dass für diese Moleküle in der frühen Vertebraten-Entwicklung eine bedeutende Rolle besteht. Insbesondere die Zeitgebung und die Muster der Expression von sek, mek4 und einigen der anderen Rezeptoren während der Phase der Gastrulation und der frühen Organogenese haben Funktionen für diese Rezeptoren in den bedeutenden zellulären Interaktionen nahegelegt, die in der Ausbildung des Embryos in diesem Stadium involviert sind (Gilardi-Hebenstreit et al. (1992), *Oncogene* 7: 2499–2506; Nieto et al. (1992), *Development* 116: 1137–1150; Henkemeyer et al., siehe oben, Ruiz et al.; siehe oben; und Xu et al., siehe oben). sek, beispielsweise, zeigt eine bemerkenswert frühe Expression in den beiden Arealen des Maus-Embryos, die eine offensichtliche Segmentierung zeigen, nämlich die Somiten im Mesoderm und die Rhombomeren des Rautenhirns; daher der Name sek, für segmental exprimierte Kinase (Gilardi-Hebenstreit et al., siehe oben; Nieto et al., siehe oben). Wie bei *Drosophila* wurden diese segmentalen Strukturen des Säugetier-Embryos als bedeutende Elemente bei der Etablierung des Körperplanes in Zusammenhang gebracht. Die Beobachtung, dass die sek-Expression dem Auftreten morphologischer Segmentierung vorangeht, legt eine Rolle für sek bei der Bildung dieser segmentalen Strukturen oder bei der Bestimmung Segment-spezifischer Zelleigenschaften, wie beispielsweise der Zelllinien-Kompartimentierung (Nieto et al., siehe oben), nahe. Überdies wurden EPH-Rezeptoren durch ihr Expressionsmuster mit der Entwicklung und Aufrechterhaltung nahezu jeden Gewebes im embryonalen und adulten Körper in Zusammenhang gebracht. Beispielsweise wurden EPH-Rezeptoren im gesamten Nervensystem nachgewiesen, den Testes, dem knorpeligen Modell des Skeletts, dem Zahn-Primordia, dem infundibularen Bestandteil der Hirnanhangsdrüse, verschiedenen Epithelgeweben, Lungen-, Pankreas-, Leber- und Nierengewebe. Beobachtungen wie beispielsweise diese, haben auf bedeutende und einzigartige Rollen für die Kinasen der EPH-Familie in der Entwicklung und Physiologie hingewiesen, jedoch wurde ein weiterer Fortschritt beim Verständnis ihrer Wirkung ernsthaft durch das Fehlen von Information bezüglich ihrer Liganden beschränkt.

[0128] Wie hierin verwendet, betrifft der Begriff „EPH-Rezeptor“ oder „EPH-artiger Rezeptor“ eine Klasse von Rezeptortyrosin-Kinasen, die zumindest 11 paraloge Gene umfassen, obwohl viel mehr Orthologe innerhalb dieser Klasse existieren, beispielsweise Homologe von unterschiedlichen Spezies. EPH-Rezeptoren sind im Allgemeinen eine diskrete Gruppe von Rezeptoren, die durch Homologie verwandt sind und einfach erkennbar sind, sie sind beispielsweise typischerweise durch eine extrazelluläre Domäne gekennzeichnet, die eine charakteristische Beabstandung von Cystein-Resten nahe dem N-Terminus und zwei Fibronectin-TypIII-Repeats enthalten (Hirai et al. (1987), *Science* 238: 1717–1720; Lindberg et al. (1990), *Mol. Cell. Biol.* 10: 6316–6324; Chan et al. (1991), *Oncogene* 6: 1057–1061; Maisonpierre et al. (1993), *Oncogene* 8: 3277–3288; Andres et al. (1994), *Oncogene* 9: 1461–1467; Henkemeyer et al. (1994), *Oncogene* 9: 1001–1014; Ruiz et al. (1994), *Mech. Dev.* 46: 87–100; Xu et al. (1994), *Development* 120: 287–299; Zhou et al. (1994), *J. Neurosci. Res.* 37: 129–143; und Referenzen in Tuzi und Gullick (1994), *Br. J. Cancer* 69: 417–421). Beispielhafte EPH-Rezeptoren schließen die eph, elk, eck, sek, mek4, hek, hek2, eek, erk, tyro1, tyro4, tyro5, tyro6, tyro11, cek4, cek5, cek6, cek7, cek8, cek9, cek10, bsk, rtk1, rtk2, rtk3, myk1, myk2, ehk1, ehk2, pagliaccio, htk, erk und nuk-Rezeptoren ein. Der Begriff „EPH-Rezeptor“ betrifft die Membranform des Rezeptorproteins ebenso wie lösliche extrazelluläre Fragmente, die die Fähigkeit beibehalten, den Liganden der vorliegenden Erfindung zu binden.

[0129] In beispielhaften Ausführungsformen wird das Nachweissignal durch Nachweisen einer Phosphorylierung von intrazellulären Proteinen bereitgestellt, beispielsweise MEKKs, MEKs oder Map-Kinasen oder durch Verwendung von Reporterkonstrukten oder Indikatorgenen, die Transkriptions-regulatorische Elemente einschließen, die auf c-fos und/oder c-jun ansprechen. Unten beschrieben.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

[0130] Eine Familie der Signaltransduktionkaskaden, die in eukaryontischen Zellen zu finden sind, verwendet heterotrimäre „G-Proteine“. Viele unterschiedliche G-Proteine interagieren bekannterweise mit Rezeptoren. G-Protein-Signalgebungssysteme schließen drei Bestandteile ein: den Rezeptor selbst, ein GTP-Bindungsprotein (G-Protein) und ein intrazelluläres Target-Protein. Die Zellmembran dient als Schalttafel. Botschaften, die durch unterschiedliche Rezeptoren eintreffen, können eine einzige Wirkung erzeugen, wenn die Rezeptoren auf denselben Typ von G-Protein einwirken. Andererseits können Signale, die einen einzigen Rezeptor aktivieren, mehr als eine Wirkung erzeugen, wenn der Rezeptor auf unterschiedliche Arten von G-Proteinen einwirkt, oder wenn die G-Proteine auf unterschiedliche Effektoren einwirken können.

[0131] In ihrem Ruhezustand sind die G-Komplexe, die aus Alpha(α)-, Beta(β)- und Gamma(γ)-Untereinheiten bestehen, mit dem Nukleotid Guanosin-diphosphat (GDP) komplexiert und sind mit Rezeptoren in Kontakt. Wenn ein Hormon oder ein anderer erster Messenger an den Rezeptor bindet, verändert sich die Rezeptorkonformation und dies verändert seine Interaktion mit dem G-Protein. Dies veranlasst die α -Untereinheit GDP freizusetzen und das häufiger vorkommende Nukleotid Guanosin-triphosphat (GTP) ersetzt es, unter Aktivierung des G-Proteins. Das G-Protein dissoziiert dann und teilt die Alpha-Untereinheit ab, von den noch komplexierten β - und γ -Untereinheiten. Entweder die $G\alpha$ -Untereinheit oder der $G\beta\gamma$ -Komplex interagiert abhängig vom Weg mit einem Effektor. Der Effektor (der oftmals ein Enzym ist) konvertiert wiederum ein inaktives Vorläufermolekül in einen aktiven „Second-Messenger“, der durch das Zytoplasma diffundieren kann, und eine metabolische Kaskade auslöst. Nach wenigen Sekunden wandelt das $G\alpha$ GTP zu GDP um, wodurch es selbst inaktiviert wird. Das inaktivierte $G\alpha$ kann sich dann mit dem $G\beta\gamma$ -Komplex reassoziieren.

[0132] Hunderte, wenn nicht tausende Rezeptoren wandeln Botschaften durch heterotrimere G-Proteine um, von denen zumindest 17 getrennte Formen isoliert wurden. Obwohl die größte Variabilität in der α -Untereinheit zu sehen ist, wurde von mehreren unterschiedlichen β - und γ -Strukturen berichtet. Es existieren zusätzlich mehrere unterschiedliche G-Protein-abhängige Effektoren.

[0133] Die meisten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren umfassen eine einzige Proteinkette, die um die Plasmamembran sieben Mal herumgewickelt ist. Solche Rezeptoren werden oftmals als Sieben-Transmembran-Rezeptoren (STRs) bezeichnet. Mehr als hundert unterschiedliche STRs wurden gefunden, einschließlich vieler verschiedener Rezeptoren, die denselben Liganden binden, und es existieren wahrscheinlich viel mehr STRs, die auf ihre Entdeckung warten.

[0134] Zusätzlich wurden STRs identifiziert, für die natürliche Liganden unbekannt sind; diese Rezeptoren werden „Orphan“-G-Protein-gekoppelte Rezeptoren genannt, wie oben beschrieben. Beispiele schließen Rezeptoren ein, die von Neote et al. (1993), Cell 72, 415, Kouba et al., FEBS Lett. (1993), 321, 173; Birkenbach et al. (1993) J. Virol. 67, 2209, kloniert wurden.

[0135] Die „exogenen Rezeptoren“ der vorliegenden Erfindung können irgendein G-Protein-gekoppelter Rezeptor sein, vorzugsweise für die Zelle exogen, die gentechnisch verändert werden soll, für die Zwecke der vorliegenden Erfindung. Dieser Rezeptor kann ein Pflanzen- oder Tierzell-Rezeptor sein. Ein Screening zur Bindung an Pflanzenzell-Rezeptoren kann bei der Entwicklung von beispielsweise Herbiziden von Nutzen sein. Im Falle eines Tierrezeptors kann dieser einen Ursprung von Wirbellosen oder Wirbeltieren aufweisen. Als Wirbellosen-Rezeptor wird ein Insektenrezeptor bevorzugt und würde die Entwicklung von Insektiziden erleichtern. Der Rezeptor kann ebenfalls ein Vertebraten, insbesondere ein Säugetier, noch mehr bevorzugt ein menschlicher Rezeptor sein. Der exogene Rezeptor ist ebenfalls vorzugsweise ein Sieben-Transmembran-Segmentrezeptor.

[0136] Bekannte Liganden für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren schließen ein: Purine und Nukleotide, beispielsweise Adenosin, cAMP, ATP, UTP, ADP, Melatonin und dergleichen; biogene Amine (und verwandte natürliche Liganden), beispielsweise 5-Hydroxy-tryptamin, Acetylcholin, Dopamin, Adrenalin, Histamin, Noradrenalin, Tyramin/Octopamin und andere verwandte Verbindungen; Peptide, beispielsweise adrenocorticotrophe Hormone (acth), Melanozyten-stimulierendes Hormon (MFH); Melanocortine, Neurotensine (nt), Bombesin und verwandte Peptide, Endotheline, Cholecystokinin, Gastrin, Neurokinin b (nk3), Invertebraten-Tachykinin-artige Peptide, Substanz k (nk2), Substanz p (nk1), Neuropeptid y (npy), Thyrotropin-freisetzender Faktor (trf), Bradykinin, Angiotensin ii, Beta-Endorphin, c5a Anaphalatoxin, Calcitonin, Chemokine (ebenfalls als Interkrine bezeichnet), corticotropher Freisetzungsfaktor (crf), Dynorphin, Endorphin, fmlp und andere formylierte Peptide, Follitropin (fsh), Pilzpaarungspheromone, Glanin, gastrischer inhibitorischer Polypeptidrezeptor (gip), gGlucagon-artige Peptide (glps), Glucagon, Gonadotropin-freisetzendes Hormon (gnrh), Wachstumshor-

mon-Freisetzungshormon (ghrh), Insekten-diuretisches Hormon, Interleukin-8, Leutropin (lh/hcg), Met-enkephalin, Opioid-Peptid, Oxytocin, Parathyroidhormon (pth) und pthrp, Hirnanhangsdrüsen-Adenylylcyclase-aktivierendes Peptid (pacap), Secretin, Somatostatin, Thrombin, Thyrotropin (tsh), vasoaktives intestinales Peptid (vip), Vasopressin, Vasotocin; Eicosanoide wie beispielsweise ip-Prostacyclin, pg-Prostaglandine, tx-Thromboxane; retinal-basierte Verbindungen, beispielsweise Vertebraten 11-cis-Retinal, Wirbellosen 11-cis-Retinal und andere verwandte Verbindungen; Lipide und Lipid-basierte Verbindungen, wie beispielsweise Cannabinoide, Anandamid, Lysophosphatidinsäure, Blutplättchen-Aktivierungsfaktor, Leukotriene und dergleichen; exzitatorische Aminosäuren und Ionen wie beispielsweise Kalziumionen und Glutamat.

[0137] Beispiele für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf, dopaminerge, muskarincholinerge, a-adrenerge, b-adrenerge, Opioid (einschließlich delta und mü), Cannabinoid, serotoninerge und GABAerge-Rezeptoren. Bevorzugte Rezeptoren schließen die Rezeptoren der 5HT-Familie, der Dopamin-Rezeptoren, der C5a-Rezeptor und FPRL-1-Rezeptor, Cyclohistidyl-prolin-diketopiperazin-Rezeptoren, Melanocyten-stimulierendes Hormon Freisetzungshemmender-Faktor-Rezeptor und Rezeptoren für Neurotensin, Thyrotropin-Freisetzungshormon, Calcitonin, Cholecystokin-A, Neurokinin-2, Histamin-3, Cannabinoid, Melanocortin oder Adrenomodulin, Neuropeptid-Y1 oder Galanin ein. Weitere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) sind in der Technik aufgelistet. Der Begriff „Rezeptor“ wie hierin verwendet, umfasst sowohl natürlich vorkommende als auch mutierte Rezeptoren.

[0138] Viele dieser G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, wie der Hefe a- und α -Faktor-Rezeptor, enthalten sieben hydrophobe Aminosäure-reiche Regionen, von denen angenommen wird, dass sie innerhalb der Plasmamembran liegen. Spezifische humane G-Protein-gekoppelte STRs, für die Gene isoliert wurden und für die Expressionsvektoren konstruiert werden könnten, schließen solche ein, die hierin aufgelistet sind, und andere, die in der Technik bekannt sind. Somit würde das Gen operabel an einen Promotor gebunden sein, der funktionell in der Zelle ist, die gentechnisch verändert werden soll, und an eine Signalsequenz, die ebenfalls in der Zelle funktioniert. Beispielsweise schließen im Falle der Hefe geeignete Promotoren Ste2, Ste3 und gal10 ein. Geeignete Signalsequenzen schließen solche von Ste2, Ste3 und von anderen Genen ein, die Proteine codieren, die von Hefezellen sezerniert werden. Vorzugsweise, wenn eine Hefezelle verwendet wird, würden die Codone des Gens für die Expression in der Hefe optimiert werden. Siehe Hoekema et al. (1987), Mol. Cell. Biol. 7: 2914–24; Sharp et al. (1986), 14: 5125–43.

[0139] Die Homologie von STRs ist in Dohlman et al., Ann. Rev. Biochem. (1991), 60: 653–88, diskutiert. Wenn STRs verglichen werden, ist ein getrenntes Raummuster der Homologie erkennbar. Die Transmembranrandomänen sind oftmals am Ähnlichsten, wohingegen die N- und C-terminalen Regionen und die zytoplasmatische Loop-verbindenden Transmembransegmente V und VI verschiedener sind.

[0140] Die funktionelle Signifikanz unterschiedlicher STR-Regionen wurde durch Einbringung von Punktmutationen (sowohl Substitutionen als auch Deletionen) studiert und durch Konstruieren von Chimären von unterschiedlichen, jedoch verwandten STRs. Synthetische Peptide, die individuellen Segmenten entsprechen, wurden auf ihre Aktivität getestet. Eine Affinitätsmarkierung wurde dazu verwendet, Ligandenbindungsstellen zu identifizieren.

[0141] In bestimmten Ausführungsformen kann der G-Protein-gekoppelte Rezeptor, wenn der Wildtyp exogene G-Protein-gekoppelte Rezeptor nicht in Hefe funktionell gemacht werden kann, für diesen Zweck mutiert werden. Ein Vergleich würde bezüglich der Aminosäuresequenzen des exogenen Rezeptors und des Heferezeptors durchgeführt werden und Regionen mit hoher und niedriger Homologie würden identifiziert werden. Versuchsmutationen würden dann durchgeführt werden, um Regionen zu unterscheiden, die in die Liganden oder G-Protein-Bindung involviert sind, um sie von solchen zu unterscheiden, die für die funktionelle Integration in die Membran notwendig sind. Der exogene Rezeptor würde dann in der letzteren Region mutiert werden, um dem Heferezeptor mehr zu ähneln, bis eine funktionelle Integration erreicht wurde. Wenn das nicht ausreichend war, um eine Funktionalität zu erreichen, würden Mutationen als nächstes in den Regionen durchgeführt werden, die in die G-Protein-Bindung involviert sind. Mutationen würden in Regionen durchgeführt werden, die in die Ligandenbindung involviert sind, jedoch nur als letzte Ausflucht, und danach würden Bemühungen erfolgen, die Ligandenbindung durch Herstellen konservativer Substitutionen zu erhalten, wenn immer dies möglich ist. Beispielsweise könnte der V-VI-Loop eines heterologen G-Protein-gekoppelten Rezeptors durch denjenigen des Hefe-STE2- oder -STE3-Rezeptors ersetzt werden).

[0142] In einer noch weiteren Ausführungsform kann ein kompatibles G-Protein bereitgestellt werden. Ein kompatibles G-Protein zur Verwendung in den vorliegenden Assays kann eine heterologe oder chimäre G-Protein-Untereinheit (oder Untereinheiten) einschließen, wie beispielsweise solche, die in der Technik beschrieben

sind (siehe beispielsweise PCT/US94/03143) und ist ausführlicher unten diskutiert.

[0143] Vorzugsweise wird das Hefe Genom so modifiziert, dass es nicht mehr dazu in der Lage ist, die Heferezeptoren zu produzieren, die mit den exogenen Rezeptoren in ihrer funktionellen Form homolog sind.

A. Chemoattractant-Rezeptoren

[0144] Ein beispielhaftes GPCR ist der N-Formylpeptid-Rezeptor, ein klassisches Beispiel für einen Kalzium-mobilisierenden GPCR, der durch Neutrophile exprimiert wird und durch andere Phagozytenzellen des Säugetierimmunsystems (Snyderman et al. (1988) in *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, Seiten 309–323). N-Formylpeptide von bakteriellem Ursprung binden an den Rezeptor und schalten ein Komplexaktivierungsprogramm ein, das eine direkte Zellbewegung, die Freisetzung inflammatorischer Granula-Inhalte und die Aktivierung einer latenten NADPH-Oxidase, die für die Produktion von Metaboliten molekularen Sauerstoffs von Bedeutung ist, zur Folge hat. Der Weg, der durch die Rezeptor-Liganden-Interaktion begonnen wird, ist im Schutz des Wirtes vor pyogenen Infektionen entscheidend. Eine ähnliche Signaltransduktion tritt in Reaktion auf die inflammatorischen Peptide C5a und IL-8 auf.

[0145] Zwei weitere Formylpeptid-Rezeptor-artige (FPRL) Gene wurden auf Grundlage ihrer Fähigkeit kloniert, an ein Fragment der NFPR-cDNA-Codierungssequenz zu hybridisieren. Diese wurden FPRL1 (Murphy et al. (1992), *J. Biol. Chem.*, 267: 7637–7643) und FPRL2 (Ye et al. (1992), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 184: 582–589), genannt. Es wurde herausgefunden, dass FPRL2 die Kalziummobilisierung in Maus-Fibroblasten vermittelt, die mit dem transfiziert und gegenüber Formyl-Peptid exponiert wurden. Im Gegensatz band der Prototyp N-Formylpeptid-Liganden, wenn sie in heterologen Zelltypen exprimiert wurden nicht, obwohl FPRL1 sich als 69% identisch in seiner Aminosäuresequenz mit NFPR herausgestellt hat. Dies führt zur Hypothese der Existenz eines bis jetzt nicht identifizierten Liganden für den FPRL1-Orphan-Rezeptor (Murphy et al., siehe oben).

B. G-Proteine

[0146] Im Falle eines exogenen G-Protein-gekoppelten Rezeptors muss die Hefezelle dazu in der Lage sein, ein G-Protein zu produzieren, das durch den exogenen Rezeptor aktiviert wird, und das wiederum den Hefe-Effektor(en) aktivieren kann. Die Technik schlägt vor, dass die endogene Hefe $G\alpha$ -Untereinheit (beispielsweise GPA) oftmals mit den „bekanntem“ $G\alpha$ -Untereinheiten ausreichend homolog ist, die nativ mit dem exogenen Rezeptor assoziiert ist, damit eine Kopplung auftritt. Es wird wahrscheinlicher notwendig sein, die Hefezelle gentechnisch zu verändern, um eine fremde $G\alpha$ -Untereinheit zu produzieren, die in geeigneter Weise mit dem exogenen Rezeptor interagieren kann. Beispielsweise kann die $G\alpha$ -Untereinheit des Hefe G-Proteins durch die $G\alpha$ -Einheit ersetzt werden, die nativ mit dem exogenen Rezeptor assoziiert ist.

[0147] Dietzel und Kurjan (1987), *Cell*, 50: 1001) demonstrierten, dass Ratten-Gas funktionell an den Hefe $G\beta\gamma$ -Komplex koppelte. Jedoch komplementierte Ratten-Gai2 nur, wenn es beträchtlich überexprimiert wurde, wohingegen $G\alpha 0$ überhaupt nicht komplementierte. Kang et al., *Mol. Cell. Biol.* (1990), 10: 2582). Folglich ist es mit einigen fremden $G\alpha$ -Untereinheiten nicht möglich, das Hefe $G\alpha$ einfach zu ersetzen.

[0148] Wenn der exogene G-Protein-gekoppelte Rezeptor nicht adäquat an Hefe $G\beta\gamma$ durch die $G\alpha$ -Untereinheit gekoppelt ist, die nativ mit dem Rezeptor assoziiert ist, kann die $G\alpha$ -Untereinheit modifiziert werden, um die Kopplung zu verbessern. Diese Modifikationen nehmen oftmals die Form von Mutationen ein, die die Ähnlichkeit der $G\alpha$ -Untereinheit mit der Hefe $G\alpha$ erhöhen, während die Ähnlichkeit mit der Rezeptor-assoziierten $G\alpha$ gesenkt wird. Beispielsweise kann ein Rest so verändert werden, dass er mit dem entsprechenden Hefe $G\alpha$ -Rest identisch wird oder zumindest zur selben Austauschgruppe dieses Restes gehört. Nach der Modifikation kann die modifizierte $G\alpha$ -Untereinheit „im Wesentlichen homolog“ mit der fremden und/oder Hefe $G\alpha$ -Untereinheit sein.

[0149] Die Modifikationen werden vorzugsweise in Regionen des $G\alpha$ konzentriert, die wahrscheinlich in die $G\beta\gamma$ -Bindung involviert sind. In einigen Ausführungsformen werden die Modifikationen die Form des Ersetzens eines oder mehrere Segmente des Rezeptor-assoziierten $G\alpha$ mit dem entsprechenden Hefe $G\alpha$ -Segment(en) einnehmen, wodurch eine chimäre $G\alpha$ -Untereinheit gebildet wird. In anderen Ausführungsformen können Punktmutationen ausreichend sein.

[0150] Diese chimäre $G\alpha$ -Untereinheit wird mit dem exogenen Rezeptor und dem Hefe $G\beta\gamma$ -Komplex interagieren, wodurch eine Signaltransduktion ermöglicht wird. Während die Verwendung der endogenen Hefe- $\beta\gamma$

bevorzugt wird, kann, wenn eine fremde oder chimäre G β y dazu in der Lage ist, das Signal zum Hefeeffektor zu transduzieren, dieses stattdessen verwendet werden.

C. G α -Struktur

[0151] Einige Aspekte der G α -Struktur sind für das Design modifizierter G α -Untereinheiten relevant. Die Amino-terminalen 66 Reste von GPA1 werden mit den bekannten Domänen von humanen Gas, Gai2, Gai3, Ga16 und Transducin ausgerichtet. In den GPA41-G α -Hybriden sind die Amino-terminalen 41 Reste (abgeleitet von GPA1) identisch, enden mit der Sequenz LEKQRDKNE und sind zur Hervorhebung unterstrichen. Alle Reste, die dem Glutamat (E)-Rest an Position 41 folgen, werden den humanen G α -Untereinheiten zugerechnet, einschließlich des Konsensusnukleotid-Bindungsmotivs -GxGxxG-. Perioden in den Sequenzen zeigen Lücken an, die zum Maximieren der Alignments in dieser Region eingebracht wurden. Der Codon-Bias ist Säugetier. Für Alignments der gesamten codierenden Regionen von GPA mit Gas, Gai und GaO, Gaq und Gaz siehe Dietzel und Kurjan (1987), *Cell* 50: 573) und Lambright et al. (1994), *Nature* 369: 621–628). Zusätzliche Sequenzinformation wird durch Mattera et al. (1986), *FEBS Lett.* 206: 36–41), Bray et al. (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83K 8893–8897) und Bray et al. (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5115–5119), bereitgestellt.

[0152] Das Gen, das ein G-Protein-Homolog von *S. cerevisiae* codiert, wurde unabhängig von Dietzel und Kurjan (siehe oben) (SCG1) und von Nakafuku et al. (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 2140–2144) (GPA1), kloniert. Eine Sequenzanalyse zeigte einen hohen Homologiegrad zwischen dem Protein, das durch dieses Gen und von Säugetier-G α codiert wurde. GPA1 codiert ein Protein von 472 Aminosäuren im Vergleich mit ungefähr 340 bis 350 Aminosäuren für die meisten Säugetier-G α -Untereinheiten in vier beschriebenen Familien, nämlich Gas, Gai, Gaq und Ga12/13. Nichts desto weniger teilt GPA1 seine Gesamtsequenz und strukturelle Homologie mit allen G α -Proteinen, die bis heute identifiziert wurden. Die höchste Gesamthomologie in GPA1 besteht zur Gai-Familie (48% Identität oder 65% mit konservativen Substitutionen) und die niedrigste mit GQS (33% Identität oder 51% mit konservativen Substitutionen) (Nakafuku et al., siehe oben).

[0153] Die Regionen mit einer hohen Sequenzhomologie unter den G α -Untereinheiten sind in ihrer gesamten primären Sequenz verteilt, wobei die Regionen des höchsten Homologiegrades an die Sequenz kartieren, die die Guanin-Nukleotidbindungs/GTPase-Domäne umfasst. Diese Domäne ist strukturell der α β -Faltung der ras-Proteine ähnlich und dem Proteinsynthese-Elongationsfaktor EF-Tu. Diese hoch konservierte Guanin-Nukleotid-Bindungsdomäne besteht aus sechssträngigem β -Blatt, umgeben von einem Satz von fünf α -Helices. Es liegt innerhalb dieser β -Faltblätter und β -Helices, dass der höchste Grad an Konservierung zwischen allen G α -Proteinen, einschließlich GPA1, beobachtet wird. Die geringste Sequenz- und Strukturhomologie ist innerhalb des dazwischenliegenden Loops zwischen den β -Faltblättern und α -Helices zu finden, die die Kern-GTPase-Domäne definieren. Es existieren insgesamt vier „dazwischenliegende Loops“ oder „Inserte“, die in allen G α -Untereinheiten vorliegen. In den Kristallstrukturen, von denen bis heute für die GDP- und GTP γ S-ligandierten Formen von Rinderstab-Translucine berichtet wurde (Noel et al. (1993), *Nature* 366: 654–663); (Lambright et al. (1994), *Nature* 369: 621–628), sind Loop-Reste außerhalb der Kern-GTPase-Struktur zu finden. Funktionelle Rollen für diese Loop-Strukturen wurden in nur einigen Fällen etabliert. Eine direkte Rolle bei der Kopplung an Phosphodiesterase- γ wurde für Reste innerhalb der Inserte 3 und 4 von Gat demonstriert (Rarick et al. (1992), *Science* 256: 1031–1033); (Artemyev et al. (1992), *J. Biol. Chem.* 267: 25067–25072), wohingegen eine „GAP-artige“ Aktivität dem großen α -helikalen Insert-1-Domänen von GaS (Markby et al. (1993), *Science* 262: 1805–1901), zugeschrieben wurde.

[0154] Während die Amino- und Carboxy-Termini der G α -Untereinheiten keine auffällige Homologie entweder auf der primären, sekundären oder tertiären Ebene teilen, existieren mehrere Verallgemeinerungen, die über diese vorgenommen werden können. Zunächst wurden die Amino-Termini der G α -Untereinheiten in den Zusammenbau der G α - mit G β y-Komplexe in Verbindung gebracht und mit der Membranassoziation über N-terminale Myristoylierung. Zusätzlich wurden die Carboxytermini mit der Assoziation von G α β y-heterotrimären Komplexen mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in Verbindung gebracht (Sullivan et al. (1987), *Nature* 330: 758–760); West et al. (1985), *J. Biol. Chem.* 260: 14428–14430); (Conklin et al. (1993), *Nature* 363: 274–276); (Kallal und Kurjan (1997), *Mol. Cell. Biol.* 17: 2897). Daten zur Unterstützung dieser Verallgemeinerungen über die Funktion des N-Terminus stammen aus verschiedenen Quellen, einschließlich sowohl biochemischer als auch genetischer Studien.

[0155] [Fig. 1](#) zeigt die Amino-terminalen 66 Reste von GPA1 aligned mit den verwandten Domänen von humanem Gas, Gai2, Gai3, Ga16 und Translucine. In den GPA41-G α -Hybriden sind die Amino-terminalen 41 Reste (abgeleitet von GPA1) identisch, enden mit der Sequenz -LEKQRDKNE- (SEQ ID NO: 47). Alle Reste folgend dem Glutamat (E)-Rest an Position 41 werden den humanen G α -Untereinheiten zugeschrieben, ein-

schließlich des Konsensusnukleotid-Bindungsmotivs, das in der Aminosäuresequenz -GxGxxG- dargestellt ist. Perioden in den Sequenzen zeigen Lücken an, die zur Maximierung der Alignments in dieser Region eingebracht wurden. Der Codon-Bias ist Säugetier. Für Alignments der gesamten codierenden Regionen von GPA1 mit Gas, Gai und GαO, Gaq und Gaz siehe Dietzel und Kurjan (1987), Cell 50: 573) und Lambright et al. (1994), Nature 369: 621–628. Zusätzliche Sequenzinformationen werden von Mattera et al. (1986), FEBS Lett. 206: 36–41, Bray et al. (1986), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8893–8897 und Bray et al. (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 5115–5119, bereitgestellt.

[0156] In weiteren biochemischen Studien, die die Überprüfung der Rolle des Amino-Terminus von Gα bei der Steuerung der Assoziation zwischen Gα und Gβγ-Untereinheiten zum Ziel hatte, wurden proteolytische oder genetisch trunkierte Versionen der Gα-Untereinheiten bezüglich ihrer Fähigkeit untersucht, mit Gβγ-Komplexen zu assoziieren, Guaninnukleotide zu binden und/oder Effektormoleküle zu aktivieren. In allen Fällen waren die Gα-Untereinheiten mit trunkierten Amino-Termini in allen drei Funktionen defizient (Graf et al. (1992), J. Biol. Chem. 267: 24307–24314); (Journot et al. (1990), J. Biol. Chem. 265: 9009–9015); und (Neer et al. (1988), J. Biol. Chem. 263: 8996–9000). Slepak et al. (1993, J. Biol. Chem. 268: 1414–1423) berichteten von einer Mutationsanalyse der N-terminalen 56 Aminosäuren von Säugetier-Gαo, exprimiert in *Escherichia coli*. Moleküle mit einer apparent reduzierten Fähigkeit, mit exogen zugesetzten Säugetier-Gβγ zu interagieren, wurden in der mutierten Bibliothek identifiziert. Wie die Autoren dargelegt haben, war der zum Screenen der Mutanten verwendete Assay des Ausmaßes der ADP-Ribosylierung des mutierten Gα durch Pertussis-Toxin keine vollständig zufriedenstellende Probe der Interaktionen zwischen Gα und Gβγ. Mutationen, die als die Interaktion der Untereinheiten hemmend identifiziert wurden, können unter Verwendung dieses Assays nach wie vor die Komplexierung von Gα und Gβγ ermöglichen, während die Ribosylierung von Gα durch ein Toxin sterisch gehindert wird. Genetische Studien, die die Rolle der Amino-terminalen Determinanten von Gα in der heterotrimeren-Untereinheitsassoziation überprüften, wurden sowohl in Hefesystemen unter Verwendung von GPA1-Säugetier-Gα-Hybriden (Kang et al. (1990), Mol. Cell. Biol. 10: 2582–2590) als auch in Säugetiersystemen unter Verwendung von Gai/Gas-Hybriden (Russell und Johnson (1993), Mol. Pharmacol. 44: 255–263) durchgeführt. In den letzteren Studien wurden Genfusionen zusammengesetzt aus Hefe GPA1 und Säugetier-Gα-Sequenzen von Kang et al. (siehe oben) konstruiert und bezüglich ihrer Fähigkeit untersucht, einen GPA1-Null-Phänotyp in *S. cerevisiae* zu komplementieren (d. h. eine konstitutive Aktivierung des Pheromon-Reaktionsweges). Kang et al. zeigten, dass Wildtyp-Säugetier-Gas, Gai, jedoch nicht GαO-Proteine dazu in der Lage sind, mit Hefe Gα zu assoziieren und den GPA1-Null-Phänotyp unterdrücken, jedoch nur, wenn sie überexprimiert werden. Fusionsproteine, die die Aminoterminalen 330 Reste der GPA1-Sequenz, gebunden an 160, 143 oder 142 Reste der Säugetier-Gas, Gai und Gαo-Carboxyl-terminalen Regionen jeweils enthalten, werden an den Hefepaarungsreaktionsweg gekoppelt, wenn sie auf High-Copy-Plasmiden mit stark induzierbaren (CUP) oder konstitutiven (PGK) Promotoren überexprimiert werden. Alle drei dieser Hybridmoleküle waren dazu in der Lage, die GPA1-Null-Mutation in einem Wachstumsstoppassay zu komplementieren und waren zusätzlich dazu in der Lage, die α-Faktor-Responsivität und die Paarung der Teststämme zu hemmen. Diese letzten beiden Beobachtungen argumentieren, dass Hybridhefe-Säugetier-Gα-Untereinheiten dazu in der Lage sind, direkt mit Hefe Gβγ zu interagieren, wodurch die normale Funktion des Hefeheterotrimers unterbrochen wird. Fusionen, die die Amino-terminale Domäne von Gas, Gai oder Gαo enthalten, komplementierten den GPA1-Null-Phänotyp nicht, was auf ein Erfordernis nach Determinanten in den Amino-terminalen 330 Aminosäureresten von GPA1 zur Assoziation und Sequestration von Hefe Gβγ-Komplexen hinweist. Zusammen genommen legen diese Daten nahe, dass die Terminanden in der Amino-terminalen Region von Gα-Untereinheiten nicht nur die Fähigkeit zur Assoziation mit Gβγ-Untereinheiten im Allgemeinen determinieren, sondern ebenfalls mit spezifischen Gβγ-Untereinheiten in einer Spezies-beschränkten Art und Weise.

[0157] Hybrid-Gai/Gas-Untereinheiten wurden in Säugetier-Expressionssystemen untersucht (Russell und Johnson (siehe oben)). In diesen Studien wurde eine große Anzahl chimärer Gα-Untereinheiten bezüglich einer Fähigkeit zur Aktivierung von Adenylylcyclase untersucht und deswegen, indirekt, auf ein Vermögen, mit Gβγ zu interagieren (d. h. Kopplung von Gα an Gβγ = inaktive Cyclase; Nicht-Kopplung von Gα an Gβγ = aktive Cyclase). Aus diesen Studien ergab sich ein komplexes Bild, bei dem Determinanten im Bereich zwischen den Resten 25 und 96 der Hybride sich als den Zustand der Aktivierung dieser Allele determinierend herausgestellt haben, wie es in der Geschwindigkeit des Guanin-Nukleotid-Austausches unter GTP-Hydrolyse und dem Umfang, in dem sie in vivo Adenylylcyclase aktivierten, widerspiegelt wurde. Diese Daten könnten interpretiert werden, um die Hypothese zu unterstützen, dass strukturelle Elemente in der Region zwischen dem Amino-terminalen Methionin und dem ~1-Blatt, identifiziert in der Kristallstruktur von Gat (siehe Noel et al., siehe oben und Lambright et al., siehe oben) in die Bestimmung bzw. Determinierung des Zustands der Aktivierung des Heterotrimers durch (1) Antreiben der Assoziation/Dissoziation zwischen Gα- und Gβγ-Untereinheiten; (2) durch Antreiben bzw. Steuern bzw. Kontrollieren des GDP/GTP-Austausches, involviert sind. Während kein direkter Beweis von diesen Studien bereitgestellt wurde, um die Idee zu unterstützen, dass Reste in diesem Be-

reich von α - und Reste in den β -Untereinheiten einander berühren, stellen diese Daten nichts desto weniger einen positiven Hinweis für die Konstruktion einer Hybrid- α -Untereinheit bereit, die eine Funktion beibehält. Es besteht jedoch ein negativer Indikator, der sich von dieser Arbeit ableiten lässt, insofern als einige Hybridkonstrukte eine konstitutive Aktivierung der chimären Proteine zur Folge hatten (d. h. ein Verlust der Rezeptor-abhängigen Stimulierung der β -Dissoziierung und Effektor-Aktivierung).

