

**Weiterentwicklung der Intramertechologie zur
Charakterisierung von Cytohesin-2 als neuen Effektor
der MAP-Kaskade in HeLa-Zellen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Mirko G. Theis

aus Wallenborn

Bonn 2004



Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Referent: Prof. Dr. Michael Famulok

2. Referent: Prof. Dr. Waldemar Kolanus

Tag der Promotion:

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1 Einleitung	1
1.1 Proteomics.....	1
1.2 Evolutive Methoden.....	3
1.2.1 Funktionale Peptide und Proteine	3
1.2.2 Funktionale Nukleinsäuren.....	4
1.2.2.1 Aptamere als Effektoren <i>in vivo</i>	6
1.2.2.2 Aptamere in der Analytik und Diagnostik.....	8
1.3 Zellkommunikation und Signaltransduktion	9
1.3.1 Der MAP-Kinase Signalweg	9
1.3.2 Das „ <i>Serum Response Element</i> “ und das Proto-onkogen c-Fos	13
1.4 ARF-GTPasen und die Klasse der kleinen GEF.....	14
1.4.1 ARF-GTPasen	14
1.4.2 Kleine Guaninnukleotid-Austauschfaktoren.....	15
1.5 Zielsetzung	18
Kapitel 2 Ergebnisse	20
2.1 Expression und Reinigung von ARNO und Cytohesin-1	20
2.2 <i>In vitro</i> Selektion	21
2.2.1 Die Bibliothek I-N40.....	21
2.2.2 Das Selektionsschema.....	22
2.2.3 Der Selektionsverlauf	24
2.2.4 Sequenzierung und Poolanalyse	26
2.3 Charakterisierung monoklonaler Aptamere	27
2.3.1 Bindungsstudien durch Oberflächenplasmonresonanz (Biacore).....	27
2.3.2 Bindungsstudien in Lösung	30
2.3.3 Bindungsstudien an Membranen - Aptablots.....	32
2.4 Bindungsmotive und funktionale Studien.....	33
2.4.1 Bestimmung von Minimalmotiven für das Aptamer K61.....	33
2.4.1.1 Rationales Design des Minimalmotivs K61M	33
2.4.1.2 Das Minimalmotiv K61S	34
2.4.2 Das Proteinepitop der Aptamer - ARNO Interaktion.....	36
2.4.2.1 Plasmid-Amplifikation zur Erzeugung von Mutationen.....	36
2.4.2.2 Heterologe Expression und Reinigung von ARNO-Domänen.....	38
2.4.2.3 Filterbindung an ARNO-Domänen	39
2.4.3 Funktionale Studien.....	41

2.4.3.1 Austauschstudien an $\Delta 17\text{ARF1}$	41
2.4.3.2 Rekrutierungsstudien von ARNO an PIP_2 -dotierte Vesikel	43
2.5 Zellkulturstudien in HeLa-Zellen.....	46
2.5.1 Stabilität des Intramers K61 <i>in vivo</i>	46
2.5.2 Expressionsstudien von SRE-regulierten Genen	49
2.5.2.1 Das Intramer K61 und SRE-regulierte Genexpression	49
2.5.2.2 Die Mutante ARNO[E156K] und SRE-regulierte Genexpression.....	51
2.5.3 Aktivitätsassay des MAP-Signalweges	52
2.5.3.1 Das Intramer K61 und die Anti-ARNO siRNA366.....	52
2.5.3.2 Das Intramer M69 und die Anti-Cytohesin-1 siRNA756	55
Kapitel 3 Diskussion	57
3.1 <i>In vitro</i> Selektion	57
3.2 Die Applikation von K61 <i>in vivo</i>	58
3.3 Die biologische Funktion von ARNO in HeLa-Zellen.....	59
3.4 Perspektiven der Aptamer-/Intramertechnologie - Ausblick	64
Kapitel 4 Material	66
4.1 Geräte	66
4.2 Verbrauchsmaterialien	68
4.3 Chemikalien.....	69
4.4 Nukleotide und Radiochemikalien.....	71
4.5 Enzyme und Proteine	72
4.6 DNA- und Protein Längenstandards	72
4.6.1 DNA-Standards	72
4.6.2 Protein Standards.....	73
4.7 Kulturmedien, Lösungen und Puffer	73
4.7.1 Kulturmedien und Lösungen für Zellkulturarbeiten.....	73
4.7.2 Vorratslösungen und Puffer	74
4.8 Kommerzielle Reaktionssysteme	76
4.9 Antikörper	77
4.10 Plasmide	77
4.11 Oligonukleotide.....	78
4.11.1 Primer	78
4.11.2 Aptamere und die Bibliothek I-N40	79
4.11.3 „Short-interfering“ RNA.....	79
4.12 Bakterienstämme.....	79

4.13 Eukaryontische Zelllinien	80
Kapitel 5 Methoden.....	81
5.1 Allgemeine Methoden im Umgang mit Proteinen	81
5.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	81
5.1.2 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	82
5.1.3 Immunologische Detektion von Proteinen (Western-Blot).....	84
5.1.4 „Stripping“ von Nitrozellulosemembranen.....	85
5.1.5 Färbung von Proteingelen.....	86
5.1.5.1 Coomassie-Färbung (Brilliant Blau G 250).....	86
5.1.5.2 Silber-Färbung.....	87
5.1.5.3 Ponceau S Färbung	88
5.1.6 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	88
5.1.6.1 Photometrische Bestimmung nach Warburg und Christian	89
5.1.6.2 Photometrische Bestimmung nach Lambert-Beer.....	89
5.1.6.3 Photometrische Bestimmung nach Bradford.....	90
5.1.6.4 Quantifizierung von Proteinen mit NanoOrange®	90
5.1.7 Dialyse und Gelfiltration zum Pufferwechsel	91
5.1.8 Aptablot-Assay	92
5.1.9 Chromatographische Methoden der Proteinreinigung.....	93
5.1.9.1 Affinitätschromatographie über immobilisierte Metallionen (IMAC)	93
5.1.9.2 Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose.....	94
5.2 Allgemeine Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren.....	95
5.2.1 Phenol/Chloroform Extraktion	95
5.2.2 Ethanol-Präzipitation	96
5.2.3 Photometrische Nukleinsäure-Quantifizierung	96
5.2.4 Agarose-Gelelektrophorese	98
5.2.5 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	98
5.2.6 Isolierung von Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen.....	100
5.2.7 Enzymatische Methoden.....	100
5.2.7.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	100
5.2.7.2 Reverse Transkription.....	101
5.2.7.3 <i>In vitro</i> Transkription.....	103
5.2.7.4 Dephosphorylierung von Nukleinsäure mit CIAP	103
5.2.7.5 Radioaktive 5'-Endmarkierung von Nukleinsäuren.....	104
5.2.8 DNA-Sequenzierung	105

5.3 Damage Selection	106
5.3.1 Partielle alkalische Hydrolyse des RNA-Aptamers K61	107
5.3.2 T1-Ribonuklease Spaltungsreaktion	108
5.4 <i>In vitro</i> Selektion	108
5.4.1 Präparation der Selektionsmatrix	109
5.4.2 Reverse Transkription (RT) und PCR in einem Ansatz	111
5.4.3 Poolklonierung in den Sequenzierungsvektor pGEM-4Z	112
5.5 Klonierungsmethoden	113
5.5.1 Restriktionsverdau von doppelsträngiger DNA	113
5.5.2 Ligation von DNA-Fragmenten	113
5.6 Plasmid-Amplifikation zur Erzeugung von Mutationen	114
5.7 Real-Time PCR	115
5.8 Funktionale Studien der Aptamere	116
5.8.1 GDP/GTP Austauschassay	116
5.8.2 Rekrutierungsassay an PIP ₂ -dotierte Vesikel	117
5.9 Bindungsstudien	118
5.9.1 Filterbindung an Nitrozellulosemembranen	118
5.9.2 Oberflächenplasmonresonanz (BIAcore)	118
5.10 Prokaryontische Zellkultur	119
5.10.1 Allgemeiner Umgang mit prokaryontischer Zellkultur	119
5.10.2 Plattenkultur	119
5.10.3 Flüssigkultur	120
5.10.4 Anlegen von Dauerkulturen	120
5.10.5 Bestimmung der Bakterienkonzentration in Flüssigkulturen	120
5.10.6 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien mittels CaCl ₂	121
5.10.7 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	121
5.10.8 Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i> Bakterien	121
5.10.9 Präparation von heterolog exprimierten Fusionsproteinen	122
5.10.10 Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i> Bakterien	124
5.11 Eukaryontische Zellkultur	124
5.11.1 Allgemeiner Umgang mit eukaryontischer Zellkultur	124
5.11.2 Handhabung von Dauerkulturen	125
5.11.3 Transfektion von Plasmiden, Aptameren und siRNA	125
5.11.4 Isolierung von cytoplasmatischer RNA aus HeLa-Zellen	126
5.12 SRE-Luciferase Assay	127

5.13 p44/42 MAP Kinase Assay	128
Kapitel 6 Zusammenfassung.....	130
Kapitel 7 Literaturverzeichnis	138
Kapitel 8 Anhang	139
8.1 Sequenzdaten ARNO und Cytohesin-1	139
8.1.1 Sequenzvergleich.....	139
8.1.2 ARNO und Domänenkonstrukte im Plasmid pET11d.....	139
8.2 Expressionsvektor pET11d	141
8.2.1 Vektorkarte	141
8.2.2 Multiple cloning site	141
8.2.3 Vektorsequenz.....	141
8.3 Vektor pGEM-4Z.....	143
8.3.1 Vektorkarte	143
8.3.2 Multiple cloning site	144
8.3.3 Vektorsequenz.....	144
8.4 Vektor - pEGFP-N1	145
8.4.1 Vektorkarte	145
8.4.2 Multiple cloning site	145
8.4.3 Vektorsequenz.....	146
8.5 Abkürzungsverzeichnis	146
8.6 Danksagung.....	146
8.7 Lebenslauf	146

Kapitel 1 Einleitung

1.1 Proteomics

Die Rohsequenz des menschlichen Genoms wurde Anfang des Jahres 2001 vorgestellt^[1] und ist zweifellos eine der größten Errungenschaften der modernen Biowissenschaften. Sie ermöglichte erstmals einen Überblick über die etwa 30.000 - 40.000 Gene, die auf den Chromosomen des Menschen kodiert sind. Das Verständnis der komplexen Regulation und des Zusammenspiels der einzelnen Genprodukte kann jedoch anhand der reinen Sequenzinformation nicht abgeleitet werden und stellt sicherlich eine der größten Herausforderungen in den kommenden Jahrzehnten dar.

Das neue, in Anlehnung an den Begriff Genomics als Proteomics^[2] bezeichnete Forschungsfeld, beschäftigt sich mit der Frage, wie komplexe biologische Prozesse auf molekularer Ebene ablaufen, welcher Regulation sie unterliegen und welche Unterschiede es in verschiedenen Zelltypen gibt. Hierfür steht ein Repertoire an Technologien zur Verfügung, die jeweils Teilaspekte der Proteomanalyse abdecken.

So können Informationen über Art und Menge der Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle vorliegen, durch zweidimensionale Gelelektrophorese^[3, 4], Microarrays^[5-7], Massenspektrometrie^[8, 9] oder „SAGE“ (*serial analysis of gene expression*)^[10, 11] gewonnen werden. Dies ermöglicht den Zugang zu einer Fülle an Informationen über den Proteinstatus einer Zelle. Allerdings können hieraus nur wenige Erkenntnisse über die biologische Funktion einzelner Proteine abgeleitet werden.

Aus diesem Grund wurden andere Verfahren entwickelt, die zwar einen weniger globalen Einblick bieten, dafür aber die genaue Analyse einzelner Proteine ermöglichen. Neben den verschiedenen *in vitro*-Techniken wie TAP (*tandem-affinity purification*)^[12, 13], Coimmunpräzipitation^[14, 15] und Immunfluoreszenz-Mikroskopie^[16] sind hierbei vor allem diejenigen Technologien herauszustellen, die eine funktionale Charakterisierung des Proteins im Kontext einer lebenden Zelle ermöglichen. So erlaubt eine kombinatorische Analytik von cDNA-Bibliotheken in einer sog. „*yeast two hybrid*“-Strategie^[17, 18] die Identifizierung von zellulären Interaktionspartnern für Proteine in kurzer Zeit. Die Technik beruht darauf, dass bei der Wechselwirkung des Zielproteins mit dem zellulären Interaktionspartner, der in einer cDNA-Bibliothek

kodiert ist, die Transkriptionsaktivierung eines Reportergenes eintritt. Allerdings sind nicht alle Proteine gleichermaßen zugänglich, beispielsweise können sich posttranslationale Modifikationen nach Synthese im Wirtsorganismus *Saccharomyces cerevisiae* von den physiologischen unterscheiden. Auch Proteininteraktionen die ausschließlich an Membranen stattfinden sind nur schlecht zu detektieren.

Alternative Verfahren umgehen diese Probleme, indem die Funktion eines Proteins direkt im physiologischen Kontext moduliert wird. Beispielsweise ermöglichen genetische Strategien, Proteine zu mutieren oder die Information für ein Genprodukt vollständig zu entfernen. Diese sogenannten „*knock-out*“-Verfahren konnten in jüngerer Zeit entscheidend verbessert werden. Die Entwicklung regulierbarer Systeme, wie etwa dem Tet-Repressorsystem^[19, 20] erlaubt die Modulation von Genen zu klar definierten Zeitpunkten, beispielsweise in verschiedenen Entwicklungs- oder Differenzierungsstadien.

Leider ist die Erzeugung von genetischen Veränderungen speziell in multizellulären Organismen langwierig und schwierig. Neuere Strategien wie *antisense*-RNA^[21, 22] oder siRNA (*short interfering*)^[23, 24] manipulieren daher nicht das Gen, sondern nur das RNA-Transkript, sodass eine Veränderung des Genstatus der Zielzelle vermieden wird. Bei allen Verfahren erfolgt die Einordnung der Proteinfunktion ausschließlich anhand des Phänotyps, der durch die Modulation der entsprechenden Proteinaktivität induziert wird. Problematisch hierbei ist, dass Veränderung der genetischen Information, auf DNA- oder RNA-Ebene, einen schwerwiegenden Eingriff in die Zelle darstellen und sekundäre Effekte verursachen können, die nicht mit der Funktion des Zielproteins in Zusammenhang stehen^[25].

Eine Lösung kann nur in der direkten Inhibition des Zielproteins bestehen. Historisch sind dabei kleine organische Moleküle als Proteineffektoren an erster Stelle zu nennen. Diese können zelluläre Membranen durchdringen und auf diese Weise einfach, auch in multizelluläre Organismen, eingebracht werden^[26]. Solche Effektoren werden entweder durch das „*Screening*“ von großen natürlichen oder synthetischen Substanzbibliotheken oder durch rationales Design erhalten. Leider ist die Identifizierung schwierig und zeitaufwendig, da sich Eigenschaften wie Spezifität, Membrangängigkeit oder Zelltoxizität schlecht vorhersagen lassen^[27, 28]. Obwohl die rasante Entwicklung von Hochdurchsatz-Screeningverfahren eine verbesserte Zugängigkeit bietet, erscheint die

funktionale Charakterisierung des Proteoms durch kleine molekulare Effektoren gegenwärtig kaum möglich.

Aus diesem Grund werden heute verstärkt evolutive Verfahren zur Entwicklung von Inhibitoren eingesetzt. Diese erleichtern den Zugang zu funktionalen Molekülen durch eine Vereinigung der kombinatorischen Synthese von Biopolymeren mit dem Naturprinzip von Mutation und Selektion.

Der Ausgangspunkt jedes evolutiven Verfahrens ist eine hochdiverse kombinatorische Molekülbibliothek. Die einzelnen Spezies dieses Pools werden durch geeignete Selektionskriterien in funktionale und nicht-funktionale Moleküle aufgetrennt, von denen ausschließlich die funktionalen vermehrt und mutiert werden. Diese können nun erneut einer Selektion unterworfen werden. Durch Verschärfung der Selektionskriterien entsteht so aus einem diversen Anfangspool innerhalb weniger iterativer Zyklen ein angereicherter Pool mit den gewünschten Eigenschaften.

Der besondere Vorteil von evolutiven Methoden liegt darin, dass Bibliotheken von bis zu 10^{16} verschiedenen Molekülen durchsucht werden können^[29] und so eine enorme Strukturvielfalt zur Verfügung steht.

1.2 Evolutive Methoden

1.2.1 Funktionale Peptide und Proteine

Grundvoraussetzung jeder evolutiven Methode ist die Amplifizierbarkeit der gewünschten Poolspezies. Dies stellt die erste wichtige Herausforderung bei der Selektion von Peptiden oder Proteinen dar, da diese nicht direkt amplifiziert werden können. Das Problem wird durch eine Verknüpfung jeder einzelnen Polyaminosäure mit der kodierenden Nukleinsäuresequenz gelöst.

Das Prinzip der Verknüpfung von Geno- und Phänotyp wird bei der sog. Display-Technik ausgenutzt, welche erstmals in den frühen neunziger Jahren durch Scott et al.^[30] vorgestellt wurde. Dieser entwickelte ein Verfahren, welches auf der Vermehrung von Bakteriophagen in *Escherichia coli* Bakterien basiert^[31]. Deshalb wird diese Technik als Phagen-Display bezeichnet. Dabei präsentieren die Phagen eine Bibliothek aus verschiedenen Peptiden oder Proteinen auf ihrer Oberfläche. Hierzu wird eine kombinatorische DNA-Bibliothek in den für ein Hüllprotein kodierenden Abschnitt des

Phagengenoms insertiert. Da jeder Phage nur ein Genom enthält, liegt eine eindeutige Verknüpfung von Geno- und Phänotyp vor.

Ein alternativer Ansatz, das sog. Ribosomen-Display^[32-34], erfolgt vollständig *in vitro*. Hierbei wird eine kombinatorische mRNA-Bibliothek durch isolierte Ribosomen in die entsprechende Proteinbibliothek translatiert. Da nach vollständiger Translation keine *Release*-Faktoren an den Komplex aus Ribosom, mRNA und Protein binden, zerfällt dieser nicht. Auf diese Weise bleibt jede mRNA an das dazugehörige Protein gebunden und kann nach der Selektion revers transkribiert und PCR-amplifiziert werden.

Problematisch an den genannten Technologien ist, dass die Proteinbibliothek direkt mit der komplexen Struktur von Phagen bzw. Ribosomen verknüpft werden muss. Dadurch kann die Faltung des gebundenen Proteins derart beeinflusst werden, dass es als freies Protein nicht mehr bindet.

Die mRNA-Display Technik^[35] umgeht dieses Problem, da sie auf der kovalenten Verknüpfung des jeweiligen Proteins oder Peptids mit der kodierenden mRNA basiert. So kann auf große komplexe Strukturen verzichtet werden; das Peptid oder Protein enthält lediglich einen Anteil an kodierender Nukleinsäure. Hierzu werden die Nukleinsäuren einer Bibliothek 3'-terminal mit dem Antibiotikum Puromycin verknüpft. Aufgrund einer strukturellen Ähnlichkeit von Puromycin mit Aminoacyl-tRNA kann es am Ende einer *in vitro* Translation in die A-Bindungsstelle des Ribosoms eintreten. Nun wird durch Transpeptidierung eine kovalente Bindung zwischen der naszierenden Peptidkette und Puromycin hergestellt.

Einschränkungen dieser Verfahren bestehen hauptsächlich in der Limitierung der Anfangsdiversität und dem hohen technischen Aufwand. So können die Vielzahl enzymatischer Schritte des mRNA-Displays oder die Infektiosität des Bakteriophagen im Fall des Phagen-Displays Kriterien sein, welche einen erfolgreichen Ausgang der Selektion verhindern.

1.2.2 Funktionale Nukleinsäuren

Die *in vitro* Selektion von Nukleinsäuren wurde Anfang der neunziger Jahre durch J. W. Szostak^[36] und L. Gold^[37] unabhängig voneinander vorgestellt. Das SELEX-Verfahren (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) ermöglicht es, umfangreiche Oligonukleotid-Bibliotheken mit bis zu 10^{16} verschiedenen Nukleinsäure-

molekülen gezielt auf eine bestimmte Eigenschaft hin anzureichern. Ein großer Vorteil dieser Technologie im Vergleich zur Selektion von Peptiden oder Proteinen [1.2.1] liegt darin, dass Nukleinsäuren mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt werden können, d. h. dass Geno- und Phänotyp in einem Molekül vereint sind.

Daher kann eine kombinatorische DNA- oder RNA-Bibliothek direkt mit dem Zielmolekül inkubiert und diejenigen Moleküle entfernt werden, die nicht mit dem Zielmolekül in Wechselwirkung treten. Nach Amplifikation und erneuter Selektion sind funktionale Nukleinsäuren zugänglich, die als Aptamere (lat.: aptus = passend, gr.: meros = Ort, Stelle) bezeichnet werden.

Aptamere sind in der Lage, ihr Zielmolekül mit hoher Spezifität und Affinität zu binden. So wurde ein Aptamer selektiert, das mit nanomolarer Affinität an PKC- β II bindet, aber keine Wechselwirkung mit der Spleißvariante PKC- β I zeigt, obwohl diese zu 96 % identisch ist^[38]. Auch wurden Aptamere isoliert, die mit hoher Affinität an Theophyllin binden, aber 10.000fach gegenüber Coffein diskriminieren, welches sich lediglich in einer Methylgruppe von Theophyllin unterscheidet^[39].

Zielprotein	K_D [nM]	Applikation	Referenz
IgE	10,0	Allergische Immunreaktion	Wiegand et al. ^[40]
Hepatitis C Virus NS3 Protease	n.b.	Virusinfektion	Nishikawa et al. ^[41]
Cytohesin-1	16,0	Immunantwort	Mayer et al. ^[42]
Prion Protein, PrP ^{Sc}	23,4	BSE	Rhie et al. ^[43]
PDGF (<i>platelet-derived growth factor</i>)	0,1	Tumorentwicklung	Green et al. ^[44]
KGF (<i>keratinocyte growth factor</i>)	0,0003	Hyperproliferation	Pagratis et al. ^[45]
VEGF (<i>vascular endothelial growth factor</i>)	0,14	Angiogenese	Green et al. ^[46]
Tenascin-C	5,0	Tumorentwicklung	Hicke et al. ^[47]
Anti-DNA Autoantikörper	2,0	Lupus Erythematosus	Kim et al. ^[48]
Raf Protein	152,0	Tumorentwicklung	Kimoto et al. ^[49]
HIV-1 RT	1,0	Virusreplikation	Tuerk et al. ^[50]
NFAT (<i>nuclear factor of activated T cells</i>)	30,0	Immunantwort	Bae et al. ^[51]

Tabelle 1.1: Auswahl an Proteinen, für die Nukleinsäure-Binder selektiert werden konnten. Aptamere binden mit hoher Affinität und Spezifität an ihr Zielmolekül. In Kombination mit der vergleichsweise einfachen Zugänglichkeit sind sie ideal zur Aufklärung von Fragestellungen in der Proteomforschung. K_D : Dissoziationskonstante; n.b.: nicht bestimmt

Die molekularen Zielstrukturen eines Aptamers sind breit gefächert. Beispielsweise sind Aptamere evolviert worden, die mit so unterschiedlichen Strukturen wie vollständigen

Rous-Sarcom-Viren^[52], einzelnen Aminosäuren^[53-56], Peptiden oder Proteinen^[57], kleinen organischen Molekülen^[58] oder Cofaktoren^[59-61] spezifisch interagieren.

In Tabelle 1.1 wird eine Auswahl an Zielverbindungen vorgestellt, für die inzwischen Nukleinsäure-Binder erhalten wurden und die für Applikationen in der molekularen Medizin oder Diagnostik von Interesse sein könnten.

1.2.2.1 Aptamere als Effektoren *in vivo*

Aptamere sind in der Lage, die biologische Aktivität ihres Zielmoleküls sowohl *in vitro* als auch *in vivo* spezifisch zu inhibieren.

Dies konnte bereits an einer Vielzahl extrazellulärer Proteine demonstriert werden. So blockiert ein Aptamer für den basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) dessen Wechselwirkung mit Zelloberflächenrezeptoren^[62]. Ein Aptamer, welches an Angiopoietin-2 bindet, ein natürlicher Antagonist der endothelialen Rezeptor-Tyrosinkinase Tie2, inhibiert die Angiogenese im Tiermodell^[63]. Die Aptamerbindung an Autoantikörper von Patienten die an *Myasthenia gravis* leiden blockiert in Zellkultur deren Wechselwirkung mit Acetylcholinrezeptoren^[64]. Auch die Stimulation der Zellproliferation durch PDGF konnte durch ein Aptamer inhibiert werden, welches in Ratten den Verlauf der proliferatorischen Erkrankungen *Glomerulonephritis* und *Arteriosclerose* verbessert^[65, 66].

Da Nukleinsäuren eine geringe Halbwertszeit in Blutseren aufweisen, ist deren Anwendung *in vivo* limitiert. In den oben genannten Beispielen wurde daher die Stabilität des Aptamers gegenüber Nukleasedegradation erhöht. Hierzu können verschiedene Strategien verwendet werden, wobei die chemische Modifikation durch 2'-Amino-, 2'-Fluoro- oder 2'-Methoxygruppen die größte Verbreitung erlangt hat^[45], da diese mit allen enzymatischen Schritten einer *in vitro* Selektion kompatibel^[67, 68] sind. Die Stabilität von Aptameren in Blutseren kann auf diese Weise von wenigen Minuten auf einige Tage gesteigert werden^[57].

Ein weiterer Ansatz beruht auf der sog. Spiegelmer-Technologie. Hierbei wird zunächst gegen das Enantiomer des natürlichen Zielmoleküls (z.B. D-Peptid) selektiert. Nachdem ein Aptamer identifiziert worden ist, wird chemisch das Enantiomer des entsprechenden Aptamers (L-RNA) synthetisiert, welches als Spiegelmer bezeichnet wird. Dieses Spiegelmer bindet an die natürliche Konfiguration des Zielmoleküls

(L-Peptid), kann aber wegen seiner invertierten Stereochemie nicht von Nukleasen degradiert werden^[69].

Aufgrund der großen Erfolge in der Stabilisierung und Selektion von Aptameren wird ihre Verwendbarkeit als Therapeutika getestet. So befindet sich ein Aptamer, das den humanen Wachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*) bindet, bereits in der zweiten Phase der klinischen Studien. Das Aptamer ist durch chemische Modifizierung stabilisiert und blockiert die Wechselwirkung von VEGF mit dem entsprechenden Zelloberflächen-Rezeptor^[70]. VEGF bewirkt u.a. die Angiogenese von neuen Blutgefäßen. Bei Patienten mit diabetischer Retinopathie ist die Bildung neuer Blutgefäße im Auge abnormal erhöht, welches zu Erblindung führen kann. Durch Verabreichung des Aptamers konnte diese Angiogenese stark reduziert werden und führte so zu einer Verbesserung des Sehvermögens bei 87,5 % der Patienten^[71].

Im Gegensatz zur Anwendung als Inhibitor extrazellulärer Strukturen ist die intrazelluläre Verwendung von Aptameren schwierig, da diese die Plasmamembran nicht durchdringen können und daher exprimiert werden müssen. Trotzdem konnte die biologische Funktionalität von Aptameren im Kontext einer lebenden Zelle (sog. Intramer^[72]) bereits verschiedentlich nachgewiesen werden. Beispielsweise wurde ein RNA-Aptamer, das mit hoher Spezifität an das Rev-Protein des HI-Virus (*human immunodeficiency*) bindet, unter der Kontrolle des tRNA(met)- bzw. des U6 snRNA-Promotors in humanen Zellen exprimiert. Dies führte zu einer Inhibition der HIV-1 Replikation^[73]. Dabei sind solche vektorbasierten Systeme besonders effizient, wenn das Zielprotein im Nukleus lokalisiert ist, da cytosolische Proteine nur gebunden werden, wenn das Intramer ein Kernexportsignal enthält^[74, 75].

Eine Weiterentwicklung dieses Konzepts stellt die Herstellung von transgenen Modellorganismen dar, in denen Intramere induzierbar exprimiert werden können. So klonierte Shi et al. ein Intramer gegen den Spleißfaktor B52 in das Polytänchromosom von *Drosophila melanogaster*. Daraus resultierte ein transgener Fliegenstamm, der das Intramer nach Induktion durch Hitzeschock oder Kupferkationen exprimiert. Auf diese Weise wurde bei 50 % der Fliegen eine letale Fehlentwicklung induziert, die auch bei genetischen *knock-out* Phänotypen von B52 zu beobachten war^[76].

Ein weiteres Beispiel für die Expression eines Intramers wurde von Mayer et al.^[42] vorgestellt. Dabei wurde ein Expressionssystem verwendet, welches auf der Infektion

mit Vaccinia Viren beruht. Dies bietet den Vorteil, dass die Transkription des Intramers direkt im Cytoplasma der infizierten Zelle stattfindet und auf Kernexportsignale verzichtet werden kann. Das Intramer, welches gegen die katalytische Domäne des kleinen Austauschfaktors Cytohesin-1 gerichtet war, verursachte in T-Zellen eine Inhibition der Adhäsion an ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*) und eine Reorganisation des Cytoskeletts. Beide Effekte konnten auf eine intrazelluläre Wechselwirkung mit Cytohesin-1 zurückgeführt werden^[42].

Da die Selektion von Aptameren vollständig *in vitro* erfolgt und technisch vergleichsweise einfach aufgebaut ist, kann sie automatisiert erfolgen^[77-79]. Dies erlaubt einen schnellen Zugang zu einer Vielzahl unterschiedlicher Inhibitoren auf Nukleinsäure-Basis. Obwohl speziell im Fall der intrazellulären Applikationen noch Optimierungsbedarf besteht, besitzt diese Technik zweifellos das Potenzial in größerem Umfang Inhibitoren für die Proteomforschung zur Verfügung zu stellen.

1.2.2.2 Aptamere in der Analytik und Diagnostik

Die Möglichkeiten von Aptameren sind mit dem Einsatz als zelluläre Inhibitoren keineswegs erschöpft. Auch in anderen Bereichen wie der Analytik und Diagnostik werden sie erfolgreich eingesetzt. So werden Aptamere u.a. für ELISA-Assays^[80], *in vivo* Imaging^[81, 82], FACS-Analysen^[83, 84] und zur Konstruktion von Biosensoren^[85, 86] verwendet. Herauszustellen ist das von Fredriksson et al.^[87] vorgestellte Nachweisverfahren für den Wachstumsfaktor PDGF. Mit diesem aptamerbasierten System lassen sich Proteinmengen von lediglich $40 \cdot 10^{-21}$ mol zuverlässig detektieren. Eine Nachweisgrenze, die sicherlich durch kein anderes technisch derart einfaches Verfahren erreicht wird.

Ein besonders interessantes Feld ist der Einsatz von Aptameren für die Hochdurchsatzanalyse von Bibliotheken kleiner organischer Moleküle. Beispielsweise konnte Hartig et al.^[88] durch Fusion eines Anti-Rev Aptamers mit dem Hammerhead-Ribozym eine allosterische Regulierbarkeit der Ribozymaktivität durch das Rev-Protein erzeugen. Das System wurde bereits erfolgreich zum Durchsuchen einer Substanzbibliothek eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch Modulation der Ribozymaktivität

über eine Bindung der niedermolekularen Substanz an das Rev-Protein unter Verdrängung des Anti-Rev Aptamers.

Neben diesem Verfahren kann die Aptamerbindung auch direkt detektiert werden. Fang et al.^[89] stellte eine Methode vor, die auf Fluoreszenzpolarisierung basiert. Die Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Anti-PDGF Aptamers ermöglichte den analytischen Nachweis des Zielproteins bis in den subnanomolaren Bereich. Diese Konzepte lassen sich auf nahezu jedes Aptamer übertragen.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die Aptamer-/Intramertechnologie nicht nur einen Zugang zur funktionalen Charakterisierung annähernd jeder Zielstruktur eröffnet, sondern auch ein Ausgangspunkt für die Identifizierung von niedermolekularen Wirkstoffmolekülen sein kann. Da Signaltransduktionsprozesse von zentraler Bedeutung in der Regulation von zellulären Abläufen sind, ist der Einsatz von Aptamertechnologien in diesem Bereich besonders interessant.

1.3 Zellkommunikation und Signaltransduktion

1.3.1 Der MAP-Kinase Signalweg

Der Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) Signalweg koppelt Signale von Zelloberflächenrezeptoren zu Transkriptionsfaktoren und reguliert auf diese Weise die Genexpression. In der Abbildung 1.1 wird eine schematische Übersicht des Erk/MAP-Signalweges dargestellt.

Die Proteine der MAP-Kaskade sind Serin/Threonin Kinasen, welche durch eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli wie Mitogene/Wachstumsfaktoren, Cytokine aber auch Zellstress aktiviert werden können. Diese extrazellulären Signale werden durch Transmembranproteine über die Zellmembran transduziert und so mit der Aktivität intrazellulärer Signalwege gekoppelt. Im folgenden wird dieses Prinzip anhand von zwei Klassen an Membranproteinen erläutert, den Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) und den Integrinen, bei denen die Phosphorylierung von Tyrosinresten eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion spielt:

So führt die Bindung eines Stimulus an RTKs zur Homodimerisierung des Rezeptors und induziert so die Autophosphorylierung von Tyrosinresten. Diese werden von Adapterproteinen wie Shc oder Grb2 gebunden, welche eine SH2-Domäne enthalten.

SH2-Domänen stellen ein weit verbreitetes Modul zur Interaktion von Proteinen mit Phosphotyrosinen dar.

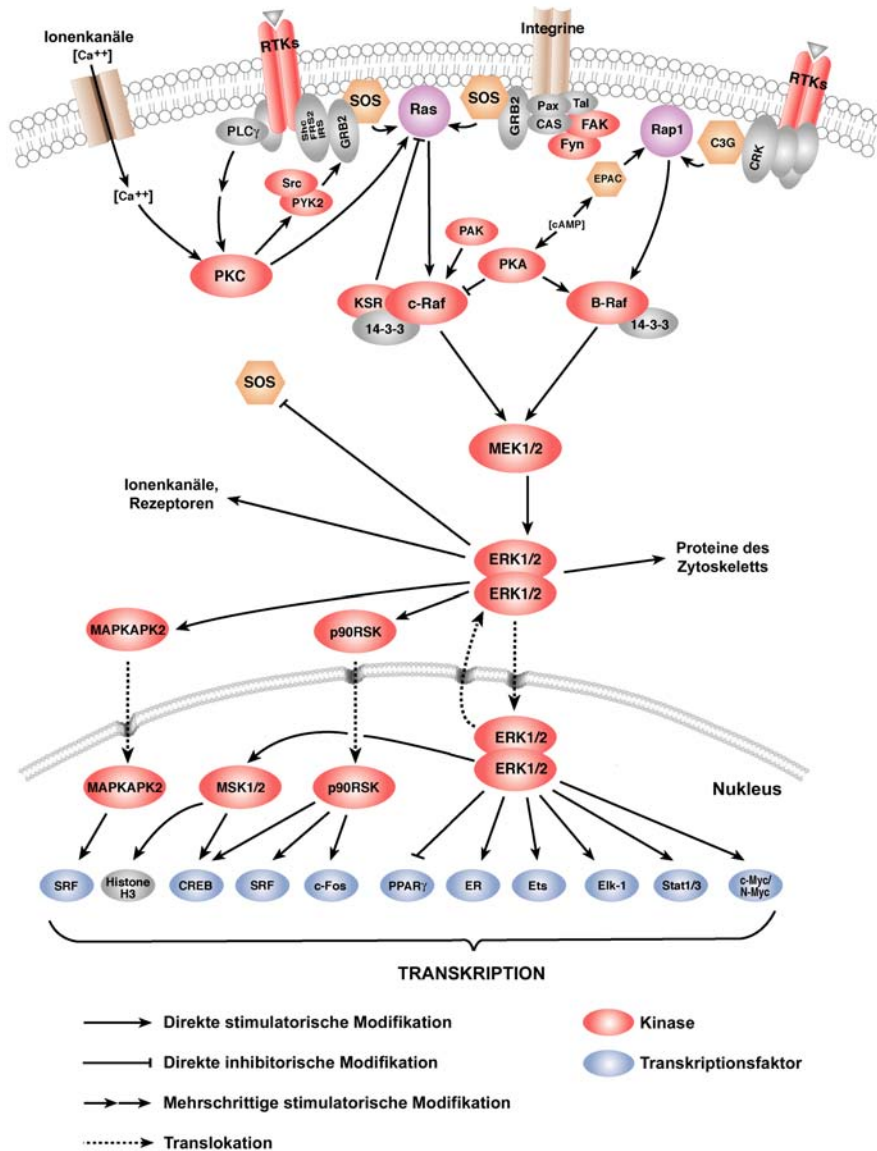


Abb. 1.1: Schema des Mitogen-aktivierten Protein Kinase Signalweges. Der MAP-Signalweg koppelt extrazelluläre Signale mit der Genexpression. So führt eine Aktivierung der Raf-Kinase durch Ras zu einer Kaskade von Phosphorylierungen unterschiedlicher Kinasen. Letztlich erfolgt so die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, welche die Expression verschiedener Gene induzieren. Abk.: Erk: extracellular-signal-regulated kinase; Grb2: growth factor receptor-bound protein; MAPKAPK: MAP-Kinase activating protein kinase; SOS: son-of-sevenless; EGFR: epidermal growth factor receptor; CREB: cyclic AMP-responsive element-binding protein; RSK: ribosomal S6 kinase; MSK: mitogen- and stress-activated protein kinase; SRF: serum response factor; RTK: receptor tyrosine kinase; PLC: phospholipase C; MEK: MAPK/Erk kinase; PKC: protein kinase C; PKA: protein kinase A; Pax: paxillin; Tal: talin; FAK: focal adhesion kinase; KSR: kinase suppressor of Ras; PAK: p21-activated protein kinase; cAMP: cyclic adenosine monophosphate

Integrine vermitteln Zell-Zell oder Zell-Matrixkontakte an sogenannten *focal adhesion points*. Dies sind Multiprotein-Komplexe auf der cytosolischen Seite des Rezeptors, welche mit der intrazellulären Matrix und Actinfilamenten in Kontakt stehen. Die Tyrosinkinase FAK rekrutiert an *focal adhesion points* und durchläuft eine Autophosphorylierung in Abhängigkeit der Integrin-Aktivität. Hierdurch entstehen Phosphotyrosine, die ebenfalls durch Grb2 gebunden werden. An dieser Stelle konvergieren die Signalwege von RTKs und Integrinen. Beide werden nach Aktivierung von Grb2 gebunden^[90].

Einmal rekrutiert, bindet Grb2 das Protein SOS, ein Guaninnukleotid-Austauschfaktor für Ras. Ras ist eine monomere GTPase und wird durch die Assoziation von GTP aktiviert. Ras-GTP bindet die MAP-Kinase Raf und rekrutiert diese so aus dem Cytosol an die Plasmamembran^[91, 92]; eine Voraussetzung für die Aktivierung von Raf durch eine Reihe verschiedener Effektoren. So werden jeweils unterschiedliche Aminosäurereste durch Kinasen wie PAK3, PKC, PKA oder Src phosphoryliert, während andere Phosphatgruppen z. B. durch Protein-Phosphatase 2A (PP2A) entfernt werden^[93, 94]. Dabei kann die Aktivität und Spezifität von Raf durch den Phosphorylierungsstatus präzise moduliert werden.

Allerdings stellt dies nicht die einzige Möglichkeit zur Steuerung der Raf-Aktivität dar. Vielmehr ist Raf ein zentrales Schaltmodul, an dem verschiedene Signale unterschiedlicher Effektoren konvergieren.

Beispielsweise wird Raf durch die Chaperone 14-3-3 und HSP70 oder das „*scaffold*“-Protein KSR (*kinase suppressor of Ras*) gebunden^[95, 96]. KSR bindet ebenfalls an MEK- und Erk-Kinasen. Auf diese Weise werden alle Komponenten des Signalweges in räumliche Nähe gebracht und eine Signalverstärkung hervorgerufen. Dabei ist KSR aber auch durch einen negativen Rückkopplungsloop an der Inaktivierung von Ras beteiligt^[96]. Darüber hinaus sind verschiedene Isoformen von Raf bekannt, die sich in ihrer Spezifität unterscheiden. So führt eine A-Raf Aktivierung zur Stimulation der Proliferation, während hingegen B-Raf Apoptose induziert^[97]. Da diese verschiedenen Isoformen Heterodimere bilden können, werden die Möglichkeiten der Raf-Modulation noch potenziert.

Raf selbst ist eine Kinase und phosphoryliert u. a. MEK-Proteine, die hierdurch aktiviert werden^[98]. MEK-Proteine sind ihrerseits in der Lage die MAP-Kinasen Erk1 und -2 zu

phosphorylieren. Erk als letztes Modul des MAP-Signalweges induziert die Genexpression durch Kinasierung von Transkriptionsfaktoren^[99] wie Elk-1, ein Mitglied der Ets-Familie oder c-Myc, NF- κ B und c-Jun.

Allerdings konnten auch Erk-Substrate identifiziert werden, die keine Transkriptionsfaktoren sind. Die Proteine p90^{RSK} und MAPKAPK-2 (*MAPK-activated protein kinase*) sind ebenfalls Kinasen und werden von Erk aktiviert. Beide sind in der Lage, die Genexpression direkt durch Kinasierung von Transkriptionsfaktoren wie z. B. SRF oder c-Fos zu induzieren. Interessant ist, dass auch SOS durch Erk phosphoryliert werden kann, welches in einem negativen Rückkopplungsloop zu einer Verringerung der Ras-Aktivität führt^[100, 101]. Insgesamt konnten bisher 50 verschiedene Erk-Substrate identifiziert werden.

Der MAP-Signalweg stellt ein zentrales regulatorisches Signaltransduktionsmodul dar, das so unterschiedliche zelluläre Effekte wie Proliferation, Apoptose, Embryogenese oder Differenzierung steuert. Die Komplexität dieser regulatorischen Mechanismen wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher Interaktionen und „*cross-talk*“ mit anderen Signalwegen deutlich:

So überlappt die Aktivierung des MAP-Signalweges durch Wachstumsfaktoren mit der Aktivierung von Rap1 durch die gleichen Stimuli. Für Rap1, dessen Aktivität ebenfalls von der intrazellulären cAMP-Konzentration abhängt, konnten spezifische Interaktionen mit einzelnen Raf-Isoformen nachgewiesen werden^[102]. Eine Abhängigkeit der MAPK-Aktivität von der intrazellulären Konzentration der sekundären Botenstoffe Ca²⁺ und Diacylglycerol (DAG) wurde ebenfalls beobachtet. Beispielsweise ist die Ras-Kinase PYK2 von Calciumkationen abhängig. Der Ras-Austauschfaktor GRP wird durch Calciumkationen und DAG reguliert^[103]. Wichtig ist darüber hinaus, dass auch Mechanismen der Raf-Aktivierung nachgewiesen wurden, die unabhängig von Ras sind. So kann Raf direkt durch Kinasen der PKC-Familie aktiviert werden, welche von Phosphatidylinositolphosphaten abhängig sind^[104].

Die Regulation der Genexpression durch MAP-Kinasen erfolgt nicht ausschließlich durch Transkriptionsfaktoren. Beispielsweise kann auch eine Veränderung der Nukleosomenstruktur induziert werden. Hierzu wird das Histon H3 durch die Erk-regulierten Proteine MSK und p90^{RSK} phosphoryliert^[105]. Des Weiteren konnte erst kürzlich durch Matter et al. gezeigt werden, dass MAP-Kinasen an der Regulation des

RNA-Spleißens beteiligt sind. Die Phosphorylierung des RNA-Bindeproteins Sam68 führt zu einem alternativen Spleiß von verschiedenen Genen^[106].

Aufgrund dieser komplexen Interaktionen verwundert es nicht, dass die MAPK-vermittelte Signaltransduktion in einigen Teilen nur unvollständig verstanden ist und eine weitere Analyse dieses Netzwerkes notwendig macht.

1.3.2 Das „Serum Response Element“ und das Proto-onkogen c-Fos

c-Fos gehört zur Klasse der sog. „*immediate early*“-Gene und heterodimerisiert mit c-Jun, welches zur Bildung des Transkriptionsfaktors AP-1 führt. Dieser ist an der Expression einer Reihe wichtiger Gene beteiligt, wie etwa der Interleukine (IL-2, -3, -4, -5), TNF α und p53. Die Expression von c-Fos wird über den MAP-Signalweg reguliert [1.3.1], wobei c-Fos selbst ein Substrat von MAP-Kinasen ist. So verhindert die Phosphorylierung von c-Fos durch Erk-Kinasen dessen Degradation^[107].

Im regulatorischen Element der Promotorregion des c-Fos Gens finden sich die Bindestellen für sechs verschiedene Transkriptionsfaktoren [Abb. 1.2], u. a. für SRF (*serum response factor*) und TCF (*ternary complex factor*). Diese beiden Regionen werden unter dem Begriff „*serum response element*“ (SRE) zusammengefasst^[108]. Das SRE wurde zuerst von Treisman et al. beschrieben^[109] und besteht aus einer A/T-reichen Kernregion, die von C/G-reichen Regionen flankiert wird, sowie einer stromaufwärts gelegenen AGGA-Sequenz.

Die Sequenz CC[AT]₆GG konnte bisher in der Promotorregion von 30 Genen identifiziert werden. Die Aktivierung der Transkription am SRE erfolgt durch Bindung eines Komplexes, bestehend aus SRF und Proteinen der Klasse der TCFs, wie Elk-1 oder SAP-1. Dabei tritt SRF mit der CC[AT]₆GG-Region in Wechselwirkung, während TCF an die stromaufwärts gelegene AGGA-Sequenz bindet.

Die meisten SRE-regulierten Gene gehören zur Klasse der „*immediate early*“-Gene, wie z.B. junB, egr-1 oder fosB; allerdings finden sich auch neuronale Gene oder Muskelzellgene^[110, 111].

Das SRE wird durch MAP-Kinasen aktiviert; so ist Elk-1 ein Substrat der Erk-Kinasen, während SRF durch die stromabwärts der Erk-Aktivierung gelegenen Kinasen p90^{RSK} und MAPKAPK-2 reguliert wird [1.3.1].



Abb. 1.2: Bindestellen für Transkriptionsfaktoren im regulatorischen Element des c-Fos Gens. Die Zahlen bezeichnen die relative Lage bezogen auf den Transkriptionsstart (+1). Abk.: SIE: sis-inducible element; TCF: ternary complex factor; SRE: serum response element; SRF: serum response factor; AP-1: activator protein-1; CRE: cAMP-response-element-binding protein (CREB) response element; DR: direct repeat

1.4 ARF-GTPasen und die Klasse der kleinen GEF

1.4.1 ARF-GTPasen

ADP-Ribosylierungsfaktoren (ARF) sind monomere GTPasen und gehören zur Ras-Superfamilie. In Säugerzellen konnten sechs verschiedene ARF-GTPasen identifiziert werden. Die Hauptfunktion der ARF-Proteine besteht in der Regulation des Vesikeltransports, allerdings konnte auch eine Beteiligung an der Reorganisation des Actincytoskeletts und Interaktionen mit Enzymen des Phospholipidmetabolismus (PI-Kinasen, PLD) nachgewiesen werden^[112].

Einzelne ARF-Proteine regulieren unterschiedliche Teile des Vesikeltransports. So sind ARF1-3 u.a. im Golgi-Apparat und den Endosomen aktiv und ARF6 an der Plasmamembran. Für ARF4 und -5 ist bisher keine Zuordnung möglich^[113].

Wie alle Ras-GTPasen ist auch ARF ein molekularer Schalter, der entweder in einer inaktiven GDP- oder einer aktiven GTP-gebundenen Form vorliegt. Dabei katalysieren Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF) die Dissoziation von GDP aus dem Komplex mit ARF. Ein GTP tritt daraufhin in die freie Nukleotidbindestelle ein und aktiviert ARF. Der Austausch findet an der Oberfläche von Membranen statt, an die sowohl ARF-GDP als auch der Austauschfaktor rekrutiert werden. Die Rekrutierung von ARF-GDP findet über eine Myristoylgruppe statt, die sich am Ende einer N-terminalen 17 aa α -Helix befindet. Wird ARF-GDP um diese Helix verkürzt ($\Delta 17$ ARF), geht die Fähigkeit zur Membranassoziation vollständig verloren^[114].

Wie durch Amor et al. beschrieben^[115], führt der Guaninnukleotid-Austausch zu einer Exposition verschiedener hydrophober Reste an der Oberfläche von ARF-GTP, welche zusätzlich mit der Membran in Wechselwirkung treten und dadurch die Assoziation verstärken^[116]. Gleichzeitig erfolgt die Bindung von sog. „coat“-Proteinen wie Clathrin

oder COPI. Das Resultat ist ein Ausknospen der Membran und das Abschnüren eines Vesikels. Nachdem sich ein Vesikel aus der Membran gelöst hat, erfolgt die Deaktivierung von ARF-GTP durch Hydrolyse zu GDP, welches anschließend im Komplex mit ARF verbleibt. Hierzu ist die Assoziation von sog. „*GTPase aktivierenden Proteinen*“ (GAP) notwendig, da die intrinsische GTPase-Aktivität von ARF sehr niedrig ist^[117].

ARF-GEF werden abhängig von ihrem Molekulargewicht in die großen und die kleinen GEF unterteilt. Dabei regulieren die großen GEF eher den Vesikeltransport im ER-Golgi System, während die kleinen GEF im Endosomen-Plasmamembran System aktiv sind^[118]. Tabelle 1.2 zeigt eine Übersicht der humanen ARF-GEF und deren intrazellulären Lokalisierung.

Austauschfaktor	Masse [kD]	ARF-Spezifität	Lokalisierung	Referenz
BIG1/2 ^{**}	190/200	ARF1,-3	Golgi	Yamaji et al. ^[119]
GBF1 ^{**}	206	ARF1,-3,-5	Golgi	Claude et al. ^[120]
EFA6 ^{**}	71	ARF6	Plasmamembran	Franco et al. ^[121]
ARF GEP 100 ^{**}	100	ARF6	Zellperipherie	Someya et al. ^[122]
Cytohesin-1 [*]	47	ARF1,-6	Plasmamembran	Kolanus et al. ^[123]
Cytohesin-2 / ARNO [*]	47	ARF1,-6	Plasmamembran	Chardin et al. ^[124]
ARNO3 [*]	47	ARF1,-6	Plasmamembran	Franco et al. ^[125]
Cytohesin-4 [*]	47	ARF1,-6	n.b.	Ogasawara et al. ^[126]

Tabelle 1.2: Übersicht der verschiedenen ARF-GEF in *homo sapiens*. n.b.: nicht bestimmt; (**) großes GEF; (*) kleines GEF

1.4.2 Kleine Guaninnukleotid-Austauschfaktoren

In die Klasse der kleinen GEF werden vier Proteine eingeordnet [Tabelle 1.2], welche große Homologien in der Primärstruktur aufweisen. So sind beispielsweise Cytohesin-1 und -2 zu 87 % in der Aminosäuresequenz identisch (Abb. 1.3). Die Proteine besitzen die gleiche Domänenzusammensetzung und enthalten eine N-terminale Coiled-coil-Domäne, eine zentrale Sec7-Domäne, eine Pleckstrin Homologie (PH)-Domäne und eine C-terminale polybasische C-Domäne^[113]. In der Primärstruktur stechen drei Regionen mit hoher Diversität heraus. Diese Regionen befinden sich an den Termini der Proteine und in der Übergangsregion zwischen der Coiled-coil- und der Sec7-Domäne.

