

„Hefe als Lupe –wie man mit lebenden Zellen einen Einblick in die Welt der molekularen Interaktionen gewinnt“

Fena Ochs und Daniel Degreif

Was wäre unsere Welt ohne Hefen? Die Frage ist leicht zu beantworten: „Auf jeden Fall nicht das, was sie heute ist!“ Diese gerade einmal 5 bis 10 µm messenden Zellen begleiteten die Menschheit über Jahrtausende, ohne dass wir von ihnen wussten. Heute wissen wir, dass es sie gibt, und können sie daher systematisch und vielfältig einsetzen. Wenn wir von Hefe sprechen, meinen wir im Allgemeinen die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, die uns kulinarische Köstlichkeiten wie Wein, Bier und unser täglich Brot schenkt. Diese klassischen Anwendungen der Hefe sind tausende von Jahren alt. Durch die anaerobe Umwandlung von Glucose produziert die Hefe Kohlenstoffdioxid und Ethanol. In Bier und Wein sorgt der Alkohol für die berauschende Wirkung. Beim Brotbacken führt das Kohlenstoffdioxid zum Aufgehen des Teiges, was uns dann ein locker luftiges Brot beschert. Doch während im Bereich der Lebensmittelherstellung der Einsatz der Hefe nahezu gleich geblieben ist, konnte dieser Organismus in der Biochemie und Molekularbiologie ganz neue Anwendungen finden.

Heute ermöglichen Hefen einen Einblick in die Welt der molekularen Wechselwirkungen - seien es Protein-Protein-Interaktionen oder gar die Bindung niedermolekularer Verbindungen an Proteine. Auf diese Weise sind wir in der Lage, medizinisch relevante Substanzen zu identifizieren, die Wirkmechanismen bereits heute eingesetzter Medikamente aufzuklären und das Verständnis vieler biologischer Vorgänge zu verbessern. Die molekularbiologischen Methoden, die dazu eingesetzt werden, fasst man als Hefe-Hybrid-Systeme zusammen. [1]

Diese Technik basiert auf einer Reihe von Entdeckungen, die heute Grundlagen der modernen Biochemie darstellen. Besonders wichtig war die Erkenntnis, dass viele Proteine aus funktionellen Domänen bestehen, die ihre Funktion behalten, wenn sie isoliert oder sogar gebunden an andere Proteindomänen vorliegen. In letzterem Fall, in dem zwei Domänen von Proteinen, die in der Natur nichts miteinander zu tun haben, molekularbiologisch zusammengefügt werden, spricht man von Fusionsproteinen. Auf diese Weise lassen sich Proteine erschaffen, die Eigenschaften von unterschiedlichen Proteinen vereinen und somit Hybride mit einzigartigen Eigenschaften darstellen. Ein weiterer wichtiger Schritt auf dem Weg zu den Hefe-Hybrid-Systemen war die Erkenntnis, dass bestimmte Fusionsproteine gemeinsam die Produktion von Eiweißen auslösen können, indem sie als Transkriptionsfaktor wie ein molekularer Schalter eines Gens fungieren. Funktionsfähige Transkriptionsaktivatoren besitzen eine DNA-Bindedomäne, die vor dem entsprechenden Gen an die DNA bindet, sowie eine Transkriptionsaktivierungsdomäne, die Proteine rekrutiert, die das Gen ablesen. Bei den Hefe-Hybrid-Systemen liegen die beiden Domänen des Transkriptionsaktivators als Teile zweier Fusionsproteine vor, die durch ihre fusionierten Proteinanteile über Protein-Protein-Wechselwirkungen aneinander binden (siehe Abb. 2). Genau diese Protein-Protein-Wechselwirkungen lassen sich in der Hefe näher betrachten und analysieren.