D. Konstruktion chimärer α -Untereinheiten

[0158] Bei der Entwicklung von α -Untereinheiten, die zum Übertragen bzw. Transmittieren von Signalen in der Hefe in der Lage sind, die von Säugetier-G-Protein gekoppelten Rezeptoren abstammen, wurden zwei allgemeine Desiderata erkannt. Zunächst sollten die Untereinheiten so viel der nativen Säugetierproteinsequenz wie möglich beibehalten. Als Zweites sollte die Expressionsstärke bzw. das Niveau der Expression für die heterologen Komponenten so nahe wie möglich der Konzentration ihrer endogenen Gegenstücke nahekomen. Die von King et al. (1990), Science 250: 121–123, für die Expression des humanen β 2-adrenergen Rezeptors und von Gas in Hefe beschriebenen Ergebnisse zusammengenommen mit negativen Ergebnissen, die von Kang et al. (siehe oben) mit Volle-Länge-Säugetier- α -Untereinheiten, die von Gas verschieden waren, erzielt wurden, führten uns zu den folgenden Bevorzungen für die Entwicklung von Hefestämmen, bei denen Säugetier-G-Protein-gekoppelte Rezeptoren an den Pheromon-Reaktionsweg gekoppelt werden konnten.

1. Säugetier- α -Untereinheiten werden unter Verwendung der nativen Sequenz jeder Untereinheit exprimiert, oder, alternativ, als minimale Genfusionen mit Segmenten aus dem Amino-Terminus von GPA1, der die homologen Reste aus den Säugetier- α -Untereinheiten ersetzt.
2. Säugetier- α -Untereinheiten werden aus dem GPA1-Promotor entweder auf Low-Copy-Plasmiden oder nach Integration in das Hefe Genom als Single-Copy-Gene exprimiert.
3. Endogene β -Untereinheiten werden durch die Hefe STE4- und STE18-Stellen bzw. -Orte bereitgestellt werden.

E. Ortsgerichtete Mutagenese gegen zufallsbedingte Mutagenese

[0159] Es existieren zwei allgemeine Ansätze zur Lösung von Struktur-Funktionsproblemen der Art, die durch Ansätze präsentiert werden, die Determinanten zu definieren, die in der Vermittlung der Assoziation der das G-Protein-Heterotrimer umfassenden Untereinheiten involviert sind. Der erste oben diskutierte Ansatz bezüglich von Hybrid-Konstrukten, ist ein vernünftiger Ansatz, bei dem spezielle Mutationen oder Veränderungen in ein Molekül auf Grundlage der verfügbaren experimentellen Beweislage eingebracht werden. In einem zweiten Ansatz werden zufallsbedingte Mutagenese-Techniken, gekoppelt mit der Selektion oder Screening-Systemen dazu verwendet, große Mengen an Mutationen in ein Molekül einzubringen und dass die Sammlung zufallsbedingt mutierter Moleküle dann einer Selektion nach dem erwünschten Phänotyp unterworfen wird oder ein Screening durchgeführt wird, bei dem der erwünschte Phänotyp gegen einen Hintergrund unerwünschter Phänotypen beobachtet werden kann. Bei der zufallsbedingten Mutagenese kann man ein gesamtes Molekül mutagenisieren oder kann durch eine Kassettenmutation vorgehen. Im ersteren Fall wird die gesamte codierende Region eines Moleküls durch eine von mehreren Verfahren (chemisch, PCR, dotierte Oligonukleotid-Synthese) mutagenisiert und diese Sammlung zufallsbedingt mutierter Moleküle wird einer Selektion oder Screening-Verfahren unterworfen. Die zufallsbedingte Mutagenese kann auf diese Weise in Fällen angewendet werden, in denen das Molekül, das untersucht wird, relativ klein ist, und es existieren kraftvolle und stringente Selektionen oder Screenings, die dazu in der Lage sind, zwischen den unterschiedlichen Klassen mutierter Phänotypen zu unterscheiden, die sich unweigerlich ergeben werden. Im zweiten Ansatz werden diskrete Regionen eines Proteins, entsprechend ihrer definierten strukturellen (d. h. α -Helices, β -Faltblätter, Turns, Oberflächenloops) oder funktionellen Determinanten (beispielsweise katalytischen Spalten, Bindungsdeterminanten, Transmembransegmenten) einer sättigenden oder halb-zufallsbedingten Mutagenese unterworfen, und diese mutagenisierten Kassetten werden erneut im Kontext des ansonsten Wildtyp-Allels eingebracht. Eine Kassetten-Mutagenese ist am meisten von Nutzen, wenn experimenteller Beweis verfügbar ist, der eine spezielle Funktion für eine Molekülregion nahelegt, und es existieren kraftvolle Selektions- und/oder Screening-Ansätze, die verfügbar sind, um zwischen interessierenden und nicht-interessierenden Mutanten zu unterscheiden. Eine Kassetten-Mutagenese ist ebenfalls von Nutzen, wenn das Stammolekül vergleichsweise groß ist und es erwünscht ist, die funktionellen Domänen eines Moleküls durch Mutagenisieren des Moleküls in einer schrittartigen Weise zu kartieren, d. h. ein Mutieren einer linearen Kasette von Resten am einen Zeitpunkt und darauf die Untersuchung ihrer Funktion.

[0160] Die vorliegende Erfindung betrachtet die Anwendung der zufallsbedingten Mutagenese, um die Determinanten, die in die α - β -Assoziierung involviert sind, weiter zu skizzieren. Die zufallsbedingte Mutagenese kann durch viele Mittel erreicht werden, einschließlich:

1. PCR-Mutagenese, bei der die fehleranfällige Taq-Polymerase zur Erzeugung mutierter Allele von α -Untereinheiten verwendet wird, die direkt in Hefe bezüglich einer Fähigkeit zur Kopplung an Hefe $\beta\gamma$ untersucht werden.
2. Chemische Mutagenese, bei der Expressionskassetten, die α -Untereinheiten codieren, gegenüber Mutagenen exponiert werden, und die Proteinprodukte der mutierten Sequenzen werden direkt in Hefe bezüglich ihrer Fähigkeit, an Hefe $\beta\gamma$ zu koppeln, untersucht.
3. Dotierte Synthese von Oligonukleotiden, die Teile des α -Gens codieren.
4. In-vivo-Mutagenese, bei der zufallsbedingte Mutationen in die codierende Region von α -Untereinheiten durch Passage durch einen Mutatorstamm von *E. coli*, XL1-Red (mutD5 mutS mutT) (Stratagene, Menasa, WI) eingebracht werden.

[0161] Die zufallsbedingte Mutagenese kann auf Regionen fokussiert werden, die unter dem Verdacht stehen, dass sie in die α - $\beta\gamma$ -Assoziation involviert sind, wie im nächsten Abschnitt diskutiert wird. Die zufallsbedingten Mutagenese-Ansätze sind auf zwei Gründen durchführbar. Zunächst hat man in der Hefe die Fähigkeit, stringente Screenings zu konstruieren und einfache Selektionen (Wachstum gegen Tod, Transkription gegen Fehlen einer Transkription), die in Säugetiersystemen nicht leicht verfügbar sind. Zweitens, wenn Hefe verwendet wird, ist es möglich, effizient durch Tausende von Transformanten rasch zu screenen. Eine Kassettenmutagenese wird sofort durch die Beobachtung nahegelegt (siehe unten), dass die GPA41-Hybride an den Pheromon-Reaktionsweg koppeln. Diese relativ kleine Region von α -Untereinheiten repräsentiert ein vernünftiges Ziel für diese Art von Mutagenese. Ein weiterer Bereich, der einer Kassettenmutagenese gegenüber anfällig ist, ist derjenige, der die Oberfläche der Switch-Region von α -Untereinheiten definiert, die Lösungsmittel-exponiert in den Kristallstrukturen von Gai und Translucin vorliegen. Aus den unten beschriebenen Daten kann die Oberfläche Reste enthalten, die in direktem Kontakt mit Hefe $\beta\gamma$ -Untereinheiten stehen, und können deswegen ein vernünftiges Ziel für die Mutagenese darstellen.

F. Rationelles Design chimärer α -Untereinheiten

[0162] Mehrere Klassen an rationell entwickelten GPA1-Säugetier- α -Hybriduntereinheiten wurden auf ihre Fähigkeit getestet, an Hefe $\beta\gamma$ zu koppeln. Die ersten und größten Klassen von Hybriden sind solche, die unterschiedliche Längen der GPA1-Amino-terminalen Domäne stelle der homologen Regionen der Säugetier- α -Untereinheiten codieren. Diese Klasse an Hybridmolekülen schließt $\text{GPH}_{\text{BAMH1}}$, GPH_{41} , GPA_{ID} und GPA_{LW} -Hybride, unten beschrieben, ein. Die Begründung für die Konstruktion dieser Hybrid- α -Proteine basiert auf den Ergebnissen, die oben beschrieben wurden, die die Bedeutung der Amino-terminalen Reste von α bei der Vermittlung der Interaktion mit $\beta\gamma$ beschreiben.

[0163] Vorzugsweise wird die Hefe α -Untereinheit durch eine chimäre α -Untereinheit ersetzt, in der ein Teil, beispielsweise zumindest ungefähr 20, besonders bevorzugt zumindest ungefähr 40 Aminosäuren, die im Wesentlichen mit den entsprechenden Resten des Amino-Terminus der Hefe α homolog sind, ersetzt, wird an eine Sequenz fusioniert, die im Wesentlichen mit dem Hauptkörper eines Säugetier(oder anderen exogenen)- α homolog ist. Während 40 Aminosäuren der vorgeschlagene Startpunkt ist, können kürzere oder längere Anteile getestet werden, um die minimale Länge zu bestimmen, die zum Koppeln an Hefe $\beta\gamma$ erforderlich ist, und die maximale Länge, die mit der Zurückhaltung der Kopplung bzw. Beibehaltung der Kopplung an den exogenen Rezeptor kompatibel ist. Es wird gegenwärtig angenommen, dass nur die finalen 10 oder 20 Aminosäuren am Carboxyterminus der α -Untereinheit zur Interaktion mit dem Rezeptor erforderlich sind.

[0164] $\text{GPH}_{\text{BAMH1}}$ -Hybride. Kang et al., siehe oben, beschrieben Hybrid- α -Untereinheiten, die die Amino-terminalen 310 Reste von GPA1 fusioniert an die Carboxy-terminalen 160, 143 und 142 Reste jeweils von α S, Gai2 und Gao codieren. In allen Fällen überprüften Kang et al., ob die Hybridproteine dazu in der Lage waren, den Wachstumshalt-Phänotyp der *gpa1*-Stämme zu komplementieren. Diese Erkenntnisse wurden bestätigt und zusätzlich wurden Hybride zwischen GPA1- und Gai3 konstruiert und getestet sowie zwischen Gaiq und α 16. Alle Hybride dieses Typs wurden getestet, und es ergab sich, dass sie funktionell den Wachstumsstopp-Phänotyp von *gpa1*-Stämmen komplementieren.

[0165] GPA41-Hybride. Die Begründung für die Konstruktion eines Minimalhybrids, das nur 41 Aminosäuren von GPA1 codiert, beruht auf dem biochemischen Beweis für die Rolle des Amino-Terminus von α -Untereinheiten, oben diskutiert, zusammen mit der folgenden Beobachtung. β - und γ -Untereinheiten agieren bekannterweise mit α -helikalen Domänen an ihren jeweiligen Amino-Termini (Pronin et al. (1992), Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89: 6220–6224); Garritsen et al. (1993). Der Vorschlag, dass die Amino-Termini von α -Untereinheiten ein helikales Knäuel bilden können und dass dieses helikale Knäuel in die Assoziation von α mit $\beta\gamma$ involviert ist (Masters et al. (1986), Protein Engineering 1: 47–54); Lupas et al. (1992), FEBS Lett. 314:

105–108), führt zur Hypothese, dass die drei Untereinheiten des G-Proteinheterotrimeres miteinander reversibel durch Umwinden und Nicht-Umwinden ihrer Amino-terminalen helikalen Regionen interagieren. Ein Mechanismus dieses Typs wurde nahegelegt, ebenso aus einer Analyse von Leucin-Zippermutanten des GCN4-Transkriptionsfaktors (Harbury et al. (1993), Science 262: 1401–1407). Die Begründung zur Konstruktion von Hybriden wie solchen, die von Kang et al., siehe oben, beschrieben wurden, die eine Vielzahl von Hefesequenzen enthalten und nur minimale Säugetiersequenz, stammt aus ihrer Fähigkeit, in Assays der Kopplung zwischen α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten zu funktionieren. Jedoch wurden diese Chimären niemals bezüglich ihrer Fähigkeit untersucht, sowohl an Säugetier-G-Protein gekoppelte Rezeptoren als auch Hefe $\beta\gamma$ -Untereinheiten zu binden und daher einen Hybrid-Signalgebungsweg in Hefe zu rekonstituieren.

[0166] GPA₄₁-Hybride, die konstruiert und getestet wurden, schließen Gas, Gai2, Gai3, Gaq, Gao_a, Gao_b und Ga₁₆ ein. Hybride von Gas, Gai2, Gai3 und Ga16 komplementieren funktionell den Wachstumsstopp-Phänotyp von gpa1-Stämmen, wohingegen GPA₄₁-Hybride von Gao_a und Gao_b dies nicht tun. Zusätzlich zum Testen in Wachstumsstoppassay wurden diese Konstrukte bezüglich des empfindlicheren Transkriptions-Assays zur Aktivierung eines fus1-p-HIS3-Gens untersucht. In diesen beiden Assays koppeln das GPA₄₁-Gas-Hybrid weniger gut als die GPA₄₁i2, -i3 und -16-Hybride, während GPA₄₁-o_a- und -o_b-Hybride in keinem Assay funktionieren.

[0167] Mehrere prädiktive Algorithmen zeigen, dass die Amino-terminale Domäne bis zur hoch konservierten Sequenz-Motiv -LLLLGAGESG- (SEQ ID NO: 46) (das erste L im Motiv ist Rest 43 in GPA1) eine helikale Struktur mit amphipathischen Charakter bildet. Unter der Annahme einer heptahelikalen Wiederholungseinheit können die folgenden Hybride zwischen GPA1 und GaS dazu verwendet werden, die Anzahl helikaler Repeats in diesem Motiv zu bestimmen, die zur Hybridfunktion notwendig sind:

GPA1-7/Gas8-394
 GFA1-14/Gas15-394
 GPA1-21/Gas22-394
 GPA1-28/Gas29-394
 GPA1-35/Gas36-394
 GPA1-42/Gas43-394

[0168] Bei diesen Hybriden ist die Vorhersage, dass die strukturelle Wiederholungseinheit in der Amino-terminalen Domäne bis zum Tetrалеucin-Motiv 7 ist und dass Swapping-Sequenzen in den Einheiten von 7 tatsächlich das Swappen von Einheits-Turns von Turns der helikalen Struktur ermöglichen wird, die diese Domäne umfasst.

[0169] Eine zweite Gruppe von „Doppel-Crossover“-Hybriden dieser Klasse sind solche, die an der ersten putativen Heptad-Wiederholung, beginnend mit Rest G11 in GPA1, ausgerichtet werden. In diesen Hybriden werden helikale Repeats von GPA in das GaS-Grundgerüst gewapped, eine Heptad-Einheit pro Zeitpunkt.

GaS1-10/GPA11-17/Gas18-394
 GaS1-17/GPA18-24/GaS25-394
 GaS1-17/GPA24S-31/GaS32-394
 GaS?-17/GPA32-38/GaS39-394

[0170] Die Lücke, die zwischen den Resten 9 und 10 in der GaS-Sequenz eingebracht wird, soll das Alignment des -LLLLGAGE- (Aminosäuren 1–8 von SEQ ID NO: 46) Sequenzmotivs schützen. Diese Klasse von Hybriden kann durch Kassettenmutagenese jeder Heptadeinheit, gefolgt vom Screening dieser Kollektionen von „Heptad“-Bibliotheken in Standardkopplungsassays komplementiert werden.

[0171] Eine dritte Klasse von Hybriden auf Grundlage der Vorhersage, dass der Amino-Terminus eine helikale Domäne mit einer Heptad-helikalen Wiederholungseinheit bildet, sind solche, die den gesamthydrophoben oder -hydrophilen Charakter der gegenüberliegenden Seiten der vorhergesagten helikalen Struktur (siehe Lupas et al., siehe oben) beeinträchtigen. In diesem Modell hat sich herausgestellt, dass die α - und δ -Positionen der Heptad-Wiederholung abcdefg-konservierte hydrophobe Reste sind, die eine Seite der Helix definieren, wohingegen die ϵ - und γ -Positionen die geladene Seite der Helix definieren. In dieser Klasse von Hybriden wird die Sequenz des GaS-Stammes aufrechterhalten, außer für spezifische Substitutionen an ein oder mehreren der folgenden entscheidenden Reste, um die unterschiedlichen helikalen Flächen von GaS mehr „GPA1-artig“ zu machen.

K8Q
 +1-10
 EIOG
 Q12E

R13S
 N14D
 -E15P
 E15F
 K17L
 E21R
 K28Q
 K32L
 V36R

[0172] Diese Kollektion einzelner Mutationen könnte auf ihre Kopplungseffizienz an Hefe G β y gescreent und danach in Kombinationen konstruiert werden (doppelt und größer, falls notwendig).

[0173] Eine vierte Klasse an Hybridmolekülen, die diese Region von GPA1/G α -Hybriden überspannt, sind solche, die Kreuzungen zwischen GPA1 und Ga-Untereinheiten aufweisen, die durch drei Primer-PCR eingebracht wurden. In diesem Ansatz werden die beiden Außen-Primer durch Sequenzen am Startmethionin von GPA auf der 5'-Seite und an Tetraleucin-Motiv von GaS (beispielsweise) auf der 3'-Seite codiert. Eine Reihe von Kreuzungs-Primern, die unterschiedliche Kreuzungspunkte überspannen, können mit den Außen-Primern gemischt werden, um eine Reihe von Molekülen herzustellen, von denen jede unterschiedliche Mengen an GPA1 und GaS-Sequenzen jeweils aufweist.

[0174] GPA_{ID}- und GPA_{LW}-Hybride. Die Regionen einer hohen Homologie zwischen G β y-Untereinheiten, die durch Sequenz-Alignment identifiziert wurden, sind im gesamten Molekül verteilt. Die G1-Region, die das hoch konservierte -GSGESGDST-Motif enthält, wird unmittelbar von einer Region mit einer sehr niedrigen Sequenzkonservierung gefolgt, der „il“- oder Insert1-Region. Beide, Sequenz und Längen, variieren beträchtlich zwischen den il-Regionen der G α -Untereinheiten. Durch Aligning der Sequenzen von G α -Untereinheiten wurden konservierte Regionen, die die il-Region banden, identifiziert, und zwei zusätzliche Klasse von GPA1-G α -Hybriden wurden konstruiert. Die GPA_{ID}-Hybride codieren die Amino-terminalen 102 Reste von GPA1 (bis zu Sequenz -QARKLGIQ-), fusioniert in-frame an Säugetier-G α -Untereinheiten, wohingegen die GPA_{LW}-Hybride die Amino-terminalen 244 Reste von GPA1 codieren (bis zu Sequenz -LIHEDIKA- in GPA1). Der Grund zur Konstruktion der GPA_{ID}- und GPA_{LW}-Hybride bestand darin, die Hypothese zu testen, dass die il-Region von GPA1 zur Vermittlung der Interaktion von GPA1 mit Hefe G β y-Untereinheiten zur stabilen Expression der Hybridmoleküle oder zur Funktion der Hybridmoleküle erforderlich ist. Die GPA_{ID}-Hybride enthalten die Amino-terminale Domäne von GPA1, fusioniert an die il-Domäne von Säugetieruntereinheiten und enthalten deswegen die GPA_{IL}-Region nicht, wohingegen die GPA_{LW}-Hybride die Amino-terminalen 244 Reste von GPA enthalten, einschließlich der gesamten il-Region (wie durch Sequenz-Alignments identifiziert). Hybride sowohl von GPA_{ID}- als auch GPA_{LW}-Klassen wurden für GaS, C- α 2, Gai3, Gao_a und Ga16 konstruiert; keines dieser Hybride komplementierte den gal-Wachstumsstopp-Phänotyp.

[0175] Anschließend an die Konstruktion und das Testen der GPA_{ID}- und GPA_{LW}-Klassen von Hybriden wurden die Kristallstrukturen von G-Translucin sowohl in der GDP- als auch GTP γ S-ligandierten Form und die Kristallstruktur mehrerer Gail-Varianten in der GTP γ S-ligandierten und GDP-ALF₄-Form berichtet (Noel et al., siehe oben; Lambright et al., siehe oben; und Coleman et al. (1994), Science 265: 1405–1412). Die Kristallstrukturen zeigen, dass die il-Region, definiert durch Sequenz-Alignment, eine konservierte Struktur aufweist, die sechs α -Helices in einer starren Anordnung umfasst, und dass die Kreuzungen, die für die Konstruktion der GPA_{ID}- und GPA_{LW}-Hybride ausgewählt sind, mit der Konservierung der strukturellen Merkmale der il-Region nicht kompatibel waren, die in den Kristallen beobachtet wurde. Die für die GPA_{ID}-Hybride gewählte Kreuzung fällt in das Zentrum der langen α A-Helix; eine Chimärisierung dieser Helix destabilisiert aller Wahrscheinlichkeit nach diese und die Proteinstruktur insgesamt. Dasselbe stimmt auch bezüglich der für die GPA_{LW}-Hybride gewählte Kreuzung, bei der der Cross-over-Punkt zwischen GPA1 und der Säugetier-G α -Untereinheit an das Ende der kurzen α C-Helix fällt und deswegen diese stören und das Protein destabilisieren kann.

[0176] Der Fehler bzw. das Versagen der GPA_{ID}- und GPA_{LW}-Hybride ist vorhergesagtermaßen auf eine Störung kritischer struktureller Elemente in der il-Region wie oben diskutiert zurückzuführen. Auf Grundlage neuer Alignments und der in Noel et al. (siehe oben), Lambright et al. (siehe oben) und Coleman et al. (siehe oben) präsentierten Daten kann dieses Problem abgewendet werden, wobei die ras-artige Kerndomäne und die il-helikale Domäne außerhalb bekannter struktureller Elemente die α -Helices eingebracht werden.

[0177] Dieses Hybrid enthält das gesamte il-Insert von GPA1 in die GaS-Sequenz eingebracht.

Hybrid B GPA1–41/GaS4443–67/GP466–299/GaS203–394

[0178] Dieses Hybrid enthält die Amino-terminalen 41 Reste von GPA1 anstelle der 42 Aminoterminalen Reste von GaS, die in Hybrid A zu finden sind.

[0179] Gas-Hybride. Es bestehen Hinweise darauf, dass die „Switch-Region“, die von den Resten 171–237 von α -Transducin (unter Verwendung der Nummerierung von Noel et al. (siehe oben)) ebenfalls eine Rolle bei der $G\beta\gamma$ -Kopplung spielt. Zunächst verhindert die G226A in GaS die GTP-induzierte Konformationsänderung, die mit dem Austausch von GDP für GTP nach Rezeptoraktivierung durch den Liganden eintritt. Dieser Rest kartiert auf die hoch konservierte Sequenz -DVGGQ-, die in allen α -Untereinheiten vorliegt und die in die GTP-Hydrolyse involviert ist. Sowohl in den Gat- als auch Gail-Kristallstrukturen liegt dieses Sequenzmotiv in der Loop bzw. Schleife, die das β -Dreifaltblatt und die α 2-Helix im Guaninnukleotid-Bindungskern verbindet. Zusätzlich zur Blockierung der Konformationsänderung, die nach GTP-Bindung auftritt, verhindert diese Mutation ebenfalls die Dissoziation von GTP-ligandierten α von $G\beta\gamma$. Zweitens zeigen die Vernetzungsdaten, dass ein hoch konserviertes Cystein-Rest in der α 2-Helix (C215 in Gao, C210 in Gat) an den Carboxy-terminalen Bereich der $G\beta$ -Untereinheiten vernetzt werden kann. Zuletzt identifiziert ein genetischer Beweis (Whiteway et al. (1993), Mol. Cell. Biol. 14: 3233–3239) einen bedeutenden einzelnen Rest im GPA1 (E307) im β 2-Faltblatt der Kernstruktur, die in direkter Berührung mit $\beta\gamma$ sein kann. Eine Mutation im GPA1-Protein an dieser Position unterdrückt den konstitutiven Signalsgebungs-Phänotyp einer Vielzahl von STE4 ($G\beta$) dominant negativen Mutationen, von denen ebenfalls bekannt ist, dass sie in der α -, $G\beta\gamma$ -Assoziation (wie durch zwei Hybridassay in Hefe ebenso wie durch mehrere konventionelle Gentests bestimmt) defektiv bzw. mangelhaft sind.

[0180] Die Hypothese, dass Switch-Region-Determinanten in die Assoziation von α mit $G\beta\gamma$ involviert sind, wurde durch Konstruieren einer Reihe von Hybrid-Ga-Proteinen, die Anteile von GPA1 und GaS in verschiedenen Kombinationen codieren, getestet.

[0181] Es wurden zwei Schlüsse gezogen. Zunächst unterdrückt im Kontext des Amino-Terminus von GaS DGPA1-Switch-Region eine Kopplung an Hefe $G\beta\gamma$ (SGS), wohingegen im Kontext des GPA1-Amino-Terminus die GPA1-Switch-Region eine Kopplung mit $G\beta\gamma$ ($GP\beta\gamma$ -SGS) stabilisiert. Dies legt nahe, dass diese beiden Regionen von GPA1 zusammenarbeiten, um Interaktionen zwischen α -Untereinheiten und $G\beta\gamma$ -Untereinheiten zu ermöglichen. Dieser Schluss wird ein wenig durch die Beobachtung gelindert, dass das GPA_{41} -GaS-Hybrid, das die GPA1-Switch-Region nicht enthält, dazu in der Lage ist, den Wachstumsstopp-Phänotyp von $gpa1$ -Stämmen zu komplementieren. Ein quantitativer Unterschied zwischen dem Verhalten des GPA_{41} -GaS-Allels und des $GPA1$ -SGS-Allels wurde nicht bemerkt, wenn jedoch diese Interaktion ein wenig degeneriert ist, kann es schwierig sein, diese genau zu quantifizieren. Der zweite Schluss, der aus diesen Ergebnissen gezogen werden kann, besteht darin, dass andere Determinanten in die Stabilisierung der Interaktion von α mit $G\beta\gamma$ involviert sind, über diese beiden Regionen hinaus, weil keines der GPA1-GaS-Hybridproteine genauso effizient an Hefe- $G\beta\gamma$ wie natives GPA1 koppelt.

[0182] Die Rolle der Oberflächen-exponierten Reste dieser Region können für das wirksame Koppeln an $G\beta\gamma$ entscheidend sein und können in Hybridmoleküle wie folgt nachstehend eingebaut werden.

GaS-GPA-Switch GaS1–202/GPA298–350/GaS253–394

[0183] Dieses Hybrid codiert die gesamte Switch-Region von GPA1 im Kontext von GaS.

GaS-GPA- α 2 GQS1–226/GPA322–332/GQS238–394

[0184] Dieses Hybrid codiert die α^2 -Helix von GPA1 im Kontext von GaS.

GPA41-GaS-GPA- α 2GPA1-41/GQS43–226/GPA322–332/GQS238–394

[0185] Dieses Hybrid codiert die 41 Reste Amino-terminale Domäne von GPA1 und die α 2-Helix von GPA1 im Kontext von GaS.

[0186] Zuletzt wird die letzte Klasse der Hybride diskutiert werden, die hier ausgewählt wurde, die die Ober-

flächen-exponierten Reste der β 2- und β 3-Faltblätter von α S so verändern, dass diese der GPA1 QS-Helix ähneln. Diese veränderten α 2-helikalen Domänen weisen die folgende Struktur auf (die Position der geänderten Reste entsprechen G α S).

L203K
K211E
D215G
K216S
D229S

[0187] Diese einzelnen Mutationen können in ein G α S-Grundgerüst eingebaut werden, einzeln und in paarweise Kombinationen. Zusätzlich können diese im Kontext sowohl der Vollen-Länge-G α S als auch des GPA₄₁-G α S-Hybrides eingebracht werden, das früher beschrieben wurde. Es wird für alle vorhergesagt, dass die Kopplung von G α -Untereinheiten an Hefe-G β -Untereinheiten mittels verbesserter elektrostatischer und hydrophober Kontakte zwischen dieser Region und den Regionen von G β , die durch Whiteway und Mitarbeiter definiert wurden, verbessert wird (Whiteway et al. (siehe oben), die den Ort (Orte) definieren, die mit GPA1 interagieren).

[0188] In Zusammenfassung hat die Identifizierung von Hybrid-G α -Untereinheiten, die an den Hefe-Pheromonweg koppeln, zu den nachfolgenden allgemeinen Beobachtungen geführt. Zuerst assoziieren alle GPA_{BAMH1}-Hybride mit Hefe-G β und deswegen enthalten diese Hybride zumindest die Determinanten in GPA1, die zum Koppeln an den Pheromon-Reaktionsweg notwendig sind. Zweitens enthalten die Amino-terminalen 41 Reste von GPA ausreichende Determinanten, um die Kopplung von G α -Hybriden an Hefe-G β bei einigen, jedoch nicht allen Fällen zu erleichtern und dass einige G α -Untereinheiten Regionen außerhalb der ersten 41 Reste enthalten, die ausreichend ähnlich zu solchen in GPA1 sind, um die Interaktion vom GPA1 selbst in Abwesenheit der Amino-terminalen 41 Reste von GPA1 zu erleichtern. Als drittes existieren weitere Determinanten in den ersten 310 Resten von GPA1, die in die Kopplung von G α -Untereinheiten an Hefe-G β -Untereinheiten involviert sind.

[0189] Die verschiedenen Klassen von Hybriden, die oben erwähnt sind, sind nicht wechselseitig ausschließend. Beispielsweise könnte ein GPA1-enthaltendes GPA₄₁- ebenfalls die L203K-Mutation aufweisen.

[0190] Während zu Vereinfachungszwecken Hybride von Hefe-GPA1 und Säugetier-G α S beschrieben wurden, wird erkennbar sein, dass Hybride aus anderen Hefe-G α -Untereinheiten und/oder anderen Säugetier-G α -Untereinheiten hergestellt werden können, insbesondere Säugetier-G α i-Untereinheiten. Überdies sind Hybride aus drei oder mehr Stammproteinen ebenfalls möglich, wohingegen die beschriebenen Hybride aus zwei parentalen bzw. Stammproteinen konstruiert sind.

[0191] Wie in den Beispielen dargestellt, sind chimäre G α -Untereinheiten insbesondere beim Koppeln von Rezeptoren an G α i-Spezies von Nutzen.

G. Expression von G α

[0192] Kang et al., siehe oben, berichteten, dass mehrere Klassen nativer Säugetier-G-Untereinheiten dazu in der Lage waren, funktionell mit Hefe- α -Untereinheiten zu interagieren, wenn die Expression von G α aus einem konstitutiv aktiven, starken Promotor (PGK) oder aus einem starken induzierbaren Promotor (CUP) gesteuert wurde. Diese Autoren berichteten, dass Ratten-G α S, -G α i2 oder -G α o eine hohe Konzentration exprimierten, gekoppelt an Hefe- β . Eine hohe Expression von Säugetier-G α (d. h. nicht-stöchiometrisch bezüglich Hefe- β) ist für die Anwendungen wie solche, die in dieser Anmeldung beschrieben sind, nicht wünschenswert. Die Rekonstruktion von G-Protein-gekoppeltem Rezeptorsignal-Transduktionen in Hefe erfordert die Signalkomponente des heterotrimeren Komplexes (G β) stöchiometrisch mit G α -Untereinheiten vorhanden zu sein. Ein Überschuss an G α -Untereinheiten (wie er zum Koppeln von Säugetier-G α i2 und -G α o an Hefe- β in Kang et al. erforderlich war) würde das Signal in den Systemendämpfern, in denen G β -Subeinheiten das Signal transduzieren. Ein Überschuss an G α -Untereinheiten erhöht die Hintergrundstörung der Signalgebung im System auf unakzeptable hohe Werte. Vorzugsweise sind die Konzentrationen von G α - und G β -Untereinheiten ausgeglichen. Beispielsweise können heterologe G α -Untereinheiten aus Vektoren mit niedriger Kopienanzahl (Low-Copy-Vectors) (CEN ARS) exprimiert werden, die endogenen GPA1-Promotor und die GPA1 3'-untranslatierte Region aufweisen. Das minimale Kriterium, angewendet auf eine heterologe G α -Untereinheit bezüglich ihrer Fähigkeit, funktionell an den Hefe-Pheromonweg zu koppeln, besteht darin, dass sie einen gpa1-Genotyp komplementiert, wenn er aus dem GPA1-Promotor auf Low-Copy-Plasmiden oder aus einem integrierten, Ein-Kopien-Gen exprimiert wird, komplementiert. In der in dieser Anmeldung beschriebenen Arbeit

wurden alle heterologen G α -Untereinheiten in zwei biologischen Systemen untersucht. In dem ersten Assay wurden heterologe G α -Untereinheiten auf ihr Vermögen getestet, funktionell den Wachstumsanhalt-Phänotyp von gpa1-Stämmen zu komplementieren. Im zweiten Assay wird die Transkription eines Fus1-HIS3-Reportergens dazu verwendet, das Ausmaß zu messen, in dem der Pheromon-Reaktionsweg aktiviert wird und daher das Ausmaß, in dem die heterologe G α -Untereinheit den endogenen Hefe-G $\beta\gamma$ -Komplex sequestriert. Säuger-Gas, Gai2, Gai3, Gaq, G α 11, G α 16, Gao_a, Gao_b und Gaz von Ratten-, Maus- oder Menschenursprung wurden aus einem Low-Copy-CEN-ARS-Vektor exprimiert, der den GPA1-Promotor enthielt. Eine funktionelle Komplementierung von gpa1-Stämmen wurde in keinem Assaysystem mit jedem dieser Volle-Länge-G α -Konstrukte beobachtet, mit der Ausnahme von Ratten und humanem G α S.

H. Chimäre Hefe- $\beta\gamma$ -Untereinheiten

[0193] Eine Alternative zur Modifikation einer Säuger-G α -Untereinheit zur verbesserten Signaltransduktion ist die Modifikation der entsprechenden Stellen in den Hefe-G β - oder -G γ -Untereinheiten. Die bereits bezüglich G α -Untereinheiten diskutierten Prinzipien treffen mutatis mutandis auch auf Hefe-G β - oder -G γ zu.

[0194] Beispielsweise können in bestimmten Ausführungsformen die Hefe-Ste4p G β -Untereinheit mit einer Kassettenmutagenese als Ziel definiert werden. Insbesondere würde die Region von Ste4p, die mehrere der dominant negativen, Signal-defektiven Mutationen codiert, ein ausgezeichnetes Ziel für eine Kassettenmutagenese sein, wenn nach einer Kopplung von Hefe-G $\beta\gamma$ an spezifische Säuger-G α -Untereinheiten gesehen wird.

V. Testverbindungen

Exogen zugesetzte Verbindungen

[0195] Ein neuer Trend in der medizinischen Chemie schließt die Produktion von Gemischen von Verbindungen ein, die hierin als Bibliotheken bezeichnet werden. Während die Verwendung von Bibliotheken von Peptiden in der Technik wohl etabliert ist, wurden neue Techniken entwickelt, die die Produktion von Gemischen anderer Verbindungen, beispielsweise von Benzodiazepinen ermöglichten (Bunin et al. (1992), J. Am. Chem. Soc. 114: 10987; DeWitt et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6909), wie auch von Peptoiden (Zuckermann (1994), J. Med. Chem. 37: 2678), Oligocarbamaten (Cho et al. (1993), Science 261: 1303) und Hydantoinen (DeWitt et al., siehe oben). Rebek et al. haben einen Ansatz zur Synthese von molekularen Bibliotheken kleiner organischer Moleküle mit einer Diversität von 104–105 beschrieben (Carell et al. (1994), Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1994, 33: 2061).

[0196] Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung können unter Verwendung irgendwelcher der zahlreichen Ansätze in kombinatorischen Bibliothekverfahren, die in der Technik bekannt sind, gewonnen werden, einschließlich: biologischer Bibliotheken; räumlich adressierbarer paralleler Festphasen- oder Lösungsphasen-Bibliotheken, synthetischer Bibliotheken-Verfahren, die eine Dekonvolution erforderlich machen, das „Ein-Kügelchen-eine-Verbindung“-Bibliothekverfahren und synthetische Bibliotheken-Verfahren unter Verwendung einer Affinitätschromatographieselektion. Der biologische Bibliothek-Ansatz ist auf Peptid-Bibliotheken beschränkt, wohingegen die andere vier Ansätze auf Peptid-, Nicht-Peptid-, Oligomer- oder kleine Molekül-Bibliotheken von Verbindungen anwendbar sind (Lam, I. S., Anticancer Drug Des. 1997, 12: 145).

[0197] In einer Ausführungsform ist die Testverbindung ein Peptid in einem Peptidomimetikum. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform sind die Verbindungen kleine organische nicht-peptidische Verbindungen.

[0198] Weitere beispielhafte Verfahren zur Synthese molekularer Bibliotheken sind in der Technik beispielsweise in: Erb et al. (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11422; Horwell et al. (1996), Immunopharmacology 33: 68; und in Gallop et al. (1994), J. Med. Chem. 37: 1233. Zusätzlich können Bibliotheken wie solche, die in gemeinsamem Besitz befindlichen Anmeldungen beschrieben sind, wie USSN 08(864 241, USSN 08/864 240 und USSN 08/835 623, verwendet werden, um Verbindungen zum Testen der vorliegenden Erfindung bereitzustellen. Der Inhalt jeder dieser Anmeldungen ist ausdrücklich hierin durch diese Bezugnahme mitaufgenommen.

[0199] Bibliotheken aus Verbindungen können in Lösung (beispielsweise Houghten (1992), Biotechniques 13: 412–421) oder auf Kügelchen bzw. Perlen (Lam (1991), Nature 354: 82–84), auf Chips (Fodor (1993), Nature 364: 555–556), Bakterien (Ladner USP 5 223 409), Sporen (Ladner USP '409), Plasmide (Cull et al. (1992),

Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 1865–1869) oder auf Phagen (Scott und Smith (1990), Science 249: 386–390); (Devlin (1990), Science 249: 404–406); (Cwirla et al. (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 6378–6382); (Felici (1991), J. Mol. Biol. 222: 301–310); (Lader, siehe oben) präsentiert werden.