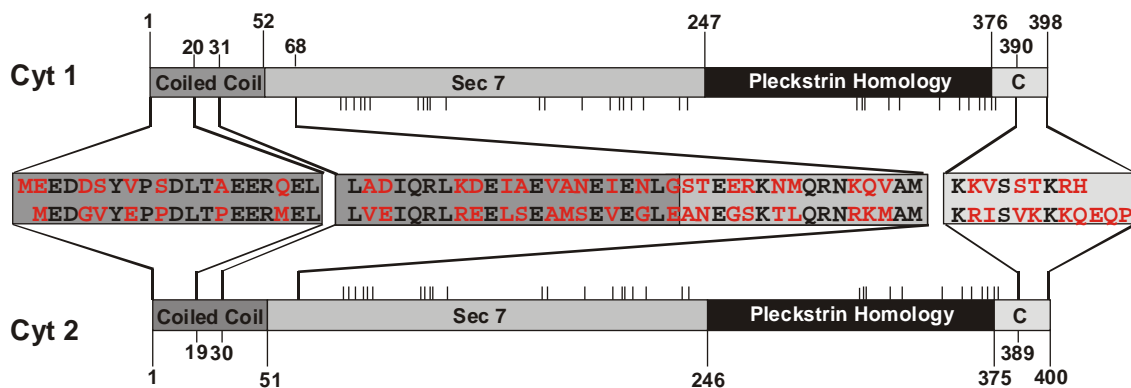


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Domänenzusammensetzung und Sequenzvergleich von Cytohesin-1 und -2. Beide Proteine enthalten eine N-terminale Coiled-coil-Domäne, eine zentrale Sec7-Domäne, eine Pleckstrin Homologie-Domäne und eine C-terminale polybasische C-Domäne. Hervorgehoben sind Regionen großer Diversität, wobei Unterschiede rot markiert sind. Die vertikalen Striche bezeichnen Unterschiede außerhalb dieser Regionen. Die Zahlen stehen für die Aminosäureanzahl beginnend beim N-Terminus. Sequenzinformation: Cyt-1: EBI Datenbank BC050452; Cyt-2: EBI Datenbank U70728

Die Sec7-Domäne ist phylogenetisch stark konserviert und katalysiert die eigentliche Austauschreaktion an ARF-GTPasen^[127]. Die Funktion der übrigen Domänen liegt in der intrazellulären Lokalisierung, der Regulation der Sec7-Aktivität und der Wechselwirkung mit anderen Effektoren. So werden die kleinen GEF über die Assoziation der PH-Domäne an Phosphatidylinositolphosphate (PIP₂/PIP₃) an Membranen rekrutiert, eine Voraussetzung für die Aktivierung von ARF^[113] [1.4.1]. Dabei führen Unterschiede in den PH-Domänen der kleinen GEF zur Modulation der Affinität gegenüber Phosphatidylinositolen unterschiedlichen Phosphorylierungsgrades^[128, 129], welches eine Spezifität für verschiedene ARF-Proteine vermittelt^[130].

Die Affinität der PH-Domäne gegenüber Phosphatidylinositolen kann durch Phosphorylierung der polybasischen C-Domäne beträchtlich erniedrigt werden. Sie findet *in vivo* durch Proteinkinase C statt^[131] und resultiert in einer Relokalisierung des GEFs in das Cytosol und der Modulation der Austauschaktivität.

Interessanterweise wurde der erste kleine Austauschfaktor Cytohesin-1 nicht aufgrund seiner Interaktion mit ARF-Proteinen, sondern durch seine Assoziation an den cytosolischen Teil der β_2 -Kette des Integrins LFA-1 (*leukocyte function-associated antigen*) entdeckt. So konnte Kolanus et al.^[123] zeigen, dass Cytohesin-1 ein positiver Effektor der LFA-1-vermittelten T-Zelladhäsion an ICAM-1 ist. Ein Signaltransduktionsereignis in „*inside-out*“ Richtung, da die extrazelluläre Domäne des

Transmembranproteins LFA-1 durch Assoziation von Cytohesin-1 an den intrazellulären Teil aktiviert wird. Studien mit der Sec7-defizienten Mutante Cytohesin-1 [E156K]^[132] erlaubten einen Einblick in den Mechanismus dieser Signaltransduktion. So führt die Überexpression von Cytohesin-1 [E156K] in Lymphozyten zwar zu einer Aktivierung der extrazellulären Domäne von LFA-1, trotzdem wird die Zelladhäsion inhibiert^[133]. Diese Beobachtung zeigt, dass die Katalyse des Guaninnukleotid-Austausches nicht für die LFA-1 Aktivierung notwendig ist, vermutlich aber die Ausbildung von stabilen Rezeptor/Ligand-Komplexen, etwa durch Änderung der Avidität des Integrins, begünstigt.

Ein weiterer interessanter Aspekt der Wechselwirkung von Cytohesin-1 und LFA-1 wurde von Perez et al.^[134] vorgestellt. So beeinflusst Cytohesin-1 nicht nur die Signaltransduktion in „*inside-out*“, sondern auch in „*outside-in*“-Richtung.

So führt die Wechselwirkung von LFA-1 mit ICAM-2 zu einer Aktivierung von Proteinkinase C. Diese phosphoryliert Cytohesin-1 innerhalb der polybasischen C-Domäne, welches eine notwendige Voraussetzung für die Integrin-vermittelte Stimulation des MAP-Signalweges^[134, 135] darstellt und in der Expressionsregulation von Genen der T-Zellaktivierung und -differenzierung eine wichtige Rolle spielt.

Zusammenfassend kann Cytohesin-1 also als Effektor der Zelladhäsion und der Expressionskontrolle betrachtet werden. Die biologische Funktion dieses kleinen GEF geht also weit über die reine Interaktion mit ARF-GTPasen hinaus. Überraschend erscheint, dass bisher für Cytohesin-2, welches auch als ARNO (*ARF nucleotide binding-site opener*) bezeichnet wird, keine Wechselwirkung mit Integrinen nachgewiesen werden konnte. Die kleinen Austauschfaktoren sind also funktionsdivers. Dies wird durch die Beobachtung unterstrichen, dass die Proteine der GEF-Familie ein zelltypabhängiges Expressionsmuster aufweisen. So ist Cytohesin-1 vornehmlich in Zellen des Immunsystems exprimiert^[126, 136], während ARNO ubiquitär vorliegt^[124].

Aufgrund der Komplexität der biologischen Funktionen von kleinen Austauschfaktoren verwundert es nicht, dass ihre Aktivität durch eine Reihe von Effektoren reguliert wird. Neben der bereits dargestellten Modulation durch Phosphatidylinositole und Proteinkinase C wird vor allem die intrazelluläre Lokalisierung, aber auch die Austauschaktivität selbst, durch Interaktoren der Coiled-coil-Domäne beeinflusst. Die bereits identifizierten Mitglieder dieser erst kürzlich entdeckten Proteinklasse sind in

Tabelle 1.3 zusammenfasst und induzieren eine Reihe unterschiedlicher biologischer Effekte.

Bezeichnung	Masse [kD]	Referenz
GRSP1	112	Klarlund et al. ^[137]
GRASP	42,4	Nevrivy et al. ^[138]
Cybr/CASP/CYTIP	40,0	Tang et al. ^[139] / Mansour et al. ^[140] / Boehm et al. ^[141]
IPCEF1	45,7	Venkateswarlu et al. ^[142]

Tabelle 1.3: Übersicht der Coiled-coil-Domänenbinder verschiedener kleiner GEF.

So führt die Wechselwirkung von IPCEF1 und Cybr mit kleinen GEF, zu einer Verstärkung der Austauschaktivität an ARF6 bzw. ARF1 *in vitro* und *in vivo*^[139, 142]. Auch Effekte wie die Rekrutierung von GEF aus dem Cytosol an die Plasmamembran durch IPCEF1 bzw. GRSP1 wurden nach Stimulation mit EGF bzw. Insulin beschrieben^[137, 142].

Im Gegensatz hierzu wurde durch Boehm et al.^[141] gezeigt, dass eine Bindung von Cytohesin-1 durch CYTIP nach der Stimulation von T-Zellen durch Phorbol ester zu einer Relokalisierung ins Cytosol führt. Erwartungsgemäß wird die Integrin-vermittelte Zelladhäsion an ICAM-1 durch die Überexpression von CYTIP inhibiert, welches CYTIP als negativen Effektor von Integrin-regulierten Signaltransduktionswegen erscheinen lässt.

Da alle Interaktoren der kleinen GEF mehrere Protein-Bindedomänen, wie Coiled-coil-, PDZ- oder FERM-Domänen enthalten, wird eine Funktion als „*scaffold*“-Protein vermutet. Auch könnte diese Proteinklasse durch selektive Bindung einzelner GEF funktionale Unterschiede innerhalb der Familie vermitteln. Trotz dieser Erkenntnisse bleibt das Verständnis der Funktionen von GEF-Interaktoren zum gegenwärtigen Zeitpunkt unvollständig. Auch kann keine eindeutige Abgrenzung der biologischen Funktion der einzelnen kleinen Austauschfaktoren vorgenommen werden.

1.5 Zielsetzung

Die Klasse der kleinen GEF ist an der Regulation einer Reihe wichtiger zellulärer Prozesse, wie der Zellproliferation und -differenzierung [1.3.1], der Integrin-

vermittelten Zelladhäsion [1.4.2] oder dem Vesikeltransport [1.4.1] beteiligt. Die Proteine der GEF-Familie sind in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen exprimiert und phylogenetisch hoch konserviert. Diese Punkte heben ihre Bedeutung in Signaltransduktionsprozessen hervor und machen sie zu einem interessanten Studienobjekt.

Die Möglichkeiten zur Funktionsaufklärung von kleinen Austauschfaktoren sind jedoch limitiert. So bindet der einzige bekannte Inhibitor M69^[42] unspezifisch an alle kleinen GEF, welches eine Zuordnung zellulärer Effekte zu einzelnen Austauschfaktoren unmöglich macht. Der Aspekt gewinnt jedoch zunehmend an Bedeutung, da bereits Unterschiede in der biologischen Funktion einzelner GEF nachgewiesen wurden [1.4.2].

In der vorliegenden Arbeit sollte daher unter Verwendung von *in vitro* Selektion ein spezifisches RNA-Aptamer für Cytohesin-2 gefunden werden, welches gegenüber dem homologen Cytohesin-1 diskriminiert. Ein solches inhibitorisches Aptamer sollte in Hinblick auf seine Bindungseigenschaften und biologischen Effekte charakterisiert werden. Anschließend sollten Strategien zur Verwendung als Intramer [1.2.2] in humanen Zellen erarbeitet werden und eine biologische Funktionscharakterisierung von ARNO unter Abgrenzung der anderen kleinen GEF erfolgen. Des Weiteren sollten die biologischen Effekte des Intramers durch alternative Strategien bestätigt werden, um so die Verwendbarkeit des Aptamer-/Intrameransatzes als Werkzeug zur biologischen Funktionsaufklärung weiter zu untermauern.

Die intrazelluläre Verwendung eines Aptamers ist gegenwärtig an eine Stabilisierung gegen Nukleasedegradation und ein effektives Expressionssystem geknüpft. Ein von Blind et al.^[72] vorgestelltes Expressionssystem basiert auf der Infektion mit Vaccinia Viren, es ist jedoch technisch aufwendig und die Verwendbarkeit limitiert. Alternative Strategien bedienen sich vektorbasierender Expressionssysteme, welche allerdings auf die Anwesenheit von Kernexportsignalen angewiesen sind [1.2.2.1]. Diese wichtigen Einschränkungen sollten überprüft und überwunden werden.

Kapitel 2 Ergebnisse

2.1 Expression und Reinigung von ARNO und Cytohesin-1

Die beiden kleinen Austauschfaktoren ARNO und Cytohesin-1 können durch heterologe Expression in *Escherichia coli* Bakterien erhalten werden^[123, 124]. Daher wurde die cDNA der Austauschfaktoren unter der Kontrolle eines T7-Promotors in die prokaryontischen Expressionsplasmide pET11d für ARNO^[143] und pET11a für Cytohesin-1 inseriert [s. Anhang]. Zusätzlich enthielten beide Plasmide eine Hexahistidin-codierende Sequenz 5'-seitig der cDNA, sodass nach Transformation in *E. coli* BL21 (DE3) Bakterien die Expression von His₆-Fusionsproteinen induziert werden konnte [5.10.8].

Hexahistidinsequenzen binden Metallkationen wie Nickel, Zink und Kupferkationen, was in diesem Fall zur Aufreinigung durch Affinitätschromatographie an *Nitrilotriacetic acid* (NTA)-chelatisierten Ni²⁺-Kationen ausgenutzt wird [5.1.9.1]. Der Reinheitsgrad der Proteine nach diesem ersten Reinigungsschritt wurde durch SDS-PAGE Analysen [5.1.1] auf ca. 70 % bestimmt.

Zur Abtrennung der verbliebenen Kontaminationen wurde zunächst die Ionenstärke in der Probe durch Gelfiltration an Sepharose verringert. Beide Proteine konnten daraufhin durch Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose [5.1.9.2] aufgereinigt werden und eluierten im Natriumchloridgradienten bei einer Konzentration von 190 mM NaCl. Nach diesem zweiten Reinigungsschritt erschien Cytohesin-2 in einer SDS-PAGE Analyse weitgehend homogen (Abb. 2.1A), während Cytohesin-1 mit einer Reinheit von ca. 95 % noch leichte Restkontaminationen mit *E. coli* Proteinen bei 28 kD (Abb. 2.1C) aufwies. Die Konzentration wurde durch die in 5.1.6 beschriebenen Methoden auf 0,1 mg/ml für ARNO und 0,4 mg/ml für Cytohesin-1 bestimmt. Daraus folgt eine Ausbeute an gereinigtem Protein von 0,5 mg ARNO und 1,1 mg Cytohesin-1 pro Liter Kulturvolumen. Die auf diese Weise gereinigten Proteine wurden u. a. in der unter 2.2 beschriebenen *in vitro* Selektion eingesetzt.

Die Identität der Proteine wurde nach der Reinigung durch immunologischen Nachweis im Western Blot [5.1.3] bestätigt. Man erkennt, dass durch den primären Anti-GEF

Antikörper Mab19 sowohl Cytohesin-2 (Abb. 2.1B) als auch Cytohesin-1 (Abb. 2.1D) detektiert werden konnten.

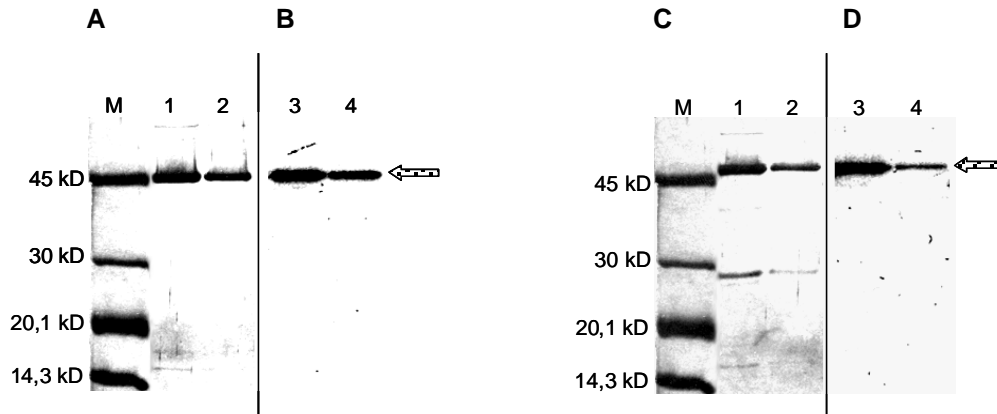


Abb. 2.1: Analyse der kleinen Austauschfaktoren ARNO und Cytohesin-1 nach der Reinigung über Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie. (A) ARNO (gepunkteter Pfeil; 1: 440 ng; 2: 260 ng) erscheint in einer SDS-PAGE Analyse nach Silberfärbung homogen. (C) Cytohesin-1 (schraffierter Pfeil; 1: 300 ng; 2: 150 ng) weist eine Restkontamination mit *E. coli* Protein bei 28 kD auf. Der immunologische Nachweis von (B) ARNO (3: 44 ng; 4: 26 ng) und (D) Cytohesin-1 (3: 30 ng; 4: 15 ng) bestätigt die Identität der gereinigten Proteine. M: Proteinstandard

2.2 In vitro Selektion

2.2.1 Die Bibliothek I-N40

Die synthetische DNA Bibliothek I-N40 (Abb. 2.2) ist Ausgangspunkt der *in vitro* Selektion und besteht aus einer 40 Nukleotide langen randomisierten Region, die von zwei konstanten Regionen flankiert wird^[143].

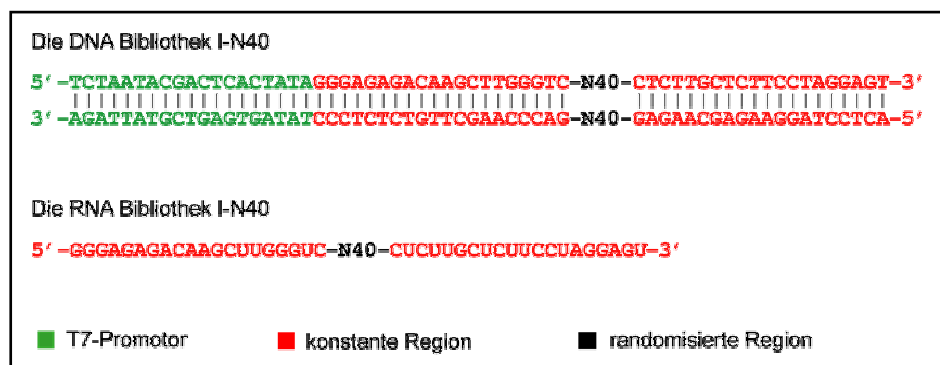


Abb. 2.2: Sequenz und Aufbau der Bibliothek I-N40. Der dsDNA Pool kann unter Ausnutzung des T7-Promotors (grün) mittels *in vitro* Transkription in eine RNA Bibliothek umgeschrieben werden. Diese enthält ebenfalls die randomisierte Region von 40 nt Länge, sowie zwei flankierende konstante Regionen (rot) mit deren Hilfe eine reverse Transkription und PCR-Amplifikation erfolgen kann.

Die entsprechende RNA-Bibliothek wurde durch *in vitro* Transkription [5.2.7.3] unter Ausnutzung der T7-Promotorregion hergestellt und hat eine Länge von 80 Nukleotiden. Die reverse Transkription und Amplifikation [5.4.2] der RNA-Bibliothek am Ende eines Selektionszykluses wurde durch die konstanten Regionen 5'- und 3'-seitig der randomisierten Region sichergestellt.

2.2.2 Das Selektionsschema

Das Ziel der Selektion war die Anreicherung von Aptameren, die Cytohesin-2 unter Diskriminierung des homologen Cytohesin-1 binden. Daher wurde eine Selektionsstrategie verwendet, die zunächst die Anreicherung von GEF-Bindern an Cytohesin-2 begünstigt. Anschließend wurden durch Verwendung einer „counter“-SELEX gegen Cytohesin-1 alle unspezifischen GEF-Aptamere aus dem Pool entfernt.

Hierzu wurden zunächst die Proteine ARNO und Cytohesin-1 kovalent an eine Sepharosematrix gekoppelt. Dadurch können RNA-Spezies, welche mit dem Zielprotein interagieren, durch ein der Affinitätschromatographie verwandtes Verfahren leicht von nicht-bindenden Spezies abgetrennt werden. Daher wurden die Proteine nach der Reinigung [2.1] durch Dialyse in Kopplungspuffer überführt und anschließend mit prähydrolysierter CNBr-aktivierter Sepharose inkubiert [5.4.1]. Die Kopplung erfolgte laut SDS-PAGE Analyse mit einer Effizienz von ca. 95 % über freie Aminogruppen. Zur Absättigung verbliebener CNBr-Gruppen wurde Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan verwendet. Eine Präselektionssäule gegen den Matrixhintergrund wurde durch direkte Kopplung von Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan in Abwesenheit von Proteinen erhalten. Die Selektionsmatrices wiesen einen Derivatisierungsgrad von 0,8 µg Protein pro Mikroliter Säulenmaterial auf.

Das Selektionsschema ist in Abbildung 2.3 dargestellt und geht von der dsDNA Bibliothek I-N40 aus, die zunächst durch Transkription in die entsprechende RNA-Bibliothek umgeschrieben wurde. Nach De- und Renaturierung des Pools wurde dieser mit den unterschiedlichen Selektionsmatrices für 30 min bei 37° C inkubiert und zur Abtrennung aller nichtbindenden Spezies mit Selektionspuffer gewaschen. Anschließend konnten die RNA-Binder mit Elutionspuffer eluiert werden.

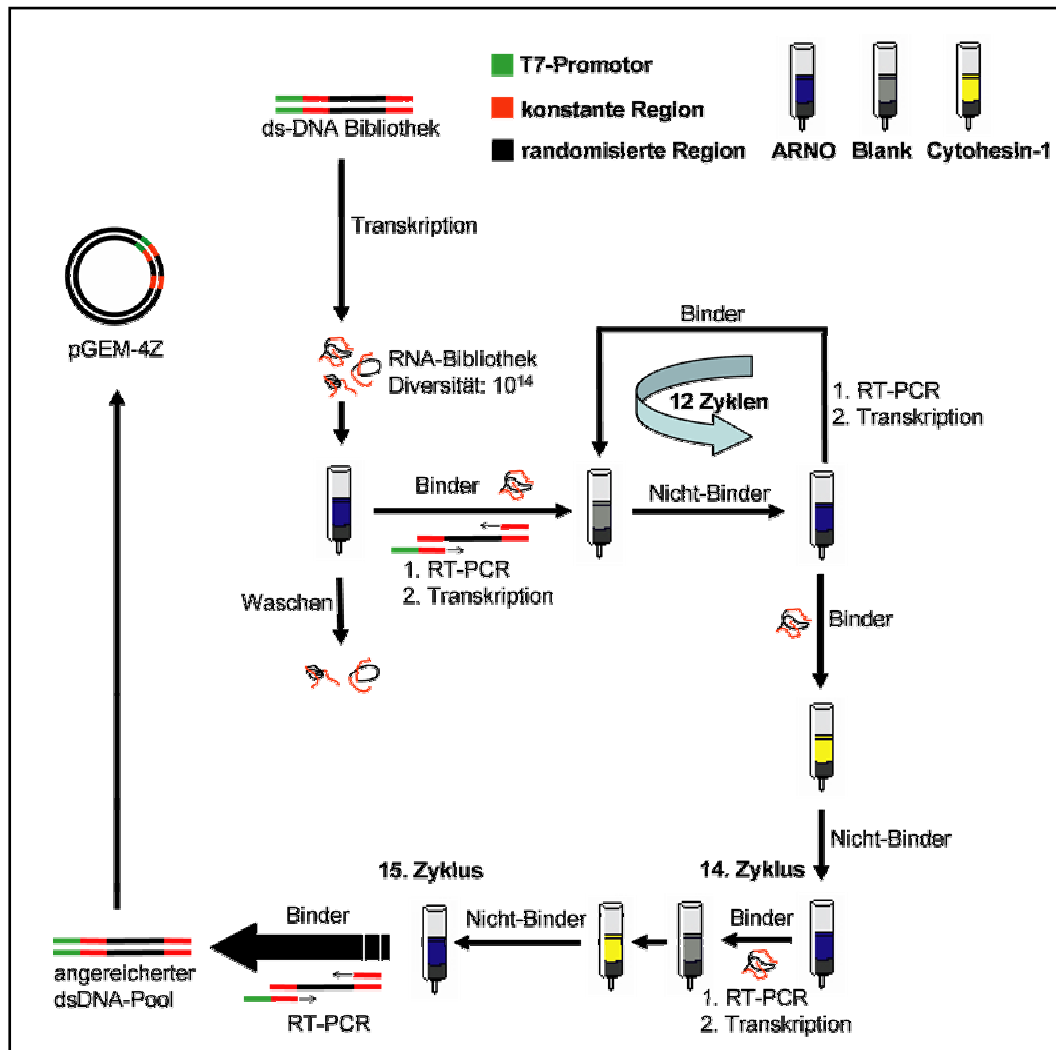


Abb. 2.3: Schema der *in vitro* Selektion von Aptameren an ARNO und „counter“-Selektion gegen Cytohesin-1. Nach Transkription der dsDNA Bibliothek unter Ausnutzung des T7-Promotors (grün) entstand eine RNA Bibliothek von 80 Nukleotiden Länge. Diese wurde mit ARNO-Sepharose inkubiert (blau) und alle Binder anschließend 12 iterativen Zyklen von Präselektion gegen eine underivatisierte Blanksäule (schwarz) und Selektion gegen ARNO-Sepharose (blau) unterzogen. In den Zyklen 14 und 15 wurde zusätzlich eine Präselektion gegen Cytohesin-1-Sepharose (gelb) vorgeschaltet. Die bindenden Spezies des letzten Zyklus wurden in den Sequenzierungsvektor pGEM-4Z kloniert.

Der Elutionspuffer enthielt zu diesem Zweck das Detergenz Natriumdodecylsulfat, welches vorwiegend auf Proteine denaturierend wirkt. Auf diese Weise konnte ein Selektionsdruck gegen Hintergrundbindung ausgeübt werden, bei gleichzeitig hohen Elutionsausbeuten von ca. 99 % [5.4].

Im ersten Zyklus wurde ausschließlich gegen die Zielmatrix selektiert, während in den folgenden 12 Zyklen eine Präselektion gegen underivatisierte Sepharosematrix vorgeschaltet war. In den Zyklen 14 und 15 wurde die Spezifität für Cytohesin-2 durch

„counter“-SELEX gegen Cytohesin-1 eingeführt. Zur Analyse der Poolzusammensetzung und Identifizierung monoklonaler Aptamere wurde nach 15 iterativen Selektionszyklen in den Sequenzierungsvektor pGEM-4Z kloniert [5.5.1-2]

2.2.3 Der Selektionsverlauf

Nach Transkription der DNA Bibliothek I-N40 wurden 10 nmol der entsprechenden RNA Bibliothek in den ersten Selektionszyklus eingesetzt. Dies entspricht einer Startdiversität von 10^{14} verschiedenen Molekülen. Wie in Tabelle 2.1 zusammengefasst, wurde der Selektionsdruck in den ersten 13 Zyklen bis zu einer Anreicherung von ARNO-Bindern durch Vergrößerung der Waschvolumina und Verkleinerung des Verhältnisses von Protein zu RNA stetig erhöht.

#	Menge RNA [pmol]	Matrix Präselekt.	Matrix Selekt.	Verhältnis Prot:RNA	Waschvol. Präselekt.	Waschvol. Selektion	PCR-Zyk. berech./beob.	Transk.-Ausb. [nmol]	Kompetitor
1	10000	---	200 µl	1 : 3	---	2000 µl	4 / 5	---	---
2	500	200 µl BL	100 µl	3,4 : 1	1000 µl	1600 µl	7 / 7	3,9	---
3	250	50 µl BL	25 µl	1,7 : 1	2000 µl	2000 µl	8 / 8	3,8	2,6 µM tRNA
4	250	50 µl BL	15 µl	1 : 1	2000 µl	10000 µl	9 / 9	7,1	5 µM tRNA
5	250	50 µl BL	15 µl	1 : 1	2000 µl	10000 µl	8 / 8	6,1	2,5 µg/µl Hep.
6	250	50 µl BL	15 µl	1 : 1	2000 µl	10000 µl	9 / 9	6,8	2,5 µg/µl Hep.
7	250	50 µl BL	15 µl	1 : 1	2000 µl	10000 µl	8 / 8	6,4	2,5 µg/µl Hep.
8	250	50 µl BL	15 µl	1 : 1	2000 µl	10000 µl	8 / 8	6,3	2,5 µg/µl Hep.
9	250	50 µl BL	15 µl	1 : 1	2000 µl	10000 µl	8 / 8	6,2	2,5 µg/µl Hep.
10	250	50 µl BL	15 µl	1 : 1	2000 µl	10 ml + 10 ml -	9 / 9	7,0	2,5 µg/µl Hep.
11	250	50 µl BL	15 µl	1 : 1	2000 µl	10 ml + 10 ml -	8 / 8	5,3	2,5 µg/µl Hep.
12	250	50 µl BL	15 µl	1 : 1	2000 µl	10 ml + 10 ml -	8 / 8	5,9	2,5 µg/µl Hep.
13	250	50 µl BL	15 µl	1 : 1	2000 µl	10 ml + 10 ml -	8 / 8	7,0	2,5 µg/µl Hep.
14	250	50 µl Cyt1	15 µl	1 : 1	2000 µl	10 ml + 10 ml -	7 / 7	7,6	2,5 µg/µl Hep.
15	250	50 µl BL 50 µl Cyt1	15 µl	1 : 1	2000 µl	16 ml + 16 ml -	8 / 8	6,4	2,5 µg/µl Hep.

Tabelle 2.1: Selektionsbedingungen der Anti-ARNO Selektion. BL: underivatisierte Sepharosematrix, Cyt1: Sepharosematrix mit immobilisiertem Cytohesin-1; (+): 600 mM NaCl in Selektionspuffer; (-): kein zusätzliches NaCl in Selektionspuffer; Hep.: Heparin; Präselekt.: Präselektion; Selekt.: Selektion; Prot.: Protein; Transk.-Ausb.: Transkriptionsausbeute; PCR-Zyk.: PCR-Zyklen; Waschvol.: Waschvolumen

Weiterhin wurden ab dem 2. Zyklus tRNA und Heparin als unspezifische Kompetitoren zugesetzt. Um nichtionische-Wechselwirkungen zu begünstigen, wurde ab dem 10. Zyklus zusätzlich mit 600 mM Natriumchlorid in Selektionspuffer gewaschen.

Die verwendeten Selektionskriterien führten innerhalb der ersten 13 Zyklen zu einer Anreicherung von 2,63 % an der Zielmatrix (Abb. 2.4A), bei gleichzeitig geringer Hintergrundbindung an underivatisierter Sepharose. Durch „counter“-Selektion gegen Cytohesin-1 in den Zyklen 14 und 15 konnten unspezifische GEF-Aptamere aus dem Pool entfernt werden, welches durch die Abnahme der Bindung an die Cytohesin-1 Matrix deutlich wurde (Abb. 2.4A).

Diese Beobachtung wurde durch Filterbindungsexperimente [5.9.1] mit Pool-15 RNA an Cytohesin-1 und -2 bestätigt (Abb. 2.4B). Hieraus ergab sich eine Dissoziationskonstante K_D von $154 \pm 5,8$ nM an ARNO und mehr als 1800 nM an Cytohesin-1, welches einem Spezifitätsfaktor von > 12 entspricht. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde die Selektion nach 15 Selektionszyklen beendet. Zur Identifizierung von monoklonalen Aptamersequenzen wurde der Pool-15 in den Sequenzierungsvektor pGEM-4Z kloniert und sequenziert. [5.5.1-2; 5.10.7].

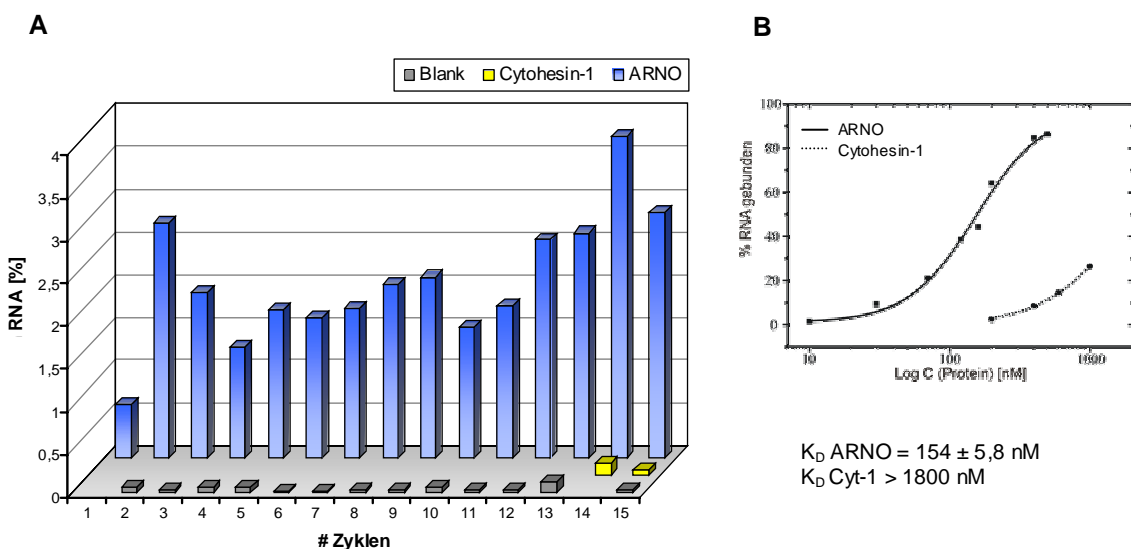


Abb. 2.4: Selektionsverlauf über 15 Selektionszyklen und Filterbindung der Pool-15 RNA. (A) Anreicherung von spezifischen Anti-ARNO Aptameren über 15 iterative Selektionszyklen lässt sich an der Zunahme immobilisierter RNA auf der Zielmatrix (blau) bei gleichzeitig geringer Wechselwirkung mit der Blank-Säule (grau) erkennen. Die Spezifität für ARNO wird in den Zyklen 14 und 15 durch Präselektion gegen eine Cytohesin-1 Sepharose (gelb) eingeführt. (B) Bindungskurven von Pool-15 RNA an ARNO (—) und Cytohesin-1 (·····) zeigen eine Spezifität des Pools für ARNO auf.

2.2.4 Sequenzierung und Poolanalyse

Die Pool-15 RNA wurde nach reverser Transkription und Amplifikation unter Verwendung der Primer P-SEQ I und II [5.4.3] mittels der 5'- und 3'-terminalen Restriktionsschnittstellen BamH I und EcoR I in den Sequenzierungsvektor pGEM-4Z kloniert und anschließend in *E. coli* Bakterien transformiert. Um monoklonale Aptamersequenzen zu erhalten, wurden die Bakterien vereinzelt und insgesamt 62 Monoklonen sequenziert. Diese enthielten lediglich 19 verschiedene Aptamersequenzen, was zeigt, dass eine Anreicherung des Pools unter den gewählten Selektionskriterien erfolgt war. Die Verteilung der monoklonalen Aptamere ist in Abbildung 2.5 dargestellt. Die größte Häufigkeit weist der Klon 61 mit insgesamt 14 Sequenzen auf, welches einem Anteil von 23 % aller Spezies im Pool entspricht. Neben diesem häufigsten Klon in der Verteilung sind weiterhin die Klone 32 und 50 hervorzuheben, die jeweils einen Anteil von 13 % und 11 % aufweisen. Alle weiteren Sequenzen kamen wesentlich seltener vor und nehmen daher eine untergeordnete Rolle in der Poolzusammensetzung ein.

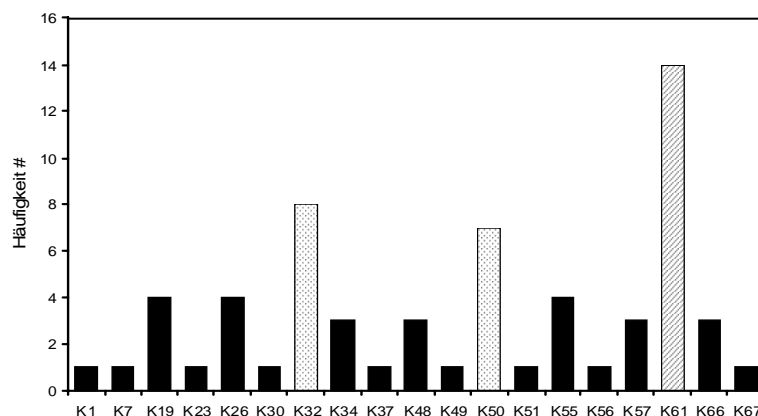


Abb. 2.5: Verteilung der monoklonalen Aptamere nach 15 Selektionszyklen. Das Aptamer K61 (schraffiert) hatte mit 14 Sequenzen den größten Anteil am Pool, die Aptamere K32 und K50 (gepunktet) stechen ebenfalls mit jeweils 8 bzw. 7 Monoklonen heraus. Alle weiteren Klone kamen wesentlich seltener in der gewählten Stichprobe von insgesamt 62 Klonen vor, sie nehmen nur eine untergeordnete Rolle in der Poolzusammensetzung ein.

Eine Analyse der 19 unterschiedlichen Monoklonen mit Hilfe des Programms ClustalW ([<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>]) zeigte, dass eine Zuordnung zu 13 verschiedenen Familien möglich ist (Abb. 2.6, Klammern). Diese Familien teilen kein weiteres Consensus-Motiv mehr.

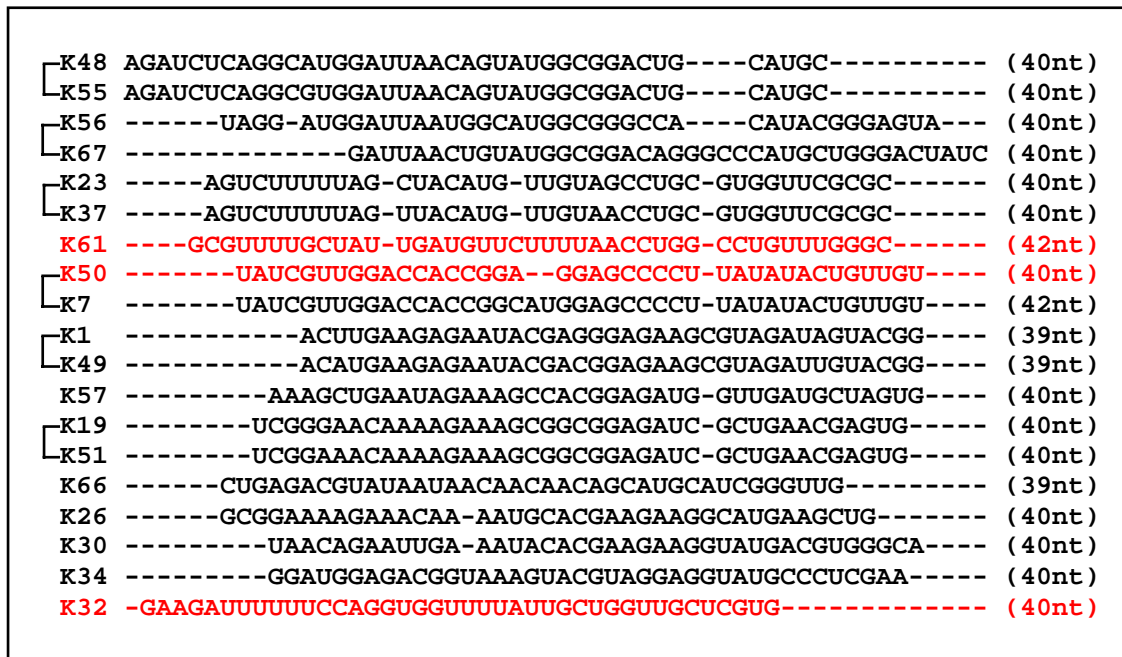


Abb. 2.6: Sequenzvergleich der randomisierten Region der monoklonalen Aptamere durch das Programm ClustalW. Die in rot dargestellten Sequenzen weisen die größte Häufigkeit im selektierten Pool auf. Die schwarzen Linien verbinden Monoklonen mit ausgeprägter Homologie. Die in Klammern dargestellte Basenzahl lässt bei gewissen Sequenzen die Anwesenheit von Deletions- und Insertionsmutationen erkennen, sodass von der ursprünglichen Länge von 40 Basen abgewichen wird.

Ein Vergleich der verschiedenen Sekundärstrukturen mit Hilfe des Programms mfold 3.1 [<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna>] ergab ebenfalls keine Ähnlichkeiten auf Ebene der Sekundärstruktur. Interessant erscheint die Tatsache, dass einige Aptamere in der Länge des randomisierten Bereichs um 1-2 Basen von der ursprünglichen Länge von 40 Nukleotiden abweichen, welches ebenfalls für den prominentesten Klon der Verteilung K61 zutrifft.

2.3 Charakterisierung monoklonaler Aptamere

2.3.1 Bindungsstudien durch Oberflächenplasmonresonanz (Biacore)

Die Bindungscharakterisierung der einzelnen monoklonalen Aptamere erfolgte u. a. durch Oberflächenplasmonresonanz. Bei diesem Verfahren wird die Veränderung der Masse eines Goldchips optisch durch die Verschiebung des Reflektionsmaximums bei einer bestimmten Wellenlänge ermittelt. Dafür muss einer der Bindungspartner in seiner aktiven Konformation stabil auf der Chipoberfläche immobilisiert werden.

Hierzu wurden die beiden Proteine Cytohesin-1 und -2 jeweils mittels der EDC/NHS Kopplungschemie kovalent auf der Oberfläche eines CM5-Chips (Biacore) aufgebracht [5.9.2]. Bei diesem Verfahren erfolgt die Kopplungsreaktion zwischen aktivierten Carboxylsäurefunktionen der Dextranoberfläche und primären Aminofunktionen des zu koppelnden Proteins unter Ausbildung von Amidbindungen. Die verbliebenen aktiven Säurefunktionen auf der Oberfläche wurden mit Ethanolamin blockiert.

Auf diese Weise konnten je nach Anwendung zwischen 4000 und 10000 „*Response units*“ (RU) stabil auf der Chipoberfläche immobilisiert werden. Die Herstellung einer Kontrolloberfläche erfolgte durch Absättigung mit Ethanolamin in Abwesenheit von Proteinen. Alle Signale der Messoberfläche wurden auf diese Kontrolle normiert. Die erfolgreiche Kopplung und sterische Zugängigkeit der Proteine konnte durch den Antikörper Mab19 bestätigt werden [4.9], der sowohl ARNO als auch Cytohesin-1 bindet. Die Injektion dieses Antikörpers auf die mit Protein belegten Oberflächen führte zu einer Bindungsantwort von 600-800 RU.

Die Bestimmung der Bindungskonstanten erfolgte durch Injektion steigender Konzentrationen (10-1000 nM) an monoklonalem Aptamer auf die derivatisierten Oberflächen. Wie in Abbildung 2.7A (a-e) exemplarisch für das Aptamer K61 dargestellt, konnte eine konzentrationsabhängige Bindung an Cytohesin-2 beobachtet werden. Entsprechend wurde anhand der Biacore-Evaluierungssoftware jeder Aptamerkonzentration eine Bindungsantwort im Gleichgewicht zugeordnet, woraus die in Abbildung 2.7B gezeigte Bindungskurve resultierte. Die Dissoziationskonstante K_D ergab sich dann aus der Konzentration des Aptamers bei halbmaximaler Sättigung.

Als Kontrolle wurde der RNA-Startpool I-N40 verwendet, der bis zu einer Konzentration von 1000 nM keine Wechselwirkung mit den immobilisierten Proteinen zeigte (Abb. 2.7A f). Die hohe Spezifität der Aptamere für ARNO zeigte sich darin, dass bis zu einer Konzentration von 1000 nM keine Bindung an die Cytohesin-1 Oberfläche detektiert werden konnte (Abb. 2.7A g).

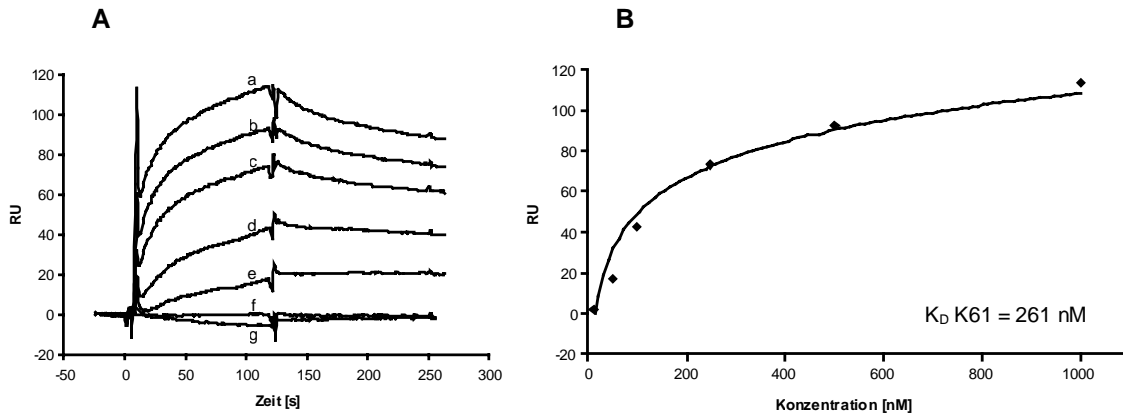


Abb. 2.7: (A) Bindungskurven des Aptamers K61. K61-RNA wurden mit steigenden Konzentrationen (a: 1000 nM; b: 500 nM; c: 250 nM; d: 100 nM; e: 50 nM) auf eine mit ARNO derivatisierte Oberfläche injiziert. (B) Die Bindungsantwort im Gleichgewicht wurde gegen die Aptamerkonzentration aufgetragen. Die Konzentration bei halbmaximaler Sättigung entspricht der Dissoziationskonstante (K_D) dieser Wechselwirkung. Die Bindung des Aptamers ist hochspezifisch, da keine Wechselwirkung mit einer Cytohesin-1 Oberfläche detektiert werden konnte (g). Der Startpool (1000 nM) zeigt ebenfalls kein Bindungssignal an ARNO (f).

Die Dissoziationskonstanten (K_D) für alle in 2.2.4 erhaltenen monoklonalen Aptamere sind in Tabelle 2.2 dargestellt. Hiernach zeigt der Klon 1 die stärkste Bindung an Cytohesin-2 mit einer Dissoziationskonstante von 49 nM, aber auch die Aptamere K7, K49, K50 und K61 weisen Bindungskonstanten im nanomolaren Bereich auf. Im Gegensatz hierzu binden die Aptamere K34, K48, K55, K56 und K67 erst im mikromolaren Bereich, während der Klon 19 keine detektierbare Wechselwirkung mit der ARNO-Oberfläche zeigte.

Aptamer	K1	K7	K19	K23	K26	K30	K32	K34	K37	K48
K_D [nM] ARNO	49	152	n. d.	332	310	332	320	3650	191	5040
Aptamer	K49	K50	K51	K55	K56	K57	K61	K66	K67	Pool
K_D [nM] ARNO	151	218	269	5880	3380	177	261	251	1820	n. d.

Tabelle 2.2: Dissoziationskonstanten (K_D) der monoklonalen Aptamere an ARNO. Die in rot dargestellten Klone weisen die größte Häufigkeit im Pool auf. n.d.: nicht detektierbar

2.3.2 Bindungsstudien in Lösung

Die hochspezifische Bindung der monoklonalen Aptamere an das Zielprotein Cytohesin-2 unter Diskriminierung des homologen Cytohesin-1 wurde durch Oberflächenplasmonresonanz-Experimente gezeigt [2.3.1]. Da bei diesen Experimenten jedoch einer der Bindungspartner stets auf einer Oberfläche immobilisiert vorliegt, wurden zusätzlich Filterbindungsstudien durchgeführt, um die Interaktion der Bindungspartner in Lösung zu untersuchen. Hierzu und für alle weiteren Studien wurden die Aptamere K1, K32, K37, K50, K57, K61, K66 ausgewählt, da diese bereits in Biacore-Studien gute Bindungseigenschaften gezeigt hatten und unterschiedlichen Familien zuzuordnen waren [2.2.4].

Zur Durchführung der Filterbindung wurden steigende Konzentrationen der Proteine ARNO (1 - 400 nM) und Cytohesin-1 (200 - 3500 nM) jeweils mit 1 nM radioaktiv markiertem Aptamer in Selektionspuffer inkubiert [5.9.1]. Anschließend wurde die freie RNA durch Filtration über Nitrozellulose von proteingebundener RNA getrennt. Die Quantifizierung erfolgte über Autoradiographie an einem PhosphorImager. Zusätzlich wurde 1 nM ungefilterte RNA als Kontrolle auf dem Filter aufgetragen und so der prozentuale Anteil an gebundener RNA berechnet. Als Kontrolle diente die unselektierte Bibliothek I-N40, die bis zu einer Proteinkonzentration von 3500 nM keine Bindung zeigte. Die Dissoziationskonstanten wurden mittels des Programms Origin[®] 6.1 (OriginLab Corporation) ermittelt und entsprechen der Proteinkonzentration bei halbmaximaler Sättigung [5.9.1]. Exemplarische Bindungskurven für die Aptamere K61 und K66 sind in Abbildung 2.8 dargestellt; man erkennt die Bindungsdiskriminierung zwischen ARNO und Cytohesin-1, wobei das Aptamer K66 den kleinsten Spezifitätsfaktor und das Aptamer K61 den größten aufweist.

Wie in Tabelle 2.3 zusammengefasst, weisen alle untersuchten Aptamere Dissoziationskonstanten (K_D) von ca. 100 nM am Zielprotein ARNO auf. Deutliche Unterschiede ergeben sich jedoch bezüglich der Diskriminierung von Cytohesin-1. So bindet die monoklonale Sequenz K1 mit einem K_D -Wert von 725 nM an Cytohesin-1, während das Aptamer K61 erst im mikromolaren Bereich Interaktionen zeigt.

