

Identifizierung und Charakterisierung eines neuen Inhibitors der PH-Domäne der Cytohesin-Familie

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Julian Theis

aus

Troisdorf

Bonn, Januar 2011

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Famulok

2. Gutachter: Prof Dr. Günter Mayer

Tag der Promotion: 26.05.2011

Erscheinungsjahr: 2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1. Einleitung	1
1.1 Signaltransduktion	1
1.1.1 Insulinsignaltransduktion	2
1.1.2 Phosphatidylinositolphosphate	4
1.1.3 Pleckstrin-homologe Domäne (pleckstrin homology domain)	6
1.2 ADP-Ribosylierungsfaktoren und ihre Interaktionspartner	7
1.2.1 ADP-Ribosylierungsfaktoren	7
1.2.2 Cytohesine – kleine Guaninnukleotid-Austauschfaktoren	8
1.3 Ansätze zur Funktionsaufklärung von Proteinen	12
1.4 Künstliche Nukleinsäuren als Untersuchungswerkzeuge (Aptamere)	14
1.5 Vom Aptamer zum kleinen Molekül	15
2. Zielsetzung	17
3. Ergebnisse	18
3.1 Cytohesin-1 bindende RNA-Aptamere	18
3.2 Charakterisierung des RNA-Aptamers #6.10	19
3.3 Anforderungen an ein Screeningsystem	27
3.4 Mögliche Meßmethoden	29
3.4.1 Fluoreszenzpolarisation	29
3.4.1.1 Grundlagen der Fluoreszenzpolarisationsmessung	29
3.4.1.2 Fluoreszenzpolarisationsassay	29
3.4.1.3 Fluoreszenzmarkierung von RNA-Aptameren	30
3.4.1.4 Fluoreszenzpolarisationsmessungen	31
	I

3.4.2	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET)	33
3.4.3	RNA-Quantifizierung durch Messung von Fluoreszenzintensität	33
3.4.3.1	Entwicklung eines Screenings auf Basis von Fluoreszenzintensitätsmessung	34
3.4.3.2	Etablierung des Screeningsystems	37
3.4.3.3	Z'-Faktorbestimmung	43
3.5	Screening nach Inhibitoren für die Cytohesin-1 PH-Domäne	45
3.5.1	Substanzbibliotheken für das Screening	45
3.5.2	Primärscreen	45
3.5.3	Rescreening der Primär-Hits	47
3.5.4	Hit Validierung durch kompetitive Filterbindungsexperimente	48
3.5.5	Hit Validierung und Charakterisierung durch Oberflächenplasmonresonanz Spektroskopie (SPR)	49
3.5.6	Struktur-Wirkungsbeziehungen (SAR)	51
4.	Diskussion und Ausblick	55
4.1	Eigenschaften des Aptamers #6.10	55
4.2	Aptamerbasierte Hochdurchsatzscreenings	56
4.3	Inhibitoren der Cytohesin-1 PH-Domäne (Cyplecksins)	58
4.4	Einsatzmöglichkeiten der neuen Inhibitoren	61
5.	Zusammenfassung	65
6.	Methoden	67
6.1	Allgemeine Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren	67
6.1.1	Abtrennung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen	67
6.1.2	Fällung von Nukleinsäuren	67
6.1.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	67
6.1.4	Gelfiltration	68
6.1.5	5'-Dephosphorylierung von Nukleinsäuren mit alkalischer Phosphatase	68

6.1.6	5'-Phosphorylierung von dephosphorylierten Nucleinsäuren	68
6.1.7	DNA Amplifikation	69
6.1.8	<i>In vitro</i> Transkription	69
6.1.9	GMPS-Transkription	70
6.1.10	5'-Biotinylierung von RNA	71
6.1.11	3'-Fluoresceinmarkierung von RNA	71
6.1.12	Reverse Transkription und Amplifikation von cDNA (RT-PCR)	72
6.2	Gelelektrophoresen und Elution aus Gelen	73
6.2.1	Agarose-Gelelektrophorese	73
6.2.2	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	73
6.2.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	74
6.2.4	Isolierung von Nucleinsäuren aus Polyacrylamidgelen	75
6.3	Methoden zur Bakterienkultivierung	76
6.3.1	Abschätzung der Bakterienkonzentration in Flüssigkulturen	76
6.3.2	Klonierung von PCR-Produkten	76
6.3.3	Transformation kompetenter Zellen und Selektion rekombinanter Klone	76
6.3.4	Aufreinigung von Plasmid-DNA	77
6.3.5	Sequenzierung von DNA	77
6.4	Allgemeine Methoden im Umgang mit Proteinen	77
6.4.1	Färbung von Proteingelen	77
6.4.1.1	Silberfärbung	77
6.4.1.2	Coomassie-Färbung (Brilliant Blau G250)	77
6.4.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	78
6.4.2.1	Photometrische Bestimmung über UV-Extinktion	78
6.4.2.2	Photometrische Bestimmung nach Bradford	78
6.5	<i>In vitro</i> Methoden	79
6.5.1	Filterbindungsexperimente	79
6.5.2	Screening der Substanzbibliothek	79

6.5.3	Messung von Fluoreszenzintensität im Screening	80
6.5.4	Herstellung von Liposomen	80
6.5.5	Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie	81
7.	Materialien	83
7.1	Geräte	83
7.2	Chemikalien	84
7.3	Nukleotide und Radiochemikalien	86
7.4	Enzyme und Proteine	86
7.5	Medien, Stammlösungen und Puffer	86
7.5.1	Medien	87
7.5.2	Puffer- und Stammlösungen	87
7.6	Verbrauchsmaterialien	89
7.7	Plasmide und Bakterienstämme	89
7.8	Synthetische Oligodesoxynukleotide	90
7.9	Standards, Kits und Sonstiges	90
8.	Literaturverzeichnis	91
9.	Anhang	101
9.1	Sequenzen	101
9.2	Strukturen	102
10.	Abkürzungen	104

1. Einleitung

Während unbelebte Materialien in der Regel aus einfachen chemischen Verbindungen bestehen, ist die Struktur von lebenden Organismen sowohl in ihrer chemischen Zusammensetzung wie auch in ihrem Organisationsgrad äußerst komplex. Eine einzelne Zelle besteht aus einer Vielzahl unterschiedlichster Moleküle und alle Bausteine lebender Organismen erfüllen zudem jeweils spezielle Funktionen.

Charakteristikum lebender Organismen ist ihre Fähigkeit, sich selbst identisch replizieren und organisieren zu können. Die Voraussetzung dafür ist bei höheren Organismen die Interaktion einer Fülle verschiedener Zellen und Zelltypen. Der Bauplan der einzelnen Moleküle jeder Zelle eines Organismus ist in der DNA gespeichert.

Die Strukturaufklärung der DNA durch Watson und Crick im Jahre 1953 kann als Geburtsstunde der modernen Genetik, der Molekulargenetik, gesehen werden.

Die vollständige Sequenzierung des menschlichen Genoms im Jahre 2001 stellte einen weiteren entscheidenden Durchbruch dar^[1, 2]. Damals wurde von einer Anzahl von 30.000 - 40.000 proteincodierenden Genen ausgegangen. Aufgrund neuerer Ergebnisse wurde die vermutete Anzahl proteincodierender Gene auf etwa 20.000 - 25.000 reduziert^[3].

Da durch alternatives Spleißen aus etlichen Genen mehrere verschiedene Proteinprodukte generiert werden können und somit also die Ein-Gen-ein-Enzym-Hypothese^[4] nicht mehr allgemein gültig ist, liegt die tatsächliche Anzahl der im menschlichen Organismus vorliegenden Proteine um einiges höher als die Anzahl der Gene.

Trotz der vollständigen Sequenzierung des menschlichen Genoms sind weder alle menschlichen Proteine bekannt, noch wurden alle Funktionen und Interaktionen der bisher bekannten Proteine aufgeklärt.

Die Kartierung des Funktions- und Interaktionsnetzwerks der Proteine und damit auch das Verständnis des zellulären Zusammenspiels mit der daraus resultierenden Bedeutung für den Gesamtorganismus sind eine große Herausforderung der heutigen Molekularbiologie. Ein Hauptziel der Forschung besteht in der Identifizierung krankheitsrelevanter Proteinfunktionen und -interaktionen.

1.1 Signaltransduktion

Ein für lebende Organismen im Rahmen des zellulären Zusammenspiels existentiell wichtiger Bereich ist ihre Fähigkeit, externe Signale empfangen und verarbeiten zu können. Die

Signaltransduktion widmet sich sowohl dem intra- als auch dem interzellulären Informationsaustausch.

Die intrazelluläre Signalweitergabe erfolgt häufig in Form von Phosphorylierungskaskaden, in denen durch Phosphorylierung eine Proteinkinase aktiviert wird, die wiederum weitere Proteine phosphoryliert.

Der Weg externer Signale in die Zelle führt in der Regel über eine Aktivierung von Transmembranrezeptoren. Die Hauptwege der membranrezeptorvermittelten Signaltransduktion führen über Tyrosinkinasen, über die Aktivierung von G-Proteinen und über Ionenkanäle^[5].

Die Signalwege beginnen meist mit der Bindung eines extrazellulären Liganden an die extrazelluläre Domäne eines Transmembranrezeptors, der daraufhin durch eine Konformationsänderung oder Oligomerisierung aktiviert wird. Das Signal kann anschließend über verschiedene Wege in die Zelle weitergeleitet werden. Hierbei gibt es zwei prinzipielle Mechanismen: einmal besteht die Möglichkeit, daß über spezifische Protein-Protein-Wechselwirkung mit dem aktivierten Rezeptor ein nachfolgendes, intrazelluläres Signalprotein (z.B. ein G-Protein) aktiviert wird. Zum zweiten ist es möglich, daß die Aktivierung des Transmembranrezeptors eine enzymatische Aktivität in der cytosolischen Domäne des Transmembranrezeptors auslöst, die weitere Signalreaktionen hervorruft. Hierbei handelt es sich häufig um die Erzeugung einer Tyrosinkinaseaktivität, die dabei meist integraler Bestandteil der cytosolischen Domäne eines Transmembranrezeptors ist^[6].

1.1.1 Insulinsignaltransduktion

Eine spezifische Tyrosinkinase stellt der Insulinrezeptor (IR) dar. Er weist eine dimere $\alpha_2\beta_2$ -Struktur auf (siehe Abbildung 1.1). Die beiden extrazellulären α -Ketten enthalten die insulinbindende Domäne, die beiden β -Ketten bilden den transmembranen Abschnitt sowie die cytoplasmatische Domäne, welche die Tyrosinkinaseaktivität enthält. Durch Bindung von Insulin an die extrazelluläre Domäne phosphoryliert jede $\alpha\beta$ -Untereinheit spezifische Tyrosinreste in der cytoplasmatischen Domäne der β -Ketten des $\alpha\beta$ -Dimerpartners, wodurch sich das tyrosinkinaseaktive Zentrum des IR öffnet und andere Proteine phosphoryliert werden können. Unter diesen Proteinen befindet sich die Insulinrezeptor-Substrat-Familie (IRS)^[7-11]. Weitere Substrate des IR sind unter anderem SHC^[12], Cbl^[13], p62^{dok[14]} sowie Gab-1^[15].

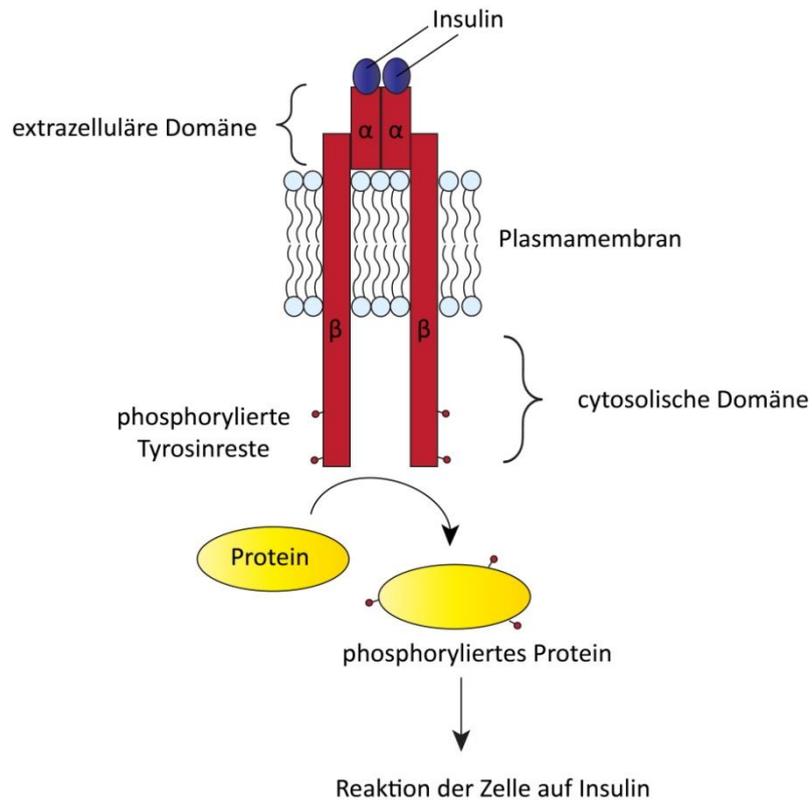


Abbildung 1.1 Insulinrezeptor: Der Insulinrezeptor (rot) besteht aus zwei extrazellulären α -Ketten sowie zwei β -Ketten, die durch die Membran ins Cytosol ragen. Bindet Insulin an die α -Ketten, ändert sich die Konformation des gesamten Rezeptors und spezifische Tyrosinreste in der cytosolischen Domäne der β -Ketten werden autophosphoryliert. Dadurch wird die Tyrosinkinaseaktivität der cytosolischen Domäne aktiviert und geeignete Substratproteine können phosphoryliert werden.

An diese phosphorylierten Substrate können nun wiederum andere Proteine binden, die eine SH2-Domäne (Src-Homolog 2) besitzen, wie z.B. die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)^[16] oder Grb2^[17]. In der weiteren Kaskade gelangt das Signal in verschiedene Signalwege, über Grb2 in den MAPK-Signalweg (mitogenaktivierte Proteinkinase) und über PI3K sowohl in die Regulation des Glukosemetabolismus als auch in die des Fettstoffwechsels (siehe Abbildung 1.2).

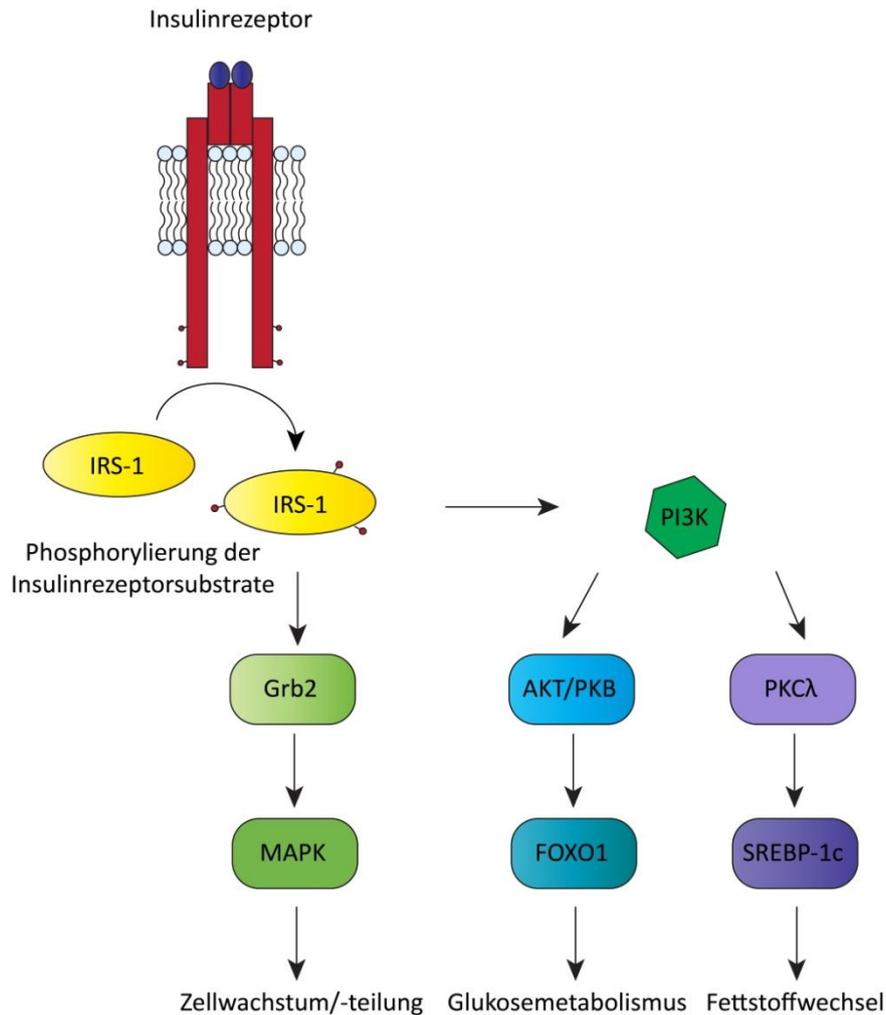


Abbildung 1.2 Insulinsignalweg: Proteine wie Grb2 und PI3K können mit ihrer SH2-Domäne an das durch den Insulinrezeptor phosphorylierte Insulinrezeptor-Substrat-1 (IRS-1) binden. Grb2 leitet dann das Signal über Sos und Ras in den MAPK-Signalweg, der u.a. das Zellwachstum und die Zellteilung reguliert. Über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) werden indirekt Proteinkinase B (PKB) und Proteinkinase C (PKC) aktiviert, welche über weitere Schritte Glukosemetabolismus sowie Fettstoffwechsel beeinflussen.

1.1.2 Phosphatidylinositolphosphate

Die PI3K des Insulinsignalwegs gehört zu einer Familie von PI3-Kinasen^[18]. Die PI3-Kinasen sind in allen eukaryotischen Zellen aktiv und entscheidend an Zellwachstum, Zellproliferation, Migration, Differenzierung und Adhäsion beteiligt^[19]. Ihre Substrate sind Phosphatidylinositole sowie Phosphatidylinositolphosphate.

Phosphatidylinositole sind negativ geladene Phospholipide, welche Bestandteile der cytosolischen Membranseite eukaryotischer Zellmembranen sind. Der Inositolring der Phosphatidylinositole (siehe Abbildung 1.3) kann durch verschiedene Kinasen an der 3'-, 4'-, und/oder der 5'-Hydroxylgruppe phosphoryliert werden, die so entstandenen Phosphatidylinositolphosphate können sieben unterschiedliche Phosphorylierungsmuster aufweisen^[20] (siehe Tabelle 1.1).

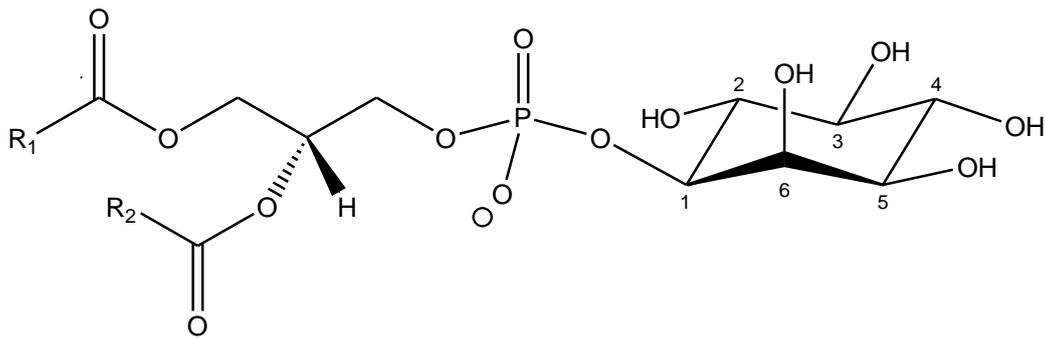


Abbildung 1.3 Strukturformel des Phosphatidylinositols (PtdIns): Sein Inositolring kann an der 3'-, 4'-, und/oder der 5'-Hydroxylgruppe phosphoryliert werden. Die Fettsäurereste R_1 und R_2 sind üblicherweise Stearinsäure und Arachidonsäure.

Phosphatidylinositolphosphate, auch als Phosphoinositide bezeichnet, spielen eine wichtige Rolle beim "Lipid Signaling", "Cell Signaling" und "Membrane Trafficking".

Zum einen können Phosphoinositide durch spezifische cytosolische Proteine erkannt und gebunden werden, die dadurch an die Membran rekrutiert werden. In der Regel handelt es sich hierbei um Proteine der Signaltransduktion, die ihrerseits an der Membran mit anderen Bestandteilen der Signaltransduktion interagieren können.

Zum anderen können Phosphatidylinositolphosphate selbst direkt in die Signaltransduktion involviert sein. So ist es beispielsweise möglich, daß PtdIns(4,5)P₂ (PIP₂) durch membrangebundene Phospholipase C in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) gespalten wird, die dann als *second messenger* wirken können^[21]. IP₃ führt zur Aktivierung von IP₃-Rezeptoren und darüber zur Freisetzung von intrazellulär gespeicherten Calciumionen (z.B. aus dem Endoplasmatischen Retikulum). DAG und Ca²⁺ aktivieren wiederum die Proteinkinase C (PKC), welche weitere Proteine phosphorylieren kann.

Phosphatidylinositolmonophosphate:	Abkürzungen:
Phosphatidylinositol-3-phosphat	PtdIns3P, PI(3)P
Phosphatidylinositol-4-phosphat	PtdIns4P, PI(4)P
Phosphatidylinositol-5-phosphat	PtdIns5P, PI(5)P
Phosphatidylinositolbisphosphate:	Abkürzungen:
Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat	PtdIns(3,4)P ₂ , PI(3,4)P ₂
Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat	PtdIns(3,5)P ₂ , PI(3,5)P ₂
Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat	PtdIns(4,5)P ₂ , PI(4,5)P ₂ oder PIP ₂
Phosphatidylinositoltrisphosphat:	Abkürzungen:
Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat	PtdIns(3,4,5)P ₃ , PI(3,4,5)P ₃ oder PIP ₃

Tabelle 1.1: Übersicht über die verschiedenen Phosphoinositide.

Die PI3K-Inhibitoren Wortmannin und LY294002 haben viel zur Aufklärung der PI3K-Funktionen beigetragen^[18] (Strukturen siehe Anhang). Die PI3K ist wesentlich verantwortlich für die Bildung von PtdIns(3,4,5)P₃ (PIP₃) aus PtdIns(4,5)P₂ (PIP₂). Veränderungen der Aktivität, der Struktur und/oder der Regulation von PI3K können zu Krankheiten wie Allergien, Entzündungen, Herzkrankheiten und Krebs führen^[22]. PI3K kommt also auch eine wichtige immunologische Bedeutung zu.

1.1.3 Pleckstrin-homologe Domäne (pleckstrin homology domain)

Die Pleckstrin-homologe Domäne^[23] (PH-Domäne) ist in mehr als 100 Proteinen enthalten, die vor allem in der intrazellulären Signaltransduktion oder als Bestandteil des Cytoskeletts vorkommen^[24]. Sie kann unter anderem an membranständige Phosphoinositide (wie z.B. PIP₃) binden und ist so für die Membranrekrutierung von Proteinen der Signaltransduktion bedeutsam.

Die PH-Domäne ist eine Proteindomäne mit einer Länge von ca. 120 Aminosäuren. Ihre dreidimensionale Struktur in verschiedenen Proteinen ist auch bei größeren Unterschieden in der Aminosäuresequenz relativ gut konserviert. Sie verfügt über eine Bindetasche, die typischerweise durch verschiedene Aminosäuren wie Lysin, Arginin und Histidin eine positiv geladene Oberfläche besitzt. Dadurch kann es zu einer relativ starken elektrostatischen Wechselwirkung mit negativ geladenen Liganden kommen.

Die negativ geladenen Phosphatidylinositolphosphate werden von fast allen PH-Domänen gebunden. Dabei ist diese Wechselwirkung meist relativ schwach und unspezifisch gegenüber

dem Phosphorylierungsmuster der Phosphoinositide^[25]. Manche PH-Domänen binden jedoch mit hoher Affinität und Spezifität einen Liganden, beispielsweise bindet die PH-Domäne des Proteins Grp1 spezifisch PIP₃^[26], die PH-Domäne von PLCδ1-PH spezifisch PIP₂^[27].

Durch die Regulation der Phosphorylierung der Phosphoinositide kann ein Protein, welches ein spezifisches Phosphoinositid bindet, zu einer definierten Zeit an eine Membran rekrutiert werden, an der es dann mit anderen Komponenten (z.B. aus der Signaltransduktion) interagieren kann^[28, 29].

1.2 ADP-Ribosylierungsfaktoren und ihre Interaktionspartner

1.2.1 ADP-Ribosylierungsfaktoren

ADP-Ribosylierungsfaktoren (Arfs) sind GTP-bindende Proteine der Ras-Superfamilie mit einer Größe von ~20 kDa. Sie kommen in allen Eukaryoten hoch konserviert vor. In Säugetierzellen (Mammalia) wurden sechs verschiedene Arf-Proteine identifiziert und aufgrund der Primärstruktur in drei verschiedene Klassen unterteilt: Arf-1, -2 und -3 bilden die Klasse-I, Arf-4 und -5 die Klasse-II, Arf-6 ist der einzige Vertreter der Klasse-III.

Ihre Hauptaufgabe ist die Regulation des Membrantransports^[30], insbesondere des endocytotischen Recyclings verschiedener Membranproteine^[31]. Daneben beeinflussen sie auch die Reorganisation des Aktinzytoskeletts^[32] und interagieren mit Enzymen des Phospholipidmetabolismus^[33].

Arfs sind, wie alle Ras-GTPasen, GTP-abhängige molekulare Schalter. Sie können entweder in inaktiver GDP-gebundener oder in aktiver GTP-gebundener Form vorliegen (siehe Abbildung 1.4).

