



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 34 741 T2** 2006.11.02

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 745 130 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 34 741.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/02075**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 910 301.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/021925**

(86) PCT-Anmeldetag: **14.02.1995**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **17.08.1995**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **04.12.1996**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **11.01.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.11.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/62** (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C07K 14/72 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

195729 14.02.1994 US

(73) Patentinhaber:

BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE

(74) Vertreter:

Dres. Fitzner & Münch, 40878 Ratingen

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**PAUSCH, Henry, Mark, Robbinsville, NJ 08691, US;
OZENBERGER, Alton, Bradley, Yardley, PA 19067,
US; HADCOCK, Richard, John, Mount Holly, NJ
08060, US; PRICE, Alicia, Laura, Langhorne, PA
19047, US; KAJKOWSKI, Marie, Eileen, Ringoes,
NJ 08551, US; KIRSCH, Richard, Donald,
Princeton, NJ 08540, US; CHALEFF, Tardy,
Deborah, Pennington, NJ 08534, US**

(54) Bezeichnung: **IN HEFE EXPRIMIERTE HETEOLOGE G-PROTEIN-GEKOPPELTE REZEPTOREN, FUSIONEN
DESSELBEN MIT G-PROTEINEN UND DEREN VERWENDUNG IM BIOTEST**

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

Technisches Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Expressionskonstrukte für heterologe G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, derartige Rezeptoren exprimierende Hefezellen, zur Herstellung solcher Zellen geeignete Vektoren sowie Verfahren zur Herstellung und Verwendung davon.

Technischer Hintergrund der Erfindung

[0002] Die Wirkungen für viele extrazelluläre Signale, beispielsweise Neurotransmitter, Hormone, Duftstoffe und Licht, werden von Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen (G-Protein-gekoppelten Rezeptoren) sowie heterotrimären guaninnukleotidbindenden regulatorischen Proteinen (G-Proteinen) vermittelt. G-Proteine umfassen drei Untereinheiten: eine guanylnukleotidbindende α -Untereinheit, eine β -Untereinheit sowie eine γ -Untereinheit [für eine Übersicht, siehe Conklin, B.R. und Bourne, H.R. (1993 Cell 73, 631-641)]. Je nachdem, ob GDP oder GTP an die α -Untereinheit gebunden ist, zyklisieren G-Proteine zwischen zwei Formen. Ist GDP gebunden, so existiert das G-Protein als ein Heterotrimer in Form des $G\alpha\beta\gamma$ -Komplexes. Ist GTP gebunden, so dissoziiert die α -Untereinheit, wobei ein $G\beta\gamma$ -Komplex zurückbleibt. Von Bedeutung ist dabei, daß, wenn ein $G\alpha\beta\gamma$ -Komplex mit einem aktivierten G-Protein-gekoppelten Rezeptor in einer Zellmembran operativ in Verbindung tritt, die Geschwindigkeit des Austauschs von gebundenem GDP gegen GTP steigt und sich somit die Geschwindigkeit der Dissoziation der gebundenen $G\alpha$ -Untereinheit vom $G\beta\gamma$ -Komplex erhöht. Die freie $G\alpha$ -Untereinheit und der $G\beta\gamma$ -Komplex sind in der Lage, ein Signal auf nachgeschaltete Elemente verschiedener Signaltransduktionswege zu übertragen. Dieses grundlegende Schema von Ereignissen bildet die Grundlage für eine Vielzahl unterschiedlicher Zellsignalisierungsphänomene. Für eine Übersicht, siehe H.G. Dohlgman, J. Thorner, M. Caron und R.J. Lefkowitz, Ann. Rev. Biochem, 60, 653-688 (1991). G-Protein-vermittelte Signalisierungssysteme sind in so verschiedenen Organismen wie Hefe und Mensch vorhanden. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wird als eukaryontischer Modellorganismus genutzt. Aufgrund der Leichtigkeit, mit der sich die genetische Konstitution der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* manipulieren läßt, hat sich unter den Forschern ein detailliertes Verständnis vieler komplexer biologischer Wege herausgebildet. Dabei konnte bei zahlreichen Systemen demonstriert werden, daß die Proteinstruktur evolutionär so konserviert ist, daß viele heterologe Proteine ihre Hefeäquivalente ersetzen können. So können beispielsweise $G\alpha$ -Proteine aus Säugern heterotrimere Komplexe mit $G\beta\gamma$ -Proteinen aus Hefe bilden [Kang, Y.-S., Kane, J., Kurjan, J., Stadel, J.M. und Tipper, D.J. (1990) Mol. Cell. Biol. 10, 2582-2590]. Ferner konnte von Murphy et al. (J. Cell. Biochem. Bd. 18B, Seite 224, 1994) eine autokrine Stimulierung der Hefe durch Austausch der $G\alpha$ -Untereinheit der Hefe gegen ein modifiziertes menschliches $G\alpha_{12}$ demonstriert werden. Dies repräsentiert ein sehr spezifisches System, das auf der Expression des Angiotensin-II-Typ-Rezeptors (der die menschliche G-Protein- α -Untereinheit ($G\alpha_{12}$) übernimmt) und dem Angiotensin-II-Octapeptid als entsprechenden Liganden beruht. Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren stellen wichtige Ziele für neue therapeutische Arzneistoffe dar. Die Entdeckung solcher Arzneistoffe erfordert notwendigerweise Screening-Tests mit hoher Spezifität und hohem Durchsatz. So erfordert beispielsweise ein therapeutisches Eingreifen in die Somatostatin-Wachstumshormon-Achse neue chemische Wirkstoffe, die Somatostatinrezeptorsubtyp-selektiv wirken. Bei dem Somatostatinrezeptor (SSTR) handelt es sich um einen Prototyp der Klasse von Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen in Säugerzellen. Das zyklische Tetradecapeptidsomatostatin wurde zuerst aus Hypothalamus isoliert, und es konnte gezeigt werden, daß es sich dabei um einen starken Inhibitor der Freisetzung von Wachstumshormon aus dem Hypophysenvorderlappen handelt und daß es breite modulatorische Wirkungen im ZNS und in peripheren Geweben aufweist. Als Reaktion auf die Bindung von Somatostatin aktiviert der SSTR ein heterotrimeres G-Protein, das wiederum die Aktivität verschiedener Effektorproteine, einschließlich, ohne darauf beschränkt zu sein, Adenylatcyclasen, Ionenkanälen und Phospholipasen, modifiziert. Die Somatostatineffekte werden über die Wirkungsweise von in fünf unterschiedlichen Rezeptorsubtypen codierten Genprodukten, die kürzlich kloniert werden konnten, weitergeleitet [Strnad, J., Eppler, C.M., Corbett, M. und Hadcock, J.R. (1993) BBRC 191, 968-976; Yamada, Y., Post, S.R., Wang, K., Tager, H.S., Bell, G.I. und Seino, S. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 251-255; Meyerhof, W., Paust, H.-J., Schonrock, C. und Richter, D. (1991); Kluxen, F.-W., Bruns, C. und Lubbert, H. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4618-4622; Li, X.-J., Forte, M., North, R.A., Rose, C.A. und Snyder, S. (1992) J. Biol. Chem. 267, 21307-21312; Bruno, J.F., Xu, Y., Song, J. und Berelowitz, M. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 11151-11154; O'Carroll, A.-M., Lolait, S.J., König, M. und Mahan, L. (1992) Mol. Pharmacol. 42, 939-946]. Screening-Tests, bei denen zur Anpassung an die funktionelle Expression der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren genetisch modifizierte Hefestämme eingesetzt werden, bieten bei der Forschung an der Bindung von Liganden an den Somatostatinrezeptor ebenso wie eine Reihe weiterer Rezeptoren, die mit verschiedenen Krankheitszuständen in Verbindung gebracht werden, signifikante Vorteile.

Kurze Beschreibung der Erfindung

[0003] Ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung richtet sich auf Expressionsvektoren sowie damit transformierte Hefezellen, wobei die Vektoren eine erste, für einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, beispielsweise den Somatostatinrezeptor, codierende heterologe Nukleotidsequenz sowie eine zweite, für einen G-Protein- $\alpha\beta\gamma$ -Komplex in seiner Gesamtheit oder einen Teil davon codierende Nukleotidsequenz enthalten. In bestimmten Ausführungsformen ist eine für eine α -Untereinheit eines heterologen G-Proteins codierende Nukleotidsequenz in ihrer Gesamtheit oder teilweise an eine Nukleotidsequenz von der Hefe-G-Protein- α -Untereinheit fusioniert. In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen enthalten die Expressionsvektoren und transformierten Zellen eine dritte heterologe Nukleotidsequenz, die einen auf Pheromon reagierenden Promotor sowie ein stromabwärts von dem auf Pheromon reagierenden Promotor liegendes und damit operativ assoziiertes Indikatorgen umfaßt. Die Vektoren und Zellen können ferner mehrere Mutationen enthalten. Dazu gehören 1) eine Mutation des SCG1/GPA1-Gens aus Hefe, durch die das Hefe-G α -Protein inaktiviert wird, was die Wechselwirkung des heterologen Rezeptors mit dem G-Protein erleichtert; 2) eine Mutation eines Hefegens, um dessen Funktion zu inaktivieren und der Hefezelle zu ermöglichen, trotz der Aktivierung des Signaltransduktionswegs der Reaktion auf Pheromon weiterzuwachsen, wobei es sich hier bei bevorzugten Ausführungsformen um Mutationen der Gene FAR1 und/oder FUS3 handelt, und 3) eine Mutation eines Hefegens, deren Effekt in einem starken Anstieg der Empfindlichkeit der Reaktion der Zelle auf die rezeptorabhängige Aktivierung des Signaltransduktionswegs der Reaktion auf Pheromon besteht, wobei es sich bei bevorzugten Genen diesbezüglich um die Gene SST2, STE50, SGV1, STE2, STE3, PIK1, AFRI, MSG5 und SIG1 handelt.

[0004] Bei einem zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung handelt es sich um ein chimärisches Expressionskonstrukt sowie damit transformierte Hefezellen, wobei das Konstrukt eine erste, für einen Hefe-G-Protein-gekoppelten Rezeptor codierende Nukleotidsequenz in operativer Assoziation mit einer heterologen Nukleotidsequenz, die für einen heterologen G-Protein-gekoppelten Rezeptor codiert, umfaßt. Dabei können die Konstrukte und Zellen eine zweite heterologe Nukleotidsequenz enthalten, die einen auf Pheromon reagierenden Promotor sowie ein stromabwärts von dem auf Pheromon reagierenden Promotor liegendes und mit diesem operativ assoziiertes Indikatorgen umfaßt. Die Konstrukte und Zellen können ferner mehrere Mutationen enthalten. Zu diesen gehören 1) eine Mutation eines Hefegens, um dessen Funktion zu inaktivieren und der Hefezelle zu ermöglichen, trotz der Aktivierung des Signaltransduktionswegs der Reaktion auf Pheromon weiterzuwachsen, wobei es sich hier bei bevorzugten Ausführungsformen um Mutationen der Gene FAR1 und/oder FUS3 handelt, und 2) eine Mutation eines Hefegens, deren Effekt in einem starken Anstieg der Empfindlichkeit der Reaktion der Zelle auf die rezeptorabhängige Aktivierung des Signaltransduktionswegs der Reaktion auf Pheromon besteht, wobei es sich bei bevorzugten Genen diesbezüglich um die Gene SST2, STE50, SGV1, STE2, STE3, PIK1, AFRI, MSG5 und SIG1 handelt. Ein produktives Signal wird in einem Bioassay durch Kopplung des heterologen Rezeptors an ein Hefeprotein nachgewiesen.

[0005] Bei einem dritten Aspekt der vorliegenden Erfindung handelt es sich um ein Verfahren zum Testen von Verbindungen zur Bestimmung der Auswirkungen einer Ligandenbindung an die heterologen Rezeptoren durch Messung der Auswirkungen auf das Zellwachstum. In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen werden dabei Hefezellen der oben beschriebenen Art in zur Auslösung der Expression heterologer Proteine geeignetem Wachstumsmedium kultiviert, in Agar-Wachstumsmedium eingebettet und auf die Oberfläche der Agarplatten ausgebrachten Verbindungen ausgesetzt. Dabei erwartet man Auswirkungen auf das Wachstum der eingebetteten Zellen um Verbindungen herum, die den heterologen Rezeptor aktivieren. Ein verstärktes Wachstum könnte bei Verbindungen, die als Agonisten wirken, beobachtet werden, während ein reduziertes Wachstum bei solchen, die als Antagonisten wirken, beobachtet werden könnte.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0006] [Fig. 1](#). Die angegebenen G α -Expressionsplasmide enthaltende Stämme werden mit Paarungspheromon (α -Faktor) behandelt. Ein Maß für die erhaltene Signaltransduktion wird durch ein FUS1-lacZ tragendes Reporterplasmid bereitgestellt. Die Daten sind als Prozent β -Galactosidaseaktivität, gemessen in einem lediglich das Wildtyp-G α -Protein exprimierenden Stamm, dargestellt.

[0007] [Fig. 2](#). Das angegebene CUP1p-G α -Expressionsplasmid enthaltende Stämme, die in die angegebene Kupferkonzentration enthaltendem Medium angezogen wurden, werden mit Paarungspheromon (α -Faktor) behandelt. Ein Maß für die erhaltene Signaltransduktion wird durch ein FUS1-lacZ tragendes Reporterplasmid bereitgestellt. Die Daten sind als Prozent β -Galactosidaseaktivität, gemessen in einem kein exogenes G α -Protein exprimierenden Stamm, dargestellt.

- [0008] Fig. 3.** Sättigungsbindung von ^3H -Spiperon an aus einem den Serotoninrezeptor 5HT1a exprimierenden Stamm (CY382) präparierte Hefemembranfraktionen. $B_{\text{max}} = 3,2 \text{ pmol/mg Protein}$; $K_d = 115 \text{ nM}$.
- [0009] Fig. 4.** Aminoterminal chimärische Ste2/5HT1a-Rezeptoren. Der CHI11-Rezeptor enthält die ersten 14 Aminosäuren des Hefeproteins Ste2. Der CHI17-Rezeptor weist einen Austausch des Aminoterminus des Rezeptors 5HT1a über die ersten beiden Transmembrandomänen gegen den entsprechenden Bereich des Rezeptors Ste2 auf. Der CHI18-Rezeptor weist die gleichen Ste2-Sequenzen auf, und zwar direkt an den Aminoterminus des 5HT1a-Rezeptors fusioniert, so daß ein Rezeptor erzeugt wird, von dem vorhergesagt wird, daß er die Zellmembran neunmal überspannt. Die B_{max} -Werte wurden durch Messen der maximalen Bindung des radioaktiv markierten Liganden ^3H -Spiperon bestimmt. Die Werte sind als pmol gebundener radioaktiv markierter Ligand pro mg Gesamtprotein angegeben.
- [0010] Fig. 5.** Analyse der kompetitiven Bindung der Agonisten Isoproterenol oder Epinephrin gegenüber ^{125}I -Cyanopindolol mit von einem den β_2 -adrenergen Rezeptor exprimierenden Wildtyp-Hefestamm präparierten Rohmembranextrakten. Die Daten sind als Prozent Maximalbindung des radioaktiv markierten Liganden dargestellt. IC_{50} -Werte = 10 nM, Isoproterenol; 200 nM, Epinephrin.
- [0011] Fig. 6.** Analyse der kompetitiven Bindung der Agonisten Isoproterenol oder Epinephrin gegenüber ^{125}I -Cyanopindolol mit aus einem den β_2 -adrenergen Rezeptor sowie Säuger- G_{os} coexprimierenden Hefestamm präparierten Extrakten. Die Daten sind als Prozent Maximalbindung des radioaktiv markierten Liganden dargestellt. IC_{50} -Werte = 10 nM, Isoproterenol; 60 nM, Epinephrin.
- [0012] Fig. 7.** Sättigungsbindung von ^{125}I tyr 11 S-14 an Membranen von den SSTR2-Subtyp sowie Scgl/ G_{ia2} coexprimierenden Hefezellen. Membranen von den SSTR2-Subtyp exprimierenden Hefezellen wurden wie unter Experimentelle Vorgehensweisen beschrieben präpariert. Die Sättigungsbindung wurde mit 20-1600 pM ^{125}I tyr 11 S-14 durchgeführt. Die nichtspezifische Bindung für jeden Punkt in Form von gebundenen cpm in Gegenwart von 1 μM kaltem S-14 reichte von 10 bis 40%. Dargestellt ist ein mit Doppelbestimmung durchgeführtes repräsentatives Experiment.
- [0013] Fig. 8.** Immunoblot, der die Expression des Somatostatinrezeptors zeigt. Membranfraktionen wurden aus den angegebenen Hefestämmen isoliert. Teilmengen von 5 bis 30 μg Protein werden mittels Polyacrylamidgelelektrophorese/Western-Blot-Analyse untersucht. Die Molekulargewichtsmarker sind in Kilodalton angegeben. Die Somatostatinrezeptor-Proteinbanden sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Mehrere Spezies dieses Rezeptors sind zu sehen, und zwar Doppel- sowie Dreifachbanden zusätzlich zu dem 43 kd großen einfachen Rezeptor. Spuren 1+2: CY602 (siehe Tabelle 1); 3+4: CY603; 5+6: CY624; 7: keinen Rezeptor exprimierender kongener Stamm.
- [0014] Fig. 9.** Immunoblot, der die Expression des muskarinischen Acetylcholinrezeptors (mAChR) zeigt. Membranfraktionen werden aus den angegebenen Hefestämmen isoliert. Teilmengen von jeweils 30 μg Protein werden mittels Polyacrylamidgelelektrophorese/Western-Blot-Analyse, wie im Text beschrieben, untersucht. Die Molekulargewichtsmarker sind in Kilodalton angegeben. mAChR-Proteinbanden sind mit Pfeilen gekennzeichnet.
- [0015] Fig. 10.** Immunoblot, der die Expression von α_2 -AR zeigt. Membranfraktionen werden aus den angegebenen Hefestämmen isoliert. Teilmengen von jeweils 30 μg Protein werden mittels Polyacrylamidgelelektrophorese/Western-Blot-Analyse untersucht. Die Molekulargewichtsmarker sind in Kilodalton angegeben. α_2 -AR-Proteinbanden sind mit Pfeilen gekennzeichnet.
- [0016] Fig. 11.** Somatostatinrezeptor-Expressionsplasmid pJH1.
- [0017] Fig. 12.** G-Protein-Expressionsplasmid pLP82.
- [0018] Fig. 13 (A&B).** Dosisabhängige Reaktion des Wachstums von Hefezellen auf Somatostatin. Kulturen des Hefestamms LY268 werden in Agar (obere Platte) eingebettet oder gleichmäßig über die Oberfläche von Agarplatten ausgestrichen (untere Platte) und den angegebenen, auf oben auf den Agar gelegte Papierscheibchen punktförmig aufgetragenen Mengen an den genannten Verbindungen ausgesetzt. Die Platten werden bei 30°C inkubiert.
- [0019] Fig. 14 (A,B,C,&D).** Die Reaktion des Wachstums von Somatostatin ausgesetzten Hefezellen hängt von der Menge des exprimierten chimärischen G-Proteins ab. Kulturen von im Text beschriebenen Hefestäm-

men werden in Agar eingebettet und den angegebenen, auf oben auf den Agar gelegte Papierscheibchen punktförmig aufgetragenen Mengen an den genannten Verbindungen ausgesetzt. Die Platten werden bei 30°C inkubiert.

[0020] Fig. 15 (A,B,C,&D). Die Reaktion des Wachstums von Somatostatin ausgesetzten Hefezellen hängt von der Menge des exprimierten Hefe-G-Proteins ab. Kulturen von im Text beschriebenen Hefestämmen werden in Agar eingebettet und den angegebenen, auf oben auf den Agar gelegte Papierscheibchen punktförmig aufgetragenen Mengen an den genannten Verbindungen ausgesetzt. Die Platten werden bei 30°C inkubiert.

[0021] Fig. 16 (A&B). Hefezellen, die eine Mutation im *sst2*-Gen zeigen, zeigen eine erhöhte Resistenz gegenüber AT, wenn sie Paarungspheromon ausgesetzt werden. Kulturen von Hefestämmen werden in Agar eingebettet und den angegebenen, auf oben auf den Agar gelegte Papierscheibchen punktförmig aufgetragenen Mengen an α -Paarungsfaktor ausgesetzt. Die Platten werden bei 30°C inkubiert.

[0022] Fig. 17 (A,B,C,&D). Eine Mutation im *sst2*-Gen verbessert das Wachstum der Somatostatin ausgesetzten Hefezellen. Kulturen von im Text beschriebenen Hefestämmen werden in Agar eingebettet und den angegebenen, auf oben auf den Agar gelegte Papierscheibchen punktförmig aufgetragenen Mengen an den genannten Verbindungen ausgesetzt. Die Platten werden bei 30°C inkubiert.

[0023] Fig. 18. Ligandenbindung an den in Hefe exprimierten CCK_B-Rezeptor der Ratte. Aus Über-Nacht-Flüssigkulturen von LY613-Zellen wurden Rohmembranfraktionen präpariert und danach wie in Methoden und Material beschrieben Sättigungsagonistenbindungstests durchgeführt. Die Sättigungsbindung wurde mit 4-60 nM [³H] CCK-8 (25 µg Protein/Röhrchen) durchgeführt. Die nichtspezifische Bindung für jeden Punkt in Form von gebundenen cpm in Gegenwart von 1 µM kaltem CCK-8 reichte von 20 bis 60%. Dargestellt ist ein mit Doppelbestimmung durchgeführtes repräsentatives Experiment.

[0024] Fig. 19 (A&B). Wachstum von Hefe als Reaktion auf CCK_B-Rezeptoragonisten. Hefestämme, die den CCK_B-Rezeptor der Ratte funktionell exprimieren (LY628, LLY631), wurden wie in Material und Methoden beschrieben kultiviert und auf SC-Galactose (2%)-ura, trp, his-Agarmedium ausplattiert (2 × 10⁴ Zellen/ml). Sterile Filterscheibchen wurden auf die Oberfläche des verfestigten Agars gelegt und mit 10 µl DMSO, das jeweils eine Menge von 10 µl der angegebenen Verbindungen enthielt, gesättigt. Anschließend wurden die Platten 3 Tage bei 30°C inkubiert. (A) CCK-8, (B) CCK-4.

[0025] Fig. 20. A_{2A}-Adenosinrezeptor-Sättigungsbindungstest. Radioligandenbindungstests wurden in 96-Loch-Mikroliterplatten unter Verwendung von Bindungspuffern (50 nM HEPES, pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 0,25% BSA) mit Proteaseinhibitoren (5 µg/ml Leupeptin, 5 µg/ml Aprotinin, 100 µg/ml Bacitracin und 100 µg/ml Benzamidin) durchgeführt. Alle Komponenten wurden in Proteaseinhibitoren enthaltendem Bindungspuffer verdünnt und in der folgenden Reihenfolge in die Löcher der Mikroliterplatte gegeben: Bindungspuffer, kalter Kompetitor (NECA, Endkonzentration 1 µM), [³H]NECA (1-50 nM). Die Bindungsreaktionen wurden durch Zugabe von 82 µg Membranprotein in einem Volumen von 170 µl gestartet. Das endgültige Reaktionsvolumen betrug 200 µl/Loch. Alle Inkubationen wurden über einen Zeitraum von 2 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Freier Radioligand wurde von gebundenem Liganden mittels schneller Filtration durch ein Glasfaserfilter unter Verwendung eines Zellernters von der Firma Inotech getrennt. Die Filterscheibchen wurden danach mehrere Male mit kaltem (4°C) Bindungspuffer ohne BSA vor dem Zählen gewaschen.

[0026] Fig. 21. Wachstum von Hefe als Reaktion auf A_{2A}-Adenosinrezeptoragonisten. Wie in Material und Methoden beschrieben kultivierte LY595-Zellen wurden auf SC-Galactose (2%)-ura, trp, his-Agarmedium (2 × 10⁴ Zellen/ml) ausplattiert. Sterile Filterscheibchen wurden auf die Oberfläche des verfestigten Agars gelegt und mit 10 µl DMSO, das die 10 µg der angegebenen Verbindungen enthielt, gesättigt. Anschließend wurden die Platten 3 Tage bei 30°C inkubiert. (A, B) CGS-21680, (B) NECA (C) DPMA.

[0027] Fig. 22. Wachstum von SSTR5 enthaltenden Hefezellen als Reaktion auf Somatostatinrezeptoragonisten. Wie in Material und Methoden beschrieben kultivierte LY620-Zellen wurden auf SC-Galactose (2%)-ura, trp, his-Agarmedium (2 × 10⁴ Zellen/ml) ausplattiert. Sterile Filterscheibchen wurden auf die Oberfläche des verfestigten Agars gelegt und mit 10 µl sterilem Wasser, das die angegebenen Mengen der angegebenen Verbindungen enthielt, gesättigt. Anschließend wurden die Platten 3 Tage bei 30°C inkubiert. (A) 60 nmol S-14, (B) 30 nmol S-28.

[0028] Fig. 23. Wachstum von Schweine-SSTR2 enthaltenden Hefezellen als Reaktion auf Somatostatinrezeptoragonisten. LY474 (zwei unabhängige Isolate: 21,22) wurden wie in Material und Methoden beschrieben

kultiviert und auf SC-Galactose (2%)-ura, trp, his-Agarmedium (2×10^4 Zellen/ml) ausplattiert. Sterile Filterscheibchen wurden auf die Oberfläche des verfestigten Agars gelegt und mit 10 µl sterilem Wasser, das die angegebenen Mengen der angegebenen Verbindungen enthielt, gesättigt. Anschließend wurden die Platten 3 Tage bei 30°C inkubiert. (1) 600 pmol, (2) 60 pmol.

[0029] Fig. 24. Die Deletion von MSG5 erhöht die Empfindlichkeit des Hefe-Biotests. Kulturen von Hefestämmen wurden zur Expression des SSTR2 wie in Material und Methoden beschrieben induziert und auf SC-Galactose (2%)-ura, trp, his-Agarmedium (2×10^4 Zellen/ml) ausplattiert. Sterile Filterscheibchen wurden auf die Oberfläche des verfestigten Agars gelegt und mit 10 µl sterilem Wasser, das die angegebenen Mengen an S-14 enthielt, gesättigt. Anschließend wurden die Platten 3 Tage bei 30°C inkubiert. (A) MPY459 sst2ΔADE2 msg5ΔLEU2, (B) MPY458 SST2 msg5ΔLEU2, (C) LY288 SST2 MSG5, (D) LY268 sst2ΔADE2 MSG5.

[0030] Fig. 25 (A&B). Wachstum von Hefe als Reaktion auf GRF-rezeptoragonisten. Wie in Material und Methoden beschrieben kultivierte CY990-Zellen wurden auf SC-Galactose (2%)-ura, trp, his-Agarmedium (2×10^4 Zellen/ml) ausplattiert. Sterile Filterscheibchen wurden auf die Oberfläche des verfestigten Agars gelegt und mit 10 µl sterilem Wasser, das 20 nmol der angegebenen Verbindungen enthielt, gesättigt. Anschließend wurden die Platten 3 Tage bei 30°C inkubiert. (A) hGRF(1-29)-NH₂, (B) hGRF (1-29), (D-arg²)-hGRF(1-29).

[0031] Fig. 26 (A&B). Auswirkung der Überexpression von STE50 auf den SSTR2-Biotest. Das Testmedium sowie die Hefestämme wurden wie in Material und Methoden beschrieben hergestellt. Platte A enthält den STE50-Überexpressionsstamm CY560; Platte B enthält den Kontrollstamm CY562. Auf jede Platte wurden mit Lösungen der folgenden Peptide gesättigte Filterscheibchen aufgebracht: 1 mM Hefe-α-Pheromon (links, Mitte), 1 µg/ml Somatostatin-14 (rechts, oben), 100 µg/ml Somatostatin-14 (rechts, unten). Die Platten wurden 3 Tage bei 30°C inkubiert.

[0032] Fig. 27 (A&B). Biotest von Verbindungen mit Somatostatinrezeptor- und/oder Antagonisteneigenschaften. LY364-Zellen wurden auf SC-Galactose (2%)-ura, trp, his-Agarmedium (2×10^4 Zellen/ml) ausplattiert. Für den Antagonistentest wurde Somatostatin (20 nM S-14) vor dem Gießen zu dem geschmolzenen Agar gegeben. Sterile Filterscheibchen wurden auf die Oberfläche des verfestigten Agars gelegt und mit 10 µl sterilem Wasser, das die Testverbindungen enthielt, gesättigt. Anschließend wurden die Platten 3 Tage bei 30°C inkubiert. (Links) Test für Somatostatinagonisten. Somatostatin (S-14) wurde auf Positionen in der unteren Reihe, linke Seite aufgetragen (6 nmol, 600 pmol, 60 pmol, 600 pmol), (Rechts) Test für Somatostatinantagonisten. Somatostatin (S-14) wurde auf Positionen in der unteren Reihe, linke Seite aufgetragen (6 nmol, 600 pmol, 60 pmol, 600 pmol).

[0033] Fig. 28 (A&B) Fusion von STE2-Sequenzen an den Aminoterminus von SSTR2 reduziert die Signalisierungseffizienz als Reaktion auf Somatostatin. LY268- und LY322-Zellen wurden auf SC-Galactose (2%)-ura, trp, his-Agarmedium ausplattiert (2×10^4 Zellen/ml). Sterile Filterscheibchen wurden auf die Oberfläche des verfestigten Agars gelegt und mit 10 µl Somatostatin (S-14) gesättigt. Anschließend wurden die Platten 3 Tage bei 30°C inkubiert. (A) LY268. S-14 wurde im Uhrzeigersinn von oben auf Filterscheibchen aufgetragen: Träger, 60 nmol, 6 nmol, 600 pmol, 60 pmol, 6 pmol. (B) LY322. S-14 wurde im Uhrzeigersinn von oben auf Filterscheibchen aufgetragen: 0,6 pmol, Träger, 60 nmol, 6 nmol, 600 pmol, 60 pmol, 6 pmol.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0034] Nukleotidbasen werden im vorliegenden Text wie folgt abgekürzt:

A-Adenin	G-Guanin
C-Cytosin	T-Thymin
U-Uracil	

(hier manchmal mit „ura“ abgekürzt)

[0035] Aminosäurereste werden im vorliegenden Text entweder auf drei Buchstaben oder einen einzigen Buchstaben wie folgt abgekürzt:

Ala; A-Alanin
 Arg; R-Arginin
 Asn; N-Asparagin
 Asp; D-Asparaginsäure
 Cys; C-Cystein
 Gln; Q-Glutamin
 Glu; E-Glutaminsäure
 Gly; G-Glycin
 His; H-Histidin
 Ile; I-Isoleucin

Leu; L-Leucin
 Lys; K-Lysin
 Met; M-Methionin
 Phe; F-Phenylalanin
 Pro; P-Prolin
 Ser; S-Serin
 Thr; T-Threonin
 Trp; W-Tryptophan
 Tyr; Y-Tyrosin
 Val; V-Valin

[0036] Die Begriffe „DNA“ und „Nukleotidsequenz“ werden gegeneinander austauschbar verwendet und sollen ohne Beschränkung alle Formen linearer Polymere, die Nukleotidbasen umfassen, einschließen, einschließlich gegebenenfalls RNA.

[0037] Der Begriff „Säuger“, wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf eine beliebige Säugerspezies (z.B. Mensch, Maus, Ratte und Affe).

[0038] Der Begriff „heterolog“ wird hier in bezug auf Hefe verwendet und bezieht sich somit auf DNA-Sequenzen, Proteine und andere Materialien, die aus anderen Organismen als Hefe stammen (z.B. Säuger, Vögel, Amphibien, Insekten, Pflanzen), oder auf Kombinationen davon, die nicht natürlicherweise in der Hefe angetroffen werden.

[0039] Der Begriff „stromaufwärts“ bzw. „stromabwärts“ wird hier unter Bezug auf die Richtung der Transkription und Translation verwendet, wobei eine vor einer anderen Sequenz transkribierte oder translatierte Sequenz als „stromaufwärts“ von der letzteren liegend bezeichnet wird.

[0040] Alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren oder Teile davon können ebenso wie die sie codierenden Nukleotidsequenzen zur Praktizierung der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden. Zu derartigen Rezeptoren gehören beispielsweise, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, Adenosinrezeptoren, Somatostatinrezeptoren, Dopaminrezeptoren, Cholecystokininrezeptoren, muskarinische cholinerge Rezeptoren, α -adrenerge Rezeptoren, β -adrenerge Rezeptoren, Opiatrezeptoren, Cannabinoidrezeptoren sowie Rezeptoren für Wachstumshormon freisetzender Faktor, Glucagon und Serotonin. Der Begriff Rezeptor, wie er hier verwendet wird, soll Subtypen der genannten Rezeptoren sowie Mutanten und Homologe davon zusammen mit den diese codierenden Nukleotidsequenzen umfassen. Dem Fachmann ist ebenso ersichtlich, daß in manchen Fällen nicht der gesamte Rezeptor exprimiert zu werden braucht, um die gewünschten Zwecke zu erzielen. Dementsprechend soll der Rezeptor verkürzte Formeln sowie andere Formvarianten eines gegebenen Rezeptors ohne Beschränkung umfassen.

[0041] Zur Praktizierung der folgenden Erfindung können alle DNA-Sequenzen, die für eine $G\alpha$ -Untereinheit ($G\alpha$) codieren, verwendet werden. Zu den $G\alpha$ -Untereinheiten gehören beispielsweise, ohne darauf beschränkt zu sein, G_s -Untereinheiten, G_i -Untereinheiten, G_o -Untereinheiten, G_z -Untereinheiten sowie G_q -, G_{11} -, G_{16} - und transduzierende Untereinheiten. Zu den zur Praktizierung der folgenden Erfindung geeigneten G-Proteinen und Untereinheiten gehören Subtypen sowie Mutanten und Homologe davon zusammen mit den diese codierenden DNA-Sequenzen.

[0042] Einem Fachmann ist aus den Lehren, wie sie hier dargestellt sind, ersichtlich, daß die für die Konstrukte und Hefezellen der vorliegenden Erfindung geeigneten G-Proteine heterologe $G\alpha$ -Untereinheiten, Hefe- $G\alpha$ -Untereinheiten oder chimärische Hefe-/heterologe Versionen umfassen können. Dabei ist leicht bestimmbar, welche Konfiguration sich am besten für eine angemessene Kopplung an einen bestimmten heterologen Rezeptor eignet, indem man einfach, wie hier gelehrt, Vektoren konstruiert und die Signalgebung der Ligandenbindung als Reaktion auf einen gegebenen Test mißt. In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen ist $G\alpha_{12}$ die $G\alpha$ -Untereinheit der Wahl, insbesondere, wenn es sich bei dem heterologen G-gekoppelten-Protein um einen vollständigen Somatostatinrezeptor oder einen Teil davon handelt. In diesem Fall ist es besonders bevorzugt, daß die $G\alpha_{12}$ -Untereinheit an einen Hefe- $G\beta\gamma$ -Komplex gekoppelt wird. Ebenso können bestimmte chimärische Konstrukte eine verbesserte Signaltransduktion im Hinblick auf bestimmte heterologe Rezeptoren liefern. Dabei ist ein chimärisches Konstrukt, das aus der Fusion der aminoterminalen Domäne des Hefe-GPA1/SCG1 mit der carboxyterminalen Domäne eines heterologen $G\alpha_1$, $G\alpha_s$ und vor allem $G\alpha_{12}$ her-

vorgeht, besonders bevorzugt.

[0043] Zur Praktizierung der vorliegenden Erfindung können alle DNA-Sequenzen, die für eine G β γ -Untereinheit (G β γ) codieren, verwendet werden. Zu den zur Praktizierung der vorliegenden Erfindung geeigneten G-Proteinen und Untereinheiten gehören Subtypen sowie Mutanten und Homologe davon zusammen mit den diese codierenden DNA-Sequenzen. Die Wirtszellen können dabei entweder endogenes G β γ exprimieren oder können zur Expression von heterologem G β γ (z.B. aus Säugern) gegebenenfalls gentechnisch auf die gleiche Weise manipuliert werden, wie sie zur Expression von heterologem G α gentechnisch manipuliert würden.