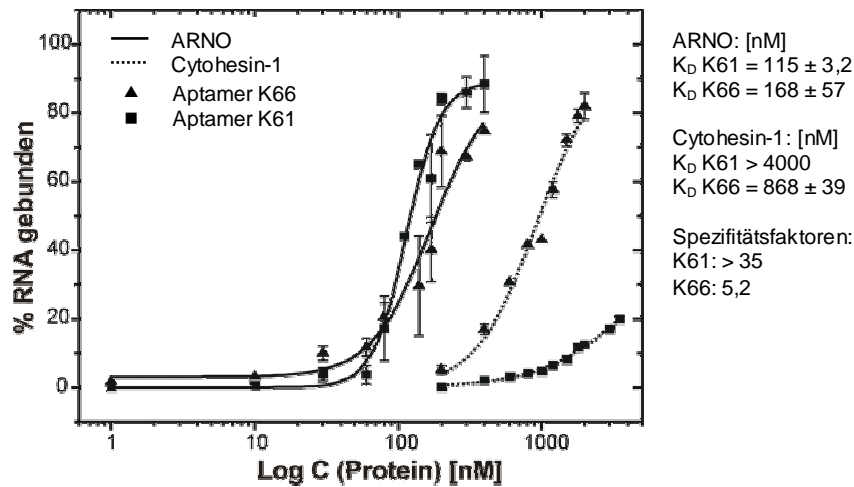


Abb. 2.8: Bindungskurven der Aptamere K61 (■) und K66 (▲) an ARNO (—) und Cytohesin-1 (.....). Es wurden jeweils steigende Konzentrationen der Proteine mit Aptamer-RNA inkubiert und durch Nitrozellulosemembranen gefiltert. Die Menge an retardiertem Aptamer wurde durch Autoradiographie quantifiziert und gegen den dekadischen Logarithmus der Proteinkonzentration aufgetragen. Die Dissoziationskonstante (K_D) entspricht der Proteinkonzentration bei halbmaximaler Sättigung.

Bemerkenswert ist, dass diejenigen Aptamere die sich am stärksten im Pool anreichern konnten [2.2.4] auch die höchsten Spezifitätsfaktoren aufweisen. Dies entspricht den angelegten Selektionskriterien, denn nach Anreicherung des Pools gegen die Zielmatrix wurde lediglich in zwei weiteren Selektionszyklen auf höhere Bindungsspezifität durch „counter“-SELEX gegen Cytohesin-1 selektiert [2.2.2]. Die durch Selektion gegen das Zielprotein angereicherten Binder mit geringeren Spezifitätsfaktoren wurden durch diese „counter“-SELEX gegen Cytohesin-1 zugunsten der spezifischeren Aptamere zurückgedrängt, ohne völlig aus der Population zu verschwinden.

Aptamer	K _D [nM] an ARNO	K _D [nM] an Cytohesin-1	Spezifitätsfaktor
K1	108 ± 4,1	725 ± 60	6,7
K32	110 ± 8,5	988 ± 51	9
K37	121 ± 3,6	1140 ± 34	9,4
K50	92 ± 3,5	1062 ± 30	11,5
K57	101 ± 8,1	1000 ± 53	9,9
K61	115 ± 3,2	> 4000	> 35
K66	168 ± 57	868 ± 39	5,2
Startpool	> 3500	> 3500	---

Tabelle 2.3: Dissoziationskonstanten (K_D) der monoklonalen Aptamere und der Startpool-RNA an ARNO und Cytohesin-1. Der Spezifitätsfaktor ergibt sich aus dem Quotienten der Bindungskonstanten. Die in rot dargestellten Sequenzen weisen die höchste Häufigkeit im Pool nach 15 Selektionsrunden auf.

2.3.3 Bindungsstudien an Membranen - Aptablots

Die Bindung des kleinen Austauschfaktors Cytohesin-2 und die Diskriminierung des homologen Cytohesin-1 konnte sowohl in Lösung durch Filterbindungsexperimente [2.3.2], als auch durch Oberflächenplasmonresonanz [2.3.1] nachgewiesen werden. In beiden Fällen lagen die Proteine in ihrer nativen Konformation vor. Daher wurde die Auswirkung von Protein-Denaturierung auf das Bindungsereignis durch Aptablot-Analysen untersucht [5.1.8]. Hierbei wurden die Proteine durch Gelelektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Diese wurde anschließend mit 1 pmol radioaktiv markiertem Aptamer inkubiert und die Protein-RNA-Komplexe durch Autoradiographie visualisiert.

Dabei konnte für alle monoklonalen Aptamere eine Wechselwirkung mit ihrem Zielprotein detektiert werden (Abb. 2.9A und B). Auch die Fähigkeit zur Diskriminierung gegenüber Cytohesin-1 blieb unter diesen Bedingungen erhalten, was in Abbildung 2.9 A exemplarisch für K57 veranschaulicht ist. Deutliche Unterschiede ergaben sich jedoch in Bezug auf die Bindungsstärke; so interagierten die Aptamere K1 und K57 unter diesen Bedingungen wesentlich besser mit ihrem Zielprotein als K32 oder K37 - eine Eigenschaft, die interessanterweise weder mit den Dissoziationskonstanten, noch mit den Spezifitätsfaktoren der Aptamere [2.3.2] korrelierte.

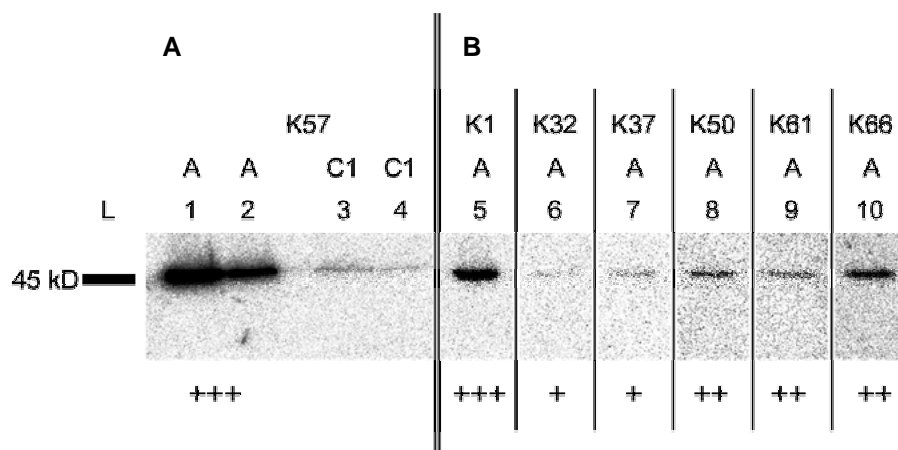


Abb. 2.9: Aptablot-Analyse der monoklonalen Aptamere. (A) Aptamer K57 bindet ARNO (1: 690 ng; 2: 230 ng) unter Diskriminierung von Cytohesin-1 (3: 1880 ng; 4: 940 ng). (B) Alle Aptamere unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit zur Bindung von denaturiertem ARNO (5-10: 230 ng). Die Symbole geben die Signalintensität an. L: Laufhöhe; A: ARNO; C1: Cytohesin-1

Diese Beobachtung lässt die Schlussfolgerung zu, dass die einzelnen Aptamere unterschiedliche Bindungsepitope an ihrem Zielprotein erkennen, die entweder einen kontinuierlichen oder diskontinuierlichen Charakter aufweisen und somit gegenüber Denaturierung unterschiedlich sensitiv sind.

Das Aptamer K57 scheint ein weitgehend lineares Bindungsepitop zu besitzen, da die molekulare Erkennung des Zielproteins, als auch die Fähigkeit zur Diskriminierung gegenüber Cytohesin-1 durch Denaturierung kaum beeinflusst wird.

2.4 Bindungsmotive und funktionale Studien

2.4.1 Bestimmung von Minimalmotiven für das Aptamer K61

2.4.1.1 Rationales Design des Minimalmotivs K61M

Das Aptamer K61 ist die häufigste Spezies der Poolsequenzierung und weist die besten Bindungseigenschaften aller monoklonalen Aptamere auf, da es mit hoher Spezifität und Affinität an den kleinen Guaninnukleotid-Austauschfaktor Cytohesin-2 bindet [2.2.4; 2.3.1; 2.3.2].

Um das minimale Bindungsmotiv des Aptamers näher zu bestimmen, wurde zunächst die in Abbildung 2.10A dargestellte Sekundärstruktur unter Verwendung des Programms `mfold 3.1` [<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna>] berechnet. Man erkennt, dass sich die beiden Termini in direkter räumlicher Nähe zueinander am Ende einer stabilen stem-loop Struktur von 11 Nukleotiden Länge befinden. Dieser Bereich des Aptamers besteht hauptsächlich aus den konstanten Regionen des Pools I-N40 [2.2.1] und unterlag somit keinem Selektionsdruck. Daher wurden diejenigen Teile dieser Region deletiert, die für den restlichen Teil des Aptamers nicht strukturbestimmend waren.

Das so erhaltene Minimalmotiv ist in Abb. 2.10A farbig unterlegt und wurde anhand von Filterbindungsexperimenten auf seine Bindungseigenschaften hin untersucht.

Tatsächlich konnte keine signifikante Veränderung der Bindungseigenschaften des um 29 nt deletierten Minimalmotivs K61M gegenüber dem Vollängenaptamer festgestellt werden (Abb. 2.10B). Obwohl K61 um 35 % verkürzt wurde, bindet es das Zielprotein

ARNO mit einer Dissoziationskonstante (K_D) von $135 \text{ nM} \pm 1,9$ und diskriminiert das homologe Cytohesin-1 mit einer K_D von $> 2500 \text{ nM}$.

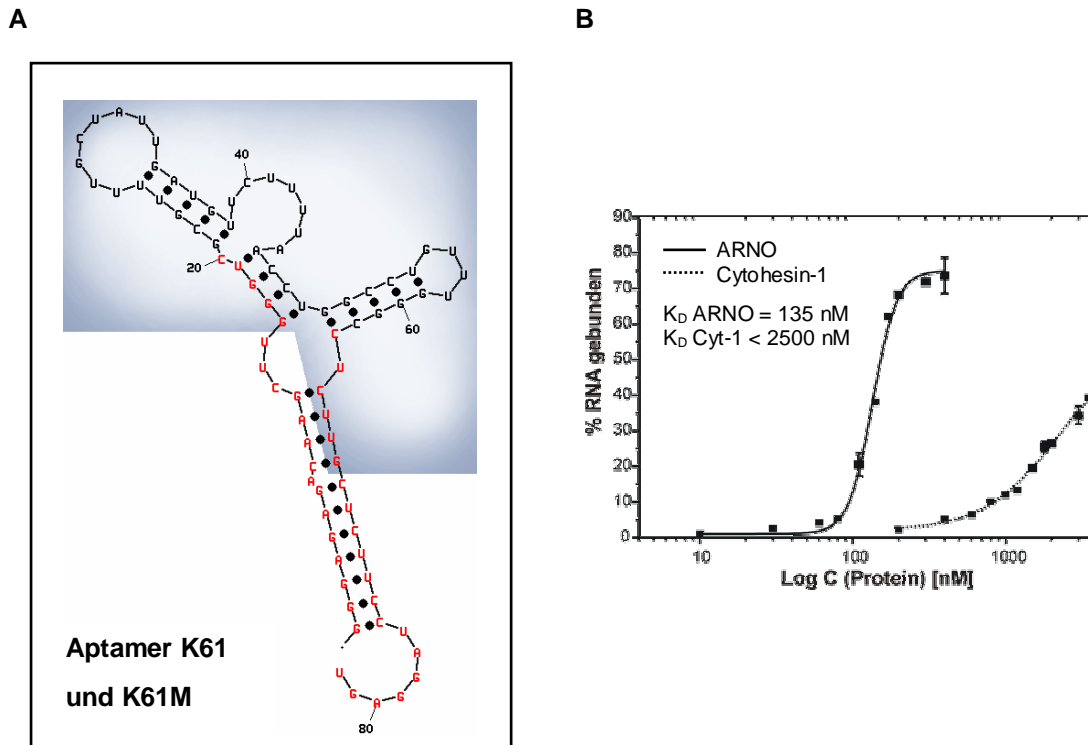


Abb. 2.10: (A) Sekundärstruktur des Aptamers K61. Konstante Regionen des Pools I-N40 sind in rot dargestellt, evolvierte Regionen in schwarz. Die Zahlen entsprechen der Basenzahl beginnend beim 5'-Terminus. Das Minimalmotiv K61M ist farbig unterlegt. (B) Bindungskurven des Minimalmotives K61M an ARNO (—) und Cytohesin-1 (.....).

2.4.1.2 Das Minimalmotiv K61S

Um das Minimalmotiv K61M weiter zu verkürzen und so eine noch genauere Vorstellung des Bindungsmotivs zu erhalten, wurde mit dem Vollängenaptamer K61 eine „*Damage Selektion*“ durchgeführt^[70, 144]. Dieses Verfahren ermöglicht die Bestimmung von Bindungsmotiven innerhalb einer Aptamersequenz. Hierzu wurden zunächst durch milde Hydrolyse des Aptamers alle denkbaren Fragmentlängen erzeugt (Abb. 2.11A1). Dieses Gemisch wurde nun mit 200 nM (Abb. 2.11A3) bzw. 150 nM (Abb. 2.11A4) ARNO in Selektionspuffer inkubiert und die nicht-bindenden Fragmente durch Filtration über Nitrozellulosemembranen abgetrennt, wobei die RNA-Proteinkomplexe durch die Membran zurückgehalten wurden [5.3]. Diese RNA-Fragmente konnten nach Auftrennung in einem denaturierenden Polyacrylamidgel

durch Vergleich mit einem RNase-T1 Verdau [5.3.2] der K61-RNA (Abb. 2.11A2) einer bestimmten Sequenzposition zugeordnet werden.

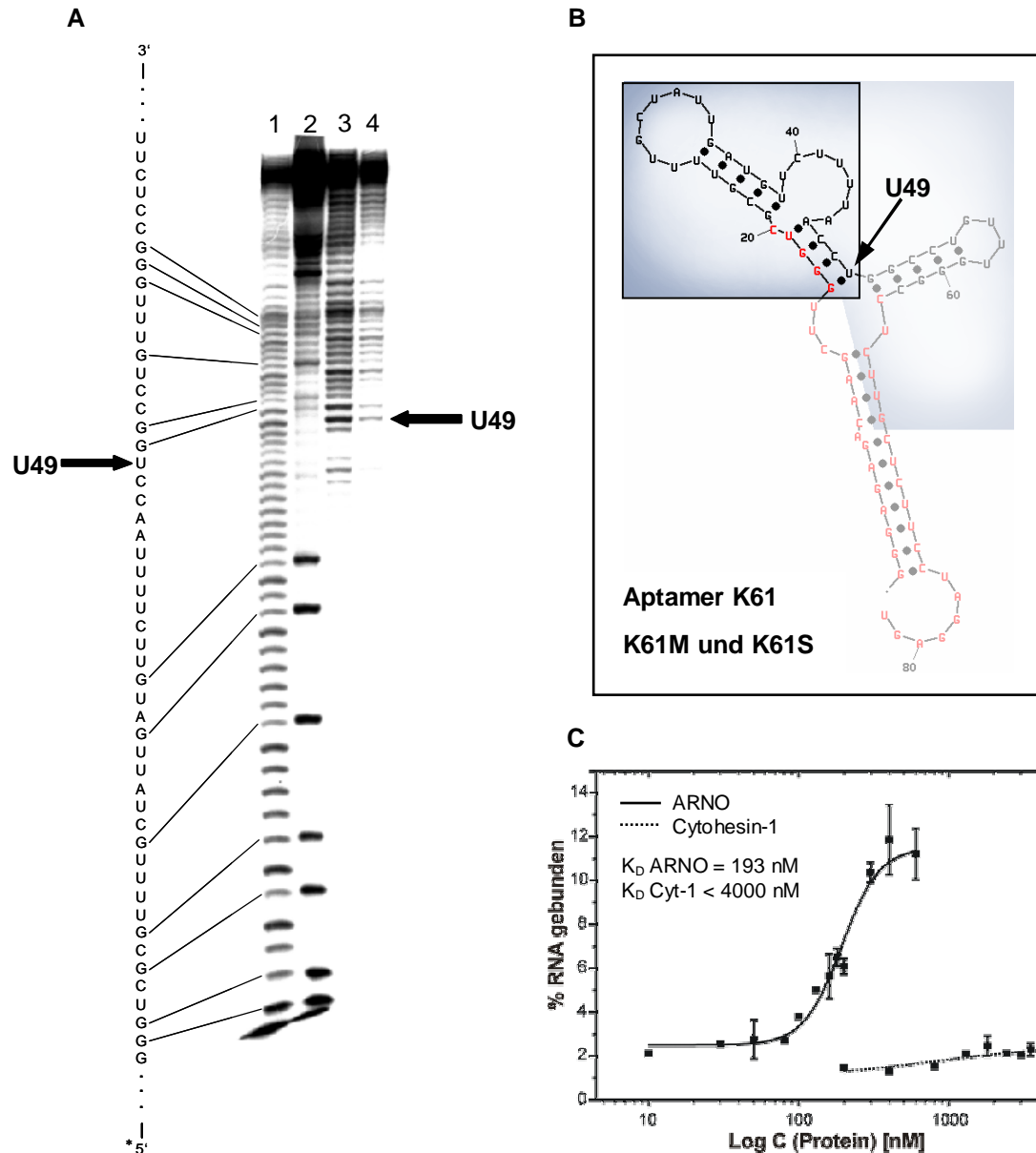


Abb. 2.11: Bestimmung des Minimalmotives K61S. (A) Zur Analyse des Bindungsmotives des Aptamers K61 wurde dieses 5'-terminal radioaktiv markiert (*) und unter milden Bedingungen hydrolysiert, sodass alle denkbaren Fragmentlängen entstanden (1). Dieses Gemisch wurde mit 200 nM (3) bzw. 150 nM (4) ARNO inkubiert und die freie RNA durch Filtration separiert. Diejenigen Fragmentlängen die im Komplex mit ARNO vorlagen, wurden gelelektrophoretisch getrennt und anhand eines RNase T1-Verdau des Vollängenaptamers K61 (2) einer bestimmten Sequenzposition zugeordnet. Das kürzeste aktive Fragment hat eine Länge von 49 nt (Pfeil), wobei eine Verkürzung um nur ein weiteres Nukleotid bereits einen vollständigen Verlust der Bindungseigenschaften hervorrief. (B) Sekundärstruktur des Aptamers K61, sowie der Minimalmotive K61M (farbig hinterlegt) und K61S (eingerahmt). Die experimentell ermittelte kleinste Fragmentgröße ist mit einem Pfeil markiert. Zusätzlich wurden bei K61S 15 nt vom 5'-Terminus deletiert. Konstante Regionen des Pools I-N40 sind in rot dargestellt, evolvierte Regionen in schwarz. (C) Bindungskurven des Minimalmotives K61S an ARNO (—) und Cytohesin-1 (.....).

Das kleinste aktive Fragment (Pfeil) markiert das minimale Bindungsmotiv und hat eine Länge von 49 Nukleotiden. Die Verkürzung um jedes weitere Nukleotid führte bereits zu einem totalen Verlust der Bindungseigenschaften.

Da die verwendete RNA ausschließlich 5'-terminal radioaktiv markiert worden war, konnten nur diejenigen Fragmente detektiert werden, die ein intaktes 5'-Ende aufwiesen. Da aber das in 2.4.1.1 dargestellte rational verkürzte Bindungsmotiv K61M beweist, dass die 5'-terminalen Nukleotide für die Bindung nicht notwendig sind, wurden diese wie in K61M entfernt. Das so erhaltene Minimalmotiv K61S ist in Abbildung 2.11B umrahmt dargestellt und konnte gegenüber der Volllänge um 48 nt verkürzt werden.

Tatsächlich bindet dieses Minimalmotiv mit vergleichbaren Bindungseigenschaften wie das Vollängenaptamer an sein Zielprotein, obwohl es mit 34 Nukleotiden nur noch 41 % von dessen Länge aufweist. So ergab sich aus Filterbindungsstudien (Abb. 2.11C) eine Dissoziationskonstante (K_D) an Cytohesin-2 von $193 \text{ nM} \pm 6$ und an Cytohesin-1 von $> 4000 \text{ nM}$.

2.4.2 Das Proteinepitop der Aptamer - ARNO Interaktion

Durch Analyse der Bindungsmotive des Aptamers K61 konnten verkürzte Varianten mit ähnlichen Bindungscharakteristika wie das Vollängenaptamer gefunden werden [2.4.1.1; 2.4.1.2]. Die Bestimmung des Bindungsepitops des Proteins ist dabei nicht weniger bedeutsam, da dies Einblicke in den Mechanismus der molekularen Erkennung erlaubt und so eventuell Eingrenzungen des biologischen Effektes der Aptamerbindung vorgenommen werden können.

2.4.2.1 Plasmid-Amplifikation zur Erzeugung von Mutationen

Die Analyse des Bindungsepitops erfolgte durch Filterbindungsstudien an verschiedenen ARNO-Konstrukten. Daher musste ein schneller und einfacher Zugang zu verschiedenen Deletionsmutanten gefunden werden. Hierzu wurde ein neues Verfahren zur Manipulation von Plasmiden entwickelt, das prinzipiell nicht nur die Einführung von Deletions- und Insertionsmutationen, sondern auch die Substitution einzelner Basen ermöglicht. Das Verfahren basiert auf der spezifischen Amplifikation

des gesamten Plasmides durch PCR, wobei die Mutationen durch Verwendung entsprechender Primer eingeführt wurden [5.6]. Diese einfache Manipulation von Plasmiden wurde erst durch Verwendung von Polymerasen mit „proofreading“-Funktion, wie beispielsweise der „*Pyrococcus furiosus*“ (*Pfu*) DNA-Polymerase^[145] möglich. Diese kann sowohl lange Template von > 6 kb, als auch schwierige Template wie zirkuläre Plasmide mit ausreichender Genauigkeit kopieren. Da die verwendeten Primer bereits phosphoryliert vorlagen, konnte das lineare PCR-Produkt ohne weitere Aufarbeitung intramolekular ligiert und transformiert werden.

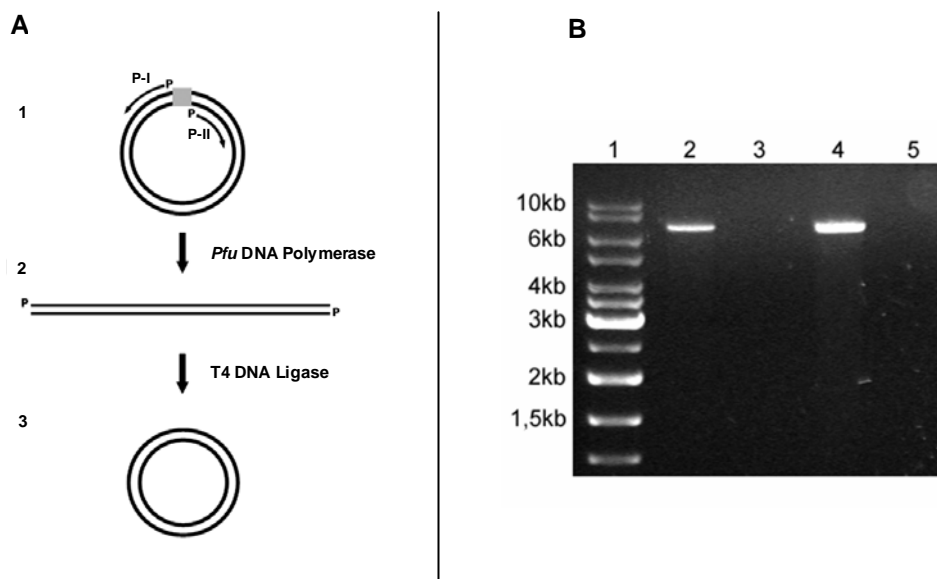


Abb. 2.12: (A) Schematisches Protokoll der Erzeugung von Deletionsmutationen durch PCR. Der zirkuläre Expressionsvektor pET11d-ARNO wurde als Template in einer PCR mit *Pfu* DNA Polymerase eingesetzt. (1) Die 5'-terminal phosphorylierten Primer (P-I und P-II) wurden so gewählt, dass der zu deletierende DNA-Abschnitt (graues Rechteck) zwischen ihnen lag. (2) In 15 PCR-Zyklen entstand ein lineares Amplifikat, das um den entsprechenden Bereich verkürzt war. (3) Nach direkter Ligation mit T4 DNA Ligase wurde das generierte Plasmid in *E. coli* Bakterien transformiert. (B) Analyse der manipulativen PCR-Amplifikation durch Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte pET11d-S7PH (2) und pET11d-CCS7 (4). Die Negativkontrollen nach 15 PCR-Zyklen in Abwesenheit des Templates pET11d-ARNO (3 und 5) zeigen, dass keine Kontamination oder unspezifische Amplifikation vorlag. (1) 2µg dsDNA als Längensstandard (peQLab). Alle Proben wurden ohne jede Aufarbeitung direkt aus dem PCR-Reaktionsgemisch auf ein Agarosegel (0,7 %) geladen.

Nach diesem Verfahren wurden zwei Konstrukte von ARNO kloniert, die entweder um die PH- und C-Domäne deletiert (ARNO-CCS7) waren oder keine Coiled-coil-Domäne enthielten (ARNO-S7PH) (Domänengrenzen s. Abb. 2.13B). Hierzu wurde das Plasmid pET11d-ARNO wie in Abbildung 2.12 A dargestellt mit den Primern CCS7 I und II bzw. S7PH I und II [4.11.1] amplifiziert. Dabei konnten innerhalb von 15 PCR-Zyklen

lineare Produkte erhalten werden (Abb. 2.12 B), die im Fall des Konstruktes ARNO-S7PH um 147 bp und im Fall des Konstruktes ARNO-CCS7 um 459 bp gegenüber der Volllänge verkürzt waren.

Um die allgemeine Verwendbarkeit und Zuverlässigkeit dieser Klonierungsmethode aufzuzeigen, wurden insgesamt 22800 Basen in 38 verschiedenen Monoklonen sequenziert. Wie in Tabelle 2.4 zu erkennen, enthielten 80 % aller Klone die erwartete Sequenz ohne jede Sekundärmutation. Die übrigen Klone wiesen keine Mutationen an den Ligationsstellen auf, welches die vollständige Abwesenheit einer terminalen Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT)-Aktivität aufzeigt, die oftmals ein Problem in PCR-basierten Klonierungsstrategien darstellt^[146-148].

Da die verwendete *PfuTurbo*[®]-Polymerase eine hohe Genauigkeit besitzt, konnte die Templatmenge stark reduziert werden. Dies führt zu einem großen Produkt-zu-Templat Verhältnis, sodass keine Selektion gegen das Ausgangsplasmid erfolgen musste^[149-151]. Tatsächlich konnte in 38 sequenzierten Klonen kein wild-typ Plasmid gefunden werden. Dies stellt einen Vorteil zu bereits etablierten Methoden, wie etwa dem QuikChange[®]-Protokoll^[152, 153] oder der Klonierung unter Verwendung von Restriktionsendonukleasen dar^[154]. Mit dem vorliegenden Verfahren können unabhängig vom Aufbau des Ausgangsplasmids oder der Anwesenheit von Restriktionsschnittstellen in kurzer Zeit Manipulationen vorgenommen werden. Auf die Verwendung von speziellen Bakterienstämmen, wie z. B. *dam*⁺ Stämmen wie im Fall des QuikChange[®]-Protokolls kann verzichtet werden.

Vektor	pET11d-CCS7	pET11d-S7PH
sequenzierte Klone	15	23
fehlerfreie Klone	12	18
Punktmutationen	1	4
Deletion	2	2
Insertion	1	1

Tabelle 2.4: Statistische Auswertung der Mutageneseeffizienz und Verteilung von Sekundärmutationen.

2.4.2.2 Heterologe Expression und Reinigung von ARNO-Domänen

Die heterologe Expression der in 2.4.2.1 erhalten Domänenkonstrukte ARNO-CCS7, ARNO-S7PH, sowie des Kontruktes ARNO-S7, welches ausschließlich die Sec7-

Domäne enthielt, wurde in *E. coli* BL21 (DE3) Bakterien durchgeführt. Da alle Proteine einen N-terminalen Hexahistidininfusionsanteil enthielten, konnte nach Expression und Zellyse [5.10.8; 5.10.9] eine Aufreinigung über Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA Agarose erfolgen [5.1.9.1]. Anschließend wurden alle Proteine durch SDS-PAGE in Kombination mit einer Coomassie-Färbung analysiert. Der Reinheitsgrad wurde dabei auf > 95 % bestimmt (Abb. 2.13A). Nun wurden alle Proteine mit Hilfe von Gelfiltrationssäulen in Selektionspuffer überführt und nach Konzentrationsbestimmung direkt in Filterbindungsexperimente [2.4.2.3] eingesetzt. Die Konzentration der Proteine wurde nach der Aufreinigung durch eine Kombination der in 5.1.6 beschriebenen Methoden auf 0,3 mg/ml für ARNO-CCS7, 8 mg/ml für ARNO-S7PH und 0,3 mg/ml ARNO-S7 bestimmt. Hieraus ergibt sich eine Ausbeute von 1,5 mg ARNO-CCS7, 40 mg ARNO-S7PH und 1,5 mg ARNO-S7 pro Liter Kulturvolumen.

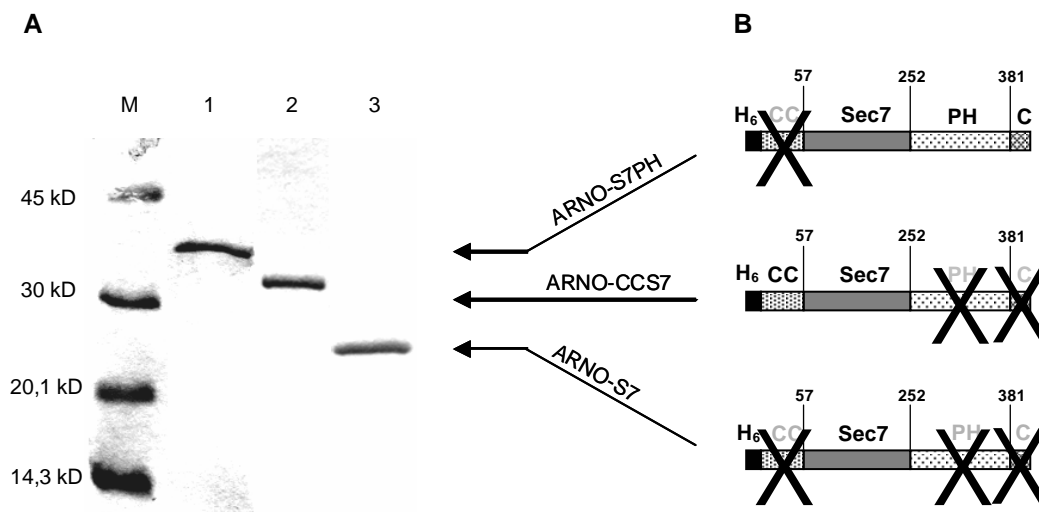


Abb. 2.13: (A) SDS-PAGE Analyse in Kombination mit Coomassie-Färbung der ARNO-Domänenkonstrukte S7PH (1), CCS7 (2) und S7 (3) nach Aufreinigung über Affinitätschromatographie. Es sind keine Kontaminationen mit Fremdproteinen zu erkennen. (B) Schematische Darstellung der Domänenzusammensetzung von ARNO. Die deletierten Regionen in den einzelnen Konstrukten sind mit (X) gegenzeichnet. Die Zahlen entsprechen der jeweiligen Aminosäureposition. H₆: Hexahistidinsequenz, CC: Coiled-coil-Domäne; PH: Pleckstrin Homologie-Domäne; C: polybasische C-Domäne

2.4.2.3 Filterbindung an ARNO-Domänen

Die Bestimmung der Bindungsepitope erfolgte durch die Auswertung von Sequenzvergleichen zwischen Cytohesin-1 und -2 in Kombination mit Filterbindungsdaten. So wurden die Dissoziationskonstanten (K_D) für die Wechselwirkung der ARNO-

Konstrukte CCS7, S7PH und S7 mit den in 2.3.2 untersuchten monoklonalen Aptameren bestimmt. Hierzu wurde jeweils 1 nM des radioaktiv markierten Aptamers mit steigenden Konzentrationen der verschiedenen Konstrukte für 30 min bei 37° C in Selektionspuffer inkubiert und durch Filtration über Nitrozellulosemembranen die freie RNA von den Protein-Aptamer Komplexen getrennt. Die proteingebundene RNA wurde anschließend an einem PhosphorImager quantifiziert und auf eine ungefilterte Kontrolle normiert.

Diese Datenpunkte wurden mit Hilfe des Programms Origin[®] 6.1 (OriginLab Corporation) gefittet [5.9.1]. Typische, bei diesem Verfahren erhaltene Bindungskurven sind in Abbildung 2.14 für die Wechselwirkung des Aptamers K61 und die verschiedenen ARNO-Konstrukte dargestellt, wobei sich die Dissoziationskonstanten aus der Konzentration des Proteins bei halbmaximaler Sättigung ergaben.

Man erkennt bereits anhand der Bindungskurven, dass die stärkste Interaktion mit dem CCS7-Konstrukt eintrat.

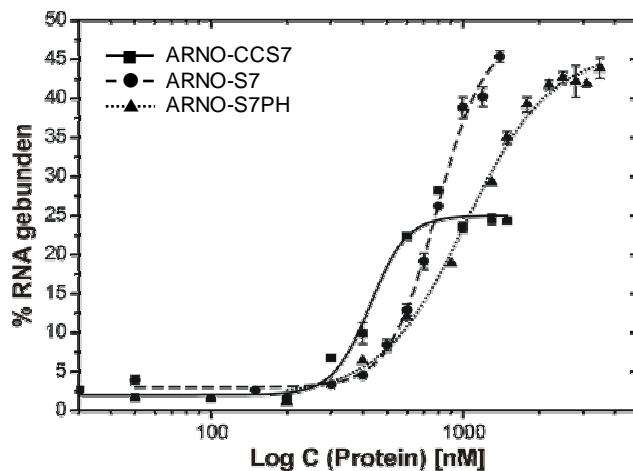


Abb. 2.14: Bindungskurven der ARNO-Domänen CCS7 (—■—), S7 (—●—) und S7PH (.....▲.....) und des Aptamers K61. Die stärkste Wechselwirkung tritt mit dem CCS7-Konstrukt auf. Dies legt eine Beteiligung der Coiled-coil-Domäne am Bindungsereignis nahe.

Die Dissoziationskonstanten (K_D) aller untersuchten Wechselwirkungen sind in Tabelle 2.5 zusammengefasst. Dabei fällt auf, dass mit Ausnahme des Klons 57 alle Aptamere eine deutlich bessere Interaktion mit dem CCS7-Konstrukt als mit den übrigen Konstrukten aufwiesen. Da sowohl im Konstrukt S7PH als auch in S7 keine Coiled-coil-Domäne enthalten war, kann diese als ein entscheidender Teil des Bindungs-epitopes angesehen werden.

Ein Sequenzvergleich zwischen ARNO und Cytohesin-1 unterstützt diese Beobachtung. So finden sich 41 % aller Unterschiede in der Primärstruktur zwischen diesen beiden Proteinen innerhalb der Coiled-coil-Domäne bzw. in der Übergangsregion zwischen der Coiled-coil- und Sec 7 Domäne [siehe Abb. 1.3]. Da alle Aptamere in der Lage sind unter Diskriminierung von Cytohesin-1 an ARNO zu binden [2.3.2], erscheint die Beteiligung dieser diversen Regionen am Bindungsereignis als wahrscheinlich.

Weiterhin zeigen die Konstrukte S7PH und S7 eine Restbindung im unteren mikromolaren Bereich, die deutlich über der Affinität des Pools liegt. Obwohl jeweils unterschiedliche Teile des Vollängenproteins deletiert wurden, bleiben also immer Teile des Epitops erhalten. Dies spricht für eine diskontinuierliche Struktur des Bindungs-epitopes.

Aptamer	K_D [nM] an CCS7	K_D [nM] an S7PH	K_D [nM] an S7
K1	408 ± 11	770 ± 40	726 ± 11
K32	594 ± 12	1022 ± 32	825 ± 11
K37	568 ± 13	1337 ± 25	849 ± 12
K50	543 ± 8	957 ± 31	697 ± 16
K57	810 ± 60	883 ± 38	944 ± 11
K61	420 ± 21	998 ± 25	781 ± 9
K66	816 ± 21	1042 ± 33	948 ± 16

Tabelle 2.5: Dissoziationskonstanten (K_D) der Bindung verschiedener monoklonaler Aptamere an die ARNO-Konstrukte CCS7, S7PH und S7.

2.4.3 Funktionale Studien

2.4.3.1 Austauschstudien an $\Delta 17ARF1$

ARF1 gehört zur Klasse der kleinen G-Proteine und kann sowohl in einem aktiven GTP-gebundenen, als auch in einem nichtaktiven GDP-gebundenen Zustand vorliegen.

Cytohesin-2 ist ein Guaninnukleotid-Austauschfaktor für ARF1 und katalysiert die Dissoziation von GDP aus dem Komplex mit ARF1^[113]. In die freie Nukleotidbindestelle kann dann ein Molekül GTP eintreten [1.4.1].

Da die selektierten Aptamere spezifisch und mit hoher Affinität an Cytohesin-2 binden [2.3.2], wurde die Auswirkung dieser Bindung auf die Fähigkeit zur Katalyse des Nukleotidaustausches an ARF1 untersucht. Hierzu wurde ARNO mit einem Überschuss

Aptamer vorinkubiert und die Reaktion durch zusetzen einer löslichen Variante von ARF1 ($\Delta 17$ ARF1) gestartet. Die unselektierte Bibliothek I-N40 diente als Positivkontrolle für die Austauschaktivität. Aufgrund der intrinsischen GTPase-Aktivität von ARF1 wurde $GTP\gamma S$ anstelle des natürlichen Nukleotides verwendet, da dieses von ARF1 nicht hydrolysiert werden kann. Die experimentellen Einrichtungen, sowie gereinigtes $\Delta 17$ ARF1 wurden vom Arbeitskreis Prof. Dr. F. Wieland (Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Die Kinetik des GDP/GTP Austausches an der N-terminal verkürzten Variante von ARF1 wurde durch Fluoreszenzmessungen verfolgt. Hierzu wurde die Zunahme der Tryptophanfluoreszenz in ARF1 während der konformationellen Änderung von ARF-GDP zu ARF-GTP ausgenutzt^[115, 155] [5.8.1].

Typische, bei diesem Verfahren erhaltene Austauschkinetiken sind in Abbildung 2.15 für die Aptamere K1, K37 und K61 dargestellt. Die Positivkontrolle in Form der Startpool-RNA hat keine Auswirkung auf die Austauschaktivität von ARNO, dessen hohe katalytische Aktivität durch die wesentlich langsamere Austauschreaktion in Abwesenheit eines GEFs deutlich wird. Man erkennt bereits anhand der graphischen Daten, dass ein fünffacher molarer Überschuss Aptamer nur geringe Auswirkungen auf die Geschwindigkeit der Austauschreaktion an ARF1 hat.

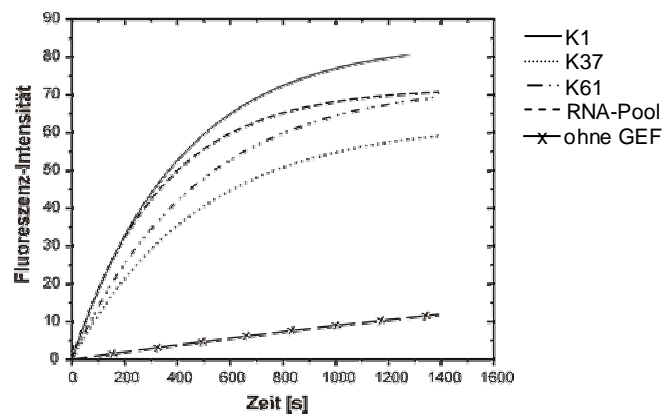


Abb. 2.15: Messung der Änderung der Tryptophanfluoreszenz von $\Delta 17$ ARF1 während der Katalyse des Guaninnukleotid-Austausches durch ARNO in Anwesenheit eines fünffachen molaren Überschusses der Aptamere K1 (—), K37 (.....) und K61 (-·-·), sowie Startpool-RNA als Positivkontrolle (- - -) und in Abwesenheit eines Austauschfaktors (-x-).

Die Austauschraten (k_{exch}) der Reaktion wurden anhand des Programms Origin 6.1[®] (OriginLab Corporation) aus den Fluoreszenzdaten bestimmt. Dabei gilt für die Austauschreaktion das Geschwindigkeitsgesetz 1. Ordnung [5.8.1].

In Tabelle 2.6 sind die erhaltenen Austauschraten (k_{exch}) für alle untersuchten Aptamere zusammengefasst. Diese Austauschraten wurden auf die Positivkontrolle normiert, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Man erkennt, dass kein Aptamer mehr als 15 % von der Poolkontrolle abweicht. Nur K1 weist einen leicht verstärkenden Effekt auf die Austauschaktivität auf.

Aus diesen Ergebnissen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Bindung der Aptamere an Cytohesin-2 in einer Region erfolgt, welche die Austauschaktivität der ARNO-Sec7 Domäne nicht beeinflusst.

Aptamer	Austauschrate (k_{exch})	Inhibition [%]
K1	0,00297 ± 1,7E-6	121
K32	0,00248 ± 2,4E-6	101
K37	0,00209 ± 3,2E-6	85
K50	0,00259 ± 2,6E-6	105
K57	0,0023 ± 3,4E-6	93
K61	0,00213 ± 1,4E-6	87
K66	0,00225 ± 4E-6	91
Startpool	0,00246 ± 1,6E-6	100
ohne GEF	0,0002 ± 1E-5	8,1

Tabelle 2.6: Austauschraten (k_{exch}) der monoklonalen Aptamere, sowie Normierung der Austauschraten auf die Aktivität von ARNO in Anwesenheit von Startpool-RNA.

2.4.3.2 Rekrutierungsstudien von ARNO an PIP₂-dotierte Vesikel

ARNO ist ein Austauschfaktor für ADP-Ribosylierungsfaktoren (ARF) und katalysiert die Dissoziation von GDP aus dem Komplex mit ARF an Membranoberflächen. Hierzu wird ARNO durch eine Wechselwirkung der Pleckstrin Homologie-Domäne (PH) mit Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) an Membranen rekrutiert. Durch diese Wechselwirkung erfolgt einerseits eine Verstärkung der intrinsischen Austauschaktivität von ARNO, andererseits eine intrazelluläre Lokalisierung an Membranen, die entsprechende Phosphatidylinositolphosphate präsentieren^[156, 157]. Da Aptamere evolviert werden konnten, die Cytohesin-2 mit hoher Affinität und Spezifität binden

[2.3.2], wurde deren Auswirkung auf die PH-vermittelte Rekrutierung von ARNO an PIP₂-dotierte Vesikel untersucht. Zu diesem Zweck wurden Vesikel aus L- α -Phosphatidylcholin, β -Palmitoyl- γ -oleoyl (PC) und L- α -Phosphatidyl-DL-glycerol, β -Oleoyl- γ -palmitoyl (PG) sowie 10 % PIP₂ nach der Extruder-Methode hergestellt^[116, 158] [5.8.2]. Als Kontrolle dienten undotierte Vesikel, bei denen der entsprechende PIP₂-Anteil durch PG ersetzt worden war.

Alle Bindungsstudien wurden mittels Oberflächenplasmonresonanz durchgeführt, wobei die Vesikel zuvor durch hydrophobe Wechselwirkungen an eine Chipoberfläche gekoppelt worden waren. Eine entsprechende Kontrolloberfläche konnte durch Belegung mit undotierten Vesikeln erhalten werden. Alle Messsignale wurden auf diese Kontrolloberfläche normiert.

Zunächst wurde getestet ob die Wechselwirkung von ARNO mit PIP₂ in immobilisierten Vesikeln erhalten bleibt, da die sterische Zugänglichkeit und Aktivität durch die Kopplung an eine Oberfläche beeinflusst werden kann. Die Injektion steigender Konzentrationen (0,4 - 3,5 μ M) von ARNO zeigte eine konzentrationsabhängige Bindungsantwort an PIP₂-dotierte Vesikel (Abb. 2.16).

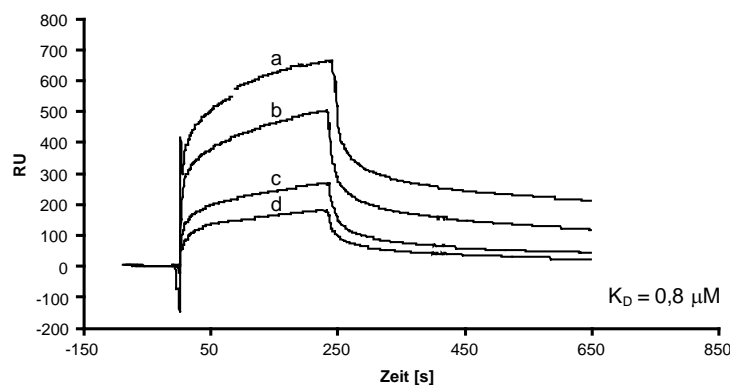


Abb. 2.16: Bindungskurven der Rekrutierung von ARNO an PIP₂-dotierte Vesikel. Die Injektion von ARNO (a: 3,5 μ M; b: 2,15 μ M; c: 0,8 μ M; d: 0,4 μ M) führte zu einer konzentrationsabhängigen Bindungsantwort.

Da undotierte Vesikel als Kontrolle verwendet wurden, konnte hierdurch die direkte Wechselwirkung von Cytohesin-2 mit PIP₂ in der Lipidschicht der Vesikel nachgewiesen werden. Die Dissoziationskonstante (K_D) dieser Wechselwirkung wurde anhand der Biacore-Evaluierungssoftware 3.1 nach dem Langmuir-Modell bestimmt. Es konnte ein K_D -Wert von 0,8 μ M ermittelt werden, der nur wenig vom literaturbekannten

Wert von $1,6 \mu\text{M}^{[129]}$ abweicht. Da die monoklonalen Aptamere ihr Zielprotein ARNO mit Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich binden, kann davon ausgegangen werden, dass bei einer konkurrierenden Bindung von Aptamer und PIP_2 an die PH-Domäne eine Verdrängung durch das Aptamer stattfinden kann.

Daher wurde ein vierfacher bzw. 24facher molarer Überschuss der Aptamere mit dem Zielprotein Cytohesin-2 inkubiert und dieses Gemisch auf die vesikelbelegten Oberflächen injiziert. Typische Bindungskurven in Anwesenheit der Aptamere K1, K57 und K61 sind in Abbildung 2.17 dargestellt. Als Positivkontrolle der ARNO-Rekrutierung diente die unselektierte Bibliothek I-N40, welche keine Auswirkungen auf die PH-Domänenaktivität hatte. Eine direkte Wechselwirkung des Startpools mit den Vesikeln in Abwesenheit von ARNO konnte ebenfalls nicht detektiert werden.

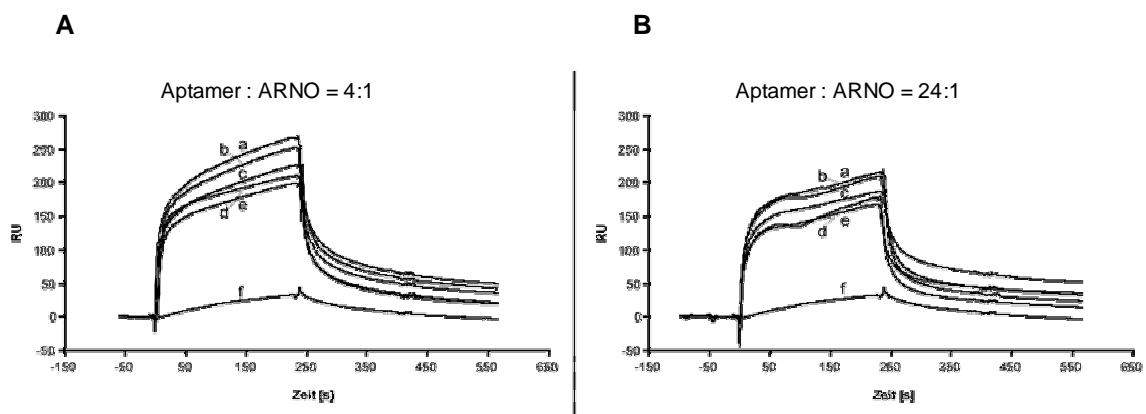


Abb. 2.17: Bindungskurven von ARNO an PIP_2 -dotierte Vesikel in Anwesenheit von monoklonalen Aptameren. (A) Bindungskurven von $0,8 \mu\text{M}$ ARNO nach Inkubation mit $3,3 \mu\text{M}$ K1 (c); K57 (e); K61 (d), sowie Startpool-RNA (b). Als Positivkontrolle diente $0,8 \mu\text{M}$ ARNO in Abwesenheit von RNA (a) und als Negativkontrolle $3,3 \mu\text{M}$ Startpool-RNA in Abwesenheit von ARNO (f). (B) Bindungskurven von $0,4 \mu\text{M}$ ARNO nach Inkubation mit $9,4 \mu\text{M}$ K1 (a); K57 (c); K61 (e), sowie Startpool-RNA (d). Als Positivkontrolle wurde $0,4 \mu\text{M}$ ARNO (b) in Abwesenheit von RNA verwendet. Als Negativkontrolle diente $3,3 \mu\text{M}$ Startpool-RNA in Abwesenheit von ARNO (f).

Die Bindungsantwort im Gleichgewicht diente als Maß für die Affinität der Wechselwirkung zwischen Cytohesin-2 und der PIP_2 -Vesikel Oberfläche. Bereits aus den graphischen Daten ist zu erkennen, dass die Rekrutierung von Cytohesin-2 an die Oberfläche kaum durch die Anwesenheit der Aptamere beeinflusst wurde.

In Tabelle 2.7 ist die Bindungsantwort im Gleichgewicht für die verschiedenen Aptamere gegenübergestellt. Man erkennt, dass weder bei einem vierfachen noch bei einem 24fachen Überschuss der Aptamere eine wesentliche Reduktion der Bindung von

ARNO an PIP₂ eintrat. Die leicht erniedrigten Werte der PH-vermittelten Rekrutierung von ARNO, die für einige Aptamere beobachtet wurden, müssen mit 15 - 20 % als nicht signifikant eingestuft werden. Diese Daten lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Aptamere an eine Proteinregion binden, die keine Auswirkungen auf die PH-vermittelte Rekrutierung von ARNO an PIP₂-präsentierende Membranen hat.

Aptamer	Aptamer : ARNO = 4:1		Aptamer : ARNO = 24:1	
	Bindungsantwort [RU]	Inhibition [%]	Bindungsantwort [RU]	Inhibition [%]
K1	223	84	214	103
K32	223	84	181	87
K37	231	87	200	97
K50	218	82	197	95
K57	221	83	186	90
K61	209	79	166	80
K66	213	80	179	86
ARNO ohne RNA	266	100	207	100
Startpool	250	94	175	85
Pool ohne ARNO	32	12	32	15

Tabelle 2.7: Bindungsantwort im Gleichgewicht von ARNO an PIP₂-dotierte Vesikel in An- und Abwesenheit von monoklonalen Aptameren oder Startpool-RNA. Die Aptamere zeigen kaum Auswirkungen auf die PH-Domänenaktivität. Die Inhibition wurde auf die Kontrolle in Abwesenheit von RNA normiert.