[0200] In bestimmten Ausführungsformen werden die Testverbindungen exogen in Hefezellen zugesetzt, die einen rekombinanten Rezeptor exprimieren, und Verbindungen, die die Signaltransduktion über den Rezeptor modulieren, werden ausgewählt. In anderen Ausführungsformen exprimieren die Hefezellen die zu testenden Verbindungen. Beispielsweise kann eine Kultur der vorliegenden Hefezellen weiter modifiziert werden, dass sie kollektiv eine Peptid-Bibliothek exprimieren, wie es ausführlicher in der PCT-Offenlegung WO94/23025 beschrieben ist, deren Inhalt durch diese Bezugnahme hierin ausdrücklich mitaufgenommen ist.

[0201] Weitere Arten von Peptid-Bibliotheken können ebenfalls exprimiert werden, siehe beispielsweise US-Patente 5 270 181 und 5 292 646 und PCT-Veröffentlichung WO94/02502). In einer noch weiteren Ausführungsform sind die kombinatorischen Polypeptide aus einer cDNA-Bibliothek erzeugt worden.

[0202] Beispielhafte Verbindungen, die bezüglich einer Aktivität gescreent werden können, schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf, Peptide, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate, kleine organische Moleküle und natürliche Produktextrakt-Bibliotheken. In solchen Ausführungsformen können beide Verbindungen, die den Rezeptor oder Kanal-vermittelten Signalfunktion agonisieren oder antagonisieren, ausgewählt und identifiziert werden.

Peptid-Bibliotheken

[0203] In bestimmten Ausführungsformen können Hefezellen gentechnisch verändert werden, um die zu testenden Verbindungen zu produzieren. Dieses Assaysystem weist den Vorteil der Erhöhung der effektiven Konzentration der zu testenden Verbindung auf. In einer Ausführungsform kann ein Verfahren wie das in WO94/23025 beschriebene Verfahren verwendet werden.

[0204] Andere Verfahren können ebenfalls verwendet werden. Beispielsweise sind Peptid-Bibliotheken Systeme, die simultan eine hoch diverse und zahlreiche Kollektion von Peptiden in einer Form zeigen, die eine Interaktion mit einem Ziel erlaubt. Diese Peptide können in Lösung (Houghten (1992), Biotechniques 13: 412–421) oder auf Perlen (Lam (1991), Nature 354: 82–84), Chips (Fodor (1993), Nature 364: 555–556), Bakterien (Ladner USP 5 223 409), Sporen (Ladner USP '409), Plasmiden (Cull et al. (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865–1869) oder auf Phagen (Scott und Smith (1990), Science 249: 386–390); (Devlin (1990), Science 249: 404–406); (Cwirla et al. (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 6378–6382); (Felici (1991), J. Mol. Biol. 22: 301–310); (Ladner, siehe oben) präsentiert werden. Viele dieser Systeme sind bezüglich der maximalen Länge der Peptide oder der Zusammensetzung des Peptids limitiert (beispielsweise Cys ausgenommen). Sterische Faktoren, beispielsweise die Nähe eines Trägers, kann die Bindung stören. Üblicherweise erfolgt das Screening nach einer Bindung in vitro an ein artifiziell präsentiertes Ziel, nicht bezüglich der Aktivierung oder Hemmung eines zellulären Signaltransduktionsweges in einer lebenden Zellen. Während ein Zelloberflächenrezeptor als Target verwendet werden kann, wird das Screening nicht zeigen, ob die Bindung des Peptids eine allosterische Veränderung der Konformation des Rezeptors verursacht.

[0205] Das Laden et al. Patent, USSN 5 096 815, beschreibt ein Verfahren zum Identifizieren neuer Proteine oder Polypeptide mit einer erwünschten DNA-Bindungsaktivität. Halb-zufallsbedingt („variierte“) DNA, die eine große Anzahl unterschiedlicher potentieller Bindungsproteine codiert, wird in exprimierbarer Form in geeignete Hefezellen eingebracht. Die Ziel-DNA-Sequenz wird in ein gentechnisch verändertes Operon eingebaut, derart, dass die Bindung des Proteins oder Polypeptids die Expression eines Genproduktes, das für das Gen unter selektiven Bedingungen zerstörerisch ist, verhindern wird. Zellen, die die selektiven Bedingungen überleben, sind somit Zellen, die ein Protein exprimieren, das die Target-DNA bindet. Während angenommen wird, dass Hefezellen für das Testen verwendet werden können, sind bakterielle Zellen bevorzugt. Die Interaktionen zwischen dem Protein und der Target-DNA tritt nur in der Zelle (und dann nur im Kern), nicht im Periplasma oder Zytoplasma ein, und das Target ist eine Nukleinsäure und nicht ein Rezeptorprotein. Die Substitution zufallsbedingter Peptid-Sequenzen für funktionelle Domäne in zellulären Proteinen ermöglicht eine gewisse Determination der spezifischen Sequenzerfordernisse für das Erreichen der Funktion. Obwohl die Einzelheiten der Erkennungsphänomene, die bei der Lokalisierung der Proteine innerhalb der Zelle eintreten, größtenteils unbekannt bleiben, wurden die Beschränkungen der Sequenzvariation mitochondrialer Target-Sequenzen und Proteinsekretions-Signalsequenzen unter Verwendung von zufallsbedingten Peptiden ans Licht gebracht (Lemire et al. (1989), J. Biol. Chem. 264: 20206 und Kaiser et al. (1987), Science 235: 312).

[0206] In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung liegen die getesteten Verbindungen in Form von Peptiden aus einer Peptid-Bibliothek vor. Die Peptid-Bibliothek der vorliegenden Erfindung nimmt die Form einer Zellkultur ein, in der im Wesentlichen jede Zelle ein und üblicherweise nur ein Peptid der Bibliothek exprimiert. Während die Diversität der Bibliothek maximiert wird, wenn jede Zelle ein Peptid einer unterschiedlichen Sequenz produziert, ist es üblicherweise klug, die Bibliothek so zu konstruieren, dass eine gewisse Redundanz vorliegt. Abhängig von der Größe können die kombinatorischen Peptide der Bibliothek wie sie sind exprimiert werden oder können in größere Fusionsproteine eingebaut werden. Das Fusionsprotein kann beispielsweise eine Stabilität gegen einen Abbau oder eine Denaturierung ebenso wie ein Sekretionssignal bereitstellen, wenn es sezerniert wird. In einer beispielhaften Ausführungsform einer Bibliothek für intrazelluläre Expression wird beispielsweise zur Verwendung in Verbindung mit intrazellulären Targetrezeptoren, die Polypeptid-Bibliothek als Thioredoxin-Fusionsproteine exprimiert (siehe beispielsweise US-Patente 5 270 181, 5 292 646 und die PCT-Offenlegung WO94/02502). Das kombinatorische Peptid kann am Terminus des Thioredoxin-Proteins befestigt werden oder für kurze Peptid-Bibliotheken, in die so genannte aktive Schlaufe eingefügt werden.

[0207] In einer Ausführungsform wird die Peptid-Bibliothek so gewonnen, dass sie eine kombinatorische Bibliothek von Polypeptiden exprimiert, die nicht auf irgendwelchen bekannten Sequenzen basieren, noch von cDNA abgeleitet sind. Das heißt, die Sequenzen der Bibliothek sind größtenteils zufallsbedingt. In bevorzugten Ausführungsformen sind die kombinatorischen Polypeptide im Bereich von 3–110 Aminosäuren Länge, besonders bevorzugt 5–50 und am meisten bevorzugt zumindest 10, 13, 15, 20 oder 25 Aminosäurereste lang. Vorzugsweise sind die Polypeptide der Bibliothek gleichförmig lang. Es wird verständlich sein, dass die Länge des kombinatorischen Peptids irgendwelche unerheblichen Sequenzen, die vorliegen können, um die Expression zu erleichtern, beispielsweise Signalsequenzen oder Invariante Anteile eines Fusionsproteins, nicht widerspiegeln.

[0208] In einer anderen Ausführungsform wird die Peptid-Bibliothek so gewonnen, dass sie eine kombinatorische Bibliothek von Polypeptiden exprimiert, die zumindest teilweise auf einer bekannten Polypeptidsequenz oder eines Teils hiervon basieren (nicht eine cDNA-Bibliothek). Das heißt, die Sequenzen der Bibliothek sind halb-zufallsbedingt, und sind durch kombinatorische Mutagenese einer bekannten Sequenz abgeleitet. Siehe beispielsweise Ladner et al., PCT-Veröffentlichung WO90/02909; Garrard et al., PCT-Veröffentlichung WO92/09690; Marks et al. (1992), J. Biol. Chem. 267: 16007–16010; Griffiths et al. (1993), EMBO J. 12: 725–734; Clackson et al. (1991), Nature 352: 624–628; und Barbas et al. (1992), PNAS 89: 4457–4461. Demgemäß können Polypeptide, die für einen Target-Rezeptor bekannte Liganden sind, durch Standardtechniken mutagenisiert werden, um eine variierte Bibliothek von Polypeptidsequenzen zu gewinnen, die weiter nach Agonisten und/oder Antagonisten gescreent werden. Beispielsweise kann der Surrogat-Ligand, der für FPRL-1 identifiziert wurde, beispielsweise Ser-Leu-Leu-Trp-Leu-Thr-Cys-Arg-Pro-Trp-Glu-Ala-Met-Peptid mutagenisiert werden, um eine Bibliothek von Peptiden zu erzeugen, die eine gewisse Beziehung zum originalen Tridecapeptid aufweisen. Diese Bibliothek kann in einer Reagenz-Zelle der vorliegenden Erfindung exprimiert werden, und andere Rezeptor-Aktivatoren können aus der Bibliothek isoliert werden. Dies kann die Identifizierung noch potenterer FPRL-1-Surrogat-Liganden ermöglichen.

[0209] Alternativ kann die Bibliothek unter Bedingungen exprimiert werden, bei denen die Zellen mit dem ursprünglichen Tridecapeptid in Berührung gebracht werden, beispielsweise wird der FPRL-1-Rezeptor durch den Surrogat-Liganden induziert. Peptide von einer exprimierten Bibliothek können auf Grundlage ihrer Fähigkeit, die Induktion zu potenzieren oder die Induktion zu inhibieren, isoliert werden, verursacht durch den Surrogat-Liganden. Das Letztere wird selbstverständlich potentielle Antagonisten von Chemoattractans-Rezeptoren identifizieren. In noch weiteren Ausführungsformen kann der Surrogat-Ligand dazu verwendet werden, exogene Verbindungsbibliotheken (Peptid und Nicht-Peptid) zu screenen, die durch Modulieren der Aktivität des identifizierten Surrogats, vermutlich ebenfalls in ähnlicher Weise die Wirkung des nativen Liganden auf den Zielrezeptor bewirken werden. In solchen Ausführungsformen kann der Surrogat-Ligand auf die Zellen aufgebracht werden, obwohl es bevorzugt durch die Reagenz-Zelle erzeugt wird, wodurch eine autokrine Zelle bereitgestellt wird.

[0210] In einer noch weiteren Ausführungsform werden die kombinatorischen Polypeptide aus einer cDNA-Bibliothek erzeugt.

[0211] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erzeugen die Hefezellen kollektiv eine „Peptid-Bibliothek“, die vorzugsweise zumindest 10^3 bis 10^7 unterschiedliche Peptide einschließt, sodass diverse Peptide simultan bezüglich ihrer Fähigkeit untersucht werden können, mit dem exogenen Rezeptor zu interagieren. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden zumindest einige Peptide der Pep-

tid-Bibliothek in das Periplasma sezerniert, wobei sie mit den „extrazellulären“ Bindungsstellen eines exogenen Rezeptors interagieren können. Sie ahmen somit die klinische Interaktion von Arzneistoff mit zellulären Rezeptoren enger nach. Diese Ausführungsform kann optional weiterhin verbessert werden (in Assays, die eine Pheromon-Sekretion nicht erfordern), indem die Pheromon-Sekretion vermieden wird und dadurch eine Konkurrenz zwischen dem Peptid und dem Pheromon um die Signalpeptidase und andere Bestandteile des Sekretionssystems zu vermeiden.

[0212] In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden die Peptide der Bibliothek durch ein Gemisch aus DNA-Molekülen unterschiedlicher Sequenz codiert. Jedes Peptid-codierende DNA-Molekül ist mit einem Vektor-DNA-Molekül ligiert, und das sich ergebende rekombinant DNA-Molekül wird in eine Hefezelle eingebracht. Weil es eine Frage der Chance ist, welches Peptid-codierende DNA-Molekül in eine spezielle Zelle eingebracht wird, ist es nicht vorhersehbar, welches Peptid diese Zelle erzeugen wird. Jedoch auf Basis der Kenntnis der Weise, in der das Gemisch hergestellt wurde, kann man bestimmte statistische Vorhersagen über das Gemisch von Peptiden in der Peptid-Bibliothek machen.

[0213] Die Peptide der Bibliothek können aus konstanten und variablen Resten zusammengesetzt sein. Wenn der n-te Rest derselbe für alle Peptide der Bibliothek ist, ist diese eine so genannte konstante Bibliothek. Wenn der n-te Rest variiert, abhängig vom fraglichen Peptid, ist sie eine variable Bibliothek. Die Peptide der Bibliothek werden zumindest einen und üblicherweise mehr als einen variablen Rest aufweisen. Ein variabler Rest kann zwischen irgendeinem von 2 oder 20 der genetisch codierten Aminosäuren variieren; die variablen Reste des Peptids können in derselben oder in einer anderen Weise variieren. Darüber hinaus kann die Frequenz des Auftretens der erlaubten Aminosäuren an einer speziellen Resteposition gleich oder verschieden sein. Das Peptid kann ebenfalls ein oder mehrere konstante Reste aufweisen.

[0214] Es existieren zwei Hauptwege, in denen die erforderlichen DNA-Gemische erzeugt werden. Bei einem Verfahren werden die DNAs Base für Base synthetisiert. Wenn eine Variation erwünscht ist, wird an einer Basenposition, die durch den genetischen Code vorgegeben ist, ein geeignetes Gemisch an Nukleotiden mit der naszenten DNA umgesetzt, eher als das reine Nukleotid-Reagenz einer konventionellen Polynukleotid-Synthese.

[0215] Das zweite Verfahren stellt eine exaktere Kontrolle über die Aminosäure-Variation bereit. Zunächst werden Trinukleotid-Reagenzien hergestellt, wobei jedes Trinukleotid ein Codon eines (und nur eines) der Aminosäuren ist, das in der Peptid-Bibliothek dargeboten wird. Wenn ein spezieller variabler Rest synthetisiert werden soll, wird ein Gemisch der geeigneten Trinukleotide hergestellt und mit der naszenten bzw. naszierenden DNA umgesetzt. Wenn einmal die notwendige „degenerierte“ DNA vollständig ist, muss diese mit den DNA-Sequenzen verbunden werden, was notwendig ist, um die Expression des Peptids sicherzustellen, wie unten ausführlicher diskutiert wird, und das vollständige DNA-Konstrukt muss in die Hefezelle eingebaut werden.

[0216] In Ausführungsformen, in denen die Testverbindungen Peptide sind, kann es wünschenswert sein, solche Peptide im Kontext einer Leader-Sequenz zu exprimieren. Hefezellen werden durch eine Lipid-Bilayer gebunden, die als die Plasmamembran bezeichnet werden. Zwischen dieser Plasmamembran und der Zellwand befindet sich der periplasmatische Raum. Peptide, die durch Hefezellen durch die Plasmamembran hindurch sezerniert werden, durch eine Vielzahl von Mechanismen, treten dadurch in den periplasmatischen Raum ein. Die sezernierten Peptide sind dann frei, mit anderen Molekülen zu interagieren, die im Periplasma vorliegen oder auf der Außenoberfläche der Plasmamembran dargeboten werden. Die Peptide machen dann entweder eine Wiederaufnahme in die Zelle durch, diffundieren durch die Zellwand in das Medium oder werden innerhalb des periplasmatischen Raums abgebaut.

[0217] Die Test-Polypeptid-Bibliothek kann in das Periplasma durch irgendeine Anzahl beispielhafter Mechanismen sezerniert werden, abhängig von der Natur des Expressionssystems, an das sie gebunden sind. In einer Ausführungsform kann das Peptid strukturell an eine Hefesignalsequenz gebunden sein, wie beispielsweise diejenige, die im α -Faktor-Präcursor vorliegt, die eine Sekretion durch das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat leitet. Weil dies derselbe Weg ist, dem das Rezeptorprotein auf seiner Reise zur Plasmamembran folgt, besteht die Gelegenheit in den Zellen, die sowohl den Rezeptor als auch die Peptid-Bibliothek exprimieren, dass ein spezifisches Peptid mit dem Rezeptor während des Transits durch den sekretorischen Weg interagiert. Es wurde postuliert, dass dies in Säugetierzellen eintritt, die eine autokrine Aktivierung zeigen. Eine solche Interaktion könnte eine Aktivierung der Reaktionswege während des Transits ermöglichen, was noch die Identifizierung solcher Zellen erlauben würde, die einen Peptid-Agonisten exprimieren. Für Situationen, in denen die Peptid-Agonisten für extern aufgebrauchte Rezeptor-Agonisten gesucht werden, wäre dieses System nach wie vor effektiv, weil sowohl der Peptid-Antagonist als auch der Rezeptor an der Außenseite der

Zelle zusammen geliefert werden würden. Somit wären solche Zellen, die einen Antagonisten produzieren, selektierbar, weil der Peptid-Antagonist in geeigneter Weise und zeitgerecht angeordnet wäre, um zu verhindern, dass der Rezeptor durch extern aufgebracht Agonisten stimuliert wird.

[0218] Ein alternativer Mechanismus zur Abgabe von Peptiden an den periplasmatischen Raum besteht darin, die ATP-abhängigen Transporter der STE6/MDR1-Klasse zu verwenden. Der Transportweg und die Signale, die ein Protein oder Peptid zu diesem Weg dirigieren, sind nicht so gut charakterisiert, wie es beim endoplasmatischen Retikulum basierten sekretorischen Weg der Fall ist. Nichts desto trotz können diese Transporter offensichtlich bestimmte Peptide effizient exportieren, direkt durch die Plasmamembran hindurch, ohne dass die Peptide den ER/Golgi-Weg durchqueren müssen. Es wird angenommen, dass zumindest eine Untergruppe von Peptiden durch diesen Weg durch Exprimieren der Bibliothek im Kontext der α -Faktor-Prosequenz und des terminalen Tetrapeptids sezerniert werden kann. Der mögliche Vorteil dieses Systems besteht darin, dass der Rezeptor und das Peptid nicht miteinander in Berührung kommen, bis beide an die externe Oberfläche der Zelle abgegeben werden. Somit macht das System strikt die Situation eines Agonisten oder Antagonisten nach, der normalerweise von außerhalb der Zelle abgegeben wird. Die Verwendung jedes der beschriebenen Wege liegt innerhalb des Umfangs der Erfindung. Die vorliegende Erfindung erfordert keine periplasmatische Sekretion oder, falls eine solche Sekretion bereitgestellt wird, irgendeines speziellen Sekretionssignals oder Transportweges.

VI. Screening und Selektion

[0219] Die Fähigkeit spezieller Testverbindungen, eine Signaltransduktionsaktivität des Rezeptors von Interesse zu modulieren, kann durch Nachweisen der Nach-oben- oder Nach-unten-Regulation eines Nachweissignals gescort werden. Beispielsweise können Veränderungen der endogenen Hefe-Zweiten-Messenger-Erzeugung (beispielsweise GTPase-Aktivität, Phospholipid-Hydrolyse oder Protein-Phosphorylierungsmuster oder Enzym-Aktivität) direkt gemessen werden. Alternativ kann die Verwendung eines Indikatorgenes oder eines heterologen Reportergenes einen geeigneten Read-out bereitstellen. In jedem Falle kann die Veränderung des Nachweissignales dazu verwendet werden, die Identifizierung von Verbindungen, die die Signalgebung über den Rezeptor modulieren, zu vereinfachen.

Zweite Messenger-Produktion (Second Messenger Production)

[0220] In bestimmten Ausführungsformen können Veränderungen der intrazellulären zweiten Messenger-Wege biochemisch nachgewiesen werden, d. h. durch Messen der Veränderungen der zweiten Messenger, die durch Modulation eines endogenen Hefe-Signalgebungsweges erzeugt werden. Beispielsweise können Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} , Phosphorylierungszustände von Proteinen, Aktivitäten intrazellulärer Enzyme und dergleichen nachgewiesen werden. Noch weitere Nachweistekniken schließen mikrophysiometrische Vorrichtungen ein, die den Nachweis kleiner Veränderungen in beispielsweise Ionen oder den intrazellulären pH ermöglichen. In weiteren beispielhaften Ausführungsformen können die Modulation beispielsweise der Adenylylcyclase, des zyklischen GMP, von Phosphodiesterasen, Phosphoinositidasen, Phosphoinositolkinasen und Phospholipasen ebenso wie einer Vielzahl von Ionen untersucht werden.

[0221] In einer Ausführungsform kann die GTPase enzymatischer Aktivität durch G-Proteine in Plasmamembran-Zubereitungen gemessen werden, in dem der Abbau bzw. die Aufschlüsselung von $\gamma^{32}\text{P}$ GTP unter Verwendung von Techniken bestimmt werden, die in der Technik bekannt sind (beispielsweise siehe Signal Transduction: A Practical Approach. G. Milligan, Hsg. Oxford University Press, Oxford England). Wenn Rezeptoren, die cAMP modulieren, getestet werden, wird es möglich sein, Standardtechniken für die cAMP-Detektion zu verwenden, beispielsweise kompetitive Assays, die $[3\text{H}]\text{cAMP}$ in Gegenwart unmarkiertem cAMP quantifizieren.

[0222] Bestimmte Rezeptoren und Ionenkanäle stimulieren die Aktivität von Phospholipase C, die den Abbau von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu 1,4,5-IP₃ (das intrazelluläres Ca^{++} mobilisiert) und Diacylglycerol (DAG) stimuliert (das Proteinkinase C aktiviert). Inositol-Lipide können unter Verwendung von Standard-Lipidextraktionstechniken extrahiert und analysiert werden. DAG kann ebenfalls unter Verwendung einer Dünnschichtchromatographie gemessen werden. Wasserlösliche Derivat aller drei Inositol-Lipide (IP₁, IP₂, IP₃) können ebenfalls unter Verwendung von Radiomarkierungstechniken oder HPLC quantifiziert werden.

[0223] Das andere Produkt des PIP₂-Abbaus, DAG, kann ebenfalls aus Phosphatidylcholin erzeugt werden. Der Abbau dieses Phospholipids in Reaktion auf Rezeptor-vermittelte Signalgebung kann ebenfalls unter Verwendung einer Vielzahl von Radiomarkierungstechniken gemessen werden. Die Aktivierung von Phospholipa-

se A2 kann in einfacher Weise unter Verwendung bekannter Techniken quantifiziert werden, einschließlich beispielsweise der Erzeugung von Arachidonat in der Zelle.

[0224] In anderen Ausführungsformen, beispielsweise im Falle bestimmter Rezeptoren und Ionenkanäle, kann es wünschenswert sein, nach Veränderungen der zellulären Phosphorylierung zu screenen. Derartige Assayformate können von Nutzen sein, wenn der Rezeptor von Interesse eine Rezeptorkinase oder Phosphatase ist. Beispielsweise Immunblotting (Lyons und Nelson (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 7426–7430) unter Verwendung von Anti-Phosphotyrosin-, Anti-Phosphoserin- oder Anti-Phosphothreonin-Antikörpern. Zusätzlich können Tests nach einer Phosphorylierung ebenfalls von Nutzen sein, wenn der Rezeptor selbst nicht eine Kinase sein kann, jedoch Proteinkinasen oder Phosphatase aktiviert, die stromabwärts des Signaltransduktionsweges funktionieren.

[0225] Eine solche Kaskade ist der MAP-Kinaseweg, der sowohl mitogene, Differenzierungs- und Stress-Reaktionen in unterschiedlichen Zelltypen zu vermitteln scheint. Die Stimulation von Wachstumsfaktorrezeptoren haben die Ras-Aktivierung, gefolgt von einer sequentiellen Aktivierung von c-Raf, MEK und p44- und p42-MAP-Kinasen (ERK1 und ERK2) zur Folge. Eine aktivierte MAP-Kinase phosphoryliert dann viele regulatorische Schlüsselproteine, einschließlich p90RSK und Elk-1, die phosphoryliert werden, wenn die MAP-Kinase zum Kern transloziert. Homologe Wege existieren in Säugetier- und Hefezellen. Beispielsweise umfasst ein essentieller Teil des *S. cerevisiae*-Pheromon-Signalgebungsweges eine Proteinkinase-Kaskade, die aus den Produkten der STE11, STE7 und FUS3/KSS1-Gene zusammengesetzt ist (das letztere Paar wird unterschieden und ist funktionell redundant). Demgemäß kann eine Phosphorylierung und/oder Aktivierung von Elementen dieser Kinase-Kaskade nachgewiesen und verwendet werden, um ein Einschalten des Rezeptors zu quantifizieren. Phosphotyrosin-spezifische Antikörper sind verfügbar, um Zunahmen der Tyrosinphosphorylierung zu messen und Phospho-spezifische Antikörper sind kommerziell erhältlich (New England Biolabs, Beverly, MA).

[0226] In noch weiteren Ausführungsformen kann das nachweisbare Signal durch Verwendung von Enzymen oder chromogenen/fluoreszierenden Sonden bzw. Proben erzeugt werden, deren Aktivitäten von der Konzentration eines zweiten Messengers abhängig ist, wie beispielsweise Kalzium, Hydrolyseprodukten von Inositolphosphat, cAMP etc. Beispielsweise kann die Mobilisierung von intrazellulärem Kalzium oder der Einstrom von Kalzium von außerhalb der Zelle unter Verwendung von Standardtechniken gemessen werden. Die Auswahl geeigneter Kalzium-Indikator, fluoreszierender, bioluminiszierender, Metallochromer oder Ca^{++} -empfindlicher Mikroelektroden hängt vom Zelltyp und der Magnitude und Zeitkonstante des Ereignisses unserer Studie ab (Borle (1990), Environ Health Perspect. 84: 45–56). Als beispielhaftes Verfahren einer Ca^{++} -Detektion können Zellen mit dem Ca^{++} -empfindlichen fluoreszierenden Farbstoff fura-2 oder indo-1 beladen werden, unter Verwendung von Standardverfahren, und irgendeine Veränderung des Ca^{++} wird unter Verwendung eines Fluorometers gemessen.

Nachweis der Transkription oder der Transkriptionsprodukte

[0227] Zusätzlich zur direkten Messung der zweiten Messenger-Produktion kann die Signaltransduktionsaktivität eines Rezeptors durch Detektion eines Transkriptionsproduktes gemessen werden, beispielsweise durch Nachweisen einer Rezeptor/Kanal-vermittelten Transkriptionsaktivierung (oder Repression) eines endogenen Gens (Gene). Der Nachweis des Transkriptionsproduktes schließt den Nachweis des Gentranskriptes, den Nachweis des Produktes direkt (beispielsweise durch Immunassay) oder den Nachweis einer Aktivität des Proteins (wie beispielsweise einer enzymatischen Aktivität oder chromogenen/fluorogenen Aktivität ein; von denen jedes im Allgemeinen hierin als Mittel zum Nachweisen der Expression des Indikatorgenes bezeichnet wird. Das Indikatorgen kann ein unmodifiziertes endogenes Gen der Hefezelle oder ein modifiziertes endogenes Gen sein.

[0228] In einer Ausführungsform ist das Indikatorgen ein unmodifiziertes endogenes Gen. Beispielsweise kann das vorliegende Verfahren auf dem Nachweis der Transkriptionsstärke eines solchen Pheromon-Systemweg-reponsiven endogenen Gens beruhen, wie dem Bar1 oder Fu1, Fu2, Paarungsfaktor, Ste3 Ste13, Kex1, Ste2, Ste6, Ste7, sSst2 oder Chs1 (Appletauer und Achstetter (1989), Eur. J. Biochem. 181: 243).

[0229] In weiteren Ausführungsformen kann die Empfindlichkeit eines endogenen Indikatorgens durch Manipulieren der Promotorsequenz am natürlichen Ort für das Indikatorgen erhöht werden. Eine solche Manipulation kann sich von Punktmutationen für die endogenen regulatorischen Elemente zu groß angelegtem Ersatz aller oder aller wesentlichen Teile der regulatorischen Elemente erstrecken. Die frühere Diskussion von Mutationen bezüglich von G-Proteinen und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wird hierin wiederholt.

[0230] Beispielsweise kann im Falle des Bar1-Gens der Promotor des Genes so modifiziert werden, dass die Transkription von Bar1 nach Aktivierung des Hefe-Pheromonensystemweges erhöht wird. Die Bar1-Gentranskription wird nach Exposition von Hefezellen gegenüber dem Paarungsfaktor inaktiviert. Die Sequenz des Bar1-Gens ist in der Technik bekannt (siehe beispielsweise US-Patent Nr. 4 613 572). Darüber hinaus wurden die Sequenzen, die für eine α -Faktor-erhöhte Expression des Bar1 erforderlich ist und anderer Pheromon-responsiver Gene, identifiziert (Appletauer und Achstetter (1989), Eur. J. Biochem. 181: 243; Hagen et al. (1991), Mol. Cell. Biol. 11: 2952). In einer beispielhaften Ausführungsform kann der Hefe-Bar1-Promotor durch Mutagenese so verändert werden, dass er responsiver wird, beispielsweise gegenüber einer stärkeren Promotoren-Transkription, nach Simulation des Hefe-Pheromonwegs. Standardtechniken zur Mutagenisierung des Promotors können verwendet werden. In solchen Ausführungsformen ist es wünschenswert, dass das konservierte Oligonukleotid-Motiv, das von Appletauer et al. beschrieben wird, konserviert ist.

[0231] In einer weiteren Ausführungsform kann der endogene Bar1-Promotor einer Hefezelle ersetzt werden, beispielsweise durch homologe Rekombination, durch einen Bar1-Promotor, der so verändert wurde, dass er eine höhere Expressionsstärke von Bar1 nach Pheromon-Stimulierung verursacht.

[0232] In einer weiteren beispielhaften Ausführungsform kann der Promotor (oder andere Transkriptions-regulatorische Sequenzen) des endogenen Genes mit einer heterologen Promotor-Sequenz „ausgeschaltet“ werden, beispielsweise, um ein chimäres Gen am Indikator endogenen Gen-Ort zu bilden. Wiederum können zur Verwendung solcher Techniken wie homologer Regulation die regulatorische Sequenz am genomischen Ort des Indikatorgenes so verändert werden. Beispielsweise kann der Bar1-Promotor am Bar1-Ort ersetzt werden durch den Promotor für das fus1(oder fus2)-Gen. Der fus 1-Promotor weist eine höhere Ansprechbarkeit gegenüber der Stimulation durch Pheromon-Induktion als der Bar1-Promotor auf und kann demgemäß die Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisse und den dynamischen Bereich des Indikatorgens erhöhen. Beispielsweise wurde fus1 und fus2 für Promotoren an anderen Orten substituiert, wie beispielsweise der can1-Promotor. Diese Stämme wurden Canavanin-empfindlich nach Expression des can1-Gens. Ein ähnlicher Ansatz wurde verwendet, um die fus1- und fus2-Promotoren stromaufwärts des ura3-Gens anstelle des ura3-Promotors einzufügen, wodurch eine Uracil-Prototrophie in einer Art und Weise übertragen wurde, die von der Aktivierung des Hefe-Pheromonensignalweges abhängig ist. Desgleichen können die fus1- und fus2-Promotorregionen stromaufwärts der anderen Gene eingeführt werden, um ihre Expression zu kontrollieren: gal1 (verleiht eine Desoxygalactose-Empfindlichkeit oder Galactose-Empfindlichkeit aufgrund des gleichzeitigen Verlustes des gal10-Gens); β -D-Glucanase (exg1: ein einfach untersuchtes extrazelluläres Enzym); Chitinase (cts1); Asparaginase (ast3: hydrolysiert Asparagin zu Ammoniak und Aspartat); und Invertase (suc2); sezernierte saure Phosphatase (pho3 oder pho5).

[0233] Es kann in bestimmten Ausführungsformen wünschenswert sein, das Niveau der Transkriptionsaktivierung des endogenen Indikatorgens durch den Signalweg zu erhöhen, um beispielsweise das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis des Testsystems zu verbessern oder um das Niveau der Reaktion auf ein Niveau einzustellen, das für eine spezielle Nachweisteknik geeignet ist. In einer Ausführungsform kann die Transkriptionsaktivierungsfähigkeit des Signalweges durch Überexpression einer oder mehrerer der in die intrazelluläre Signalkaskade involvierten Proteine amplifiziert werden, insbesondere von Enzymen, die in den Weg involviert sind. Beispielsweise kann eine erhöhte Expression von Jun-Kinasen (JNKs) das Niveau der Transkriptionsaktivierung durch ein Signal in einem MEKK/JNKK-Weg potenzieren. Desgleichen kann die Überexpression eines oder mehrerer Signaltransduktionsproteine im Hefe-Pheromonweg die Konzentration der Fus1-, Fus2- und/oder Bar1-Expression erhöhen. Dieser Ansatz kann ebenfalls dazu verwendet werden, das Niveau der Transkription eines heterologen Reportergens (unten beschrieben) ebenso zu verstärken.

Enzymaktivierung

[0234] In noch weiteren Ausführungsformen kann eher als die Messung der zweiten Messenger-Produktion oder von Veränderungen der Transkription die Aktivität endogener Hefeproteine untersucht werden. Beispielsweise kann in einer Ausführungsform der Signaltransduktionsweg des Rezeptors die Expression nach oben regulieren oder ein Enzym in anderer Weise aktivieren, das zum Modifizieren eines Substrates in der Lage ist, das der Zelle zugesetzt werden kann. Das Signal kann durch Verwendung eines nachweisbaren Substrates nachgewiesen werden, und in diesem Falle wird der Verlust des Substratsignales überwacht oder alternativ durch Verwendung eines Substrates, das ein nachweisbares Produkt verwendet. In bestimmten Ausführungsformen kommt das Substrat natürlich vor. Alternativ kann das Substrat nicht-natürlich vorkommend sein.

[0235] In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Enzym, das das Substratpeptid spaltet, das Produkt des BAR1-Gens, dessen Expression durch Simulation des Hefe-Pheromonweges nach oben reguliert wird. Somit

können Hefezellen, die erzeugt wurden, um den Pheromonsignalweg zum Nachweis auszubeuten, mit einem geeigneten Detektionsmittel in Berührung gebracht werden, d. h. ein Substratpeptid, das durch BAR1 gespalten werden kann, um ein nachweisbares Fragment freizusetzen, beispielsweise ein nachweisbar markiertes Fragment, und die Ebene der BAR1-Aktivität wird somit bestimmt.

[0236] Veränderungen der Enzym-Aktivität, die durch die Interaktion einer Testverbindung und eines Rezeptors vermittelt werden, können durch eine Vielzahl von Mitteln nachgewiesen werden. In bevorzugten Ausführungsformen wird die Umwandlung des Substrates unter Verwendung eines semiquantitativen Plattenassays gemessen, um die BAR1p-Aktivität, wie in Beispiel 2 beschrieben, zu messen. Als illustrative Ausführungsform können Zellen, denen endogenes BAR1 fehlt (als „Testhefestamm“ bezeichnet) in einem geeigneten Medium gezüchtet werden. Die Über-Nacht-Kulturen können dann auf Medium gegossen werden, das α -Faktor enthält, einige Minuten stehengelassen werden und abgegossen werden. Dies hat die Bildung konfluenter und sogar eines Rasens von Testwellen zur Folge. Weil der ausplattierte Rasen von Zellen kein BAR1-Gen aufweist, ist er gegenüber α -Faktor überempfindlich, was dessen Wachstum auf der α -Faktor-Platte anhält. Ein Medium aus BAR1-induzierbaren Hefezellen, das gegenüber Testverbindungen exponiert wurde, kann auf seine Fähigkeit getestet werden, das Wachstum der BAR1-defizienten Testhefezellen im Rasen zu ermöglichen. Das Wachstum des Zellrasens zeigt, dass BAR1 im Medium anwesend ist und dass deswegen das Pheromonsystem der BAR1-induzierbaren Hefezelle durch Kontakt mit der Testverbindung moduliert wurde. Unter Verwendung dieses Assays können zweifache Unterschiede in der BAR1-Aktivität über einen hundertfachen Konzentrationsbereich unterschieden werden.