Eine oft im Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendete DNA-Bindedomäne ist LexA aus dem Bakterium *Escherichia coli*. Dort bindet es spezifisch an einen DNA-Abschnitt, den so genannten LexA-Operator, und verhindert interessanterweise die Transkription eines

nachfolgenden Gens. Als Aktivierungsfaktor verwendet man häufig Gal4-AD, die Aktivierungsdomäne eines hefespezifischen Transkriptionsfaktors, der die Produktion von Enzymen steuert, die das Wachstum der Hefe mit dem Zucker Galaktose als Energiequelle erlauben. Gal4-AD rekrutiert die Transkriptionsmaschinerie zum Promotor des Gens und ermöglicht somit das Ablesen der codierenden Sequenz.

Dieses System bezeichnet man als Hefe-Zwei-Hybrid-System, da ein Konstrukt aus zwei Komponenten die Transkription aktiviert. Erweitert man dieses Konstrukt um ein weiteres Bindeglied, so erhält man ein Hefe-Drei-Hybrid-System.

Die Hefe-Hybrid-Systeme gleichen einem molekularen Puzzle in einer Zelle. Nur wenn alle Puzzleteile richtig zusammenpassen, wird ein bestimmtes Gen auch wirklich abgelesen. Wird gezielt ein Reporter gen in die Hefezelle eingebaut, dessen Ablesen eine detektierbare Veränderung der Zelle bewirkt, so lassen sich Bindungen zwischen den beiden Fusionsproteinen erkennen. Eine leicht detektierbare Eigenschaft ist beispielsweise das Wachstum auf Mangelnährmedien, auf welchen Wildtyp-Hefen nicht wachsen können. Auf diese Weise lassen sich Zellen mit funktionsfähigem Konstrukt selektieren. Die DNA des gesamten Hybrid-Konstrukts muss künstlich aus allen benötigten Bereichen, wie LexA-Operator, UAS und dem Reporter gen mit Promotor und codierendem Bereich zusammengebaut und in die Hefezelle eingebracht werden. Beim Hefe-Drei-Hybrid-System ermöglichen drei Komponenten bei gleichzeitiger Bindung die Transkription. Zwei der drei Komponenten stellen dabei Fusionsproteine dar, die eine DNA-Bindedomäne bzw. eine Transkriptionsaktivierungs-Domäne beinhalten. Die jeweils anderen Domänen der Fusionsproteine werden über ein drittes Bindeglied verknüpft, das einen zu untersuchenden Bindepartner, beispielsweise einen pharmazeutischen Wirkstoff, beinhaltet. [2-4]

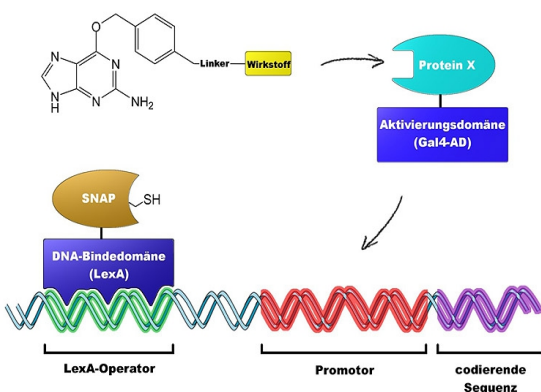


Abbildung 1: Komponenten des Hefe-Drei-Hybrid-Systems mit SNAP-tag. Abgebildet sind die beiden benötigten Fusionsproteine mit der DNA-Bindedomäne (LexA) und dem Aktivierungsdomäne (Gal4-AD) sowie das Benzylguanin-Derivat des Wirkstoffes. Dieses besteht aus dem spezifischen Wirkstoff, welcher über einen Linker an Benzylguanin (SNAP-tag) gebunden ist. Der an das Benzylguanin konjugierte Wirkstoff wird kovalent an das SNAP-Protein gebunden.