Arf-GDP interagiert mit Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs: *guanine nucleotide exchange factors*), welche einen GDP-GTP-Austausch zu Arf-GTP katalysieren^[34]. Arf-GDP wird über eine N-terminale Myristoylgruppe^[35], die GEFs über ihre PH-Domäne an die Membran rekrutiert, wo der Austausch stattfindet.

Die Bindung von aktivem Arf-GTP zu verschiedenen Effektorproteinen übermittelt anschließend die physiologische Funktion der Arfs. Da die intrinsische GTPase-Aktivität der Arfs gering ist^[36], werden für die Inaktivierung der Arfs Hilfsproteine benötigt. Diese GTPase aktivierenden Proteine (GAPs) erkennen Arf-GTP und induzieren eine Hydrolyse zu inaktivem Arf-GDP.

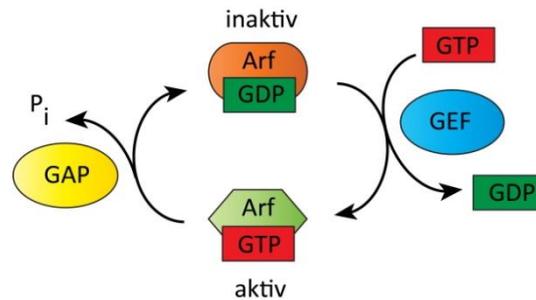


Abbildung 1.4 Der Arf-Zyklus: Arf liegt im inaktiven Zustand GDP-gebunden vor. Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) katalysieren den Austausch von GDP durch ein GTP und bringen damit Arf in den aktiven Zustand. Zur Inaktivierung von Arf binden GTPase aktivierende Proteine (GAPs) an Arf und hydrolysieren das gebundene GTP zu GDP.

Arf-GEFs werden auf der Grundlage ihres Molekulargewichts in große und kleine GEFs unterteilt. Die großen GEFs sind an der Regulation des Vesikeltransports des ER-Golgi-Systems beteiligt, die kleinen GEFs an der des Endosomen-Plasmamembran-Systems^[34].

Eine Übersicht über die verschiedenen humanen Arf-GEFs und ihre intrazelluläre Lokalisierung zeigt Tabelle 1.2.

Die GDP-GTP Austauschreaktion der großen GEFs kann durch Brefeldin A (BFA) inhibiert werden^[37-42]. Die gegenüber BFA insensitiven kleinen GEFs lassen sich durch SecinH3 spezifisch inhibieren^[43] (Struktur siehe Anhang).

Austauschfaktor	Masse [kD]	Arf-Spezifität	Lokalisierung in der Zelle	Referenz
BIG1/2*	190/200	Arf1, Arf3	Golgi	Yamaji et al. ^[44]
GBF1*	206	Arf1, -3, -5	Golgi	Claude et al. ^[45]
EFA6*	71	Arf6	Plasmamembran	Franco et al. ^[46]
ARF-GEP ₁₀₀ *	100	Arf6	Zellperipherie	Someya et al. ^[47]
Cytohesin-1**	47	Arf1	Plasmamembran, Golgi	Kolanus et al. ^[48]
Cytohesin-2**	47	Arf1, Arf6	Plasmamembran	Chardin et al. ^[49]
Cytohesin-3**	47	Arf1, Arf6	Plasmamembran	Franco et al. ^[50]
Cytohesin-4**	47	Arf1, Arf6	nicht bestimmt	Ogasawara et al. ^[51]

Tabelle 1.2: Übersicht über die verschiedenen Arf-GEFs in *homo sapiens*, (*) großes GEF; (**) kleines GEF.

1.2.2 Cytohesine – kleine Guaninnukleotid-Austauschfaktoren

Zur Klasse der kleinen GEFs zählt man beim Menschen die vier Proteine der Cytohesin-Familie: Cytohesin-1^[52], Cytohesin-2 (ARNO)^[49], Cytohesin-3 (ARNO3/Grp1)^[50, 53] und Cytohesin-4^[51].

Die 47 kD großen Cytohesine bestehen aus folgenden Domänen mit jeweils spezifischer Funktion (siehe Abbildung 1.5): die N-terminale Coiled-coil-Domäne kann Protein-Protein-

Wechselwirkungen eingehen, die zentrale Sec7-Domäne katalysiert den GDP-GTP Austausch an Arfs, die PH-Domäne kann die Cytohesine über Bindung an PIPs an die Membran rekrutieren, die C-terminale polybasische C-Domäne ist für eine höhere Affinität der PH-Domäne von Cytohesin-1 an PIP₃ nötig^[54].

Durch Phosphorylierung der C-Domäne durch Proteinkinase C kann die Affinität der PH-Domäne gegenüber PIPs vermindert werden^[55], was zu einer Relokalisation der Cytohesine ins Cytoplasma und so zu einer Modulation der Austauschaktivität führen kann.

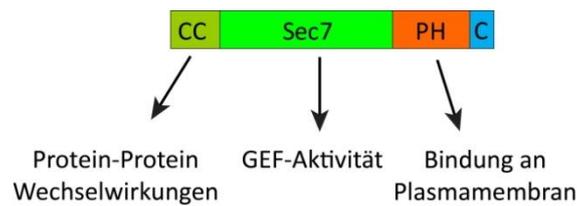


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Cytohesin und deren Funktionen. Die N-terminale Coiled-coil-Domäne (CC) kann mit verschiedenen Proteinen, wie Cybr^[56], CYTIP^[57], CASP^[58], CNK1^[59] und IPCEF1^[60] Protein-Wechselwirkungen eingehen. Die zentrale Sec7-Domäne kann mit Arfs, ARD1^[61] sowie LFA-1^[48] interagieren. Die PH-Domäne ermöglicht eine Bindung an PIPs. Die C-Domäne verfügt über Phosphorylierungsstellen für Kinasen und beeinflusst die Affinität der PH-Domäne zu PIPs.

Die Cytohesine weisen in ihrer Primärstruktur hohe Homologien auf. Bei Cytohesin-1, Cytohesin-2 und Cytohesin-3 besteht eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von 81-84%. Cytohesin-4 ist zu diesen zu 69-71% homolog. Die PH-Domänen der Cytohesin weisen mit 87-91% Übereinstimmung eine noch etwas höhere Homologie auf (siehe Abbildung 1.6).

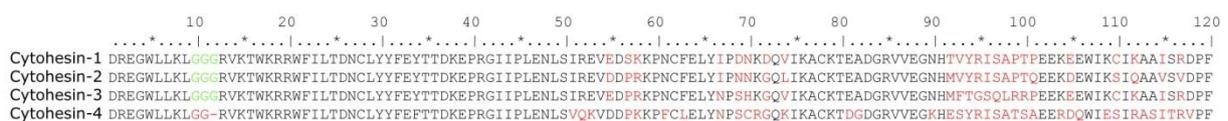


Abbildung 1.6 Aminosäuresequenzen: Sequenzvergleich der PH-Domänen der Cytohesine 1-4. Die Aminosäuresequenzen der PH-Domänen der Cytohesine 1-3 sind untereinander zu 89-90% homolog, die Sequenz von Cytohesin-4 ist zu diesen zu 87-91% homolog^[51]. grün: Triglycinmotiv; von Cytohesin-1 bis -3 existiert jeweils auch eine Spleißvariante mit Diglycinmotiv; von Cytohesin-4 existiert nur die Spezies mit Diglycinmotiv, rot: Abweichungen in den Sequenzen zwischen Cytohesin-1 bis -3, sowie zusätzliche Abweichungen in Cytohesin-4.

Cytohesine wirken auf die Signaltransduktion diverser biologischer Prozesse wie Chemotaxis^[62], Zelladhäsion^[48], Zellausbreitung^[63], Proteintransport^[64, 65] und Umstrukturierung des Zytoskeletts^[66]. Dabei erfüllen Cytohesine unterschiedliche Funktionen:

Die Bedeutung des Cytohesin-1 für den Informationsfluß aus der Zelle heraus (*inside-out signaling*) wurde von Kolanus et al.^[48] untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß Cytohesin-1

in Immunzellen (T-Zellen) nach Stimulation durch Chemokine mit der cytoplasmatischen Domäne der $\beta 2$ -Untereinheit (CD18) von LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*, $\alpha L\beta 2$), einem Integrin-Rezeptor, interagiert. Diese Interaktion führt zur Bindung der extrazellulären Domäne des Integrin-Rezeptors an das interzelluläre Adhäsionsprotein-1 (ICAM-1). Dieses ist z.B. auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) zu finden. Die Wechselwirkung von LFA-1 und ICAM-1 führt zu einer schwachen Affinität von T-Zellen an APCs, wodurch die dort präsentierten Antigene durch den T-Zellrezeptor gescannt werden können. Sowohl durch Einsatz einer austauschinaktiven Cytohesin-1 Mutante (E157K)^[63] als auch durch Einsatz des Aptamers M69^[67], welches spezifisch die Sec7-Domäne von Cytohesinen bindet, konnte gezeigt werden, daß diese Zelladhäsion von einem funktionierenden GDP/GTP-Austausch durch Cytohesin-1 abhängig ist.

Von Perez et al.^[68] konnte zudem gezeigt werden, daß Cytohesin-1 auch für den Informationsfluß in Immunzellen hinein (*outside-in signaling*) bedeutsam ist. Durch Stimulation von LFA-1 kommt es zu einer Aktivierung des MAPK-Signalwegs, was wiederum eine Produktion von verschiedenen Chemokinen zur Folge hat. Durch Inhibition des C-Terminus von Cytohesin-1 mittels Antikörpern kann diese Signaltransduktion inhibiert werden.

Der Einfluß von Cytohesin-2 auf den MAPK-Signalweg konnte in HeLa-Zellen gezeigt werden^[69]. Das Cytohesin-2 spezifische Aptamer K61 führt durch Inaktivierung von Cytohesin-2 zu einer Inhibition der Stimulation der Transkriptionsaktivierung durch das Serum-Response-Element (SRE). Gleiche Effekte konnten durch den Einsatz der austauschinaktiven Cytohesin-2 Mutante (E156K)^[70] erzielt werden.

Hafner et al.^[43] konnten zeigen, daß Cytohesin auch in der Insulinsignaltransduktion eine wichtige Rolle spielt. Durch Inhibition der Sec7-Domäne des Cytohesins mit Hilfe des Sec7-spezifischen Inhibitors SecinH3 kommt es bei Mäusen zu hepatischer Insulinresistenz. Diese Resistenz scheint für die Entstehung von Typ-2-Diabetes mit ursächlich zu sein^[71].

Nach Aktivierung des Insulinrezeptors, anschließender Phosphorylierung von IRS-1 und Aktivierung von PI3K kommt es zu einem Anstieg der PIP₃-Konzentration in der Plasmamembran. Die dadurch gesteigerte Rekrutierung von Cytohesin an die Membran führt zu vermehrter Bildung von Cytohesin-Arf-Komplexen. Es wird vermutet, daß durch Bindung des Cytohesin-Arf-Komplexes an den Insulinrezeptor die Rekrutierung von IRS-1 an diesen erhöht wird und es somit zu einer positiven Rückkopplung kommt (siehe Abbildung 1.7).

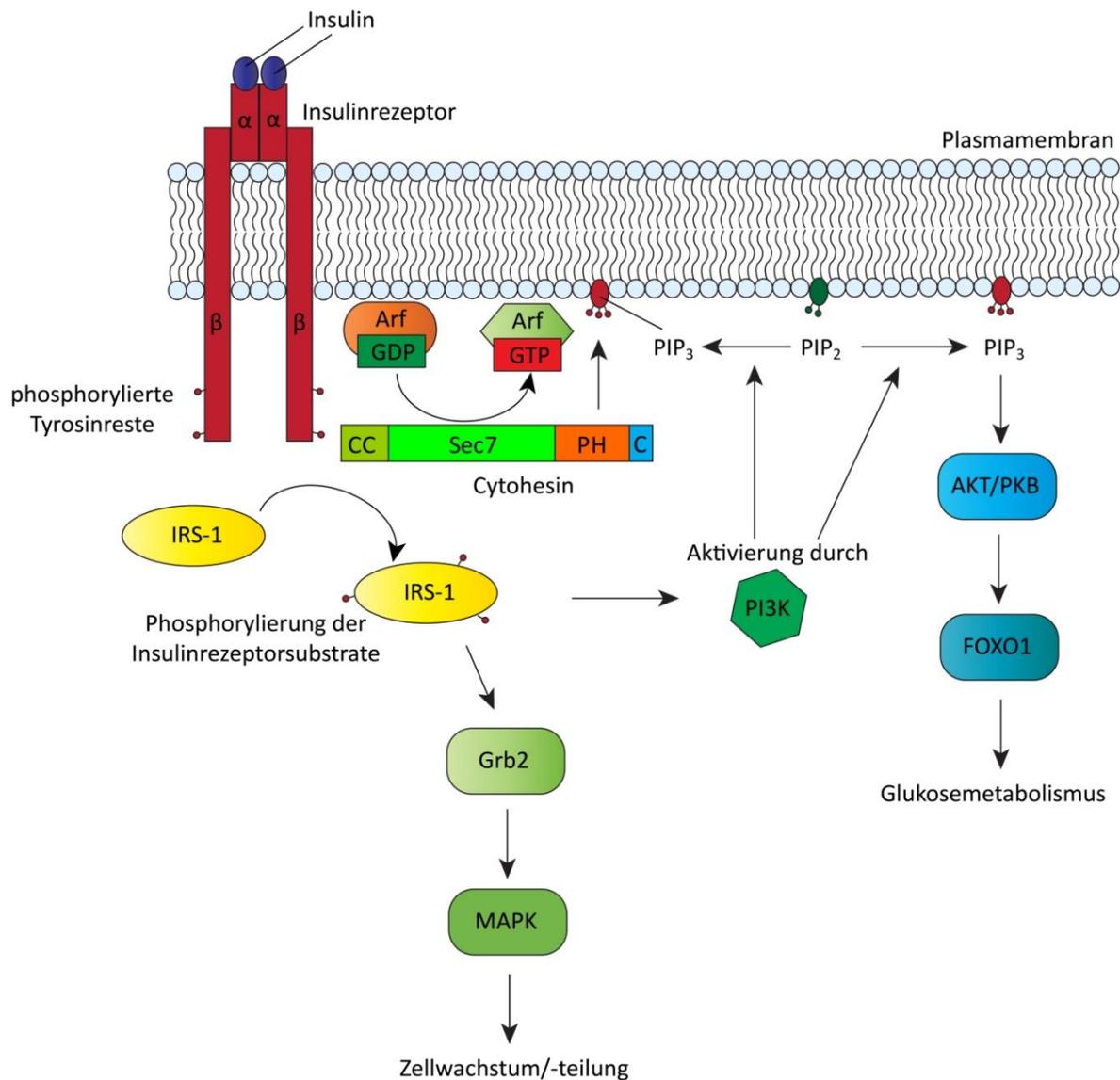


Abbildung 1.7 Cytohesine in der Insulinsignalkaskade: Die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor startet eine Signalkaskade, die FOXO1 aktiviert, welches die Expression von Genen reguliert, die im Zusammenhang mit dem Glukosestoffwechsel stehen. Cytohesin bindet mit seiner PH-Domäne an durch PI3K synthetisiertes PIP₃. Durch Interaktion eines Cytohesin-Arf-Komplexes mit dem Insulinrezeptor kommt es wahrscheinlich zu einer verstärkten Bindung und Phosphorylierung von IRS-1 und somit zu einer Verstärkung des Signals in diesem Signalweg.

Fuss et al.^[72] untersuchten in *Drosophila* das zur Cytohesin-Familie gehörende Protein Steppke. Taufliegen mit mutiertem Steppke-Gen, sowie solche, die mit SecinH3 gefüttert wurden, waren kleiner und entwickelten sich langsamer als normale Taufliegen – Merkmale dafür, daß die Insulinsignalkaskade beeinflusst ist^[73].

Lim et al.^[59] konnten mit CNK1 ein weiteres Protein identifizieren, welches an der Membranrekrutierung der Cytohesine beteiligt ist. In HeLa, HepG2 sowie MCF7-Zellen, in denen CNK1-*knockdown* durch siRNA durchgeführt wurde, konnte eine signifikant niedrigere Phosphorylierung von IRS-1 und AKT nach Stimulation der Zellen mit Insulin oder

insulinähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF) nachgewiesen werden. Sie konnten zeigen, daß in diesen Zellen die Membranrekrutierung von IRS-1, Cytohesin-2 sowie Arf1, jedoch nicht von Arf6 vermindert ist.

Jüngst haben Bill et al.^[74] zeigen können, daß Cytohesine auch als Aktivatoren der ErbB-Rezeptoren (Rezeptoren des Epidermalen Wachstumsfaktors) fungieren können. Die vier ErbB-Rezeptoren (ErbB1/EGFR, ErbB2/Her2, ErbB3/Her3 sowie ErbB4/Her4) gehören, ebenso wie der Insulin-Rezeptor, zur Rezeptorklasse der Tyrosinkinase. Eine Bindung von EGF an die extrazelluläre Domäne der ErbB-Rezeptoren ist nicht hinreichend, um den EGF-Signalweg zu aktivieren. Erst durch zusätzliche Interaktion mit Cytohesin kommt es zur Autophosphorylierung des Rezeptors und zur Aktivierung des nachfolgenden EGF-Signalweges.

Die Membranrekrutierung der Cytohesine wird von verschiedenen Faktoren gesteuert, deren genaues Zusammenspiel jedoch noch nicht umfassend geklärt ist. Um die Auswirkungen auf die Signaltransduktion besser zu verstehen, soll ein genauerer Blick auf die bislang weniger untersuchte PH-Domäne des Cytohesins geworfen werden. Hierzu gibt es verschiedene Ansatzmöglichkeiten, die im Folgenden aufgezeigt werden sollen.

1.3 Ansätze zur Funktionsaufklärung von Proteinen

Die Funktionsaufklärung von Proteinen umfaßt mehrere Schritte. Ist durch Methoden wie Realtime-PCR, Northern-Blot, Microarray, zweidimensionale Gelelektrophorese und Massenspektrometrie das Expressionsprofil eines Proteins ermittelt und somit bekannt, in welchem Zelltyp und in welcher Menge das zu untersuchende Protein auftritt, können durch weitere Methoden wie Hefe-Zwei-Hybrid-System (*yeast-two-hybrid*), Koimmunopräzipitation und TAP (*tandem affinity purification*) mögliche Interaktionspartner identifiziert werden. Somit kann ein Protein evtl. schon einem System, z.B. einem speziellen Signalweg, zugeordnet werden.

Für die genaue Aufklärung der Funktion eines Proteins ist die "*loss of function*"-Analyse eine wichtige Methode. Hierbei wird ein Protein bzw. eine Proteinfunktion inaktiviert und versucht, durch Untersuchung auftretender Phänotypen auf die Funktion des Proteins zu schließen.

Der Eingriff kann durch Mutation oder Deletion eines Gens (*knockout*) auf DNA-Ebene, durch Einsatz von siRNA (*small interfering RNA*), antisense-DNA, sowie Ribozymen auf mRNA-Ebene oder mit Hilfe von Antikörpern, Aptameren oder kleinen Molekülen direkt auf Proteinebene durchgeführt werden.

RNA-Interferenz durch siRNA führt zu einem Abbau von mRNA und somit zu einem Ausbleiben von Proteintranslation^[75].

Die Hybridisierung von mRNA bzw. pre-mRNA mit komplementären DNA-Oligonukleotiden (15-20 nt) (antisense-DNA) führt ebenfalls zu einem Abbau von mRNA und Ausbleiben der Proteintranslation.

Der gleiche Effekt tritt auch beim Einsatz von Ribozymen, RNA-Molekülen, die andere RNAs katalytisch spalten können, auf^[76].

Die oben genannten Methoden führen zu einem Verlust des zu untersuchenden Proteins aus dem zellulären Kontext. Aus dem hierdurch in der zu untersuchenden Zelle bzw. im Organismus auftretenden Phänotyp lassen sich meist nur indirekt Schlüsse auf die konkrete Funktion des fehlenden Proteins ziehen. Es kann sogar vorkommen, daß kein Phänotyp auftritt, da z.B. auf anderem Wege das fehlende Protein kompensiert wird.

Zudem können so genannte "*off-target*" Effekte die Untersuchung erschweren^[77, 78]. Diese können beispielsweise dadurch auftreten, daß siRNA mit nicht vollständig komplementärer mRNA interagiert^[79], diese abbaut und damit Phänotypen hervorruft, die kausal nicht mit dem zu untersuchenden Protein zusammenhängen.

Ein weiteres Problem der oben aufgeführten Methoden besteht darin, daß sie es in der Regel nicht ermöglichen, einzelne Proteindomänen gesondert zu untersuchen.

Auch die Verwendung von monoklonalen Antikörpern bietet sich hier weniger an. Zwar können sie ihr Zielmolekül mit sehr hoher Affinität binden und gut inhibieren, jedoch sind sie in der Regel auf extrazelluläre Proteine beschränkt, da es im reduktiven Milieu des Zytoplasmas häufig zu Fehlfaltungen und Aggregation kommen kann^[80].

Desweiteren stellt das Einschleusen der oben genannten Moleküle in die Zielzellen meist eine weitere Herausforderung dar.

Für Untersuchungen zur Aufklärung krankheitsrelevanter Proteinfunktionen und -interaktionen ist die Chemische Genetik (*chemical genetics*) ein weiterer wichtiger Ansatz. Im Gegensatz zur "klassischen" Genetik, in der versucht wird, biologische Vorgänge über eine Beeinflussung der Gene selbst zu klären (*knockout*, Mutationen), setzt die Chemische Genetik auf die Interaktion von chemischen Substanzen mit Genprodukten, meist Proteinen.

Die verwendeten chemischen Substanzen sind in der Regel kleine organische Moleküle, können jedoch auch Aptamere sein.

1.4 Künstliche Nukleinsäuren als Untersuchungswerkzeuge (Aptamere)

Aptamere (von lat. *aptus*, passen und gr. *meros*, Teil), hier im speziellen RNA-Aptamere, sind kurze einzelsträngige RNA-Oligonukleotide (ca. 20-90 Basen), die in ihrer dreidimensional gefalteten Struktur in der Lage sind, ein spezifisches Target (Molekül, Protein, Zelle, ...) zu binden. Die Dissoziationskonstanten von RNA-Aptameren liegen i.d.R. im pico- bis nanomolaren Bereich. Sie binden ihre Zielmoleküle also ähnlich gut wie Antikörper.

Aptamere werden *in vitro* durch das SELEX-Verfahren (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) gewonnen^[81, 82].

Das SELEX-Verfahren nutzt die Vielfalt von RNA-Zufallspolymeren aus Bibliotheken mit 10^{14} bis 10^{15} verschiedenen Sequenzen pro μmol . Bei einer randomisierten Oligonukleotidlänge von 70 Basen sind theoretisch $4^{70} \approx 10^{42}$ verschiedene Sequenzen möglich, diese sind von der Menge her aber nicht mehr darstellbar.

Aus dieser Menge an Sequenzen werden in der SELEX diejenigen herausgefiltert, die das gewünschte Target binden. Dafür wird das Target immobilisiert und nichtbindende Sequenzen werden gewaschen; das Waschen ist hierbei der Selektionsdruck. Bindende Sequenzen werden eluiert und mittels RT-PCR amplifiziert. Die auf diesem Weg gewonnene DNA-Bibliothek wird transkribiert und die so erhaltene neue RNA-Bibliothek in einen neuen Zyklus von Bindung, Wegwaschen und Elution eingesetzt. Nach mehreren Zyklen erhält man so eine Anreicherung von einigen wenigen bindenden Sequenzen, welche man als Aptamere bezeichnet.

Die Fähigkeit, durch Bindung an spezifische Proteindomänen deren Funktion gezielt auszuschalten, macht Aptamere zu einem interessanten molekularen Werkzeug.

Dies gilt vor allem für *in vitro* Untersuchungen, da dort RNase-frei gearbeitet werden kann. In Zellen oder *in vivo* ist ein Einsatz von Aptameren schwieriger, da zum einen RNasen ubiquitär vorkommen und einen schnellen Abbau der RNA-Aptamere bewirken. Man kann dem Abbau der RNA-Aptamere durch gezielten Einbau geeigneter Modifikationen (z.B. -F) entgegenwirken. Zum anderen ist es schwierig, RNA-Aptamere (z.B. durch Transfektion) in Zellen einzuschleusen, damit sie dort wirken können. Alternativ können Aptamere direkt in Zielzellen als sogenannte Intramere^[83, 84] exprimiert werden (durch Transfektion eines

Expressionsvektors). Diese Möglichkeit bietet sich primär für Zellkulturversuche an, für den Einsatz als Medikament ist sie wenig praktikabel.

Es gibt bislang nur ein als Medikament zugelassenes RNA-Aptamer, Pegaptanib (Macugen[®]), welches zur Behandlung der feuchten altersabhängigen Makula-Degeneration (AMD) eingesetzt wird. Pegaptanib ist ein 2'-Fluor-Pyrimidin und 2'-O-Methyl-Purin substituiertes 27mer RNA-Aptamer. Es bindet, intravitreal injiziert, an das extrazelluläre Protein VEGF-A₁₆₅ (*Vascular Endothelial Growth Factor*) und muß daher nicht in Zellen gelangen.

1.5 Vom Aptamer zum kleinen Molekül

Hat man *in vitro* ein Aptamer erzeugt, so bietet sich ein Verdrängungsexperiment (Aptamer-Displacement-Screening) an, um ein kleines Molekül mit ähnlichen Eigenschaften aus einer großen Bibliothek kleiner Moleküle zu finden. Auf diese Weise wurde bereits SecinH3 als Inhibitor der Cytohesin Sec7-Domäne identifiziert^[43].

Die Anzahl an verschiedenen theoretisch möglichen Molekülen, die auf 10^{400} Moleküle geschätzt werden, überschreitet die angenommene Menge aller existenten Atome im Universum (10^{80}), so daß in der Realität nur ein winziger Bruchteil der theoretisch möglichen Moleküle synthetisiert werden kann. Die Gesamtheit aller Moleküle die existieren bzw. hergestellt werden könnten, wird als *Chemical space* bezeichnet.