[0044] Heterologe DNA-Sequenzen werden in einem Wirt mittels eines Expressions "konstrukts" oder -"vektors" exprimiert. Bei einem Expressionsvektor handelt es sich um ein replizierbares DNA-Konstrukt, in dem eine für die heterologe DNA-Sequenz codierende DNA-Sequenz mit geeigneten Kontrollsequenzen, die die Expression eines Proteins oder einer Proteinuntereinheit, das bzw. die von der heterologen DNA-Sequenz codiert wird, in dem vorgesehenen Wirt beeinflussen können, operativ verknüpft ist. Dabei umfassen eukaryontische Kontrollsequenzen im allgemeinen einen Transkriptionspromotor, doch kann es auch angebracht sein, daß eine für geeignete mRNA-ribosome Bindungsstellen codierende Sequenz sowie (gegebenenfalls) Sequenzen, die die Termination der Transkription kontrollieren, bereitgestellt werden. Zu zur Praktizierung der vorliegenden Erfindung geeigneten Vektoren gehören Plasmide, Viren (einschließlich Bakteriophagen) sowie integrationsfähige DNA-Fragmente (d.h. Fragmente, die zur Integration in das Wirtsgenom mittels genetischer Rekombination fähig sind). Der Vektor kann unabhängig vom Wirtsgenom replizieren und funktionieren, wie im Fall eines Plasmids, oder kann in das Genom selbst integrieren, wie im Fall eines integrationsfähigen DNA-Fragments. Geeignete Vektoren enthalten Replikon- und Kontrollsequenzen, die aus mit dem vorgesehenen Expressionswirt kompatiblen Spezies stammen. So handelt es sich beispielsweise bei einem Promotor, der in einer Wirtszelle betrieben werden kann, um einen Promotor, der die RNA-Polymerase dieser Zelle bindet, und bei einer ribosomen Bindungsstelle, die in einer Wirtszelle betrieben werden kann, um eine Bindungsstelle, die die endogenen Ribosomen dieser Zelle bindet.

[0045] DNA-Bereiche sind operativ assoziiert, wenn sie miteinander funktionell verwandt sind. So steht beispielsweise ein Promotor in operativer Verknüpfung mit einer codierenden Sequenz, wenn er die Transkription der Sequenz kontrolliert; eine Ribosomenbindungsstelle steht in operativer Verknüpfung mit einer codierenden Sequenz, wenn sie so positioniert ist, daß sie die Translation gestattet. Im allgemeinen bedeutet operativ verknüpft zusammenhängend sowie im Fall von Leader-Sequenzen zusammenhängend und im Leseraster.

[0046] Bei den transformierten Wirtszellen der vorliegenden Erfindung handelt es sich um Zellen, die mit den unter Verwendung rekombinanter DNA-Techniken konstruierten Vektoren transformiert oder transfiziert wurden und die das bzw. die von den heterologen DNA-Sequenzen codierte Protein oder Proteinuntereinheit exprimieren. Dabei sind verschiedene Hefekulturen und geeignete Expressionsvektoren zur Transformation von Hefezellen bekannt. Siehe beispielsweise US-Patent Nr. 4,745,057; US-Patent Nr. 4,797,359; US-Patent Nr. 4,615,974; US-Patent Nr. 4,880,734; US-Patent Nr. 4,711,844; und US-Patent Nr. 4,865,989. Unter den Hefen am häufigsten verwendet wird *Saccharomyces cerevisiae*, obwohl eine Reihe anderer Hefespezies allgemein verfügbar sind. Siehe beispielsweise US-Patent Nr. 4,806,472 (*Kluveromyces lactis* und Expressionsvektoren dafür); 4,855,231 (*Pichia pastoris* und Expressionsvektoren dafür). Hefevektoren können einen Replikationsursprung aus dem endogenen 2-Mikron-Hefeploid oder eine autonom replizierende Sequenz (ARS), die dem Plasmid die Fähigkeit verleiht, in der Hefezelle mit einer hohen Kopienzahl zu replizieren, zentromere (CEN-) Sequenzen, die die Fähigkeit des Plasmids auf eine Replikation mit einer nur geringen Kopienzahl in der Hefezelle beschränken, einen Promotor, die heterologen DNA-Sequenzen codierende DNA, Sequenzen für die Polyadenylierung und Transkriptionstermination sowie ein selektionierbares Markergen enthalten. Beispielhafte Plasmide und Einzelheiten der Materialien und Methoden zur Herstellung und Verwendung derselben sind im Beispielteil aufgeführt.

[0047] Zur Verwendung in den Konstrukten und Zellen der vorliegenden Erfindung kann ein beliebiger, in Hefesystemen funktionsfähiger Promotor ausgewählt werden. Zu geeigneten Promotorsequenzen in Hefevektoren gehören die Promotoren für Metallothionein, 3-Phosphoglyceratkinase (PGK) [Hitzeman et al., (1980) J. Biol. Chem. 255, 2073] oder andere glykolytische Enzyme [(Hess et al., (1968) J. Adv. Enzyme Reg. 7, 149]; und Holland et al., (1978) Biochemistry 17, 4900], wie beispielsweise Enolase, Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase, Hexokinase, Pyruvat-decarboxylase, Phosphofructokinase, Glucose-6-phosphat-isomerase, 3-Phosphoglyceratmutase, Pyruvatkinase, Triosephosphatisomerase, Phosphoglucoseisomerase und Glucokinase. Geeignete Vektoren und Promotoren zur Verwendung bei der Hefeexpression sind ferner bei R. Hitzeman et al., EPO-Veröffentlichung Nr. 73657 beschrieben. Weitere Promotoren, die den zusätzlichen Vorteil einer durch Wachstumsbedingungen kontrollierten Transkription aufweisen, sind die Promotorbereiche für

Alkoholdehydrogenase, 1,2-Isocytochrom C, Säurephosphate, abbauende Enzyme, die mit dem Stickstoffmetabolismus assoziiert sind, sowie die oben erwähnte Metallothionein- und Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase ebenso wie für die Maltose- und Galactoseverwertung verantwortliche Enzyme, wie beispielsweise der durch Galactose induzierbare Promotor GAL1. Zur Verwendung hier besonders bevorzugt sind der PGK-Promoter, der GAL1-Promotor und Alkoholdehydrogenase (ADH)-Promotoren. Schließlich können bei der Konstruktion geeigneter Expressionsplasmide auch die mit diesen Genen assoziierten Terminationssequenzen in den Expressionsvektor ligiert werden, und zwar 3' von den heterologen codierenden Sequenzen, um so für die Polyadenylierung und Termination der mRNA zu sorgen. Bei der Herstellung der bevorzugten Expressionsvektoren der vorliegenden Erfindung werden zur Vermittlung der effizientesten Expression einer gegebenen Nukleinsäuresequenz in der Hefezelle Translationsinitiationsstellen gewählt [siehe Cigan, M. und T.F. Donahue 1987, GENE, Band 59, S. 1-18 für eine Beschreibung geeigneter Translationsinitiationsstellen].

[0048] Ein zur Durchführung der vorliegenden Erfindung geeigneter, besonders bevorzugter Nukleotidexpressionsvektor umfaßt eine solche oben erwähnte Promotorsequenz, die sich stromaufwärts von der Translationsinitiationsstelle der für den heterologen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, den sie exprimieren soll, codierenden heterologen Nukleotidsequenz sowie im korrekten Leseraster damit befindet. Diesbezüglich besonders bevorzugte Promotoren sind die Promotoren GAL1, PGK und ADH. Die Positionierung des oben erwähnten Promotors stromaufwärts von der gewählten Translationsinitiationsstelle kann die Expression eines heterologen Proteins verbessern. In diesen bevorzugten Ausführungsformen wird kein Segment eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors aus Hefe an das Segment des heterologen G-Protein-gekoppelten Rezeptors fusioniert. Von den Erfindern der vorliegenden Anmeldung wurde festgestellt, daß solche Hybridrezeptoren zur Erzielung der Rezeptorexpression in Hefe nicht kritisch sind. Dies steht im Gegensatz zu der diesbezüglichen, im Fachgebiet akzeptierten Lehre [siehe King et al., unten zitiert].

[0049] Allerdings wird in bestimmten anderen Ausführungsformen mindestens ein Fragment des 5'-nicht-translatierten Bereichs eines Hefegens stromaufwärts vom heterologen G-Protein-gekoppelten Segment positioniert und mit diesem operativ assoziiert. Hierzu werden von der vorliegenden Erfindung auch Konstrukte mit geeigneten Promotoren und Translationsinitiationsstellen, wie oben beschrieben, bereitgestellt, doch enthalten diese Konstrukte ein Hefesegment, das mindestens ein Fragment der äußersten aminoterminalen codierenden Nukleotidsequenz eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors aus Hefe umfaßt, sowie ein zweites Segment, das stromabwärts vom ersten Segment liegt und sich im korrekten Leseraster damit befindet, wobei das zweite Segment eine einen heterologen G-Protein-gekoppelten Rezeptor codierende Nukleotidsequenz umfaßt. Diesbezüglich kann das Hefesegment dazu vorgesehen sein, daß es tatsächlich wie eine Reportersequenz wirkt, statt zur Verbesserung der wirksamen Expression des heterologen G-Proteins im Hefesystem zu dienen. Somit umfassen bestimmte Ausführungsformen eine ein Hefesegment eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors aus Hefe codierende Gensequenz, die als ein Reportersegment fungiert, indem sie nämlich für ein Peptid codiert, das über herkömmliche Mittel, wie beispielsweise Antikörperbindung und dergleichen nachgewiesen werden kann. Diesbezüglich bevorzugt ist ein vollständiger Hefe-Pheromonrezeptor oder ein Teil davon, der mit einem heterologen G-Protein-gekoppelten Rezeptor fusioniert ist und der hauptsächlich als „Epitop-Tag“ für den hochspezifischen Nachweis der Expression des gewünschten heterologen Rezeptors unter Verwendung von spezifisch gegen die exprimierte Epitopsequenz gerichteten Antikörpern verwendet werden kann. Bei der Konstruktion eines solchen Vektors kann das Hefesegment stromaufwärts zum heterologen Protein positioniert werden, oder es kann als Alternative ein Fragment der äußersten aminoterminalen codierenden Sequenz des heterologen G-Protein-gekoppelten Rezeptors deletiert und das Hefesegment direkt daran fusioniert werden. In einigen Fällen werden dabei eine oder mehrere der aminoterminalen Transmembrandomänen oder intrazellulären Domänen des heterologen Proteins deletiert. Als Alternative kann das Hefesegment direkt an den Aminoterminus des heterologen Rezeptors angefügt werden, wodurch die Gesamtlänge des chimärischen Rezeptorkonstrukts vergrößert wird.

[0050] Das erste und das zweite Segment sind operativ mit einem Promotor, wie beispielsweise dem GAL1-Promotor, der in einer Hefezelle operativ ist, operativ assoziiert. Codierende Sequenzen für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aus Hefe, die bei der Konstruktion derartiger Vektoren verwendet werden können, sind durch die für Hefe-Pheromonrezeptoren codierenden Gensequenzen beispielhaft dargestellt (z.B. das STE2-Gen, das für den α -Faktor-Rezeptor codiert, und das STE3-Gen, das für den a-Faktor-Rezeptor codiert).

[0051] Bestimmte, hier bereitgestellte bevorzugte chimärische Rezeptoren umfassen ein Ste2-Proteinsegment aus Hefe, das direkt an einen vollständigen heterologen G-Proteinrezeptor oder einen Teil davon fusioniert ist, und vorzugsweise den 5HT1a-Rezeptor, muskarinischen Rezeptor, α -adrenergen Rezeptor oder einen Somatostatinrezeptor.

[0052] Für den Nachweis der Auswirkungen einer Ligandenbindung kann ein beliebiges aus einer Vielfalt von Mitteln genutzt werden. So läßt sich beispielsweise die Messung der Dissoziation von α von $\beta\gamma$ über herkömmliche biochemische Techniken messen. Dabei soll jedoch angemerkt werden, daß die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor eine nachweisbare biologische Reaktion, die ihrerseits sich möglicherweise auch zur Messung eignet, entweder auslösen oder blockieren kann. Bei einer solchen biologischen Reaktion handelt es sich um die Fähigkeit von Hefezellen zur Paarung. Die Verwendung des pheromoninduzierten Paarungssignaltransduktionswegs ist ein bevorzugtes Verfahren zum Nachweis der Ligandenbindungseffekte in den hier vorgestellten Testsystemen, deren Grundlage nachfolgend ausführlicher erörtert wird.

[0053] In der Hefe wird von G-Protein-gekoppelten Pheromonrezeptoren ein Entwicklungsprogramm gesteuert, das in der Paarung (Fusion) haploider α - und α -Zellarten unter Bildung des α/α -Diploids kulminiert (für eine Übersicht, siehe G.F. Sprague, Jr. und J.W. Thorner, in *Molecular Biology and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*: Band II, Gene Expression). Der Paarungsprozeß wird dabei durch extrazelluläre Peptide, die Paarungspheromone gestartet. Die Zellen des α -Paarungstyps sezernieren α -Faktor, der eine Antwort in α -Zellen hervorruft; Zellen des α -Paarungstyps sezernieren α -Faktor, der nur auf α -Zellen wirkt. Haploide Zellen reagieren auf die Gegenwart der Peptidpaarungspheromone über die Wirkung endogener G-Protein-gekoppelter Pheromonrezeptoren (STE2: α -Faktor-Rezeptor, nur in α -Zellen exprimiert, und STE3: α -Faktor-Rezeptor, nur in α -Zellen exprimiert). Beide Rezeptoren wechselwirken mit den gleichen heterotrimeren G-Proteinen und einer Signaltransduktionskaskade, die beiden haploiden Zellarten gemeinsam ist. Nach Pheromonbindung an den Rezeptor macht dieser vermutlich eine Konformationsänderung durch, die zur Aktivierung des G-Proteins führt. Die α -Untereinheit SCG1/GPA1 übt eine negative Wirkung auf den Pheromonantwortweg aus, die durch rezeptorabhängige Aktivierung aufgehoben wird. Man nimmt an, daß der Komplex der $\beta\gamma$ -Untereinheiten (STE4, STE18) das positive Signal auf einen Effektor, möglicherweise STE20, eine putative Proteinkinase, überträgt [Leberer, E., Dignard, D., Harcus, D., Thomas, D.Y., Whiteway, M. (1992) *EMBO J.* 11, 4815-4824]. Der Effektor aktiviert wiederum nachgeschaltete Elemente des Signaltransduktionswegs, einschließlich STE5, sowie eine vermutete, sich aus den Produkten der Gene STE11, STE7, FUS3 und KSS1 zusammensetzende Proteinkinasekaskade, was letztendlich zum Zellzyklusarrest und zur Transkriptionsinduktion führt. Die Hauptschnittstelle zwischen Elementen des Pheromonantwortwegs und dem Zellzyklusregulationsapparat ist das FAR1-Genprodukt. Bestimmte rezessive Allele von FAR1 und FUS3 machen nicht den Zellzyklusarrest als Reaktion auf Pheromon mit, während sie die pheromonabhängige Transkription stattfinden lassen. Die pheromonabhängige Transkription wird durch die Wirkung des sequenzspezifischen DNA-Bindungsproteins STE12 vermittelt. Die Aktivierung von STE12 führt zur Transkription von Genen, die eine in cis wirkende DNA-Sequenz, das Pheromonantwortelement, besitzen. Diese auf Pheromon reagierenden Gene codieren für Produkte, die für die Pheromonsynthese (MFA1, MFA2, MFA1, MFA2, STE6, STE13) und die Reaktion auf Pheromon (STE2, STE3, SCG1/GPA1, FUS3) benötigt werden und die die Zellassoziation und -fusion (FUS1), den Zellzyklusarrest (FAR1) und die zur Paarung erforderlichen morphologischen Ereignisse erleichtern oder daran beteiligt sind. Falls der Paarungsvorgang nicht vollzogen wird, adaptieren Hefezellen an die Gegenwart von Pheromon und nehmen das mitotische Wachstum wieder auf. Somit ist in bestimmten bevorzugten Ausführungsformen das FUS3- oder FAR1-Gen mutiert oder komplett deletiert, wodurch der Zellzyklusarrestweg vom Signaltransduktionsweg getrennt und das fortgesetzte Wachstum der Zellen als Antwort auf die Bindung von Paarungspheromon an den heterologen Rezeptor gestattet wird. Da es sich bei FAR1 um einen Hauptfaktor im Zellzyklusregulationsweg handelt, ist seine Deletion bzw. Mutation in den Expressionskonstrukten der vorliegenden Erfindung bevorzugt. Mit derartigen Konstrukten transformierte Hefezellen ergeben hervorragende Hefestämme für Ligandenbindungstests.

[0054] Es ist bekannt, daß der Paarungssignaltransduktionsweg durch mehrere Mechanismen, einschließlich Pheromonabbau und Modifikation der Funktion des Rezeptors, der G-Proteine und/oder nachgeschalteter Elemente der Pheromonsignaltransduktion durch die Produkte der Gene SST2, STE50, AFR1 [Konopka, J.B. (1993) *Mol. Cell. Biol.* 13, 6876-6888] sowie SGV1, MSG5 und SIG1, desensibilisiert wird. Ausgewählte Mutationen in diesen Genen können zur Überempfindlichkeit gegenüber Pheromon sowie zu einer Unfähigkeit zur Anpassung an die Gegenwart von Pheromon führen. So stellt beispielsweise die Einführung von funktionsstörenden Mutationen in heterologe G-Protein-gekoppelte Rezeptoren exprimierende Stämme eine signifikante Verbesserung gegenüber Wildtypstämmen dar und ermöglicht die Entwicklung äußerst empfindlicher Biotests für mit den Rezeptoren wechselwirkende Verbindungen. Andere Mutationen, z.B. STE50, sgV1, ste2, ste3, pik1, msg5, sig1 und afr1, weisen den ähnlichen Effekt einer Erhöhung der Empfindlichkeit des Biotests auf. Dem Fachmann ist ersichtlich, daß eine erhöhte Empfindlichkeit des Testsystems durch die Deletion eines oder mehrerer dieser oben erwähnten Gene sowie die Einführung von deren Expression herunterregulierenden oder in bestimmten Fällen deren Überexpression bewirkenden Mutationen erreicht wird. Beispielsweise ist bei dem STE50-Konstrukt die Überexpression des Gens und nicht die Deletion des Gens gewünscht.

[0055] Die Einführung einer Konstellation von Mutationen im Paarungssignaltransduktionsweg führt zu einer Hefezelle, die sich gut zur Expression heterologer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren eignet, welche zu einer funktionellen Reaktion auf ihre zugehörigen Liganden fähig sind, wobei eine biologische Antwort geliefert wird, die die Bindung des Rezeptors an den Liganden signalisiert.

[0056] In Verbindung mit einer oder mehrerer der oben angeführten Mutationen besteht ein besonders zweckmäßiges Verfahren zum Nachweis von Ligandenbindung an in Hefezellen exprimierten heterologen Rezeptor in der Nutzung eines herkömmlichen genetischen Indikatorsystems. Somit werden in bestimmten bevorzugten Ausführungsformen die Zellen mit einer zusätzlichen heterologen Nukleotidsequenz versehen, die einen auf Pheromon reagierenden Promotor sowie ein stromabwärts von dem auf Pheromon reagierenden Promotor liegendes und damit operativ assoziiertes Indikatorgen umfaßt. Bei Vorliegen einer solchen Sequenz kann der Nachweisschritt durch Verfolgen der Expression des Indikatorgens in der Zelle erfolgen. Dabei könnten verschiedene auf Pheromon reagierende Promotoren zum Einsatz kommen, beispielsweise ein Promotor, der eines der oben erwähnten auf Pheromon reagierenden Gene (z.B. mFa1, mFa2, MFA1, MFA2, STE6, STE13) steuert, der Promotor des Gens BAR1 und der Promotor des Gens FUS1. Ebenfalls könnte eines aus einer breiten Vielfalt von Indikatorgenen verwendet werden, zu denen beispielsweise die Gene HIS3, G418r, URA3, LYS2, CAN1, CYH2 und LacZ zählen. Ein besonders bevorzugtes Reportergenkonstrukt wird genutzt, indem man Transkriptionskontrollelemente eines FUS1-Gens an für das HIS3-Protein codierende Sequenzen fusioniert und das ursprüngliche FUS1-Gen durch dieses Reporterkonstrukt ersetzt. Dadurch wird die Expression des HIS3-Genprodukts unter die Kontrolle des Pheromonsignaltransduktionswegs gestellt. Hefestämme (his3), die dieses Konstrukt tragen, können auf supplementiertem Minimalmedium ohne Histidin schlecht wachsen und sind gegenüber einem Inhibitor des HIS3-Genprodukts empfindlich. In anderen bevorzugten Ausführungsformen tragen Plasmide eine FUS1-lacZ-Genfusion. Dabei wird die Expression des FUS1-Gens als Reaktion auf Rezeptoraktivierung durch Pheromonbindung stimuliert. Daher läßt sich die Signaltransduktion quantifizieren, indem man die von dem FUS1-lacZ-Reporter gen erzeugte β -Galactosidase-Aktivität mißt.

[0057] An weiteren sinnvollen Reportergenkonstrukten, die weiterhin unter der Kontrolle von Elementen des Pheromonsignaltransduktionswegs stehen, bei denen es sich jedoch um Alternativen zu den oben erörterten Reportersystemen handelt, können Signale beteiligt sein, die über andere heterologe Effektorproteine, die ko-exprimiert werden, transduziert werden. Beispielsweise kann 1) die ligandenabhängige Stimulierung einer heterologen Adenylylcyclase das Überleben eines Hefestamms, dem aufgrund einer Mutation im Gen *cdc35* seine eigene Adenylylcyclase fehlt, 2) die ligandenabhängige Stimulierung eines heterologen G-Protein-gekoppelten Kaliumkanals das Überleben eines Hefestamms, der nicht in Medium mit einer niedrigen Kaliumkonzentration wachsen kann [(trk1, trk2), siehe beispielsweise Anderson, J.A. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 3736-3740], oder 3) die ligandenabhängige Stimulierung einer heterologen Phospholipase C (vor allem PLC- β) das Überleben eines Hefestamms, dem seine eigene PLC fehlt [(plc), siehe beispielsweise Payne, W.E. und Fitzgerald-Hayes, M. (1993) Mol. Cell Biol. 13, 4351-4363], gestatten.

[0058] Zur Praktizierung der vorliegenden Erfindung können alle für eine Adenylylcyclase codierenden DNA-Sequenzen verwendet werden. Zu den Beispielen für eine Adenylylcyclase gehören das Produkt des *Rutabaga*-Gens aus *D. melanogaster* und die Untereinheitstypen I-VIII aus Säugern [für eine Übersicht, siehe Tang, W.-J. und Gilman, A.G. (1992) Cell 70, 869-872] sowie Mutanten und Homologe davon zusammen mit den dafür codierenden DNA-Sequenzen, die sich zur Praktizierung der vorliegenden Erfindung eignen.

[0059] Zur Praktizierung der vorliegenden Erfindung können alle für einen G-Protein-gesteuerten Kaliumkanal codierenden DNA-Sequenzen verwendet werden. Zu den Beispielen für einen G-Protein-gesteuerten Kaliumkanal gehören GIRK1 [Kubo, Y., Reuveny, E., Slesinger, P.A., Jan, Y.N. und Jan, L.Y. (1992) Nature 365, 802-806], zur Praktizierung der vorliegenden Erfindung geeignete Untereinheiten sowie Mutanten und Homologe davon zusammen mit den dafür codierenden DNA-Sequenzen.

[0060] Zur Praktizierung der vorliegenden Erfindung können alle für ein Phospholipaseprotein codierenden DNA-Sequenzen verwendet werden. Zu den Phospholipaseproteinen (PLC-Proteinen) gehören beispielsweise das *norpA*-Genprodukt aus *D. melanogaster* und die PLC- β -Proteine [für eine Übersicht, siehe Rhee, S.G. und Choi, K.D. (1992) J. Biol. Chem. 267, 12392-12396], zur Praktizierung der vorliegenden Erfindung geeignete Untereinheiten sowie Mutanten und Homologe davon zusammen mit den dafür codierenden DNA-Sequenzen.

[0061] Vorliegend wird ein besonders bevorzugtes Hefe-Expressionssystem beschrieben, das SSTR und ein chimärisches G-Protein tragende Hefezellen aufweist, deren kontinuierliches Wachstum vom Vorhandensein von Somatostatin abhängt. Wie oben angemerkt exprimieren transformierte Wirtszellen der vorliegenden Er-

findung die von den heterologen DNA-Sequenzen codierten Proteine oder Proteinuntereinheiten. Wird der G-Protein-gekoppelte Rezeptor exprimiert, so ist er in der Wirtszellmembran lokalisiert (d.h. er ist darin physikalisch in der korrekten Orientierung sowohl für die stereoselektive Bindung von Liganden als auch für die funktionelle Wechselwirkung mit G-Proteinen auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran positioniert). Die Realisierung des hier beschriebenen empfindlichen und spezifischen Hefe-Expressionssystems erleichtert die Beschreibung struktureller und funktioneller Aspekte von Rezeptor/Ligand- und Rezeptor/G-Protein-Wechselwirkungen. Durch die Modifikation von Elementen des Paarungssignaltransduktionswegs ermöglichte leistungsfähige genetische Selektionsschemata können zur Identifizierung von Aspekten des Rezeptors, die sich auf Agonistenselektivität, Ligandenstereoselektivität sowie Determinanten der Agonisten-/Antagonistenbindung auswirken, eingesetzt werden. Mit Hilfe dieses leistungsfähigen genetischen Systems kann die Rolle von Proteinen, die die Reaktion von Rezeptoren und G-Proteinen auf Liganden modifizieren, im Detail verstanden werden. Wichtig ist, daß durch das System ein verallgemeinerter Ansatz zur Untersuchung der Funktionsweise und der Komponenten des G-Protein-gekoppelten Signaltransduktionssystems ebenso wie ein verallgemeinerter Ansatz für Screening-Tests unter Verwendung des G-Protein-gekoppelten Signaltransduktionssystems bereitgestellt wird. Mit dem vorliegenden Verfahren werden an die Aufnahme eines von verschiedenen heterologen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren angepaßte Expressionskonstrukte und Testsysteme in Form von "Expressionskassetten" bereitgestellt. Dabei wird der zu untersuchende heterologe G-Protein-gekoppelte Rezeptor einfach in die hier bereitgestellten Vektoren inseriert und in Hefezellen exprimiert. Möglicherweise an den exprimierten Rezeptor bindende Liganden läßt man in der Art eines beliebigen herkömmlichen Tests mit den Zellen in Kontakt treten, wobei sich die Auswirkungen der Wechselwirkung leicht verfolgen lassen. Die hier vorliegenden Systeme sind somit bei der Identifizierung von Liganden für "orphan" ["verwaiste"] G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sowie für die Entdeckung neuer therapeutisch geeigneter Liganden für medizinisch, tiermedizinisch und landwirtschaftlich wichtige Rezeptoren von enormem Nutzen.

[0062] Zur weiteren Veranschaulichung verschiedener Aspekte der vorliegenden Erfindung werden die folgenden Beispiele bereitgestellt, die jedoch nicht als Beschränkung der Erfindung aufzufassen sind.

BEISPIEL 1

Funktionelle Expression von G- α -Proteinen aus Säugern in *Saccharomyces cerevisiae*

[0063] Zur Messung der Störung der Wechselwirkungen von G α und G $\beta\gamma$ der Hefe durch die Expression heterologer G α -Proteine wird ein empfindlicher Biotest genutzt. Dabei werden Säuger-G α -Gene von 2 μ - oder zentromertragenden Plasmiden unter der Kontrolle des konstitutiven PGK- oder des induzierbaren CUP1-Promotors exprimiert. Die Daten demonstrieren, daß G α_s und G α_{i2} der Ratte sowie ein chimärisches Hefe/Säuger-G α auf wirksame Weise mit Hefe-G $\beta\gamma$ wechselwirken können.

[0064] Medien und Stämme. Die Anzucht der Bakterienstämme sowie die Plasmidmanipulationen werden nach Standardverfahren (Maniatis T., Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982)) durchgeführt. Die Anzucht und Transformation von Hefestämmen erfolgt wie bei Rose et al. beschrieben (Rose M.D., Methods in yeast genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990). Die in diesen Arbeiten verwendeten Hefestämmen (CY414, MATa ura3-52 trp1 leu2 his3 pep4::HIS3) leiten sich von bei E. Jones (Jones, E.W., Ann. Rev. Genet 18:233, 1984) beschriebenen Stämmen ab. CY414 wird nacheinander mit dem FUS1-lacZ-Fusionsplasmid pSB234 (Trueheart, J. et al. Mol. Cell. Biol. 7(7): 2316-2328, 1987) und G α -Expressionsplasmiden transformiert.

[0065] Konstruktion der G α -Expressionsplasmide. Ratten-cDNA-Klone für G α_s und G α_{i2} sowie für Fusionen mit dem Hefe-SCG1-Gen sind an anderer Stelle beschrieben [Kang, Y.-S., Kane, J., Kurjan, J., Stadel, J.M. und Tipper, D.J. (1990) Mol. Cell. Biol. 10, 2582-2590]. Zur Expression dieser Gene von Plasmiden mit niedriger Kopienzahl werden XhoI-SalI-Fragmente, die jede Expressionskassette (einschließlich der PGK-Promotor- und Terminatorsequenzen) enthalten, isoliert und in das mit XhoI verdaute CEN-Plasmid pRS414 kloniert. Für die induzierbare Expression wird das PGK-Promotorsequenzen enthaltende DNA-Segment durch stromaufwärts liegende aktivierende Sequenzen aus dem CUP1-Gen ersetzt.

[0066] β -Galactosidase-Tests. Kulturen werden auf 5×10^7 Zellen/ml verdünnt und in getrennte Röhrchen aliquotiert. Zu einer Probe gibt man Pheromon mit einer Endkonzentration von 10^{-9} M. Danach werden die Kulturen 4 Std. bei 30°C inkubiert. Die anschließende Messung der β -Galactosidase-Aktivität erfolgt wie an anderer Stelle beschrieben (Rose, M.D., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990).

[0067] Plasmide mit hoher bzw. niedriger Kopienzahl, die die jeweils vom Hefe-PGK-Promotor exprimierten

Gene Hefe-SCG1 oder Säuger- G_{α_s} oder - G_{α_i} oder chimärisches Hefe/Säuger- G_{α} tragen, werden in einen Wildtyp-Hefestamm, der auch ein eine FUS1-lacZ-Genfusion tragendes Plasmid enthält, transformiert. Die Expression des FUS1-Gens wird als Reaktion auf die Rezeptoraktivierung durch Pheromonbindung stimuliert. Daher läßt sich die Signaltransduktion quantifizieren, indem man die von dem FUS1-lacZ-Reporter gen erzeugte β -Galactosidase-Aktivität mißt. Dabei wird die Störung der normalen Signaltransduktion durch die Expression eines heterologen G_{α} -Proteins als Abnahme der β -Galactosidase-Aktivität beobachtet.

[0068] Eingeführte G_{α} -Gene exprimierende Stämme werden auf pheromoninduzierte Genaktivierung getestet. Die Daten sind als Prozent Wildtyp-Reaktion in [Fig. 1](#) dargestellt. Die FUS1-lacZ-Expressionsniveaus wurden durch die Expression von allen G_{α} -Plasmiden reduziert, wodurch demonstriert wird, daß die G_{α} -Proteine funktionell an Hefe- $G\beta\gamma$ koppelten. Für Scg1, G_{α_s} und $G_{\alpha_{i2}}$ wurde eine Dosisabhängigkeit beobachtet. Die Signalgebung wird durch die Expression von Plasmiden mit hoher Kopienzahl stark reduziert, was vermuten läßt, daß ein großer Überschuß an heterologem G_{α} -Protein vorhanden ist. Das chimärische Scg-Gai2-Protein reduziert selbst vom Plasmid mit niedriger Kopienzahl die Signalgebung fast auf die nichtstimulierten Hintergrundniveaus. Mit anderen CEN-Expressionsplasmiden wird die Signalgebung auf 53 bis 84% der Wildtypniveaus reduziert.

[0069] Um eine genauere Kontrolle der G_{α} -Expression zu erreichen und die Expression auf ein hinreichend niedriges Niveau zu reduzieren, so daß minimale Auswirkungen auf die pheromoninduzierte Signalgebung auftreten, werden G_{α} -Gene (außer G_{α_s}) unter die Kontrolle des induzierbaren CUP1-Promotors gestellt und auf Plasmiden mit niedriger Kopienzahl in Hefe transformiert. Das Niveau der von diesen Plasmiden vermittelten Repression der Signalgebung hängt von der Konzentration des dem Medium zugesetzten Cu^{++4} ab ([Fig. 2](#)). Allerdings entsprach die Grundexpression (ohne Zugabe von Cu^{++4}) den beobachteten Niveaus vom PGK-Promotor ([Fig. 1](#)). Das chimärische SCG-Gai2-Protein reduziert wie im vorherigen Experiment die Signalgebung fast auf Hintergrundniveaus.

[0070] Die in [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) dargestellten Daten deuten darauf hin, daß alle untersuchten G_{α} -Expressionsplasmide funktionelle G_{α} -Proteine produzieren, indem sie alle den Signaltransduktionsweg hemmen. Bei Verwendung eines konstitutiven Promotors (PGK) zeigen die meisten G_{α} -Gene einen dosisabhängigen Effekt, wobei mit den in hoher Kopienzahl vorliegenden 2-Mikron-Plasmiden die Signalgebung drastisch reduziert wird ([Fig. 1](#)). Durch die niedrigere Expression von CEN-Plasmiden werden die Signalgebungsniveaus bis hinunter zu 16% reduziert (siehe G_{α_i} , [Fig. 1](#)). Die Expression der G_{α} -Gene vom CUP1-Promotor zeigt die erwarteten Dosis/Wirkung-Effekte, wobei die reduzierte Signalgebung mit erhöhten Cu^{++} -Konzentrationen korreliert ist ([Fig. 2](#)).

BEISPIEL 2

Pharmakologische Bewertung in *Saccharomyces cerevisiae* exprimierter heterologer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

[0071] Hefestämme. Die Anzucht und Transformation von Hefestämmen erfolgt wie bei Rose et al. beschrieben (Rose M.D., Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990). Die in diesen Arbeiten verwendeten Hefestämme (CY414, MATA ura3-52 trp1 leu2 his3 pep4 Δ HIS3) leiten sich von bei E. Jones (Jones, E.W., Ann. Rev. Genet 18:233, 1984) beschriebenen Stämmen ab.

[0072] Nukleinsäuremanipulation. Die Anzucht der Bakterienstämme sowie die Plasmidmanipulationen werden nach Standardverfahren [Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis T., Molecular Cloning, 2. Aufl. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)] durchgeführt. Die DNA-Sequenzierung wird mittels "High temperature cycle"-Sequenzierung (Applied Biosystems) durchgeführt.

[0073] Proteinanalyse. Die Rezeptorexpressionsstämme werden in synthetischem Komplettmedium ohne spezifische Nährstoffe zur Selektion auf Plasmidretention sowie mit 3% Galactose zur Induktion der Rezeptorgenexpression angezogen. Die Zellen werden pelletiert und in Lysepuffer (10 mM Natriumhydrogencarbonat pH 7,2, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA) gewaschen, anschließend in Lysepuffer plus Proteaseinhibitoren (5 μ g/ml Leupeptin, 10 μ g/ml Benzamidin, 10 μ g/ml Bacitracin, 5 μ g/ml Pepstatin, 5 μ g/ml Aprotinin) resuspendiert und durch physikalischen Aufschluß mit Glasperlen lysiert. Zelltrümmer werden durch 10minütige Zentrifugation bei 1000 $\times$ g abgetrennt. Die Membranfraktion wird durch 10minütige Zentrifugation bei 100000 $\times$ g isoliert. Dieses Pellet wird einmal in Lysepuffer plus Inhibitoren gewaschen. Die Polyacrylamidgelelektrophorese der Hefeextrakte wird nach Standardverfahren durchgeführt, mit der Ausnahme, daß die Proben nicht aufgekocht werden. Die Proteine werden mit der Semi-Dry-Technik auf Immobilon-P-Millipore-Filter übertragen. Rezeptor-

protein wird unter Verwendung von ECL-Reagentien mit Kaninchen-Anti-Ste2-Antikörpern sichtbar gemacht.

