

Deutsches Institut für Ernährungsforschung

Abteilung Ernährungstoxikologie

**Optimierung der Expressionsstärke von
fremdstoffmetabolisierenden Enzymen in Bakterien und
permanenten Zellkulturen für toxikologische Untersuchungen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin „Molekulare Toxikologie“

Eingereicht an der

Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Potsdam

von

Mandy Osterloh-Quiroz

geboren am 07.09.1979 in Güstrow

Nuthetal, Juli 2006

Für meinen geliebten Opa Benno

Inhalt

INHALT	I
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Fremdstoffmetabolisierende Enzyme	1
1.1.1 Die SULT-Enzymsuperfamilie	2
1.1.2 rGSTT2	6
1.2 Gentoxizitätstestsysteme (<i>in vitro</i>).....	6
1.3 Heterologe Proteinexpression	7
1.3.1 RNA-Sekundärstrukturen	9
1.3.2 Korrelation von mRNA-Niveau und heterologer Proteinexpression	9
1.4 Codon Usage Bias.....	10
1.4.1 Seltene Codons und Translationseffizienz.....	11
1.4.2 Genregulatorische Funktion seltener Codons.....	12
1.4.3 Einfluss seltener Codons auf Tandem-Translation	13
1.5 Ziel der Arbeit	14
2 MATERIAL UND METHODEN.....	16
2.1 Material.....	16
2.1.1 Geräte / Gebrauchsmaterialien	16
2.1.2 Software	17
2.1.3 Chemikalien und Fertigmedien	17
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	18
2.1.5 Enzyme	20
2.1.6 DNA-Leitern	21
2.1.7 Plasmide	21
2.1.8 Bakterienstämme und Zelllinien.....	21
2.1.9 Antiseren.....	21

2.1.10	Reaktionskits.....	22
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	22
2.2.1	DNA-Sequenzierung.....	22
2.2.2	Elektrophorese von Nukleinsäuren.....	22
2.2.3	Herstellen kompetenter Zellen.....	23
2.2.4	Hybridisierung von Einzelstrangoligonukleotiden.....	23
2.2.5	Kryokonservierung.....	23
2.2.6	Ligation.....	23
2.2.7	Ortsgerichtete Mutagenese.....	23
2.2.8	Plasmid-DNA-Präparation.....	24
2.2.9	Bestimmung der relativen Plasmidkopienzahl.....	24
2.2.10	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	24
2.2.11	Real-Time PCR.....	25
2.2.12	Restriktionsverdau.....	25
2.2.13	Reverse Transkription.....	25
2.2.14	Bestimmung des relativen RNA-Niveaus.....	26
2.2.15	Transformation.....	26
2.2.16	Herstellung der cDNA-Konstrukte.....	26
2.3	Zellbiologische Methoden.....	29
2.3.1	Kultivierung von V79-Zellen.....	29
2.3.2	Transfektion von V79-Zellen mit SULT-Expressionsplasmiden.....	30
2.3.3	Zellernte.....	30
2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	30
2.4.1	β -Galactosidase-Assay.....	30
2.4.2	Herstellung subzellulärer Fraktionen aus <i>E. coli</i> und <i>S. typhimurium</i>	31
2.4.3	Herstellung subzellulärer Fraktionen aus V79-Zellen.....	31
2.4.4	Luciferase-Assay (Chemilumineszenzdetektion).....	32
2.4.5	Proteinbestimmung.....	32
2.4.6	SDS-PAGE.....	32
2.4.7	Western-Blot und Immundetektion.....	33
2.5	Toxikologische und Expressions-Testsysteme.....	33
2.5.1	Indikatorzellen.....	33
2.5.2	Genmutationstest in <i>S. typhimurium</i>	34

2.6	Analytik	35
2.6.1	Inkubation und Festphasenextraktion	35
2.6.2	HPLC-MS/MS.....	37
2.7	Statistik	38
3	ERGEBNISSE	39
3.1	Untersuchungen in Prokaryonten	39
3.1.1	Einfluss seltener Codons auf die 1A2*1-Expression.....	39
3.1.2	Sensitivität von TA1538-1A2*1 und -1A2*1Z4 im Ames-Test.....	44
3.1.3	Einfluss seltener Codons auf 1A1*1-Expression.....	45
3.1.4	Sensitivität von TA1538-1A1*1 und -1A1*1Y im Ames-Test.....	47
3.1.5	Einfluss seltener Codons auf die 2B1b-Expression	49
3.1.6	Tandem-Translation von 2B1b.....	62
3.1.7	Einfluss seltener Codons auf die Luciferase-Expression	65
3.1.8	Einfluss seltener Codons auf GSTT2-Expression.....	69
3.2	Untersuchungen in Eukaryonten.....	71
3.2.1	Konstruktion von pMPSV-1A1*1Yeu.....	71
3.2.2	Einfluss seltener Codons auf die 1A1*1-Expression.....	72
3.2.3	Sulfonierungsaktivität von 2B1b.....	73
3.3	Einfluss von mRNA-Sekundärstrukturen und Downstream Box (DB)	75
3.3.1	Einfluss seltener Codons auf die Stabilität von mRNA-Sekundärstrukturen	75
3.3.2	Einfluss seltener Codons auf den Consensus von DB und 16S rRNA	77
4	DISKUSSION	80
4.1	Einfluss seltener Codons auf die heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i> und <i>S. typhimurium</i>.....	80
4.1.1	Einfluss seltener Codons auf Plasmidkopienzahl und mRNA-Konzentration	83
4.1.2	Einfluss seltener Codons auf Stabilität von mRNA-Sekundärstrukturen.....	85
4.1.3	Einfluss seltener Codons auf Consensus von DB und 16S rRNA	87
4.1.4	CACA-Folgen erhöhen Effizienz der Translationsinitiation	89

4.1.5	Einfluss des GC-Gehaltes auf die Translationseffizienz	91
4.2	Einfluss seltener Codons auf die heterologe SULT Expression in V79-Zellen	91
4.3	Heterologe Expression der 2B1b in Bakterien	92
4.3.1	Einfluss seltener Codons auf Expression in <i>E. coli</i> und <i>S. typhimurium</i>	92
4.3.2	Tandem-Translation in <i>E. coli</i> und <i>S. typhimurium</i>	94
4.4	Sensitivität der SULT-optimierten Stämme im Ames-Test.....	96
4.5	Schlussbetrachtung.....	100
5	ZUSAMMENFASSUNG	101
6	ANHANG.....	103
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	105
6.2	Tabellenverzeichnis	106
6.3	Literaturverzeichnis	107
6.4	Publikationen.....	114
6.4.1	Artikel in Fachzeitschriften	114
6.4.2	Tagungsbeiträge	114
6.5	Curriculum Vitae.....	115
6.6	Danksagung.....	116

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CUB	codon usage bias
<i>C. griseus</i>	<i>Cricetulus griseus</i>
BPO	Benzo[a]pyrene 4,5-oxid
BSA	Bovines Serum Albumin
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESI	Elektrospray Ionisierung
FKS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
2-HEP E1	2-Hydroxyethylpyren Enantiomer 1 (+)
1-HMP	1-Hydroxymethylpyren
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
rGST-T2	ratten Glutathion-S-Transferase Theta 2
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
MRM	Multiple reaction monitoring
MS	Massenspektrometrie
OD	Optische Dichte
ONPG	<i>o</i> -Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
hSULT	humane cytosolische Sulfotransferase
TBST	Tris-gepufferte salzlösung mit Tween [®] 20
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenprozent

1 Einleitung

In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche *in vitro* Mutagenitätstestsysteme, zur Aufklärung der Fähigkeit einzelner Substanzen frühe Ereignisse in der Entstehung von Krebs auszulösen, entwickelt. Da insbesondere Fremdstoffe und ihre reaktiven Metabolite diese frühen Ereignisse (z.B. Bildung von DNA-Addukten) auslösen können und somit eine entscheidende Rolle bei der Krebsentstehung spielen, ist neben den verwendeten Indikatorzellen der Einsatz geeigneter Metabolisierungssysteme von grosser Bedeutung. In ersten *in vitro* Testsystemen, wie z.B. dem Ames-Test, wurde als metabolisierendes System S9-Mix von Rattenlebern verwendet¹. Als S9-Mix bezeichnet man den Überstand (supernatant 9000) von zentrifugiertem Gewebehomogenat, der mit Komponenten zur NADPH-Generierung angereichert wurde, um den Kofaktor für Cytochrome P450 zur Verfügung zu stellen. Es gibt jedoch zahlreiche Nachteile bei der Verwendung dieses Systems. So ist z.B. die Aktivierung durch Rattenleber-Enzyme nicht direkt auf die durch Humanleber-Enzyme übertragbar und S9 Mix von humanen Lebern ist nur sehr begrenzt verfügbar. Des Weiteren können ionische reaktive Metabolite (z.B. Schwefelsäureester), die in einem solchen externen System gebildet werden, nicht oder nur sehr begrenzt in die Indikatorzellen eindringen. Dadurch können in einem Mutagenitätstest mit externem Metabolisierungssystem falsch negative Ergebnisse entstehen. Moderne Methoden der Gentechnik ermöglichen jedoch heute die Expression verschiedener fremdstoffmetabolisierender Enzyme direkt in den Indikatorzellen. Im folgenden werden die für die vorliegende Arbeit relevanten fremdstoffmetabolisierenden Enzyme vorgestellt.

1.1 Fremdstoffmetabolisierende Enzyme

Der Metabolismus von Fremdstoffen wird in zwei Phasen unterteilt: Zum Phase-I-Metabolismus gehört die Umwandlung apolarer, lipophiler Stoffe in polare Stoffe durch das Einführen oder Freisetzen (Demaskieren) funktioneller Gruppen. Dies ermöglicht es den konjugierenden Enzymen des Phase-II-Metabolismus hydrophile Moleküle mit dem Fremdstoff zu konjugieren. In der Regel sind die Metaboliten des Phase-II-Metabolismus dann leichter ausscheidbar.

1.1.1 Die SULT-Enzymsuperfamilie

Die löslichen Sulfotransferasen (SULT) (E.C.2.8.2) werden aufgrund ihrer Sequenzhomologie zur SULT-Enzymsuperfamilie zusammengefasst². Für den Menschen sind zwölf SULT-Gene bekannt, die für 13 Enzymformen kodieren. Alle bekannten SULT-Enzyme katalysieren den Transfer der Sulfonylgruppe ihres Ko-Substrates 3' Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS)^{3,4} auf nucleophile Gruppen wie z.B. Amino- oder Hydroxylgruppen von endogenen (z.B. Steroidhormone) und exogenen Substraten (z.B. Arzneimittel und andere)⁵. Die Bindestelle für das Ko-substrat ist bei allen fremdstoffmetabolisierenden SULT konserviert⁶.

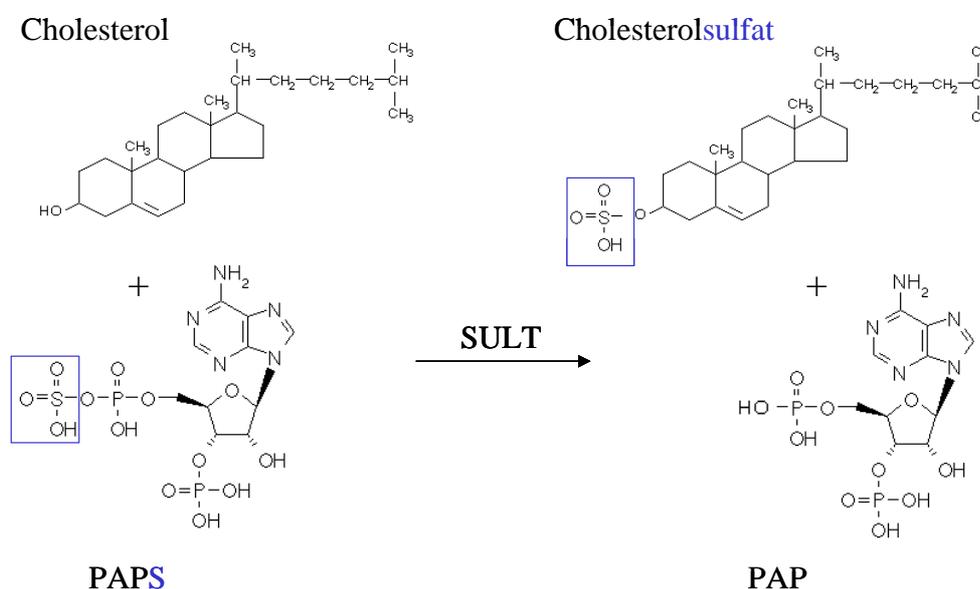


Abbildung 1-1 Sulfonierung von Cholesterol durch hSULT2B1b
Reaktionschema löslicher Sulfotransferasen und ihres Ko-substrates
PAPS am Beispiel der hSULT2B1b und ihrem Substrat Cholesterol.

Für die systematische Bezeichnung der löslichen Sulfotransferasen wurde ein Nomenklatorsystem basierend auf Aminosäuresequenzidentitäten entwickelt. Die Abkürzung SULT wird als Gensymbol verwendet, gefolgt von einer Ziffer für die Familie (mindestens 45 % Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz), einem Großbuchstaben für die Subfamilie (mindestens 60 % Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz) und einer Ziffer für das individuelle Enzym innerhalb einer Subfamilie. Die Vergabe der Ziffern und Buchstaben erfolgt dabei im Allgemeinen alphabetisch entsprechend der Reihenfolge der Identifizierung, mit einigen Ausnahmen aus Rücksicht auf historisch bereits etablierte Bezeichnungen⁷. Durch einen Präfix vor

dem systematischen Namen wird die Spezies angegeben (h für human). Da in dieser Arbeit ausschließlich humane SULT verwendet wurden, werden die Enzyme im folgenden nur mit der Nomenklatur für Familie, Subfamilie und das individuelle Enzym bezeichnet. Auf die Abkürzung für die Spezies und das Gensymbol wird verzichtet.

Viele hydrophobe Fremdstoffe werden in der Phase II des Fremdstoffmetabolismus durch Sulfonierung oder Glucuronidierung mit negativ geladenen Gruppen konjugiert. Diese Konjugate besitzen eine erhöhte Wasserlöslichkeit, welche die passive Permeation von Zellmembranen behindert und somit die Exkretion erleichtert. Außerdem wird die Membranpermeation durch die negative Ladung dieser Metabolite erschwert. In Abhängigkeit von der Struktur des Zielmoleküls kann dies jedoch auch zur metabolischen Aktivierung von endogenen Substraten und Pharmaka führen⁸. So kann es insbesondere bei der Sulfonierung von allylischen und benzyllischen Alkoholen sowie aromatischen Hydroxylaminen zur Bildung instabiler Metaboliten kommen. Durch heterolytische Abspaltung von Sulfationen entstehen Carbenium- bzw. Nitreniumionen. Diese mesomeriestabilisierten Kationen sind hochreaktiv gegenüber zellulären Nucleophilen wie z.B. der DNA⁹.

1.1.1.1 Die humane Sulfotransferase 1A1

Die 1A1 wird auch bezeichnet als Phenol-SULT oder „Phenol Preferring SULT“ (P-PST) und ist auf dem Chromosomenabschnitt 16 p12.1-11.2 kodiert. Für dieses Enzym wurden mehrere Polymorphismen beobachtet. Der prominenteste Polymorphismus basiert auf einem Einzelnucleotidpolymorphismus an Position 638 im 1A1 Gen. Hier gibt es eine Transition von G zu A, was in der Aminosäuresequenz zu einem Arg²¹³->His Austausch führt und in Kaukasiern zu 31-37 % (pro Allel) beobachtet wurde¹⁰⁻¹³. Dieses Allel wird als 1A1*2 bezeichnet, während die häufigste Variante mit 1A1*1 bezeichnet wird. In dieser Arbeit wurde nur die am häufigsten vorkommende Variante 1A1*1 verwendet. Die 1A1 wird *in vivo* am stärksten in der Leber und im Dünndarm, weniger stark jedoch auch in vielen anderen Geweben exprimiert¹⁴. Wie zuvor erwähnt kann die Sulfokonjugation mit der Bioaktivierung von Prokanzerogenen assoziiert werden. Für den Nachweis der Bioaktivierung durch einzelne hSULT werden sowohl prokaryontische als auch eukaryontische *in vitro* Testsysteme benötigt.

So konnten bereits verschiedene Varianten der 1A1 (u.a. 1A1*1) heterolog in verschiedenen Expressionssystemen (*S. typhimurium* und V79-Zellen) auf hohem Niveau exprimiert und eine Bioaktivierung verschiedener Prokanzerogener Substanzen gezeigt werden¹⁵⁻¹⁹.

1.1.1.2 Die humane Sulfotransferase 1A2

Die 1A2 wird auch als P-PST 2 bezeichnet und das Gen ist lokalisiert auf dem Chromosomenabschnitt 16 p12.2 nahe des hSULT1A1 Gens. Ebenso wie für die 1A1 (s. 1.1.1.1) sind auch für die 1A2 verschiedene polymorphe Varianten bekannt. Der häufigste Polymorphismus beruht hier auf 2 Basensubstitutionen (T²⁰->C und A⁷⁰⁶->C) welche jeweils zu einem Aminosäureaustausch (Ile⁷->Thr und Asn²³⁵->Thr) führen. Die Referenzform wird als 1A2*1 und die zweithäufigste Form als 1A2*2 bezeichnet. Die katalytische Aktivität der beiden Formen wird durch die Aminosäureaustausche nicht signifikant verändert.

In Mutagenitätsexperimenten (Ames-Test)^{1,20}, durchgeführt mit rekombinanten *S. typhimurium* Stämmen, die verschiedene allelische Varianten der 1A2 (*1 und *2) exprimieren, konnte ein hohes Potential für die Aktivierung von N-hydroxylierten aromatischen Aminen zu Mutagenen gezeigt werden²¹. Auch konnten signifikante Unterschiede in der Aktivierung durch die verschiedenen allelischen Varianten beobachtet werden. So wurde z.B. N-hydroxy-2-acetylaminofluoren von der 1A2*1 Form mit 7-fach höherer Effizienz aktiviert als durch die 1A2*2. Allerdings zeigte die Analyse der SULT-Proteinexpression auch eine 2,5-fach höhere Expression der 1A2*1 in dem verwendeten *S. typhimurium* Stamm. Um den Einfluss des Expressionsniveaus auf die Mutagenität genauer beurteilen zu können, sollte das Expressionsniveau der beiden 1A2-Varianten in den Test-Stämmen angeglichen werden. Versuche, die Expression von 1A2*2 in dem verwendeten *S. typhimurium* Stamm zu steigern, schlugen fehl. Barnes *et al* hatten gezeigt, dass synonyme Codon-Austausche am 5'-Ende der cDNA von P450 Enzymen deren Expressionsniveau in Bakterien veränderten²². In diesen Untersuchungen zeigte sich, dass Codons, die im Genom von Prokaryonten nur sehr selten vorkommen, die heterologe Expression negativ beeinflussen^{23,24}. Daher wurde versucht, das Expressionsniveau der 1A2*1 durch Austausch von in *S. typhimurium* häufiger verwendeten Codons durch seltene synonyme zu verringern. Entgegen diesen Erwartungen konnte jedoch durch den Austausch von häufigen gegen seltene Codons am 5'-Ende der 1A2*1-cDNA eine 3-fache Expressionsteigerung beobachtet werden. Der Austausch dieser Codons in der

1A2*2-cDNA führte zu einer noch stärkeren Erhöhung der Expression (1A2*2Y), so dass jetzt äquivalente Expressionsniveaus in *S. typhimurium* vorhanden waren. Erneute Mutagenitätstest mit den codonmanipulierten Stämmen 1A2*1Z und 1A2*2Y zeigten eine 4,7-fach höhere Aktivierungseffizienz der 1A2*1 gegenüber der gleichstark exprimierten 1A2*2.

1.1.1.3 Die humane Sulfotransferase 2B1

Die 2B1 wird auch zu den Hydroxysteroidsulfotransferasen gezählt. Das entsprechende Gen befindet sich auf dem Chromosomenabschnitt 19 q13.3 und besteht aus den Exons 1A, 1B und 2-6. Es kodiert für zwei Proteine, die als 2B1a und 2B1b bezeichnet werden. Die Aminosäuresequenz der beiden Enzyme stimmt zu 94 % überein; sie unterscheidet sich lediglich am N-Terminus aufgrund der alternativen ersten Exons und verschiedener Transkriptionsstartpunkte²⁵. Die 2B1a-mRNA besteht aus den Exons 1A und 2-6, während die 2B1b-mRNA durch Spleißen des Exons 1B, den letzten 143 bp von Exon 1A und den Exons 2-6 entsteht. So besteht der einzige individuelle Sequenzabschnitt der 2B1a nur aus den ersten acht Aminosäuren des Exons 1A. Die 2B1b besitzt 23 individuelle Aminosäuren kodiert im Exon 1B²⁶. Die beiden Enzyme besitzen unterschiedliche Substratspezifitäten: 2B1a sulfoniert mit hoher Effizienz Pregnenolon und mit sehr geringer Effizienz Cholesterol, während 2B1b bevorzugt Cholesterol sulfoniert und mit etwas geringerer Effizienz Pregnenolon. Das Deletieren der 53 C-terminalen Aminosäuren, die beide Formen gemein haben, bewirkte keinerlei Veränderung der katalytischen Aktivität. Ebenso war die katalytischen Aktivität der 2B1a ohne die individuellen acht Aminosäuren am N-Terminus unverändert. Dagegen zeigte die Deletion der 23 individuellen Aminosäuren am N-Terminus der 2B1b mittels ortsspezifischer Mutagenese, dass dieser Bereich essentiell für die Sulfonierung von Cholesterol ist²⁵.

Die Expression der mRNA beider 2B1-Formen konnte *in vivo* mit RT-PCR nachgewiesen werden. Während die 2B1b-mRNA in vielen humanen Geweben nachgewiesen wurde, ist die Expression von 2B1a auf wenige Organe beschränkt, wie z.B. Kolon, Ovarium oder fötales Hirn^{27,28}. Auf Proteinebene (Western Blot) konnte nur die Expression der 2B1b nachgewiesen werden und scheint somit die physiologisch relevantere Form in humanen Geweben zu sein²⁹. Da jedoch auch die Expression der 2B1b in Geweben sehr gering ist, wurden beide 2B1-Enzyme für Studien zur Enzymaktivität heterolog in Bakterien exprimiert. Unter Verwendung der ursprünglichen cDNA-Sequenzen ist die Expression der 2B1a-Form in den Bakterien *E. coli* und

S. typhimurim sehr gut. Die Expression der 2B1b ist jedoch kaum detektierbar. Durch das Einführen von sechs N-terminalen Histidin-Resten (His-Tag) konnte die Expression der 2B1b erhöht werden, jedoch veränderte dies auch die Aktivität des Enzyms gegenüber Cholesterol³⁰.

1.1.2 rGSTT2

Die cytosolischen Glutathion-S-Transferasen (GST) (EC 2.5.1.18) gehören ebenso wie die Sulfotransferasen zu den fremstoffmetabolisierenden Enzymen der Phase II. Sie katalysieren die Substitution elektronenziehender Halogen-, Sulfat-, Phosphat- und Nitrogruppen durch Glutathion (GSH, γ -Glutamylcysteinylglycin) an gesättigten Kohlenstoffatomen. Durch diese Reaktion können einige GST z.B. von SULT gebildete reaktive Metabolite detoxifizieren.

Die GST werden entsprechend ihrer immunologischen und enzymatischen Eigenschaften sowie Sequenzübereinstimmungen in zwölf Spezies-unabhängige Klassen eingeteilt: Alpha, Beta, Delta, My, Phi, Pi, Tau, Theta, Omega, Kappa und Zeta³¹. Es sind drei Formen der GST-Theta Klasse bekannt: GSTT1, -T2 und -T3^{32,33}. Die GSTT2 der Ratte katalysiert die spezifische Bioinaktivierung von Sulfoxymethylarenen, den reaktiven Metaboliten von Hydroxymethylarenen³⁴. Für die humane und die Ratten-GSTT2 konnte eine Inaktivierung von *N*-Acetoxy-Derivaten, Metabolisierungsprodukte des kanzerogenen heterozyklischen Amins 1-Methyl-6-phenyl-imidazo[4,5-*b*]pyridin (PhIP), gezeigt werden³⁵.

1.2 Genotoxizitätstestsysteme (*in vitro*)

Zur Untersuchung potentiell genotoxischer Substanzen mittels *in vitro* Testsystemen haben sich zahlreiche Methoden, die frühe Ereignisse in der Entstehung von Tumoren untersuchen, etabliert. Zu den *in vitro* nachweisbaren „frühen Ereignissen“ gehören: (1) Genmutationen (der Nachweis erfolgt aufgrund vererbbarer physiologischer Funktionsänderungen in Folge von Mutationen ganz bestimmter Gene)^{1,36,37}, (2) Chromosomen-Aberrationen (numerische oder strukturelle Veränderungen von Chromosomen)³⁸, (3) Schwesterchromatidaustausche (SCE)^{39,40}, (4) Mikrokernbildung⁴¹, (5) DNA-Reparatursynthese (UDS)⁴², (6) DNA-Addukte^{43,44}, (7) DNA-Strangbrüche⁴⁵. Als Indikatorzellen werden sowohl Bakterien (z.B. *E. coli*, *S. typhimurium*) als auch Säugerzellen (z.B. V79) verwendet. Es ist also möglich, diverse genotoxische Endpunkte mittels *in vitro* Testsystemen nachzuweisen.

Allerdings sind die meisten genotoxischen Stoffe keine direkten Mutagene, sondern werden erst durch fremdstoffmetabolisierende Enzyme „aktiviert“⁴⁶. Bei vielen Indikatorzellen jedoch fehlt die Expression solcher fremdstoffmetabolisierender Enzyme^{47,48}. Als Ersatz wird z.B. im Ames-Test S9-Mix von Ratten (oder humanen) Lebern eingesetzt, allerdings sind einige reaktive (ionische) Metabolite nur schlecht membrangängig, so dass ein externes Metabolisierungssystem nicht immer ausreichend ist. Dies erfordert die heterologe Expression fremdstoffmetabolisierender Enzyme direkt in den Indikatorzellen der *in vitro* Testsysteme⁴⁸.

1.3 Heterologe Proteinexpression

Zum besseren Verständnis der speziellen Aspekte der heterologen Proteinexpression werden im Folgenden zunächst die wichtigsten Punkte der Proteinbiosynthese am Beispiel der bakteriellen Translation erläutert.

Die Proteinbiosynthese findet an großen makromolekularen Ribonukleinkomplexen, den Ribosomen, statt und wird als Translation bezeichnet. Die Translation kann sowohl bei Prokaryonten als auch bei Eukaryonten in vier Phasen unterteilt werden: Initiation, Elongation, Termination und Ribosomen-Regenerierung. Die Hauptprozesse der Translation sind universell konserviert, aber im Gegensatz zu den sehr komplexen Translationsprozessen in Eukaryonten sind bei der bakteriellen Proteinsynthese nur relativ wenige Faktoren involviert^{49,50}. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der bakteriellen Translation ist die Initiation, die durch die Ribosomen bereits während der Transkription an der mRNA erfolgt. Die prokaryontischen 70S Ribosomen bestehen aus zwei Untereinheiten (30S und 50S), besitzen drei tRNA Bindungsstellen: Aminoacyl (A)-, Peptidyl (P)- und Exit (E)-Stelle und bestehen zu ca. zwei Dritteln aus rRNA und einem Drittel aus Protein⁵¹. Die mRNA sind bei Prokaryonten in der Regel polycistronisch, und die Initiation erfolgt an verschiedenen Translationsstartpunkten. Als Startcodon werden in *E. coli* neben „ATG“ (90 %), auch „GTG“ (8 %) und „TTG“ (1 %) verwendet⁵². Des Weiteren wird für die Initiation eine Ribosomenbindestelle (RBS) benötigt. Diese erstreckt sich über ca. 30 bp am 5'-Ende der mRNA und wird bei der Initiation vom Ribosom abgedeckt⁵³. In der 5'UTR (untranslatierte Region) der mRNA befindet sich die Shine-Dalgarno-Sequenz (SD), diese dient der Basenpaarung mit der 16S rRNA der 30S Untereinheit des Ribosoms und reguliert somit die korrekte Positionierung der Initiations-tRNA (fMet-tRNA^{Met}) an der ribosomalen Peptidyl-tRNA-Bindestelle⁵⁴. Die SD-Sequenz (GGAGG) von *E. coli*-mRNA befindet sich in der Regel

7 (+/-2) bp 5' vor dem Initiationscodon⁵⁵. Sie ist komplementär zur stark konservierten 3' 16S rRNA Sequenz. Je größer der Consensus von SD-Sequenz und 16S rRNA, umso stärker ist die SD-Sequenz, d.h. umso effizienter ist die Ribosomenbindung⁵⁴. Ebenfalls in der 5'UTR, noch vor der SD-Sequenz, befindet sich eine pyrimidinreiche Region, die mit dem ribosomalen Protein S1 interagiert und als Ribosomen-Erkennungsstelle dient⁵⁶. Ferner wird eine Region 3' (ca. +15 bis +26) nach dem Initiationscodon beschrieben, die in vielen prokaryontischen mRNA nachgewiesen werden konnte und die die Effizienz der translationsinitiiierenden Region stark beeinflusst. Diese sogenannte DB-Sequenz („downstream box“) ist ähnlich der SD-Sequenz komplementär zu einem Abschnitt in der Helix 44 der 16S rRNA (bp 1469-1483). Je größer die Übereinstimmung zwischen DB-Sequenz einer mRNA und der 16S rRNA, umso effizienter ist die Initiation der Translation⁵⁷. Die Kontrolle der Translations-Initiation erfolgt mit Hilfe der Initiationsfaktoren IF1, IF2 und IF3. Diese dirigieren, durch Bindung an die ribosomalen Untereinheiten, die korrekte Anordnung des Initiationskomplexes bestehend aus der mRNA, der Initiations-tRNA und der 30 S Untereinheit des Ribosoms. Die Elongationsphase der bakteriellen Translation wird durch die Elongationsfaktoren EF-Tu und EF-G gesteuert⁵⁸. Sie liefern während jedes Elongationszykluses die benötigten Aminoacyl-tRNAs in Form eines GTP-Komplexes und katalysieren die Translokation des Elongationskomplexes entlang der mRNA. Mit dem Erreichen des Stopcodons auf der mRNA dissoziiert der Ribosomkomplex in seine Bestandteile. Dies wird wiederum von den Release-Faktoren RF-1, RF-2 und RF-3 katalysiert⁵⁸.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen pro- und eukaryontischer Translation besteht darin, dass die Translation bei Bakterien bereits während der Transkription an der gerade entstehenden mRNA initiiert wird. Dadurch sind bei den Prokaryonten die Transkription und die Translation sehr eng aneinander gekoppelt. Bei Eukaryonten hingegen sind Transkription und Translation räumlich getrennt. Die Transkription erfolgt im Zellkern während die Translation am Endoplasmatischen Reticulum erfolgt. Außerdem gibt es bei Eukaryonten oft splicing Prozesse an der mRNA bevor diese translatiert wird. Ein weiterer fundamentaler Unterschied besteht darin, dass bei Prokaryonten meist polycistronische mRNA gebildet werden, so dass mehrere Gene ko-transkribiert werden können, während die mRNA bei Eukaryonten in der Regel monocistronisch sind. Dies ist darauf zurückzuführen, dass prokaryontische Ribosomen an unterschiedlichen Stellen an die mRNA binden können. Eukaryontische Ribosomen hingegen binden nur am 5'-Ende der mRNA⁵⁹. Ein weiterer wichtiger

Unterschied ist der unterschiedliche Einfluss von mRNA-Sekundärstrukturen auf die Translationsregulation bei Pro- und Eukaryonten. Dieser Aspekt wird im folgenden weiter erläutert.

1.3.1 RNA-Sekundärstrukturen

Die Interaktion von Ribosom und mRNA wird entscheidend von möglichen mRNA-Sekundärstrukturen beeinflusst^{60,61}. Für die erfolgreiche Translation einer mRNA ist deren vollständige Auffaltung nötig. Eventuelle Sekundärstrukturen würden die Translation behindern. Noller *et al* zeigten, dass das Ribosom selbst über Helikaseaktivität verfügt und die mRNA auffalten kann. Es wurde gezeigt, dass mRNA-Sekundärstrukturen downstream mittels einer Translations-gekoppelten Helikaseaktivität aufgetrennt wurden, während upstream Sequenzen bereits translatiert wurden⁶². Somit stellen interne mRNA-Sekundärstrukturen kein Hindernis für die Translation da. Problematisch sind allerdings stabile Sekundärstrukturen am 5'-Ende der zu translatierenden mRNA, da sie die Initiation der Translation inhibieren können. Eine solche Inhibition der Translationsinitiation durch stabile Sekundärstrukturen kann teilweise durch eine besonders starke SD-Sequenz in der 5'UTR aufgehoben werden⁶³. Die Inhibition der Translationsinitiation durch mRNA-Sekundärstrukturen wurde *in vitro* zwar sowohl für prokaryontische als auch für eukaryontische mRNA gezeigt, *in vivo* scheint sie jedoch eine größere Rolle bei den Prokaryonten zu spielen⁶⁴⁻⁶⁶. Dafür spricht auch die Beobachtung, dass *E. coli*-mRNA am 5'-Ende im allgemeinen sehr adeninreich sind, was die Bildung von stabilen Sekundärstrukturen minimiert⁶⁷. Im Gegensatz dazu haben eukaryontische 5'UTR Sequenzen meist einen hohen GC-Gehalt, der die Bildung stabiler Sekundärstrukturen begünstigt⁶⁸.

1.3.2 Korrelation von mRNA-Niveau und heterologer Proteinexpression

Verschiedene Methoden zur Erhöhung der Proteinexpression beruhen auf einer gesteigerten Transkriptionsrate und führen somit zu einer Erhöhung der entsprechenden mRNA-Konzentration in der Zelle. Ein Beispiel dafür ist das *E. coli*-BL21-Expressionssystem. Dieses verwendet an Stelle des durch Galactose oder chemische Analoga induzierbaren *lacZ*-Promotors von *E. coli* den wesentlich stärkeren Promotor des Bakteriophagen T7. Die T7-RNA-Polymerase synthetisiert mRNA schneller als *E. coli*-RNA-Polymerasen, wodurch sich die mRNA-Konzentration in der Zelle erhöht⁶⁹. Ebenfalls zu einer Erhöhung der mRNA-Konzentration führen Methoden, die die mRNA stabilisieren. Im *E. coli* BL21 (DE3) Stamm werden beide

Methoden miteinander kombiniert und zusätzlich Proteasen gehemmt. Die *E. coli* BL21 (DE3) Zellen besitzen eine Mutation im RNaseE-codierenden Gen (*rne131*). Diese Mutation bewirkt einen Funktionsverlust der C-terminalen Domäne der RNaseE. Diese Domäne ist essentiell für die Degradation von mRNA, aber entbehrlich für das rRNA processing. Dadurch wird eine erhöhte Stabilität der mRNA erreicht, ohne das rRNA processing zu beeinträchtigen⁷⁰.

Es gibt jedoch auch Beispiele bei denen das mRNA-Niveau nicht mit dem Expressionsniveau des entsprechenden Proteins korreliert. So haben z.B. Lakey *et al* publiziert, dass sie die Expression des *Mycobacterium tuberculosis* Antigen 85B in *E. coli* durch synonyme Codonaustausche (s. 1.4) in dem entsprechenden Gen 54-fach steigern konnten. Gleichzeitig erhöhte sich die Menge der entsprechenden mRNA nur maximal 2.5-fach. Dies spricht dagegen, dass die erhöhte Proteinexpression auf eine Erhöhung der mRNA-Produktion bzw. deren Stabilität zurückzuführen ist. Vermutlich wurde die Erhöhung der Proteinexpression durch eine gesteigerte Effizienz der Translation erzielt²⁴. Bei einer erhöhten Translationseffizienz wird, durch die Bindung des Ribosoms, die mRNA vor dem Abbau geschützt und es ist eine leichte Erhöhung der mRNA Konzentration zu beobachten^{71,72}.

1.4 Codon Usage Bias

Für die meisten Aminosäuren ist der genetische Code degeneriert, d.h. dieselbe Aminosäure kann durch mehrere unterschiedliche Codons codiert werden. Es sind jedoch nicht alle möglichen Codons mit der Information für dieselbe Aminosäure auch gleich häufig vertreten. So gibt es z.B. für Leucin sechs verschiedene Codons und trotzdem wird in *E. coli* in 50 % der Fälle Leucin nur mit dem Codon CTG codiert. Die restlichen fünf Leucin-Codons werden nur in 5-12 % der Fälle verwendet. Diese bevorzugte Verwendung bestimmter Codons des degenerierten genetischen Codes wird als „codon usage bias“ (CUB) bezeichnet und variiert zwischen verschiedenen Organismen. Ähnliche Organismen wie *E. coli* und *S. typhimurium* besitzen auch ein ähnliches CUB, d.h. die Verwendung bestimmter Codons unterscheidet sich in der Regel nur um wenige Prozentpunkte. Zwischen weiter entfernten Organismen gibt es auch größere Unterschiede bezüglich des CUB. So ist z.B. das häufigste der vier Prolin-Codons in *E. coli* und *S. typhimurium* jeweils CCG mit 53 % bzw. 55 %. Beim Menschen und auch beim Chinesischen Hamster ist CCG jedoch mit 11% bzw. 8 % das am seltenste in mRNA vorkommende Prolin-Codon, stattdessen findet sich am

häufigsten das Codon CCC (33 % bzw. 32 %) ⁷³. Es gibt also eine unterschiedliche Präferenz für bestimmte Codons in verschiedenen Organismen, wobei jeweils die meisten Gene innerhalb eines Genoms die gleiche Codierungsstrategie verfolgen und ähnliche Codons bzw. degenerierte Basen verwenden ⁷⁴⁻⁷⁶. Demzufolge gibt es keine universell optimalen Codons.

1.4.1 Seltene Codons und Translationseffizienz

Dass die Verwendung bestimmter Codons des degenerierten Codes von entscheidender Bedeutung für die Translation ist, konnte durch die Analyse der entsprechenden tRNA gezeigt werden. Ikemura *et al* haben die relativen Konzentrationen verschiedener tRNA in *E. coli* und *S. cerevisiae* gemessen. Das Ergebnis war eine mehr als 10-fache Differenz in der Zusammensetzung der individuellen tRNA Pools (Relation der verschiedenen tRNA). Ein Vergleich der tRNA Verteilung und der Codon Usage stark exprimierter Gene dieser Organismen zeigte, dass häufig verwendete Codons mit einer hohen Konzentration der entsprechenden tRNA korrelieren ⁷⁷. Die tRNA für häufig verwendete Aminosäuren (z.B. Glycin und Alanin) liegen jeweils in hoher Konzentration in der Zelle vor. Für alle Aminosäuren, die durch mehrere Codons kodiert werden, ist der tRNA Pool an das Codon adaptiert, welches am häufigsten verwendet wird. In mehrzelligen Eukaryonten ist die Analyse der Codon Usage jedoch aufgrund der zellulären Differenzierung wesentlich komplizierter. In Abhängigkeit der Funktion einzelner Gewebe ändern sich auch die bevorzugten Codons. Eine Analyse der Gensequenzen von Immunglobulinen, Globulinen und Peptidhormonen zeigte, dass die Codon-Verteilung in mehrzelligen Eukaryonten sich sowohl von der in Prokaryonten als auch von einzelligen Eukaryonten, wie z.B. in *S. cerevisiae*, unterscheidet ⁷⁴⁻⁷⁶. Im Allgemeinen werden von mehrzelligen Eukaryonten Codons bevorzugt, die auf C oder G enden ⁷⁸. Eine weitere Besonderheit der mehrzelligen Eukaryonten ist die sogenannte „funktionelle tRNA-Adaptation“. Diese konnte in vielen spezialisierten Geweben wie z.B. Brustdrüse, Lymphozyten und Retikulozyten nachgewiesen werden ⁷⁹⁻⁸¹. Es handelt sich dabei um die Änderung des tRNA-Pools in Anpassung an die Änderungen der mRNA Population einer Zelle ⁸². Dabei ändert sich die Zusammensetzung des tRNA-Pools in Anpassung an die jeweils dominierenden mRNA Spezies bzw. deren Codonsequenz.

Durch die Analyse von Codon-Sequenzen bekannter *E. coli* Gene und den entsprechenden mRNA-Niveaus konnte bereits 1982 ein Zusammenhang zwischen der Transkriptionseffizienz und der Verwendung bestimmter Codons gezeigt werden ⁸³. Da

für viele *E. coli* Gene auch die zelluläre Konzentration der Translationsprodukte bekannt war, deuteten weitere Autoren an, dass die Bevorzugung bestimmter Codons direkt mit dem Expressionsniveau eines Gens korreliert⁸⁴⁻⁸⁶. Dieser Zusammenhang wurde später auch mit Microarray-Daten für *E. coli* dokumentiert^{87,88}. Noch deutlicher als in *E. coli* wird jedoch diese Korrelation in *S. cerevisiae*. Die Bevorzugung bestimmter Codons in stark exprimierten Genen ist in dem Eukaryonten noch höher als in dem Prokaryonten⁸⁹. Allerdings unterscheiden sich die bevorzugten Codons dieser beiden Organismen voneinander⁹⁰. Für die Expression heterologer (z.B. humaner) Gene in Bakterien spielen die im Gen verwendeten Codons eine entscheidende Rolle bei der Translationseffizienz. Aufgrund der bereits erwähnten Unterschiede in der Codon Usage zwischen Prokaryonten und Eukaryonten, kommt es häufig vor, dass ein Gen, welches heterolog in Bakterien exprimiert wird, zahlreiche Codons enthält, die in Prokaryonten sehr selten sind. Ein Beispiel dafür sind die Arginin-Codons AGG und AGA. Der genetische Code ist für diese Aminosäure sechsfach degeneriert. In humanen Genen wird Arginin zu 20 % bzw. 21 % von diesen Codons kodiert. In *E. coli* beträgt die Häufigkeit dieser beiden Codons nur 2 % bzw. 4 %⁷³. Die entsprechenden tRNA Arg4 (AGA/AGG) und Arg5 (AGG) machen nur 13 % bzw. 6 % des gesamten Arginin tRNA-Pools (Arg1-5) aus⁹¹. Dies führt zu einer verlangsamten Translation bei der Expression humaner Gene in *E. coli* und vermindert somit deren Expressionsstärke²³. Neben den Arginin-Codons gibt es weitere Beispiele (u.a. Leucin, Isoleucin und Prolin) für Codons mit unterschiedlicher Häufigkeit in prokaryontischen und eukaryontischen mRNA, wodurch die heterologe Expression erschwert wird^{92,93}.