2.5 Zellkulturstudien in HeLa-Zellen

2.5.1 Stabilität des Intramers K61 *in vivo*

Aptamere sind in der Lage ihr Zielprotein nicht nur *in vitro*, sondern auch in einer lebenden Zelle zu binden und spezifisch zu inhibieren [1.2.2.1]. Daher können Aptamere intrazellulär als sogenannte Intramere verwendet werden, um die Funktion von Proteinen spezifisch zu verändern. Da RNA intrazellulär eine vergleichsweise geringe Halbwertszeit aufweist, werden Intramere in der Regel gegen Nuklease-degradation geschützt^[42, 72, 76, 159].

Da das Aptamer K61 den kleinen Guaninnukleotid-Austauschfaktor ARNO mit hoher Spezifität und Affinität [2.3.2] bindet, wurde dessen Verwendbarkeit als Intramer

geprüft. Hierzu wurde die intrazelluläre Stabilität gegenüber Nukleasedegradation untersucht.

Zu diesem Zweck wurden 15 pmol K61- bzw. Startpool-RNA in HeLa-Zellen transfiziert [5.11.3]. Nach 3- bzw. 6-stündiger Stimulation mit fetalem Kälberserum (FCS) wurde die total-RNA der Zellen nach dem Protokoll 5.11.4 extrahiert und anschließend revers transkribiert [5.2.7.2]. Das so erhaltene cDNA-Gemisch wurde 1:100 bzw. 1:1000 verdünnt und als Templat in eine „*real-time*“-PCR eingesetzt [5.7]. In Abbildung 2.18A-a bzw. 2.18B-a sind die Messkurven dieser PCR dargestellt. Um eine Quantifizierung der K61-RNA zu ermöglichen, wurden unterschiedliche Standardmengen (0,08-800 amol) an synthetischer K61- bzw. Startpool-I-N40 DNA eingesetzt (schwarz). Daraus konnten die in Abbildung 2.18A-b bzw. 2.18B-b dargestellten Standardkurven ermittelt werden. Diese weisen eine gute Korrelation von eingesetzter Startmenge und benötigter PCR-Zyklenzahl auf, welches für die Zuverlässigkeit des Verfahrens spricht.

Die Ausgangsmenge der Aptamere im Probenmaterial wurde dann durch Vergleich mit den Standardkurven ermittelt (rot). Da die Effizienz einer PCR-Amplifikation von der Art des Templates abhängt, wurden jeweils synthetische DNA-Oligomere des Aptamers und des Pools als Standard eingesetzt (Abb. 2.18A / B).

Um die Spezifität der Amplifikation zu überprüfen, wurde die cDNA untransfizierter Zellen, sowie eine total-RNA Präparation, die nicht revers transkribiert worden war, als Kontrollen eingesetzt. Weiterhin wurde eine PCR in Abwesenheit von Templat durchgeführt, um auszuschließen dass sich amplifizierbare Kontaminationen im Reaktionsgemisch befanden. In allen Kontrollreaktionen konnte keine Amplifikation bis zum 25. Zyklus festgestellt werden. Die korrekte Länge des Amplifikates wurde anhand von Agarosegelelektrophorese überprüft.

Wie in Abbildung 2.19 zu erkennen, sind nach mehrstündiger Inkubation ca. 7 amol Aptamer- bzw. Pool-RNA pro Zelle nachweisbar. Dies entspricht ca. 2,5 pmol bezogen auf die Gesamtmenge der eingesetzten Zellen. D.h. nach Transfektion und Inkubation der Zellen, sowie nach dem gesamten Präparations- und Quantifizierungsvorgang blieben immer noch 17 % der RNA erhalten. Nimmt man ein durchschnittliches Zellvolumen einer HeLa-Zelle von 10^{-11} Liter an^[160], ergibt sich eine Aptamer- bzw. Pool-RNA Konzentration von ca. 700 nM. Dieser Wert liegt um ein Vielfaches über der

Dissoziationskonstante K_D des Aptamers K61 [2.3.2], sodass sowohl eine ausreichende Stabilität des Intramers, als auch eine ausreichende zelluläre Konzentration erreicht wird, um biologische Effekte durch Bindung des Zielproteins ARNO zu ermöglichen.

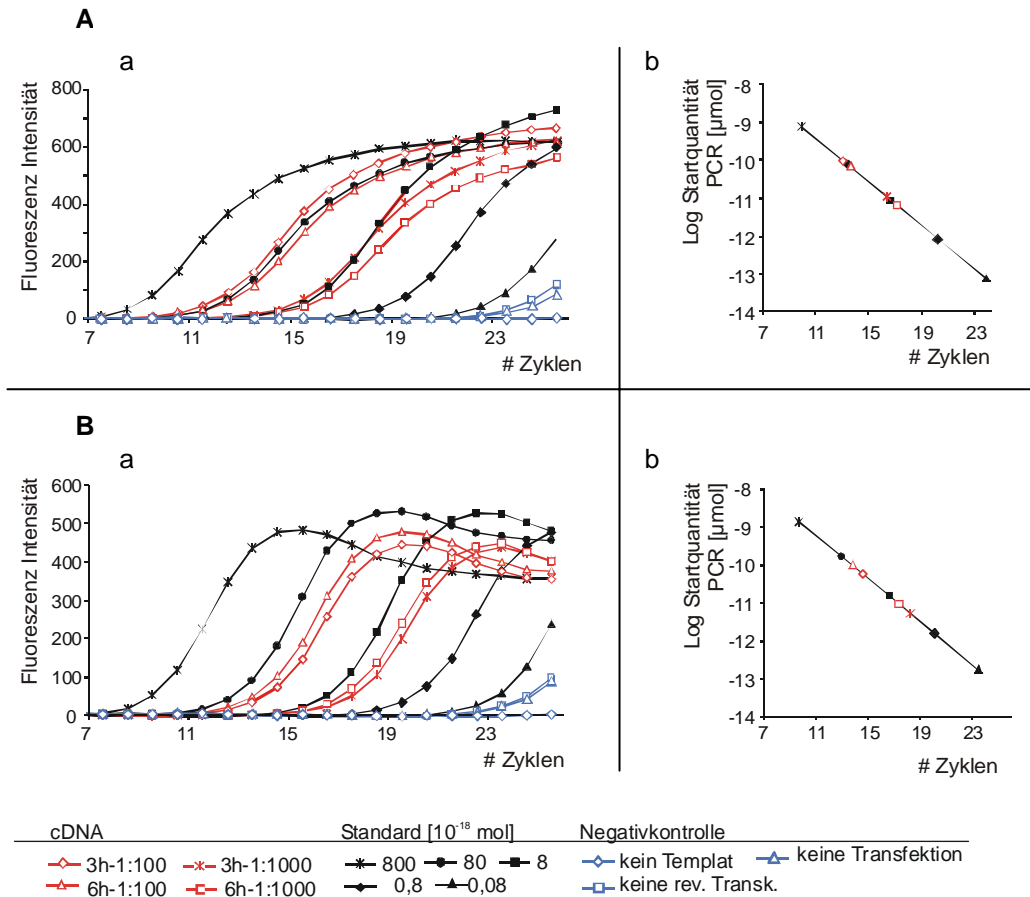


Abb. 2.18: Quantifizierung des Intramers K61 und der Startpool-RNA nach Transfektion in HeLa-Zellen. Nach 3- bzw. 6-stündiger Stimulation der Zellen wurde die total-RNA extrahiert und revers transkribiert. Die cDNA diente 1:100 bzw. 1:1000 verdünnt (rot) als Templat für eine „real-time“-PCR. Die Messkurven (a) der Amplifikation des Aptamers K61 (A) bzw. des Pools (B) zeigen eine spezifische Amplifikation der jeweiligen Template, da sowohl in Abwesenheit von Templat, als auch ohne Transfektion oder reverser Transkription keine Amplifikation zu beobachten war (blau). Die Bestimmung der Startmengen an K61- bzw. Pool-DNA erfolgte anhand einer Reihe von Standardproben bekannter Konzentration (schwarz). Die jeweiligen Eichkurven (b) zeigen eine gute Korrelation zwischen benötigter Zyklenzahl und eingesetzter Templatmenge.

Dieses Ergebnis zeigt, dass das Aptamer K61 nicht modifiziert werden muss, um es als Intramer *in vivo* einzusetzen. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass K61 mit hoher Effizienz in HeLa-Zellen transfiziert werden kann. Dies ermöglicht den Verzicht auf Expressionssysteme und stellt gleichzeitig die Lokalisierung des Aptamers im Cytosol der transfizierten Zelle sicher.

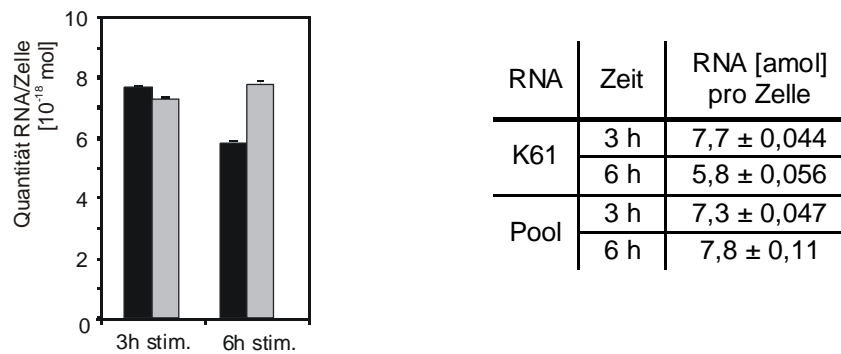


Abb. 2.19: Gehalt an Intramer K61-RNA (schwarz) bzw. Startpool-RNA (grau) in HeLa-Zellen 3- bzw. 6 Stunden nach Stimulation. Man erkennt, dass beide RNA-Spezies eine ähnliche Stabilität *in vivo* aufweisen. Es konnten ca. 7 amol RNA pro Zellen nachgewiesen werden, welches einer Konzentration von ca. 700 nM entspricht. Die Stabilität und Konzentration der RNA im Cytosol ist ausreichend zur Verwendung von K61 als Intramer.

2.5.2 Expressionsstudien von SRE-regulierten Genen

2.5.2.1 Das Intramer K61 und SRE-regulierte Genexpression

Der kleine Guaninnukleotid-Austauschfaktor Cytohesin-1 ist an der Regulation der Genexpression in T-Zellen beteiligt. Dabei erfolgt eine Cytohesin-1 vermittelte Kontrolle der Aktivität des MAP-Signalweges in Abhängigkeit von LFA-1^[134, 135] [1.4.2]. Obwohl Cytohesin-1 und -2 homolog sind, ist eine Beteiligung von ARNO an der Expressionsregulation bisher nicht bekannt.

Der MAP-Signalweg reguliert eine Fülle unterschiedlicher Gene, unter denen der Transkriptionsfaktor c-Fos eine wichtige Stellung einnimmt [1.3.1]. Die Expression von c-Fos nach Stimulation durch Mitogene oder Wachstumsfaktoren wird u. a. durch das „serum response element“ (SRE) vermittelt, welches in der Promotorregion des c-Fos Genes enthalten ist^[110, 111].

Das Aptamer K61 bindet mit hoher Affinität an ARNO und diskriminiert gegenüber Cytohesin-1 [2.3.2]. Weiterhin ist K61 *in vivo* stabil und kann leicht durch Lipofektion in HeLa-Zellen eingebracht werden [2.5.1]. Daher ist K61 geeignet zur biologischen Funktionsaufklärung von ARNO. Die hohe Spezifität des Intramers ermöglicht dabei eine Abgrenzung der biologischen Effekte innerhalb der Klasse der kleinen GEF.

Zur Analyse der SRE-kontrollierten Genexpression wurde ein Assay angewandt, der auf Luciferase als Reportergen basiert. Das Strukturgen von Luciferase liegt dabei unter der

Kontrolle des „*serum response element*“ im Plasmid SRE-Luc [4.10]. Dieses Plasmid wurde mit dem Intramer K61 bzw. mit Startpool-RNA als Negativkontrolle in HeLa-Zellen cotransfiziert. Um das Lumineszenzsignal auf die Transfektionseffizienz normieren zu können, wurde diesem Transfektionsgemisch ebenfalls das Plasmid pEGFP-N1 [4.10] zugesetzt. Dieses Plasmid enthält das Strukturgen des „*enhanced green fluorescent protein*“ (EGFP) unter der Kontrolle eines humanen Cytomegalovirus (CMV) Promotors. Weiterhin erfolgte eine Normierung des Lumineszenzsignales auf die Proteinkonzentration der Probe, um Schwankungen in der Lysiseffizienz auszugleichen.

Wie in Abbildung 2.20 A zu erkennen, führt die Transfektion des Intramers K61 zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition der serumstimulierten Luciferase Expression. Da alle Werte auf die Poolkontrolle normiert wurden, liegt ein sequenzspezifischer Effekt vor. Der endogene Level an Luciferase konnte durch Transfektion von 3 pmol Intramer auf 24 % bezogen auf die Poolkontrolle gesenkt werden. In Abwesenheit des Intramers und ohne Stimulation mit Wachstumsfaktoren konnte eine Hintergrundexpression von ebenfalls 24 % bezogen auf eine stimulierte Kontrolle beobachtet werden. Berücksichtigt man diese serumunabhängige Hintergrundexpression, wird eine vollständige Inhibition der SRE-kontrollierten Genexpression durch 3 pmol Intramer K61 erreicht.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Cytohesin-2 ein positiver Effektor von Signaltransduktionswegen ist, die durch Wachstumsfaktoren stimuliert werden können.

Um sicherzustellen, dass der Phänotyp tatsächlich durch Inhibition von ARNO und nicht durch sekundäre Effekte verursacht wurde, erfolgte ein „*rescue*“ durch Überexpression von ARNO. Hierzu wurden das Plasmid pRK-wtARNO [4.10] und 3 pmol K61 cotransfiziert. Dabei war eine konzentrationsabhängige Wiederherstellung der ARNO-Aktivität durch das Plasmid pRK-wtARNO zu beobachten (Abb. 2.20 B). Bereits 1 µg Plasmid war ausreichend um die Aktivität von ARNO vollständig zu retten. Als Negativkontrolle wurden 2 µg des Plasmides pRK-wtARNO in Abwesenheit von RNA transfiziert, welches keinen Effekt auf den endogenen Luciferaselevel hatte.

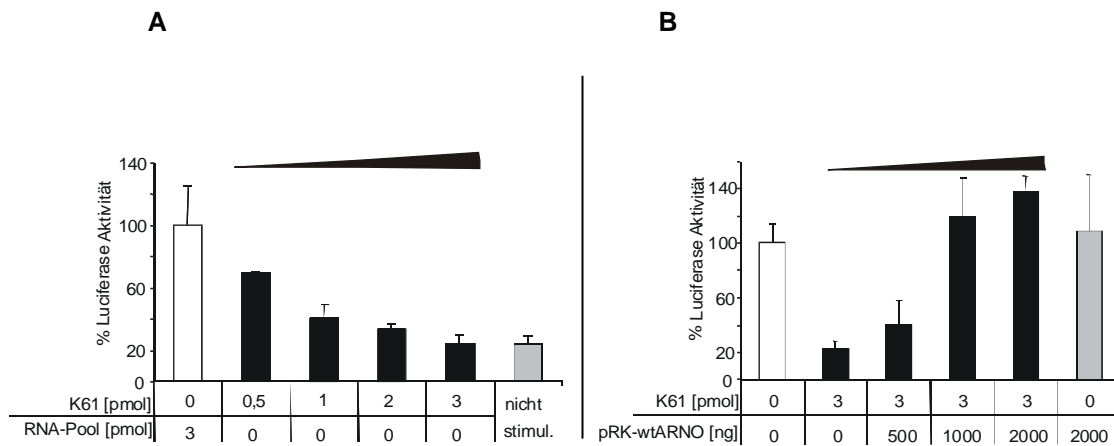


Abb. 2.20: Effekte des Intramers K61 auf die SRE-regulierte Genexpression. (A) Die Transfektion von K61 verursacht eine konzentrationsabhängige Inhibition der SRE-regulierten c-Fos Expression (schwarz). Dabei reduzieren 3 pmol Intramer die serumstimulierte Expression von c-Fos auf das gleiche Niveau wie in Abwesenheit von Serum (grau). Als Negativkontrolle diente die unselektierte Bibliothek I-N40 (weiß), auf die alle anderen Werte normiert wurden. (B) Die Inhibition der c-Fos Expression lässt sich durch eine Überexpression von ARNO retten (schwarz). Bereits eine Menge von 1000 ng des Plasmides pRK-wtARNO ist ausreichend um die Aktivität von ARNO vollständig wiederherzustellen. Alle Werte wurden auf eine Kontrolle in Abwesenheit von pRK-wtARNO und K61 normiert (weiß). Als Negativkontrolle dienten 2 µg des Plasmides pRK-wtARNO in Abwesenheit von RNA.

2.5.2.2 Die Mutante ARNO[E156K] und SRE-regulierte Genexpression

Das Intramer K61 bindet an Cytohesin-2 unter *in vivo* Bedingungen und führt zu einer Inhibition der Expression von c-Fos [2.5.2.1]. Da die Bindung von K61 an das Zielprotein ARNO *in vitro* keine Auswirkung auf die Aktivität der Sec7-Domäne hat [2.4.3.1], wurde die Bedeutung des Guaninnukleotid-Austausches für die Transkriptionsregulation untersucht.

Die intrinsische Austauschaktivität der Sec7-Domäne kann durch eine Punktmutation der Glutaminsäure 156 zu Lysin stark reduziert werden^[132]. Diese Mutante wurde in das Plasmid N1 unter der Kontrolle eines CMV-Promotors kloniert [4.10]. Anschließend wurden steigende Mengen (300-2000 ng) dieses Plasmides in HeLa-Zellen transfiziert. Die Durchführung des Luciferase-Aktivitätsassays erfolgte dann wie in 2.5.2.1 beschrieben.

Die dominant negative Expression der Mutante E156K führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der SRE-kontrollierten Luciferaseexpression (Abb. 2.21). Die Transfektion von 2 µg des Plasmides N1-ARNO[E156K] war

ausreichend um die Luciferaseaktivität auf 27 % zu reduzieren. Diese Reduktion entspricht ungefähr der Restaktivität von Luciferase nach Transfektion von 3 pmol des Intramers K61 [2.5.2.1].

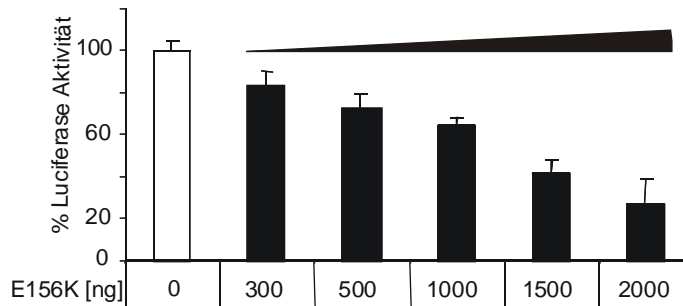


Abb. 2.21: Überexpression der GEF-defizienten Mutante ARNO[E156K] resultiert in einer konzentrationsabhängigen Inhibition der c-Fos Expression (schwarz). Die Transfektion von 2 µg des Plasmides N1-ARNO[E156K] reduziert die Luciferaseaktivität auf 27 % im Vergleich zu einer Kontrolle in Abwesenheit von ARNO [E156K] (weiß).

Dieses Ergebnis bestätigt die Funktion von Cytohesin-2 als positiven Effektor der Expression von SRE-regulierten Genen. Da die Mutante E156K ausschließlich GEF-defizient ist, kann von einer Beteiligung der Sec7-Domäne an der Transkriptionsregulation durch ARNO ausgegangen werden.

2.5.3 Aktivitätsassay des MAP-Signalweges

2.5.3.1 Das Intramer K61 und die Anti-ARNO siRNA366

ARNO ist an der Kontrolle der SRE-regulierten Genexpression in HeLa-Zellen beteiligt [2.5.2.1; 2.5.2.2]. Die Inhibition von ARNO verursacht eine Reduktion des endogenen Levels von SRE-kontrollierten Genen.

Der MAP-Kinase Signalweg koppelt Signale von Zelloberflächenrezeptoren an die Expression von Genen. Diese Signaltransduktionskaskade ist für ihre Beteiligung an der Regulation von Transkriptionsfaktoren bekannt, die an das „*serum response element*“ binden^[111]. Um die Beteiligung von Cytohesin-2 an dieser Signalkaskade zu klären und um die Frage zu beantworten, ob die Aktivität von MAP-Kinasen durch Inhibition von ARNO verändert werden kann, wurden HeLa-Zellen jeweils mit dem Intramer K61 und der spezifischen Anti-ARNO siRNA366 transfiziert (Design s. Abb. 2.23A). Nach der

Stimulation mit Serum wurde die intrinsische Aktivität der MAP-Kinasen Erk1 und -2 anhand des p42/p44 MAP-Kinase-Assays bestimmt, dessen Aufbau in Abbildung 2.22 schematisch dargestellt ist.

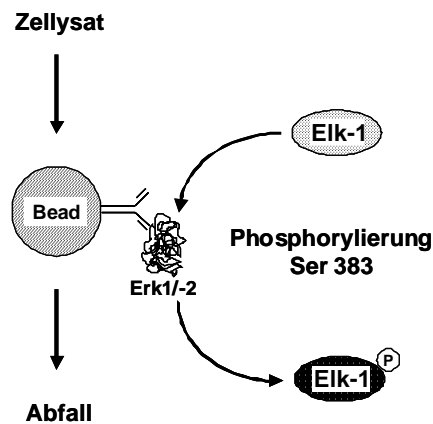


Abb. 2.22: Schematische Darstellung des p42/p44 MAP-Kinase-Assays. Nach Transfektion und Stimulation wurden die Zellen geerntet und mit sepharosegekoppelten Erk1/-2 Antikörpern inkubiert. Nach Abtrennung des übrigen Zellsates wurde die Sepharose direkt mit rekombinantem Elk-1 inkubiert, welches hierbei phosphoryliert wurde. Die Menge an phosphoryliertem Elk-1 korreliert mit der MAPK-Aktivität und wurde durch Western-Blot Analysen in Kombination mit densitometrischen Messungen bestimmt.

Hierbei wurden Erk1/-2 zunächst mittels sepharosegekoppelter Anti-Erk1/2 Antikörper immunpräzipitiert und anschließend mit einer verkürzten Variante des physiologischen Substrates Elk-1 inkubiert. Der Phosphorylierungsgrad von Elk-1 ist proportional zur MAP-Kinase-Aktivität und wurde in einem Western Blot mittels eines spezifischen Anti-pElk-1 (Ser383) Antikörpers detektiert [5.13]. Die quantitative Auswertung erfolgte densitometrisch in einem PhosphorImager.

Das Intramer K61 und die siRNA366 [4.11.3] reduzieren die MAP-Kinase-Aktivität auf jeweils 26 % bzw. 6 % im Vergleich zur Poolkontrolle (Abb. 2.23B2). Somit ist Cytohesin-2 an der Regulation der Aktivität von Kinasen des MAP-Signalweges beteiligt. Weiterhin bestätigen diese Beobachtungen die Ergebnisse des SRE-Luciferaseassays [2.5.2.1]. Interessant ist die Tatsache, dass durch die Verwendung von siRNA die gleichen Effekte erzielt werden konnten wie durch das Intramer K61.

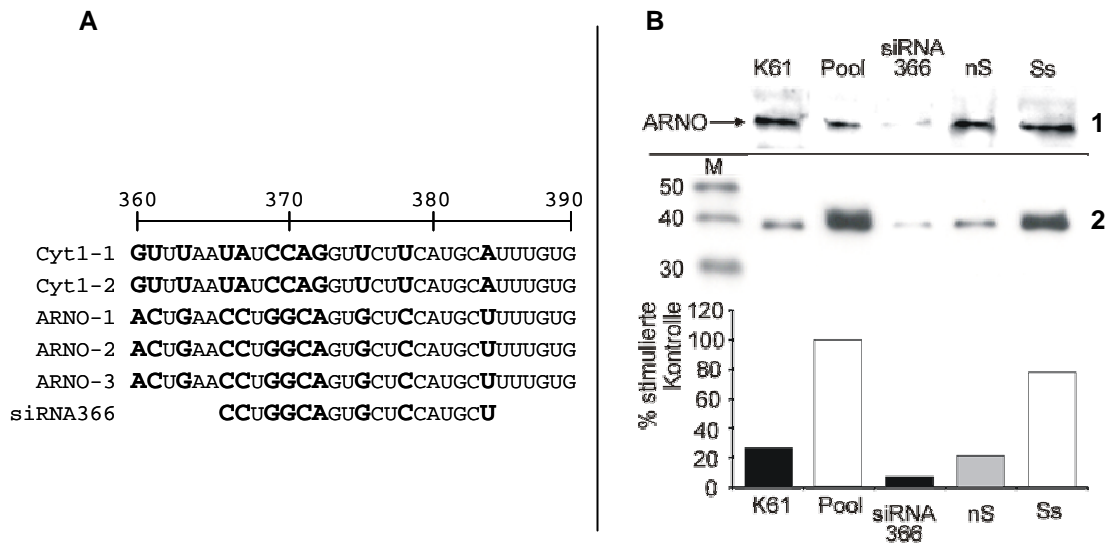


Abb. 2.23: Bestimmung der Aktivität der MAP-Kinasen Erk1 und -2 nach Transfektion des Intramers K61 und der Anti-ARNO siRNA366. (A) Sequenzvergleich der mRNA verschiedener Isoformen von ARNO und Cytohesin-1. Die siRNA366 unterscheidet sich an dieser Position um 9 Basen (fett) von der Cytohesin-1 mRNA-Sequenz. Die dargestellten Sequenzen entsprechen den folgenden Einträgen in der EBI Datenbank: Cyt1-1: BC050452; Cyt1-2: NM_017456; ARNO-1: BC038713; ARNO-2: U70728; ARNO-3: NM_004228. (B2) Die ARNO-Inhibitoren K61 und siRNA366 wurden in HeLa-Zellen transfiziert und nach Serumstimulation wurden die MAP-Kinasen Erk1 und -2 immunpräzipitiert. Nach Inkubation mit Elk-1 erfolgte die Bestimmung der intrinsischen Kinaseaktivität von Erk1 und -2 durch Western Blot mittels eines spezifischen Anti-pElk-1 (Ser383) Antikörpers. Die quantitative Auswertung erfolgte densitometrisch auf einem PhosphorImager. Die Aktivität der MAP-Kinasen konnte durch K61 und siRNA366, bezogen auf eine Negativkontrolle mit Startpool-RNA, auf 26 % bzw. 6 % erniedrigt werden. Als Positivkontrolle dienen serumstimulierte Zellen, als weitere Negativkontrolle unstimulierte Zellen. (B1) Der Expressionslevel von ARNO wurde durch den spezifischen Anti-ARNO Antikörper Cyt2-21 in einem Western Blot bestimmt. Man erkennt, dass der endogene Level an ARNO durch die siRNA366 reduziert wurde, während die übrigen Effektoren keinen Einfluss auf die ARNO-Expression zeigten.

Um auszuschließen, dass die Inhibition der Erk-Kinasen durch das Intramer K61 auf einer Modulation des Expressionslevels von ARNO beruhte, wurde die Menge an endogenem Cytohesin-2 mittels des ARNO-spezifischen Antikörpers Cyt2-21 in den gleichen Proben quantifiziert, die auch für den in Abb. 2.23B2 dargestellten Assay verwendet wurden. Wie in Abb. 2.23B1 zu erkennen, beeinflusst lediglich die siRNA366 den ARNO-Expressionslevel, während in den übrigen Präparationen keine Veränderung des Cytohesin-2 Levels - bezogen auf die Kontrollen - zu beobachten ist.

2.5.3.2 Das Intramer M69 und die Anti-Cytohesin-1 siRNA756

Der kleine Austauschfaktor ARNO ist an der Regulation der Genexpression über den MAP-Kinase Signalweg beteiligt [2.5.3.1]. Da bereits eine Transkriptionsregulation von Interleukin-2 durch Cytohesin-1 beschrieben wurde^[134, 135], könnte eine ähnliche Funktion auch in Nicht-Immunzellen übernommen werden.

Um Unterschiede in der biologischen Funktion einzelner kleiner GEF genauer zuordnen zu können, wurde die Aktivität der MAP-Kinasen Erk1 und -2 nach Transfektion des Intramers M69^[42] und der spezifischen Anti-Cytohesin-1 siRNA756 (Design s. Abb. 2.24A) mittels des in 2.5.3.1 beschriebenen Assays untersucht. Das Intramer M69 bindet sowohl an Cytohesin-1 als auch an Cytohesin-2, diskriminiert aber gegenüber der Klasse der großen GEF. Da M69 direkt an die Sec7-Domäne bindet, inhibiert es die intrinsische Austauschaktivität sowohl *in vitro* als auch *in vivo*^[42].

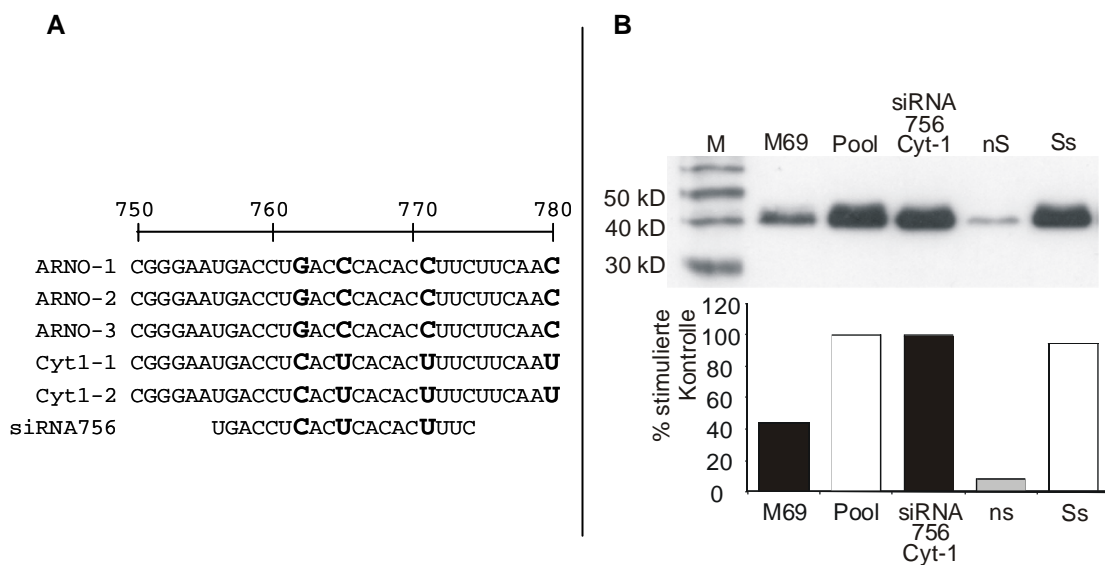


Abb. 2.24: Bestimmung der Aktivität der MAP-Kinasen Erk1 und -2 nach Transfektion des Intramers M69 und der Anti-Cytohesin-1 siRNA756. (A) Sequenzvergleich der mRNA verschiedener Isoformen von ARNO und Cytohesin-1. Die siRNA756 unterscheidet sich an dieser Position um drei Basen (fett) von der ARNO mRNA-Sequenz. Die dargestellten Sequenzen entsprechen den folgenden Einträgen in der EBI Datenbank: Cyt1-1: BC050452; Cyt1-2: NM_017456; ARNO-1: BC038713; ARNO-2: U70728; ARNO-3: NM_004228. (B) Der GEF-Inhibitor M69 und die siRNA756 wurden in HeLa-Zellen transfiziert und nach Serumstimulation wurden die MAP-Kinasen Erk1 und -2 immunpräzipitiert. Nach Inkubation mit Elk-1 erfolgte die Bestimmung der intrinsischen Kinaseaktivität von Erk1 und -2 durch Western Blot mittels eines spezifischen Anti-pElk-1 (Ser383) Antikörpers. Die quantitative Auswertung erfolgte densitometrisch auf einem Phosphorimager. Die Aktivität der MAP-Kinasen konnte durch M69, bezogen auf eine Negativkontrolle mit Startpool-RNA halbiert werden. Die siRNA756 hingegen hatte keinen Einfluss auf die MAPK-Aktivität. Als Positivkontrolle dienten serumstimulierte Zellen, als weitere Negativkontrolle unstimulierte Zellen. M: Proteinstandard

Wie in der Abbildung 2.24B dargestellt, blockierte das Intramer M69 die MAP-Kinase Aktivierung nach Serumstimulation ebenso effektiv wie das Intramer K61 und die Anti-ARNO siRNA366. Dies ist neben den Studien mit der dominant negativen Mutante E156K [2.5.2.2] ein weiterer Hinweis darauf, dass die Austauschaktivität der Sec7-Domäne entscheidend an der Transkriptionsregulation über den MAP-Signalweg beteiligt ist. Weiterhin bestätigen diese Experimente die bereits im SRE-Luciferase Assay [2.5.2.1] und im Aktivitätsassay [2.5.3.1] beobachteten Effekte.

Interessant erscheint, dass die Anti-Cytohesin-1 siRNA 756 keine Reduktion der MAP-Kinase Aktivität verursacht. Da die siRNA756 ausschließlich den Expressionslevel von Cytohesin-1 beeinflusst und den endogenen Level an ARNO unverändert lässt (Prof. Dr. W. Kolanus, persönliche Mitteilung) führt dies zur Schlussfolgerung, dass Cytohesin-1 und ARNO, obwohl sehr homolog, keine redundanten Funktionen in Nicht-Immunzellen übernehmen. Somit ist die Kontrolle der Genexpression über den MAP-Signalweg in Nicht-Immunzellen auf ARNO beschränkt.

Kapitel 3 Diskussion

3.1 In vitro Selektion

Die Analyse der biologischen Funktion von Proteinen und ihrer Wechselwirkung in komplexen regulatorischen Netzwerken ist von zentraler Bedeutung im Verständnis zellulärer Prozesse [1.1].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Klasse der kleinen Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF) studiert, welche an einer Reihe verschiedener Signalkaskaden beteiligt ist. Die einzelnen Mitglieder dieser Klasse besitzen große Homologien auf Struktur- und Sequenzebene. Trotzdem wurden bereits einige Unterschiede in der biologischen Funktion einzelner GEF-Proteine beschrieben [1.4.2]. Die Beteiligung an unterschiedlichen zellulären Prozessen, wie Vesikeltransport, Zelladhäsion oder Expressionskontrolle macht diese Proteinfamilie so interessant und die Zuordnung der Funktion zu einzelnen Austauschfaktoren ist für das Verständnis dieser Abläufe von großer Bedeutung. Leider sind die Möglichkeiten zur Analyse gegenwärtig limitiert; es stehen keine Inhibitoren einzelner Proteine dieser Klasse zur Verfügung.

Aus diesem Grund wurde unter Verwendung von *in vitro* Selektion [1.2.2], ein RNA-Aptamer selektiert, das ARNO unter Diskriminierung von Cytohesin-1 bindet [2.3.2]. Da ARNO und Cytohesin-1 große Sequenzhomologien aufweisen [Abb. 1.3], stellt die Selektion spezifischer Aptamere eine Herausforderung dar. Daher wurde eine Selektionsstrategie verwendet, die auf einer Kombination aus Selektion gegen ARNO und „counter“-Selektion gegen Cytohesin-1 basiert [Abb. 2.3]. Durch dieses Verfahren konnten Aptamere angereichert werden, die unter Beteiligung der Coiled-coil- und Teilen der Sec7-Domäne spezifisch an Cytohesin-2 binden [2.4.2.3].

Die Übergangsregion zwischen Coiled-coil- und Sec7-Domäne weist die größte Diversität zwischen Cytohesin-1 und -2 auf und könnte daher für die Vermittlung von biologischen Funktionsunterschieden verantwortlich sein [1.4.2]. Aptamere welche diese Proteinregion binden, können daher zur Charakterisierung funktionaler Unterschiede von Cytohesin-1 und -2 verwendet werden. Dabei erscheint besonders interessant, dass das häufigste Aptamer der Selektion K61 weder die intrinsische Sec7-Austauschaktivität [2.4.3.1], noch die Aktivität der PH-Domäne [2.4.3.2] moduliert.

K61 erlaubt somit nicht nur die Analyse von Unterschieden in der Funktion von Cytohesin-1 und -2, sondern auch die Zuordnung biologischer Effekte zur Übergangsregion zwischen der Coiled-coil- und der Sec7-Domäne.

3.2 Die Applikation von K61 *in vivo*

Aptamertechnologie zeichnet sich gegenüber anderen Verfahren vor allem durch die Vielseitigkeit der Anwendung aus [1.2.2]. So binden Aptamere ihr Zielprotein nicht nur *in vitro*, sondern auch im Kontext einer lebenden Zelle^[25, 57] [1.2.2.1]. Aus diesem Grund konnten sich Aptamere als spezifische Modulatoren zellulärer Prozesse etablieren und ihr Verwendungsspektrum wird stetig erweitert^[70, 71].

Allerdings weist die Intramertechnologie gegenwärtig gewisse Einschränkungen auf. So können RNA-Spezies die Plasmamembran nicht durchdringen und müssen daher intrazellulär exprimiert werden. Dies kann beispielsweise durch das Einbringen der genetischen Information für ein Aptamer über eine Virusinfektion der Zielzelle stattfinden^[72]. Verwendet man Vaccinia Viren als Vektor, findet die Expression des Intramers direkt im Cytosol statt und gewährleistet eine hohe Konzentration des Aptamers im Zielkompartiment. Nachteilig ist jedoch, dass bereits durch die Infektion sekundäre Effekte hervorgerufen werden können, die mit der Aptamerbindung nicht ursächlich im Zusammenhang stehen.

Eine alternative Strategie verzichtet daher auf die Virusinfektion und verwendet Expressionsplasmide, welche direkt in die Zielzelle eingebracht werden. Diese erfahren allerdings eine Translokation in den Nukleus, sodass die Expression des Intramers im Kern stattfindet. Daher ist dieses Verfahren vor allem für die Inhibition von Kernproteinen geeignet, denn das Adressieren cytosolischer Proteine erfordert die Verwendung von Kernexportsignalen^[73, 161].

In der vorliegenden Arbeit wurden diese Beschränkungen der Intramertechnologie überwunden. Es konnte gezeigt werden, dass das Intramer K61 durch Lipofektion in eukaryontische Zellen eingebracht werden kann [2.5.1]. Auf diese Weise gelangt es direkt ins Cytoplasma, was eine bessere Kontrolle der intrazellulären Konzentration erlaubt, da völlig auf die zelluläre Transkriptionsmaschinerie verzichtet werden kann. Diese Methode ist nicht nur schonender, sodass viele sekundäre Effekte vermieden

werden, sondern ist auch technisch einfacher durchzuführen. So muss nicht für jedes Aptamer ein gentechnisch veränderter Virus bzw. ein Expressionsplasmid hergestellt werden. Der zelluläre Einsatz von Intrameren wird somit vereinfacht und die biologische Charakterisierung von intrazellulären Zielstrukturen beschleunigt.

Aufgrund der Anwesenheit von Ribonukleasen im Cytosol werden Aptamere in der Regel gegen Degradierung geschützt, indem beispielsweise 5'- und 3'-seitig terminale Haarnadelstrukturen angebracht werden^[72]. Allerdings können diese die Bindungseigenschaften eines Aptamers nachteilig beeinflussen, sodass stets eine Überprüfung des modifizierten Aptamers vorgenommen werden muss.

Interessant ist daher, dass K61 ohne jede Modifizierung mehrere Stunden intrazellulär nachgewiesen werden konnte [Abb. 2.19]. Dies war nicht nur für K61 der Fall, sondern gilt ebenfalls für den randomisierten Startpool I-N40 [2.5.1]. Da also die intrazelluläre Stabilität von RNA in HeLa-Zellen nicht sequenzabhängig zu sein scheint, sollten auch andere Intramere eine ähnliche Stabilität aufweisen, sodass eine Vielzahl an cytosolischen Zielproteinen durch Aptamere adressiert werden könnten, ohne dass diese zuvor modifiziert werden müssen. Obwohl sicherlich von einer Zelltypabhängigkeit der intrazellulären Stabilität von RNA-Aptameren auszugehen ist - so konnte durch Lee et al.^[162] eine hohe Labilität von Aptameren in *Escherichia coli* nachgewiesen werden - scheint zumindest für HeLa-Zellen eine gute Ausgangssituation für die Verwendung von unmodifizierten RNA-Aptameren vorzuliegen. Dies könnte eventuell auch für andere Eukaryontenzellen zutreffen.

3.3 Die biologische Funktion von ARNO in HeLa-Zellen

Cytohesin-1 und -2 sind vielseitige zelluläre Effektoren, deren Funktion weit über die Katalyse der Austauschreaktion an ADP-Ribosylierungsfaktoren (ARF) hinausgeht. Dabei nehmen diese immer mehr den Charakter von Schaltmodulen zellulärer Prozesse an, da die Aktivität mehrere Signalkaskaden auf Ebene der kleinen GEF konvergiert [1.4]. So moduliert Cytohesin-1 die Aktivität von Integrinen und katalysiert ebenfalls die ARF-Aktivierung^[133], sodass eine funktionale Beziehung zwischen der Zelladhäsion und der ARF-vermittelten Reorganisation des Actincytoskeletts oder des Vesikeltransportes hergestellt wird^[113, 117]. Neben dieser Signaltransduktion in „inside-out“-

Richtung ist Cytohesin-1 ebenfalls an der Transduktion in „*outside-in*“-Richtung beteiligt. So konnte Perez et al.^[134] zeigen, dass die Stimulation von T-Zellen über LFA-1 mit ICAM-2 bei Costimulation an CD3 bzw. CD28 zu einer Cytohesin-1 abhängigen Aktivierung des MAP-Signalweges führt. Dies wurde durch einen Peptid-Antagonisten gezeigt, welcher die Phosphorylierung von Cytohesin-1 inhibierte.

Die MAP-Kaskade ist an der Regulation einer Fülle verschiedener Gene beteiligt, die u. a. die T-Zellaktivierung und -differenzierung vermitteln. So wird die Expression von Interleukin-2 (IL-2) durch Cytohesin-1 u. a. über die MAP-Kinasen Erk1 und -2 reguliert^[135]. In der Promotorregion des IL-2-Genes befindet sich u. a. die Erkennungssequenz des Transkriptionsfaktors AP-1, welcher ein Heterodimer aus c-Fos und c-Jun ist. Dabei wird die Aktivität von c-Fos in zweierlei Hinsicht durch Erk-Kinasen reguliert. Zum einen kann c-Fos direkt von Erk-Kinasen phosphoryliert werden, zum anderen wird der Expressionslevel von c-Fos durch Regulation des „*serum response element*“ (SRE) in der Promotorregion des c-Fos Proto-onkogens moduliert^[110, 111, 163-166].

In der vorliegenden Studie konnte erstmals eine Beteiligung von ARNO an der Expressionsregulation von c-Fos nach Stimulation des MAP-Signalweges durch Wachstumsfaktoren in Nicht-Immunzellen nachgewiesen werden [Abb. 2.20]. So führt die ARNO-Inhibition durch das Intramer K61 zu einer Reduktion der Erk1/-2 Aktivierung, welches in der Blockierung der serum-stimulierten Expression von SRE-regulierten Genen mündet [Abb. 2.23].

Diese Beobachtung stellt also nicht nur Cytohesin-1, sondern auch ARNO als Effektor der MAPK-Aktivität dar. Allerdings erlaubt sie keine Aussagen über die mechanistischen Grundlagen.

Das Verständnis der Abläufe, welche an der Expressionsregulation beteiligt sind, könnte jedoch wichtige Hinweise zur Aufklärung von Regulationsmechanismen liefern. Aus diesem Grund wurde die Sec7-defiziente Mutante ARNO[E156K] in HeLa-Zellen überexprimiert, was ebenfalls den endogenen Level an SRE-regulierten Genen deutlich reduzierte [Abb. 2.21]. Da die Funktion der übrigen Domänen durch die Punktmutation nicht berührt wird^[132], kann die Sec7-Austauschaktivität als wichtige Voraussetzung für die Signaltransduktion nach der Stimulation mit Wachstumsfaktoren angesehen werden. Ein Befund, der ebenfalls durch das Intramer M69 bestätigt werden konnte. Dieser von

Mayer et al.^[42] etablierte GEF-Inhibitor blockiert die Aktivität der Sec7-Domäne *in vivo* und *in vitro*.

Das Aptamer K61 bindet an die Übergangsregion zwischen der Coiled-coil- und der Sec7-Domäne von Cytohesin-2 [2.4.2.3] und beeinflusst die intrinsische GEF-Aktivität der Sec7-Domäne nicht [2.4.3.1]. Trotzdem erfolgt eine Inhibition der Genexpression durch K61, was darauf hindeutet, dass die Coiled-coil-Domäne an der ARNO-Signaltransduktion oder der Modulation der Sec7-Austauschaktivität beteiligt ist.

Physiologisch wird die Coiled-coil-Domäne durch eine Reihe verschiedener Interaktoren gebunden [1.4.2], deren Wechselwirkung mit ARNO durch das Aptamer K61 moduliert werden könnte. Auf diese Weise würde beispielsweise eine Störung der Cytohesin-2 Lokalisierung oder eine Verringerung der intrinsischen Sec7-Austauschaktivität *in vivo* durch das Aptamer hervorgerufen. Beide Effekte wurden bereits für Coiled-coil-Interaktoren beschrieben^[137-142].

Wenn also sowohl Cytohesin-1 als auch ARNO die Aktivität des MAP-Signalweges beeinflussen, ist die Funktion dieser GEF-Proteine in Bezug auf die Expressionskontrolle redundant?

ARNO und Cytohesin-1 sind sowohl in Immun- als auch in Nichtimmunzellen exprimiert. Allerdings konnte für ARNO keine Interaktion mit Integrinen detektiert werden (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Kolanus). Andererseits führt die Inhibition von ARNO in CD3- und PMA-stimulierten Jurkat-Zellen zu einer Verminderung der MAPK-Aktivität (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Kolanus). Daher liegt die Vermutung nah, dass zumindest in Bezug auf die Regulation des MAP-Signalweges ARNO und Cytohesin-1 in Immunzellen eine ähnliche Funktion übernehmen.

In der vorliegenden Studie wurde eine Beteiligung von ARNO an der MAPK-Aktivität in Nichtimmunzellen nachgewiesen, jedoch scheint Cytohesin-1 in HeLa-Zellen kein Effektor der MAP-regulierten Genexpression zu sein [Abb. 2.24].

Dieses unerwartete Ergebnis deutet darauf hin, dass eine überlappende Funktion von Cytohesin-1 und -2 in Immunzellen, aber eine Trennung der physiologischen Aufgaben in Nichtimmunzellen vorliegt.

Die einzelnen Coiled-coil-Interaktoren weisen unterschiedliche Expressionsmuster in verschiedenen Zelltypen auf und könnten daher die Funktionsdiversität der kleinen GEF zelltypabhängig vermitteln. So konnten Boehm et al.^[141] eine Relokation von

Cytohesin-1 ins Cytosol nach Überexpression von CYTIP in Immunzellen feststellen, ein Effekt der erwartungsgemäß zu einer Reduktion der Integrin-vermittelten Zelladhäsion an ICAM-1 führte. Im Gegensatz hierzu stellte Venkateswarlu et al.^[142] eine IPCEF1 (*interaction protein for cytohesin exchange factors*) [1.4.2] vermittelte Rekrutierung von ARNO an die Plasmamembran nach EGF-Stimulation in Nicht-immunzellen fest.

Aus diesen Beobachtungen wurde ein Modell der Funktionscharakteristika von ARNO und Cytohesin-1 in HeLa-Zellen abgeleitet, das in Abbildung 3.1 dargestellt ist.

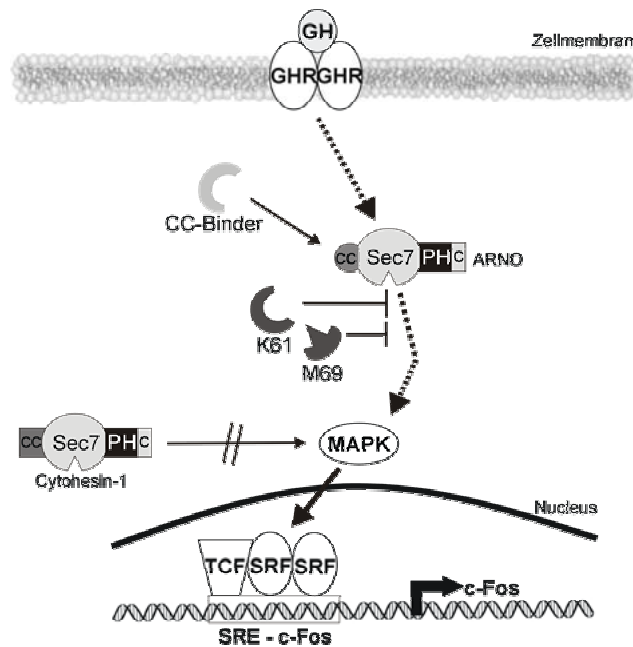


Abb. 3.1: Beteiligung von ARNO an der Signaltransduktion über den MAP-Signalweg in HeLa-Zellen. ARNO ist ein positiver Effektor der MAPK-Aktivität in HeLa-Zellen, während das homologe Cytohesin-1 eine solche Funktion nicht übernimmt. Die beiden Intramere K61 und M69 inhibieren die Funktion von ARNO, sodass sowohl eine Beteiligung der Coiled-coil- als auch der Sec7-Domäne an der Signaltransduktion angenommen werden kann. Die Wechselwirkung mit Coiled-coil-Interaktoren verursacht eine Modulation der GEF-Aktivität, welches zelltypabhängige Unterschiede von Cytohesin-1 und -2 erklären könnte. Die MAP-Kaskade reguliert u. a. die Funktion des Proto-onkogens c-Fos, dessen Expression durch das SRE kontrolliert wird. GH: Wachstumsfaktoren; GHR: Rezeptor für Wachstumsfaktoren; CC: Coiled-coil-Domäne; TCF: ternary complex factor; SRF: serum response factor; SRE: serum response element

Die Stimulation mit Wachstumsfaktoren (GH) führt zur Induktion der Expression von SRE-regulierten Genen. Dabei wird dieses Signal über die MAP-Kaskade intrazellulär transduziert. ARNO ist in Nichtimmunzellen ein positiver Effektor dieser Signal-

transduktion, während Cytohesin-1 nicht beteiligt zu sein scheint. Mechanistisch ist diese Funktion von ARNO an das Vorhandensein der Sec7-Austauschaktivität gekoppelt, deren Modulation entweder intrinsisch oder mittels Relokation durch Coiled-coil Binder verändert wird.