[0074] Radioligandenbindungstests. Die Reaktionen werden in einem Volumen von 0,2 µl mit 5 bis 50 µg Protein durchgeführt. Bei den Bindungstests für Liganden des 5HT1a-Rezeptors oder des β2-adrenergen Rezeptors wird ein Puffer aus 50 mM Tris pH 7,4, 10 mM MgCl₂ verwendet. Somatostatinbindung wird in einem Puffer von 50 mM HEPES, pH 7,4, 5 mM MgCl₂ durchgeführt. Man läßt die Ligandenbindung bis zum Erreichen des Gleichgewichts bei Raumtemperatur ablaufen und isoliert anschließend die Membranfraktionen auf GFC-Glasfaserfiltern. Dabei werden die folgenden Ligandenendkonzentrationen verwendet: Radioliganden: ³H-Spiperon, 80 nM; ¹²⁵I-Cyanopindolol, 250 pM; [¹²⁵I-tyr¹¹]-Somatostatin 14, 250 pM; Kompetitoren: Serotonin, 10 µM; Propanolol, 20 µM; Somatostatin 14, 1 µM. Es werden 100 µM des Guanosintriphosphat-Analogs Gpp(NH)p verwendet.

[0075] Expression des menschlichen serotonergen Rezeptors 5HT1a. Das für den menschlichen 5HT1a-Rezeptor codierende Gen wird unter Addition der ersten 14 Aminosäuren des Ste2-Proteins der Hefe modifiziert, in das Expressionsplasmid pMP3 kloniert und mit pCHI11 bezeichnet. Dieser Stamm mit der Bezeichnung CY382 wird zur Induktion der Rezeptorexpression in galactosehaltigem Medium angezogen, fraktioniert und über die Bindung des radioaktiv markierten Antagonisten ³H-Spiperon auf Rezeptoraktivität getestet. Die Sättigungsbindung zeigt, daß der Rezeptor auf hohem Niveau exprimiert wird (B_{max} = 3,2 pmol/mg Protein) und daß er Spiperon mit einer ähnlichen Affinität (K_d = 115 nM; [Fig. 3](#)) wie der in Säugergeweben beobachteten (K_d = 20 bis 100 nM) bindet.

[0076] Zwei chimärische Rezeptorgene werden gentechnisch hergestellt: in pCH117 sind für den N-Terminus einschließlich der ersten beiden Transmembrandomänen des 5HT1a-Rezeptors codierende Sequenzen durch die entsprechenden Sequenzen des Ste2-Rezeptors ersetzt, und in pCH118 sind diese Ste2-Sequenzen direkt an den N-Terminus des 5HT1a-Rezeptors angefügt, so daß ein neuer Rezeptor mit neun Transmembrandomänen entsteht ([Fig. 4](#)). Diese Rezeptoren exprimierende Stämme werden auf die Bindung von radioaktiv markiertem Liganden untersucht. Beide Rezeptoren zeigen spezifische Bindung des 5HT-Rezeptor-Antagonisten ³H-Spiperon ([Fig. 4](#)). Der Austausch der ersten beiden Transmembrandomänen gegen solche eines nicht verwandten Rezeptors wirkt sich anscheinend nicht auf die Bindung dieses Liganden aus. Das Hinzufügen von Transmembrandomänen bewirkt keine Bindung, was vermuten läßt, daß dieser ungewöhnliche Rezeptor eine funktionelle Konformation in der Zellmembran einnehmen kann. pCH111, pCH117 bzw. pCH118 tragende Stämme produzieren B_{max}-Werte von 3,1, 1,6 bzw. 0,7 pmol/mg. Zwar ergeben diese chimärischen Rezeptoren im Hinblick auf die Rezeptorstruktur interessante Ergebnisse, doch werden dadurch die Gesamtniveaus an funktionellen Rezeptoren in der Zelle nicht gesteigert.

[0077] Alle intrazellulären Sequenzen des 5HT1a-Rezeptors werden zur direkten Kopplung des Rezeptors an das Hefe-G-Protein durch entsprechende Sequenzen des Hefe-Ste2-Proteins ersetzt. Der dabei erhaltene chimärische Rezeptor CHI16 wird in einem Wildtyp-Hefestamm exprimiert und auf die hochaffine Bindung von 5HT1a-Rezeptor-Agonisten untersucht. Eine Agonistenbindung wird nicht nachgewiesen. Allerdings entspricht das Niveau der Bindung des radioaktiv markierten Spiperons dem von CHI11, was darauf hindeutet, daß dieser Rezeptor auf hohem Niveau und in einer funktionellen Konformation exprimiert wird.

[0078] Expression des menschlichen β2-adrenergen Rezeptors. Der menschliche adrenerge Rezeptor wird in der Hefe mit der Absicht, ihn als Modell zur Optimierung der Expression und G-Protein-Kopplung zu verwenden, exprimiert. Ein den Rezeptor exprimierender Hefestamm wird mittels Scatchard-Analyse auf die Bindung des Liganden ¹²⁵I-Cyanopindolol untersucht. Die Bindung läßt sich absättigen und zeigt einen zu dem bei Säugergeweben angegebenen Wert ähnlichen K_d-Wert (23 pM). Danach werden Stämme mit und ohne koexprimiertes Gas in Kompetitionstests untersucht, bei denen die Bindung dieses Radioliganden mit den Agonisten Isoproterenol oder Epinephrin konkurriert. In beiden Stämmen wurde eine hochaffine Bindung beobachtet, die erwartungsgemäß nur dann auftritt, wenn der Rezeptor aktiv an G-Protein gekoppelt wird ([Fig. 5](#) und [Fig. 6](#)). Die extrapolierten K_i-Werte für diese Liganden (Isoproterenol = 10 nM; Epinephrin = 60 nM) sind mit den in Säugergeweben beobachteten Affinitäten vereinbar und zeigen die erwartete Potency-Reihenfolge. Andere Daten lassen jedoch vermuten, daß die hochaffine Bindung von Agonisten an den β2-adrenergen Rezeptor in Hefe anomal ist. und nicht von einer Kopplung an G-Protein herrührt. Insbesondere wird der dritte intrazelluläre Loop (der die primären Gα-Kontaktpunkte enthält) des β2-adrenergen Rezeptors durch die entsprechende Domäne des Hefe-Ste2-Rezeptors ersetzt. Dieser Rezeptor zeigt die gleichen Affinitäten für adrenerge Agonisten, was vermuten läßt, daß der β2-adrenerge Rezeptor in der Hefe eine ungeeignete Konformation einnimmt.

[0079] Expression des Somatostatinrezeptors der Ratte. Die hochaffine Bindung von Somatostatin an SSTR2

hängt von der Ausbildung eines Rezeptor/G-Protein-Komplexes ab (Strnad et al., 1993). Sind SSTR und G-Protein voneinander entkoppelt, so ist die hochaffine Bindung von [125 I]tyr 11 S-14 abgeschwächt. Wie in [Fig. 8](#) gezeigt, läßt sich die Bindung von [125 I]tyr 11 S-14 an in Scg1/G α_{12} koexprimierender Hefe exprimierten SSTR2 absättigen und weist eine hohe Affinität auf. Der berechnete K_d -Wert für in Hefe exprimierten SSTR2 bindendes [125 I]tyr 11 S-14 beträgt 600 pM. Ähnliche Bindungsaffinitäten werden beobachtet, wenn statt Scg1/G α_{12} G α_{12} mit SSTR2 koexprimiert wird. Der in der Hefe beobachtete K_d -Wert stimmt gut mit dem berechneten K_d -Wert der [125 I]tyr 11 S-14-Bindung von in Säugerzellen exprimiertem SSTR2 (Strnad et al., 1993) überein. Es wird gezeigt, daß die Addition des Hefe-Ste2-Rezeptors an den N-Terminus dieses Rezeptors keine Auswirkung auf dessen Fähigkeit zur Bindung von S-14 hat. Die Ste2-Sequenzen fungieren als Tag für die immunchemische Untersuchung der Rezeptorexpression. Der in [Fig. 7](#) gezeigte Immunoblot veranschaulicht das hohe Niveau der SSTR2-Expression in drei unterschiedlichen Stämmen. Den Somatostatinrezeptor SSTR2 sowie unterschiedliche G α -Proteine exprimierende Hefestämme leiten sich von dem Stamm YPH500 ab. Diese Stämme teilen den Genotyp MATa scg1 Δ hisG lys2-801 ura3-52 leu2 Δ 1 trp1 Δ 63 his3 Δ 200 ade2 SSTR2. Stämme mit der Bezeichnung CY624 (G α_{12}), CY602 (G α_s) und CY603 (Scg1) werden auf die spezifische Bindung von radioaktiv markiertem Somatostatin-14 (S-14) untersucht. Alle drei zeigen einen gewissen Grad an Somatostatinbindung (Tabelle 1). Die hochaffine Bindung dieses Liganden erfordert die Kopplung des Rezeptors an G-Protein, normalerweise G α_i (Luthin D.R. 1993; Strnad J. 1993), so daß das hohe Bindungsniveau in Abwesenheit von G α_i unerwartet ist. Als Bestätigung für die Kopplung des Rezeptors an G-Proteine wird die Bindung in Gegenwart des nicht hydrolysierbaren Guanosintriphosphat-Analogs Gpp(NH)p untersucht. Die Zugabe dieser Verbindung hebt die Ligandenbindung auf (Tabelle 1), wodurch demonstriert wird, daß der SSTR2-Rezeptor an G-Protein gekoppelt ist. Diese Daten zeigen, daß ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor aus Säugern eine funktionelle Wechselwirkung mit einem aus seinem bevorzugten G α -Protein plus den G β - und G γ -Untereinheiten aus Hefe zusammengesetzten G-Protein eingehen kann und daß ein heterologer Rezeptor in der Lage ist, funktionell an ein vollständig aus Hefe-Untereinheiten zusammengesetztes G-Protein zu koppeln.

TABELLE 1. Bindung von [125 I]-Somatostatin

STAMM ^a	G α	Bmax ^b	+Gpp (NH) p ^c
CY624	G α_i	94, 5	22%
CY602	G α_s	13, 7	0%
CY603	Scg1	24, 7	4%

^a Aus den Ratte-SSTR-Somatostatinrezeptor-Subtyp und das angegebene G α -Protein exprimierenden Hefestämmen wurden Membranrohextrakte präpariert. Die maximale Bindung von radioaktiv markiertem Somatostatin 14 wurde wie im Text beschrieben gemessen. ^b Bmax-Werte sind als fmol/mg Gesamtprotein angegeben. ^c Zur Entkopplung von Rezeptor und G-Protein wurden Proben mit dem nicht hydrolysierbaren GTP-Analog Gpp(NH)p versetzt. Die Daten sind als Prozent gebundener Radioligand verglichen mit unbehandelten Proben dargestellt.

[0080] Expression des muskarinischen Acetylcholinrezeptors aus Drosophila. Einen muskarinischen Acetylcholinrezeptor aus Drosophila (Dm-mAChR) codierende DNA-Sequenzen werden durch das Hinzufügen einer Sall-Stelle in den 5'-codierenden Sequenzen unter Verwendung von PCR modifiziert. Für die ersten 23 Aminosäuren des STE2-Genprodukts codierende DNA-Sequenzen werden an das 5'-Ende von Dm-mAChR in Form eines BamHI/Sall-Fragments angefügt. Die modifizierte Dm-mRChR-Sequenz wird in die BamHI-Stelle im Plasmid pMP3 inseriert, wobei die Expression des Rezeptors unter die Kontrolle des GAL1-Promotors gestellt und das Plasmid pMP3-Dm-mAChR gebildet wird. Der Stamm CY414 wird mit diesem Plasmid transformiert und zur Rezeptorexpression nach Standardverfahren kultiviert. Von diesen Zellen werden Membranrohpräparationen hergestellt und auf das Vorhandensein spezifischer Bindungsstellen für den muskarinischen Antagonisten 3H-Chinuclidinylbenzilat (10 nM) in Konkurrenz mit Atropin (50 μ M) getestet. Es werden spezifische Bindungsstellen (Bmax 10 bzw. 30 fmol/mg) beobachtet.

[0081] Die Expression von Drosophila-mAChR ist auch mit Immunoblot-Verfahren nachweisbar. In Übereinstimmung mit dem aus der Primärsequenz von mAChR vorhergesagten Molekulargewicht wird unter Verwendung eines gegen das assoziierte Ste2-Epitop gerichteten Antikörpers ein reichlich vorhandenes 75 kDa großes Polypeptid in Proteinproben (30 μ g/Spur) aus Membranrohpräparationen von mAChR von pMP3 exprimierenden Zellen nachgewiesen ([Fig. 9](#)). Wesentlich weniger Protein wird nachgewiesen, wenn mAChR von pMP2, einem Derivat von pMP3 ohne GAL4-Sequenzen, exprimiert wird, womit keine Bestätigung einer Expression von mAChR auf hohem Niveau erwartet wird.

[0082] Expression eines $\alpha 2$ -adrenergen Rezeptors ($\alpha 2$ -AR). Ein EcoRI-NarI-Fragment aus dem Plasmid pMP3, einschließlich dem GAL1,10-Promotor-EcoRI-BamHI-Fragment, für die ersten 23 Aminosäuren des STE2-Genprodukts codierenden und auf einem BamHI-Sall-Fragment liegenden DNA-Sequenzen, dem Sall-SphI-Polylinker-Fragment aus YEp352 sowie STE7-Terminatorsequenzen, wird unter Bildung von pLP15 auf pRS424 übertragen. Ein für einen $\alpha 2A$ -AR aus Schwein [Guyer, C.A., Horstman, D.A., Wilson, A.L., Clark, J.D., Cragoe, E.J. und Limbird, L.E. (1990) J. Biol. Chem. 265, 17307-17317] codierendes PstI-PvuII-Fragment wird in die PstI-SmaI-Stellen von pLP15 inseriert, wobei pLP50 gebildet wird. Ein EcoRI-Fragment von GAL4 wird in die EcoRI-Stelle von pLP50 unter Bildung von pLP60 inseriert. Der Stamm LY124 [ein Derivat von YPH500 (Stratagene), das das scg1 Δ hisG-Allel enthält sowie das Plasmid pLP10 [pLP10:pUN75 (Elledge, S. J. und Davis, R. W. Genetics 87, 189-194) mit dem in die Sall-Stelle inserierten PGK-Scg1-Gai2-XhoI-Sall-Fragment aus pPGKH-Scg1Gai2] trägt, wird mit pLP60 transformiert und auf Rezeptorexpression nach Standardverfahren kultiviert. Von diesen Zellen werden Membranrohpräparationen hergestellt und auf das Vorhandensein spezifischer Bindungsstellen für den $\alpha 2$ -AR-Antagonisten 3H-Rauwolscin (200 nM) in Konkurrenz mit Phentolamin (10 μ M) getestet. Es wurden spezifische Bindungsstellen mit einem Bmax zwischen 10 und 84 fmol/mg beobachtet.

[0083] Die Expression von Schweine- $\alpha 2$ AR ist auch mit Immunoblot-Verfahren nachweisbar ([Fig. 10](#)). Dabei werden unter Verwendung eines gegen das assoziierte Ste2-Epitop gerichteten Antikörpers in Proteinproben (30 μ g/Spur) aus Membranrohextrakten von $\alpha 2$ AR von pMP3 exprimierenden Zellen mehrere reichlich vorhandene Polypeptide nachgewiesen.

Beispiel 3

Agonistenabhängiges Wachstum von Hefe als Reaktion auf Somatostatinrezeptor-Agonisten

[0084] Hefestämme, die auf Somatostatin reagieren, werden durch Einführung mehrerer Modifikationen in typische Laborhefestämme erzeugt. Dabei wird erstens eine für den Somatostatinrezeptor Subtyp 2 (SSTR2) codierende cDNA in einem Mehrkopien-Hefepiasmid unter die Kontrolle des galactoseinduzierbaren GAL1-Promotors gestellt ([Fig. 11](#)). Eine Rezeptorexpression auf hohem Niveau wird durch induzierbare Koüberexpression des Transkriptionsaktivierungsproteins GAL4 vom gleichen Plasmid erreicht. Zweitens wird das endogene G α -Proteingen GPA1/SCG1 durch ein sich aus einer aminoterminalen Domäne aus GPA1/SCG1 sowie C-terminalen Sequenzen aus Ratte-Gai2 zusammensetzendes chimärisches Gen ersetzt ([Fig. 12](#)). Es konnte bereits gezeigt werden, daß die Expression chimärischer G-Proteine in Hefe den Wachstumsdefekt von scg1/gpa1-Mutantenzellen supprimiert [Kang, Y. -S., Kane, J., Kurjan, J., Stadel, J. M. und Tipper, D. J. (1990) Mol. Cell. Biol. 10, 2582-2590]. Drittens wird das FAR1-Gen deletiert, was die Fortsetzung des Wachstums bei Vorhandensein eines aktivierten Paarungssignaltransduktionswegs gestattet. Es wird vermutet, daß das FAR1-Protein als primäre Schnittstelle zwischen dem Paarungssignaltransduktionsweg und dem Zellzyklusapparat dient [Chang, F. und Herskowitz, I. (1990) Cell 63, 999-1012; Peter, M., Gartner, A., Horecka, J., Ammerer, G. und Herskowitz, I. (1993) Cell. Biol. 13, 5659-5669]. Viertens wird das FUS1-Gen durch ein durch Fusion von Transkriptionskontrolelementen des FUS1-Gens an für das HIS3-Protein codierende Sequenzen gebildetes Reportergenkonstrukt ersetzt, wodurch die Expression des HIS3-Genprodukts unter die Kontrolle des Paarungssignaltransduktionswegs gestellt wird. Dieses Konstrukt tragende Hefestämme (his3) können auf supplementiertem Minimalmedium ohne Histidin schwach wachsen und sind gegenüber 3-Amino-1,2,4-triazol (AT), einem Inhibitor des HIS3-Genprodukts, empfindlich. Die Rezeptoraktivierung durch Agonistenbindung führt zu einer erhöhten HIS3-Proteinexpression, einem entsprechenden Anstieg der Resistenz gegenüber AT und daher der Fähigkeit zum Wachstum auf Medium ohne Histidin und/oder in Gegenwart des Inhibitors. Die Einstellung des pH-Werts des Wachstumsmediums auf > pH 5,5 verstärkt die Fähigkeit solcher Zellen, in Gegenwart eines Agonisten zu wachsen, vermutlich aufgrund einer erhöhten Fähigkeit von Somatostatin zur Bindung an SSTR2.

[0085] Der Nutzen des Hefe-Expressionssystems liegt in seiner Anpassungsfähigkeit an schnelles Massen-Screening. Zur Erleichterung des Screening auf neue, auf die SSTRs gerichtete Therapeutika wird ein zweckmäßiger Agarplatten-Biotest entwickelt, bei dem die funktionelle Kopplung der Somatostatinbindung an Rezeptor und der anschließenden Aktivierung des Paarungssignaltransduktionswegs als eine Wachstumszone (Hof) um die aufgetragenen Verbindungen herum nachgewiesen wird ([Fig. 13](#)). Übernachts-Flüssigkulturen von LY268 [einem Derivat von YPH500 (Stratagene) MATa ura3-52 lys2-801 ade2 trp1 Δ 63 his3 Δ 200 leu2 Δ 1 far1 Δ LYS2 scg1 Δ hisG fus1 Δ FUS1-HIS3 sst2 Δ ADE2, das das SSTR2-Expressionsplasmid und das SCG1-Gai2-Expressionsplasmid pLP82 trägt] in SC-Dextrose (2%) ohne ura, trp wurden auf SC-Lactat-Medium (2%) ohne ura und trp und anschließend auf SC-Galactose-Medium (2%) ohne ura und trp überführt. Die Zellen (2×10^5) werden dann in 30 ml SC-Galactose-Agar (2%) ohne ura, trp und his ausplattiert ([Fig. 13A](#)

obere Abbildung) oder gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt ([Fig. 13B](#), untere Abbildung), die angegebenen Mengen an ausgewählten Verbindungen auf der Oberfläche der Agarplatte befindliche Papierscheibchen aufgetragen und 3-5 Tage bei 30°C inkubiert. Wachstumshöfe werden mit verschiedenen Konzentrationen an Somatostatin (S-14) und MK678 [einem Hexapeptidanalogue von Somatostatin, das eine hochaffine Bindung zu SSTR2 zeigt [Verber, D., Saperstein, R., Nutt, R., Friedinger, R., Brady, P., Curley, P., Perlov, D., Paleveda, W., Zacchei, A., Cordes, E., Anderson, P. und Hirschmann, R. (1981) *Life Sci*, 35, 1371-1378] gesättigten Scheibchen herum beobachtet. Die Hofgröße nimmt proportional zur aufgetragenen Menge an Agonist zu, wobei sogar bei der geringsten aufgetragenen Menge (6 nmol S-14) eine signifikante Reaktion beobachtet wird, was die ausgezeichnete Empfindlichkeit des Tests demonstriert. Mit dem Träger allein sowie gegenüber Met-enkephalin, einem Opiatrezeptor-Agonisten, wird keine nachweisbare Reaktion beobachtet.

[0086] Das Hefemedium sowie die Kultivierungsbedingungen werden gemäß Standardverfahren formuliert, und die DNA-vermittelte Transformation der Hefe erfolgt mit dem LiAc-Verfahren [Sherman, F., Fink, G. R. und Hicks, J. B. (1986) *Methods in Yeast Genetics* (Cold Spring Harbor Laboratory Press)]. LY268 wird mittels sequentieller Insertionsdeletion unter Verwendung der rekombinanten Allele *scg1ΔhisG*, *far1ΔLYS2*, *FUS1ΔHIS3* und *sst2ΔADE2* konstruiert. Dabei wird das *scg1ΔhisG*-Allel durch Insertion des *hisG*-URA3-*hisG*-Fragments aus pNKY51 [Alani, E., Cao, L. und Kleckner, N. (1987) *Genetics* 116, 541-545] zwischen das 5'-EcoRI-HindIII-Fragment und das 3'-SphI-SnaBI-Fragment von SCG1/GPA1 zusammengebaut. Nach der DNA-vermittelten Transformation entsprechender Hefestämme und der Selektion auf den Austausch des chromosomalen Allels wird das URA3-Gen entfernt, indem man durch Wachstum auf 5-Fluororotsäure (FOA) enthaltendem Medium die Rekombination zwischen *hisG*-Wiederholungen induziert [Boeke, J., Lacroute, F. und Fink, G. (1984) *Mol. Gen. Genet.* 197, 345-346]. Das *far1ΔLYS2*-Allel wird konstruiert, indem man zwei Fragmente des FAR1-Gens [Chang, F. und Herskowitz, I. (1990) *Cell* 63, 999-1012] aus genomischer Hefe-DNA (Stamm YPH501, Stratagene) unter Verwendung synthetischer Oligonukleotide, durch die im 5'-Fragment an Position 1201 eine EcoRI-Stelle sowie im 3'-Fragment an Position 2017 eine HindIII-Stelle und in Position 2821 eine Sall-Stelle eingeführt werden, amplifiziert. Die Fragmente werden in das EcoRI/Sall-Fragment von pBSK (Stratagene) kloniert. Das vollständige *far1ΔLYS2*-Konstrukt wird mit EcoRI verdaut und zur Hefetransformation verwendet. Ein für das FUS1-HIS3-Reportergen codierendes EcoRI-Fragment wird aus pSL1497 [Stevenson, B. J., Rhodes, N., Errede, B. und Sprague, G. F. (1992) *Genes Dev.* 6, 1293] herausgetrennt und zur Transformation entsprechender Hefestämme verwendet. Das *sst2ΔADE2*-Allel [Dietzel, C. und Kurjan, J. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7, 4169-4177] wird aus einem mit PCR unter Verwendung von Oligos, mit denen an Position 1 eine Cla-Stelle und an Position 2518 eine NheI-Stelle plziert wurde, amplifizierten 2,5 kb großen Fragment des ADE2-Gens aufgebaut. Dieses Fragment wird für den Austausch des internen ClaI-NheI-Fragments in SST2 verwendet. Das *sst2ΔADE2*-Fragment wird durch Verdauung mit Sall freigesetzt und zur Transformation entsprechender Hefestämme verwendet.

[0087] Die aus mehreren Schritten bestehende Konstruktion des SSTR2-Expressionsplasmids pJH2 ([Fig. 11](#)) wird durch die Insertion eines SphI/NarI-Fragments des 3'-nichttranslatierten Bereichs aus dem STE7-Gen [Teague, M. A., Chaleff, D. T. und Errede, B. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7371-7375] sowie eines EcoRI/BamHI-Fragments des GAL1/10-Promotors [Yocum, R. R., Hanley, S., West, R., and Ptashne, M. (1984) *Mol. Cell. Biol.* 4, 1985-1998] in entsprechende Stellen in YEp352 [Hill, J. E., Myers, A. M., Koerner, T. J. und Tzagoloff, (1986) *Yeast* 2, 163-167] gestartet, wobei pEK1 erzeugt wird. Ein für das offene Leseraster und Transkriptionsterminationssequenzen des GAL4-Gens codierendes PCR-Produkt wird mit 5'-EcoRI- und 3'-AatII-Stellen enthaltenden Oligos amplifiziert und in pEK1 inseriert, wobei pMP3 entsteht. Die für Ratte-SSTR2 codierende cDNA [Strnad, J., Eppler, C. M., Corbett, M. und Hadcock, J. R. (1993) *BBRC* 191, 968-976] wird mittels PCR unter Verwendung von Oligonukleotiden, die den für den Aminoterminus von SSTR2 codierenden DNA-Sequenzen eine BglII-Stelle sowie direkt hinter der Translationsstoppstelle eine BglII-Stelle hinzufügen, modifiziert. Für SSTR2 codierende Sequenzen werden als BglII-PCR-Fragment in die BamHI-Stelle von pMP3 inseriert.

[0088] Das Plasmid pLP82 ([Fig. 12](#)) wird konstruiert, indem man zunächst das XhoI/EcoRI-Promotorfragment in pPGKH-SCG1-Gas [Kang, Y. -S., Kane, J., Kurjan, J., Stadel, J. M. und Tipper, D. J. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10, 2582-2590] durch ein aus genomischer Hefe-DNA unter Verwendung von Oligonukleotiden, durch die an den Positionen -200 und -42 5'-XhoI- und 3'-EcoRI-Stellen eingeführt werden, modifiziertes SCG1-Promotorfragment [Dietzel, C. und Kurjan, J. (1987) *Cell* 50, 1001-1010] ersetzt, wobei das Plasmid pLP61 gebildet wird. Das für die Gas-Domäne codierende BamHI-Fragment wird durch ein vergleichbares, für Gai2 codierendes Fragment ersetzt, wobei das Plasmid pLP71 gebildet wird. Das für ein unter der Kontrolle des SCG1-Promotors exprimiertes chimärisches SCG1-Gai2-G-Protein codierendes XhoI/Sall-Fragment von pLP71 wird in die Sall-Stelle in pRS414 (Stratagene) übertragen, wobei pLP82 gebildet wird.

[0089] Das Plasmid pLP83 wird konstruiert, indem man das EcoRI-Fragment in pLP71 durch das für I codierende EcoRI-Fragment aus pPGKH-SCG1 [Kang, Y. -S., Kane, J., Kurjan, J., Stadel, J. M. und Tipper, D. J. (1990) Mol. Cell. Biol. 10, 2582-2590] ersetzt, wobei das Plasmid pLP75 gebildet wird. Das für SCG1 codierende XhoI/Sall-Fragment wird in die Sall-Stelle in pRS414 (Stratagene) übertragen, wobei das Plasmid pLP83 gebildet wird.

BEISPIEL 4

Auswirkungen der G-Protein-Expression auf die Empfindlichkeit des Biotests

[0090] Die Hefestämme LY268 (pLP82: CEN pSCG1-Scg1-Gai2), LY262 (pRS414-PGK-Scg1-Gai2: pRS414 mit dem PGK-Scg1-Gai2-Xho/Sall-Fragment aus pPGKH-Scg1-Gai2 in der Sall-Stelle), LY324 (pLP84: 2µ pSCG1-Scg-Gai2) und LY284 (pRS424-PGK-Scg-Gai2: pRS424 mit dem PGK-Scg1-Gai2-Xho/Sall-Fragment aus pPGKH-Scg1-Gai2 in der Sall-Stelle) wurden durch Einbringen der genannten Plasmide in den Stamm LY260 [einem Derivat von YPH500 (Stratagene) MATa ura 3-52 lys2-801 ade2 trp1D63 his3Δ200 leu2α1 far1ΔLYS2 scg1ΔhisG fus1ΔFUS1-HIS3 sst2ΔADE2, das das SSTR2-Expressionsplasmid trägt] konstruiert. Übernacht-Flüssigkulturen in SC-Dextrose (2%) ohne ura und trp wurden auf SC-Lactat-Medium (2%) ohne ura und trp und anschließend auf SC-Galactose-Medium (2%) ohne ura und trp überführt. Die Zellen (2×10^5) werden dann in 30 ml SC-Galactose-Agar (2%) ohne ura, trp und his ausplattiert, die angegebenen Mengen an ausgewählten Verbindungen auf der Oberfläche der Agarplatte befindliche Papierscheibchen aufgetragen und 3-5 Tage bei 30°C inkubiert (**Fig. 14**). Das Ausmaß an Wachstum um S-14 herum hängt jeweils von dem im jeweiligen Stamm enthaltenen G-Protein-Expressionsplasmid ab. Das ausgiebigste Wachstum wird als Reaktion auf S-14 bei LY268 (pLP82: CEN pSCG1-Scg1-Gai2) beobachtet, ein geringeres Wachstum ist bei den Stämmen LY262 (pRS414-PGK-Scg1-Gai2) und LY324 (pLP84: 2µ-pSCG1-Scg-Gai2) zu sehen, während LY284 (pRS424-PGK-Scg1-Gai2) nur wenig nachweisbares Wachstum zeigt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der beobachteten Hemmung pheromonstimulierter Transkriptionsinduktion durch erhöhte Mengen an exprimiertem $G\alpha$ -Protein. Somit ist eine präzise Regulation der G-Protein-Expressionsniveaus in heterologe G-Protein-gekoppelte Rezeptoren exprimierenden Stämmen für die Entwicklung und erfolgreiche Realisierung eines Biotests für mit dem Rezeptor wechselwirkende Verbindungen entscheidend.

[0091] Das Plasmid pLP84 wird konstruiert, indem man zunächst das XhoI/EcoRI-Promotorfragment in pPGKH-SCG1- $G\alpha_s$ [Kang, Y. -S., Kane, J., Kurjan, J., Stadel, J. M. und Tipper, D. J. (1990) Mol. Cell. Biol. 10, 2582-2590] durch ein aus genomischer Hefe-DNA unter Verwendung von Oligonukleotiden, durch die an den Positionen -200 and -42 5'-XhoI- und 3'-EcoRI-Stellen eingeführt werden, modifiziertes SCG1-Promotorfragment [Dietzel, C. und Kurjan, J. (1987) Cell 50, 1001-1010] ersetzt, wobei das Plasmid pLP61 gebildet wird. Das für die $G\alpha_s$ -Domäne codierende BamHI-Fragment wird durch ein vergleichbares für $G\alpha_{12}$ codierendes Fragment ersetzt, wobei das Plasmid pLP71 gebildet wird. Das für ein unter der Kontrolle des SCG1-Promotors exprimiertes chimärisches SCG1- $G\alpha_{12}$ -G-Protein codierende XhoI/Sall-Fragment aus pLP71 wird in die Sall-Stelle in pRS424 (Stratagene) übertragen, wobei pLP84 gebildet wird.

BEISPIEL 5

Der Somatostatin-Rezeptor kann ein Signal über das endogene Hefe- $G\alpha$ -Protein übermitteln

[0092] Man nimmt an, daß SSTR2 in Säugerzellen an $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ koppeln kann [Luthin, D. R., Eppler, C. M. und Linden, J. (1993) J. Biol. Chem. 268, 5990-5996]. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß SSTR2 ein Signal über das endogene Hefe- $G\alpha$ -Protein übermitteln kann, wenn er in entsprechenden Hefestämmen (unten beschrieben) exprimiert wird. Diese Beobachtung impliziert eine notwendige Kopplung von SSTR2 an das endogene $G\alpha$ -Protein. Die Fähigkeit heterologer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren zur Kopplung an das endogene $G\alpha$ -Protein bedeutet eine signifikante Verbesserung der existierenden Technologie und wird im Stand der Technik nicht für möglich gehalten (King K., Dohlman, H. G., Thorner, J., Caron, M. G. und Lefkowitz, R. J. (1990) Science 250, 121-123). Die Hefestämme LY266 (pLP83: CEN pSCG1-Scg1), LY280 (pRS414-PGK-Scg1: pRS414 mit dem PGK-Scg1-Xho-Sall-Fragment aus pPGKH-Scg1 in der Sall-Stelle), LY326 (pLP86: 2µ-pSCG1-Scg) und LY282 (pRS424-pPGK-Scg: pRS424 mit dem PGK-Scg1-Xho-Sall-Fragment aus pPGKH-Scg1 in der Sall-Stelle) wurden durch Einbringen der genannten Plasmide in den Stamm LY260 konstruiert. Übernacht-Flüssigkulturen dieser Stämme, die nur SCG1/GPA1 exprimieren können, in SC-Dextrose (2%) ohne ura und trp wurden auf SC-Lactat-Medium (2%) ohne ura, trp und anschließend auf SC-Galactose-Medium (2%) ohne ura und trp überführt. Die Zellen (2×10^5) werden dann in 30 ml SC-Galactose-Medium (2%) ohne ura, trp und his ausplattiert, die angegebenen Mengen an ausgewählten Verbindungen auf der Oberfläche der Agarplatte befindliche Papierscheibchen aufgetragen und 3-5 Tage bei 30°C

inkubiert. Wachstumshöfe werden um mit verschiedenen Konzentrationen an S-14 gesättigten Scheibchen herum beobachtet, wodurch demonstriert wird, daß ein produktives Signal über eine Wechselwirkung zwischen SSTR2 und dem Hefeprotein SCG1/GPA1 übertragen werden kann (**Fig. 15**). Diese Beobachtungen zeigen, daß ein einfacher und breit anwendbarer Biotest realisiert werden kann, bei dem ein beliebiges Mitglied der Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in entsprechend modifizierten Hefestämmen exprimiert und zur Kopplung an das endogene $G\alpha$ -Protein veranlaßt werden kann.

[0093] Das Plasmid pLP86 wird konstruiert, indem man das EcoRI-Fragment in pLP71 durch das für SCG1 codierende EcoRI-Fragment aus pPGKH-SCG1 [Kang, Y. -S., Kane, J., Kurjan, J., Stadel, J. M. und Tipper, D. J. (1990) Mol. Cell. Biol. 10, 2582-2590] ersetzt, wobei das Plasmid pLP75 gebildet wird. Das für SCG1 codierende XhoI/Sall-Fragment wird in die Sall-Stelle in pRS424 (Stratagene) übertragen, wobei das Plasmid pLP86 gebildet wird.

BEISPIEL 6

Mutationen in SST2 verbessern die Empfindlichkeit der Reaktion auf Somatostatin

[0094] Mutationen im SST2-Gen führen zur Supersensitivität von Zellen, bei denen es sich ansonsten um Wildtypzellen handelt, gegenüber Paarungspheromon. Die Auswirkung dieser Mutation auf die in *far1*-, *FUS1*-*HIS3*-Stämmen exprimierten AT-Resistenzniveaus wird untersucht. (**Fig. 16**). Zellen (5×10^5) aus Übernachtskulturen von LY230 [einem Derivat von YPH50 (Stratagene) MATa SST2 *ura3-52 lys2-801 ade2 trp1 Δ 63 his3 Δ 200 leu2 Δ 1 far1 Δ FUS1-HIS3*] und LY238 (einer Modifikation von LY230 *sst2 Δ ADE2*) in SCD-*ura*, *trp* werden auf SCD-*ura*, *trp*, *his* plus 10 mM AT ausplattiert und 2 Tage bei 30 °C inkubiert. LY238 (*sst2*) zeigt eine erhöhte AT-Resistenz als Reaktion auf Paarungsfaktor. Dabei wird LY238-Wachstum um Scheibchen mit 10 pmol Paarungspheromon herum beobachtet, während LY230 (SST2) 1 nmol Paarungsfaktor benötigt, so daß ein signifikantes Wachstum beobachtet werden kann. Somit steigert die Einführung von *sst2* in diese Stämme die Empfindlichkeit des Biotests um mindestens das 100fache, wodurch ebenso eine Erhöhung der Empfindlichkeit des SSTR-abhängigen Biotests ermöglicht wird.