[0237] In besonders bevorzugten Ausführungsformen erzeugt die Umwandlung des Substrates zum Produkt durch das Enzym eine nachweisbare Veränderung der optischen Eigenschaften der Testzelle, beispielsweise wird das Substrat und/oder das Produkt chromogen oder fluorogen aktiv. In einer illustrativen Ausführungsform verursacht der Signaltransduktionsweg eine Veränderung der Aktivität eines proteolytischen Enzyms, unter Veränderung der Geschwindigkeit, in der sie ein Substratpeptid spaltet (oder einfach das Enzym hin zum Substrat aktiviert). Das Substratpeptid kann ein fluorogenes Donor-Radikal einschließen, beispielsweise ein Fluoreszenz-imitierendes Radikal und ein Akzeptorradikal, beispielsweise ein aromatisches Radikal, das die Fluoreszenzenergie des fluorogenen Donor-Radikals absorbiert, wenn das Akzeptorradikal und das fluorogene Donor-Radikal kovalent in enger Nachbarschaft gehalten werden. Siehe beispielsweise USSN 5 527 681, 5 506 115, 5 429 766, 5 424 186 und 5 316 691; und Capobianco et al. (1992), Anal. Biochem. 204: 96–102. Beispielsweise weist das Substratpeptid eine Fluoreszenz-Donor-Gruppe wie beispielsweise 1-Aminobenzoesäure (Anthranilsäure oder ABZ) oder Aminomethylcoumarin (AMC) auf, lokalisiert an einer Position am Pepsid und einen Fluoreszenz-Quencher-Gruppe, wie beispielsweise Lucifer-Gelb bzw. Lucifer Yellow, Methyl-Rod oder Nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazol (NBD) bei einer unterschiedlichen Position nahe dem distalen Ende des Peptids. Eine Spaltstelle für das aktivierte Enzym wird zwischen jeder der Stellen für den Donor und die Akzeptor-Gruppen angeordnet. Der intramolekulare Resonanzenergietransfer vom Fluoreszenz-Donor-Molekül zum Quencher wird die Fluoreszenz des Donor-Moleküls quenchen bzw. löschen, wenn die beiden ausreichend nah beabstandet sind, beispielsweise wenn das Peptid intakt ist. Nach Spaltung des Peptids jedoch wird der Quencher von der Donor-Gruppe abgespalten und lässt ein fluoreszierendes Fragment zurück. Somit hat die Aktivierung des Enzyms eine Spaltung des Nachweispeptids zur Folge und ein Dequenching der fluoreszierenden Gruppe. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das zur Untersuchung der BAR1-Aktivität verwendete Substrat an einen fluoreszierenden Donor konjugiert, wie beispielsweise 5-[(2-Aminoethyl)amino]naphthalin-1-sulfonsäure (EDANS) und ein Quench-Akzeptor wie beispielsweise 4-(4-Dimethylaminophenylazo)benzoesäure (DABCYL). In einer bevorzugten Ausführungsform besteht das Substrat aus einem Peptid, das die BAR1p-Erkennungssequenz mit (EDANS) und (DABCYL), jeweils an den COOH- und NH₂-Termini befestigt, enthält. In einer weiteren Ausführungsform umfasst das Substrat weiterhin eine GABA-Gruppe zwischen der EDANS-Gruppe und der ersten Aminosäure am COOH-Terminus (beispielsweise der Trp-Rest). Die intrinsische Fluoreszenz von EDANS reduziert erwarteterweise das Substrat dramatisch wegen einem intramolekularen Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET) an die DABCYL-Gruppe. Weil FRET außerhalb von Distanzen von 100 Å insignifikant wird, wird die Fluoreszenz von EDANS nach Spaltung des Substrats wiederhergestellt (Matayoshi et al. (1990), Science 247: 954). Somit kann die proteolytische Aktivität kontinuierlich durch Aufzeichnen der Zunahme der Fluoreszenzintensität über die Zeit überwacht werden.

[0238] Alternativ kann eine Benzamidin-, Benzyloxycarbonyl(Cbz)-Gruppe am N-Terminus des Substrates und eine Rhodamin-Gruppe am C-Terminus des Substrates befestigt werden. Freies Rhodamin oder mono-substituiertes Rhodamin existiert in erster Linie als hoch fluoreszentes Chinon. Jedoch existiert bis-substituiertes Rhodamin als tatsächlich nicht-fluoreszierendes Lacton (McGrath et al., Virology, 1996 217: 131). Somit weist das bis-substituierte BAR1p-Substrat eine sehr geringe Fluoreszenz auf. Die Peptide am Substrat werden vor ihrer Spaltung durch Aminopeptidasen geschützt. Die Spaltung des Peptids mit BAR1p macht das

restliche Rhodamin-angefügte Peptid gegenüber einer Aminopeptidasenspaltung empfänglich. Aminopeptidase-Entfernung des Peptids von Rhodamin hat die Produktion von hoch fluoreszierenden mono-substituierten und freien Rhodamin-Molekülen zur Folge.

[0239] In einer Ausführungsform ist das zu untersuchende Substrat natürlich-vorkommender Hefe- α -Faktor. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst ein Substrat die folgende Verbindung:
DABCYL-Trp-Leu-Gln-Leu-Lys-Pro-Gly-Gln-Pro-Met-Tyr-EDANS (SEQ ID NO: 4)

[0240] In einer noch weiteren Ausführungsform umfasst ein bevorzugtes Substrat die Verbindungen:
Cbz-Trp-Leu-Gln-Leu-Lys-Pro-Gly-Gln-Pro-Met-Tyr-NH₂-Rhodamine (SEQ ID NO: 5).

Zymogen-Aktivierung

[0241] In einer zusätzlichen Ausführungsform kann die Bar1-Aktivität durch Nachweisen der Aktivierung eines Enzym-Vorläufers zu einem aktiven Enzym gemessen werden. Zymogene sind Enzym-Vorläufer, die nach einer spezifischen beschränkten proteolytischen Behandlung aktiv werden. Bei der Herstellung eines Zymogen-Substrates zur Verwendung in den vorliegenden Assays wird eine Bar1-empfindliche Stelle (beispielsweise die Sequenz von ungefähr 9–10 Aminosäuren vom Hefe- α -Faktor, einschließlich der Leu-Lys-Sequenz) zwischen der Vorläufer-Pro-Region eines Zymogens und der reifen (aktiven) Proteinsequenz durch Standardgentechnik eingeführt. Die Behandlung des Zymogens mit Bar1p setzt dann aktives Enzym aus dem Zymogen frei. Unter Verwendung dieses Nachweisverfahrens können Hefezellen oder Überstände aus Hefezellen, die durch eine Verbindung stimuliert werden, zur Erzeugung von Bar1, durch Messen der Umwandlung von Zymogen zu aktivem Enzym getestet werden, beispielsweise durch Nachweisen der Spaltung eines Substrates, das gegenüber einer Spaltung durch das aktive Enzym empfindlich ist. Beispiele für Zymogene, die in solchen Assays nützlich sind, schließen Trypsinogen, Plasminogen, Prothrombin, Pepsinogen, Fibrinogen und Hefe-Carboxypeptidase Y ein Verfahren zum Untersuchen der Aktivität der aktiven Enzyme, die aus diesen Zymogenen abgeleitet sind, sind in der Technik wohl bekannt.

[0242] Das obige System kann ebenfalls zur intrazellulären Zymogen-Prozessierung angepasst werden. In einer beispielhaften Ausführungsform kann die Bar1-Protease zytoplasmatisch durch Exzision der Sequenzen exprimiert werden, die zur Sekretion aus dem Gen notwendig sind, was die intrazelluläre Expression des reifen Bar1-Proteins zur Folge hat. Zellen, die dieses intrazelluläre Bar1p exprimieren, werden dann gentechnisch so verändert, dass sie intrazelluläres Zymogen mit einer Bar1p-sensitiven Spalt- und Aktivierungsstelle, wie oben beschrieben, coexprimieren.

[0243] Um eine Bar1p-Aktivität nachzuweisen, d. h. die Umwandlung des Zymogens zum aktiven Enzym, können mehrere Assays verwendet werden. Beispielsweise kann das bakterielle Lac-Alpha-Fragment mit einem großen Peptid oder Protein fusioniert werden. Eine solche Funktion nach Lac-Alpha unfähig, mit dem Lac-Omega-Fragment zu komplementieren (diese Komplementierung ist die Basis der Blau-Weiß-Unterscheidung von In-frame-Insertionsklonen in Lac-Alpha-Vektoren). Wenn jedoch eine solche Bar1-empfindliche Stelle benachbart der Lac-Alpha-Peptidfusionskreuzung eingeschlossen ist, wird eine Behandlung mit Bar1p das funktionelle Lac-Alpha-Peptid freisetzen, das nunmehr dazu in der Lage ist, Lac-Alpha-Omega zu komplementieren. Somit kann die Bar1-Aktivität als Farbveränderung in der Zelle abgelesen werden. β -Galactosidase-Enzymaktivität kann durch irgendeine in einer Vielzahl von üblicherweise verwendeten Verfahren nachgewiesen und gemessen werden, wobei die am meisten bevorzugten das chromogene Assay auf Basis von Indigo-Farbstoffbildung nach Behandlung des X-gal-Substrates ist. In einer weiteren Ausführungsform kann dieses System in die obige Zymogen-Ausführungsform eingebaut werden, was sowohl β -Galactosidase als auch Zymogen-Ablesungen ermöglicht.

Substrat-Stabilität

[0244] In einer noch weiteren Ausführungsform eines Assays, der auf der Detektion der Modulation eine Enzymaktivität beruht, kann ein Enzymsubstrat derart modifiziert werden, dass die Spaltung durch das Enzym eine Destabilisierung des Substrates zur Folge hat (ein Beispiel hiervon ist weiter in Beispiel 5 beschrieben). Beispielsweise sind Proteine mit Lys an ihrem N-Terminus in Hefe instabil (Bachmair und Varshavsky (1989), Cell 56: 1019). Demgemäß wird ein Enzymsubstrat abgespalten werden, sodass ein N-terminales Lys exponiert wird und an ein einfach zu untersuchendes Nachweisprotein fusioniert werden kann. Beispielsweise kann das BAR1-Substrat, α -Faktor, an ein nachweisbares Gen, beispielsweise ein lacZ-Gen, fusioniert werden. In bevorzugten Ausführungsformen kann es wünschenswert sein, das endogene BAR1-Gen zu modifizieren, um Signale zur Sekretion zu entfernen (vorliegend am N- und C-Terminus von BAR1), wodurch eine Interaktion

von BAR1 mit zytoplasmatischen Substraten erhöht wird. In bestimmten Ausführungsformen ist das Nachweisprotein ein essentielles Protein, das somit eine Negativselektion für die BAR1-Expression oder -Aktivität bereitstellt. In anderen Ausführungsformen kann ein Repressorprotein als Nachweisprotein verwendet werden, wodurch eine positive Ablesung bereitgestellt wird.

Verwendung chimärer Konstrukte zur Herstellung endogener Pheromon-responsiver Gene

[0245] In einer noch weiteren Ausführungsform können chimäre Konstrukte verwendet werden, die eine Pheromon-Ansprechbarkeit für endogene Hefe-Gene verleiht, die normalerweise nicht Pheromon-ansprechbar sind, wie in Beispiel 6 beschrieben ist. Solche Konstrukte umfassen ein Segment eines Genes, das einen Pheromon-induzierbaren Transkriptionsfaktor codiert, wie beispielsweise den Ste12p-Transkriptionsfaktor. Beispielsweise wird im Falle einer Pheromon-Signalgebung Ste12p ein potenter Transkriptionsaktivator von Genen, deren Promotoren eine wohl definierte DNA-Bindungsstelle enthalten (das Pheromon-Respons-Element oder PRE). Die chimären Konstrukte umfassen weiterhin ein zweites Segment, das eine DNA-Bindungsdomäne codiert, die eine DNA-Sequenz im Promotor des endogenen Genes codiert, auf das eine Pheromon-Ansprechbarkeit übertragen werden soll. Das Gen, aus dem das zweite Segment abgeleitet ist, wird auf Grundlage der erwünschten Ablesung ausgewählt werden. Wenn beispielsweise der Assay unter Verwendung von Gen A als Ablesung konstruiert werden soll (wegen der Vereinfachung der Untersuchung für das Produkt von Gen A), dann codiert das zweite Segment des chimären Konstruktes eine DNA-Bindungsdomäne, die an den Gen-A-Promotor bindet und eine Expression eines Genes A induziert, das untersucht werden soll. Beispielsweise codiert in einer bevorzugten Ausführungsform das zweite Segment des Konstruktes die DNA-Bindungsdomäne von Pho4p. Wildtyp-Pho4p bindet und aktiviert den Promotor des PHO5, ein sezerniertes alkalisches Phosphatase-Gen. Nach Expression des chimären Konstruktes wird die Signalgebung durch den Pheromonreaktionsweg das Pho4-Ste12-Fusionsprotein, das durch das chimäre Konstrukt codiert ist, aktivieren, und danach wird dieses Pho4-Ste12-Fusionsprotein an die Pho4-Bindungsstelle im Pho5-Promotor binden und die Expression des PHO5-Genes induzieren.

[0246] In Assays, die Chimäre Konstrukte verwenden, wird die Modulation eines Rezeptors durch eine Testverbindung eine Veränderung der Transkription eines Genes zur Folge haben, das normalerweise nicht Pheromon-responsiv ist. In bevorzugten Ausführungsformen ist dieses Gen einfach nachweisbar. Beispielsweise kann in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegende Assay dazu verwendet werden, Pho5, eine sezernierte saure Phosphatase, zu messen. Die saure Phosphatase-Aktivität kann unter Verwendung von Standardtechniken gemessen werden. Beispielsweise kann der Überlagerungs-Assays von Toh-e et al. (J. Bacteriol. 1973) verwendet werden. Beispielsweise werden Zellen auf das geeignete Medium aufgesetzt und über Nacht wachengelassen. Für jede Platte wird ein Gemisch aus 2 ml geschmolzener 1%iger Agarose in 50 mM NaAc pH 4,0, 700 µl H₂O und 300 µl α-Naphthyl saures Phosphat (50 mg/ml) hergestellt und auf die Platte aufgebracht. Danach werden 1 ml D-Dianisidin Fast Blue Salz B (50 mg/ml in 50 mM NaAc pH 4,0) auf die Platte gegossen. Der Grad der Farbentwicklung ist ein Maß für die Konzentration der sauren Phosphatase, die durch das Pflaster aus Zellen erzeugt wurde. Eine solche Farbentwicklung weist auf die Modulation eines Rezeptors durch eine Testverbindung hin.

[0247] In bestimmten Ausführungsformen werden solche chimären Konstrukte weiterhin eine Kernlokalisierungssequenz umfassen.

[0248] Wie oben angezeigt, ist die DNA-Bindungsdomäne des Konstruktes (d. h., die durch das zweite Segment des Konstruktes codiert ist) aus der PHO4 DNA-Bindungsdomäne. Die Sequenz der PHO4 DNA-Bindungsdomäne ist in der Technik bekannt. Das Konstrukt kann ein Segment des natürlich vorkommenden PHO4-Genes umfassen oder kann ein Segment umfassen, das aus dem natürlich vorkommenden PHO4-Gen abgeleitet ist, das jedoch verändert wurde, beispielsweise durch Mutation. In bevorzugten Ausführungsformen codiert das zweite Gensegment die Aminosäuren 227–312 der PHO4 DNA-Bindungsdomäne.

[0249] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das Pheromon-induzierbare Transkriptionsfaktor (d. h. durch das erste Gensegment des Konstruktes codiert) vom Ste12-Gen abgeleitet. Irgendeines einer Vielzahl von Ste12-Fragmenten kann in den gegenständlichen Konstrukten verwendet werden. Die Sequenz von Ste12 ist in der Technik bekannt. Es existieren mehrere Informationsquellen bezüglich der Sequenz von Ste12, auf die sich der Fachmann berufen kann, wenn das Segment von Ste12 ausgewählt wird, das in das chimäre Konstrukt eingebaut werden soll. Beispielsweise wurden Fusionen zwischen der Ga14-DNA-Bindungsdomäne und unterschiedlichen Regionen von Ste12 hergestellt (Song et al., Genes & Development, 1991). Zusätzlich wurden Deletions- und Insertions-Mutanten von Ste12 konstruiert und auf ihre Fähigkeit hin getestet, die Paarung und die Transkriptionsaktivität eines ste12Δ-Stammes wiederherzustellen (Kirman-Correia et al., Mol.

Cell. Biol., 1993). Solche Experimente stellen eine Anleitung bezüglich der Anteile von Ste12 bereit, die in die Konstrukte eingebaut werden können, und diese Anteile sind wahrscheinlich einer Mutation zugänglich.

[0250] Die chimären Konstrukte der vorliegenden Erfindung können ein Segment umfassen, das von einer natürlichen DNA-Sequenz abgeleitet ist, oder die gegenständlichen Konstrukte können ein Segment umfassen, das zu einem natürlich vorkommenden Gen homolog ist, das jedoch verändert wurde, beispielsweise durch Mutation. Irgendeines der Standardverfahren zur Herstellung von Mutationen, die in der Technik bekannt oder hierin diskutiert sind, können für diesen Zweck verwendet werden.

[0251] Beispielsweise umfasst in bevorzugten Ausführungsformen das erste Gensegment, das in das Konstrukt eingebaut wird, eine Nukleotidsequenz, die die Aminosäuren 1–473 des natürlich vorkommenden Ste12 codiert. In einer weiteren Ausführungsform umfasst das Konstrukt eine Nukleotidsequenz, die die Aminosäuren 214–473 des natürlich vorkommenden Ste12 codiert. In einer weiteren Ausführungsform umfasst das Konstrukt eine Nukleotidsequenz, die die Aminosäuren 214–688 von natürlich vorkommenden Ste12 umfasst. In einer noch weiteren Ausführungsform umfasst das Konstrukt eine Nukleotidsequenz, die Aminosäuren 1–688 von natürlich vorkommendem Ste12 codiert.

[0252] In noch weiteren Ausführungsformen kann das Segment des Konstruktes, das aus dem Ste12-Gen abgeleitet ist, eine Mutation umfassen. Beispielsweise kann in einer Ausführungsform eine solche Mutation die Einfügung einer oder mehrerer Aminosäuren zur Folge haben, beispielsweise die Insertion von Lys-Leu zwischen den Aminosäuren 85 und 86 von Ste12. In einer weiteren Ausführungsform kann eine solche Mutation die Insertion von Ser-Leu zwischen den Aminosäuren 103 und 104 zur Folge haben. In einer noch weiteren Ausführungsform können 1 oder mehrere Aminosäuren deletiert werden, beispielsweise die Aminosäuren 253–305, 572–669 oder 588–669.

[0253] In bevorzugten Ausführungsformen ist das endogene Hefe Gen, das einem Gen entspricht, das im Konstrukt vorliegt, gestört. Beispielsweise können in bevorzugten Ausführungsformen Hefezellen, die ein Ste12-PHO4-Konstrukt tragen, derart gentechnisch verändert werden, dass das PHO4-Gen der Wirtshefezelle gestört werden kann. In weiteren Ausführungsformen kann das PHO3-Gen, das ebenfalls eine sezernierte saure Phosphatase codiert, das jedoch unter Hoch-Phosphat-Bedingungen induziert wird, und das weiter durch Thiamin-Aussonderung bzw. -Abreicherung erhöht wird, gestört werden kann.

Heterologe Ablesungen: Reporter-Gen-Konstrukte

[0254] In noch weiteren Ausführungsformen kann ein heterologes Genkonstrukt dazu verwendet werden, die Modulation eines Rezeptors nachzuweisen. Durch Auswahl von transkriptionalen regulatorischen Sequenzen, die gegenüber transduzierten intrazellulären Signalen responsiv sind und operativ die ausgewählten Promotoren an Reporter gene binden, deren Transkription oder Translation einfach nachweisbar und messbar ist, stellt ein Transkription-basierter Assay einen raschen Nachweis bereit, ob ein spezifischer Rezeptor mit einer Testverbindung in irgendeiner Weise interagiert, die die intrazelluläre Transduktion moduliert. Die Expression des Reporter gens stellt somit ein wertvolles Screening-Werkzeug zur Entwicklung von Verbindungen bereit, die als Agonisten oder Antagonisten eines solchen Rezeptors dienen.

[0255] Reporter-Gen-basierte Assays dieser Erfindung messen das Endstadium der oben beschriebenen Kaskade von Ereignissen, beispielsweise einer Transkriptionsmodulation. Demgemäß wird bei der Ausübung einer Ausführungsform der Erfindung ein Reporter-Gen-Konstrukt in die Reagenz-Zelle eingeführt, um ein Nachweissignal zu erzeugen, abhängig von der Rezeptorsignalgebung. Typischerweise wird das Reporter-Gen-Konstrukt ein Reporter-Gen in operativer Bindung mit ein oder mehreren Transkriptions-regulatorischen Elementen einschließen, die gegenüber der Signaltransduktionsaktivität des Targetrezeptors responsiv sind, wobei die Expressionsstärke des Reporter gens das Rezeptor-abhängige Detektionssignal bereitstellt. In einer weiteren Ausführungsform kann die Menge der Transkription aus dem Indikator-Gen unter Verwendung irgendeines Verfahrens gemessen werden, von dem dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt ist, dass es geeignet ist.

[0256] In bevorzugten Ausführungsformen wird das Produkt des Reporter genes durch intrinsische Aktivität nachgewiesen, die mit diesem Produkt assoziiert ist. Beispielsweise kann das Indikator-Gen ein Genprodukt codieren, das, durch enzymatische Aktivität, ein Detektionssignal auf Grundlage beispielsweise von Farbe, Fluoreszenz oder Lumineszenz entstehen lässt.

[0257] Die Expressionsmenge aus dem Reporter-Gen wird dann mit der Expressionsmenge in jeder der selben Zellen in Abwesenheit der Testverbindung verglichen, oder sie kann mit der Menge der Transfektion in einer

im Wesentlichen identischen Zelle verglichen werden, der die spezifischen Rezeptoren fehlen. Eine Kontrollzelle kann aus denselben Zellen gewonnen werden, aus denen die Testzelle hergestellt wurde, die jedoch nicht mit der Verbindung behandelt wurde. Alternativ kann sie eine Zelle sein, in der der Rezeptor von Interesse nicht vorliegt. Irgendeine Veränderung der Transkriptionsmenge (Beispiel 2 eine statistisch signifikante Veränderung) zeigt, dass die Testverbindung in einer gewissen Weise die Aktivität des spezifischen Rezeptors oder Ionenkanals verändert hat.

[0258] In anderen bevorzugten Ausführungsformen stellt das Reportergen ein Selektionsverfahren derart bereit, dass Zellen, bei denen eine Aktivierung (oder Inaktivierung) eines oder mehrerer Signalwege eines Rezeptors oder Ionenkanals vorliegt, einen Wachstumsvorteil gegenüber der behandelten Zelle bereitstellt. Beispielsweise könnte die Expression des Indikatorgens die Zellebensfähigkeit erhöhen, ein Zellernährungserfordernis lindern und/oder eine Arzneistoffresistenz bereitstellen.

[0259] Viele beispielhafte Reporter Gene und Transkriptions-regulatorische Elemente sind dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt und andere können durch Verfahren, die auf dem Gebiet bekannt sind, identifiziert oder synthetisiert werden. Derartige Beispiele von Reporter Genen schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf, CAT (Chloramphenicolacetyltransferase) (Alton und Vapnek (1979), *Nature* 282: 864–869), Luciferase und andere Enzymdetektionssysteme wie beispielsweise β -Galaktosidase; Glühwürmchen-Luciferase (deWet et al. (1987), *Mol. Cell. Biol.* 7: 725–737); bakterielle Luciferase (Engbrecht und Silverman (1984), *PNAS* 1: 4145–4158; Baldwin et al. (1984), *Biochemistry* 23: 3663–3667); alkalische Phosphatase (Toh et al. (1989), *Eur. J. Biochem.* 182: 231–238; Hall et al. (1983), *J. Mol. Appl. Gen.* 2: 101), humane placentale sezernierte alkalische Phosphatase (Cullen und Malim (1992), *Methods in Enzymol.* 2: 362–368); β -Lactamase oder GST.

[0260] Transkriptionskontrollelemente zur Verwendung in den Reporter Gen-Konstrukten oder zum Modifizieren des Genortes eines Indikatorgens schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf, Promotoren, Enhancer und Repressor- und Aktivator-Bindungsstellen. Geeignete Transkriptions-regulatorische Elemente können aus den Transkriptions-regulatorischen Regionen von Genen abgeleitet werden, deren Expression rasch induziert wird, im Allgemeinen innerhalb von Minuten eines Kontakts zwischen dem Zelloberflächenprotein und dem Effektorprotein, das die Aktivität des Zelloberflächenproteins moduliert. Beispiele für solche Gene schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf, the immediate early genes (unmittelbare frühe Gene) (siehe Sheng et al. (1990), *Neuron* 4: 477–485), wie beispielsweise c-fos. Immediate-Early-Gene, die nach Bindung eines Liganden an ein Zelloberflächenprotein rasch induziert werden. Die Transkriptionskontrollelemente, die zur Verwendung in den Genkonstrukten bevorzugt sind, schließen Transkriptionskontrollelemente für Immediate-Early-Gene, Elemente, die aus anderen Genen abgeleitet sind, die einige oder alle der Charakteristika der Immediate-Early-Gene zeigen, oder synthetische Elemente ein, die derart konstruiert sind, dass Gene in operativer Bindung hiermit derartige Charakteristika zeigen. Die Eigenschaften bevorzugter Gene, aus denen die Transkriptionskontrollelemente abgeleitet sind, schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf, niedrige oder nicht nachweisbare Expression in ruhenden Zellen, eine rasche Induktion der Transkriptionsniveaus innerhalb von Minuten nach extrazellulärer Stimulation, die Induktion, die transient bzw. vorübergehend ist und von einer neuen Proteinsynthese abhängt, abschließende Shut-off der Transkription erfordert eine neue Proteinsynthese und mRNAs, die aus diesen Genen transkribiert wurden, weisen eine kurze Halbwertszeit auf. Es ist nicht notwendig, dass all diese Eigenschaften vorliegen.

[0261] Weitere Promotoren und Transkriptionskontrollelemente, zusätzlich zu den oben beschriebenen, schließen das vasoaktive intestinale Peptid(VIP)-Genpromotor (cAMP-responsiv; Fink et al. (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 6662–6666); Somatostatin-Gen-Promotor (cAMP-responsiv, Montminy et al. (1986); *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 6682–6686); den Proenkephalin-Promotor (responsiv gegenüber cAMP, Nikotinsäureagonisten und Phorbolestern; Comb et al. (1986), *nature* 323: 353–356); den Phosphoenolpyruvatcarboxy-Kinase-Gen-Promotor (cAMP-responsiv; Short et al. (1986), *J. Biol. Chem.* 261: 9721–9726); den NG-FI-A-Gen-Promotor (responsiv gegen über NGF, cAMP und Serum; Changelian et al. (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 377–381) und andere ein, die bekannt sein können oder die vom Fachmann auf dem Gebiet hergestellt werden können.

[0262] Im Falle von Rezeptoren, die zyklisches AMP modulieren, kann ein Transkriptions-basierter Read-out bzw. Ablesung unter Verwendung des zyklischen AMP-Reaktionselement-Bindungsproteins, CREB, konstruiert werden, das ein Transkriptionsfaktor ist, dessen Aktivität durch Phosphorylierung an einem speziellen Serin reguliert wird (S133). Wenn dieser Serin-Rest phosphoryliert ist, bindet CREB an eine Erkennungssequenz, die als CRE bekannt ist (cAMP-responsives Element), das am 5' von Promotoren zu finden ist, von denen bekannt ist, dass sie gegenüber erhöhten cAMP-Konzentrationen responsiv sind. Nach Bindung von phosphoryliertem CREB an wird für die Transkription aus diesem Promotor erhöht.

[0263] Die Phosphorylierung von CREB ist in Reaktion sowohl auf erhöhte cAMP-Konzentrationen als auch erhöhte intrazelluläre Ca-Konzentrationen ersichtlich. Erhöhte cAMP-Konzentrationen haben die Aktivierung von PKA zur Folge, was wiederum CREB phosphoryliert und zur Bindung an CRE und Transkriptionsaktivierung führt. Erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentrationen haben eine Aktivierung von Kalzium/Calmodulin-responsiver Kinase II (CaM-Kinase II) zur Folge. Die Phosphorylierung von CREB durch CaM-Kinase II ist effektiv dieselbe wie die Phosphorylierung von CREB durch PKA und hat die Transkriptionsaktivierung von CRE-enthaltenden Promotoren zur Folge.

[0264] Ein Transkriptions-basierter Read-out kann in Zellen konstruiert werden, die ein Reporter gen enthalten, dessen Expression durch einen basalen Promotor angetrieben wird, der ein oder mehrere CRE enthält. Veränderungen der intrazellulären Konzentration an Ca^{++} (eine Folge von Veränderungen der Aktivität des Rezeptors nach Bindung mit einem Liganden) haben Veränderungen der Expressionsstärke des Reporter genes zur Folge, wenn: a) CREB ebenfalls in der Zelle coexprimiert wird und b) entweder eine endogene oder heterologe CaM-Kinase CREB in Reaktion auf Erhöhungen des Kalzium phosphoryliert oder, wenn eine exogen exprimierte CaM-Kinase II in derselben Zelle vorliegt. Mit anderen Worten, kann eine Stimulierung der PLC-Aktivität des Phosphorylierung von CREB und eine erhöhte Transkription aus dem CRE-Konstrukt zur Folge haben, während eine Hemmung der PLC-Aktivität eine gesenkte Transkription aus dem CRE-responsiven Konstrukt zur Folge haben kann.

[0265] Wie in Bonni et al. (1993), Science 262: 1575–1579, beschrieben, führt die Beobachtung dass CNTF-Behandlung von SK-N-MC-Zellen zur erhöhten Interaktion von STAT/p91 und STAT-verwandten Proteinen mit speziellen DNA-Sequenzen führt, zum Vorschlag, dass diese Proteine Schlüsselregulatoren der Veränderungen der Genexpression sein könnten, die durch CNTF ausgelöst werden. Konsistent mit dieser Möglichkeit ist die Erkenntnis, dass DNA-Sequenzelemente ähnlich den Konsensus-DNA-Sequenzen, die für die STAT/p91-Bindung erforderlich sind, stromaufwärts eine Anzahl von Genen vorliegen, von denen sich kürzlich herausgestellt hat, dass sie von CNTF induziert werden (beispielsweise humanes c-fos, Maus-c-fos, Maus-tis11, Ratten-junB, Ratten-SOD-1 und CNTF). Diese Autoren zeigten die Fähigkeit von STAT/p91-Bindungsstellen eine CNTF-Reaktivität auf ein nicht-responsives Reporter gen zu übertragen. Demgemäß kann ein Reporter konstrukt zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung zum Nachweis einer Signaltransduktion durch STAT-Proteine, beispielsweise aus Cytokin-Rezeptoren, durch Verwendung von -71 bis +109 des Maus-c-fos-Genes fusioniert an das bakterielle Chloramphenicolacetyltransferasegen (-71 fosCAT) oder ein anderes nachweisbares Reporter gen erzeugt werden. Die Induktion durch einen Cytokin-Rezeptor induziert die Tyrosinphosphorylierung von STAT und STAT-verwandten Proteinen mit einer anschließenden Translokation und Bindung dieser Proteine an STAT-RE. Dies führt dann zur Aktivierung der Transkription von Genen, die dieses DNA-Element enthalten, innerhalb ihrer Promotoren.

[0266] In bevorzugten Ausführungsformen ist das Reporter gen ein Gen, dessen Expression eine phänotypische Veränderung verursacht, die screenbar oder selektierbar ist. Wenn die Veränderung selektierbar ist, erzeugt die phänotypische Veränderung einen Wachstumsunterschied oder einen Unterschied der Überlebensrate zwischen Zellen, die das Reporter gen exprimieren und die dieses nicht exprimieren. Falls die Veränderung screenbar ist, erzeugt die phänotypische Veränderung einen Unterschied in einigen nachweisbaren Eigenschaften der Zelle, durch die die Zelle, die den Reporter exprimiert, von solchen, die es nicht tun, unterschieden werden kann. Die Selektion ist gegenüber dem Screening zu bevorzugen, insofern, als sie ein Mittel zum Amplifizieren solcher Zellen aus der Zellkultur bereitstellen kann, die ein Testpolypeptid exprimieren, das ein Rezeptoreffektor ist.

[0267] Das Reporter gen wird an den Rezeptorsignalgebungsweg so gekoppelt, dass die Expression des Reporter genes abhängig von der Aktivierung des Rezeptors ist. Diese Kopplung kann durch operatives Verbinden des Reporter genes mit einem Rezeptor-responsiven Promotor erreicht werden. Der Begriff „Rezeptor-responsiver Promotor“ zeigt einen Promotor an, der durch ein Produkt des Rezeptorsignaltransduktionsweges reguliert wird.

[0268] Alternativ kann der Promotor ein Promotor sein, der durch den Rezeptorweg exprimiert wird, durch Vermeiden der Expression eines Produktes, das für die Zelle zerstörerisch ist. Mit einem Rezeptor-unterdrückten Promotor screen man nach Agonisten durch Binden des Promotors an ein schädliches Gen und für Antagonisten durch dessen Bindung an ein vorteilhaftes Gen. Die Unterdrückung kann durch operatives Binden eines Rezeptor-induzierten Promotors an ein Gen erreicht werden, das mRNA codiert, das antisens ist gegenüber zumindest einem Anteil der mRNA, die durch das Reporter gen codiert wird (gleichgültig ob in der codierenden oder der flankierenden Region), um eine Translation dieser mRNA zu hemmen. Die Unterdrückung kann ebenfalls durch Binden eines Rezeptor-induzierten Promotors an ein Gen gewonnen werden, das ein

DNA-Bindungsrepressorprotein codiert und durch Einbauen eines geeigneten Operatorortes in den Promotor oder einer weiter geeigneten Region des Reportergens.

[0269] Im Falle der Hefe fließen geeignete positiv selektierbare (vorteilhafte) Gene wie folgend ein: URA3, LAS2, HIS3, LEU2, TRP1; ADE1,2,3,4,5,7,8; ARG1,3,4,5,6,8; HIS1,4,5; THR1,4; TRP2,3,4,5; LEU1,4; MET2,3,4,8,9,14,16,19; URA1,2,4,5,10; HOM3,6; ASP3; CHO1; ARO2,7; CYS3; OLE1; INO1,2,4; PRO1,3. Zahllose andere Gene sind potentiell selektive Marker. Das Obere ist in wohl-charakterisierte biosynthetische Wege involviert. Das Imidazolglycerolphosphatdehydratase (IGP-Dehydratase)-Gen (HIS3) wird bevorzugt, weil es sowohl ziemlich empfindlich ist, als auch über einen breiten Bereich an Expressionsstärken selektiert werden kann. Im einfachsten Falle ist die Zelle für Histidin autotroph (erfordert Histidin zum Wachstum) in Abwesenheit einer Aktivierung. Die Aktivierung führt zur Synthese des Enzyms und die Zelle wird prototroph für Histidin (erfordert Histidin nicht). Somit erfolgt die Selektion bezüglich eines Wachstums in Abwesenheit von Histidin. Weil nur einige wenige Moleküle pro Zelle für eine Histidin-Prototrophie erforderlich sind, ist der Assay sehr empfindlich.

[0270] In einer komplexeren Version des Assays können die Zellen bezüglich einer Resistenz gegenüber Aminotriazol (AT) ausgewählt werden, ein Arzneistoff, der die Aktivität der IGP-Dehydratase hemmt. Zellen mit einer niedrigen, fixierten Expressionsstärke von HIS3 sind gegenüber dem Arzneistoff empfindlich, wohingegen Zellen mit höheren Stärken resistent sind. Die Menge an AT kann ausgewählt werden, um Zellen mit einer Basisstärke der HIS3-Expression (was auch immer diese Stärke ist) zu hemmen, erlauben jedoch das Wachstum von Zellen mit einem induzierten Expressionsniveau. In diesem Falle erfolgt die Selektion nach dem Wachstum in Abwesenheit von Histidin und in Anwesenheit einer geeigneten Konzentration an AT.

[0271] In geeigneten Assays können so genannte gegen-selektierbare oder negativ-selektierbare Gene verwendet werden. Geeignete Gene schließen ein: URA3 (Orotidin-5'-phosphatdecarboxylase; hemmt das Wachstum von 5-Fluororotsäure), LYS2 (2-Aminoacidatreduktase; hemmt das Wachstum von α -Aminoacidat als einziger Stickstoffquelle), CYH2 (codiert das ribosomale Protein L29; Cycloheximid-empfindliches Allel ist gegenüber einem resistenten Allel dominant), CAN1 (codiert Argininpermease; Null-Allele verleiht gegen Arginin-Analog Canavanin eine Resistenz) und andere rezessive Arzneistoff-resistente Marker).

[0272] In einem Beispiel betrifft das Reportergergen das Hefezellwachstum. Die natürliche Reaktion auf ein Signaltransduktion über die Hefe-Pheromonsystemreaktionswege ist für Zellen, einen Wachstumstopp durchzumachen. Dies ist der bevorzugte Weg, nach Antagonisten gegenüber einem Liganden/Rezeptor-Paar zu selektieren, das den Weg induziert. Ein autokriner Peptid-Antagonist würde die Aktivierung des Weges hemmen; daher wäre die Zelle dazu in der Lage, zu wachsen. Somit könnte das FAR1-Gen als endogener gegen-selektierbarer Marker bezeichnet werden. Das FAR1-Gen wird vorzugsweise inaktiviert, wenn nach einer Agonistenaktivität gescreent wird.

[0273] Das Reportergergen kann ebenfalls ein screenbares Gen sein. Die gescreente Eigenschaft kann eine Veränderung der Zellmorphologie, des Metabolismus oder anderer screenbarer Merkmale sein. Geeignete Marker schließen β -Galactosidase (Xgal, C₁₂FDG, Lachs-gal, Magenta-Gal (die letzteren beiden von Biosynth AG)), alkalische Phosphatase, Meerrettich-Peroxidase, Exo-Glucanase (Produkt des Hefe-exbl-Gens; nichtessentiell, sezerniert); Luciferase; bakterielles grün fluoreszierendes Protein; (humane plazentale) sezernierte alkalische Phosphatase (SEAP); und Chloramphenicoltransferase (CAT). Einige der obigen kann gentechnisch verändert werden, sodass sie sezerniert werden (obwohl nicht β -Galactosidase). Ein bevorzugtes screenbares Reportergergen ist eine β -Galactosidase; Hefezellen, die das Enzym exprimieren, wandeln das farblose Substrat Xgal in ein blaues Pigment um. Wiederum kann der Promoto Rezeptor-induziert oder Rezeptor-inhibiert sein.