Eine bahnbrechende Weiterentwicklung des Hefe-Drei-Hybrid-Systems gelang der Gruppe um Kai Johnsson an der Eidgenössischen Technischen Hochschule Lausanne. [5] Sie fusionierten die DNA-Bindedomäne LexA mit dem sogenannten SNAP-Protein, einer Abwandlung des Enzyms O-6-Alkylguanin-alkyltransferase (vgl. Abb. 1). Es stellt eine Kupplung zwischen dem zu untersuchenden niedermolekularen Wirkstoff und der DNA-Bindedomäne dar. SNAP reagiert mit einem Benzylguaninkonjugat und bindet unter Abspaltung von Guanin den konjugierten Wirkstoff über eine Linker-Struktur kovalent an sich. Die Linker-Struktur verleiht dem Konstrukt einen gewissen Grad an Flexibilität. Das Novum dieses Systems stellt die Möglichkeit der regiospezifischen kovalenten Bindung eines kleinen Moleküls an ein Protein in einem Y3H-System dar. Für solche Vorhaben sind nur sehr wenige Systeme verfügbar. Das SNAP-tag System ist hier ein wertvolles Werkzeug, da es sich theoretisch auf jedes beliebige kleine Molekül anwenden lässt. [6]

Das Puzzle ist dann komplett und funktionsfähig, wenn der Wirkstoff mit einem zu identifizierenden Protein X wechselwirkt. Das Protein X ist wiederum Teil des zweiten Fusionsproteins und ist kovalent an die Transkriptionsaktivierungs-Domäne des Gal4-Transkriptionsaktivators gebunden. Kann das Protein X nun den Wirkstoff binden, so wird

letztlich der Transkriptionsfaktor rekonstituiert, so dass die Transkription des Reportergens ermöglicht wird. Die Funktionsfähigkeit des Konstrukts wird folglich allein durch die Wechselwirkung zwischen dem Wirkstoff und dem Protein X bestimmt. Somit eignet sich das Hefe-Drei-Hybrid-System, um zu testen, ob ein Wirkstoff an ein bestimmtes Protein bindet, wodurch letztlich Aussagen über dessen Wirkmechanismus möglich werden. Im Gegensatz zu einem in vitro Experiment, erlaubt dieser Test eine direkte Untersuchung von Wechselwirkungen innerhalb einer Zelle. [5]

Die Variation von verschiedenen Wirkstoffen unter Verwendung eines einzigen Proteins X kann neue Wirkstoffe zu Tage fördern, die spezifisch an das Protein X binden und es eventuell inaktivieren. Je nach Fragestellung kann ebenfalls nur das Protein X variiert werden.

Die benötigten Fusionsproteine werden nicht direkt in die Hefen eingeschleust. Vielmehr bringt man die für die Fusionsproteine codierende DNA mittels kleinen zirkulären DNA-Vektoren, so genannten Plasmiden, in die Hefezelle ein, wo die Fusionsproteine biosynthetisiert werden. Verwendet man eine DNA-Bibliothek, die für eine Vielzahl von verschiedenen Proteinen X codiert, so können parallel tausende von Wirkstoff-Protein-Interaktionen untersucht werden. Solche Protein-Bibliotheken erzeugt man, indem man die gesamte für Proteine codierende mRNA aus dem zu untersuchenden Gewebe isoliert und diese mittels eines viralen Enzyms, der reversen Transkriptase, in die entsprechende DNA umwandelt. Die so erhaltenen DNA Sequenzen (cDNA) werden spezifisch an die für die Gal4-AD codierende DNA angefügt. Jede Hefezelle produziert nun ein einzigartiges Fusionsprotein mit einem anderen Protein X. Das Benzylguanin-Derivat wird über das Kulturmedium in das System eingebracht. Konnten Hefen mit Wirkstoff-Protein X-Bindung durch Wachstum auf Selektivmedium identifiziert werden, so wird die DNA isoliert und durch Sequenzierung der DNA das Protein X identifiziert.