[0095] Hefestämme, die SSTR2 exprimieren und ein defektes *sst2*-Gen tragen, zeigen ein weitaus stärkeres Wachstum um Scheibchen mit verschiedenen Somatostatinkonzentrationen herum als Stämme mit einem funktionsfähigen SST2-Gen. Übernachtskulturen der Stämme LY268 (*sst2*, mit pLP82), LY266 (*sst2*, mit pLP83), LY288 [einem das SSTR2-Expressionsplasmid und das SCG1- $G\alpha_{12}$ -Expressionsplasmid pLP82 tragenden Derivat von YPH500 (Stratagene) MATa SST2 *ura3-52 lys2-801 ade2 trp1 Δ 63 his3 Δ 200 leu2 Δ 1 far1 Δ LYS2 scg1 Δ hisG fus1 Δ FUS1-HIS3*] und LY290 (einer pLP83 enthaltenden Modifikation von LY288) in SC-Dextrose (2%) ohne *ura*, *trp* wurden auf SC-Lactat-Medium (2%) ohne *ura* und *trp* und anschließend auf SC-Galactose-Medium (2%) ohne *ura* und *trp* überführt. Die Zellen (2×10^5) werden dann auf 30 ml SC-Galactose-Platten (2%) ohne *ura*, *trp* und *his* ausplattiert, die angegebenen Mengen an ausgewählten Verbindungen auf der Oberfläche der Agarplatte befindliche Papierscheibchen aufgetragen und 3-5 Tage bei 30°C inkubiert. Wachstumshöfe werden um mit verschiedenen Konzentrationen an S-14 gesättigten Scheibchen herum sowohl bei *sst2 Δ* - als auch SST2-Stämmen beobachtet (**Fig. 17**), doch ist der von den Stämmen LY268 und LY266 (*sst2*) gezeigte Wachstumsgrad deutlich höher als der für die Stämme LY288 und LY290 (SST2) beobachtete. Weiterhin tritt der Herunterregulationseffekt von SST2 stärker in denjenigen Stämmen zutage, die lediglich das SCG1/GPA1-Wildtypprotein exprimieren, was damit übereinstimmt, daß man von SST2 eine festere Wechselwirkung mit dem nativen Protein als mit dem chimärischen SCG1- $G\alpha_{12}$ -Protein erwartet.

BEISPIEL 7

Funktionelle Expression eines Cholecystokinin (CCK_B)-Rezeptors der Ratte in Hefe

[0096] Cholecystokinin (CCK) ist ein Haupthormon im Verdauungstrakt, das eine wichtige Rolle bei der Steuerung der pankreatischen Sekretion und dem Ausstoß von Gallenflüssigkeit spielt (1). CCK ist ebenfalls eines der am weitesten verbreiteten Neuropeptide des Gehirns (2). Die CCK-Effekte werden über die Wirkung von Zelloberflächenrezeptoren vermittelt, die sich unter Verwendung pharmakologischer Kriterien in zwei Subtypen, nämlich CCK_A und CCK_B, klassifizieren lassen (3). Durch molekulare Klonierungsarbeiten konnten cDNAs identifiziert werden, die für G-Protein-gekoppelte CCK_A- (4) bzw. CCK_B- (5-8) Rezeptoren codieren. Kürzlich wurden Verbindungen mit selektiven CCK_B-Rezeptor-Antagonisteneigenschaften und einer starken anxiolytischen Aktivität identifiziert (9). Die funktionelle Expression von CCK_B-Rezeptoren in Hefe sollte ein schnelles Screening auf neue Verbindungen mit CCK_B-Antagonisteneigenschaften gestatten und die für die rationale Konstruktion neuer CCK_B-Liganden erforderliche molekulare Charakterisierung struktureller Aspekte des

CCK_B-Rezeptors erleichtern.

Material und Methoden

[0097] Plasmidkonstruktionen. Alle molekularbiologischen Manipulationen wurden gemäß Standardverfahren (10) durchgeführt. Der Ratte-CCK_B-Rezeptor wurde von Rattenhirn-cDNA mittels PCR unter Verwendung von Oligonukleotidprimern, mit denen an den 5'- und 3'-Enden BglII-Stellen eingeführt werden (5'-AAAA-GATCTAAAATGGACCTGCTCAAGCTG, 3'-AAAAGATCTTCAGCCAGGCCCCAGTGTGCT), kloniert. Das CCK_B-Rezeptor-Expressionsplasmid pJH20 wurde konstruiert, indem das mit BglII verdaute PCR-Fragment in der korrekten Orientierung in das mit BamHI geschnittene pMP3 (11) inseriert wurde. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gα-Protein-Expressionsplasmide wurden konstruiert, indem für die 47 carboxyterminalen Aminosäuren von GPA1 codierende DNA-Sequenzen in pLP83 (11) durch solche für Gα_s (pLP122), Gα_{i2} (pLP121) ersetzt wurden.

[0098] Stammkonstruktionen. Die Konstruktion der Hefestämme sowie die Formulierung der Wachstumsmedien und Kultivierungsbedingungen erfolgten nach Standardverfahren (12). Die DNA-vermittelte Hefetransformation wurde mit dem Lithiumacetatverfahren durchgeführt. Die als Grundlage für alle in diesem Bericht beschriebenen Experimente verwendeten Hefestämme wurden mittels sequentieller Insertionsdeletion unter Verwendung rekombinanter Allele konstruiert. Den Ratte-CCK_B-Rezeptor exprimierende Hefestämme wurden mittels sequentieller DNA-vermittelter Transformation von LY296 (MATa ura3-52 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 ade2-101 lys2-801 gpa1ΔhisG far1ΔLYS2 FUS1-HIS3 sst2ΔADE2, Ref. 7) mit pJH20 und danach mit den oben beschriebenen Gα-Protein-Expressionsplasmiden konstruiert.

[0099] Sättigungsbindungstests mit radioaktiv markiertem Agonisten. Hefemembranrohextrakte wurden von Kulturen in der späten log-Phase mittels Glasperlenlyse und Zentrifugation bei 40000 × g nach einem veröffentlichten Verfahren (13) präpariert. Der Proteingehalt der Membranrohfractionen wurde mit dem Biorad-Proteintestkit gemäß den Angaben des Herstellers gemessen. Radioligandenbindungstests wurden gemäß Strnad et al. (14) mit ³H-CCK-8 (Amersham) in Gegenwart von 150 mM NaCl ausgeführt. Als nicht-spezifische Bindung wurde die in Gegenwart von 1 μM CCK-4 beobachtete Bindung definiert. In aus Zellen ohne CCK_B-Rezeptor hergestellten Membranfraktionen wurde eine vernachlässigbare spezifische Bindung beobachtet (Daten nicht gezeigt).

[0100] Biotest. Ein Funktionstest für in Hefe exprimierten CCK_B-Rezeptor wurde unter Verwendung einer Modifikation eines Standardverfahrens (11) ausgeführt. Dabei wurden Hefestämme über Nacht in 2 ml synthetischem komplettem Flüssigmedium mit Glucose (2%) und ohne Uracil und Tryptophan (SCD-ura-trp) angezogen, zur Entfernung von Glucoseresiden gewaschen und über Nacht in 5 ml SC-Galactose (2%)-ura-trp-Flüssigmedium angezogen. Geschmolzenes (50 °C) SC-Galactose (2%)-ura-trp-his-Agarmedium (30 ml, durch Zugabe von konzentriertem KOH oder NH₄OH vor dem Autoklavieren auf pH 6,8 eingestellt) wurde mit der Übernachtskultur (2 × 10⁴ Zellen/ml) angeimpft und in quadratische (9 × 9 cm) Petrischalen gegossen. Auf die Oberfläche des verfestigten Agars wurden sterile Filterscheibchen gelegt und mit 10 μl die angegebenen Mengen der genannten Verbindungen enthaltendem DMSO gesättigt. Die Platten wurden 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Cholecystokinin (CCK-4, CCK-8), Somatostatin (S-14) und Metenkephalin stammten von Bachem. Oxy-metazolin, Isoprotenerol und Carbachol stammten von Sigma.

ERGEBNISSE

[0101] Bindung von Cholecystokinin an den in Hefe exprimierten Ratte-CCK_B-Rezeptor. Die funktionelle Expression des Ratte-CCK_B-Rezeptors auf hohem Niveau in der Hefe war eine notwendige Voraussetzung für die Entwicklung eines sinnvollen Biotests. Dabei wurde die Ratte-CCK_B-Rezeptor-cDNA unter der Kontrolle des GAL1-Promotors im Plasmid pJH20 gestellt. Mit diesem Konstrukt wird auch die induzierbare Überexpression von Gal4p, dem Transkriptionsaktivierungsprotein für galactoseinduzierbare Gene, verliehen, was zu deutlich erhöhten Niveaus an Rezeptorprotein in Membranrohfractionen im Vergleich zu einem von einem Plasmid ohne GAL4-Sequenzen exprimierten Rezeptor führt (Daten nicht gezeigt). CCK_B-Rezeptorsequenzen wurden in pJH20 ohne Modifikation der proteincodierenden Sequenzen eingeführt. Von King et al. wurde bereits berichtet, daß der Austausch der aminoterminalen Domäne des β₂-adrenergen Rezeptors gegen die äquivalente STE2-Sequenz für eine effiziente Rezeptorexpression in der Hefe notwendig war (15). Im Gegensatz dazu benötigt die funktionelle Expression des CCK_B-Rezeptors in der Hefe keine Addition von Hefesequenzen an den Aminoterminus. Es wurden die Expression chimärischer Gα-Proteine, die sich aus der aminoterminalen βγ-Wechselwirkungsdomäne von Gpa1p und carboxyterminalen Rezeptorwechselwirkungsdomänen von Ratte-Gα_{i2} (pLP121) oder -Gα_s (pLP122) zusammensetzen, unter der Kontrolle des GPA1-Promotors verleihende

Plasmide konstruiert. Hefestämme, die exprimierten CCK_B-Rezeptor sowie chimärisches Gα₁₂-(LY628) bzw. Gα_s-(LY631) Protein enthalten, wurden durch Transformation eines durch die Deletion von für Komponenten des Paarungssignaltransduktionswegs codierenden Genen modifizierten Hefestamms (LY296) mit CCK_B-Rezeptor- und Gα-Protein-Expressionsplasmiden konstruiert. Die meisten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zeigen jeweils agonistenabhängige hoch- und niedrigaffine Zustände. Die hochaffine Agonistenbindung hängt von der funktionellen Assoziation des Rezeptors mit einem heterotrimeren G-Protein ab. Falls der Rezeptor nicht mit dem G-Protein assoziiert oder von diesem entkoppelt ist, liegt eine niedrigaffine Agonistenbindung vor, die in Sättigungsbindungstests mit radioaktiv markiertem Agonisten nicht nachweisbar ist. In aus LY631-Zellen hergestellten Hefe-Membranrohfraktionen band der Agonist ³H-CCK-8 mit hoher Affinität und auf sättigbare Weise an den CCK_B-Rezeptor (Fig. 18), womit demonstriert wurde, daß (1) eine funktionelle ligandenbindende Konformation des CCK_B-Rezeptors in der Hefe exprimiert wurde und (2) der Rezeptor funktionell mit dem chimärischen Gα-Protein unter Ausbildung eines hochaffinen Agonistenbindungszustands assoziiert war. Der in Hefe exprimierte CCK_B-Rezeptor zeigte eine Affinität für ³H-CCK-8 ($K_d = 8$ nM), die wesentlich niedriger als der hochaffine Bindungszustand des in Säugerzellen exprimierten CCK_B-Rezeptors ($K_d = 100$ pM, Ref. 5) war, was vielleicht an einer ineffizienten Wechselwirkung mit der Rezeptorwechselwirkungsdomäne von Ratte-Gα_s lag. Man würde erwarten, daß diese Bindungsparameter den nativen Werten in Extrakten aus das zugehörige Gα-Protein Gαq (5-8) enthaltenden Zellen stärker ähneln. Die Gesamtzahl an beobachteten ³H-CCK-8-Bindungsstellen ($B_{max} = 206$ fmol/mg) stand im Einklang mit Werten, die für den α-Paarungspheromon-Rezeptor der Hefe erhalten wurden (200 fmol/mg, Ref. 16). Bei vielen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist die hochaffine Agonistenbindung gegenüber GTP und dessen Analogen empfindlich. GTP-Analoga induzieren die Dissoziation des Rezeptor/G-Protein-Komplexes, was zu einem niedrigaffinen Agonistenbindungszustand führt. Die Zugabe von GppNHp (100 µM), einem nicht hydrolysierbaren GTP-Analog, zu einem Agonistenbindungstest reduziert die spezifische Bindung von ³H-CCK-8 an den CCK_B-Rezeptor in Membranrohfraktionen aus LY631-Zellen um mehr als 50%. Diese Ergebnisse stellen einen weiteren Hinweis auf die funktionelle Kopplung zwischen dem CCK_B-Rezeptor und dem chimärischen Gα-Protein dar. Somit zeigt der in Hefe exprimierte Ratte-CCK_B-Rezeptor Eigenschaften einer hochaffinen Agonistenbindung, die mit den in Säugerorganen beobachteten vergleichbar sind.

[0102] Die Agonistenselektivität des CCK_B-Rezeptors blieb bei der Expression in Hefe erhalten. Es wurde ein selektiver und empfindlicher Biotest entwickelt, bei dem Hefestämme verwendet werden, die die oben beschriebenen genetischen Modifikationen sowie die Expression des CCK_B-Rezeptors und chimärischer Gα₁₂- und Gα_s-Proteine verleihende Plasmide tragen. Eine dosisabhängige Wachstumsreaktion von LY628- und LY631-Zellen war um das aufgetragene CCK-4 deutlich erkennbar (Fig. 19). Der Test war selektiv: der Durchmesser der Wachstumszonen war zur angegebenen Affinität der Liganden für den CCK_B-Rezeptor (CCK-8 > Gastrin > CCK-4) proportional, was die Fähigkeit des Biotests zur Unterscheidung zwischen Liganden mit unterschiedlicher Potency (5-8) widerspiegelt. Nachweisbare Wachstumsreaktionen wurden weder als Antwort auf verschiedene für andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren selektive Agonisten (Somatostatin, Metenkephalin, Oxymetazolin, Isoproterenol, Carbachol) noch für Hefezellen, denen der CCK_B-Rezeptor fehlt, beobachtet (Daten nicht gezeigt). Eine nachweisbare Reaktion wurde gegenüber 10 µg CCK-4 beobachtet.

DISKUSSION

[0103] An den CCK-Rezeptoren wirkende Verbindungen, insbesondere Antagonisten, können ein großes therapeutisches Potential besitzen (3). In der Peripherie machen die Hemmwirkungen von CCK-Antagonisten diese zu ausgezeichneten Kandidaten für die Behandlung von Pankreatitis, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Gallenkolik, Störungen der Magenentleerung und Reizcolon. Durch CCK-Antagonisten wird die Entwicklung einer Übersättigung aufgehoben, so daß sie sich zur Verbesserung des Appetits bei Patienten mit Anorexie oder anderen, bei denen eine erhöhte Nahrungsaufnahme erforderlich ist, eignen könnten. Umgekehrt könnten CCK-Agonisten als Appetitzügler geeignet sein. Durch CCK-Antagonisten wird auch die Opiatanalgesie potenziert, so daß sie sich zur Verwendung bei der Kontrolle klinischer Schmerzzustände eignen könnten. Im ZNS zeigen ausgewählte CCK-Antagonisten Potential als leistungsfähige Anxiolytika (9). Ferner lindern CCK-Antagonisten das mit dem Absetzen von Arzneimitteln assoziierte Angstgefühl und könnten somit eine Verwendung bei der Behandlung der Entziehung von allgemein mißbrauchten Arzneimitteln finden. CCK-Agonisten könnten als Antipsychotika eingesetzt werden.

IN DIESEM BEISPIEL ZITIERTER LITERATURSTELLEN

1. Ivy, A.C. und E. Oldberg. 1928. J. Physiol. (London) 86: 599-613.
2. Dockray, G.J.R. 1976. Immunochemical evidence of cholecystokinin-like peptides in brain. Nature 264: 568-570.

3. Woodruff, G.N. und J. Hughes. 1991. Cholecystokinin antagonists. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 31: 469-501.
4. Wank, S.A., R. Harkins, R.T. Jensen, H. Shapiro, A. de Weerth und T. Slattery. 1992. Purification, molecular cloning, and function expression of the cholecystokinin receptor from rat pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3125-3129.
5. Kopin, A.S., Y-M. Lee, E.W. McBride, L.J. Miller, M. Liu, H.Y. Lin, L.F. Kolakowski und M. Beinborn. 1992. Expression cloning and characterization of the canine parietal cell gastrin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3605-3609.
6. Wank, S.A., J.R. Pisenga und A. de Weerth. 1992. Brain and gastrointestinal cholecystokinin receptor family: Structure and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8691-8695.
7. Lee, Y-M., M. Beinborn, E.W. McBride, M. Lu, L.F. Kolakowski und A.S. Kopin. 1993. The human brain cholecystokinin-B/gastrin Receptor. *J. Biol. Chem.* 268: 8164-8169.
8. Ito, M., T. Matsui, T. Taniguchi, T. Tsukamoto, T. Murayama, N. Arima, H. Nakata, T. Chiba und K. Chibura. 1993. Functional characterization of a human brain cholecystokinin-B receptor. *J. Biol. Chem.* 268: 18300-18305.
9. Hughes, J., P. Boden, B. Costall, A. Domeney, E. Kelly, D.C. Horwell, J.C. Hunter, R.D. Pinnock und G.N. Woodruff. 1990. Development of a class of selective cholecystokinin type B receptor antagonists having potent anxiolytic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6728-6732.
10. Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, NY.
11. Price, L.A., E.M. Kajkowski, J.R. Hadcock, B.A. Ozenberger und M.H. Pausch. 1995. Yeast cell growth in response to agonist dependent activation of a mammalian somatostatin receptor. Eingereicht.
12. Rose, M., F. Winston und P. Hieter. 1990. *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, NY.
13. Blumer, K. J., J. E. Reneke und J. Thorner. 1988. The STE2 gene product is the ligand-binding component of the α -factor receptor of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 263: 10836-10842.
14. Strnad, J., C. M. Eppler, M. Corbett und J. R. Hadcock. 1993. The rat SST2 somatostatin receptor subtype is coupled to inhibition of cyclic AMP accumulation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 191: 968-976.
15. King, K., H. G. Dohlman, J. Thorner, M. G. Caron und R.J. Lefkowitz. 1990. Control of yeast mating signal transduction by a mammalian β_2 -adrenergic receptor and $G_s \alpha$ subunit. *Science* 250: 121-123.
16. Weiner, J. L., C. Gutierrez-Steil und K. J. Blumer. 1993. Disruption of receptor-G protein coupling in yeast promotes the function of an SST2-dependent adaptation pathway. *J. Biol. Chem.* 268: 8070-8077.

BEISPIEL 9

Funktionelle Expression eines Adenosinrezeptors A_{2a} der Ratte in Hefe

[0104] Adenosin wirkt ebenso wie ATP und verwandte purinerge Verbindungen sowohl als neurohormonales Agens als auch als den Vorgang der Kommunikation von Zelle zu Zelle steuerndes Autokoid (1). In dieser Rolle reguliert Adenosin eine große Bandbreite physiologischer Funktionen, einschließlich Herzschlagfrequenz und Kontraktilität, Tonus der glatten Muskulatur, Sedation, Freisetzung von Neurotransmittern, Blutplättchenfunktion, Lipolyse, Nierenfunktion und Funktion der weißen Blutkörperchen. Dabei werden die Adenosineffekte über die Wirkung von Zelloberflächenrezeptoren vermittelt, die sich unter Anwendung pharmakologischer Kriterien in drei Subtypen, nämlich A_1 , A_{2a} und A_{2b} sowie A_3 , klassifizieren lassen. Durch molekulare Klonierungsarbeiten konnten cDNAs identifiziert werden, die für G-Protein-gekoppelte A_1 - (2-5), A_{2a} - und A_{2b} - (6-9) und A_3 - (10) Adenosinrezeptoren codieren. Die funktionelle Expression von Adenosinrezeptoren in Hefe sollte ein schnelles Screening auf neue Verbindungen mit Adenosin-Agonisten- und -Antagonisteneigenschaften gestatten und die für die rationale Konstruktion neuer Adenosinliganden erforderliche molekulare Charakterisierung struktureller Aspekte des Adenosinrezeptors erleichtern.

MATERIAL UND METHODEN

[0105] Plasmidkonstruktionen. Alle molekularbiologischen Manipulationen wurden gemäß Standardverfahren (11) durchgeführt. Der Ratte- A_{2a} -Adenosinrezeptor (9) wurde von Rattenhirn-cDNA mittels PCR unter Verwendung von Oligonukleotidprimern, mit denen an den 5'- und 3'-Enden BamHI-Stellen eingeführt werden (5'-GAA-GATCTAAAAAATGGGCTCCTCGGTGTAC, 3'-ACATGCATGCAGATCTTCAGGAAGGGGCAAACCTC), kloniert. Das A_{2a} -Adenosinrezeptor-Expressionsplasmid pJH21 wurde konstruiert, indem das mit BglIII verdaute PCR-Fragment in der korrekten Orientierung in das mit BamHI geschnittene pMP3 (12) inseriert wurde. Zur konstitutiven Expression des A_{2a} -Adenosinrezeptors in glucosehaltigem Medium wurde der Expressionsvektor pLP100 konstruiert. Dabei wurden für Transkriptionsregulationssequenzen aus dem ADH1-Gen (&) codieren-

de DNA-Fragmente mittels PCR amplifiziert und in pRS426 inseriert. Ein ADH1-Transkriptionsterminatorfragment wurde aus genomischer Hefe-DNA (YPH501, Stratagene) unter Verwendung synthetischer Oligonukleotide, mit denen eine 5'-XhoI- (TTTCTCGAGCGAATTCTTATGATTT) und eine 3'-KpnI- (TTTGGTACCGGG-CCCGGACGGATTACAACAGGT) Stelle hinzugefügt wurden, amplifiziert. Ein ADH1-Promotorfragment wurde aus genomischer Hefe-DNA unter Verwendung synthetischer Oligonukleotide, mit denen eine 5'-SacI- (GG-GAGCTCTGATGGTGGTACATRACG) und eine 3'-BamHI- (GGGGGATCCTGTATATGAGATAGTTGA) Stelle hinzugefügt wurden, amplifiziert. Das A_{2a}-Adenosinrezeptor-Expressionsplasmid pLP116 wurde konstruiert, indem ein für den A_{2a}-Adenosinrezeptor codierendes und unter Verwendung von Oligonukleotiden, mit denen eine 5'-BglII- (AAAGATCTAAAATGGGCTCCTCGGTGTAC) und eine 3'-Sall- (AAGTCGACTCAGGAAGGGG-CAAACTC) Stelle hinzugefügt wurden, amplifiziertes PCR-Fragment in das mit BamHI und Sall geschnittene pLP100 inseriert wurde. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gα-Protein-Expressionsplasmide wurden konstruiert, indem für die 47 carboxyterminalen Aminosäuren von GPA1 codierende DNA-Sequenzen in pLP83 (12) durch solche für Gα_s (pLP122) und Gα_{i2} (pLP121) ersetzt wurden.

[0106] Stammkonstruktionen. Die Konstruktion der Hefestämme sowie die Formulierung der Wachstumsmedien und Kultivierungsbedingungen erfolgten nach Standardverfahren (13). Die DNA-vermittelte Hefetransformation wurde mit dem Lithiumacetatverfahren durchgeführt. Die als Grundlage für alle in diesem Bericht beschriebenen Experimente verwendeten Hefestämme wurden mittels sequentieller Insertionsdeletion unter Verwendung rekombinanter Allele konstruiert. Den Ratte-A_{2a}-Adenosinrezeptor exprimierende Hefestämme wurden mittels sequentieller DNA-vermittelter Transformation von LY296 (MATa ura3-52 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 ade2-101 lys2-801 gpa1ΔhisG far1ΔLYS2 FUS1-HIS3 sst2ΔADE2, Ref. 12) mit A_{2a}-Adenosinrezeptor-Expressionsplasmiden und danach mit den oben beschriebenen Gα-Protein-Expressionsplasmiden konstruiert.

[0107] Sättigungsbindungstests mit radioaktiv markiertem Agonisten. Hefemembranrohextrakte wurden von Kulturen in der späten log-Phase mittels Glasperlenlyse und Zentrifugation bei 40000 × g nach einem veröffentlichten Verfahren (14) präpariert. Der Proteingehalt der Membranrohfractionen wurde mit dem Biorad-Proteintestkit gemäß den Herstellerangaben gemessen. Radioligandenbindungstests wurden gemäß Strnad et al. (15) mit ³H-NECA (Amersham) ausgeführt. Als nichtspezifische Bindung wurde die in Gegenwart von 1 μM NECA beobachtete Bindung definiert. In aus Zellen ohne A_{2a}-Adenosinrezeptor hergestellten Membranfraktionen wurde eine vernachlässigbare spezifische Bindung beobachtet (Daten nicht gezeigt).

[0108] Biotest. Ein Funktionstest für den in Hefe exprimierten A_{2a}-Adenosinrezeptor wurde unter Verwendung einer Modifikation eines Standardverfahrens (12) ausgeführt. Dabei wurden Hefestämme über Nacht in 2 ml synthetischem komplettem Flüssigmedium mit Glucose (2%) und ohne Uracil und Tryptophan (SCD-ura-trp-Medium) angezogen, zur Entfernung von Glucoseresten gewaschen und über Nacht in 5 ml SC-Galactose (2%)-ura-trp-Flüssigmedium angezogen. Geschmolzenes (50 °C) SC-Galactose (2%)-ura-trp-his-Agarmedium (30 ml, durch Zugabe von konzentriertem KOH oder NH₄OH vor dem Autoklavieren auf pH 6,8 eingestellt) wurde mit der Übernachtskultur (2 × 10⁴ Zellen/ml) angeimpft und in quadratischen (9 × 9 cm) Petrischalen ausplattiert. Zur Expression des A_{2a}-Adenosinrezeptors in glucosehaltigem Medium wurden der ersten Übernachtskultur Proben entnommen und in wie oben zusammengesetztem Agarmedium mit Glucose (2%) statt Galactose getestet. Auf die Oberfläche des verfestigten Agars wurden sterile Filterscheibchen gelegt und mit 10 μl die angegebenen Mengen der genannten Verbindungen enthaltendem DMSO gesättigt. Die Platten wurden 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Adenosinliganden CGS-21680, NECA und DPMA wurden von RBI bezogen. Somatostatin (S-14) und Metenkephalin stammten von Bachem. Oxymetazolin, Iso-proterenol und Carbachol stammten von Sigma.

ERGEBNISSE

[0109] Bindung von Adenosin-Agonisten an den in Hefe exprimierten Ratte-A_{2a}-Adenosinrezeptor. Die funktionelle Expression des Ratte-A_{2a}-Adenosinrezeptors auf hohem Niveau in der Hefe war eine notwendige Voraussetzung für die Entwicklung eines sinnvollen Biotests. Dabei wurde im Plasmid pJH21 die Ratte-A_{2a}-Adenosinrezeptor-cDNA unter die Kontrolle des induzierbaren GAL1-Promotors gestellt. Mit diesem Konstrukt wird auch die induzierbare Überexpression von Gal4p, dem Transkriptionsaktivierungsprotein für galactoseinduzierbare Gene, verliehen, was zu deutlich erhöhten Niveaus an Rezeptorprotein in Membranrohfractionen im Vergleich zu einem von einem Plasmid ohne GAL4-Sequenzen exprimierten Rezeptor führt (Daten nicht gezeigt). Das Plasmid pLP116 verleiht eine konstitutive Expression des A_{2a}-Adenosinrezeptors auf hohem Niveau unter der Kontrolle des ADH1-Promotors. Bei beiden Plasmiden wurden für den A_{2a}-Adenosinrezeptor codierende DNA-Sequenzen ohne Modifikation der proteincodierenden Sequenzen eingeführt. Von King et al. wurde bereits berichtet, daß der Austausch der aminoterminalen Domäne des β₂-adrenergen Rezeptors gegen die äquivalente STE2-Sequenz für eine effiziente Rezeptorexpression in der Hefe notwendig war (16). Im Gegen-

satz dazu benötigt die funktionelle Expression des A_{2a} -Adenosinrezeptors in der Hefe keine Addition von Hefesequenzen an den Aminoterminal. Es wurde ein chimärisches $G\alpha$ -Protein, das sich aus der vorgeschlagenen aminoterminalen $\beta\gamma$ -Wechselwirkungsdomäne von Gpa1p und einer carboxyterminalen Rezeptorwechselwirkungsdomäne von Ratte- $G\alpha_s$ (pLP122) unter der Kontrolle des GPA1-Promotors zusammensetzt, konstruiert. Hefestämme, die exprimierten A_{2a} -Adenosinrezeptor sowie chimärisches $G\alpha$ -Protein enthalten, wurden durch Transformation eines durch die Deletion von für Komponenten des Paarungssignaltransduktionswegs codierenden Genen modifizierten Hefestamms (LY296) mit A_{2a} -Adenosinrezeptor- und $G\alpha$ -Protein-Expressionsplasmiden konstruiert.

[0110] Die meisten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zeigen jeweils agonistenabhängige hoch- und niedrigaffine Zustände. Die hochaffine Agonistenbindung hängt von der funktionellen Assoziation des Rezeptors mit einem heterotrimeren G-Protein ab. Falls der Rezeptor nicht mit dem G-Protein assoziiert oder von diesem entkoppelt ist, liegt eine niedrigaffine Agonistenbindung vor, die in Sättigungsbindungstests mit radioaktiv markiertem Agonisten nicht nachweisbar ist. In Hefe-Membranrohfraktionen aus pLP116 und pLP122 tragenden Zellen (LY626) band der Agonist 3H -NECA mit hoher Affinität und auf sättigbare Weise an den A_{2a} -Adenosinrezeptor ([Fig. 20](#)), womit demonstriert wurde, daß (1) eine funktionelle ligandenbindende Konformation des A_{2a} -Adenosinrezeptors in der Hefe exprimiert wurde und (2) der Rezeptor funktionell mit dem chimärischen $G\alpha$ -Protein unter Ausbildung eines hochaffinen Agonistenbindungszustands assoziiert war. Die Gesamtzahl an beobachteten 3H -NECA-Bindungsstellen ($B_{max} = 242$ fmol/mg) überschritt Werte, die für den α -Paarungspheromon-Rezeptor der Hefe erhalten worden waren (200 fmol/mg, Ref. 17). Die Affinität von [3H]-NECA für den A_{2a} -Adenosinrezeptor in Hefemembranen ($K_d = 8$ μM) ist mit der in Säugerzellen beobachteten gleichwertig, was auf eine funktionelle Kopplung zwischen Rezeptor und G-Protein hindeutet.

[0111] Die Agonistenselektivität des A_{2a} -Adenosinrezeptors blieb bei der Expression in Hefe erhalten. Es wurde ein selektiver und empfindlicher Biotest entwickelt, bei dem ein Hefestamm (LY595) verwendet werden, der die oben beschriebenen genetischen Modifikationen sowie die Expression des A_{2a} -Adenosinrezeptors (pLP116) und von GPA1 (pLP83) verleihende Plasmide trägt. Eine dosisabhängige Wachstumsreaktion von LY595-Zellen war um aufgetragenes CGS-21680, einem A_{2a} -Adenosinrezeptorselektiven Agonisten, deutlich erkennbar, wobei die Wachstumsreaktion deutlich stärker als die von auf NECA und DPMA reagierenden Zellen war ([Fig. 21](#)). Der Test war selektiv: der Durchmesser der Wachstumszonen war zur angegebenen Affinität der Liganden für den A_{2a} -Adenosinrezeptor (CGS-21680 > NECA = DPMA) proportional, was die Fähigkeit des Biotests zur Unterscheidung zwischen Liganden mit unterschiedlicher Potency widerspiegelt. Nachweisbare Wachstumsreaktionen wurden weder als Antwort auf verschiedene für andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren selektive Agonisten (Somatostatin, Metenkephalin, Oxymetazolin, Isoproterenol, Carbachol) noch für Hefezellen, denen der A_{2a} -Adenosinrezeptor fehlt, beobachtet (Daten nicht gezeigt). Eine nachweisbare Reaktion wurde gegenüber 10 μg CGS-21680 beobachtet.

DISKUSSION

[0112] Für Verbindungen, die die Funktion der Adenosinrezeptoren modulieren (1), gibt es viele therapeutische Anwendungsmöglichkeiten. Adenosin-Agonisten können bei der Behandlung epileptischer Anfälle und zur Verhinderung einer neuronalen Schädigung bei Schlaganfall und neurodegenerativen Erkrankungen geeignet sein. Die antidysrhythmische Wirkung von Adenosin läßt vermuten, daß Adenosin-Agonisten bei der Behandlung der Komplex-Tachykardie wirksam sein könnten. A_2 -Adenosin-Agonisten besitzen eine starke sedative, antikonvulsive und anxiolytische Aktivität. A_{2a} -Adenosin-selektive Agonisten können für die Stimulierung der Lipolyse in Fettgewebe geeignet sein, was ihnen eine Eignung als Therapien zur Gewichtsabnahme oder als Antidiabetika sowie bei der Verbesserung der Fleischqualität landwirtschaftlicher Nutztiere verleiht. A_1 -Adenosin-Antagonisten können bei der Behandlung von akuter Nierenfunktionsstörung geeignet sein. A_3 -Adenosin-Antagonisten können bei der Modulation der Mastzellen-Degranulierung zur Behandlung entzündlicher Erkrankungen, einschließlich Asthma, nützlich sein.

IN DIESEM BEISPIEL ZITIERTER LITERATURSTELLEN

1. Jacobsen, K.A., P.J.M. van Galen und M. Williams. 1992. Adenosine receptors: Pharmacology, structure-activity relationships, and therapeutic potential. *J. Med. Chem.* 35: 407-422.
2. Libert, F., S.N. Schiffmann, A. Lefort, M. Parmentier, C. Gerard, J.E. Dumont, J.-J. Vanderhaeghen und G. Vassart. 1991. The orphan receptor cDNA RDC7 encodes an A1 adenosine receptor. *EMBO J.* 10: 1677-1682.
3. Mahan, L.C., L.D. McVittie, E.M. Smyk-Randal, H. Nakata, F.J. Monsma, C.R. Green und D.R. Sibley. 1991. Cloning and expression of an A_1 adenosine receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.* 40: 1-7.
4. Olah, M.E., H. Ren, J. Ostrowski, K.A. Jacobsen und G.L. Stiles. 1992. Cloning, expression and characteri-

- zation of the unique bovine A₁ adenosine receptor. *J. Biol. Chem.* 267: 10764-10770.
5. Tucker, A.L., J. Linden, A.S. Robeva, D.D. D'angelo und K.R. Lynch. 1992. Cloning and expression of a bovine adenosine A₁ receptor cDNA. *FEBS Lett.* 297: 107-111.
 6. Maenhaut, C., J. van Sande, F. Libert, M. Abramowicz, M. Parmentier, J.-J. E. Dumont, G. Vassart und S. Schiffmann. 1990. RDC8 codes for an adenosine A₂ receptor with physiological constitutive activity. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 173: 1169-1178.
 7. Pierce, K.D., Furlong, T.J., L.A. Stehle und J. Shine. 1992. Molecular cloning and expression of an adenosine A_{2b} receptor from human brain. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 187: 86-93.
 8. Chern, Y., K. King, H.-L. Lai und H.-T. Lai. 1992. Molecular cloning of a novel adenosine receptor gene from rat brain. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 185: 304-309.
 9. Stehle, J.H., S.A. Rivkees, J.J. Lee, D.R. Weaver, J.D. Deeds und S.M. Reppert. 1992. Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A₂ adenosine receptor subtype. *Mol. Endocrinol.* 6: 384-393.
 10. Zhou, Q.-Y., C. Li, M.E. Olah, R.A. Johnson, G.L. Stiles und O. Civelli. 1992. Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: The A₃ adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7432-7436.
 11. Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, NY.
 12. Price, L.A., E.M. Kajkowski, J.R. Hadcock, B.A. Ozenberger und M.H. Pausch. 1995. Yeast cell growth in response to agonist dependent activation of a mammalian somatostatin receptor. Eingereicht.
 13. Rose, M., F. Winston und P. Hieter. 1990. *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, NY.
 14. Blumer, K. J., J. E. Reneke und J. Thorner. 1988. The STE2 gene product is the ligand-binding component of the α -factor receptor of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 263: 10836-10842.
 15. Strnad, J., C. M. Eppler, M. Corbett und J. R. Hadcock. 1993. The rat SSTR2 somatostatin receptor subtype is coupled to inhibition of cyclic AMP accumulation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 191: 968-976.
 16. King, K., H. G. Dohlman, J. Thorner, M. G. Caron und R.J. Lefkowitz. 1990. Control of yeast mating signal transduction by a mammalian β_2 -adrenergic receptor and G_s α subunit. *Science* 250: 121-123.
 17. Weiner, J. L., C. Gutierrez-Steil und K. J. Blumer. 1993. Disruption of receptor-G protein coupling in yeast promotes the function of an SST2-dependent adaptation pathway. *J. Biol. Chem.* 268: 8070-8077.