Um einen neuen Inhibitor eines Proteins bzw. einer Proteindomäne zu finden, ist es sinnvoll, für ein Screening eine Bibliothek auszuwählen, die den *Chemical space* in einem möglichst breiten Spektrum verschiedener Moleküleigenschaften abbildet (diversitätsorientierte Bibliothek). Ist bereits eine Leitstruktur eines Inhibitors bzw. die Struktur eines Inhibitors für ein ähnliches Protein bekannt, bietet sich der Einsatz einer fokussierten Bibliothek an. Diese setzt sich aus vielen ähnlichen, von der o.g. Leitstruktur abgeleiteten Derivaten zusammen.

Die Moleküle in der Bibliothek sollten zudem den Lipinski-Regeln folgen (Lipinskis *Rule of Five*^[85, 86]). Diese bilden eine Untermenge von 10^{60} Molekülen^[87] im *Chemical Space*, die potentiell als orales Arzneimittel eingesetzt werden könnten.

Die Lipinski-Regeln beschreiben die Voraussetzungen, die erfüllt sein sollten, damit ein Molekül mit höherer Wahrscheinlichkeit zellgängig sowie in Wasser oder DMSO (Dimethylsulfoxid) löslich ist. Somit kann es in Zellversuchen und in *in vivo* Experimenten relativ einfach eingesetzt werden.

Die Voraussetzungen, die an die Moleküle gestellt werden, sind:

- Molare Masse kleiner 500 g/mol
- weniger als 5 Donoren für Wasserstoffbrückenbindungen (z.B. OH-, NH-Gruppen)
- weniger als 10 Akzeptoren für Wasserstoffbrückenbindungen (z.B. O, N-Atome)
- berechneter Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient ($\log P$) kleiner 5

Kleine organische, die Lipinski-Regeln erfüllende Moleküle sind in der Regel von sich aus membrangängig und haben eine höhere Stabilität gegenüber dem zellulären Katabolismus. Dadurch sind sie als intrazellulärer Wirkstoff potentiell besser einsetzbar als Aptamere.

2. Zielsetzung

Wie bereits in einer früheren Arbeit von Hafner et al.^[43] gezeigt wurde, kann mit Hilfe eines RNA-Aptamers in einem kompetitiven Screening aus einer Substanzbibliothek ein Inhibitor identifiziert werden, der spezifisch dieselbe Domäne und Funktion eines Zielproteins adressiert wie das Aptamer.

Ziel der vorliegenden Dissertation war unter Verwendung eines Aptamers einen niedermolekularen Inhibitor für die PH-Domäne des Cytohesin-1 zu identifizieren. Hierzu sollte ein Screening einer diversitätsorientierten Substanzbibliothek aus kleinen organischen Molekülen durchgeführt werden.

Die dabei identifizierten aktiven wirkstoffähnlichen Substanzen sollten des weiteren auf ihre Bindungs- und Inhibitionseigenschaft untersucht werden.

Fernziel ist der Einsatz der Inhibitoren auf zellulärer Ebene, um die Funktionen und Interaktionen der Cytohesine, insbesondere ihrer PH-Domäne, weiter aufzuklären.

3. Ergebnisse

3.1 Cytohesin-1 bindende RNA-Aptamere

Ausgangspunkt der Untersuchungen war eine von Prof. Günter Mayer zur Verfügung gestellte, angereicherte RNA-Bibliothek, die durch eine *in vitro* Selektion von N30 RNA-Bibliothek gegen Cytohesin-1 gewonnen wurde. Dabei sind sieben Selektionszyklen durchgeführt und einige Monoklonale sequenziert worden (siehe Anhang).

Um die Bindungseigenschaften der angereicherten RNA-Bibliothek und der sequenzierten Aptamere zu untersuchen wurden Filterbindungsexperimente durchgeführt. Hierfür wurde die RNA radioaktiv markiert und mit möglichen interagierenden Proteinen inkubiert. An Protein gebundene RNA-Moleküle wurden durch Nitrozellulosefiltration von ungebundener RNA getrennt und mit Hilfe der photostimulierten Lumineszenz (PSL) am Phosphorimager quantifiziert.

Die ersten Ergebnisse von Prof. Günter Mayer zeigten, daß die angereicherte RNA-Bibliothek nach sieben Selektionszyklen sowohl das Protein in Volllänge als auch ein Sec7-PH Konstrukt gebunden hat, jedoch keine Affinität zur isolierten Sec7-Domäne aufwies (siehe Abbildung 3.1).

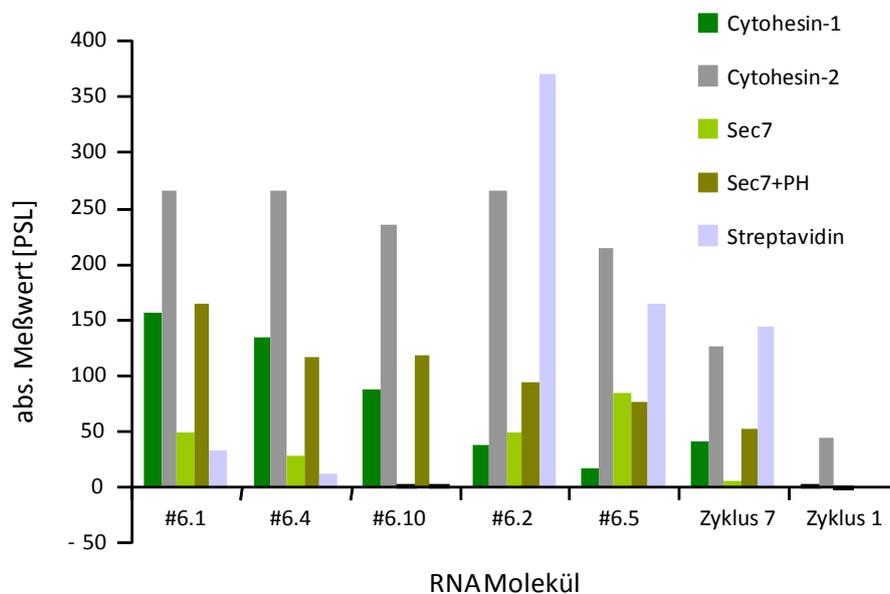


Abbildung 3.1 Filterbindungsassay: Bindung angereicherter Bibliotheken nach dem ersten und letzten (7.) Selektionszyklus sowie Bindung monoklonaler Sequenzen (#6.x) wurden gegen verschiedene Proteine/Proteinkonstrukte (Proteinkonzentrationen 500 nM) getestet: Cytohesin-1 (Selektionstarget), Cytohesin-2 (ARNO), Sec7-Domäne von Cytohesin-1, Sec7-PH-Domänenkonstrukt von Cytohesin-1, Streptavidin (Selektionsmatrix).

Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, daß in der Selektion PH-Domänen-Binder angereichert wurden. Diese Vermutung konnte im Folgenden in eigenen Untersuchungen bestätigt werden (siehe Abbildung 3.2); die angereicherte RNA-Bibliothek bindet im Filterbindungsexperiment die isolierte PH-Domäne.

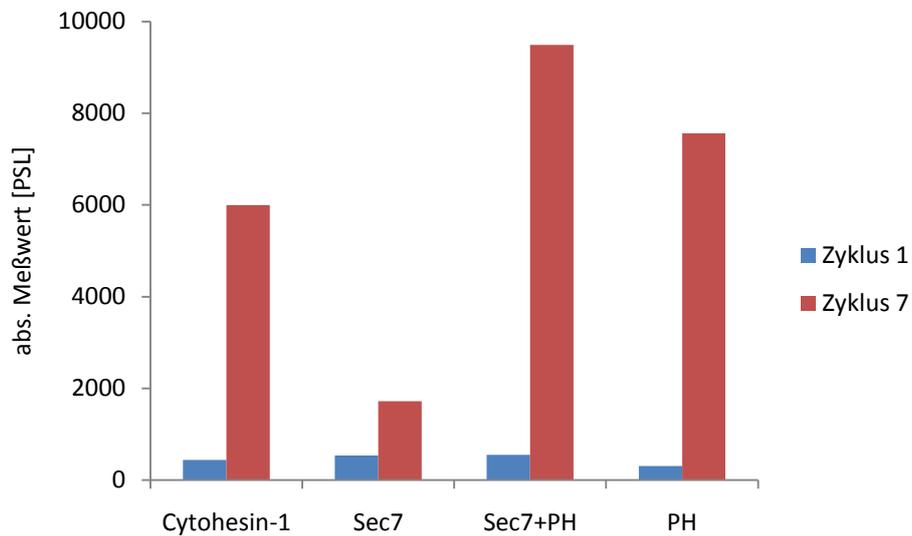


Abbildung 3.2 Filterbindungsassay: Bindung angereicherter, radioaktiv transkribierter RNA-Bibliotheken der Cytohesin-1 *in vitro* Selektion nach dem ersten und letzten (7.) Selektionszyklus an verschiedene Cytohesin-1 Proteinkonstrukte (1 μ M; Volllänge, Sec7-Domäne, Sec7+PH-Domäne, PH-Domäne).

Von den Monoklonen wiesen einige eine erhöhte Affinität zur Selektionsmatrix Streptavidin auf (z.B. #6.2). Monoklon #6.10 zeigte in Filterbindungsexperimenten weder Bindung an die Selektionsmatrix noch Bindung an die isolierte Sec7-Domäne von Cytohesin-1 (siehe Abbildung 3.1). Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, daß es sich bei Monoklon #6.10 um ein PH-Domänen spezifisches Aptamer handelte, welches weiter untersucht werden sollte.

3.2 Charakterisierung des RNA-Aptamers #6.10

Die isolierte PH-Domäne von Cytohesin-1 wurde in einem Filterbindungsexperiment von #6.10 ebenso gebunden wie das Volllängeprotein, die isolierte Sec7-Domäne jedoch nicht (siehe Abbildung 3.3); die PH-Domänenspezifität des #6.10 konnte somit bestätigt werden.

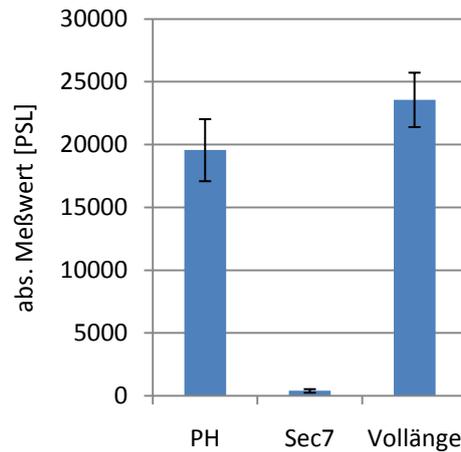


Abbildung 3.3 Filterbindungsassay: Bindung von #6.10 an die Cytohesin-1 PH-Domäne, Sec7-Domäne und Cytohesin-1 in Vollänge (je 1 μ M, n=2).

Um, neben der Spezifität, die Bindungsaffinität von #6.10 zum Volllänge Cytohesin-1 zu untersuchen, wurde in einem weiteren Filterbindungsexperiment die Dissoziationskonstante (K_d) von #6.10 bei steigender Cytohesin-1 Konzentration bestimmt und mit Hilfe des Programms OriginPro berechnet (siehe Abbildung 3.4). Der K_d -Wert lag bei 692 nM. Die zur Kontrolle gemessene unselektierte RNA Bibliothek (N30) zeigte erwartungsgemäß keine Bindung an Cytohesin-1.

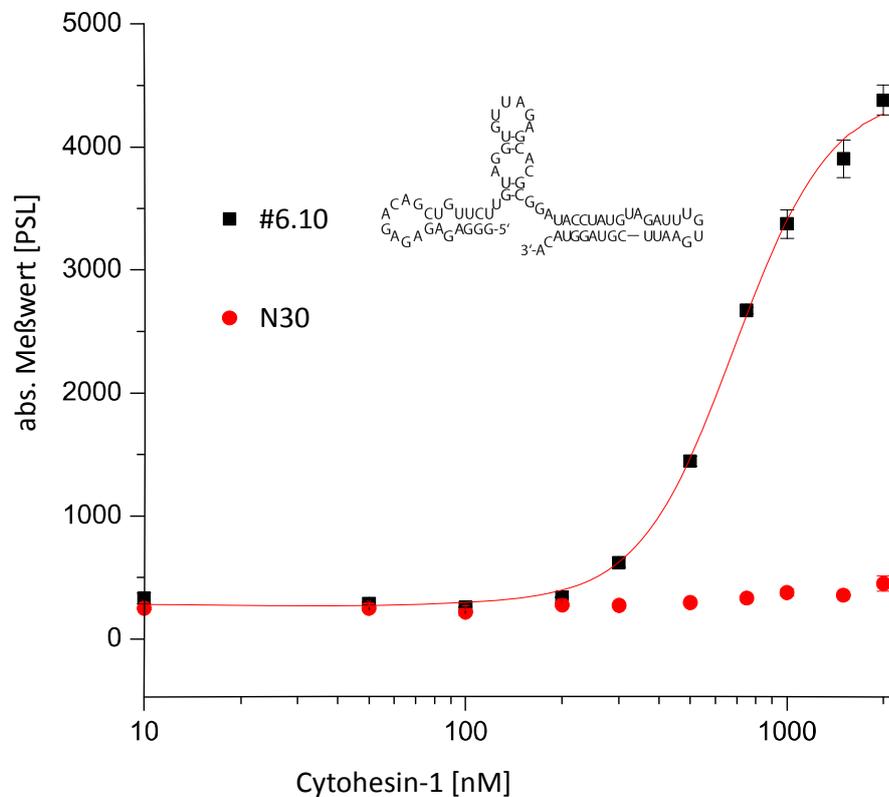


Abbildung 3.4 Filterbindungsassay: Bindung von #6.10 an Cytohesin-1 (10 nM bis 2000 nM) ($K_d=692$ nM), keine Bindung von N30 Pool-RNA.

In weiteren Filterbindungsexperimenten zeigte sich, daß #6.10 auch zu Cytohesin-2 und Cytohesin-3 mit K_d -Werten von 352 nM und 409 nM ähnlich gute Bindungsaffinitäten aufweist (siehe Abbildung 3.5). Es unterscheidet also kaum zwischen den in hohem Maße homologen PH-Domänen der Cytohesin Familie (siehe Abbildung 1.6).

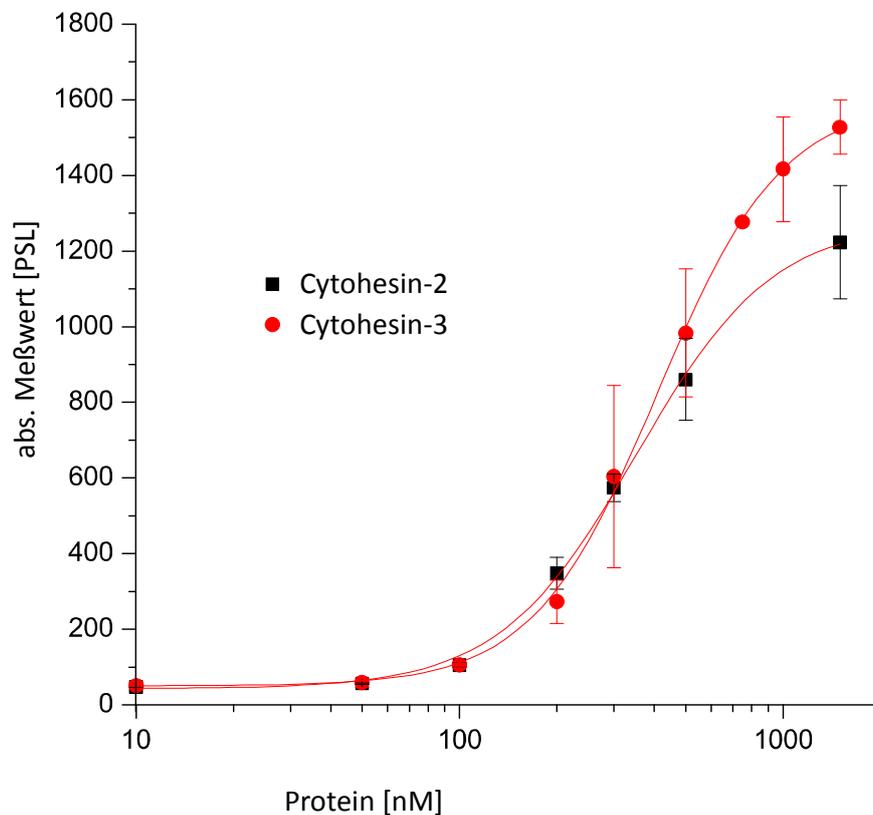


Abbildung 3.5 Filterbindungsassay: Bindung von #6.10 an Cytohesin-2 ($K_d=352$ nM) und Cytohesin-3 ($K_d=409$ nM).

Die Spezifität gegenüber PH-Domänen, die auch in anderen Proteinen enthalten ist, wurde zunächst exemplarisch an einem weiteren Protein getestet. Das humane Protein KIAA0403 (EMBL/Gen-BankTM/DDBJ Datenbank-Nummer: BAA23699; PIP₃-E mit 21 zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren, Datenbank-Nummer: NP_056368), welches im Rahmen des „*human brain-clone projects*“ identifiziert wurde, ist wie Cytohesin-1 ein PIP₃-bindendes Protein. Darüber hinaus konnte KIAA0403 bislang keine biologische Funktion und Relevanz zugeordnet werden. Es enthält eine N-terminale PH-Domäne. Das Aptamer #6.10 zeigte in Filterbindungsexperimenten keine Bindung an ein die PH-Domäne enthaltendes GST-KIAA0403-Konstrukt.

Zur Validierung des zuvor bestimmten K_d -Werts der Bindung von Cytohesin-1 mit #6.10 wurden Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie-Messungen (*surface plasmon resonance*

SPR) an einem Biacore 3000 Gerät durchgeführt. Mit dieser Methode ist es möglich, Bindungskinetiken von Analyten und Liganden in Echtzeit zu messen. Der Ligand muß hierzu auf der Chipoberfläche des Geräts immobilisiert werden, während der Analyt in Lösung vorliegt. Für eine optimale Messung empfiehlt es sich, die RNA auf den Chip zu koppeln während das Protein in Lösung zugegeben wird, da die SPR-Messung bei höheren Analytgewichten genauere Meßergebnisse liefert.

Bewährt haben sich Streptavidin-derivatisierte Meßchips (SA-Chips), auf denen biotinylierte RNA immobilisiert werden kann.

Hierzu wurde 5'-biotinylierte RNA (#6.10/N30) über GMPS-Transkription (siehe Protokoll 6.1.9) und Biotinylierung des 5'-RNA-Endes mit Iodoacetyl-PEO₂ Biotin hergestellt (siehe Protokoll 6.1.10) und auf einem SA-Chip immobilisiert.

Interessanterweise konnte keine Bindung von Cytohesin-1 an immobilisiertem #6.10 gemessen werden.

Die daraus entstandene Vermutung, daß das in der 5'-biotinylierten RNA fehlende 5'-Triphosphat entscheidend an der Bindung von #6.10 und Cytohesin-1 beteiligt ist, konnte durch ein weiteres Filterbindungsexperiment bestätigt werden (siehe Abbildung 3.6). In diesem Experiment ging bei radioaktiv transkribierter (*body labelled*; siehe Protokoll 6.1.8) #6.10 RNA durch 5'-Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase (CIAP) (siehe Protokoll 6.1.5) die Bindung zu Cytohesin-1 vollständig verloren. Der weitere Einsatz von 5'-gelabeltem Aptamer ist daher nicht möglich. Eine mögliche Alternative stellt, wie später gezeigt wird, das 3'-Labeling dar.

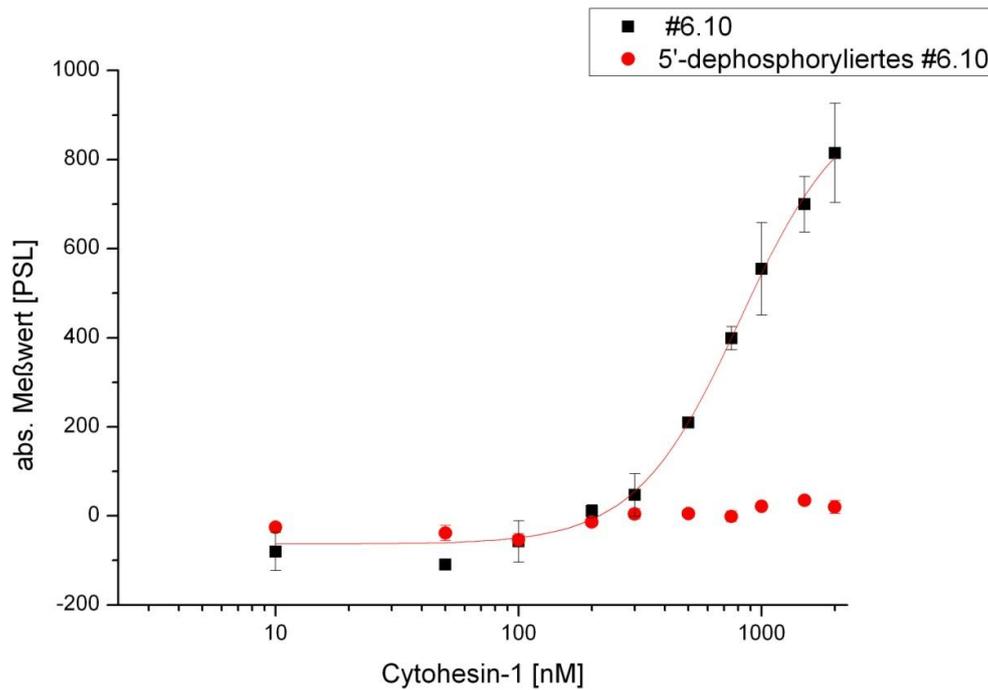


Abbildung 3.6 Filterbindungsassay: keine Bindung von 5'-dephosphoryliertem #6.10 an Cytohesin-1.

Um zu zeigen, daß mit Hilfe des RNA-Aptamers #6.10 die physiologische Funktion der PH-Domäne des Cytohesins, nämlich das Binden an PIP_3 in biologischen Membranen, inhibiert werden kann, wurden *in vitro* mit Hilfe immobilisierter PIP_3 -haltiger Vesikel SPR-Messungen durchgeführt (siehe Protokoll 6.5.5).

Zunächst wurde die Bindung verschiedener Konzentrationen von Cytohesin-1 (1 nM bis 2 μM) an immobilisierte PIP_3 -haltige Vesikel gemessen (siehe Abbildung 3.7), beginnend mit der niedrigsten Konzentration, anschließender Regeneration des Meßchips und Messung der nächsthöheren Konzentration. Hierbei konnten keine Regenerationsbedingungen gefunden werden, unter denen einerseits gebundenes Cytohesin-1 vollständig vom Chip dissoziierte, andererseits die immobilisierten Vesikel vollständig intakt blieben. Dadurch war eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nicht gegeben. Die Bindung erfolgte offenbar konzentrationsabhängig, aus den Meßdaten konnte aber kein zuverlässiger K_d -Wert bestimmt werden.

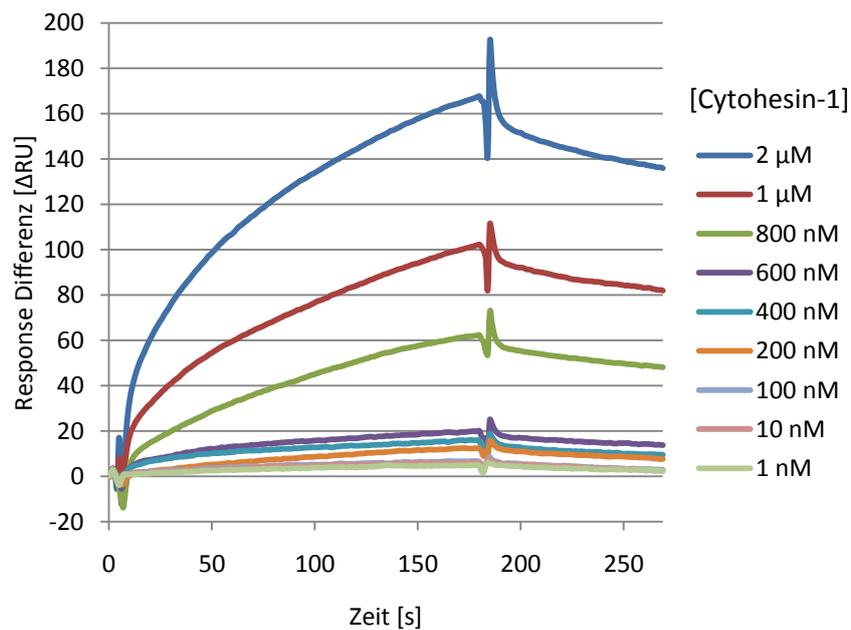


Abbildung 3.7 SPR-Differenzmessung: Bindung von Cytohesin-1 in unterschiedlichen Konzentrationen (1 nM bis 2 µM) an PIP₃-haltige Vesikel. Die Bindung wurde gegen eine Oberfläche mit immobilisierten, PIP₃-freien Vesikeln referenziert.

Wegen der fehlenden Regenerationsbedingungen wurde auf eine etablierte, regenerationsfreie Meßmethode zurückgegriffen^[88], die zu stets reproduzierbaren Ergebnissen führte. Bei dieser Methode wurde eine Verdünnungsreihe von fünf Konzentrationen mit festem Verdünnungsfaktor (hier: Verdünnungsfaktor = 3; 30 nM, 89 nM, 266 nM, 800 nM, 2400 nM) in gleichmäßigen Abständen (3 min Assoziation, 2 min Dissoziation) injiziert und gemessen (siehe Abbildung 3.8). Mit dem von Karlsson et al.^[88] entwickelten titrationskinetischen Fit ließ sich aus dieser Messung ein K_d von 581 nM bestimmen.