Leider können in der Realität auch Komplikationen auftreten, die falsche Ergebnisse liefern. So kann anstelle der spezifischen Wirkstoff-Protein X-Interaktion eine Komponente des Hybrid-System allein das Ablesen des Gens ermöglichen. Denkbar wäre ebenfalls, dass das Protein X unspezifisch an das SNAP-Protein bindet. Identifizierte Treffer müssen auf diese Möglichkeiten untersucht werden. [5]

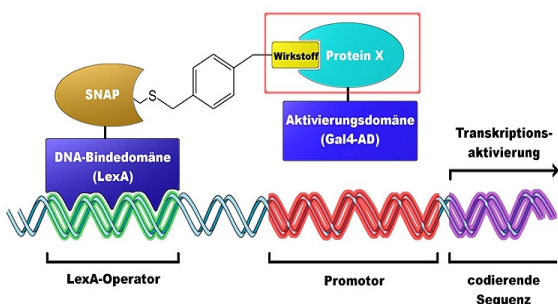


Abbildung 2: Funktionsfähiges Konstrukt des Hefe-Drei-Hybrid-Systems. Im roten Kasten ist die zu untersuchende Wechselwirkung zwischen dem Wirkstoff und dem Protein X gezeigt. Das SNAP-Protein hat unter Abspaltung von Benzylguanin den Wirkstoff kovalent gebunden.

Die Anwendung dieses neu entwickelten Hefe-Drei-Hybrid-Systems mit SNAP-tag ermöglichte die Identifikation eines Wirkortes des Wirkstoffes Sulfasalazin. Sulfasalazin ist eine entzündungshemmende Substanz, die bereits seit Jahrzehnten gegen chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn, aber auch gegen rheumatoide Arthritis eingesetzt wird, ohne den genauen Wirkmechanismus zu kennen. Sulfasalazin inhibiert ein Enzym namens Sepiapterin-Reduktase, das den finalen Schritt in der Biosynthese des Kofaktors Tetrahydrobiopterin katalysiert. Dieser enzymatische Kofaktor ist wiederum in verschiedene Biosynthesen von Hormonen und Neurotransmittern wie Serotonin

und Dopamin, aber auch in die Biosynthese von Stickstoffmonoxid involviert, das als bioaktives Molekül maßgeblich an der Auslösung von Entzündungsreaktionen beteiligt ist. Sulfasalazin stellt überdies eine Wirkstoff-Vorstufe dar. Die Spaltung von Sulfasalazin durch bakterielle Enzyme im Darm setzt weitere Wirkstoffe frei, die ebenfalls

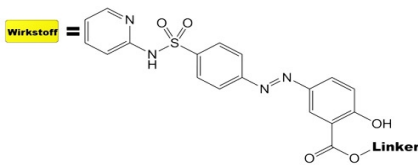


Abbildung 3: Chemische Struktur des Wirkstoffmoleküls Sulfasalazin.



entzündungshemmende Wirkungen zeigen. Auch die Bindung dieser Metabolite an die Sepiapterin-Reduktase und die damit einhergehende Inaktivierung des Enzyms konnten durch ein Hefe-Drei-Hybrid-System entdeckt und bestätigt werden. [5]

Das Hefe-Drei-Hybrid-System stellt ein großartiges Werkzeug zur Analyse von molekularen Interaktionen dar. Somit geben uns die kleinen und unscheinbar anmutenden Hefen die Möglichkeit, unsere Welt ein Stückchen besser zu verstehen.

Die Aufklärung von Wirkmechanismen pharmazeutischer Wirkstoffe verschafft uns eine Grundlage, mit deren Hilfe es uns vielleicht gelingt, diese weiter zu optimieren. Auch die Aufklärung von molekularen Wechselwirkungen in der Zelle, deren Bedeutung wir heute vielleicht noch gar nicht zu fassen vermögen, macht das System zukunftsfähig. Wenn Sie das nächste Mal bei einer zünftigen Brotzeit mit kühlem Bier und duftendem Brot, oder doch lieber abends auf der Terrasse beim Sonnenuntergang mit einem guten Glas Rotwein sitzen, dann sollten Sie sich klar machen, wem sie diese kulinarischen Genüsse eigentlich zu verdanken haben: Den Hefen, die noch zu so viel mehr fähig sind, als sich nur um unsere Gaumenfreuden zu kümmern.