1.4.2 Genregulatorische Funktion seltener Codons

Neben der Behinderung der Translation durch seltene Codons aufgrund der entsprechenden seltenen tRNA wird auch eine genregulatorische Funktion dieser Codons diskutiert. So wurde von Chen *et al* beobachtet, dass seltene Codons, wie z.B. die Arginin-Codons AGA und AGG innerhalb der ersten 25 bp eines Gens signifikant häufiger vorkommen als in den Gensequenzen, die weiter 3' liegen. Durch das Einfügen von ein bis fünf AGG Codons an verschiedenen Positionen des *lacZ*-Gens von *E. coli*, konnten sie zeigen, dass diese seltenen Codons die Expression negativ beeinflussen und mit zunehmender Anzahl eingefügter AGG-Codons die Expression abnahm. Allerdings konnte der negative Einfluss der seltenen Codons durch eine Vergrößerung des Abstands zwischen dem Startcodon und den AGG Codons reduziert werden. Diese Ergebnisse indizieren, dass seltene Codons in Abhängigkeit von ihrer

Position in der mRNA eine wichtige Rolle bei der Genexpression spielen, indem sie die Stabilität des Initiationskomplexes bei der Proteinsynthese modulieren. In einer späteren Publikation konnte dann auch gezeigt werden, dass verschiedene essentielle Gene die ein einzelnes AGA- oder AGG-Codon in unmittelbarer Nähe zum Startcodon enthalten, allgemein durch die Verfügbarkeit der entsprechenden tRNA (ArgUCU/CCU) reguliert werden^{94,95}. Einen weiteren Beleg für die genregulatorische Funktion seltener Codons wurde durch Versuche von Elf *et al* geliefert^{91,96}. Sie fanden heraus, dass synonyme tRNA, die für die gleiche Aminosäure kodieren, bei Mangel der entsprechenden Aminosäure mit unterschiedlicher Präferenz beladen werden. Unter idealen Bedingungen sind alle tRNA in gleichem Maße beladen und Gene mit seltenen Codons sind in ihrer Expression benachteiligt, da die entsprechend beladenen tRNA ebenfalls selten sind. Gibt es jedoch eine Mangelsituation, werden die jeweils selteneren tRNA bevorzugt mit der entsprechenden Aminosäure beladen. In dieser Situation sind dann die Gene in der Expression bevorteilt, die seltener Codons beinhalten. Dadurch kann die Expression von Genen, die eine essentielle Funktion bei Aminosäuremangel haben, gezielt in genau dieser Mangelsituation hochreguliert werden.

1.4.3 Einfluss seltener Codons auf Tandem-Translation

Eine spezielle Form der Genregulation durch seltene Codons wurde von Laursen *et al* beobachtet⁹⁷. Es ist bekannt, dass in Bakterien sogenannte Tandemtranslationsprodukte gebildet werden. Dabei werden von einer mRNA zwei oder mehr unterschiedlich große Proteine gebildet, die sich lediglich am N-Terminus unterscheiden, während der C-Terminus identisch ist. Die unterschiedliche Größe der Proteine resultiert daraus, dass zusätzlich zum Startcodon am 5'-Ende der mRNA noch weitere intracistronische Startcodons vorhanden sind. Damit auch an diesen intracistronischen Startcodons eine Initiation der Translation erfolgen kann, sind eine offene Einzelstrangstruktur der mRNA in der Ribosomenbinderegion sowie seltene Codons upstream des intracistronischen Startcodons erforderlich. Die seltenen Codons blockieren dabei wahrscheinlich die Ribosomen während der Elongationsphase und ermöglichen somit die Initiation an dem stromabwärts gelegenen intracistronischen Startcodon.

1.5 Ziel der Arbeit

Genotoxizitätsprüfungen mittels *in vitro* Testsystemen haben in den letzten Jahren mehr und mehr an Bedeutung gewonnen. Dies wird zum einen bedingt durch ethische Argumente (Vermeidung von Tierversuchen). Zum anderen haben *in vitro* Systeme auch ökonomische Vorteile, da sie es ermöglichen, in relativ kurzer Zeit und mit wenig Aufwand statistisch auswertbare Ergebnisse zu erhalten. Für primäre Untersuchungen sind bakterielle Testsysteme, wie z.B. der Ames-Test, aufgrund der einfachen Handhabung sehr gut geeignet. Etwas aufwändiger sind dagegen Testsysteme, die Säugerzellen (z.B. Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase-Genmutationstest) verwenden, diese entsprechen aber auch eher dem menschlichen Organismus. Das gemeinsame Problem aller *in vitro* Testsysteme ist jedoch der fehlende oder unzureichende Fremdstoffmetabolismus. Selbst bei Säugerzellkulturen kommt es zu einer Adaptation an die Kulturbedingungen und dabei zum Verlust der Expression fremdstoffmetabolisierender Enzyme^{47,48}. Da jedoch die überwiegende Zahl genotoxischer Substanzen keine direkten Mutagene sind, sondern erst durch fremdstoffmetabolisierende Enzyme „aktiviert“ werden und einige chemisch reaktive (ionische) Metaboliten nur schlecht die Zellmembran passieren, ist die Expression entsprechender Enzyme direkt in den Indikatorzellen der *in vitro* Testsysteme von entscheidender Bedeutung⁴⁶. Die Expression humaner fremdstoffmetabolisierender Enzyme ist jedoch, insbesondere in Bakterien, teilweise technisch problematisch. So zeigen z.B. sehr ähnliche Enzyme (SULT1A2*1 und *2) deutliche Unterschiede im Expressionsniveau bei exakt gleichen äußeren Bedingungen. Dies erschwert den Vergleich der enzymatischen Aktivitäten dieser Enzyme im *in vitro* Testsystem. Andere Enzyme (z.B. SULT2B1b) werden, unter Verwendung ihrer Wildtyp-cDNA, zum Teil nicht detektierbar exprimiert.

Ziel dieser Arbeit war somit die Etablierung einer Methode zur Optimierung der heterologen Expression fremdstoffmetabolisierender Enzyme für Genotoxizitätsuntersuchungen. Es wurde bereits gezeigt, dass mit synonymen Codonaustauschen am 5'-Ende der 1A2-cDNA eine Erhöhung der Expression des entsprechenden Enzyms in *S. typhimurium* erzielt werden kann²¹. Dementsprechend sollten verschiedene Codons in unterschiedlichen Kombinationen am 5'-Ende der 1A1-, 1A2-, 2B1b- und rGSTT2-cDNA ausgetauscht werden. Anschließend sollte die Expression der entsprechenden Enzyme in *E. coli* (als prokaryontischer

Modellorganismus), in *S. typhimurium* und in V79-Zellen analysiert sowie die Funktionalität der exprimierten Enzyme in Mutagenitätstests bzw. Enzym-Aktivitäts-Assays überprüft werden. Des Weiteren sollte in dieser Arbeit aufgeklärt werden, warum seltene Codons am 5'-Ende von SULT-cDNA die Expression erhöhen, während in der Literatur stets über negative Effekte auf die Proteinexpression durch seltene Codons berichtet wird.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte / Gebrauchsmaterialien

Artek Counter Model 880	Dynatech Laboratories
Blot-Apparatur (Multiphor II)	Amersham Pharmacia Biotech
Brutschrank (CO ₂ -Inkubator Serie CB)	Binder
Brutschrank (BBD 6220)	Heraeus
Brutschrank (NU2700E)	Nuaire
MR5000	Dynatech
Elektrophoresesystem (Hoefler SE 600 Series)	GE Healthcare
Elektrophorese Power Supply EPS 600	GE Healthcare
Extraction columns spe 7020-03	Mallinckrodt Baker, Inc.
Feinwaage MC1	Sartorius
Flachbettelektrophoresekammer (Agagel Mini)	Biometra
Fujifilm LAS-1000	Raytest
Gel Doc EQ System	BioRad
Gene Quant II	GE Healthcare
HPLC Alliance Separation Module 2695	Waters
HPLC-Trennsäule: NovaPak C ₁₈	Waters
Hybond ECL Nitrocellulose Membran	GE Healthcare
IKA-Minishaker MS 1	IKA
iCycler Thermal Cycler	BioRad
Luminoskan Ascent	Labsystems
Mikroeinsätze	Machery-Nagel
Mikroliterpipetten, Model <i>Reference</i> (0,5-2500 µl)	Eppendorf
Mikroskop (IMT-2)	Olympus
Mikroskop (BH2-RFCA)	Olympus
Mikrotiterplatten, Nuclon	Nunc
Mikrotiterplattenreader	SLT Labinstruments
Multipette 4780	Eppendorf
Munktell Filter Papier	GE Healthcare

Schüttelinkubator, Ceromat BS-1	Braun International
Schüttelwasserbad	GFL
Schraubampullen	Machery-Nagel
Speedvac SC110	Savant
Swip SM 25 DIGI	Edmund Bühler
Thermocycler T	Biometra
Thermomixer 5436	Eppendorf
Triple Quadrupol Massenspektrometer Quattro II	Micromass
Ultraschallsonde Vibra Cell VC50T	Bioblock Scientific
UV-Detektion (Eagle Eye II)	Stratagene
UV-Visible Spectrophotometer	GE Healthcare
Waage Basic	Sartorius
Zellkulturflaschen T25 und T75	Biochrom
Zellkulturschalen Ø 5 cm, 10 cm, 15 cm	Nunc
Zellzählgerät (Casy 1 TT)	Schärfe
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge 5403	Eppendorf
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf
Zentrifuge Optima TM TLX Ultrazentrifuge	Beckman
Zentrifuge J2-M1	Beckman
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus

2.1.2 Software

Aida/2D Densitometry	Raytest GmbH
BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	National Center for Biotechnology Information (NCBI)
iCycler TM iQ Optical System Software (3.0a)	BioRad
MassLynx 3.5	Waters
Quantity One [®] 1-D Analysis Software (4.6)	BioRad
VectorNTI (Suite 9)	Invitrogen
Vienna RNA Package	Universität Wien

2.1.3 Chemikalien und Fertigmedien

dNTPs	Invitrogen
FastGreen, Magnesiumchlorid	Fluka
Fötale Kälberserum	Biochrom

Lysozym	Boehringer
Nutrient Broth Nr.2	Oxoid GmbH
Trypsin	Invitrogen

Colcemid, DMEM, Penicillin/Streptomycin und Puromycin wurden von Gibco BRL bezogen. Von Merck wurden β -Mercaptoethanol und Essigsäure bezogen.

Acrylamidlösung, Agarose, ϵ -Aminocapronsäure, Ammoniumacetat, Ampicillin Dinatriumsalz, BSA, Calciumchlorid, DMSO, EDTA, Glucose, Glycin, Glycerol, Hefeextrakt, HEPES, IPTG, Kaliumchlorid, Kaliumphosphat, LB-Medium, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Methanol, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, SDS, TEMED, Tris, Trypton und Tween[®]20 stammen von Roth.

Ammoniumpersulfat, Aristolochiasäure, Bisbenzimid, Bromdeoxyuridin, Bromphenolblau, DHEA, Dehydroepiandrosteron-3-sulfat, DTT, Ethidiumbromid, Kaliumchlorid, Kanamycin und Ponceau S wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

BPO, 1-HMP, 2-HEP E1 und 2-Nitrobenzylalkohol wurden von Dr. A. Seidel (Großhansdorf) synthetisiert.

2.1.4 Puffer und Lösungen

2.1.4.1 Agarosegelelektrophorese

Agarosegele: 1 % Agarose in TAE-Puffer (w/v) mit 0,004 % (w/v) Ethidiumbromid

Probenpuffer: 50 % Glycerin in 10 mM Tris-HCl, Spatelspitze Bromphenolblau ad 10 ml Probenpuffer

TAE-Puffer: 40 mM Tris-HCl, 20 mM NaCH₃COO, 1 mM EDTA (pH 7,5) in H₂O

2.1.4.2 β -Galactosidase Assay

Assay-Puffer (2x): 200 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 7,3), 2 mM MgCl₂, 100 mM β -Mercaptoethanol, 1,33 mg/ml ONPG

2.1.4.3 Cytosolpräparation aus Bakterienzellen

KCP-Puffer: 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 7,4), 150 mM KCl

2.1.4.4 Cytosolpräparation aus V79-Zellen

KP-Puffer: 5 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ (pH 7,4), 5 mM MgCl₂, 50 μ M PAPS

2.1.4.5 Genmutationstest mit *S. typhimurium*

Medium A: 1.6 g/l Bacto Nutrient Broth, 5 g/l NaCl

Minimal Agar: 15 mg/ml Agar in Vogel-Bonner E Medium (20 mg/ml Glucose)

Softagar: 5.5 mg/ml Agar, 5 mg/ml NaCl, 50 μ M Biotin, 50 μ M Histidin, 25 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7,4)

2.1.4.6 Hybridisierung von Einzelstrangoligonukleotiden

Hybridisierungspuffer: 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, 60 mM Ammoniumacetat (pH 8,0)

2.1.4.7 Elektroporation

SOC-Medium: 2.0 % (m/v) Trypton, 0,5 % (m/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 20 mM Glucose

2.1.4.8 SCE-Test

Fixativ: 3 Teile Methanol, 1 Teil Eisessig (100 %)

Hoechstlösung: 20 mg Bisbenzimid ad 400 ml Phosphatpuffer

Medium: DMEM (5 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin)

Phosphatpuffer: 65 mM KH_2PO_4 , 35 mM Na_2HPO_4

SSC-Puffer: 125 mM NaCl, 15 mM Tri-Na-Citrat (pH 6,9)

Trypsin/EDTA: 0,05 % Trypsin in 0,53 mM EDTA x 4 Na (Invitrogen)

2.1.4.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Laufpuffer: 25 mM Tris-HCl, 120 mM Glycin, 0,1 % SDS (w/v) in H_2O

Reduzierender Laemmlipuffer: 0,0625 M Tris-HCl (pH 6,8), 10 % Glycerin (v/v), 2 % SDS (w/v), 0,00125 % Bromphenolblau (w/v), 2,5 % β -Mercaptoethanol (v/v) in H_2O

Sammelgel: 3 % Acrylamid (m/v), 25 % Sammelgelpuffer (v/v), 0,3 mg/ml Ammoniumpersulfat, 20 μ l *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin in H_2O

Sammelgelpuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,4 % SDS (w/v), in H_2O

Trenngel: 11 % Acrylamid (m/v), 25 % Trenngelpuffer (v/v), 0,3 mg/ml Ammoniumpersulfat, 20 μ l *N, N, N', N'*-Tetramethylethyldiamin in H_2O

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,4 % SDS (w/v), in H_2O

2.1.4.10 Transfektion von Zellen

CaCl ₂ -Lösung:	2,5 mM CaCl ₂ in H ₂ O
Komplettmedium:	Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM) mit 4500 mg D-Glucose und L-Glutamin ohne Natriumpyruvat, 5 % (v/v) FKS
PBS:	Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -freie Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 54 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,4)
Reporter Lysis Puffer:	Promega
Transfektionspuffer:	137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na ₂ HPO ₄ , 0,1 % Glucose (w/v), 130 mM HEPES, in H ₂ O (pH 7,0 –7,1)
Trypsinlösung:	0,05 % (w/v) Trypsin, 0,5 M EDTA in Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -freiem PBS-Puffer

2.1.4.11 Western Blot und Immundetektion

Anodenpuffer I:	0,3 M Tris-HCl (pH 10,5), 20 % (v/v) Methanol in H ₂ O
Anodenpuffer II:	25 mM Tris-HCl (pH 8,5), 20 % Methanol in H ₂ O
Antiseren:	Verdünnungen in TBST mit 1 % (w/v) BSA
Blockierungslösung:	1 % BSA (w/v) in TBST
Kathodenpuffer:	40 mM ε-Aminocaprinsäure, 001 % SDS (w/v), 20 % Methanol (v/v) in H ₂ O
Ponceaurot:	0,1 % (w/v) Ponceau S, 5 % (v/v) Essigsäure, in H ₂ O
TBST:	20 mM Tris-HCl (pH 9,0), 14 mM NaCl, 0,01 % (w/v) Tween [®] 20 in H ₂ O

2.1.5 Enzyme

Quick T4 DNA Ligase (rekombinant)	NEB
PfuTurbo [®] DNA Polymerase	Stratagene
RQ1 Rnase-Free DNase	Promega
Rnasin [®] Ribonuclease Inhibitor	Promega
Taq DNA Polymerase	Qiagen

Taq DNA Polymerase	Promega
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas / NEB

2.1.6 DNA-Leitern

λ -DNA <i>EcoRI</i> x <i>HindIII</i>	MBI Fermentas
Gene Ruler™ DNA Ladder Mix	MBI Fermentas

2.1.7 Plasmide

pET-28(+)	Novagen
pGL3	Promega
pKK233-2	Clontech
pKN	H.R. Glatt, DIfE, Rehbrücke
pKK-1A1*1	H.R. Glatt, DIfE, Rehbrücke
pKK-1A2*1 / *1Z	H.R. Glatt, DIfE, Rehbrücke
pKK-2B1b / *X	H.R. Glatt, DIfE, Rehbrücke
pKK-rGSTT2	H.R. Glatt, DIfE, Rehbrücke
pMPSV	P. Artelt, GBF, Braunschweig
pSV- β -Galactosidase Control Vector	Promega

2.1.8 Bakterienstämme und Zelllinien

<i>Escherichia coli</i> XL-1 blue	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> BL21	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> BL21 (RIPL) codon plus	Stratagene
<i>Salmonella typhimurium</i> LB5000	L.R. Bullas, Loma Linda, Kalifornien
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1538	B.N. Ames, Berkeley, Kalifornien
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	B.N. Ames, Berkeley, Kalifornien
V79-Mz	H.R. Glatt, DIfE, Rehbrücke

2.1.9 Antiseren

hSULT1A1-Antiserum aus Schaf	M. Coughtrie University of Dundee
hSULT2B1a-Antiserum aus Kaninchen	C.N. Falany University of Alaba at Birmingham, Birmingham, USA
rGST-T2-Antiserum aus Kaninchen	H.R. Glatt, DIfE, Rehbrücke
Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat aus Ziege	Sigma-Aldrich
Anti-Schaf-IgG-Peroxidase-Konjugat aus Esel	Sigma-Aldrich

2.1.10 Reaktionskits

BCA Protein Assay Kit	Pierce
Bright-Glo™ Luciferase Assay System	Promega
β-Galactosidase Enzym Assay System	Promega
iQ™SYBR®Green Supermix	BioRad
ECL Western Blotting Kit	GE Healthcare
Enhanced Avian First Strand Synthesis Kit	Sigma-Aldrich
Invisorb Spin Cell RNA Mini Kit	Invitek GmbH
Qiagen® Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen
Quick Ligation™ Kit	NEB
Quick Change® Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 DNA-Sequenzierung

Die SULT-cDNA-Sequenzen wurden jeweils nach der Klonierung in die Expressionsvektoren pKK233-2 oder pMPSV überprüft. Die Sequenzierungen erfolgten durch die AGOWA GmbH (Berlin) unter Verwendung der Primer F39 und R13 (pKK233-2) bzw. F40 und R14 (pMPSV) (s. Tabelle 6-1).

2.2.2 Elektrophorese von Nukleinsäuren

Die Reinheit und Größe von PCR-Produkten sowie der Produkte aus den Restriktionsanalysen wurde unter Verwendung des Gelelektrophorese-Systems von Biometra® mittels Flachbettgelelektrophorese überprüft⁹⁸. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in 1 % oder 2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer (0,4 µg Ethidiumbromid /ml Agaroselösung) bei 80 mA. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit Ladebuffer (5:1, v/v) versetzt. Als Größenstandard wurden λ-DNA *EcoRI* *HindIII* oder Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (Fermentas) verwendet. Die Visualisierung der DNA im Gel erfolgte durch Fluoreszenzdetektion des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids im UV-Licht (312 nm). Die Dokumentation und Auswertung erfolgte mit Hilfe des Eagle Eye Systems bzw. des GelDocs.

2.2.3 Herstellen kompetenter Zellen

Kompetente *E. coli* bzw. *S. typhimurium* wurden nach folgendem Protokoll gewonnen: 250 ml Bakterienkultur wurden bis zur $OD_{600} = 0,5$ bei 37°C und 200 upm im Schüttelinkubator inkubiert. Das abzentrifugierte (5000 x g, 5 min, 4°C) Zellpellet wurde in 30 ml eiskalter $CaCl_2$ -Lösung (100 mM) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das resultierende Zellpellet in 5 ml eiskalter $CaCl_2$ -Lösung (100 mM mit 15 % Glycerol) resuspendiert. Aliquots dieser Bakteriensuspension wurden bei – 80°C bis zu ihrer Verwendung aufbewahrt.

2.2.4 Hybridisierung von Einzelstrangoligonukleotiden

Für die Hybridisierung wurden in einem 100 µl Ansatz jeweils 2,5 nM von beiden Einzelstrangoligonukleotiden in Hybridisierungspuffer eingesetzt. Der Ansatz wurde für 5 min auf 98°C erhitzt und dann langsam, um 0,01°C pro Sekunde, auf 4°C herunter gekühlt.

2.2.5 Kryokonservierung

Von den positiv selektierten Bakterienkolonien wurden jeweils 950 µl der Übernachtskultur mit 50 µl DMSO versetzt und bei – 80°C eingefroren.

2.2.6 Ligation

Für die Ligationen der zu klonierenden SULT-cDNA mit den entsprechenden Expressionsvektoren (pKK233-2, pET bzw. pMPSV) wurden cDNA und Vektor-DNA im molaren Verhältnis von 5:1 vermischt und für 5 min mit Quick T4 DNA Ligase in Quick-Ligation-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ligation erfolgte mit dem Quick-Ligation™-Kit (NEB) laut Protokoll des Herstellers in 20 µl Ansätzen mit jeweils 1 µl Ligase.

2.2.7 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Mutagenese-Ansatz: 50 ng Plasmid-DNA; 125 ng je Oligonukleotidprimer; 250 µM dNTPs; 2 mM Mg^{2+} ; 2,5 U PfuTurbo® DNA Polymerase (Stratagene)

Mutagenese-Bedingungen: 30 s 95°C [30 s 95°C, 1 min 55°C, 6 min 68°C]
14 Zyklen

Anschließend wurde der gesamte Ansatz für 1 h bei 37 °C mit 10 U *DpnI* (Fermentas) verdaut. Dieses Restriktionsenzym schneidet nur methylierte DNA (nicht-mutierte parentale Plasmid-DNA). Nach der Hitzeinaktivierung (10 min 65°C) des *DpnI* wurde die DNA in *E. coli* XL-1 transfiziert.

2.2.8 Plasmid-DNA-Präparation

Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Qiagen® Plasmid Midi bzw. des Qiaprep® Spin Miniprep Kits (Qiagen) entsprechend dem Protokoll der Firma Qiagen. Die Plasmid-DNA Konzentration im Eluat wurde anschließend photometrisch mit dem Gene Quant II bestimmt.

2.2.9 Bestimmung der relativen Plasmidkopienzahl

Zur Bestimmung der relativen Plasmidkopienzahl wurde Plasmid-DNA aus je 4 ml *E. coli* Kultur ($OD_{650} = 0,5$) isoliert (s.2.2.8). Die Bestimmung der relativen Plasmidkopienzahl erfolgte, nach Linearisierung der Plasmide durch einen Restriktionsverdau mit *HindIII*, im einprozentigen ethidiumbromidgefärbten Agarosegel. Mit Hilfe des Quantity One 1-D Analyse Programms wurde die relative Bandenintensität berechnet⁹⁹.

2.2.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Codonaustausche wurden mit Mutagenese-PCRs in einem Gesamtvolumen von 50 µl unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

PCR-Ansatz: 100 ng Plasmid-DNA-Template; 100 nM je Oligonukleotidprimer;
25 µM dNTPs; 1,5 mM MgCl₂; 2,5 U *Taq*-Polymerase (Promega)

PCR-Bedingungen: 5 min 95°C, [1 min 94°C, 1 min Hybridisierungstemperatur^a, 1 min 72°C] 35 Zyklen, 10 min 72°C

^aAngaben siehe Tabelle 6-1

2.2.11 Real-Time PCR

Die Quantifizierung der hSULT- bzw. GAPDH-mRNA-Kopienzahl mittels Real-Time-PCR erfolgte unter Verwendung des iQ™ SYBR®Green Supermix (BioRad) und der Primer F37 / R11 (SULT) bzw. F38 / R12 (GAPDH) in einem Gesamtvolumen von 25 µl bei folgenden Bedingungen:

PCR-Ansatz: 0,5 µl bzw. 4 µl (SULT- bzw. GAPDH-PCR) RT-Produkt; 200 nM je Oligonukleotidprimer; 200 µM dNTP; 3 mM MgCl₂; 0,625 U iTaq DNA Polymerase; 10 nM Fluorescein; SYBR Green I

PCR-Bedingungen: 2 min 95°C, [30 s 94°C, 45 s Hybridisierungstemperatur^a, 2 min 72°C] 40 Zyklen

^aAngaben sowie Primer-Sequenzen siehe Tabelle 6-1

2.2.12 Restriktionsverdau

PCR-Produkten und Plasmide für die Ligation sowie Vektorkonstrukte zur Analyse wurden mit Restriktionsenzymen verdaut. Die Restriktionsenzyme wurden in den vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffern in der entsprechenden Konzentration eingesetzt und die DNA für jeweils 2 h (Analyse) bzw. 6 h (Ligation) bei 37°C inkubiert.

2.2.13 Reverse Transkription

Jeweils 3 µg DNaseI-verdaute RNA wurden unter Verwendung des „Enhanced Avian First Strand Synthesis Kit“ (Sigma-Aldrich) und der reversen Primer F12 und F13 entsprechend dem Protokoll der Firma Sigma 1 h bei 45°C revers transkribiert. Der Reversen Transkription ging eine 10-minütige Inkubation bei 80°C zur Auflösung von mRNA-Sekundärstrukturen voraus. Im Anschluss an die Reverse Transkription wurde die Reverse Transkriptase durch eine 15-minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert.

RT-Ansatz: 3 µg DNaseI-verdaute RNA; 1 µM je Oligonukleotidprimer; 500 nM dNTPs; 8 mM MgCl₂; 20 U Enhanced Avian Reverse Transkriptase; 20 U RNase-Inhibitor

2.2.14 Bestimmung des relativen RNA-Niveaus

2.2.14.1 SULT-RNA Expression in *E. coli*

Es wurden 200 µl *E. coli* Übernachtskultur in 5 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) angeimpft und für 3 h bei 37°C und 225 upm im Schüttelinkubator inkubiert. Nach 3 h ($OD_{600} = 0,5$) wurde die SULT-Expression mit 1 mM IPTG induziert und die Kultur für weitere 0,5 h, 1 h und 2 h bei 30°C und 225 upm inkubiert. Die Pellets aus jeweils 4 ml Kultur wurden bis zur RNA-Präparation bei -80°C aufbewahrt.

2.2.14.2 RNA-Präparation aus *E. coli*

Die RNA aus *E. coli* wurde unter Verwendung des Invisorb Spin Cell RNA Mini Kits (Invitek) entsprechend dem Protokoll der Firma Invitek präpariert. Die Gesamtkonzentration der RNA im Eluat wurde anschließend photometrisch mit dem Gene Quant II (Pharmacia Biotech) bestimmt (Dreifachbestimmung). Bei der RNA-Präparation mit dem Invitk-Kit wird bakterielle DNA mittels eines DNA-Filters entfernt. Da das pKK-2B1b Plasmid jedoch in großen Mengen in den Zellen vorliegt, wurde das Eluat zusätzlich einem DnaseI-Verdau unterzogen. Dazu wurden jeweils 3 µg RNA in einem 10 µl Ansatz mit 80 U Rnasin®-Ribonuclease-Inhibitor (Promega) und 2 U RNase-freie DnaseI (Promega) für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DnaseI durch 10-minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert.

2.2.15 Transformation

Je 50 µl bzw. 100 µl kompetente Bakterien (*E. coli* bzw. *S. typhimurium*) wurden mit 20 µl Ligationsansatz für 15 min auf Eis inkubiert, anschließend für 1 min auf 42°C erhitzt und dann für 1 min auf Eis gestellt. Danach wurde der Transformationsansatz mit 250 µl LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37°C und 225 upm inkubiert. Anschließend wurden 100 µl bzw. 200 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agar Platten (100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.16 Herstellung der cDNA-Konstrukte

Alle Konstrukte wurden zunächst *Nco*I x *Xba*I (1A2*1 und Luciferase) bzw. *Nco*I x *Hind*III (1A1*1 und 2B1b) oder *Nco*I x *Pst*I (rGSTT2) in das Expressionsplasmid pKK233-2 kloniert. Für die Expression in *E. coli* BL21 oder BL21 (RIPL) wurden die cDNA *Nco*I x *Hind*III in das Plasmid pET-28b(+) umkloniert. Die Expression in *S. typhimurium* TA100 erforderte die Umklonierung in den pKN-Vektor, dieser wurde aus

dem pKK233-2 Vektor generiert und besitzt statt der Ampicillin- eine Neomycinresistenz¹⁰⁰. Für die Expression in V79-Zellen wurden die cDNA in den pMPSV Vektor mittels der Restriktionsenzyme *EcoRI* x *HindIII* umkloniert.

2.2.16.1 Konstruktion von pKK-1A1*1Y

Mittels gerichteter Mutagenese durch PCR (s. 2.2.10) wurden sechs Codons am 5'-Ende der hSULT1A1*1-cDNA durch synonyme seltenere Codons ersetzt. Die Auswahl der insertierten Codons am 5'-Ende der SULT cDNA erfolgte nach den Codon Usage Daten von <http://www.kazusa.or.jp/codon/>⁷³. Dafür wurde der Vorwärtsprimer F1 und der Rückwärtsprimer R1 verwendet (s. Tabelle 6-1). Als Template wurde das Konstrukt pKK-1A1*1 verwendet.

2.2.16.2 Konstruktion der pKK-1A2*1 Klone

Ebenfalls mittels gerichteter Mutagenese durch PCR (s.2.2.10) wurden 7 hSUL1A2*1 cDNA-Konstrukte mit unterschiedlicher Codonsequenz am 5'-Ende hergestellt. Es wurden ausschließlich synonyme Codon-Austausche vorgenommen und dafür die Vorwärtsprimer F2-F8 jeweils mit dem Rückwärtsprimer R2 verwendet (s. Tabelle 6-1). Als Template diente das Konstrukt pKK-1A2*1 bzw. pKK-1A2*1Z.

2.2.16.3 Konstruktion der pKK-2B1b Klone

Mittels gerichter Mutagenese durch PCR (s. 2.2.10) wurden 11 verschiedene hSULT2B1b-cDNA-Konstrukte hergestellt, die sich lediglich durch ihre Codonsequenz am 5'-Ende unterscheiden. Die ausschließlich stillen Mutationen wurden unter Verwendung der Vorwärtsprimer F9-F19 sowie dem Rückwärtsprimer R1 eingefügt (s. Tabelle 6-1).

Des weiteren wurden durch ortsgerichtete Mutagenese (s. 2.2.7) verschiedene hSULT2B1b Konstrukte hergestellt, bei denen das ATG Codon an Position 1 bzw. Position 76 zu CTG mutiert wurde. Dafür wurden die Primer F20 und R3 (2B1b*CTG) bzw. F21 und R4 (2B1b*CTG1+2 / *CTG-2 / *XCTG-2 / *gc8CTG-2) verwendet.

Mittels gerichteter Mutagenese durch PCR wurden ein weiteres hSULT2B1b-Konstrukt hergestellt, bei dem die downstream box (2B1b*db) am 5'-Ende der cDNA optimiert wurde. Dazu wurde der Vorwärtsprimer F23 sowie der Rückwärtsprimer R1 verwendet (s. Tabelle 6-1). Zusätzlich wurde mittels der Primer F36 und R11 ein Konstrukt hergestellt mit deletiertem 5'-Ende (225 bp) der cDNA.

Für sämtliche Klonierungen der hSULT2B1b wurden die Konstrukte pKK-2B1b oder pKK-2B1b*X verwendet.

2.2.16.4 Konstruktion von pMPSV-1A1*1Yeu

Für die Expression in eukaryontischen Zellen wurden mittels gerichteter Mutagenese durch PCR (s. 2.2.10) ein hSULT1A1-Konstrukt hergestellt, bei dem die Codonsequenz am 5'-Ende manipuliert wurde. Die Codonaustausche wurden entsprechend <http://www.kazusa.or.jp/codon/> ausgewählt, so dass die neu generierte Sequenz in Eukaryonten (*Cricetulus griseus*) selten verwendete Codons enthält⁷³. Als Template für die PCR wurde das Konstrukte pKK-1A1*1 verwendet. Der verwendete Vorwärtsprimer (F26) ist in der Tabelle 6-1 aufgeführt. Als Rückwärtsprimer wurde der R1 verwendet.

2.2.16.5 Konstruktion der hSULT2B1b-Luciferase-Fusionsproteine

Für die Konstruktion der hSULT2B1b-Luciferase-Fusionsproteine wurde zunächst mittels ortsgerichteter Mutagenese (s. 2.2.7) eine *Pst*I-Schnittstelle 66 bp nach dem Startcodon in die *Photinus pyralis* Luciferase cDNA eingefügt. Eine weitere *Pst*I-Schnittstelle im pKK233-2 Vektor wurde ebenfalls mittels ortsgerichteter Mutagenese entfernt. Dafür wurden die Primer F28 und R5 bzw. F29 und R5 verwendet (s. Tabelle 6-1).

In den resultierenden Vektor pKK-LucPstI-2 wurden 49 bp lange hSULT2B1b-cDNA-Sequenzabschnitte kloniert. Dazu wurde das Plasmid mit *Nco*I verdaut und der dabei entstandene 5'-Überhang mittels Klenow-Fragment (Fermentas) entsprechend dem Protokoll von Fermentas aufgefüllt. Anschließend wurde das linearisierte Plasmid noch mit *Hind*III verdaut und mit TSAP (Thermosensitive Alkalische Phosphatase, Gibco) entsprechend dem Protokoll von Gibco dephosphoryliert. Einzelsträngige 5'-phosphorylierte Oligonukleotide (F30-F32 und R7-R9, s. Tabelle 6-1) mit der entsprechenden hSULT2B1b Sequenz wurden von Biotex (Berlin) bezogen und hybridisiert (s. 2.2.4). Für die Ligation (s. 2.2.6) mit dem desphosphorylierten Plasmid wurden ca. 50 ng hybridisiertes Oligonukleotid eingesetzt. Es wurden drei verschiedene Fusionsproteinvarianten (hSULT2B1bLuc, hSULT2B1b*1X1Luc, hSULT2B1b*1X7Luc) hergestellt, die sich lediglich in ihrer Codon usage am 5'-Ende der hSULT2B1b-cDNA unterscheiden.

2.2.16.6 Konstruktion von pKK-Luc*X

Mittels gerichteter Mutagenese durch PCR wurden am 5'-Ende der Luciferase-cDNA acht Codons durch synonyme seltenere Codons ausgetauscht. Dafür wurde der Vorwärtsprimer F33 kombiniert mit R1 verwendet (s. Tabelle 6-1). Als Template diente das pKK-Luciferase-Plasmid mit der cDNA der *Photinus pyralis* Luciferase. Die Luciferaseexpression in den Klonen wurde später mittels Luciferase-Assay (s. 2.4.4) untersucht.

2.2.16.7 Konstruktion von pKK-GSTT2*X6 und pKK-GSTT2*X8

Die Konstruktion verschiedener Codonvarianten von rGSTT2 erfolgte ebenfalls mittels gerichteter Mutagenese durch PCR mit den Vorwärtsprimern F34 und F35 und dem Rückwärtsprimer R10 (s. Tabelle 6-1). Als Template wurde das Konstrukt pKK-rGSTT2 verwendet. In der ersten Variante (F34) wurden sechs Codons und in einer zweiten Variante (F35) acht Codons durch synonyme seltenere Codons ersetzt.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung von V79-Zellen

2.3.1.1 V79-Zellen

Die V79-Zelllinie wurde ursprünglich 1958 aus Lungengewebe eines männlichen Chinesischen Hamsters isoliert, seitdem durch mehrere Arbeitsgruppen weiter entwickelt und gilt heute als ein klassisches Zellkulturmodell für toxikologische Untersuchungen¹⁰¹. Nicht-transformierte V79-Zellen exprimieren keine endogenen SULT.

2.3.1.2 Kulturbedingungen

Die Kultivierung der V79-Zellen erfolgte in 5 ml bzw. 20 ml Komplettmedium (DMEM) in 25-cm²- bzw. 75-cm²-Polystyren-Zellkulturflaschen bei 37°C, 8 % CO₂ und 85 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank. Zur Erhaltung der Zellen in 75-cm²-Kulturflaschen erfolgte alle 2-3 Tage eine sterile Zellpassage. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit 1 ml Trypsinlösung für 5 min bei 37°C im Brutschrank, um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Die proteolytische Aktivität des Trypsins wurde durch die

Zugabe von 10 ml Komplettmedium abgestoppt. Die Zellzahl wurde in einer 1:100 (v/v) Verdünnung der Zellsuspension im Zellzählgerät bestimmt.

2.3.2 Transfektion von V79-Zellen mit SULT-Expressionsplasmiden

Die pMPSV-SULT-Plasmide wurden mit dem pSV- β Gal-Plasmid, zur späteren Überprüfung der Transfektionseffizienz mit Hilfe des β -Galactosidase-Assays, kotransfiziert.

Für die transiente Transfektion wurden $7,5 \times 10^5$ V79-Zellen in 25-cm²-Zellkulturflaschen ausgesät und 24 h in 5 ml Komplettmedium kultiviert. Die Transfektion erfolgte nach der Methode der Calciumphosphatpräzipitation. Pro Transfektionsansatz wurden je 20 μ g pMPSV-SULT und 20 μ g pSV- β Gal mit 54 μ l CaCl₂-Lösung und 1 ml Transfektionspuffer vermischt und für 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die dabei gebildeten Calciumphosphat-DNA Präzipitate wurden mit einer Pasteurpipette auf den Zellrasen getropft und die Zellen im Brutschrank weiter kultiviert. Nach 24 h wurde das Transfektionsmedium gegen 5 ml frisches Komplettmedium ausgetauscht. Weitere 24 h später wurden die Zellen geerntet.

2.3.3 Zellernte

Zur Zellernte 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen 2 x mit je 5 ml PBS gewaschen und anschließend für 15 min in 500 μ l Reporter-Lysis-Puffer bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (Swip SM 25 DIGI) inkubiert. Danach wurden die Zellen vom Flaschenboden abgeschabt und die Suspension bei -80°C vollständig durchgefroren. Nach dem Auftauen wurde die lösliche Fraktion mit einem Zentrifugationsschritt (2 min, 15.000 x g) abgetrennt. Das im Überstand gewonnene Zelllysat wurde für den β -Galactosidase-Assay sowie für die Proteinbestimmung und den Western Blot eingesetzt.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 β -Galactosidase-Assay

Die Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität in den V79-Zelllysaten erfolgte unter Verwendung des β -Galactosidase-Enzym-Assay-Systems (Promega) in

Mikrotiterplatten in Form einer Dreifachbestimmung. Jeweils 50 µl unverdünntes Zelllysate (für den Leerwert: 50 µl Reporter Lysis Puffer) wurden mit 50 µl Assay-Puffer für 0,5 h bis 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption photometrisch bei 405 nm mit dem Dynatech MR5000 bestimmt.

β-Galactosidase hydrolysiert das farblose Substrat ONPG zu gelb gefärbtem o-Nitrophenol. Dessen Entstehung wurde durch die Absorptionsmessung bei 405 nm bestimmt.

2.4.2 Herstellung subzellulärer Fraktionen aus *E. coli* und *S. typhimurium*

2.4.2.1 SULT-Expression in *E. coli*

Es wurden 1 ml *E. coli* Übernachtskultur in 25 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) angeimpft und für 3 h bei 37°C und 225 upm inkubiert. Nach 3 h ($OD_{600} = 0,5$) erfolgte die Induktion der Proteinexpression mit 1 mM IPTG. Anschließend wurde die Kultur für weitere 6 h bei 30°C und 225 upm inkubiert.

2.4.2.2 SULT-Expression in *S. typhimurium*

Es wurden 50 µl *S. typhimurium* Übernachtskultur in 50 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin bzw. 40 µg/ml Kanamycin) angeimpft und für 8 h bei 37°C und 200 upm inkubiert.

2.4.2.3 Cytosolpräparation

Das Pellet aus 25 ml bzw. 50 ml Expressionskultur (s. 2.4.2.1 bzw. 2.4.2.2) wurde 2 x mit je 12 ml bzw. 25 ml KCl-P gewaschen, anschließend in 400 µl bzw. 800 µl KCl-P resuspendiert und 3 x 15 s auf Eis sonifiziert. Durch Zentrifugation bei 100.000 x g (4°C, 1 h) wurde die lösliche Fraktion mit den cytosolischen Proteinen im Überstand erhalten. Die Aufbewahrung der Cytosole erfolgte bei -80°C.

2.4.3 Herstellung subzellulärer Fraktionen aus V79-Zellen

Für die Bestimmung der Sulfonierungsaktivität von hSULT2B1b in V79-Cytosolen wurden jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen ausgesät und für 48 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und bei 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 10 ml kaltem PBS-Puffer gewaschen und danach in 100 µl kaltem KCP-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 3 x 10 s auf Eis sonifiziert und danach für 1 h

bei 100.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde schockgefroren (flüssiger Stickstoff) und bei -80°C aufbewahrt.