[0274] In bestimmten Assays kann es wünschenswert sein, Veränderungen des Wachstums in Screening-Verfahren zu verwenden. Beispielsweise ist eine der Konsequenzen der Aktivierung des Pheromonsignalweges in Wildtyp-Hefe ein Wachstumsstopp. Wenn man auf einen Agonisten eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors testet, kann diese normale Reaktion des Wachstumsstopps dazu verwendet werden, Zellen zu selektieren, in denen der Pheromonreaktions-Weg gehemmt wurde. Das heißt, Zellen, die gegenüber einer Testverbindung exponiert sind, werden in ihrem Wachstum angehalten, wenn die Verbindung ein Agonist ist, werden jedoch normal wachsen, wenn die Verbindung neutral ist oder ein Antagonist ist. Somit kann die Wachstumsstoppreaktion dazu vorteilhaft verwendet werden, Verbindungen zu entdecken, die als Agonisten oder Antagonisten dienen. Darüber hinaus kann die Wirkung des Wachstumsstopps ein selektiver Vorteil in Gegenwart eines Mittels sein, das gegenüber mitotischen Zellen zytotoxisch ist. Beispielsweise wird während des Wachstumsstopp-Fensters das zytotoxische Mittel der Kultur zugesetzt. Zellen, die mit dem Zellzyklus fortfahren, beispielsweise die in ihrem Wachstum nicht angehalten sind, werden getötet. Nach einiger Zeit folgend dem Zu-

satz des zytotoxischen Mittels kann dieses aus der Kultur gewaschen werden und die überlebenden Zellen können mit ihrer Proliferation fortschreiten. Zellen, die durch die Testverbindung angehalten wurden, werden in der überlebenden Population angereichert.

[0275] Jedoch ist in bestimmten Ausführungsformen (insbesondere solchen, in denen eine autokrine Peptid-Bibliothek verwendet wird) der Wachstumsstopp als Konsequenz der Aktivierung des Pheromonreaktions-Weges eine unerwünschte Wirkung, weil die Zellen, die Agonisten binden, in ihrem Wachstum anhalten, wohingegen die umgebenden Zellen, die nicht an Peptide binden, in ihrem Wachstum fortfahren. Die Zellen von Interesse werden dann überwuchert oder ihr Nachweis durch die Hintergrundzellen unklar, wodurch die Identifizierung der Verbindung von Interesse durcheinandergebracht wird. Um dieses Problem zu überwinden, lehrt die vorliegende Erfindung die gentechnische Veränderung der Zelle derart, dass: 1) ein Wachstumsstopp nicht als Folge einer exogenen Signalwegaktivierung eintreten kann (beispielsweise durch Inaktivierung des FAR1-Gens); und/der 2) ein selektiver Wachstumsvorteil durch Aktivierung des Weges verliehen wird (beispielsweise durch Transformieren einer auxotrophen Mutante mit einem HIS3-Gen unter der Kontrolle eines Pheromon-responsiven Promotors und Ausüben selektiver Bedingungen).

[0276] Es ist wünschenswert, dass der exogene Rezeptor auf einer kontinuierlichen Basis gegenüber den Peptiden exponiert wird. Dies ist leider wahrscheinlich Folge einer Desensibilisierung des Pheromonweges gegenüber dem Reiz. Beispielsweise ist bekannt, dass der Paarungssignaltransduktionsweg durch mehrere Mechanismen desensibilisiert wird, einschließlich des Pheromon-Abbaus und der Modifikation der Funktion des Rezeptors, von G-Proteinen und/oder stromabwärts liegenden Elementen des Pheromonsignaltransduktions-Weges durch die Produkte der SST2, STE50, AFR1 (Konopka, J. B. (1993), *Mol. Cell, Biol.* 13: 6876–6888) und SGV1-, MSGS- und SIG1-Gene. Selektierte Mutationen in diesen Genen können zu einer Überempfindlichkeit gegenüber Pheromon und einem Unvermögen führen, sich an das Vorhandensein von Pheromon anzupassen. Beispielsweise stellt die Einbringung von Mutationen, die mit Funktionen in den Stämmen, die heterologe G-Protein-gekoppelte Rezeptoren exprimieren, eine signifikante Verbesserung bei Wildtyp-Stämmen dar und ermöglicht die Entwicklung extrem empfindlicher Bioassays für Verbindungen, die mit den Rezeptoren interagieren. Andere Mutationen, beispielsweise STE50, *sgv1*, *Bar1*, *ste2*, *ste3*, *pik1*, *msg5*, *sig1* und *aft1* weisen die ähnliche Wirkung der Erhöhung der Empfindlichkeit des Bioassays auf. Somit kann die Desensibilisierung durch Mutieren vermieden werden (was ein Deletieren miteinschließen kann) des SST2-Gens, sodass es nicht mehr länger ein funktionelles Protein produziert oder durch Mutieren eines der anderen oben aufgelisteten Gene.

[0277] Wenn eine Testverbindung dabei versagt, die Aktivität eines Rezeptors zu stimulieren, kann der Assay wiederholt und durch Einführung eines Schrittes modifiziert werden, bei dem die Reagenz-Zelle zunächst mit einem bekannten Aktivator des Zielrezeptor/Kanals in Berührung gebracht wird, um eine Signaltransduktion zu induzieren, und die Testverbindung kann bezüglich ihrer Fähigkeit untersucht werden, den aktivierten Rezeptor/Kanal zu hemmen, beispielsweise um Antagonisten zu identifizieren. In noch weiteren Ausführungsformen können Batterien von Verbindungen bezüglich Mitteln gescreent werden, die die Reaktion auf einen bekannten Aktivator der Rezeptors potenzieren.

XII. Genetische Marker in Hefestämmen

[0278] Hefestämme, die für Histidin auxotroph sind (HIS3) sind bekannt, siehe Struhl und Hill (1987), *Mol. Cell. Biol.* 7: 104; Fasullo und Davis, *Mol. Cell. Biol.* (1986) 8: 4370. Das HIS3(Imidazolglycerolphosphatdehydratase)-Gen wurde als selektiver Marker in Hefe verwendet. Siehe Sikorski und Heiter (1989), *Genetics* 122: 19; Struhl et al., *PNAS* (1979) 76: 1035; und für FUS1-HIS3-Fusionen, siehe Stevenson et al. (1992), *Genes Dev.* 6: 1293.

XIII. Pharmazeutische Zubereitungen für identifizierte Mittel

[0279] Nach dem Identifizieren bestimmter Testverbindungen in dem gegenständlichen Assay, beispielsweise als potentielle Surrogat- bzw. Ersatzstoffliganden oder Rezeptor-Antagonisten, wird der Fachmann, der den vorliegenden Assay ausübt, fortfahren, die Wirksamkeit und Spezifität der ausgewählten Verbindungen sowohl in vitro als auch in vivo zu testen. Gleichgültig, ob für nachfolgendes In-vivo-Testen oder zur Verabreichung an ein Tier als zugelassener Arzneistoff können im vorliegenden Assay identifizierte Mittel in pharmazeutischen Zubereitungen zur in vivo-Verabreichung an ein Tier, vorzugsweise einen Menschen, formuliert werden.

[0280] Die im vorliegenden Assay selektierten Verbindungen oder pharmazeutisch verträgliche Salze hiervon können demgemäß zur Verabreichung mit einem biologisch akzeptablen Medium formuliert werden, wie bei-

spielsweise Wasser, gepufferte Salzlösung, Polyol (beispielsweise Glycerol, Propylenglycol, flüssiges Polyethylenglycol und dergleichen) oder geeigneten Gemischen hiervon. Die optimale Konzentration des aktiven Inhaltsstoffs (Inhaltsstoffe) im ausgewählten Medium kann empirisch bestimmt werden, gemäß Verfahren, die dem Medizinchemiker wohl bekannt sind. Wie hierin verwendet schließt „biologisch akzeptables Medium“ jedes und alle Lösungsmittel, Dispersionsmedien und dergleichen ein, die für den erwünschten Verabreichungsweg der pharmazeutischen Zubereitung geeignet sein können. Die Verwendung solcher Medien für pharmazeutisch aktive Substanzen ist in der Technik bekannt. Ausgenommen insofern, als irgendwelche herkömmlichen Medien oder Mittel mit der Aktivität der Verbindung inkompatibel sind, wird deren Verwendung in der pharmazeutischen Zubereitung der Erfindung ins Auge gefasst. Geeignete Trägerstoffe und deren Formulierung, einschließlich anderer Proteine, sind beispielsweise im Buch Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA 1985) beschrieben. Diese Trägerstoffe schließen injizierbare „Depotformulierungen“ ein. Auf Grundlage des Obigen schließen solche pharmazeutischen Zubereitungen, obwohl nicht ausschließlich, Lösungen oder gefriergetrocknete Pulver der Verbindung in Verbindung mit einem oder mehreren pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmitteln ein und sind in gepufferten Medien bei einem geeigneten pH enthalten und sind mit physiologischen Flüssigkeit isoosmotisch. In einer bevorzugten Ausführungsform kann die Verbindung in einer sterilen Zubereitung zur topischen und/oder systemischen Verabreichung angeordnet sein. Im Falle gefriergetrockneter Zubereitungen kann ein Unterstützen von Trägerstoffen wie beispielsweise, jedoch nicht ausschließlich, Mannitol oder Glycin verwendet werden und geeignete gepufferte Lösungen des erwünschten Volumens werden bereitgestellt werden, um adäquate isotonische gepufferte Lösungen des erwünschten pHs bereitzustellen. Ähnliche Lösungen können ebenfalls für die pharmazeutischen Zusammensetzungen von Verbindungen in isotonischen Lösungen des erwünschten Volumens verwendet werden und schließen ein, jedoch nicht ausschließlich, die Verwendung gepufferter Salzlösungen mit Phosphat oder Citrat in geeigneten Konzentrationen, um isotonische pharmazeutische Zubereitungen des erwünschten pHs zu allen Zeitpunkten zu gewinnen (beispielsweise neutraler pH).

Beispiele

[0281] Die Erfindung wird nunmehr unter Bezugnahme auf die nachfolgenden Beispiele besser verständlich werden, die lediglich zu Veranschaulichungszwecken bestimmter Aspekte und Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung mitaufgenommen wurden und die Erfindung nicht einschränken sollen. Alle Patente, veröffentlichten Patentanmeldungen und anderen Bezugnahmen, die hierin offenbart sind, sind ausdrücklich durch Bezugnahme mitaufgenommen.

Beispiel 1: Entwicklung von Assays zur Bar1-Proteaseaktivität

[0282] Dieses Beispiel beschreibt die Entwicklung von Assays zur Erleichterung der Verwendung der Bar1-Protease als Anzeige für die Induktion des Pheromonreaktions-Weges in *S. cerevisiae*. Das *S. cerevisiae*-BAR1-Gen codiert eine Protease, die das Hefe- α -Faktor-Peptidpheromon erkennt und spaltet. Bar1p spaltet das reife 13 Aminosäure- α -Faktor-Peptid zwischen den Resten 6 und 7 (Leu-Lys), und macht das Pheromon inaktiv. Bar1p weist drei Merkmale auf, die es potentiell als Ablesesystem nützlich machen: (1) Das BAR1-Gen wird durch Signalgebung durch den Pheromonreaktions-Weg induziert. (2) Bar1p wird sezerniert und (3) Bar1p ist ein katalytisches Enzym, das die Signalamplifikation ermöglicht (Review von Sprague und Thorner in *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*, Bd. 2, 1992).

Stamm-Konstruktion

[0283] Um die Entwicklung eines Assays für die Bar1p-Aktivität zu erleichtern, wurde das BAR1-Gen in zwei Hefeexpressionsplasmide kloniert. Eines, ein Low-Copy-Vektor, bei dem das Gen unter seinem Promotor steht, und das andere, ein High-Copy-Vektor, bei dem das Gen durch den starken konstitutiven *S. cerevisiae* PGK-Promotor gesteuert wird. Beide Plasmide enthalten das *S. cerevisiae*-LEU2-Gen, um eine Selektion in Hefe aufrechtzuerhalten. Die Primer:

#1- 5' CTAATCTCGAGTTAAGAAGGCCGTT 3' (SEQ ID NO: 1)

und

#2- 5' GTTAAGGATCCTGTACTCCAGATTT 3' (SEQ ID NO: 2)

wurden dazu verwendet, um die Basen -480 bis 1760 des BAR1-Gens von genomischer Hefe-DNA zu amplifizieren. Das amplifizierte Produkt trägt eine Xho1-Stelle an seinem 5'-Ende, eine BamH1-Stelle an seinem 3'-Ende und enthält den vollständigen Bar1-Openreading-Frame bzw. offenes Leseraster ebenso wie alle Promotorelemente, von denen bekannt ist, dass sie die BAR1-Expression beeinflussen (Kronstad et al., *Cell* 1987). Das Produkt wurde mit Xho und BamH1 digeriert und in einen Hefeexpressionsvektor subkloniert

(pRS415, hierin als Cadus 1014 bezeichnet; siehe beispielsweise Sikorski und Hieter, 1989, Genetics, 122: 19) das mit Xho1 und BamH1 digeriert wurde. Das sich ergebende Plasmid wurde als Cadus 3974 bezeichnet.

[0284] Um das PGK-BAR1-Expressionsplasmid zu erzeugen, wurden Primer Nr. 2 und Primer #3- 5' GATATCGTCTCACATGTCTGCAATTA 3' (SEQ ID NO: 3) dazu verwendet, Sequenzen zu amplifizieren, die nur das BAR1-offene-Leseraster aus dem PCR-Produkt, das oben beschrieben wurde, codieren. Das Produkt trägt eine BsmB1-Stelle (Digestion mit BsmB1 hat einen NcoI-kompatiblen Überhang zur Folge) an seinem 5'-Ende und ein BamH1-Ort an seinem 3'-Ende. Das Produkt wurde mit BsmB1 und BamH1 digeriert und in Cadus 1651 subkloniert, das mit Nco1 und BamH1 digeriert wurde. Das sich ergebende Plasmid wurde als Cadus 3975 bezeichnet.

[0285] Cadus 1014, 3974, 1651 und 3975 wurden in Cadus 579 (MAT α Bar1::hisG::URA3 trp1 leu2 ura3 his3 FUS1::HIS3 sre14::TRP1) eingebracht, ein Hefestamm, dem seine eigene Kopie des BAR1-Gens fehlt.

Bar1-Plattenassay

[0286] Ein halb-quantitativer Plattenassay wurde dazu verwendet, die Bar1p-Aktivität zu messen. Obwohl Bar1p aus irgendeiner Quelle in diesem Assay verwendet werden kann, wurde in diesem Beispiel Bar1p, produziert von CY 11362 (Cadus 579, das Cadus 397 enthält) verwendet. CY-11362-Zellen wurden bis zur Sättigung über Nacht in SD-LEU-Medium gezüchtet. Die Zellen wurden aus der Kultur durch Filtration entfernt. Die Aktivität von Bar1p in den konditionierten Medien wurde durch Tüpfel von 2 μ l auf eine Bar1-Assayplatte (unten beschrieben) gemessen. Um die Empfindlichkeit des Assays zu bestimmen, wurden acht Zweifach-Serienverdünnungen des konditionierten Mediums durchgeführt und 5 μ l jeder Verdünnung wurde auf die Assayplatte aufgebracht.

[0287] Die Assayplatten wurden wie folgt hergestellt. CY-579-Zellen wurden über Nacht in YEPD-Medium gezüchtet. Die Über-Nacht-Kulturen wurden bis zu OD₆₀₀ 0,1 verdünnt und einige Stunden wachengelassen (bis zu OD₆₀₀ 0,4). Die Zellen wurden dann auf OD₆₀₀ 0,1 in H₂O verdünnt und 5 ml wurden auf eine YEPD + α -Faktor-Platte gegossen (1 μ g α -Faktor verteilte sich gleichmäßig auf der Oberfläche einer YEPD-Platte knapp vor der Anwendung), wurde einige Minuten stehengelassen und abgegossen. Dies hat die Bildung eines konfluenten und gleichmäßigen Zellrasens auf der YEPD + α -Faktor-Platte zur Folge. Die konditionierten Medien wurden dann auf die Assayplatte aufgebracht und die Platte wurde bei 30°C für 1–2 Tage inkubiert.

[0288] Weil CY 579 das BAR1-Gen fehlt, ist es gegenüber α -Faktor überempfindlich, was einen Wachstumsstopp auf der YEPD + α -Faktor-Platte zur Folge hat. Wenn die auf den Rasen aufbrachten konditionierten Medien eine Bar1p-Aktivität enthalten, wird der α -Faktor in diesem Bereich zerstört und ermöglicht das Wachstum der CY-579-Zellen.

[0289] Unter Verwendung dieses Assays können zweifache Unterschiede in der Bar1-Aktivität über einen hundertfachen Konzentrationsbereich unterschieden werden. Somit ist dieser Assay zur Bereitstellung einer Aktivierung des Pheromonreaktions-Wegs in Zellen von Nutzen, die nur das endogene BAR1-Gen exprimieren. Die Reihen von Reihenverdünnungen von CY-11362-konditionierten Medien, die in diesem Beispiel beschrieben sind, werden dazu verwendet, eine Standardkurve zu erzeugen und um somit ein halb-quantitatives Assay für die Bar1p-Aktivität bereitzustellen. Zu diesem Zwecke wurde ein großer Pool von CY-11362-konditionierten Medien hergestellt und Teilmengen wurden zur Verwendung in anschließenden Experimenten eingefroren.

Fluoreszierende Bar1-Substrate

[0290] Zwei neue fluoreszierende Substrate wurden entwickelt, um die Aktivität der Bar1p-Protease in Flüssigkeitsassays zu überwachen, die einem High-throughput-Screening gegenüber zugänglich sind. Jedes dieser Substrate schließt die Bar1p-Peptid-Erkennungssequenz ein und wurde so entwickelt, dass die Spaltung von Bar1 ein deutliches Fluoreszenzsignal zur Folge hat. Das erste Signalsubstrat, nämlich DABCYL-(GABA)-Trp-Leu-Gln-Leu-Lys-Pro-Gly-Gln-Pro-Met-Tyr-EDANS (SEQ ID NO: 4) basiert auf einem Substrat für die HIV-1-Protease (Matayoshi et al., Science, 1990). Das Substrat besteht aus einem Peptid, das die Bar1p-Erkennungssequenz mit einem fluoreszierenden Donor, nämlich 5-[(2-Aminoethyl)amino]naphthalin-1-sulfonsäure (EDANS) und einem Lösungsakzeptor, nämlich 4-(4-Dimethylamino-phenylazo)benzoesäure (DABCYL) gebunden an den COOH- bzw. NH₂-Termini, enthält. Die intrinsische Fluoreszenz von EDANS wird erwarteterweise dramatisch in diesem Substrat reduziert, wegen einer intramolekularen Fluoreszenzresonanzenergieübertragung (FRET) an die DABCYL-Gruppe. Weil FRET jenseits von

Distanzen von 100 Å insignifikant wird, wird die Fluoreszenz von EDANS nach Spaltung des Peptids wiederhergestellt (Matayoshi et al., Science, 1990).

[0291] Das zweite Substrat

Cbz-Trp-Leu-Gln-Leu-Lys-Pro-Gly-Gln-Pro-Met-Tyr-NH₂-Rhodamin (SEQ ID NO: 5) basiert auf einem Substrat für die Adenovirus-Proteinase (McGrath et al., Virology, 1996). Freies Rhodamin oder mono-substituiertes Rhodamin existiert in erster Linie als hoch fluoreszierendes Chinon. Jedoch existiert bis-substituiertes Rhodamin als tatsächlich nicht fluoreszierendes Lacton (McGrath et al., Virology, 1996). Somit zeigt das bis-substituierte Bar1p-Substrat eine sehr geringe Fluoreszenz. Dieses Substrat kann in einem gekoppelten Assay verwendet werden, das eine Spaltung zunächst durch Bar1p und dann durch zugesetzte Aminopeptidase einschließt. Die Peptide auf dem Substrat werden vor einer Spaltung durch Aminopeptidasen geschützt. Die Spaltung des Peptids mit Bar1p macht das übrige Rhodamin-gebundene Peptid gegenüber einer Spaltung durch zugesetzte Aminopeptidase empfindlich. Die Aminopeptidase-Entfernung des Peptids von Rhodamin hat die Produktion von hoch fluoreszierenden mono-substituierten und freien Rhodamin-Molekülen zur Folge.

Zymogen-Aktivierungsassays

[0292] In einer zusätzlichen Ausführungsform kann die Bar1-Aktivität durch Untersuchen der Aktivierung eines Enzymvorläufers zu einem aktiven Enzym gemessen werden. Zymogene sind Enzymvorläufer, die nach spezifischer, begrenzter proteolytischer Behandlung aktiv werden. Eine Bar1-empfindliche Stelle (beispielsweise die Sequenz von ungefähr 9–10 Aminosäuren von Hefe- α -Faktor einschließlich der Leu-Lys-Sequenz) wird zwischen der Vorläuferpro-Region eines Zymogens und der reifen (aktiven) Proteinsequenz durch gentechnische Standardtechniken eingebracht. Eine Behandlung des Zymogens mit Bar1p setzt dann aktives Enzym aus dem Zymogen frei. Unter Verwendung dieses Nachweisverfahrens können Hefezellen oder Überstände aus Hefezellen, die durch eine Verbindung zur Herstellung von Bar1 stimuliert wurden, auf ihr Vermögen hin getestet werden, ein Zymogen zu aktivieren. Die Zymogen-Aktivität wird dann durch Verfahren gemessen, die dem Fachmann auf dem Gebiet wohl bekannt sind. Beispiele für Zymogene, die in solchen Assays nützlich sein können, schließen Trypsinogen, Plasminogen, Prothrombin, Pepsinogen, Fibrinogen und Hefecarboxypeptidase Y ein.

[0293] Das obige System kann ebenfalls für eine intrazelluläre Zymogen-Verarbeitung angepasst werden. Die Bar1-Protease kann zytoplasmatisch durch Aufschneiden der Sequenzen exprimiert werden, die für die Sekretion aus dem Gen notwendig sind, was eine intrazelluläre Expression des reifen BAR1-Proteins zur Folge hat. Die Zellen, die dieses intrazelluläre Bar1p exprimieren, werden dann gentechnisch verändert, sodass sie intrazellulär Zymogen mit einer Bar1p-empfindlichen Spalt- und Aktivierungsstelle wie oben beschrieben coexprimieren.

[0294] Die Fusion des bakteriellen Lac-Alpha-Fragmentes mit einem großen Peptid oder Protein macht es unmöglich, mit diesem eine Komplementierung mit dem Lac-Omega-Fragment durchzuführen (dies ist die Basis der Blau-Weiß-Unterscheidung von In-frame-Insertionsklonen in Lac-Alpha-Vektoren). Wenn jedoch eine solche Fusion von Lac-Alpha mit einem anderen Peptid oder Protein einen Bar1-empfindlichen Ort nahe der Fusionskreuzung derart aufweist, dass eine Behandlung mit Bar1p ein funktionelles Lac-Alpha-Peptid freisetzt, das nunmehr zu einer Lac-Alpha-Omega-Komplementierung in der Lage ist. Die β -Galactosidase-Enzymaktivität kann durch irgendeines einer Vielzahl üblicherweise verwendeter Verfahren nachgewiesen und gemessen werden, wobei das am meisten bevorzugte ein chromogener Assay auf Grundlage einer Indigo-Farbstoffbildung ist, nach Behandlung des Xgal-Substrats. Dieses System kann in die Zymogen-Ausführungsform wie oben eingebaut werden, was sowohl β -Galactosidase- als auch Zymogen-Ablesungen erlaubt.

Beispiel 2: Nachweis der Ste2p-Aktivierung unter Verwendung des Bar1-Plattenassays

[0295] Dieses Beispiel demonstriert die Nützlichkeit des Bar1-Plattenassays zum Überprüfen einer Agonisten-induzierten Aktivierung des *S. cerevisiae*-Pheromonrezeptors, Ste2p.

Stammkonstruktion

[0296] Zunächst wird das Gen, das das *S. cerevisiae*-G α , GPA1, codiert, in das Genom von CY 8034 (MATa gpa1*1162far1-1 ste2*1154 ste14::trp1::LYS2 fus1-HIS3 ura3 trp1 leu2 lys2 his3 ade2-1 met1) durch Transformation mit einem Integrationsplasmid, das GPA1 (Cadus 3907) integriert, eingebracht, was CY 11364 erzeugt. Als nächstes wurde das Gen, das das *S. cerevisiae*-RGS-Protein, SST2, codiert, in diesem Stamm zerstört,

um CY 11645 zu erzeugen. Weil Sst2p in die Desensibilisierung des Pheromonreaktions-Weges involviert ist, hat seine Zerstörung einer erhöhte Signalgebung durch den Weg zur Folge (Review von Sprague und Thomer in *Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*, Bd. 2, 1992).

[0297] Ein High-Copy-Ste2-Expressionsplasmid wurde wie folgt konstruiert. Das 4,3kb-BamH1-Fragment, das das gesamte STE2-Gen enthielt, wurde aus dem Hefeexpressionsplasmid Yep24-STE2 ausgeschnitten (bezogen von J. Thomer, Univ. von Californien Berkeley) und in den BamH1-Ort von pRS425 (Cadus 1018) kloniert (Sikorski und Heiter, *Genetics*, 1989). Das sich ergebende Plasmid, Cadus 2456, und die Vektorkontrolle, Cadus 1018, wurden darauf in CY 11645 eingebracht, um CY 11728 bzw. CY 11727 zu erzeugen.

Detektion der Ste2p-Aktivierung unter Verwendung des Bar1-Plattenassays

[0298] Über-Nacht-Kulturen von CY 11727 und CY 11728 wurden in SD-LEU-Medium bis zu einem OD₆₀₀ von 0,2 verdünnt, und für einige Stunden bei 30°C wachengelassen (bis zu einem OD₆₀₀ 0,4). Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt, mit 1X SD-LEU-Medium gewaschen und in 2 ml SD-LEU-Medium resuspendiert. Die Kulturen wurden in Hälften aufgeteilt und α -Faktor (10 μ g) wurden in einer Teilmenge zugesetzt und Trägerstoff (in diesem Falle H₂O) wurde dem anderen zugesetzt. Nach 2 Stunden Inkubation bei 30°C wurden die Zellen entweder durch vier aufeinanderfolgende Runden der Zentrifugation oder durch Filtration entfernt und 5 μ l konditionierte Medien wurden auf eine Bar1-Assayplatte (beschrieben in Beispiel 1) aufgebracht. Eine Standardkurve wurde ebenfalls mit jedem Experiment durchgeführt (in Beispiel 1 beschrieben), um die Ergebnisse zu quantifizieren.

[0299] Eine geringe oder keine Bar1p-Aktivität wurde in konditionierten Medien aus Zellen nachgewiesen, denen das Ste2p-Expressionsplasmid fehlt. In Zellen, die Ste2p exprimieren, hatte eine Exposition gegenüber Agonisten eine größer als achtfache Zunahme der Bar1p-Aktivität zur Folge. Diese Daten zeigen, dass der Bar1-Plattenassay zum Nachweis der Aktivierung des *S.-cerevisiae*-G-Protein-gekoppelten Rezeptors Ste2p verwendet werden kann. Durch Analogie kann dieser Assay verwendet werden, um die Aktivierung irgendeines Rezeptors (einschließlich nicht homologer, beispielsweise Säugetier-GPCRs), gekoppelt an *S.-cerevisiae*-Pheromonreaktions-Wege, zu verwenden.

Beispiel 3: Nachweis der Melatonin-1b-Rezeptoraktivierung in *S. cerevisiae* unter Verwendung des Bar1-Plattenassays

[0300] Dieses Beispiel demonstriert die Nützlichkeit des Bar1-Plattenassays zum Nachweisen der Aktivierung von Säugetier-G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die an den *S.-cerevisiae*-Pheromonreaktions-Weg gekoppelt sind. Für diesen Zweck wurden Hefestämme, die Melatonin-1b-Rezeptor exprimieren, konstruiert.

Plasmid und Stammkonstruktion

[0301] Ein Plasmid, pcDNA3-hML1b, das den vollständigen Open-Reading-Frame des humanen Melatonin-1b-Rezeptors enthält, wurde als geeignete Genquelle verwendet. Die Sequenz des Melatonin-1b-Rezeptors ist in der Technik bekannt (siehe beispielsweise Genbank Zugangsnummer U253451). Die Primer 5' CCTCCGGTCTCCCATGTGAGAACGGCTCCTT 3' (SEQ ID NO: 6)

und

5' CCTCCGGTCTGGGATCCGAGAGCATCTGCCTGGTGC 3' (SEQ ID NO: 7)

wurden dazu verwendet, die Rezeptorsequenzen aus diesem Plasmid zu amplifizieren. Das amplifizierte Produkt trägt Bsal-Stellen sowohl an den 5'- als auch 3'-Enden. Eine Digestion mit Bsal hatte ein Produkt mit einem NcoI-kompatiblen Überhang am 5'-Ende und einen BamHI-kompatiblen Überhang am 3'-Ende zur Folge. Dieses Produkt wurde Gel-gereinigt und in Cadus 1651 subkloniert, der mit NcoI und BamHI digeriert wurde. Das sich ergebende Plasmid wurde als Cadus 3693 bezeichnet.

[0302] Cadus 1651 und 3693 wurden in CY 11645 transformiert (beschrieben in Beispiel 2), um CY 11729 bzw. CY 11730 zu erzeugen. Um zu verifizieren, dass Melatonin-1b-Rezeptoren, exprimiert in CY 11730, dazu in der Lage sind, durch Agonisten aktiviert zu werden und dass diese Aktivierung eine Signalgebung durch den Pheromonreaktions-Weg zur Folge hat, wurde die Expression des integrierten FUS1-HIS3-Reporters überprüft. Rasen von CY-11729- und CY-11730-Zellen wurden auf SD-LEU-HIS-pH-6,8-Platten auf SD-LEU-pH-6,8-Über-Nacht-Kulturen wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt. Nach Präparation der Rasen wurde Melatonin (20 μ g) auf die Platten aufgetüpfelt und die Platten wurden bei 30°C über Nacht inkubiert. Nur Zellen, die das Melatonin-1b-Expressionsplasmid (CY 11630) enthielten, wuchsen, und diese Zellen wuchsen nur innerhalb der Diffusionszone des aufgetropften Melatonins. Diese Daten zeigen die funktionelle Express-

sion des humanen Melatonin-1b-Rezeptors in Hefe und die Kopplung dieses Rezeptors an den Pheromonreaktions-Weg.

Nachweis von Melatonin-1b-Rezeptoraktivierung unter Verwendung des Bar1-Plattenassays

[0303] Über-Nacht-Kulturen von CY 11729 und CY 11730 wurden in SD-LEU-pH-6,8-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,2 verdünnt und für wenige Stunden bei 30°C wachengelassen (bis OD_{600} 0,4). Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt, einmal mit SD-LEU-pH-6,8-Medium gewaschen und in 2 ml SD-LEU-pH-6,8-Medium resuspendiert. Melatonin (10 µg) wurden einer Teilmenge zugesetzt und Trägerstoff (in diesem Falle DMSO) wurde dem anderen Teil zugesetzt. Nach 4 Stunden Inkubation bei 30°C wurden die Zellen durch vier aufeinanderfolgende Zentrifugationsrunden oder durch Filtration entfernt und 2 µL der konditionierten Medien wurden auf eine Bar1-Assayplatte (oben beschrieben) aufgebracht. Eine Standardkurve wurde ebenfalls bei jedem Experiment bestimmt, um die Ergebnisse zu quantifizieren. Eine geringe oder keine Bar1p-Aktivität wurde in konditionierten Medien aus Zellen nachgewiesen, denen das Melatonin-1b-Rezeptor-expressionsplasmid fehlte.

[0304] In mehreren Experimenten führte der Zusatz von 10 µg Melatonin zu Zellen, die den Rezeptor exprimieren, zu einer ungefähr zwei- bis achtfachen Induktion von Bar1p. Somit kann der Bar1-Plattenassay dazu verwendet werden, die Aktivierung von Säugetier-G-Protein-gekoppeltem Rezeptor in *S. cerevisiae* nachzuweisen.

Beispiel 4: Nachweis der C5a-Rezeptoraktivierung in *S. cerevisiae* unter Verwendung des Bar1-Plattenassays

[0305] In diesem Beispiel wird die C5a-Rezeptoraktivierung unter Verwendung des Bar1-Plattenassays in einem Hefestamm untersucht, der die Chimäre $G\alpha$, GPA1₄₁-Gai3 exprimiert.

Stammkonstruktion

[0306] Die Chimäre $G\alpha$, GPA1₄₁-Gai3 wurde in den GPA1-Locus von CY 8034 eingebracht, um CY 11365 zu erzeugen. Um die Integration zu verifizieren, wurde die Expression des FUS1-HIS3-Reporters in CY 8034 und CY 11365 verglichen. Weil CY 8034 ein $G\alpha$ -Protein nicht exprimiert, wird der Pheromonreaktions-Weg konstitutiv in diesem Stamm aktiv. Somit würde erwartet werden, dass die Integration von GPA1₄₁-Gai3 die Expression des Reporters senken würde. Wie erwartet, wurde die Reporter-Expression in CY 11365 reduziert, sie wurde jedoch nicht vollständig eliminiert. Die Restaktivität ist wahrscheinlich auf eine unvollständige Kopplung der GPA1₄₁-Gai3-Chimäre an Hefe-G $\beta\gamma$ zurückzuführen.

[0307] Cadus 1303, ein High-Copy-Hefeexpressionsvektor, der den C5a-Rezeptor Open-Reading-Frame fusioniert an den Hefe-PGK-Promotor enthält und Cadus 1289, die Vektorkontrolle, wurden in CY 11365 transformiert, um CY 11458 bzw. CY 11457 zu erzeugen. Die Expression des FUS1-HIS3-Reporters in diesen Zellen unter Verwendung des Merck-C5a-Rezeptoragonisten, CHA-CHA, wurde wie in Beispiel 2 überprüft. Wie erwartet, wuchsen nur Zellen, die den C5a-Rezeptor exprimieren (CY 11458) auf SD-LEU-HIS-pH-6,8-Platten, die 1 mM Aminotriazol enthielten und diese Zellen wuchsen nur innerhalb der Diffusionszone von aufgebrachtem CHA-CHA.

Nachweis von C5 α -Rezeptoraktivierung unter Verwendung des Bar1-Plattenassays

[0308] Über-Nacht-Kulturen von CY 11457 und CY 11458 wurden in SD-LEU-pH-6,8-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,2 verdünnt und für einige Stunden bei 30°C wachengelassen (bis OD_{600} 0,4). Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt, einmal mit SD-LEU-pH-6,8-Medium gewaschen und in 2 ml SD-LEU-pH-6,8-Medium resuspendiert. CHA-CHA (10 µg) wurden einer Teilmenge zugesetzt und Trägerstoff (in diesem Falle DMSO) wurde dem anderen Teil zugesetzt. Nach 4 Stunden Inkubation bei 30°C wurden die Zellen entweder durch vier aufeinanderfolgende Runden einer Zentrifugation oder durch Filtration entfernt und 5 µl der konditionierten Medien wurden auf eine Bar1-Assayplatte (beschrieben in Beispiel 1) aufgebracht. Eine Standardkurve wurde jedem Experiment bestimmt, um die Ergebnisse zu quantifizieren. Eine Exposition von Zellen, die C5a-Rezeptor exprimieren, gegenüber CHA-CHA, hatte eine erhöhte Bar1p-Aktivität zur Folge, obwohl die Induktion weniger als diejenige war, die bei Ste2p oder Melatonin-1b-Rezeptoren ersichtlich war.

Beispiel 5: Nachweis einer Bar1p-vermittelten Proteindegradation

[0309] Dieses Beispiel veranschaulicht eine Ausführungsform der vorliegenden Assays, bei der Enzym-ver-

mittelte Spaltung von α -Faktor durch Bar1p dazu verwendet werden kann, die Stabilität eines Substrats zu kontrollieren, das als selektierbares Ereignis verwendet werden kann. Die Spaltung eines α -Faktors durch Bar1p lässt einen N-terminalen Lysin-Rest zurück. Proteine mit Lysin an ihrem End-Terminus zeigten sich als in Hefe instabil (Bachmair und Varshavsky, 1989, Cell 56: 1019). Deswegen können chimäre Substratproteine, deren Stabilität in Hefe durch die Konzentrationen an Bar1p kontrolliert wird, konstruiert werden. Die α -Faktor-Peptidsequenz wird in den Open-Reading-Frames eines einfach zu untersuchenden Proteins eingebracht. Die Bar1p-Induktion verursacht dann eine Spaltung der α -Faktor-Sequenz innerhalb des chimären Substrates und einen Abbau des Substrates durch den N-Ende-Regel-Weg.

[0310] Die α -Faktor-Peptidsequenz wird an den N-Terminus eines Modellsubstrates fusioniert, beispielsweise an LacZ, unter Verwendung von Standard-DNA-Rekombinationstechniken. Das Konstrukt wird unter der Kontrolle eines konstitutiven, moderat exprimierten Promotors in einem Hefeexpressionsvektor angeordnet. Dieser Vektor wird in Hefezellen eingebracht, in denen eine Bar1p-Aktivität nach Stimulierung mit einer geeigneten Testverbindung induziert werden kann, und LacZ (entweder Enzymaktivität oder Proteinkonzentration) wird darauf in Zellen überprüft, die mit den Testverbindungen in Berührung gebracht wurden. Testverbindungen, die Bar1p induzieren, werden auf Grundlage der gesenkten Stabilität des chimären LacZ-Substrates ausgewählt.

[0311] In alternativen Ausführungsformen kann LacZ beispielsweise mit einem essentiellen Gen ersetzt werden (um eine Negativselektion für die Bar1p-Aktivität bereitzustellen) oder mit einem Repressorprotein, (um eine positive Selektion für eine Bar1p-Aktivität bereitzustellen).

[0312] In bestimmten Ausführungsformen des Assays kann es wünschenswert sein, die Signale zur Sekretion zu entfernen, die am N- und C-Terminus von Bar1p vorliegen, um dadurch ein Targeting von Bar1p in die Sekretionsmaschine zu hemmen. Dies ermöglicht einen größeren Zugang von Bar1p zum chimären Substrat, das in Zytoplasma vorliegt.