BEISPIEL 8

Funktionelle Expression eines Somatostatin-Subtyp-5-Rezeptors der Ratte in Hefe

[0113] Das zyklische Tetradecapeptid Somatostatin ist ein starker Inhibitor der Sekretion mehrerer Hormone, einschließlich Wachstumshormon aus der Hypophyse, Glucagon und Insulin aus der Bauchspeicheldrüse und Gastrin aus dem Darm. Somatostatin wirkt auch als Neurotransmitter, und es konnte gezeigt werden, daß es breite modulatorische Effekte im ZNS und in peripheren Geweben besitzt (1). Die Somatostatineffekte werden über die Bindung des Hormons an hochaffine, plasmamembranständige Somatostatinrezeptoren (SSTR) transduziert (2). Die in fünf verschiedenen Subtypen (SSTR1-5) codierten SSTR, was teilweise die gewebespezifischen Unterschiede in den Reaktionen auf Somatostatin erklärt (3-10), umfassen eine Unterfamilie der Superfamilie der Sieben-Transmembrandomänen-, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die Reaktionen auf eine breite Vielfalt extrazellulärer Signale vermittelt. Die funktionelle Expression von SSTR5 in Hefe sollte ein schnelles Screening auf neue subtypenselektive Somatostatin-Agonisten und Verbindungen mit Antagonisteneigenschaften gestatten und die für die rationale Konstruktion neuer Somatostatinliganden erforderliche molekulare Charakterisierung struktureller Aspekte des SSTR5 erleichtern.

MATERIAL UND METHODEN

[0114] Plasmidkonstruktionen. Alle molekularbiologischen Manipulationen wurden gemäß Standardverfahren (11) durchgeführt. Der Ratte-SSTR5 (7) wurde aus genomischer Ratten-DNA mittels PCR unter Verwendung von Oligonukleotidprimern, mit denen an den 5'- und 3'-Enden BglII-Stellen eingeführt werden (5'-AAAAA-GATCTAAAATGGAGCCCCTCTCTG, 3'-AGCAGATCTTCAGATCCCAGAAGACAAC), kloniert. Das SSTR5-Expressionsplasmid pJH19 wurde konstruiert, indem das mit BglII verdaute PCR-Fragment in der korrekten Orientierung in das mit BamHI geschnittene pMP3 (12) inseriert wurde. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten G α -Protein-Expressionsplasmide wurden konstruiert, indem für die 47 carboxyterminalen Aminosäuren von GPA1 codierende DNA-Sequenzen in pLP83 (12) durch solche für G α_s (pLP122) und G α_{12} (pLP121) ersetzt wurden.

[0115] Stammkonstruktionen. Die Konstruktion der Hefestämme sowie die Formulierung der Wachstumsmedien und Kultivierungsbedingungen erfolgten nach Standardverfahren (13). Die DNA-vermittelte Hefetransfor-

mation wurde mit dem Lithiumacetatverfahren durchgeführt. Die als Grundlage für alle in diesem Bericht beschriebenen Experimente verwendeten Hefestämme wurden mittels sequentieller Insertionsdeletion unter Verwendung rekombinanter Allele konstruiert. SSTR5 exprimierende Hefestämme wurden mittels sequentieller DNA-vermittelter Transformation von LY296 (MATa ura3-52 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 ade2-101 lys2-801 gpa1ΔhisG far1ΔLYS2 FUS1-HIS3 sst2ΔADE2, Ref. 12) mit pJH19 und danach mit den oben beschriebenen Gα-Protein-Expressionsplasmiden konstruiert.

[0116] Biotest. Ein Funktionstest für den in Hefe exprimierten SSTR5 wurde unter Verwendung einer Modifikation eines Standardverfahrens (12) ausgeführt. Dabei wurden Hefestämme über Nacht in 2 ml synthetischem komplettem Flüssigmedium mit Glucose (2%) und ohne Uracil und Tryptophan (SCD-ura-trp-Medium) angezogen, zur Entfernung von Glucoseresten gewaschen und über Nacht in 5 ml SC-Galactose (2%)-ura-trp-Flüssigmedium angezogen. Geschmolzenes (55 °C) SC-Galactose (2%)-ura-trp-his-Agarmedium (30 µl, durch Zugabe von konzentriertem KOH oder NH₄OH vor dem Autoklavieren auf pH 6,8 eingestellt) wurde mit der Übernachtskultur (2 × 10⁴ Zellen/ml) angeimpft und in quadratischen (9 × 9 cm) Petrischalen ausgeplattiert. Auf die Oberfläche des verfestigten Agars wurden sterile Filterscheibchen gelegt und mit 10 µl die angegebenen Mengen der genannten Verbindungen enthaltendem sterilem Wasser gesättigt. Die Platten wurden 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Somatostatin (S-14, S-28) und Metenkephalin sowie CCK-8 stammten von Bachem. Oxymetazolin, Isoproterenol und Carbachol stammten von Sigma.

ERGEBNISSE

[0117] Somatostatin-abhängige Wachstumsreaktion von den SSTR5 exprimierenden Hefezellen. Die funktionelle Expression des SSTR5 auf hohem Niveau in der Hefe war eine notwendige Voraussetzung für die Entwicklung eines sinnvollen Biotests. Dabei wurde im Plasmid pJH19 die SSTR5-cDNA unter die Kontrolle des induzierbaren GAL1-Promotors gestellt. Mit diesem Konstrukt wird auch die induzierbare Überexpression von Gal4p, dem Transkriptionsaktivierungsprotein für galactoseinduzierbare Gene, verliehen, was zu deutlich erhöhten Niveaus an Rezeptorprotein in Membranrohfraktionen im Vergleich zu einem von einem Plasmid ohne GAL4-Sequenzen exprimierten Rezeptor führt (Daten nicht gezeigt). SSTR5-Sequenzen wurden in pJH19 ohne Modifikation der proteincodierenden Sequenzen eingeführt. Von King et al. wurde bereits berichtet, daß der Austausch der aminoterminalen Domäne des β2-adrenergen Rezeptors gegen die äquivalente STE2-Sequenz für eine effiziente Rezeptorexpression in der Hefe notwendig war (15). Im Gegensatz dazu benötigt die funktionelle Expression von SSTR5 in der Hefe keine Addition von Hefesequenzen an den Aminoterminus. Es wurde ein chimärisches Gα-Protein, das sich aus der vorgeschlagenen aminoterminalen β2-Wechselwirkungsdomäne von Gpa1p und einer carboxyterminalen Rezeptorwechselwirkungsdomäne von Ratte-Gq₁₂ (pLP121) unter der Kontrolle des GPA1-Promotors zusammensetzt, konstruiert. Ein Hefestamm (LY620), der exprimierten SSTR5 sowie chimärisches Gα-Protein enthält, wurde durch Transformation eines durch die Deletion von für Komponenten des Paarungssignaltransduktionswegs codierenden Genen modifizierten Hefestamms (LY296) mit SSTR5- (pJH19) und Gα-Protein-Expressionsplasmiden (pLP121) konstruiert. Eine dosisabhängige Wachstumsreaktion von LY620-Zellen war um das aufgetragene S-14 herum deutlich erkennbar ([Fig. 22](#)). Nachweisbare Wachstumsreaktionen wurden weder als Antwort auf verschiedene für andere G-Proteingekoppelte Rezeptoren selektive Agonisten (CCK 8, Metenkephalin, Oxymetazolin, Isoproterenol, Carbachol) noch für Hefezellen, denen der SSTR5 fehlt, beobachtet (Daten nicht gezeigt). Eine nachweisbare Reaktion wurde gegenüber 60 nmol S-14 beobachtet.

IN DIESEM BEISPIEL ZITIERTER LITERATURSTELLEN

1. Brazeau, P., W. Vale, R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, J. Rivier und R. Guillemin. 1973. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 129: 77-79.
2. Raisine, T. und G. I. Bell. 1993. Molecular biology of somatostatin receptors. *Trends Neurosci.* 16: 34-38.
3. Meyerhof, W., H.-J. Paust, C. Schonrock und D. Richter. 1991. Cloning of a cDNA encoding a novel putative G protein-coupled receptor expressed in specific rat brain regions. *DNA Cell Biol.* 10: 689-694.
4. Bruno, J. F., Y. Xu, J. Song und M. Berelowitz. 1992. Molecular cloning and functional expression of a brain specific somatostatin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11151-11155.
5. Kluxen, F.-W., C. Bruns und H. Lubbert. 1992. Expression cloning of a rat brain somatostatin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4618-4622.
6. Li, X.-J., M. Forte, R. A. North, C. A. Ross und S. H. Snyder. 1992. Cloning and expression of a rat somatostatin receptor enriched in brain. *J. Biol. Chem.* 267: 21307-21312.
7. O'Carroll, A.-M., S. J. Lolait, M. König und L. Mahan. 1992. Molecular cloning and expression of a pituitary somatostatin receptor with preferential affinity for somatostatin-28. *Mol. Pharmacol.* 42: 939-946.
8. Yasuda, K., S. Rens-Domiano, C. D. Breder, S. F. Law, C. B. Saper, T. Reisine und G. I. Bell. 1992. Cloning

- of a novel somatostatin receptor, SSTR3, coupled to adenylylcyclase. *J. Biol. Chem.* 267 (28): 20422-20428.
9. Yamada, Y., S. R. Post, K. Wang, H. S. Tager, G. I. Bell und S. Seino. 1992. Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 251-255.
10. Strnad, J., C. M. Eppler, M. Corbett and J. R. Hadcock. 1993. The rat SSTR2 somatostatin receptor subtype is coupled to inhibition of cyclic AMP accumulation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 191: 968-976.
11. Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, NY.
12. Price, L.A., E.M. Kajkowski, J.R. Hadcock, B.A. Ozenberger und M.H. Pausch. 1995. Yeast cell growth in response to agonist dependent activation of a mammalian somatostatin receptor. Eingereicht.
13. Rose, M., F. Winston und P. Hieter. 1990. *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, NY.
14. Blumer, K. J., J. E. Reneke und J. Thorner. 1988. The STE2 gene product is the ligand-binding component of the α -factor receptor of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 263: 10836-10842.
15. King, K., H. G. Dohlman, J. Thorner, M. G. Caron und R.J. Lefkowitz. 1990. Control of yeast mating signal transduction by a mammalian β_2 -adrenergic receptor and $G\alpha$ subunit. *Science* 250: 121-123.
16. Weiner, J. L., C. Gutierrez-Steil und K. J. Blumer. 1993. Disruption of receptor-G protein coupling in yeast promotes the function of an SST2-dependent adaptation pathway. *J. Biol. Chem.* 268: 8070-8077.

Beispiel 10

Funktionelle Expression des Somatostatin-Subtyp-2-Rezeptors (SSTR2) des Schweins in Hefe

[0118] Das zyklische Tetradecapeptid Somatostatin ist ein starker Inhibitor der Sekretion mehrerer Hormone, einschließlich Wachstumshormon aus der Hypophyse, Glucagon und Insulin aus der Bauchspeicheldrüse und Gastrin aus dem Darm. Somatostatin wirkt auch als Neurotransmitter, und es konnte gezeigt werden, daß es breite modulatorische Effekte im ZNS und in peripheren Geweben besitzt (1). Die Somatostatineffekte werden über die Bindung des Hormons an hochaffine, plasmamembranständige Somatostatinrezeptoren (SSTR) transduziert (2). Die in fünf verschiedenen Subtypen (SSTR1-5) codierten SSTR, was teilweise die gewebespezifischen Unterschiede in den Reaktionen auf Somatostatin erklärt (3-11), umfassen eine Unterfamilie der Superfamilie der Sieben-Transmembrandomänen-, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die Reaktionen auf eine breite Vielfalt extrazellulärer Signale vermittelt. Die funktionelle Expression von Schwein-SSTR2 in Hefe sollte ein schnelles Screening auf neue subtypenselektive Somatostatin-Agonisten und Verbindungen mit Antagonisteneigenschaften gestatten und die für die rationale Konstruktion neuer Somatostatinliganden erforderliche molekulare Charakterisierung struktureller Aspekte des Schwein-SSTR2 erleichtern. In Screens mit hohem Durchsatz auf Mechanismusbasis identifizierte Verbindungen stellen Anhaltspunkte für neue wachstumsverbessernde Agentien zur Verwendung in Schweinen dar.

MATERIAL UND METHODEN

[0119] Plasmidkonstruktionen. Alle molekularbiologischen Manipulationen wurden gemäß Standardverfahren (12) durchgeführt. Der Schwein-SSTR2 (11) wurde aus einer cDNA-Bank von menschlichem Gehirn mittels PCR unter Verwendung von Oligonukleotidprimern, mit denen an den 5'- und 3'-Enden BglII-Stellen eingeführt werden (5'-AAAAGATCTAAATGTCCATTCCATTTGAC, 3'-AAAAGGTACCAGATCTTCAGATACTGGTTTGAG), kloniert. Das Schwein-SSTR2-Expressionsplasmid pJH18 wurde konstruiert, indem das mit BglII verdaute PCR-Fragment in der korrekten Orientierung in das mit BamHI geschnittene pMP3 (13) inseriert wurde.

[0120] Stammkonstruktionen. Die Konstruktion der Hefestämme sowie die Formulierung der Wachstumsmedien und Kultivierungsbedingungen erfolgten nach Standardverfahren (14). Die DNA-vermittelte Hefetransformation wurde mit dem Lithiumacetatverfahren durchgeführt. Die als Grundlage für alle in diesem Bericht beschriebenen Experimente verwendeten Hefestämme wurden mittels sequentieller Insertionsdeletion unter Verwendung rekombinanter Allele konstruiert. Den Schwein-SSTR2 exprimierende Hefestämme wurden mittels sequentieller DNA-vermittelter Transformation von LY296 (MATa ura3-52 trp1 Δ 63 his3 Δ 200 leu2 Δ 1 ade2-101 lys2-801 gpa1 Δ hisG far1 Δ LYS2 FUS1-HIS3 sst2 Δ ADE2, Ref. 13) mit dem chimärischen $G\alpha_{12}$ -Protein-Expressionsplasmid pLP82 (13) und danach mit pJH18 oder pJH17 konstruiert.

[0121] Sättigungsbindungstests mit radioaktiv markiertem Agonisten. Hefemembranrohextrakte wurden von Kulturen in der späten log-Phase mittels Glasperlenlyse und Zentrifugation bei 40000 $\times$ g nach einem veröffentlichten Verfahren (15) präpariert. Der Proteingehalt der Membranrohfractionen wurde mit dem Biorad-Proteintestkit gemäß den Herstellerangaben gemessen. Radioligandenbindungstests wurden gemäß Strnad et al.

(10) mit radioaktiv markiertem Somatostatin (^{125}I -tyr¹¹-S-14, Amersham) ausgeführt. Als nicht-spezifische Bindung wurde die in Gegenwart von 1 μM S-14 beobachtete Bindung definiert. In aus Zellen ohne Schwein-SSTR2 hergestellten Membranfraktionen wurde eine vernachlässigbare spezifische Bindung beobachtet (Daten nicht gezeigt).

[0122] Biotest. Ein Funktionstest für den in Hefe exprimierten Schwein-SSTR2 wurde unter Verwendung einer Modifikation eines Standardverfahrens (13) ausgeführt. Dabei wurden Hefestämme über Nacht in 2 ml synthetischem komplettem Flüssigmedium mit Glucose (2%) und ohne Uracil und Tryptophan (SCD-ura-trp-Medium) angezogen, zur Entfernung von Glucoseresiden gewaschen und über Nacht in 5 ml SC-Galactose (2%)-ura-trp-Flüssigmedium angezogen. Geschmolzenes (55 °C) SC-Galactose (2%)-ura-trp-his-Agarmedium (30 ml, durch Zugabe von konzentriertem KOH oder NH_4OH vor dem Autoklavieren auf pH 6,8 eingestellt) wurde mit der Übernachtskultur (2×10^4 Zellen/ml) angeimpft und in quadratischen (9 × 9 cm) Petrischalen ausgeplattiert. Auf die Oberfläche des verfestigten Agars wurden sterile Filterscheibchen gelegt und mit 10 μl die angegebenen Mengen der genannten Verbindungen enthaltendem sterilem Wasser gesättigt. Die Platten wurden 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Somatostatin (S-14, S-28) und Metenkephalin stammten von Bachem. Oxymetazolin, Isoproterenol und Carbachol stammten von Sigma. MK678 und Sandostatin wurden synthetisiert.

ERGEBNISSE

[0123] Bindung von Somatostatin an den in Hefe exprimierten Schwein-SSTR2-Rezeptor. Die funktionelle Expression des Schwein-SSTR2-Rezeptors auf hohem Niveau in der Hefe war eine notwendige Voraussetzung für die Entwicklung eines sinnvollen Biotests. Dabei wurde im Plasmid pJH17 und 18 die Schwein-SSTR2-cDNA unter die Kontrolle des GAL1-Promotors gestellt. Mit diesen Konstrukten wird auch die induzierbare Überexpression von Gal4p, dem Transkriptionsaktivierungsprotein für galactoseinduzierbare Gene, verliehen, was zu deutlich erhöhten Niveaus an Rezeptorprotein in Membranrohfraktionen im Vergleich zu einem von einem Plasmid ohne GAL4-Sequenzen exprimierten Rezeptor führt (Daten nicht gezeigt). Die Schwein-SSTR2-Rezeptor-Sequenzen wurden in pJH18 ohne Modifikation der proteincodierenden Sequenzen eingeführt. Von King et al. wurde bereits berichtet, daß der Austausch der aminoterminalen Domäne des β_2 -adrenergen Rezeptors gegen die äquivalente STE2-Sequenz für eine effiziente Rezeptorexpression in der Hefe notwendig war (16). Im Gegensatz dazu benötigt die funktionelle Expression des Schwein-SSTR2-Rezeptors in der Hefe keine Addition von Hefesequenzen an den Aminoterminus. Es wurde ein chimärisches G_α -Protein, das sich aus der vorgeschlagenen aminoterminalen $\beta\gamma$ -Wechselwirkungsdomäne von Gpa1p und einer carboxyterminalen Rezeptorwechselwirkungsdomäne von Ratte- $\text{G}\alpha_{12}$ (pLP82) unter der Kontrolle des GPA1-Promotors zusammensetzt, konstruiert. Hefestämme, die exprimierten Schwein-SSTR2 sowie chimärisches G_α -Protein enthalten, wurden durch Transformation eines durch die Deletion von für Komponenten des Paarungssignaltransduktionswegs codierenden Genen modifizierten Hefestamms (LY296) mit Expressionsplasmiden für Schwein-SSTR2 (pJH17, pJH18) und G_α -Protein (pLP82) konstruiert.

[0124] Die meisten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zeigen jeweils agonistenabhängige hoch- und niedrigaffine Zustände. Die hochaffine Agonistenbindung hängt von der funktionellen Assoziation des Rezeptors mit einem heterotrimeren G-Protein ab. Falls der Rezeptor nicht mit dem G-Protein assoziiert oder von diesem entkoppelt ist, liegt eine niedrigaffine Agonistenbindung vor, die in Sättigungsbindungstests mit radioaktiv markiertem Agonist ^{125}I -tyr¹¹-S-14 mit hoher Affinität und auf sättigbare Weise an den Schwein-SSTR2, womit demonstriert wurde, daß (1) eine funktionelle 1igandenbindende Konformation des Schwein-SSTR2 in der Hefe exprimiert wurde und (2) der Rezeptor funktionell mit dem chimärischen G_α -Protein unter Ausbildung eines hochaffinen Agonistenbindungszustands assoziiert war. Die Gesamtzahl an beobachteten ^{125}I -tyr¹¹-S-14-Bindungsstellen ($B_{\text{max}} = 146 \text{ fmol/mg}$) stand im Einklang mit Werten, die für den α -Paarungsspheromon-Rezeptor der Hefe erhalten worden waren (200 fmol/mg, Ref. 17).

[0125] Die Agonistenselektivität des Schwein-SSTR2 blieb bei der Expression in Hefe erhalten. Es wurde ein selektiver und empfindlicher Biotest entwickelt, bei dem ein Hefestamm (LY474) verwendet wird, der die oben beschriebenen genetischen Modifikationen sowie die Expression des Schwein-SSTR2 (pJH18) und eines chimärischen Gpa1- $\text{G}\alpha_{12}$ -Proteins (pLP82) verleihende Plasmide trägt. Eine dosisabhängige Wachstumsreaktion von LY474-Zellen war um aufgetragenes S-14, MK678 und Sandostatin deutlich erkennbar ([Fig. 23](#)). Der Test war selektiv: der Durchmesser der Wachstumszonen war zur angegebenen Affinität der Liganden für den Schwein-SSTR2 (S-14=MK678>Sandostatin) proportional, was die Fähigkeit des Biotests zur Unterscheidung zwischen Liganden mit unterschiedlicher Potency widerspiegelt (18). Nachweisbare Wachstumsreaktionen wurden weder als Antwort auf verschiedene für andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren selektive Agonisten (Metenkephalin, Oxymetazolin, Isoproterenol, Carbachol) noch für Hefezellen, denen der Schwein-SSTR2

fehlt, beobachtet (Daten nicht gezeigt). Eine nachweisbare Reaktion wurde gegenüber nur 60 pmol S-14 beobachtet, wodurch die außerordentliche Empfindlichkeit des Biotests veranschaulicht wird.

IN DIESEM BEISPIEL ZITIERTER LITERATURSTELLEN

1. Brazeau, P., W. Vale, R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, J. Rivier und R. Guillemin. 1973. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 129: 77-79.
2. Reisine, T. und G. I. Bell. 1993. Molecular biology of somatostatin receptors. *Trends Neurosci.* 16: 34-38.
3. Meyerhof, W., H.-J. Paust, C. Schonrock und D. Richter. 1991. Cloning of a cDNA encoding a novel putative G protein-coupled receptor expressed in specific rat brain regions. *DNA Cell Biol.* 10: 689-694.
4. Bruno, J. F., Y. Xu, J. Song und M. Berelowitz. 1992. Molecular cloning and functional expression of a brain specific somatostatin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11151-11155.
5. Kluxen, F.-W., C. Bruns und H. Lobbert. 1992. Expression cloning of a rat brain somatostatin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4618-4622.
6. Li, X.-J., M. Forte, R. A. North, C. A. Ross und S. H. Snyder. 1992. Cloning and expression of a rat somatostatin receptor enriched in brain. *J. Biol. Chem.* 267: 21307-21312.
7. O'Carroll, A.-M., S. J. Lolait, M. König und L. Mahan. 1992. Molecular cloning and expression of a pituitary somatostatin receptor with preferential affinity for somatostatin-28. *Mol. Pharmacol.* 42: 939-946.
8. Yasuda, K., S. Rens-Domiano, C. D. Breder, S. F. Law, C. B. Saper, T. Reisine und G. I. Bell. 1992. Cloning of a novel somatostatin receptor, SSTR3, coupled to adenylylcyclase. *J. Biol. Chem.* 267 (28): 20422-20428.
9. Yamada, Y., S. R. Post, K. Wang, H. S. Tager, G. I. Bell und S. Seino. 1992. Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 251-255.
10. Strnad, J., C. M. Eppler, M. Corbett und J. R. Hadcock. 1993. The rat SSTR2 somatostatin receptor subtype is coupled to inhibition of cyclic AMP accumulation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 191: 968-976.
11. Matsumoto, K., Y. Yokogoshi, Y. Fujinaka, C. Z. Xiang und S. Saito. 1994. Molecular cloning and sequencing of porcine somatostatin receptor 2. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 199: 298-305.
12. Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, NY.
13. Price, L.A., E.M. Kajkowski, J.R. Hadcock, B.A. Ozenberger und M.H. Pausch. 1995. Yeast cell growth in response to agonist dependent activation of a mammalian somatostatin receptor. Eingereicht.
14. Rose, M., F. Winston und P. Hieter. 1990. *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, NY.
15. Blumer, K. J., J. E. Reneke und J. Thorner. 1988. The STE2 gene product is the ligand-binding component of the α -factor receptor of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 263: 10836-10842.
16. King, K., H. G. Dohlman, J. Thorner, M. G. Caron und R.J. Lefkowitz. 1990. Control of yeast mating signal transduction by a mammalian β_2 -adrenergic receptor and G_s α subunit. *Science* 250: 121-123.
17. Weiner, J. L., C. Gutierrez-Steil und K. J. Blumer. 1993. Disruption of receptor-G protein coupling in yeast promotes the function of an SST2-dependent adaptation pathway. *J. Biol. Chem.* 268: 8070-8077.
18. Marbach, P., W. Bauer und U. Briner. 1988. Structure-function relationships of somatostatin analogs. *Horm. Res.* 29: 54-58.

BEISPIEL 11

Die Empfindlichkeit der Antwort gegenüber Agonisten wird durch die Deletion von MSG5 erhöht.

[0126] Die Reaktionsfähigkeit eines Signaltransduktionssystems gegenüber einem Dauerreiz nimmt mit der Zeit ab. Dieses Phänomen, das unter dem Namen Desensibilisierung oder Adaption bekannt ist, ist ein allgemeines Kennzeichen eines Signalantwortsystems. Für den Paarungssignaltransduktionsweg der Hefe wurden mehrere molekulare Mechanismen für die Adaption beschrieben (1). Mutationen im SST2-Gen vermitteln Adaptionsdefekte sowie eine erhöhte Paarungspheromonempfindlichkeit (2,3). Die Reaktion von den Ratte-SSTR2 funktionell exprimierenden Hefezellen auf appliziertes Somatostatin ist in sst2-Mutantenzellen stark erhöht (4). Man würde erwarten, daß Mutationen in anderen Genen, deren Produkte eine Rolle bei der Adaptionsantwort spielen, ähnliche Effekte hervorrufen. Durch Mutationen im MSG5-Gen, das für eine putative Protein-Tyrosinphosphatase codiert, wird die Empfindlichkeit gegenüber Paarungspheromon stark erhöht (5). In der vorliegenden Arbeit führt die Deletion von MSG5 in den Ratte-SSTR2 exprimierenden Zellen zu einem starken Anstieg der Empfindlichkeit gegenüber Somatostatin. Der Effekt der MSG5-Mutation ist bei einer SST2-Deletionsmutation additiv. Die sst2-msg5-Doppelmutantenzellen bilden die Grundlage für einen äußerst empfindlichen Biotest auf Verbindungen, die mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und G-Proteinen wechselwirken.

MATERIAL UND METHODEN

[0127] Stammkonstruktionen. Alle molekularbiologischen Manipulationen wurden gemäß Standardverfahren (6) durchgeführt. Die Konstruktion der Hefestämme sowie die Formulierung der Wachstumsmedien und Kultivierungsbedingungen erfolgten nach Standardverfahren (7). Die DNA-vermittelte Hefetransformation wurde mit dem Lithiumacetatverfahren durchgeführt. Die in diesen Experimenten beschriebenen Hefestämme wurden unter Verwendung des rekombinanten msg5ΔLeu2-Allels in pS/PDel und Multikopien-YEpMSG5 (5) konstruiert. Veränderte MSG5-Niveaus tragende Hefestämme wurden über DNA-vermittelte Hefetransformation von LY268 (MATa ura3-52 trp1D63 his3D200 leu2D1 ade2-101 lys2-801 gpa1ΔhisG far1ΔLYS2 FUS1-HIS3 sst2ΔADE2, pJH2, pLP82) unter Erhalt von MPY459 (LY268 msg5ΔLeu2 sst2ΔADE2) und MPY467 (LY268 YEpMSG5) sowie von LY288 (LY268 SST2) unter Erhalt von MPY458 (LY288 msg5ΔLeu2 SST2) und MPY466 (LY288 YEpMSG5) konstruiert (4).

[0128] Biotest. Ein Funktionsbiotest für den in Hefe exprimierten Ratte-SSTR2 wurde unter Verwendung einer Modifikation eines Standardverfahrens (4) ausgeführt. Dabei wurden Hefestämme über Nacht in 2 ml synthetischem komplettem Flüssigmedium mit Glucose (2%) und ohne Uracil, Tryptophan und Leucin (SCD-ura-trp-leu-Medium) angezogen, zur Entfernung von Glucoseresten gewaschen und über Nacht in 5 ml SC-Galactose (2%)-ura-trp-leu-Flüssigmedium angezogen. Geschmolzenes (55 °C) SC-Galactose (2%)-ura-trp-leu-his-Agarmedium (35 ml, durch Zugabe von konzentriertem NH₄OH vor dem Autoklavieren auf pH 6,8 eingestellt) wurde mit der Übernachtskultur (2 × 10⁴ Zellen/ml) angeimpft und in quadratischen (9 × 9 cm) Petrischalen ausplattiert. Auf die Oberfläche des verfestigten Agars wurden sterile Filterscheibchen gelegt und mit 10 µl die angegebenen Mengen des Somatostatins (S-14) enthaltendem sterilem Wasser gesättigt. Die Platten wurden 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Somatostatin (S-14) stammte von Bachem.

ERGEBNISSE

[0129] Die Empfindlichkeit gegenüber Ligand wird durch Deletion von MSG5 gesteigert. Die Effekte von Änderungen in der Expression des MSG5-Genprodukts wurden analysiert, indem die Wachstumsreaktion von den Ratte-SSTR2 exprimierenden Zellen gegenüber S-14 verglichen wurde ([Fig. 24](#)). Man würde erwarten, daß Mutationen, durch die die MSG5-Adaptionsfunktion aufgehoben wird, zu einer erhöhten Empfindlichkeit des Biotests gegenüber aufgetragenem S-14 führt, während die Überexpression von MSG5 die Wachstumsreaktion abschwächen sollte. Wie erwartet wurde bei LY288 (SST2 MSG5) eine dosisabhängige Wachstumsreaktion gegenüber aufgetragenem S-14 beobachtet. In Übereinstimmung mit den Erwartungen führt die Deletion des MSG5-Gens in MPY458 zu einer wesentlichen Verbesserung der Empfindlichkeit des Biotests. Die Wachstumsreaktion von MPY458 ist mit der von LY268 (sst2ΔADE2, MSG5) gezeigten vergleichbar. Bei der Doppelmutante MPY459 (msg5ΔLeu2 sst2ΔADE2), die eine weitere Verbesserung der Wachstumsreaktion zeigte, wurden die Effekte von Mutationen in beiden Genen beobachtet. Durch die Überexpression von MSG5 in SST2- (MPY466) und sst2ΔADE2- (MPY467) Stämmen wurde die Wachstumsreaktion stark reduziert.

IN DIESEM BEISPIEL ZITIERTER LITERATURSTELLEN

1. Sprague, G. F. und J. W. Thorner. 1992. Pheromone response and signal transduction during the mating process of *Saccharomyces cerevisiae*, 657-744. In J. R. Pringle, E. W. Jones and J. R. Broach, Gene expression, 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
2. Chan, R. K. und C. A. Otte. 1982. Isolation and genetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutants supersensitive to G1 arrest by α factor and a factor pheromones. *Mol. Cell. Biol.* 2: 11-20.
3. Chan, R. K. und C. A. Otte. 1982. Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants supersensitive to G1 arrest by α factor and a factor pheromones. *Mol. Cell. Biol.* 2: 21-29.
4. Price, L.A., E.M. Kajkowski, J.R. Hadcock, B.A. Ozenberger und M.H. Pausch. 1995. Yeast cell growth in response to agonist dependent activation of a mammalian somatostatin receptor. Eingereicht.
5. Doi, K., A. Gartner, G. Ammerer, B. Errede, H. Shinkawa, K. Sugimoto und K. Matsumoto. 1994. MSG5, a novel protein phosphatase promotes adaptation to pheromone response in *S. cerevisiae*. *EMBO J.* 13: 61-70.
6. Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, NY.
7. Rose, M., F. Winston und P. Hieter. 1990. *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, NY.

Funktionelle Expression eines menschlichen GRF (Growth Hormone Release Factor) -Rezeptors in Hefe

[0130] Bei dem GRF (Growth Hormone Release Factor) handelt es sich um einen starken Stimulator der Sekretion von Wachstumshormon aus der Hypophyse (1). Die GRF-Effekte werden über die Bindung des Hormons an hochaffine, plasmamembranständige GRF-Rezeptoren transduziert. Der GRF-Rezeptor sowie verwandte Rezeptoren der Secretin-Klasse bilden eine Unterfamilie der Superfamilie der Sieben-Transmembrandomänen-, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die Reaktionen auf eine breite Vielfalt extrazellulärer Signale vermittelt, und zeichnen sich durch das Vorhandensein einer großen aminoterminalen Ligandenbindungsdomäne aus (2). Die funktionelle Expression des menschlichen GRF-Rezeptors (3) in Hefe sollte ein schnelles Screening auf neue speziesspezifische Agonisten gestatten und die für die rationale Konstruktion neuer Liganden des GRF-Rezeptors erforderliche molekulare Charakterisierung erleichtern. GRF-Agonisten repräsentieren eine neue Klasse wachstumsfördernder Agentien zur Verwendung in landwirtschaftlichen Nutztieren und könnten eine therapeutische Anwendung beim Menschen bei der Kontrolle des Wachstums von kleinwüchsigen Kindern finden.

MATERIAL UND METHODEN

[0131] Plasmidkonstruktionen. Alle molekularbiologischen Manipulationen wurden gemäß Standardverfahren (4) durchgeführt. Der menschliche GRF-Rezeptor (3) wurde aus einer cDNA-Bank von menschlichem Gehirn mittels PCR unter Verwendung von Oligonukleotidprimern, mit denen an den 5'- und 3'-Enden BamHI-Stellen eingeführt werden (5'-ATAGGATCCAAATGGACCGCCGGATGTGGGGG, 3'-ATATGGATCCCTAGCACATAGATGTCAG), kloniert. Das GRF-Rezeptor-Expressionsplasmid pJH25 wurde konstruiert, indem das mit BamHI verdaute PCR-Fragment in der korrekten Orientierung in das mit BamHI geschnittene pMP3 (5) inseriert wurde. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten G_{α} -Protein-Expressionsplasmide wurden konstruiert, indem für die 47 carboxyterminalen Aminosäuren von GPA1 codierende DNA-Sequenzen in pLP83 (12) durch solche für G_{α_s} (pLP122) ersetzt wurden.

[0132] Stammkonstruktionen. Die Konstruktion der Hefestämme sowie die Formulierung der Wachstumsmedien und Kultivierungsbedingungen erfolgten nach Standardverfahren (6). Die DNA-vermittelte Hefetransformation wurde mit dem Lithiumacetatverfahren durchgeführt. Die als Grundlage für alle in diesem Bericht beschriebenen Experimente verwendeten Hefestämme wurden mittels sequentieller Insertionsdeletion unter Verwendung rekombinanter Allele konstruiert. Den menschlichen GRF-Rezeptor exprimierende Hefestämme wurden mittels sequentieller DNA-vermittelter Transformation von LY296 (MATa ura3-52 trp1 Δ 63 his3 Δ 200 leu2 Δ 1 ade2-101 lys2-801 gpa1 Δ hisG far1 Δ LYS2 FUS1-HIS3 sst2 Δ ADE2, Ref. 5) mit pJH25 und danach mit dem chimärischen G_{α_s} -Protein-Expressionsplasmid pLP122 (5) konstruiert.