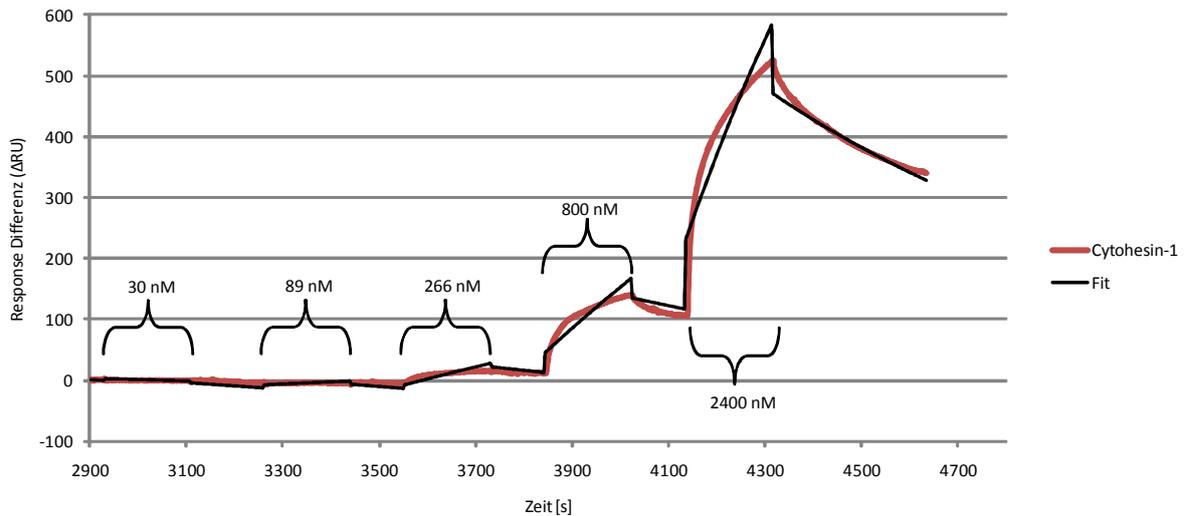


Abbildung 3.8 Oberflächenplasmonresonanz Sensogramm mit Fit: Eine ansteigende Verdünnungsreihe von Cytohesin-1 (Verdünnungsfaktor = 3; 30 nM, 89 nM, 266 nM, 800 nM, 2400 nM) wurde in gleichmäßigen Abständen (3 min Assoziation, 2 min Dissoziation) injiziert. Die Messung erfolgte an auf L1-Chip immobilisierten Vesikeln (siehe Protokoll 6.5.5). Der titrationskinetische Fit (titration kinetic fit)^[88] wurde mit dem Programm BIAevaluation erstellt und lieferte einen K_d von 581 nM.

Nachdem die Interaktion von Cytohesin-1 und PIP_3 quantifiziert werden konnte, sollte die Inhibition durch das Aptamer #6.10 nachgewiesen werden. Hierzu wurden bei konstanter Cytohesin-1 Konzentration (800 nM) steigende Mengen an #6.10 RNA koinjiziert (0 nM bis 200 nM). Es war zwar nicht möglich einen K_i -Wert zu bestimmen, dennoch konnte gezeigt werden, daß die Bindung von Cytohesin-1 an PIP_3 -haltige Vesikel konzentrationsabhängig durch #6.10 inhibiert wurde (siehe Abbildung 3.9).

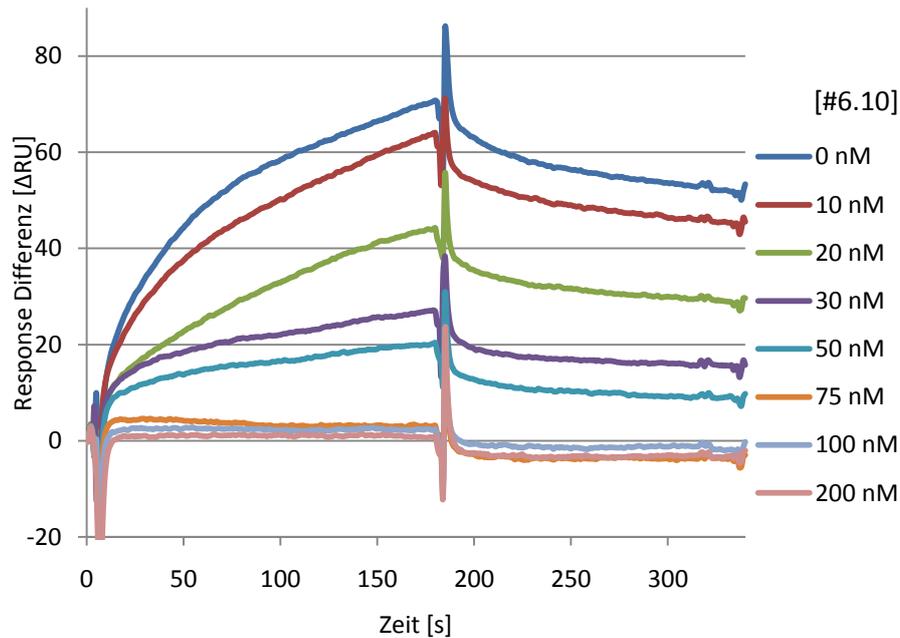


Abbildung 3.9 SPR-Differenzmessung: Inhibition der Bindung von 800 nM Cytohesin-1 an PIP₃-Vesikel durch verschiedene Konzentrationen an #6.10 (0 nM bis 200 nM).

Zur Validierung der ersten Inhibitionsergebnisse wurde erneut eine Messung nach der regenerationsfreien Methode durchgeführt (siehe Abbildung 3.10). Durch Verwendung von N30 Pool-RNA (1 μM) konnte zunächst ausgeschlossen werden, daß RNA ein genereller Inhibitor der Cytohesin-1 PIP₃ Interaktion ist (vgl. roter Kurvenverlauf in Abbildung 3.10 mit Abbildung 3.8). Die Bindung von Cytohesin-1 an die Vesikel konnte durch #6.10 vollständig inhibiert werden, solange die Aptamerkonzentration über der Cytohesin-1 Konzentration lag (siehe blaue Kurve in Abbildung 3.10). Erst bei einem Überschuß an Cytohesin-1 (2,4 μM zu 1 μM) konnte eine im Vergleich zur Kontrollmessung verminderte Bindung nachgewiesen werden.

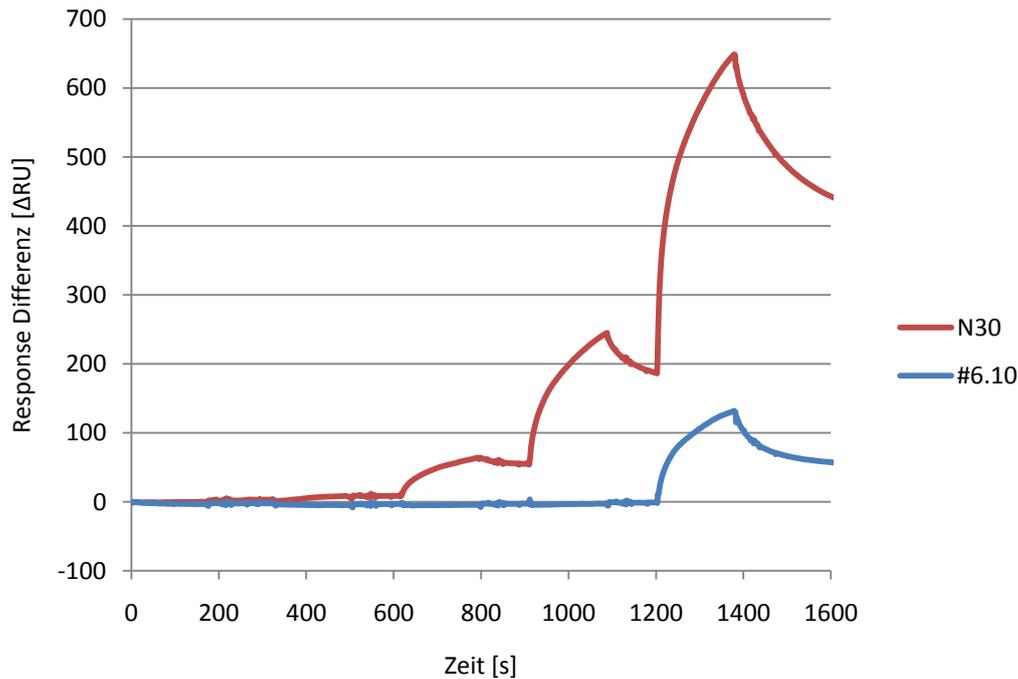


Abbildung 3.10 Oberflächenplasmonresonanz Sensogramm: Koinjektion von 1 μM RNA (#6.10/N30) mit ansteigenden Cytohesin-1 Konzentrationen (30 nM bis 2400 nM). Das Aptamer #6.10 konnte Bindung von Cytohesin-1 inhibieren, N30 Pool-RNA hingegen nicht.

Ein K_i -Wert für die Inhibition läßt sich mangels geeigneter Fitmethoden nicht berechnen, eine Bewertung unterschiedlicher Inhibitionen kann jedoch über einen qualitativen Vergleich der Kurvenverläufe erfolgen.

Da kleine organische Moleküle *in vivo* besser als Inhibitor eingesetzt werden können, wurde im Folgenden versucht, das inhibitorische Aptamer #6.10 durch ein kleines organisches Molekül zu ersetzen. Ebenso wie das Aptamer #6.10 soll das kleine organische Molekül einerseits spezifisch die PH-Domäne der Cytohesine binden, andererseits soll es die Membranrekrutierung von Cytohesinen inhibieren. Hierzu wurde ein kompetitives *in vitro* Screening durchgeführt.

3.3 Anforderungen an ein Screeningsystem

Um bei einer Testung von vielen Substanzen qualitativ verwertbare Ergebnisse zu erhalten bedarf es einiger notwendiger Voraussetzungen. Wichtigste Voraussetzung ist ein gleichbleibend zuverlässiges Arbeiten, da sich die Testung oft über einige Tage bis Wochen erstreckt.

Um den Aufwand für Screenings in durchführbaren Grenzen zu halten, ist eine Automatisierbarkeit des Verfahrens wichtig. In Hochdurchsatzsystemen (HTS *high throughput screening*, 1.000 - 10.000 Substanzen pro Tag) liegen die Anforderungen an die Automatisierbarkeit höher als in Niedrigdurchsatzsystemen (LTS *low throughput screening*, 1 - 500 Substanzen pro Tag). Der Einsatz von Mikrotiterplatten (96, 384, 1536 oder sogar 3456 Wells) ist für die Automatisierbarkeit und vor allem die Verringerung der Testvolumina auf wenige Mikroliter unerlässlich und führt zu einer Zeit- und Kostenersparnis^[89].

Die Möglichkeit, aktive Substanzen (Hits) mit einer spezifischen Meßmethode zu identifizieren, hängt in hohem Maße von der Qualität der Messung ab. Einen statistischen Parameter für die Qualität einer HTS oder LTS-Messung führten Zhang et al.^[90] mit dem Z-Faktor ein. Dieser Faktor stellt eine Relation zwischen den 3-Sigma-Umgebungen der Positiv- und Negativkontrollen und dem Abstand der Mittelwerte der Positiv- und Negativkontrollen her.

$$Z = 1 - \frac{3\sigma_p + 3\sigma_n}{|\mu_p - \mu_n|}$$

σ_p und σ_n = Standardabweichungen der Positiv- bzw. Negativkontrolle

μ_p und μ_n = Mittelwerte der Positiv- bzw. Negativkontrolle

Z-Wert	Screeningsystem	Struktur des Assays
1	ideales System	$\sigma = 0$ oder Dynamikbereich $\rightarrow \infty$
$1 > Z \geq 0,5$	exzellentes System	Großer Abstand der 3-Sigma-Umgebungen der Positiv- und Negativkontrollmeßwerte
$0,5 > Z > 0$	grenzwertiges System	Geringer Unterschied 3-Sigma-Umgebungen der Positiv- und Negativkontrollmeßwerte
< 0	ungeeignetes System	Positiv- und Negativkontrollmeßwerte sowie deren 3-Sigma-Umgebungen überlappen

Tabelle 3.1: Bedeutung der Z-Werte für einen Screening-Assay^[90].

Ein Z-Wert von 1 ist in einem realen Screening nicht zu erreichen, da jede Messung fehlerbehaftet ist. Um ausreichend gut zwischen „Hit“ und „kein Hit“ unterscheiden zu können, sollte demnach der Z-Wert für ein HTS oder LTS zwischen 1 und 0,5 liegen.

Bestimmt man den Z-Faktor ohne aktive Substanzen, wird dieser als Z'-Faktor bezeichnet.

3.4 Mögliche Meßmethoden

Um ein Screening durchzuführen, dessen Hit-Identifikation durch die Messung einer Bindung zwischen Aptamer und Protein erfolgt, muß die ausgewählte Meßmethode die vorgenannten Bedingungen erfüllen (siehe Kapitel 3.3).

Auf Fluoreszenz basierende spektroskopische Messungen eignen sich im Allgemeinen aus folgenden Gründen gut für ein solches Screening: 1. die Meßzeit ist kurz (ms/Meßpunkt); 2. die Messung läßt sich im Mikrotiterplattenformat durchführen; 3. die Messung kann ohne Separation der Interaktionspartner in Lösung durchgeführt werden.

Als mögliche Methoden bieten sich die Messung von Fluoreszenzpolarisation^[91], Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET)^[92] und Fluoreszenzintensität^[93] an.

3.4.1 Fluoreszenzpolarisation

3.4.1.1 Grundlagen der Fluoreszenzpolarisationsmessung

Der Fluoreszenzpolarisationsmessung liegt die Beobachtung zugrunde, daß fluoreszierende Moleküle nach Anregung mit linear polarisiertem Licht dieses wieder linear polarisiert emittieren^[94]. Sind die Fluorophore beweglich, so beeinflußt dies die Fluoreszenzpolarisation. Da sich alle zu messenden Moleküle statistisch bewegen, führt dies zu einer verringerten Polarisation. Die Polarisation hängt im wesentlichen von der Fluoreszenzlebensdauer und der Rotationsgeschwindigkeit der Fluorophore während der Fluoreszenzanregung ab. Bei konstanter Temperatur und Viskosität der Meßlösung ist die Rotationsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zum Volumen des fluoreszenten Moleküls. Je größer ein Fluorophor ist, desto höher ist die gemessene Polarisation.

3.4.1.2 Fluoreszenzpolarisationsassay

Um mit Hilfe der Fluoreszenzpolarisationsmessung RNA-Protein Interaktionen messen zu können, muß eines der beiden Moleküle fluoreszent sein. Idealerweise modifiziert man die im Verhältnis zum Protein kleinere RNA, da bei Bildung des RNA-Protein-Komplexes so eine höhere Größenänderung auftritt und somit größere Polarisationsunterschiede gemessen werden können.

Das in Lösung frei vorliegende, fluoreszenzmarkierte Aptamer zeigt eine niedrigere Polarisation als im proteingebundenen Zustand. Diesen Polarisationsunterschied kann man zur Identifizierung von kleinen Molekülen nutzen, die die Interaktion zwischen Aptamer und

Protein stören. Dadurch sollte die Polarisation idealerweise wieder den ursprünglichen Wert des freien Aptamers erreichen (siehe Abbildung 3.11).

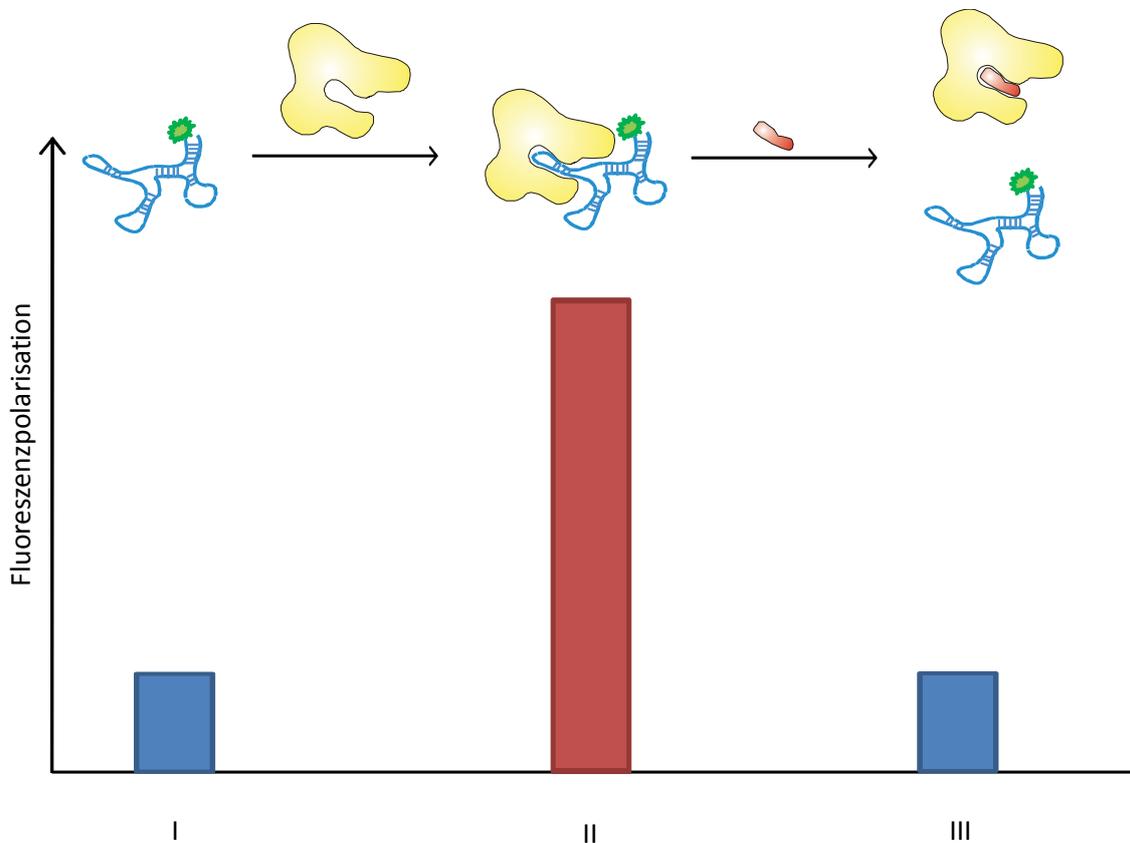


Abbildung 3.11 Fluoreszenzpolarisationsassay: I. freies Aptamer → niedrige Polarisation; II. Aptamer-Protein-Komplex → hohe Polarisation; III. durch Inhibitor verdrängtes, freies Aptamer → niedrige Polarisation.

3.4.1.3 Fluoreszenzmarkierung von RNA-Aptameren

Die etablierteste Methode der Herstellung fluoreszenter Aptamere ist die Markierung am 5'-Ende über eine GMPS-Transkription (siehe Protokoll 6.1.9) und die anschließende Reaktion mit Iodoacetamidofluorescein. Da das zu untersuchende Aptamer #6.10, wie bereits dargelegt, nicht 5'-gelabelt werden kann, um nicht sein 5'-Triphosphat und somit seine Bindungsaffinität zu Cytohesin-1 zu verlieren, wird als Alternative die Möglichkeit der 3'-Fluoresceinmarkierung genutzt^[95].

Hierbei wird die Ribose am 3'-Ende der RNA selektiv durch Natriumperodat oxidiert und das erhaltende Dialdehyd mit Fluorescein-5'-thiosemicarbazid kondensiert. Durch Reduktion mit Natriumcyanoborhydrid erhält man eine stabil 3'-fluoresceinmarkierte RNA (siehe Abbildung 3.12 sowie Protokoll 6.1.11). Diese wird über denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgereinigt (siehe Protokoll 6.2.2).

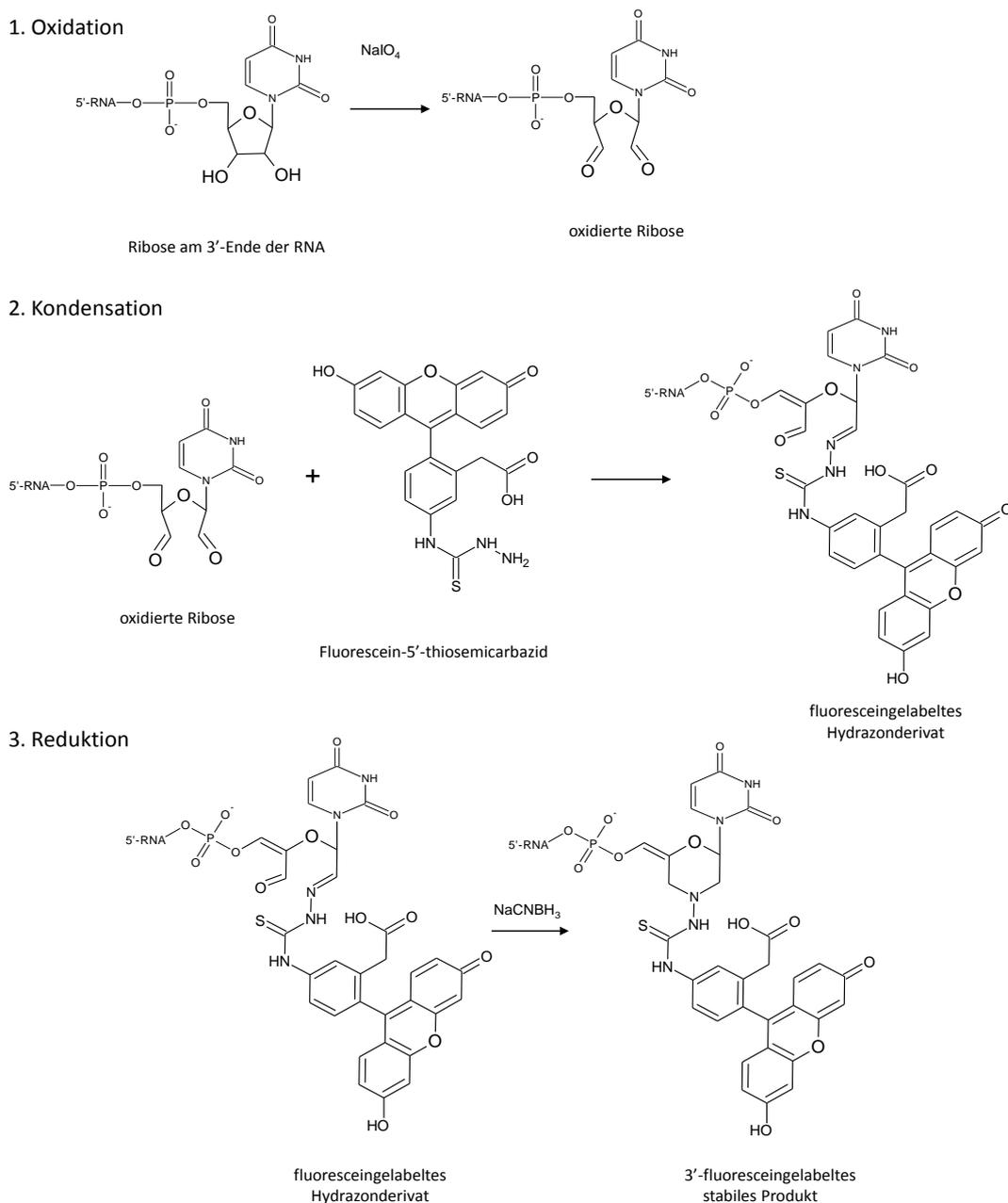


Abbildung 3.12 Reaktionsgleichungen: Dreischrittreaktion zur 3' Fluoresceinmarkierung von RNA nach Wu et al.^[95]. 1. Selektive Oxidation der Ribose am 3'-Ende der RNA, 2. Kondensation der oxidierten RNA mit Fluorescein-5'-thiosemicarbazid, 3. Reduktion des Kondensationsprodukts zu einer stabil 3'-fluoresceingelabelten RNA.

3.4.1.4 Fluoreszenzpolarisationsmessungen

Erste Messungen mit dem 3'-fluoresceinmarkierten Aptamer lieferten erwartungsgemäße Ergebnisse, steigende Zugabe von Cytohesin-1 bzw. Cytohesin-1 PH-Domäne führte zu höheren Polarisationswerten. Aufgrund mangelnder Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unter Zugabe von Volllänge Cytohesin-1 wurde mit der PH-Domäne des Cytohesin-1 weitergearbeitet. Diese Ergebnisse waren gut reproduzierbar (siehe Abbildung 3.13).

Die zur Kontrolle gemessene 3'-fluoresceingelabelte N30 RNA-Bibliothek zeigte wie erwartet keinen Anstieg der Polarisation bei Zugabe von Cytohesin-1 PH-Domäne.

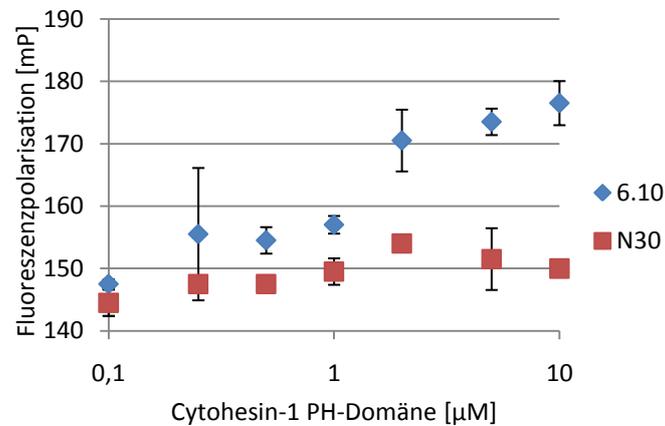


Abbildung 3.13 Fluoreszenzpolarisation: Messung von 16 nM 3'-fluoresceingelabelter RNA (#6.10/N30) mit steigenden Konzentrationen an Cytohesin-1 PH-Domäne (100 nM - 10 µM), 1x PBS, 3 mM MgCl₂, 1 µg/µl Heparin als unspezifischer Kompetitor sowie 10% DMSO.

Trotz zahlreicher Optimierungsversuche zur Verbesserung des für das Screening maßgeblichen Z'-Werts (größer 0,5), konnte nur ein Z'-Wert von 0,3 erzielt werden.

Aufgrund dieses unzureichenden Ergebnisses (vgl. Tabelle 3.1) konnte diese Methode für das Screening nicht eingesetzt werden.