Beispiel 6: Konstruktion von PHO4/STE12-Chimären

[0313] Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion von Hefeexpressionsplasmiden, die eine Reihe von PHO4/STE12-Chimären codiert. Diese Chimären werden dazu verwendet, ein einfach zu untersuchendes Genprodukt herzustellen, wobei die sezernierte saure Phosphatase Pho5p Pheromon-induzierbar ist. Veränderungen der Genexpression als Folge der Pheromoninduktion werden durch den Ste12b-Transkriptionsfaktor vermittelt. In Gegenwart von Pheromonsignalgebung wird Ste12p ein potenter Transkriptionsaktivator von Genen, deren Promotoren eine wohl definierte DNA-Bindungsstelle enthalten (das Pheromon-Respons-Element oder ERP) (Review von Sprague und Thoe in The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces, Bd. 2, 1992). Der Transkriptionsfaktor Pho4p wird aktiviert, wenn Zellen bezüglich Phosphat abgereichert sind. Einmal aktiviert, bindet Pho4p an Promotorelemente in mehreren Genen, einschließlich Pho5, und induziert deren Transkription (Review von Johnson und Carlson in the Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces, Bd. 2, 1992). Chimäre Transkriptionsfaktoren, die die Transkriptionsaktivierungsdomänen von Ste12p enthalten, wurden durch Fusionieren von Regionen von Ste12p mit der DNA-Bindungsdomäne von Pho4p konstruiert. Die Expression dieser Chimären in Hefe hat eine Induktion der Pho5-Expression zur Folge, wenn der Pheromonreaktions-Weg aktiviert wird. Diese Aktivität ist auf die Stimulierung durch die Ste12-Transkriptionsaktivierungsdomäne zurückzuführen, die mit dem Pho5-Promotor durch Pho4-DNA-Bindungsdomäne in Nachbarschaft gebracht wird. Die Expression von Pho5 kann einfach durch mehrere wohl definierte Verfahren zum Nachweisen von saurer Phosphatase-Aktivität untersucht werden.

[0314] Ein Hefeexpressionsplasmid wurde konstruiert, das den Hefe-ADH-Promotor enthält, fusioniert an Sequenzen, die ein 11 Aminosäure-Kernlokalisierungssignal und die PHO4-DNA-Bindungsdomäne codieren (Aminosäuren 227–312). Sequenzen, die die PHO4-DNA-Bindungsdomäne codieren, wurden aus genomischer Hefe-DNA unter Verwendung der Primer

5'CGACTAAGCTTATGGGTGCACCTCCTAAAAAGAAGAGAAAGGTAGCCCCGCACGGATCGAGCCAT 3'
(SEQ ID NO: 8)

und

5' CCGGAATTCCGTGCTCACGTTTC-3'. (SEQ ID NO: 9)

amplifiziert. Das PCR-Produkt codiert die Pho4-DNA-Bindungsdomäne flankiert von einer HindIII-Stelle und Sequenzen, die ein Kernlokalisierungssignal an ihrem 5'-Ende und eine EcoRI-Stelle an ihrem 3'-Ende codieren. Dieses Produkt wurde mit HindIII und EcoRI digeriert und Gel-aufgereinigt. Plasmid pCD72 (Cadus 3973) wurde von Dr. J. Broach gewonnen. Es ist ein High-Copy-Hefevektor, der den ADH-Promotor und Transkriptionsterminationssequenzen ebenso wie Sequenzen enthält die die GAL4-DNA-Bindungsdomäne codieren. Die Digestion dieses Plasmids mit HindIII und EcoRI hat drei Fragmente zur Folge; eines, das das Vektorgrundge-

rüst, den ADH-Promotor, flankiert von HindIII-Überhängen, enthält, ein zweites, das die ADH-Transkriptionsterminationssequenzen mit einem EcoRI-Überhang an seinem 5'-Ende und einem HindIII-Überhang an seinem 3'-Ende enthält, und ein drittes, das die GAL4-DNA-Bindungsdomäne mit einem HindIII-Überhang an einem 5'-Ende und einen EcoRI-Überhang an seinem 3'-Ende enthält. Die ersten beiden Fragmente wurden Gel-aufgereinigt und in einer Dreistück-Legierung mit dem digerierten und Gel-gereinigten PCR-Amplifikationsprodukt verwendet. Das sich ergebende Plasmid wurde als Cadus 4129 bezeichnet.

[0315] Fragmente von STE12 wurden in-frame 3' zur Pho4-DNA-Bindungsdomäne und 5' der ADH-Transkriptionsterminationssequenzen durch Verwendung entweder der EcoRI-Stelle, der EcoRI- und BamHI-Stellen oder der EcoRI- und PstI-Stellen in Cadus 4129 subkloniert. Die Auswahl von Ste12-Fragmenten basierte auf zwei Studien, von denen eine mit Fusionen zwischen Gal4-DNA-Bindungsdomäne und unterschiedlichen Regionen von Ste12 durchgeführt wurde (Song et al., Genes & Development, 1991) und eine, bei der Deletions- und Insertionsmutanten von Ste12 konstruiert und bezüglich ihrer Fähigkeit getestet wurden, eine Paarung und Transkriptionsaktivität gegenüber einem ste12 Δ -Stamm wiederherzustellen (Kirkman-Correia et al. Mol. Cell. Biol., 1993). Plasmide, die die unterschiedlichen Ste12-Fragmente codieren, wurden von Dr. S. Fields bezogen.

Plasmid	Region von Ste12p (Aminosäuren)
Cadus 4183	1-688 (ganzes Protein)
Cadus 4184	214-688
Cadus 4185	214-473
Cadus 4186	1-473
Cadus 4747	Insertion von Lys-Leu zwischen aa 85 & 86
Cadus 4553	Insertion von Ser-Leu zwischen aa 103 & 104
Cadus 4554	Δ 253-305
Cadus 4555	Δ 572-669
Cadus 4556	Δ 588-669

[0316] Cadus 4183 wurde durch Digerieren von pOF22 (GAL4-STE12 1-688) (Cadus 3918) mit EcoRI konstruiert, Das 2,8-kb-Fragment, das den gesamten STE12-Open-Reading-Frame enthielt wurde Gel-gereinigt und in den EcoRI-Ort von Cadus 4129 subkloniert. Cadus 4183 wurde durch Digerieren von pYZ1 (GAL4-STE12 214-688) (Cadus 3916) mit EcoRI konstruiert. Das 2,2-kb-EcoRI-Fragment, das die Aminosäuren 214-688 von Ste12p codiert, wurde Gel-gereinigt und in den EcoRI-Ort von Cadus 4129 subkloniert. Cadus 4185 wurde durch Digerieren von pYB1 (GAL4-STE12 214-473) (Cadus 3972) mit EcoRI und BamHI konstruiert. Das 780-bp-Fragment, das die Aminosäuren 214-473 von Ste12p codierte, wurde Gel-aufgereinigt und an Cadus 4129 ligiert, der mit EcoRI und BamHI digeriert wurde. Cadus 4186 wurde durch Digerieren von pOG4 (GAL4-STE12 1-473) konstruiert (Cadus 3919), mit EcoRI und BamHI. Das 1,42-kb-Fragment, das die Aminosäuren 1-473 von Ste12p codiert, wurde Gel-gereinigt und an Cadus 4129 ligiert, das mit EcoRI und BamHI digeriert wurde. Die Primer

5' CCGGAATTCATGAAAGTCCAAATAACC 3' and (SEQ ID NO: 10)

und

5' GCCTGCAGAATTATATTATATCAGGTTG 3' (SEQ ID NO: 11)

wurden dazu verwendet, die Insertions- und Deletionsmutanten von Ste12p zu amplifizieren. Die amplifizierten Produkte tragen EcoRI-Stellen an ihren 5'-Enden und PstI-Stellen an ihren 3'-Enden. Sie wurden mit EcoRI und PstI digeriert, Gel-gereinigt und an Cadus 4129 ligiert, das mit EcoRI und PstI digeriert wurde. Cadus 4747 enthält das amplifizierte Produkt von Plasmid ik85 (Cadus 3913), Cadus 4553 das Produkt von Plasmid ik103 (Cadus 3910), Cadus 4554 das Produkt von D11 (D253-305) (Cadus 3911), Cadus 4555, das Produkt von D7 (D512-699) (Cadus 3912) und Cadus 4556 das Produkt von D22 (D588-669).

Beispiel 7: Detektion der Ste2p-Aktivierung unter Verwendung der PHO4/STE12-Chimäre

[0317] Dieses Beispiel zeigt die Verwendung der PHO4/STE12-Chimäre (beschrieben in Beispiel 5) zur Induktion der Expression des PHO5-Genes, wenn der Pheromonreaktions-Weg aktiviert ist.

Stammkonstruktion

[0318] Das endogene PHO4-Gen wurde in Cy 1638 gestört (MAT α far1*1442 tbt1-1 FUS1-HIS3 trp1 ura3 leu2 his3 suc2) mit dem Gen, das eine Kanamycin-Resistenz codiert, nämlich KanMX2 (Yeast 10: 1793-1808),

Primer

5' GAGCAAAGGAGACAGAACAAGAGTAGCAGAAAGTCCAGCTGAAGCTTCGTACGC 3' (SEQ ID NO: 12)
und
5' CACGTGCTCACGTTCTGCTGTAGGTGACGGATGTAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG 3' (SEQ ID NO: 13)

wurden dazu verwendet, das KanMX2-Gen zu amplifizieren. Das Amplifikationsprodukt wurde durch Sequenzen flankiert, die den 5'- und 3'-Enden des PHO4-Gens entsprechen. Dieses DNA wurde in CY 1639 transformiert. Transformanten wurden auf YEPD + Geneticin (200 µ/ml) Platten selektiert. Die Störung von PHO4 in diesem Stamm, CY 9788, wurde durch Bestimmung der sauren Phosphatase-Aktivität in Zellen verifiziert, die auf Phosphat-depletiertem YEPD-Medium gezüchtet wurden (100 ml YEPD, 1 ml NH₄OH, 1 ml MgSO₄ (1 M); stehenlassen 30 Minuten; filtern) (Biscon und Thomer, Genetics (1982). Die saure Phosphatase-Aktivität wurde unter Verwendung des Überschichtungs- bzw. Overlay-Assays von Toh et al. (J. Bacteriol., 1973) bestimmt. Die Zellen wurden auf YEPD- oder Phosphat-depletierten YEPD-Platten aufgebracht und über Nacht wachsgelassen. Für jede Platte wurde ein Gemisch aus 2 ml geschmolzener 1%iger Agarose in 50 mM NaAc, pH 4,0, 700 µl H₂O und 300 µl α-Naphthyl saures Phosphat (50 mg/ml) hergestellt und auf die Platte aufgebracht. Danach wurde 1 ml D-Dianisidin Fast Blue Salt B (50 mg/ml in 50 mM NaAc, pH 4,0) auf die Platte gegossen. Das Ausmaß der Farbentwicklung ist ein Maß für die saure Phosphatase-Aktivität, die durch das Zellpflaster produziert wurde. Wie erwartet, wies CY 9788 eine viel niedrigere saure Phosphatase-Aktivität als CY 1638 auf.

[0319] Die kleine Menge an saurer Phosphatase-Aktivität, die bei CY 9788 beobachtet wurde, ist wahrscheinlich die von Pho3p. Das PHO3-Gen codiert ebenfalls eine sezernierte saure Phosphatase, jedoch wird dessen Expression nicht durch Pho4p reguliert. Anstelle dessen wird seine Expression unter Hoch-Phosphat-Bedingungen induziert und wird weiter durch Thiamin-Verarmung erhöht (Review von Vogel und Hinnen, 1990, Mol. Microbiol). Weil dieses Gen nicht essentiell ist und seine Gegenwart erfordern würde, dass alle Assays unter Bedingungen einer Phosphat-Verarmung durchgeführt werden, wurde es gestört, die Primer

5' CATGAAGCTTCTCCTACTACCAAGACTG 3' and (SEQ ID NO: 14)

5' GATCGAATTCGGTAATTTGGAATGGC 3' (SEQ ID NO: 15)

wurden dazu verwendet, Sequenzen am 5-Ende des PHO3-Gens zu amplifizieren. Das Amplifikationsprodukt, das eine HindIII-Stelle an seinem 5'-Ende und eine EcoRI-Stelle an seinem 3'-Ende trägt, wurde mit HindIII und EcoRI digeriert und Gel-aufgereinigt. Die Primer

5' GATCGAATTCCTGTTCCACCGGCC 3' and (SEQ ID NO: 16)

5' GATCTCTAGAGAGGCGATTGCTGTAATGC 3' (SEQ ID NO: 17)

wurden dazu verwendet, Sequenzen in den 3'-untranslatierten Bereich des PHO3-Gens zu amplifizieren. Das Amplifikationsprodukt, das eine EcoRI-Stelle an seinem 5'-Ende und eine XbaI-Stelle an seinem 3'-Ende trägt, wurde mit EcoRI und XbaI digeriert und Gel-gereinigt. Der URA3-markierte Integrationsvektor pRS406 (Cadus 1011) (Sikorski und Hieter, 1989, Genetics) wurde mit HindIII und XbaI digeriert, Gel-gereinigt und in einer Dreistück-Ligation mit den beiden PCR-Produkten verwendet. Das sich ergebende Zweischritt-Disruptions-Plasmid (Boeke et al., 1988), nämlich Cadus 4602, wurde mit HpaI digeriert und dazu verwendet, CY 9788 zu einer Uracil-Prototrophie zu transformieren. Eine anschließende Selektion nach Ura-Derivaten dieser Transformante unter Verwendung von S-FOA ergab CY 11643, das die Deletion des PHO3-Gens trug. Die Disruption von PHO3 in CY 11643 wurde durch Messen der Säurephosphatase-Aktivität auf YEPD-Platten und auf Phosphat, depletierten YEPD-Platten wie oben beschrieben verifiziert. Wie erwartet, wies die CY 11643 eine extrem niedrige Phosphatase-Aktivität auf beiden Platten auf. Die Aktivität seines Mutterstammes, nämlich CY 9788, war auf der YEPD-Platte sehr hoch (aufgrund des Vorliegens von Pho3p), jedoch auf der Phosphat-depletierten SD-Platte sehr niedrig (aufgrund des Fehlens von Pho4p). Zuletzt war die Aktivität des ursprünglichen Stammes, CY 1638, auf beiden Platten sehr hoch, was darauf hinweist, dass sowohl Pho4 als auch Pho3 gestört bzw. unterbrochen waren.

[0320] Die neun PHO4/STE12-chimären Plasmide (beschrieben in Beispiel 5) und Cadus 4129, das nur die Pho4-DNA-Bindungsdomäne codiert, wurden dann zu CY 11643 transformiert.

Detektion von Ste2p-Aktivierung durch Messung der Pho4p-Aktivität in Stämmen, die die PHO4/STE12-Chimären enthalten

[0321] Zellen wurden über Nacht in SD-TRP-Medien gezüchtet. Die Über-Nacht-Kulturen wurden auf einen OD₆₀₀ von 0,2 verdünnt und einige Stunden wachsgelassen (bis zu OD₆₀₀ 0,4). Die Kulturen wurden zur Hälfte (jeweils 2,5 ml) aufgespalten und α-Faktor (25 µg) wurde zu einer Teilmenge zugesetzt. Nach 2,5 Stunden bei 30°C wurden die Zellen durch Zentrifugation gesammelt, dreimal mit H₂O gewaschen, einmal mit 50 mM NaAc pH 4,0, und in 250 µl 50 mM NaAc pH 4,0 resuspendiert. Die saure Phosphatase-Aktivität wurde im We-

sentlichen wie von Torriani beschrieben bestimmt (Biochem. Biophys. ACTA, 1960). 100 µl Zellen wurden zu 400 µl p-Nitrophenolphosphat (1 mg/ml in 50 mM NaAc pH 4,0) zugesetzt. Nach 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden 270 µg gesättigte NaCO₃ zugesetzt, um die Reaktion zu stoppen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation entfernt und die optische Dichte bei 420 nm wurde bestimmt. Die Aktivitäten wurden bis zur optischen Dichte bei 600 nm von 100 µl Zellen in 900 µl H₂O normalisiert. Die Ergebnisse der beiden unabhängigen Experimente sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst:

Plasmid	- α-factor	+ α-factor
Cadus 4129	+/-	+/-
Cadus 4183	+/-	++
Cadus 4184	+++	++++
Cadus 4185	+++	++++
Cadus 4186	+	++
Cadus 4747	+/-	+
Cadus 4553	+	+++
Cadus 4554	+	++
Cadus 4555	+	+++
Cadus 4556	+/-	++

[0322] Zellen, die nur die Pho4p-DNA-Bindungsdomäne exprimieren (CY 11643 + Cadus 4129) (und keinen Ste12-Bestandteil), wiesen eine extrem niedrige saure Phosphatase-Aktivität auf, die nicht durch Exposition gegenüber α-Faktor erhöht wurde. Im Gegensatz hierzu wurde eine Pheromon-induzierbare saure Phosphatase-Aktivität in allen Stämmen beobachtet, die Pho4/Ste12-Chimären exprimieren. Zwei der Chimären, nämlich Pho4/Ste12 (214–473) (Cadus 4184) und Pho4/Ste12 (1–473) (Cadus 4185) wiesen ebenfalls hohe Konzentrationen einer konstitutiven Pho5p-Aktivität auf, jedoch nur ein zwei- bis vierfaches Induktionsverhältnis. Mehrere Chimären wiesen ähnliche Induktionsverhältnisse auf. Andere wiesen eine sehr niedrige konstitutive Aktivität und ähnliche Induktionsverhältnisse von fünf- bis zehnfach auf. Diese Daten zeigen, dass die Pho4/Ste12-chimären Transkriptionsfaktoren dazu verwendet werden können, das PHO5-Gen Pheromon-induzierbar zu machen. Als Erweiterung kann diese Ablesung dazu verwendet werden, die Aktivierung irgendeines G-Protein-gekoppelten Rezeptors, der in *S. cerevisiae* exprimiert wird, nachzuweisen, ebenso wie eine Aktivierung irgendeines Pheromonreaktions-Weg-Bestandteils, stromabwärts des Rezeptors. Eine solche Aktivierung kann auf eine Modulation durch eine Verbindung oder durch eine Protein-Protein-Interaktion zurückzuführen sein (beispielsweise durch Interaktion mit einem klonierten heterologen Genprodukt).

Beispiel 8: Funktionelle Expression eines Säugetier-G-Protein-gekoppelten Rezeptors und Liganden in einer Hefestamm

[0323] In diesen Beispiel wird die Konstruktion einer Hefezelle, die einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor exprimiert, und die zur Verwendung in der vorliegenden Assays geeignet ist, beschrieben. Dieses Beispiel weist folgende Einzelheiten au: (1) Expression des humanen C5a-Rezeptors in Hefe; (2) Expression des nativen Liganden dieses Rezeptors, des humanen C5a, in Hefe; und (3) Aktivierung des endogenen Hefe-Pheromon-Weges nach Stimulation des C5a-Rezeptors durch C5a, wenn diese beiden Moleküle innerhalb desselben Stammes einer autokrinen Hefe exprimiert werden. Im Anschluss sind die experimentellen Daten, die die Nützlichkeit autokriner Stämme der Hefe, die den humanen C5a-Rezeptor funktionell exprimieren, dargelegt.

[0324] Humanes C5a ist ein 74 Aminosäure-Polypeptid, das sich aus dem fünften Bestandteil eines Komplexes ableitet, während der Aktivierung der Komplementkaskade; es ist das Wirksamste der Komplement-abgeleiteten Anaphylatoxine. C5a ist ein starker Aktivator von Neurophilen und der Makrophagenfunktionen einschließlich zytotoxischer Superoxidradikale und der Induktion einer Chemotaxe und einer Anhaftung. Zusätzlich simuliert C5a die Kontraktion von glatten Muskeln, induziert die Degranulation von Mastzellen, induziert die Serotonin-Freisetzung aus den Blutplättchen und erhöht die Gefäßpermeabilität. Das C5a-Anaphylatoxin kann ebenfalls entzündliche Reaktionen durch Simulierung der Produktion von Zytokinen amplifizieren bzw. verstärken. Weil C5a ein hoch wirksames Entzündungsmittel ist, ist es das primäre Target zur Entwicklung

von Antagonisten, die zur Intervention bei einer Vielzahl von entzündlichen Prozessen verwendet werden sollen.

[0325] Der C5a-Rezeptor liegt auf Neutrophilen, Mastzellen, Makrophagen und glatten Muskelzellen vor und koppelt durch G-Proteine zur Übertragung von Signalen, die durch die Bindung von C5a initiiert werden.

Expression des C5a-Rezeptors

[0326] Das Plasmid pCDM8-C5aRc, das die cDNA-Sequenz trägt, die den humanen C5a-Rezeptor codiert, wurde von N. Gerard und C. Gerard (Harvard Medical School, Boston, MA) (Gerard und Gerard 1991) bezogen. Eine Sequenz, die C5a codiert, wurde auf diesem Plasmid durch PCR unter Verwendung von VENT-Polymerase gewonnen (New England Biolabs Inc., Beverly, MA), und unter Verwendung der nachfolgenden Primer:

#1-GGTGGGAGGGTGCTCCTCTAGAAGGAAGTGTTACC (SEQ ID NO: 18)

#2-GCCCAGGAGACCAGACCCATGGACTCCTTCAATTATACCACC (SEQ ID NO: 17)

[0327] Primer Nr. 1 enthält einen einzigen Basenpaar-Mismatch (unterstrichen) zur C5a-Rezeptor-cDNA. Er führt eine XbaI-Stelle (fettgedruckt) 201 Basenpaare stromabwärts des TAG-Stoppcodons der C5a-Rezeptor-codierenden Sequenz ein. Primer Nr. 2 enthält zwei Mismatch-Basen und dient dazu, eine NcoI-Stelle (fettgedruckt) zu erzeugen, die das ATG-Startcodon umgibt (doppelt unterstrichen). Die zweite Aminosäure wird von einer Asparaginsäure zu einem Asparagin-Rest verändert. Dies ist die einzige Veränderung der primären Aminosäuresequenz vom humanen Wildtyp-C5a-Rezeptor.

[0328] Das PCR-Produkt wurde mit NcoI und XbaI (Stellen fettgedruckt) eingeschränkt und in Cadus 102 (Yep51Nco) kloniert, ein Gal-10-Promotor-Expressionvektor. Die Sequenz des gesamten Insertes wurde durch Didesoxy-Sequenzierung unter Verwendung multipler Primer bestimmt. Die Sequenz zwischen den NcoI- und XbaI-Stellen erwies sich als mit der humanen C5a-Rezeptorsequenz identisch, die bei GenBank (Zugangsnummer J05327) hinterlegt wurde, mit Ausnahme solcher Veränderungen, die von den PCR-Primern codiert werden. Das C5a-Rezeptor-codierende Insert wurde auf CADUS 1289 (pLPXt) übertragen, ein PGK-Promotor-Expressionsvektor, unter Verwendung der NcoI- und XbaI-Stellen, um den C5a-Rezeptor-Hefeexpressionsklon, nämlich CADUS 1303, zu erzeugen.

[0329] Eine Version des C5a-Rezeptors, der eine Hefe-Invertase-Signalsequenz und eine mac-Epitop-Markierung an seinem Amino-Terminus enthält, wurde in Cadus 1270 transferierter Hefe unter Kontrolle eines GAL10-Promotors exprimiert. Plasmide, die eine nicht-markierte Version des C5a-Rezeptors und ein myc-markiertes Derivat von FUS1 codieren, dienten als Kontrollen. Die Expression des markierten Rezeptors in der Hefe wurde durch Western Blot unter Verwendung des anti-myc-monoklonalen Antikörpers 9E10 bestätigt. In der Bahn, die den Extrakt aus der Cadus-1270-Transformante enthielt, ist das Protein mit dem monoklonalen anti-myc-Antikörper 9E10 reaktiv, das eine Größe wie erwartet von ungefähr 40 kD aufweist. Es sei angemerkt, dass dieses Rezeptorkonstrukt nicht mit demjenigen identisch ist, das für die autokrinen Aktivierungsexperimente verwendet wird. Der Rezeptor ist nicht markiert, enthält keine Signalsequenz und wird durch den PGK-Promotor angetrieben.

Expression des Liganden C5a

[0330] Ein synthetisches Konstrukt der Sequenz, die C5a codiert, wurde von C. Gerard (Harvard Medical School, Boston, MA) bezogen. Dieses synthetische Gen wurde als FLAG-markiertes Molekül für die Sekretion von E. coli bezeichnet (Gerard und Gerard (1990), Biochemistry 29: 9274–9281). Die C5a-codierende Region, die noch den E.-coli-Condon-Bias enthält, wurde unter Verwendung von VENT-Polymerase amplifiziert (New England Biolabs Inc. Beverly, MA) durch 30 Zyklen bzw. Umläufe unter Verwendung der folgenden Primer:

C5a5' = CCCCTTAAGCGTGAGGCAGAAGCTACTCTGCAAAGAAGATC (SEQ ID NO: 20)

C5a3' = GAAGATCTTCAGCGGCCGAGTTGCATGTC (SEQ ID NO: 21)

[0331] Ein PCR-Produkt von 257 bp wurde Gel-isoliert, mit AflIII und BglIII restringiert und in CADUS 1215 kloniert (ein Expressionsvektor, der so entwickelt wurde, dass er Peptid-Sequenzen im Kontext von Mfa exprimiert), um CADUS 1297 zu ergeben. Die Homologie-Regionen zum synthetischen C5a-Gen sind unterstrichen. Der 5'-Primer enthält ebenfalls Prä-Pro- α -Faktor-Sequenz. Nach Translation und Prozessierung der Prä-Pro- α -Faktor-Sequenz sollte authentisches humanes C5a durch eine Hefe sezerniert werden, die CADUS 1297 enthält. Die Insertsequenz in CADUS 1297 wurde in beiden Richtungen durch das Didesoxy-Verfahren sequenziert und mit derjenigen, die durch die PCR-Primer vorausgesagt wurde, identisch befunden und mit

der publizierten Sequenz des synthetischen C5a-Gens (Franke et al. (1988), *Methods in Enzymology* 162: 653–668).

[0332] Die beiden Reihen von Experimenten demonstrierten abgesehen von der autokrinen Aktivierung von Hefe, die unten dargestellt ist, dass CADUS 1297 zur Expression von C5a in Hefe verwendet werden kann.

1) C5a wurde immunologisch sowohl in Kulturüberstand als auch lysierten Zellen unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Enzym-gebundenen Immunsorbent-Assays (ELISA) (Tabelle 1) nachgewiesen. Dieser Assay zeigte, dass die Konzentration von C5a im Kulturüberstand ungefähr 50–100 nM betrug. Im Vergleich hierzu ist in Daten, die von Säugetierzellen gewonnen wurden, die Bindung von C5a an seinen Rezeptor konstant 1 nM (Boulay et al. (1991), *Biochemistry* 30: 2993–2999).

2) C5a, exprimiert in Hefe, konkurrierte um die Bindung mit kommerziell bezogenen (Amersham Corporation, Arlington Heights, IL) radiomarkiertem C5a auf induzierten HL60-Zellen.

Aktivierung des Pheromon-Reaktions-Weges in autokriner Hefe, die humanen C5a-Rezeptor und humanes C5a exprimiert

[0333] Die Aktivierung des Hefe-Pheromonreaktions-Weges durch Interaktion von C5a mit dem C5a-Rezeptor wurde unter Verwendung eines Wachstums-Read-out demonstriert. Der zur Analyse verwendete Stamm, CY 455 (MAT α tbt1-1 ura3 leu2 trp1 his3 fus1-HIS3 can1 ste14::TRP1 ste3*1156) enthält die folgenden signifikanten Modifikationen. Ein Pheromon-induzierbares HIS3-Gen, nämlich fus1-HIS3, wird am Fus1-Locus integriert. Ein Hybridgen, das eine Sequenz enthält, die die ersten 41 Aminosäuren von Gpa1 (die Hefe-G α -Untereinheit) fusioniert an eine Sequenz, die humanes Gai2a (minus Codon für die N-terminalen 33 Aminosäuren) codiert, ersetzt GPA1 an seinem normalen chromosomalen Ort. Das Hefe-STE14-Gen wird gestört, um das Basissignalniveau durch den Pheromonreaktions-Weg zu stören. Das Hefe-a-Faktor-Rezeptorgen, nämlich STE3, wird deletiert. Die letzten beiden Modifikationen sind wahrscheinlich nicht essentiell, scheinen jedoch das Signal-zu-Störpegel-Verhältnis zu verbessern.

[0334] CY 455 (MAT α tbt1-1 ura3 leu2 trp1 his3 fus1-HIS3 can1 ste14::TRP1 ste3*1156) wurde mit den nachfolgenden Plasmiden transformiert:

Cadus 1280 + Cadus 1215 = Receptor⁻ Ligand⁻ = (R-L-)

Cadus 1313 + Cadus 1215 = Receptor⁺ Ligand⁻ = (R+L-)

Cadus 1289 + Cadus 1297 = Receptor⁻ Ligand⁺ = (R-L+)

Cadus 1303 + Cadus 1297 = Receptor⁺ Ligand⁺ = (R+L+)

[0335] „Receptor“ betrifft den humanen C5a-Rezeptor.

[0336] Der Ligand betrifft humanes C5a.

[0337] Drei Kolonien wurden aus jeder Transformation aufgenommen und über Nacht in Medien gezüchtet, denen Leucin und Uracil fehlte, bei pH 6,8 mit 25 mM PIPES (LEU URA pH 6,8 mit 25 mM PIPES). Diese Medien wurden durch Zusatz von 0,45 ml steriler 1 M KOH und 2,5 ml sterilem 1 M PIPES pH 6,8 auf 100 ml Standard-SD-LEU-URA-Medien hergestellt. Nach Über-Nacht-Wachstum wird der pH der Medien üblicherweise auf ungefähr pH 5,5 angesäuert. Über-Nacht-Kulturen wurden einmal mit 25 mM PIPES pH 6,8 gewaschen und in einem gleichen Volumen von Medium resuspendiert, dem Leucin, Uracil und Histidin fehlte (LEU URA HIS pH 6,8 mit 25 mM PIPES). Die optische Dichte bei 600 nm einer 1/20-Verdünnung dieser Kulturen wurde bestimmt, und die Kulturen wurden in 25 mM PIPES pH 6,8 auf einem End-OD₆₀₀ von 0,2 verdünnt. Ein Volumen (5 μ l) dieser Verdünnung, das 10.000 Zellen äquivalent war, wurde auf selektive (HIS+ TRP pH 6,8)-Platten aufgetüpfelt. Nur solche Stämme, die sowohl C5a als auch seinen Rezeptor (R+L+) exprimieren, zeigen ein Wachstum auf selektiven Platten, denen Histidin fehlt. Alle Teststämme sind dazu in der Lage, auf Platten zu wachsen, die Histidin enthalten. Der R+L+-Stamm wächst auf Platten, die bis zu 5 mM Aminotriazol enthalten, die höchste getestete Konzentration.

[0338] Zur Verifizierung der Pheromonweg-Aktivierung und Quantifizierung der Stimulation wurde die Aktivität des fus1-Promotors kolorimetrisch unter Verwendung einer fus1-lacZ-Fusion in einem ähnlichen Satz von Stämmen bestimmt. CY 878 (MAT α tbt1-1 fus1-HIS3 can1 ste14:trp1::LYS2 ste3* 1156 gpa1(41)-Gai2) wurde als Ausgangsstamm für diese Experimente verwendet. Dieser Stamm ist ein trp1-Derivat von CY 455. Die Transformanden für dieses Experiment enthielten CADUS 1584 (pRS424-fus1-lacZ) zusätzlich zu den Rezeptor- und Liganden-Plasmiden. Vier Stämme wurden über Nacht in SD LEU URA TRP pH 6,8 mit 50 mM PIPES bis zu einem OD₆₀₀ von weniger als 0,8 gezüchtet. Ein Assay der β -Galactosidase-Aktivität kann unter Verwendung von Verfahren, die in der Technik bekannt sind (Guarente 1983) durchgeführt werden. Diese Experimente

zeigen, dass die Expression des C5a-Rezeptors und des Liganden (R+L+)-Zellen eine autokrine Stimulation und β -Galactosidase-Aktivität zur Folge hat.

Projizierte Anwendungen der autokrinen C5a-Stämme

[0339] Eine primäre Verwendung der autokrinen C5A-Stämme liegt in der Entdeckung eines C5a-Antagonisten. Inhibitoren der biologischen Funktion von C5a würden erwarteterweise gegen eine Gewebsschädigung schützen, die sich aus einer Entzündung in einem breiten Bereich inflammatorischer Krankheitsprozesse ergeben würde, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf: Atemnotsyndrom (Duchateau et al. (1984), *Am. Rev. Respir. Dis.* 130: 1058); (Hammerschmidt et al. (1980), *Lancet* 1: 947); septische Lungenverletzung (Olson et al. (1985), *Ann. Surg.* 202: 771); Arthritis (Banerjee et al. (1989), *J. Immunol.* 142: 2237); ischämische und postischämische myokardiale Verletzung (Weisman (1990), *Science* 146: 249), (Weisman (1990), *Science* 146: 249); (Crawford et al. (1988), *Circulation* 78: 1449) und Verbrennungsverletzung (Gelfand et al. (1982), *J. Clin. Invest.* 70: 1170).

[0340] Das autokrine C5a-System wie beschrieben kann dazu verwendet werden, C5a-Antagonisten wie folgt zu isolieren:

1. High-Troughput-Screenings zum Identifizieren von Antagonisten von C5a

[0341] Ein geradliniger Ansatz schließt das Screening von Verbindungen ein, um solche zu identifizieren, die das Wachstum des R+L+-Stammes, oben beschrieben, in selektiven Medien hemmen, die jedoch das Wachstum desselben Stammes oder eines R+L—Stammes in nicht-selektiven Medien nicht hemmen. Ein Gegen-screening ist notwendig, um solche Verbindungen aus der Betrachtung zu eliminieren, die im Allgemeinen gegenüber Hefe toxisch sind. Initiale Experimente dieses Typs haben zur Identifizierung von Verbindungen mit potentiell therapeutischer Nützlichkeit geführt.

2. Identifizierung von Antagonisten unter Verwendung einer negativen Selektion

[0342] Der Ersatz eines *fus1-HIS3*-Read-out durch ein oder mehrere negative Selektionsschemata (*fus1-URA3/FOA*, *fus1-GAL1/Galactose* oder *Desoxygalactose*, *Far1 sst2* oder weitere Mutationen, die die Hefe gegenüber einem Wachstumsstopp überempfindlich machen) würden ein Testsystem erzeugen, bei dem das Vorhandensein eines Antagonisten das Wachstum des Assay-Stammes zur Folge haben würde. Ein solcher Ansatz wäre bei High-Throughput-Screening von Verbindungen anwendbar ebenso wie zur Selektion von Antagonisten aus zufallsbedingten Peptid-Bibliotheken, die in autokriner Hefe exprimiert werden. Eine Optimierung von Screenings diesen Typs würde das Screening der R+L+-Stämme bei einer Konzentration von Aminotriazol einschließen, das das Wachstum des R+L—Stammes beendet (beispielsweise 0,6–0,8 mM) und ein Gegen-screening des R+L—Stammes bei einer Konzentration von Aminotriazol, die eine identische Wachstumsrate ergibt (beispielsweise 0,14 mM). Zusätzlich könnte das System eines von mehreren kolorimetrischen, fluoreszierenden oder chemilumineszierenden Read-outs verwenden. Einige der Gene, die an den *fus1*-Promotor für diese alternativen Read-outs verwendet werden können, schließen *lacZ* (kolorimetrische und fluoreszierende Substrate), *Glucoronidase 20* (kolorimetrische und fluoreszierende Substrate), *Phosphatasen* (beispielsweise *PHO3*, *PHO5*, alkalische Phosphatase; kolorimetrische und chemilumineszierende Substrate), grünes Protein (endogene Fluoreszenz), *Meerrettich-Peroxidase* (kolorimetrisch), *Luciferase* (Chemilumineszenz), ein. Die autokrinen C5a-Stämme weisen eine weitere Nützlichkeit wie folgt auf:

3) Bei der Identifizierung neuer C5a-Agonisten aus zufallsbedingten Peptid-Bibliotheken, die in autokriner Hefe exprimiert werden.

[0343] Neue Peptid-Antagonisten würden zur Struktur/Funktionsanalysen beitragen, die als Anleitung für das rationale Design von C5a-Antagonisten verwendet werden könnten.

4) Bei der Identifizierung von Rezeptormutanten

[0344] Konstitutiv aktive, d. h. Liganden-unabhängige Rezeptoren können aus in hohem Grade mutagenisierter Populationen durch Wachstum auf selektiven Medien ausgewählt werden. Diese konstitutiv aktiven Rezeptoren können eine Nützlichkeit dabei aufweisen, die Kartierung der Interaktionsstellen zwischen dem Rezeptor und dem G-Protein zu ermöglichen. Die Identifizierung solcher Stellen kann für das rationale Design von Arzneistoffen wichtig sein, um die Interaktion zu blockieren. Zusätzlich können Rezeptoren bezüglich einer Fähigkeit ausgewählt werden, durch einige Agonisten stimuliert zu werden, jedoch nicht von anderen, oder gegen-

über Antagonisten resistent zu sein. Diese Varianten-Rezeptoren würden bei der Kartierung von Stellen der Interaktion zwischen Rezeptor oder Agonist oder Antagonist helfen und würden deswegen zu rationalen Arzneistoff-Designbemühungen beitragen.

5) Bei der Identifizierung von Molekülen, die mit Gai2 interagieren

[0345] Verbindungen oder Peptide, die direkt den GDP-Austausch aus Gai2 hemmen, würden dieselbe Wirkung wie C5a-Antagonisten in diesen Assays haben. Zusätzliche Information würden Inhibitoren des GDP-Austausches von C5a-Antagonisten unterscheiden. Diese Information könnte durch Assays gewonnen werden, die Folgendes bestimmen:

1. Hemmung durch Testverbindungen der Gai2-Aktivierung aus anderen Rezeptoren,
2. Versagen der Testverbindungen, mit radioaktiv markiertem C5a um die Bindung an den C5a-Rezeptor zu konkurrieren,
3. Versagen von Testverbindungen, die Aktivierung anderer G α -Untereinheiten durch C5a zu hemmen, und
4. Hemmung der Signalgebung durch Testverbindungen aus konstitutiv aktiven Versionen von C5a oder anderen Rezeptoren.