2.4.4 Luciferase-Assay (Chemilumineszenzdetektion)

Für die Selektion Luciferase-positiver Klone wurden die Agarplatten, mit den über Nacht gewachsenen Kolonien, mit 1 ml Bright-Glo™-Reagent (Promega) bedeckt und die Chemilumineszenz mit Hilfe des Lumineszenz Analysegerätes LAS-1000 (Fujifilm) und der Software Aida/2D Densitometry detektiert. Die Lumineszenz war mit bloßem Auge (Dunkelkammer) nicht zu erkennen.

Für die quantitative Messung der Luciferaseaktivität in den Fusionsproteinklonen (hSULT2B1bLuc, hSULT2B1b*XLuc, hSULT2B1b*GPAPQILuc) bzw. den Luciferaseklonen (Luc, Luc*X) wurde jeweils das Pellet aus 6 ml bzw. 4 ml Übernachtskultur in 400 µl Glo-Lysis-Puffer (Promega) resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung der Luciferaseaktivität erfolgte luminometrisch mit jeweils 100 µl bzw. 30 µl Lysat zu dem, unmittelbar vor der Messung, je 100 µl Bright-Glo™ Reagent (Promega) gegeben wurden. Die Messung erfolgte im Luminoskan.

2.4.5 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch mit Bicinchonsäure (BCA) nach dem Protokoll der Firma Pierce bestimmt ¹⁰². Dazu wurden die Bakterienzytosole 1:5 (*E. coli*) bzw. 1:10 (*S. typhimurium*) in H₂O und die V79-Zelllysate 1:2 oder 1:4 in RLB verdünnt. Zu je 10 µl Probe wurden 200 µl BCA-Reagenz gegeben und nach 20 min Inkubation bei 37°C die Extinktion bei 570 nm bestimmt. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe einer Eichgeraden, die mit fünf standardisierten BSA-Lösungen (0,5 mg/ml - 2,5 mg/ml) angesetzt in H₂O bzw. RLB entsprechend der Probenverdünnung aufgenommen wurde.

2.4.6 SDS-PAGE

Die cytosolischen Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen durch diskontinuierliche Elektrophorese nach Laemmli aufgetrennt ¹⁰³. Die verwendeten Gele waren 20 cm² groß und 1,5 mm dick und enthielten 11 % Acrylamid. Die Proben wurden in reduzierendem Laemmli-Puffer 10 min bei 95°C inkubiert. Die Elektrophorese wurde im Sammelgel bei 50 mA und im Trenngel bei 70 mA durchgeführt. Beendet

wurde die Elektrophorese, wenn die Bromphenolblaubande den unteren Gelrand erreichte.

2.4.7 Western-Blot und Immundetektion

Die Überführung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf die Nitrocellulosemembran erfolgte mit Hilfe des semitrockenen Elektroblotsystems¹⁰⁴ für 2 h bei 0,8 mA/cm². Vor der Immundetektion wurde die Blot-Effizienz mittels Ponceaurotfärbung überprüft und die Membran in 1 % (w/v) BSA für 1 h inkubiert, um die unspezifische Bindung der Antikörper zu blockieren. Die Immunfärbung erfolgte durch einstündige Inkubation der Membran mit dem ersten Antiserum (anti-SULT). Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen mit TBST (5 x 5 min) entfernt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (anti-Kaninchen bzw. anti-Schaf-IgG-Peroxidase-Konjugat) und erneutes Waschen mit TBST (5 x 5 min). Zur Entwicklung des Blots wurde der ECL Western Blotting Kit verwendet. Dabei katalysiert die an den zweiten Antikörper konjugierte Peroxidase die Oxidation von Luminol und versetzt dieses in einen chemilumineszierenden Zustand. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte mit Hilfe des Lumineszenz Analysegerätes LAS-1000 und der Software Aida/2D Densitometry.

2.5 Toxikologische und Expressions-Testsysteme

2.5.1 Indikatorzellen

2.5.1.1 *Escherichia coli* XL-1 / BL-21 / BL21(RIPL)

In dieser Arbeit wurden verschiedene *E. coli* Stämme als Modellorganismen für die Expressionstudien eingesetzt. *E. coli* XL-1 blue ist ein Standardstamm für das Klonieren von Plasmiden oder Lamda Vektoren und kann auch für eine Blau-Weiß-Selektion rekombinanter Plasmide eingesetzt werden. Für die Untersuchung des Einflusses der seltenen tRNAs (Arg / Ile / Pro / Leu) wurden *E. coli* BL21 codon plus (RIPL) und als Kontrolle BL21 DE3 eingesetzt. *E. coli* BL21 (DE3) sind Lysogene des Bacteriophagen DE3 und exprimieren die bacteriophagen T7 RNA Polymerase unter der Kontrolle des *lac*-Promotors. Nach Induktion des *lac*-Promotors mit IPTG können *E. coli* BL21 (DE3) durch den T7-Promotor gesteuerte Gene exprimieren. Dieses Expressionssystem ist wesentlich effektiver als das *lac*-Promotorsystem der *E. coli* XL-1⁶⁹. Des weiteren besitzen *E. coli* BL21 codon plus (RIPL) zusätzliche Kopien der

Gene *argU*, *ileW*, *leuY* und *proL* für eine erhöhte Expression der entsprechenden seltenen tRNAs.

2.5.1.2 *Salmonella typhimurium* LB5000 / TA1538 / TA100

Der *S. typhimurium* LB5000 Stamm ist restriktionsdefizient, aber methylierungsprofizient und kann somit zur Adaptierung der aus *E. coli* isolierten Plasmid-DNA an das Methylierungsmuster von *S. typhimurium* verwendet werden¹⁰⁵.

Der *S. typhimurium* Stamm TA1538 ist aufgrund einer Minus-1 Leseraster Mutation Histidin-auxotroph und kann im Mutagenitätstest zur Detektion von frameshift-Mutagenen eingesetzt werden. *S. typhimurium* TA100 besitzt eine Substitutions-Mutation im Histidin-Operon und kann durch verschiedene Substitutions-Mutationen oder Deletionen innerhalb des Leserasters zu einem Histidin prototrophen Stamm revertiert werden. Der TA100 Stamm wurde mit dem Plasmid pKM101 transfiziert, welches ein „error-prone“ DNA Reparatursystem sowie eine Ampicillin Resistenz codiert, um die Sensitivität bei der Detektion von Mutationen zu erhöhen¹⁰⁶.

2.5.1.3 V79-Zellen des Chinesischen Hamsters

Die verwendete eukaryontische V79-Zelllinie ist eine Fibroblasten-Zelllinie des Chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*)¹⁰⁷. Diese Zellen sind aufgrund ihrer kurzen Populationsverdopplungszeit und einer hohen Kloniereffizienz sehr gut für verschiedene Genmutationstests geeignet^{40-42,45,108}. Sie besitzen eine stabilen quasi-diploiden Satz von 22 Chromosomen, die morphologisch gut unterscheidbar sind¹⁰⁹. Außerdem gibt es zu dieser etablierten Zelllinie auch eine gute Datenbasis für Mutagenitätstests¹⁰⁸.

2.5.2 Genmutationstest in *S. typhimurium*

Für den Genmutationstest wurden die Bakterien in Nutrient Broth Nr.2 (Oxoid) bei 37°C und 225 upm für 8 h inkubiert. Die parentalen Stämme TA1538 und TA100 wurden in Medium ohne Zusatz von Antibiotika inkubiert. Für die rekombinanten Stämme, die mit einem pKK233-2 bzw. pKKneo Plasmid transfiziert wurden, wurde dem Medium Ampicillin (100 µg/ml) bzw. Neomycin (100 µg/ml) zugesetzt. Anschließend wurden die Kulturen abzentrifugiert, in Medium A resuspendiert, die Bakteriendichte nephelometrisch auf $1-2 \times 10^9$ /ml eingestellt und auf Eis aufbewahrt. Kurz vor dem Einsatz der Bakterien im Test wurden sie erneut zentrifugiert, anschließend wurden die Bakterien in 5-fach höherer Dichte resuspendiert.

Die Bestimmung der Mutagenität erfolgte mittels einer modifizierten Version des Präinkubationstests nach Maron und Ames ¹⁰⁶. Dazu wurden jeweils 100 µl Bakteriensuspension und anschließend die jeweilige Testsubstanz (in 10 µl DMSO) in ein Glassröhrchen (enthält 500 µl 100 mM MgSO₄) gegeben. Nach 60-minütiger Inkubation bei 37°C wurden 2 ml warmer (45°C) Softagar hinzugegeben und der Mix auf eine Petrischale mit 24 ml Minimalagar ausplattiert. Die Platten wurden dann 2-3 Tage inkubiert bis große (gut zählbare) *his*⁺-revertierte Kolonien herangewachsen waren. Das Auszählen der Kolonien erfolgte mittels Zählgerät im Bereich von 35-1500 Kolonien pro Platte bzw. per Hand bei weniger als 35 bzw. mehr als 1500 Kolonien pro Platte.

Zur Auswertung der Daten wurde jeweils die spezifische Mutagenität (Revertanten pro nmol Testsubstanz) ermittelt. Dazu wurden nur Revertantenzahlen einbezogen, die mindestens 2-fach höher waren als die des Kontrollansatzes (Lösungsmittelkontrolle). Es wurde jeweils die Differenz aus Revertantenzahl und dem Wert der Lösungsmittelkontrollen gebildet und der erhaltene Wert durch die Dosis der Testsubstanz dividiert ¹¹⁰.

2.6 Analytik

Um die Funktionalität der heterolog überexprimierten hSULT2B1b zu überprüfen wurde die Sulfonierung von Dehydroepiandrosteron (DHEA), dem prototypischen Substrat für die hSULT2 Familie, in cytosolischen Fraktionen von *E. coli* XL-1, *S. typhimurium* und V79-Zellen bestimmt und die DHEA-Sulfonierung in intakten V79-Zellen ermittelt.

2.6.1 Inkubation und Festphasenextraktion

2.6.1.1 Cytosolische Fraktionen von Bakterien und V79-Zellen

Für die Bestimmung der Sulfonierungsaktivität von hSULT2B1b in cytosolischen Fraktionen von Bakterien (*E. coli*, *S. typhimurium*) und V79-Zellen wurden jeweils 0-1000 µg bzw. 0-800 µg cytosolisches Protein mit 20 µM DHEA (in DMSO, Endkonzentration 0,5 %) in KP-Puffer für 15 min bei 37°C inkubiert. Zur Anreicherung des DHEA-Sulfates und zur Abtrennung von Störkomponenten erfolgte eine Festphasenextraktion unter Verwendung von Bakerbond spe 7020-03 Säulen. Vor der Beladung wurden die Säulen mit je 3 ml Methanol und dest. Wasser equilibriert. Der vollständige Reaktionsansatz wurde auf die Säule übertragen. Zusätzlich wurde das

Reaktionsgefäß mit 500 µl Wasser gespült und dieses ebenso auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurden die Säulen zunächst mit 5 ml dest. Wasser gespült, trocken gesaugt und dann das DHEA-Sulfat mit 2 ml Methanol eluiert. Das Eluat wurde bis zur Trockne eingeeengt (Speedvac) und der Rückstand in 200 µl Methanol wieder aufgenommen (Ultraschallbad). Davon wurden je 20 µl pro Messung mittels HPLC-MS/MS eingesetzt.

2.6.1.2 Intakte V79-Zellen

Für die Bestimmung der Sulfonierungsaktivität von hSULT2B1b in lebenden V79-Zellen wurden jeweils 5×10^5 Zellen in T25 Kulturflaschen ausgesät (je 4 Ansätze: 3 Messwerte + 1 Zellzahl) und für 16 h im Brutschrank vorinkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit 20 µM DHEA in je 1 ml Medium für weitere 1 h bis 24 h im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen abgeschabt und jeweils 1 Ansatz für die Bestimmung der Zellzahl (s. unten) verwendet. Die anderen 3 Ansätze wurden für die spätere Bestimmung des DHEA-Sulfates schockgefroren (flüssiger Stickstoff) und bei -20°C aufbewahrt. Dafür wurden die Zellkulturflaschen nach dem Abschaben der Zellen noch 2 x mit je 500 µl dest. Wasser gespült und dieses auch für die Festphasenextraktion verwendet. Für die Festphasenextraktion wurden wiederum Bakerbond spe 7020-03 Säulen, equilibriert mit je 3 ml Methanol und dest. Wasser, verwendet. Jeweils der gesamte Reaktionsansatz wurde auf eine Säule gegeben, diese wurde anschließend mit 3 ml dest. Wasser gespült und trocken gesaugt. Die Elution des DHEA-Sulfates erfolgte mit 2 ml Methanol. Das Eluat wurde bis zur Trockne eingeeengt (Speedvac) und anschließend in 200 µl Methanol wieder aufgenommen (Ultraschallbad). Für die Messung mittels HPLC-MS/MS wurden jeweils 5 µl eingesetzt.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit der 1:1000 (v/v) verdünnten Zellsuspension im Zellzählgerät (Einstellungen: 60 µm Kapillare, Zählvolumen 3×200 µl, Auswertungsbereich \varnothing 4-30 µm).

2.6.2 HPLC-MS/MS

Die Quantifizierung des gebildeten DHEA-Sulfates erfolgte mittels HPLC-MS/MS. Dazu wurde zunächst das komplexe Gemisch der cytosolischen Proben mittels High Performance Liquid Chromatographie (HPLC, Alliance Separation Module 2695) unter folgenden Bedingungen aufgetrennt:

Trennsäule	NovaPak C ₁₈ (3,9 x 300 mm, 4 µm)
Eluent A	Methanol-0,01 M Ammoniumacetat, pH 6,9 (10:90)
Eluent B	Methanol
Fluss	0,5 ml/min
Säulentemperatur	25°C
Probentemperatur	15°C
Detektor	Photo Diode Array Detector 996

Tabelle 2-1: Gradient für HPLC

Zeit (min)	% A	% B
0	60	40
8	20	80
10	10	90
20	3	97
20,5	60	40
23	60	40

Als externer Standard wurde DHEA-Sulfat verwendet und die Auswertung erfolgte mittels einer Eichgerade.

Anschließend erfolgte der quantitative Nachweis des gebildeten DHEA-Sulfates. Dazu wurde die HPLC mittels Interface mit dem Triple Quadrupol Massenspektrometer mit Z-Spray ESI (Elektrospray Ionisierung) Quelle verbunden. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Split:	1:4
Ionisierung	Negativ-Ionen Elektrospray-Ionisierung (ESP)
Capillary	2,9 kV
Source Block Temp	110°C
Desolvationstemp	400°C
Desolvationsgas (N ₂)	400 l/h
Kollisionsgas	2,7 x 10 ⁻³ mBar
Cone Volt	45 V
Kollisionsenergie	30 eV
MRM (5-15 min)	367 m/z -> 97 m/z

2.7 Statistik

Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle Experimente mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und anhand der Einzel- bzw. Mittelwerte Standardabweichungen berechnet. Für die Berechnung von Signifikanzen wurde der ungepaarte, zweiseitige *t*-Test verwendet. Dabei wurde $p < 0,05$ als Signifikanzgrenze festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen in Prokaryonten

3.1.1 Einfluss seltener Codons auf die 1A2*1-Expression

3.1.1.1 Konstruktion der pKK-1A2*1 Klone

Um die Expression der 1A2*1 in Bakterien zu optimieren wurden in dieser Arbeit mittels gerichteter Mutagenese durch PCR acht verschiedene 1A2*1-cDNA-Konstrukte hergestellt. Die einzelnen Konstrukte unterscheiden sich in ihrer Codonsequenz am 5'-Ende (Tabelle 3-1). Als Referenz wurde die 1A2*1-cDNA (GenBank Nummer U28169) mit den Codons, wie sie in der humanen Sequenz vorgegeben sind, verwendet. Das Austauschen von sechs häufigen Codons am 5'-Ende der 1A2*1-cDNA gegen synonyme seltene Codons hatte in einer früheren Arbeit zu einer unerwarteten Steigerung der Expression um das 3-fache in *S. typhimurium* (1A2*1Z1) geführt²¹. In der vorliegenden Arbeit wurden nun diese sechs Codons in verschiedenen Kombinationen ausgetauscht, um den Effekt der seltenen Codons auf die Expressionsstärke des 1A2*1-Proteins genauer zu untersuchen.

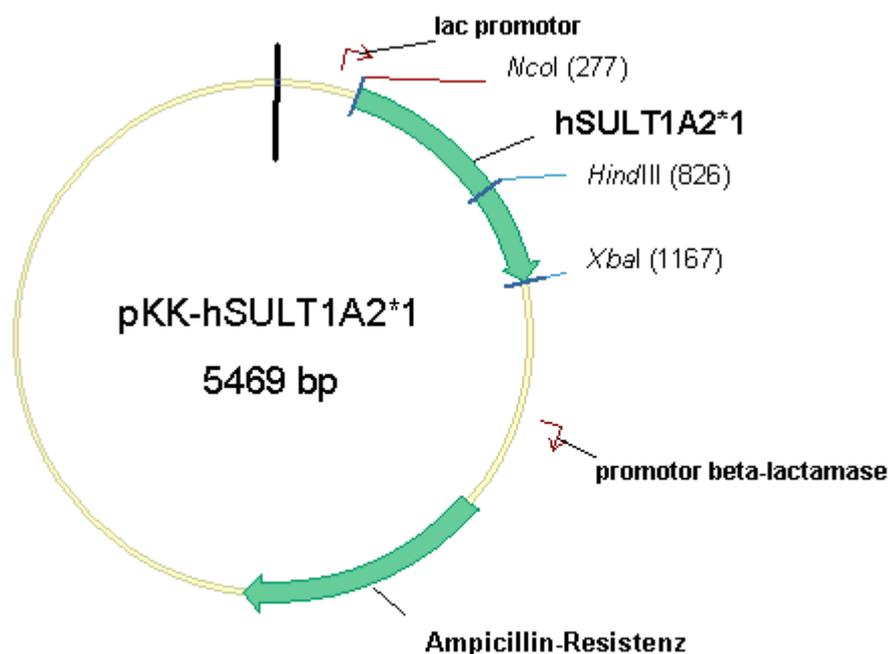


Abbildung 3-0: Vektorkarte von pKK-1A2

Für die heterologe Expression in Bakterien wurden die einzelnen cDNA *NcoI* x *XbaI* in den prokaryontischen Expressionvektor pKK233-2 kloniert. Dieser Vektor wurde bereits für die konstitutive Expression von hSULT in *E. coli*^{111,112} und *S. typhimurium*^{16,113} beschrieben.

Tabelle 3-1: 5'-cDNA-Sequenzen und Codon Usage der 1A2*1-Konstrukte

cDNA	Codons und Codon Usage									+/-GC [#]
	M	E	L	I	Q	D	I	S	R	
1A2*1	ATG	GAG	CTG	ATC	CAG	GAC	ATC	TCT	CGC	
<i>S. typhimurium</i>	100 %	37 %	50 %	41 %	71 %	39 %	41 %	12 %	41 %	
<i>E. coli</i>	100 %	31 %	50 %	42 %	65 %	37 %	42 %	15 %	40 %	
1A2*1Z1	ATG	GAC	CTA	ATA	CAA	GAC	ATA	TCA	AGG	- 6
<i>S. typhimurium</i>			5 %	9 %	29 %		9 %	11 %	3 %	
<i>E. coli</i>			4 %	7 %	35 %		7 %	12 %	2 %	
1A2*1gc6	ATG	GAA	CTG	ATT	CAG	GAT	ATT	AGT	CGT	- 6
<i>S. typhimurium</i>		63 %		50 %		61 %	50 %	13 %	33 %	
<i>E. coli</i>		69 %		51 %		63 %	51 %	15 %	38 %	
1A2*1Z2	ATG	GAC	CTA	ATA	CAG	GAC	ATA	TCT	AGG	- 4
1A2*1Z3	ATG	GAG	CTG	ATC	CAA	GAC	ATC	TCA	CGC	- 2
1A2*1Z4	ATG	GAC	CTA	ATA	CAA	GAC	ATC	TCT	CGC	- 3
1A2*1Z5	ATG	GAG	CTG	ATC	CAG	GAC	ATA	TCA	AGG	- 2
1A2*1Z6	ATG	GAC	CTA	ATA	CAG	GAC	ATC	TCA	AGG	- 3

[#] gibt an um wieviele Basen der GC-Gehalt durch das Austauschen der Codons reduziert wurde

3.1.1.2 Expressionsniveau von 1A2*1 in *E. coli* XL-1

Die Quantifizierung der 1A2*1-Expression in *E. coli* erfolgte mittels Western-Blot-Analyse (Abbildung 3-1). Jeweils 1 µg cytosolisches Protein wurde eingesetzt und die Detektion erfolgte mit einem Antiserum aus dem Schaf gegen humane SULT1A3. Dieses erkennt, aufgrund der starken Übereinstimmung der Aminosäureprimärsequenz, die humanen SULT1A1, 1A2 und 1A3. Die anschließende densitrometrische Auswertung der Blots ergab, dass die Expression von 1A2*1Z4 bis zu 18-fach im Vergleich zur Wildtypsequenz 1A2*1, durch das Einführen von drei seltenen Codons in den Positionen Leu-3, Ile-4 und Glu-5 am 5'-Ende der cDNA, erhöht werden konnte. Das Ersetzen von insgesamt sechs Codons in den Positionen 3, 4, 5 und 7, 8, 9 durch seltene Codons (1A2*1Z1) führte zu einer 9-fachen Expressionsteigerung. Da durch das Einführen seltener Codons auch der GC-Gehalt der cDNA gesenkt wurde, wurde

des weiteren ein Konstrukt (1A2*1gc6) getestet, bei dem wie im Konstrukt 1A2*1Z1 jeweils sechs GC-Nukleotide durch AT-Nukleotide ersetzt wurden. In diesem Fall wurden jedoch häufige Codons eingeführt. Der entsprechende Stamm zeigte keine signifikante Erhöhung der Expression im Vergleich zum Wildtyp. Das Einführen der vier sehr seltenen Codons Leu (CTA- 4 %), 2 x Ile (ATA- 7 %) und Arg (AGG- 2 %) führte nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Expression (1A2*1Z2). Wurden nur die beiden weniger seltenen Codons in den Positionen Glu-5 und Ser-8 eingeführt (1A2*1Z3) konnte die Expression noch 7-fach gesteigert werden.

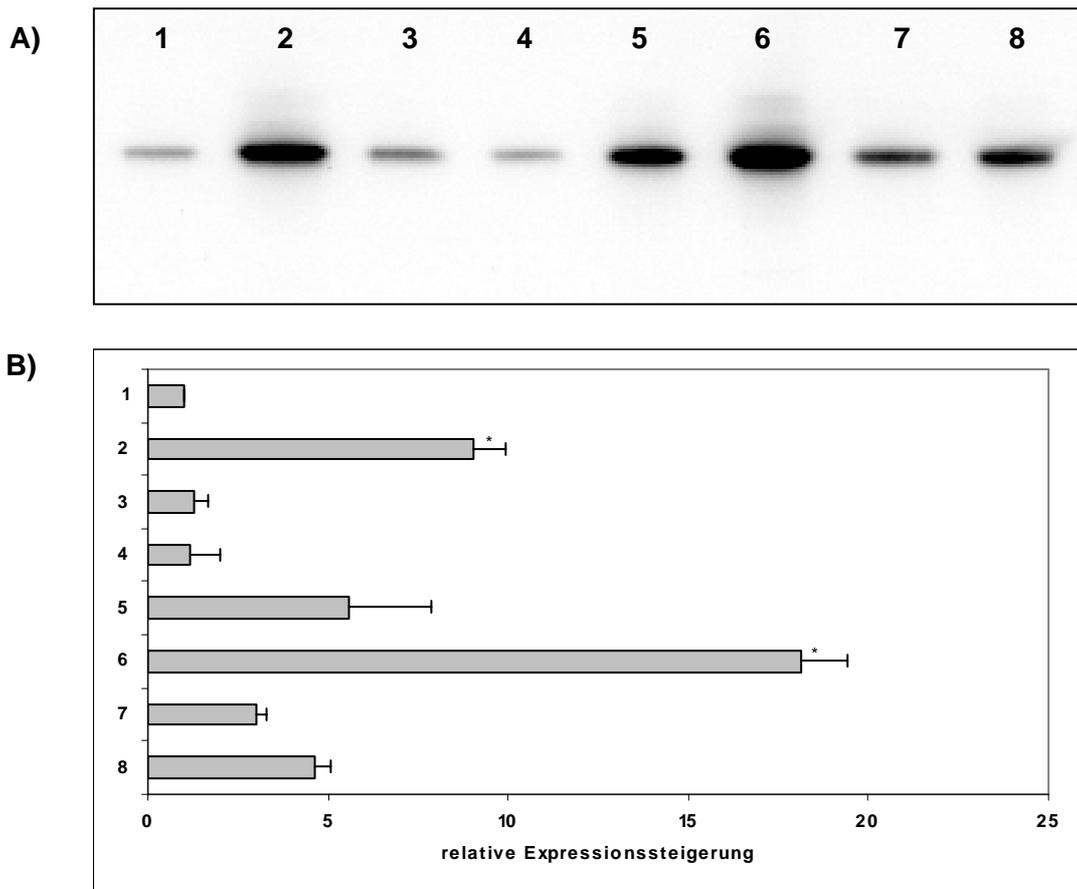


Abbildung 3-1: Quantifizierung der 1A2*1 Expression in *E. coli* XL-1

A) Western-Blot-Analyse von Cytosolpräparationen aus *E. coli* XL-1 transfiziert mit pKK-1A2*1 (1), pKK-1A2*1Z1 (2), pKK-1A2*1gc6 (3), pKK-1A2*1Z2 (4), pKK-1A2*1Z3 (5), pKK-1A2*1Z4 (6), pKK-1A2*1Z5 (7), pKK-1A2*1Z6 (8). Pro Spur wurden je 1 µg cytosolisches Protein eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit: 1. Antikörper Schaf anti-SULT1A3 IgG (erkennt alle 1A-Proteine) und 2. Antikörper Esel anti-Schaf IgG. **B)** Ergebnisse der densitrometrischen Auswertung der Western Blot Analyse. Es wurden jeweils drei unabhängige Western Blots mit denselben cytosolischen Präparationen densitrometrisch ausgewertet. Die Zahlen sind relativ zur Wildtypsequenz 1A2*1, die 1 gesetzt wurde. Stern (*) bezeichnet $P < 0,05$ vs. Wildtyp.

3.1.1.3 Expressionsniveau von 1A2*1 in *S. typhimurium*

Die Quantifizierung der 1A2*1-Expression in *S. typhimurium* erfolgte analog zur Expressionsanalyse in *E. coli* mittels densitometrischer Auswertung von Western Blots (Abbildung 3-2). Auch in den Salmonellen konnte die höchste Expressionssteigerung (14-fach) mit dem Konstrukt 1A2*1Z4 beobachtet werden. Der Klon 1A2*1gc6 zeigte in *S. typhimurium* zwar eine signifikante Erhöhung der Expression (3-fach), jedoch lag das Expressionsniveau noch deutlich unter dem des 1A2*1Z1-Klons (6-fach im Vergleich zum Wildtyp). Beim 1A2*1gc6 wurden statt seltener Codons synonyme häufige Codons eingefügt, die den GC-Gehalt der cDNA im gleichen Maße absenkten wie die eingefügten seltenen Codons beim 1A2*1Z1. Dieses Konstrukt wurde generiert, um zu überprüfen, ob die Expressionssteigerung nicht auf die seltenen Codons, sondern auf die damit verbundene Senkung des GC-Gehaltes der cDNA zurückzuführen ist.

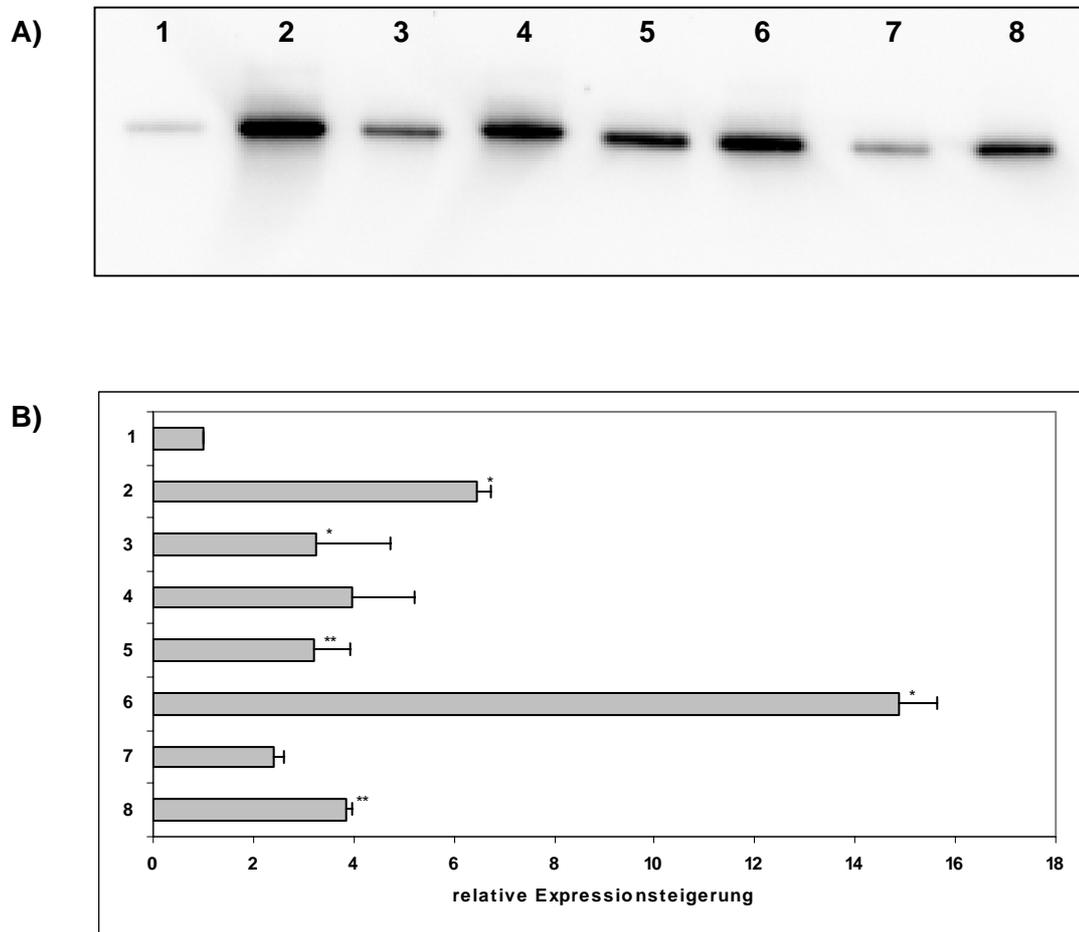


Abbildung 3-2: Quantifizierung der 1A2*1 Expression in *S. typhimurium* TA1538

A) Western-Blot-Analyse von Cytosolpräparationen aus *S. typhimurium* transfiziert mit pKK-1A2*1 (1), pKK-1A2*1Z1 (2), pKK-1A2*1gc6 (3), pKK-1A2*1Z2 (4), pKK-1A2*1Z3 (5), pKK-1A2*1Z4 (6), pKK-1A2*1Z5 (7), pKK-1A2*1Z6 (8). Je 1 µg cytosolisches Protein wurden eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit: 1. Antikörper Schaf anti-SULT1A3 IgG (erkennt alle 1A-Proteine) und 2. Antikörper Esel anti-Schaf IgG. **B)** Ergebnisse der densitrometrischen Auswertung der Western Blot Analyse. Es wurden jeweils drei unabhängige Western Blots mit denselben cytosolischen Präparationen densitrometrisch ausgewertet. Stern (*) bzw. (**) bezeichnet $P < 0,05$ bzw $P < 0,01$ vs. Wildtyp.

3.1.2 Sensitivität von TA1538-1A2*1 und -1A2*1Z4 im Ames-Test

Um zu überprüfen, ob die Erhöhung der 1A2*1 Expression in *S. typhimurium* einen Einfluss auf die Sensitivität der Stämme im Mutagenitätstest hatte, wurden die beiden Stämme mit der höchsten Expression, im Vergleich zum Wildtyp 1A2*1, im Ames-Test überprüft. Als Testsubstanzen wurden 1-Hydroxymethylpyren (1-HMP), 2-Hydroxyethylpyren E1 (2-HEP E1, (+) Enantiomer) und 2-Nitrobenzylalkohol verwendet. Außerdem wurde das direkte Mutagen Benzo[a]pyren-4,5-oxid (BPO) eingesetzt, um zu überprüfen, ob die einzelnen Stämme vergleichbar auf mutagene Testsubstanzen, die nicht durch SULT aktiviert werden, reagieren.

1-HMP, 2-HEP und 2-Nitrobenzylalkohol sind keine direkten Mutagene in *S. typhimurium*, aber sie werden durch verschiedene SULT Formen des Menschen und der Ratte zu Mutagenen aktiviert und eignen sich deshalb als Positivkontrolle für die Funktionalität der exprimierten 1A2*1³⁷. 1-HMP wird von der 1A1*1 stärker aktiviert als von der 1A2*1, so dass die Aktivierung durch die 1A2*1 eher von biochemischem als von toxikologischem Interesse ist.

Zum Vergleich der Sensitivität der Indikatorstämme im Ames-Test wurde jeweils die spezifische Mutagenität (Revertanten pro nmol Testsubstanz) ermittelt. TA1538-1A2*1Z1 und -1A2*1Z4 reagierten auf alle drei Testsubstanzen deutlich sensitiver als TA1538-1A2*1. Gleichzeitig war jedoch die spezifische Mutagenität von BPO in den beiden höher exprimierenden Stämmen sehr viel niedriger als im Stamm mit der Wildtypsequenz (Tabelle 3-2). Vergleicht man die Stämme TA1538-1A2*1Z1 und -1A2*1Z4, ist das Verhältnis der Sensitivität bei den verschiedenen Testsubstanzen unterschiedlich. Für 1-HMP war die spezifische Mutagenität in beiden Stämmen ca. 1,7-fach erhöht im Vergleich zu TA1538-1A2*1. Für 2-HEP ist die spezifische Mutagenität jedoch in TA1538-1A2*1Z1 am höchsten, obwohl dieser Stamm eine geringere Expression der SULT im Vergleich zu TA1538-1A2*1Z4 besitzt. Für 2-Nitrobenzylalkohol wiederum ist die spezifische Mutagenität in TA1538-1A2*1Z4 etwas höher als in TA1538-1A2*1Z1.

Tabelle 3-2: Spezifische Mutagenitäten (Revertanten pro nmol Testsubstanz) in den *S. typhimurium* TA1538 Stämmen mit unterschiedlich stark exprimierter 1A2*1

	Ohne <i>SULT</i>	1A2*1	1A2*1Z1	1A2*1Z4
1-HMP	< 0,1	129	216	216
2-HEP E1	#	112	165	130
2-Nitrobenzylalkohol	#	2,1	2,7	2,8
BPO	12850	11042	3583	3367

nicht untersucht

3.1.3 Einfluss seltener Codons auf 1A1*1-Expression

Die 1A1*1 cDNA (GenBank Nummer X78283), insertiert in den prokaryontischen Expressionsvektor pKK233-2, wurde für die heterologe Expression der entsprechenden *SULT* in *E. coli* XL-1 und *S. typhimurium* TA1538 verwendet. Für die Expression in TA100 wurde der Vektor pKN verwendet; dieser wurde aus dem pKK233-2 generiert und besitzt anstatt der Ampicillin- eine Neomycinresistenz¹⁰⁰. Der pKK233-2 ist für die Transfektion von *S. typhimurium* TA100 nicht geeignet, da dieser Stamm bereits ein Plasmid mit einer Ampicillinresistenz (pKM101) besitzt. Zur Steigerung des Expressionsniveaus wurden sechs häufige Codons am 5'-Ende der cDNA mittels gerichteter Mutagenese durch PCR gegen synonyme seltene Codons ausgetauscht (Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3: 5' cDNA Sequenzen und Codon Usage von 1A1*1 bzw. 1A1*1Y

<i>cDNA</i>	<i>Codons und Codon Usage</i>									
	M	E	L	I	Q	D	T	S	R	+/- GC [#]
1A1*1	ATG	GAG	CTG	ATC	CAG	GAC	ACC	TCC	CGC	
<i>S. typhimurium</i>	100 %	37 %	50 %	41 %	71 %	39 %	43 %	17 %	41 %	
<i>E. coli</i>	100 %	31 %	50 %	42 %	65 %	37 %	43 %	15 %	40 %	
1A1*1Y	ATG	GAC	CTA	ATA	CAA	GAC	ACA	TCA	AGG	- 6
<i>S. typhimurium</i>			5 %	9 %	29 %		11 %	11 %	3 %	
<i>E. coli</i>			4 %	7 %	35 %		13 %	12 %	2 %	

gibt an um wieviele Basen der GC-Gehalt durch das Austauschen der Codons reduziert wurde

Die Quantifizierung der Expression erfolgte mittels Western-Blot-Analyse von cytosolischen Präparationen aus *E. coli* bzw. *S. typhimurium*. Die Detektion erfolgte mit dem gleichen Antiserum aus dem Schaf gegen 1A3, das auch für die Analysen der 1A2*1 Expression verwendet wurde. Die densitrometrische Auswertung der Blots ergab eine Erhöhung der Expression um das 3-fache in *E. coli* und um das 4- bzw. 7-fache *S. typhimurium* TA1538 bzw. TA100. In Abbildung 3-3 sind drei repräsentative Western Blots gezeigt.

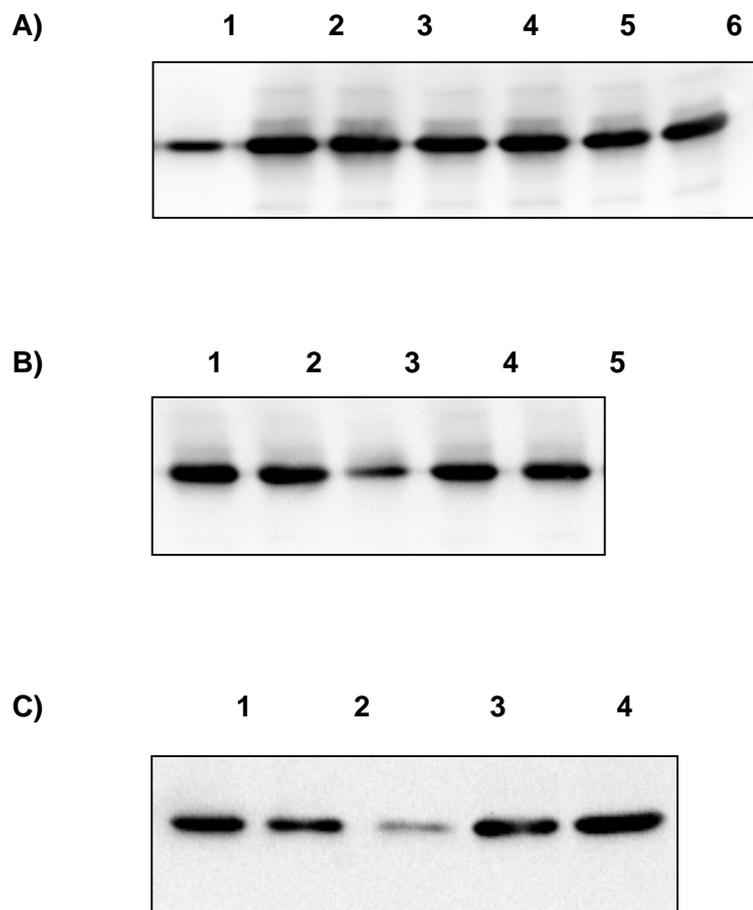


Abbildung 3-3: Expression von hSULT1A1*1 in *E. coli* und *S. typhimurium*

Western-Blot-Analyse mit Cytosolpräparationen aus **A)** *E. coli* XL-1 transfiziert mit pKK-1A1*1 (1) und pKK-1A1*1Y (2-7), **B)** *S. typhimurium* TA1538 transfiziert mit pKK-1A1*1 (3) und pKK-1A1*1Y (1, 2, 4, 5) und **C)** *S. typhimurium* TA100 transfiziert mit pKN-1A1*1 (3) und pKN-1A1*1Y (1, 2, 4, 5). Aufgetragen wurden jeweils 10 µg (*E. coli*) bzw. 5 µg (*S. typhimurium* TA1538) bzw. 3 µg (*S. typhimurium* TA100) cytosolisches Protein.

Auf den Western Blots in der Abbildung 3-3 sind jeweils mehrere unabhängige Klone des Konstruktes pKK-1A1*1Y bzw. pKN-1A1*1Y (TA100) abgebildet. Das Expressionsniveau der 1A1*1 in den einzelnen Klonen ist sowohl in *E. coli* als auch in der verschiedenen *S. typhimurium* Stämmen konstant.

3.1.4 Sensitivität von TA1538-1A1*1 und -1A1*1Y im Ames-Test

Die Funktionalität der überexprimierten Sulfotransferase konnte im Ames-Test nachgewiesen werden. Als Testsubstanz wurde Aristolochiasäure, ein typischer Sekundärmetabolit aus *Aristolochia* Pflanzen, verwendet (Abbildung 3-4). Aristolochiasäure ist ein Substanzgemisch aus verschiedenen Nitrophenanthren-carboxylsäuren mit den Hauptbestandteilen Aristolochiasäure I und II.