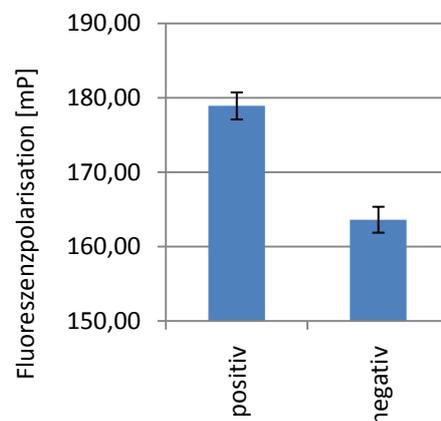


Abbildung 3.14 Güte des Fluoreszenzpolarisationsassays: zur Bestimmung des Z'-Faktors des Fluoreszenzpolarisationsassays wurde die Fluoreszenzpolarisation von Positivkontrollen (120 nM 3'-fluoresceingelabeltes #6.10, 4 µM Cytohesin-1 PH-Domäne) und Negativkontrollen (120 nM 3'-fluoresceingelabeltes #6.10, kein Protein) mehrfach bestimmt (n=24). Als Meßpuffer diente 1x PBS, 2,5 mM MgCl₂, 0,001% Tween20, 16,7% DMSO, die Pipettierung erfolgte per Roboter in 96-Loch Mikrotiterplatten (finales Meßvolumen von 25 µl). Der hieraus berechnete Z'-Wert lag bei 0,3.

3.4.2 Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET)

Bei einer FRET-Messung müssen die beiden Interaktionspartner, deren Bindung es zu messen gilt, gelabelt sein. Ein Partner trägt eine Fluoreszenzmarkierung, der andere einen Fluoreszenzquencher. Die Energie eines angeregten Fluoreszenzlabels (Donor) kann bei Bindung der beiden Interaktionspartner durch die dadurch herbeigeführte räumliche Nähe strahlungslos auf den Fluoreszenzquencher (Akzeptor) übertragen werden, so daß es zu einer Fluoreszenzlöschung kommt. Für eine nukleinsäurebasierte FRET-Messung hat sich als Donor-Akzeptor-Paar FAM-TAMRA (Fluorescein/N,N'-Tetramethylrhodamin) bewährt^[92].

Für ein FRET-basiertes Screening hätte also neben #6.10 auch das Protein Cytohesin-1 markiert werden müssen. Mit den üblichen Proteinmarkierungsmethoden wäre keine Kontrolle der Markierungsposition im Protein möglich gewesen, was dazu geführt hätte, daß zum einen eine räumliche Nähe des Donor-Akzeptor-Paars bei Bindung nicht hätte garantiert werden können und zum anderen die Aktivität des Proteins durch das Label möglicherweise beeinflusst worden wäre.

Aufgrund der bereits dargestellten Problematik bei der #6.10-Markierung schien eine auf FRET-basierte Meßmethode, die gelabeltes #6.10 benötigt, als wenig erfolgversprechend und darüber hinaus wegen der notwendigen Etablierung einer Markierung des Cytohesin-1 recht aufwendig, weshalb auf FRET als Meßmethode für ein Screening verzichtet wurde.

3.4.3 RNA-Quantifizierung durch Messung von Fluoreszenzintensität

Manche Fluoreszenzfarbstoffe, wie RiboGreen oder Ethidiumbromid, erfahren einen starken Anstieg ihrer Fluoreszenz, sobald sie an Nukleinsäuren gebunden sind. Dies kann genutzt werden, um Nukleinsäuren zu detektieren und zu quantifizieren.

Die Quantifizierung von RNA (und auch von DNA) mittels eines Fluoreszenzfarbstoffs bietet im Hinblick auf ein Screening gegenüber der klassischen Konzentrationsbestimmung, der Absorptions-Spektroskopie bei 260 nm, einige Vorteile. Neben den bereits in Kapitel 3.4 aufgeführten Gründen sprechen darüber hinaus weitere Faktoren für den Einsatz eines Fluoreszenzfarbstoffs.

Die Konzentrationsbestimmung mittels eines Fluoreszenzfarbstoffs ist im Gegensatz zur Absorptions-Spektroskopie relativ insensitiv gegenüber in der Meßprobe befindlichen Proteinen und kann ohne vorheriges Entfernen von Proteinen durchgeführt werden.

Für die Entwicklung eines Screenings wurde RiboGreen als Fluoreszenzfarbstoff ausgewählt. Neben Proteinen ist RiboGreen auch gegenüber anderen nicht-nukleinsäurehaltigen

Verunreinigungen, die typischerweise in Nukleinsäureansätzen enthalten sind, wie z.B. Salze oder Ethanol, insensitiv^[96]. Zudem ist es mit RiboGreen möglich, bereits geringe Nukleinsäuremengen zu detektieren; der Meßbereich liegt bei 1 ng/ml bis 1 µg/ml, bei der Absorptions-Spektroskopie liegt der Meßbereich oberhalb von ~4 µg/ml ($A_{260} > 0,1$). Der Einsatz von RiboGreen bedarf, anders als bei Ethidiumbromid, keiner speziellen Arbeitssicherheitsmaßnahme.

RiboGreen hat, gebunden an RNA, ein Emissionsmaximum von ~525 nm. Im Vergleich zu RNA-ungebundenem RiboGreen steigt die Fluoreszenz mehr als 1000fach an (zum Vergleich bei Ethidiumbromid um ~30fach)^[96].

3.4.3.1 Entwicklung eines Screenings auf Basis von Fluoreszenzintensitätsmessung

Wie beim Fluoreszenzpolarisationsassay soll auch hier Aptamer-Verdrängung durch kleine Moleküle nachgewiesen werden. Ein auf Fluoreszenzintensitätsmessung basierender Screeningassay, durchgeführt mit RiboGreen, quantifiziert stets sämtliche in Meßlösung vorliegenden Aptamere. Daher muß gebundenes und ungebundenes Aptamer vor der Messung voneinander separiert werden.

Hierzu ist folgender Ablauf denkbar: Nach der Inkubation von immobilisiertem Protein mit Aptamer und einem kleinen Molekül werden nichtbindende Spezies durch Waschen entfernt und gebundene, zurückbleibende RNA mit Hilfe von RiboGreen quantifiziert (siehe Abbildung 3.15).

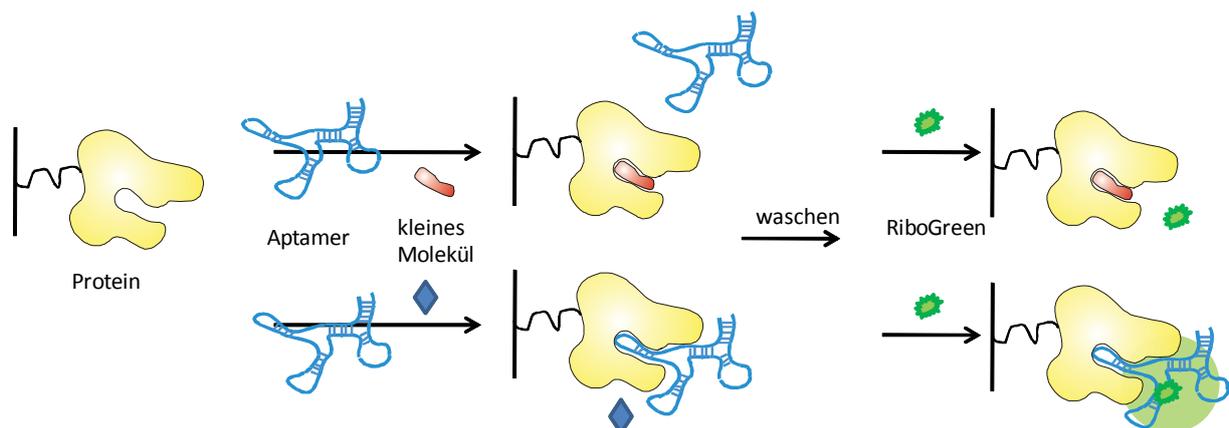


Abbildung 3.15 Schema des RiboGreen basierten Assays: immobilisiertes Protein wird mit RNA-Aptamer und mit kleinen Molekülen versetzt, anschließend werden freie Moleküle durch Waschen entfernt und die verbleibende RNA mittels RiboGreen-Fluoreszenz quantitativ nachgewiesen.

Das Targetprotein Cytohesin-1 wird durch Coating nicht-kovalent in einer Mikrotiterplatte immobilisiert.

Das Aptamer #6.10 wird mit dem zu testenden kleinen Molekül in Lösung vorgemischt und nach Zugabe in die Mikrotiterplatte bis zur Einstellung eines Bindungsgleichgewichts inkubiert.

Durch Ausleeren und anschließendes Waschen der Mikrotiterplatte werden alle ungebundenen, in Lösung verbliebenen Moleküle entfernt. Dadurch werden auch sonstige, die Messung möglicherweise beeinflussende Komponenten beseitigt und somit optimale Meßbedingungen geschaffen. RiboGreen wird in Lösung hinzugegeben und die Mikrotiterplatte inkubiert. Anschließend kann durch Messung der Fluoreszenzintensität die in der Mikrotiterplatte verbliebene RNA-Menge quantifiziert werden.

Eine niedrige Fluoreszenzintensität kann auf eine inhibitorische Wirkung des kleinen Moleküls hinweisen. Es sind jedoch auch andere Szenarien denkbar (siehe Abbildung 3.16).

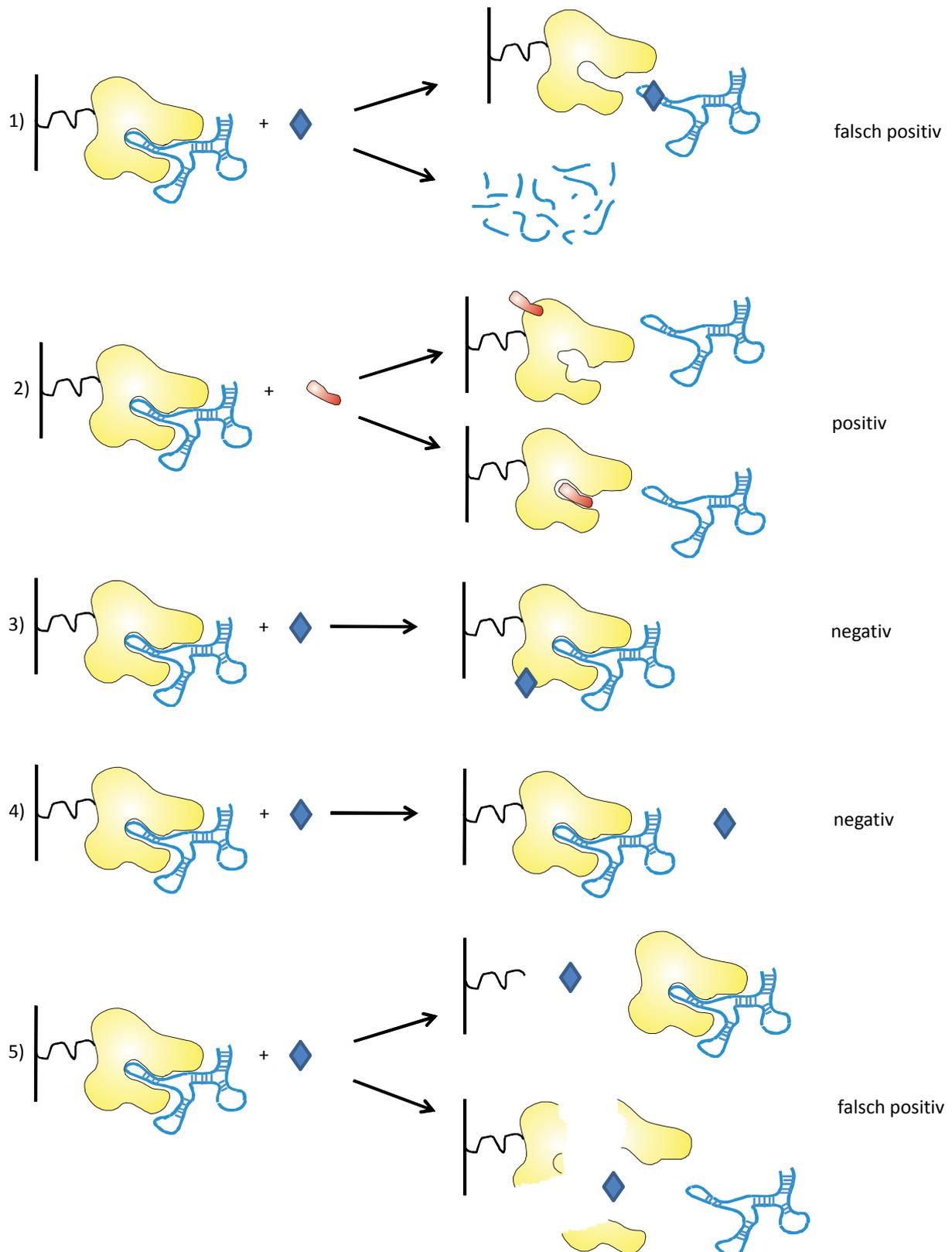


Abbildung 3.16 mögliche Szenarien: im RiboGreen basierten Assay sind verschiedene Arten der Interaktion zwischen kleinem Molekül, Protein und RNA-Aptamer möglich, die das kleine Molekül in Bezug auf eine Konkurrenz des Aptamers entweder negativ, positiv oder falsch positiv erscheinen lassen:

1. Das kleine Molekül bindet oder baut das Aptamer #6.10 ab, sodass dieses nicht mehr an das Protein binden kann. Dies würde zu einem falsch positiven Ergebnis führen.

2. Das kleine Molekül bindet an Cytohesin-1 und verhindert durch Blockieren der Bindestelle oder durch allosterische Hemmung die Bindung von #6.10 an Cytohesin-1. Man erhielte in diesem Fall ein positives Ergebnis.
3. Das kleine Molekül bindet an Cytohesin-1, verhindert aber nicht die Bindung des #6.10. Hier erhielte man ein negatives Ergebnis.
4. Das kleine Molekül interagiert nicht, was zu einem negativen Ergebnis führen würde.
5. Das kleine Molekül zerstört Cytohesin-1 oder löst es von der Mikrotiterplatte, sodaß der Protein-Aptamer-Komplex durch das Waschen entfernt wird. Dies ergäbe ein falsch positives Ergebnis.

Da kleine Moleküle im Screening neben positiv auch als falsch positiv identifiziert werden können (d.h. in beiden Fällen als Hit erscheinen), muß nach dem Screening ein funktionaler Assay durchgeführt werden, um positive Hits als Inhibitor zu identifizieren und falsch positive Hits auszusortieren.

3.4.3.2 Etablierung des Screeningsystems

Zunächst sollte getestet werden, ob eine Bindung zwischen #6.10 und Cytohesin-1 mit der angedachten Methode überhaupt nachgewiesen werden kann.

Dazu wurden in eine 96-Loch Mikrotiterplatte (*Greiner, flat-bottomed, full-area, mid-binding, black*) drei verschiedene Cytohesin-1 Konstrukte (Cytohesin-1 Volllänge, PH-Domäne sowie Sec7-Domäne) pipettiert und über Nacht bei 4°C gecoatet (in Bindungspuffer: 1x PBS, 3 mM MgCl₂). Zur Kontrolle wurden einige Löcher nur mit Bindungspuffer befüllt.

Nach der Übernachtinkubation wurde die gecoatete Mikrotiterplatte vorsichtig ausgeschüttet und über Kopf leicht auf einem Küchenpapier ausgeklopft, um etwaige festhängende Tröpfchen zu entfernen – dieses Prozedere wurde im Folgenden (inklusive dem Screening) bei sämtlichen Schritten, in denen eine Mikrotiterplatte entleert werden mußte analog durchgeführt.

Anschließend wurden die gecoateten Löcher der Mikrotiterplatte je zweimal mit 100 µl Bindungspuffer gewaschen und anschließend für eine Stunde mit 100 µl RNA-Lösung (#6.10 bzw. N30: 100 nM, 200 nM, 400 nM) bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach erneutem zweimaligem Waschen mit 100 µM Bindungspuffer wurden 250 µl RiboGreen-Lösung (6,25 µl Quant-It RiboGreen Reagenz in 25 ml TE Puffer; 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) in jedes Loch pipettiert und nach fünf Minuten die Fluoreszenzintensität bestimmt (Tecan Ultra).

Die Ergebnisse der ersten Messung zeigen bereits eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenzintensität bei #6.10 und Cytohesin-1 Volllänge gegenüber N30 sowie der Sec7-Domäne (siehe Abbildung 3.17 A). Bei mit PH-Domäne gecoateten sowie bei ungecoateten Mikrotiterplattenlöchern kam es generell zu einem sehr starken Anstieg der

Fluoreszenzintensität. Dies läßt sich durch unspezifische RNA-Bindung an die Mikrotiterplatte erklären, der Effekt wurde mit steigender PH-Domänenkonzentration (800 nM) und somit vollständigerer Belegung der Oberfläche zurückgedrängt. Das größere Cytohesin-1 Volllänge konnte die Oberfläche bereits bei 100 nM, ebenso die Sec7-Domäne bei 400 nM, so gut bedecken, daß keine unspezifische RNA-Bindung auftrat. Aufgrund der besseren Ergebnisse wurden die Mikrotiterplatten im Folgenden, insbesondere im finalen Screening, mit 800 nM Cytohesin-1 Volllänge gecoatet.

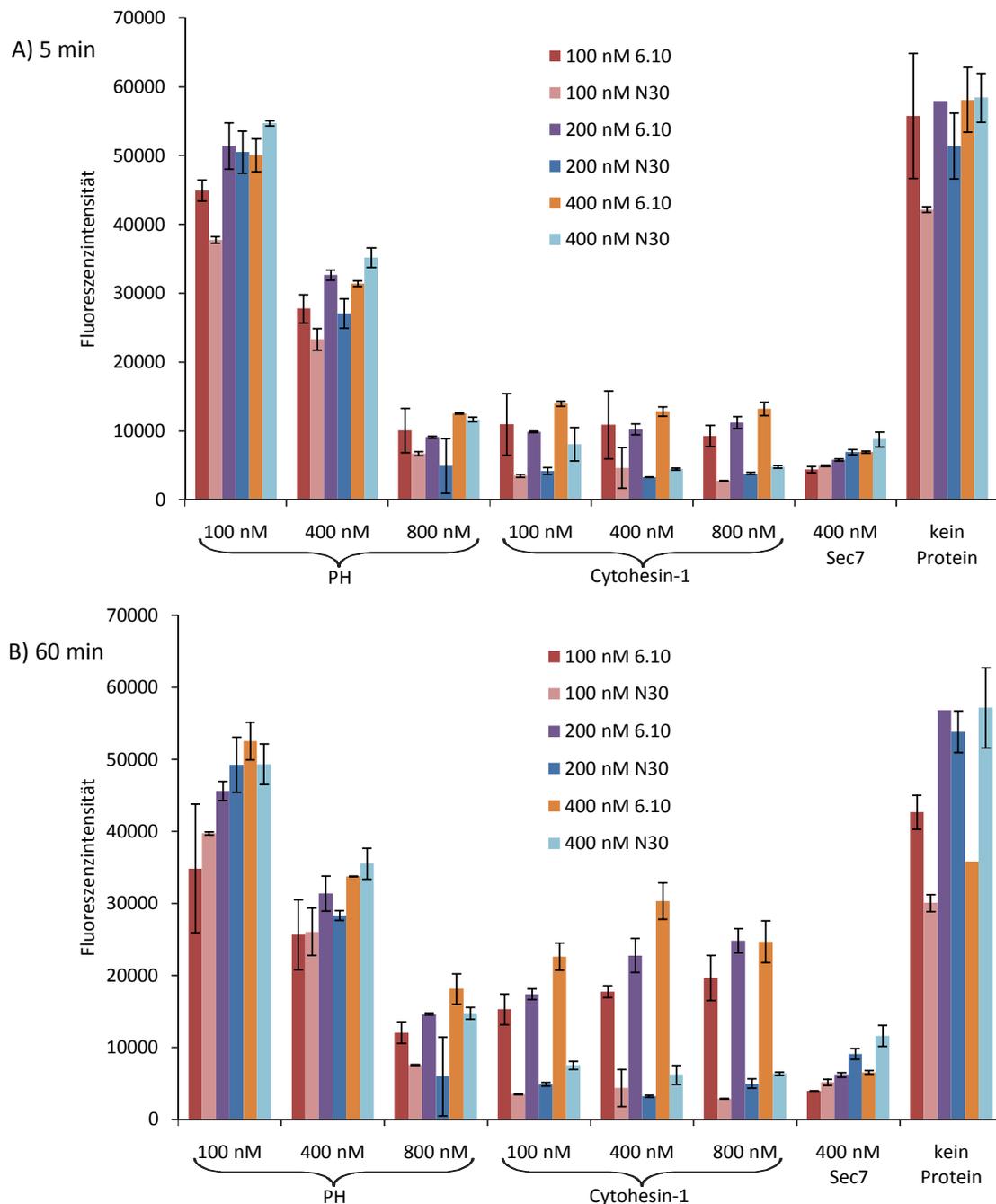


Abbildung 3.17 RiboGreen-Assay: in einer 96-Loch Mikrotiterplatte gecoatetes Cytohesin-1, PH-Domäne, Sec7-Domäne bzw. Kontroll-Löcher (kein Protein) wurden 60 min mit RNA (100 nM, 400 nM, 800 nM #6.10/N30) in Bindepuffer (BP) inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit BP gewaschen und nach Inkubation mit RiboGreen-Lösung die Fluoreszenzintensität gemessen: A) Erste Messung nach 5 Minuten, B) Zweite Messung der selben Mikrotiterplatte nach einer Stunde (finales Meßvolumen 250 µl), (n=2).

Die selbe Mikrotiterplatte der oben beschriebenen Messung (nach 5 Minuten Inkubation) wurde nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur erneut vermessen (siehe Abbildung 3.17 B). Hier stieg die Fluoreszenzintensität bei Bindung von #6.10 an Cytohesin-1 im Vergleich zu den Kontrollen noch stärker an. Vermutlich wurde die RNA durch die längere Inkubation mit DMSO-haltiger RiboGreen-Lösung wieder von der Mikrotiterplatte gelöst (als

freie RNA oder RNA-Protein-Komplex) und konnte so, optimaler im Strahlengang des Meßgeräts liegend, besser detektiert werden.

Weitere Versuche mit unterschiedlichen Inkubationszeiten ergaben ein Optimum bei ca. 120 min, welches im finalen Screening verwendet wurde (siehe Abbildung 3.22). Experimente, in denen durch Zugabe von Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid eine stärkere Freisetzung der RNA aus dem RNA-Protein-Komplex erreicht werden sollte, führten zu keiner weiteren Verbesserung und wurden daher verworfen.

Da die zu screenenden Substanzen in der Substanzbibliothek in DMSO gelöst vorlagen, mußte getestet werden, ob DMSO einen nachteiligen Effekt auf den RiboGreen-Assay ausübt. Die Zugabe von 10% DMSO (entspräche einer finalen Compound-Konzentration im Screening von 100 µM) zum Bindungspuffer, in dem #6.10 für den Assay vorlag, führte zu keiner Verschlechterung (siehe Abbildung 3.18). Die zusätzliche Hinzunahme von 0,001% Tween20, einem Detergenz, welches zur Verminderung unspezifischer Bindungen eingesetzt werden kann, führte zu einer starken Verminderung der Fluoreszenzintensität bei allen getesteten Negativkontrollen, während die Positivkontrolle (#6.10 mit Cytohesin-1) nur schwach abnahm (siehe Abbildung 3.18). Da die Anwesenheit von DMSO im Screening unvermeidlich ist und Tween20 im RiboGreen-Assay die unspezifische RNA-Bindung gut unterdrücken konnte, wurde dem RNA-Bindungspuffer in allen weiteren Optimierungsexperimenten sowie im Screening 10% DMSO und 0,001% Tween20 zugesetzt.

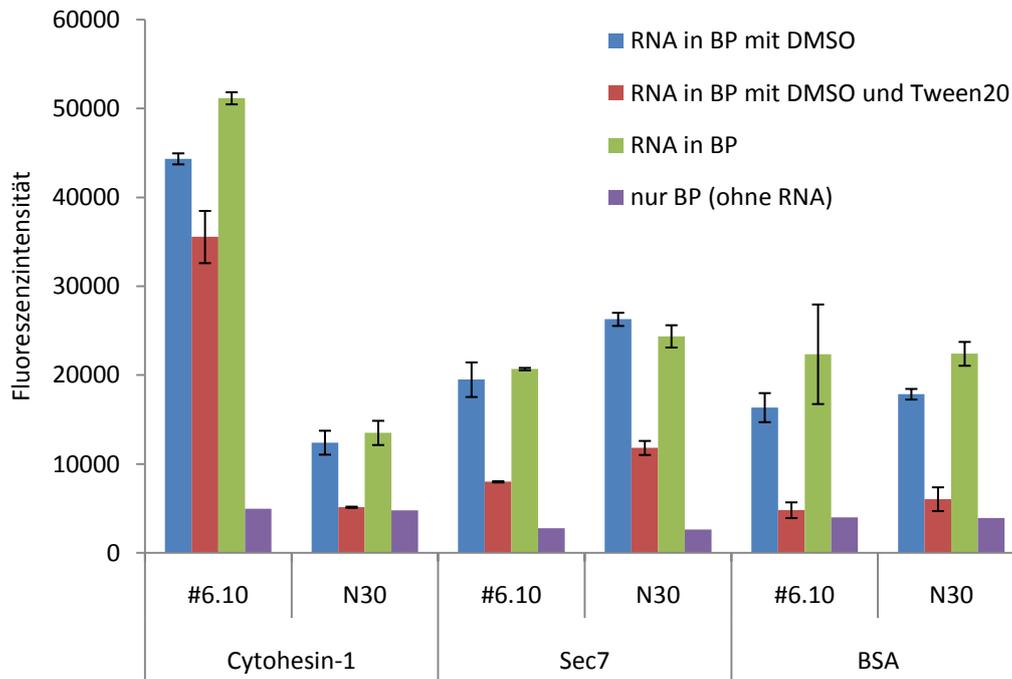


Abbildung 3.18 Einfluß von DMSO und Tween20 auf den RiboGreen-Assay: in einer Mikrotiterplatte gecoatetes Cytohesin-1, Sec7-Domäne und Rinderserumalbumin (BSA) wurden 60 min mit unterschiedlichen RNA-Mixturen inkubiert (400 nM RNA (#6.10/N30) in Bindepuffer (BP), $\pm 10\%$ DMSO, $\pm 0,001\%$ Tween20). Anschließend wurde zweimal mit BP gewaschen und nach 60 min Inkubation mit RiboGreen-Lösung die Fluoreszenzintensität gemessen (n=2).