[0133] Biotest. Ein Funktionstest für den in Hefe exprimierten menschlichen GRF-Rezeptor wurde unter Verwendung einer Modifikation eines Standardverfahrens (5) ausgeführt. Dabei wurden Hefestämme über Nacht in 2 ml synthetischem komplettem Flüssigmedium mit Glucose (2%) und ohne Uracil und Tryptophan (SCD-ura-trp-Medium) angezogen, zur Entfernung von Glucoseresten gewaschen und über Nacht in 5 ml SC-Galactose (2%)-ura-trp-Flüssigmedium angezogen. Geschmolzenes (55 °C) SC-Galactose (2%)-ura-trp-his-Agarmedium (30 ml, durch Zugabe von konzentriertem KOH oder NH_4OH vor dem Autoklavieren auf pH 6,8 eingestellt) wurde mit der Übernachtskultur (2×10^4 Zellen/ml) angeimpft und in quadratische (9 x 9 cm) Petrischalen gegossen. Auf die Oberfläche des verfestigten Agars wurden sterile Filterscheibchen gelegt und mit 10 μ l die angegebenen Mengen der genannten Verbindungen enthaltendem sterilem Wasser gesättigt. Die Platten wurden 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Menschlicher GRF (hGRF (1-29)- NH_2), (D-ala²)-hGRF (1-29)- NH_2 und Metenkephalin stammten von Bachem. Oxymetazolin, Isoproterenol und Carbachol stammten von Sigma.

ERGEBNISSE

[0134] Bindung von GRF an den in Hefe exprimierten menschlichen GRF-Rezeptor. Die funktionelle Expression des menschlichen GRF-Rezeptors auf hohem Niveau in der Hefe war eine notwendige Voraussetzung für die Entwicklung eines sinnvollen Biotests. Dabei wurde im Plasmid pJH25 die GRF-Rezeptor-cDNA unter die Kontrolle des GAL1-Promotors gestellt. Mit diesen Konstrukten wird auch die induzierbare Überexpression von Gal4p, dem Transkriptionsaktivierungsprotein für galactoseinduzierbare Gene, verliehen, was zu deutlich erhöhten Niveaus an Rezeptorprotein in Membranrohfraktionen im Vergleich zu einem von einem Plasmid ohne GAL4-Sequenzen exprimierten Rezeptor führt (Daten nicht gezeigt). Die GRF-Rezeptor-Sequenzen wurden in

pJH25 ohne Modifikation der proteincodierenden Sequenzen eingeführt. Von King et al. wurde bereits berichtet, daß der Austausch der aminoterminalen Domäne des β_2 -adrenergen Rezeptors gegen die äquivalente STE2-Sequenz für eine effiziente Rezeptorexpression in der Hefe notwendig war (9). Im Gegensatz dazu benötigt die funktionelle Expression des GRF-Rezeptors in der Hefe keine Addition von Hefesequenzen an den Aminoterminus. Es wurde ein chimärisches $G\alpha$ -Protein, das sich aus der vorgeschlagenen aminoterminalen $\beta\gamma$ -Wechselwirkungsdomäne von Gpa1p und einer carboxyterminalen Rezeptorwechselwirkungsdomäne von Ratte- $G_{\alpha s}$ (pLP122) unter der Kontrolle des GPA1-Promotors zusammensetzt, konstruiert. Hefestämme, die exprimierten GRF-Rezeptor sowie chimärisches $G_{\alpha s}$ -Protein enthalten, wurden durch Transformation eines durch die Deletion von für Komponenten des Paarungssignaltransduktionswegs codierenden Genen modifizierten Hefestamms (LY296) mit Expressionsplasmiden für menschlichen GRF-Rezeptor (pJH25) und chimärisches Gpa1- $G\alpha_s$ -Protein (pLP122) konstruiert.

[0135] Die Agonistenselektivität des menschlichen GRF-Rezeptors blieb bei der Expression in Hefe erhalten. Es wurde ein selektiver und empfindlicher Biotest entwickelt, bei dem ein Hefestamm (CY990) verwendet wird, der die oben beschriebenen genetischen Modifikationen sowie die Expression des menschlichen GRF-Rezeptors (pJH25) und eines chimärischen Gpa1- $G\alpha_s$ -Proteins (pLP122) verleihende Plasmide trägt. Eine dosisabhängige Wachstumsreaktion von CY990-Zellen war um ein aufgetragenes Agonistenanalog von GRF [hGRF (1-29)-NH₂] herum deutlich erkennbar [Fig. 25A], die durch die Koapplikation eines Antagonistenanaloges [(D-arg²)-hGRF (1-29)-NH₂] gehemmt wurde [Fig. 25B]. Der Test war selektiv: nachweisbare Wachstumsreaktionen wurden weder als Antwort auf verschiedene für andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren selektive Agonisten (Metenkephalin, Oxymetazolin, Isoproterenol, Carbachol) noch für Hefezellen, denen der GRF-Rezeptor fehlt, beobachtet (Daten nicht gezeigt). Eine nachweisbare Reaktion wurde gegenüber 20 nmol GRF beobachtet, wodurch die Empfindlichkeit des Biotests veranschaulicht wird.

IN DIESEM BEISPIEL ZITIERTER LITERATURSTELLEN

1. Bohlen, P. F. Esch, P. Brazeau, N. Ling und Guillemin. 1983. Isolation and characterization of the porcine hypothalamic growth hormone releasing factor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 116: 726-734.
2. Segre, G. V. und S. R. Goldring. 1993. Receptors for secretin, calcitonin, parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide, vasoactive intestinal peptide, glucagonlike peptide 1, growth hormone releasing hormone, and glucagon belong to a newly discovered G protein linked receptor family. *Trends Endo. Metab.* 4: 309-314.
3. Gaylinn, B. D., J. K. Harrison, J. R. Zysk, C. E. Lyons, K. R. Lynch und M. O. Thorner. 1993. Molecular cloning and expression of a human anterior pituitary receptor for growth hormone releasing hormone. *Mol. Endocrinol.* 7: 77-84.
4. Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, NY.
5. Price, L.A., E.M. Kajkowski, J.R. Hadcock, B.A. Ozenberger und M.H. Pausch. 1995. Yeast cell growth in response to agonist dependent activation of a mammalian somatostatin receptor. Eingereicht.
6. Rose, M., F. Winston und P. Hieter. 1990. *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, NY.
7. Blumer, K. J., J. E. Reneke und J. Thorner. 1988. The STE2 gene product is the ligand-binding component of the α -factor receptor of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 263: 10836-10842.
8. Strnad, J., C. M. Eppler, M. Corbett und J. R. Hadcock. 1993. The rat SSTR2 somatostatin receptor subtype is coupled to inhibition of cyclic AMP accumulation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 191: 968-976.
9. King, K., H. G. Dohlman, J. Thorner, M. G. Caron und R.J. Lefkowitz. 1990. Control of yeast mating signal transduction by a mammalian β_2 -adrenergic receptor and $G_s \alpha$ subunit. *Science* 250: 121-123.
10. Weiner, J. L., C. Guttierrez-Steil und K. J. Blumer. 1993. Disruption of receptor-G protein coupling in yeast promotes the function of an SST2-dependent adaptation pathway. *J. Biol. Chem.* 268: 8070-8077.

BEISPIEL 13

Die Empfindlichkeit des Hefe-Biotests wird durch die Überexpression von STE50 verbessert.

[0136] Für den Paarungssignaltransduktionsweg der Hefe wurden mehrere molekulare Adaptionsmechanismen beschrieben (1). Veränderungen an einem oder mehreren dieser Mechanismen sollten der Verbesserung der Empfindlichkeit eines Biotests dienen, und zwar durch Veränderung von Desensibilisierungswegen und daher Verlängerung des durch Agonistenbindung an den Rezeptor initiierten Signals. Die Auswirkungen einer sst2-Mutation auf die Empfindlichkeit des Hefe-Biotests wurden bereits beschrieben (Beispiel 6). Es wurde vorhergesagt, daß eine als Alternative zur genetischen Modifikation an sst2 vorgesehene Überexpression des He-

fezens STE50 ähnliche Auswirkungen haben sollte (2), allerdings über einen unterschiedlichen Wirkmechanismus (2,3). Das STE50-Gen wurde isoliert und unter die Kontrolle eines starken konstitutiven Promotors in einem Plasmid mit hoher Kopienzahl gestellt, was zu einer signifikanten Überexpression des Gens führte. Es stellte sich heraus, daß auf eine Reaktion gegenüber dem Säugerhormon Somatostatin über einen exprimierten SSTR2-Somatostatinrezeptor hin manipulierte Hefe eine robustere Reaktion auf Hormon zeigte, wenn STE50 überexprimiert wurde.

MATERIAL UND METHODEN

[0137] Konstruktion des STE50-Expressionsplasmids. Die Anzucht der Bakterienstämme und die Plasmidmanipulationen wurden nach Standardverfahren durchgeführt (4). Die proteincodierenden Sequenzen für STE50 wurden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung von durch Untersuchung der veröffentlichten Sequenz (2) ausgewählten Oligonukleotiden amplifiziert. Das Sense-Oligonukleotid (5'-GTC-GACAAATCAG ATG GAG GAC GGT AAA CAG G-3') enthielt das Translationsstartcodon (unterstrichen) sowie eine Sall-Restriktionsstelle und das Antisense-Oligonukleotid (5'-GAGCTCA TTA GAG TCT TCC ACC GGG GG-3') das Translationsstoppcodon (unterstrichen) sowie eine SacI-Restriktionsstelle. Diese Oligonukleotide wurden als Primer in einer Standard-PCR zur Amplifikation von STE50 aus genomischer *Saccharomyces cerevisiae*-DNA eingesetzt. Das 1100 Basenpaar große Amplifikationsprodukt wurde in den Vektor pCR2 (Invitrogen Corp., San Diego, CA, USA) kloniert und durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Die STE50-Sequenzen wurden dann auf einem Sall-SacI-Restriktionsfragment isoliert und in einen pADH-Expressionsvektor (5) kloniert, wodurch die Expression von STE50 unter die Kontrolle des starken konstitutiven ADH1-Promotors gestellt wurde. Dieses Plasmid wurde mit pOZ162 bezeichnet.

[0138] Hefestammkonstruktion. Die Anzucht und Transformation von Hefestämmen wurde wie bei Rose et al. (6) beschrieben durchgeführt. Der SSTR2-Somatostatinrezeptor-Expressionsstamm LY268 (MATa *ura3-52 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 ade2-101 lys2-801 gpa1ΔhisG far1ΔLYS2 FUS1-HIS3 sst2ΔADE2, pJH2, pLP82*) wurde in vorhergehenden Beispielen sowie bei Price et al. (7) beschrieben. Der Stamm LY268 wurde entweder mit dem STE50-Expressionsplasmid pOZ162 oder dem pADH-Vektor transformiert. Diese Stämme werden mit CY560 bzw. CY562 bezeichnet.

[0139] Biotest. Der Biotest für in Hefe exprimierten SSTR2-Somatostatinrezeptor wurde in vorhergehenden Beispielen sowie bei Price et al. (7) beschrieben. In Kürze: Hefestämmen wurden über Nacht in 2 ml synthetischem komplettem Flüssigmedium mit Glucose (2%) und ohne Uracil, Tryptophan und Leucin (SCD-*ura-trp-leu*) angezogen, zur Entfernung von Glucoseresten gewaschen und über Nacht in 5 ml SC-Galactose (2%)-*ura-trp-leu*-Flüssigmedium angezogen. Geschmolzenes (52 °C) SC-Galactose (2%)-*ura-trp-leu-his*-Agarmedium (30 ml, durch Zugabe von KOH vor dem Autoklavieren auf pH 6,8 eingestellt) wurde mit 0,06 ml der Übernachtskultur angeimpft, so daß sich eine endgültige Zelldichte von ungefähr 10⁵ Zellen/ml ergab, und in quadratische (9 × 9 cm) Petrischalen gegossen. Auf die Oberfläche des verfestigten Agars wurden sterile Filterscheibchen gelegt und mit 10 µl die angegebenen Mengen an Somatostatin-14 (Bachem Bioscience Inc., Philadelphia, PA, USA) oder α-Paarungspheromon (Sigma, St. Louis, MO, USA) enthaltendem sterilem Wasser gesättigt. Die Platten wurden 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

ERGEBNISSE

[0140] Die Auswirkung der STE50-Überexpression auf die Empfindlichkeit des Hefe-Biotests wurde untersucht, indem sich nur im Niveau der STE50-Expression unterscheidende Stämme verglichen wurden (**Fig. 26**). Es wurden Biotestplatten hergestellt, die entweder den STE50-Überexpressionsstamm CY560 oder den Kontrollstamm CY562 enthielten. Die Reaktionen dieser Stämme auf Somatostatin oder Hefepheromon wurden wie in Material und Methoden beschrieben untersucht. Beide Stämme wiesen sehr schwache Reaktionen gegenüber Hefepheromon auf, da das Gα-wildtyphefegen GPA1 unterbrochen und durch ein chimärisches Gpa1/Gα₁₂-Protein exprimierendes Gen funktionell ersetzt worden war (7). Dieses chimärische Gα-Protein kann mit dem Hefepheromonrezeptor keine effiziente Wechselwirkung eingehen. Die Reaktion dieser Zellen auf Somatostatin ist jedoch stark (**Fig. 26**). Wie vorhergesagt führte die Überexpression von STE50 zu einer robusteren Reaktion (**Fig. 26a**). Durch diese Daten wird demonstriert, daß die Überexpression von STE50 eine Überempfindlichkeit gegenüber Liganden, die über an den Hefe-Signaltransduktionsweg gekoppelte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wirken, hervorruft, selbst wenn der Ligand und der Rezeptor aus einer heterologen Quelle stammen.

IN DIESEM BEISPIEL ZITIERTER LITERATURSTELLEN

1. Sprague GF, Thorner JW. Pheromone response and signal transduction during the mating process of *Saccharomyces cerevisiae*. In: The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*. EW Jones JR Pringle und JR Broach, Hrsg. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992.
2. Ramezani-Rad M, Xu G, Hollenberg CP 1992. STE50, a novel gene required for activation of conjugation at an early step in mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 236:145-154.
3. Chan RK, Otte CA 1982. Isolation and genetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutants supersensitive to G1 arrest by α factor and α factor pheromones. *Mol Cell Biol* 2: 11-20.
4. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
5. Martin GA, Viskochil D, Bollag G et al. 1990. The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell* 63:843-849.
6. Rose MD, Winston F, Hieter P. Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.
7. Price LA, Kajkowski EM, Hadcock JA, Ozenberger BA, Pausch MH 1995. Yeast cell growth in response to agonist-dependent activation of a mammalian somatostatin receptor. Eingereicht.

BEISPIEL 14

IDENTIFIZIERUNG VON VERBINDUNGEN MIT SOMATOSTATINREZEPTOR-AGONISTEN- UND/ODER -ANTAGONISTENEIGENSCHAFTEN

[0141] Neue subtypselektive Verbindungen mit Somatostatinagonisteneigenschaften besitzen ein signifikantes therapeutisches Potential beim Nachweis und bei der Behandlung verschiedener Krebsarten. Verbindungen mit Somatostatinagonisteneigenschaften können sich zur Förderung der Wachstumshormonausschüttung in landwirtschaftlichen Spezies eignen. Eine erhöhte Wachstumshormonausschüttung kann zu beachtlichen Verbesserungen der Wachstumsleistung und Fleischqualität führen. Hierzu wurde ein auf einen Mechanismus auf Hefebasis beruhender Screening-Test entwickelt, um auf solche Verbindungen zu testen, die wünschenswerte Somatostatinagonisten- und/oder -antagonisteneigenschaften besitzen.

[0142] Biotest. Ein für den Nachweis von Verbindungen mit Somatostatinagonisten- und/oder -antagonisteneigenschaften vorgesehener Biotest wurde unter Verwendung eines den Ratte-SSTR2 funktionell exprimierenden Hefestamms (LY 364 MATa ura3-52 trp1 Δ 63 his3 Δ 200 leu2 Δ 1 ade2-101 lys2-801 gpa1 Δ hisG far1 Δ LYS2 FUS1-HIS3 sst2 Δ ADE2, pJH2, pLP82) mobilisiert. Der Test wurde unter Verwendung einer Modifikation eines Standardverfahrens ausgeführt. Dabei wurde LY364 über Nacht in 2 ml synthetischem komplettem Flüssigmedium mit Glucose (2%) und ohne Uracil und Tryptophan (SCD-ura-trp-Medium) angezogen, zur Entfernung von Glucoseresten gewaschen und über Nacht in 5 ml SC-Galactose (2%)-ura-trp-Flüssigmedium angezogen. Geschmolzenes (55 °C) SC-Galactose (2%)-ura-trp-his-Agarmedium (150 ml, durch Zugabe von konzentriertem (2×10^4 Zellen/ml) auf pH 6,8 eingestellt und in quadratischen (500 cm²) Petrischalen ausplattiert. Für den Antagonistentest wurde dem geschmolzenen Agar vor dem Gießen Somatostatin (20 nM S-14) zugesetzt. Auf die Oberfläche des verfestigten Agars wurden sterile Filterscheibchen gelegt und mit 10 μ l die Kandidatenverbindungen enthaltendem sterilem Wasser gesättigt. Die Platten wurden 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

[0143] Ergebnisse. Mit einem primären Screening erhaltene aktive Verbindungen wurden erneut getestet, wobei die Ergebnisse in **Fig. 27** dargestellt sind. Dabei zeigt die linke Abbildung die Ergebnisse eines Tests auf Verbindungen mit Somatostatinagonisteneigenschaften. Vier Verbindungen zeigten eine von Verbindungen mit Somatostatinagonisteneigenschaften erwartete beträchtliche wachstumsfördernde Aktivität. Bei den in den vier Positionen unten links vorhandenen Verbindungen handelt es sich um als Kontrolle aufgetragene unterschiedliche Mengen an Somatostatin. Die rechte Abbildung zeigt die Ergebnisse eines Tests auf Verbindungen mit Somatostatinantagonistenaktivität. Im Antagonisten-Biotest wird dem geschmolzenen Agar vor dem Gießen Somatostatin zugesetzt. Auf diese Weise wird bei allen Zellen auf der Platte als Reaktion auf Somatostatin Wachstum induziert. Mit der Diffusion der aufgetragenen aktiven Verbindungen mit Antagonisteneigenschaften in das Agarmedium und deren Inkontakttreten mit den Zellen darin wird die durch Somatostatin induzierte Wachstumsreaktion unterbrochen, wodurch eine klare Zone mit gehemmtem Wachstum entsteht. Mehrere Verbindungen zeigten nachweisbare wachstumshemmende Eigenschaften.

BEISPIEL 15

[0144] Die Signalgebungseffizienz als Reaktion auf Somatostatin wird durch die Fusion von STE2-Sequenzen an den Aminoterminus von SSTR2 reduziert.

[0145] Die funktionelle Expression von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren im allgemeinen und des SSTR2 im besonderen auf hohem Niveau war eine notwendige Voraussetzung für die Entwicklung eines sinnvollen Biotests. Von King et al. wurde berichtet, daß der Austausch der aminoterminalen Domäne des β_2 -adrenergen Rezeptors gegen äquivalente STE2-Sequenz für eine effiziente Rezeptorexpression in der Hefe notwendig war. Um diese Hypothese sowie die Auswirkung von STE2-Sequenzen auf die Expression des Somatostatin-Rezeptors in der Hefe zu testen, wurde die Ratte-SSTR2-cDNA in den Plasmiden pJH1 und pJH2 unter die Kontrolle des GAL1-Promotors gestellt. Mit diesen Konstrukten wird die induzierbare Überexpression von Gal4p, dem Transkriptionsaktivierungsprotein für galactoseinduzierbare Gene, verliehen, was zu deutlich erhöhten Niveaus an Rezeptorprotein in Membranrohfraktionen im Vergleich zu einem von einem Plasmid ohne GAL4-Sequenzen exprimierten Rezeptor führt (Daten nicht gezeigt). Im SSTR2-Expressionsplasmid pJH1 wurden für die ersten 13 Aminosäuren von SSTR2 codierende DNA-Sequenzen durch für die ersten 23 Aminosäuren von STE2 codierende Sequenz ersetzt ([Fig. 11](#)). Die Ratte-SSTR2-Sequenzen wurden in pJH2 ohne Modifikation der proteincodierenden Sequenzen eingeführt. Hefestämme mit diesen Konstrukten (LY322: MATa ura3-52 trp1 Δ 63 his3 Δ 200 leu2 Δ 1 ade2-101 lys2-801 gpa1 Δ hisG far1 Δ LYS2 FUS1-HIS3 sst2 Δ ADE2, pJH1, pLP82; LY268: MATa ura3-52 trp1 Δ 63 his3 Δ 200 ade2-101 lys2-801 gpa1 Δ hisG far1 Δ LYS2 FUS1-HIS3 sst2 Δ ADE2, pJH2, pLP82) tragen ein Plasmid (pLP82), durch das die Expression eines chimärischen G α -Protein, das sich aus der vorgeschlagenen aminoterminalen $\beta\gamma$ -Wechselwirkungsdomäne von Gpa1p und einer carboxyterminalen Rezeptorwechselwirkungsdomäne von Ratte-G α_{12} unter der Kontrolle des GPA1-Promotors zusammensetzt, vermittelt wird. Es wurde die Stärke der Reaktion dieser Stämme auf appliziertes Somatostatin (S-14) gemessen ([Fig. 28](#)). LY268-Zellen zeigten eine robuste Wachstumsreaktion auf appliziertes S-14, womit demonstriert wird, daß für die funktionelle Expression des Ratte-SSTR2 in der Hefe keine STE2-Sequenzen benötigt werden ([Fig. 28A](#)). Die Wachstumsreaktion von LY268-Zellen war wesentlich stärker als die von LY322-Zellen gezeigte ([Fig. 28B](#)). Der einzige Unterschied zwischen diesen Stämmen besteht im Vorhandensein von STE2-Sequenzen im in LY322 vorliegenden pJH1. Somit wird durch den Austausch des Aminoterminus von SSTR2 gegen das äquivalente STE2-Segment die Effizienz der Signalgebung als Reaktion auf appliziertes Somatostatin stark reduziert. Trotz der Beobachtungen von King et al. benötigen in Hefe exprimierte heterologe G-Protein-gekoppelte Rezeptoren für die funktionelle Expression keinerlei aminoterminaler proteincodierende Sequenzen von Hefeproteinen.

Patentansprüche

1. Transformierte Hefezelle, umfassend:
 - (i) eine für einen heterologen G-Protein-gekoppelten Rezeptor codierende Nukleotidsequenz,
 - (ii) eine Genmutation,
 - a) die eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Rezeptoraktivierung, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus sst2, STE50, sgyl, ste2, ste3, pik1, afr1, msg5 und sig1, verursacht und
 - b) die die transkriptionale Aktivierung von auf Pheromon reagierenden Genen ohne Zellzyklusarrest gestattet, wobei die genetische Mutation ausgewählt ist aus der Gruppe, die im wesentlichen aus einer Mutation an einem die Expression herunterregulierenden Gen, einer Deletion eines Gens oder einer Überexpression eines Gens besteht, und
 - (iii) ein Reporter-gen unter der Kontrolle eines auf Pheromon reagierenden Promotors, dessen Expression als Reaktion auf die exogene Zuführung eines Liganden für den heterologen Rezeptor in Schritt i stimuliert wird.
2. Transformierte Hefezelle nach Anspruch 1, wobei die genetische Mutation wenigstens eine weitere Genmutation an einem Gen, ausgewählt aus der Gruppe von Genen, bestehend aus FAR1 und FUS3, umfaßt.
3. Transformierte Hefezelle nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Reporter-gen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus HIS3, G418r, URA3, LYS2, CAN1, Lacz und CYH2 und es sich bei dem auf Pheromon reagierenden Promotor um FUS1 handelt.
4. Transformierte Hefezelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die genetische Mutation wenigstens eine genetische Mutation, ausgewählt aus der Gruppe, die im wesentlichen aus sgyl, ste2 und ste3 besteht, umfaßt.
5. Transformierte Hefezelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, umfassend fus3 und ferner umfassend eine Mutation an SST2.
6. Transformierte Hefezelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, umfassend far1 und ferner umfassend eine Mutation an SST2.

7. Transformierte Hefezelle nach Anspruch 1, wobei es sich bei dem Gen um STE50 und bei der Mutation um eine Überexpression handelt.
8. Transformierte Hefezelle nach Anspruch 1, wobei das G-Protein-Rezeptorgen einen Rezeptor, ausgewählt aus der Gruppe, die im wesentlichen aus dem beta-2-adrenergen Rezeptor, dem alpha-2-adrenergen Rezeptor, dem 5HT-1A-Rezeptor, dem muskarinischen Acetylcholinrezeptor, dem Rezeptor des Wachstumshormon freisetzenden Faktors, dem Somatostatinrezeptor, dem Cholecystokininrezeptor und dem Adenosinrezeptor besteht, codiert.
9. Transformierte Hefezelle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, die ferner eine heterologe $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit umfaßt.
10. Transformierte Hefezelle nach Anspruch 1 oder 2, ferner umfassend eine Mutation an einem GPA1/SCG1-Gen.
11. Transformierte Hefezelle nach Anspruch 10, wobei die Mutation bei der Herunterregulierung der Expression wirksam ist.
12. Transformierte Hefezelle nach Anspruch 1 oder 2, die ferner eine heterologe $G\alpha$ -Untereinheit umfaßt.
13. Transformierte Hefezelle nach Anspruch 12, wobei die $G\alpha$ -Untereinheit eine $G\alpha$ -Untereinheit, ausgewählt aus der Gruppe, die im wesentlichen aus einer $G\alpha_s$ -Untereinheit, $G\alpha_i$ -Untereinheit, $G\alpha_o$ -Untereinheit, $G\alpha_z$ -Untereinheit, $G\alpha_q$ -Untereinheit, $G\alpha_{11}$ -Untereinheit und $G\alpha_{16}$ -Untereinheit besteht, umfaßt.
14. Transformierte Hefezelle nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei es sich bei der Mutation an SST2 um eine Punktmutation oder Deletion handelt.
15. Verfahren zum Testen von Verbindungen zur Bestimmung der Auswirkungen einer Ligandenbindung an einen heterologen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, das die folgenden Schritte umfaßt:
 - a) Bereitstellen einer Kultur einer transformierten Hefezelle, umfassend:
 - (i) eine erste Nukleotidsequenz, die für einen heterologen G-Protein-gekoppelten Rezeptor codiert,
 - (ii) eine zweite Nukleotidsequenz, die für einen gesamten G-Protein-Komplex oder einen Teil davon codiert,
 - (iii) eine Mutation eines Hefegens, um dessen Funktion zu inaktivieren und der Hefezelle zu ermöglichen, trotz Aktivierung des Signaltransduktionswegs der Reaktion auf Pheromon weiterzuwachsen,
 - (iv) ein Reportergen unter der Kontrolle eines auf Pheromon reagierenden Promotors, dessen Expression als Reaktion auf die exogene Zuführung eines Liganden für den heterologen Rezeptor in Schritt i stimuliert wird, und
 - (v) eine Genmutation, die eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Rezeptoraktivierung, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus sst2, SET50, sgvl, ste2, ste3, pik1, afr1, msg5 und sig1, verursacht;
 - b) Zusammenbringen der Zellen mit einer zu testenden Verbindung und
 - c) Bestimmen des Wachstums der Zelle oder der Aktivierung des Reportergens als Anzeichen für die Aktivierung des heterologen G-Protein-gekoppelten Rezeptors bei Bindung der Verbindung.
16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die transformierte Hefezelle die Genmutation umfaßt, wobei die Genmutation wenigstens eine Genmutation an einem Gen, ausgewählt aus der Gruppe von Genen, die im wesentlichen aus FUS3 und FAR1 besteht, umfaßt.
17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, wobei das Reportergen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus HIS3, G418r, URA3, LYS2, CAN1, Lacz und CYH2m und es sich bei dem auf Pheromon reagierenden Promotor um FUS1 handelt.
18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die transformierte Hefezelle ferner eine Mutation an einem Gen, die die transkriptionale Aktivierung von auf Pheromon reagierenden Genen ohne Zellzyklusarrest gestattet, umfaßt.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18, wobei der heterologe G-Protein-gekoppelte Rezeptor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus dem beta2-adrenergen Rezeptor, dem muskarinischen Acetylcholinrezeptor und dem Somatostatinrezeptor

Es folgen 28 Blatt Zeichnungen

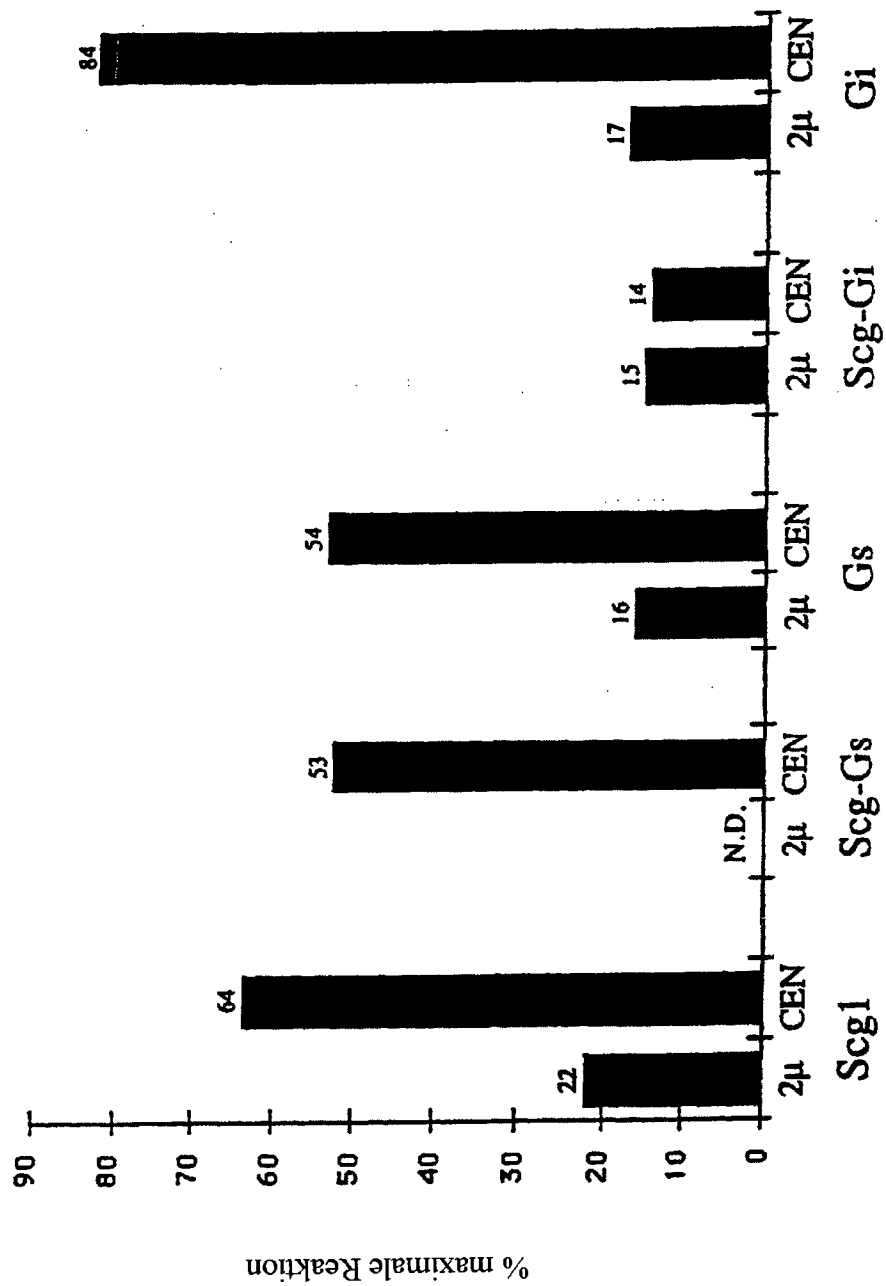


FIG. 1

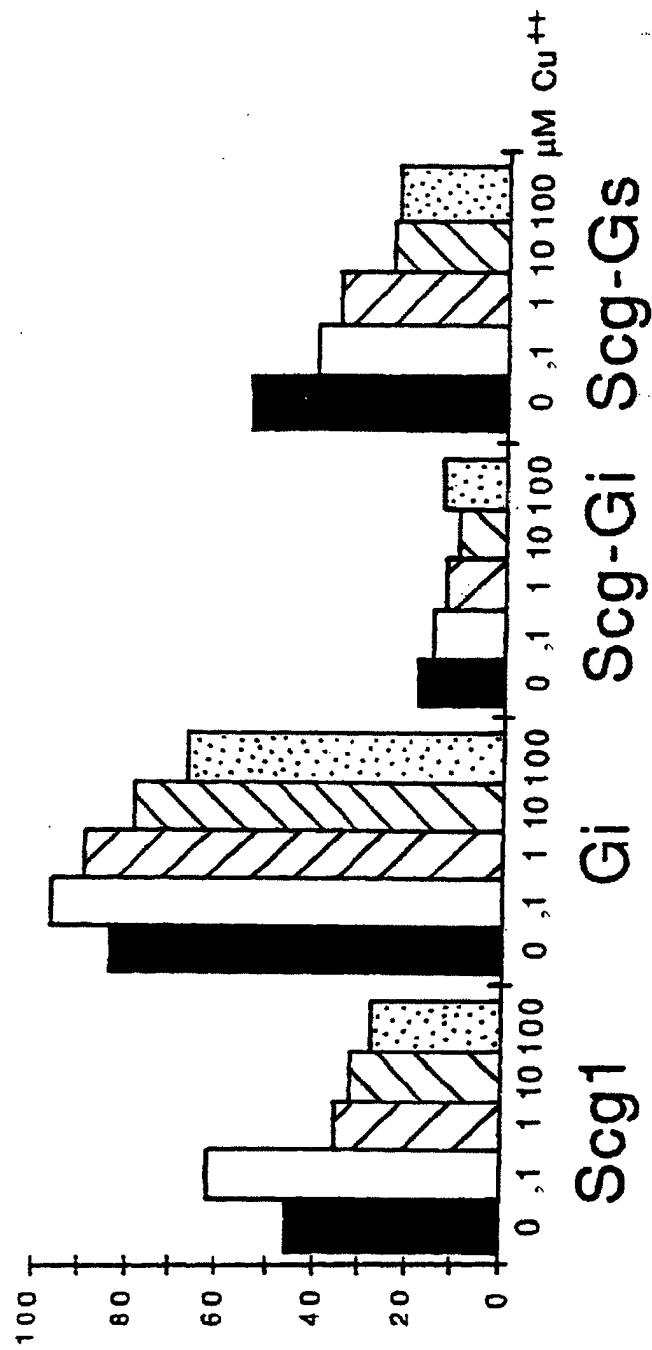


FIG. 2

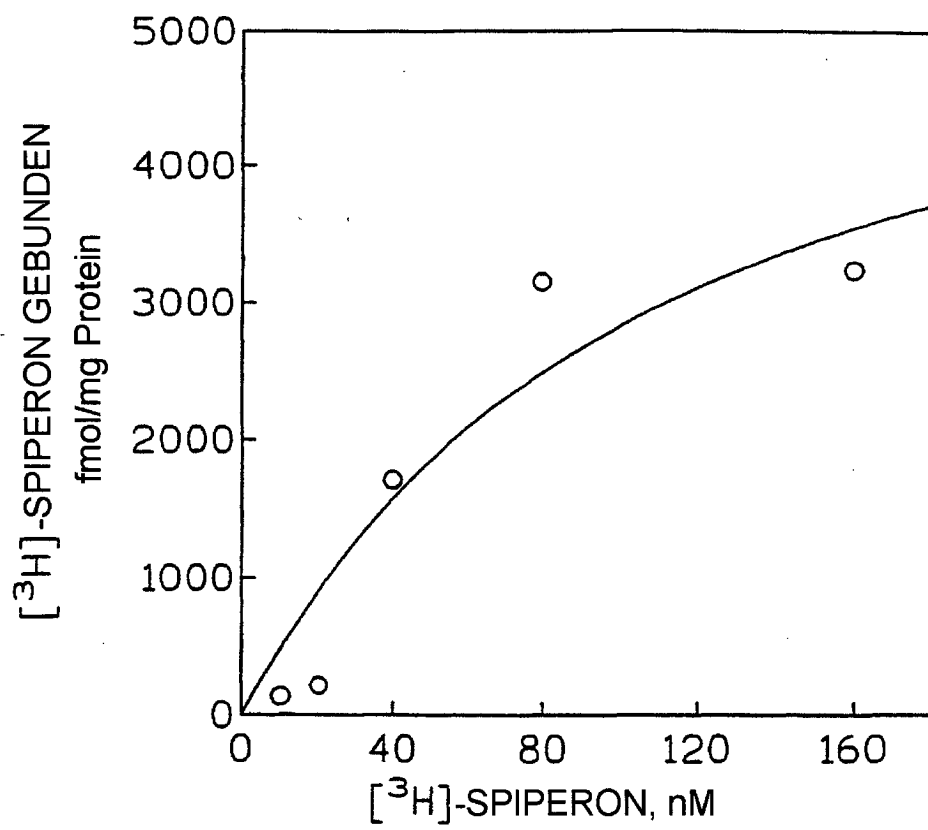


FIG. 3

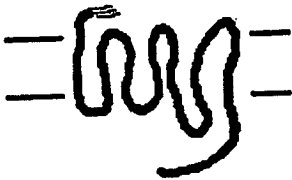
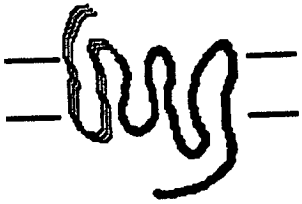
		Bmax (pmol/mg)
CHI11		3,1
CHI17		1,6
CHI18		0,7