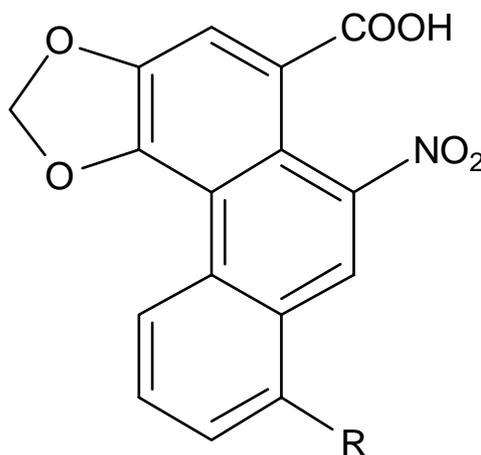


Abbildung 3-4: Strukturformel von Aristolochiasäure I (R = OCH₃) und II (R=H)

Es ist bekannt, dass Aristolochiasäure nephrotoxisch und kanzerogen wirkt. Für die Bildung DNA-reaktiver Metabolite aus Nitroarenen ist zunächst eine Nitroreduktion Voraussetzung. Im hier verwendeten *in vitro* Mutagenitätstestsystem mit *S. typhimurium* erfolgt die Nitroreduktion durch eine endogene bakterielle Nitroreduktase^{114,115}. Wahrscheinlich wird die Mutagenität verursacht durch die Entstehung eines resonanzstabilisierten Nitrenium-Ions aufgrund einer intramolekularen Acylierung. Demnach reicht bereits die Nitroreduktion aus für eine Bioaktivierung der Aristolochiasäure. Allerdings ist bekannt, dass die Mutagenität

verschiedener aromatischer Hydroxylamine, gebildet aus Nitroarenen, durch eine weitere Bioaktivierung (z.B. Sulfonierung) noch verstärkt werden kann^{116,117}. Deshalb wurde hier untersucht, ob die Mutagenität von Aristolochiasäure im Ames-Test durch die heterologe Expression von 1A1*1 in den Indikatorzellen *S. typhimurium* noch gesteigert werden kann. Dafür wurden sowohl die Stämme mit dem 1A1*1-Wildtypkonstrukt als auch mit dem Codon-optimierten Konstrukt 1A1*1Y verwendet. Wie in Abbildung 3-5 gezeigt, konnte eine deutliche Steigerung der Revertantenrate durch die Expression von 1A1*1 in *S. typhimurium* TA1538 erzielt werden. Des Weiteren zeigte der 1A1*1Y-Stamm eine deutlich erhöhte Sensitivität, bei geringen Konzentrationen der Testsubstanz, im Vergleich zum 1A1*1-Stamm. Durch die Erhöhung der 1A1*1-Expression um das 4-fache, konnte ein wesentlich steilerer Anstieg der Revertantenrate erzielt werden.

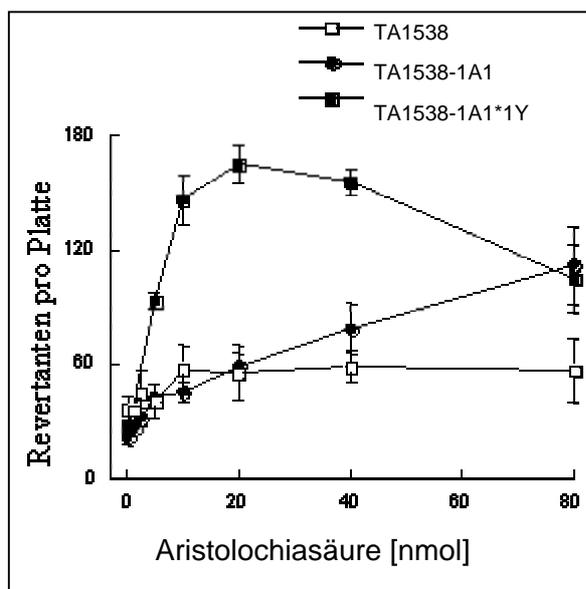


Abbildung 3-5: Ames-Test mit *S. typhimurium* TA1538 Stämmen mit unterschiedlich stark exprimierter 1A1*1

Mutagenität von Aristolochiasäure in *S. typhimurium* TA1538 und TA1538-1A1*1 bzw. -1A1*1Y.

Der Stamm *S. typhimurium* TA100-hSULT1A1*1Y zeigte eine deutlich reduzierte Reaktion auf das direkte Mutagen BPO im Vergleich zum Stamm TA100-1A1*1 und wurde deshalb nicht im Ames-Test eingesetzt.

3.1.5 Einfluss seltener Codons auf die 2B1b-Expression

3.1.5.1 Konstruktion der 2B1b-Klone

Die Expression der 2B1b in Prokaryonten (*E. coli* und *S. typhimurium*) ist unter Verwendung der Wildtyp-cDNA-Sequenz äußerst schwach. Um die Expression zu steigern, ohne das Protein und somit seine katalytischen Eigenschaften zu verändern, wurden stille Mutationen am 5'-Ende der 2B1b-cDNA eingefügt. Maximal neun Codons der nativen Sequenz wurden durch synonyme Codons, die in Prokaryonten seltener vorkommen, ausgetauscht. Für die Klonierung und Expression der 2B1b-cDNA wurde ebenfalls das Plasmid pKK233-2 verwendet.

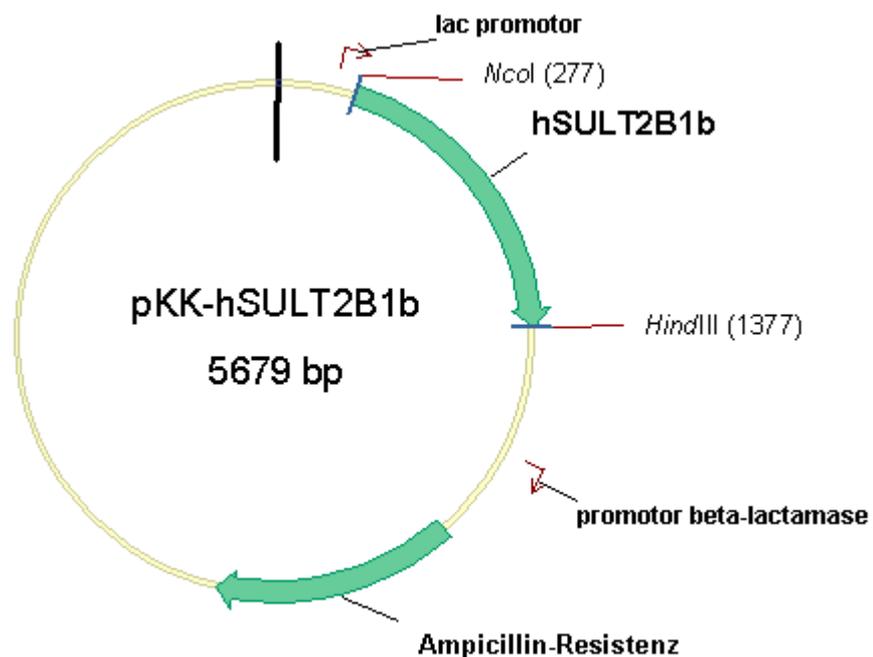


Abbildung 3-6 Vektorkarte von pKK-2B1b.

Mittels gerichteter Mutagenese durch PCR wurden zwölf verschiedene pKK-2B1b-Konstrukte hergestellt. Die einzelnen Konstrukte unterscheiden sich lediglich in ihrer Codon Usage am 5'-Ende der 2B1b-cDNA (Tabelle 3-4). Für die Untersuchung des Einflusses der seltenen Codons auf das Expressionsniveau der 2B1b in Prokaryonten wurden *E. coli* XL-1 und *S. typhimurium* TA1538 mit den verschiedenen Konstrukten transfiziert.

Tabelle 3-4: 5'-cDNA Sequenzen und Codon Usage der 2B1b-Konstrukte

<i>cDNA</i>	<i>Codons und Codon Usage</i>												+/- GC #
	M	D	G	P	A	E	P	Q	I	P	G	L	
2B1b	ATG	GAC	GGG	CCC	GCC	GAG	CCC	CAG	ATC	CCG	GGC	TTG	
<i>S. typhimurium</i>	100 %	39 %	16 %	16 %	30 %	37 %	16 %	71 %	41 %	55 %	48 %	12 %	
<i>E. coli</i>		37 %	15 %	12 %	27 %	31 %	12 %	65 %	42 %	53 %	40 %	13 %	
2B1b*1X1			GGA	CCA	GCA		CCA	CAA	ATA	CCA	GGA	CTA	-8
<i>S. typhimurium</i>			12 %	13 %	13 %		13 %	29 %	9 %	13 %	12 %	5 %	
<i>E. coli</i>			11 %	19 %	21 %		19 %	35 %	7 %	19 %	11 %	4 %	
2B1b*gc8		GAT	GGT	CCT		GAA	CCT		ATT		GGT	TTA	-8
<i>S. typhimurium</i>		61 %	24 %	16 %		63 %	16 %		50 %		24 %	12 %	
<i>E. coli</i>		63 %	34 %	16 %		69 %	16 %		51 %		34 %	13 %	
2B1b*1X2									ATA			CTA	-1
2B1b*1X3			GGA	CCA	GCA		CCA	CAA		CCA	GGA		-7
2B1b*1X4			GGA	CCA	GCA								-3
2B1b*1X5							CCA	CAA	ATA				-3
2B1b*1X6										CCA	GGA	CTA	-2
2B1b*1X7			GGA	CCA	GCA		CCA	CAA	ATA				-6
2B1b*1X8							CCA	CAA	ATA	CCA	GGA	CTA	-5
2B1b*1X9			GGA	CCA	GCA					CCA	GGA	CTA	-5
2B1b*1X10			GGA	CCA							GGA	CTA	-3

gibt an um wieviele Basen der GC-Gehalt durch das Austauschen der Codons reduziert wurde

3.1.5.2 Expressionsniveau von 2B1b in *E. coli* XL-1

Zur Quantifizierung der 2B1b Expression in *E. coli* wurden jeweils 50 µg cytosolisches Protein im Western Blot (Abbildung 3-7) eingesetzt und dieser dann semi-quantitativ densitrometrisch ausgewertet. Die Detektion erfolgte mit einem Antiserum aus Kaninchen gegen 2B1a. Dieses erkennt sowohl die 2B1a als auch die 2B1b³⁰.

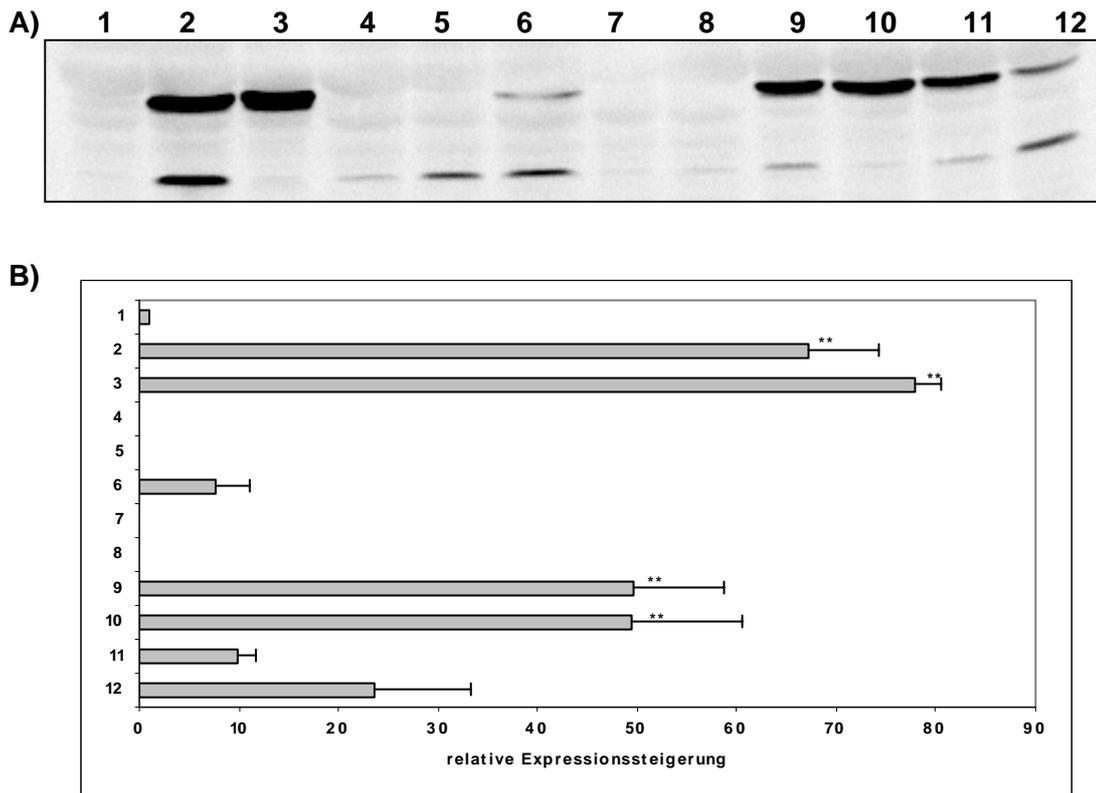


Abbildung 3-7: Quantifizierung der 2B1b Expression in *E. coli* XL-1

A) Western-Blot-Analyse mit Cytosolpräparationen aus *E. coli* XL-1 transfiziert mit pKK-2B1b (1), pKK-2B1b*1X1 (2), pKK-2B1b*1X3 (3), pKK-2B1b*1X2 (4), pKK-2B1b*gc8 (5), pKK-2B1b*1X4 (6), pKK-2B1b*1X5 (7), pKK-2B1b*1X6 (8), pKK-2B1b*1X10 (9), pKK-2B1b*1X9 (10), pKK-2B1b*1X7 (11) and pKK-2B1b*1X8 (12). In jeder Spur wurden 50 µg cytosolisches Protein aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit: 1. Antikörper Kaninchen anti-SULT2B1a IgG (erkennt beide 2B1-Proteine) und 2. Antikörper Ziege anti-Kaninchen IgG. **B)** Ergebnisse der densitrometrischen Auswertung der Western Blot Analyse. Es wurden jeweils 3 unabhängige Western Blots mit denselben cytosolischen Präparationen densitrometrisch ausgewertet. Die Zahlen sind relativ zum Wildtyp 2B1b, der 1 gesetzt wurde. Stern (*) bzw. (**) bezeichnet $P < 0,05$ bzw. $P < 0,01$ vs. Wildtyp.

Durch das Einführen seltener synonyme Codons am 5'-Ende der 2B1b-cDNA konnte die Expression der 2B1b in *E. coli* XL-1 bis zu 80-fach gegenüber dem Wildtyp-Konstrukt erhöht werden. Die Mutation von zwei bis neun Codons (Tabelle 3-4), in verschiedenen Kombinationen innerhalb der ersten zwölf Codons der cDNA, führte zu signifikanten Änderungen des Expressionsniveaus. Die höchste Expressionssteigerung konnte durch den Austausch von sieben bis neun Codons (2B1b*1X3: 3-5, 7-8 und 10-11 bzw. 2B1b*1X1: 3-5 und 7-12) oder aber den Austausch von vier bis sechs Codons (2B1b*1X10: 3-4 und 11-12 bzw. 2B1b*1X9: 3-5 und 10-12) erzielt werden. Wobei bei den zuletzt genannten Konstrukten die Codonaustausche lediglich am Anfang und am Ende der betroffenen Sequenz durchgeführt wurden. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass der Austausch von sechs aufeinanderfolgenden Codons am Anfang (2B1b*1X7) oder am Ende (2B1b*1X8) des betrachteten Bereichs zu einem stärkeren Anstieg der Expression führte als der Austausch von nur drei aufeinanderfolgenden Codons (2B1b*1X4, 2B1b*1X5, 2B1b*1X6). Dies weist darauf hin, dass die Länge der veränderten Sequenz ein wesentlicher Faktor für die Steigerung der Expression ist, und die Möglichkeit besteht, einen Sequenzabschnitt durch Codonaustausche am Anfang und am Ende einzuschließen. Ein weiterer entscheidender Faktor für die Expressionssteigerung ist die Nähe der ausgetauschten Codons zum 5'-Ende der cDNA. So konnte die Expression durch den Austausch der ersten drei bzw. sechs betroffenen Codons (2B1b*1X4, 2B1b*1X7) 8- bzw. 24-fach gesteigert werden, während der Austausch der letzten drei bzw. sechs betroffenen Codons (2B1b*1X6, 2B1b*1X8) zu keiner Expression bzw. zu einer 10-fachen Expressionssteigerung führte. Die alleinige Einführung der beiden seltensten Codons (2B1b*1X2) im betroffenen Sequenzabschnitt sowie eine Senkung des GC-Gehaltes durch die Einführung häufiger Codons (2B1b*gc8) führte zu keinem Anstieg der Expression in *E. coli* XL-1. Die seltensten Codons (Ile-ATA (7%); Leu-CTA (4%)) führten sogar zu einer signifikanten Reduktion der Expression, während mit dem Austausch von sieben der betroffenen Codons, ausgenommen Isoleucin und Leucin, die höchste Expressionssteigerung erzielt werden konnte. Was darauf schließen lässt, dass die Insertion zu seltener Codons die Expression hemmt und die Senkung des GC-Gehaltes durch das Austauschen von Codons die Expression in *E. coli* nicht beeinflusst.

Durch das Austauschen einzelner Codons, durchgeführt im Rahmen einer Diplomarbeit¹¹⁸, konnte kein spezielles Codon identifiziert werden, welches die Expressionssteigerung bewirkt. Allerdings wurde ein ortsspezifischer Effekt

beobachtet. Das Einführen desselben Codons wie z.B. Pro-CCA (19 %) an verschiedenen Positionen (4, 7 oder 10) hatte eine 20-fache, keine oder 4-fache Erhöhung der Expression zur Folge. Insgesamt konnte aber durch keinen Einzelcodonaustausch die Expression so stark gesteigert werden wie durch das kombinierte Austauschen mehrerer Codons.

3.1.5.3 Expressionsniveau von 2B1b in *S. typhimurium*

Die Bestimmung des Expressionsniveaus von 2B1b in *S. typhimurium* erfolgte ebenfalls semi-quantitativ durch densitrometrische Auswertung von Western Blots durchgeführt mit Cytosolpräparationen aus *S. typhimurium* (Abbildung 3-8).

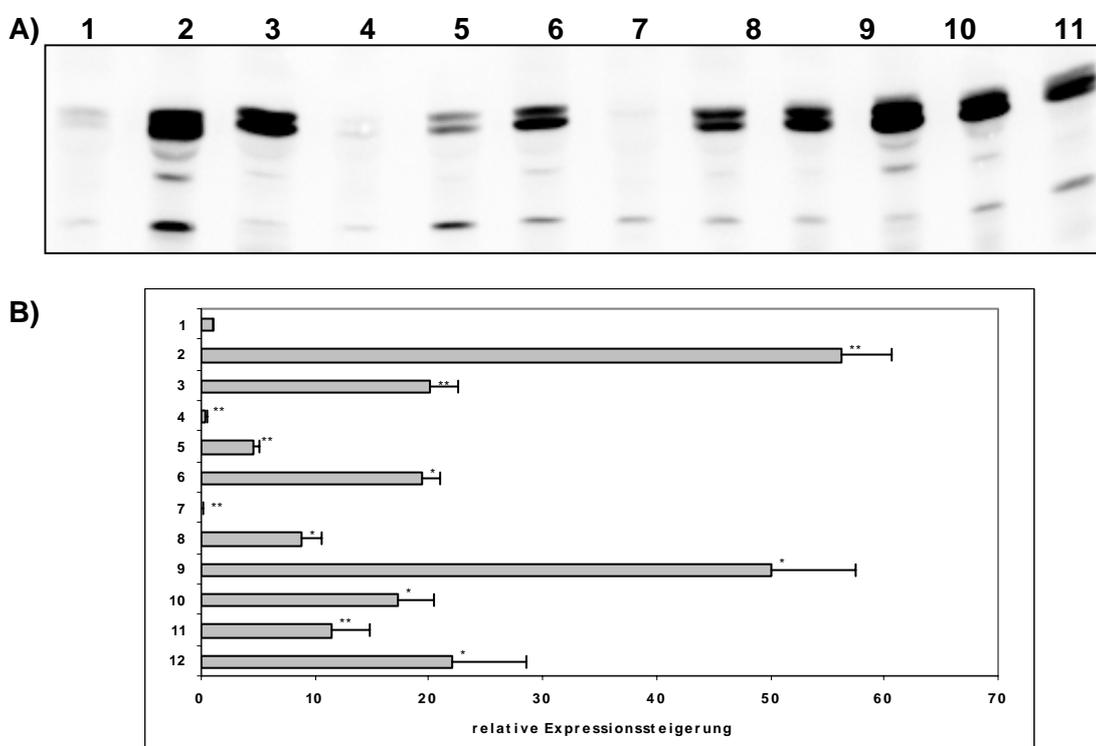


Abbildung 3-8: Quantifizierung der 2B1b Expression in *S. typhimurium* TA1538

A) Western-Blot-Analyse von Cytosolpräparationen aus *S. typhimurium* TA1538 transfiziert mit pKK-2B1b (1), 2B1b*1X1 (2), pKK-2B1b*1X3 (3), pKK-2B1b*1X2 (4), 2B1b*gc8 (5), pKK-2B1b*1X4 (6), pKK-2B1b*1X5 (7), pKK-2B1b*1X6 (8), pKK-2B1b*1X10 (9), pKK-2B1b*1X9 (10), pKK-2B1b*1X7 (11) and pKK-2B1b*1X8 (12). Je 30 µg cytosolisches Protein wurden eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit dem Antiserum gegen 2B1a. **B)** Ergebnisse der densitrometrischen Auswertung der Western Blot Analyse. Es wurden jeweils 3 unabhängige Western Blots mit denselben cytosolischen Präparationen densitrometrisch ausgewertet. Die Zahlen sind relativ zur Wildtypsequenz 2B1b, die 1 gesetzt wurde. Stern (*) bzw. (**) bezeichnet $P < 0,05$ bzw. $P < 0,01$ vs. Wildtyp.

Ähnlich wie bereits für *E. coli* XL-1 gezeigt wurde, konnte auch in *S. typhimurium* die Expression von 2B1b durch die Einführung seltener Codons (bis zu 56-fach) gesteigert werden. Der Wildtyp ist in *S. typhimurium* allerdings stärker exprimiert als in *E. coli* XL-1, deshalb ist die Expressionssteigerung im Allgemeinen nicht so dramatisch wie in *E. coli*. Die Änderung des Expressionsniveaus, im Vergleich zum Wildtyp, durch die Verwendung der gleichen elf verschiedenen Konstrukte (Tabelle 3-4) ist in *S. typhimurium* ähnlich wie in *E. coli*. Die stärkste Expression wurde hier durch den Austausch aller neun untersuchten Codons (2B1b*1X1) bzw. der Codons 3-5 und 10-12 (2B1b*1X9) erzielt. Die Konstrukte 2B1b*1X3 und 2B1b*1X10, die in *E. coli* XL-1 ebenfalls zu einer sehr hohen Expressionssteigerung führten, konnten die Expression in *S. typhimurium* nur noch ca. 20-fach im Vergleich zum Wildtyp erhöhen. Eine ebenfalls ca. 20-fache Erhöhung der Expression wurde auch durch den Austausch der ersten drei bzw. sechs betroffenen Codons (2B1b*1X4 bzw. 2B1b*1X7) erreicht. Für die Stämme 2B1b*gc8 und 2B1b*1X6, die in *E. coli* XL-1 keine Expression zeigten, konnte in *S. typhimurium* eine signifikante Erhöhung der Expression gegenüber dem Wildtypklon 2B1b nachgewiesen werden. Die Expression von 2B1b*1X2 und 2B1b*1X5 war allerdings auch in *S. typhimurium* kaum detektierbar und noch geringer als die des Wildtypklons.

Das Austauschen einzelner Codons führte in *S. typhimurium* zu einem ähnlichen Ergebnis wie in *E. coli*. Es wurden ebenfalls ortsspezifische Effekte beim Austauschen desselben Codons an unterschiedlichen Positionen beobachtet und es konnte kein einzelnes Codon identifiziert werden, welches für die Expressionssteigerungen allein verantwortlich ist¹¹⁸.

In den Western Blots mit cytosolischen Fraktionen von *S. typhimurium* wurden zwei sehr nahe beieinander migrierende 2B1b Banden angefärbt. Die beiden Banden waren nicht immer gleich stark ausgeprägt und das Verhältnis zwischen den Intensitäten variierte mit dem Austausch unterschiedlicher Codons.

3.1.5.4 Sulfonierungsaktivität in *E. coli* und *S. typhimurium* Cytosolen

Die *S. typhimurium* Stämme TA1538-2B1b bzw. -2B1b*1X1 und TA100-2B1b bzw. -2B1b*1X1 wurden ebenfalls im Ames-Test überprüft. Es konnte jedoch weder mit den Wildtyp Stämmen noch mit den höher exprimierenden Varianten die Aktivierung eines Promutagens gezeigt werden. Als Testsubstanzen wurden 3 β -Hydroxy-Cyproteronacetat, 3 β -Hydroxy-Chlormadinonacetat und 3 β -Hydroxy-Megestrolacetat

ausgewählt, da bekannt ist, dass die 2B1b 3 β -Hydroxysteroiden sulfonieren kann¹¹¹. Außerdem wurden noch nahrungsrelevante Substanzen (z.B. 5-Hydroxymethylfurfural) und Umweltkontaminanten (z.B. Nitrofen, 1-Hydroxymethylpyren) als Testsubstanzen verwendet von denen bekannt ist, dass sie durch SULT zu Mutagenen aktiviert werden können^{119,120}. Die ermittelten spezifischen Mutagenitäten waren für alle genannten Substanzen < 0.1 (Tabelle 3-5). Im Gegensatz zu den hochexprimierenden 1A2*1 Stämmen zeigten die 2B1b Stämme jedoch keine reduzierte Sensitivität gegenüber dem direkten Mutagen BPO.

Tabelle 3-5: Im Ames-Test mit TA100-2B1b*1X1 getestete Substanzen

Testsubstanz	Spezifische Mutagenität [Revertanten/nmol Testsubstanz]
3 β -Hydroxy-Cyproteronacetat	0,035
3 β -Hydroxy-Chlormadinonacetat	0,039
3 β -Hydroxy-Megestrolacetat	0,095
1-Hydroxymethylpyren	0,058
Nitrofen	0,021
5-Hydroxymethylfurfural	0,012

Um zu überprüfen, ob die in Bakterien exprimierte 2B1b enzymatisch aktiv ist, wurde die Sulfonierung von Dehydroepiandrosteron (DHEA), einem prototypischen Substrat für hSULT2-Enzyme, in cytosolischen Fraktionen von *E. coli* XL-1 und *S. typhimurium* TA1538 bestimmt. Dazu wurden jeweils 300 μ g cytosolisches Protein der Stämme 2B1b und 2B1b*1X1 mit 20 μ M DHEA für 15 min bei 37°C inkubiert, anschließend wurde das entstandene DHEA-Sulfat durch Festphasenextraktion angereichert und mittels HPLC-MS/MS quantifiziert. Für *E. coli* XL-1 Cytosole wurde eine Sulfonierungsaktivität von 4 bzw. 32 pmol/min/mg und für *S. typhimurium* 16 bzw. 168 pmol/min/mg Gesamtprotein (jeweils 2B1b und 2B1b*1X1) bestimmt. Das Expressionsniveau von 2B1b beträgt in TA1538-2B1b*1X1 ca. 2-3 % des cytosolischen Proteins¹²¹. Es ergibt sich also für diesen Stamm eine Metabolisierungsgeschwindigkeit von 5,6 bzw. 8,4 pmol/min/ μ g 2B1b Protein.

Die Bestimmung der DHEA-Sulfonierung in cytosolischen Fraktionen von 2B1b exprimierenden Bakterien erfolgte innerhalb einer Diplomarbeit welche im Rahmen dieser Arbeit betreut wurde¹¹⁸.

3.1.5.5 Expressionsniveau von 2B1b in *E. coli* BL21 (DE3)

Für die Expression der 2B1b in einem weiteren *E. coli* Stamm (BL21) wurden die zwölf Varianten der cDNA (Tabelle 3-4) jeweils unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *Nco*I x *Hind*III aus dem pKK233-2-Expressionsvektor in den pET-28(+)-Expressionsvektor umkloniert. Der pET-28(+)-Vektor ist ebenfalls für die Expression in Prokaryonten geeignet und besitzt einen T7-Promotor; dieser ist stärker als der lacZ-Promotor des pKK233-2 Vektors^{69,122}. Des weiteren besitzt der *E. coli* Stamm BL21 (DE3) eine Mutation im RNase-E-codierenden Gen (*rne131*), dadurch wird eine erhöhte Stabilität der mRNA in diesen Bakterienzellen erreicht⁷⁰. Die Quantifizierung der 2B1b Expression in *E. coli* BL21 erfolgte, wie bereits unter 2.4.7 beschrieben, mittels densitrometrischer Auswertung von Western Blots (Abbildung 3-9) für die jeweils 1 µg cytosolisches Protein eingesetzt wurden.

Auf Grund der zuvor erläuterten Unterschiede der beiden Expressionssysteme war das Expressionsniveau der 2B1b in *E. coli* BL21 DE3 deutlich höher (ca. 50-fach beim Wildtypkonstrukt) im Vergleich zum Stamm XL-1. Der Vergleich der Expressionsniveaus der cDNA-Konstrukte in den unterschiedlichen Expressionsvektoren zeigte, dass in *E. coli* BL21 generell die Unterschiede in der Expressionsstärke geringer waren. Darüber hinaus zeigten sich wesentliche Unterschiede bezüglich der Veränderung des Expressionsniveaus der einzelnen cDNA-Konstrukte. Während im Stamm XL-1 die höchsten Expressionsniveaus mit den Konstrukten 2B1b*1X3, 2B1b*1X1, 2B1b*1X9 und 2B1b*1X10 erzielt wurden, zeigten diese Konstrukte in den BL21 nur eine mittlere Steigerung (ca. 4-fach) der Expression gegenüber dem Wildtyp 2B1b. Dagegen konnte hier mit dem Konstrukt 2B1b*1X4, welches in den XL-1 nur eine schwache Erhöhung der Expression bewirkte, die Expression um das 7-fache gegenüber dem Wildtyp gesteigert werden. Im Gegensatz zu den XL-1 bei denen vier der Veränderungen in der cDNA-Sequenz zur Folge hatten, dass in diesen Stämmen kein 2B1b Protein nachgewiesen werden konnte, konnte im pET-BL21-System für jedes getestete Konstrukt die Expression des 2B1b Proteins gezeigt werden (Abbildung 3-9). Die vier Konstrukte, die in den XL-1 keine detektierbare Expression zeigten (2B1b*1X2, 2B1b*gc8, 2B1b*1X5, 2B1b*1X6), führten in den BL21 zu einer detektierbaren Expression. Für die drei zuletzt genannten konnte sogar eine ca. 1,5-fache Steigerung der Expression im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden.

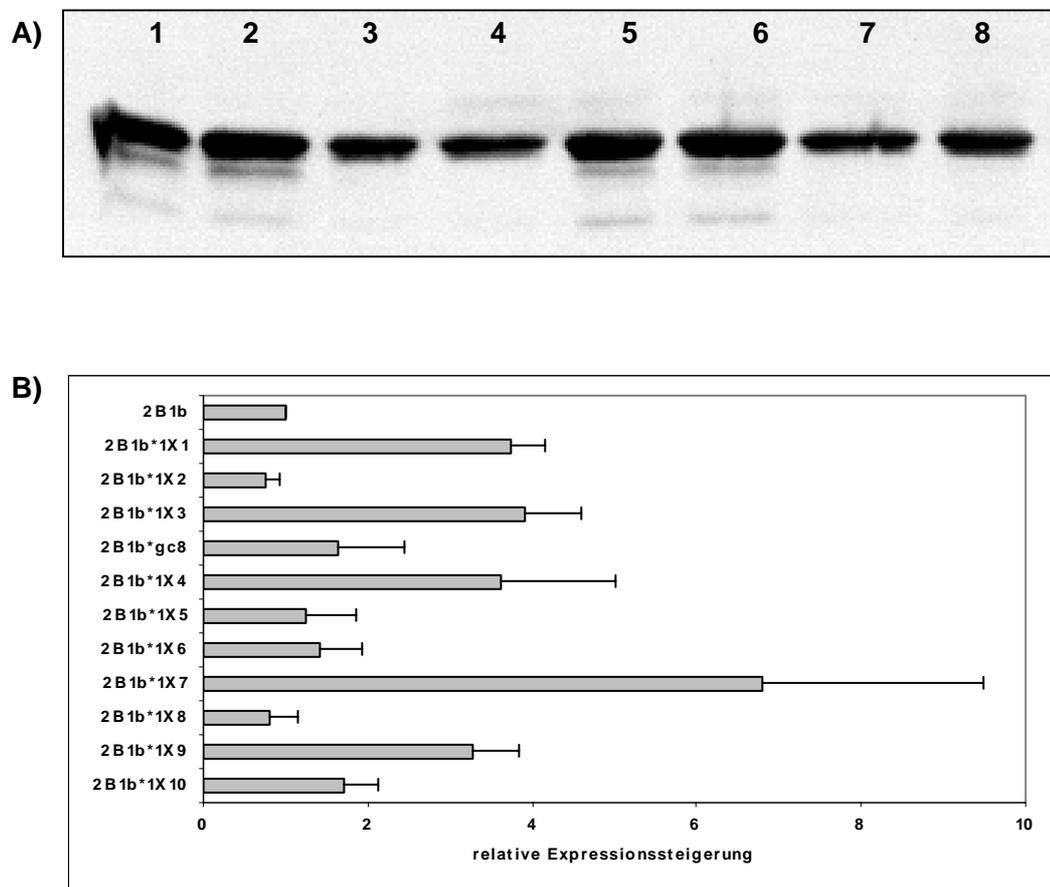


Abbildung 3-9: Quantifizierung der 2B1b Expression in *E. coli* BL21

A) Western-Blot-Analyse von Cytosolpräparationen aus *E. coli* BL21 transfiziert mit pET-2B1b*1X3 (1)+(2), pET-2B1b*1X2 (3)+(4), pET-2B1b*1X1 (5)+(6), pET-2B1b (7)+(8). Pro Spur wurde je 1 µg cytosolisches Protein eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit dem Antiserum aus dem Kaninchen gegen 2B1a. **B)** Ergebnisse der densitrometrischen Auswertung relativ zur Wildtypsequenz der Western Blot Analyse aller 11 Konstrukte (in Teil A nur vier ausgewählte Konstrukte gezeigt) im Vergleich zur Wildtypsequenz. Es wurden jeweils 3 unabhängige Western Blots mit denselben cytosolischen Präparationen densitrometrisch ausgewertet.

3.1.5.6 Expressionsniveau von 2B1b in *E. coli* in BL21 (RIPL)

Um den Einfluss der Verfügbarkeit einiger seltener tRNA auf die Expression der verschiedenen Konstrukte zu untersuchen, wurden *E. coli* BL21 (RIPL) codon plus mit den zwölf Varianten der 2B1b-cDNA (Tabelle 3-4) im pET-Vektor transfiziert. Dieser *E. coli* Stamm entspricht dem BL21 und trägt ein zusätzliches Expressionsplasmid mit den folgenden Genen seltener tRNA: argU (AGA, AGG), ileY (AUA), proL (CCC) und leuW (CUA). Die Überexpression der seltenen tRNA wird für gewöhnlich zur Steigerung der Proteinexpression verwendet, wenn die zu translatierende heterologe cDNA viele seltene Codons enthält. Die Quantifizierung der 2B1b Expression erfolgte mittels densitrometrischer Auswertung von Western Blots (Abbildung 3-10) analog zur Quantifizierung der Expression in den *E. coli* BL21.

Entgegen den Erwartungen konnte bei den Konstrukten 2B1b*1X1 und 2B1b*1X2, die neun seltene bzw. zwei sehr seltene Codons enthalten keine signifikante Veränderung des Expressionsniveaus in BL21 und BL21 (RIPL) beobachtet werden. Für das Konstrukt 2B1b*1X2 konnte ebenfalls keine signifikante Expressionssteigerung durch die Überexpression der entsprechenden tRNA (Ile-AUA und Leu-CUA) erzielt werden. Eine deutliche Steigerung der Expression (max. 9-fach zwischen BL21 und BL21 RIPL) konnte jedoch bei allen Konstrukten festgestellt werden, bei denen jeweils ein Prolin-Codon ausgetauscht wurde (2B1b*1X4, 2B1b*1X5, 2B1b*1X6). Wurden jedoch zwei Prolin-Codons ausgetauscht, war die Expressionssteigerung durch die überexprimierten Prolin-tRNA wesentlich geringer (max. 4-fach für 2B1b*1X9) bzw. war überhaupt keine Expressionsteigerung mehr nachweisbar (2B1b*1X7). Auch bei den Konstrukten mit drei ausgetauschten Prolin Codons (2B1b*1X1 und 2B1b*1X3) wurde keine signifikante Änderung der Expression beobachtet.

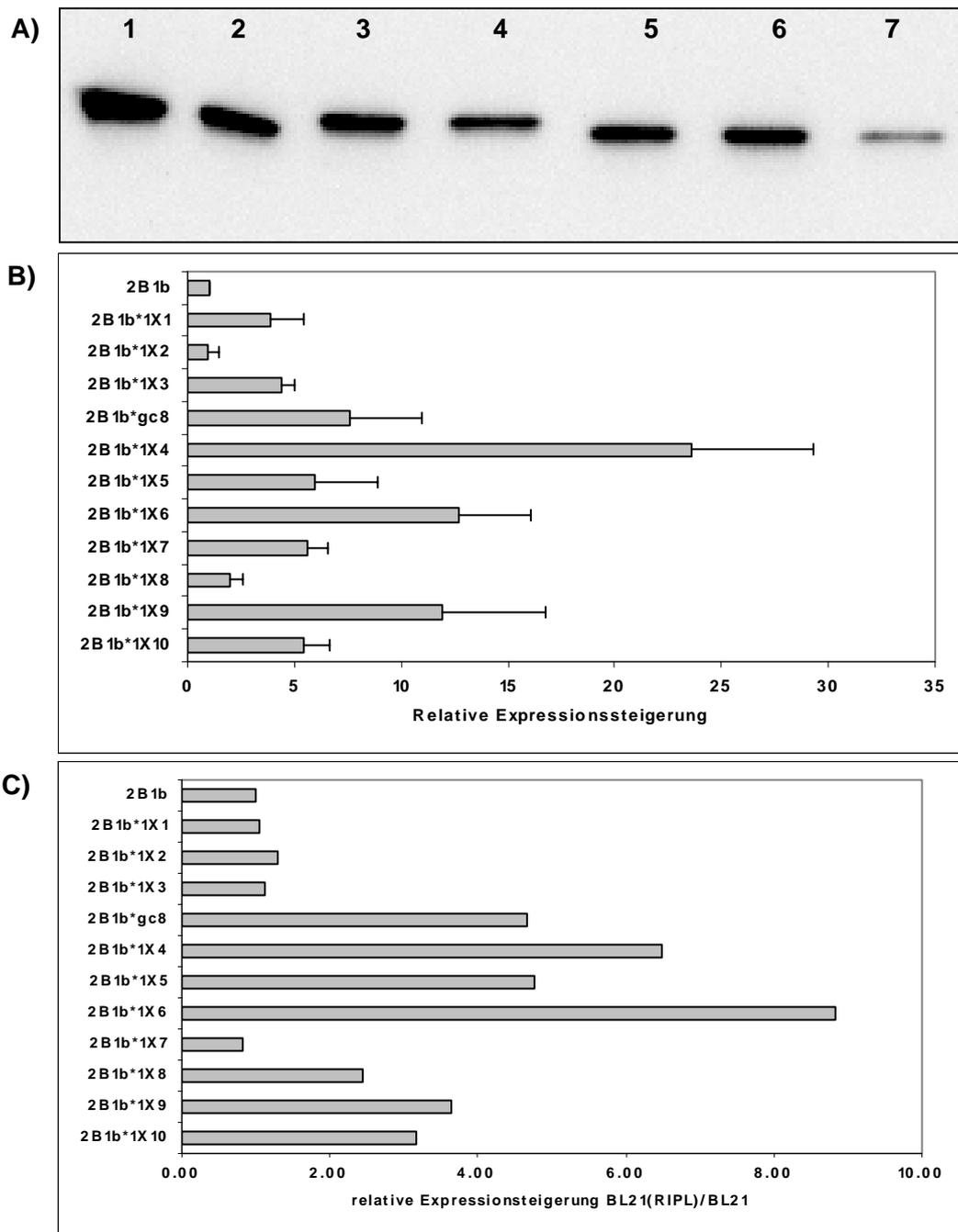


Abbildung 3-10: Quantifizierung der 2B1b Expression in *E. coli* BL21 (RIPL)

A) Western-Blot-Analyse mit Cytosolpräparationen von *E. coli* BL21 transfiziert mit pET-2B1b*1X6 (1)+(2), pET-2B1b*1X5 (3)+(4), pET-2B1b*gc8 (5)+(6), pET-2B1b (7). Pro Spur wurden je 1 µg cytosolisches Protein eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit dem Antiserum gegen 2B1a. **B)** Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der Western Blot Analyse relativ zur Wildtypsequenz (1 gesetzt). Es wurden jeweils 3 unabhängige Western Blots mit denselben cytosolischen Präparationen densitometrisch ausgewertet. **C)** Vergleich der Expressionssteigerungen von BL21 und BL21 (RIPL).

3.1.5.6.1 Einfluss seltener Codons auf die relative Plasmidkopienzahl in *E. coli* XL-1

Um zu untersuchen, ob die Expressionssteigerung durch die Manipulation der Codons in der 2B1b cDNA auf eine Erhöhung der Plasmidkopienzahl des pKK-2B1b Plasmides in den verschiedenen *E. coli* XL-1 Klonen zurückzuführen ist, wurde hier die relative Plasmidkopienzahl, bezogen auf den Wildtyp-Klon, der verschiedenen pKK-2B1b Konstrukte bestimmt. Dazu wurde die isolierte Plasmid-DNA im Restriktionsverdau linearisiert und anschließend im Agarosegel densitrometrisch ausgewertet. Diese semi-quantitative Analyse (Abbildung 3-11) zeigte keine signifikanten Veränderungen der Plasmidkopienzahlen der einzelnen Klone im Vergleich zum Wildtyp. Die Erhöhung der Expression durch Codonaustausche in der cDNA ist also nicht auf eine Erhöhung der Plasmidkopienzahl zurückzuführen.