In weiterführenden Studien könnte nun eine Analyse der GEF-vermittelten Signaltransduktion erfolgen, indem beispielsweise die Wachstumsfaktor-Rezeptoren (GHR) identifiziert werden, die an der ARNO-vermittelten Regulation der Genexpression beteiligt sind. Dies jedoch wird durch die Tatsache erschwert, dass eine Vielzahl an Zellmembranrezeptoren an der Regulation des MAP-Signalweges beteiligt sind. Entsprechend sind die Faktoren welche eine intrazelluläre Transduktion eines solchen Signals vermitteln vielfältig. Diese reichen von der Klasse der Tyrosinkinasen bis zu sekundären Botenstoffen wie cAMP oder Calciumkationen [1.3.1].

Einen Anhaltspunkt liefert die von Li et al.^[167] beschriebene Abhängigkeit der Phospholipase D (PLD) Aktivität von ARNO, nach Stimulation von HIRcB Zellen mit Insulin. Durch Rizzo et al.^[168] wurde eine Insulin-abhängige Stimulation des MAP-Signalweges unter Beteiligung von PLD nachgewiesen. Da ARF1 ein bereits bekannter Effektor der PLD-Aktivität ist^[169], könnte dies durch den Guaninnukleotid-Austausch unter Beteiligung kleiner GEF stromabwärts des Insulin-Rezeptors reguliert werden. So konnte durch Li et al. für ARNO und ARF1 eine Rekrutierung an die Plasmamembran nach Stimulation mit Insulin festgestellt werden. Ein Effekt, welcher mit der PLD-Aktivierung durch Insulin korreliert war^[167]. Interessant erscheint darüber hinaus, dass durch Coimmunpräzipitation eine direkte Wechselwirkung von ARNO mit dem Insulin-Rezeptor nachgewiesen werden konnte, die von einer intakten ARNO-Coiled-coil- und einer intakten PH-Domäne abhängig ist. Die Deletion einer dieser Domänen war ausreichend, eine PLD-Aktivierung nach Insulin-Stimulation zu verhindern.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Aptamer vorgestellt, welches unter Beteiligung der Coiled-coil-Domäne an ARNO bindet und zur Aufklärung der Signalleitung stromabwärts des Insulin-Rezeptors beitragen könnte. Beispielsweise würde eine Modulation der MAP-Aktivität, nach Insulin-Stimulation in An- bzw. Abwesenheit des Intramers K61, die Beteiligung von ARNO an der Signaltransduktion über den Insulin-Rezeptor bestätigen. Auf diese Weise könnten auch andere extrazelluläre Stimuli des MAP-Signalweges eingesetzt werden um eine Einteilung der Rezeptoren in Bezug auf

die Abhängigkeit der jeweiligen Signaltransduktion von der ARNO-Aktivität zu ermöglichen.

3.4 Perspektiven der Aptamer-/Intramertechnologie - Ausblick

Die rasch voranschreitende funktionale Charakterisierung des humanen Genoms und die Analytik des Proteoms verschiedener Zelltypen und pathogener Charakteristika führen zu einem wachsenden Bedarf an Inhibitoren zur biologischen Funktionsaufklärung neuer Proteine. Die Erkenntnisse bei der Analyse wichtiger zellulärer Prozesse wie Proliferation, Apoptose oder maligner Transformation werden immer schneller in die Entwicklung von Therapeutika konvertiert.

Aus diesem Grund sind Technologien, die sowohl in der Validierung von pharmakologischen Zielstrukturen als auch in der Entwicklung von Wirkstoffen eingesetzt werden können von zunehmender Bedeutung.

Die Aptamer-/Intramertechnologie erfüllt diese Voraussetzungen in idealer Weise. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein aptamerbasierter Ansatz verwendet um die biologischen Charakteristika des Austauschfaktors ARNO zu untersuchen. Hierbei wurde das hohe Potential der Intramertechnologie erneut unter Beweis gestellt, aber auch in einigen wichtigen Punkten verbessert. So konnte gezeigt werden, dass Intramere ähnlich gehandhabt werden können wie „*short interfering*“-RNA, eine Technik, welche die spezifische Expressionsinhibition von Proteinen ermöglicht und inzwischen einen hohen Verbreitungsgrad erlangt hat^[24, 170].

Ein wesentlicher Vorteil der Aptamer-/Intramertechnologie im Vergleich zu siRNA-Verfahren liegt in der Verwendbarkeit sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. Darüber hinaus erlaubt die direkte Wechselwirkung des Intramers mit dem Zielprotein eine geringe Verzögerung bei der Ausbildung des Phänotyps, da das Intramer die Zielfunktion des Proteins unmittelbar inhibiert. Im Gegensatz hierzu tritt die Proteininhibition bei siRNA-Verfahren durch Degradation der mRNA ein. Da das bereits in der Zelle exprimierte Protein hiervon unberührt bleibt, tritt ein Phänotyp oftmals erst nach einiger Zeit in Erscheinung. Da diese Verzögerung von der Halbwertszeit des jeweiligen Proteins abhängt, kann die Analyse unterschiedlicher Zielproteine innerhalb eines Assaysystems erschwert sein.

Die Analyse der biologischen Funktionen von Cytohesin-2 unter Verwendung eines spezifischen Intramers ermöglicht erstmals dessen Einordnung als Effektor der MAP-kontrollierten Genexpression. Intramere bieten den Vorteil, dass einzelne Domänen innerhalb eines Multidomänenproteins inhibiert werden können. Dies ist mit genetischen Strategien, aber auch mit siRNA-Verfahren nur schwer möglich, da in der Regel die Information eines kompletten Proteins verändert wird.

Eine besonders interessante Perspektive von aptamerbasierenden Inhibitoren liegt in deren Konvertierung in ein kleines organisches Molekül. Hierzu stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, welche die Hochdurchsatz-Analyse von Aptamer-Proteininteraktionen ermöglichen^[88, 89].

Hartig et al.^[88] stellte eine Methode vor, die unter Ausnutzung eines Aptamers die allosterische Kontrolle von Ribozymen durch das Zielprotein ermöglicht. Dieses System wurde bereits erfolgreich zum Durchsuchen einer Substanzbibliothek eingesetzt, sodass die Bindung eines Aptamers an das HIV-Rev Protein in das kleine organische Molekül Coumermycin A übersetzt werden konnte. Dies kleine Molekül könnte nun als Leitstruktur für die Entwicklung von Therapeutika dienen.

Dabei ist auch die Familie der kleinen GEF für pharmakologische Zielsetzungen nicht uninteressant. So konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals eine Beteiligung von ARNO an der Expressionskontrolle des Proto-onkogens c-Fos nachgewiesen werden. Dabei ist ARNO ein positiver Effektor der MAP-Kaskade, die eine zentrale Bedeutung in der Regulation der Zellproliferation hat. Maligne transformierte Zellen zeigen häufig Veränderungen in diesem Signalweg. So weisen 30 % aller Tumore Mutationen des Proto-onkogens Ras auf^[164], welche zu einer konstitutiven Aktivierung von Ras und damit der MAP-Kaskade führt. Aus diesem Grund wurden Ras-Inhibitoren, wie z.B. die Verbindung R-115777 der Firma Janssen Pharmaceutica entwickelt, die sich bereits in klinischen Studien befindet^[91, 163].

Das Adressieren von ARNO durch Therapeutika könnte eine Ras-unabhängige Möglichkeit zur Modulation der MAPK-Aktivität darstellen und somit als alternative Strategie zu etablierten Verfahren der Krebstherapie angesehen werden.

Kapitel 4 Material

4.1 Geräte

Gerät; Typ	Hersteller
Agarose Gelkammer	Fisher Scientific
Autoklaven; Tecnoclav 50 3850EL; 5075EL	Tecnomara-Fedegari Systec
Blot Apparatur; Trans-Blot SEMI-DRY	Bio-Rad
Entwicklermaschine; TR	Optimax
Extruder	Avestin
FPLC-Kühlschrank; Unichromat1500	UniEquip
FPLC-System; ÄKTA	Amersham Biosciences
Gefriertrockner; CT 110	Heto
Geiger-Zähler; Series900mini-I	Morgan
Gelfiltrationssäule; Econo-Pac P6	Bio-Rad
Geltrockner; Model 583	Bio-Rad
Genetic Analyzer; ABI Prism 310	Perkin Elmer
Handcounter; LB122	Berthold
Hybridisierungsöfen; Si20H	Stuart-Scientific
IMAC-Säulen; HiTrap-Chelating HP	Amersham Biosciences
Inkubationsschüttler; 4430	Innova
Inkubatorschrank; HeraCell	Heraeus
Ionenaustauschsäule; BioScaleQ 5 ml	Bio-Rad
Leersäule HR 16/10	Amersham Biosciences
Lichtmikroskop; Axiovert25	Zeiss
Mikropipetten; research research-Multikanal 30-300µl Multidispenser	Eppendorf Eppendorf Eppendorf
Minifold I	Schleicher & Schuell
Neubauer Zählkammer; T728.1	Roth
Oberflächenplasmonresonanz; Biacore3000	Biacore

PAGE-Apparatur; Mini-Protean 3 Cell	Bio-Rad
PCR-Cycler; Personal Cycler	Biometra
T Gradient	Biometra
T3 Thermocycler	Biometra
pH-Meßgerät; pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Phosphorimager; FLA-3000	Fujifilm
Photometer; Lambda 2S	Perkin Elmer
Pipettierhilfen; Easypet	Eppendorf
Accu-Jet	Brand
Real-Time PCR Cycler; iCycler iQ	Bio-Rad
Reinstwasseranlage; Easy pure UV/UF	Barnstead
Röntgenfilme; BioMax MR	Kodak
Sonifikatorstab; Sonoplus HD70	Bandelin
Spannungsquellen; E865; E833; E802	Consort
Spectrofluorometer; FP6500	Jasco
Speed-Vac; Concentrator 5301	Eppendorf
Spektroskope; POLARstar Optima	bMG
Fluoroskan AscentFL	Labsystems
Sterilbänke; Antares	Kendro
HeraSafe	Heraeus
Sterilisierbrenner; Vulcan	Heraeus
Szintillationszähler; winSpectral 1414	Perkin Elmer
Thermoblock; Block Heater	Stuart-Scientific
Thermomixer; comfort	Eppendorf
Tischschüttler; 3017	GFL
Trockenschrank	WTB-Binder
Überkopfschüttler; Reax2	Heidolph
UV-Transilluminator; IDA	Raytest
Eagle Eye II	Stratagene
Vakuumpumpe; HydroTech	Bio-Rad
Vortexer; 7-2020	NeoLab
Waagen; JL-200 / MK-500C	Chyo Balance

BL1500S	Sartorius
Wasserbad; 1008	GFL
Zentrifugen; 5804R; 5810R; 5417C	Eppendorf
Biofuge 15R	Heraeus
J2-Mi	Beckman

4.2 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
BD Biosciences; BD Falcon Petri-Schalen	BD Biosciences
BD Falcon Kulturplatten 6-, 12-, 24-, 96-well	BD Biosciences
BD Falcon Pipetten 50, 25, 10, 5, 2 ml	BD Biosciences
BD Falcon Zellkulturflasche 75 cm ²	BD Biosciences
BD Falcon Zentrifugenröhrchen 225 ml	BD Biosciences
CM5-Chip	Biacore
Cryoröhrchen	Roth
Dialysesschläuche (MW cut of: 6-8 kDa)	Spectrum
Einwegspritzen	Chirana-Prema / Braun
Extruder-Membranen (Polycarbonat)	Avestin
Glaswolle, silanisiert	Serva
Kanülen	Terumo
MicroSpin G-25 Säule	Amersham Biosciences
Nitrozellulosemembran (Filterbindung); Protran 0,45 µm	Schleicher & Schuell
Nitrozellulosemembran (Western-Blot); Protran 0,1 µm	Schleicher & Schuell
Petrischalen	Nunclon
Pioneer L1-Chip	Biacore
Polyprepsäule	BioRad
Reaktionsgefäße (1,5 ml u. 2,0 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (PCR 0,2 u. 0,5 ml)	Eppendorf
Skalpelle	Bayha
Spitzen für Mikropipetten	Peske, Biozym
Spritzenvorsatzfilter	QualiLab

Sterilfiltrationsaufsätze	Nalgene
Whatman-Filterpapier	Merck Eurolab
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	Roth
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Roth

4.3 Chemikalien

Reagenz	Hersteller
β -Mercaptoethanol	Sigma
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma
6-Aminohexansäure	Merck
Agar	Sigma
Agarose, Electrophoresisgrade	Invitrogen
Ammoniumacetat	Merck
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Ampicillin-Na-Salz	Sigma
Aprotinin	Sigma
Benzamidin	Merck
Bis-Acrylamide; Rotiphorese	Roth
Bradford-Reagenzlösung	Bio-Rad
Bromphenolblau	Merck
CHAPS	Sigma
Chloroform	Merck
CNBr-aktivierte Sepharose 4B	Amersham Biosciences
Coomassie Brilliant Blau G 250	Merck
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
EDC/NHS Kopplungsreagenzien	Biacore
Essigsäure (99,8 %)	Merck
Ethanol abs.	Merck
Ethanolamin	Biacore
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA); Titriplex II	Calbiochem

Ficoll (400)	Merck
Formaldehyd (36 %)	Fluka
Formamide	Fluka
Glutaraldehyd	Sigma
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Glycogen	Roche
Guanidiniumhydrochlorid	Sigma
Harnstoff	Calbiochem
Heparin	Sigma
Imidazol	Merck
Isopropanol	Merck
Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranosid (IPTG)	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Kanamycin	Sigma
KH_2PO_4	Merck
Konservierer für Wasserbäder	Roth
L- α -Phosphatidylcholin, β -Palmitoyl- γ -oleoyl	Sigma
L- α -Phosphatidyl-DL-glycerol, β -Oleoyl- γ -palmitoyl	Sigma
Leupeptin	Sigma
Lösungsmittel, organische	Merck, Riedel-de Haën, Kraemer & Martin
Magermilchpulver	TIP
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	ICN Biomedicals
Metafectene	Biontex
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat	Sigma

Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Riedel-de Haën
Natriumhydroxid	Merck
Natriumthiosulfat	Merck
Ni-NTA Superflow	Qiagen
NP-40 (Igepal)	Fluka
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA)	Sigma
Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP ₂)	Sigma
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Calbiochem
Ponceau S	Sigma
Roti-Phenol für Extraktionen	Roth
Salzsäure (37 %)	Merck
Silbernitrat	Merck
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	ICN Biomedicals
Triton X-100 [®]	Merck
tRNA (<i>E. coli</i>)	Roche
X-Gal	Sigma
Xylencyanol	Merck
Zitronensäure	Merck

Alle Chemikalien waren vom höchsten erhältlichen Reinheitsgrad.

4.4 Nukleotide und Radiochemikalien

dNTP - Set	Roche, Mannheim
NTP - Set	Roche, Mannheim
[$\alpha^{32}\text{P}$]-GTP; 10 mCi/ml	NEN, Zaventem, Belgien
[$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP; 10 mCi/ml	NEN, Zaventem, Belgien
GTP γ S	Amersham Biosciences, Freiburg

4.5 Enzyme und Proteine

Enzym	Hersteller
Δ 17ARF1	AK Prof. Dr. Wieland
Anorg. Pyrophosphatase	Roche
BamH I	New England Biolabs
Bovine Serum Albumine (BSA)	Calbiochem
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Stratagene
DNase I	Roche
EcoR I	New England Biolabs
Lysozym	Sigma
<i>Pfu</i> Turbo [®] DNA Polymerase	Stratagene
<i>Pwo</i> -Polymerase	Stratagene
Ribonuclease T1	Roche
RNasin	Promega
Superscript II - reverse Transkriptase	Invitrogen
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
T4-Polynukleotidkinase (PNK)	Stratagene
T7-RNA-Polymerase	Stratagene
<i>Taq</i> -Polymerase	Promega

4.6 DNA- und Protein Längenstandards

4.6.1 DNA-Standards

Bezeichnung	Hersteller	Fragmentlängen (Bp)
peqGOLD 100 bp 0,5 mg DNA/ml	peqLab	1031; 900; 800; 700; 600; 500; 400; 300; 200; 100; 80
peqGOLD 0,4 mg DNA/ml	peqLab	10000; 8000; 6000; 5000; 4000; 3500; 3000; 2500; 2000; 1500; 1200; 1031; 900; 800; 700; 600; 500; 400; 300; 200; 100

4.6.2 Protein Standards

Es wurden vorgefertigte SDS-Protein-Längenstandards (Amersham Biosciences) der folgenden Zusammensetzung verwendet:

Bezeichnung	Protein	Molekulargewicht (kD)
Low Range Rainbow Marker RPN755	Ovalbumin	45
	Carbonic Anhydrase	30
	Trypsin Inhibitor	20,1
	Lysozyme	14,3
	Aprotinin	6,5
	Insulin β -Kette	3,5
	Insulin α -Kette	2,5
High Range Rainbow Marker RPN756	Myosin	220
	Phosphorylase β	97
	Bovine Serum Albumin	66
	Ovalbumin	45
	Carbonic Anhydrase	30
	Trypsin Inhibitor	20,1
	Lysozyme	14,3

4.7 Kulturmedien, Lösungen und Puffer

4.7.1 Kulturmedien und Lösungen für Zellkulturarbeiten

Bezeichnung	Hersteller
DMSO HYBRI-Max	Sigma
Dulbecco's Mod Eagle Medium (DMEM)	Gibco Life Technologies
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco Life Technologies
PBS (1x); pH 7,4	Gibco Life Technologies
Trypsin/EDTA (1x)	Gibco Life Technologies

Ampicillin-Stammlösung:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 10 ml
Na-Ampicillin	371,4	100 mg/ml	1 g

in 50 % Ethanol lösen, bei -20° C lagern

Kanamycin-Stammlösung:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 10 ml
Kanamycin	582,6	30 mg/ml	300 mg

mit H₂O (dest.) lösen

IPTG-Stammlösung:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 10 ml
IPTG	238,3	1 M	2,38 g

mit H₂O (dest.) lösen

4.7.2 Vorratslösungen und Puffer

Puffer	Hersteller
<i>Pwo</i> Reaktionspuffer	Stratagene
Reporter Lysispuffer	Promega
Superscript II RT-Puffer	Invitrogen
T4-Ligase Puffer	New England Biolabs
T4-PNK Puffer	Stratagene
<i>Taq</i> PCR-Puffer	Promega
Transkriptionspuffer	Stratagene

Magnesiumchlorid-Lösung:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 250 ml
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	203,3	100 mM	5,08 g

mit H₂O (dest.) lösen

Dithiothreitol-Lösung:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 10 ml
Dithiothreitol	154,2	100 mM	154 mg

mit H₂O (dest.) lösen, aliquotieren und bei -20° C lagern

Phenylmethylsulfonylfluorid-Lösung:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 10 ml
PMSF	174,2	100 mM	174 mg

mit Ethanol lösen und bei -20° C lagern

Ammoniumacetat-Lösung:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 250 ml
NH ₄ OAc	77,08	6 M	115,6 g

mit H₂O (dest.) lösen

Natriumacetat-Lösung:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 250 ml
NaOAc	82,03	3 M	61,52 g

pH-Wert auf 5,4 einstellen und mit H₂O (dest.) auffüllen

EDTA-Lösung:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 250 ml
EDTA (Titriplex II)	292,25	0,5 M	46,5 g

pH-Wert mit festem NaOH auf 8,0 einstellen und mit H₂O (dest.) auffüllen

Ethidiumbromid-Lösung:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 20 ml
Ethidiumbromid	394,3	10 mg/ml	200 mg

mit H₂O (dest.) auffüllen

Leupeptin-Lösung:

Reagenz	Konzentration	benötigt für 1 ml
Leupeptin	2,5 mg/ml	2,5 mg

mit H₂O (dest.) auffüllen, aliquotieren und bei -20° C lagern

Aprotinin-Lösung:

Reagenz	Konzentration	benötigt für 1 ml
Aprotinin	5 mg/ml	5 mg

mit H₂O (dest.) auffüllen, aliquotieren und bei -20° C lagern

TE-Puffer:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 1000 ml
Tris	121,14	10 mM	1,21 g
0,5 M EDTA-Lösung		1 mM	2 ml

pH-Wert auf 7,5 einstellen und mit H₂O (dest.) auffüllen

TBE-Puffer:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 1000 ml
Tris	121,14	89 mM	10,8 g
Borsäure	61,84	89 mM	5,5 g
0,5 M EDTA-Lösung		2 mM	4 ml

pH-Wert auf 8,0 einstellen und mit H₂O (dest.) auffüllen

4.8 Kommerzielle Reaktionssysteme

Bezeichnung	Hersteller
AmpliTa [®] q FS BigDye Terminator	Perkin Elmer
HRP-Detektionssystem (ECL-Reagenz)	Amersham Biosciences
iQ SYBR-Green Supermix Kit	Bio-Rad
Luciferase Assay System	Promega
NanoOrange [®] Protein Quantitation Kit	Molecular Probes
One Step RT PCR Kit	Qiagen
p44/42 MAP Kinase Assay Kit	Cell Signaling Technology
PCR-Purification Kit	Qiagen
Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
RNA/DNA Kit	Qiagen

4.9 Antikörper

Bezeichnung	Verwendung	Verdünnung	Hersteller
Mab19; monoklonal aus Ratte	primärer Antikörper; Anti-Cytohesin-1 und Anti-ARNO	1:20	AK Prof. Dr. Kolanus
Mab10; monoklonal aus Ratte	primärer Antikörper; spezifisch Anti-Cytohesin-1	1:20	AK Prof. Dr. Kolanus
Cyt2-21; monoklonal aus Maus	primärer Antikörper; spezifisch Anti-ARNO	1:400	Sigma
Anti-Ratten-Immunglobulin aus Kaninchen	sekundärer Antikörper; Peroxidase-konjugiert	1:1000	DakoCytomation
Anti-Maus-Immunglobulin aus Ziege	sekundärer Antikörper; Peroxidase-konjugiert	1:5000	DakoCytomation

4.10 Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Verwendung	Reverenz/Hersteller
pGEM-4Z	Ampicillin	Sequenzierung	Promega
pEGFP-N1	Kanamycin	Reporterplasmid	Clontech
SRE-Luc	Ampicillin	Reporterplasmid	Liao et al., 1997 ^[166]
pRK-wtARNO	Ampicillin	Expression in Eukaryonten	Moser et al., 1993 ^[171]
N1-ARNO [E156K]	Kanamycin	Expression in Eukaryonten	Clontech
pET11d-ARNO	Ampicillin	Expression in Prokaryonten	Novagen
pET11d-CCS7	Ampicillin	Expression in Prokaryonten	Novagen
pET11d-S7PH	Ampicillin	Expression in Prokaryonten	Novagen
pET11a-ARNOS7	Ampicillin	Expression in Prokaryonten	AK Prof. Dr. Kolanus
pET11a-Cyt1	Ampicillin	Expression in Prokaryonten	AK Prof. Dr. Kolanus

4.11 Oligonukleotide

Alle RNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Dharmacon (Lafayette) synthetisiert, DNA-Oligonukleotide von den Firmen Metabion (München) oder MWG (Ebersberg).

4.11.1 Primer

Primer P-39F

5'-TCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGACAAGCTTGGGTC-3'

unterstrichen: T7-Promotor

Primer P-20I

5'-ACTCCTAGGAAGAGCAAGAG-3'

Primer K61M I

5'-TCTAATACGACTCACTATA-3'

Primer K61M II

5'-CAAGAGGCCCAAACAG-3'

Primer K61S I

5'-AGGTAAAAGAACATCAAT

Primer P-SEQ I

5'-GCTTGGATCCTCTAATACGACTCACTATAGG-3'

unterstrichen: Restriktionsschnittstelle für BamH I

Primer P-SEQ II

5'-GGTCGAATTCCTCCTAGGAAGAGCAAGAG-3'

unterstrichen: Restriktionsschnittstellen für EcoR I

Primer pGEM-4ZSQ

GTTTTCCCAGTCACGAC

Primer CCS7 I

5'-AGGAATCTTGAAGGGCTCATT-3'

Primer CCS7 II

5'-TGAGATCCGGCTGCTAACA-3'

Primer S7PH I

5'-GTGATGATGATGATGATGACCC-3'

Primer S7PH II

5'-GAGGCCAATGAGGGCAGTA-3'

4.11.2 Aptamere und die Bibliothek I-N40

Anti-ARNO Aptamer K61 (RNA)

5'-GGGAGAGACAAGCUUGGGUCGCGUUUUGCUAUUGAUGUUCUUUUAACC
UGGCCUGUUUGGGCCUCUUGCUCUUCCUAGGAGU-3'

Anti-GEF Aptamer M69 (RNA)

5'-GGGAGAGACAAGCUUGGGUCUAUUAUGCCUUUAGCUAGCGCAUUCUGU
GGGGUGGGUGGAAGAAGAGAAAGAGAAGUAAUUAAGGAUCCUCAG-3'

DNA-Startpool I-N40

5'-TCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGACAAGCTTGGGTC-N40-CTCTTGC
TCTTCCTAGGAGT-3'

unterstrichen: T7-Promotor

Anti-ARNO Aptamer K61M (RNA)

5'-GGGUCGCGUUUUGCUAUUGAUGUUCUUUUAACCUGGCCUGUUUGGGC
CUCUUG-3'

Anti-ARNO Aptamer K61S (RNA)

5'-GGGUCGCGUUUUGCUAUUGAUGUUCUUUUAACCU-3'

4.11.3 „Short-interfering“ RNA

Anti-ARNOsiRNA366 (sense)

5'-CCUGGCAGUGCUGCAUGCUdTdT-3'

Anti-Cyt1siRNA756 (sense)

5'-UGACCUCACUCACACUUUCdTdT-3'

4.12 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> - Stamm	Genotyp	Verwendung	Referenz
BL 21 DE3	hsdS gal (λ cIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)	Proteinexpression	Sambrook et al., 2001 ^[154]
BL21 DH10B	Δ (mrr-hsd RMS-mcrBC) mcrA recA1	Plasmidpropagation	Sambrook et al., 2001 ^[154]

4.13 Eukaryontische Zelllinien

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
HeLa	humane Zelllinie mit epithelartiger Morphologie aus Patienten mit Cervix-Karzinom	Tyndall et al., 1965 ^[172]

Kapitel 5 Methoden

5.1 Allgemeine Methoden im Umgang mit Proteinen

5.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch Gelelektrophorese lassen sich Biomoleküle abhängig von Ladung, Molekulargewicht und Konformation auftrennen. Dies erfolgte unter denaturierenden Bedingungen durch diskontinuierliche, eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese^[173]. Das Detergenz SDS bindet unspezifisch an Proteine und zerstört hierbei alle nichtkovalenten Wechselwirkungen, sodass die native Konformation aufgelöst wird. Da viele Moleküle des anionischen SDS an ein Protein binden, wird die Eigenladung des Proteins überlagert; die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel hängt dann nur noch vom Molekulargewicht des Proteins und dem Vernetzungsgrad des Gels ab.

Zur Herstellung eines Gels (10 x 8 cm) wurde eine Trenngel-Lösung zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen. Für die Dauer der Polymerisation (ca. 45 min) wurde die Lösung mit Isopropanol überschichtet. Danach wurde eine Sammelgel-Lösung so auf das Trenngel gegossen, dass sich eine Laufstrecke von ca. 0,5 cm im Sammelgel ergab, um eine ausreichende Fokussierung der Banden zu gewährleisten.

Die Proteinproben wurden mit 4x SDS-Probenpuffer 3 min bei 95° C erhitzt und nach kurzem Zentrifugieren auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte dann bei 180 Volt in SDS-Elektrodenpuffer.

Trenngel (12,5 %): 10 ml

<u>Reagenz</u>	<u>Stammlösung</u>	<u>Volumen</u>	<u>Endkonzentration</u>
H ₂ O (dest.)		3,2 ml	
Tris/HCl, pH 8,8	1,5 M	2,5 ml	375 mM
SDS	10 % (w/v)	0,1 ml	0,1 % (w/v)
Bis-Acrylamid	30 % (v/v)	4,2 ml	12,5 % (v/v)
APS	10 % (w/v)	50 µl	0,05 % (w/v)
TEMED	rein	5 µl	0,05 % (v/v)

Sammelgel (4 %): 10 ml

<u>Reagenz</u>	<u>Stammlösung</u>	<u>Volumen</u>	<u>Endkonzentration</u>
H ₂ O (dest.)		6,1 ml	
Tris/HCl pH 6,8	0,5 M	2,5 ml	125 mM
SDS	10 % (w/v)	0,1 ml	0,1 % (w/v)
Bis-Acrylamid	30 % (v/v)	1,3 ml	4 % (v/v)
APS	10 % (w/v)	50 µl	0,05 % (w/v)
TEMED	rein	10 µl	0,1 % (v/v)

SDS-Elektrodenpuffer: 10x

<u>Reagenz</u>	<u>MW [g/mol]</u>	<u>Konzentration</u>	<u>benötigt für 1000 ml</u>
Tris	121,14	250 mM	30 g
Glycin	75	14,4 % (w/v)	144 g
SDS	288	1 % (w/v)	10 g

mit H₂O (dest.) auffüllen

SDS-Probenpuffer: 4x

<u>Reagenz</u>	<u>MW [g/mol]</u>	<u>Konzentration</u>	<u>benötigt für 10 ml</u>
Tris	121,14	33 mM	40 mg
Glycerin	92,1	21 % (v/v)	2,1 ml
SDS	288	4 % (w/v)	0,4 g
DTT	154,2	21 % (w/v)	2,1 g
Bromphenolblau	692	Spatelspitze	

pH-Wert auf 6,8 einstellen, mit H₂O (dest.) auffüllen und bei -20° C lagern

5.1.2 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Ein Transfer auf Nitrozellulosemembranen wurde zur Immobilisierung und späteren immunologischen Detektion [5.1.3] bzw. für einen Aptablot-Assay [5.1.8] von ARNO und Cytohesin-1 durchgeführt. Der Proteintransfer erfolgte in einer Semi-Dry Blot Apparatur unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems.

Nach Trennung der Proteine im SDS-PAGE [5.1.1] wurde das Polyacrylamidgel, die Nitrozellulosemembran und die Filterpapiere (Whatman) im entsprechenden Elektrodenpuffer äquilibriert und gemäß dem folgenden Schema zwischen den Elektroden angeordnet:

Anode

6 Filterpapiere - Anodenlösung I
3 Filterpapiere - Anodenlösung II
Nitrozellulose - Anodenlösung II
SDS-PAGE Gel - Kathodenlösung
9 Filterpapiere - Kathodenlösung

Kathode

Der Transfer fand dann bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm² Blotgröße in 45 min statt. Als Blotkontrolle wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt und vor der weiteren Bearbeitung wieder mit Wasser entfärbt [5.1.5.3].

Anodenlösung I:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 1000 ml
Tris	121,14	300 mM	36,3 g
Methanol	32	20 % (v/v)	200 ml

pH-Wert auf 10,5 einstellen, mit H₂O (dest.) auffüllen und bei 4° C lagern

Anodenlösung II:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 1000 ml
Tris	121,14	25 mM	3,03 g
Methanol	32	20 % (v/v)	200 ml

pH-Wert auf 10,4 einstellen und mit H₂O (dest.) auffüllen, Lagerung bei 4° C

Kathodenlösung:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 1000 ml
6-Aminohexansäure	131,2	40 mM	5,2 g
Methanol	32	20 % (v/v)	200 ml

pH-Wert auf 7,5 einstellen, mit H₂O (dest.) auffüllen und bei 4° C lagern

5.1.3 Immunologische Detektion von Proteinen (Western-Blot)

Die immunologische Detektion von Proteinen erfolgte auf Nitrozellulosemembranen unter Ausnutzung spezifischer Antigen-Antikörper Interaktionen. Dabei wurde zunächst mit einem primären Antikörper inkubiert, dessen Nachweis anschließend mit einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper erfolgte. Dieser wurde dann durch Chemilumineszenz detektiert, da bei der Spaltung von ECL-Substrat durch Peroxidase Photonen emittiert werden.

Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran [5.1.2] wurde diese mit TBS-Puffer ab gespült und zur Absättigung freier Bindungsstellen 1 h auf einem Tischschüttler bei 60 Upm oder über Nacht bei 4° C mit Blockierlösung geblockt.

Nach Waschen mit WPT-Puffer inkubierte man die Membran mit primärem Antikörper, der in 10 ml AKB-Puffer verdünnt worden war, für 2 h unter leichtem Schwenken auf einem Tischschüttler [Antikörper und Verdünnungen, 4.9].

Nun wurde 5x mit TBS-Puffer für jeweils 10 min gewaschen und mit dem sekundären Antikörper, der ebenfalls in 10 ml AKB-Puffer verdünnt worden war, für 1 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Zum Abschluss erfolgte dreimaliges Waschen mit WPT-Puffer, sowie 3x mit TBS für jeweils 10 min. Die Detektion konnte dann durch Versetzen mit 2 ml ECL-Reagenz für 1 min gemäß den Herstellerangaben durchgeführt werden. Entsprechend der Lumineszenzintensität wurde ein Röntgenfilm für 5 sek bis 1 h exponiert und anschließend entwickelt.

TBS-Puffer: 10x

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 1000 ml
Tris	121,14	1 M	121,14 g
Natriumchlorid	58,44	1,5 M	87,66 g

pH-Wert auf 7,4 einstellen und mit H₂O (dest.) auffüllen

Blockierlösung:

<u>Reagenz</u>	<u>MW [g/mol]</u>	<u>Konzentration</u>	<u>benötigt für 500 ml</u>
Tris	121,14	65 mM	3,95 g
Natriumchlorid	58,44	200 mM	5,84 g
Tween 20	1228	0,1 % (v/v)	0,5 ml
Magermilchpulver		5 % (w/v)	25 g

pH-Wert auf 7,4 einstellen, mit H₂O (dest.) auffüllen und aliquotieren, Lagerung -20° C

WPT-Puffer:

<u>Reagenz</u>	<u>MW [g/mol]</u>	<u>Konzentration</u>	<u>benötigt für 1000 ml</u>
Tris	121,14	10 mM	1,21 g
Natriumchlorid	58,44	150 mM	8,77 g
Tween 20	1228	0,2 % (v/v)	2 ml

pH-Wert auf 7,4 einstellen und mit H₂O (dest.) auffüllen

AKB-Puffer:

<u>Reagenz</u>	<u>Konzentration</u>	<u>benötigt für 40 ml</u>
WPT-Puffer		40 ml
Magermilchpulver	1 % (w/v)	0,4 g

5.1.4 „Stripping“ von Nitrozellulosemembranen

Das „Stripping“-Verfahren ermöglicht das Entfernen von Antikörpern von Nitrozellulosemembranen und dadurch die mehrfache Detektion mit Antikörpern verschiedener Spezifität auf einer Membran.

Membranen mit gebundenen Antikörpern wurden zunächst mit TBS-Puffer gewaschen und anschließend 30 min bei 50° C unter leichtem Schwenken mit *Stripping*-Puffer inkubiert. Nach Entfernen des Puffers wurde die Membran 3x mit TBS-Puffer für je 5 min gewaschen und konnte anschließend wieder zur immunologischen Proteindetektion [5.1.3] eingesetzt werden.

Stripping-Puffer:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 1000 ml
Tris	121,14	62,5 mM	7,57 g
β-Mercaptoethanol	78,1	100 mM	7,81 g
SDS	288	2 % (w/v)	20 g

pH-Wert auf 6,7 einstellen und mit H₂O (dest.) auffüllen

5.1.5 Färbung von Proteingelen**5.1.5.1 Coomassie-Färbung (Brilliant Blau G 250)**

Zur schnellen Anfärbung der durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine, wurde das Verfahren der Coomassie-Blau-Färbung angewendet. Die Proteingele wurden hierzu etwa 30 min bei Raumtemperatur auf einem Tischschüttler bei 60 Upm in Coomassie-Lösung geschwenkt und anschließend zum Entfernen der Hintergrundfärbung für 1 h mit Entfärber-Lösung inkubiert. Die Gele wurden danach auf ein angefeuchtetes Whatman-Papier gelegt und im Geltdrockner (30 min bei 80° C im Vakuum) getrocknet.

Coomassie-Lösung:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 1000 ml
Essigsäure	60,05	10 % (v/v)	100 ml
Methanol	32,04	40 % (v/v)	400 ml
Wasser	18	50 % (w/v)	500 ml
Coomassie Brilliant Blue G250			16 Pastillen

Entfärber-Lösung:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 1000 ml
Essigsäure	60,05	10 % (v/v)	100 ml
Methanol	32,04	30 % (v/v)	300 ml
Wasser	18	60 % (w/v)	600 ml

5.1.5.2 Silber-Färbung

Die Silber-Färbung wird zur Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen verwendet. Diese ist aufwendiger als die in 5.1.5.1 beschriebene Coomassie-Färbung, dafür aber ca. 10-fach sensitiver. Hierbei werden die Gele mit Silbernitrat inkubiert, welches im Verlaufe der Färbung zu elementarem Silber reduziert wird. Da dies nur in den proteinhaltigen Zonen des Gels stattfindet, kann eine rötlich-braune Färbung der Proteinbanden erzielt werden. Das folgende Protokoll wurde durchgeführt:

1. Fixieren	10 min	LÖS1
2. Vernetzen	10 min	LÖS2
3. Waschen	20 min	H ₂ O (dest.)
4. Färben	10 min	LÖS3
5. Entwickeln	10 min	LÖS4
6. Stoppen	5 min	5 % (v/v) Essigsäure
7. Waschen	5 min	H ₂ O (dest.)
8. Imprägnieren	5 min	10 % (v/v) Glycerin

Die Gele wurden in Glasschalen auf einem Tischschüttler bei leichtem Schwenken inkubiert, anschließend auf ein angefeuchtetes Whatman-Papier aufgelegt und für 30 min bei 80° C im Vakuum getrocknet.

LÖS1

<u>Reagenz</u>	<u>MW [g/mol]</u>	<u>Konzentration</u>	<u>benötigt für 1000 ml</u>
Ethanol	46,07	30 % (v/v)	300 ml
Essigsäure	60,05	10 % (v/v)	100 ml

mit H₂O (dest.) auffüllen und lagern bei 4° C

LÖS2

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 500 ml
Natriumacetat	82,03	0,4 M	16,4 g
Glutaraldehyd	100,1	0,5 % (v/v)	2,5 ml
Natriumthiosulfat	158,18	0,1 % (w/v)	500 mg
Ethanol	46,07	30 % (v/v)	150 ml

mit H₂O (dest.) auffüllen und bei 4° C lagern

LÖS3

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 500 ml
Silbernitrat	169,87	0,1 % (w/v)	500 mg
Formaldehyd (36 %)	30,03	3 µM	125 µl

mit H₂O (dest.) auffüllen und bei 4° C lagern

LÖS4

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 500 ml
Natriumcarbonat	105,99	2,5 % (w/v)	12,5 g
Formaldehyd (36 %)	30,03	4,8 µM	200 µl

mit H₂O (dest.) auffüllen und bei 4° C lagern

5.1.5.3 Ponceau S Färbung

Auf eine Nitrozellulosemembran transferierte Proteine können über eine Ponceau S Färbung nachgewiesen werden. Dadurch konnte der Transfer optisch kontrolliert werden.

Die Färbung erfolgte durch 30-minütige Inkubation mit Ponceau S Färbelösung bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Vor der Durchführung der immunologischen Detektion wurde für 30 min in Wasser entfärbt.

5.1.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Konzentration von Proteinen in Lösung wurden verschiedene Methoden verwendet, um systematische Ungenauigkeiten zu reduzieren. Optische

Verfahren wurden durch eine vergleichende SDS-PAGE Analyse mit Coomassiefärbung unter Verwendung entsprechender Proteinstandards überprüft.

Alle Absorptionswerte wurden gegen eine Leerwertkontrolle, bestehend aus dem jeweiligen Solvens, abgeglichen.

5.1.6.1 Photometrische Bestimmung nach Warburg und Christian

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Warburg und Christian basiert auf der Absorptionsmessung bei den Wellenlängen $\lambda = 280 \text{ nm}$ (A_{280}) und $\lambda = 260 \text{ nm}$ (A_{260}).

Bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin und in geringerem Maße auch Phenylalanin, während bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ in erster Linie eine Absorption durch die häufig als Kontamination in Proteinlösungen enthaltenen Nukleinsäuren auftritt. Dieser Wert dient daher zur Korrektur der Absorption bei 280 nm Wellenlänge.

Die Proteinkonzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Proteinkonzentration [mg/ml]} = (1,55 \cdot A_{280}) - (0,76 \cdot A_{260})$$

Das Verfahren nach Warburg und Christian ist eine schnelle und einfache Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration, vernachlässigt aber die sequenzabhängige Veränderung des Absorptionskoeffizienten und kann daher in erster Linie als Näherungsverfahren angesehen werden. Dabei liegt sein größter Vorteil in der Anwendbarkeit bei komplexen Proteingemischen.

5.1.6.2 Photometrische Bestimmung nach Lambert-Beer

Die Konzentrationsbestimmung nach Lambert-Beer basiert auf der Absorptionsmessung einer Proteinlösung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280 \text{ nm}$ (A_{280}).

Im Gegensatz zum Verfahren nach Warburg und Christian kann dieses nur in homogenen Proteinlösungen verwendet werden, da der molare Absorptionskoeffizient (ϵ) des Proteins bekannt sein muss. Dieser kann aber in guter Näherung für eine gegebene Aminosäuresequenz berechnet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die molaren Absorptionskoeffizienten unter Verwendung des Programms „*Biopolymer Calculator 4.1.1*“ (<http://paris.chem.yale.edu/extinct.html>) bestimmt.

Die Proteinkonzentration wurde dann wie folgt berechnet:

$$\log \frac{I_0}{I} = A_{280} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

I_0 = Intensität der einfallenden Strahlung
 I = Intensität der gemessenen Strahlung
 A_{280} = Absorption bei 280 nm
 ε = molarer Absorptionskoeffizient [$\text{M} \cdot \text{cm}$]⁻¹
 c = Konzentration [M]
 d = Länge der Meßstrecke [cm]

5.1.6.3 Photometrische Bestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford^[174] basiert auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau an basische und aromatische Aminosäurereste. Dabei absorbiert der gebundene Farbstoff bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm stärker als der freie Farbstoff.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde im Handel erhältliche, konzentrierte Bradford-Reagenzlösung 1:5 in Wasser verdünnt und Proteinproben unbekannter Konzentration, sowie die als Referenz verwendeten BSA-Proben (2,5; 5; 10; 15; 22; 30; 44 $\mu\text{g/ml}$) in einer 96-well Kulturplatte vorgelegt. Nun wurden 200 μl verdünnter Bradford-Lösung pro Vertiefung zugesetzt und die Absorption bei $\lambda = 595$ nm gemessen.

Die Umrechnung der Absorption auf die Konzentration erfolgte dann mittels der BSA-Eichkurve.

5.1.6.4 Quantifizierung von Proteinen mit NanoOrange®

Die Quantifizierung von Proteinen unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes NanoOrange® basiert auf der Verstärkung von dessen Fluoreszenz bei Bindung an Proteine. Der größte Vorteil dieser Methode liegt in ihrer Sensitivität und der Unempfindlichkeit gegenüber unterschiedlichen Puffersystemen.

Hierzu wurde der Farbstoff zunächst nach Herstellerangaben in der mitgelieferten Lösung Comp. B 1: 500 verdünnt. Anschließend wurden die Proteinproben unbekannter Konzentration, sowie die BSA-Standard Proben (0,1; 0,3; 0,5; 0,9; 1,1; 1,3; 1,5; 1,8; 2,2; 2,7; 3,5 µg/ml) mit dem verdünnten Farbstoff versetzt und 10 min bei 95° C inkubiert. Nach 20-minütigem Abkühlen bei Raumtemperatur wurde die Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 485$ nm und einer Emissionswellenlänge von $\lambda = 590$ nm gemessen. Die Proteinkonzentration konnte anschließend anhand der BSA-Eichkurve berechnet werden.

5.1.7 Dialyse und Gelfiltration zum Pufferwechsel

Zur Veränderung der Pufferbedingungen von Proteinlösungen wurden diese in einen für 12 h in Zielpuffer gequollenen Dialyseschlauch gefüllt und für 15 h bei 4° C gegen 1 L des Zielpuffers dialysiert. Anschließend wurde der Schlauch in 0,5 L frischen Zielpuffer überführt und erneut für 6 h bei 4° C dialysiert. Die Verwendung von Dialyseschläuchen mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 6-8 kD ermöglichte den schonenden Austausch von Puffersalzen und das Entfernen von Resten niedermolekularer Kontaminationen. Nach diesem Verfahren wurden die Proteine ARNO und Cytohesin-1 nach der chromatographischen Reinigung [5.1.9] in den Kopplungspuffer der Selektionsmatrix überführt [5.4.1]. Alle Proteine wurden nach der Dialyse erneut auf einem SDS-PAGE analysiert und die Konzentration nach den in 5.1.6 angegebenen Methoden bestimmt.

Nach der affinitätschromatographischen Trennung von ARNO und Cytohesin-1 über IMAC [5.1.9.1] musste die Ionenstärke für die nachfolgende Ionenaustauschchromatographie [5.1.9.2] erniedrigt werden. Dies wurde unter Verwendung der Gelfiltrationssäule Econo-Pac P6 (Bio-Rad) an einem FPLC-System durchgeführt. Hierzu wurden 3 ml Proteinlösung bei einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule injiziert. Als Laufpuffer diente der Startpuffer der Ionenaustauschchromatographie. Der Erfolg des Pufferaustausches konnte durch die Detektion der Leitfähigkeit und der UV-Absorption bei 280 nm beobachtet werden. Dabei wurden die Fraktionen mit der größten Absorption bei 280 nm vereint und vor der weiteren Bearbeitung auf einem SDS-PAGE [5.1.1] analysiert.

5.1.8 Aptablot-Assay

Im Aptablot-Assay werden Proteine auf Nitrozellulosemembranen durch Ausnutzung spezifischer Aptamer-Proteinwechselwirkungen detektiert. Dieses Verfahren ist an den in 5.1.3 beschriebenen Western-Blot angelehnt.

Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran [5.1.2] wurde diese kurz mit PBS gespült, anschließend mit 10 ml BK-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler abgesättigt und erneut 2x für jeweils 10 min mit PBS gewaschen. Nun folgte eine zweimalige Inkubation der Membran mit jeweils 5,2 mg tRNA (*E. coli*) in 5 ml PBS und anschließend 10 ml PBS mit 3 mM Magnesiumchlorid für je 10 min im Überkopfschüttler. Die Inkubation mit 5'-terminal radioaktiv markiertem Aptamer (1 pmol), verdünnt in 5 ml Inkubationspuffer, erfolgte 30 min bei 37° C im Hybridisierungssofen.

Abschließend wurde 3x für je 5 min mit PBS/3 mM MgCl₂ gewaschen und die gebundene RNA durch Autoradiographie visualisiert.

PBS: 10x

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 1000 ml
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	177,99	43 mM	7,65 g
KH ₂ PO ₄	136,09	14 mM	1,91 g
Kaliumchlorid	74,56	27 mM	2,01 g
Natriumchlorid	58,44	1470 mM	85,91 g

pH-Wert auf 7,4 einstellen und mit H₂O (dest.) auffüllen

BK-Lösung:

Reagenz	Vorrat	Endkonzentration	benötigt für 10 ml
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	100 mM	3 mM	300 µl
BSA (Nuclease-frei)		1 % (w/v)	100 mg
PBS 1x			9,7 ml

erst kurz vor der Verwendung herstellen, nicht lagern

Inkubationspuffer:

Reagenz	Vorrat	Endkonzentration	benötigt für 5 ml
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	100 mM	3 mM	150 µl
tRNA	100 µg/µl	104 µg/ml	5,2 µl
RNasin	40 U/µl	0,4 U/µl	50 µl
DTT	100 mM	0,1 mM	5 µl

mit 1x PBS auffüllen, direkt verwenden, nicht lagern

5.1.9 Chromatographische Methoden der Proteinreinigung

Alle chromatographischen Trennverfahren wurden bei 4° C durchgeführt und beziehen sich auf ein Kulturvolumen von einem Liter.

5.1.9.1 Affinitätschromatographie über immobilisierte Metallionen (IMAC)

Die Expression [5.10.8] und Aufreinigung rekombinanter Proteine mit Hexahistidin-Fusionsanteil aus *E. coli* ermöglicht eine hohe Proteinausbeute bei hoher Reinheit, da diese durch spezifische Wechselwirkung des His₆-Fusionsanteils mit Nickelkationen auf einer *Nitrilotriaceticacid* (NTA)-Agarose Matrix erfolgt^[175]. Die Proteine können nach Abtrennung aller Kontaminationen spezifisch mit Imidazol eluiert werden. Alle in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden nach diesem Verfahren gereinigt.

Dabei wurde nach Expression und Zellyse [5.10.8; 5.10.9] das Lysat mit 15 mM Imidazol und 2 ml Ni²⁺-NTA Agarose versetzt, die zuvor in Lysispuffer äquilibriert worden war. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 12 h bei 4° C im Überkopfschüttler. Das Gemisch wurde nun in eine HR 16/10 Leersäule von Amersham Biosciences gefüllt und an ein ÄKTA-FPLC System angeschlossen. Die Trennung des Zielproteins von den Kontaminationen konnte durch Waschen mit ca. 80 ml Waschpuffer erreicht werden und die Elution erfolgte mit 250 mM Imidazol in Elutionspuffer bei einer Flussrate von 1 ml/min. Zur Verhinderung von Proteindegradierung durch Proteasen wurden dem Elutionspuffer unmittelbar vor der Verwendung 0,5 mM PMSF, 0,5 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Aprotinin sowie eine Spatelspitze Benzamidin zugesetzt. Für Trennungen im kleineren Maßstab (bis 0,5 L Zellkultur) bzw. für die Reinigung der verschiedenen ARNO-Domänen Konstrukte wurde direkt auf einer HiTrap Chelating-Fertigsäule immobilisiert, die zuvor mit Nickelkationen beladen worden war.