Beispiel 9: Konstruktion einer Hybrid-G α -Genkonstruktion aus zwei Sätzen chimärer Hefe/Säugetier-G α -Gene, nämlich GPA₄₁-G α und GPA_{BAM}-G α

[0346] Die G α -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine muss sowohl mit dem $\beta\gamma$ -Komplex als auch dem Rezeptor interagieren. Weil die Domänen von G α , die für jede dieser Interaktionen verantwortlich sind, bisher noch nicht vollständig definiert wurden, und weil unser letztendliches Ziel G α -Proteine erfordert, die mit einem Säugetier-Rezeptor auf der einen Seite und den Hefe- $\beta\gamma$ -Untereinheiten auf der anderen Seite kommunizieren, wurden humane Hefe-G α -Proteine mit einer optimierten Fähigkeit, beide Funktionen durchzuführen, gewonnen. Aus diesen hier berichteten Studien wurde bestimmt, dass der Einschluss eines nur kleinen Anteils des Amino-Terminus von Hefe-G α erforderlich ist, ein Säugetier-G α -Protein an die Hefe- $\beta\gamma$ -Einheiten zu koppeln. Es wurde angenommen, dass ein weiterer Vorteil der Verwendung dieser limitierten Chimären die Konservierung der gesamten Säugetierdomäne des G α -Proteins sein müsste, von der angenommen würde, dass sie in Rezeptorkontakt und Interaktion involviert wäre. Somit war die Wahrscheinlichkeit, dass diese Chimären ihre Fähigkeit beibehalten würden, funktionell mit einem Säugetierrezeptor zu interagieren, der an derselben Hefezelle exprimiert wird, als sehr hoch angesehen.

Plasmid-Konstruktionen

[0347] PRS416-GPA1 (Cadus 1069). Ein XbaI-SacI-Fragment, das die gesamte GPA1-Promotorregion, die codierende Region und ungefähr 250 Nukleotide der 3'- und translatierten Region codiert, wurde aus 10 Ycplac111-GPA1 (von S. Reed, Scripps Institute) ausgeschnitten und in den YEp-Vektor pRS416 kloniert (Sikorski und Hieter, Genetics 122: 19 (1989)), geschnitten mit XbaI und SacI.

[0348] Ortsgerichtete Mutagenese von GPA1 (Cadus 1075, 1121 und 1122). Ein 1,9-kb-EcoRI-Fragment, das die gesamte GPA1-codierende Region und 200 Nukleotide aus dem 5'-untranslatierten Bereich enthielt, wurde kloniert, EcoRI-geschnitten, Phosphatase-behandelt, mit pALTER-1 (Prometa) und durch Elektroporation transformiert (Biorad Gene Pulser) in DHS α F⁻-Bakterien, um Cadus 1075 zu gewinnen. Rekombinante Phagemide wurden mit M13KO7-Helferphagen gewonnen und einsträngige rekombinante DNA wurde extrahiert und gemäß den Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Eine neue NcoI-Stelle wurde am Startmethionin von GPA1 durch Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese unter Verwendung des synthetischen Oligonukleotids eingebracht:

5' GATATATTAAGGTAGGAAACCATGGGGTGTACAGTGAG 3'. (SEQ ID NO: 22)

[0349] Positive Klone wurden in Ampicillin selektiert und mehrere unabhängige Klone wurden in beiden Richtungen über die neue NcoI-Stelle bei +1 hinweg sequenziert. Die Klone, die die richtigen Sequenzen enthielten, wurden als Cadus 1121 und 1122 zurückbehalten.

[0350] Konstruktion von GPA1-basiertem Expressionsvektor (Cadus 1127). Der zur Expression von Volle-Länge- und Hybrid-Säugetier-G α -Proteinen in Hefe, nämlich Cadus 1172, verwendete Vektor wurde in der folgenden Weise konstruiert. Ein 350-Nukleotid-Fragment, das die 3'-untranslatierte Region von GPA1 überspannte, wurde mit Taq-Polymerase (Ampli Taq; Perkin Elmer) unter Verwendung der Oligonukleotid-Primer A (5' CGAGGCTCGAGGGAACGTATAATTAAGTAGTG 3') (SEQ ID NO: 23)

und

B (5' GCGCGGTACCAAGCTTCAATTCGAGATAATACCC 3'). (SEQ ID NO: 22) amplifiziert. Das 350-Nukleotid-Produkt wurde durch Gel-Elektrophorese unter Verwendung von GeneClean II (Bio101) aufgereinigt und wurde direkt in den pCRII-Vektor durch einzelne Nukleotid-Überlappung TA-Klonierung (InVitrogen) kloniert. Rekombinante Klone wurden durch Restriktionsenzym-Kartierung und durch Didesoxynukleotid-Sequenzierung charakterisiert. Rekombinante Klone enthielten eine neue XhoI-Stelle 5' zur authentischen GPA1-Sequenz und eine neue KpnI-Stelle 3' zur authentischen GPA1-Sequenz, die jeweils von Primer A und Primer B abstammten.

[0351] Die NotI- und SacI-Stellen im Polylinker von Cadus 1013 (pRS414) wurden durch Restriktion mit diesen Enzymen, gefolgt von Einfüllen mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I entfernt und einer Blunt-End-Ligation (Ligation mit stumpfen Enden) unterworfen, um Cadus 1092 zu ergeben. Das 1,4-kb-PstI-EcoRI-5'-Fragment von GPA1 aus Ycplac111-GPA1, das den GPA1-Promotor und die 5'-untranslatierte Region von GPA1 enthielt, wurde durch Gel-Elektrophorese unter Verwendung von GeneClean (Bio101) aufgereinigt und in PstI-EcoRI-restringiertes Cadus 1013 kloniert, um Cadus 1087 zu ergeben. Das PCR-amplifizierte XhoI-KpnI-Fragment, das die 3'-untranslatierte Region von GPA codierte, wurde aus Cadus 1089 ausgeschnitten und in XhoI-KpnI-restringiertes Cadus 1087 kloniert, um Cadus 1092 zu ergeben. Die NotI- und SacI-Stellen im Polylinker von Cadus 1092 wurden durch Restriktion mit diesen Enzymen entfernt, mit Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aufgefüllt und einer Blunt-End-Ligation unterworfen, um Cadus 1110 zu gewinnen. Die Region von Cadus 1122, die die Region von GPA1 aus der EcoRI-Stelle bei -200 bis 120 codierte, wurde mit Vent-DNA-Polymerase amplifiziert (New England Biolabs, Beverly, MA) mit den Primern 5' CCCGAATCCACCAATTTCTTTACG 3' (SEQ ID NO: 25) und 5' GCGGCGTCGACGCGGCCGCGTAACAGT 3' (SEQ ID NO: 26).

[0352] Das amplifizierte Produkt, das eine EcoRI-Stelle an seinem 5'-Ende trug und neue SacI-, NotI- und Sall-Stellen an seinem 3'-Ende wurden mit EcoRI und Sall restringiert, unter Verwendung von GeneClean II (Bio101) Gel-gereinigt und in EcoRI und Sall restringiertes Cadus 1110 kloniert, um Cadus 1127 zu gewinnen. Die DNA-Sequenz des Vektors zwischen der EcoRI-Stelle bei -200 und der KpnI-Stelle am 3'-Ende der 3'-untranslatierten Region wurde durch Restriktionsenzym-Kartierung und Didesoxynukleotid-DNA-Sequenzanalyse verifiziert.

[0353] PCR-Amplifizierung von GPA₄₁-Gα-Proteinen und Klonierung in Cadus 1127. cDNA-Klone, die die humane Gα-Untereinheiten Gas, Gai2, Gai3 und S.-cerevisiae-GPA1 klonieren, wurden mit Vent-thermostabiler Polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA) amplifiziert. Die Primer-Paare, die in der Amplifikation verwendet waren, waren wie folgt:

GαS Primer 1: 5'CTGCTGGAGCTCCGCCTGCTGCTGCTGGGTGCTGGAG3' (SacI 5') (SEQ ID NO: 27)

Primer 2: 5'CTGCTGGTTCGACGCGGCCGCGGGGTTCTTCTTAGAAGCAGC3' (Sall 3') (SEQ ID NO: 28)

Primer 3: 5'GGGCTCGAGCCTTCTTAGAGCAGCTCGTAC3' (XhoI 3') (SEQ ID NO: 29)

Gai2 Primer 1: 5'CTGCTGGAGCTCAAGTTGCTGCTGTTGGGTGCTGGGG3' (SacI5') (SEQ ID NO: 30)

Primer 2: 5'CTGCTGGTTCGACGCGGCCGCGCCCTCAGAAGAGGCCGCGGTCC3' (Sall 3') (SEQ ID NO: 31)

Primer 3: 5'GGGCTCGAGCCTCAGAAGAGGCCGCGAGTC3' (XhoI 3') (SEQ ID NO: 32)

Gai2 Primer 1: 5'CTGCTGGAGCTCAAGCTGCTGCTACTCGGTGCTGGAG3' (SacI5') (SEQ ID NO: 33)

Primer 2: 5'CTGCTGGTTCGACGCGGCCGCGCCACTAACATCCATGCTTCTCAATAAAGTC3' (Sall 3') (SEQ ID NO: 34)

Primer 3: 5'GGGCTCGAGCATGCTTCTCAATAAAGTCCAC3' (XhoI 3') (SEQ ID NO: 35)

[0354] Nach der Amplifizierung wurden die Produkte durch Gel-Elektrophorese unter Verwendung von GeneClean II (Bio101) gereinigt und wurden mit den geeigneten Restriktionsenzymen zum Klonieren in Cadus 1127 gespalten.

[0355] Die Hybrid-GPA₄₁-Gα-Untereinheiten wurden über eine SacI-Stelle kloniert, die an der erwünschten Position nahe dem 5'-Ende der amplifizierten Gene eingeführt wurde und über eine Sall- oder XhoI-Stelle, die in die 3'-untranslatierte Region eingebracht wurde. Ligationsgemische wurden in kompetente Bakterien elektrophoretisiert und Plasma-DNA wurde aus 50 Kulturen Ampicillin-resistenter Bakterien hergestellt.

[0356] Konstruktion von Integrationsvektoren, die die GPA₄₁-Gα-Untereinheiten codieren. Die codierende Region jedes GPA₄₁-Gα-Hybrids wurde in einen Integrationsvektor (pRS406 = URA3 AmpR) unter Verwendung der BssHII-Stellen kloniert, die die Polylinker-Klonierungsstellen in diesem Plasmid flankieren. Cadus 1011 (pRS406) wurde mit BssHII restringiert, mit alkalischer Shrimps-Phosphatase nach den Anweisungen des Her-

stellers behandelt und der linearisierte Vektor wurde durch Gel-Elektrophorese aufgereinigt. Inserte aus jedem der GPA₄₁-G α -Hybride wurden mit BssHII aus dem parentalen Plasmid ausgeschnitten und Gel-aufgereinigtes Cadus 1011 subkloniert.

[0357] Konstruktion von GPA_{BAM}-G α -Konstrukten. Eine neue BamHI-Stelle wurde in-frame in die GPA1-codierende Region durch PCR-Amplifikation unter Verwendung von Cadus 1179 (die eine Wildtyp-GPA1-Allel mit einer neuen NcoI-Stelle am Startmethionin codierte) als Matrize, VENT-Polymerase und der nachfolgenden Primer eingebracht: Primer A = 5'GCATCCATCAATAATCCAG3' (SEQ ID NO: 36) und Primer B = 5'GAAACAATGGATCCACTTCTTAC3' (SEQ ID NO: 37). Das 1,1-kb-PCR-Produkt wurden mit GeneClean II (Bio101) Gel-gereinigt, mit NcoI und BamHI restringiert und einkloniert, NcoI-BamHI-geschnitten und Cadus 1122 phosphatase, um Cadus 1605 zu gewinnen. Die Sequenz von Cadus 1605 wurde durch Restriktionsanalyse und Didesoxy-Sequenzierung doppelsträngiger Matrizen verifiziert. Rekombinante GPA_{BAM}-G α -Hybride von G α s, G α i2 und G α 16 wurden erzeugt. Die Konstruktion von Cadus 1855 codierender rekombinanter GPA_{BAM}-G α 16 dient als Masterbeispiel: Die Konstruktionen der anderen Hybride folgten einer analogen Klonierungsstrategie. Der Elternstamm Cadus 1617, der natives G α 16 codierte, wurde mit NcoI und BamHI restringiert, mit alkalischer Shrimp-Phosphatase nach den Anleitungen des Herstellers behandelt und der linearisierte Vektor wurde durch Gel-Elektrophorese aufgereinigt. Cadus 1605 wurde mit NcoI und BamHI restringiert und das 1,1-kb-Fragment, das die Amino-terminalen 60% von GPA 1 codierten, wurden mit einer neuen BamHI-Stelle am 3'-Ende restringiert und wurden in das NcoI- und BamHI-restringierte Cadus 1617 kloniert. Das sich ergebende Plasmid, das das GPA_{BAM}-G α 16-Hybrid codierte, wurde durch Restriktionsanalyse verifiziert und in Testerstämmen untersucht bezüglich der Fähigkeit, an Hefe-G β y zu koppeln und dadurch den GPA1-Nullphänotyp zu unterdrücken. Zwei zusätzliche GPA_{BAM}-G α -Hybride, GPA_{BAM}-G α s und GPA_{BAM}-G α i2, beschrieben in dieser Anmeldung, wurden in einer analogen Weise hergestellt, unter Verwendung von Cadus 1606 als parentalem Plasmid zur Konstruktion des GPA_{BAM}-G α i2-Hybrids und Cadus 1181 als Parentalplasmid für die Konstruktion des GPA_{BAM}-G α s-Hybrids.

[0358] Kopplung durch chimäre G α -Proteine. Die G α -Chimären, die oben beschrieben wurden, wurden bezüglich der Fähigkeit getestet, einen Säugetier-G-Protein-gekoppelten Rezeptor an den Pheromonreaktions-Weg in der der Hefe zu koppeln.

Beispiel 10: Screening für Modulatoren einer G α -Aktivität

[0359] Screenings für Modulatoren einer G α -Aktivität können ebenfalls durchgeführt werden, wie es in den nachfolgenden Beispielen zu Veranschaulichungszwecken dargestellt ist, die nicht-einschränkend sein sollen. Die Stämme CY 4874 und CY 4877 sind isogen, jedoch bezüglich des Vorhandenseins der Q205L-Mutation im klonierten G α ₁₂-Gen kloniert in Plasmid 1. Die Stämme CY 4901 und CY 4904 weisen jeweils chromosomal integrierte chimäre G α -Fusionen auf, die 41 Aminosäuren von gpa1 am N-Terminus des humanen G α ₁₂-Gens aufweisen und sind isogen, jedoch bezüglich des Vorhandenseins einer konstitutiv aktivierenden Mutation im C5a-Rezeptorgen von CY 4901. Stamm-CY5058 ist ein gpa1-Mutante, die nur die Hefe-G β y-Untereinheiten und keine G α -Untereinheit trägt. Dieser Stamm ist ein Kontrollstamm, um die Spezifität der Wirkung an der G α -Untereinheit zu demonstrieren.

I. Unterdrückung der Aktivierung durch Mutation von G α

[0360] Die Q205L-Mutation ist eine konstitutiv aktivierte GTPase defiziente Mutante des humanen G α ₁₂-Gens. Anatagonisten-Verbindungen, Chemikalien oder andere Substanzen, die auf G α ₁₂ einwirken, können durch deren Wirkung erkannt werden, um das Aktivierungsniveau zu reduzieren und somit das Signal aus dem fus1-lacZ-Reporter gen auf das zweite Plasmid (Plasmid 2).

A. GTPase G α ₁₂-Mutanten

Testbestandteil = gpa₄₁-G α ₁₂ (Q₂₀₅L)

Kontrollbestandteil = gpa₄₁-G α ₁₂

[0361] Ebenso wie die CY4874- und CY4877-Konstrukte, die oben ausgeführt wurden, können ähnliche Stämme mit fus1-His3 oder fus2-CNA-1-Wachstumsablesungen ebenfalls verwendet werden. Die fus1-His3-Stämme sind zum Screening nach Antagonisten bevorzugt und die fusII-CAN1-Stämme sind für Antagonisten-Screenings bevorzugt.

Readout	Teststamm	Wirkung des $G\alpha_{i2}$ -Antagonisten	Kontrollstamm
fus1-HIS3	CY4868	Hemmt das Wachstum von -HIS +AT (Aminotriazol)	CY4871
fus1-lacZ	CY4874	Reduzierende β -gal-Aktivität	CY4877
fus2-CAN1	CY4892	Induzieren des Wachstums auf Canavanin	CY4386

[0362] In jedem Fall sollte ein Antagonist verursachen, dass sich der Teststamm mehr wie der Kontrollstamm verhält.

B. GTPase $G_{\alpha s}$ -Mutanten ($G\alpha$ -Spezifität)

Testbestandteil = $G_{\alpha s}(Q_{227}L)$

Kontrollbestandteil = $G_{\alpha s}$

Readout	Teststamm	Wirkung des $G\alpha_{i2}$ -Antagonisten	Kontrollstamm
fus1-HIS3	CY4880	keine	CY4883
fus1-lacZ	CY4886	keine	CY4889
fus2-CAN1	CY4895	keine	CY4898

[0363] In jedem Falle würde ein unspezifischer Antagonist verursachen, dass sich der Teststamm mehr wie der Kontrollstamm verhält.

[0364] Zusätzliche Medienerfordernisse: -TRP für die $G\alpha$ -Plasmid-Aufrechterhaltung in fus1-HIS3 und fus2-CAN1-Screenings und -TRP-URA für $G\alpha$ - und fus1-lacZ-Plasmid-Aufrechterhaltung in fus1-lacZ-Screenings.

II. Unterdrückung der Aktivierung durch Rezeptoren

Konstitutiv C5a-Rezeptoren

Testbestandteil = C5aR* ($Pa_{184}L$, aktivierter C5a-Rezeptor)

Kontrollbestandteil = C5aR

[0365] Die C5aR*-Mutation weist einen Leucin-Rest anstelle des Prolin-Restes des Wildtyps an Position 184 der Aminosäuresequenz auf.

Readout	Teststamm	Wirkung des $G\alpha_{i2}$ -Antagonisten	Kontrollstamm
fus1-HIS3	CY4029	Hemmung des Wachstums von -HIS +AT (Aminotriazol)	CY2246
fus1-lacZ	CY4901	Reduzieren der β -gal-Aktivität	CY4904
fus2-CAN1	CY4365	Induzieren des Wachstums auf Canavanin	CY4362

[0366] In jedem Falle sollte ein Antagonist verursachen, dass der Teststamm sich mehr wie der Kontrollstamm verhält.

[0367] Zusätzliche Medienerfordernisse: -LEU für die Rezeptorplasmid-Aufrechterhaltung in fus1-HIS3 und fus2-CAN1-Screenings und -LEU-URA für Rezeptor und fus1-lacZ-Plasmid-Aufrechterhaltung in fus1-lacZ-Screening, nicht-gepufferte Hefemedien (pH 5,5).

Beispiel 11: Identifizierung eines Surrogat-Liganden unter Verwendung der Expression einer zufallsbedingten Peptid-Bibliothek in einer Hefe, die einen Säugetier-Orphan-Rezeptor exprimiert

[0368] FPRL-1 (Formylpeptid-Rezeptor-artiger 1) ist ein strukturelles Homolog des Formylpeptid-Rezeptors (FPR). FPR ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, exprimiert auf neutrophilen und phagozytischen Zellen, der durch N-Formylpeptide bakteriellen Ursprungs stimuliert wird. Eine spezifische Bindung des natürlichen Liganden, f-Met-Leu-Phe, stimuliert die Transduktion eines Signales, um Kalzium zu mobilisieren, was zelluläre Veränderungen einschließlich einer Chemotaxis und der Freisetzung von Granula-Inhaltsstoffen zur Folge hat.

Niedrig-stringente Hybridisierung von HL60-cDNA-Bibliotheken mit einer FPRcDNA-Sonde ermöglicht die Identifizierung des verwandten Rezeptors, FPRL-1 (Murphy et al., siehe oben; Ye et al., siehe oben). Die FPRL-1-cDNA codiert ein 351 Aminosäureprotein mit 69% Sequenzhomologie gegenüber FPR (Murphy et al., siehe oben), FPR und FPRL-1 erwiesen sich als mit humanem Chromosom 19 co-zu-lokalisieren und wiesen ein Gewebsexpressionsmuster auf, das demjenigen von FPR identisch war, d. h. die Expression ist auf Zellen von Myeloid-Ursprung beschränkt (Murphy et al., siehe oben). Ye et al. (siehe oben) demonstrierten eine schwache Bindung von f-Met-Leu-Phe (μM -Konzentrationen) an Fibroblasten, die mit FPRL-1-cDNA transfiziert waren. Im Gegensatz hierzu konnte Murphy et al. (siehe oben) keine Bindung von N-Formylpeptiden an Xenopusoocyten nachweisen, die mit FPRL-1-cDNA transfiziert waren. FPRL-1 scheint ein Orphan-Rezeptor zu sein, dessen spezifischer Ligand sich von den Formylpeptid-Liganden, auf die FPR anspricht, unterscheidet.

[0369] In diesen beispielhaften Experimenten werden die folgenden Details beschrieben: (1) Etablierung eines Hefestammes, der entwickelt wurde, um den humanen Orphan-G-Protein-gekoppelten Rezeptor FPRL-1 zu exprimieren; (2) Expression einer zufallsbedingten Peptid-Bibliothek im vorher erwähnten Hefestamm; und (3) Aktivierung des endogenen Hefe-Pheromonweges nach Stimulierung des FPRL-1-Rezeptors durch ein Peptid, codiert durch eine zufallsbedingte Bibliothek, exprimiert mit demselben Hefestamm.

Herstellung des FPRL-1-Hefeexpressionsvektors

[0370] Ein Plasmid, pFPRL1-L31, das ein 2,6-kb-EcoRI-XhoI-Fragment enthielt, das FPRL-1-cDNA codiert, im Blue Script II SK+ Vektor wurde von Philip Murphy (NIH) erzielt. Die Sequenz, die FPRL1 codierte, wurde durch die Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung von VENT-Polymerase amplifiziert (New England Biolabs Inc., Beverly, MA) durch 20 Zyklen und die nachfolgenden Oligonukleotid-Primer:

#1 5' GGCGCCCGGTCTCCATGGAAACCAACTTCTCCACT (SEQ ID NO: 38)

#2 5' GGCGCCCGGTCTCCGATCCCATGCTGTAAGTCACTCTC (SEQ ID NO: 39)

[0371] Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt, mit Bsal restringiert und in Cadus 1651 (p1PBX-1) kloniert, ein PGK-Promotor-angetriebener Expressionsvektor, unter Verwendung von NcoI- und BamHI-Stellen, um Cadus 2311 zu gewinnen. Die Sequenz des gesamten Insertes wurde bestimmt und mit der FPRL-1-Sequenz, die bei GenBank hinterlegt war (Zugangsnummer M84562) als identisch befunden.

Herstellung von zufallsbedingten Oligonukleotiden

Bibliothek-Recycling-Protokoll zur Identifizierung eines Ersatzstoff-Liganden

[0372] Der Hefestamm CY1141 (MAT α Far1*144 tbt1-fus1-HIS3 can1 ste14::trp1::LYS2 ste3*1156 gpa1(41)-Galpha2 lys2 ura3 leu2 trp1 his3) wurde in den Experimenten wie folgend verwendet. CY1141 enthält ein Pheromon-induzierbares HIS3-Gen, fus1-HIS3, integriert am FUS1-Locus und ein Hybridgen, das die ersten 41 Aminosäuren von GPA1 (Hefe-G α), fusioniert an eine Sequenz codiert, die humanes G α i2 codiert (dem Codone fehlen, die die N-terminalen 33 Aminosäuren codieren), unter Ersetzen von GPA1 an seinem chromosomalen Ort. Das Hefe-STE14-Gen wird gestört, um die Basiskonzentration der Signalgebung durch den Pheromonreaktions-Weg zu senken. Das Hefe- α -Faktor-Rezeptorgen, STE3, wird deletiert. CY1141 wurde mit Cadus 2311 transformiert, so dass sich CY6571 ergab, ein Stamm, der den humanen Orphan-Rezeptor FPRL-1 exprimiert.

[0373] CY6571 zeigte LIRMA (Liganden unabhängige Rezeptor-vermittelte Aktivierung), d. h. eine Aktivierung des Hefe-Pheromonweges in Abwesenheit eines Liganden. Es wurde bestimmt, dass das Hefewachstum auf selektiven Medien, das sich aus LIRMA ergibt, durch zusätzliche 2,5 millimolare Konzentrationen an 3-Aminotriazol (AT) eliminiert wurde. AT ist ein Inhibitor des HIS3-Genproduktes, das zur Reduzierung des Hintergrundwachstums dient. Deswegen wurden Selektionsprotokolle die die Identifizierung von Surrogat-Liganden für den FPRL-1-Rezeptor zum Ziel haben, bei dieser Konzentration von AT durchgeführt.

[0374] CY6571 wurde zu 10 ml Standardsynthesemedium (SD), dem Leucin (-Leu) fehlte, inokuliert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Die 10 ml Über-Nacht-Kultur wurde dazu verwendet, 50 ml YEPD zu inokulieren; diese Kultur wurde bei 30°C 4,5 bis 5 Stunden inkubiert, und zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen geerntet und zur Transformation mit DNA präpariert, die eine zufallsbedingte Peptid-Bibliothek (Alpha-NNK (6.24.94)) codierte, die Tridecapeptide mit zufälliger Sequenz codierten, durch Elektroporation. Nach Elektroporation (in 0,2 cm Kuvetten, 0,25 μF , 200 Ω , 1,5 kV) wurden die Zellen sofort in 1 ml eiskalter 1 M Sorbitol verdünnt, und 100 μl Teilmengen wurden auf 10 Synthesemedienplatten (pH 6,8) angeordnet, denen Leucin und Uracil fehlte

(–Leu –Ura). Die Platten wurden bei 30°C für 2–4 Tage inkubiert und zu diesem Zeitpunkt wurden zwei Replikas jedes ursprünglichen Transformationsplatte für synthetische Medien hergestellt (pH 6,8), denen Leucin, Uracil und Histidin fehlte, und die mit 2,5 mM AT (–Leu –Ura –His +2,5 mM AT) supplementiert waren. Die Replikas wurden bei 30°C für 3–5 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Kolonien, wie auf den Replika selbst von zweien vorlagen, aus den Platten abgeschabt, in einem Gesamtvolumen von 10 ml H₂O (5 ml jede Platte). Die OD₆₀₀ jeder Zellsuspension wurde bestimmt und die Rohplasma-Isolationen wurden auf 8–16 OD-Einheiten von Zellen für jeden Pool durchgeführt. Insgesamt 8 Pools ergaben sich aufgrund der niedrigen Anzahl von Hefekolonien, die in vier Plattensätzen vorlagen. Die aus diesen Rohplasmid-Isolationen gewonnenen Pellets (die so genannte „Zerschlagen und Aufgreifen“-Technik, *Methods in Yeast Genetics – A Laboratory Manual*, 1990, M. D. Rose, F. Winston und P. Heiler, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.), wurden in 40 µl 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0 resuspendiert, und 1 µl wurde verwendet, um *E. coli* durch Elektroporation (0,1 cm Kuvetten, 0,25 µF, 200 Ω, 1,8 kV) zu transformieren. Nach der Elektroporation wurden die Zellen unmittelbar in 1 ml 2XYT-Medien verdünnt und unter Schütteln bei 37°C für 30 Minuten inkubiert und nach dieser Zeit wurden die Zellen dazu verwendet, 50 ml 2XYT, ergänzt mit 100 µg/ml Ampicillin, zu inokulieren. Die 10 sich ergebenden Kulturen wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Plasma-DNA wurde aus jeder dieser Bakterienkulturen unter Verwendung von Qiagen-Säulen isoliert (Qiagen Inc. Chatsworth, CA)). Jedes Plasmid-DNA-Pellet wurde in 50 µl Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0 resuspendiert.

[0375] Stamm-CY6571 wurde mit 1 µl jedes Plasmid-Pools durch Elektroporation transformiert. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 400 µl 1 M Sorbitol verdünnt. Aus jeder elektrophoretisierten Zellsuspension wurden 1 µl und 400 µl Zellen auf –Leu-Ura-Synthetischen Medien ausplattiert, pH 6,8, um „Niedrige Dichte“- und „Hohe Dichte“-Ausplattierungen zu gewinnen. Die Platten wurden bei 30°C für 3 Tage inkubiert, und zu diesem Zeitpunkt wurden Replikas der beiden der niedrigen und hoch-dichten Platten hergestellt, für –Leu –Ura –His +2,5 mM AT. Für diese Fälle, in denen die Anreicherung nach einem Plasmid, das zur Übertragung eines His⁺-Phänotyps in der Lage ist, auftrat, würde dies eine amplifizierte Anzahl an His⁺-Kolonien an beiden der niedrigen und hoch-dichten Platten widerspiegeln, sichtbar an den Tagen 2–3, obwohl die Amplifikation an den Platten am offensichtlichsten sein würde, die eine hohe Dichte an Zellen empfangen. Im FPRL-1-Experiment zeigten 1/8 Poole eine Amplifikation von His⁺-Kolonien. Die Zellen wurden aus der Platte in 5 ml Wasser abgeschabt, der OD₆₀₀ der Zellsuspension wurde bestimmt und eine Rohplasmid-Isolierung wurde auf 15 OD-Einheiten von Hefezellen durchgeführt. Das erzielte Pellet wurde in 40 µl 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0 resuspendiert, und 1 µl wurden verwendet, um *E. coli* zu transformieren. Die Plasmid-DNA wurde durch Mini-prep aus 3 ml 2XYT-Kulturen aus einzelnen Bakterienkolonien isoliert, die sich aus dieser Transformation ergaben. 10 DNA-Pellets (A1 bis A10), die von den individuellen Bakterienkolonien abgeleitet wurden, wurden in 20 µl 10 mM Tris 1 mM EDTA, pH 8,0 resuspendiert und zur Transformation von CY6571 verwendet (das den FPRL-1-Expressionsvektor enthielt) und CY6263 (CY1141, das einen Kontrollexpressionsvektor enthielt, dem jegliche Rezeptorsequenz fehlte), durch Elektroporation. Cadus 1625, ein Kontrollvektor, dem Sequenzen fehlen, die ein Peptid codieren, wurde eingeschlossen und zur Transformation sowohl der Rezeptor⁺- als auch der Rezeptor[–]-Stämme der Hefe verwendet. Transformanden wurden zunächst auf –Leu –Ura pH 6,0 selektiert, dann wurden drei Hefetransformanden jedes Typs (aus 11 CY6571-Transformanden und 11 CY6263-Transformationen) auf –Leu –Ura pH 6,8 aufgebracht, um die Kolonien zu expandieren. Wenn sie einmal expandiert waren, wurden Streifen der Transformanden auf –Leu –Ura –His +2,5 mM AT durchgeführt, um das Wachstum in Abwesenheit von Histidin zu testen. Alle Plasmide außer dem als A2 bezeichneten, übertragen ein Wachstumsvorteil auf die Medien, denen Histidin fehlte, auf Hefe, die das FPRL-1-codierende Plasmid trug, jedoch nicht auf Hefen, denen das Rezeptorplasmid fehlte. Die Peptidsequenz, von der sich herausgestellt hat, dass sie durch die Plasmide A1 und A3–A10 codiert wird ist; SerLeuLeuTrpLeuThrCysArgProTrpBluAlaMet, (SEQ ID NO: 40) und wird codiert durch die Nukleotid-Sequenz 5'- TCT CTG CTT TGG CTG ACT TGT CGG CCT TGG GAG GCG ATG-3'. (SEQ ID NO: 41).

Aktivierung des Pheromonreaktions-Weges in Hefe, die den FPRL-1-Rezeptor und den Peptid-Agonisten exprimiert

[0376] Zur Verifizierung der Pheromonweg-Aktivierung und Quantifizierung der Stimulation wurde die Aktivität des *fus1*-Promotors kolorimetrisch unter Verwendung einer *fus1-lacZ*-Fusion in parallelen Reihen von Teststämmen bestimmt. CY1141, oben beschrieben, wurde als Empfängerstamm für diese Experimente verwendet. Die Transformanden enthielten Cadus 1584 (pRS424-*fus1-lacZ*) zusätzlich zu den Rezeptor (R^{+/–})- und Liganden (L^{+/–})-Plasmiden. Vier Stämme, die die identischen Plasmide trugen, wurden über Nacht in Minimalmedien gezüchtet, denen Leucin, Uracil und Tryptophan fehlte, pH 8,6. Die Über-Nacht-Kulturen wurden dazu verwendet, –Leu –Ura –Trp pH 6,8 Medien zu inokulieren und diese neuen Kulturen wurden für ungefähr 4,5 bis 5 Stunden bis zu einer OD₆₀₀ von weniger als 0,4 gezüchtet. Ein Assay der β-Galactosidase-Aktivität (Guarente 1983) in Zellen aus diesen Kulturen ergab die folgenden Ergebnisse:

CY1141/CADUS 2311/peptid A1/CADUS 1584	R ⁺ L ⁺	28 units
CY1 141/CADUS 2311/CADUS 1625/CADUS 1584	R ⁺ L ⁻	3 units
CY1141/CADUS 1289/peptid A1/CADUS 1584	R ⁻ L ⁺	3.5 units
CY1141/CADUS 1289/CADUS 1625/CADUS 1584	R ⁻ L ⁻	3.9 units

Units Einheiten

[0377] Das Vorhandensein von Rezeptor- und Peptid-codierenden Plasmiden ergab durchschnittlich eine achtfache Simulierung über Hintergrundkonzentrationen von β -Galactosidase.

Beispiel 12: Identifizierung von Surrogat-Liganden unter Verwendung einer Expression einer zufallsbedingten Peptid-Bibliothek in Hefe, die Säugetier-Orphan-Rezeptor MDR-15 exprimiert

[0378] In einer ähnlichen Weise wurde ein Plasmid, das den Monozyten-abgeleiteten Rezeptor 15 enthielt (MDR15; Barella et al. (1995), Biochem. J. 309: 773–9) dazu verwendet, einen Hefestamm (CY6573) zu konstruieren, der diesen Rezeptor exprimiert. Der Rezeptor ist eine alternative Spleiß-Form des Burkitt's-Lymphom-Rezeptor (BLR1), der durch eine humane Burkitt's-Lymphom-cDNA (Dobner et al. (1992), Eur. J. Immunol. 22, 2795–2799) codiert ist. Stamm-CY6573 wurde in einer ähnlichen Weise mit der NNK13-Bibliothek transformiert und im Anschluss an eine Selektion auf zehn –Leu –Ura ($4,4 \times 10^5$ Kolonien pro Platte) wurden Replika auf –Leu –Ura –His + 1 mM AT-Platten ausplattiert. Nach Reisolierung von Plasmid-Poolen und Re-transformation in die Stämme CY6573 zeigen acht von zehn Pools eine signifikant angereicherte Koloniebildung auf –Leu –Ura –His + 1 mM AT-Platten. Acht einzigartige Plasmide, die aus diesen Pools abgeleitet waren, wurden in CY6573 retransformiert, was auf –Leu –Ura –His + 1 Mm AT-Platten ein Wachstum verlieh. Eines dieser Plasmide versagte dabei, ein Wachstum in einem Hefestamm zu verleihen, dem der MDR15-Rezeptor fehlte.

Beispiel 13: Identifizierung eines Liganden unter Verwendung der Expression einer zufallsbedingten Peptid-Bibliothek in Hefe, die den humanen Thrombin-Rezeptor exprimiert

[0379] Der Rezeptor für Thrombin, ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, liegt auf zahlreichen Zelltypen vor, einschließlich Blutplättchen, glatter Gefäßmuskulatur, Fibroblasten und einer Untergruppe von Zellen, die im Immunsystem funktionieren. Thrombin, eine Serin-Protease bindet an und spaltet das Rezeptormolekül an Rest 41 und erzeugt einen neuen Rezeptor-N-Terminus. Die Nach-Spaltung der N-terminale Reste dienen dann als „angebundener Ligand“, um das Rezeptormolekül zu aktivieren (Vu et al., 1994). Es hat sich gezeigt, dass in Blutplättchen die Signalgebung durch den Thrombin-Rezeptor zahlreiche Wirkungen zur Folge hat, einschließlich der Stimulierung von Phospholipase C, der Mobilisierung intrazellulären Ca^{2+} und der Hemmung der Adenylylcyclase.

[0380] In diesem Beispiel werden Experimente, die Folgendes ausführen, beschrieben: (1) Etablierung eines Hefestammes, der entwickelt wurde, um den humanen G-Protein-gekoppelten Rezeptor für Thrombin zu exprimieren; (2) Expression einer zufallsbedingten Peptid-Bibliothek im vorher erwähnten Hefestamm und (3) Aktivierung des endogenen Hefe-Pheromonweges nach Stimulierung des Thrombin-Rezeptors durch Peptide, die durch eine zufallsbedingte Bibliothek codiert werden, exprimiert innerhalb desselben Hefestammes.