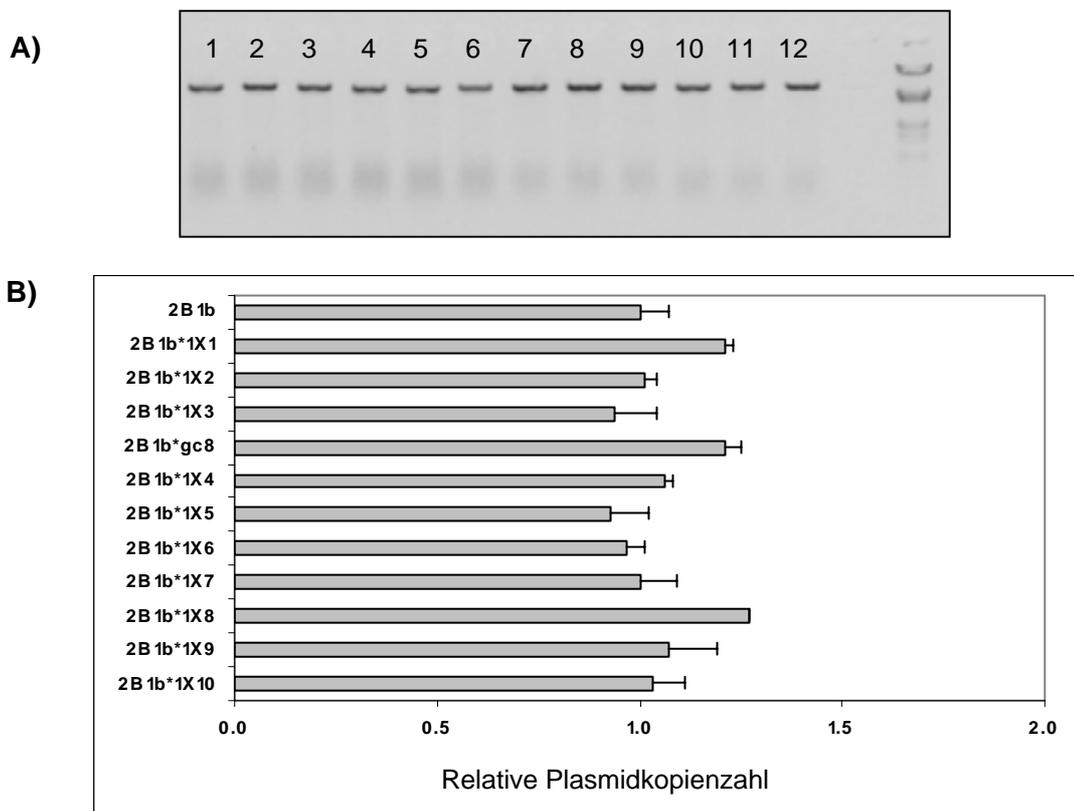


Abbildung 3-11: Quantifizierung der pKK-2B1b Plasmidkopienzahl in *E. coli*

A) Agarosegel mit den linearisierten Plasmiden: pKK-2B1b (1), pKK-2B1b*1X1 (2), pKK-2B1b*1X2 (3), pKK-2B1b*1X3 (4), pKK-2B1b*1X4 (5), pKK-2B1b*1X5 (6), pKK-2B1b*1X6 (7), pKK-2B1b*1X7 (8), pKK-2B1b*1X8 (9), pKK-2B1b*1X9 (10), pKK-2B1b*1X10 (11), pKK-2B1b*1X11 (12), pKK-2B1b*1X12 (13). **B)** Densitrometrische Auswertung der Plasmidkopienzahl jeweils relativ zum Wildtyp. Es wurden jeweils 3 Agarosegele mit denselben Plasmidpräparationen densitrometrisch ausgewertet.

3.1.5.7 Einfluss seltener Codons auf das 2B1b-mRNA-Niveau in *E. coli* XL-1

Da eine Erhöhung der Plasmidkopienzahl nicht als Ursache für die Expressionssteigerung in Frage kam, sollte nun untersucht werden ob die seltenen Codons eine Erhöhung des 2B1b-mRNA-Niveaus zur Folge haben. Der Einfluss der eingeführten seltenen Codons auf die entsprechende 2B1b-mRNA in *E. coli* XL-1 wurde mittels RT-real-time-PCR analysiert. Als interne Kontrolle wurde die bakterielle GAPDH-mRNA bestimmt. Die Quantifizierung der 2B1b-mRNA zeigte einen maximalen 3,8-fachen Anstieg der mRNA-Menge 2 h nach der Induktion mit IPTG (Abbildung 3-12). Den stärksten Anstieg auf mRNA-Ebene zeigten die Klone 2B1b*1X1 und 2B1b*1X3, welche auch den stärksten Anstieg von 2B1b-Protein gezeigt hatten. Bei anderen Klonen, wie z.B. 2B1b*1X7 und 2B1b*1X9, die eine deutliche höhere Proteinexpression zeigten (25- bzw. 50-fach erhöht), konnte keine signifikante Erhöhung der mRNA im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Für die vier Konstrukte, die in *E. coli* XL-1 keine Proteinexpression zeigten (2B1b*1X2, 2B1b*gc8, 2B1b*1X5, 2B1b*1X6), konnte 2B1b-mRNA nachgewiesen werden. Das mRNA-Niveau von 2B1b*1X2 ist nach 2 h sogar deutlich höher als beim Wildtyp-Klon. Die Unterschiede der einzelnen Klone auf mRNA-Ebene spiegeln also nicht die Expressionsunterschiede auf Proteinebene wieder.

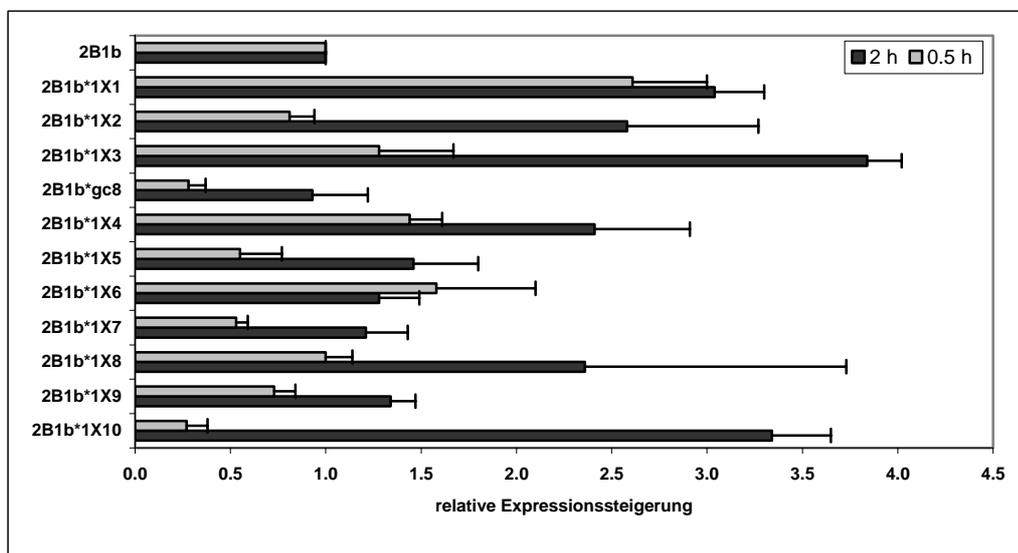


Abbildung 3-12: Quantifizierung der 2B1b mRNA in *E. coli* mittels real-time PCR

Jeweils 0,5 bzw. 2 h nach der Induktion mit IPTG wurde die RNA isoliert, je 3 µg RNA mittels RT-PCR umgeschrieben und anschließend mittels real-time PCR quantifiziert. Jedes real-time Experiment wurde dreifach mit einer Dreifachbestimmung jeder Probe durchgeführt.

3.1.6 Tandem-Translation von 2B1b

In den Western-Blot-Analysen mit Cytosolen einiger 2B1b exprimierenden *E. coli* und *S. typhimurium* Klone konnte zusätzlich zu der Vollängen-2B1b-Bande (40 kD) jeweils noch eine weitere Bande von einem ca. 30 kD großen Protein detektiert werden. Diese zusätzliche Bande wurde ebenfalls spezifisch vom verwendeten 2B1a-Antikörper erkannt. Dieser ist gegen den C-Terminus gerichtet¹²³. Diese zusätzliche Bande trat in *E. coli* XL-1 am stärksten mit dem Konstrukt 2B1b*1X1 auf, das die zweitstärkste Expression des Vollängenproteins zeigte. Im Gegensatz dazu zeigte das Konstrukt 2B1b*1X3 keine Expression des 30-kD-Fragments, jedoch das höchste Expressionsniveau für das Vollängenprotein. Die Expression des Vollängenproteins war bei den Konstrukten 2B1b*1X9 und 2B1b*1X10 gleich stark, aber nur bei 2B1b*1X10 war auch die Expression des 30-kD-Fragmentes zu beobachten. Aufgrund dieser stark variierenden Expressionstärke des 30-kD-Fragmentes in den einzelnen Klonen, unabhängig vom Expressionsniveau des Vollängenproteins, kommt es als Abbauprodukt der 2B1b nicht in Frage. Um die Entstehung des 30-kD-Fragmentes zu ermitteln, wurde die cDNA Sequenz der 2B1b untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass ein zweites Startcodon (ATG) im Leseraster der cDNA 225 bp abwärts vom eigentlichen Startcodon vorhanden ist. Ein Translationsstart an diesem zweiten ATG würde zu einem um 75 Aminosäuren verkürzten Protein führen, welches mit ca. 32 kD der Größe des im Western Blot detektierten Fragmentes (ca. 30 kD) entspräche. Desweiteren ergab die Sequenzanalyse einen deutlich verringerten GC-Gehalt im Bereich (bp +175 bis +275) des 2. ATG (47 %) im Vergleich zur Gesamt-cDNA (60 %). Eine solche Verringerung des GC-Gehaltes verringert die Stabilität möglicher mRNA-Sekundärstrukturen, die eine Translationsinitiation an diesem ATG behindern könnten. Zusätzlich wird dieses intracistronische Startcodon von Shine-Delgharno ähnlichen Sequenzen und einer „downstream box“ flankiert (Abbildung 3-13) und besitzt somit wesentliche Voraussetzungen für die Initiation einer Tandem-Translation.

```

ATGGACGGGCCCGCCGAGCCCCAGATCCCGGGCTTGTGGGACACCTATGAAGATGACAT
CTCGGAAATCAGCCAGAAGTTGCCAAGGTGAATACTTCCGGTACAAGGGCGTCCCCTTCCC
CGTCGGCCTGTACTCGCTCGAGAGCATCAGCTTGGCGGAGAACACCCAAGATGTGCGGG
ACGACGACATCTTTATCATCACCTACCCCAAGTCAGGCACGACCTGGATGATCGAGATCA
TCTGCTTAATCCTGAAGGAAGGGGATCCATCCTGGATCCGCTCCGTGCCATCTGGGAGC
GGGCACCCTGGTGTGAGACCATTGTGGGTGCCTTCAGCCTCCCGGACCAGTACAGCCCCC
GCCTCATGAGCTCCCATCTTCCCATCCAGATCTTCACCAAGGCCTTCTTCAGCTCCAAGGC
CAAGGTGATCTACATGGGCCGCAACCCCCGGGACGTTGTGGTCTCCCTCTATCATTACTC
CAAGATCGCCGGGCAGTTAAAGGACCCGGGCACACCCGACCAGTTCCTGAGGGACTTCC
TCAAAGGCGAAGTGCAGTTTGGCTCCTGGTTCGACCACATTAAGGGCTGGCTTCGGATGA
AGGGCAAAGACAACCTTCCTATTTATCACCTACGAGGAGCTGCAGCAGGACTTACAGGGC
TCCGTGGAGCGCATCTGTGGGTTCCCTGGGCCGTCCGCTGGGCAAGGAGGCACTGGGCTCC
GTGCTGGCACACTCAACCTTCAGCGCCATGAAGGCCAACACCATGTCCAACCTACACGCTG
CTGCCTCCCAGCCTGCTGGACCACCGTCGCGGGGCCCTTCCTCCGAAAGGGGTCTGCGGC
GACTGGAAGAACCCTTCACGGTGGCCAGAGCGAAGCCTTCGATCGTGCCTACCGCAA
GCAGATGCGGGGGATGCCGACCTTCCCCTGGGATGAAGACCCGGAGGAGGATGGCAGCC
CAGATCCTGAGCCCAGCCCTGAGCCTGAGCCCAAGCCCAGCCTTGAGCCCAACACCAGC
CTGGAGCGTGAGCCCAGACCCAACCTCAGCCCCAGCCCCAGCCCCGGCCAGGCCTCTGA
GACCCCGCACCCACGACCCTCATAA

```

Abbildung 3-13: 2B1b cDNA Sequenz mit intracistronischem Startcodon

Bei Analyse der 2B1b Sequenz konnten folgende (farbig hervorgehobene) Elemente identifiziert werden: Potentielle Translationsstartcodons (Position 1 und 76), flankierende Shine-Delgarno Sequenzen (-35 box, -10 box) und eine downstream box (blau: Konsensus zur idealen Sequenz, orange: „mismatch“).

Zur Überprüfung, ob das 30-kD-Fragment das Produkt einer Tandemtranslation der 2B1b-cDNA in Bakterien darstellt, wurden weitere sechs 2B1b-Konstrukte hergestellt, die in Tabelle 3-6 beschrieben sind.

Tabelle 3-6: Eingeführte Mutationen der Konstrukte, die zur Überprüfung der Tandem-Translations-Hypothese generiert wurden

Konstrukt	Mutationen
2B1b*ct	Deletion der Basen 1-224 im Konstrukt pKK-2B1b
2B1b*CTG1	Mutation der Base „A“ an Position 1 zu „C“ im Konstrukt pKK-2B1b
2B1b*CTG2	Mutation der Base „A“ an Position 225 zu „C“ im Konstrukt pKK-2Bb
2B1b*CTG1+2	Mutation der Basen „A“ an Positionen 1 und 225 zu „C“ im Konstrukt pKK-2B1b
2B1b*1X1CTG2	Mutation der Base „A“ an Position 225 zu „C“ im Konstrukt pKK-2Bb*1X1
2B1b*gc8CTG2	Mutation der Base „A“ an Position 225 zu „C“ im Konstrukt pKK-2Bb*gc8

In diesen Konstrukten wurden die potentiellen Startcodons „ATG“ zu „CTG“ mutiert, da „CTG“ im Gegensatz zu TTG, GTG und ATG nicht von *E. coli* als Startcodon verwendet werden kann⁵⁹. Alle obengenannten pKK-2B1b Konstrukte wurden sowohl in *E. coli* XL-1 als auch in *S. typhimurium* transfiziert und die Expression in den Cytosolen mittels Western Blot analysiert.

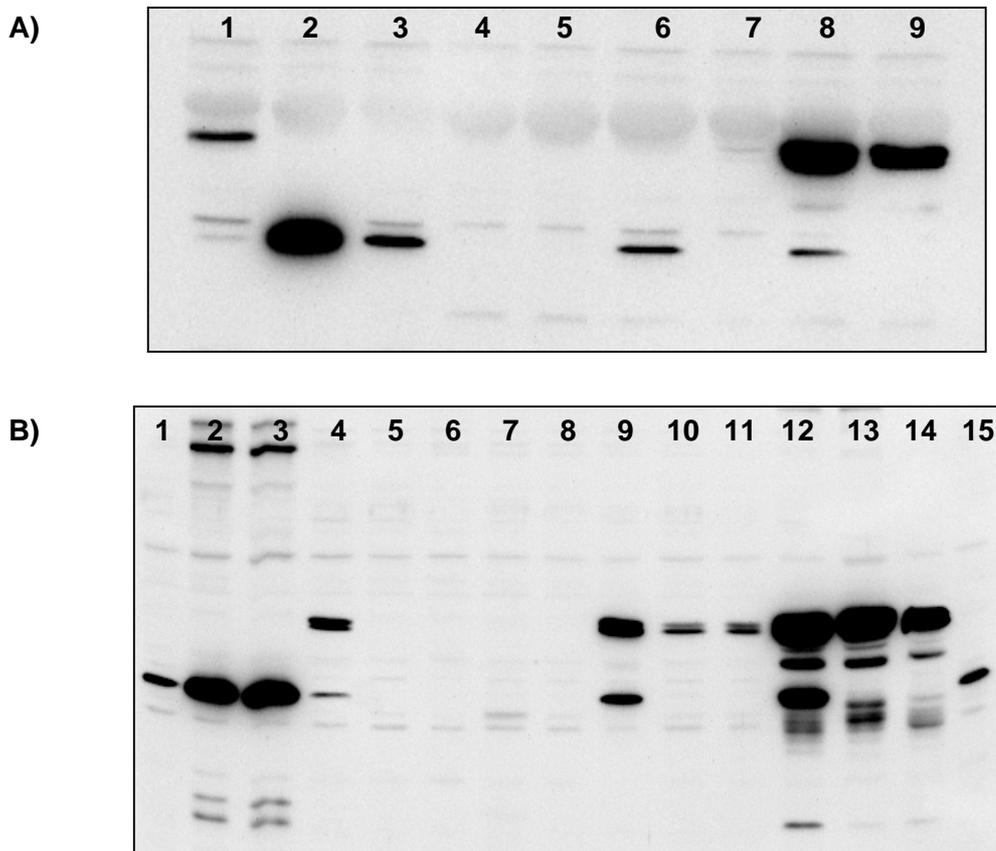


Abbildung 3-14: Expression von 2B1b in *E. coli* XL-1

A) Western-Blot-Analyse mit Cytosolpräparationen aus *E. coli* XL-1 transfiziert mit pKK-2B1b (1), pKK-2B1b*ct (2), pKK-2B1b*CTG1 (3), pKK-2B1b*CTG2 (4), pKK-2B1b*CTG1+2 (5), pKK-2B1b*gc8 (6), pKK-2B1b*gc8CTG2 (7), pKK-2B1b*1X1 (8), pKK-2B1b*1X1CTG2 (9). Je 50 µg cytosolisches Protein wurden eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit dem 1. Antikörper aus dem Kaninchen gegen 2B1a und dem 2. Antikörper aus der Ziege gegen anti-Kaninchen-IgG. **B)** Western Blot Analyse mit Cytosolpräparationen aus *S. typhimurium* transfiziert mit pKK-2B1b*CTG1 (1)+(15), pKK-2B1b*ct (2)+(3), pKK-2B1b (4), pKK-2B1b*CTG2 (5)+(6), pKK-2B1b*CTG1+2 (7)+(8), pKK-2B1b*gc8 (9), pKK-2B1b*gc8CTG2 (10)+(11), pKK-2B1b*1X1 (12), pKK-2B1b*1X1CTG2 (13)+(14).

Wurde das erste Startcodon der 2B1b-cDNA so mutiert, dass an dieser Stelle keine Translationsinitiation mehr möglich war (2B1b*CTG1), kam es zu einer verstärkten Expression des 32-kD-Fragmentes. Nach einer Mutation des „ATG“ an Position 76 (2B1b*CTG2, 2B1b*1X1CTG2, 2B1b*gc8CTG2) konnte bei allen drei verwendeten Konstrukten keine 32-kD-Bande mehr detektiert werden. Gleichzeitig kam es in *E. coli* jedoch auch zu einer Reduktion der Expression der Vollängen-2B1b mit den Konstrukten 2B1b*CTG2 und 2B1b*1X1CTG2. Bei dem Konstrukt 2B1b*gc8CTG2 führte die Mutation des intracistronischen Startcodons zu einer leichten Erhöhung der Expression des Vollängenproteins in *E. coli*. In *S. typhimurium* kam es jedoch nach der Mutation des Startcodons in Position 76 bei allen drei Konstrukten zu einer Reduktion der Expression des Vollängenproteins. Nach der Mutation beider Startcodons (2B1b*CTG1+2) konnte sowohl in *E. coli* als auch in *S. typhimurium* weder die Expression des 40-kD-Proteins noch die des 32-kD-Proteins nachgewiesen werden. Die vollständige Deletion der 5'-Sequenz (bp 1-224) führte zur stärksten Expression des 32-kD-Fragmentes im Vergleich aller Konstrukte.

3.1.7 Einfluss seltener Codons auf die Luciferase-Expression

3.1.7.1 Fusionsproteine aus 2B1b und Luciferase

Um den Einfluss der in die 2B1b-cDNA eingefügten seltenen Codons auf die Expression anderer cDNA-Gene zu untersuchen, wurden Fusionsproteinkonstrukte hergestellt. Dazu sollten die 5'-Sequenzen verschiedener 2B1b-Konstrukte mit dem 3'-Ende der cDNA eines Reportergens fusioniert werden. Als Reportergen wurde die Glühwürmchen Luciferase (*Photinus pyralis*) ausgewählt, da sie sowohl einen sehr sensitiven Nachweis als auch eine genaue Quantifizierung ermöglicht.

Für eukaryontische Zellen, jedoch nicht für Prokaryonten, sind verschiedene Luciferase-Expressionsvektoren, u.a. der pGL3 (Promega) erhältlich. Geller *et al* haben gezeigt, dass die Expression von funktioneller Luciferase auch in *E. coli* möglich ist. Die Messung der Chemilumineszenz erfolgte in *E. coli*-Lysaten¹²⁴. Alipour *et al* haben die *Lampyrus turkestanicus* Luciferase ebenfalls in *E. coli* exprimiert und die Chemilumineszenz direkt von den Kolonien auf der Agar-Platte detektiert¹²⁵. In der vorliegenden Arbeit wurde die cDNA der *Photinus pyralis* Luciferase aus dem pGL3-Plasmid, unter Verwendung der Restriktionsenzyme *NcoI* und *XbaI*, in den pKK233-3-Vektor umkloniert. Die Expression der Luciferase wurde durch Detektion der

Chemilumineszenz der Bakterienkolonien direkt auf der Agarplatte kontrolliert (Abbildung 3-15).

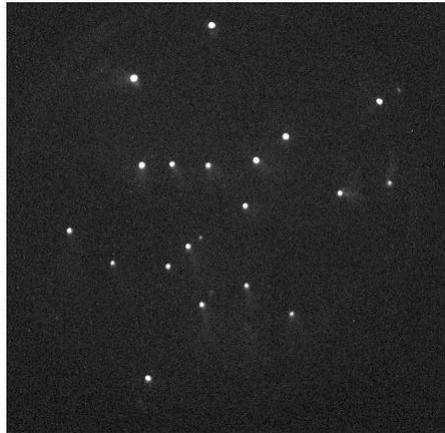


Abbildung 3-15: Expression von Luciferase in *E. coli* XL-1

Chemilumineszenzdetektion der *Photinus pyralis* Luciferase in transfizierten *E. coli* XL-1 Kolonien.

Für die Klonierung der Fusionsproteine wurde zunächst mittels Mutagenese eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Pst*I in die Luciferase-cDNA so eingefügt, dass die Aminosäuresequenz der Luciferase unverändert blieb (Abbildung 3-16). Eine weitere *Pst*I-Schnittstelle welche im pKK233-2-Vektor enthalten ist wurde durch Mutagenese entfernt.

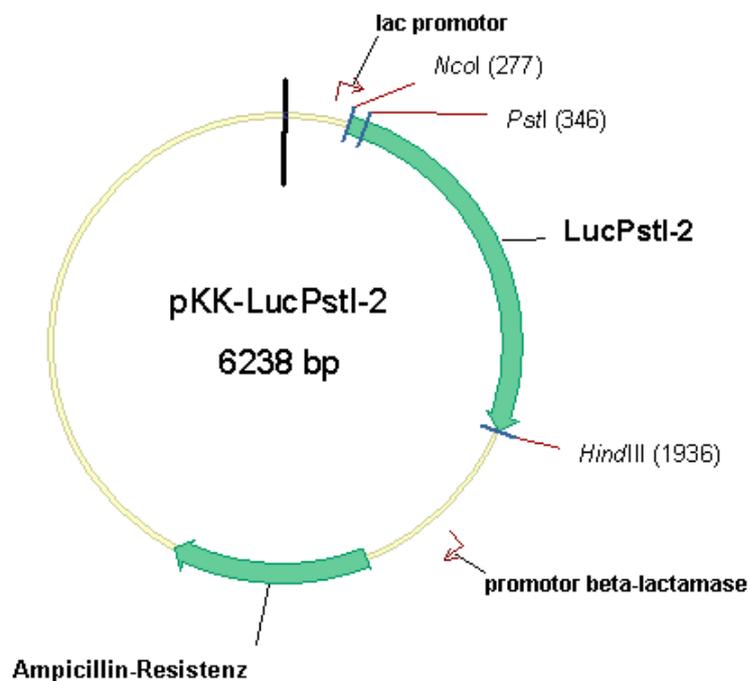


Abbildung 3-16: Vektorkarte von pKK-LucPstI-2

Dieses Konstrukt enthält die *Photinus pyralis* Luciferase mit einer durch stille Mutation eingeführten Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Pst*I.

Jeweils die ersten 66 bp (22 Codons) der Luciferase-cDNA wurden gegen die ersten 48 bp (16 Codons) der 2B1b-cDNA ausgetauscht. Die fusionierte cDNA hatte eine Gesamtlänge von 1635 bp, dies entspricht einem Protein von 545 Aminosäuren (ca. 60 kD). Es wurden drei Fusionsproteinkonstrukte hergestellt. Die verwendeten 2B1b-cDNA-Sequenzabschnitte entsprachen denen der 2B1b-Konstrukte: 2B1b (Wildtyp), 2B1b*1X1 und 2B1b*1X7 (Tabelle 3-4). Die Chemilumineszenz wurde in *E. coli* XL-1 Lysaten quantifiziert. Hierbei konnte eine signifikante Reduktion der Fusionsproteinexpression durch das Einfügen seltener Codons am 5'-Ende der cDNA beobachtet werden. Die höchste Expression des Fusionsproteins zeigte der Klon mit dem Konstrukt 2B1bLuc, dessen 5'-Ende die unveränderte 2B1b-Sequenz darstellt. Das Einführen von sechs seltenen Codons (2B1b*1X7Luc) am 5'-Ende des Fusionsproteins führte zu einer Abnahme der Expression um ca 30 % im Vergleich zum Ausgangskonstrukt. Das Einführen von neun seltenen Codons (2B1b*1X1Luc) führte sogar zu einer Abnahme der Expression um 50 % im Vergleich zum Ausgangskonstrukt (Abbildung 3-17). Die gleichen seltenen Codons hatten jedoch bei den Volllängen-2B1b-Konstrukten (ohne Fusion mit Luciferase) zu einer 25- bzw. 65-fachen Erhöhung der Expression im Vergleich zum Ausgangskonstrukt 2B1b in *E. coli* XL-1 geführt.

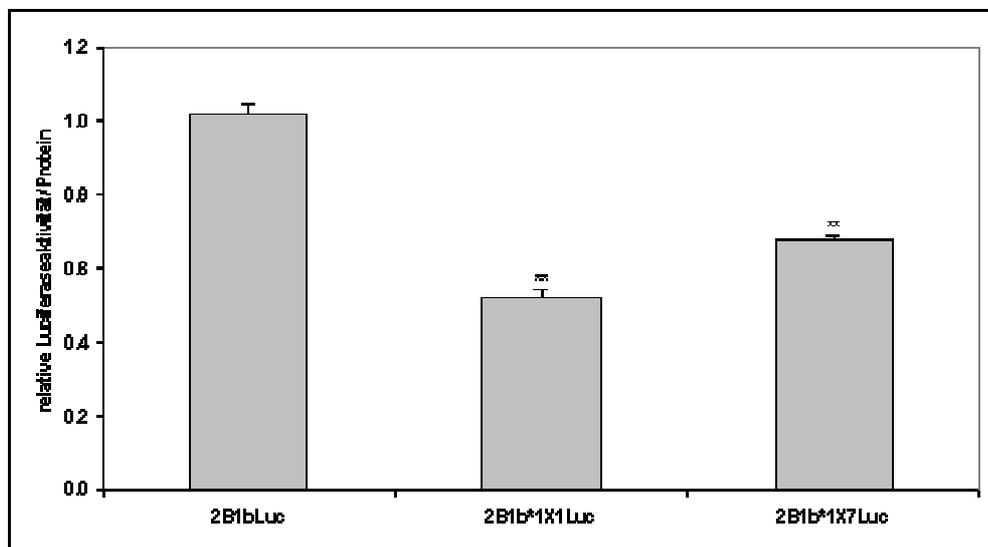


Abbildung 3-17: Quantifizierung der Luciferaseexpression in *E. coli* XL-1

Luciferaseaktivität der Fusionsproteine relativ zum Fusionsprotein aus Luciferase und 2B1b-Wildtyp. Stern (**) bezeichnet $P < 0,01$ vs. Wildtyp. Die Luciferaseaktivität wurde jeweils in einer Dreifachbestimmung in 3 unabhängigen Experimenten bestimmt.

3.1.7.2 Luciferase

Um die widersprüchlichen Ergebnisse zum Einfluss seltener Codons auf die heterologe Expression von 2B1b und 2B1bLuc-Fusionsproteinen weiter zu überprüfen, wurde das 5'-Ende der Vollängen-Luciferase-cDNA, im analogen Bereich zu der 2B1b-cDNA, mutiert. Dabei wurden mittels gerichteter Mutagenese durch PCR acht häufige Codons gegen synonyme seltene Codons ausgetauscht. Für die Expressionsanalyse der hergestellten cDNA Luc*X wurde diese in das Expressionsplasmid pKK233-2 kloniert. Die Quantifizierung der Luciferaseexpression mit dem Konstrukt pKK-Luc*X wurde (wie in 4.1.7.1) mit *E. coli* XL-1 Lysaten durchgeführt. Im Gegensatz zu 2B1b, bei der die seltenen Codons am 5'-Ende eine Expressionssteigerung zur Folge hatten, war die Expression der Luciferase nach Austausch von häufigen gegen seltene Codons stark reduziert (-80 %).

Tabelle 3-7: 5'-cDNA-Sequenzen und Codon Usage von Luc und Luc*X

<i>cDNA</i>	<i>Codons und Codon usage</i>												+/-GC #
	M	E	D	A	K	N	I	K	K	G	P	A	
Luc	ATG	GAA	GAC	GCC	AAA	AAC	ATA	AAG	AAA	GGC	CCG	GCG	
<i>E. coli</i>	100 %	63 %	39 %	30 %	74 %	53 %	9 %	26 %	74 %	48 %	55 %	44 %	
Luc*X		GAG		GCT	AAG	AAT			AAG	GGA	CCA	GCT	- 2
<i>E. coli</i>		37 %		13 %	26 %	47 %			26 %	12 %	13 %	13 %	

gibt an um wieviele Basen der GC-Gehalt durch das Austauschen der Codons reduziert wurde

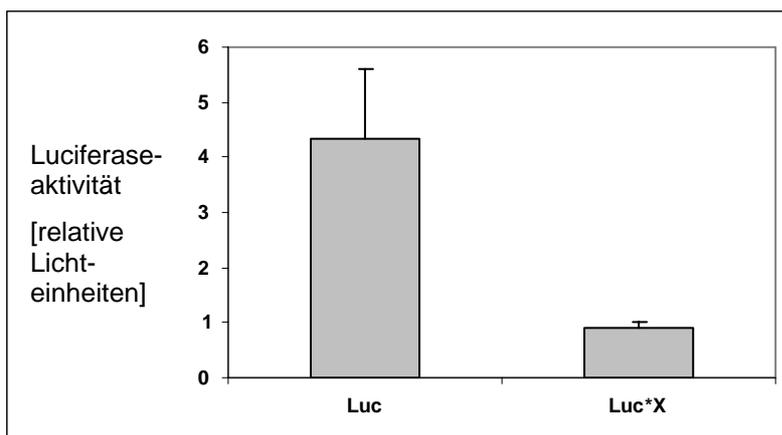


Abbildung 3-18: Quantifizierung der Luciferaseaktivität in *E. coli* XL-1

Luciferaseaktivität in Lysaten von *E. coli* XL-1 transfiziert mit pKK-Luciferase (WT) und pKK-Luc*X. Stern (**) bezeichnet $P < 0,01$ vs. Wildtyp. Die Luciferaseaktivität wurde jeweils in einer Dreifachbestimmung in 3 unabhängigen Experimenten bestimmt.

Diese Daten unterstützen die Ergebnisse, die zuvor mit den 2B1bLuc-Fusionsproteinen erhalten wurden. Bei den Fusionsproteinen führte das Einfügen von seltenen Codons zu einer Senkung der Expression des entsprechenden Proteins. Im Gegensatz dazu stehen jedoch die Ergebnisse einer expressionssteigernden Wirkung durch das Einfügen seltener Codons in die cDNA der in dieser Arbeit untersuchten Sulfotransferasen. Zur Gewinnung weiterer Erkenntnisse wurde der Einfluss seltener Codons auf die Expression einer weiteren „Nicht-SULT“-cDNA untersucht.

3.1.8 Einfluss seltener Codons auf GSTT2-Expression

3.1.8.1 Konstruktion der pKK-GSTT2 Klone

Analog zu den Experimenten mit der 1A2*1, 2B1b und der Luciferase, wurden am 5'-Ende der Glutathion-S-Transferase T2 (rGSTT2) sechs bis acht häufige Codons durch seltene synonyme Codons ersetzt. Die rGSTT2 cDNA enthält innerhalb der ersten zwölf Codons vier häufige Leucin-Codons. Da die entsprechenden seltenen Codons zu den extrem seltenen Codons gehören, die bei der 2B1b (siehe 2B1b*1X3 / *1X2) eher einen negativen Effekt auf die Expression hatten, wurden zwei Konstrukte hergestellt. Ein Konstrukt mit acht Codonaustauschen (darunter 4 x Leu) rGSTT2*X8 und ein Konstrukt mit sechs Codonaustauschen (darunter 2 x Leu) rGSTT2*X6.

Tabelle 3-8: 5'-cDNA-Sequenzen und Codon Usage von rGSTT2 bzw. rGSTT2*X8/*X6

cDNA	Codons und Codon Usage												+/- GC #
	M	G	L	E	L	Y	L	D	L	L	S	Q	
rGSTT2	ATG	GGT	TTG	GAG	CTC	TAC	CTG	GAC	CTG	CTG	TCG	CAG	
<i>S. typhimurium</i>	100 %	24 %	12 %	37 %	10 %	40 %	50 %	39 %	50 %	50 %	16 %	71 %	
<i>E. coli</i>	100 %	34 %	13 %	31 %	10 %	43 %	50 %	37 %	50 %	50 %	15 %	65 %	
rGSTT2*X8		GGA	CTA		CTA		CTA		CTA	CTA	TCT	CAA	- 6
<i>S. typhimurium</i>	100 %	12 %	5 %		5 %		5 %		5 %	5 %	12 %	29 %	
<i>E. coli</i>	100 %	11 %	4 %		4 %		4 %		4 %	4 %	15 %	35 %	
rGSTT2*X6		GGA	CTA		CTA				CTA		TCT	CAA	- 4

gibt an um wieviele Basen der GC-Gehalt durch das Austauschen der Codons reduziert wurde

Beide cDNA-Konstrukte sowie die Wildtyp-cDNA wurden in das pKK233-2-Expressionsplasmid kloniert.

3.1.8.2 Expressionsniveau von rGSTT2 in *E. coli* XL-1 und *S. typhimurium*

Die Expression der rGSTT2 mit den verschiedenen Konstrukten wurde im Western Blot (Abbildung 3-19) mit Cytosolen aus *E. coli* XL-1 und *S. typhimurium* TA1538 untersucht. Zur Quantifizierung wurden jeweils 3-10 µg cytosolisches Protein eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit einem Antikörper aus Kaninchen gegen rGSTT2. Die densitrometrische Auswertung der Western Blots ergab eine Steigerung der Expression um das 3-fache (GSTT2*X6) bzw. 5-fache (GSTT2*X8) im Vergleich zum Wildtyp in *E. coli* XL-1. In *S. typhimurium* TA1538 wurde die Expression durch das Einfügen von sechs bzw. acht seltenen Codons 2-fach (GSTT2*X6) bzw. 3-fach (GSTT2*X8) gesteigert.

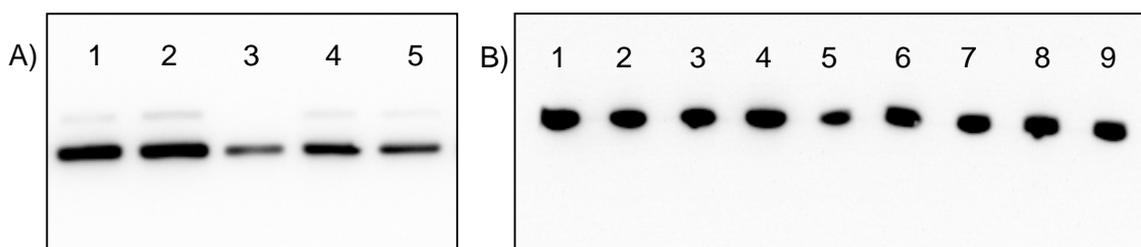


Abbildung 3-19: Quantifizierung der rGSTT2 Expression in *E. coli* und *S. typhimurium*

A) Western-Blot-Analyse mit Cytosolpräparationen aus *E. coli* XL-1 transfiziert mit pKK-rGSTT2*X8 (1)+(2), pKK-rGSTT2 (3), pKK-rGSTT2*X6 (4)+(5). Je 5 µg cytosolisches Protein wurden eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit 1. Antikörper: Kaninchen anti-rGSTT2 IgG und 2. Antikörper: Ziege anti-Kaninchen IgG. **B)** Western Blot Analyse mit Cytosolpräparationen aus *S. typhimurium* transfiziert mit pKK-rGSTT2*X8 (1)-(4), pKK-rGSTT2 (5), pKK-rGSTT2*X6 (6)-(9). Je 3 µg cytosolisches Protein wurden eingesetzt.

3.2 Untersuchungen in Eukaryonten

3.2.1 Konstruktion von pMPSV-1A1*1Yeu

Bei Eukaryonten kann man ebenso wie bei den Prokaryonten Unterschiede in der Häufigkeit synonymen Codons feststellen. Die Codon Usage phylogentisch nahe verwandter Eukaryonten (z.B. Mensch und Chinesischer Hamster) ähnelt sich. Im Vergleich mit Prokaryonten gibt es jedoch zahlreiche Unterschiede und so sind einige der Codons, die in Bakterien nur sehr selten verwendet werden (z.B. Arg-AGA und AGG), bei Eukaryonten sehr häufig. Eine Besonderheit der mehrzelligen Eukaryonten ist die gewebsabhängige „funktionelle tRNA-Adaptation“ in Abhängigkeit der Codon Usage in den hochexprimierten mRNA der Zellen. Die Codonpräferenzen der einzelnen Gewebe in Eukaryonten sind jedoch bisher kaum untersucht worden.

In dieser Arbeit wurde nun der Einfluss von seltenen Codons am 5'-Ende der hSULT-cDNA auf die Expression der humanen Sulfotransferase 1A1*1 in eukaryontischen V79-Zellen untersucht. Dazu wurden mittels gerichteter Mutagenese durch PCR acht synonyme Codon-Austausche in der 1A1*1-cDNA durchgeführt. Die neu insertierten Codons sind seltener bezüglich des Genoms von *Cricetulus griseus*, aus dem die Zelllinie gewonnen wurde (Tabelle 3-9). Für die heterologe Expression der hSULT in V79-Zellen wurden das cDNA-Konstrukt in den eukaryontischen Expressionsvektor pMPSV¹²⁶ kloniert, da mit diesem Vektor bereits die erfolgreiche Expression von hSULT in der genannten Zelllinie beschrieben wurde^{127,128}.

Tabelle 3-9: 5'-cDNA-Sequenzen und Codon Usage von 1A1*1 und 1A1*1Yeu

cDNA	Codons und Codon Usage									+/- GC #
	M	E	L	I	Q	D	T	S	R	
1A1*1	ATG	GAG	CTG	ATC	CAG	GAC	ACC	TCT	CGC	
<i>C. griseus</i>	100 %	60 %	40 %	51 %	77 %	53 %	37 %	21 %	18 %	
1A1*1Yeu	ATG	GAA	CTA	ATA	CAA	GAT	ACG	TCG	CGT	- 5
<i>C. griseus</i>		40 %	8 %	14 %	23 %	47 %	8 %	5 %	11 %	

gibt an um wieviele Basen der GC-Gehalt durch das Austauschen der Codons reduziert wurde

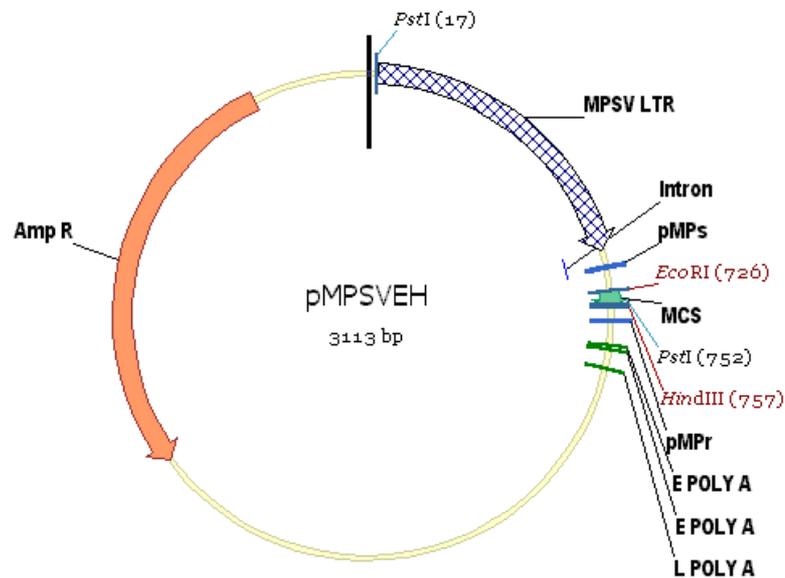


Abbildung 3-20: Vektorkarte von pMPSV

In diesen Vektor wurde das 1A1-Konstrukt für die Expression in V79-Zellen kloniert.