Waschpuffer:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 1000 ml
Tris	121,14	100 mM	12,1 g
Natriumchlorid	58,44	300 mM	17,5 g
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	203,3	3 mM	0,61 g
Glycerin	92,09	10 % (v/v)	100 ml
Imidazol	68,1	20 mM	1,36 g
DTT	154,2	1 mM	154 mg

pH-Wert auf 8,0 einstellen, mit H₂O (dest.) auffüllen und bei 4° C lagern

Elutionspuffer:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 500 ml
Tris	121,14	50 mM	3,03 g
Natriumchlorid	58,44	300 mM	8,8 g
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	203,3	3 mM	0,3 g
Glycerin	92,09	10 % (v/v)	50 ml
Imidazol	68,1	250 mM	8,51 g
DTT	154,2	1 mM	77 mg

pH-Wert auf 8,0 einstellen, mit H₂O (dest.) auffüllen und bei 4° C lagern

5.1.9.2 Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose

Die Ionenaustauschchromatographie basiert auf der reversiblen Adsorption von geladenen Molekülen an entgegengesetzt geladenen Resten einer stationären Phase. Die elektrostatischen Wechselwirkungen sind abhängig vom verwendeten pH-Wert und dem isoelektrischen Punkt (pI) des Proteins. Die Proteine werden daher gemäß ihrer unterschiedlichen isoelektrischen Punkte unterschiedlich stark auf dem Material retardiert. Die Auftrennung erfolgt in einem Gradienten zunehmender Ionenstärke.

Die in der vorliegenden Arbeit für *in vitro* Selektion [5.4] verwendeten Proteine Cytohesin-1 und -2 wurden über Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose gereinigt. Dabei wurden die Proteine nach Vorreinigung über IMAC [5.1.9.1] unter Verwendung einer Econo-Pac P6 Gelfiltrationssäule in den Startpuffer der Q-Sepharose Trennung umgepuffert [5.1.7].

Nach Injektion der Proteine auf eine BioScaleQ-Anionenaustauschersäule erfolgte die Trennung in einem Stufengradienten von 0-1 M Natriumchlorid bei einer Flussrate von 2 ml/min. Zunächst wurde mit 15 ml Startpuffer gewaschen und anschließend die Natriumchloridkonzentration über ein Volumen von 10 ml auf 130 mM, in der zweiten Stufe über ein Volumen von 60 ml auf 300 mM und abschließend über 15 ml auf die Endkonzentration von 1 M gesteigert. Die entsprechenden Elutionsfraktionen wurden nach der Trennung mit 10 % (v/v) Glycerin versetzt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Startpuffer:

<u>Reagenz</u>	<u>MW [g/mol]</u>	<u>Konzentration</u>	<u>benötigt für 2000 ml</u>
Tris	121,14	50 mM	12,1 g
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	203,3	3 mM	1,22 g
DTT	154,2	1 mM	308 mg
[Natriumchlorid	58,44	1 M	117 g]

pH-Wert auf 8,0 einstellen, mit H₂O (dest.) auffüllen und bei 4° C lagern

5.2 Allgemeine Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren

Alle Puffer und Lösungen für RNA-Arbeiten wurden mit H₂O (bidest.) angesetzt, welches zuvor mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt worden war. Hierzu wurde 1 L Wasser mit 2 ml DEPC versetzt und nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur für 1 h bei 120° C autoklaviert.

5.2.1 Phenol/Chloroform Extraktion

Die Abtrennung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen erfolgte durch Extraktion mit Phenol. Dazu wurde die wässrige Lösung mit einem Volumen Phenol versetzt, gründlich durchmischt und zur Beschleunigung der Phasentrennung für 30 sek bei 20800 x g zentrifugiert. Um Phenolreste zu entfernen wurde die obere nukleinsäurehaltige Phase abgenommen und erneut mit einem Volumen Chloroform extrahiert.

5.2.2 Ethanol-Präzipitation

Nucleinsäuren können zur Beseitigung von Salzen oder Verunreinigungen bzw. zur Aufkonzentrierung aus wässriger Lösung mittels Ethanol ausgefällt werden. Hierzu wurde die Nucleinsäurelösung mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,4) oder einem halben Volumen 6 M Ammoniumacetat sowie 3 Volumen Ethanol (100 %, vorgekühlt auf -20°C) versetzt. Zur Fällung von kleinen Mengen Nucleinsäure wurde zusätzlich noch 20 $\mu\text{g/ml}$ Glycogen als Fällungshilfe zugesetzt. Nun wurde 10 min bei -80°C für den Fall der Natriumacetat-Fällung bzw. 5 min bei Raumtemperatur für die Ammoniumacetat-Fällung inkubiert und anschließend für 20 min bei 20800 x g und Kühlung auf 4°C zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurde das Präzipitat mit 200 μl 70 %iger vorgekühlter wässriger Ethanolösung gewaschen, 1 min bei 20800 x g zentrifugiert und nach Abnehmen des Überstandes für 5 min bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wurde nun in H_2O (dest.) oder TE-Puffer [4.7.2] resuspendiert.

5.2.3 Photometrische Nucleinsäure-Quantifizierung

Die Bestimmung der Konzentration von Nucleinsäuren in wässriger Lösung erfolgte durch spektrophotometrische Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260\text{ nm}$ (OD_{260}). Für Nucleinsäuren unbekannter Sequenz bzw. für komplexe Gemische wurden die in Tabelle 6.1 dargestellten empirischen Werte (F), bezogen auf $\text{OD}_{260} = 1$, verwendet^[154]:

Wert (F)	Nucleinsäure
50 $\mu\text{g/ml}$	doppelsträngige DNA
38 $\mu\text{g/ml}$	einzelsträngige DNA
38 $\mu\text{g/ml}$	einzelsträngige RNA

Tabelle 6.1: Konzentrationen von Nucleinsäuren bei $\text{OD}_{260} = 1$

Unter Berücksichtigung eines durchschnittlichen Molekulargewichtes (M_{av}) von 330 g/mol pro Nucleotid für DNA und 345 g/mol für RNA gilt die folgende Gleichung:

$$c = \frac{OD_{260} \cdot F \cdot V}{n \cdot M_{av}} \quad [\text{mM}]$$

OD_{260} = Absorption bei 260 nm Wellenlänge

F = empirischer Wert bezogen auf $OD_{260} = 1$ [$\mu\text{g/ml}$]

V = Verdünnungsfaktor

n = Anzahl der Basen

M_{av} = durchschnittliches Molekulargewicht pro Nukleotid

Für kürzere Oligodesoxyribonukleotide mit bekannter Basensequenz werden die Konzentrationen aus der Summe der molaren Absorptionskoeffizienten (ϵ) der einzelnen Basen berechnet. Dazu wurden folgende Werte aus Tabelle 6.2 verwendet:

dNTP	ϵ [$\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]	NTP	ϵ [$\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
dATP	15,4	ATP	15,2
dCTP	9,0	CTP	7,05
dGTP	13,7	GTP	12,1
dTTP	10,0	UTP	8,4

Tabelle 6.2: Molare Absorptionskoeffizienten der Nukleotidbasen.

Die Konzentration wird dann nach folgender Gleichung berechnet:

$$c = \frac{OD_{260} \cdot V}{\sum \epsilon \cdot d} \quad [\text{mM}]$$

d = Länge der Messtrecke [cm]

ϵ = molarer Absorptionskoeffizient [$\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]

Da Proteine und Phenol bei $\lambda = 280$ nm ein Absorptionsmaximum besitzen, gibt der Quotient aus OD_{260} und OD_{280} Aufschluss über die Reinheit einer Nukleinsäure-Präparation. Bei reinen Nukleinsäurelösungen liegt er ungefähr bei 1,8 - 2; niedrigere Werte sind ein Hinweis auf Verunreinigung durch Proteine oder Phenol.

5.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA- und RNA-Molekülen zur Analyse erfolgte unter anderem durch nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese. Grundlage dieses Verfahrens ist die Wanderung von negativ geladenen Nucleinsäuren zur Anode im elektrischen Feld. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente fanden Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,7 % - 3 % (w/v) in 0,5x TBE-Puffer [4.7.2] Verwendung, denen Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugesetzt wurde.

Die Nucleinsäureproben wurden mit einem 6x Auftragungspuffer versetzt und auf das Gel geladen. Zusätzlich wurde ein Längenstandard aufgetragen [4.6.1], um so das Molekulargewicht der aufgetrennten Nucleinsäuren bestimmen zu können. Die Trennung erfolgte dann bei 170 Volt Spannung in 0,5x TBE Laufpuffer.

Zur Visualisierung wurde das Gel auf einen UV-Transilluminator aufgelegt und mit UV-Licht (Wellenlänge 366 nm) bestrahlt. Da das zugesetzte Ethidiumbromid in doppelsträngige DNA oder RNA interkaliert, wird die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes im Gegensatz zum freien Farbstoff erhöht, sodass die nucleinsäurehaltigen Bereiche des Gels als rötlich-orange Banden sichtbar wurden, die abschließend zu Dokumentationszwecken fotografiert wurden.

Auftragungspuffer: 6x

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 10 ml
Tris	121,14	50 mM	61 mg
Ficoll (400)	400000	15 % (w/v)	1,5 g
0,5 M EDTA, pH 8,0	292,25	6 mM	120 µl
Bromphenolblau	691,94	0,25 % (w/v)	25 mg
Xylencyanol	538,62	0,25 % (w/v)	25 mg

pH-Wert auf 8,3 einstellen und mit H₂O (dest.) auffüllen

5.2.5 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Analyse und Reinigung von Oligonucleotiden erfolgte durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Je nach Länge der zu trennenden Nucleinsäuremoleküle wurden 8-15 %ige Polyacrylamidgele hergestellt (Gelstärke:

1 mm zur Analyse und 1,5 mm für präparative Zwecke, Laufstrecke: 15-25 cm), die aus entsprechenden Anteilen der Vorratslösungen (B; C; D) pipettiert wurden. Für Sequenzgele wurde die Laufstrecke auf 45 cm erhöht und die Gelstärke auf 0,4 mm verringert. Die Denaturierung der Nukleinsäuren wurde durch die Verwendung von Harnstoff im Gel sichergestellt, sodass die Laufstrecke ausschließlich von der Basenanzahl, nicht aber von der Sekundärstruktur abhing. Die Polymerisation erfolgte mittels 400 µl 10 %iger (w/v) APS-Lösung und 20 µl TEMED pro 50 ml Gellösung. Nach vollständiger Polymerisation (ca. 45-60 min) wurde das Gel in eine vertikale Gelapparatur eingesetzt, der Laufpuffer 1x TBE [4.7.2] hinzugefügt und ein Vorlauf bei 350 V für ca. 10 min gestartet. Die Auftrennung im Sequenzgel erfolgte nach 20 min Vorlauf für 1,5 h bei 2300 V. Nach dem Ausspülen der Geltaschen mit Laufpuffer wurden die Proben aufgetragen, welche zuvor für 1 min bei 95° C in 3x PAA-Ladepuffer denaturiert worden waren. Als Längenreferenz dienten die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol, diese wandern in einem 8 %igen Gel auf der Höhe von 20 bzw. 80 Basen. Nach elektrophoretischer Trennung für 2 h bei 350 V, wurden die Nukleinsäuren durch Fluoreszenzlöschung detektiert. Hierzu wurde das Gel auf eine Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator gelegt und mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt (*UV-shadowing*). Bei analytischen Gelen erfolgte die Detektion über Autoradiographie. Die Nukleinsäuren konnten gemäß Protokoll 5.2.6 aus dem Gel eluiert werden.

Vorratslösung B; 5 ml

10x TBE in 8,3 M Harnstoff

Vorratslösung C

25 % Acrylamidlösung in 8,3 M Harnstoff

1,25 % N,N'-Methylenbisacrylamid

Vorratslösung D

8,3 M Harnstoff

Vorratslösung C wurde je nach benötigter Polyacrylamidkonzentration variiert und jeweils mit Vorratslösung D auf 50 ml aufgefüllt.

PAA-Ladepuffer: 3x

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 10 ml
Harnstoff	60,1	9 M	5,4 g
0,5 M EDTA pH 8,0	292,3	50 mM	1 ml
Bromphenolblau	691,9	0,05 % (w/v)	5 mg
Xylencyanol	538,6	0,05 % (w/v)	5 mg

mit H₂O (dest.) auffüllen

5.2.6 Isolierung von Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen

Nach Trennung von Oligonukleotiden durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese [5.2.5] und deren Detektion im Gel wurden die Banden aus dem PAA-Gel ausgeschnitten und zerkleinert. Die Elution aus dem Gel erfolgte dann durch Zusatz von 1 ml 0,3 M Natriumacetat (pH 5,4) für 90 min bei 65° C unter starkem Schütteln. Die Gelmasse wurde daraufhin durch Filtration über silanisierte Glaswolle abgetrennt und die Nukleinsäuren wie unter 5.2.2 beschrieben präzipitiert.

5.2.7 Enzymatische Methoden**5.2.7.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) führt zu exponentieller Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei an den komplementären Strängen hybridisierenden Oligodesoxyribonukleotiden (Primer)^[176-178]. Die Primer [4.11.1] wurden dabei mit Hilfe des Programmes Oligo Calculator 3.02 (<http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>) so gewählt, dass sie ähnliche Schmelztemperaturen aufwiesen und keine Möglichkeit zur Bildung von Primerdimeren oder stabilen sekundären Faltungsmotiven vorhanden war. Die Amplifikation von einzelsträngigen oder doppelsträngigen DNA-Templaten erfolgte zumeist in Ansätzen von 100 µl in einem PCR-Thermocycler.

Standardmäßig wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

1. Initiale Denaturierung	120 sek	95° C
2. Denaturierung	50 sek	95° C
3. Primer- <i>Annealing</i>	60 sek	variabel, je nach verwendeten Primern
4. Elongation	60 sek	72° C
5. finale Elongation	7 min	72° C
Heizdeckeltemperatur		110° C

Die Schritte 2 bis 4 wurden wiederholt, bis keine weitere Amplifikation beobachtet werden konnte.

PCR-Reaktion: 100 µl

Reagenz	Menge	Vorrat	Endkonzentration
PCR Puffer	10 µl	10x	1x
MgCl ₂	6 µl	25 mM	1,5 mM
5'-Primer	1 µl	100 µM	1 µM
3'-Primer	1 µl	100 µM	1 µM
dNTP-Mix	0,8 µl	25 mM	0,2 mM
DNA Templat	nach Bedarf		
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0,5 µl	5 U/µl	0,025 U/µl
H ₂ O (dest.)	auf 100 µl auffüllen		

Ein Ansatz ohne DNA-Templat diente als Negativkontrolle auf unspezifische Amplifikation oder Kontamination mit Fremd-DNA. Nach der PCR-Reaktion wurde nach 5.2.1 mit Phenol und Chloroform extrahiert und anschließend mit Ethanol gemäß 5.2.2 gefällt. Zur Überprüfung der Reaktion wurde ein Aliquot (5 µl) des Ansatzes gemäß [5.2.4] auf einem Agarosegel analysiert.

5.2.7.2 Reverse Transkription

Durch die reverse Transkription (RT) wird ein DNA-RNA-Hybrid aus einem einzelsträngigen RNA Templat und einem RT-Primer (synthetische DNA) erzeugt.

Der auf diese Weise hergestellte zum RNA Templat komplementäre DNA Strang (cDNA) kann dann in einer PCR amplifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die reverse Transkription mit Hilfe der reversen Transkriptase Superscript II durchgeführt. Für die *in vitro* Selektion wurde jedoch auf einen Kombinationsansatz zurückgegriffen, der reverse Transkription und PCR-Amplifikation in einem Reaktionsgemisch vereint [5.4.2].

Zur Durchführung einer reversen Transkription (100 µl Ansatz) wird zunächst Mix I (50 µl) für 10 Minuten bei 42° C inkubiert. Währendessen wird Mix II (50 µl) pipettiert und für 1 Minute bei 95° C denaturiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wird Mix I hinzugegeben und gemischt. Die Reaktion erfolgt anschließend bei 42° C für 60 Minuten. Anschließend wurde eine Phenol/Chloroform Extraktion und eine Ethanol-Fällung [5.2.1; 5.2.2] durchgeführt und in H₂O (dest.) resuspendiert.

RT-Mix I:

<u>Reagenz</u>	<u>Menge</u>	<u>Vorrat</u>	<u>Endkonzentration</u>
RT-Puffer	20 µl	5×	1×
DTT	10 µl	100 mM	10 mM
dNTP Mix	0,8 µl	25 mM	0,2 mM
Superscript II RT	2 µl	200 U/µl	4 U/µl
H ₂ O (dest.)	17,2 µl		

Inkubation bei 42° C für 10 Minuten

RT-Mix II:

<u>Reagenz</u>	<u>Menge</u>	<u>Vorrat</u>	<u>Endkonzentration</u>
RT-Primer	2 µl	100 µM	2 µM
RNA Templat	nach Bedarf		
H ₂ O (dest.)	auf 50 µl auffüllen		

Denaturierung für 1 Minute bei 95° C und Inkubation bei 42° C für 60 Minuten

5.2.7.3 *In vitro* Transkription

Für die *in vitro* Transkription von doppelsträngigen DNA-Templaten wurde die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 verwendet. In der Regel wurden 100 bis 300 pmol dsDNA in einen 100 µl Ansatz eingesetzt. Zur radioaktiven Markierung der RNA wurden [$\alpha^{32}\text{P}$]-markierte Nukleosidtriphosphate zugesetzt.

Nach Transkription über Nacht bei 37° C im Wasserbad wurde das DNA-Templat durch Zugabe von 1 µl DNase I (Endkonzentration 0,1 U/µl) für 15 min bei 37° C degradiert. Anschließend wurden 50 µl EDTA (0,5 M pH 8,0) zugesetzt und eine Ethanol-Fällung mit 6 M Ammoniumacetat gemäß 5.2.2 durchgeführt. Das Pellet wurde daraufhin direkt in 60 µl PAA-Ladepuffer resuspendiert und nach 5.2.5 über denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgereinigt.

Transkriptions-Ansatz: 100 µl

Reagenz	Menge	Vorrat	Endkonzentration
Transkriptionspuffer	20 µl	5x	1x
NTP Mix	10 µl	25 mM	1 mM
Anorg. Pyrophosphatase	1 µl	2 U/µl	0,02 U/µl
[$\alpha^{32}\text{P}$]-NTP	3 µl	10 µCi/µl	0,3 µCi/µl
RNasin	1 µl	40 U/µl	0,4 U/µl
DNA Templat	100 – 300 pmol		
T7 RNA-Polymerase	5 µl	50 U/µl	2,5 U/µl
H ₂ O (dest.)	auf 100 µl auffüllen		

5.2.7.4 Dephosphorylierung von Nukleinsäure mit CIAP

Die alkalische Phosphatase CIAP (*calf intestine alkaline phosphatase*) hydrolysiert die 5'-terminale Phosphoesterbindung an RNA- oder DNA-Molekülen. Dies wurde eingesetzt um die intramolekulare Religation von Vektoren zu verhindern [5.5.2] oder um eine radioaktive Endmarkierung [5.2.7.5] durchführen zu können.

Hierzu wurden die Nukleinsäuren bei 37° C für 15 Minuten mit CIAP gemäß dem folgenden Ansatz inkubiert. Nach erneuter Zugabe von Enzym wurde nochmals für 15 min bei 55° C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion durch EDTA-Lösung wurde

das Enzym für 10 min bei 75° C inaktiviert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion [5.2.1] und Ethanol-Präzipitation [5.2.2] wurde das Pellet in H₂O (dest.) resuspendiert.

CIAP-Puffer 10x

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 10 ml
NaCl	58,44	500 mM	0,29 g
Tris	121,14	100 mM	0,12 g
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	203,3	100 mM	203 mg
DTT	154,2	10 mM	15 mg
ATP	507,18	10 mM	51 mg

pH-Wert auf 7,9 einstellen und mit H₂O (dest.) auffüllen

CIAP-Ansatz: 50 µl

Reagenz	Menge	Vorrat	Endkonzentration
CIAP-Puffer	5 µl	10x	1x
BSA	5 µl	10 mg/ml	1 µg/µl
RNasin	0,5 µl	40 U/µl	0,4 U/µl
CIAP	0,3 µl	57 U/µl	0,17 U/µl
RNA	215 pmol		4,3 µM

H₂O (dest.) auf 50 µl auffüllen

Inkubation: 15 Minuten, 37° C

CIAP + 0,15 µl

Inkubation: 15 Minuten, 55° C

0,5 M EDTA; pH 8,0 0,5 µl

Inkubation: 10 Minuten, 75° C

5.2.7.5 Radioaktive 5'-Endmarkierung von Nucleinsäuren

Zur radioaktiven Endmarkierung wurden 5'-terminal dephosphorylierte Nucleinsäuren unter Verwendung T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK) mit [γ^{32} P]-ATP phosphoryliert. Dazu wurde mit T4-PNK gemäß dem folgenden Ansatz für 45 min bei 37° C im Wasserbad inkubiert.

Kinasierungs-Ansatz: 20 µl

Reagenz	Menge	Vorrat	Endkonzentration
T4-PNK Puffer	2 µl	10x	1x
[γ - ³² P]-ATP	3 µl	10 µCi/µl	1,5 µCi/µl
RNasin	0,5 µl	40 U/µl	1 U/µl
T4-Polynukleotidkinase	2 µl	10 U/µl	1 U/µl
dephosph. RNA/DNA	10 pmol		0,5 µM
H ₂ O (dest.)	auf 20 µl auffüllen		

Durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) wird die Reaktion gestoppt und anschließend die Nukleinsäure durch Ethanol gefällt [5.2.2]. Die Abtrennung von nicht inkorporiertem [γ ³²P]-ATP erfolgte dann entweder über eine PAA-Gel [5.2.5] oder durch Gelfiltration über G25-Sephadex Microspinsäulen nach Herstellerangaben.

5.2.8 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach dem enzymatischen Kettenabbruchverfahren nach Sanger^[179]. Dabei wurde eine Primer-Verlängerung (*extension*) unter Verwendung des Primers pGEM-4ZSQ [4.11.1] in Gegenwart von vier Didesoxyribonukleotiden durchgeführt, die jeweils mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren. Die erhaltenen DNA-Stränge wurden durch eine Ethanol-fällung [5.2.2] von den Komponenten der Reaktionslösung abgetrennt und auf einem AbiPrism 310 kapillarelektrophoretisch getrennt. Die Sequenz ergab sich dann aus der Abfolge der bei unterschiedlichen Wellenlängen detektierten Absorptionsmaxima der fluoreszenzmarkierten DNA-Einzelstränge.

Die Sequenzierung fand unter Verwendung des AmpliTaq[®] FS BigDye Terminator Kits der Firma Perkin Elmer und deren Protokoll statt.

Sequenzierungs-Ansatz: 10 µl

Reagenz	Menge	Vorrat	Endkonzentration
Premix	2 µl		
DNA-Templat	380 ng		
Primer	10 pmol	100 µM	1 µM
H ₂ O (dest.)	auf 10 µl auffüllen		

Temperaturprogramm:

1. Initiale Denaturierung 95° C; 2 min
2. Denaturierung 95° C; 10 sek
3. Annealing 50° C; 5 sek
4. Extension 60° C; 4 min

Die Schritte 2-4 wurden 25x wiederholt.

5.3 Damage Selection

Das Verfahren der „*damage selection*“ wird zur Bestimmung von Bindungsmotiven innerhalb einer Aptamersequenz verwendet^[70].

Hierzu wurde zunächst eine hydrolytische Spaltung des 5'-radiomarkierten [5.2.7.4; 5.2.7.5] RNA-Aptamers K61 mit Natriumhydrogencarbonat durchgeführt [5.3.1]. Die Spaltungsbedingungen wurden so gewählt, dass statistisch jede denkbare Fragmentlänge des Aptamers erzeugt wird. Anschließend wurden jeweils 200 und 150 nM ARNO in 20 µl Selektionspuffer mit 45 fmol der partiell hydrolysierten K61-RNA inkubiert (30 min bei 37° C), die zuvor nach 5.4 gefaltet worden war. Nun wurden die bindenden von den nichtbindenden Fragmentlängen durch Filterbindung an Nitrozellulosefiltern [5.9.1] separiert und die bindenden Fragmente vom Filter eluiert. Dies erfolgt durch zweimaliges Erhitzen mit je 100 µl DS-Elutionspuffer für 3 min bei 95° C in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß. Die beiden Elutionsfraktionen wurden vereint, nach 5.2.2 mit Ethanol präzipitiert und in 6 µl DS-Ladepuffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der unterschiedlichen Fragmente auf einem PAA-Sequenzgel bei 2300 V in 1,5 h nach Protokoll 5.2.5.

Die Zuordnung der einzelnen Fragmente zu einer bestimmten Aptamersequenz erfolgte mit Hilfe einer „Hydrolyseleiter“ und einer spezifischen Spaltungsreaktion mit T1-Ribonuklease [5.3.2], die ebenfalls mit der K61-RNA durchgeführt und auf dem Sequenzgel aufgetragen worden waren.

DS-Elutionspuffer:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 10 ml
Tris	121,14	30 mM	36 mg
Guanidinium*HCl	95,53	6 M	5,73 g
0,5 M EDTA	292,25	5 mM	100 µl

pH-Wert auf 7,5 einstellen und mit H₂O (dest.) auffüllen

DS-Ladepuffer:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 10 ml
Formamide	45,04	95 % (v/v)	9,5 ml
0,5 M EDTA	292,25	10 mM	200 µl
SDS	288	0,1 % (w/v)	10 mg

5.3.1 Partielle alkalische Hydrolyse des RNA-Aptamers K61

Zur partiellen Hydrolyse wurden 0,4 pmol des 5'-terminal ³²P-markierten RNA-Aptamers K61 mit 20 µl 1x Hydrolysepuffer versetzt und 20 min bei 95° C inkubiert. Nach Ethanol-Präzipitation [5.2.2] und Resuspendieren in Wasser wurde die RNA zur „*damage selection*“ [5.3] eingesetzt bzw. 40 fmol mit DS-Ladepuffer verdünnt und als „Hydrolyseleiter“ auf ein entsprechendes Sequenzgel aufgetragen.

Hydrolysepuffer: 5x

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 10 ml
NaHCO ₃	84,01	250 mM	210 mg
0,5 M EDTA	292,25	4 mM	80 µl

5.3.2 T1-Ribonuklease Spaltungsreaktion

Die Ribonuklease T1 spaltet die Phosphodiesterbindung von Ribonukleinsäuren spezifisch bei Guanin. Die auf diese Weise erhaltenen Fragmente der K61-RNA ermöglichten eine Zuordnung der aus der „*damage selection*“ [5.3] erhaltenen Fragmentlängen zu einer bestimmten Sequenzposition auf der RNA. Hierzu wurden zunächst 200 fmol 5'-radiomarkierter K61-RNA mit 10 µg tRNA versetzt und mit Ethanol ausgefällt [5.2.2]. Nach Resuspendieren in 3 µl CEU-Puffer wurde für 5 min bei 50° C inkubiert und mit 0,5 U RNase T1 versetzt. Die spezifische Spaltungsreaktion erfolgte dann während einer Inkubation von 12 min bei 50° C und wurde mit 6 µl DS-Ladepuffer abgestoppt. Die RNA konnte nun direkt auf ein Sequenzgel aufgetragen werden.

CEU-Puffer:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 100 ml
Zitronensäure	210,14	10 mM	210 mg
Natriumcitrat	294,1	15 mM	441 mg
Harnstoff	60,1	7 M	42 g
0,5 M EDTA	292,25	1 mM	200 µl

pH-Wert auf 4,7 einstellen und mit H₂O (dest.) auffüllen

5.4 In vitro Selektion

Die RNA wurde durch *in vitro* Transkription [5.2.7.3] in Gegenwart von [α -³²P]GTP aus der dsDNA-Bibliothek I-N40 [4.11.2] erhalten, über denaturierende PAA-Gelelektrophorese gereinigt [5.2.5; 5.2.6] und anschließend de- und renaturiert. Hierzu wurde die RNA für eine Minute in 1x PBS [5.1.8] auf 95° C erhitzt und nach Zugabe von 3 mM Magnesiumchlorid für 20 min bei 37° C gefaltet. Nun erfolgte die Inkubation mit den Präselektionsmatrizes [5.4.1] im Selektionspuffer mit RNasin (0,8 U/µl) und DTT (4 mM) für 30 min bei 37° C. Nach Überführen in eine Polyprep-Säule wurde mit Selektionspuffer gewaschen und der Durchfluss sowie der erste Waschschrift (200 µl) vereinigt. Diese wurden nun erneut mit RNasin und DTT sowie mit der Selektionsmatrix und ab dem 3. Zyklus zusätzlich mit tRNA bzw. Heparin als Kompetitoren

versetzt und 30 min bei 37° C inkubiert. Nach Waschen mit Selektionspuffer wurde die RNA mit 200 µl Elutionspuffer 3 min auf 95° C erhitzt und nach zweimaligem Waschen mit je 200 µl Elutionspuffer konnten die Eluate im Szintillationszähler einzeln quantifiziert werden. Nun wurden die Elutionsfraktionen vereinigt, Phenol/Chloroform extrahiert sowie Ethanol präzipitiert [5.2.1; 5.2.2]. Anschließend erfolgte eine reverse Transkription und Amplifikation mittels PCR gemäß dem Protokoll 5.4.2.

Elutionsspuffer:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 50 ml
Tris	121,14	30 mM	181 mg
Glycerin	92,09	20 % (v/v)	10 ml
SDS	288	2 % (w/v)	1 g
DTT	154,2	1 M	7,71 g

pH-Wert auf 6,8 einstellen, mit H₂O (dest.) auffüllen und bei -20° C lagern

Selektionspuffer:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 1000 ml
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	177,99	4,3 mM	765 mg
KH ₂ PO ₄	136,09	1,4 mM	191 mg
Kaliumchlorid	74,56	2,7 mM	201 mg
Natriumchlorid	58,44	147 mM	8,59 g
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	203,3	3 mM	610 mg

pH-Wert auf 7,4 einstellen und mit H₂O (dest.) auffüllen

5.4.1 Präparation der Selektionsmatrix

Die Kopplung von ARNO und Cytohesin-1 erfolgte kovalent über freie Aminogruppen an Cyanogenbromid-aktivierte (CNBr-aktivierte) Sepharose.

Hierzu wurde zunächst 0,5 g Sepharosepulver in 4 ml verdünnter Salzsäurelösung (1 mM) gelöst und in eine Bio-Rad Polyprepsäule überführt. Nun wurde mit 200 ml Salzsäurelösung und anschließend mit 9 ml Kopplungspuffer gewaschen und zwecks Prähydrolyse für 3,5 h bei 4° C im Überkopfschüttler inkubiert. Dies verringerte die

Anzahl an reaktiven CNBr-Gruppen auf der Matrixoberfläche und verhindert so die Mehrfach-Kopplung der Proteine an die Säule.

Die Proteine wurden nach 5.1.7 gegen Kopplungspuffer dialysiert und anschließend für 2 h bei Raumtemperatur mit prähydrolysiertes Matrix inkubiert. Dabei wurden die Proteine mit einer Konzentration von 0,8 mg/ml Säulenmaterial eingesetzt. Zusätzlich wurde ein Aliquot der Matrix mit Kopplungspuffer in Abwesenheit von Proteinen inkubiert und stellte die Leermatrix für die spätere Präselektion dar. Nach erfolgter Kopplung wurde die Matrix mit 5 Säulevolumen Kopplungspuffer gewaschen und die verbliebenen reaktiven Gruppen durch 2-stündige Inkubation bei Raumtemperatur mit Blockierungspuffer geblockt. Die Matrix wurde in 3 Zyklen mit je 5 Volumen Waschlösung I und II gewaschen und abschließend in 1x PBS umgepuffert. Die Lagerung der Matrix erfolgte dann in einer 1:1-Suspension in 1x PBS bei 4° C. Die Kopplungseffizienz wurde durch SDS-PAGE kontrolliert [5.1.1].

Kopplungspuffer:

<u>Reagenz</u>	<u>MW [g/mol]</u>	<u>Konzentration</u>	<u>benötigt für 1000 ml</u>
NaHCO ₃	84,01	0,1 M	8,4 g
NaCl	58,44	0,5 M	29,22 g

pH-Wert auf 8,3 einstellen und mit H₂O (dest.) auffüllen

Blockierungspuffer:

<u>Reagenz</u>	<u>MW [g/mol]</u>	<u>Konzentration</u>	<u>benötigt für 1000 ml</u>
Tris	121,14	0,1 M	12,1 g

pH-Wert auf 8,0 einstellen und mit H₂O (dest.) auffüllen

Waschpuffer I:

<u>Reagenz</u>	<u>MW [g/mol]</u>	<u>Konzentration</u>	<u>benötigt für 1000 ml</u>
NH ₄ OAc	77,08	0,1 M	7,71 g
NaCl	58,44	0,5 M	29,2

pH-Wert auf 4,0 einstellen und mit H₂O (dest.) auffüllen

Waschpuffer II:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 1000 ml
Tris	121,14	0,1 M	12,1
NaCl	58,44	0,5 M	29,2

pH-Wert auf 8,0 einstellen und mit H₂O (dest.) auffüllen

5.4.2 Reverse Transkription (RT) und PCR in einem Ansatz

Am Ende jedes Selektionszykluses erfolgte ein Kombinationsansatz aus reverser Transkription und PCR. Daher konnte auf die in Punkt 5.2.7.2 beschriebene Aufarbeitung der cDNA verzichtet werden, welches speziell in den ersten Selektionszyklen einen geringeren systematischen Verlust an bindenden Spezies ermöglichte. Hierzu wurde der folgende Ansatz unter Verwendung des One Step RT-PCR Kits (Qiagen) durchgeführt:

RT-PCR-Reaktion: 100 µl

Reagenz	Menge	Vorrat	Endkonzentration
RT-PCR Puffer	20 µl	5x	1x
Primer P-39F	1 µl	100 µM	1 µM
Primer P-20I	1 µl	100 µM	1 µM
dNTP-Mix	4 µl	10 mM	0,4 mM
DNA Templat	10 µl (entspricht 1/5 der eluierten RNA)		
Enzym-Mix	4 µl		
H ₂ O (dest.)	60 µl		

Temperaturprogramm:

1. Reverse Transkription	30 min	50° C
2. Initiale Denaturierung	15 min	95° C
3. Denaturierung	50 sek	95° C
4. Annealing	1 min	55° C
5. Elongation	1 min	72° C
6. finale Elongation	10 min	72° C
Heizdeckeltemperatur		110° C

Die Schritte 3-5 wurden wiederholt, bis keine weitere Amplifikation mehr beobachtet werden konnte. Die Reaktionskontrolle erfolgte durch Agarosegelelektrophorese [5.2.4]. Anschließend wurden die Ansätze vereinigt, Phenol/Chloroform extrahiert und Ethanolpräzipitiert [5.2.1; 5.2.2].

5.4.3 Poolklonierung in den Sequenzierungsvektor pGEM-4Z

Der angereicherte Pool wurde zwecks Sequenzierung in den Vektor pGEM-4Z (s. Anhang) kloniert. Hierbei wurden die Restriktionsschnittstellen EcoR I und BamH I in die Pool-DNA eingeführt, indem eine Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung der Primer P-SEQ I und P-SEQ II [4.11.1] mit der Polymerase *Pwo* durchgeführt wurde. Die Polymerase *Pwo* bietet den Vorteil einer höheren Lesegenauigkeit als die standardmäßig verwendete *Taq*-Polymerase.

Es wurden 10 identische PCR-Reaktionsansätze der folgenden Zusammensetzung verwendet, nach der Amplifikation vereinigt, Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt [5.2.1; 5.2.2]. Nun konnte der DNA-Pool in den unter 5.5.1 beschriebenen Restriktionsverdau eingesetzt werden.

PCR-Reaktion: 100 µl

Reagenz	Menge	Vorrat	Endkonzentration
PCR Puffer (<i>Pwo</i>)	10 µl	10x	1x
MgSO ₄	8 µl	25 mM	2 mM
Primer P-SEQ I	1 µl	100 µM	1 µM
Primer P-SEQ II	1 µl	100 µM	1 µM
dNTP-Mix	0,8 µl	25 mM	0,2 mM
cDNA-Pool #15	2,2 µl	0,9 µM	20 nM
<i>Pwo</i> DNA Polymerase	1 µl	5 U/µl	0,025 U/µl
H ₂ O (dest.)	76 µl		

Temperaturprogramm:

1. Initiale Denaturierung	2 min	95° C
2. Denaturierung	50 sek	95° C
3. Annealing	1 min	55° C
4. Elongation	1 min	72° C
5. finale Elongation	7 min	72° C
Heizdeckeltemperatur		110° C

Die Schritte 2-4 wurden insgesamt 6x wiederholt.

5.5 Klonierungsmethoden

5.5.1 Restriktionsverdau von doppelsträngiger DNA

Restriktionsendonukleasen katalysieren die hydrolytische Spaltung von Phosphodiesterbindungen an definierten Erkennungssequenzen innerhalb eines DNA-Doppelstranges. In der vorliegenden Arbeit wurden die Endonukleasen EcoR I und BamH I verwendet um die nach 15 Selektionszyklen erhaltene dsDNA in den Sequenzierungsvektor pGEM-4Z zu klonieren.

Zu diesem Zweck wurden 1,5 µg des Vektor pGEM-4Z und 100 pmol der Pool-15 DNA über Nacht bei 37° C in EcoR I-Puffer (New England Biolabs) mit 40 U BamH I und 40 U EcoR I sowie 1 µl BSA (New England Biolabs) in einem Gesamtvolumen von 100 µl inkubiert. Um die intramolekulare Religation des Vektors zu vermeiden, wurde eine Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase [5.2.7.4] durchgeführt. Abschließend wurde eine Reinigung sowohl des Vektors als auch der Pool-DNA über das PCR-Purification Kit (Qiagen) gemäß der Herstellerangaben vorgenommen; die Reaktionskontrolle erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese.

5.5.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4-DNA Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen endständigen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen einer doppelsträngigen DNA. Hierdurch werden rekombinante Plasmide erzeugt, die anschließend in *E. coli* Bakterien transformiert werden können [5.10.7].

Dazu wurden 0,1 pmol linearisiertes Plasmid pGEM-4Z mit dem 60-fachen Überschuss an geschnittener Pool-15 DNA in Gegenwart von 400 U T4 DNA-Ligase inkubiert. Die Ligation erfolgte in 20 µl 1x Ligationspuffer (New England BioLabs) für 2 h bei 37° C. Als Kontrollreaktionen, die ebenfalls transformiert wurden, dienten Ligationsansätze ohne Insert (Kontrolle auf Religation des Plasmids) sowie ohne Insert und Enzym (Kontrolle auf Rest-Kontamination mit ungeschnittenem Plasmid).

Die Selektion von rekombinanten Klonen erfolgte durch das in der „*multiple-cloning site*“ (MCS) enthaltene *lacZ*-Gen, welches für β -Galaktosidase kodiert. In rekombinanten Klonen kann nur eine inaktive Variante dieses Enzyms exprimiert werden, sodass ein dem Medium zugesetzter Profarbstoff (X-Gal) nicht gespalten werden kann [5.10.2]. Klone die ein rekombinantes Plasmid enthalten erscheinen daher weiß, nicht-rekombinante jedoch blau.

5.6 Plasmid-Amplifikation zur Erzeugung von Mutationen

Zur Durchführung von „*Epitop-Mapping*“-Studien wurden große Deletionsmutationen in die cDNA von ARNO unter Verwendung einer Polymerase-Kettenreaktion eingeführt. Zu diesem Zweck wurde der Expressionsvektor pET11d-ARNO (s. Anhang) mittels der DNA-Polymerase *PfuTurbo*[®] (Stratagene) und der 5'-phosphorylierten Primer CCS7 I und CCS7 II bzw. S7PH I und S7PH II [4.11.1] amplifiziert. Dies wurde in fünf identischen PCR-Reaktionsansätzen durchgeführt, die anschließend vereinigt, Phenol/Chloroform extrahiert, mit Ethanol gefällt [5.2.1; 5.2.2] und intramolekular ligiert werden konnten. Dazu wurden 100 ng PCR-Produkt mit 2000 U T4-DNA Ligase in 50 µl Ligationspuffer (New England BioLabs) 1 h bei 37° C inkubiert und anschließend in *E. coli* Bakterien transformiert [5.10.7].

PCR-Reaktion: 100 µl

Reagenz	Menge	Vorrat	Endkonzentration
PCR Puffer (<i>Pfu</i> -Turbo)	10 µl	10x	1x
Primer I	0,5 µl	100 µM	0,5 µM
Primer II	0,5 µl	100 µM	0,5 µM
dNTP-Mix	1 µl	25 mM	250 µM
DNA Templat	1,52 fmol		
<i>Pfu</i> -Turbo Polymerase	1 µl	5 U/µl	0,05 U/µl
H ₂ O (dest.)	auf 100 µl auffüllen		

Temperaturprogramm:

1. Initiale Denaturierung	2 min	95° C
2. Denaturierung	50 sek	95° C
3. Annealing	1 min	58° C (CCS7) und 59° C (S7PH)
4. Elongation	9 min	72° C
5. finale Elongation	7 min	72° C
Heizdeckeltemperatur		110° C

Die Schritte 2-4 wurden insgesamt 15x wiederholt.

5.7 Real-Time PCR

Zur Quantifizierung von RNA nach Transfektion in HeLa-Zellen wurde eine Real-Time PCR durchgeführt. Hierzu wurden zunächst $3 \cdot 10^5$ Zellen mit 15 pmol RNA transfiziert [5.11.3]. Nach Stimulation mit fetalem Kälberserum (FCS) für 3 bzw. 6 Stunden, wurden die Zellen geerntet und die cytoplasmatische total-RNA isoliert [5.11.4]. Anschließend erfolgte eine reverse Transkription [5.2.7.2] und eine *Real-Time* PCR nach folgendem Ansatz in einem iCycler iQ der Firma Bio-Rad unter Verwendung des *iQ SYBR-Green Supermix* Kits.

Real-Time PCR-Reaktion: 25 μ l

Reagenz	Menge	Vorrat	Endkonzentration
iQ SYBR-Green Supermix	12,5 μ l		
Primer P-39F	0,8 μ l	10 μ M	320 nM
Primer P-20I	0,8 μ l	10 μ M	320 nM
Templat	1 μ l (1:100 und 1:1000 verdünnt) aus rev. Transk.		
H ₂ O (dest.)	9,9 μ l		

Temperaturprogramm:

1. Initiale Denaturierung	3 min	95° C
2. Denaturierung	50 sek	95° C
3. Annealing	1 min	55° C
4. Elongation	1 min	72° C

Die Menge an Ziel-RNA in den einzelnen Präparationen wurde anhand einer Eichkurve verschiedener bekannter Templatmengen (800; 80; 8; 0,8; 0,08 amol) synthetischer K61-DNA und dsDNA-Pool bestimmt. Diese Werte wurden abschließend auf die unterschiedlichen total-RNA Ausbeuten normiert.

5.8 Funktionale Studien der Aptamere

5.8.1 GDP/GTP Austauschassay

Im Austauschassay wurde die Auswirkung der Aptamerbindung auf ARNO bei der Katalyse der Δ 17ARF1-Aktivierung untersucht. Zur Detektion wurde die bei Amor et al.^[115] und Macia et al.^[155] beschriebene Änderung der Tryptophan-Fluoreszenz (λ_{exc} =297,5 nm; λ_{em} =340 nm) während der Austauschreaktion auf einem Spektrofluorometer FP6500 (Jasco) verfolgt.

Hierzu wurde ein fünffacher molarer Überschuss der Aptamere bzw. der Startpool-RNA in Selektionspuffer für 10 min bei 37° C mit ARNO (117 nM) inkubiert, um die Komplexbildung zu ermöglichen. Anschließend wurden 100 μ M GTP γ S zugesetzt und die Austauschreaktion durch Injektion von 500 nM Δ 17ARF1 gestartet.

Die Austauschraten (k_{exch}) konnten dann aus der Änderung der Fluoreszenzintensität pro Zeiteinheit bestimmt werden. Dabei gilt die Geschwindigkeitsgleichung 1. Ordnung:

$$I_F = A_0 \left(1 - e^{-k_{\text{exch}} t} \right)$$

I_F = Fluoreszenzintensität
 A_0 = Anfangskonzentration
 k_{exch} = Austauschrate
 t = Zeit

5.8.2 Rekrutierungsassay an PIP₂-dotierte Vesikel

Im Rekrutierungsassay wurde die Auswirkung der Aptamerbindung auf die PH-Domänen vermittelte Assoziation an unilamellare PIP₂-dotierte Vesikel studiert. Entsprechende Vesikel konnten durch die Extruder-Methode nach Antony et al.^[116] erhalten werden. Wie in Macia et al.^[158] beschrieben, wurden die Lipide L- α -Phosphatidylcholin, β -Palmitoyl- γ -oleoyl (PC) und L- α -Phosphatidyl-DL-glycerol, β -Oleoyl- γ -palmitoyl (PG) in Chloroform und das zur Dotierung verwendete Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) in Chloroform/Methanol/Wasser (1:1:0,3) gelöst. Anschließend wurden die Lipide im Massenverhältnis von 60 % PC, 30 % PG und 10 % PIP₂ gemischt. Im Fall der als Kontrolle verwendeten undotierten Vesikel wurde der PIP₂-Anteil durch PG ersetzt. Nun wurde im Vakuum bis zur Trockene eingedampft und in Selektionspuffer resuspendiert, sodass sich eine Endkonzentration von 500 μM ergab. Zwecks Herstellung einer homogenen Lösung wurde 30 sek sonifiziert, in sechs aufeinander folgenden Zyklen in flüssigem Stickstoff gefroren, im Wasserbad bei 37° C aufgetaut und erneut für 60 sek sonifiziert. Abschließend wurde 15x unter Verwendung eines Extruders durch Polycarbonatfilter (0,1 μm Porengröße) gepresst und innerhalb von 24 h nach folgendem Programm auf einem Biacore Pioneer L1-Chip immobilisiert:

1. Waschen der Chip-Oberfläche: 50 μl CHAPS (20 mM); Flussrate: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$
 20 μl NaOH (50 mM); Flussrate: 100 $\mu\text{l}/\text{min}$
2. Immobilisierung: 60 μl Vesikel (500 μM); Flussrate: 5 $\mu\text{l}/\text{min}$
 10 μl NaOH (25 mM)
 30 μl Vesikel (500 μM)
3. Nachwaschen: 10 μl NaOH (50 mM); Flussrate: 100 $\mu\text{l}/\text{min}$

Durchschnittlich konnten auf diese Weise 4000-6000 RU an Vesikeln stabil auf dem Chip immobilisiert werden. Probeninjektionen wurden grundsätzlich bei einer Flussrate von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ in Selektionspuffer vorgenommen, der ebenfalls als Laufpuffer diente. Die Regenerierung der Chipoberfläche erfolgte durch Injektion von 10 μl NaOH (25 mM). Zur Ausbildung von ARNO-Aptamer Komplexen wurde vor der Injektion 10 min bei 37° C in Selektionspuffer inkubiert. Alle erhaltenen Signale wurden auf eine Kontrolloberfläche normiert, die mit undotierten PG/PC-Vesikeln belegt worden war.

5.9 Bindungsstudien

5.9.1 Filterbindung an Nitrozellulosemembranen

Zur Bestimmung von Bindungskonstanten in Lösung wurde 1 nM ^{32}P -endmarkierte RNA [5.2.7.5] nach der Faltung [5.4] mit steigenden Konzentrationen der jeweiligen Proteine in Selektionspuffer für 30 min bei 37° C inkubiert. Die RNA/Protein Komplexe wurden mit Hilfe eines Minifold I (Schleicher & Schuell) auf einen Nitrozellulosefilter (Protran, 0,45 μm , Schleicher & Schuell) aufgebracht und anschließend mit 200 μl Selektionspuffer gewaschen. Die Quantifizierung der gebundenen RNA erfolgte durch einen PhosphorImager (Fujifilm; FLA-3000). Die Datenpunkte wurden mit der Funktion „*Logistic*“ des Programmes Origin[®] 6.1 (OriginLab Corporation) gefittet.

5.9.2 Oberflächenplasmonresonanz (BIAcore)

Die Oberflächenplasmonresonanz (Biacore) wurde als zweite unabhängige Methode neben der in 5.9.1 beschriebenen Filterbindung zur Bestimmung von Bindungskonstanten verwendet. Hierzu wurde ARNO bzw. Cytohesin-1 auf der Oberfläche eines CM5-Chips (Biacore) nach der EDC/NHS Kopplungsstrategie gemäß der Herstellerangaben immobilisiert. Dabei wurde ARNO (1 μM) sowie Cytohesin-1 (1,5 μM) zunächst in einen Natriumacetat-Puffer (10 mM; pH 5,0) überführt [5.1.7] und anschließend bei einer Flussrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ injiziert. Auf diese Weise konnten zwischen 4000-10.000 RU Protein stabil auf dem Chip immobilisiert werden.

Die Aptamere wurden vor der Injektion nach 5.4 gefaltet und steigende Konzentrationen (10-2000 nM) bei einer Flussrate von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ in Selektionspuffer injiziert, der ebenfalls als Laufpuffer diente. Die Chipoberfläche konnte mit 20 μl Guanidiniumhydrochlorid (0,5 M) vollständig und ohne Kapazitätsverlust regeneriert werden. Alle erhaltenen Signale wurden auf eine Kontrolloberfläche normiert, die nach Aktivierung mit EDC/NHS lediglich mit Ethanolamin geblockt worden war. Die Dissoziationskonstanten (K_D) wurden anschließend nach dem „*steady-state*“-Modell unter Verwendung der Biacore-Evaluierungssoftware berechnet.

5.10 Prokaryontische Zellkultur

5.10.1 Allgemeiner Umgang mit prokaryontischer Zellkultur

Alle Arbeiten mit Bakterien wurden unter sterilen Bedingungen entweder unmittelbar neben einer Bunsenbrennerflamme oder in einer Sterilbank mit sterilen Glas- bzw. Plastikwaren durchgeführt. Glasspatel zum Ausplattieren von Bakterien wurden mit 100 % Ethanol über einer Bunsenbrennerflamme sterilisiert. Impfösen wurden nach jedem Arbeitsschritt ausgeglüht.

Die Anzucht von *E. coli* Bakterien in Flüssigkultur erfolgte in sterilen Zentrifugenröhrchen (15 ml oder 50 ml) bzw. Erlenmeyerkolben. Die Nährmedien wurden zur Sterilisation 20 min bei 120° C autoklaviert und bei 4° C gelagert. Selektionsmedien wurden durch Zusetzen von Antibiotika unmittelbar vor dem Animpfen erhalten.

5.10.2 Plattenkultur

Die Anzucht von *E. coli* Bakterien erfolgte durch Ausstreichen von Flüssigkulturen [5.10.3] auf sterilen LB-Agar-Platten. Zur Selektion wurden dem Medium Ampicillin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder Kanamycin (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugesetzt. Zur Detektion von rekombinanten Plasmiden durch Farbselektion nach dem lacZ-Galaktosidase System wurde auf den LB-Platten vor der Verwendung jeweils 20 μl einer 0,2 M IPTG-Lösung und 20 μl einer 10 %igen X-Gal Lösung (w/v) ausgestrichen. Die Inkubation der Bakterienkulturen erfolgt über Nacht bei 37° C im Brutschrank.