In weiteren Experimenten wurde auf eine andere 96-Loch Mikrotiterplatte mit geringeren Meßvolumina gewechselt (*Greiner, flat-bottomed, half-area, mid-binding, black*). Dadurch sollte, insbesondere im umfangreichen Screening, Probenmaterial eingespart werden. Die Meßergebnisse in den neuen Mikrotiterplatten blieben vergleichbar zu den alten. Eine weitere Verkleinerung der Meßvolumina in 384-Loch Mikrotiterplatten erwies sich, insbesondere durch unzureichende Genauigkeit des Pipettierroboters, als nicht möglich ($Z' < 0$).

Um die benötigte Anzahl an Waschschritten zu optimieren, wurde unterschiedlich oft (1-4 Mal) im zweiten Waschschriff des oben beschriebenen RiboGreen-Assays gewaschen (Waschen nach Inkubation mit RNA). Hier zeigte sich, daß zweimaliges Waschen nichtspezifisch gebundene RNA gut entfernt, häufigeres Waschen zu keiner weiteren Abnahme der unspezifisch gebundenen RNA führt, jedoch spezifisch gebundene RNA (#6.10 an Cytohesin-1) durch mehrmaliges Waschen teilweise mit entfernt wird (siehe Abbildung 3.19). Daher wurde im Screening das zweimalige Waschen nach der RNA-Inkubation beibehalten.

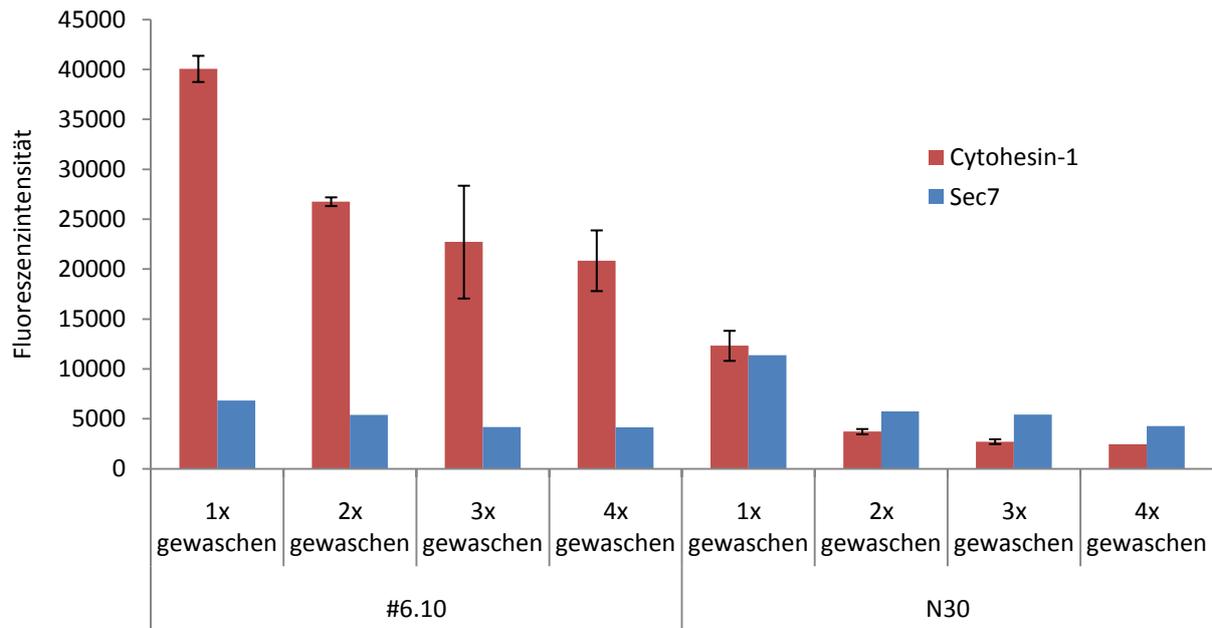


Abbildung 3.19 Einfluß der Anzahl der Waschschrte auf den RiboGreen-Assay: in einer Mikrotiterplatte gecoatetes Cytohesin-1 sowie Sec7-Domäne wurden 60 min mit 400 nM RNA (#6.10/N30) in Bindepuffer (BP) inkubiert. Anschließend wurde je nach Loch ein bis viermal mit BP gewaschen und nach 60 min Inkubation mit RiboGreen-Lösung die Fluoreszenzintensität gemessen (n=2 für Cytohesin-1).

Desweiteren wurden zur Optimierung der RNA-Inkubationszeit kürzere Zeiten getestet, um damit auch das Screening beschleunigen zu können. Eine Verkürzung der Inkubationszeit von 60 min auf 30 min stellte sich als optimal heraus (siehe Abbildung 3.20).

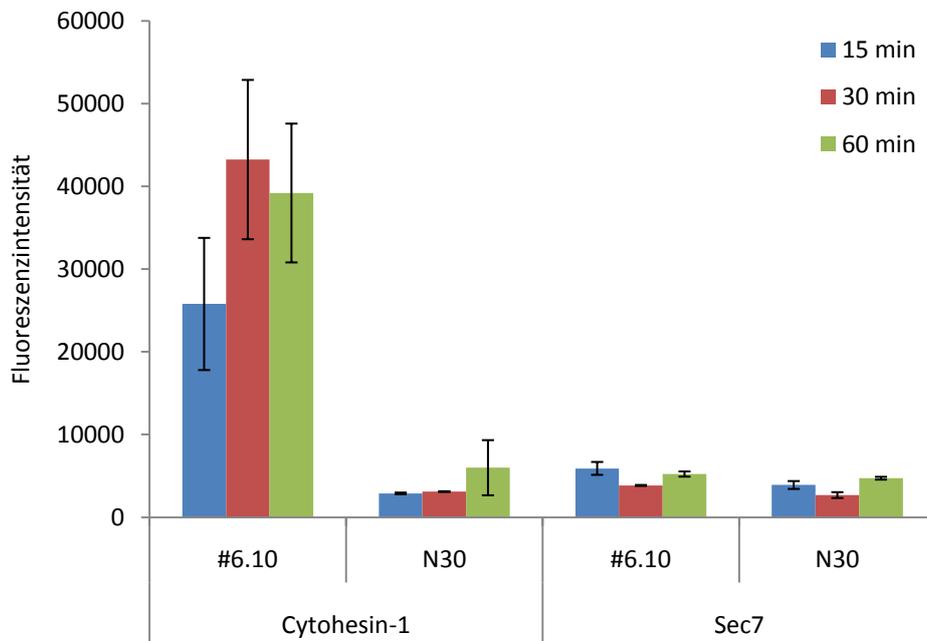


Abbildung 3.20 Optimierung der RNA-Inkubationszeit im RiboGreen-Assay: Über Nacht mit Protein (Cytohesin-1 und Sec7-Domäne) gecoatete Mikrotiterplatten wurden nach zweimaligem Waschen unterschiedlich lange mit #6.10 inkubiert (15, 30, 60 min). Anschließend wurde wieder zweimal gewaschen, eine Stunde mit RiboGreen-Lösung inkubiert und die Fluoreszenzintensität bestimmt (n=3).

Als nächstes wurde versucht, die Dissoziationskonstante von #6.10 und Cytohesin-1 mit Hilfe einer RiboGreen-Messung durchzuführen (siehe Abbildung 3.21). Dadurch sollte überprüft werden, ob sich der aus Filterbindungsexperimenten bestimmte K_d -Wert (692 nM) reproduzieren läßt.

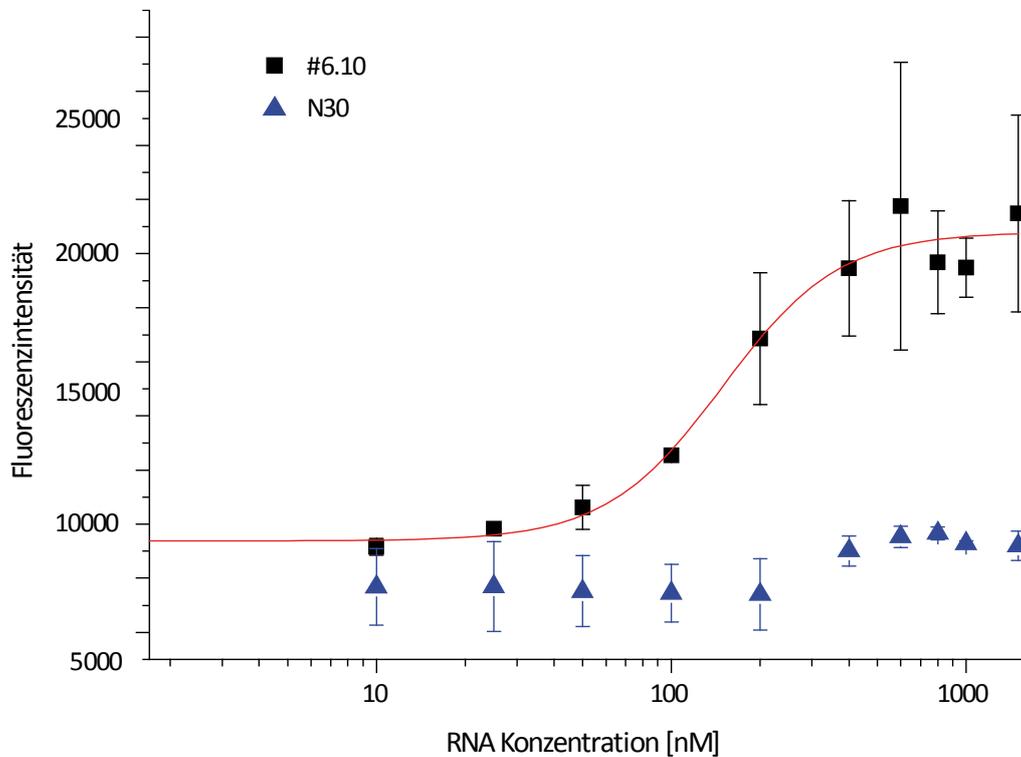


Abbildung 3.21 Bestimmung der Dissoziationskonstante durch Fluoreszenzintensitätsmessung: Die Dissoziationskonstante von Cytohesin-1 und #6.10 wurde durch eine RiboGreen basierte Messung bestimmt. Aufgetragen ist die Änderung der Fluoreszenzintensität des RiboGreens in mit Cytohesin-1 gecoateten Mikrotiterplatten, nach Inkubation mit einer Konzentrationsreihe an RNA (10 nM bis 2 μ M), sowie zweimaligem Waschen mit Bindungspuffer (1x PBS, 3 mM $MgCl_2$). Der berechnete K_d liegt bei 150 nM \pm 20 nM (n=12).

Der K_d -Wert der RiboGreen-Messung liegt mit 150 nM ungefähr fünfmal niedriger als bei den Filterbindungsexperimenten, aufgrund der höheren Fehlerbalken im RiboGreen-Assay jedoch im Rahmen der Erwartungen. N30 Pool-RNA zeigt im selben Experiment, wie erwartet, keine Affinität zu Cytohesin-1.

3.4.3.3 Z'-Faktorbestimmung

Wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 3.3) ist der Z-Faktor bzw. Z'-Faktor das ausschlaggebende Maß für die Güte eines Screening-Assays.

Da bereits eine Verlängerung der Inkubationszeit der Screeningplatte mit RiboGreen von 5 min auf 60 min (siehe Abbildung 3.17) zu besseren Ergebnissen führte, wurde anhand einer

weiteren Variierung der Inkubationszeit versucht, den optimalen Meßzeitpunkt zur Bestimmung eines möglichst guten Z-Faktors zu ermitteln (siehe Abbildung 3.22). Ab einer Inkubationszeit von ca. 100 min wiesen die Messungen relativ konstante Ergebnisse auf, welche zu Z'-Werten von über 0,6 führten. Mit verlängerter Inkubationszeit nahmen die Z'-Werte jedoch leicht ab, so daß für das Screening eine Inkubationszeit von 120 min gewählt wurde. Hier lag der Z'-Wert mit 0,69 so hoch, daß exzellente Systembedingungen für das Screening gegeben waren (vgl. Tabelle 3.1).

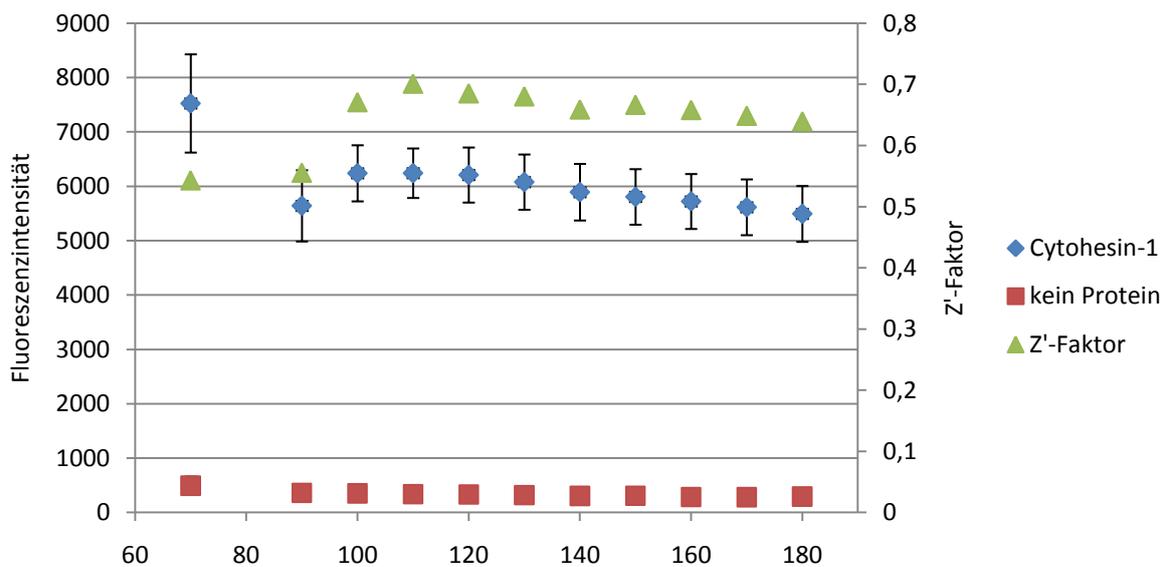


Abbildung 3.22 Z'-Faktorbestimmung bei verschiedenen Inkubationszeiten mit RiboGreen: Aufgetragen ist die Fluoreszenzintensität der Messungen bzw. der Z'-Faktor gegen die Inkubationszeit. Während der Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Mikrotiterplatte mit Aluminiumfolie vor Lichteinfall geschützt und bei 300 rpm geschüttelt (Cytohesin-1: n=83; kein Protein: n=5).

3.5 Screening nach Inhibitoren für die Cytohesin-1 PH-Domäne

3.5.1 Substanzbibliotheken für das Screening

Für Screenings verwendete Substanzbibliotheken sollten strukturdivers sein, um einen möglichst großen Raum im *Chemical Space* abzudecken, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit ein inhibitorisches Molekül zu finden erhöht. Alle in der Bibliothek enthaltenen Substanzen sollten die Lipinski-Regeln^[85, 86] erfüllen, damit sie in späteren Zellversuchen und in *in vivo* Experimenten besser einsetzbar sind.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 12.144 chemische Verbindungen gescreent. Diese setzten sich aus den kommerziell erhältlichen Bibliotheken Comgenex1-4 (bestehend aus 9.904 chemischen Verbindungen), und der Bibliothek KR1 (bestehend aus 2.240 Substanzen), deren Substanzen hauptsächlich in der Arbeitsgruppe von Prof. Gütschow (Universität Bonn) synthetisiert wurden, zusammen.

3.5.2 Primärscreen

Für das Primärscreening wurden je 2,5 µl jeder Substanz (1 mM in DMSO) mit Hilfe eines Pipettierroboters (Tecan, Freedom Evo) in 96-Loch Mikrotiterplatten verteilt und durch Zugabe von 22,5 µl RNA-Premix für das Screening vorbereitet.

RNA-Premix:

0,001% Tween20

400 nM RNA (#6.10)

1x PBS

3 mM MgCl₂

25 µl des so entstandenen RNA-Compound-Mix wurden mit Hilfe eines Pipettierroboters auf vorbereitete, mit Cytohesin-1 gecoatete Screeningplatten übertragen und gemessen (siehe Protokolle 6.5.2 und 6.5.3). Zusätzlich zu den zu screenenden Substanzen (Compounds) wurden auf jeder Screeningplatte drei Meßproben von Positiv- und Negativkontrollen aufgetragen und gemessen. Die Kontrollen enthielten keine Compound, statt dessen DMSO. Die Positivkontrolle wurde zudem in Mikrotiterplattenlöchern ohne gecoatetes Cytohesin-1 durchgeführt (siehe Abbildung 3.23). Aus den Kontrollmessungen wurde für jede

Screeningplatte ein Z'-Faktor berechnet. Da dieser bei allen im Screening gemessenen Platten größer als 0,5 war, mußte keine Platte neu pipettiert und gemessen werden.

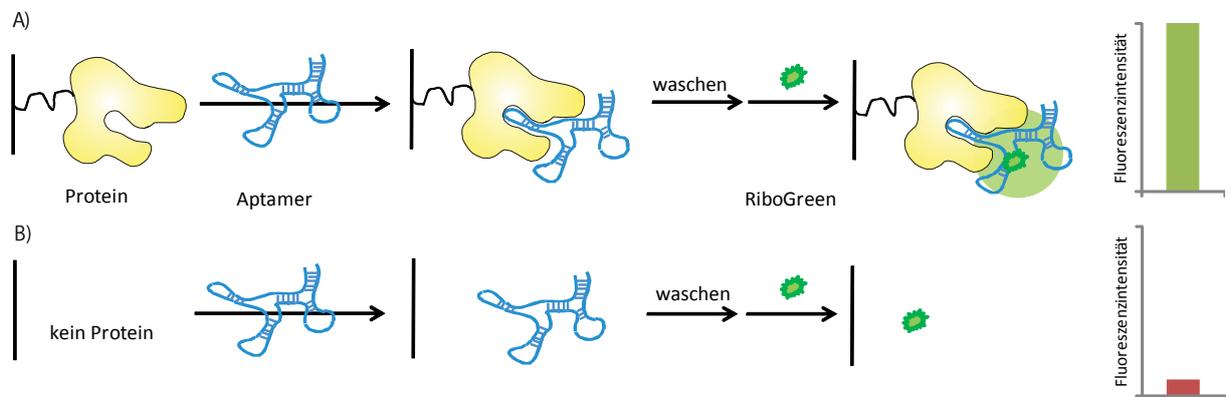


Abbildung 3.23 Schema der Kontrollversuche des Screenings: A) Negativkontrolle ohne Compound, keine Verdrängung des Aptamers → hohe Fluoreszenzintensität; B) Positivkontrolle ohne Compound und ohne Protein, kein Aptamer nach dem Waschen mehr vorhanden → geringe Fluoreszenzintensität.

Um Meßergebnisse als potentielle Inhibitoren (Hit) zu werten, wurde der Abstand zwischen den Durchschnittsergebnissen der Positiv- und Negativkontrolle berechnet. Alle Substanzen, die diesen Abstand um mehr als 50% reduzierten, wurden als Hit angesehen und weiter untersucht.

Abbildung 3.24 zeigt exemplarisch das Ergebnis der Fluoreszenzintensitätsmessung einer Screeningplatte.

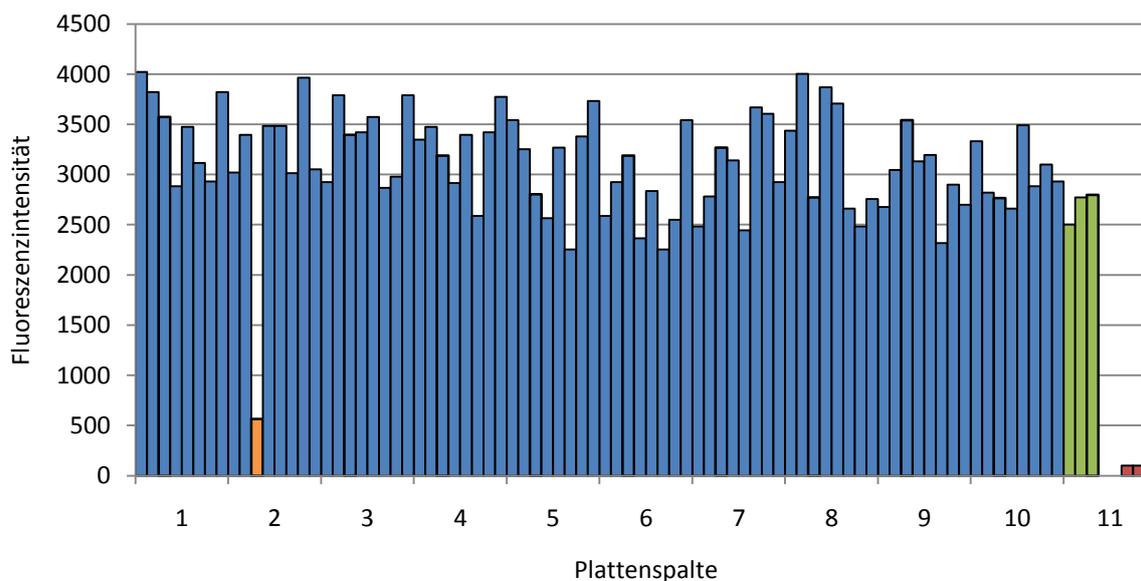


Abbildung 3.24 Fluoreszenzintensitätsbasiertes Screeningsystem: Dargestellt ist das Ergebnis der Screeningplatte Comgenex3-B19. Grün: Negativkontrollen. Rot: Positivkontrollen. Orange: aktive Compound (Hit), die die Fluoreszenzintensität verglichen mit den Kontrollen um mehr als 50% reduziert (82%).

Im Primärscreening der ca. 12.000 Substanzen konnten insgesamt 58 Hits identifiziert werden (~0,5%), die einem anschließenden Rescreening unterzogen wurden.

3.5.3 Rescreening der Primär-Hits

Zur Validierung der Ergebnisse des Primärscreenings wurde ein Rescreening durchgeführt. In einer ersten Messung wurden die Bedingungen des Primärscreenings beibehalten. Um weniger, dafür aber aktivere Hits zu erhalten, wurde in einer weiteren Rescreening-Messung die Konzentration der aktiven Substanzen auf 50 μM halbiert (siehe Abbildung 3.25).

Es konnten 11 Hits bestätigt werden, die bei 100 μM und auch noch bei 50 μM ausreichend aktiv waren (siehe Tabelle 3.2).

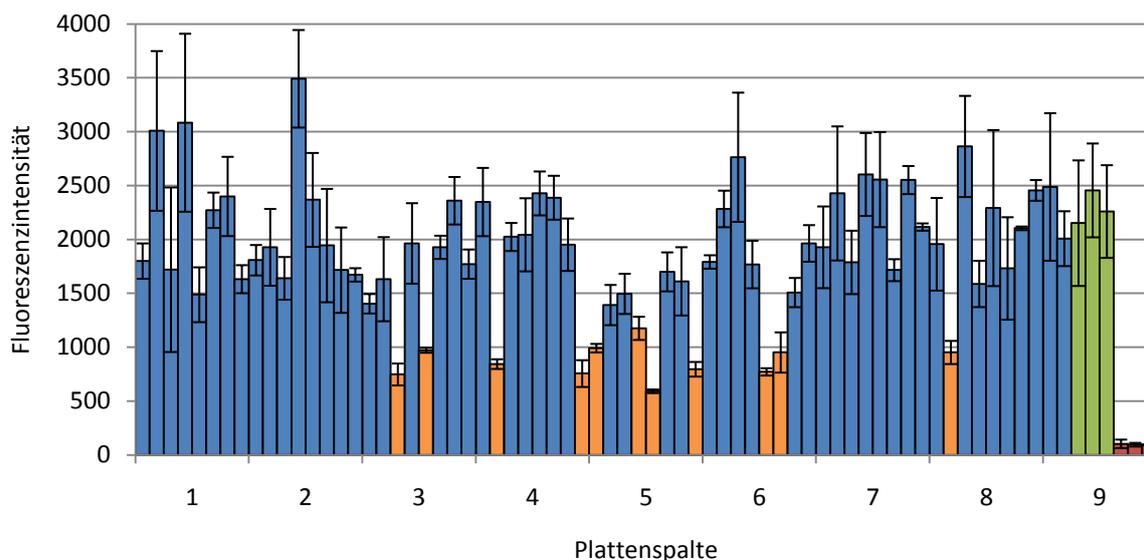


Abbildung 3.25 Fluoreszenzintensitätsmessung der Screening-Hits: Rescreening mit auf 50 μM halbierten Compound-Konzentrationen (n=2).