3.2.2 Einfluss seltener Codons auf die 1A1*1-Expression

Die Konstrukte pMPSV-1A1*1 und -1A1*1Yeu wurden mit dem pSV- β Gal-Plasmid transient in V79-Mz-Zellen ko-transfiziert. Nach 24 h, 48 h und 72 h Stunden wurden Zelllysate gewonnen und die β -Galactosidase-Aktivität als Referenz für die Transfektionseffizienz bestimmt. Entsprechend der β -Galactosidase-Aktivität erfolgte die Bestimmung der Proteinmengen, die von jedem Lysat im Western-Blot eingesetzt wurden.

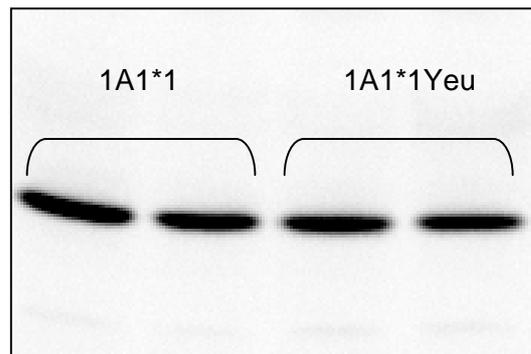


Abbildung 3-21: Quantifizierung der 1A1*1 Expression in V79-Zellen

Western Blot Analyse mit V79-Zellysaten von 1A1*1 bzw. 1A1*1Yeu transfizierten Zellen. Folgende Lysatmengen wurden eingesetzt: 44 μg bzw. 29 μg (1A1*1) und 37 μg bzw. 34 μg (1A1*1Yeu). Die Detektion erfolgte mit 1. Antikörper: Schaf anti-1A3 IgG, der auch 1A1 und 1A2 erkennt, und 2. Antikörper: Esel anti-Schaf-IgG.

In den transient 1A1-transfizierten V79-Zellen konnte keine signifikante Veränderung der Expressionstärke durch die Einführung von seltenen Codons beobachtet werden. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt mit jeweils drei Transfektionsansätzen pro Konstrukt. In Abbildung 3-21 ist eine repräsentative Western-Blot-Analyse abgebildet.

3.2.3 Sulfonierungsaktivität von 2B1b

Um zu überprüfen, ob die in den V79-Zellen exprimierte 2B1b enzymatisch aktiv ist, wurde analog zu den Enzymaktivitätsmessungen in Bakterien die Sulfonierung von DHEA in cytosolischen Präparationen sowie in intakten V79-Zellen bestimmt. Dazu wurden stabil mit pMPSV-2B1b transfizierte V79-Zellen, die zuvor in dieser Abteilung generiert wurden, verwendet. Für die Bestimmung der Sulfonierungsaktivität wurden entweder maximal 800 μg cytosolisches Protein in KP-Puffer mit 20 μM DHEA für 15 min bzw. 5×10^5 intakte V79-Zellen mit 20 μM DHEA im Medium für 1 bis 24 h bei 37°C inkubiert. Das entstandene DHEA-Sulfat wurde über Festphasenextraktion angereichert und mittels HPLC-MS/MS quantifiziert. In der Tabelle 3-10 sind die im linearen Bereich ermittelten Sulfonierungsaktivitäten dargestellt. Es ergibt sich für cytosolische Präparationen eine maximale Metabolisierungsgeschwindigkeit von ca. 20 pmol/min/mg.

Tabelle 3-10: Sulfonierungsaktivität in cytosolischen Präparationen von 2B1b V79-Zellen

<i>Cytosolisches Protein [μg]</i>	<i>Sulfonierungsaktivität [$\text{pmol}/\text{min}/\text{mg}$]</i>
100	18,0
200	20,0
300	20,6
400	20,3
500	20,0

Die cytosolischen Präparationen wurden für 15 min mit 20 μM DHEA inkubiert.

Für die Berechnung der Sulfonierungsaktivität von intakten V79-Zellen wurde in den jeweiligen Ansätzen die Zellzahl bestimmt und daraus die ungefähre Masse an Cytosol ermittelt (Erfahrungswert: 20 Mio V79-Zellen ergeben ca. 1 mg Cytosol). In Tabelle 3-11 sind die im linearen Bereich ermittelten Sulfonierungsaktivitäten dargestellt. Für lebende V79-Zellen ergibt sich daraus eine Metabolisierungsgeschwindigkeit von ca. 30 pmol/min/mg. Die für die lebenden Zellen und die cytosolischen Präparationen ermittelten Werte für die Metabolisierungsgeschwindigkeit liegen im gleichen Größenbereich (20-30 pmol/min/mg). Die Werte für die lebenden Zellen liegen geringfügig höher. Dies könnte durch günstigere Milieubedingungen in den lebenden Zelle bedingt sein. Allerdings ist die Schätzung der Cytosoläquivalente aus der Zellzahl nicht genau genug um aus diesen geringen Unterschieden in der Metabolisierungsgeschwindigkeit weitere Schlüsse zu ziehen.

Tabelle 3-11: Sulfonierungsaktivität in lebenden 2B1b V79-Zellen

<i>Inkubationszeit [h]</i>	<i>Sulfonierungsaktivität [$\text{pmol}/\text{min}/\text{mg}$]</i>
1	30,3
2	44,0
3	27,7
4	26,5
6	22,0
8	27,1

Es wurden jeweils 1 Mio V79-Zellen mit 20 μM DHEA inkubiert. Jeweils 20 Mio V79-Zellen ergeben 1 mg Cytosol (Erfahrungswert).

3.3 Einfluss von mRNA-Sekundärstrukturen und Downstream Box (DB)

3.3.1 Einfluss seltener Codons auf die Stabilität von mRNA-Sekundärstrukturen

In dieser Arbeit konnten keine einzelnen Codons identifiziert werden, die die beobachtete Expressionssteigerung in Bakterien bewirken könnten. Eine Untersuchung des mRNA-Niveaus der verschiedenen *E. coli* XL-1 2B1b-Klone zeigte, dass es lediglich leichte Veränderungen der mRNA-Expression gibt, die nicht die Expressionsunterschiede auf Proteinebene widerspiegeln. Die im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführten Einzelcodonaustausche in der 2B1b-cDNA zeigten, dass es deutliche Positionseffekte gibt, wenn dasselbe Codon an verschiedenen Positionen der cDNA eingefügt wird¹¹⁸. Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass das Einführen seltener Codons in hSULT-cDNA keinen Einfluss auf die Expression des entsprechenden Proteins in V79-Zellen hat. Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse könnten mRNA-Sekundärstrukturen sein, die durch das Einfügen der seltenen Codons verändert werden. Die Stabilität solcher Strukturen hat bei Prokaryonten einen erheblichen Einfluss auf die Translationseffizienz, während dies bei Eukaryonten anscheinend kaum eine Rolle spielt⁶⁴⁻⁶⁶.

Für die Analyse der mRNA-Sekundärstrukturen wurde das „Vienna RNA Secondary Structure Prediction Tool“ (Universität Wien) verwendet. Diese Software berechnet die freie Energie der optimalen Sekundärstruktur von RNA-Sequenzen. Die freie Energie beschreibt die Stabilität der RNA-Sekundärstruktur. Jeweils die ersten 150 bp der in dieser Arbeit verwendeten cDNA-Sequenz wurden analysiert und die Werte für die freie Energie sind in der Tabelle 3-12 zusammengefasst.

Tabelle 3-12: Freie Energien von mRNA Sekundärstrukturen und Consensus der DB

<i>cDNA</i>	<i>Freie Energie der mRNA (150 bp) [kcal/mol]</i>	<i>Consensus der DB zur 16S rRNA in E. coli [%]</i>	<i>Differenz: Consensus und [freie Energie]</i>
1A1*1	- 57,3	46,7	- 10,6
1A1*1Y	- 58,4	60,0	1,6
1A1*1Yeu	-53,7	nicht sinnvoll	
1A2*1	- 59,9	46,7	- 13,2
1A2*1Z1	- 56,8	62,5	5,7
1A2*1gc6	- 55,9	46,7	9,2
1A2*1Z2	- 59,3	53,3	- 6,0
1A2*1Z3	- 54,8	56,3	1,5
1A2*1Z4	- 51,7	46,7	- 5,0
1A2*1Z5	- 65,3	62,5	- 2,8
1A2*1Z6	- 60,4	68,8	8,4
2B1b	- 54,9	40,0	- 14,9
2B1b*1X1	- 42,0	66,7	24,7
2B1b*1gc8	- 46,2	53,3	7,1
2B1b*1X2	- 50,9	40,0	- 10,9
2B1b*1X3	- 45,2	66,7	21,5
2B1b*1X4	- 49,8	56,3	6,6
2B1b*1X5	- 51,2	53,3	2,1
2B1b*1X6	- 47,7	40,0	- 7,7
2B1b*1X7	- 46,2	66,7	20,5
2B1b*1X8	- 45,3	53,3	8,0
2B1b*1X9	- 44,0	56,3	12,3
2B1b*1X10	- 45,9	50,0	4,1
2B1b*1mRNA	- 43,2	66,7	23,5
2B1b*1db	- 40,9	93,3	52,4
2B1b*1Xeu	-51,1	nicht sinnvoll	
2B1bLuc	- 48,6	40,0	- 8,6
2B1b*1XLuc	- 43,5	66,7	23,2
2B1b*1GPAPQILuc	- 43,1	66,7	23,6
Luciferase	- 39,3	60,0	20,7
Luc*X	- 40,6	66,7	26,1
rGSTT2	- 46,6	50,0	3,4
rGSTT2*X6	- 40,6	56,3	15,7
rGSTT2*X8	- 39,1	46,7	7,6

Betrachtet man die freien Energien, so ist für viele Klone ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Expressionsniveau des Proteins und der Stabilität der mRNA-Sekundärstrukturen zu erkennen. Die 2B1b-Konstrukte mit der geringsten Expression sind 2B1b, 2B1b*1X2 und 2B1b*1X5. Diese Konstrukte haben die mRNA mit den stabilsten Sekundärstrukturen im Vergleich aller 2B1b-mRNA (-54,9 / -50,9 / -51,2 kcal/mol). Gleichzeitig zeigen die Konstrukte 2B1b*1X1, 2B1b*1X3 und 2B1b*1X9 die höchsten Expressionsniveaus und besitzen die mRNA-Sekundärstrukturen mit der geringsten Stabilität (-42,0 / -45,2 / -44,0 kcal/mol). Bei den 1A2*1-Konstrukten verhält es sich ähnlich. Auch ist im Vergleich von dem Wildtypkonstrukt 1A2*1 (-59,9 kcal/mol) und dem Konstrukt mit sechs seltenen Codons 1A2*1Z1 (56,8 kcal/mol) eine geringere Stabilität der mRNA-Sekundärstrukturen bei dem Konstrukt zu beobachten, welches die höhere Expression zeigt. Allerdings besitzen die Konstrukte 1A2*1Z5 und 1A2*1Z6 sogar noch stabilere mRNA-Sekundärstrukturen (-65,3 und -60,4 kcal/mol) als der Wildtyp 1A2*1. Gleichzeitig ist die Expression mit diesen Konstrukten jedoch höher. Für die 1A1*1 ergibt sich ein ähnliches Bild. Das Wildtypkonstrukt 1A1*1 (-57,3 kcal/mol) besitzt weniger stabile mRNA-Sekundärstrukturen als die höher exprimierende Variante mit den seltenen Codons 1A1*1Y (-58,4 kcal/mol). Um diese Daten zu erklären muss also ein weiterer expressionsbeeinflussender Faktor betrachtet werden: die sogenannte „Downstream Box“.

3.3.2 Einfluss seltener Codons auf den Consensus von DB und 16S rRNA

Als „Downstream Box“ (DB) wird ein Sequenzabschnitt, am 5'-Ende der mRNA (ca. bp +15 bis +26), bezeichnet, der komplementär zu einem Abschnitt der bakteriellen 16S rRNA ist⁵⁷. Für bakterielle Gene konnte gezeigt werden, dass je größer der Consensus dieser DB und der 16S rRNA umso effizienter ist die Translationsinitiation. Da die Expressionsunterschiede der verschiedenen in dieser Arbeit generierten Konstrukte nicht allein durch die Veränderung der Stabilität der mRNA-Sekundärstrukturen erklärt werden konnten, wurden sämtliche cDNA auf das Vorhandensein bzw. die Veränderung der DB durch das Einführen seltener Codons untersucht (Tabelle 3-12). Auch hier zeigte sich für die meisten Konstrukte ein Zusammenhang zwischen dem Consensus von DB und 16S rRNA und dem Expressionsniveau des entsprechenden Proteins. So beträgt z.B. der Consensus bei den Konstrukten 2B1b und 2B1b*1X2 nur 40 %, während er bei den höher exprimierenden Konstrukten 2B1b*1X1 und 2B1b*1X3 66,7 % beträgt.

Bei den 1A1*1-Konstrukten gibt es ebenfalls einen deutlichen Unterschied im Consensus von DB und 16S rRNA. Für 1A1*1 beträgt er nur 46,7 %, für den höher exprimierenden Klon 1A1*1Y dagegen 60,0 %. Auch bei den 1A2*1-Konstrukten sind entsprechend den Expressionsunterschieden Unterschiede im Consensus zu erkennen. Für den Wildtyp 1A2*1 beträgt er nur 46,7 % und für 1A2*1Z1 sind es 62,5 %. Eine hohe Übereinstimmung der DB gibt es auch bei den Konstrukten 1A2*1Z5 (62,5 %) und 1A2*1Z6 (68,8 %).

Zur Überprüfung der Theorie, dass die Erhöhung der Expression nach dem Einführen seltener Codons durch die Optimierung der DB hervorgerufen werden kann, wurde ein weiteres Konstrukt (2B1b*db) hergestellt. Bei diesem Konstrukt wurde die DB ohne Berücksichtigung der Codons (auch nicht-synonyme Austausche) optimiert. Dadurch wurde gleichzeitig die Stabilität der mRNA Sekundärstrukturen stark verringert. Das Expressionsniveau dieses Konstruktes entspricht dem der beiden höchstexprimierenden Konstrukte 2B1b*1X1 und 2B1b*1X3 (Abbildung 3-22).

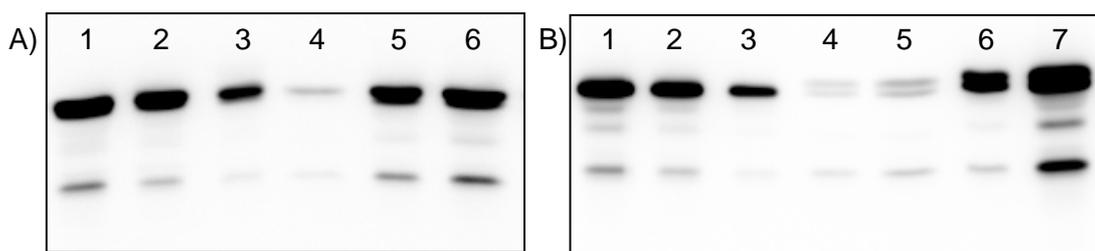


Abbildung 3-22: Expression von 2B1b in *E. coli* XL-1 und *S. typhimurium* nach Optimierung der DB am 5'-Ende der 2B1b-cDNA

A) Western-Blot-Analyse von Cytosolpräparationen aus *E. coli* XL-1 transfiziert mit pKK-2B1b*db (1) 50 µg (2) 25 µg (3) 10 µg Protein, pKK-2B1b (4) 50 µg Protein, pKK-2B1b*1X1 (5) 25 µg (6) 50 µg Protein. **B)** Western Blot Analyse von Cytosolpräparationen aus *S. typhimurium* TA1538 transfiziert mit pKK-2B2b*db (1) 25 µg (2) 10 µg (3) 5 µg Protein, pKK-2B1b (4) 25 µg (5) 50 µg Protein, pKK-2B1b*1X1 (6) 5 µg (7) 25 µg Protein. Die Detektion erfolgte mit dem 1. Antikörper: Kaninchen anti-SULT2B1a IgG.

Für eine bessere Beurteilung der Expressionsniveauänderungen durch das Einführen seltener Codons müssen also beide Faktoren, die Stabilität der mRNA-Sekundärstrukturen und der Consensus von DB und 16S rRNA gleichzeitig betrachtet werden. Um dies zu erleichtern wurde hier die Differenz aus dem Consensus von DB und 16S rRNA und dem Betrag der freien Energie der mRNA gebildet (Tabelle 3-12). Diese willkürliche Rechnung dient lediglich dazu auf einen Blick sichtbar zu machen für

welche Konstrukte eine hohe und für welche eine niedrige Expression zu erwarten wäre unter Berücksichtigung der mRNA-Sekundärstrukturen und der DB. Die Gewichtung dieser beiden Faktoren wurde zur Vereinfachung 1:1 gewählt, da die Werte jeweils die gleiche Größenordnung haben und anhand der bisherigen Ergebnisse nicht gefolgert werden kann, welcher der beiden Faktoren einen größeren Einfluss hat. Da sowohl eine möglichst hohe Übereinstimmung der DB mit der 16S rRNA, als auch eine möglichst geringe Stabilität der mRNA Sekundärstrukturen zu einem hohen Expressionsniveau führen sollten, müssten die Konstrukte die hier einen besonders hohen Wert erzielen auch eine gute Expression zeigen bzw. umgekehrt. Die niedrigsten Werte erhält man hierbei für die Wildtyp Konstrukte 2B1b (-14,9), 1A2*1 (-13,2) und 1A1*1 (-10,6), welche in Bakterien auch die niedrigsten Expressionsniveaus zeigten. Besonders hohe Werte erzielen hingegen die Konstrukte 2B1b*1X1 (24,7), 2B1b*1X3 (21,5), 2B1b*1db (52,4) und die beiden Luciferasekonstrukte (20,7 und 26,1). Alle diese Konstrukte besitzen ein sehr hohes Expressionsniveau.

4 Diskussion

In der Literatur gibt es zahlreiche Beispiele dafür, dass die heterologe Proteinexpression in Bakterien durch seltene Codons in der cDNA des zu exprimierenden Proteins behindert wird^{23,24}. Meinl *et al* zeigten jedoch, dass das Ersetzen von sechs häufigen Codons am 5'-Ende der 1A2-cDNA zu einer erhöhten Expression des entsprechenden Proteins in *S. typhimurium* führt. Durch die erhöhte Expression des Enzyms konnte gleichzeitig auch die Sensitivität der *S. typhimurium* Stämme im Mutagenitätsexperiment (Ames-Test) gesteigert werden²¹. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, welchen Einfluss seltene Codons auf die Menge und Funktionalität heterolog exprimierter humaner SULT haben.

4.1 Einfluss seltener Codons auf die heterologe Proteinexpression in *E. coli* und *S. typhimurium*

In dieser Arbeit wurde der Einfluss seltener Codons am 5'-Ende verschiedener cDNA auf das Expressionsniveau der entsprechenden Proteine in Bakterien und Säugerzellkulturen untersucht. Das Ersetzen von häufigen Codons am 5'-Ende der cDNA von 1A2*1 (6 Codons), 1A1*1 (6 Codons), 2B1b (9 Codons) und rGSTT2 (8 Codons) durch synonyme seltene Codons führte zu einer Erhöhung der Proteinexpression auf das 3- bis 80-fache in *E. coli* und *S. typhimurium*. Dies steht im Gegensatz zur gängigen Meinung in der Literatur, dass diese seltenen Codons die Expression in Bakterien inhibieren^{23,24}. Um diesen erstaunlichen Effekt genauer zu untersuchen wurden von der 1A2 und der 2B1b acht bzw. zwölf verschiedene cDNA-Konstrukte hergestellt, in denen diese Codons in unterschiedlichen Kombinationen ausgetauscht wurden. Dabei zeigte sich, dass die Erhöhung der Expression am stärksten war, wenn die seltenen Codons möglichst nahe am 5'-Ende ausgetauscht wurden. So konnte die Expression der 1A2*1 auf das 18-fache gesteigert werden, wenn die Codons in den Positionen 3, 4 und 5 ausgetauscht wurden (1A2*1Z4), während Codonaustausche in den Positionen 7, 8 und 9 nur zu einer 3-fachen Steigerung der 1A2*1-Expression führten (1A2*1Z5). Für die 2B1b ergab sich ein ähnliches Bild. Wurden hier die Codons in den Positionen 3, 4, 5, 7, 8 und 9 ausgetauscht (2B1b*1X7), bewirkte dies eine 24-fache Expressionssteigerung, während Codonaustausche in den Positionen 7, 8, 9, 10, 11 und 12 nur eine 10-fache

Erhöhung der Expression zur Folge hatten (2B1b*1X8). In bisherigen Publikationen wurde allerdings berichtet, dass mehrere seltene Codons besonders in der Nähe des Startcodons problematisch für die Expression in Bakterien sind^{94,129}. Auffällig ist allerdings dass bestimmte seltene Codons (z.B. die für Arginin codierenden AGG und AGA) in *E. coli* Genen besonders häufig am 5'-Ende (innerhalb der ersten 25 bp) in der Nähe des Startcodons auftreten. Es wird deshalb auch diskutiert, dass seltene Codons eine regulatorische Funktion bei der Genexpression haben, indem sie die Effizienz der Translationsinitiation beeinflussen. Entscheidend für den regulatorischen Effekt ist dabei der Abstand zwischen dem Startcodon und dem seltenen Codon. Dies unterstützt die Beobachtung, dass die Wirkung der Codonaustausche am stärksten ist, je näher sie am 5'-Ende stattfinden⁹⁴. Eine Erklärung dafür, dass die seltenen Codons in den hier untersuchten Fällen die Expression erhöhen statt zu verringern, liefern diese Publikationen jedoch nicht.

Es wird angenommen, dass seltene Codons die Translation inhibieren, da die tRNA mit den entsprechenden Anticodons ebenfalls selten sind. So korreliert die Konzentration einer tRNA in der Regel mit der Häufigkeit des von ihr erkannten Codons^{85,130}. Bei der Expression eines Gens mit einer hohen Anzahl seltener Codons wird während der Translation auch eine hohe Anzahl der entsprechenden tRNA benötigt. Da jedoch deren Konzentration in der Bakterienzelle sehr gering ist, kommt es zu einem Mangel an benötigten tRNA und das Ribosom wird im Translationsprozess gebremst. Dies kann zum einen eine Verlangsamung der Translation zur Folge haben, zum anderen ist auch der Abbruch des Translationsprozesses und der Zerfall des Ribosoms möglich^{94,131}. Elf *et al* haben jedoch beobachtet, dass seltene Codons unter bestimmten Bedingungen auch einen Vorteil für die Expression eines Proteins haben können. Sie zeigten, dass bei einem Mangel an Aminosäuren bevorzugt die seltenen tRNA mit ihrer Aminosäure beladen wurden, während die häufigeren tRNA unbeladen blieben. In dieser Mangelsituation werden bevorzugt Gene, die viele seltene Codons enthalten, exprimiert^{91,96}. Dieser Mechanismus sollte in den hier gezeigten Untersuchungen jedoch keine Rolle spielen, da kein Mangelmedium für die Expressionsexperimente verwendet wurde und somit die Aminosäuren stets ausreichend zur Verfügung standen.

Ein weiterer Aspekt, der bei der Untersuchung der verschiedenen 2B1b Konstrukte beobachtet wurde, ist, dass die Länge der ausgetauschten Sequenz ebenfalls eine große Rolle spielt. So ergab das Einführen von drei aufeinanderfolgenden seltenen Codons (2B1b*1X4) am 5'-Ende der 2B1b-cDNA eine Expressionserhöhung auf das

8-fache, während sechs ausgetauschte Codons (2B1b*1X7) die Expression 24-fach erhöhten. Der starke Einfluss der Länge der ausgetauschten Sequenz sowie die Positionseffekte bei den Einzelcodonaustauschen sprechen dafür, dass die Expressionserhöhung durch eine strukturelle Veränderung der cDNA bzw. der mRNA hervorgerufen werden könnte. Ein weiterer Fakt, der dafür spricht, dass die Expressionserhöhung eher auf einen strukturellen Effekt als auf die direkte Wirkung seltener Codons zurückzuführen ist, ist die Tatsache, dass sehr seltene Codons auch in der hier vorgestellten Arbeit einen negativen Effekt auf das Expressionsniveau hatten. So hatte das alleinige Einführen der sehr seltenen Codons für Arginin, Leucin und Isoleucin in die cDNA der 1A2*1 bzw. 2B1b keine Expressionsteigerung bzw. eine signifikante Reduktion der Expression in *E. coli* zur Folge. Gleichzeitig wurde für die 2B1b die höchste Expression mit einem Konstrukt erzielt, bei dem sieben Codons ausgetauscht und speziell die beiden sehr seltenen Codons für Isoleucin und Leucin nicht eingeführt wurden. Bei der rGSTT2 konnte dies allerdings nicht beobachtet werden. In diesem Fall war die Expression höher, wenn fünf statt drei sehr seltene Leucin-Codons eingeführt wurden. Ebenfalls gegen eine direkte Wirkung der seltenen Codons sprechen die Ergebnisse der Expressionsuntersuchungen in *E. coli* BL21 RIPL, die die sehr seltenen tRNA für Arginin, Isoleucin, Prolin und Leucin überexprimieren. Diese *E. coli* Stämme werden im Allgemeinen dazu verwendet, die Ausbeute in der heterologen Proteinexpression zu erhöhen, wenn die zu exprimierende cDNA seltene Codons enthält. In dieser Arbeit wurde die Expression der verschiedenen 2B1b-cDNA-Konstrukte in *E. coli* BL21 und *E. coli* BL21 RIPL verglichen. Dabei fiel auf, dass die Expression des Konstruktes 2B1b*1X2, welches die beiden sehr seltenen Codons für Isoleucin und Leucin enthält, durch die Überexpression der entsprechenden tRNA nicht gesteigert wurde. Auch für die Konstrukte 2B1b*1X1 (neun seltene Codons, inklusive Ile und Leu) und 2B1b*1X3 (sieben seltene Codons, ohne Ile und Leu) wurde keine Expressionssteigerung durch die Überexpression der seltenen tRNA beobachtet. Lediglich für die Konstrukte mit jeweils einem seltenen Prolin-Codon konnte das Expressionsniveau bis zu 9-fach gesteigert werden. Da die Expression jedoch mit keinem Konstrukt durch die Überexpression der seltenen tRNA reduziert wurde, kann die Möglichkeit dass eine gebremste Translation aufgrund der seltenen Codons zu einer höheren Proteinausbeute führt, weil mehr Zeit für eine korrekte Faltung des Proteins bleibt, ausgeschlossen werden.

4.1.1 Einfluss seltener Codons auf Plasmidkopienzahl und mRNA-Konzentration

Um zu überprüfen ob, die eingeführten seltenen Codons einen Einfluss auf die Replikation des Plasmids in Bakterien haben, wurde für die zwölf pKK-2B1b-Konstrukte die Plasmidkopienzahl in *E. coli* XL-1 bestimmt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Änderungen der Plasmidkopienzahl durch das Einführen seltener Codons im Vergleich zum Wildtypkonstrukt.

Eine weitere mögliche Erklärung für die Expressionssteigerung durch Codonaustausche, wäre eine Erhöhung der entsprechenden mRNA Konzentration. Dies könnte zum einen durch eine erhöhte Transkriptionsrate (regulatorische Funktion seltener Codons) oder aber aufgrund einer erhöhten Stabilität der mRNA bedingt sein. Deshalb wurde in dieser Arbeit die 2B1b-mRNA-Konzentration der zwölf verschiedenen Konstrukte in *E. coli* XL-1 mittels RT-real-time-PCR untersucht. Dabei zeigten sich zwar z.T. signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt, allerdings war die maximale Erhöhung der mRNA-Konzentration lediglich 3,8-fach im Vergleich zum Wildtyp. Gemessen an der maximal 80-fachen Erhöhung der Expression ist diese Erhöhung der mRNA-Konzentration sehr gering und kann nicht allein als Ursache für die Expressionssteigerung angesehen werden. Des weiteren korreliert die Steigerung der mRNA Konzentration nicht bei allen Konstrukten mit der Expressionssteigerung. So konnte zwar für die Konstrukte mit der höchsten Proteinexpression (2B1b*1X1 und 2B1b*1X3) auch der stärkste Anstieg auf mRNA-Ebene (3-fach, 3,8-fach) nachgewiesen werden, für die ebenfalls hochexprimierenden Konstrukte 2B1b*1X7 und 2B1b*1X9 wurde jedoch keine signifikante Erhöhung der mRNA-Konzentration detektiert. Gleichzeitig konnte auch für die Konstrukte 2B1b*1X2, 2B1b*1gc8, 2B1b*1X5 und 2B1b*1X6 2B1b-spezifische mRNA nachgewiesen werden, obwohl keine 2B1b-Proteinexpression detektiert werden konnte. Die mRNA-Konzentration für 2B1b*1X2 ist 2 h nach der Induktion sogar signifikant höher als beim Wildtypkonstrukt 2B1b. Der beobachtete Anstieg der mRNA-Konzentration kommt also als Ursache für die Steigerung der Proteinexpression nicht in Frage. Vielmehr ist anzunehmen, dass die Veränderungen auf mRNA-Ebene eine Folge der unterschiedlichen Proteinexpressionsniveaus sind. Geht man davon aus, dass alle cDNA-Konstrukte gleich gut transkribiert werden, würde man zunächst ein gleichmäßiges mRNA-Niveau für alle Konstrukte erwarten. Ist die Translation jedoch für die Konstrukte mit den verschiedenen ausgetauschten Codons unterschiedlich effizient, könnte dies einen unterschiedlich schnellen Abbau der mRNA zu Folge haben, so dass dann Unterschiede auf mRNA-Ebene auftreten würden. So haben

Yarchuk *et al* publiziert, dass eine effizientere Translation der mRNA diese, durch die Bindung des Ribosoms, gleichzeitig vor dem Abbau schützt^{71,72}. In dieser Arbeit wurde die mRNA-Konzentration 0,5 h und 2 h nach Induktion der Proteinexpression bestimmt. Bereits nach 0,5 h waren Unterschiede auf mRNA-Ebene zu sehen. Nach 2 h waren die Unterschiede in den meisten Fällen jedoch noch größer. Die Proteinexpression in Bakterien ist ein sehr schneller Prozeß und die Translation setzt bereits während der Transkription ein. Es ist also zu erwarten, dass Unterschiede im mRNA Abbau aufgrund unterschiedlich effizienter Translation, bereits relativ früh sichtbar werden würden (0,5 h nach Induktion) und akkumulieren würden (2 h nach Induktion). Des Weiteren würde man erwarten, dass Unterschiede aufgrund einer unterschiedlichen Transkriptionseffizienz sichtbar werden, noch bevor überhaupt Unterschiede in der Proteinexpression detektiert werden können. In diesem Fall würde man erwarten, dass 0,5 h nach der Induktion der Proteinexpression bereits die Maximalwerte für die Unterschiede auf mRNA-Ebene zu beobachten wären, während 2 h nach der Induktion die Unterschiede auf mRNA-Ebene wieder geringer würden²⁴. Lakey *et al* haben über einen ähnlichen Effekt bei der Expression des Antigens 85B aus *Mycobacterium tuberculosis* in *E. coli* berichtet. Sie konnten die Proteinexpression in *E. coli* durch das synonyme Austauschen von fünf Codons in der entsprechenden cDNA auf das 54-fache steigern. Allerdings haben sie seltene Codons in der Wildtyp-cDNA durch häufigere Codons ersetzt. Eine Analyse der entsprechenden mRNA-Konzentration in *E. coli* zeigte, dass das mRNA-Niveau mit dem optimierten cDNA Konstrukt nur 1,7 bis 2,5-fach erhöht war. Die maximale Erhöhung der mRNA-Konzentration wurde 0,5 h nach Induktion der Proteinexpression mit IPTG bestimmt. Aufgrund dieser Ergebnisse haben Lakey *et al* gefolgert, dass die Expressionserhöhung nicht auf eine erhöhte mRNA-Konzentration, sondern vielmehr auf eine erhöhte Translationseffizienz zurückzuführen ist²⁴. Da die in dieser Arbeit bestimmten Werte für die Erhöhung der 2B1b-Proteinexpression (maximal 80-fach) und die Erhöhung der entsprechenden mRNA-Konzentration (maximal 3,8-fach) sich ähnlich verhalten, kann man vermuten, dass auch hier die Expressionssteigerung durch eine Erhöhung der Translationseffizienz hervorgerufen wurde. Unklar ist bisher allerdings immer noch, warum gerade die Translation bei den Konstrukten mit den seltenen Codons effizienter funktioniert als bei den Wildtypkonstrukten.

4.1.2 Einfluss seltener Codons auf Stabilität von mRNA-Sekundärstrukturen

Griswold *et al* haben beschrieben, dass seltene Codons aufgrund einer Änderung der mRNA-Sekundärstruktur in einem speziellen Fall günstiger für die Expression in *E. coli* waren als häufigere Codons. In der Annahme, dass seltene Codons die heterologe Expression in *E. coli* inhibieren, hatten sie in der *Fusarium solani* Cutinase-cDNA 18 von 214 Codons gegen häufigere Codons ausgetauscht. Entgegen den Erwartungen zeigte das „optimierte“ Konstrukt jedoch eine signifikant verringerte Expression im Vergleich zum Wildtypkonstrukt mit den seltenen Codons. Als Grund für diesen Effekt wurde eine erhöhte Neigung der „Codon-optimierten“ mRNA zur Ausbildung stabiler mRNA-Sekundärstrukturen, die die Translation behindern können, diskutiert¹³². Da bei den hier untersuchten 2B1b-Konstrukten offensichtlich auch eine weniger effiziente Translation mit den häufigen Codons (Wildtypkonstrukt 2B1b) zu beobachten ist, wurden die verschiedenen mRNA-Sequenzen bezüglich ihrer Neigung zur Ausbildung stabiler Sekundärstrukturen analysiert. Die Berechnungen wurden mittels „Vienna RNA Secondary Structure Prediction Tool“ der Universität Wien durchgeführt. Dieses Programm berechnet die freie Energie der optimalen Sekundärstruktur von RNA Sequenzen. Bei der Analyse der ersten 150 bp der 2B1b Sequenzen zeigte sich, dass die 2B1b Wildtypsequenz die stabilsten Sekundärstrukturen ausbildet (-54,9 kcal/mol). Das korreliert mit der sehr niedrigen Proteinexpression des Wildtypkonstruktes. Die einzigen 2B1b-Konstrukte, deren Expression noch geringer war als die des Wildtyps, waren 2B1b*1X2, 2B1b*1X5 und 2B1b*1X6. Diese drei Konstrukte bilden ebenfalls sehr stabile Sekundärstrukturen, deren freie Energie nur geringfügig kleiner ist als die von 2B1b (-50,9 / -51,2 / -47,7 kcal/mol). Dass diese Konstrukte ein noch niedrigeres Expressionsniveau besitzen als das Wildtypkonstrukt, könnte darauf zurückzuführen sein, dass sie zusätzlich zu den stabilen mRNA-Sekundärstrukturen auch die sehr seltenen Codons (Ile-ATA, Leu-CTA) enthalten, die aufgrund eines Mangels an entsprechenden tRNA die Translation negativ beeinflussen können. Das Konstrukt 2B1b*X4 besitzt ähnlich stabile Sekundärstrukturen wie die drei zuvor diskutierten Konstrukte (-49,8 kcal/mol), aber es enthält keines der sehr seltenen Codons und die Stabilität der Sekundärstruktur ist geringer als beim Wildtypkonstrukt. Dies erklärt die 8-fach erhöhte Proteinexpression im Vergleich zum Wildtyp. 2B1b*1X7, 2B1b*1X8 und 2B1b*1X10 bilden wiederum weniger stabile Sekundärstrukturen (-46,2 / -45,3 / -45,9 kcal/mol), und zeigen auch ein höheres Expressionsniveau als die bisher genannten Konstrukte. 2B1b*X8 enthält zwei sehr seltene Codons und zeigt das geringste Expressionsniveau im Vergleich dieser drei Konstrukte. 2B1b*1X10 besitzt ein höheres

Expressionsniveau als 2B1b*1X7 und gleichzeitig auch etwas weniger stabile Sekundärstrukturen. Die geringste Neigung zur Ausbildung von Sekundärstrukturen besitzen die Konstrukte 2B1b*1X3, 2B1b*1X9 und 2B1b*1X1 (-45,2 / -44,0 / -42,0 kcal/mol). Gleichzeitig zeigten sie auch die höchsten Expressionsniveaus. 2B1b*1X3 besitzt zwar im Vergleich dieser drei Konstrukte die stabilste Sekundärstruktur und zeigt trotzdem die höchste Expression, es enthält aber auch keines der sehr seltenen Codons, während 2B1b*1X1 und 2B1b*1X9 jeweils ein sehr seltenes Codon enthalten. 2B1b*1X1 zeigt wiederum eine höhere Expression als 2B1b*1X9, was mit der Stabilität der Sekundärstrukturen übereinstimmt. Die Analyse der rGSTT2-Konstrukte zeigte ebenfalls eine Korrelation der Stabilität der mRNA-Sekundärstrukturen und dem Expressionsniveau. So ergab die Berechnung der freien Energie der mRNA Sekundärstruktur der Wildtypsequenz rGSTT2 (-46,6 kcal/mol) den höchsten Wert. Während die Stabilität der mRNA-Sekundärstrukturen für beide Konstrukte mit seltenen Codons rGSTT2*X6 (-40,6 kcal/mol) und rGSTT2*X8 (-39,1 kcal/mol) wesentlich geringer ist. Diese beiden Konstrukte zeigten auch eine deutlich erhöhte Proteinexpression, wobei rGSTT2*X8 eine höhere Expression zeigte als rGSTT2*X6, was ebenfalls mit den berechneten Werten für die freie Energie der mRNA-Sekundärstruktur übereinstimmt. Für die Sequenzen 1A1*1 und 1A1*1Y ergaben die Berechnungen allerdings eine etwas erhöhte Stabilität der mRNA-Sekundärstrukturen durch das Einführen der seltenen Codons (-57,3 bzw. -58,4 kcal/mol). Die Unterschiede der freien Energien sind zwar sehr gering, stehen aber im Gegensatz zu der Erhöhung der Expression mit dem Konstrukt 1A1*1Y. Hier spielt offensichtlich noch ein weiterer Faktor bei der Erhöhung der Expression eine Rolle. Dies wird auch bei der Analyse der verschiedenen 1A2*1-Sequenzen deutlich. Zwar ergibt sich hier die geringste Stabilität der Sekundärstruktur für das Konstrukt 1A2*1Z4 (-51,7) welches gleichzeitig auch das höchste Expressionsniveau zeigt, die Konstrukte 1A2*1Z5 und 1A2*1Z6 jedoch besitzen noch stabilere Sekundärstrukturen (-65,3 und -60,4 kcal/mol) als der Wildtyp 1A2*1 (-59,9 kcal/mol), obwohl sie ein 3- bzw 5-fach erhöhtes Expressionsniveau zeigen. Die 1A2*1Z2-mRNA (-59,3 kcal/mol) bildet Sekundärstrukturen, die geringfügig weniger stabil sind, als die des Wildtyps und die Proteinexpression (1,2-fach) ist hier auch nur geringfügig erhöht gegenüber dem Wildtyp. 1A1*1Z3 dagegen zeigt ein 9-fach erhöhtes Expressionsniveau und eine geringere Stabilität der mRNA-Sekundärstruktur (-56,8 kcal/mol). In diesen Fällen korrelieren die freien Energien der Sekundärstrukturen und die Expressionsniveaus. 1A2*1Z3 sollte allerdings entsprechend seiner geringen Neigung zur Ausbildung

stabiler Sekundärstrukturen (-54,8 kcal/mol) eine stärkere Erhöhung der Proteinexpression (6-fach) im Vergleich zum Wildtyp 1A2*1 zeigen. Für die 1A1*1- und 1A2*1-Sequenzen liefert die alleinige Analyse der mRNA-Sekundärstrukturen also keine schlüssige Erklärung für die Erhöhung des Expressionsniveaus aufgrund eingeführter seltener Codons. Deshalb wurde in dieser Arbeit ein weiterer Faktor analysiert, die sogenannte „Downstream Box“ (DB).

4.1.3 Einfluss seltener Codons auf Consensus von DB und 16S rRNA

Als DB wird ein Sequenzabschnitt am 5'-Ende einer mRNA (ca. +15 bis +26 bp) bezeichnet, der bei der Translationsinitiation mit der 16S rRNA des Ribosoms interagiert. Eine DB konnte in vielen bakteriellen mRNA nachgewiesen werden. Außerdem wurde gezeigt, dass die Effizienz der Translationsinitiation vom Grad der Übereinstimmung der DB-Sequenz und der 16S rRNA beeinflusst wird. Je größer der Consensus der beiden Sequenzen, umso effizienter wird das entsprechende Gen exprimiert⁵⁷. Da der Bereich, in dem die DB in bakteriellen mRNA identifiziert wurde (+15 bis +26 bp), mit dem Bereich der Codonaustausche (+9 bis +36 bp) übereinstimmt, wurden sämtliche hier verwendete cDNA bezüglich einer potentiellen DB und deren Veränderung aufgrund der Codonaustausche hin analysiert. Für die Sequenz des 1A1*1-Wildtypkonstruktes ergibt sich lediglich eine Übereinstimmung von 46,7 % mit der 16S rRNA. Der Consensus erhöht sich jedoch stark durch das Einführen sechs seltener Codons: 1A1*1Y (60 % Übereinstimmung). Dies könnte also die Erhöhung der 1A1*1-Proteinexpression durch seltene Codons erklären, ohne dass große Veränderungen in der Stabilität der mRNA-Sekundärstrukturen auftraten. Bei der 1A2*1 konnte die Expressionssteigerung der Konstrukte 1A2*1Z5 (3-fach) und 1A2*1Z6 (5-fach) nicht durch eine Verringerung der mRNA-Sekundärstrukturen erklärt werden. Die Stabilität dieser Strukturen war im Vergleich zum Wildtypkonstrukt sogar erhöht. Betrachtet man jedoch die DB, so zeigt sich eine Erhöhung des Consensus von 46,7 % (1A2*1) auf 62,5 % (1A2*1Z5) bzw. 68,8 % (1A2*1Z6). Aufgrund dieser starken Erhöhung des Consensus der DB würde man vielleicht sogar eine stärkere Expressionserhöhung erwarten, allerdings muss man den negativen Einfluss der stabilen mRNA-Sekundärstrukturen mit berücksichtigen. Vergleicht man beide Konstrukte untereinander, so korrelieren freie Energie der mRNA Sekundärstruktur (-65,3 vs -60,4 kcal/mol) und Consensus der DB (62,5 vs 68,8 %) mit der Erhöhung der Proteinexpression (3- vs 5-fach im Vergleich zum Wildtyp).