Take-Home-Messages

- Hefezellen ermöglichen einen Einblick in die Welt der molekularen Interaktionen, beispielsweise zwischen Proteinen untereinander oder zwischen Proteinen und niedermolekularen Verbindungen.
- Das Hefe-Drei-Hybrid-System gleicht einem molekularen Puzzle, das aus drei Hybrid-Molekülen besteht. Zwei dieser Hybrid-Moleküle sind Fusionsproteine, die einmal eine DNA-Bindedomäne und einmal eine Transkriptionsaktivierungs-Domäne beinhalten.
- Im Hefe-Drei-Hybrid-System mit SNAP-tag von Kai Johnson et al. stellt das SNAP-Protein die zweite Domäne des DNA-bindenden Fusionsproteins dar. Dieses ermöglicht, über die Bindung von Benzylguanin, die gezielte kovalente Verknüpfung eines niedermolekularen Wirkstoffes bzw. dessen Benzylguanin-Derivates an das Fusionsprotein.
- Auf diese Weise konnte das Enzym Sepiapterin-Reduktase als Zielmolekül des Wirkstoffes Sulfasalazin identifiziert werden, der gegen chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn, aber auch gegen rheumatoide Arthritis eingesetzt wird.

Kontakt:	Schlauer Fuchs
 <p>Der Artikel wurde im Rahmen des Studienprojektes HighChem des Fachbereichs Chemie der Technischen Universität Darmstadt verfasst (s. Woche 2).</p> <p>Die Autoren, Fena Ochs und Daniel Degreif, sind Studierende des Faches Biomolecular Engineering (Master) an der TU Darmstadt</p> <p>(E-Mail: fena.ochs@gmx.de, dd89@gmx.net).</p>  <p>Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Harald Kolmar (E-Mail: kolmar@biochemie-tud.de).</p>	<p>Unsere Schlaue-Fuchs-Frage zu diesem Beitrag lautete:</p> <p>Was versteht man unter Fusionsproteinen?</p>

Literatur:

[1] Fields, S. and Sternglanz, R. (1994) The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. Trends Genet. 10, 286-292.

[2] Becker, F., Murthi, K., Smith, C., Come, J., Costa-Roldan, N., Kaufmann, C., Hanke, U., Degenhart, C., Baumann, S., Wallner, W., Huber, A., Dedier, S., Dill, S., Kinsman, D., Hediger, M., Bockovich, N., Meier-Ewert, S., Kluge, A. F. and Kley, N. (2004) A three-hybrid approach to scanning the proteome for targets of small molecule kinase inhibitors. Chem Biol. 11, 211-223.

[3] Bernstein, D. S., Buter, N., Stumpf, C. and Wickens, M. (2002) Analyzing mRNA-protein complexes using a yeast three-hybrid system. Methods. 26, 123-141.

[4] Stumpf, C. R., Opperman, L. and Wickens, M. (2008) Chapter 14. Analysis of RNA-protein interactions using a yeast three-hybrid system. Methods Enzymol. 449, 295-315.

[5] Chidley, C., Haruki, H., Pedersen, M. G., Muller, E. and Johnsson, K. (2011) A yeast-based screen reveals that sulfasalazine inhibits tetrahydrobiopterin biosynthesis. Nat Chem Biol. 7, 375-383.

[6] Keppler, A., Gendreizig, S., Gronemeyer, T., Pick, H., Vogel, H. and Johnsson, K. (2003) A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. Nat Biotech. 21, 86-89.