	Compound	Reduktion bei 100 μM (Screening+Rescreening)	Reduktion bei 50 μM (Rescreening)
1)	Tocris1400	78% \pm 15%	70% \pm 2%
2)	Fluka81	90% \pm 4%	59% \pm 10%
3)	Gü196	83% \pm 3%	65% \pm 6%
4)	Gü729	76% \pm 6%	70% \pm 1%
5)	Gü730	78% \pm 2%	58% \pm 8%
6)	Gü753	68% \pm 13%	50% \pm 6%
7)	SWK17	97% \pm 0,5%	77% \pm 5%
8)	SWK21	86% \pm 5%	68% \pm 4%
9)	Gü783	67% \pm 5%	69% \pm 6%
10)	AA-0411	83% \pm 17%	61% \pm 0,3%
11)	CGX-0142599	81% \pm 3%	61% \pm 4%

Tabelle 3.2: Aktivität der Hits aus Screening und Rescreening: Die Reduktion der Fluoreszenzintensität ist bei fast allen Substanzen konzentrationsabhängig und liegt sowohl bei 100 μM als auch 50 μM bei über 50% (Strukturformeln der Hits siehe Anhang Abbildung 9.1).

3.5.4 Hit Validierung durch kompetitive Filterbindungsexperimente

Die erste Charakterisierung der Hits erfolgte durch ein kompetitives Filterbindungsexperiment. Dazu wurde versucht, an Cytohesin-1 gebundenes, radioaktiv markiertes #6.10 durch Zugabe von Compound kompetitiv zu verdrängen. Für die Negativkontrolle wurde eine im Primärscreen negative Compound, SecinH3, aus der

Comgenex1-Bibliothek ausgewählt. Diese Compound konnte in einem früheren Screening als ein Inhibitor der Cytohesin Sec7-Domäne identifiziert werden^[43].

Radioaktiv markiertes #6.10 (520 nM) wurde zusammen mit Cytohesin-1 (800 nM) sowie zu testender Compound (0 bis 50 μ M) inkubiert und in einem Filterbindungsexperiment eingesetzt (siehe Protokoll 6.5.1). Ab einer Konzentration von 10 μ M ist bei einigen Compounds Konkurrenz festzustellen, einige zeigten aber, wie auch die Kontrolle SecinH3, keine Konkurrenz (siehe Abbildung 3.26). Da sich aus den Filterbindungsdaten keine verlässlichen K_i -Werte berechnen ließen, erfolgte eine qualitative Bewertung anhand eines Vergleichs der Konkurrenzkurven mit der Kurve von SecinH3 (siehe Tabelle 3.3).

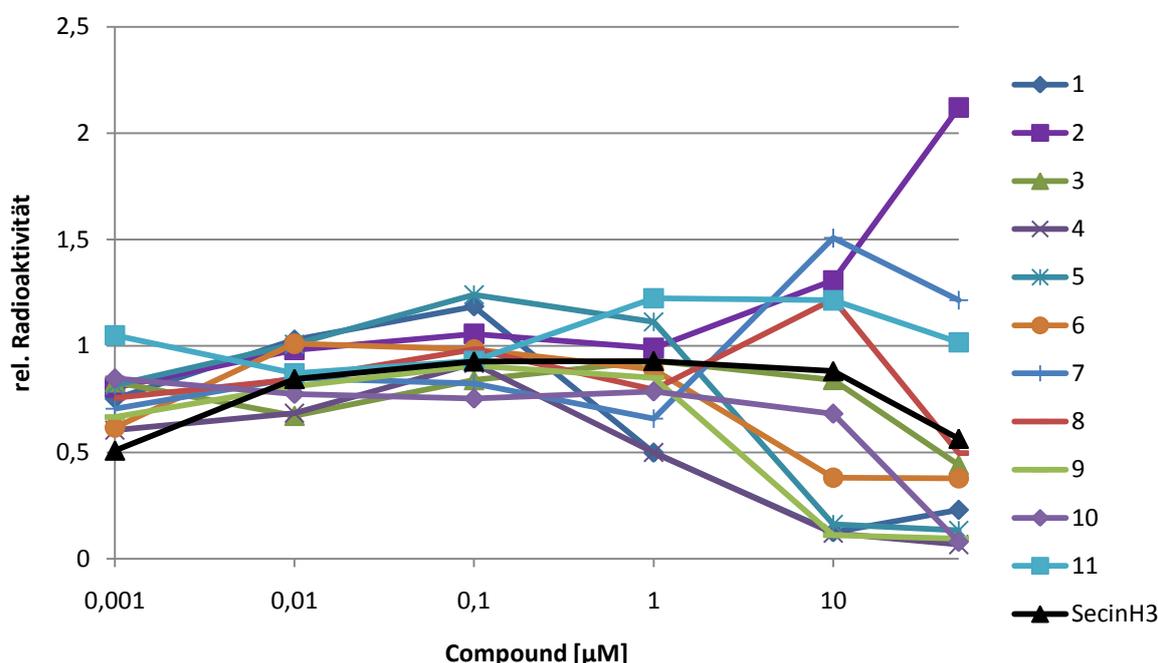


Abbildung 3.26 kompetitives Filterbindungsexperiment: Eingesetzt wurden 520 nM radioaktiv markiertes Aptamer #6.10, 800 nM Cytohesin-1 und Hit-Compounds (siehe Tabelle 3.2) in Konzentrationen von 0 bis 50 μ M. SecinH3 diente als Negativkontrolle. Die auf der Filtermembran zurückbleibende Radioaktivität wurde quantifiziert und normalisiert (rel. Radioaktivität von 1 bei Compoundkonzentration 0 μ M).

3.5.5 Hit Validierung und Charakterisierung durch Oberflächenplasmonresonanz Spektroskopie (SPR)

Durch Koinjektion von Cytohesin-1 (30 nM - 2400 nM) und Compound (1 μ M) wurde die Inhibition der Bindung von Cytohesin-1 an die PIP₃-haltigen Vesikel durch SPR gemessen (siehe Protokoll 6.5.5). Hierzu wurde die regenerationsfreie Methode gewählt und neben den 11 Hits aus dem Rescreening zusätzlich SecinH3 als Negativkontrolle vermessen (siehe Abbildung 3.8).

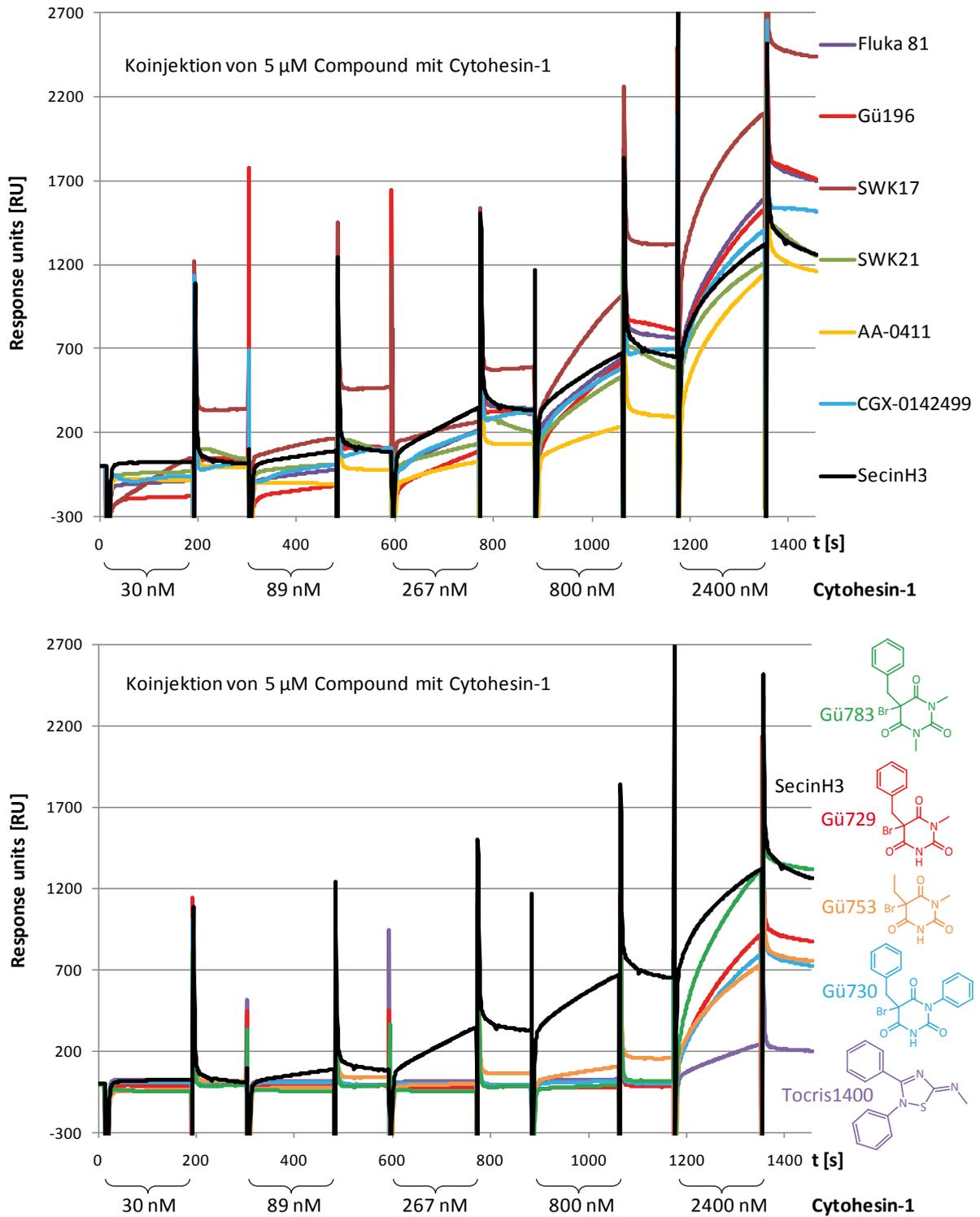


Abbildung 3.27 Oberflächenplasmonresonanz Sensogramm: Inhibition der Bindung von Cytohesin-1 an PIP₃ durch Koinjektion von 1 μ M Compound. Aufteilung der Inhibitionsmessungen nach Aktivität (oberer Teil: inaktive Substanzen; unterer Teil: aktive Substanzen). Kontrollmessung mit inaktivem SecinH3 (Strukturen aller Compounds siehe Anhang)

Ebenso wie aus den Filterbindungsexperimenten konnten aus den gemessenen SPR-Sensogrammen keine verlässlichen K_i -Werte berechnet werden. Auch hier erfolgte eine qualitative Bewertung durch einen Vergleich mit dem Sensogramm des SecinH3 (siehe Tabelle 3.3). Die qualitativen Bewertungen beider Experimente lieferten übereinstimmende Ergebnisse, fünf der elf Hits aus dem Rescreening konnten so eindeutig als Inhibitoren identifiziert werden (Tocris1400, Gü729, Gü730, Gü753 und Gü783).

Tocris1400 (auch als SCH-202676 bezeichnet) konnte bereits als Inhibitor für G-Protein gekoppelte Rezeptoren identifiziert werden, wo er durch Spaltung von Disulfid-Brücken die Proteinfunktion zerstört^[97, 98]. Da hierdurch möglicherweise ein falsch positives Screeningergebnis hervorgerufen wurde (vgl. Abbildung 3.16, Szenario 5), wurde Tocris1400 in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Die restlichen aktiven Compounds sind alle Derivate der Brombarbitursäure (5-Brompyrimidin-2,4,6-trione), die zur Untersuchung der Aminobarbitursäure-Hydantoin-Umlagerung im Arbeitskreis von Prof. Gütschow (Universität Bonn) synthetisiert wurden^[99].

	Compound	Kompetition (Filterbindung)	Inhibition (SPR)
1)	Tocris1400	+	+
2)	Fluka81	-	-
3)	Gü196	(+)	-
4)	Gü729	+	+
5)	Gü730	+	+
6)	Gü753	+	+
7)	SWK17	-	-
8)	SWK21	-	-
9)	Gü783	+	(+)
10)	AA-0411	-	+
11)	CGX-0142599	-	-

Tabelle 3.3 Inhibitionseigenschaften der Hits: Qualitative Auswertung der kompetitiven Verdrängung von radioaktiv markiertem #6.10 im Filterbindungsassay (Spalte 2) und der Inhibition von Cytohesin-1 Bindung an PIP₃-haltige Vesikel in SPR-Messungen (Spalte 3). + Kompetition/Inhibition, (+) schwache Kompetition/Inhibition, - keine Kompetition/Inhibition.

3.5.6 Struktur-Wirkungsbeziehungen (SAR)

Die Substanzbibliothek wurde auf weitere enthaltene Barbitursäurederivate durchsucht. Die hierbei gefundenen Compounds Gü726, Gü728, Gü731, Gü732, Gü734, Gü744, Gü755, Gü756, Gü757, Gü758 und Gü782 wurden in einem kompetitiven Filterbindungsexperiment (vgl. Kapitel 3.5.4) auf ihre kompetitive Eigenschaft hin untersucht. Zudem wurden drei neue

Barbitursäurederivate (Gü1554, Gü1555 und Gü1556) synthetisiert (S. Dosa, AK Gütschow) und ebenfalls im kompetitiven Filterbindungsexperiment eingesetzt. Bei den Compounds Gü1554, Gü1555 und Gü1556 handelt es sich um Analoga zu Gü730, Gü753 und Gü756 bei denen das Brom durch eine Hydroxygruppe ausgetauscht wurde (vgl. Tabelle 3.4).

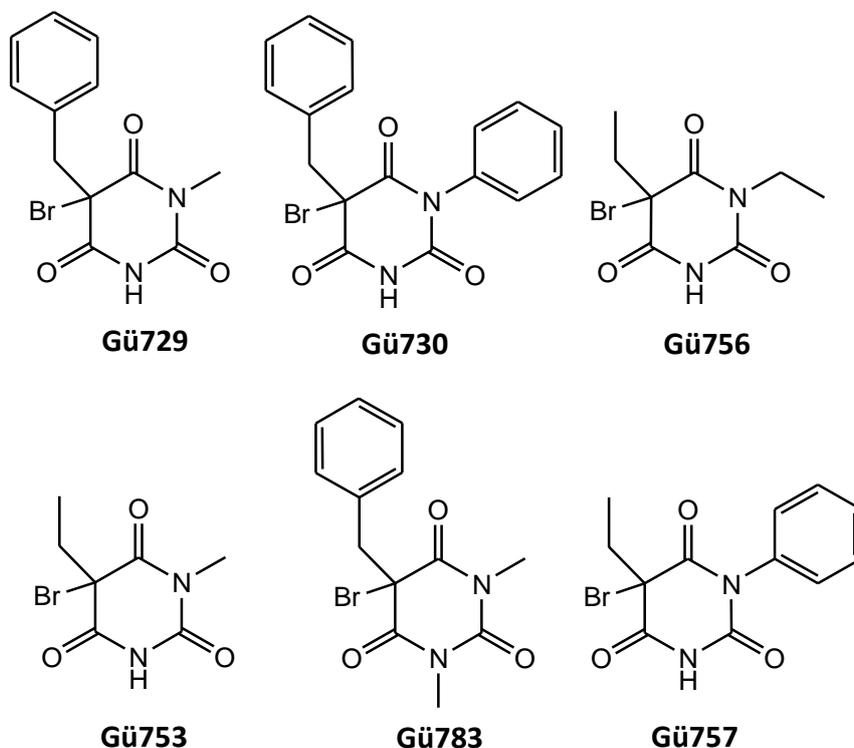


Abbildung 3.28 Strukturformeln der aktiven Compounds (5-Brom-pyrimidin-2,4,6-trione).

Alle so getesteten Substanzen, mit Ausnahme von Gü756 und Gü757, waren hierbei inaktiv. Die beiden aktiven Substanzen Gü756 und Gü757 waren bereits im Primärscreening unter den 58 Hits, wurden jedoch im Rescreening wegen ihrer nicht ausreichend hohen Aktivität bei 50 μ M aussortiert. Die Gruppe der aktiven Substanzen (Cyplecksins: Cytohesin Pleckstrin Homologe Domänen Inhibitor) umfaßte nun sechs Brombarbitursäuren: Gü729, Gü730, Gü753, Gü756, Gü757 sowie Gü783 (siehe Abbildung 3.28), die eine gemeinsame Leitstruktur aufwiesen (siehe Abbildung 3.29).

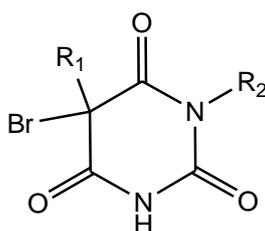


Abbildung 3.29 gemeinsame Leitstruktur der aktiven Compounds (Cyplecksins)

Im Zusammenhang mit den getesteten inaktiven Substanzen ergab sich daher das Bild, daß der Rest R_1 der Leitstruktur eine Benzyl- oder Ethylgruppe sein mußte, damit die Brombarbitursäure Konkurrenz im Filterbindungsexperiment aufwies (siehe Tabelle 3.4).

Aktiv (R_1/R_2)		Inaktiv (R_1/R_2)	
Benzyl/Methyl	Gü729	Phenyl/Ethyl	Gü732
Benzyl/Ethyl	Gü783	Phenyl/Propyl	Gü726
Benzyl/Phenyl	Gü730	Phenyl/Phenyl	Gü734
Ethyl/Methyl	Gü753	Methyl/Methyl	Gü744
Ethyl/Ethyl	Gü756	Methyl/Ethyl	Gü755
Ethyl/Phenyl	Gü757	Methyl/Phenyl	Gü758
		-H anstatt -Br:	
		Benzyl/Phenyl	Gü728
		Ethyl/Methyl	Gü731
		-OH anstatt -Br:	
		Benzyl/Phenyl	Gü1555
		Ethyl/Methyl	Gü1556
		Ethyl/Ethyl	Gü1554

Tabelle 3.4 Inhibitionseigenschaften verschiedener Barbitursäurederivate (Pyrimidin-2,4,6-trion Derivate)

Die Anforderungen an den Rest R_2 schienen weniger rigide zu sein, Methyl-, Ethyl- oder Phenylgruppe führten alle zur Konkurrenz. Entscheidend für die Aktivität der Cyphecksins war zudem die Anwesenheit des 5-Broms, ein Austausch des Broms durch Wasserstoff (-H) oder die Hydroxygruppe (-OH) führte zu einem Verlust der Konkurrenzseigenschaft (siehe Abbildung 3.30).

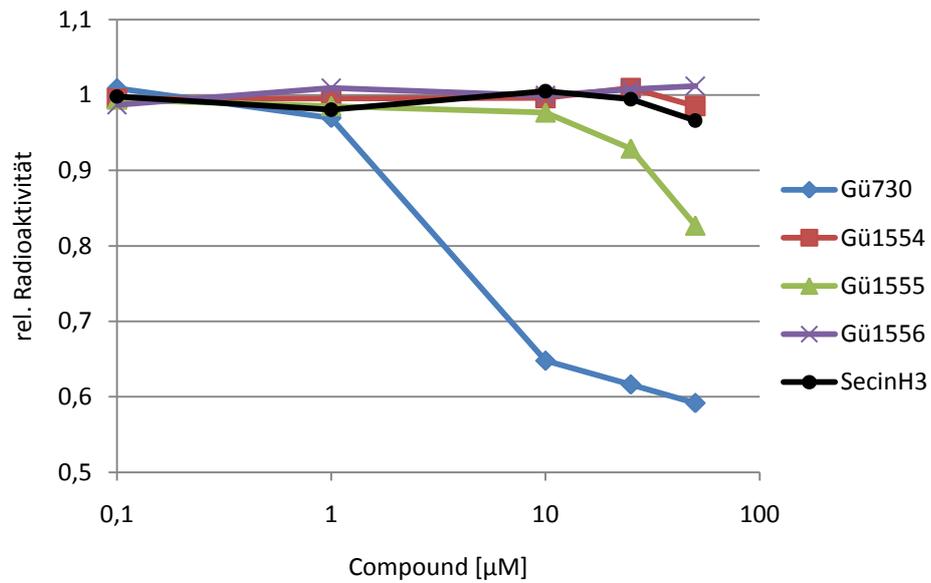


Abbildung 3.30 Austausch von Brom durch Hydroxygruppe führte im Filterbindungsexperiment zu Wettbewerbsverlust: Eingesetzt wurden 520 nM radioaktiv markiertes Aptamer #6.10, 800 nM Cytohesin-1 und Compounds in Konzentrationen von 0 bis 50 μM . Gü1554-1556 sind die Hydroxy-Derivate von Cyphecksins Gü756, Gü730 und Gü753. SecinH3 diente als Negativkontrolle. Die auf der Filtermembran zurückbleibende Radioaktivität wurde quantifiziert und normalisiert (rel. Radioaktivität von 1 bei Compoundkonzentration 0 μM).

4. Diskussion und Ausblick

Um die Rolle der PH-Domäne der Cytohesine sowohl bei der Regulation der integrinvermittelten Zelladhäsion in Immunzellen, als auch bei der Regulation des Insulinsignalwegs genauer aufzuklären, ist es hilfreich, über einen Inhibitor für die PH-Domäne zu verfügen.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe des #6.10 Aptamers eine Klasse von niedermolekularen Inhibitoren (Cyplecksins) für die PH-Domäne des Cytohesin-1 aus einer diversitätsorientierten Substanzbibliothek gefunden werden.

4.1 Eigenschaften des Aptamers #6.10

Erste Untersuchungen galten dem Aptamer #6.10. Dieses gegen Cytohesin-1 selektierte Aptamer konnte als Binder der Cytohesin PH-Domänen identifiziert werden ($K_{d(\text{Cytohesin-1})} = 692 \text{ nM}$; $K_{d(\text{Cytohesin-2})} = 352 \text{ nM}$; $K_{d(\text{Cytohesin-3})} = 409 \text{ nM}$). In SPR-Messungen konnte eine konzentrationsabhängige Inhibition der Bindung des Cytohesin-1 an PIP_3 -haltige Vesikel gezeigt werden. Es war in den Messungen nicht möglich einen Wert für K_i zu bestimmen, da üblicherweise nach jeder Messung eine Regeneration des Meßchips durchgeführt werden muß. Für diese konnten jedoch keine Bedingungen gefunden werden, die einerseits zu einer ausreichenden Regeneration führten, andererseits die Integrität der Vesikel gewährleisteten. Daher wurden Messungen ohne Regeneration zwischen den einzelnen Messungen durchgeführt. Für die Auswertung derartiger Meßreihen gibt es noch keinen Fit-Algorithmus, aus dem sich K_i -Werte berechnen lassen. Daher wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Kinomics versucht, einen geeigneten Algorithmus zu finden und anzuwenden. Hierzu wurden die gemessenen SPR-Sensogramme in Assoziations- und Dissoziationsphasen unterteilt und diese mit Hilfe des Programms MKS[®] (Multi-Schritt-Kinetik) gefittet^[100]. Die MKS-Software wurde so angepaßt, daß sie aus den gewonnenen kinetischen Daten einen K_i -Wert zu berechnen versuchte. Das zugrundeliegende kinetische Modell berechnet hierzu verschiedene Plots (z.B. Trutnau Plot^[100]) mit deren Hilfe u.a. auch die K_i -Werte validiert werden. Trotz mehrfacher Anpassung der SPR-Messungen konnten die Plots nicht korrekt berechnet und somit keine validen K_i -Werte bestimmt werden.

Damit das Aptamer an die PH-Domäne bindet, muß das im Aptamer normalerweise vorhandene 5'-Triphosphat enthalten sein. 5'-dephosphoryliertes oder 5'-biotingelabeltes #6.10

ist nicht mehr fähig die PH-Domäne zu binden. Möglicherweise bindet das Aptamer die PH-Domäne in einer Konformation, in der das 5'-Triphosphat eine Position ähnlich der Phosphoinositolgruppe des PIP₃ einnimmt^[101] und durch elektrostatische Wechselwirkungen mit der PH-Domäne erst zu einer Bindung führt.

4.2 Aptamerbasierte Hochdurchsatzscreenings

Bereits die Selektion von RNA-Aptameren kann als eine Art von Hochdurchsatzscreening angesehen werden. Aus einer hochdiversen Nukleinsäurebibliothek wird hierbei ein Molekül identifiziert, das mit hoher Affinität und Spezifität an ein Zielprotein bindet. Die eingesetzten Nukleinsäurebibliotheken weisen eine weit höhere Diversität auf (typischerweise 10¹⁴ bis 10¹⁵ verschiedene Sequenzen), als es Bibliotheken aus kleinen Molekülen könnten (wenige Hundert bis einige Millionen Substanzen). Durch Automatisierung des SELEX-Prozesses^[102, 103] können Aptamere daher relativ schnell für nahezu jedes beliebige Protein gewonnen werden, wobei allerdings das Zielprotein rekombinant exprimierbar sein muß.

Ein hochaffines und spezifisches Aptamer eignet sich wiederum als Hilfsmittel für ein Screening kleiner Moleküle. Hierbei wird versucht, ein Molekül zu finden, welches durch Konkurrenz das Aptamer vom Zielprotein verdrängt.

In der Regel weist das kleine Molekül, welches im Wettbewerbsassay an die Stelle des Aptamers tritt, ähnliche Eigenschaften wie das Aptamer auf. Da Aptamere ihr Zielprotein nicht nur binden, sondern meist auch inhibieren^[104], besteht auch bei den in Wettbewerbsassays als aktiv gefundenen kleinen Molekülen in der Regel eine hohe Korrelation zwischen Verdrängungs- und Inhibitionsfähigkeit. So erhält man meist nicht nur ein bindendes, sondern zugleich auch ein inhibierendes kleines Molekül.

Durch den Einsatz eines Aptamers können somit spezielle Eigenschaften eines zu findenden kleinen Moleküls, z.B. die Inhibition einer definierten Proteindomäne, vorab definiert werden. Die Wahrscheinlichkeit, einen spezifischen Inhibitor durch ein Screening zu identifizieren, wird dadurch erhöht.

Aptamerbasierte Hochdurchsatzscreenings haben bereits die Identifizierung mehrerer Inhibitoren für unterschiedliche Proteine ermöglicht. So konnten z.B. per Filterbindung Inhibitoren für PDGF-BB (*platelet-derived growth factor B-chain*) und WGA (*wheat germ agglutinin*)^[105], per Ribozym-FRET-Assay der HIV-Rev Inhibitor Coumermycin A₁^[92] und per Fluoreszenzpolarisation der Cytohesin-1 Sec7-Domänen Inhibitor SecinH3^[43] gefunden werden.