Die Analyse der 2B1b-Konstrukte ergab ebenfalls eine hohe Übereinstimmung des Consensus von DB und 16S rRNA mit dem entsprechenden Expressionsniveau. Den geringsten Consensus von DB und 16S rRNA besitzen die Konstrukte 2B1b, 2B1b*1X2 und 2B1b*1X6 (je 40 %). Diese drei Konstrukte zeigten gleichzeitig auch die niedrigsten Proteinexpressionsniveaus. Das Expressionsniveau von 2B1b*1X5 war zwar genauso niedrig wie von 2B1b*1X6, obwohl die DB von 2B1b*1X5 einen höheren Consensus besitzt (53,3 %). Allerdings muss man hier wiederum die Stabilität der mRNA-Sekundärstrukturen miteinbeziehen und die ist bei 2B1b*1X5 (-51,2 kcal/mol) höher als bei 2B1b*1X6 (-47,7 kcal/mol). Die größte Übereinstimmung von DB und 16S rRNA ergab sich für die Konstrukte 2B1b*1X1, 2B1b*1X3 und 2B1b*1X7 (je 66,7 %), diese zeigen gleichzeitig auch die höchste Steigerung der 2B1b-Proteinexpression im Vergleich zum Wildtypkonstrukt. Zur Überprüfung des Einflusses der DB auf das Expressionsniveau wurde ein weiteres 2B1b-Konstrukt generiert, bei dem die DB, ohne Berücksichtigung der etwaigen Änderung Aminosäuresequenz, optimiert wurde. Der Consensus von DB und der 16S rRNA betrug bei dem entsprechenden Konstrukt 2B1b*db 93,3 %. Die Proteinexpression wurde dadurch im Vergleich zum Wildtypkonstrukt 2B1b ca. 70-fach gesteigert. Gleichzeitig wurde auch die Stabilität der mRNA-Sekundärstruktur stärker reduziert als bei allen anderen Konstrukten (2B1b: -54,9 kcal/mol, 2B1b*db: - 40,9 kcal/mol). Die Existenz bzw. der Einfluss der DB ist in der Literatur noch umstritten. Die Hypothese von Sprengart *et al*, dass die DB die Effizienz der Translationsinitiation durch transiente Basenpaarung mit der 16S rRNA (anti-DB) erhöht, wurde von O'Connor *et al* widerlegt. Mutationen der anti-DB auf der 16S rRNA hatten keinen Einfluss auf das Expressionsniveau der gestesteten mRNA. Die Erhöhung der Translation ist also nicht auf eine mRNA-rRNA Basenpaarung zurückzuführen, es ist also bislang ungeklärt warum ein hoher Consensus von DB und 16S rRNA zu einer hohen Translationsrate führt^{59,133,134}. Die Analyse der in dieser Arbeit verwendeten cDNA-Konstrukte zeigt jedoch einen eindeutigen Zusammenhang zwischen „Optimierung“ der DB und der Steigerung des Expressionsniveaus, die durch eine alleinige Betrachtung der mRNA Sekundärstrukturen nicht erklärt werden konnte. Es ist jedoch bemerkenswert, dass das Einführen seltener Codons in vielen Fällen eine Optimierung der DB und gleichzeitig eine Optimierung der mRNA-Sekundärstruktur zur Folge hatte.

Die Reduktion der Expression durch das Einführen seltener Codons in die Luciferase-cDNA steht im Widerspruch zur Optimierung der DB (Luc: 60 %, Luc*X: 66,7 %). Allerdings ist der Consensus von DB und 16S rRNA in diesem Fall bereits beim

Wildtypkonstrukt Luc sehr hoch, im Vergleich zu den Wildtypkonstrukten von 2B1b (40 %), 1A2*1 (46,7 %) und 1A1*1 (46,7 %). Außerdem ergab die Optimierung der DB bei dieser cDNA auch keine Optimierung der mRNA-Sekundärstrukturen. Die Stabilität der mRNA-Sekundärstruktur war beim Konstrukt Luc*X (-40,6 kcal/mol) sogar leicht erhöht gegenüber dem Wildtypkonstrukt Luc (-39,3 kcal/mol). Da die Expression des Wildtypkonstruktes im Fall der Luciferase bereits sehr hoch war und auch die DB bereits eine 60 % Übereinstimmung mit der 16S rRNA hatte, überwiegt hier anscheinend der negative Effekt der seltenen Codons an sich. Deshalb konnte in diesem Fall keine Erhöhung der Proteinexpression durch das Einführen seltener Codons beobachtet werden.

4.1.4 CACA-Folgen erhöhen Effizienz der Translationsinitiation

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Erhöhung der Translationeffizienz in *E. coli* durch wiederholte CA-Sequenzen downstream vom Startcodon. Martin-Farmer und Janssen haben verschieden lange CA-Multimere in das *E. coli lacZ*-Gen eingeführt und damit die Expression des entsprechenden Proteins stimulieren können. Wurden fünf CA-Folgen am 5'-Ende des Gens eingefügt, konnte die Proteinexpression auf das 74-fache gesteigert werden. Das alleinige Einfügen von fünf mal Adenin bzw. fünf mal Cytosin führte ebenfalls zu einer Veränderung des Expressionsniveaus, eine Erhöhung durch fünf mal Adenin, jedoch auch eine Verminderung durch fünf mal Cytosin. Am effizientesten war jedoch die Erhöhung der Expression durch fünf CA-Folgen. Beim Einfügen einzelner CA-Dinukleotide wurden unterschiedlich starke Expressionssteigerungen beobachtet, in Abhängigkeit von der Position bzw. dem relativen Abstand zum Startcodon. Des Weiteren konnte eine Erhöhung der *lacZ*-mRNA-Konzentration durch das Einfügen der CA-Folgen beobachtet werden. Die mRNA-Konzentration variierte in den unterschiedlichen Klonen, wurde allerdings nur maximal 2-fach erhöht im Vergleich zu dem Wildtypkonstrukt. Mittels Primer extension Inhibitionsanalyse¹³⁵ wurde die Ribosomenbindeeffizienz der verschiedenen Konstrukte überprüft, und es konnte gezeigt werden, dass die eingefügten CA-Folgen zu einer wesentlich effizienteren Bindung der Ribosomen an die mRNA und somit auch zu einer effizienteren Translation führen¹³⁶. Seltene Codons besitzen in der 3. Position oft ein Adenin während häufigere Codons eher ein Cytosin, Guanin oder Thymin besitzen, es ist also wahrscheinlich, dass durch das Einfügen seltener Codons auch zusätzliche CA-Folgen am 5'-Ende der cDNA generiert wurden. Deshalb wurden für 1A1*1, 1A2*1, 2B1b, rGSTT2 und Luciferase jeweils die Wildtyp-cDNA und das Konstrukt mit den

meisten eingefügten seltenen Codons auf CA-Folgen innerhalb der ersten 30 bp untersucht. In Abbildung 4-1 ist das Ergebnis graphisch dargestellt. Bei der 1A1*1, 1A2*1 und 2B1b wurde durch das Einfügen der seltenen Codons gleichzeitig auch die Anzahl der CA-Folgen erhöht. Am stärksten ist dieser Unterschied bei der 2B1b. Hier werden vier neue CA Folgen zusätzlich eingefügt und für dieses Protein war auch der Anstieg des Expressionsniveaus mit den seltenen Codons am stärksten. Die einzige cDNA, bei der das Einfügen der seltenen Codons zu einer Verringerung der Anzahl von CA Folgen innerhalb der ersten 30 bp geführt hat, ist die der Luciferase. Dies war auch das einzige Beispiel, bei dem die Proteinexpression durch das Einführen seltener Codons reduziert wurde. Es ist demnach möglich, dass die Expressionssteigerung durch das Einführen seltener Codons am 5'-Ende der cDNA durch eine effizientere Ribosomenbindung (aufgrund einer höheren Anzahl von CA-Folgen) unterstützt wird.

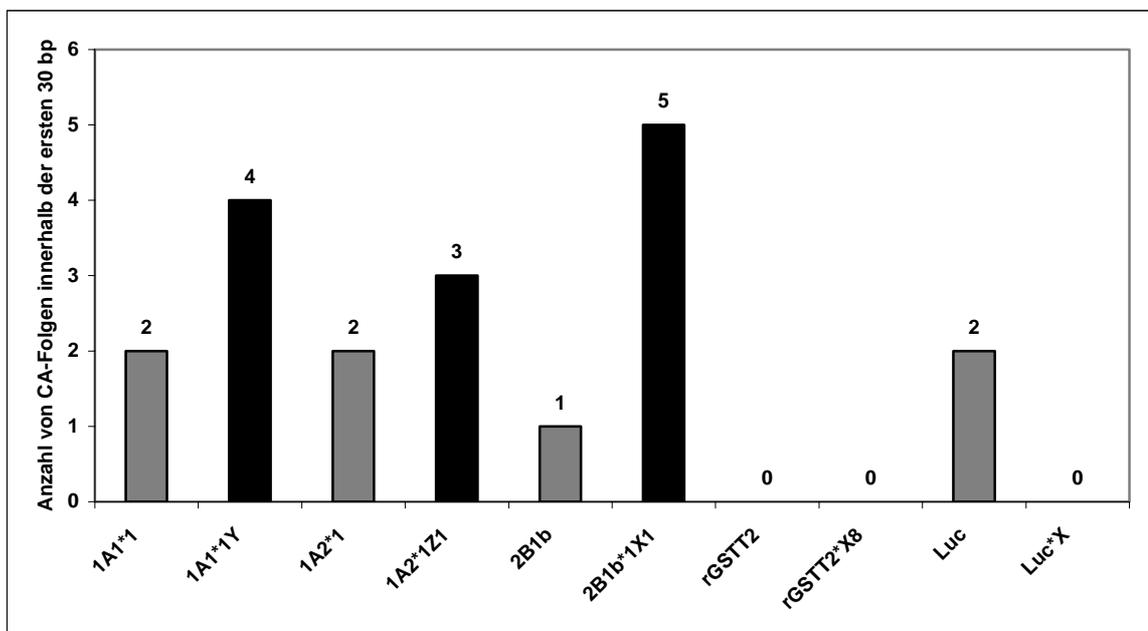


Abbildung 4-1: Anzahl von CA-Folgen am 5'-Ende der Wildtyp cDNA sowie der cDNA mit seltenen Codons

Als alleinige Ursache der Expressionserhöhung kommt dieser Aspekt jedoch nicht in Frage, da es bei der rGSTT2 weder beim Wildtypkonstrukt noch bei der Variante mit den seltenen Codons ein CA-Dinukleotid innerhalb der ersten 30 bp gibt. Dennoch wurde auch hier eine Expressionssteigerung durch die seltenen Codons beobachtet.

4.1.5 Einfluss des GC-Gehaltes auf die Translationseffizienz

Dadurch dass die seltenen Codons oft in der 3. Position ein Adenin besitzen, werden allerdings nicht nur zusätzliche CA-Folgen generiert, sondern auch der GC-Gehalt gesenkt. Um zu überprüfen ob, die Expressionssteigerungen lediglich durch strukturelle Änderungen der mRNA aufgrund einer Senkung des GC-Gehaltes verursacht werden, wurde für die 1A2*1 und 2B1b jeweils ein Konstrukt generiert, bei dem der GC-Gehalt durch das Einführen häufiger Codons im gleichen Maß gesenkt wurde wie durch das Einführen der maximalen Anzahl seltener Codons. Die resultierenden Konstrukte 1A2*1gc6 und 2B1b*gc8 zeigten jedoch eine wesentlich geringere (bzw. gar keine) Erhöhung der Expression als die Konstrukte mit den seltenen Codons. Dabei ist aber zu berücksichtigen, dass die eingeführten häufigeren Codons, zur Senkung des GC-Gehaltes, in der 3. Position meist ein Thymin und kein Adenin codieren. Martin-Farmer und Janssen hatten ebenfalls nur mit eingefügten Adenin-Nukleotiden eine Erhöhung der Expression beobachtet. Muto *et al* haben zudem publiziert, dass es keinen signifikanten Unterschied im GC-Gehalt gut und schlecht exprimierter *E. coli* Gene gibt¹³⁷.

4.2 Einfluss seltener Codons auf die heterologe SULT Expression in V79-Zellen

In V79-Zellen wurde für die 1A1*1 keine Änderung des Expressionsniveaus durch das Einführen seltener Codons beobachtet. Die mRNA-Sequenz des Konstruktes 1A1*1Yeu bildet zwar auch weniger stabile Sekundärstrukturen im Vergleich zur jeweiligen Wildtyp mRNA, aber dies spielt bei eukaryontischen Zellen keine so große Rolle wie bei Bakterien. In Säugerzellen werden die mRNA durch Proteinkomplexe stabilisiert und der gesamte Mechanismus der Transkription und Translation ist sehr verschieden von dem der Bakterien. Während z.B. bei Prokaryonten Transkription und Translation gekoppelt ablaufen, sind diese Prozesse bei Eukaryonten streng getrennt⁵⁹. Wenn man davon ausgeht, dass die Expressionssteigerung nach dem Einführen seltener Codons auf einer Verringerung der Neigung zur Ausbildung stabiler mRNA-Sekundärstrukturen beruht, sollte man in Säugerzellen auch keinen Einfluss auf die Expression erwarten. Der ebenfalls diskutierte Effekt der Optimierung der DB durch seltene Codons ist ebenfalls nur für Bakterien relevant, da sich die DB auf die bakterielle 16S rRNA bezieht. Auch die Optimierung der Ribosomenbindung durch zusätzliche CA-Folgen ist nur für bakterielle Ribosomen beschrieben. Insgesamt passt

es also ins Bild, dass die seltenen Codons keine Expressionssteigerung in V79-Zellen bewirken konnten. Dass die seltenen Codons auch keine Reduktion der Expression zur Folge hatte, deutet darauf hin, dass diese Codons für Säugierzellen kein so bedeutendes Problem darstellen wie für Bakterien. Dazu gibt es jedoch bisher noch keine genaueren Untersuchungen.

4.3 Heterologe Expression der 2B1b in Bakterien

4.3.1 Einfluss seltener Codons auf Expression in *E. coli* und *S. typhimurium*

Die Expression der 2B1b in Bakterien ist im Gegensatz zu vielen anderen SULT sehr problematisch. Die Expression in *E. coli* XL-1 ist im Western Blot kaum detektierbar und auch in *S. typhimurium* TA1538 ist die Expression verhältnismäßig schwach. Meloche *et al* haben ebenfalls publiziert, dass die Expression der 2B1b in *E. coli* sehr gering ist und nur durch das Hinzufügen eines His-Tags gesteigert werden konnte. Das Protein mit dem His-Tag zeigte jedoch auch veränderte katalytische Eigenschaften³⁰. Da das Ersetzen häufiger Codons durch synonyme seltene Codons bereits bei der 1A2*1 und der 1A1*1 erfolgreich zur Erhöhung der Proteinexpression eingesetzt werden konnte^{21,121}, lag es nahe, diese Methode auch bei der 2B1b anzuwenden. Durch das Einführen von bis zu zwölf seltenen Codons konnte die Expression der 2B1b in *E. coli* XL-1 bzw. *S. typhimurium* maximal 80- bzw. 56-fach erhöht werden. Dass die Expressionssteigerung in *E. coli* höher ausfällt als in *S. typhimurium*, liegt vermutlich an dem unterschiedlich hohen Expressionsniveau des Wildtypkonstruktes in den verschiedenen Bakterien. Die 2B1b-Expression mit der Wildtyp cDNA ist in *S. typhimurium* ca. 10-fach höher als in *E. coli* XL-1. Dies erklärt jedoch nicht die relativen Unterschiede in der Expression einzelner Konstrukte. So ist z.B. in *E. coli* die Expression von 2B1b*1X3 und 2B1b*1X10 relativ gesehen höher als in *S. typhimurium*. Die Expression von 2B1b*1X6 ist wiederum in *S. typhimurium* höher als in *E. coli*. Eine Ursache dafür könnten einige Unterschiede in der Codon Usage der beiden Bakterien sein. Die Codon Usage von *E. coli* und *S. typhimurium* ist zwar sehr ähnlich, stimmt aber nicht absolut überein. So ist in *S. typhimurium* das Prolin Codon CCA (13 %) seltener als CCC (16 %). In *E. coli* ist jedoch CCC (12 %) seltener als CCA (13 %). Dieses Codon ist allerdings das einzige hier insertierte Codon, welches in *E. coli* häufiger ist als das Wildtypcodon. Alle weiteren Unterschiede in der Codon Usage zeigen lediglich etwas unterschiedliche Prozentzahlen. Eine weitere Erklärung für das unterschiedliche Expressionsmuster der einzelnen Konstrukte in *E. coli* und

S. typhimurium könnten Unterschiede in der Sequenz der 16S rRNA sein. Die hier durchgeführten Berechnungen der DB beruhen auf der Sequenz der 16S rRNA von *E. coli*.

Unterschiede in der Expression der 2B1b zeigten sich auch zwischen *E. coli* XL-1 und *E. coli* BL 21. Die wesentlich höhere Expression in den BL21 im Vergleich zu den XL-1 war zu erwarten, da die Expression der heterologen cDNA in den XL-1 unter der Kontrolle des lacZ-Promotors stand und in den BL21 unter der des T7-Promotors. Der T7-Promotor ist ein besonders starker Promotor aus dem Bakteriophagen T7. Dieser Promotor kann nur in speziellen Bakterien (z.B. *E. coli* BL21) verwendet werden, die rekombinant die T7-RNA-Polymerase exprimieren und somit eine Expression der vom T7-Promotor kontrollierten cDNA ermöglichen. Aufgrund dieser forcierten Expression ist das 2B1b-Proteinniveau in den BL21 ca. 50-fach höher als in den XL-1. Insofern ist es nicht überraschend, dass die Expressionssteigerung durch die Codonaustausche in den BL21 verhältnismäßig geringer sind als in den XL-1. Das Muster der Expressionsveränderungen einzelnen Konstrukte ist in den BL21 jedoch im wesentlichen ähnlich zu dem in XL-1. Darüber hinaus konnte in den BL21 auch für die Konstrukte 2B1b*1X2, 2B1b*1gc8, 2B1b*1X5 und 2B1b*1X6 das 2B1b Protein im Western Blot detektiert werden. In den XL-1 war für diese Konstrukte keine Expression detektierbar.

Das 2B1b-Protein wird in *S. typhimurium* TA1538 im Western Blot als eine Doppelbande zweier sehr dicht migrierender Banden detektiert. In *E. coli* hingegen gibt es im Western Blot nur eine Bande des Volllängenproteins. Eine posttranslationale Modifikation eines Teils des Proteins kommt als mögliche Erklärung nicht in Frage, da das Mengenverhältnis aus größerer und kleinerer Bande bei den verschiedenen Konstrukten unterschiedlich ist. Die Konstrukte unterscheiden sich jedoch nur in ihrer DNA bzw. mRNA-Sequenz, die Aminosäuresequenz des resultierenden Proteins ist gleich. Somit sollte es auch keine Unterschiede bei posttranslationalen Modifikationen geben. Die Doppelbande könnte eventuell die Folge einer Modifikation der mRNA aufgrund unterschiedlicher Translationseffizienz sein. Ausgeschlossen werden kann ein alternatives Startcodon. Das einzige alternative Startcodon im gleichen Leseraster könnte das Leucin Codon TTG an Position zwölf darstellen. Dieses ist jedoch z.B. in den Konstrukten 2B1b*1X1 und 2B1b*1X6 zu CTA mutiert worden und auch diese Konstrukte zeigen im Western Blot die erwähnte Doppelbande.

4.3.2 Tandem-Translation in *E. coli* und *S. typhimurium*

Neben der Hauptbande bei ca. 40 kD wurde im Western Blot sowohl in cytosolischen Präparationen von *E. coli* XL-1 als auch *S. typhimurium* TA1538 eine weitere Bande auf einer Höhe von ca. 30 kD detektiert. Da die Detektion dieser Bande mit einem Antikörper gegen die 2B1a, der gegen den C-Terminus des Proteins gerichtet ist¹²³, erfolgte, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei dem 30-kD-Fragment um ein N-terminal verkürztes 2B1b-Protein handelt. Die Expression dieses Fragmentes variiert sehr stark in Abhängigkeit der ausgetauschten Codons. Als Degradationsprodukt der 2B1b kommt es nicht in Frage, da es z.B. bei dem sehr hoch exprimierenden Konstrukt 2B1b*1X3 gar nicht detektiert wird, während es in dem ebenfalls hoch exprimierenden Konstrukt 2B1b*1X1 am stärksten auftritt und auch bei dem in *E. coli* nicht exprimierenden Konstrukt 2B1b*1gc8 detektiert werden kann. Die Menge des kürzeren Fragmentes korreliert also nicht mit der des Vollängenproduktes. Die Analyse der 2B1b-cDNA-Sequenz ergab, dass sich 225 bp downstream vom ersten Startcodon ein zweites ATG im Leseraster befindet, das, würde es als Startcodon fungieren können, zu einem um 75 Aminosäuren verkürzten 2B1b-Protein führen würde. Dies entspräche einer Größe von 32 kD (Größe des detektierten 2B1b Fragmentes beträgt ca. 30 kD). Die Translation eines solchen intracistronischen Startcodons erfordert bestimmte Voraussetzungen der mRNA. Dazu gehört eine offene Einzelstrangstruktur der mRNA in der Ribosomenbinderegion um das intracistronische Startcodon⁹⁷. Die Sequenzanalyse der 2B1b ergab einen GC-Gehalt von 60 % für die gesamte cDNA. Eine Analyse speziell des Bereichs um das intracistronische Startcodon (50 bp 5' bis 50 bp 3') ergab einen deutlich geringeren GC Gehalt von 47 %. Ein derartig reduzierter GC-Gehalt verringert die Neigung zur Bildung stabiler Sekundärstrukturen und ermöglicht eine offene Einzelstrangstruktur der mRNA in diesem Bereich. Dies ist wiederum Voraussetzung für die Bindung des Ribosoms und die Translationsinitiation am intracistronischen Startcodon. Eine weitere günstige Voraussetzung für eine solche sogenannte Tandem-Translation ist das Vorhandensein seltener Codons am 5'-Ende des Gens. Diese seltenen Codons bremsen die Ribosomen während der Translation ab und ermöglichen somit die zusätzliche Translationsinitiation des Tandemproduktes⁹⁷. Auch diese Voraussetzung ist bei den 2B1b-Konstrukten gegeben. Ein Vergleich der Konstrukte 2B1b*1X1 und 2B1b*1X3 verdeutlicht den Einfluss der seltenen Codons für Isoleucin und Leucin auf die Expression des Tandemtranslationsproduktes. Beide Konstrukte werden in *E. coli* sehr stark exprimiert (67- bzw. 78-fach stärker als das Wildtypkonstrukt), jedoch entsteht das

Tandem-Fragment nur bei 2B1b*1X1. Diese Sequenz enthält die beiden sehr seltenen Codons für Isoleucin und Leucin, während 2B1b*1X3 alle Codonaustausche wie 2B1b*1X1 bis auf diese beiden Codons beinhaltet und keine Expression des Tandemproduktes zeigt. Zur Überprüfung der These, dass das 30-kD-Fragment ein Tandemtranslationsprodukt der 2B1b ist, wurde in einigen der bereits generierten 2B1b-Konstrukten zusätzlich Mutationen eingefügt. Bei dem Wildtypkonstrukt wurden das erste Startcodon und bzw. oder das potentielle interne Startcodon zu CTG mutiert (2B1b*CTG1, 2B1b*CTG2, 2B1b*CTG1+2), da CTG das einzige NTG-Codon ist, welches von Bakterien nicht als Startcodon verwendet werden kann⁵². Bei den Konstrukten 2B1b*1X1 und 2B1b*gc8 wurde jeweils das potentielle interne Startcodon zu CTG mutiert (2B1b*1X1CTG2, 2B1b*gc8CTG2). Diese beiden Konstrukte wurden ausgewählt, weil sie eine besonders starke Expression des kürzeren Fragmentes zeigten und überprüft werden sollte, ob die 30-kD-Bande im Western Blot verloren geht, wenn das interne Startcodon entfernt wird. Zusätzlich wurde ein verkürztes 2B1b-Konstrukt hergestellt, bei dem die ersten 224 bp im 5' Bereich der cDNA deletiert wurden, so dass sich das vermutete intracistronische Startcodon der Originalsequenz in diesem Konstrukt an erster Position befindet (2B1b*ct). Die Expression des 2B1b*ct-Konstruktes ergab eine ca. 30 kD große Bande im Western Blot exakt auf der Höhe des unbekanntes Fragmentes. Allerdings war die Intensität der Bande jetzt wesentlich stärker, da das 32-kD-Produkt jetzt das alleinige Expressionsprodukt der cDNA war. Damit wurde das unbekanntes Fragment eindeutig als Tandemtranslationsprodukt der 2B1b identifiziert. Eine Mutation des ersten Startcodons im Wildtypkonstrukt zu CTG führte zu einem Verlust der Expression der 40-kD-2B1b-Bande und gleichzeitig zu einer Verstärkung der Expression des 32-kD-Fragmentes. Dies war einerseits zu erwarten, da sich bei Verlust des ersten Startcodons der Translationsprozeß auf das interne Startcodon konzentriert und verstärkt das verkürzte Produkt gebildet werden kann. Andererseits ist es aber auch erstaunlich, dass sich ein Startcodon, welches sich 225 bp downstream aller regulatorischen Sequenzen (Shine-Delgarno, Ribosomenbindestelle) befindet, noch für die Translationsinitiation eignet. Eine weitere Analyse der 2B1b-cDNA zeigte, dass das interne Startcodon ebenfalls von potentiellen Shine-Delgarno Sequenzen und einer DB flankiert wird. Die Shine-Delgarno Sequenzen umfassen die -35 box und die -10 box mit jeweils einem mismatch. Die DB besitzt einen Consensus von 60 % mit der 16S rRNA von *E. coli*. Dies ist ein relativ guter Wert im Vergleich zu der DB des ersten Startcodons im Wildtypkonstrukt der 2B1b (40 %). Die Mutation des internen Startcodons zu einem CTG in dem

Wildtypkonstrukt führte nicht nur zu einem Verlust des 32-kD-Fragmentes, sondern auch zu einem Verlust des Volllängenproteins. Die Konstrukte 2B1b*CTG2 und 2B1b*CTG1+2 zeigten beide keinerlei Expression des Volllängen- oder des 32-kD-Proteins. Derselbe Effekt wurde mit dem 2B1b*gc8CTG2-Konstrukt beobachtet. Und eine Mutation des internen Startcodons des 2B1b*1X1-Konstruktes führte zu einer deutlichen Reduktion der Expression der Volllängen-2B1b. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Translationsinitiation am ersten Startcodon der 2B1b-cDNA von der Translationsinitiation des intracistronischen Startcodons abhängig ist. Eine mögliche Erklärung dafür wäre eine strukturelle Veränderung der mRNA durch die Bindung von Ribosomen 225 bp downstream vom eigentlichen Startcodon. Des Weiteren könnte die mRNA durch die Bindung zusätzlicher Ribosomen effektiver vor dem Abbau geschützt werden und somit auch für die Translation des Volllängenproteins längere Zeit zu Verfügung stehen.

4.4 Sensitivität der SULT-optimierten Stämme im Ames-Test

Die Erhöhung der heterologen Expression fremdstoffmetabolisierender Enzyme in Bakterien durch seltene Codons sollte für die Optimierung von Indikatorzellen für toxikologische Testsysteme genutzt werden. Für den Genmutationstest nach Ames¹⁰⁶ werden *S. typhimurium* Stämme mit verschiedenen Mutationen im Histidin-Operon verwendet. Zu diesen Indikatorstämmen gehören *S. typhimurium* TA1538 (Minus-1 Leserastermutation) und *S. typhimurium* TA100 (Substitutionsmutation). Der *S. typhimurium* Stamm TA100 besitzt zusätzlich noch ein plasmidcodiertes error-prone DNA Reparatursystem.

Es ist bekannt, dass alkylierte (polyzyklische) aromatische Kohlenwasserstoffe (z.B. 1-HMP, 2-HEP und 2-Nitrobenzylalkohol) durch SULT zu DNA-reaktiven Substanzen aktiviert werden können. Die Detektion der SULT-vermittelten Mutagenität in Standard-*in-vitro*-Mutagenitätstestsystemen ist jedoch problematisch, da die Indikatorzellen (z.B. *S. typhimurium*) keine SULT exprimieren. Die Verwendung externer Metabolisierungssysteme (S9-Mix aus Ratten- oder humaner Leber) unter Zusatz des SULT-Kofaktors PAPS ermöglicht zwar die Bildung der reaktiven Schwefelsäureester, die Penetration der negativ geladenen, kurzlebigen Metabolite in die Indikatorzellen ist jedoch fragwürdig^{37,138}. Deshalb ist für die Detektion SULT-vermittelter Mutagenität die heterologe Expression von SULT direkt in den Indikatorzellen erforderlich.

Für eine möglichst hohe Sensitivität der Indikatorzellen ist wiederum eine stabile Expression der Enzyme auf hohem Niveau erstrebenswert.

Durch das Einführen seltener Codons konnte die Expression der 1A2*1 7-fach (1A2*1Z1) bzw. 15-fach (1A2*1Z4) im Vergleich zum Wildtypkonstrukt in *S. typhimurium* TA1538 gesteigert werden. Die höher exprimierenden Stämme TA1538-1A2*1Z1 und -1A2*1Z4 reagierten auf alle drei Testsubstanzen (1-HMP, 2-HEP E1, 2-Nitrobenzylalkohol) sensitiver als der ursprüngliche Stamm mit dem Wildtypkonstrukt TA1538-1A2*1. Für das 1-HMP stieg die spezifische Mutagenität von 129 (1A2*1) auf 216 Revertanten pro nmol (1A2*1Z1 und 1A2*1Z4). Von dem Stamm TA1538-1A2*1Z1 zu -1A2*1Z4 wäre eigentlich eine weitere Steigerung der spezifischen Mutagenität aufgrund einer erhöhten SULT Expression zu erwarten. Es ist allerdings möglich, dass die Substratkonzentration hier der limitierende Faktor war und deshalb trotz erhöhter 1A2*1 Expression keine weitere Steigerung der Mutagenität im Vergleich der beiden optimierten Stämme zu beobachten war. Für das 2-HEP stieg die spezifische Mutagenität von 112 (1A2*1) auf 165 (1A2*1Z1) bzw. 130 Revertanten pro nmol (1A2*1Z4). Damit war die Mutagenität zwar auch wieder in beiden optimierten Stämmen erhöht, es ist jedoch unklar, warum TA1538-1A2*1Z4, trotz höherer 1A2*1-Expression, auf diese Substanz weniger sensitiv reagiert hat als TA1538-1A2*1Z1. Auf den 2-Nitrobenzylalkohol reagierten die drei Stämme wiederum, entsprechend ihres unterschiedlichen 1A2*1-Expressionsniveaus, unterschiedlich sensitiv. Die Revertanzahl pro nmol 2-Nitrobenzylalkohol stieg von 2,1 (1A2*1) auf 2,7 (1A2*1Z1) bzw. 2,8 (1A2*1Z4). Zur Überprüfung der SULT-unabhängigen Sensitivität der einzelnen Stämme wurde jeweils das direkte Mutagen BPO getestet. Dabei zeigte sich, dass die Revertanzahlen in den für die SULT-Expression optimierten Stämmen deutlich reduziert waren. Die spezifische Mutagenität betrug in diesen Stämmen nur 32 % (1A2*1Z1) bzw. 30 % (1A2*1Z4) im Vergleich zum ursprünglichen Stamm TA1538-1A2*1. Es wurden jeweils mehrere Subklone aus unterschiedlichen Transfektionen getestet und jedes Mal war die Sensitivität der höher exprimierenden Stämme gegenüber dem BPO stark reduziert. BPO wurde als SULT-unabhängiges Mutagen eingesetzt um zu überprüfen, ob die transformierten Zellen sich von den Wildtypstämmen in ihrer Reaktion auf SULT-unabhängige mutagene Substanzen unterscheiden. Die reduzierte Sensitivität der hochexprimierenden Stämme auf BPO könnte zahlreiche Ursachen haben. Anscheinend beeinflusst die sehr hohe SULT-Expression indirekt den SULT-unabhängigen Stoffwechsel der Zellen.

Änderungen im Zellzyklus, Zellwachstum oder aber der Expression anderer Enzyme (z.B. DNA- Polymerasen) sind zu vermuten.

Die Expression der 1A1*1 in *S. typhimurium* TA1538 bzw. TA100 wurde durch das Einführen seltener Codons 4-fach bzw. 7-fach erhöht. Beim Test mit BPO zeigte der Stamm TA100-1A1*1Y eine deutlich reduzierte Reaktion im Vergleich zu TA100-1A1*1 und wurde deshalb nicht im Ames-Test verwendet. In diesen Stämmen hängt die reduzierte Sensivität gegenüber BPO eventuell mit einer Wechselwirkung des pKN-1A1*1Y-Expressionsplasmides und dem pKM101-Plasmid zusammen, das das error-prone DNA Reparatursystem codiert. TA1538-1A1*1Y zeigte keine verminderte Reaktion auf BPO und wurde im Vergleich mit TA1538 (ohne heterologe SULT-Expression) und TA1538-1A1*1 im Ames-Test mit der Testsubstanz Aristolochiasäure eingesetzt. Mit dem TA1538 Stamm ist bereits ohne heterologe SULT Expression eine schwache Mutagenität zu beobachten. Diese beruht wahrscheinlich auf der Entstehung eines resonanzstabilisierten Nitrenium-Ions. Es ist bereits bekannt, dass die Mutagenität verschiedener aromatischer Hydroxylamine (gebildet aus Nitroarenen) durch Sulfonierung noch verstärkt werden kann^{116,117}. Durch die Expression der 1A1*1 in *S. typhimurium* TA1538 wurde die Mutagenität der Aristolochiasäure bei höheren Konzentrationen (> 20 nmol) im Vergleich zu den Indikatorzellen ohne SULT-Expression erhöht. Eine Erhöhung der SULT-Expression in TA1538-1A1*1Y führte zu einem wesentlich steileren Anstieg der Revertantenrate bei geringen Konzentrationen von Aristolochiasäure (< 20 nmol). Dieses Beispiel zeigt deutlich, dass eine Erhöhung der heterologen SULT-Expression die Sensitivität der Indikatorzellen im Ames-Test steigern kann. Dies ist besonders dann erforderlich, wenn die Testsubstanz nur eine relativ geringe Affinität zur exprimierten SULT besitzt. Dies ist bei der hier getesteten Aristolochiasäure wahrscheinlich auch der Fall, da entweder eine hohe Substanzkonzentration oder ein hohes Expressionsniveau erforderlich war, um die SULT-spezifische Aktivierung der Aristolochiasäure zu detektieren.

Die Expression der 2B1b in *S. typhimurium* TA100 und TA1538 konnte ebenfalls durch Codonaustausche stark erhöht werden. Die Sensitivität von TA100-2B1b*X gegenüber BPO war durch die erhöhte SULT Expression nicht reduziert und der optimierte Stamm konnte im Ames-Test eingesetzt werden. Als Testsubstanzen wurden 3 β -Hydroxy-Steroide (3 β -Hydroxy-Cyproteronacetat, 3 β -Hydroxy-Chlormadinonacetat, 3 β -Hydroxy-Megestrolacetat) sowie nahrungsrelevante Substanzen (z.B. 5-Hydroxymethylfurfural) und Umweltkontaminanten (1-Hydroxymethylpyren, Nitrofen) ausgewählt. Für Nitrofen

wurde bereits gezeigt, dass es im Ames-Test durch SULT zum Mutagen aktiviert wird¹³⁹. Des Weiteren konnte in unserer Arbeitsgruppe eine SULT-vermittelte Aktivierung der 3 β -Hydroxy-Steroide (durch SULT2A1) und des 5-Hydroxymethylfurfural (durch SULT1A1) im Ames-Test gezeigt werden (unveröffentlichte Daten). Allerdings wurde keine dieser Testsubstanzen durch 2B1b im Ames-Test aktiviert. Da jedoch mit anderen SULT-exprimierenden Stämmen gezeigt wurde, dass die Sulfokonjugate eine mutagene Wirkung haben, wurden die getesteten Substanzen im hier Ames-Test offensichtlich nicht umgesetzt. Um zu überprüfen, ob das heterolog exprimierte Enzym in den Bakterien überhaupt aktiv ist, wurde ein Enzym-Assay mit DHEA, dem prototypischen Substrat für hSULT2-Enzyme entwickelt. Dafür wurde die DHEA-Sulfonierung in cytosolischen Präparationen von *E. coli* XL-1 und *S. typhimurium* TA1538 bestimmt. Die dabei ermittelte Metabolisierungsgeschwindigkeit vom Stamm TA1538-2B1b*1X betrug 168 pmol/min pro mg cytosolisches Protein. Das Expressionsniveau der 2B1b beträgt in diesem Stamm ca. 2-3 % des cytosolischen Proteins. Dieser Wert wurde mittels densitrometrischer Auswertung von Western Blots im Vergleich von cytosolischen Präparationen und 2B1b-Inclusion-Bodies bestimmt¹²¹. Die Berechnung der maximalen Metabolisierungsgeschwindigkeit der reinen 2B1b ergibt somit 5,6 pmol/min/ μ g. Geese und Raftogianis haben mit aufgereinigter 2B1b eine maximale Metabolisierungsgeschwindigkeit von 1,6 pmol/min/ μ g ermittelt²⁸. Der hier bestimmte Wert ist also 3-5 mal höher als der von Geese und Raftogianis publizierte. Dies könnte mit der längeren Aufarbeitungsprozedur für das gereinigte Enzym im Vergleich zur relativ schnellen Cytosolpräparation zusammenhängen. Es ist auch denkbar, dass die cytosolische Präparation dem physiologischen Milieu ähnlicher ist, als das aufgereinigte Protein. In jedem Fall ist die bakteriell exprimierte 2B1b in den cytosolischen Präparationen aktiv. Es ist jedoch möglich, dass in den lebenden Salmonellen die Sulfonierungsreaktion durch endogene Faktoren bzw. veränderte Bedingungen (Salzkonzentration) inhibiert wird.

4.5 Schlussbetrachtung

Zusammenfassend kann man sagen, dass von den fünf in dieser Arbeit untersuchten cDNA für vier eine Steigerung der Expression mittels Ersetzen häufiger Codons durch synonyme seltene Codons erzielt werden konnte. Es konnten jedoch keine bestimmten Codons identifiziert werden, welche alleine die Expressionsteigerung hervorrufen. Des Weiteren gab es keinen Einfluss der seltenen Codons auf die pKK-2B1b-Plasmidkopienzahl in *E. coli*. Eine Untersuchung der 2B1b-mRNA-Konzentration zeigte lediglich geringe Veränderungen auf mRNA-Ebene, die nicht mit den Expressionsänderungen korrelierten. Die berechnete Stabilität der mRNA-Sekundärstrukturen jedoch korrelierte mit den Änderungen auf Proteinexpressionsebene. Konstrukte mit einer hohen Neigung zur Ausbildung stabiler mRNA-Sekundärstrukturen, die die Translationsinitiation inhibieren können, zeigten auch überwiegend geringe Expressionsniveaus. Ebenso konnte ein Zusammenhang von dem Einführen seltener Codons, der Optimierung der DB und einer erhöhten Expression gezeigt werden. Und auch der von Martin-Farmer und Janssen publizierte positive Effekt von CA-Folgen am 5'-Ende einer mRNA auf die Translationseffizienz konnte in dieser Arbeit beobachtet werden. Für die Luciferase konnte, als einziges Protein, keine Expressionssteigerung durch das Einführen seltener Codons erzielt werden. In diesem Fall waren allerdings die Werte für die Stabilität der mRNA-Sekundärstrukturen und der Consensus der DB auch schon bei der Wildtypsequenz wesentlich günstiger als bei den anderen verwendeten cDNA. Außerdem wurde hier die Anzahl der CA-Folgen durch das Austauschen der Codons nicht erhöht sondern verringert. Um seltene Codons als regulatorisches Element zur Expressionssteigerung zu verwenden, sollte zuvor in jedem Fall eine Analyse der mRNA-Sequenz, mit und ohne seltene Codons, erfolgen um abzuschätzen ob eine Expressionssteigerung möglich und das Austauschen der Codons sinnvoll ist. Für eine Optimierung der Expression in eukaryontischen Zellen ist diese Methode der Codonaustausche nicht geeignet.

5 Zusammenfassung

Die Enzymsuperfamilie der löslichen Sulfotransferasen (SULT) spielt eine wichtige Rolle in der Phase II des Fremdstoffmetabolismus. Sie katalysieren den Transfer einer Sulfonylgruppe auf nucleophile Gruppen endogener und exogener Substrate. Die Sulfokonjugation von Fremdstoffen erhöht deren Wasserlöslichkeit und behindert die passive Permeation von Zellmembranen. Dadurch wird die Ausscheidung dieser konjugierten Substanzen erleichtert. In Abhängigkeit von der Struktur des Zielmoleküls kann die Sulfokonjugation aber auch zur metabolischen Aktivierung von Fremdstoffen durch die Bildung instabiler Metabolite führen. Dabei entstehende hochreaktive mesomeriestabilisierte Carbenium- bzw. Nitreniumionen können mit zellulären Nucleophilen wie z.B. der DNA reagieren. Die SULT-vermittelte Aktivierung promutagener Substanzen ist somit von toxikologischem Interesse. Für die Detektion SULT-vermittelter Mutagenität mittels bakterieller *in-vitro* Testsysteme ist die heterologe Expression der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme direkt in den Indikatorzellen (*S. typhimurium*) notwendig. *S. typhimurium* exprimieren selbst keine SULT, und externe Metabolisierungssysteme sind problematisch, weil die negativ geladenen, kurzlebigen Metabolite nur schlecht die Zellmembran penetrieren können. Die Expression humaner Enzyme in Bakterien ist jedoch zum Teil sehr kritisch. So zeigen z.B. sehr ähnliche Enzyme (SULT1A2*1 und *2) deutliche Unterschiede im Expressionsniveau bei exakt gleichen äußeren Bedingungen. Dies erschwert den Vergleich der enzymatischen Aktivitäten dieser Enzyme im *in-vitro* Testsystem. Andere Enzyme (z.B. SULT2B1b) werden unter Verwendung ihrer Wildtyp-cDNA zum Teil nicht detektierbar exprimiert. Deshalb sollte in dieser Arbeit eine Methode zur Optimierung der heterologen Expression fremdstoffmetabolisierender Enzyme für Genotoxizitätsuntersuchungen etabliert werden.