5.10.3 Flüssigkultur

Mit Einzelkolonien von einer Plattenkultur wurde 5 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin oder Kanamycin (30 µg/ml) angeimpft und über Nacht bei 37° C und 200 Upm bebrütet. Diese Vorkultur wurde anschließend direkt zum Animpfen einer Hauptkultur für die Proteinexpression oder zur Plasmidpropagation verwendet.

LB-Medium:

<u>Reagenz</u>	<u>benötigt für 1000 ml</u>
LB Broth (Sigma)	20 g

Die entsprechenden Agarnährböden wurden durch Zusatz von 2 % (w/v) Agar hergestellt.

5.10.4 Anlegen von Dauerkulturen

Zwecks Lagerung und schneller Verfügbarkeit von Bakterien wurden Glycerin-Kulturen angelegt. Hierzu wurden 750 µl einer Übernachtskultur in LB-Selektionsmedium mit 750 µl Glycerin-Medium versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Kulturen konnten dann bei -80° C gelagert werden.

Glycerin-Medium:

<u>Reagenz</u>	<u>MW [g/mol]</u>	<u>Konzentration</u>	<u>benötigt für 250 ml</u>
Tris	121,14	25 mM	757 mg
Magnesiumsulfat	120,37	100 mM	3,0 g
Glycerin	92,09	65 % (v/v)	162,5 ml

pH-Wert auf 8,0 einstellen und mit H₂O (dest.) auffüllen

5.10.5 Bestimmung der Bakterienkonzentration in Flüssigkulturen

Mit Hilfe der Trübungsmessung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm lässt sich die Bakterienkonzentration von Flüssigkulturen bestimmen, deren Dichte größer als 10⁶ Zellen/ml ist. Die mathematische Beschreibung der optischen Absorption erfolgt durch das Lambert-Beersche Gesetz [5.1.6.2]. Für *E. coli* Bakterien kann näherungs-

weise eine Konzentration von 8×10^8 Zellen/ml für eine OD_{600} von 1 angenommen werden.

5.10.6 Herstellung kompetenter *E. coli* Bakterien mittels $CaCl_2$

Die Permeabilität von Bakterienmembranen für DNA-Moleküle ist sehr niedrig; sie lässt sich aber durch Behandlung der Zellen mit $CaCl_2$ beträchtlich steigern^[180].

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 200 ml LB-Medium mit 1 ml Bakterienvorkultur angeimpft und bei 37° C bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,7 inkubiert. Anschließend auf 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und 30 min auf Eis abgekühlt. Nach Zentrifugation der Bakterien (1000 x g, 10 min, 4° C) wurde der Überstand verworfen, in 30 ml eisgekühlter 100 mM $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert, nach weiteren 30 min Inkubation auf Eis erneut pelletiert. Nun wurde in 2 ml eisgekühlter $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. Anschließend konnte sofort transformiert werden oder es wurde mit einem Volumen Glycerin-Medium [5.10.4] verdünnt und bei -80° C gelagert.

5.10.7 Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien

Bei der Transformation von *E. coli* Zellen wurden 100-250 ng Plasmid mit 100 µl einer Suspension kompetenter Zellen [5.10.6] vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 40 sek auf 37° C erhitzt, 2 min auf Eis gelagert und 500 µl vorgewärmtes LB-Medium zugesetzt. Nach 45 min Inkubation bei 37° C im Schüttler wurde 2 min bei 4000 Upm zentrifugiert, der Überstand bis auf 100 µl verworfen und die Zellen resuspendiert. Aliquots dieser Zellsuspension wurden dann entweder auf entsprechenden LB-Selektionsplatten ausgestrichen oder eine Flüssigkultur angeimpft.

5.10.8 Heterologe Proteinexpression in *E. coli* Bakterien

Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Proteinexpressionen erfolgten im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) [4.12]. Zu diesem Zweck wurden kompetente Bakterien nach 5.10.6 mit den Expressionsplasmiden pET11d-ARNO, pET11d-CCS7, pET11d-S7PH, pET11a-ARNOS7, pET11a-C1S7 und pET11a-Cyt1 [siehe 4.10 und Anhang] transformiert. Im pET-Expressionssystem^[181, 182] liegt das Gen für die Zielproteine unter

der Kontrolle des Bakteriophagen T7-Promotors. Weiterhin enthalten diese Plasmide das Gen für den lac-Repressor, der an den lac-Operator bindet und so die Expression dieser Proteine in Abwesenheit des Induktors Allolactose unterdrückt.

Nach Selektion der transformierten Bakterien auf LB/Amp-Agarplatten wurden Einzelkolonien in 35 ml LB/Amp-Flüssigmedium überimpft und über Nacht bei 37° C im Bakterienschüttler inkubiert. Diese Vorkultur wurde nun zum Animpfen von 1 L vorgewärmtem LB/Amp-Medium verwendet, welches anschließend bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-1 inkubiert wurde. Die Expression des Zielproteins wurde durch Zusetzen von 1 mM IPTG induziert und erfolgte bei 26° C während einer Inkubation über Nacht.

Die Expression des Zielproteins wurde durch SDS-PAGE Analyse [5.1.1] kontrolliert. Hierzu wurde ein Aliquot (1 ml) der Zellkultur vor und nach der Induktion entnommen, pelletiert und nach Erhitzen (2 min, 95° C) in SDS-Probenpuffer auf das Gel aufgetragen.

5.10.9 Präparation von heterolog exprimierten Fusionsproteinen

Die Bakterien wurden nach Expression des Zielproteins durch Zentrifugation für 10 min bei 3000 x g und 4° C geerntet. Alle weiteren Schritte beziehen sich auf ein Kulturvolumen von einem Liter und wurden entweder auf Eis oder im Kühlraum bei 4° C durchgeführt.

Das Zellpellet wurde zunächst in 20 ml Lysispuffer resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach langsamem Auftauen wurde mit 200 µg/ml Lysozym versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Zur vollständigen Lyse wurde nun auf Eiswasser mittels eines Sonoplus HD70 Sonifikatorstabes nach folgendem Programm sonifiziert:

1. Schritt: 1 min konstant (40 %)
2. Schritt: 2 min Pulse (70 %, cycle 30)
3. Schritt: 3 min Pause
4. Schritt: 2 min Pulse (70 %, cycle 60)
5. Schritt: 2 min Pause
6. Schritt: 1 min konstant (60 %)

Noch unlösliche Bakterienbestandteile wurden 30 min bei 3000 x g abgetrennt, der Überstand aufbewahrt, das erhaltene Pellet in 5 ml Lysispuffer resuspendiert und erneut nach folgendem Programm sonifiziert:

1. Schritt: 1 min konstant (60 %)
2. Schritt: 1 min Pause
3. Schritt: 2 min Pulse (70 %, cycle 40)

Anschließend wurde erneut für 30 min bei 3000 x g pelletiert, die Überstände vereint und 3x für je 1 h bei 35.000 x g zentrifugiert, wobei nach jedem Zentrifugationsschritt der Überstand in eine neues Zentrifugenröhrchen überführt wurde. Das auf diese Weise erhalten Zellysat wurde nun direkt in die unter 5.1.9 beschriebenen chromatographischen Trennungen eingesetzt.

Lysispuffer:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 250 ml
Tris	121,14	20 mM	606 mg
Natriumchlorid	58,44	0,5 M	7,3 g
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	203,3	3 mM	152 mg
Glycerin	92,09	10 % (v/v)	25 ml
NP-40 Igepal		0,1 % (v/v)	0,25 ml
Dithiothreitol	154,2	1 mM	38,6 mg

pH-Wert auf 7,3 einstellen und mit H₂O (dest.) auffüllen

Die folgenden Proteaseinhibitoren wurden dem Lysispuffer kurz vor der Anwendung zugesetzt:

Aprotinin	2 µg/ml
Leupeptin	1 µg/ml
PMSF	1 mM
Benzamidin	Spatelspitze

5.10.10 Plasmid-Präparation aus *E. coli* Bakterien

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen erfolgte zum einen aus analytischen Gründen, z.B. um die Transformation mit dem korrekten Plasmid sicherzustellen oder um eine Sequenzierung mittels des Vektors pGEM-4Z durchzuführen [5.4.3], zum anderen zur Propagation. Hierbei wurde der *E. coli*-Stamm BL21 (DH10B) verwendet [4.12]. Zur Isolierung analytischer Mengen an Plasmid-DNA wurden 5 ml LB-Selektionsmedium inokuliert und für 12 h bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 3000 x g) geerntet und die Plasmide mit Hilfe des *QIAprep Spin Miniprep Kit* der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers isoliert. Zur Herstellung präparativer Mengen an Plasmid-DNA wurden 250 ml LB-Selektionsmedium angeimpft, nach 12 h Inkubation bei 37° C durch Zentrifugation geerntet und mit dem *Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) gemäß der Herstellerangaben behandelt.

5.11 Eukaryontische Zellkultur

5.11.1 Allgemeiner Umgang mit eukaryontischer Zellkultur

Alle Arbeiten mit eukaryontischen Zellen wurden unter einer Sterilbank mit sterilen Glas- bzw. Plastikwaren durchgeführt. Alle Medien oder Puffer wurden unmittelbar vor der Verwendung auf 37° C vorgewärmt.

Die Kultivierung von adhärenenten HeLa Zellen [4.13] erfolgte als Monolayer-Kultur in 75 cm²-Kulturflaschen mit Dulbecco's Mod Eagle Medium (DMEM) unter Stimulation mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FCS) in einem Begasungsbrutschrank (37° C, 5 % CO₂). Das FCS wurde vor der Verwendung für 30 min bei 56° C inaktiviert und anschließend bei 4° C gelagert.

Zum Aussähen der Zellen in Kulturplatten oder zum Verdünnen wurde zunächst mit 1x PBS (Gibco Life Technologies) gewaschen und anschließend mit 2 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 mg Trypsin/ml) für 3 min im Brutschrank inkubiert. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 8 ml DMEM/10 % FCS abgestoppt und die Zellen gut suspendiert. Nach dem Übersetzen in eine weitere 75 cm²-Kulturflasche wurde mit DMEM/10 % FCS auf 40 ml aufgefüllt.

Dabei wurden die Zellen spätestens bei einer optischen Konfluenz von ca. 90 % verdünnt, welche bei einem Verdünnungsfaktor von 1:10 nach 3 Tagen Inkubation wieder erreicht werden konnte.

5.11.2 Handhabung von Dauerkulturen

Zur langfristigen Lagerung von eukaryontischen Zellen wurden Dauerkulturen angelegt. Die Zellen einer ca. 80 % optisch konfluenten 75 cm²-Kulturflasche wurden zunächst mit vorgewärmtem 1x PBS (Gibco Life Technologies) gewaschen. Anschließend wurden 2 ml Trypsin/EDTA zugegeben und kurz geschwenkt. Daraufhin wurde das Trypsin/EDTA wieder abgenommen und die Zellen mit dem zurückgebliebenen Trypsinfilm für 3-5 min im Brutschrank inkubiert.

Währenddessen wurden 4 Cryoröhrchen mit einer Lösung aus 200 µl DMSO (HYBRI-Max) und 400 µl FCS auf 4° C vorgekühlt. Nach dem vollständigen Ablösen der Zellen wurden diese in 5,6 ml auf 4° C vorgekühltem DMEM suspendiert. Je 1,4 ml dieser Zellsuspension wurden dann zum vorgelegten DMSO/10 % FCS gegeben und gemischt. Nun konnte bei -80° C für mehrere Monate gelagert werden.

Zum Auftauen eingefrorener Zellen wurden diese direkt von -80° C in einem Wasserbad auf 37° C erwärmt (ca. 2 min) und mit 45 ml vorgewärmten DMEM / 10 % FCS verdünnt.

5.11.3 Transfektion von Plasmiden, Aptameren und siRNA

Adhärente HeLa Zellen wurden mit Plasmiden, Aptameren oder siRNAs unter Verwendung von Lipofektion transfiziert. Hierzu wurden ca. $6,5 \cdot 10^4$ Zellen (24-well Format) bzw. $3,25 \cdot 10^5$ Zellen (6-well Format) 18-24 h vor der Transfektion in Kulturplatten ausgesät. Anschließend wurden die zu ca. 80 % optisch konfluenten Zellen mit 1x PBS gewaschen und in serumfreiem DMEM für 1 h inkubiert. Währenddessen wurde sowohl das Transfektionsreagenz Metafectene in einem vierfachen Volumenüberschuss, bezogen auf die zu transfizierende Nukleinsäuremasse, als auch die Nukleinsäure(n) in einer 96-well Platte vorgelegt. Beide Lösungen wurden mit je 30 µl DMEM verdünnt, sofort vereint und 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde das Transfektionsgemisch direkt in den Kulturüberstand der Zellen gegeben und

vorsichtig durchmischt. Nach weiteren 15 h Inkubation wurde das serumfreie DMEM durch FCS-haltiges Medium ersetzt. Diese Serumstimulation der Zellen erfolgte dann je nach Anwendung weiter 30 min bis 6 h.

5.11.4 Isolierung von cytoplasmatischer RNA aus HeLa-Zellen

HeLa Zellen wurden wie unter 5.11.3 beschrieben in 6-well Platten kultiviert und nach 3- bzw. 6-stündiger Stimulation mit FCS geerntet. Hierzu wurde zunächst 2x mit je 2 ml 1x PBS pro Vertiefung gewaschen, 300 µl Trypsin/EDTA zugegeben und für 3 min im Brutschrank inkubiert. Die Trypsinierung wurde mit 1,5 ml DMEM abgestoppt, die Zellen suspendiert und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß für 5 min bei 300 x g pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen auf Eis für 5 min mit 100 µl RLN-Puffer, dem 1000 U/ml RNasin und 1 mM DTT zugesetzt worden waren, lysiert. Die total-RNA wurde nun unter Verwendung des RNA/DNA Kits (Qiagen) und dem Protokoll „*Isolation of cytoplasmic RNA from animal cells*“ und „*Isolation of low-molecular weight RNA*“ extrahiert und nach 5.2.4 auf Degradationen überprüft. Die Konzentration wurde nach 5.2.3 bestimmt und anschließend nach 5.2.7.2 unter Verwendung des Primers P-20I [4.11.1] revers transkribiert. Die so erhaltene cDNA wurde abschließend in eine *Real-Time* PCR [5.7] auf einem iCycler iQ eingesetzt. Die Mengen an Pool- bzw. K61-RNA in der Probe wurden durch Vergleich mit entsprechenden Standardmengen bekannter Konzentration bestimmt.

RLN-Lysispuffer:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 100 ml
Tris	121,14	50 mM	606 mg
Natriumchlorid	58,44	140 mM	818 mg
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	203,3	1,5 mM	30,5 mg
NP-40 Igepal		0,5 % (v/v)	0,5 ml

pH-Wert auf 8,0 einstellen und mit H₂O (dest.) auffüllen

5.12 SRE-Luciferase Assay

Im SRE-Luciferase Assay wurde die serumstimulierte Expression des Reporterenzym Luciferase in An- bzw. Abwesenheit von Effektoren bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen in 24-well Kulturplatten mit 1000 ng der Reportermischung, bestehend aus dem Reporterplasmid SRE-Luc und dem Plasmid pEGFP-N1 (siehe 4.10 und Anhang) im Massenverhältnis 4:1, sowie den verschiedenen Effektoren cotransfiziert [5.11.3]. Als Effektoren wurden unterschiedliche Mengen der Aptamere K61 und M69, der Plasmide pRK-wtARNO und N1-ARNO [E156K] sowie der siRNAs Anti-ARNO-366 und Anti-Cyt1-756 verwendet [4.11.2; 4.11.3]. Als Negativkontrolle diente die unselektierte RNA-Bibliothek I-N40. Die „*short-interfering*“ Ribonukleinsäuren wurden von der Firma Dharmacon als Einzelstränge erhalten und gemäß den Herstellerangaben aufgearbeitet und zu einem Doppelstrang hybridisiert. Alle verwendeten Plasmide wurden aus *E. coli* Bakterien präpariert [5.10.10], nach der Isolierung gefällt und in H₂O (dest.) resuspendiert. Die RNA-Aptamere wurden aus den entsprechenden DNA-Templaten unter Verwendung von T7-RNA Polymerase durch *in vitro* Transkription [5.2.7.3] erhalten und anschließend durch PAA-Gelelektrophorese gereinigt [5.2.5; 5.2.6].

Nach Transfektion und Inkubation für 15 h in Abwesenheit von Serum, erfolgte die Stimulation der Zellen durch Zusetzen von 10 % FCS in DMEM. Nach weiteren 4-6 h Inkubation und zweimaligem Waschen mit 1x PBS erfolgte die Zellyse mit 200 µl Reporter-Lysispuffer (Promega) durch zweimaliges Einfrieren bei -80° C und Auftauen bei 37° C im Wasserbad. Nun wurde das Lysat in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, zwecks Abtrennung der Zelltrümmer für 2 min bei 20800 x g zentrifugiert und das klare Lysat in neue Gefäße überführt. Ein 6 µl Aliquot dieses Lysates wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford [5.1.6.3] verwendet, während die EGFP-Fluoreszenzintensität ($\lambda_{ex}=485$ nm; $\lambda_{em}=520$ nm) aus einem weiteren 110 µl-Aliquot bestimmt wurde. Abschließend erfolgte die Bestimmung der Luciferase-Aktivität unter Verwendung des „*Luciferase Assay Systems*“ (Promega) aus einem 100 µl Aliquot nach Herstellerangaben. Die restlichen 94 µl des Zellysates konnten ohne Aktivitätsverlust noch mehrere Tage bei -20° C gelagert werden. Die Lumineszenzintensität wurde auf die Proteinkonzentration, als auch anhand der EGFP-Fluoreszenzintensität, auf die Transfektionseffizienz normiert. Alle verwendeten

Plasmidkonstrukte, mit Ausnahme des Reporterplasmides SRE-Luc, enthielten das jeweilige Strukturgen unter der Kontrolle des humanen Cytomegalovirus (CMV)-Promotors. Im Reporterplasmid SRE-Luc befand sich das Luciferase-Strukturgen unter der Kontrolle des humanen „*serum response element*“ (SRE) Promotors. Die spektroskopischen Messungen erfolgten auf einem POLARstar Optima der Firma BMG.

5.13 p44/42 MAP Kinase Assay

Im p44/42 MAP Kinase Assay wurde die Aktivität der beiden Kinasen Erk1 und Erk2 in An- bzw. Abwesenheit von Effektoren bestimmt. Erk1/-2 wurden zu diesem Zweck zunächst immunpräzipitiert und anschließend mit ihrem physiologischen Substrat Elk-1 inkubiert. Der Phosphorylierungsgrad von Elk-1 stellt dabei ein Maß für die Erk1/-2 Aktivität im untersuchten Lysat dar.

Nach Transfektion von 15 pmol der Aptamere K61, M69, sowie 100 pmol der siRNAs Anti-ARNO-366 und Anti-Cyt1-756 [4.11.2; 4.11.3] in einer 6-well Kulturplatte 5.11.3 erfolgte eine Serumstimulation mit 10 % FCS in DMEM für 30 min im Brutschrank. Als Negativkontrolle diente auch hier der Startpool I-N40. Die Zellyse sowie die Detektion der MAP-Kinase Aktivität erfolgte unter Verwendung des „*p44/42 MAP Kinase Assay Kits*“ der Firma Cell Signaling Technology gemäß der Herstellerangaben.

Hierzu wurden die Zellen zunächst mit 2 ml eiskaltem 1x PBS gewaschen, mit 500 µl Lysispuffer, der 1 mM PMSF als Proteaseinhibitor enthielt, versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Überführen in Eppendorf-Reaktionsgefäße wurde auf Eis sonifiziert (3x je 5 sek bei 30 %; cycle 30) und zum Entfernen der Zelltrümmer für 10 min bei 4° C und 20800 x g zentrifugiert.

Die Immunpräzipitation erfolgte durch Inkubation mit Anti-Phospho-p44/42 MAP Kinase Antikörper, die auf Sepharosebeads immobilisiert worden waren bei 4° C über Nacht. Nach Abtrennen des Überstandes durch Zentrifugation für 30 sek bei 425 x g und 4° C wurden die Beads 2x mit je 500 µl Lysispuffer und 1x mit 500 µl Kinasepuffer gewaschen. Anschließend wurde mit 50 µl Kinasepuffer, sowie 200 µM ATP und 2 µg einer verkürzten Variante von Elk-1 versetzt, für 30 min bei 30° C inkubiert und nach Verdünnen in 25 µl SDS-Ladepuffer für 5 min auf 95° C erhitzt.

Nun wurden 15 µl des Sepharoseüberstandes auf einem SDS-PAGE 5.1.1 aufgetragen und die Proteine anschließend nach 5.1.2 auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Die immunologische Detektion erfolgte gemäß 5.1.3 mittels eines spezifischen Anti-pElk-1 (Ser383) Antikörpers. Als Laufstandard verwendete biotinylierte Proteine wurden ebenfalls mittels eines Anti-Biotin Antikörpers detektiert, der im Gemisch mit dem Anti-pElk-1 (Ser383) Antikörper verwendet wurde. Die quantitative Auswertung der Bandenintensität erfolgte auf einem PhosphorImager FLA-3000 der Firma Fujifilm.

Kapitel 6 Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurden Technologien entwickelt, die eine rasche Analyse des Genoms und Proteoms verschiedener Zelltypen ermöglichen. Erkenntnisse über die biologischen Funktionen neuer zellulärer Komponenten werden dabei immer schneller in die Entwicklung von Therapeutika konvertiert. Somit besteht ein wachsender Bedarf an Techniken, die Inhibitoren zur funktionalen Proteincharakterisierung liefern, aber auch als Ausgangspunkt für die Entwicklung von Wirkstoffen dienen können.

Die Klasse der kleinen Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF) ist an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Vesikeltransport, Organisation des Actincytoskeletts, aber auch T-Zelladhäsion oder -Differenzierung beteiligt. Der Komplexität dieser Signaltransduktion steht eine Funktionsvielfalt der einzelnen Austauschfaktoren gegenüber, die erst unvollständig verstanden ist.

In der vorliegenden Arbeit wird der erste Inhibitor des Austauschfaktors Cytohesin-2 vorgestellt, der keine Wechselwirkung mit den übrigen Mitgliedern der Klasse der kleinen GEF zeigt. Das durch *in vitro* Selektion erhaltene RNA-Aptamer bindet sein Zielprotein unter Beteiligung der Coiled-coil-Domäne ohne dabei die Aktivität der übrigen Domänen zu modulieren.

Bisher war die intrazelluläre Verwendung von Aptameren (Intramere) an die Etablierung eines geeigneten Expressionssystems geknüpft. Diese Einschränkung konnte überwunden werden. So kann das Anti-Cytohesin-2 Aptamer ohne weitere Modifizierung oder Stabilisierung in das Cytosol der Zielzelle transfiziert werden, die zelluläre Transkriptionsmaschinerie wird nicht benötigt. Diese Faktoren vereinfachen und beschleunigen den Einsatz von Aptameren zur biologischen Funktionsaufklärung wesentlich.

Die Analyse von Cytohesin-2 unter Verwendung eines Intramers führte zu einer bis dato unbekanntem Funktion als positiver Effektor der MAP-Kinasen Erk1/-2. So wird die serumabhängige Expression von Genen unter der Kontrolle des „*serum response*

elements“ (SRE) durch Inhibition von Cytohesin-2 erheblich reduziert. Die hohe Spezifität des Aptamers erlaubt hierbei eine Abgrenzung der Funktion von Cytohesin-2 im MAP-Signalweg gegenüber den übrigen kleinen GEF und eine Zuordnung zur Coiled-coil-Domäne.

Darüber hinaus konnte durch genetische Verfahren eine Beteiligung der Sec7-Austauschaktivität an der Modulation der MAP-Kaskade nachgewiesen werden. Eine regulatorische Funktion der Coiled-coil-Domäne bezüglich der Sec7-Aktivität erscheint damit als wahrscheinlich und erlaubt erste Einblicke in mechanistische Abläufe dieser Signaltransduktion. Der homologe Austauschfaktor Cytohesin-1 konnte als Effektor der Erk1/-2-Aktivität in Nichtimmunzellen ausgeschlossen werden.

Diese Ergebnisse wurden durch genetische Strategien und „*short-interfering*“-RNA bestätigt und unterstreichen das Potential der Intramertechnologie als Alternative zu etablierten Verfahren.

Ein besonderer Vorteil von Aptameren als Werkzeug der biologischen Funktionsaufklärung liegt in deren Konvertierbarkeit in ein organisches - wirkstoffähnliches - Molekül durch den Einsatz in der Analyse von Substanzbibliotheken. Voraussetzung hierfür ist eine geringe Größe des Aptamers. Aus diesem Grund wurde ein Minimalmotiv bestimmt, dessen Basenzahl gegenüber der Volllänge mehr als halbiert werden konnte, ohne dass ein Verlust der Bindungseigenschaften eintrat.

Der MAP-Signalweg ist von zentraler Bedeutung für eine Fülle wichtiger zellulärer Vorgänge wie Proliferation, Apoptose oder maligner Transformation. Diese Kaskade wird daher bereits durch Therapeutika adressiert. Cytohesin-2 könnte als neuer Effektor dieses Signalweges eine Alternative zu etablierten Strategien zur Modulation der MAP-Kaskade sein.

Kapitel 7 Literaturverzeichnis

1. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
2. Huber, L.A., *Is proteomics heading in the wrong direction?* Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(1): p. 74-80.
3. O'Farrell, P.H., *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. J Biol Chem, 1975. **250**(10): p. 4007-21.
4. Pasquali, C., I. Fialka, and L.A. Huber, *Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins*. Electrophoresis, 1997. **18**(14): p. 2573-81.
5. Murphy, D., *Gene expression studies using microarrays: principles, problems, and prospects*. Adv Physiol Educ, 2002. **26**(1-4): p. 256-70.
6. Templin, M.F., et al., *Protein microarray technology*. Trends Biotechnol, 2002. **20**(4): p. 160-6.
7. Templin, M.F., et al., *Protein microarrays: promising tools for proteomic research*. Proteomics, 2003. **3**(11): p. 2155-66.
8. Ho, Y., et al., *Systematic identification of protein complexes in Saccharomyces cerevisiae by mass spectrometry*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 180-3.
9. Figeys, D., L.D. McBroom, and M.F. Moran, *Mass spectrometry for the study of protein-protein interactions*. Methods, 2001. **24**(3): p. 230-9.
10. Porter, D. and K. Polyak, *Cancer target discovery using SAGE*. Expert Opin Ther Targets, 2003. **7**(6): p. 759-69.
11. Boheler, K.R. and M.D. Stern, *The new role of SAGE in gene discovery*. Trends Biotechnol, 2003. **21**(2): p. 55-7; discussion 57-8.
12. Rigaut, G., et al., *A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(10): p. 1030-2.
13. Puig, O., et al., *The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification*. Methods, 2001. **24**(3): p. 218-29.
14. McMahon, S.B., et al., *The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins*. Cell, 1998. **94**(3): p. 363-74.
15. Ohh, M., et al., *The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix*. Mol Cell, 1998. **1**(7): p. 959-68.
16. Daly, C.J. and J.C. McGrath, *Fluorescent ligands, antibodies, and proteins for the study of receptors*. Pharmacol Ther, 2003. **100**(2): p. 101-18.
17. Stajlgjar, I., *Finding partners: emerging protein interaction technologies applied to signaling networks*. Sci STKE, 2003. **2003**(213): p. pe56.
18. Uetz, P., et al., *A comprehensive analysis of protein-protein interactions in Saccharomyces cerevisiae*. Nature, 2000. **403**(6770): p. 623-7.
19. Gossen, M. and H. Bujard, *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(12): p. 5547-51.
20. Gossen, M., et al., *Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells*. Science, 1995. **268**(5218): p. 1766-9.
21. Branch, A.D., *A good antisense molecule is hard to find*. Trends Biochem Sci, 1998. **23**(2): p. 45-50.
22. Lavery, K.S. and T.H. King, *Antisense and RNAi: powerful tools in drug target discovery and validation*. Curr Opin Drug Discov Devel, 2003. **6**(4): p. 561-9.
23. Dykxhoorn, D.M., C.D. Novina, and P.A. Sharp, *Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(6): p. 457-67.
24. Scherr, M., M.A. Morgan, and M. Eder, *Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells*. Curr Med Chem, 2003. **10**(3): p. 245-56.
25. Famulok, M., M. Blind, and G. Mayer, *Intramers as promising new tools in functional proteomics*. Chem Biol, 2001. **8**(10): p. 931-9.
26. Thompson, L.A. and J.A. Ellman, *Synthesis and Applications of Small Molecule Libraries*. Chem Rev, 1996. **96**(1): p. 555-600.
27. Jayawickreme, C.K. and T.A. Kost, *Gene expression systems in the development of high-throughput screens*. Curr Opin Biotechnol, 1997. **8**(5): p. 629-34.

28. Rademann, J. and G. Jung, *Techview: drug discovery. Integrating combinatorial synthesis and bioassays*. Science, 2000. **287**(5460): p. 1947-8.
29. Osborne, S.E. and A.D. Ellington, *Nucleic Acid Selection and the Challenge of Combinatorial Chemistry*. Chem Rev, 1997. **97**(2): p. 349-370.
30. Scott, J.K. and G.P. Smith, *Searching for peptide ligands with an epitope library*. Science, 1990. **249**(4967): p. 386-90.
31. Smith, G.P. and V.A. Petrenko, *Phage Display*. Chem Rev, 1997. **97**(2): p. 391-410.
32. Mattheakis, L.C., R.R. Bhatt, and W.J. Dower, *An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(19): p. 9022-6.
33. Hanes, J. and A. Pluckthun, *In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(10): p. 4937-42.
34. Jermutus, L., L.A. Ryabova, and A. Pluckthun, *Recent advances in producing and selecting functional proteins by using cell-free translation*. Curr Opin Biotechnol, 1998. **9**(5): p. 534-48.
35. Keefe, A.D. and J.W. Szostak, *Functional proteins from a random-sequence library*. Nature, 2001. **410**(6829): p. 715-8.
36. Ellington, A.D. and J.W. Szostak, *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*. Nature, 1990. **346**(6287): p. 818-22.
37. Tuerk, C. and L. Gold, *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase*. Science, 1990. **249**(4968): p. 505-10.
38. Conrad, R., et al., *Isozyme-specific inhibition of protein kinase C by RNA aptamers*. J Biol Chem, 1994. **269**(51): p. 32051-4.
39. Jenison, R.D., et al., *High-resolution molecular discrimination by RNA*. Science, 1994. **263**(5152): p. 1425-9.
40. Wiegand, T.W., et al., *High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I*. J Immunol, 1996. **157**(1): p. 221-30.
41. Nishikawa, F., et al., *Inhibition of HCV NS3 protease by RNA aptamers in cells*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(7): p. 1935-43.
42. Mayer, G., et al., *Controlling small guanine-nucleotide-exchange factor function through cytoplasmic RNA intramers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(9): p. 4961-5.
43. Rhie, A., et al., *Characterization of 2'-fluoro-RNA aptamers that bind preferentially to disease-associated conformations of prion protein and inhibit conversion*. J Biol Chem, 2003. **278**(41): p. 39697-705.
44. Green, L.S., et al., *Inhibitory DNA ligands to platelet-derived growth factor B-chain*. Biochemistry, 1996. **35**(45): p. 14413-24.
45. Pagratis, N.C., et al., *Potent 2'-amino-, and 2'-fluoro-2'-deoxyribonucleotide RNA inhibitors of keratinocyte growth factor*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(1): p. 68-73.
46. Green, L.S., et al., *Nuclease-resistant nucleic acid ligands to vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor*. Chem Biol, 1995. **2**(10): p. 683-95.
47. Hicke, B.J., et al., *Tenascin-C aptamers are generated using tumor cells and purified protein*. J Biol Chem, 2001. **276**(52): p. 48644-54.
48. Kim, Y.M., et al., *Specific modulation of the anti-DNA autoantibody-nucleic acids interaction by the high affinity RNA aptamer*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **300**(2): p. 516-23.
49. Kimoto, M., et al., *Anti-(Raf-1) RNA aptamers that inhibit Ras-induced Raf-1 activation*. Eur J Biochem, 2002. **269**(2): p. 697-704.
50. Tuerk, C., S. MacDougal, and L. Gold, *RNA pseudoknots that inhibit human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(15): p. 6988-92.
51. Bae, S.J., et al., *In vitro selection of specific RNA inhibitors of NFATc*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **298**(4): p. 486-92.
52. Pan, W., et al., *Isolation of virus-neutralizing RNAs from a large pool of random sequences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(25): p. 11509-13.
53. Famulok, M., *Molecular Recognition of Amino Acids by RNA-Aptamers: An L-Citrulline Binding RNA Motif and Its Evolution into an L-Arginine Binder*. J. Am. Chem. Soc., 1994. **116**: p. 1698-1706.
54. Geiger, A., et al., *RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(6): p. 1029-36.
55. Lozupone, C., et al., *Selection of the simplest RNA that binds isoleucine*. Rna, 2003. **9**(11): p. 1315-22.

56. Majerfeld, I. and M. Yarus, *Isoleucine:RNA sites with associated coding sequences*. Rna, 1998. **4**(4): p. 471-8.
57. Famulok, M. and G. Mayer, *Aptamers as tools in molecular biology and immunology*. Curr Top Microbiol Immunol, 1999. **243**: p. 123-36.
58. Famulok, M., *Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules*. Curr Opin Struct Biol, 1999. **9**(3): p. 324-9.
59. Lauhon, C.T. and J.W. Szostak, *RNA aptamers that bind flavin and nicotinamide redox cofactors*. J Am Chem Soc, 1995. **117**(4): p. 1246-57.
60. Sassanfar, M. and J.W. Szostak, *An RNA motif that binds ATP*. Nature, 1993. **364**(6437): p. 550-3.
61. HuiZenga, D.E. and J.W. Szostak, *A DNA aptamer that binds adenosine and ATP*. Biochemistry, 1995. **34**(2): p. 656-65.
62. Jellinek, D., et al., *High-affinity RNA ligands to basic fibroblast growth factor inhibit receptor binding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(23): p. 11227-31.
63. White, R.R., et al., *Inhibition of rat corneal angiogenesis by a nuclease-resistant RNA aptamer specific for angiopoietin-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): p. 5028-33.
64. Lee, S.W. and B.A. Sullenger, *Isolation of a nuclease-resistant decoy RNA that can protect human acetylcholine receptors from myasthenic antibodies*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(1): p. 41-5.
65. Ostendorf, T., et al., *The effects of platelet-derived growth factor antagonism in experimental glomerulonephritis are independent of the transforming growth factor-beta system*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(3): p. 658-67.
66. Ostendorf, T., et al., *Specific antagonism of PDGF prevents renal scarring in experimental glomerulonephritis*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(5): p. 909-18.
67. Aurup, H., D.M. Williams, and F. Eckstein, *2'-Fluoro- and 2'-amino-2'-deoxynucleoside 5'-triphosphates as substrates for T7 RNA polymerase*. Biochemistry, 1992. **31**(40): p. 9636-41.
68. Lin, Y., et al., *Modified RNA sequence pools for in vitro selection*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(24): p. 5229-34.
69. Vater, A. and S. Klussmann, *Toward third-generation aptamers: Spiegelmers and their therapeutic prospects*. Curr Opin Drug Discov Devel, 2003. **6**(2): p. 253-61.
70. Jellinek, D., et al., *Inhibition of receptor binding by high-affinity RNA ligands to vascular endothelial growth factor*. Biochemistry, 1994. **33**(34): p. 10450-6.
71. *Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase II study results*. Ophthalmology, 2003. **110**(5): p. 979-86.
72. Blind, M., W. Kolanus, and M. Famulok, *Cytoplasmic RNA modulators of an inside-out signal-transduction cascade*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3606-10.
73. Good, P.D., et al., *Expression of small, therapeutic RNAs in human cell nuclei*. Gene Ther, 1997. **4**(1): p. 45-54.
74. Gwizdek, C., et al., *Terminal minihelix, a novel RNA motif that directs polymerase III transcripts to the cell cytoplasm. Terminal minihelix and RNA export*. J Biol Chem, 2001. **276**(28): p. 25910-8.
75. Hamm, J. and M. Fornerod, *Anti-idiotypic RNAs that mimic the leucine-rich nuclear export signal and specifically bind to CRM1/exportin 1*. Chem Biol, 2000. **7**(5): p. 345-54.
76. Shi, H., B.E. Hoffman, and J.T. Lis, *RNA aptamers as effective protein antagonists in a multicellular organism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(18): p. 10033-8.
77. Cox, J.C., et al., *Automated selection of aptamers against protein targets translated in vitro: from gene to aptamer*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(20): p. e108.
78. Cox, J.C. and A.D. Ellington, *Automated selection of anti-protein aptamers*. Bioorg Med Chem, 2001. **9**(10): p. 2525-31.
79. Drolet, D.W., et al., *A high throughput platform for systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX)*. Comb Chem High Throughput Screen, 1999. **2**(5): p. 271-8.
80. Drolet, D.W., L. Moon-McDermott, and T.S. Romig, *An enzyme-linked oligonucleotide assay*. Nat Biotechnol, 1996. **14**(8): p. 1021-5.
81. Tavitian, B., *In vivo imaging with oligonucleotides for diagnosis and drug development*. Gut, 2003. **52 Suppl 4**: p. iv40-7.
82. Younes, C.K., R. Boisgard, and B. Tavitian, *Labelled oligonucleotides as radiopharmaceuticals: pitfalls, problems and perspectives*. Curr Pharm Des, 2002. **8**(16): p. 1451-66.

83. Yang, X., et al., *Immunofluorescence assay and flow-cytometry selection of bead-bound aptamers*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(10): p. e54.
84. Blank, M., et al., *Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels. selective targeting of endothelial regulatory protein pigpen*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16464-8.
85. McCauley, T.G., N. Hamaguchi, and M. Stanton, *Aptamer-based biosensor arrays for detection and quantification of biological macromolecules*. Anal Biochem, 2003. **319**(2): p. 244-50.
86. Liss, M., et al., *An aptamer-based quartz crystal protein biosensor*. Anal Chem, 2002. **74**(17): p. 4488-95.
87. Fredriksson, S., et al., *Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(5): p. 473-7.
88. Hartig, J.S., et al., *Protein-dependent ribozymes report molecular interactions in real time*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(7): p. 717-22.
89. Fang, X., et al., *Molecular aptamer for real-time oncoprotein platelet-derived growth factor monitoring by fluorescence anisotropy*. Anal Chem, 2001. **73**(23): p. 5752-7.
90. Howe, A.K., A.E. Aplin, and R.L. Juliano, *Anchorage-dependent ERK signaling--mechanisms and consequences*. Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(1): p. 30-5.
91. Lee, J.T.J. and J.A. McCubrey, *Targeting the Raf kinase cascade in cancer therapy - novel molecular targets and therapeutic strategies*. Expert Opin Ther Targets, 2002. **6**(6): p. 1-20.
92. Ross, E.M. and T.M. Wilkie, *GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 795-827.
93. Kolch, W., *Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions*. Biochem J, 2000. **351 Pt 2**: p. 289-305.
94. Abraham, D., et al., *Raf-1-associated protein phosphatase 2A as a positive regulator of kinase activation*. J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 22300-4.
95. Chong, H., J. Lee, and K.L. Guan, *Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation*. Embo J, 2001. **20**(14): p. 3716-27.
96. Morrison, D.K., *KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway?* J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 9): p. 1609-12.
97. Blalock, W.L., et al., *Signal transduction, cell cycle regulatory, and anti-apoptotic pathways regulated by IL-3 in hematopoietic cells: possible sites for intervention with anti-neoplastic drugs*. Leukemia, 1999. **13**(8): p. 1109-66.
98. Frost, J.A., et al., *Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins*. Embo J, 1997. **16**(21): p. 6426-38.
99. Avruch, J., et al., *Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade*. Recent Prog Horm Res, 2001. **56**: p. 127-55.
100. Vanderkuur, J.A., et al., *Signaling molecules involved in coupling growth hormone receptor to mitogen-activated protein kinase activation*. Endocrinology, 1997. **138**(10): p. 4301-7.
101. Kolch, W., et al., *The role of Raf kinases in malignant transformation*. Exp. Rev. Mol. Med., 2002. <http://www.expertreviews.org/02004386h.htm>
102. Vossler, M.R., et al., *cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway*. Cell, 1997. **89**(1): p. 73-82.
103. Agell, N., et al., *Modulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by Ca(2+), and calmodulin*. Cell Signal, 2002. **14**(8): p. 649-54.
104. Ueda, Y., et al., *Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf*. J Biol Chem, 1996. **271**(38): p. 23512-9.
105. Yang, S.H., A.D. Sharrocks, and A.J. Whitmarsh, *Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades*. Gene, 2003. **320**: p. 3-21.
106. Matter, N., P. Herrlich, and H. Konig, *Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68*. Nature, 2002. **420**(6916): p. 691-5.
107. Murphy, L.O., et al., *Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(8): p. 556-64.
108. Hazzalin, C.A. and L.C. Mahadevan, *MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch?* Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(1): p. 30-40.
109. Treisman, R., *Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors*. Cell, 1986. **46**(4): p. 567-74.

110. Chai, J. and A.S. Tarnawski, *Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing*. J Physiol Pharmacol, 2002. **53**(2): p. 147-57.
111. Treisman, R., *The serum response element*. Trends Biochem Sci, 1992. **17**(10): p. 423-6.
112. Nie, Z., D.S. Hirsch, and P.A. Randazzo, *Arf and its many interactors*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(4): p. 396-404.
113. Jackson, C.L. and J.E. Casanova, *Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors*. Trends Cell Biol, 2000. **10**(2): p. 60-7.
114. Franco, M., et al., *Myristoylation of ADP-ribosylation factor 1 facilitates nucleotide exchange at physiological Mg²⁺ levels*. J Biol Chem, 1995. **270**(3): p. 1337-41.
115. Amor, J.C., et al., *Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP*. Nature, 1994. **372**(6507): p. 704-8.
116. Antony, B., et al., *N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange*. Biochemistry, 1997. **36**(15): p. 4675-84.
117. Moss, J. and M. Vaughan, *Molecules in the ARF orbit*. J Biol Chem, 1998. **273**(34): p. 21431-4.
118. Donaldson, J.G. and C.L. Jackson, *Regulators and effectors of the ARF GTPases*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(4): p. 475-82.
119. Yamaji, R., et al., *Identification and localization of two brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors in a macromolecular complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(6): p. 2567-72.
120. Claude, A., et al., *GBF1: A novel Golgi-associated BFA-resistant guanine nucleotide exchange factor that displays specificity for ADP-ribosylation factor 5*. J Cell Biol, 1999. **146**(1): p. 71-84.
121. Franco, M., et al., *EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization*. Embo J, 1999. **18**(6): p. 1480-91.
122. Someya, A., et al., *ARF-GEP(100), a guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor 6*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(5): p. 2413-8.
123. Kolanus, W., et al., *Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule*. Cell, 1996. **86**(2): p. 233-42.
124. Chardin, P., et al., *A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains*. Nature, 1996. **384**(6608): p. 481-4.
125. Franco, M., et al., *ARNO3, a Sec7-domain guanine nucleotide exchange factor for ADP ribosylation factor 1, is involved in the control of Golgi structure and function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(17): p. 9926-31.
126. Ogasawara, M., et al., *Similarities in function and gene structure of cytohesin-4 and cytohesin-1, guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors*. J Biol Chem, 2000. **275**(5): p. 3221-30.
127. Cherfils, J., et al., *Structure of the Sec7 domain of the Arf exchange factor ARNO*. Nature, 1998. **392**(6671): p. 101-5.
128. Pacheco-Rodriguez, G., et al., *Guanine nucleotide exchange on ADP-ribosylation factors catalyzed by cytohesin-1 and its Sec7 domain*. J Biol Chem, 1998. **273**(41): p. 26543-8.
129. Klarlund, J.K., et al., *Distinct polyphosphoinositide binding selectivities for pleckstrin homology domains of GRPI-like proteins based on diglycine versus triglycine motifs*. J Biol Chem, 2000. **275**(42): p. 32816-21.
130. Knorr, T., W. Nagel, and W. Kolanus, *Phosphoinositides determine specificity of the guanine-nucleotide exchange activity of cytohesin-1 for ADP-ribosylation factors derived from a mammalian expression system*. Eur J Biochem, 2000. **267**(12): p. 3784-91.
131. Santy, L.C., et al., *Regulation of ARNO nucleotide exchange by a PH domain electrostatic switch*. Curr Biol, 1999. **9**(20): p. 1173-6.
132. Beraud-Dufour, S., et al., *A glutamic finger in the guanine nucleotide exchange factor ARNO displaces Mg²⁺ and the beta-phosphate to destabilize GDP on ARF1*. Embo J, 1998. **17**(13): p. 3651-9.
133. Geiger, C., et al., *Cytohesin-1 regulates beta-2 integrin-mediated adhesion through both ARF-GEF function and interaction with LFA-1*. Embo J, 2000. **19**(11): p. 2525-36.
134. Perez, O.D., et al., *Leukocyte functional antigen 1 lowers T cell activation thresholds and signaling through cytohesin-1 and Jun-activating binding protein 1*. Nat Immunol, 2003. **4**(11): p. 1083-92.
135. Shimizu, Y., *LFA-1: more than just T cell Velcro*. Nat Immunol, 2003. **4**(11): p. 1052-4.

136. Meacci, E., et al., *Cytohesin-1, a cytosolic guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1745-8.
137. Klarlund, J.K., et al., *Signaling complexes of the FERM domain-containing protein GRSP1 bound to ARF exchange factor GRP1*. J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 40065-70.
138. Nevriy, D.J., et al., *Interaction of GRASP, a protein encoded by a novel retinoic acid-induced gene, with members of the cytohesin family of guanine nucleotide exchange factors*. J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 16827-36.
139. Tang, P., et al., *Cybr, a cytokine-inducible protein that binds cytohesin-1 and regulates its activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(5): p. 2625-9.
140. Mansour, M., S.Y. Lee, and B. Pohajdak, *The N-terminal coiled coil domain of the cytohesin/ARNO family of guanine nucleotide exchange factors interacts with the scaffolding protein CASP*. J Biol Chem, 2002. **277**(35): p. 32302-9.
141. Boehm, T., et al., *Attenuation of cell adhesion in lymphocytes is regulated by CYTIP, a protein which mediates signal complex sequestration*. Embo J, 2003. **22**(5): p. 1014-24.
142. Venkateswarlu, K., *Interaction protein for cytohesin exchange factors 1 (IPCEF1) binds cytohesin 2 and modifies its activity*. J Biol Chem, 2003. **278**(44): p. 43460-9.
143. Theis, M.G., *Heterologe Expression von Cytohesin-2 in Escherichia Coli und Präparation einer Nukleinsäure-Bibliothek zur in vitro Selektion von RNA-Aptameren für Cytohesin 2*. 2000. **Universität Bonn**.
144. Burgstaller, P., M. Kochoyan, and M. Famulok, *Structural probing and damage selection of citrulline- and arginine-specific RNA aptamers identify base positions required for binding*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(23): p. 4769-76.
145. Costa, G.L. and M.P. Weiner, *Polishing with T4 or Pfu polymerase increases the efficiency of cloning of PCR fragments*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(12): p. 2423.
146. Clark, J.M., *Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(20): p. 9677-86.
147. Clark, J.M., C.M. Joyce, and G.P. Beardsley, *Novel blunt-end addition reactions catalyzed by DNA polymerase I of Escherichia coli*. J Mol Biol, 1987. **198**(1): p. 123-7.
148. Hu, G., *DNA polymerase-catalyzed addition of nontemplated extra nucleotides to the 3' end of a DNA fragment*. DNA Cell Biol, 1993. **12**(8): p. 763-70.
149. Kunkel, T.A., *Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(2): p. 488-92.
150. Taylor, J.W., J. Ott, and F. Eckstein, *The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA*. Nucleic Acids Res, 1985. **13**(24): p. 8765-85.
151. Vandeyar, M.A., et al., *A simple and rapid method for the selection of oligodeoxynucleotide-directed mutants*. Gene, 1988. **65**(1): p. 129-33.
152. Geiser, M., et al., *Integration of PCR fragments at any specific site within cloning vectors without the use of restriction enzymes and DNA ligase*. Biotechniques, 2001. **31**(1): p. 88-90, 92.
153. Wang, W. and B.A. Malcolm, *Two-stage polymerase chain reaction protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions, and insertions, using QuikChange site-directed mutagenesis*. Methods Mol Biol, 2002. **182**: p. 37-43.
154. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 3 ed. 2001, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
155. Macia, E., M. Chabre, and M. Franco, *Specificities for the small G proteins ARF1 and ARF6 of the guanine nucleotide exchange factors ARNO and EFA6*. J Biol Chem, 2001. **276**(27): p. 24925-30.
156. Jackson, T.R., B.G. Kearns, and A.B. Theibert, *Cytohesins and centaurins: mediators of PI 3-kinase-regulated Arf signaling*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(10): p. 489-95.
157. Paris, S., et al., *Role of protein-phospholipid interactions in the activation of ARF1 by the guanine nucleotide exchange factor Arno*. J Biol Chem, 1997. **272**(35): p. 22221-6.
158. Macia, E., S. Paris, and M. Chabre, *Binding of the PH and polybasic C-terminal domains of ARNO to phosphoinositides and to acidic lipids*. Biochemistry, 2000. **39**(19): p. 5893-901.
159. Kubik, M.F., et al., *Isolation and characterization of 2'-fluoro-, 2'-amino-, and 2'-fluoro-/amino-modified RNA ligands to human IFN-gamma that inhibit receptor binding*. J Immunol, 1997. **159**(1): p. 259-67.
160. Jordan, M.A., D. Thrower, and L. Wilson, *Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids*. Cancer Res, 1991. **51**(8): p. 2212-22.