FIG. 4

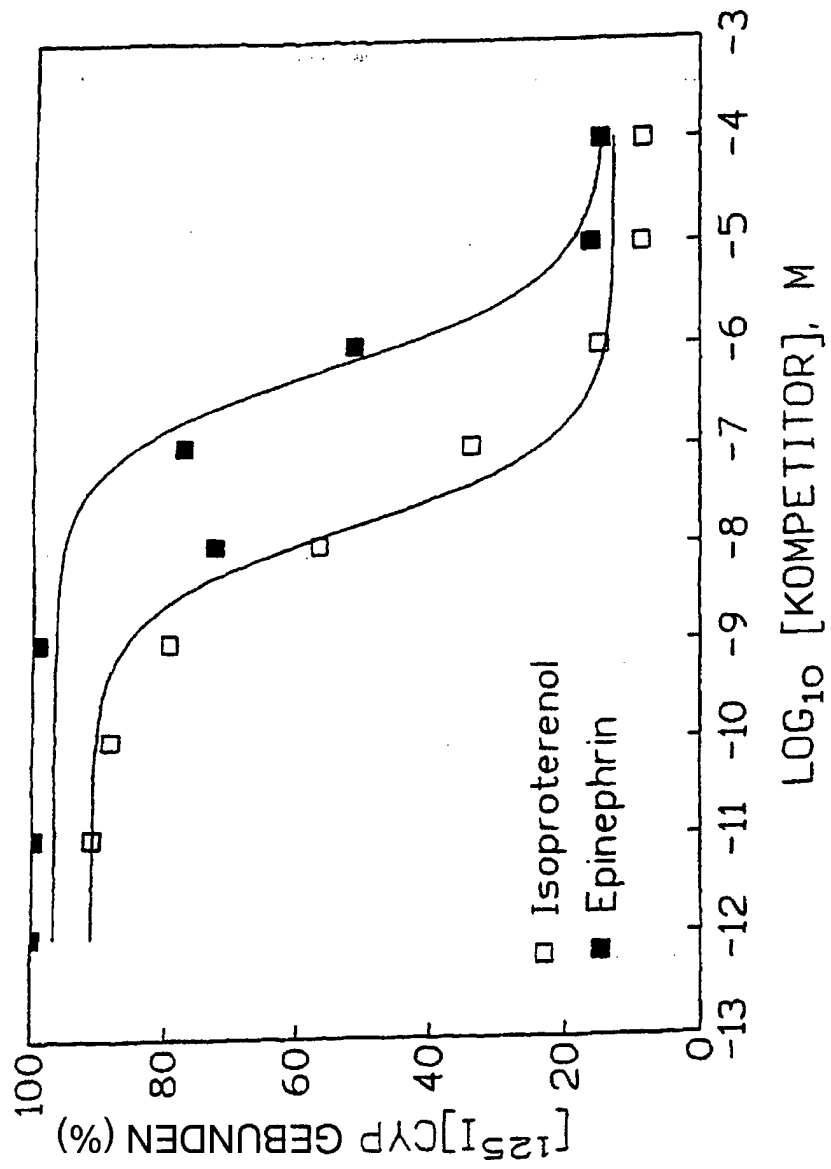


FIG. 5

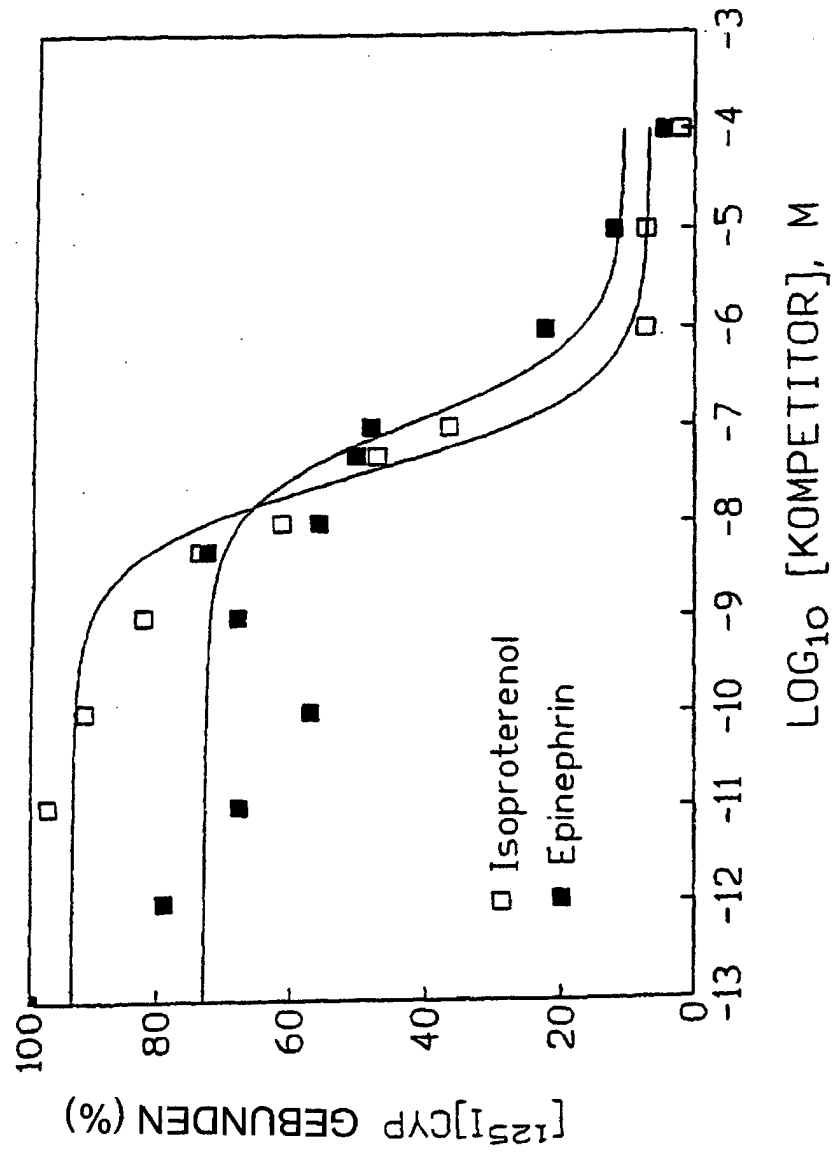


FIG. 6

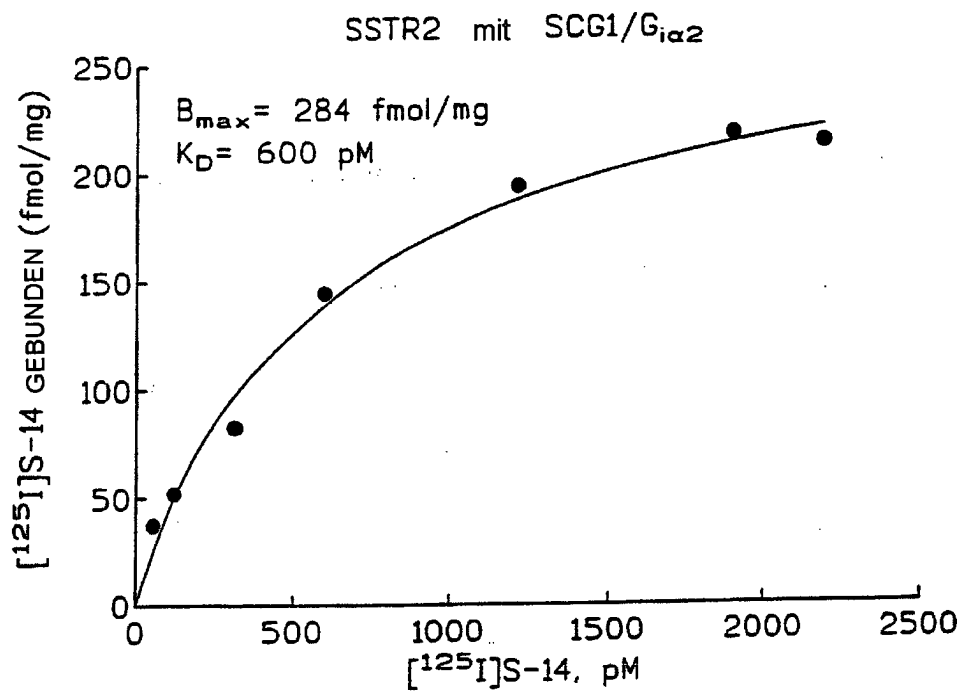


FIG. 7

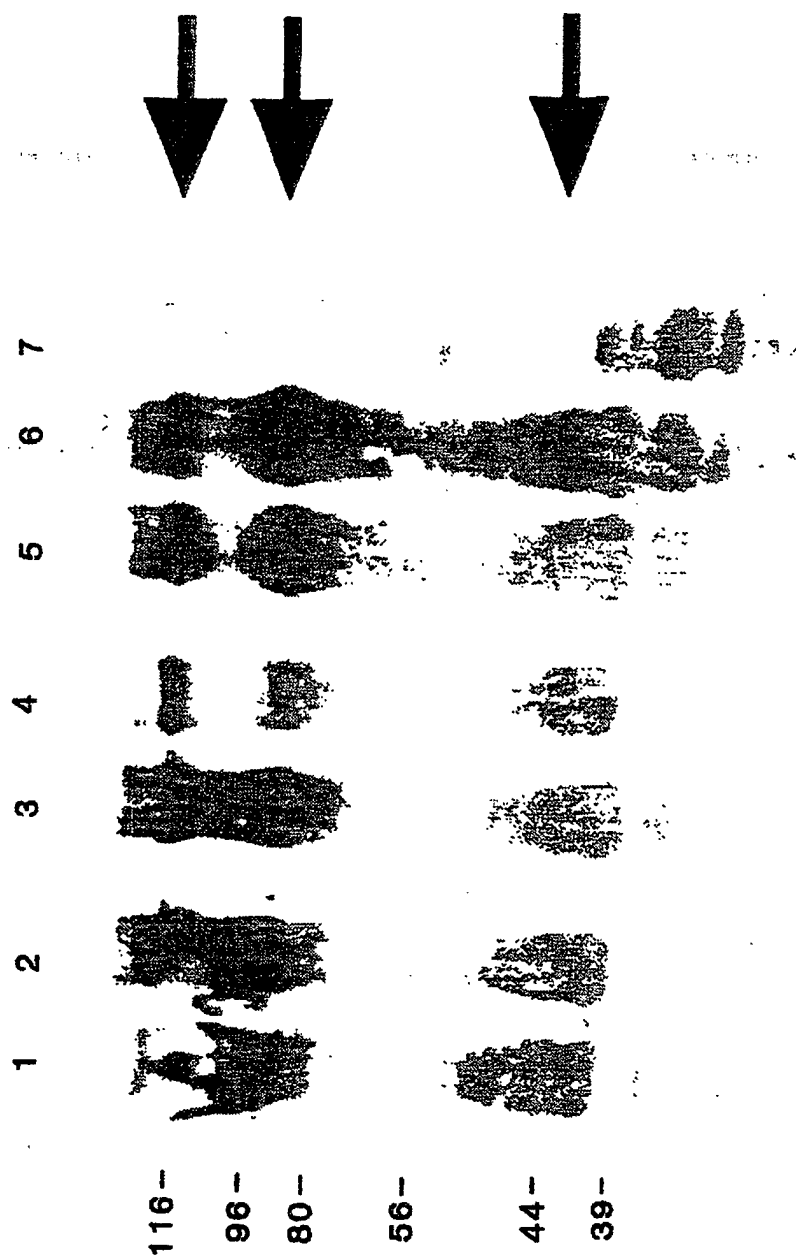


FIG. 8

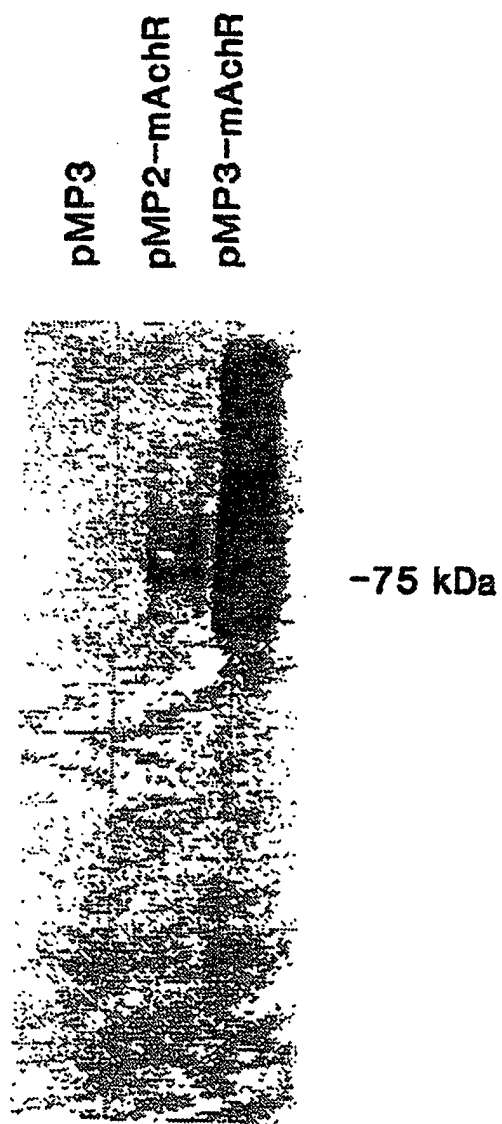


FIG. 9

FIG. 10

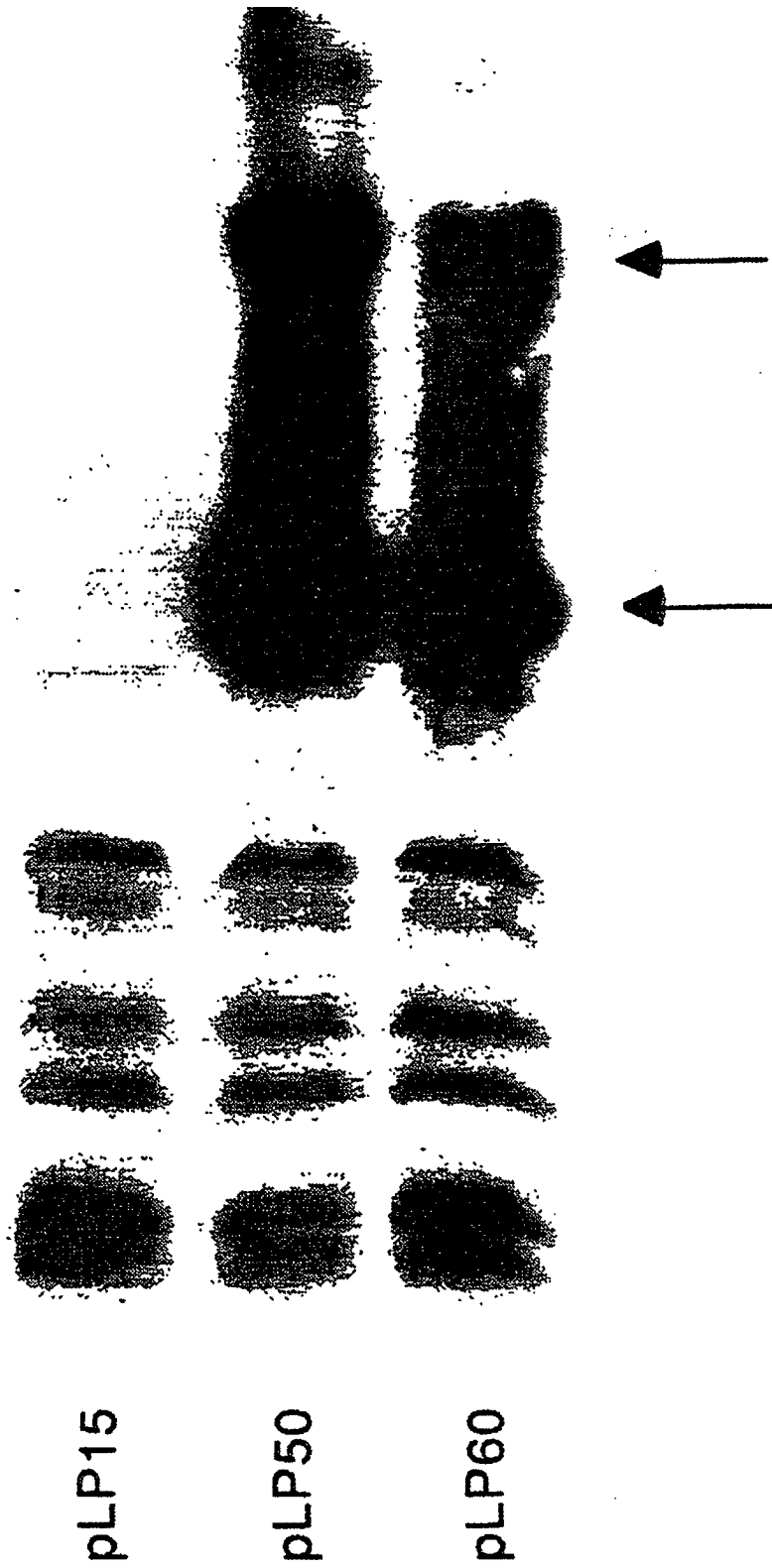
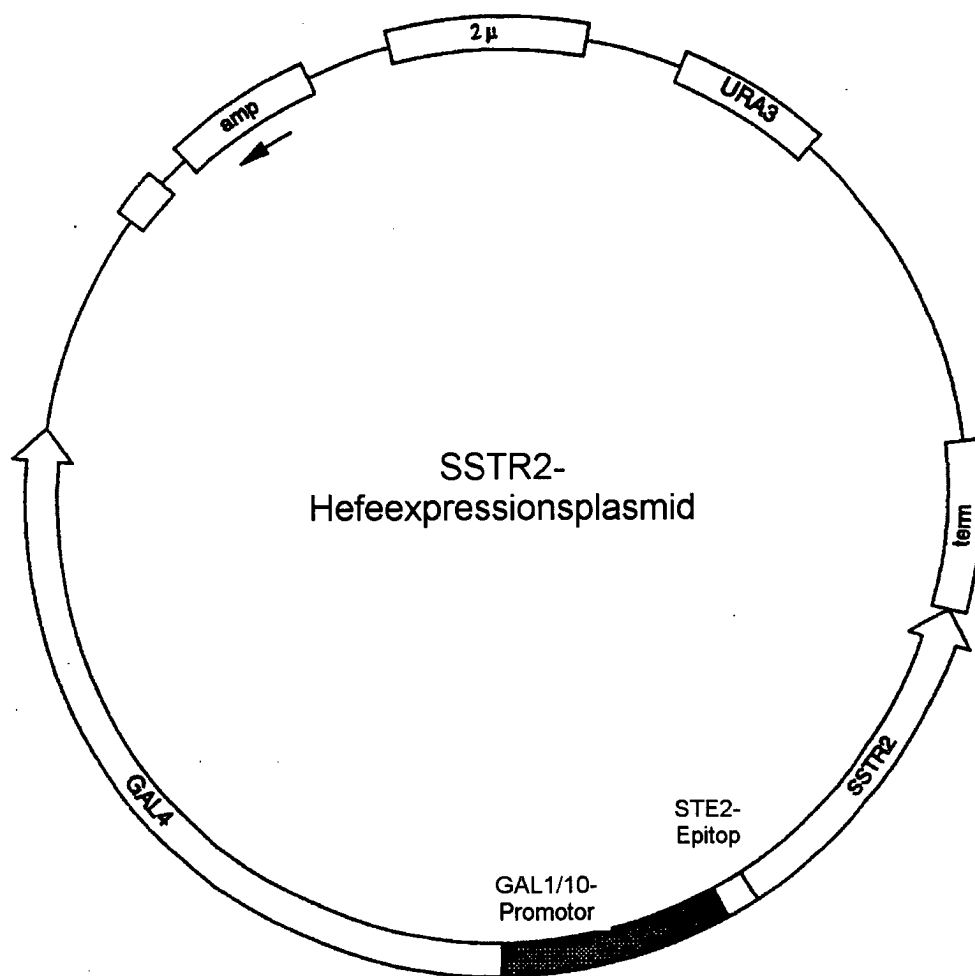