Es wurde bereits gezeigt dass synonyme Codonaustausche am 5'-Ende der humanen SULT1A2-cDNA zu einer Erhöhung der Expression des entsprechenden Enzyms in *S. typhimurium* führten. Dementsprechend wurden in dieser Arbeit Codonaustausche am 5'-Ende der cDNA verschiedener SULT (1A1*1, 1A2*1, 2B1b) sowie der Ratten Glutathion-S-Transferase Theta 2 (rGSTT2) und dem Reporter gen Luciferase durchgeführt. Die Expression der so generierten Konstrukte wurde in verschiedenen *S. typhimurium* und *E. coli* Stämmen quantifiziert und die Aktivität der überexprimierten

Enzyme im Ames-Test bzw. im Enzym-Aktivitätsassay überprüft. Durch das Einführen seltener Codons in die cDNA konnte die Proteinexpression von SULT1A1*1, SULT1A2*1 und SULT2B1b maximal 7-fach, 18-fach und 100-fach im Vergleich zur Wildtyp-cDNA gesteigert werden. Die Expression der rGSTT2 wurde ebenfalls durch das Einführen seltener Codons erhöht (maximal 5-fach). Bei dem Reporter-gen Luciferase jedoch führte das Austauschen häufiger Codons gegen seltene Codons zu einer Reduktion der Proteinexpression um 80 %. Die Expression von Fusionsproteinen aus 2B1b (5'-Ende) und Luciferase (3'-Ende) wurde durch das Einführen seltener Codons ebenfalls um 50 % reduziert. Die *S. typhimurium* Stämme mit optimierter SULT 1A1*1- bzw. 1A2*1-Expression wurden im Ames-Test eingesetzt und zeigten im Vergleich zu den geringer exprimierenden Stämmen eine höhere Sensitivität. Für SULT2B1b konnte keine Mutagenaktivierung im Ames-Test nachgewiesen werden. Allerdings zeigte ein Enzym-Aktivitätsassay mit Dehydroepiandrosteron, dass das bakteriell exprimierte Enzym funktionell war.

Da in der Literatur der Effekt seltener Codons auf die Expression in Bakterien bisher fast ausschließlich als inhibitorisch beschrieben wurde, sollte die Wirkungsweise der hier beobachteten Expressionserhöhung durch seltene Codons genauer untersucht werden. Dazu wurden verschiedene Konstrukte der SULT1A2*1 und der SULT2B1b, die unterschiedlich viele seltene Codons in verschiedenen Kombinationen besaßen, hergestellt. Es konnten jedoch keine einzelnen Codons, die für die Expressionssteigerung allein verantwortlich waren, identifiziert werden. Die Plasmidkopienzahl in den verschiedenen SULT2B1b-Klonen war konstant und die SULT2B1b-mRNA-Konzentration zeigte nur moderate Schwankungen, die nicht als Ursache für die dramatische Erhöhung der SULT2B1b-Expression in Frage kommen. Die berechnete Stabilität der potentiellen mRNA-Sekundärstrukturen wurde durch die seltenen Codons häufig stark gesenkt und ist als eine mögliche Ursache für die Expressionssteigerung anzusehen. Zusätzlich erhöhten die seltenen Codons den Consensus der Downstream Box zur 16S rRNA, was ebenfalls eine Ursache für die Expressionssteigerung sein kann.

In dieser Arbeit konnte somit die Expression der humanen SULT1A1*1, 1A2*1 und der 2B1b sowie der rGSTT2 erfolgreich mittels synonymen Codonaustausche erhöht werden. Die so optimierten *S. typhimurium* Stämme zeigten im Ames-Test eine erhöhte Sensitivität gegenüber SULT aktivierten Promutagenen bzw. erhöhte Aktivität in spezifischen Enzymaktivitätsassays.

6 Anhang

Tabelle 6-1: Oligonukleotidsequenzen

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>	T_H °C
F1	5'- AACAGACCATGGAGCTAATACAAGACACATCAAGGCCGCCAC	60
F2	5'- AACAGACCATGGAGCTAATACAAGACATATCAAGGCCGCCA	57
F3	5'- CAGACCATGGAAGTATTTCAGGATATTAGTCGTCCG	57
F4	5'- CAGACCATGGAGCTAATACAGGACATATCTAGGCCG	57
F5	5'- CAGACCATGGAGCTGATCCAAGACATCTCACGCCCG	57
F6	5'- CAGACCATGGAGCTAATACAAGAC	55
F7	5'- CAGACCATGGAGCTGATCCAGGACATATCAAGGCCG	57
F8	5'- CAGACCATGGAGCTAATACAGGACATCTCAAGGCCG	57
F9	5'- GACGGACCAGCAGAGCCACAAATACCAGGACTATGGGAC	60
F10	5'- CAGACCATGGACGGGCCCGCCGAGCCCCAGATACCGGGCCTATG	57
F11	5'- CAGACCATGGACGGACCAGCAGAGCCACAAATCCCAGGATTG	57
F12	5'- CAGACCATGGATGGTCTGCGAACCTCAG ATTCGGGGTTTATGG	57
F13	5'- CAGACCATGGACGGACCAGCAGAGCC	55
F14	5'- CAGACCATGGACGGGCCCGCCGAGCCACAAATACC	56
F15	5'- CAGACCATGGACGGGCCCGCCGAGCCCCAGATCCCAGGACTATGG	57
F16	5'- CAGACCATGGACGGACCAGCAGAGCCACAAATACCG	56
F17	5'- CAGACCATGGACGGGCCCGCCGAGCCACAAATACCAGGACTATGG	57
F18	5'- CAGACCATGGACGGACCAGCAGAGCCCCAGATCCCAGGACTATGG	57
F19	5'- CAGACCATGGACGGACCAGCCGAGCCCCAGATCCCGGGACTATGG	57
F20	5'- GGAAACAGACCTGGACGGGCCCG	55
F21	5'- GGCACGACCTGGCTGATCGAGATCATCTGC	55
F22	5'- CAGACCATGGACGGACCAGCAGAACCACAAATCCCAGGATTGTGG	57
F23	5'- CAGACCATGGACGGACCATCAGAATCACAAAGCCCAGGATTGTGG	57
F24	5'- CAGACCATGGACGGGCCCGCAGAACCACAAATCCCGGGCTTGTGG	57
F25	5'- CAGACCATGGACGGACCAGCAGAGCCACAAATCCAGGATTG	57
F26	5'- ATCGGAATTCAGGGAAATGGAGCTAATACAAGACACGTTCGCGTCCGC	57
F27	5'- CAGACCATGGACGGTCCGGCGGAACCGCAAATACCGGGTCTATGG	57
F28	5'- CCGCTGGAAGATGGAAGTGCAGGAGAGCAACTGC	55
F29	5'- CTAGAGTCGACCGCAGGCATGCAAGCTTGCC	55
F30	5'-CATGGACGGGCCCGCCGAGCCCCAGATCCCAGGGCTTGTGGGACACTGCA	
F31	5'- CATGGACGGACCAGCAGAGCCACAAATACCAGGACTATGGGACACTGCA	
F32	5'- CATGGACGGACCAGCAGAGCCACAAATACCAGGGCTTGTGGGACACTGCA	
F33	5'- CAGACCATGGAGGACGCTAAGAATATAAAGAAGGGACCAGCT	57

F34	5'- CAGACCATGGGACTAGAGCTATACCTGGACCTACTGTCTCAACCC	60
F35	5'- CAGACCATGGGACTAGAGCTATACCTAGACCTACTATCTCAACCC	60
F36	5'- ATCGAGATCATCTGCTTAATCC	56
F37	5'- GGAAACAGACCATGGACGG	60
F38	5'- ATCAACGGTTTTGGCCGTAT	65
F39	5'- TTCTGAAATGAGCTGTTGAC	
F40	5'- GTTAACTGGTAAGTTTAGTC	
R1	5'- ATTTAATCTGTATCAGGCTG	55-57
R2	5'- ACTCTCTCTAGAGTGACCCAGGAGC	55-57
R3	5'- CGGGCCCGTCCAGGTCTGTTTCC	55
R4	5'- GCAGATGATCTCGATCAGCCAGGTCGTGCC	55
R5	5'- GCAGTTGCTCTCCTGCAGTTCCATCTTCCAGCGG	55
R6	5'- GCCAAGCTTGCATGCCTGCGGTCTGACTCTAG	55
R7	5'- GTGTCCCACAAGCCCGGGATCTGGGGCTCGGCGGGCCCGTC	
R8	5'- GTGTCCCATAGTCCTGGTATTTGTGGCTCTGCTGGTCCGTC	
R9	5'- GTGTCCCACAAGCCCGGTATTTGTGGCTCTGCTGGTCCGTC	
R10	5'- AAAATACTGCAGAAGCTTCAGGGAATCCTGGCAATTC	60
R11	5'- TGCCGGACTTGGGGTAGGTG	60
R12	5'- GTTGATAACTTTAGCCAGCGG	65
R13	5'- CTGTTTTATCAGACCGCTTC	
R14	5'- GTGGTTTGTCCAAACTCATC	

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Sulfonierung von Cholesterol durch hSULT2B1b Reaktionschema löslicher Sulfotransferasen und ihres Ko-substrates PAPS am Beispiel der hSULT2B1b und ihrem Substrat Cholesterol.....	2
Abbildung 3-1: Quantifizierung der 1A2*1 Expression in <i>E. coli</i> XL-1	41
Abbildung 3-2: Quantifizierung der 1A2*1 Expression in <i>S. typhimurium</i> TA1538.....	43
Abbildung 3-3: Expression von hSULT1A1*1 in <i>E. coli</i> und <i>S. typhimurium</i>	46
Abbildung 3-4: Strukturformel von Aristolochiasäure I (R = OCH ₃) und II (R=H)	47
Abbildung 3-5: Ames-Test mit <i>S. typhimurium</i> TA1538 Stämmen mit unterschiedlich stark exprimierter 1A1*1	48
Abbildung 3-6: Vektorkarte von pKK-2B1b.	49
Abbildung 3-7: Quantifizierung der 2B1b Expression in <i>E. coli</i> XL-1	51
Abbildung 3-8: Quantifizierung der 2B1b Expression in <i>S. typhimurium</i> TA1538	53
Abbildung 3-9: Quantifizierung der 2B1b Expression in <i>E. coli</i> BL21	57
Abbildung 3-10: Quantifizierung der 2B1b Expression in <i>E. coli</i> BL21 (RIPL)	59
Abbildung 3-11: Quantifizierung der pKK-2B1b Plasmidkopienzahl in <i>E. coli</i>	60
Abbildung 3-12: Quantifizierung der 2B1b mRNA in <i>E. coli</i> mittels real-time PCR	61
Abbildung 3-13: 2B1b cDNA Sequenz mit intracistronischem Startcodon.....	63
Abbildung 3-14: Expression von 2B1b in <i>E. coli</i> XL-1.....	64
Abbildung 3-15: Expression von Luciferase in <i>E. coli</i> XL-1.....	66
Abbildung 3-16: Vektorkarte von pKK-LucPstl-2.....	66
Abbildung 3-17: Quantifizierung der Luciferaseexpression in <i>E. coli</i> XL-1	67
Abbildung 3-18: Quantifizierung der Luciferaseaktivität in <i>E. coli</i> XL-1.....	68
Abbildung 3-19: Quantifizierung der rGSTT2 Expression in <i>E. coli</i> und <i>S. typhimurium</i>	70
Abbildung 3-20: Vektorkarte von pMPSV.....	72
Abbildung 3-21: Quantifizierung der 1A1*1 Expression in V79-Zellen.....	73
Abbildung 3-22: Expression von 2B1b in <i>E. coli</i> XL-1 und <i>S. typhimurium</i> nach Optimierung der DB am 5'-Ende der 2B1b-cDNA.....	78
Abbildung 4-1: Anzahl von CA-Folgen am 5'-Ende der Wildtyp cDNA sowie der cDNA mit seltenen Codons	90

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Gradient für HPLC.....	37
Tabelle 3-1: 5'-cDNA-Sequenzen und Codon Usage der 1A2*1-Konstrukte	40
Tabelle 3-2: Spezifische Mutagenitäten (Revertanten pro nmol Testsubstanz) in den <i>S. typhimurium</i> TA1538 Stämmen mit unterschiedlich stark exprimierter 1A2*1...	45
Tabelle 3-3: 5' cDNA Sequenzen und Codon Usage von 1A1*1 bzw. 1A1*1Y.....	45
Tabelle 3-4: 5'-cDNA Sequenzen und Codon Usage der 2B1b-Konstrukte.....	50
Tabelle 3-5: Im Ames-Test mit TA100-2B1b*1X1 getestete Substanzen	55
Tabelle 3-6: Eingeführte Mutationen der Konstrukte, die zur Überprüfung der Tandem- Translations-Hypothese generiert wurden	63
Tabelle 3-7: 5'-cDNA-Sequenzen und Codon Usage von Luc und Luc*X	68
Tabelle 3-8: 5'-cDNA-Sequenzen und Codon Usage von rGSTT2 bzw. rGSTT2*X8/*X8	69
Tabelle 3-9: 5'-cDNA-Sequenzen und Codon Usage von 1A1*1 und 1A1*1Yeu.....	71
Tabelle 3-10: Sulfonierungsaktivität in cytosolischen Präparationen von 2B1b V79- Zellen	74
Tabelle 3-11: Sulfonierungsaktivität in lebenden 2B1b V79-Zellen.....	74
Tabelle 3-12: Freie Energien von mRNA Sekundärstrukturen und Consensus der DB76	
Tabelle 6-1: Oligonukleotidsequenzen.....	103

6.3 Literaturverzeichnis

- 1 Ames, B.N. et al. (1973) Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70 (8), 2281-2285
- 2 Yamazoe, Y. et al. (1994) Structural similarity and diversity of sulfotransferases. *Chem Biol Interact* 92 (1-3), 107-117
- 3 Robbins, P.W. and Lipmann, F. (1957) Isolation and identification of active sulfate. *J Biol Chem* 229 (2), 837-851
- 4 Klaassen, C.D. and Boles, J.W. (1997) Sulfation and sulfotransferases 5: the importance of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) in the regulation of sulfation. *Faseb J* 11 (6), 404-418
- 5 Banoglu, E. (2000) Current status of the cytosolic sulfotransferases in the metabolic activation of promutagens and procarcinogens. *Curr Drug Metab* 1 (1), 1-30
- 6 Komatsu, K. et al. (1994) A P-loop related motif (GxxGxxK) highly conserved in sulfotransferases is required for binding the activated sulfate donor. *Biochem Biophys Res Commun* 204 (3), 1178-1185
- 7 Blanchard, R.L. et al. (2004) A proposed nomenclature system for the cytosolic sulfotransferase (SULT) superfamily. *Pharmacogenetics* 14 (3), 199-211
- 8 Glatt, H. (2002) Sulphotransferases. In *Handbook of Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics* (Ioannides, C., ed.), pp. 353-439, John Wiley & Sons
- 9 Miller, J.A. (1994) Sulfonation in chemical carcinogenesis--history and present status. *Chem Biol Interact* 92 (1-3), 329-341
- 10 Raftogianis, R.B. et al. (1997) Phenol sulfotransferase pharmacogenetics in humans: association of common SULT1A1 alleles with TS PST phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 239 (1), 298-304
- 11 Ozawa, S. et al. (1998) Genetic polymorphisms in human liver phenol sulfotransferases involved in the bioactivation of N-hydroxy derivatives of carcinogenic arylamines and heterocyclic amines. *Chem Biol Interact* 109 (1-3), 237-248
- 12 Coughtrie, M.W. et al. (1999) Phenol sulphotransferase SULT1A1 polymorphism: molecular diagnosis and allele frequencies in Caucasian and African populations. *Biochem J* 337 (Pt 1), 45-49
- 13 Engelke, C.E. et al. (2000) Association between functional genetic polymorphisms of human sulfotransferases 1A1 and 1A2. *Pharmacogenetics* 10 (2), 163-169
- 14 Teubner, W.P., U. Meinel, W. Coughtrie, M.W.H. Falany, C.N. Kretzschmar, M. Seidel, A. Glatt, H.R. (1998) Characterisation of sulfotransferases in human colon mucosa and their expression in *Salmonella typhimurium* for the study of the activation of promutagens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 357 (R135)
- 15 Glatt, H. et al. (1994) Activation of promutagens by endogenous and heterologous sulfotransferases expressed in continuous cell cultures. *Toxicol Lett* 72 (1-3), 13-21
- 16 Glatt, H. et al. (1995) *Salmonella* strains and mammalian cells genetically engineered for expression of sulfotransferases. *Toxicol Lett* 82-83, 829-834
- 17 Glatt, H. (1997) Sulfation and sulfotransferases 4: bioactivation of mutagens via sulfation. *Faseb J* 11 (5), 314-321
- 18 Glatt, H. et al. (2004) Bioactivation of the heterocyclic aromatic amine 2-amino-3-methyl-9H-pyrido [2,3-b]indole (MeA α C) in recombinant test systems expressing human xenobiotic-metabolizing enzymes. *Carcinogenesis* 25 (5), 801-807
- 19 Glatt, H. et al. (2005) V79-hCYP2E1-hSULT1A1, a cell line for the sensitive detection of genotoxic effects induced by carbohydrate pyrolysis products and other food-borne chemicals. *Mutat Res* 580 (1-2), 41-52

- 20 Ames, B.N. (1973) Carcinogens are mutagens: their detection and classification. *Environ Health Perspect* 6, 115-118
- 21 Meinl, W. et al. (2002) Differential activation of promutagens by alloenzymes of human sulfotransferase 1A2 expressed in *Salmonella typhimurium*. *Pharmacogenetics* 12 (9), 677-689
- 22 Barnes, H.J. et al. (1991) Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (13), 5597-5601
- 23 Kane, J.F. (1995) Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 6 (5), 494-500
- 24 Lakey, D.L. et al. (2000) Enhanced production of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* antigens in *Escherichia coli* by replacement of low-usage codons. *Infect Immun* 68 (1), 233-238
- 25 Fuda, H. et al. (2002) Mutational analysis of human hydroxysteroid sulfotransferase SULT2B1 isoforms reveals that exon 1B of the SULT2B1 gene produces cholesterol sulfotransferase, whereas exon 1A yields pregnenolone sulfotransferase. *J Biol Chem* 277 (39), 36161-36166
- 26 Her, C. et al. (1998) Human hydroxysteroid sulfotransferase SULT2B1: two enzymes encoded by a single chromosome 19 gene. *Genomics* 53 (3), 284-295
- 27 Javitt, N.B. et al. (2001) Cholesterol and hydroxycholesterol sulfotransferases: identification, distinction from dehydroepiandrosterone sulfotransferase, and differential tissue expression. *Endocrinology* 142 (7), 2978-2984
- 28 Geese, W.J. and Raftogianis, R.B. (2001) Biochemical characterization and tissue distribution of human SULT2B1. *Biochem Biophys Res Commun* 288 (1), 280-289
- 29 He, D. et al. (2004) Different subcellular localization of sulphotransferase 2B1b in human placenta and prostate. *Biochem J* 379 (Pt 3), 533-540
- 30 Meloche, C.A. and Falany, C.N. (2001) Expression and characterization of the human 3 beta-hydroxysteroid sulfotransferases (SULT2B1a and SULT2B1b). *J Steroid Biochem Mol Biol* 77 (4-5), 261-269
- 31 Sheehan, D. et al. (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 360 (Pt 1), 1-16
- 32 Meyer, D.J. et al. (1991) Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochem J* 274 (Pt 2), 409-414
- 33 Coggan, M. et al. (2002) Identification and characterization of GSTT3, a third murine Theta class glutathione transferase. *Biochem J* 366 (Pt 1), 323-332
- 34 Hiratsuka, A. et al. (1994) Novel theta class glutathione S-transferases Yrs-Yrs' and Yrs'-Yrs' in rat liver cytosol: their potent activity toward 5-sulfoxymethylchrysene, a reactive metabolite of the carcinogen 5-hydroxymethylchrysene. *Biochem Biophys Res Commun* 202 (1), 278-284
- 35 Ketterer, B. and Christodoulides, L.G. (1994) Enzymology of cytosolic glutathione S-transferases. *Adv Pharmacol* 27, 37-69
- 36 Glatt, H. (1993) HPRT Genmutationstest in V79-Zellen des Chinesischen Hamsters. In *Mutationsforschung und genetische Toxikologie* (Fahrig, R., ed.), pp. 243-262, Wissenschaftliche Buchgesellschaft
- 37 Glatt, H. et al. (1998) Sulfotransferase-mediated activation of mutagens studied using heterologous expression systems. *Chem Biol Interact* 109 (1-3), 195-219
- 38 Turchi, G. et al. (1997) Structure-activity relationship in the induction of chromosomal aberrations and spindle disturbances in Chinese hamster epithelial liver cells by regioisomeric phenanthrene quinones. *Cell Biol Toxicol* 13 (3), 155-165
- 39 Matsuoka, A. et al. (1997) Aneuploidy induction by benzo[a]pyrene and polyploidy induction by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in Chinese hamster cell lines V79-MZ and V79. *Mutagenesis* 12 (5), 365-372

- 40 Speit, G. (1993) Der Schwesterchromatidaustausch als Indikator für genotoxische Effekte. In *Mutationsforschung und genetische Toxikologie* (Fahrig, R., ed.), pp. 263-273, Wissenschaftliche Buchgesellschaft
- 41 Kalweit, S. et al. (1999) Chemically induced micronucleus formation in V79 cells-- comparison of three different test approaches. *Mutat Res* 439 (2), 183-190
- 42 Rossberger, S. and Andrae, U. (1985) DNA repair synthesis induced by N-hydroxyurea, acetohydroxamic acid, and N-hydroxyurethane in primary rat hepatocyte cultures: comparative evaluation using the autoradiographic and the bromodeoxyuridine density-shift method. *Mutat Res* 145 (3), 201-207
- 43 Lutz, W.K. (1986) Quantitative evaluation of DNA binding data for risk estimation and for classification of direct and indirect carcinogens. *J Cancer Res Clin Oncol* 112 (2), 85-91
- 44 Randerath, K. et al. (1981) 32P-labeling test for DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 (10), 6126-6129
- 45 Singh, N.P. et al. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175 (1), 184-191
- 46 Miller, E.C. (1978) Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals: Presidential Address. *Cancer Res* 38 (6), 1479-1496
- 47 McGregor, D.B. et al. (1991) Endogenous xenobiotic enzyme levels in mammalian cells. *Mutat Res* 261 (1), 29-39
- 48 Glatt, H. et al. (1987) Search for cell culture systems with diverse xenobiotic-metabolizing activities and their use in toxicological studies. *Mol Toxicol* 1 (4), 313-334
- 49 Laursen, B.S. et al. (2005) Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 69 (1), 101-123
- 50 Pestova, T.V. and Hellen, C.U. (2000) The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis. *Cell Mol Life Sci* 57 (4), 651-674
- 51 Steitz, T.A. and Moore, P.B. (2003) RNA, the first macromolecular catalyst: the ribosome is a ribozyme. *Trends Biochem Sci* 28 (8), 411-418
- 52 Schneider, T.D. et al. (1986) Information content of binding sites on nucleotide sequences. *J Mol Biol* 188 (3), 415-431
- 53 Steitz, J.A. (1969) Polypeptide chain initiation: nucleotide sequences of the three ribosomal binding sites in bacteriophage R17 RNA. *Nature* 224 (223), 957-964
- 54 Shine, J. and Dalgarno, L. (1974) The 3'-terminal sequence of Escherichia coli 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71 (4), 1342-1346
- 55 McCarthy, J.E. and Brimacombe, R. (1994) Prokaryotic translation: the interactive pathway leading to initiation. *Trends Genet* 10 (11), 402-407
- 56 Boni, I.V. et al. (1991) Ribosome-messenger recognition: mRNA target sites for ribosomal protein S1. *Nucleic Acids Res* 19 (1), 155-162
- 57 Sprengart, M.L. et al. (1990) The initiation of translation in E. coli: apparent base pairing between the 16srRNA and downstream sequences of the mRNA. *Nucleic Acids Res* 18 (7), 1719-1723
- 58 Ramakrishnan, V. (2002) Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* 108, 557-572
- 59 Kozak, M. (2005) Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 361, 13-37
- 60 de Smit, M.H. and van Duin, J. (1990) Secondary structure of the ribosome binding site determines translational efficiency: a quantitative analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (19), 7668-7672
- 61 Cebe, R. and Geiser, M. (2006) Rapid and easy thermodynamic optimization of the 5'-end of mRNA dramatically increases the level of wild type protein expression in Escherichia coli. *Protein Expr Purif* 45 (2), 374-380

- 62 Takyar, S. et al. (2005) mRNA helicase activity of the ribosome. *Cell* 120 (1), 49-58
- 63 de Smit, M.H. and van Duin, J. (1994) Translational initiation on structured messengers. Another role for the Shine-Dalgarno interaction. *J Mol Biol* 235 (1), 173-184
- 64 Hoover, D.S. et al. (1997) Pim-1 protein expression is regulated by its 5'-untranslated region and translation initiation factor eIF-4E. *Cell Growth Differ* 8 (12), 1371-1380
- 65 Nikolcheva, T. et al. (2002) A translational rheostat for RFLAT-1 regulates RANTES expression in T lymphocytes. *J Clin Invest* 110 (1), 119-126
- 66 van der Velden, A.W. et al. (2002) Ribosomal scanning on the highly structured insulin-like growth factor II-leader 1. *Int J Biochem Cell Biol* 34 (3), 286-297
- 67 Chen, H. et al. (1994) The influence of adenine-rich motifs in the 3' portion of the ribosome binding site on human IFN-gamma gene expression in Escherichia coli. *J Mol Biol* 240 (1), 20-27
- 68 Shabalina, S.A. et al. (2004) Comparative analysis of orthologous eukaryotic mRNAs: potential hidden functional signals. *Nucleic Acids Res* 32 (5), 1774-1782
- 69 Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189 (1), 113-130
- 70 Lopez, P.J. et al. (1999) The C-terminal half of RNase E, which organizes the Escherichia coli degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing in vivo. *Mol Microbiol* 33 (1), 188-199
- 71 Yarchuk, O. et al. (1991) The relation between translation and mRNA degradation in the lacZ gene. *Biochimie* 73 (12), 1533-1541
- 72 Yarchuk, O. et al. (1992) Interdependence of translation, transcription and mRNA degradation in the lacZ gene. *J Mol Biol* 226 (3), 581-596
- 73 Nakamura, Y. et al. (2000) Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res* 28 (1), 292
- 74 Grantham, R. et al. (1980) Codon frequencies in 119 individual genes confirm consistent choices of degenerate bases according to genome type. *Nucleic Acids Res* 8 (9), 1893-1912
- 75 Grantham, R. et al. (1980) Codon catalog usage and the genome hypothesis. *Nucleic Acids Res* 8 (1), r49-r62
- 76 Grantham, R. et al. (1981) Codon catalog usage is a genome strategy modulated for gene expressivity. *Nucleic Acids Res* 9 (1), r43-74
- 77 Ikemura, T. and Ozeki, H. (1977) Gross map location of Escherichia coli transfer RNA genes. *J Mol Biol* 117 (2), 419-446
- 78 Chavancy, G. et al. (1979) Adaptation of iso-tRNA concentration to mRNA codon frequency in the eukaryote cell. *Biochimie* 61 (1), 71-78
- 79 Garel, J.P. (1974) Functional adaptation of tRNA population. *J Theor Biol* 43 (1), 211-225
- 80 Garel, J. (1976) Quantitative adaptation of isoacceptor tRNAs to mRNA codons of alanine, glycine and serine. *Nature* 260 (5554), 805-806
- 81 Maenpaa, P.H. and Bernfield, M.R. (1975) Subcellular redistribution of seryl-transfer RNA during estrogen-induced phosphatidyl synthesis and specificity of the estrogen effect. *Biochemistry* 14 (22), 4820-4826
- 82 Chevallier, A. and Garel, J.P. (1982) Differential synthesis rates of tRNA species in the silk gland of Bombyx mori are required to promote tRNA adaptation to silk messages. *Eur J Biochem* 124 (3), 477-482
- 83 Gouy, M. and Gautier, C. (1982) Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. *Nucleic Acids Res* 10 (22), 7055-7074
- 84 Ikemura, T. (1981) Correlation between the abundance of Escherichia coli transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the E. coli translational system. *J Mol Biol* 151 (3), 389-409

- 85 Ikemura, T. (1981) Correlation between the abundance of Escherichia coli transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes. *J Mol Biol* 146 (1), 1-21
- 86 Grosjean, H. and Fiers, W. (1982) Preferential codon usage in prokaryotic genes: the optimal codon-anticodon interaction energy and the selective codon usage in efficiently expressed genes. *Gene* 18 (3), 199-209
- 87 dos Reis, M. et al. (2003) Unexpected correlations between gene expression and codon usage bias from microarray data for the whole Escherichia coli K-12 genome. *Nucleic Acids Res* 31 (23), 6976-6985
- 88 Goetz, R.M. and Fuglsang, A. (2005) Correlation of codon bias measures with mRNA levels: analysis of transcriptome data from Escherichia coli. *Biochem Biophys Res Commun* 327 (1), 4-7
- 89 Bennetzen, J.L. and Hall, B.D. (1982) Codon selection in yeast. *J Biol Chem* 257 (6), 3026-3031
- 90 de Boer, H.A.K., R.A. (1986) Biased Codon Usage: An Exploration of Its Role in Optimization of Translation. In *Maximizing Gene Expression* (Reznikoff, W.G., L., ed.), pp. 225-285, Butterworths
- 91 Elf, J. et al. (2003) Selective charging of tRNA isoacceptors explains patterns of codon usage. *Science* 300 (5626), 1718-1722
- 92 Goldman, E. et al. (1995) Consecutive low-usage leucine codons block translation only when near the 5' end of a message in Escherichia coli. *J Mol Biol* 245 (5), 467-473
- 93 Del Tito, B.J., Jr. et al. (1995) Effects of a minor isoleucyl tRNA on heterologous protein translation in Escherichia coli. *J Bacteriol* 177 (24), 7086-7091
- 94 Chen, G.F. and Inouye, M. (1990) Suppression of the negative effect of minor arginine codons on gene expression; preferential usage of minor codons within the first 25 codons of the Escherichia coli genes. *Nucleic Acids Res* 18 (6), 1465-1473
- 95 Chen, G.T. and Inouye, M. (1994) Role of the AGA/AGG codons, the rarest codons in global gene expression in Escherichia coli. *Genes Dev* 8 (21), 2641-2652
- 96 Dittmar, K.A. et al. (2005) Selective charging of tRNA isoacceptors induced by amino-acid starvation. *EMBO Rep* 6 (2), 151-157
- 97 Laursen, B.S. et al. (2002) Structural requirements of the mRNA for intracistronic translation initiation of the enterobacterial infB gene. *Genes Cells* 7 (9), 901-910
- 98 Sambrook J, F.E., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- 99 de la Hoz, A.B. et al. (2000) Plasmid copy-number control and better-than-random segregation genes of pSM19035 share a common regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2), 728-733
- 100 Glatt, H. and Meinl, W. (2005) Sulfotransferases and acetyltransferases in mutagenicity testing: technical aspects. *Methods Enzymol* 400, 230-249
- 101 Bradley MO, B.B., Francis MC, Langenbach R, Peterson A, Huberman E. (1981) Mutagenesis by chemical agents in V79 chinese hamster cells: a review and analysis of the literature. A report of the Gene-Tox Program. *Mutat Res.* 87 (2), 81-142
- 102 Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85
- 103 Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- 104 Kyhse-Andersen J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10 (3-4), 203-209
- 105 Bullas, L.R. and Ryu, J.I. (1983) Salmonella typhimurium LT2 strains which are r- m+ for all three chromosomally located systems of DNA restriction and modification. *J Bacteriol* 156 (1), 471-474

- 106 Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 113 (3-4), 173-215
- 107 Yerganian, G. (1958) The striped-back or Chinese hamster, *Cricetulus griseus*. *J Natl Cancer Inst* 20 (4), 705-727
- 108 Bradley, M.O. et al. (1981) Mutagenesis by chemical agents in V79 chinese hamster cells: a review and analysis of the literature. A report of the Gene-Tox Program. *Mutat Res* 87 (2), 81-142
- 109 Ford, D.K. and Yerganian, G. (1958) Observations on the chromosomes of Chinese hamster cells in tissue culture. *J Natl Cancer Inst* 21 (2), 393-425
- 110 Glatt, H. (1989) Mutagenicity spectra in Salmonella typhimurium strains of glutathione, L-cysteine and active oxygen species. *Mutagenesis* 4 (3), 221-227
- 111 Falany, C.N. et al. (1994) Steroid sulfation by expressed human cytosolic sulfotransferases. *J Steroid Biochem Mol Biol* 48 (4), 369-375
- 112 Falany, C.N. et al. (1995) Bacterial expression and characterization of a cDNA for human liver estrogen sulfotransferase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 52 (6), 529-539
- 113 Hagen, M. et al. (1998) Expression of human estrogen sulfotransferase in Salmonella typhimurium: differences between hHST and hEST in the enantioselective activation of 1-hydroxyethylpyrene to a mutagen. *Chem Biol Interact* 109 (1-3), 249-253
- 114 Schmeiser, H.H. et al. (1984) Mutagenicity of the two main components of commercially available carcinogenic aristolochic acid in Salmonella typhimurium. *Cancer Lett* 23 (1), 97-101
- 115 Robisch, G. et al. (1982) Aristolochic acid is a direct mutagen in Salmonella typhimurium. *Mutat Res* 105 (4), 201-204
- 116 Bartsch, H. (1981) Metabolic activation of aromatic amines and azo dyes. *IARC Sci Publ* (40), 13-30
- 117 Rosenkranz, H.S. and Mermelstein, R. (1983) Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes. All nitro-containing chemicals were not created equal. *Mutat Res* 114 (3), 217-267
- 118 Mörbt, N. (2005) Steigerung der heterologen Expression in Bakterien durch Austausch synonymer Codons am Beispiel der humanen Sulfotransferase 2B1b. In *Ernährungstoxikologie*, Universität Potsdam
- 119 Surh, Y.J. et al. (1994) 5-Sulfoxymethylfurfural as a possible ultimate mutagenic and carcinogenic metabolite of the Maillard reaction product, 5-hydroxymethylfurfural. *Carcinogenesis* 15 (10), 2375-2377
- 120 Surh, Y.J. and Tannenbaum, S.R. (1994) Activation of the Maillard reaction product 5-(hydroxymethyl)furfural to strong mutagens via allylic sulfonation and chlorination. *Chem Res Toxicol* 7 (3), 313-318
- 121 Meinel, W. et al. (2005) Human sulphotransferases are involved in the activation of aristolochic acids and are expressed in renal target tissue. *Int J Cancer*
- 122 Unger, T. (1997) Show Me The Money: Prokaryotic Expression and Purification Systems. *The Scientist* 11 (17)
- 123 He, D. et al. (2005) Identification and immunohistochemical localization of Sulfotransferase 2B1b (SULT2B1b) in human lung. *Biochim Biophys Acta* 1724 (1-2), 119-126
- 124 Geller, B.L. et al. (2003) Inhibition of gene expression in Escherichia coli by antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers. *Antimicrob Agents Chemother* 47 (10), 3233-3239
- 125 Alipour, B.S. et al. (2004) Molecular cloning, sequence analysis, and expression of a cDNA encoding the luciferase from the glow-worm, *Lampyris turkestanicus*. *Biochem Biophys Res Commun* 325 (1), 215-222
- 126 Artelt, P. et al. (1988) Vectors for efficient expression in mammalian fibroblastoid, myeloid and lymphoid cells via transfection or infection. *Gene* 68 (2), 213-219

- 127 Czich, A. et al. (1994) Stable heterologous expression of hydroxysteroid sulphotransferase in Chinese hamster V79 cells and their use for toxicological investigations. *Chem Biol Interact* 92 (1-3), 119-128
- 128 Forbes, K.J. et al. (1995) Human fetal adrenal hydroxysteroid sulphotransferase: cDNA cloning, stable expression in V79 cells and functional characterisation of the expressed enzyme. *Mol Cell Endocrinol* 112 (1), 53-60
- 129 Makrides, S.C. (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 60 (3), 512-538
- 130 Dong, H. et al. (1996) Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. *J Mol Biol* 260 (5), 649-663
- 131 Rosenberg, A.H. et al. (1993) Effects of consecutive AGG codons on translation in *Escherichia coli*, demonstrated with a versatile codon test system. *J Bacteriol* 175 (3), 716-722
- 132 Griswold, K.E. et al. (2003) Effects of codon usage versus putative 5'-mRNA structure on the expression of *Fusarium solani* cutinase in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Protein Expr Purif* 27 (1), 134-142
- 133 O'Connor, M. et al. (1999) Enhancement of translation by the downstream box does not involve base pairing of mRNA with the penultimate stem sequence of 16S rRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (16), 8973-8978
- 134 O'Connor, M. and Dahlberg, A.E. (2001) Enhancement of translation by the epsilon element is independent of the sequence of the 460 region of 16S rRNA. *Nucleic Acids Res* 29 (7), 1420-1425
- 135 Hartz, D. et al. (1988) Extension inhibition analysis of translation initiation complexes. *Methods Enzymol* 164, 419-425
- 136 Martin-Farmer, J. and Janssen, G.R. (1999) A downstream CA repeat sequence increases translation from leadered and unleadered mRNA in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 31 (4), 1025-1038
- 137 Muto, A. and Osawa, S. (1987) The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1), 166-169
- 138 Glatt, H. (2000) Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chem Biol Interact* 129 (1-2), 141-170
- 139 Glatt, H. and Meinl, W. (2004) Use of genetically manipulated *Salmonella typhimurium* strains to evaluate the role of sulfotransferases and acetyltransferases in nitrofen mutagenicity. *Carcinogenesis* 25 (5), 779-786

6.4 Publikationen

6.4.1 Artikel in Fachzeitschriften

Meinl W, Pabel U, Osterloh-Quiroz M, Hengstler JG, Glatt HR, (2006). Human sulphotransferases are involved in the activation of aristolochic acids and are expressed in renal target tissue. *Int J Cancer*

6.4.2 Tagungsbeiträge

Osterloh-Quiroz M, Meinl W, Glatt HR, (2005). Low-usage codons enhance the expression and allow tandem-translation of human SULT2B1b in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. GBM Herbsttagung, Berlin.

Osterloh-Quiroz M, Meinl W, Glatt HR, (2005). Low-usage codons enhance the expression of human SULT2B1b in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Mosbacher Kolloquium der GBM, Mosbach (Baden).

6.5 Curriculum Vitae

Name: Mandy Osterloh-Quiroz geb. Osterloh
Geburtsdatum: 07.09.1979
Geburtsort: Güstrow

Schulische Ausbildung

1986-1990 Grundschole „Richard-Sorge“, Röbel/Müritz
 1990-1992 Orientierungsstufe
 „Schule am Gotthunskamp“, Röbel/Müritz
 1992-1998 Joliot-Curie-Gymnasium (Abitur), Röbel/Müritz

Universitäre Ausbildung

1998-2003 Universität Potsdam, Studium der Biochemie (Diplom)
 2002-2003 Deutsches Institut für Ernährungsforschung (DIfE)
 Potsdam-Rehbrücke, Abteilung Vitamine und
 Atherosklerose Anfertigung der Diplomarbeit zum Thema
 „Untersuchungen zum Einfluss von Vitamin E auf die
 DNA-Bindung des humanen Pregnan X Rezeptors“
 seit 2003 Deutsches Institut für Ernährungsforschung (DIfE)
 Potsdam-Rehbrücke, Abteilung Ernährungstoxikologie
 Anfertigung der Dissertation

weitere Tätigkeiten

April-Juni 2001 Universität Potsdam Institut für Biochemie und Biologie
 Studentische Hilfskraft
 (Praktikumsbetreuung-Tierphysiologie)
 2001-2002 Deutsches Institut für Ernährungsforschung (DIfE)
 Potsdam-Rehbrücke, Abteilung Vitamine und
 Atherosklerose Studentische Hilfskraft
 Sep.-Nov. 2001 Instituto Nacional de Tecnologia Industrial (INTI)
 Lujan de Cuyo, Mendoza, Argentinien
 Auslandpraktikum (Lebensmittelanalytik)

6.6 Danksagung

Zu allererst bedanke ich mich bei **Herrn Prof. Dr. Hansruedi Glatt** dafür, dass er es mir ermöglicht hat dieses interessante Thema für meine Promotion zu bearbeiten und für seine Unterstützung meiner Weiterbildung zur Fachtoxikologin.

Ein besonders großes Dankeschön geht an **Dr. Walter Meinl** für seine umfassende Betreuung während der letzten 3 Jahre und dafür, dass er sich bis zuletzt bemüht hat den Überblick über meine **142** Klone zu behalten!

Bedanken möchte ich mich auch bei allen anderen (Ex-) Mitarbeitern der Abteilungen AVA, BIM und ETOX für die nette Begleitung während der letzten 3 Jahre.

Nadine, dir danke ich für die moralische Unterstützung und die vielen netten Momente auch außerhalb des Labors.

Meinen **Eltern** und meinem **Mann** danke ich dafür, dass ihr euch immer geduldig alle meine Probleme angehört und meine Erfolge mitgefeiert habt. Und dafür, dass ihr meinen Erklärungen über Codons und Codon Usage ernsthaft zugehört habt!