Herstellung eines Hefeexpressionsvektors für einen Säugetier-Thrombin-Rezeptor

[0381] Der humane Thrombin-Rezeptor wurde durch PCR aus pcDNA3:Hu-Thr9b-5' (Bristol Myers Squibb) unter Verwendung der folgenden Oligonukleotide amplifiziert:

5' GGGCCATGGGGCCGCGGCGGTTG 3' (SEQ ID NO: 42)

5' CCCGGATCCTAAGTTAACAGCTTTTTGTATAT 3' (SEQ ID NO: 43)

[0382] Das amplifizierte Produkt wurde durch Gel-Elektrophorese aufgereinigt, mit NcoI und BamHI restringiert und an NcoI- und BamHI-geschnittenes CADUS 1871 ligiert, ein PGK-Promotor gesteuerter Expressionsvektor, so dass sich CADUS 2260 ergab. Eine Klonierung in CADUS 1871 führt ein neues Stoppcodon ein, dem das Triplet GlySerVal nach dem authentischen Carboxy-terminalen Codon des humanen Thrombin-Rezeptors (Threonin) vorangeht. Zusätzlich wird eine Invertase-Signalsequenz an den authentischen Amino-Terminus des Rezeptors fusioniert.

[0383] CY7467 zeigte LIRMA (Liganden-unabhängige Rezeptor-vermittelte Aktivierung), d. h. eine Aktivie-

zung des Hefe-Pheromonweges in Abwesenheit des Liganden. Es wurde bestimmt, dass das Hefewachstum auf selektiven Medien, die sich aus LIRMA ergeben, durch Zusatz von 2,5 millimolaren Konzentrationen von 3-Aminotriazol (AT) eliminiert wurden. AT ist ein Inhibitor des HIS3-Genproduktes, das zur Reduktion des Hintergrundwachstums dient. Deswegen wurden Selektionsvorschriften, die die Identifizierung neuer Peptid-Liganden für den humanen Thrombin-Rezeptor zum Ziel haben, bei dieser Konzentration von AT durch geführt.

Herstellung von zufallsbedingten Oligonukleotid-Bibliotheken

[0384] Wie oben beschrieben.

Recycling-Vorschrift zur Identifizierung eines Sunogat- bzw. Ersatzliganden

[0385] Der Hefestamm CY1141 (MAT α far1* 1442 tbt1-1 fus1-HIS3 can1 ste14::trp1::LYS2 ste3*1156gal(41)-Galpai2 lys2 ura3 leu2 trp1 is3) wurde mit Cadus 2260 transformiert, um den Stamm CY7467 zu erhalten, der den humanen Thrombin-Rezeptor exprimiert. CY7467 wurde zu 10 ml Standard-Synthesemedium (SD) inokuliert, dem Leucin (-Leu) fehlt, und wurde über Nacht bei 30°C inkubiert. Die 10 ml Über-Nacht-Kultur wurde dazu verwendet, 50 ml YEPD-Medien zu inokulieren; diese Kultur wurde bei 30°C für 4,5 bis 5 Stunden inkubiert, und zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen geerntet und zur Transformation mit DNA vorbereitet, die eine zufallsbedingte Peptid-Bibliothek codiert [Alpha-NNK (6.24.94)], durch Elektroporation. Nach der Elektroporation (in 0,2 cm Kuvetten, 0,25 mF, 200 W, 1,5 kV) wurden die Zellen sofort in 1 ml eiskaltem 1 M Sorbitol verdünnt und 100 ml Teilmengen wurden auf 10 Synthesemedienplatten (pH 6,8) ausplattiert, denen Leucin und Uracil fehlte (-Leu -Ura). Die Platten wurden bei 30°C für 2–4 Tage inkubiert, und zu diesem Zeitpunkt wurden zwei Replikas jeder originalen Transformationsplatte zu Synthesemedien (pH 6,8) durchgeführt, denen Leucin, Uracil und Histidin fehlte, und die mit 2,5 mM AT (-Leu -Ura -His + 2,5 mM AT) supplementiert waren. Die Replika bzw. Kopien wurden bei 30°C für 3–5 Tage inkubiert. Nach der Inkubation wurden die auf den Replika-Sets von jeweils zwei vorliegenden Kolonien aus den Platten abgeschabt in ein Gesamtvolumen von 10 ml H₂O (5 ml je Platte). Die OD₆₀₀ jeder Zellsuspension wurde bestimmt und Rohplasma-Isolierungen wurden auf 8–16 OD-Einheiten von Zellen für jeden Pool durchgeführt. Insgesamt 10 Pools ergaben sich. Die Pellets, die sich aus den Rohplasmid-Isolierungen ergaben, wurden in 40 ml 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0 resuspendiert, und 1 ml wurde verwendet, um *E. coli* durch Elektroporation zu transformieren (0,1 cm Kuvetten, 0,25 mF, 200 W, 1,8 kV). Nach der Elektroporation wurden die Zellen unmittelbar in 1 ml 2XYT-Medien verdünnt und unter Schütteln bei 37°C für 30 Minuten inkubiert, wonach die Zellen dazu verwendet wurden, 50 ml 2XYT zu inokulieren, das mit 100 µg/ml Ampicillin supplementiert war. Die zehn sich ergebenden Kulturen wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde aus jeder dieser bakteriellen Kulturen isoliert, unter Verwendung von Quiagen-Säulen (Quiagen Inc., Chatsworth, CA). Jedes Plasmid-DNA-Pellet wurde in 50 ml Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0 resuspendiert.

[0386] Stamm-CY7467 wurde mit 1 ml jedes Plasmid-Pools durch Elektroporation transformiert. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 400 ml 1 M Sorbitol verdünnt. Aus jeder elektroporatisierten Zellsuspension wurden 1 ml und 400 ml Zellen auf -Leu -Ura Synthesemedien, pH 6,8 ausplattiert, um „niedrig-dichte“ und „hoch-dichte“ Ausplattierungen zu gewinnen. Die Platten wurden bei 30°C für 3 Tage inkubiert, und zu diesem Zeitpunkt wurden Kopien der beiden niedrig und hoch-dichte Platten auf -Leu -Ura -His + 2,5 mM AT durchgeführt. Für diese Fälle, in denen sich eine Anreicherung für ein Plasmid, das zur Übertragung eines His+-Phänotyps in der Lage war, aufgetreten war, würde dies durch eine amplifizierte Anzahl von His+-Kolonien auf sowohl den niedrig als auch hoch-dichte Platten reflektiert werden, die bei den Tagen 2–3 sichtbar sind, obwohl die Amplifikation am offensichtlichsten auf den Platten sein würde, die eine hohe Dichte von Zellen aufwiesen. In diesem Experiment zeigten 3/10 Pools eine Amplifikation von His+-Kolonien. Die Zellen aus jeder dieser Platten wurden in 5 ml H₂O ausgekratzt, die OD₆₀₀ der Zellsuspensionen wurde bestimmt und Rohplasma-Isolationen wurden auf 8–16 OD-Einheiten von Hefezellen durchgeführt. Die gewonnenen Pellets wurden in 40 ml 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0 resuspendiert und 1 ml wurde dazu verwendet, *E. coli* zu transformieren. Plasmid-DNA wurde durch Miniprep aus 3 ml 2XYT-Kulturen von einzelnen Bakterienkolonien isoliert, die sich aus diesen Transformationen ergaben (drei bakterielle Kolonien für jeden DNA-Pool wurden auf diese Art und Weise verarbeitet). DNAs, die sich aus den drei individuellen Bakterienkolonien pro Pool ergaben, wurden in 20 ml 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0 resuspendiert. Die drei DNAs, die pro Pool abgeleitet waren, wurden sequenziert und codierten identische Peptide. Somit wurden drei verschiedene DNA-Sequenzen abgeleitet, von denen eine jeweils einen amplifizierten Pool repräsentierte. Ein Plasmid, das jedes der drei ursprünglich amplifizierten Pools repräsentiert, wurde zur Transformation von CY7468 verwendet (das den Thrombin-Rezeptorexpressionsvektor enthält) und CY6263 (CY1141), der einen Kontrollexpressionsvektor enthält, dem jegliche Rezeptorsequenz fehlt), durch Elektroporation. CADUS 1625, ein Kontrollvektor, dem Sequenzen fehlen, die ein Peptid codieren, wurde eingeschlossen und wurde dazu verwendet, sowohl die Re-

zeptor+- als auch die Rezeptor-Stämme der Hefe zu transformieren. CADUS 1651, ein Kontrollvektor, dem Sequenzen fehlen, die einen Rezeptor codieren, wurde eingeschlossen und zur Transformation sowohl der Liganden+- als auch Liganden-Stämme der Hefe verwendet. Die Transformanden wurden zunächst auf –Leu –Ura, pH 6,8 ausgewählt, darauf wurden zwei Hefe-Transformanden jedes Typs auf –Leu –Ura; pH 6,0 aufgebracht, um diese Kolonien zu expandieren. Wenn sie einmal expandiert waren, wurden Streifen der Transformanden auf –Leu –Ura –His + 2,5 mM AT durchgeführt, um auf das Wachstum in Abwesenheit von Histidin zu testen. Eines der drei Plasmide, das getestet wurde, übertrug auf die Medien, denen Histidin fehlte, auf Hefe einen Wachstumsvorteil, die das Thrombin-codierende Plasmid trugen, jedoch nicht auf Hefe, die das Rezeptorplasmid trugen. Die von diesem Plasmid codierte Peptidsequenz ist: Val-Cys-Pro-Ala-Arg-Tyr-Val-Leu-Pro-Gly-Pro-Val-Leu (SEQ ID NO: 45) und wurde durch die Nukleotidsequenz GTT TGT CCT GCG CGT TAT GTG CTG CCT GGG CCT GTT TTG. (SEQ ID NO: 44) codiert.

Sequenzprotokoll

(1) Allgemeine Information

(i) Anmelder

(A) Name: Cadus Pharmaceutical Corporation

(B) Straße: 777 Old Saw Mill River Road

(C) Stadt: Tarrytown

(D) Staat: New York

(E) Land: USA

(F) Postleitzahl (ZIP): 10591-6705

(G) Telefon:

(H) Telefax:

(ii) Titel der Erfindung: Verfahren und Zusammensetzungen zur Identifizierung von Rezeptor-Effektoren

(iii) Anzahl der Sequenzen: 47

(iv) Korrespondenzadresse:

(A) Adressat: Lahive & Cockfield, LLP

(B) Straße: 28 State Street

(C) Stadt: Boston

(D) Staat: MA

(E) Land: USA

(F) ZIP: 02109

(v) Computerlesbare Form:

(A) Mediumtyp: Floppy Disk

(B) Computer: IBM PC-kompatibel

(C) Betriebssystem: PC-DOS/MS-DOS

(D) Software: Patent in Release Nr. 1,0 Version Nr. 1,25

- (vi) Aktuelle Anmeldedaten:
 - (A) Anmeldenummer: PCT/US97
 - (B) Anmeldetag:
 - (C) Klassifizierung:

- (vii) Daten zu früheren Anmeldungen:
 - (A) Anmeldenummer: US 08/718,910
 - (B) Anmeldetag: 24. September 1996
 - (C) Anmeldenummer: US 08/851,469
 - (B) Anmeldetag: 5. Mai 1997

- (viii) Anwalt/Vertreterinformation:
 - (A) Name: DeConti, Giulio A., Jr.
 - (B) Registrier-Nr.: 31 503
 - (C) Referenz/Aktenzeichen: CPI-031C2PC

- (ix) Telekommunikationsinformation:
 - (A) Telefon: 617/227-7400
 - (B) Telefax: 617/742-4214

(2) Information für SEQ ID NO: 1:

- (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 25 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure
 - (C) Strängigkeit: einzeln
 - (D) Topologie: linear

- (ii) Molekültyp: cDNA

Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 1:

CTAATCTCGA GTTAAGAAGG CCGTT

25

(2) Information für SEQ ID NO: 2:

- (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 25 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure
 - (C) Strängigkeit: einzeln
 - (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 2:

GTTAAGGATC CTGTACTCCA GATTT

25

(2) Information für SEQ ID NO: 3:

- (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 26 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure
 - (C) Strängigkeit: einzeln
 - (D) Topologie: linear

Molekültyp: cDNA

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 3:

GATATCGTCT CACATGTCTG CAATTA

(2) Information für SEQ ID NO: 4:

- (i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 11 Aminosäuren

(B) Typ: Aminosäure

(D) Topologie: linear

Molekültyp: Peptid

Fragmenttyp: intern

Merkmal:

Name/Schlüssel: Modifizierte Stelle

Ort: 1

Weitere Informationen:/Bemerkung= Trp ist DABYL (GABA) modifiziert

(ix) Merkmal:

Name/Schlüssel: Modifizierte Stelle

Ort: 11

Weitere Informationen:/Bemerkung= Tyr ist EDANS modifiziert

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 4:

Trp Leu Gln Leu Lys Pro Gly Gln Pro Met Tyr
1 5 10

(2) Information für SEQ ID NO: 5:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 11 Aminosäuren

(B) Typ: Aminosäure

(D) Topologie: linear

Molekültyp: Peptid

Fragmenttyp: intern

- (x) Merkmal:
Name/Schlüssel: Modifizierte Stelle
Ort: 1
Weitere Informationen:/Bemerkung= Trp ist CBZ modifiziert

- (ix) Merkmal:
Name/Schlüssel: Modifizierte Stelle
Ort: 11
Weitere Informationen:/Bemerkung= Tyr ist Rhodamin modifiziert

Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 5:

Trp Leu Gln Leu Lys Pro Gly Gln Pro Met Tyr
1 5 10

- (2) Information für SEQ ID NO: 6:
- (i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 33 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: einzeln
(D) Topologie: linear

Molekültyp: cDNA

Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 6:

CCTCCGGTCT CCCATGTCAG AGAACGGCTC CTT

33

- (2) Information für SEQ ID NO: 7:
- (i) Sequenzeigenschaften:

- (A) Länge: 36 Basenpaare
- (B) Typ: Nukleinsäure
- (C) Strängigkeit: einzeln
- (D) Topologie: linear

Molekültyp: cDNA

Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 7:

CCTCCGGTCT GGGATCCGAG AGCATCTGCC TGGTGC

36

(2) Information für SEQ ID NO: 8:

- (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 65 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure
 - (C) Strängigkeit: einzeln
 - (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 8:

CGACTAAGCT TATGGGTGCA CCTCCTAAAA AGAAGAGAAA GGTAGCCCCG CACGGATCGA

60

GCCAT

65

(2) Information für SEQ ID NO: 9:

- (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 22 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strängigkeit: einzeln

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 9:

CCGGAATTCC GTGCTCACGT TC

22

(2) Information für SEQ ID NO: 10:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 27 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strängigkeit: einzeln

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 10:

CCGGAATTCA TGAAAGTCCA AATAACC

27

(2) Information für SEQ ID NO: 11:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 28 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strängigkeit: einzeln

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 11:

GCCTGCAGAA TTATATTATA TCAGGTTG

28

(2) Information für SEQ ID NO: 12:

- (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 54 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure
 - (C) Strängigkeit: einzeln
 - (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 12:

GAGCAAAGGA GACAGAACAA GAGTAGCAGA AAGTCCAGCT GAAGCTTCGT ACGC

54

(2) Information für SEQ ID NO: 13:

- (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 57 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure
 - (C) Strängigkeit: einzeln
 - (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 13:

CACGTGCTCA CGTTCTGCTG TAGGTGACGG ATGTAGCATA GGCCACTAGT GGATCTG

57

- (2) Information für SEQ ID NO: 14:
- (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 28 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure
 - (C) Strängigkeit: einzeln
 - (D) Topologie: linear
 - (ii) Molekültyp: cDNA
 - (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 14:

CATGAAGCTT CTCCTACTAC CAAGACTG

28

- (2) Information für SEQ ID NO: 15:
- (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 26 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure
 - (C) Strängigkeit: einzeln
 - (D) Topologie: linear
 - (ii) Molekültyp: cDNA
 - (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 15:

GATCGAATTC GGTAAATTGG AATGGC

26

- (2) Information für SEQ ID NO: 16:

- (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 24 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure
 - (C) Strängigkeit: einzeln
 - (D) Topologie: linear

- (ii) Molekültyp: cDNA

- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 16:

GATCGAATTC CTGTTCCACC GGCC

24

- (2) Information für SEQ ID NO: 17:
 - (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 29 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure
 - (C) Strängigkeit: einzeln
 - (D) Topologie: linear

 - (ii) Molekültyp: cDNA

 - (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 17:

GATCTCTAGA GAGGCGATTG CTGTAATGC

29

- (2) Information für SEQ ID NO: 18:
 - (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 35 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure
 - (C) Strängigkeit: einzeln

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: weitere Nukleinsäure

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 18:

GGTGGGAGGG TGCTCTCTAG AAGGAAGTGT TCACC

(2) Information für SEQ ID NO: 19:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 41 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strängigkeit: einzeln

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: weitere Nukleinsäure

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 19:

GCCCAGGAGA CCAGACCATG GACTCCTTCA ATTATACCAC C

41

(2) Information für SEQ ID NO: 20:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 42 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strängigkeit: einzeln

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: weitere Nukleinsäure

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 20:

CCCCTTAAGC GTGAGGCAGA AGCTACTCTG CAAAAGAAGA TC

42

(2) Information für SEQ ID NO: 21:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 29 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strängigkeit: einzeln

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: weitere Nukleinsäure

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 21:

GAAGATCTTC AGCGGCCGAG TTGCATGTC

29

(2) Information für SEQ ID NO: 22:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 38 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strängigkeit: einzeln

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: weitere Nukleinsäure

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 22:

GATATATTAA GGTAGGAAC CATGGGGTGT ACAGTGAG**38**

- (2) Information für SEQ ID NO: 23:
- (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 33 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure
 - (C) Strängigkeit: einzeln
 - (D) Topologie: linear
 - (ii) Molekültyp: weitere Nukleinsäure
 - (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 23:

CGAGGCTCGA GGAACGTAT AATTAAAGTA GTG**33**

- (2) Information für SEQ ID NO: 24:
- (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 34 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure
 - (C) Strängigkeit: einzeln
 - (D) Topologie: linear
 - (ii) Molekültyp: weitere Nukleinsäure
 - (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 24:

GCGCGGTACC AAGCTTCAAT TCGAGATAAT ACCC**34**

- (2) Information für SEQ ID NO: 25:

- (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 24 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure
 - (C) Strängigkeit: einzeln
 - (D) Topologie: linear

- (ii) Molekültyp: weitere Nukleinsäure

- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 25:

CCCGAATCCA CCAATTTCTT TACG

24

- (2) Information für SEQ ID NO: 26:
 - (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 27 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure
 - (C) Strängigkeit: einzeln
 - (D) Topologie: linear

 - (ii) Molekültyp: weitere Nukleinsäure

 - (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 26:

GCGGCCTCGA CGCGGCCGCG TAACAGT

27

- (2) Information für SEQ ID NO: 27:
 - (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 37 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strängigkeit: einzeln

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: weitere Nukleinsäure

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 27:

CTGCTGGAGC TCCGCCTGCT GCTGCTGGGT GCTGGAG

37

(2) Information für SEQ ID NO: 28:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 43 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strängigkeit: einzeln

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: weitere Nukleinsäure

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 28:

CTGCTGGTCG ACGCGGCCGC GGGGGTTCCT TCTTAGAAGC AGC

43

(2) Information für SEQ ID NO: 29:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 30 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strängigkeit: einzeln

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: weitere Nukleinsäure

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 29:

GGGCTCGAGC CTCCTTAGAG CAGCTCGTAC

30

(2) Information für SEQ ID NO: 30:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 37 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strängigkeit: einzeln

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: weitere Nukleinsäure

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 30:

CTGCTGGAGC TCAAGTTGCT GCTGTTGGGT GCTGGGG

37

(2) Information für SEQ ID NO: 31:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 44 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strängigkeit: einzeln

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: weitere Nukleinsäure

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 31:

CTGCTGGTCG ACGCGGCCGC GCCCCTCAGA AGAGGCCGCG GTCC

44

- (2) Information für SEQ ID NO: 32:
- (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 29 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure
 - (C) Strängigkeit: einzeln
 - (D) Topologie: linear
 - (ii) Molekültyp: weitere Nukleinsäure
 - (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 32:

GGGCTCGAGC CTCAGAAGAG GCCGCAATC

29

- (2) Information für SEQ ID NO: 33:
- (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 37 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure
 - (C) Strängigkeit: einzeln
 - (D) Topologie: linear
 - (ii) Molekültyp: weitere Nukleinsäure
 - (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 33:

CTGCTGGAGC TCAAGCTGCT GCTACTCGGT GCTGGAG

37

- (2) Information für SEQ ID NO: 34:
- (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 49 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strängigkeit: einzeln

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: weitere Nukleinsäure

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 34:

CTGCTGGTCCG ACGCGGCCGC CACTAACATC CATGCTTCTC AATAAAGTC

49

(2) Information für SEQ ID NO: 35:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 31 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strängigkeit: einzeln

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: weitere Nukleinsäure

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 35:

GGGCTCGAGC ATGCTTCTCA AATAAGTCCA C

31

(2) Information für SEQ ID NO: 36:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 19 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strängigkeit: einzeln

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: weitere Nukleinsäure

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 36:

GCATCCATCA ATAATCCAG

19

(2) Information für SEQ ID NO: 37:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 23 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strängigkeit: einzeln

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: weitere Nukleinsäure

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 37:

GAAACAATGG ATCCACTTCT TAC

23

(2) Information für SEQ ID NO: 38:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 36 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strängigkeit: einzeln

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: weitere Nukleinsäure

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 38:

GGCGCCCGGT CTCCCATGGA AACCAACTTC TCCACT
36

(2) Information für SEQ ID NO: 39:

- (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 40 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure
 - (C) Strängigkeit: einzeln
 - (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: weitere Nukleinsäure

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 39:

GGCGCCCGGT CTCCGATCCC ATTGCCTGTA ACTCAGTCTC

40

(2) Information für SEQ ID NO: 40:

- (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 13 Aminosäuren
 - (B) Typ: Aminosäure
 - (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Protein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 40:

GGCGCCCGGT CTCCGATCCC ATTGCCTGTA ACTCAGTCTC

40

(2) Information für SEQ ID NO: 41:

- (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 39 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure
 - (C) Strängigkeit: einzeln

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: weitere Nukleinsäure

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 41:

TCTCTGCTTT GGCTGACTTG TCGGCCTTGG GAGGCGATG

(2) Information für SEQ ID NO: 42:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 23 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strängigkeit: einzeln

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: weitere Nukleinsäure

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 42:

GGGCCATGGG GCCGCGGCGG TTG

23

(2) Information für SEQ ID NO: 43:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 32 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strängigkeit: einzeln

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: weitere Nukleinsäure

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 43:

CCCGGATCCT AAGTTAACAG CTTTTGTAT AT

32

(2) Information für SEQ ID NO: 44:

- (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 39 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure
 - (C) Strängigkeit: einzeln
 - (D) Topologie: linear
- (ii) Molekültyp: weitere Nukleinsäure
- (ix) Merkmal:
 - (A) Name/Schlüssel: CDS
 - (B) Ort: 1..39
- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 44:

GTT TGT CCT GCG CGT TAT GTG CTG CCT GGG CCT GTT TTG
 Val Cys Pro Ala Arg Tyr Val Leu Pro Gly Pro Val Leu
 1 5 10

39

(2) Information für SEQ ID NO: 45:

- (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 13 Aminosäuren
 - (B) Typ: Aminosäure
 - (D) Topologie: linear
- (ii) Molekültyp: Protein
- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 45:

Val Cys Pro Ala Arg Tyr Val Leu Pro Gly Pro Val Leu
1 5 10

(2) Information für SEQ ID NO: 46:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 10 Aminosäuren

(B) Typ: Aminosäure

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Protein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 46:

Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly
1 5 10

(2) Information für SEQ ID NO: 47:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 9 Aminosäuren

(B) Typ: Aminosäure

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Protein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 47:

Leu Glu Lys Gln Arg Asp Lys Asn Glu
1 5

Patentansprüche

1. Assay zum Identifizieren einer Verbindung, die einen von einer Hefezelle exprimierten heterologen Rezeptor moduliert, das Folgendes umfasst:

(i) Bereitstellen einer Hefezelle, die einen heterologen Rezeptor exprimiert, der funktionell in einen endogenen Hefe-Signalstoff-Stoffwechselweg integriert ist, wobei die Hefezelle ein endogenes Gen umfasst, das operativ an einen heterologen Promotor am natürlichen Ort des endogenen Gens in der Hefezelle gebunden ist, wobei der Promotor auf Signale anspricht, die durch den Hefe-Signalstoff-Stoffwechselweg erzeugt werden;

(ii) In-Berührung-Bringen der Hefezelle mit einer Testverbindung; und
(iii) Nachweisen einer Veränderung des Signals, das durch den endogenen Hefe-Signalstoff-Stoffwechselweg erzeugt wurde;
um dadurch eine Verbindung zu identifizieren, die den heterologen Rezeptor moduliert.

2. Assay nach Anspruch 1, wobei:

- (a) der Hefe-Signalstoff-Stoffwechselweg ein Hefe-Pheromon-Reaktions-Weg ist; und/oder
- (b) der Schritt des Nachweisens ein Messen der Transkription des Genes umfasst; und/oder
- (c) der Schritt des Nachweisens ein Messen der Menge oder der Aktivität eines endogenen Hefe-Proteins umfasst, das durch das Gen kodiert wird; und/oder
- (d) die Testverbindung aus einer Peptid-Bibliothek gewonnen wird; und/oder
- (e) die Testverbindung aus einer Bibliothek aus Nicht-Peptid-Verbindungen gewonnen wird.

3. Assay zum Identifizieren einer Verbindung, die einen heterologen Rezeptor moduliert, der durch eine Hefezelle exprimiert wird, der Folgendes umfasst:

- (i) Bereitstellen einer Hefezelle, die einen heterologen Rezeptor exprimiert, der funktionell in einen endogenen Hefe-Signalstoff-Stoffwechselweg integriert ist, der operativ an ein endogenes Gen gebunden ist, das eine Protease kodiert;
 - (ii) In-Berührung-Bringen der Hefezelle mit einer Testverbindung; und
 - (iii) Nachweisen einer Veränderung des Signals, das durch den endogenen Hefe-Signalstoff-Stoffwechselweg erzeugt wird;
- um dadurch eine Verbindung zu identifizieren, die den heterologen Rezeptor moduliert.

4. Assay nach Anspruch 3, wobei das endogene Hefe-Gen operativ an einen Promotor am natürlichen Ort des endogenen Gens in der Hefezelle gebunden ist, wobei der Promotor auf Signale anspricht, die durch einen Hefe-Pheromon-Reaktionsweg erzeugt werden.

5. Assay nach Anspruch 4, wobei der Promotor Folgendes ist:

- (a) natürlich vorkommend; oder
- (b) nicht natürlich vorkommend; oder
- (c) ein heterologer Promotor, der operativ an das endogene Hefe-Gen gebunden ist.

6. Assay nach Anspruch 5, wobei der Promotor eine mutierte Form eines natürlich vorkommenden Promotors ist.

7. Assay nach Anspruch 5, wobei der Promotor aus den Fus-1- und Fus-2-Promotoren ausgewählt ist.

8. Assay nach Anspruch 4, wobei das endogene Hefe-Gen das BAR1-Gen ist.

9. Assay zum Identifizieren einer Verbindung, die einen heterologen Rezeptor moduliert, der durch eine Hefezelle exprimiert wird, der Folgendes umfasst:

- (i) Bereitstellen einer Hefezelle, die einen heterologen Rezeptor exprimiert, der funktionell in einen endogenen Hefe-Signalstoff-Stoffwechselweg integriert ist, wobei die Hefezelle ein Gen umfasst, das ein nachweisbares Protein und ein chimäres Nukleinsäure-Konstrukt kodiert, wobei das Konstrukt Folgendes umfasst: ein erstes Segment, abgeleitet von einem ersten Gen, wobei das erste Segment ein Polypeptid kodiert, das durch den endogenen Hefe-Signalstoff-Stoffwechselweg aktiviert wird, und ein zweites Segment, das von einem zweiten Gen abgeleitet ist, wobei das zweite Segment ein Polypeptid kodiert, das eine DNA-Sequenz in der regulatorischen Region des Genes bindet; derart, dass das Gen gegenüber einer Aktivierung des Hefe-Signalstoff-Stoffwechselweges ansprechbar gemacht wird;
- (ii) In-Berührung-Bringen der Hefezelle mit einer Testverbindung; und
- (iii) Nachweisen einer Veränderung des Signals, das durch den endogenen Hefe-Signalstoff-Stoffwechselweg erzeugt wird, durch Messen der Transkription des Genes, das das nachweisbare Protein kodiert, um dadurch eine Verbindung zu identifizieren, die den heterologen Rezeptor moduliert.

10. Assay nach Anspruch 9, wobei der Signalweg ein Hefe-Pheromon-Reaktionsweg ist.

11. Assay nach Anspruch 10, wobei:

- (a) das erste Segment von einem Ste12-Gen abgeleitet ist; und/oder
- (b) das zweite Segment von einem Pho4-Gen abgeleitet ist; und/oder
- (c) das Gen, das ein nachweisbares Protein kodiert, das endogene Hefe-Pho5-Gen ist.

12. Assay nach Anspruch 11, wobei das erste Segment ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuren 1–688 von Ste12 kodiert und/oder das zweite Segment ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuren 227–312 von Pho4 umfasst.

13. Assay nach Anspruch 11(b), wobei die Hefezelle eine Mutation in ihrem endogenen Pho4-Gen umfasst.

14. Assay nach Anspruch 11(c), wobei der Schritt des Messens ein Nachweisen der Aktivität von Pho5-saurer Phosphatase umfasst.

15. Assay nach Anspruch 1, wobei der Schritt des Nachweisens ein Nachweisen einer Veränderung der Aktivität eines endogenen Enzyms umfasst, das durch die Hefezelle in Reaktion auf ein Signal exprimiert wird, das durch den endogenen Hefe-Signalstoff-Stoffwechselweg erzeugt wird, wobei optional:

- (a) der Hefe-Signalstoff-Stoffwechselweg ein Hefe-Pheromon-Reaktionsweg ist; oder
- (b) der Schritt des Nachweisens ein Messen der enzymatischen Aktivität des Enzyms umfasst; oder
- (c) das Enzym eine BAR1-Protease ist.

16. Assay nach Anspruch 15, wobei der Schritt des Nachweisens ein Bestimmen der Spaltung eines Substrats umfasst, das eine BAR1-Peptid-Erkennungssequenz aufweist.

17. Assay nach Anspruch 16, wobei das Substrat natürlich vorkommt.

18. Assay nach Anspruch 15, wobei das Substrat nicht natürlich vorkommt, wobei optional:

- (a) das Substrat die Verbindung von SEQ ID NO: 4 umfasst; oder
- (b) das Substrat die Verbindung von SEQ ID NO: 5 umfasst.

19. Assay nach Anspruch 15(c), 16 oder 17, wobei das BAR1-Substrat zumindest eine nachweisbare Markierung umfasst.

20. Assay nach Anspruch 15, 16 oder 17, wobei der Schritt des Nachweisens ein Messen der Wirkung des Enzyms auf das Wachstum eines Testhefe-Stammes umfasst, der funktionelles BAR1 Enzym nicht exprimiert.

21. Assay nach Anspruch 15(c), wobei das Substrat ein chimäres Substrat ist, das Folgendes umfasst: ein erstes Peptid, das nach Spaltung durch BAR1, ein Amino-terminales Lys exponiert; und ein zweites Polypeptid, das an den Carboxy-Terminus des ersten Polypeptids gebunden ist; wobei der Schritt des Nachweisens ein Messen der Stabilität des chimären Substrates umfasst.

22. Assay zum Identifizieren einer Verbindung, die einen Rezeptor in einer Zelle moduliert, der Folgendes umfasst:

- (i) Bereitstellen einer Zelle, die einen Rezeptor exprimiert, der funktionell in einen endogenen Signalstoff-Stoffwechselweg der Zelle integriert ist, wobei die Zelle ein endogenes Gen umfasst, das operativ an einen heterologen Promotor an der natürlichen Stelle des endogenen Gens in der Zelle gebunden ist, wobei der Promotor auf Signale anspricht, die durch den endogenen Signalstoff-Stoffwechselweg erzeugt werden;
- (ii) In-Berührung-Bringen der Zelle mit einer Bibliothek von Test-Polypeptiden, wobei die Bibliothek von Test-Polypeptiden durch die Zelle exprimiert wird; und
- (iii) Nachweisen einer Veränderung des Signals, das durch den endogenen Signalstoff-Stoffwechselweg erzeugt wird;

um dadurch eine Verbindung zu identifizieren, die den Rezeptor moduliert, wobei optional:

- (a) die Zelle eine Hefezelle ist; und/oder
- (b) wobei der Schritt des Messens ein Messen der Transkription des endogenen Gens oder der Aktivität eines endogenen Proteins in der Zelle umfasst.

23. Assay nach Anspruch 22, wobei die Zelle eine Hefezelle ist, und wobei der Signalstoff-Stoffwechselweg ein Hefe-Pheromon-Reaktionsweg ist.

24. Assay zum Identifizieren einer Verbindung, die ein Pheromonsystem-Proteinsurrogat in einer Hefezelle moduliert, der Folgendes umfasst:

- (i) Bereitstellen einer Hefezelle, die ein Pheromonsystem-Proteinsurrogat umfasst, das funktionell in einen endogenen Pheromon-Signalstoff-Stoffwechselweg der Hefezelle integriert ist, und ein endogenes Gen, das operativ an einen heterologen Promotor am natürlichen Ort des endogenen Gens in der Hefezelle gebunden ist, wobei der Promotor auf Signale anspricht, die durch den endogenen Pheromon-Signalstoff-Stoffwechselweg

erzeugt werden;

(ii) In-Berührung-Bringen der Zelle mit einer Bibliothek von Test-Polypeptiden, wobei die Bibliothek von Test-Polypeptiden durch die Zelle exprimiert wird; und

(iii) Messen einer Veränderung des Signal, das durch den endogenen Pheromon-Signalstoff-Stoffwechselweg der Hefezelle erzeugt wird;

um dadurch eine Verbindung zu identifizieren, die das Pheromonsystem-Proteinsurrogat moduliert, wahlweise:

(a) wobei der Schritt des Messens ein Messen der Transkription des endogenen Gens oder der Aktivität eines endogenen Proteins in der Zelle umfasst; oder

(b) wobei das Pheromonsystem-Proteinsurrogat aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, G-Proteinen, Proteasen, Kinasen, Farnesyltransferasen, Carboxymethyltransferasen, ABC-Transportern und Cyclinen besteht.

25. Substrat für ein BAR1-Enzym, wobei das Substrat die Verbindung von SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 5 umfasst.

26. Chimäres Substrat für ein BAR1-Enzym, wobei das chimäre Substrat Folgendes umfasst:

ein erstes Polypeptid-Segment, abgeleitet aus einem reifen Hefe-A-Faktor und ein zweites Polypeptid-Segment, abgeleitet aus einem zweiten unterschiedlichen Polypeptid, wobei nach Spaltung des ersten Polypeptid-Segments durch BAR1 eine Veränderung der Stabilität des zweiten Polypeptid-Segments nachweisbar ist, wobei wahlweise:

(a) das zweite Polypeptid-Segment von LacZ abgeleitet ist; und/oder

(b) das zweite Polypeptid-Segment von einem Protein abgeleitet ist, das für das Hefezellwachstum essentiell ist; und/oder

(c) das zweite Polypeptid-Segment von einem Heferepressor-Protein abgeleitet ist.

27. Chimäres Nukleinsäurekonstrukt, das Folgendes umfasst:

ein erstes Segment, das eine Nukleotidsequenz umfasst, die ein Polypeptid kodiert, das durch einen Hefe-Pheromon-Reaktionsweg aktiviert wird; und

ein zweites Segment, das eine Nukleotidsequenz umfasst, die ein Pho4-Polypeptid umfasst, wobei wahlweise das erste Segment ein Ste12-Polypeptid kodiert.

28. Hefezelle, die das Konstrukt nach Anspruch 27 umfasst.

29. Assay zum Identifizieren einer Verbindung, die einen humanen FPRL-1-Rezeptor moduliert, der heterolog durch eine Hefezelle exprimiert wird, der Folgendes umfasst:

(i) Bereitstellen einer Hefezelle, die einen humanen FPRL-1-Rezeptor exprimiert, der voll in einen endogenen Hefe-Pheromon-Reaktionsweg integriert ist und auf diesen anspricht;

(ii) In-Berührung-Bringen der Hefezelle mit einer Testverbindung; und

(iii) Nachweisen einer Veränderung des Signals, das durch den endogenen Hefe-Pheromon-Reaktionsweg erzeugt wird;

um dadurch eine Verbindung zu identifizieren, die einen humanen FPRL-1-Rezeptor moduliert.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIGUR 1

Sequenzalignments von N-terminalen Regionen von α -Untereinheiten und von N-terminalen Sequenzen von GPA₄₁- α -Hybrid-Proteinen

A. Alignment von GPA1 mit α -Untereinheiten

```

GPA1
MGC.TVSTOTIGDESDFELONKRANVDVIEOSLOLEKORDKNEIKLALLGAGESGKSTIVKQMLLHQ.....
GaS
MGCLGTS..KTEDQRNEKQREANKKIEKQLQKQVYRATHRLLLLGAGESGKSTIVKQMRILHV.....
Ga12
MGC.TVS.....AEDKAARSKMIDKNIREDGEKAAREVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKI IHE.....
Ga13
MGC.TVS.....AEDKAVERS KMIDRNIREDGEKAAREVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKI IHE.....
Ga16
MARSLIWRCCPWCLTEDEKAAARVDQEI NRILLEQKKQDRGELKDLLLGPGESGKSTFIKQMRI IHG.....

```

B. GPA₄₁- α -Hybride

```

GPA41-GaS
MGC.TVSTOTIGDESDFELONKRANVDVIEOSLOLLKORDKNERKLLLLGAGESGKSTIVKQMRILHV.....
GPA41-Ga12
MGC.TVSTOTIGDESDFELONKRANVDVIEOSLOLEKORDKNEVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKI IHE.....
GPA41-Ga13
MGC.TVSTOTIGDESDFELONKRANVDVIEOSLOLEKORDKNEVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKI IHE.....
GPA41-Ga16
MGC.TVSTOTIGDESDFELONKRANVDVIEOSLOLEKORDKNEIKLALLGAGESGKSTFIKQMRI IHG.....

```