161. Martell, R.E., J.R. Nevins, and B.A. Sullenger, *Optimizing aptamer activity for gene therapy applications using expression cassette SELEX*. Mol Ther, 2002. **6**(1): p. 30-4.
162. Lee, D. and W.H. McClain, *Aptamer redesigned tRNA is nonfunctional and degraded in cells*. Rna, 2004. **10**(1): p. 7-11.
163. Chang, F., et al., *Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention*. Leukemia, 2003. **17**(7): p. 1263-93.
164. Chong, H., H.G. Vikis, and K.L. Guan, *Mechanisms of regulating the Raf kinase family*. Cell Signal, 2003. **15**(5): p. 463-9.
165. Meyer, D.J., et al., *The serum response element can mediate induction of c-fos by growth hormone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(14): p. 6721-5.
166. Liao, J., et al., *Growth hormone regulates ternary complex factors and serum response factor associated with the c-fos serum response element*. J Biol Chem, 1997. **272**(41): p. 25951-8.
167. Li, H.S., et al., *The Guanine Nucleotide Exchange Factor ARNO mediates the activation of ARF and phospholipase D by insulin*. BMC Cell Biol, 2003. **4**(1): p. 13.
168. Rizzo, M.A., et al., *The recruitment of Raf-1 to membranes is mediated by direct interaction with phosphatidic acid and is independent of association with Ras*. J Biol Chem, 2000. **275**(31): p. 23911-8.
169. Shome, K., C. Vasudevan, and G. Romero, *ARF proteins mediate insulin-dependent activation of phospholipase D*. Curr Biol, 1997. **7**(6): p. 387-96.
170. Kalota, A., S.E. Shetzline, and A.M. Gewirtz, *Progress in the Development of Nucleic Acid Therapeutics for Cancer*. Cancer Biol Ther, 2004. **3**(1).
171. Moser, B., et al., *Expression of transcripts for two interleukin 8 receptors in human phagocytes, lymphocytes and melanoma cells*. Biochem J, 1993. **294** (Pt 1): p. 285-92.
172. Tyndall, R.L., K.B. Jacobson, and E. Teeter, *Characterization of HeLa cell and viral ribonucleic acid by oligonucleotide analysis*. Biochim Biophys Acta, 1965. **108**(1): p. 11-7.
173. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(259): p. 680-5.
174. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
175. Hochuli, E., H. Dobeli, and A. Schacher, *New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues*. J Chromatogr, 1987. **411**: p. 177-84.
176. Saiki, R.K., et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985. **230**(4732): p. 1350-4.
177. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
178. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods Enzymol, 1987. **155**: p. 335-50.
179. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
180. Cohen, S.N. and A.C. Chang, *Recircularization and autonomous replication of a sheared R-factor DNA segment in Escherichia coli transformants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**(5): p. 1293-7.
181. Studier, F.W. and B.A. Moffatt, *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*. J Mol Biol, 1986. **189**(1): p. 113-30.
182. Tabor, S. and C.C. Richardson, *A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(4): p. 1074-8.

Kapitel 8 Anhang

8.1 Sequenzdaten ARNO und Cytohesin-1

8.1.1 Sequenzvergleich

ARNO	M EDGVY E PPDL T PE R MELENIRRRKQ E LL V EIQRL R E E L S EAM S E V E G L E A NE G SK T L	59
Cyt1	M E E DD S Y V PSDL T A E ER Q ELENIRRRKQ E LL A DIQRL K D E IA E V A NE I EN L G S T E R K N M	60
ARNO	Q R N R K M A MGRKKFNMDPKKGIQ F L V EN E LL Q NT P E E I A R F LYK G EGLNK T AIGD Y L G ER E	119
Cyt1	Q R N K Q V A M GRKKFNMDPKKGIQ F L I EN D LL K NT C E D I A Q F LYK G EGLNK T AIGD Y L G ER D	120
ARNO	E L N L A VLHAF V D L HE F TDLNLVQALRQ F L S FR L P G E A Q K IDRM E A F AQ R Y C L C N P G V F	179
Cyt1	E F N I Q VLHAF V E L HE F TDLNLVQALRQ F L S FR L P G E A Q K IDRM E A F AQ R Y C Q C N N G V F	180
ARNO	Q S T D T C Y V L S F A V I M L N T S L H N P N V R D K P G L E R F V A M N R G I N E G G D L P E E L L R N L Y D S I R	239
Cyt1	Q S T D T C Y V L S F A I I M L N T S L H N P N V K D K P T V E R F I A M N R G I N D G G D L P E E L L R N L Y E S I K	240
ARNO	N E P F K I P E D D C N D L T H T F F N P D R E G W L L K L G G R V K T W K R R W F I L T D N C L Y F E Y T T D K E	299
Cyt1	N E P F K I P E D D C N D L T H T F F N P D R E G W L L K L G G R V K T W K R R W F I L T D N C L Y F E Y T T D K E	300
ARNO	P R G L I P L E N L S T R E V D D P R K P N C F E L Y I P N K G O L I K A C K T E A D G R V E G N H M V Y R I S A P	359
Cyt1	P R G L I P L E N L S T R E V D S K K P N C F E L Y I P D N K D O V K A C K T E A D G R V E G N H T V Y R I S A P	360
ARNO	T Q E K D E W I K S I Q A A V S V D P F Y E M L A A R K K R I S V K K Q E Q P	400
Cyt1	T P E L K E E N I K C I K A A I S R D P F Y E M L A A R K K V S S T K R H ---	398

Unterschiede in der Aminosäuresequenz sind rot hervorgehoben.
 Coiled-coil-Domäne: eingerahmt und hellgrau
 Sec7-Domäne: eingerahmt
 Pleckstrin Homology (PH)-Domäne: eingerahmt und dunkel grau
 Polybasische C-Domäne: nicht eingerahmt

8.1.2 ARNO und Domänenkonstrukte im Plasmid pET11d

1	ATC TCG ATC CCG CGA AAT TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG AAT TGT GAG
49	CGG ATA ACA ATT CCC CTC TAG AAA TAA TTT TGT TTA ACT TTA AGA AGG
97	AGA TAT ACC ^{Start} ATG ^{Hexahistidin-Tag} GGT CAT CAT CAT CAT CAT CAC GAG GAC GGC GTT TAT
145	GAA CCC CCA GAC CTG ACT CCG GAG GAG CGG ATG GAG CTG GAG AAC ATC
193	CGG CGG CGG AAG CAG GAG CTG CTG GTG GAG ATT CAG CGC CTG CGG GAG
241	GAG CTC AGT GAA GCC ATG AGC GAG GTG GAG GGG CTG GAG GCC AAT GAG
289	GGC AGT AAG ACC TTG CAA CGG AAC CGG AAG ATG GCA ATG GGC AGG AAG
337	AAG TTC AAC ATG GAC CCC AAG AAG GGG ATC CAG TTC TTG GTG GAG AAT
385	GAA CTG CTG CAG AAC ACA CCC GAG GAG ATC GCC CGC TTC CTG TAC AAG

433 GGC GAG GGG CTG AAC AAG ACA GCC ATC GGG GAC TAC CTG GGG GAG AGG

481 GAA GAA CTG AAC CTG GCA GTG CTC CAT GCT TTT GTG GAT CTG CAT GAG

529 TTC ACC GAC CTC AAT CTG GTG CAG GCC CTC AGG CAG TTT CTA TGG AGC

577 TTT CGC CTA CCC GGA GAG GCC CAG AAA ATT GAC CGG ATG ATG GAG GCC

625 TTC GCC CAG CGA TAC TGC CTG TGC AAC CCT GGG GTT TTC CAG TCC ACA

673 GAC ACG TGC TAT GTG CTG TCC TTC GCC GTC ATC ATG CTC AAC ACC AGT

721 CTC CAC AAT CCC AAT GTC CGG GAC AAG CCG GGC CTG GAG CGC TTT GTG

769 GCC ATG AAC CGG GGC ATC AAC GAG GGC GGG GAC CTG CCT GAG GAG CTG

817 CTC AGG AAC CTG TAC GAC AGC ATC CGA AAT GAG CCC TTC AAG ATT CCT

865 GAG GAT GAC GGG AAT GAC CTG ACC CAC ACC TTC TTC AAC CCG GAC CGG

913 GAG GGC TGG CTC CTG AAG CTG GGG GGC CGG GTG AAA ACG TGG AAG CGG

961 CGC TGG TTT ATC CTC ACA GAC AAC TGC CTC TAC TAC TTT GAG TAC ACC

1009 ACG GAC AAG GAG CCC CGA GGA ATC ATC CCC CTG GAG AAT CTG AGC ATC

1057 CGA GAG GTG GAC GAC CCC CGG AAA CCG AAC TGC TTT GAA CTT TAC ATC

1105 CCC AAC AAC AAG GGG CAG CTC ATC AAA GCC TGC AAA ACT GAG GCG GAC

1153 GGC CGA GTG GTG GAG GGA AAC CAC ATG GTG TAC CGG ATC TCG GCC CCC

1201 ACG CAG GAG GAG AAG GAC GAG TGG ATC AAG TCC ATC CAG GCG GCT GTG

1249 AGT GTG GAC CCC TTC TAT GAG ATG CTG GCA GCG AGA AAG AAG CGG ATT

1297 TCA GTC AAG AAG AAG CAG GAG CAG CCC TGA ^{Stop} GAT CCG GCT GCT AAC AAA

1345 GCC GAA AGG AAG CTG AGT TGG CTG CTG CCA CCG CTG AGC AAT AAC TAG

1393 CAT AAC CCC TTG GGG CCT CTA AAC GGG TCT TGA GGG GTT TTT

Benachbarte Vektorsequenzen zur cDNA: grün

Coiled-coil-Domäne: eingerahmt und hellgrau

Sec7-Domäne: eingerahmt

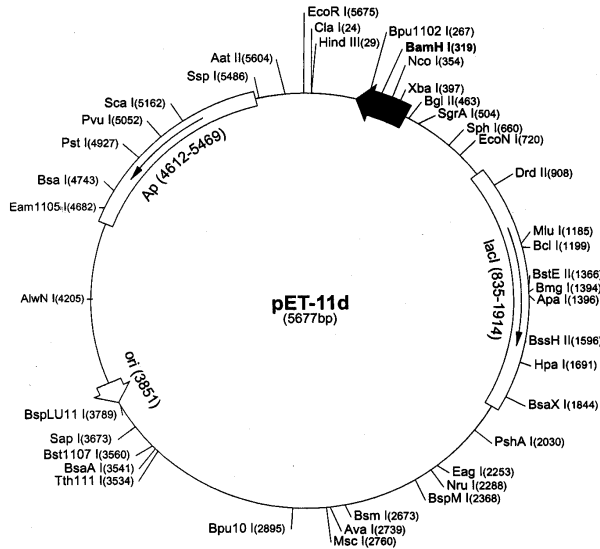
Pleckstrin Homology (PH)-Domäne: eingerahmt und dunkelgrau

Polybasische C-Domäne: nicht eingerahmt

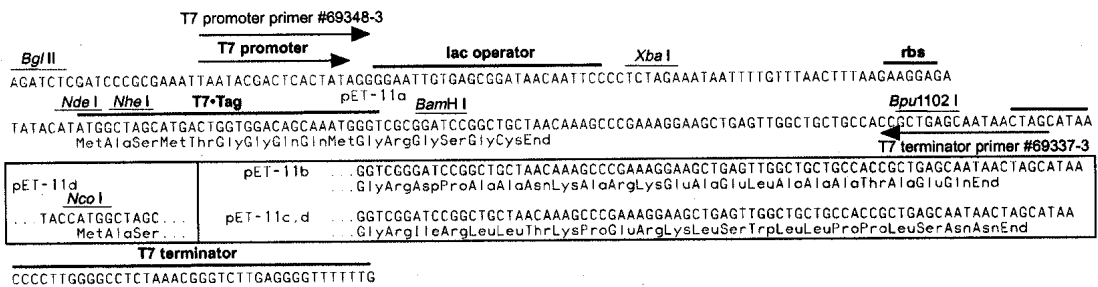
- Expressionsvektor pET11d-CCS7: um PH- und C-Domäne deletiert.
- Expressionsvektor pET11d-S7PH: um CC-Domäne deletiert.

8.2 Expressionsvektor pET11d

8.2.1 Vektorkarte



8.2.2 Multiple cloning site



8.2.3 Vektorsequenz

```

1      TTCTTGAAGA CGAAAGGGCC TCGTGATACG CCTATTTTTTA TAGTTTAATG TCATGATAAT
61     AATGTTTTCT TAGACGTCAG GTGGCACTTT TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA CCCCTATTTG
121    TTTATTTTTTC TAAATACATT CAAATATGTA TCCGCTCATG AGACAATAAC CCTGATAAAT
181    GCTTCAATAA TATTGAAAAA GGAAGAGTAT GAGTATTCAA CATTTCCGTG TCGCCCTTAT
241    TCCCTTTTTTT GCGGCATTTT GCCTTCCTGT TTTTGCTCAC CCAGAAACGC TGGTGAAAGT
301    AAAAGATGCT GAAGATCAGT TGGGTGCACG AGTGGGTTAC ATCGAACTGG ATCTCAACAG
361    CGGTAAGATC CTTGAGAGTT TTCGCCCCGA AGAACGTTTT CCAATGATGA GCACTTTTTAA
421    AGTTCTGCTA TGTGGCGCGG TATTATCCCG TGTTGACGCC GGGCAAGAGC AACTCGGTCC
481    CCGCATAAC TATTCTCAGA ATGACTTGGT TGAGTACTCA CCAGTCACAG AAAAGCATCT
541    TACGGATGGC ATGACAGTAA GAGAATTATG CAGTGCTGCC ATAACCATGA GTGATAACAC
601    TGCGGCCAAC TTACTTCTGA CAACGATCGG AGGACCGAAG GAGCTAACCG CTTTTTTGCA
661    CAACATGGGG GATCATGTAA CTCGCCTTGA TCGTTGGGAA CCGGAGCTGA ATGAAGCCAT
    
```

```

721 ACCAAACGAC GAGCGTGACA CCACGATGCC TGCAGCAATG GCAACAACGT TGCGCAAACT
781 ATTAAGTGGC GAAGTACTTA CTCTAGCTTC CCGGCAACAA TTAATAGACT GGATGGAGGC
841 GGATAAAGTT GCAGGACCAC TTCTGCGCTC GGCCCTTCCG GCTGGCTGGT TTATTGCTGA
901 TAAATCTGGA GCCGGTGAGC GTGGGTCTCG CGGTATCATT GCAGCACTGG GGCCAGATGG
961 TAAGCCCTCC CGTATCGTAG TTATCTACAC GACGGGGAGT CAGGCAACTA TGGATGAACG
1021 AAATAGACAG ATCGCTGAGA TAGGTGCCTC ACTGATTAAG CATTGGTAAC TGTCAGACCA
1081 AGTTTACTCA TATATACTTT AGATTGATTT AAAACTTCAT TTTTAATTTA AAAGGATCTA
1141 GGTGAAGATC CTTTTTGATA ATCTCATGAC CAAAATCCCT TAACGTGAGT TTTTCGTTCCA
1201 CTGAGCGTCA GACCCCGTAG AAAAGATCAA AGGATCTTCT TGAGATCCTT TTTTTCTGCG
1261 CGTAATCTGC TGCTTGCAAA CAAAAAACC ACCGCTACCA GCGGTGGTTT GTTTGCCGGA
1321 TCAAGAGCTA CCAACTCTTT TTCCGAAGGT AACTGGCTTC AGCAGAGCGC AGATACCAAA
1381 TACTGTCCCT CTAGTGTAGC CGTAGTTAGG CCACCACTTC AAGAAGCTCT TAGCACCGCC
1441 TACATACCTC GCTCTGCTAA TCCTGTTACC AGTGGCTGCT GCCAGTGGCG ATAAGTCGTG
1501 TCTTACCGGG TTGGACTCAA GACGATAGTT ACCGGATAAG GCGCAGCGGT CGGGCTGAAC
1561 GGGGGGTTCC TGCACACAGC CCAGCTTGGG GCGAACGACC TACACCGAAC TGAGATACCT
1621 ACAGCGTGAG CTATGAGAAA GCGCCACGCT TCCCGAAGGG AGAAAGGCGG ACAGGTATCC
1681 GGTAAGCGGC AGGGTCGGAA CAGGAGAGCG CACGAGGGAG CTTCAGGGG GAAACGCCTG
1741 GTATCTTTAT AGTCCTGTCG GGTTCGCA CCTCTGACTT GAGCGTCGAT TTTTGTGATG
1801 CTCGTCAGGG GGGCGGAGCC TATGGAAAAA CGCCAGCAAC GCGGCTTTT TACGGTTCCT
1861 GGCCTTTTGC TGGCCTTTTG CTCACATGTT CTTTCTGCG TTATCCCCTG ATTCTGTGGA
1921 TAACCGTATT ACCGCCTTTG AGTGAGCTGA TACCGCTCGC CGCAGCCGAA CGACCGAGCG
1981 CAGCGAGTCA GTGAGCGAGG AAGCGGAAGA GCGCTGATG CGGTATTTTC TCCTTACGCA
2041 TCTGTGCGGT ATTTACACCC GCATATATGG TGCCTCTCA GTACAATCTG CTCTGATGCC
2101 GCATAGTTAA GCCAGTATAC ACTCCGCTAT CGCTACGTGA CTGGGTCATG GCTGCGCCCC
2161 GACACCCGCC AACACCCGCT GACGCGCCCT GACGGGCTTG TCTGCTCCCG GCATCCGCTT
2221 ACAGACAAGC TGTGACCGTC TCCGGGAGCT GCATGTGTCA GAGGTTTTCA CCGTCATCAC
2281 CGAAACGCGC GAGGCAGCTG CGGTAAAGCT CATCAGCGTG GTCGTGAAGC GATTCACAGA
2341 TGTCTGCCCTG TTCATCCGCG TCCAGCTCGT TGAGTTTCTC CAGAAGCGTT AATGTCTGGC
2401 TTCTGATAAA GCGGGCCATG TTAAGGGCGG TTTTTTCTG TTTGGTCACT GATGCCTCCG
2461 TGTAAGGGGG ATTTCTGTTC ATGGGGGTAA TGATACCGAT GAAACGAGAG AGGATGCTCA
2521 CGATACGGGT TACTGATGAT GAACATGCC GGTACTGGA ACGTTGTGAG GGTAAACAAC
2581 TGGCGGTATG GATGCGGCGG GACCAGAGAA AAATCACTCA GGTCAATGC CAGCGCTTCG
2641 TTAATACAGA TGTAGGTGTT CCACAGGGTA GCCAGCAGCA TCCTGCGATG CAGATCCGGA
2701 ACATAAATGGT GCAGGGCGCT GACTTCCGCG TTTCCAGACT TTACGAAACA CGGAAACCGA
2761 AGACCATTCA TGTGTTGCT CAGGTGCGAG ACGTTTTGCA GCAGCAGTCG CTTACGTTT
2821 GCTCGCGTAT CGGTGATTCA TTCTGCTAAC CAGTAAGGCA ACCCCGCCAG CCTAGCCGGG
2881 TCCTCAACGA CAGGAGCACG ATCATGCGCA CCCGTGGCCA GGACCCAACG CTGCCGAGA
2941 TGCGCCGCGT GCGGCTGCTG GAGATGGCGG ACGCGATGGA TATGTTCTGC CAAGGGTTGG
3001 TTTGCGCATT CACAGTTCTC CGCAAGAATT GATTGGCTCC AATCTTTGGA GTGGTGAATC
3061 CGTTAGCGAG GTGCCGCCGG CTTCCATTCA GGTGAGGTG GCCCAGCTCC ATGCACCGCG
3121 ACGCAACGCG GGGAGGCAGA CAAGGTATAG GCGGCGCCT ACAATCCATG CCAACCCGTT
3181 CCATGTGCTC GCCGAGGCGG CATAAATCGC CGTGACGATC AGCGTCCAG TGATCGAAGT
3241 TAGGCTGGTA AGAGCCGCGA GCGATCCTTG AAGCTGTCCC TGATGGTCGT CATCTACCTG
3301 CCTGGACAGC ATGGCCTGCA ACGCGGGCAT CCCGATGCCG CCGGAAGCGA GAAGAATCAT
3361 AATGGGGGAA GGCATCCAGC CTCGCGTCCG GAACGCCAGC AAGACGTAGC CCAGCGCGTC
3421 GGCCGCCATG CCGGCGATAA TGGCCTGCTT CTCGCCGAAA CGTTTGGTGG CGGGACCAGT
3481 GACGAAGGCT TGAGCGAGGG CGTGCAAGT TCCGAATACC GCAAGCGACA GGCCGATCAT
3541 CGTCGCGCTC CAGCGAAAGC GGTCTCTCGC GAAAATGACC CAGAGCGCTG CCGGCACCTG
3601 TCCTACGAGT TGCATGATAA AGAAGACAGT CATAAGTGCG GCGACGATG TCATGCCCTG
3661 CGCCACCGG AAGGAGCTGA CTGGGTTGAA GGTCTCAAG GGCATCGGTG GATATCCCGG
3721 TGCCTAATGA GTGAGCTAAC TTACATTAAT TGCGTTGCGC TCACTGCCCG CTTTCCAGTC
3781 GGGAAACCTG TCGTGCCAGC TGCATTAATG AATCGGCCAA CGCGCGGGGA GAGGCGGTTT
3841 GCGTATTGGG CGCCAGGGTG GTTTTTCTTT TCACCAGTGA GACGGGCAAC AGCTGATTGC
3901 CCTTACCCGC CTGGCCCTGA GAGAGTTGCA GCAAGCGGTC CACGCTGGTT TGCCCCAGCA
3961 GGCGAAAATC CTGTTTGATG GTGGTTAACG GCGGGATATA ACATGAGCTG TCTTCGGTAT
4021 CGTCGTATCC CACTACCGAG ATATCCGCAC CAACGCGCAG CCCGGACTCG GTAATGGCGC
4081 GCATTGCGCC CAGCGCCATC TGATCGTTGG CAACCAGCAT CGCAGTGGGA ACGATGCCCT
4141 CATTGAGCAT TTGCATGGTT TGTTGAAAAC CGGACATGGC ACTCCAGTCG CCTTCCCGTT
4201 CCGCTATCGG CTGAATTTGA TTGCGAGTGA GATATTTATG CCAGCCAGCC AGACGCAGAC

```

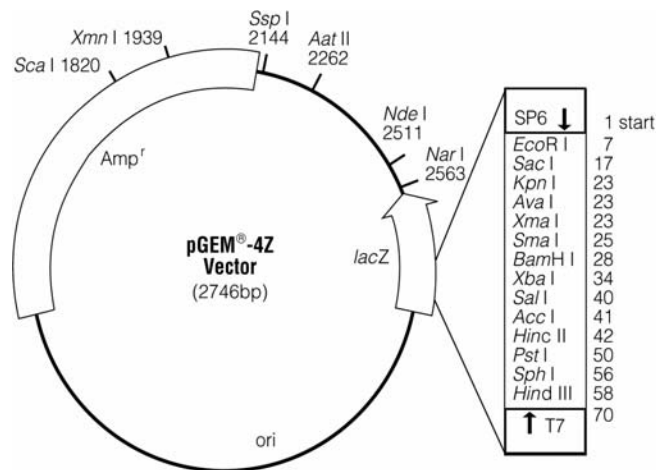
```

4261 GCGCCGAGAC AGAACTTAAT GGGCCCCTA ACACGCGGAT TTGCTGGTGA CCCAATGCGA
4321 CCAGATGCTC CACGCCAGT CGCGTACCGT CTTTCATGGGA GAAAATAATA CTGTTGATGG
4381 GTGTCTGGTC AGAGACATCA AGAAATAACG CCGGAACATT AGTGCAGGCA GCTTCCACAG
4441 CAATGGCATT CTGGTCATCC AGCGGATAGT TAATGATCAG CCCACTGACG CGTTGCGCGA
4501 GAAGATTGTG CACCGCCGCT TTACAGGCTT CGACGCGCT TCGTTCCTACC ATCGACACCA
4561 CCACGCTGGC ACCCAGTTGA TCGGCGCGAG ATTTAATCGC CGCGACAATT TGCAGCGGCG
4621 CGTGCAGGGC CAGACTGGAG GTGGCAACGC CAATCAGCAA CGACTGTTTG CCCGCCAGTT
4681 GTTGTGCCAC GCGGTTGGGA ATGTAATTCA GCTCCGCCAT CGCCGCTTCC ACTTTTTTCCC
4741 GCGTTTTTCG AGAAACGTGG CTGGCCTGGT TCACCACGCG GGAAACGGTC TGATAAGAGA
4801 CACCGGCATA CTCTGCGACA TCGTATAACG TTAATGTTT CACATTCACC ACCCTGAATT
4861 GACTCTCTTC CGGGCGCTAT CATGCCATAC CGCGAAAAGG TTTGCGCCAT TCGATGGTGT
4921 CCGGGATCTC GACGCTCTCC CTTATGCGAC TCCTGCATTA GGAAGCAGCC CAGTAGTAGG
4981 TTGAGGCCGT TGAGCACCGC CGCCGCAAGG AATGGTGCAT GCAAGGAGAT GGCGCCAAC
5041 AGTCCCCCGG CCACGGGGCC TGCCACCATA CCCACGCCGA AACAAGCGCT CATGAGCCCG
5101 AAGTGGCGAG CCCGATCTC CCCATCGGTG ATGTGCGCGA TATAGGCGCC AGCAACCPCA
5161 CCTGTGGCGC CCGTGATGCC GGCCACGATG CGTCCGGCGT AGAGGATCGA GATCTCGATC
5221 CCGCGAAATT AATACGACTC ACTATAGGGG AATTGTGAGC GGATAACAAT TCCCCCTCTAG
5281 AAATAATTTT GTTTAACTTT AAGAAGGAGA TATACCATGG CTAGCATGAC TGGTGGACAG
5341 CAAATGGGTC GGATCCGGCT GCTAACAAAG CCCGAAAAGG AGCTGAGTTG GCTGCTGCCA
5401 CCGCTGAGCA ATAAC TAGCA TAACCCCTTG GGGCTCTAA ACGGGTCTTG AGGGGTTTTT
5461 TGCTGAAAGG AGGAACTATA TCCGGATATC CCGCAAGAGG CCCGGCAGTA CCGGCATAAC
5521 CAAGCCTATG CCTACAGCAT CCAGGGTGAC GGTGCCGAGG ATGACGATGA GCGCATTGTT
5581 AGATTTTATA CACGGTGCCT GACTGCGTTA GCAATTTAAC TGTGATAAAC TACCGCATTA
5641 AAGCTTATCG ATGATAAGCT GTCAAACATG AGAA

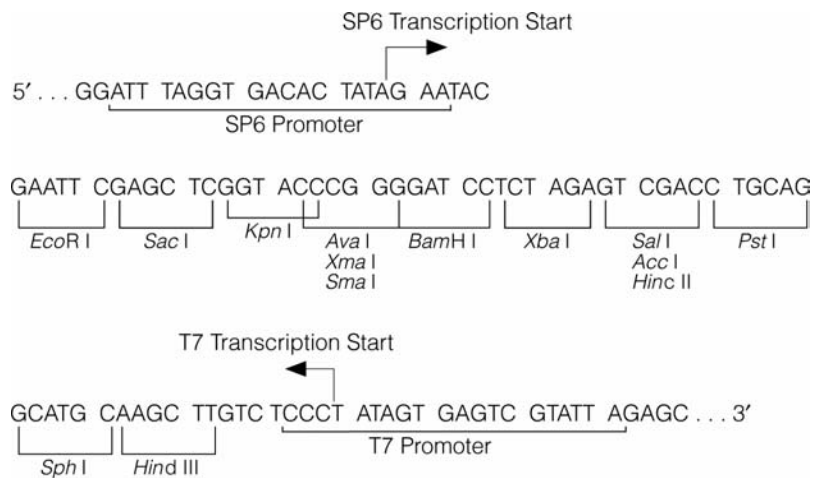
```

8.3 Vektor pGEM-4Z

8.3.1 Vektorkarte



8.3.2 Multiple cloning site



8.3.3 Vektorsequenz

```

1   GAATACGAAT TCGAGCTCGG TACCCGGGGA TCCTCTAGAG TCGACCTGCA GGCATGCAAG
61  CTTGTCTCCC TATAGTGAGT CGTATTAGAG CTTGGCGTAA TCATGGTCAT AGCTGTTTCC
121 TGTGTGAAAT TGTATCCGC TCACAATTCC ACACAACATA CGAGCCGAA GCATAAAGTG
181 TAAAGCCTGG GGTGCCTAAT GAGTGAGCTA ACTCACATTA ATTGCGTTGC GCTCACTGCC
241 CGCTTTCAG TCGGAAAACC TGTCGTGCCA GCTGCATTA TGAATCGGCC AACGCGCGGG
301 GAGAGGCGGT TTGCGTATTG GGCCTCTTC CGCTTCCTCG CTCACTGACT CGCTGCGCTC
361 GGTCTTCGG CTGCGGCGAG CGGTATCAGC TCACTCAAAG GCGGTAATAC GGTATCCAC
421 AGAATCAGGG GATAACGCAG GAAAGAACAT GTGAGCAAAA GGCCAGCAA AGGCCAGGAA
481 CCGTAAAAAG GCCGCTTGC TGGCGTTTTT CCATAGGCTC CGCCCCCTG ACGAGCATCA
541 CAAAAATCGA CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AAACCCGACA GGACTATAAA GATACCAGGC
601 GTTTCCTCCCT GGAAGCTCCC TCGTGCCTC TCCTGTTCCG ACCCTGCCCG TTACCGGATA
661 CCTGTCCGCC TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT GGCGCTTCT CATAGCTCAC GCTGTAGGTA
721 TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG TTCGCTCCAA GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCTTCA
781 GCCCGACCGC TGCGCCTTAT CCGGTAAC TAAGACACGA
841 CTTATCGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG
901 TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA CTACGGCTAC ACTAGAAGAA CAGTATTTGG
961 TATCTGCGCT CTGCTGAAGC CAGTTACCTT CGGAAAAAGA GTTGGTAGCT CTTGATCCGG
1021 CAAACAAACC ACCGCTGGTA CCGGTGGTTC TTTTGTGTTG AAGCAGCAGA TTACGCGCAG
1081 AAAAAAAGGA TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT CTTTTCTACG GGGTCTGACG CTCAGTGGAA
1141 CGAAAACTCA CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT GAGATTATCA AAAAGGATCT TCACCTAGAT
1201 CCTTTTAAAT TAAAAATGAA GTTTTAAATC AATCTAAAGT ATATATGAGT AAACCTGGTC
1261 TGACAGTTAC CAATGCTTAA TCAGTGAGGC ACCTATCTCA GCGATCTGTC TATTTCTGTT
1321 ATCCATAGTT GCCTGACTCC CCGTCGTGTA GATAACTACG ATACGGGAGG GCTTACCATC
1381 TGGCCCAGT GCTGCAATGA TACCGCGAGA CCCACGCTCA CCGGCTCCAG ATTTATCAGC
1441 AATAAACCAG CCAGCCGAA GGGCCGAGC CAGAAGTGGT CCTGCAACTT TATCCGCCTC
1501 CATCCAGTCT ATTAATTGTT GCCGGAAAGC TAGAGTAAGT AGTTCGCCAG TTAATAGTTT
1561 GCGCAACGTT GTTGCCATTG CTACAGGCAT CGTGGTGTCA CGCTCGTCGT TTGGTATGGC
1621 TTCATTGAGC TCCGGTTCCT AACGATCAAG GCGAGTTACA TGATCCCCCA TGTTGTGCAA
1681 AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG GTCCTCCGAT CGTTGTCAGA AGTAAGTTGG CCGCAGTGT
1741 ATCACTCATG GTTATGGCAG CACTGCATAA TTCTCTTACT GTCATGCCAT CCGTAAGATG
1801 CTTTTCTGTG ACTGGTGAGT ACTCAACCAA GTCATCTGA GAATAGTGTA TGCGGCGACC
1861 GAGTTGCTCT TGCCCGCGT CAATACGGGA TAATACCGCG CCACATAGCA GAACTTTAAA
1921 AGTGCTCATC ATTGGAAAAC GTTCTTCGGG GCGAAAAC TC AAGGATCT TACCGCTGTT
1981 GAGATCCAGT TCGATGTAAC CCACTCGTGC ACCCAACTGA TCTTCAGCAT CTTTTACTTT
2041 CACCAGCGTT TCTGGGTGAG CAAAAACAGG AAGGCAAAAT GCCGCAAAA AGGGAATAAG

```



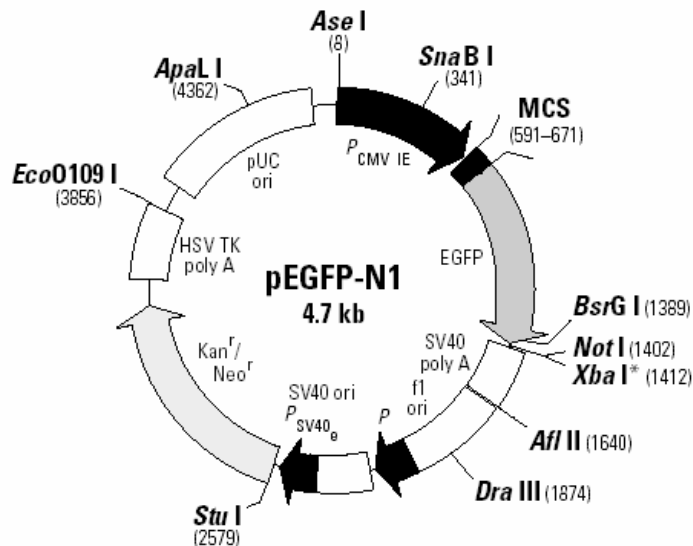
```

2101 GCGGACACGG AAATGTTGAA TACTCATACT CTTCCTTTTT CAATATTATT GAAGCATTTA
2161 TCAGGGTTAT TGTCTCATGA GCGGATACAT ATTTGAATGT ATTTAGAAAA ATAAACAAAT
2221 AGGGGTTCCG CGCACATTTT CCCGAAAAGT GCCACCTGAC GTCTAAGAAA CCATTATTAT
2281 CATGACATTA ACCTATAAAA ATAGGCGTAT CACGAGGCC TTTTCGTCTCG CGCGTTTCGG
2341 TGATGACGGT GAAAACCTCT GACACATGCA GCTCCCGGAG ACGGTCACAG CTTGTCTGTA
2401 AGCGGATGCC GGGAGCAGAC AAGCCCCTCA GGGCGCGTCA GCGGGTGTG GCGGGTGTGCG
2461 GGGCTGGCTT AACTATGCGG CATCAGAGCA GATTGTACTG AGAGTGCACC ATATGCGGTG
2521 TGAAATACCG CACAGATGCG TAAGGAGAAA ATACCGCATC AGGCGCCATT CGCCATTTCAG
2581 GCTGCGCAAC TGTGGAAG GCGGATCGGT GCGGGCCTCT TCGTATTAC GCCAGCTGGC
2641 GAAAGGGGGA TGTGCTGCAA GCGGATTAAG TTGGGTAACG CCAGGGTTTT CCCAGTCACG
2701 ACGTTGTAAA ACGACGGCCA GTGAATTGGA TTTAGGTGAC ACTATA

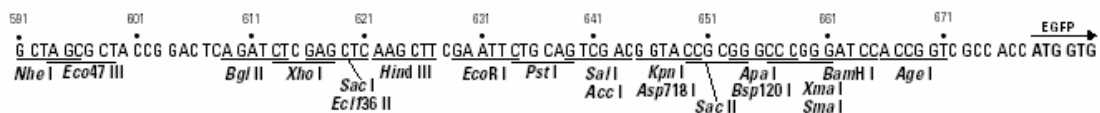
```

8.4 Vektor - pEGFP-N1

8.4.1 Vektorkarte



8.4.2 Multiple cloning site



8.4.3 Vektorsequenz

```

1   TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTTC ATTAGTTCAT AGCCCATATA TGGAGTCCG
61  CGTTACATAA CTTACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG CCCAACGACC CCCGCCATT
121 GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGACTTTCC ATTGACGTCA
181 ATGGGTGGAG TATTTACGGT AAAC TGCCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT ATCATATGCC
241 AAGTACGCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT ATGCCAGTA
301 CATGACCTTA TGGGACTTTC C TACTTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA TCGCTATTAC
361 CATGGTGATG CGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGA TAGCGGTTTG ACTCACGGGG
421 ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTTG TTTTGGCACC AAAATCAACG
481 GGACTTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG GTAGGCGTGT
541 ACGGTGGGAG GTCTATATAA GCAGAGCTGG TTTAGTGAAC CGTCAGATCC GCTAGCGCTA
601 CCGGACTCAG ATCTCGAGCT CAAGCTTCGA ATTCTGCAGT CGACGGTACC GCGGGCCCGG
661 GATCCACCGG TCGCCACCAT GGTGAGCAAG GGCGAGGAGC TGTTACCCGG GGTGGTGCCC
721 ATCCTGGTCG AGCTGGACGG CGACGTAAAC GGCCACAAGT TCAGCGTGTG CGGCGAGGGC
781 GAGGGCGATG CCACCTACGG CAAGCTGACC CTGAAAGTTCA TCTGCACCAC CGGCAAGCTG
841 CCCGTCCTT GCCCACCCCT CGTGACCACC TTGACCTACG GCGTGCAGTG CTTCAGCCGC
901 TACCCCGACC ACATGAAGCA GCACGACTTC TTCAAGTCCG CCATGCCCGA AGGCTACGTC
961 CAGGAGCGCA CCATCTTCTT CAAGGACGAC GGCAACTACA AGACCCGCGC CGAGGTGAAG
1021 TTCGAGGGCG ACACCTGGT GAACCGCATC GAGCTGAAGG GCATCGACTT CAAGGAGGAC
1081 GGCAACATCC TGGGGCACAA GCTGGAGTAC AACTACAACA GCCACAACGT CTATATCATG
1141 GCCGACAAGC AGAAGAACGG CATCAAGGTG AACTTCAAGA TCCGCCACAA CATCGAGGAC
1201 GGCAGCGTGC AGCTCGCCGA CCACTACCAG CAGAACACCC CCATCGGCGA CGGCCCCGTG
1261 CTGCTGCCCG ACAACCACTA CCTGAGCACC CAGTCCGCC TGAGCAAAGA CCCCAACGAG
1321 AAGCGGATC ACATGGTCCT GCTGGAGTTC GTGACCGCCG CCGGGATCAC TCTCGGCATG
1381 GACGAGCTGT ACAAGTAAAG CGGCCGCGAC TCTAGATCAT AATCAGCCAT ACCACATTTG
1441 TAGAGTTTTT ACTTGCTTTA AAAAACCTCC CACACCTCCC CCTGAACCTG AAACATAAAA
1501 TGAATGCAAT TGTGTTGTTT AACTTGTTTA TTGCAGCTTA TAATGGTTAC AAATAAAGCA
1561 ATAGCATCAC AAATTTTACA AATAAAGCAT TTTTTTCACT GCATTTTAGT TGTGGTTTTG
1621 CCAAACATCAT CAATGTATCT TAAGGCGTAA ATTGTAAGCG TTAATATTTT GTTAAATTC
1681 GCGTTAAAT TTTGTTAAAT CAGCTCATTT TTTAACCAAT AGGCCGAAAT CGGCAAAATC
1741 CCTTATAAAT CAAAAGAATA GACCGAGATA GGGTTGAGTG TTGTTCCAGT TTGGAACAAG
1801 AGTCCACTAT TAAAGAACGT GGACTCCAAC GTCAAAGGGC GAAAACCGT CTATCAGGGC
1861 GATGGCCCAT TACGTGAACC ATCACCTTAA TCAAGTTTTT TGGGGTCGAG TTGGCGTAAA
1921 GCACTAAATC GGAACCTTAA AGGGAGCCCC CGATTTAGAG CTTGACGGGG AAAGCCGGCG
1981 AACGTGGCGA GAAAGGAAGG GAAGAAAGCG AAAGGAGCGG GCGCTAGGGC GCTGGCAAGT
2041 GTAGCGGTCA CGCTGCGCGT AACCACCACA CCCGCCGCGC TTAATGCGCC GCTACAGGGC
2101 GCGTCAGGTG GCACTTTTCG GGGAAATGTG CGCGGAACCC CTATTTGTTT ATTTTTCTAA
2161 ATACATTCAA ATATGTATCC GCTCATGAGA CAATAACCC TATAAATGCT TCAATAATAT
2221 TGAAAAAGGA AGAGTCCTGA GCGGAAAGA ACCAGCTGTG GAATGTGTGT CAGTTAGGGT
2281 GTGAAAAGTC CCCAGGCTCC CCAGCAGGCA GAAGTATGCA AAGCATGCAT CTCAATTAGT
2341 CAGCAACCAG GTGTGAAAAG TCCCAGGCT CCCCAGCAGG CAGAAGTATG CAAAGCATGC
2401 ATCTCAATTA GTCAGCAACC ATAGTCCC GCCTAACTCC GCCCATCCCG CCCCTAACTC
2461 CGCCCAGTTC CGCCCATCTT CCGCCCCATG GCTGACTAAT TTTTTTTATT TATGCAGAGG
2521 CCGAGGCCGC CTCGGCCTCT GAGCTATTCC AGAAGTAGTG AGGAGGCTTT TTTGGAGGCC
2581 TAGGCTTTTT CAAAAGATCGA TCAAGAGACA GGATGAGGAT CGTTTCGCAT GATTGAACAA
2641 GATGGATTGC ACGCAGGTTC TCCGGCCGCT TGGGTGGAGA GGCTATTCGG CTATGACTGG
2701 GCACAACAGA CAATCGGCTG CTCTGATGCC GCCGTGTTCC GGCTGTCAGC GCAGGGGCGC
2761 CCGGTTCTTT TTGTCAAGAC CGACCTGTCC GGTGCCCTGA ATGAACTGCA AGACGAGGCA
2821 GCGCGGCTAT CGTGGCTGGC CACGACGGGC GTTCCTTGCG CAGCTGTGCT CGACGTGTGTC
2881 ACTGAACCGG GAAGGGACTG GCTGCTATTG GGCGAAGTGC CGGGGCAGGA TCTCCTGTCA
2941 TCTCACTTTG CTCTGCCGA GAAAGTATCC ATCATGGCTG ATGCAATGCG CCGGCTGCAT
3001 ACGCTTGATC CGGCTACCTG CCCATTTCGAC CACCAAGCGA AACATCGCAT CGAGCGAGCA
3061 CGTACTCGGA TGGAAAGCCG TCTTGTGCGAT CAGGATGATC TGGACGAAGA GCATCAGGGG
3121 CTCGCGCCAG CCGAACTGTT CGCCAGGCTC AAGGCGAGCA TGCCCGACGG CGAGGATCTC
3181 GTCGTGACCC ATGGCGATGC CTGCTTGCCG AATATCATGG TGGAAAATGG CCGCTTTTCT
3241 GGATTCATCG ACTGTGGCCG GCTGGGTGTG GCGGACCGCT ATCAGGACAT AGCGTTGGCT
3301 ACCCGTGATA TTGCTGAAGA GCTTGGCGGC GAATGGGCTG ACCGCTTCCT CGTGCTTTAC
3361 GGTATCGCCG CTCCCGATTC GCAGCGCAT GCCTTCTATC GCCTTCTTGA CGAGTTCTTC

```

3421 TGAGCGGGAC TCTGGGGTTC GAAATGACCG ACCAAGCGAC GCCCAACCTG CCATCACGAG
 3481 ATTTTCGATTC CACCGCCGCC TTCTATGAAA GGTTGGGCTT CGGAATCGTT TTCCGGGACG
 3541 CCGGCTGGAT GATCCTCCAG CGCGGGGATC TCATGCTGGA GTTCTTCGCC CACCCTAGGG
 3601 GGAGGCTAAC TGAAACACGG AAGGAGACAA TACCGGAAGG AACCCGCGCT ATGACGGCAA
 3661 TAAAAAGACA GAATAAAACG CACGGTGTG GGTCGTTTGT TCATAAACGC GGGGTTCCGT
 3721 CCCAGGGCTG GCACTCTGTC GATACCCAC CGAGACCCCA TTGGGGCCAA TACGCCCGCG
 3781 TTTCTTCCTT TTCCCCACCC CACCCCCCAA GTTCGGGTGA AGGCCAGGG CTCGCAGCCA
 3841 ACGTCGGGGC GGCAGGCCCT GCCATAGCCT CAGGTACTC ATATATACTT TAGATTGATT
 3901 TAAAACTTCA TTTTAAATTT AAAAGGATCT AGGTGAAGAT CCTTTTTGAT AATCTCATGA
 3961 CAAAAATCCC TTAACGTGAG TTTTCGTTCC ACTGAGCGTC AGACCCCGTA GAAAAGATCA
 4021 AAGGATCTTC TTGAGATCCT TTTTTCTGTC GCGTAATCTG CTGCTTGCAA AAAAAAAC
 4081 CACCGCTACC AGCGGTGGTT TGTGTCGGG ATCAAGAGCT ACCAACTCTT TTTCCGAAGG
 4141 TAACTGGCTT CAGCAGAGCG CAGATACCAA ATACTGTCCT TCTAGTGTAG CCGTAGTTAG
 4201 GCCACCACTT CAAGAACTCT GTAGCACCGC CTACATACCT CGCTCTGCTA ATCTGTTTAC
 4261 CAGTGGCTGC TGCCAGTGGC GATAAGTCGT GTCTTACCGG GTTGGACTCA AGACGATAGT
 4321 TACCGGATAA GGCGCAGCGG TCGGGGTGAA CGGGGGTTC GTGCACACAG CCCAGTTGG
 4381 AGCGAACGAC CTACACCGAA CTGAGATACC TACAGCGTGA GCTATGAGAA AGCGCCACGC
 4441 TTCCCGAAGG GAGAAAAGCG GACAGGTATC CGGTAAGCGG CAGGGTCGGA ACAGGAGAGC
 4501 GCACGAGGGA GCTTCCAGGG GGAAACGCCT GGTATCTTTA TAGTCCTGTC GGGTTTCGCC
 4561 ACCTCTGACT TGAGCGTCGA TTTTTGTGAT GCTCGTCAGG GGGGCGGAGC CTATGGAAAA
 4621 ACGCCAGCAA CGCGGCCTTT TTACGGTTCC TGGCCTTTTG CTGGCCTTTT GCTCACATGT
 4681 TCTTTCCTGC GTTATCCCCT GATTCTGTGG ATAACCGTAT TACCGCCATG CAT

Sequenzinformation aus EBI Datenbank: U55726

8.5 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µmol	mikromol
°C	Grad Celsius
aa	Aminosäure
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
amol	atomol
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AP-1	<i>activator protein-1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
ARF	ADP-ribosylierungsfaktor
ARNO	<i>ARF nucleotide binding-site opener</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
b	Basen
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel (1 Zerfall pro Sekunde)
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CC	coiled-coil
cDNA	<i>complementary DNA</i>

Ci	Curie ($3.7 \cdot 10^{10}$ Bq)
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
CMV	Cytomegalovirus
cpm	<i>counts per minute</i>
CRE	<i>cAMP-response-element-binding protein (CREB)</i> <i>response element</i>
CREB	<i>cyclic AMP-responsive element-binding protein</i>
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
Cyt	Cytohesin
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMEM	Dulbecco's Mod Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DR	<i>direct repeat</i>
ds	<i>double stranded</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemilumineszenz</i>
EDTA	N,N,N',N'-Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
Erk	<i>extracellular-signal-regulated kinase</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS	fetales Kälberserum
fmol	femtomol
g	Gramm
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein</i>
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
His – Tag	Histidin – Tag
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFN- γ	<i>interferon-γ</i>

IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
IMAC	<i>immobilized metallion affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilo Basenpaare
kDa	Kilodalton
KGF	<i>keratinocyte growth factor</i>
KSR	<i>kinase supressor of Ras</i>
L	Liter
LFA	<i>lymphocyte function – associated antigen</i>
M	Molar
mA	Milliampere
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MAPKAPK	<i>MAP-kinase activating protein kinase</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MEK	<i>MAPK/Erk kinase</i>
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSK	<i>mitogen- and stress-activated protein kinase</i>
MW	Molekulargewicht
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
nmol	Nanomole
NP – 40	Nonidet P – 40
nt	Nukleotid
NTA	<i>Nitrioltriacticacid</i>
NTP	Nukleotid-5'-triphosphat
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK	<i>p21-activated protein kinase</i>
Pax	<i>paxillin</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	L- α -Phosphatidylcholin, β -Palmitoyl- γ -oleoyl
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PG	L- α -Phosphatidyl-DL-glycerol, β -Oleoyl- γ -palmitoyl
PH	Pleckstrin Homologie
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKA	<i>protein kinase A</i>

PKC	<i>protein kinase C</i>
PLC	<i>phospholipase C</i>
PLD	<i>phospholipase D</i>
pM	Pikomolar
pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
PP2A	Protein-Phosphatase 2A
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RSK	<i>ribosomal S6 kinase</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	<i>receptor tyrosine kinase</i>
RU	<i>Response units</i>
S7	Sec-7
SAGE	<i>serial analysis of gene expression</i>
scFv	<i>single chain variable fragment</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
Sek	Sekunde
SELEX	<i>Systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>
si	<i>short interfering</i>
SIE	<i>sis-inducible element</i>
SOS	<i>son-of-sevenless</i>
SRE	<i>serum response element</i>
SRF	<i>serum response factor</i>
ss	<i>single stranded</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA
Tal	<i>talin</i>
TAP	<i>tandem-affinity purification</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered saline
TCF	<i>ternary complex factor</i>
Tdt	Terminale Desoxynukleotidyltransferase
TdT	Desoxynukleotidyl-Transferase
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
U	<i>unit</i>
upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

8.6 Danksagung

Ich danke:

Herrn Prof. Dr. M. Famulok, Kekulé-Institut für organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn, für die Vergabe des Themas, die Betreuung dieser Dissertation im Zeitraum von Oktober 2000 bis Mai 2004, sowie für die stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. W. Kolanus, Institut für Molekulare Physiologie und Entwicklungsbiologie der Universität Bonn, für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Prof. Dr. W. Kolanus, Institut für Molekulare Physiologie und Entwicklungsbiologie der Universität Bonn, sowie der Arbeitsgruppe für die Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. M. Hoch, Institut für Molekulare Physiologie und Entwicklungsbiologie der Universität Bonn, für die freundliche Aufnahme im Labor.

Herrn Prof. Dr. F. Wieland, Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg, für die Bereitstellung von ARF1 und des Austauschassays, sowie Dr. D. U. Gommel und Jörg Moelleken für die freundliche Aufnahme in Heidelberg.

Herrn Dr. G. Mayer, NascaCell Tutzing, für die Betreuung und die Einführung in das biochemische Arbeiten.

Herrn Dr. A. Knorre, Genzentrum der Universität München - LMU, für die Einweisung in die Zellkulturarbeiten und die nette Zeit in München.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises Prof. Famulok, für das stets angenehme und unterhaltsame Arbeitsklima, die angeregten Diskussionen und die schöne Zeit außerhalb des Laboralltags.

Markus Hafner und Alexander Heckel für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meinen Eltern, ohne deren Unterstützung und Förderung vieles nicht möglich gewesen wäre.

Schließlich meiner Freundin Manuela Kühn, für ihre Liebe, ihre Geduld und ihr Verständnis.

Diese Arbeit ist Manuela und meinen Eltern gewidmet.