FIG. 11



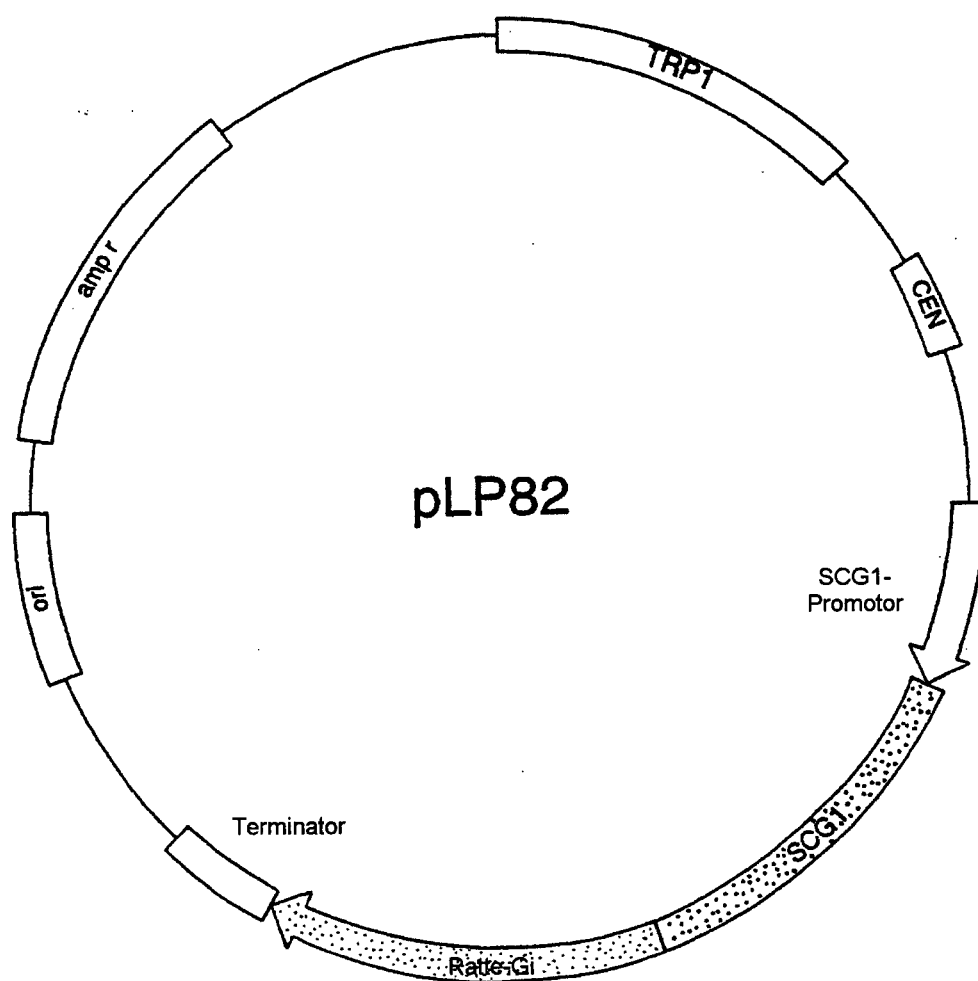


FIG. 12

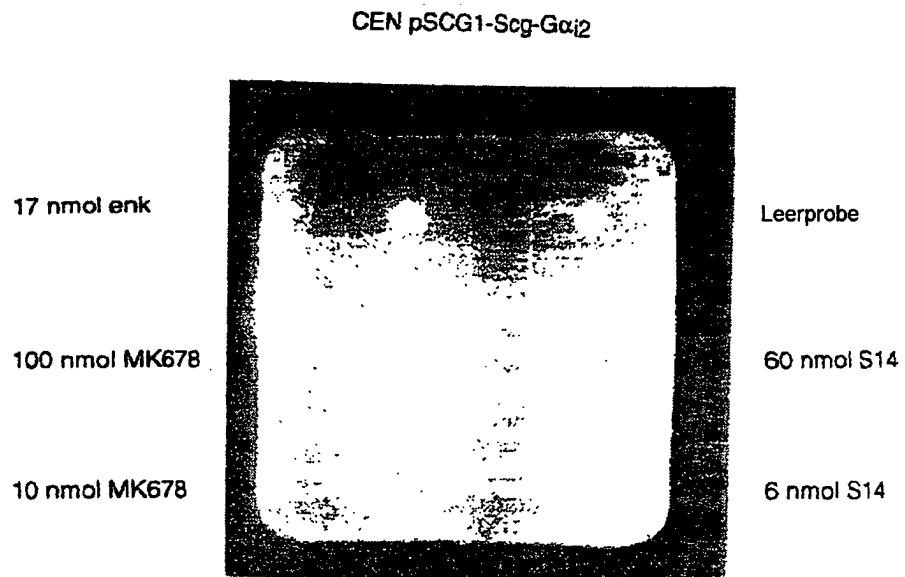


FIG. 13A

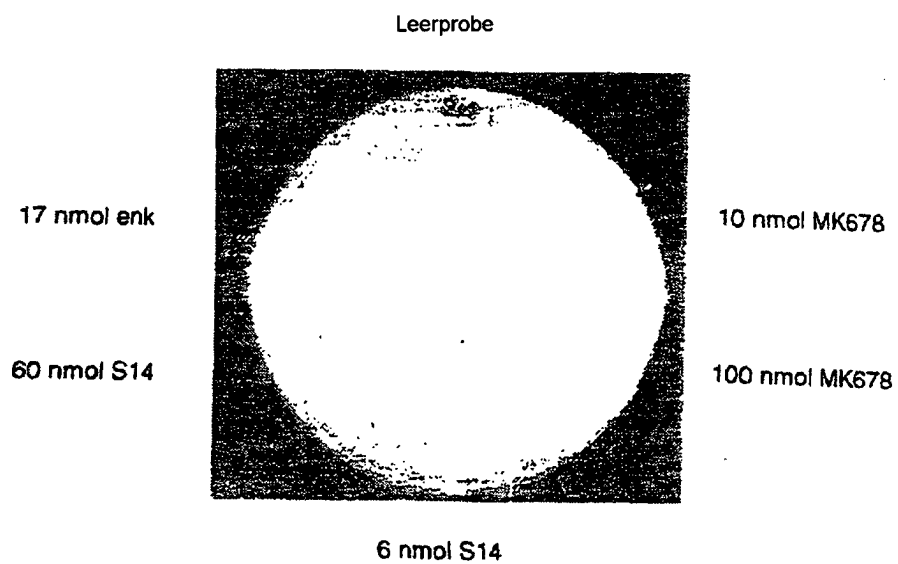


FIG. 13B

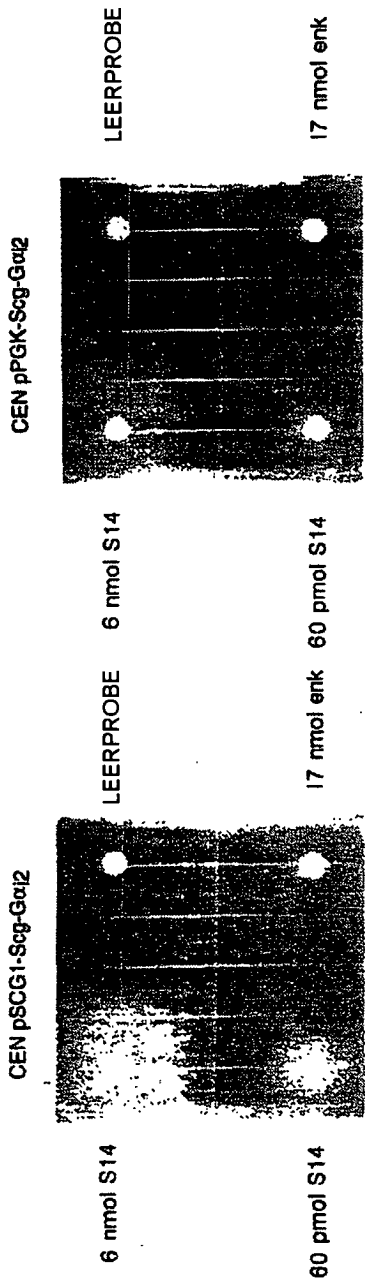


FIG. 14A

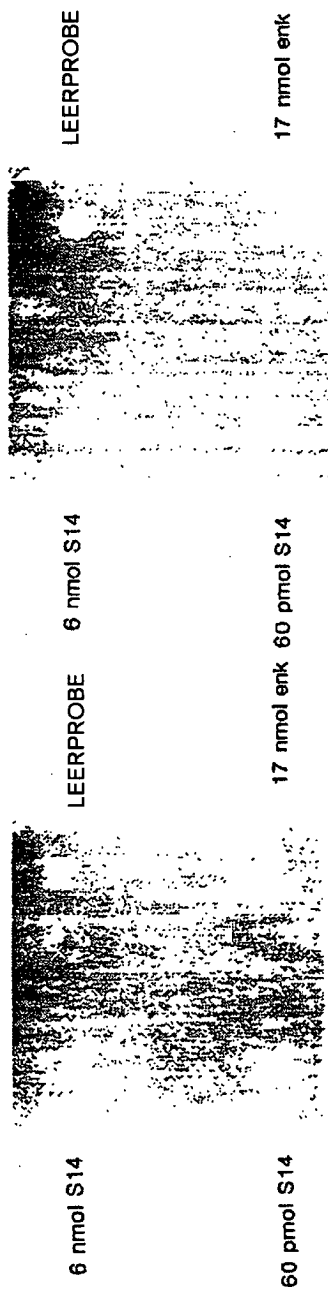


FIG. 14C

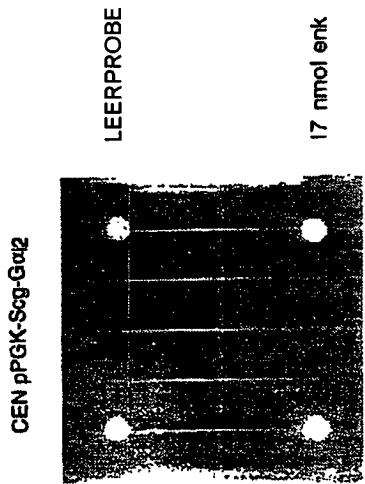


FIG. 14B

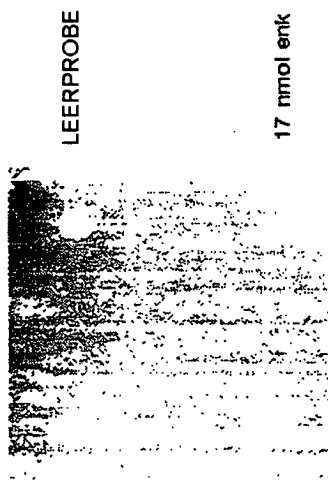


FIG. 14D

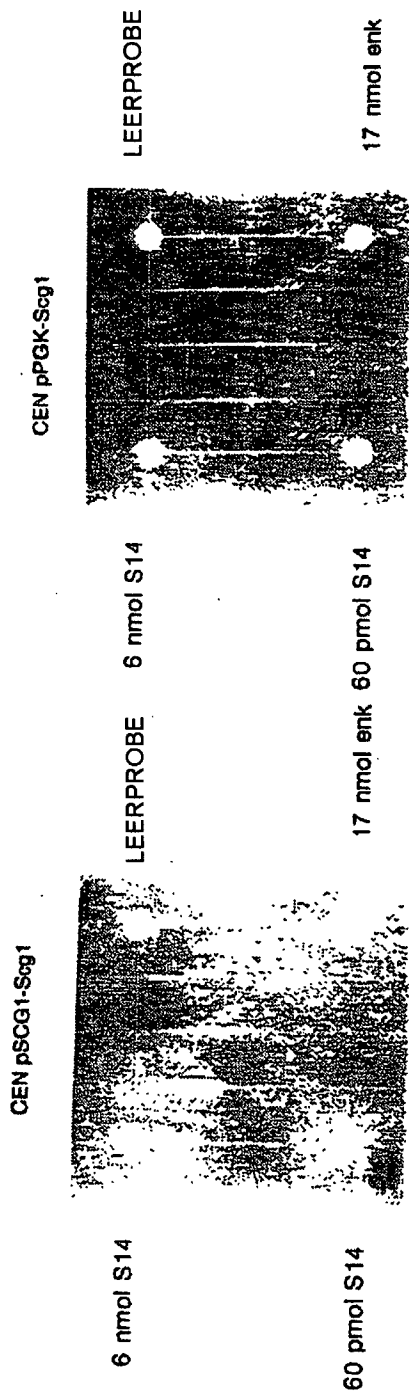


FIG. 15A

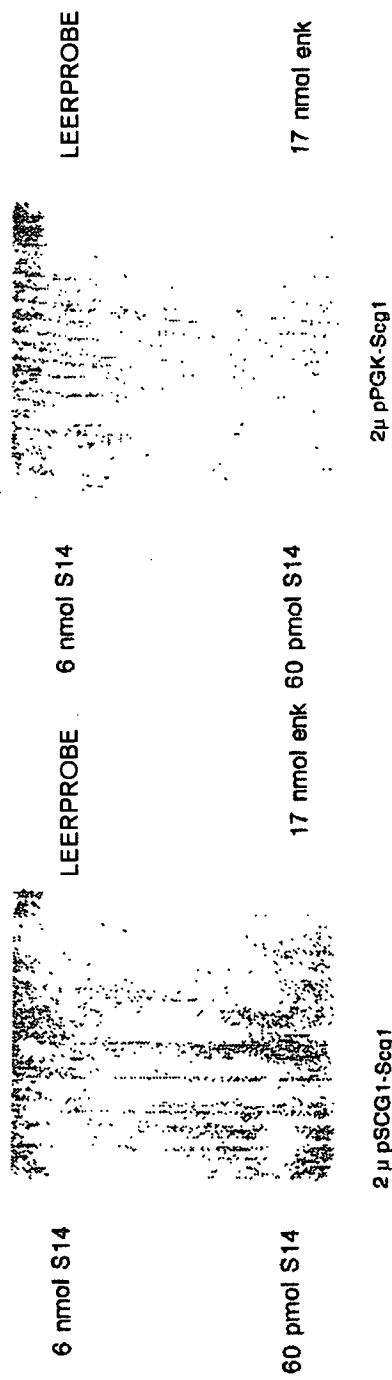


FIG. 15C

FIG. 15B

FIG. 15D

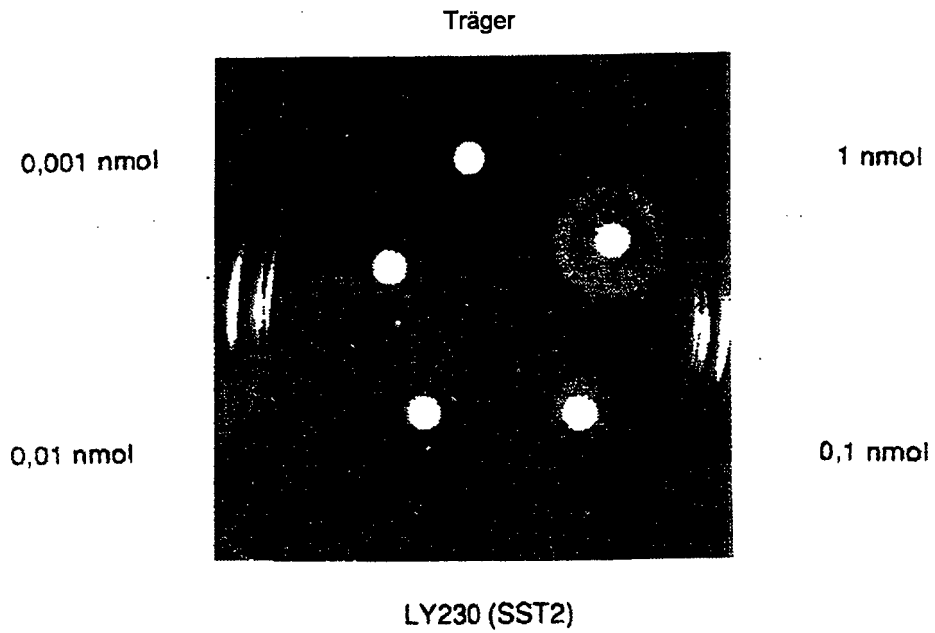


FIG. 16A

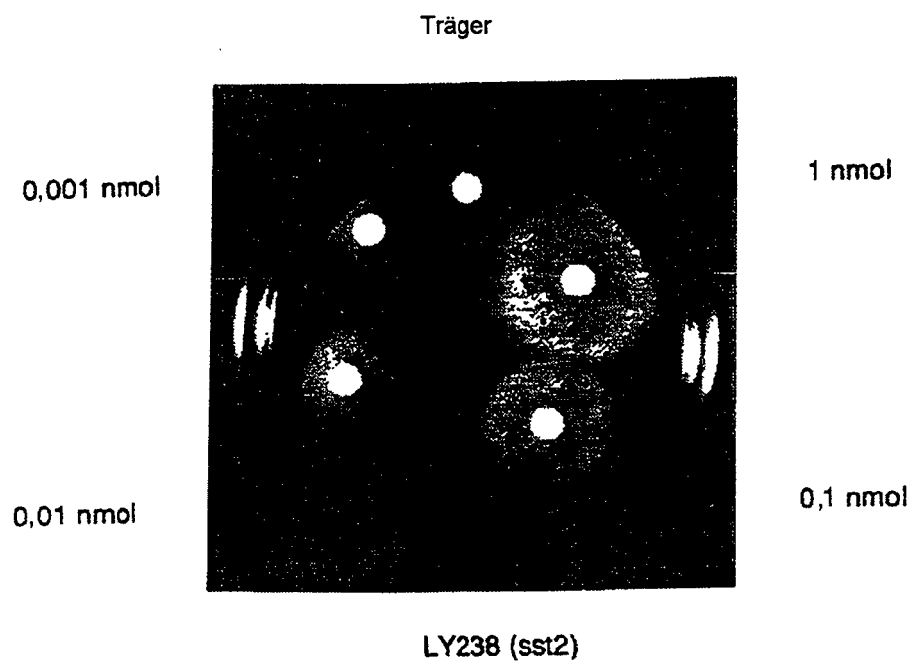


FIG. 16B

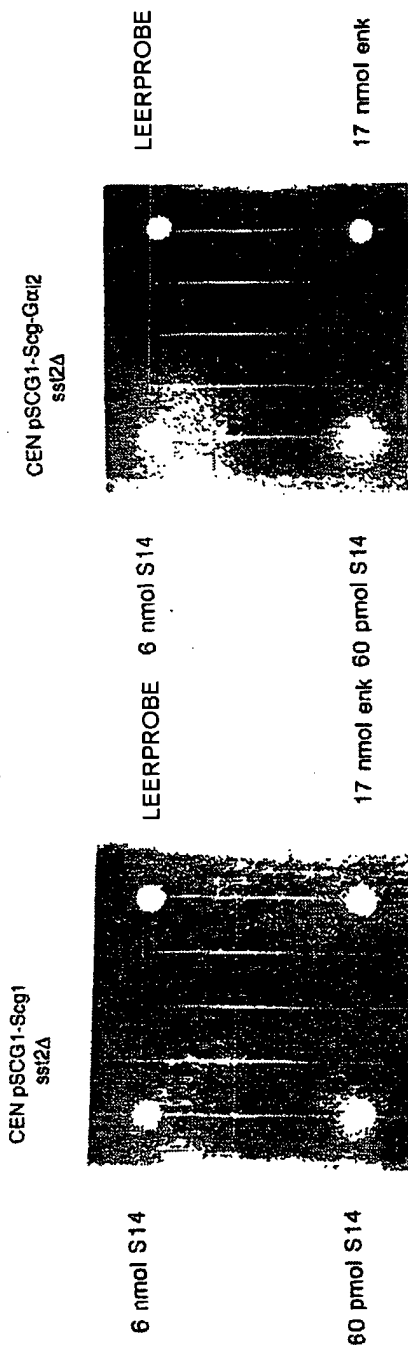


FIG. 17A

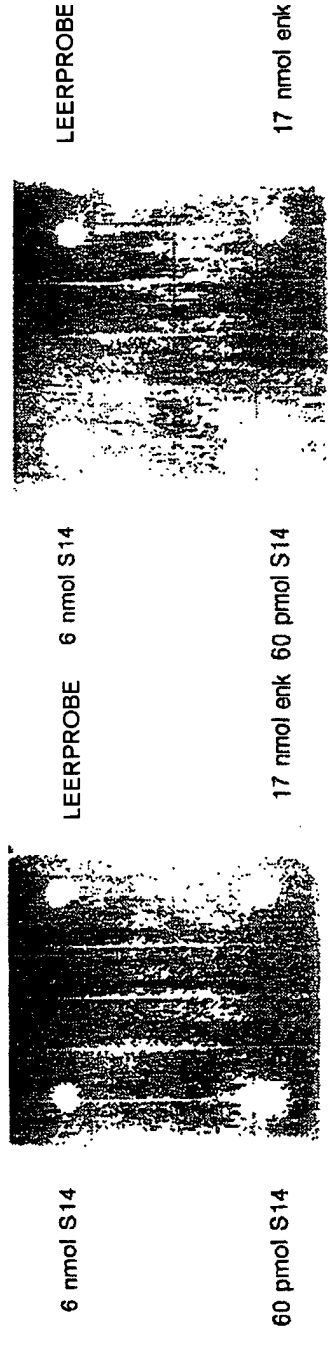


FIG. 17C

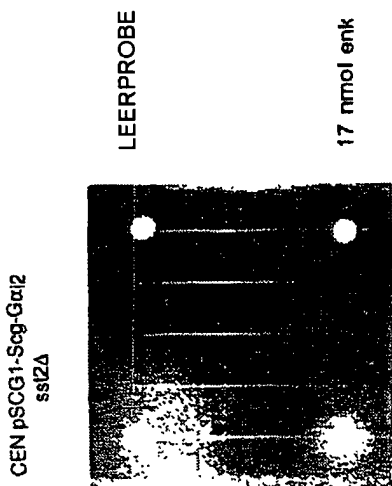


FIG. 17B

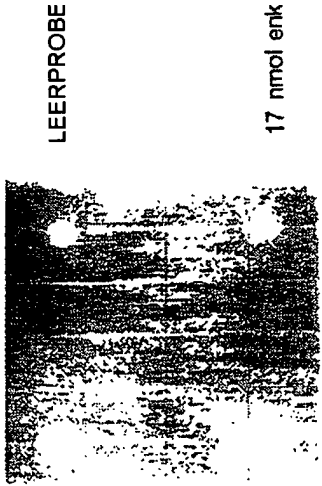


FIG. 17D

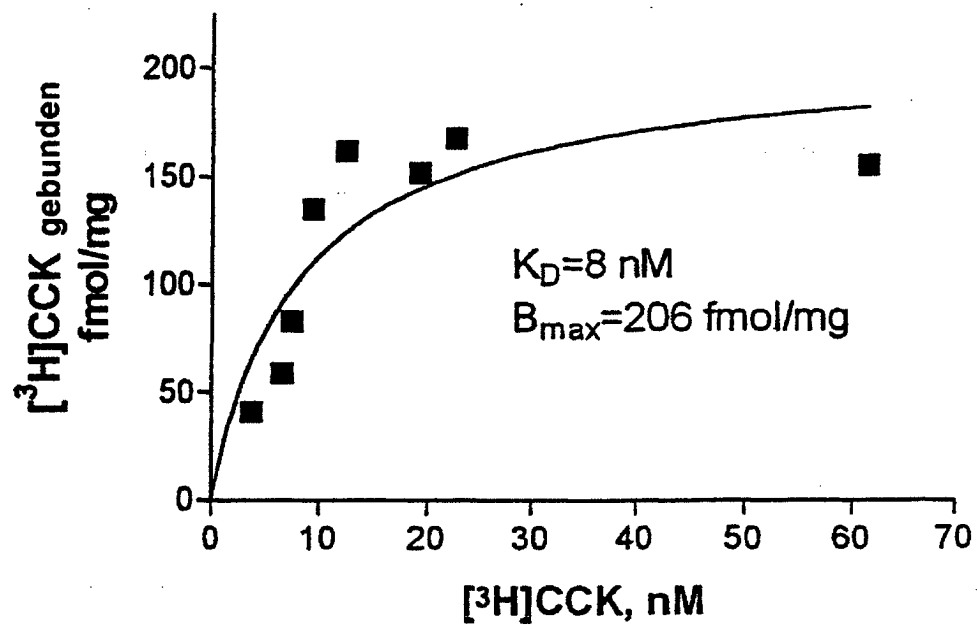


FIG. 18

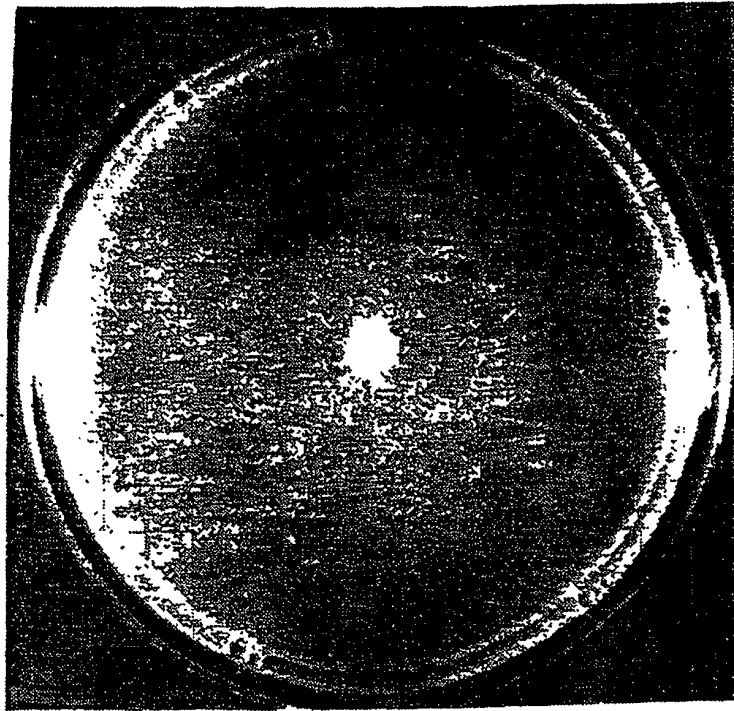


FIG. 19A

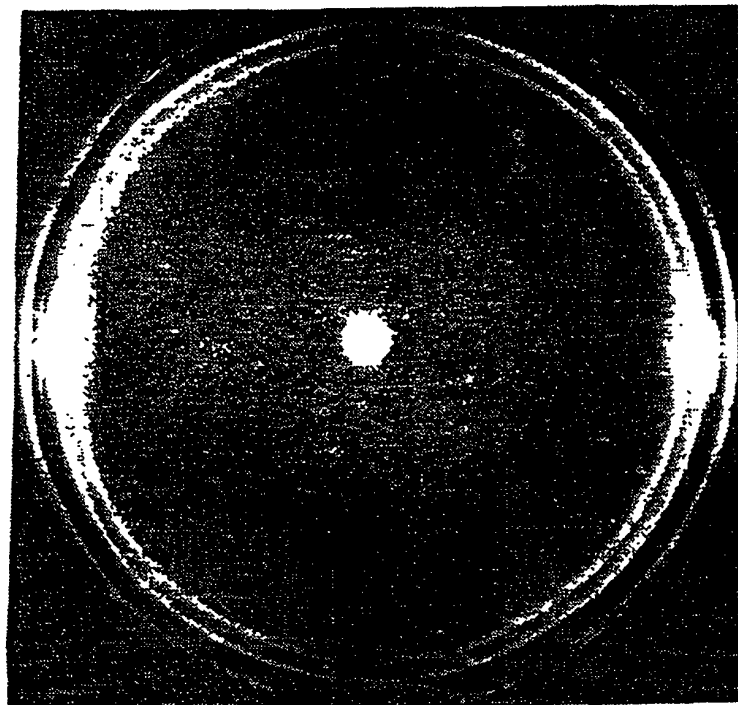
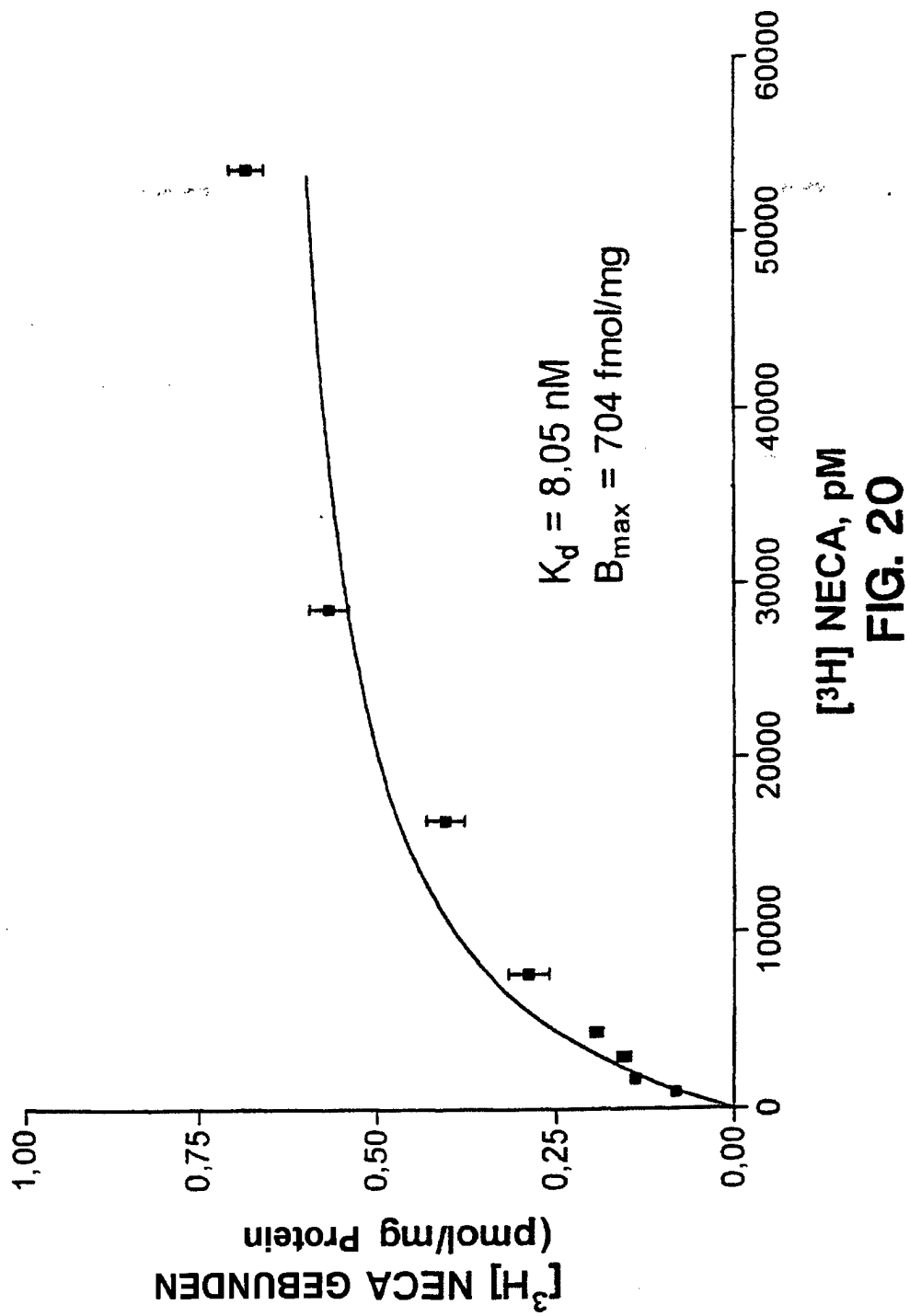


FIG. 19B



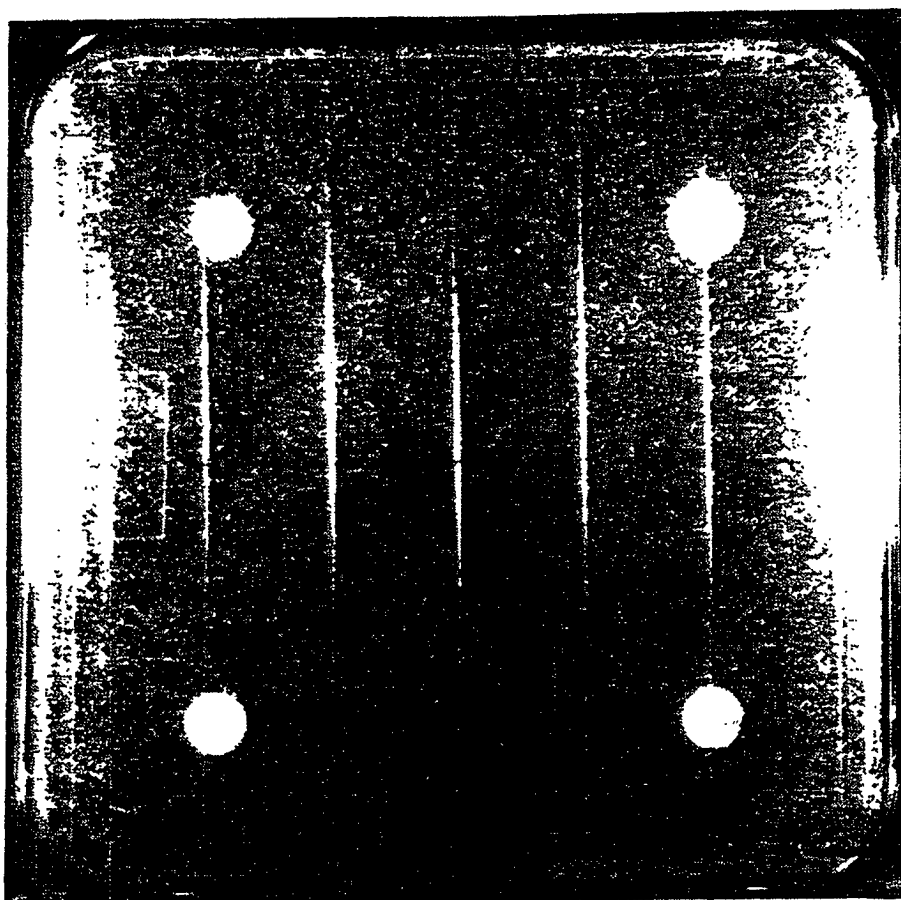


FIG. 21

A

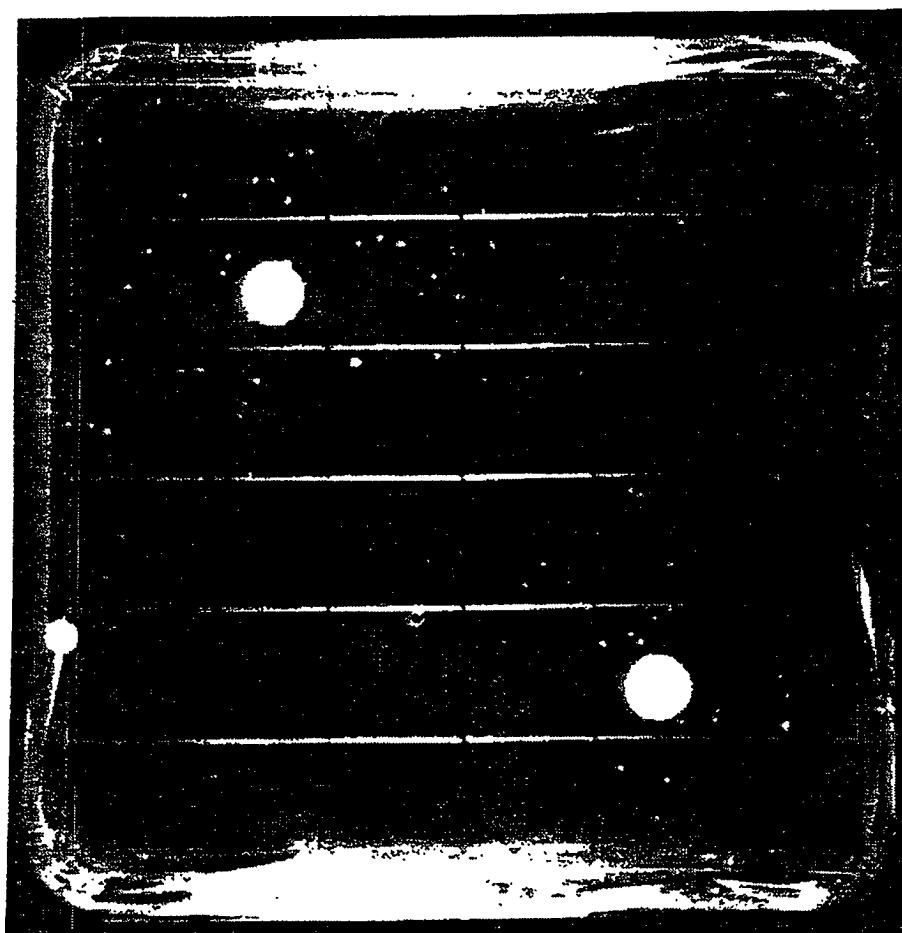


FIG. 22

B

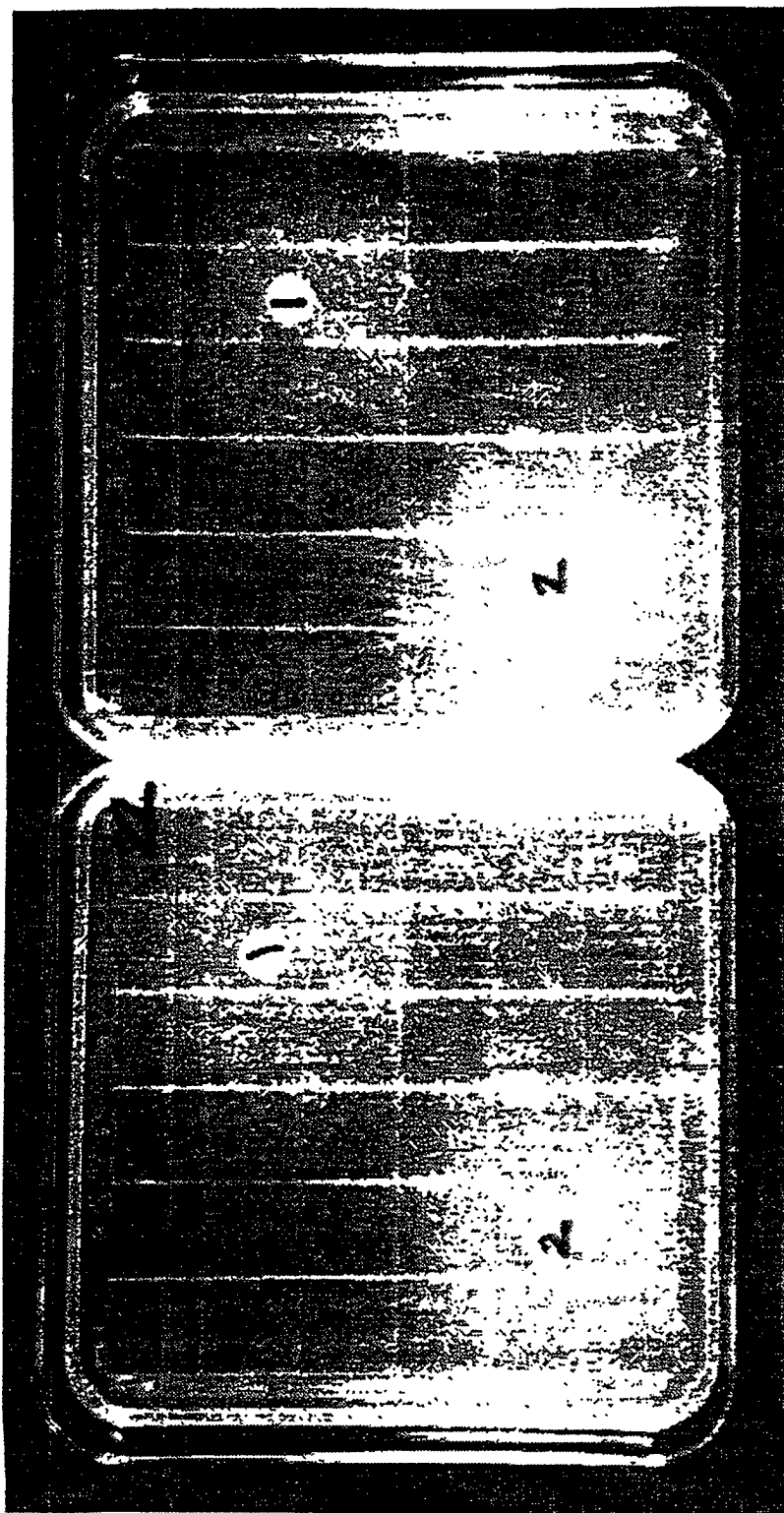


FIG. 23

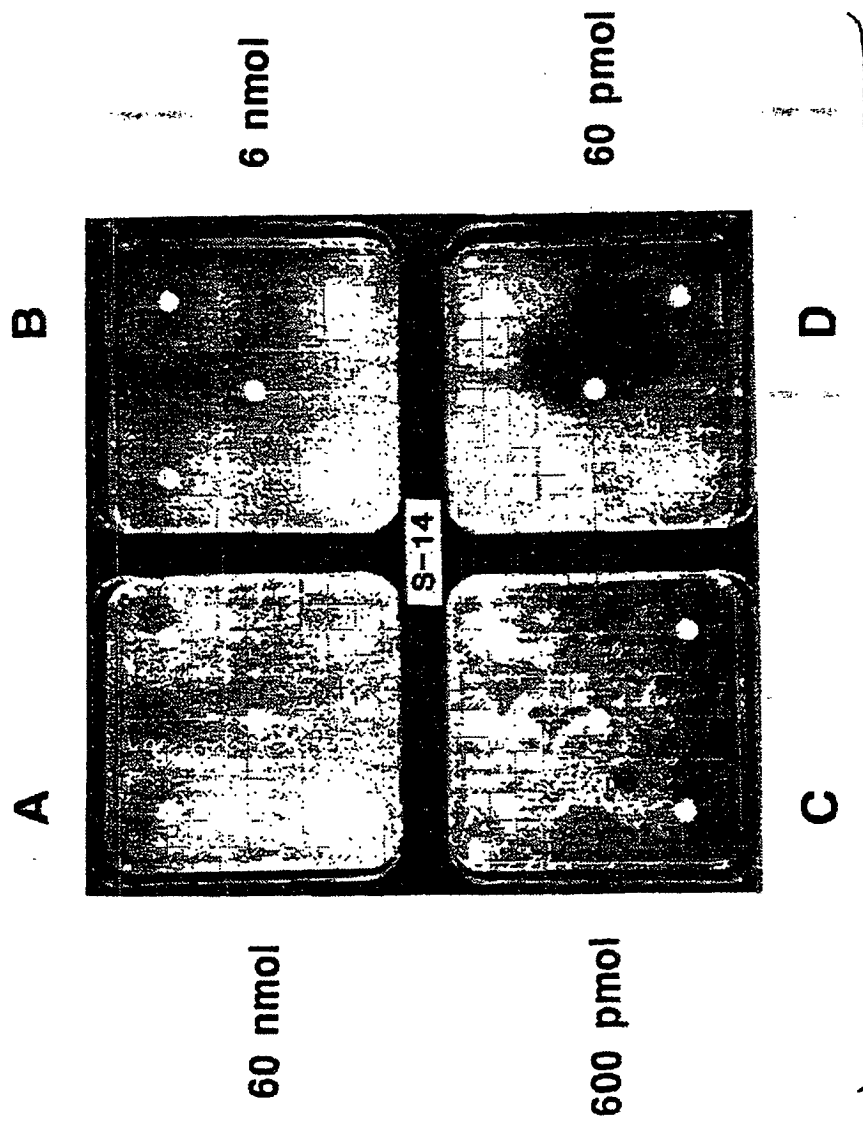


FIG. 25B

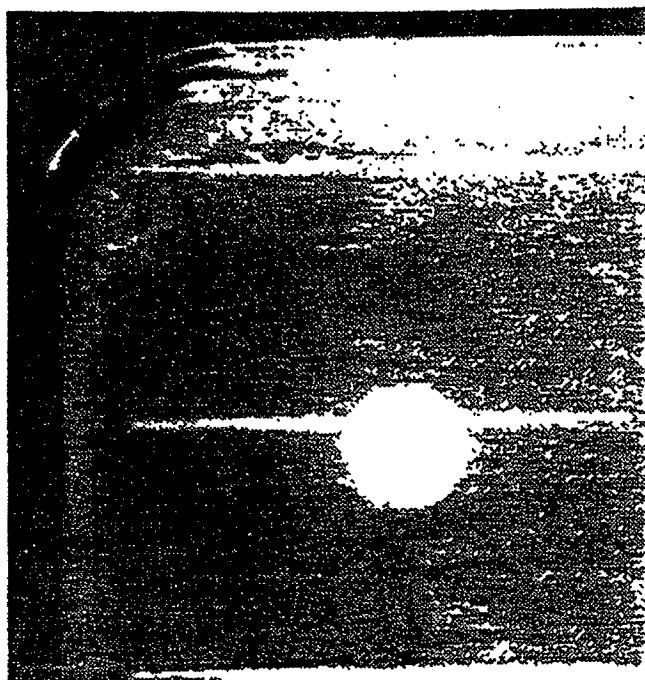


FIG. 25A

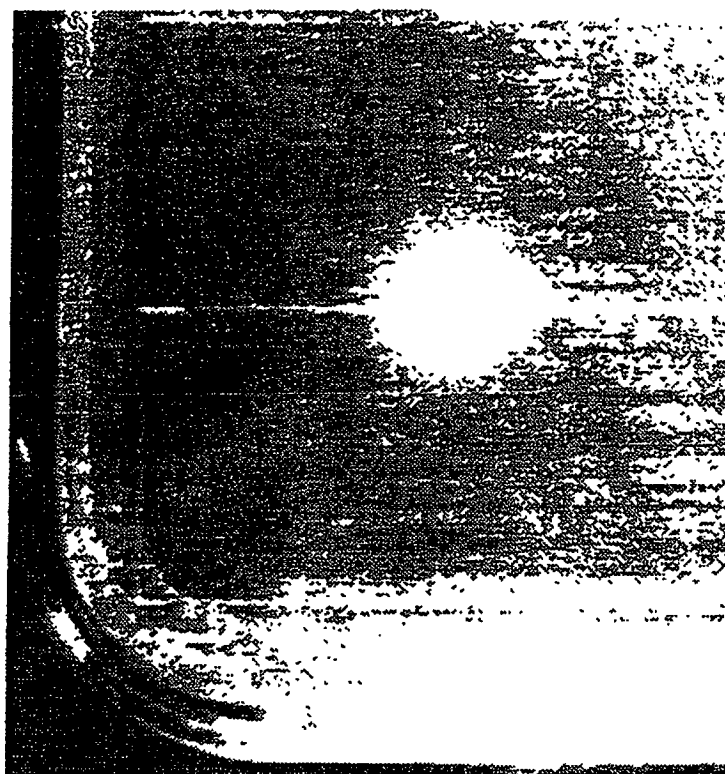


FIG. 26B



FIG. 26A

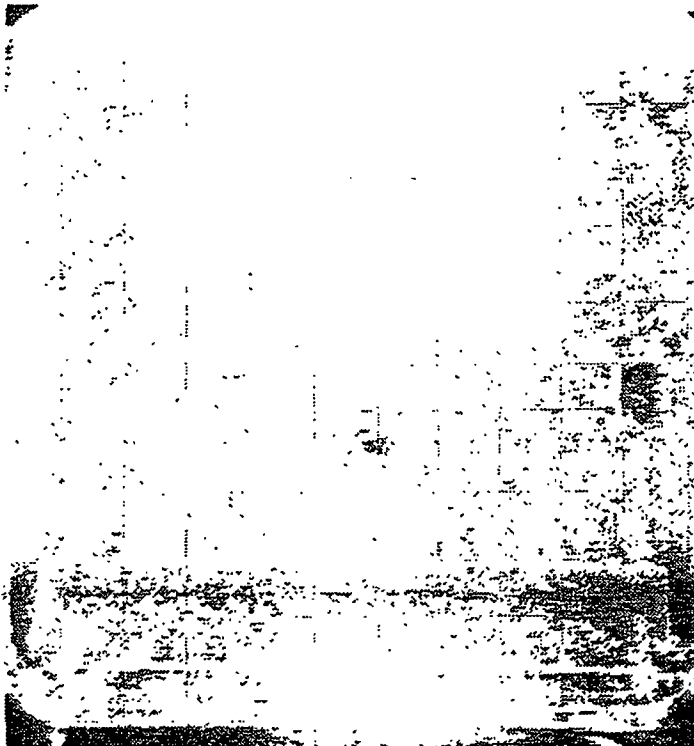
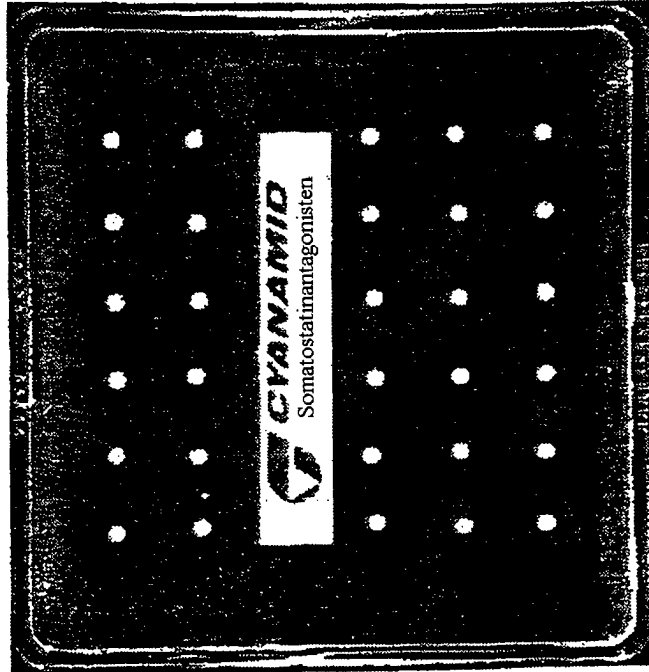


FIG. 27A



CL-Verbindungen (auf jede Position jeweils
10 μ l einer Lösung von 10 mg/ml aufgetragen)

FIG. 27B



CL-Verbindungen (auf jede Position jeweils
10 μ l einer Lösung von 10 mg/ml aufgetragen)

FIG. 28B

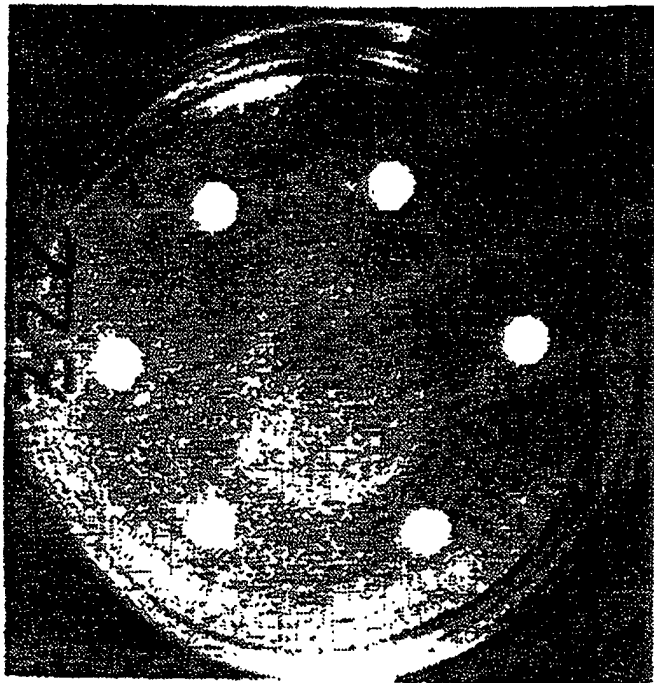


FIG. 28A