Die oben beschriebenen Eigenschaften des Aptamers #6.10 (Bindung und Inhibition) sollten in der vorliegenden Arbeit auf ein kleines Molekül übertragen werden. Hierzu wurde ein neues Screeningverfahren auf Basis von Fluoreszenzintensitätsmessung des Farbstoffs RiboGreen entwickelt und durchgeführt, da der Einsatz etablierter Screeningmethoden aus folgenden Gründen nicht möglich war.

Für das bereits etablierte Screening gegen Cytohesin-1^[43, 91], welches auf Fluoreszenz-polarisation basiert, bedarf es eines fluoreszenzgelabelten Aptamers. Da das Aptamer #6.10 jedoch 5'-phosphoryliert sein muß, um Cytohesin bindend zu sein, konnte die Standardmethode GMPS-Transkription mit anschließendem 5'-Labeling nicht zum Einsatz kommen. Auch die Alternative des 3'-Labelings erwies sich, aufgrund eines zu niedrigen Z'-Faktors bei Verwendung von 3'-gelabeltem Aptamer in einem Fluoreszenzpolarisations-assay, als nicht adäquat.

Daher sollte ein neuer Aptamer-Verdrängungsassay etabliert werden, in dem das Aptamer #6.10 ungelabelt eingesetzt wird. Hierfür bot sich der nukleinsäurespezifische Farbstoff RiboGreen an, mit dem bereits geringe Nukleinsäuremengen ab 1 ng/ml quantitativ bestimmt werden können. Zudem ist RiboGreen sowohl gegenüber Proteinen als auch gegenüber diversen anderen nicht-nukleinsäurehaltigen Verunreinigungen insensitive^[96].

Um mit Hilfe von RiboGreen Protein-Aptamer-Interaktionen zu messen, wurde das Protein zunächst nicht-kovalent auf Mikrotiterplatten gebunden. Durch das Coating von Proteinen können verschiedene Probleme auftreten. So ist durch Absorption eines Proteins auf einer Plastikoberfläche eine Veränderung der Proteinkonformation bis hin zu einer Denaturierung des Proteins möglich^[106-108]. Ferner kann durch die Interaktion des Proteins mit der Mikrotiterplatte die Bindestelle des Aptamers maskiert werden, so daß das Aptamer das gecoatete Protein möglicherweise nicht mehr binden kann. Für die Messung verschiedener Protein-Aptamer Interaktionen wurde dieses Verfahren dennoch mit Erfolg eingesetzt^[109-111].

Die Immobilisierung von Cytohesin-1 auf Mikrotiterplatten konnte hier erfolgreich durchgeführt werden, die spezifische Bindung des Aptamers #6.10 an Cytohesin-1 blieb erhalten und konnte durch RiboGreen detektiert werden (vgl. Abbildung 3.20).

Diese Messungen ließen sich auf ein halbautomatisiertes screeningkompatibles Verfahren mit einem ausreichend hohen Z'-Faktor von 0,69 übertragen. In einem auf dieser Methode basierenden Screening von ca. 12.000 Substanzen konnten erfolgreich Inhibitoren der Cytohesin-1 PH-Domäne (Cyplocksins) gefunden werden.

Inzwischen konnte von Mayer et al.^[93] gezeigt werden, daß sich ein auf RiboGreen basierendes Screening auch mit dem Aptamer M69 und der Sec7-Domäne von Cytohesin-1 durchführen läßt. Im Gegensatz zu einem auf Fluoreszenzpolarisation basierten Screening, bei dem durch die Zugabe der kleinen Moleküle eine Auslöschung (*quenching*) auftreten kann, die die Fluoreszenzmessung beeinträchtigt und unter Umständen unbrauchbar macht, ist das Screening mit RiboGreen robust und gut auf andere Zielsysteme übertragbar. Diese Methode liefert also eine weitere gute Alternative für ein Aptamerverdrängungsscreening.

4.3 Inhibitoren der Cytohesin-1 PH-Domäne (Cyplocksins)

Alle im Screening identifizierten Cyplocksins sind 5-Brom-pyrimidin-2,4,6-trione und gehören als Derivate der Barbitursäure zur chemischen Klasse der Barbiturate.

Barbiturate waren über Jahrzehnte die gängigsten Hypnotika (Schlafmittel). Ihre Wirkung beruht auf der Beeinflussung der GABA_A-Rezeptoren (GABA = γ -Aminobuttersäure, Neurotransmitter), an die sie allosterisch binden^[112, 113]. Aufgrund ihrer stark sedierenden, dosisabhängigen Wirkung, einer relativ langen Halbwertszeit sowie der Gefahr des Mißbrauchs wurde die allgemeine Zulassung der Barbiturate als Schlafmittel in den 1980er Jahren in Deutschland widerrufen. An ihrer Stelle werden heute meist Benzodiazepine eingesetzt. Die Verwendung von Barbituraten erfolgt heute nur noch unter ärztlicher Aufsicht als Narkotikum und als Antikonvulsivum zur Akutbehandlung epileptischer Anfälle (Status epilepticus)^[114]. Bei einem möglichen Einsatz der Cyplocksins *in vivo* sollte daher bedacht werden, daß es zu einer Beeinflussung der GABA-Rezeptoren mit einer entsprechenden, sedierenden Wirkung kommen könnte.

Die hier vorliegenden Cyplocksins wurden alle als Zwischenprodukt für die Synthese neuer 5,5-disubstituierter Hydantoinderivate mittels Aminobarbitursäure-Hydantoin-Umlagerung^[99, 115] hergestellt. 5-substituierte Hydantoine selbst sind wiederum eine Klasse pharmakologisch interessanter Substanzen, die als Antikonvulsiva und Antiarrhythmika eingesetzt werden^[116].

Die Cyplocksins enthalten ein reaktives 5-Brom, welches durch ein Nukleophil substituiert werden kann. Untersucht man in wässriger Lösung Zerfallsprodukte der Cyplocksins, so finden sich hauptsächlich die 5-OH Derivate, die nicht mehr in der Lage sind das Aptamer #6.10 von der PH-Domäne des Cytohesins zu verdrängen (vgl. Abbildung 3.30).

Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, daß bei der Bindung der Cyplocksins an die PH-Domäne, diese möglicherweise selbst als Nukleophil agiert und so kovalent an die

Cyclecksins gebunden wird. Damit würde es sich bei den Cyclecksins – anders als z.B. bei SecinH3 – um kovalente Inhibitoren handeln.

Sowohl zur Überprüfung dieser Hypothese, als auch zur Bestimmung möglicher K_d -Werte sollen zukünftig biotinylierte Derivate der Cyclecksins als Untersuchungswerkzeuge eingesetzt werden.

Exemplarisch könnte dazu die aktive Compound Gü730 ausgewählt werden. Die para-Position des Phenylrests an der 1-Position des Gü730 erscheint als eine geeignete Stelle zur Anbringung eines biotinylierten Tetraethylglycollinkers (siehe Abbildung 4.1), da dieser Rest (vgl. Abbildung 3.29, R_2) eine gewisse Variabilität zuläßt. So zeigen neben den Compounds mit Phenylrest (Gü730, Gü757) auch solche mit Methylrest (Gü729, Gü783) und Ethylrest (Gü756) eine vergleichbare inhibitorische Aktivität. Es ist daher zu erwarten, daß der so biotinylierte Inhibitor nach wie vor eine inhibitorische Aktivität aufweist.

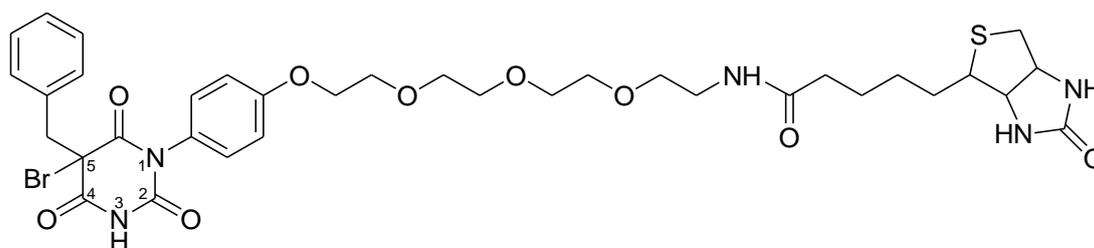


Abbildung 4.1 biotinylierter Inhibitor Gü730: Biotin ist über einen Tetraethylglycollinker an die para-Position des Phenylrings an 1-Position des Inhibitors Gü730 gebunden.

Die biotinylierte Compound kann über das Biotin auf einem Streptavidin-Chip (SA-Chip) immobilisiert werden, um dann mittels SPR-Messungen K_d -Werte für die Bindung an die Cytohesin PH-Domänen zu erhalten. Dies wäre eine Alternative zur Bestimmung der K_d -Werte über isotherme Titrationskalorimetrie (ITC), die hier keine auswertbaren Ergebnisse lieferte. Unter allen getesteten Versuchsbedingungen präzipitierten die Cytohesine bzw. die Cytohesin PH-Domäne während der ITC-Messungen. Die durch die Präzipitation freigesetzte Wärme überlagerte die zu messende Bindungswärme so stark, daß sich keine verwertbaren K_d -Werte berechnen ließen.

In einem weiteren Schritt wäre die Untersuchung der Spezifität der Inhibition, vor allem im zellulären Kontext, wichtig, da in Zellen etliche Proteine vorkommen und mehr als 100 dieser Proteine wiederum über PH-Domänen verfügen, mit denen die Cyclecksins möglicherweise ebenfalls interagieren. Zur Spezifitätsbestimmung bedarf es nicht notwendigerweise der rekombinanten Expression aller zu testenden Proteine. Vielmehr könnten die biotinylierten Cyclecksins – insofern es sich herausstellen sollte, daß sie kovalente Inhibitoren sind – als

ABPP-Sonden (*activity-based protein profiling*) eingesetzt werden^[117]. Beim ABPP werden aus einer Zelle bzw. ihrem Lysat alle an die ABPP-Sonde kovalent bindenden Proteine durch Einsatz von Streptavidin-Beads isoliert und nach einem anschließenden Trypsinverdau durch massenspektrometrische Methoden wie LC/MS (*liquid chromatography / mass spectrometry*) identifiziert (siehe Abbildung 4.2.a). So könnte die Spezifität der Cyplecksins auch gegen vorher nicht in Betracht gezogene Proteine getestet und möglicherweise ganz neue Interaktionen entdeckt werden.

Einen analogen Ansatz wählten Gubbens et al.^[118] zur Identifizierung von Proteinen, die mit Phospholipiden in Membranen interagieren. Hierbei wurden als Sonden mit Photocrosslinkern gelabelte Phospholipidanaloga verwendet, das Label zur Aufreinigung bzw. Detektion (Biotin oder Rhodamin) jedoch erst nach dem Crosslinking der Proteine an die ABPP-Sonde per Click-Chemie^[119] angebracht^[120].

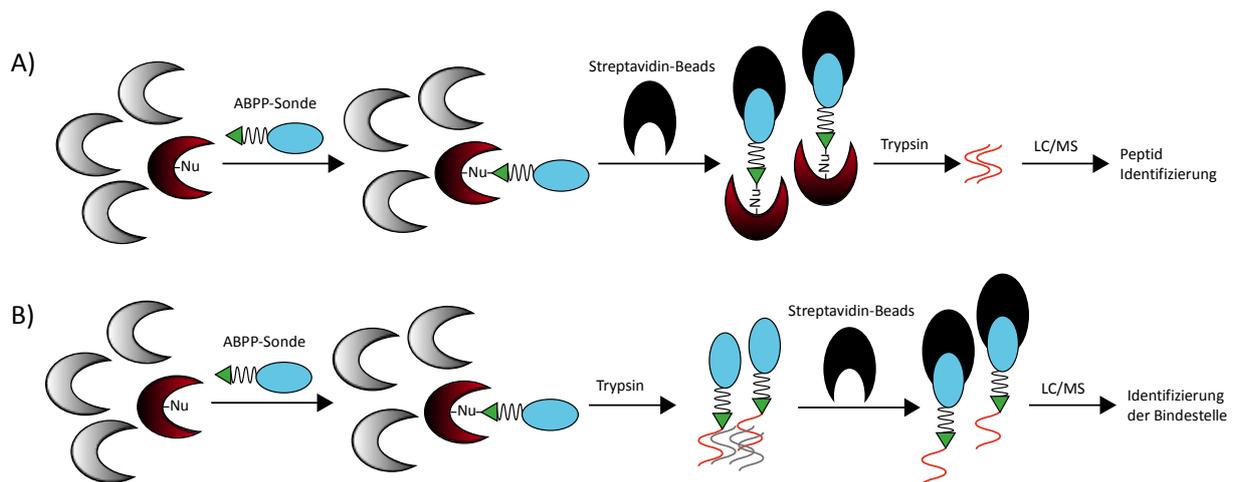


Abbildung 4.2 Schema des ABPP (*activity-based protein profiling*): **A)** ABPP-Sonde bindende Proteine werden durch Interaktion des Biotins der ABPP-Sonde mit zugegebenen Streptavidin-Beads angereichert. Anschließend wird ein Trypsinverdau auf den Beads durchgeführt und die so erhaltenen tryptischen Peptide durch multidimensionale LC-MS/MS (MudPIT: *multidimensional-protein identification technology*) analysiert^[121]. **B)** Wird eine Mischung von ABPP-Sonde mit Proteinen zuerst tryptisch verdaut und bindende Peptide erst anschließend durch Streptavidin-Beads angereichert, so können die Peptide nach Elution mit organischen Lösungsmitteln durch LC-MS/MS analysiert werden, um die genaue Bindestelle zu ermitteln^[122, 123].

Ferner kann auch die Bindestelle der Proteine an die Sonde durch ABPP identifiziert werden (siehe Abbildung 4.2.b). Hierzu wird nach dem Crosslinking der Proteine zuerst ein Trypsinverdau und erst anschließend eine Affinitätsaufreinigung mit Streptavidin-Beads durchgeführt. Dadurch erhält man nur noch jene Peptidfragmente bindender Proteine, die an der Bindung beteiligt waren und daher mit der Sonde gecrosslinked werden konnten.

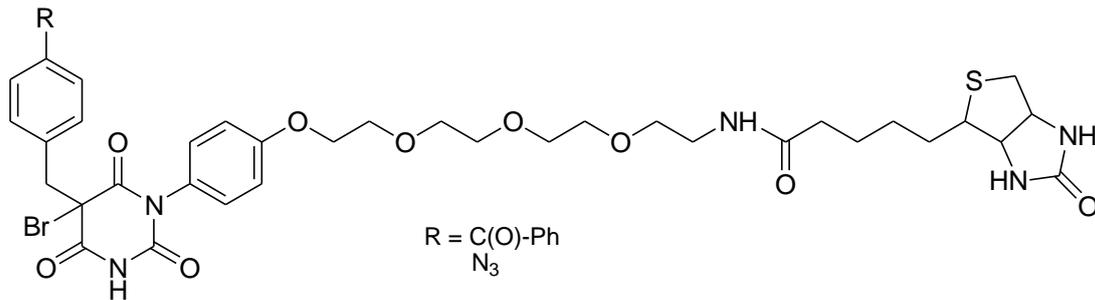


Abbildung 4.3 mögliche Struktur einer ABPP-Sonde: Biotin ist über einen Tetraethylglycollinker in para-Position des Phenylrings an 1-Position des aktivsten Inhibitors Gü730 gebunden. An der 5-Position ist zudem in para-Position des Benzylrestes eine Photocrosslinker-Gruppe angebracht (z.B. Arylazid oder Benzophenon).

Falls sich herausstellt, daß die Cyplecksins wider Erwarten nicht-kovalente Inhibitoren sein sollten, könnte durch Verwendung einer Photocrosslinkergruppe (z.B. Arylazid oder Benzophenon^[124]) dennoch eine kovalente Bindung des Inhibitors an die PH-Domäne erreicht werden. Die Photocrosslinkergruppe könnte, wie Abbildung 4.3 zeigt, am Rest der 5-Position des Inhibitors angebracht werden, so daß der so modifizierte Inhibitor als ABPP-Sonde einsetzbar wäre.

Die Cyplecksins weisen an der 5-Position des Barbitursäurerings ein Chiralitätszentrum auf, es gibt also von jedem Cyplecksin zwei Enantiomere. Da die durchgeführte Synthese (im Speziellen die Bromierung) der Cyplecksins stereounspezifisch war, wurde in allen Versuchen ein Racemat des jeweiligen Cyplecksins eingesetzt. Um die Aktivität der reinen Enantiomere zu bestimmen, wäre eine neue stereoselektive Synthese bzw. eine Racemattrennung notwendig. Sollte sich dann zeigen, daß die Inhibition durch die Cyplecksins stereospezifisch nur durch ein Enantiomer erfolgt, hätte das aktive Enantiomer eine doppelt so hohe Aktivität, wie bislang von den Cyplecksins angenommen.

Zur Struktur der Cyplecksins läßt sich zusammenfassend feststellen, daß neben dem Barbitursäurering vor allem das Brom sowie die α -CH₂-Gruppe an 5-Position für eine inhibitorische Aktivität essentiell sind, während der Rest R₂ an 1-Position eine gewisse strukturelle Flexibilität erlaubt.

4.4 Einsatzmöglichkeiten der neuen Inhibitoren

Neben der oben beschriebenen Überlegung, spezielle Derivate der Cyplecksins als ABPP-Sonden einzusetzen, sind noch weitere Einsatzmöglichkeiten der neuen Inhibitoren denkbar. Die Cyplecksins könnten genutzt werden, um die Auswirkung der Membranrekrutierung von Cytohesinen auf cytohesinabhängige zelluläre Prozesse näher zu untersuchen.

Zwischen PI3K, PIP₃ und Cytohesin besteht eine wechselseitige Abhängigkeit; so aktiviert die PI3K die integrinvermittelte Zelladhäsion und die Membranrekrutierung der Cytohesine^[125]. Zudem verstärkt PIP₃, das Hauptprodukt der PI3K, den GDP-GTP Austausch an Arf1 durch Cytohesin-1^[126]. Eine Inhibition der PI3K durch Wortmannin^[127] führt zu einem Knockdown der PIP₃-Synthese, im Folgenden findet dadurch keine Rekrutierung von Cytohesin-1 PH-Domäne an die Plasmamembran mehr statt^[128]. Darüber hinaus wirkt Cytohesin im Zusammenspiel mit IR, IRS und Arf möglicherweise als ein vorgeschalteter Regulator der PI3K-abhängigen Insulinsignaltransduktion^[43, 72].

Für die Untersuchung von Prozessen in Signalwegen die der PI3K nachgeordnet sind, wurde bislang Wortmannin eingesetzt, um PI3K zu inhibieren^[127, 128]. Dadurch konnten der PI3K zudem verschiedene zelluläre Funktionen zugeordnet werden. So hat PI3K Einfluß auf mitogenes Signaling, Inhibition von Apoptose, intrazellulären Vesikeltransport/Sekretion sowie Regulation der Actin- und Integrinfunktionen^[20]. Da durch diese Inhibition ein Knockdown des PI3K Produkts PIP₃ erfolgt, werden zeitgleich etliche Systeme mit PIP₃-bindenden Proteinen (PH-Domänen) beeinflusst. Daher ist es mit Wortmannin nicht möglich, einzelne nachfolgende Schritte im Signalweg selektiv zu untersuchen. Um einen der nachfolgenden Schritte, nämlich die durch PIP₃-Generierung induzierte Rekrutierung von Cytohesinen an die Membran und ihre Bedeutung für den Signalstoffwechsel selektiv zu untersuchen, stehen nun mit den Cyplecksins neue Inhibitoren als Untersuchungswerkzeuge zur Verfügung.

Im Gegensatz zu Wortmannin bieten sie die Möglichkeit, spezifisch die PIP₃-Cytohesin-Interaktion zu inhibieren und gleichzeitig andere PIP₃-abhängige Prozesse unangetastet zu lassen, ähnlich, wie dies bereits mit Inhibitoren der PH-Domäne der Proteinkinase B/Akt möglich ist^[129, 130].

Mit den Cyplecksins läßt sich möglicherweise auch der Einfluß der PH-Domänen-abhängigen Membranrekrutierung auf die PI3K-abhängige Insulinsignaltransduktion untersuchen und so ein tieferer Einblick in die cytohesinabhängigen Prozesse am Insulinrezeptor gewinnen.

Wie bereits durch den Einsatz des Sec7-Domänen Inhibitors der Cytohesine (SecinH3) gezeigt wurde, führt eine Inhibierung der Cytohesine zu einer stark reduzierten Proliferation von EGFR-abhängigen humanen Krebszellen^[74]. Mittels Deletionsstudien konnte zudem gezeigt werden, daß neben dem Volllängeprotein auch die isolierte Sec7-Domäne von Cytohesin-2 die Autophosphorylierung von ErbB-Rezeptoren aktivieren kann. Diese

Aktivierung stellte sich unter Verwendung der austauschaktiven Cytohesin-2 Mutante (ARNO E156K) jedoch als von der GEF-Aktivität der Sec7-Domäne unabhängig dar. Die Sec7-Domäne beinhaltet daher neben der GEF-Aktivität zusätzlich eine ErbB-aktivierende Funktion.

Durch zusätzliche Inhibierung der PH-Domäne der Cytohesine durch Cyplocksins könnte die dadurch verminderte Membranrekrutierung von Cytohesin ebenfalls zu einem positiven Effekt bei der Bekämpfung von EGFR-abhängigen humanen Tumorzellen führen. Aufgrund der resultierenden veränderten Verteilung von Cytohesin in der Zelle könnte weniger Cytohesin mit den membranständigen Rezeptoren interagieren und somit ein ähnlicher Effekt wie mit SecinH3 zu erwarten sein. In Kombination mit SecinH3, möglicherweise als kombinierter bivalenter Inhibitor (siehe Abbildung 4.4), könnte die antitumorale Wirkung des SecinH3 verstärkt werden.

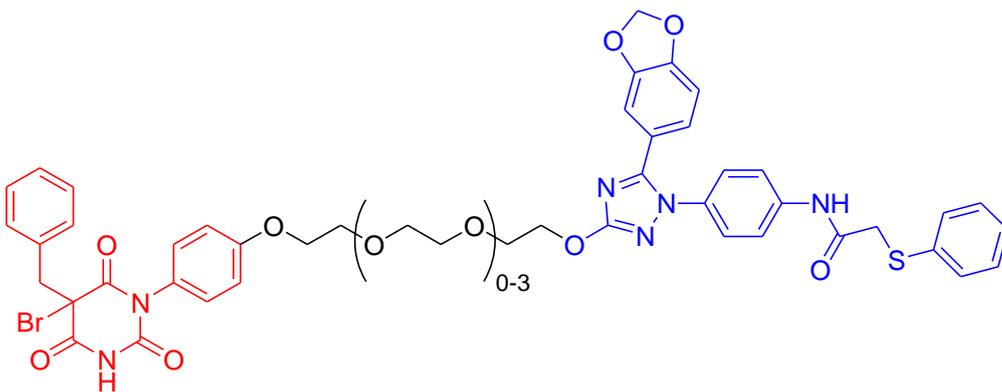


Abbildung 4.4 mögliche Struktur eines bivalenten Cyplocksin-SecinH3-Inhibitors: SecinH3 (blau) kann über einen Linker unterschiedlicher Länge an den aktivsten Inhibitor Gü730 (rot) gebunden werden. Durch Wahl der optimalen Länge könnte der Inhibitor die Sec7- und die PH-Domäne der Cytohesine gleichzeitig binden. Somit würde er, im Vergleich zu den monovalenten Inhibitoren SecinH3 und Gü730, eine höhere Bindungsaffinität zu den Cytohesinen und möglicherweise eine erhöhte inhibitorische Aktivität aufweisen.

Abschließend läßt sich festhalten, daß die Cyplocksins eine neue interessante Klasse von Inhibitoren darstellen, die – in Ergänzung zu SecinH3 – als weitere Untersuchungswerkzeuge bzw. pharmakologische Wirkstoffe für verschiedene cytohesinabhängige Signalprozesse fungieren können.



5. Zusammenfassung

Die Pleckstrin-homologe Domäne (PH-Domäne), die in vielen Proteinen zu finden ist, ist durch ihre Interaktion mit Phosphoinositiden (z.B. PIP₃) entscheidend an der Membranrekrutierung dieser Proteine beteiligt.

Die Regulation der Membranrekrutierung kann die Funktion der zu rekrutierenden Proteine beeinflussen. So können Signalproteine, die an die Membran rekrutiert werden, in der Regel erst dort mit Interaktionspartnern der Signaltransduktion in Wechselwirkung treten und damit ihre Funktion ausfüllen. Dies trifft auch auf die Proteinklasse der Cytohesine zu, die mit ihren verschiedenen direkten und indirekten Interaktionspartnern (IR, IRS, Integrin, Arf) erst nach Rekrutierung an die Membran interagiert.

Bislang konnte auf die Membranrekrutierung der Cytohesine nur indirekt, durch Einsatz des PI3K-Inhibitors Wortmannin, eingegriffen werden. Er inhibiert die Bildung von PIP₃, dem Hauptinteraktionspartner der PH-Domäne der Cytohesine. Da über PIP₃ jedoch auch verschiedene andere Signalwege vermittelt werden, wird für eine spezifische Regulation der Membranrekrutierung der Cytohesine ein spezifischer PH-Domänen Inhibitor benötigt.

In der vorliegenden Arbeit konnten aus einer Bibliothek von 12.000 Substanzen Inhibitoren der Cytohesin PH-Domäne (Cyplocksins) identifiziert werden. Hierzu wurde ein Aptamerverdrängungsscreening auf Basis der Fluoreszenzintensitätsmessung des Nukleinsäurefarbstoffs RiboGreen entwickelt.

Diese Methode ermöglicht, im Unterschied zu bereits bekannten Aptamerverdrängungsassays (z.B. auf Basis von Fluoreszenzpolarisation oder FRET), den direkten Einsatz eines *in vitro* transkribierten, ungelabelten RNA-Aptamers. Mit dieser Methode wird zudem das Repertoire an aptamerbasierten Hochdurchsatzscreenings erweitert.

Es konnte gezeigt werden, daß die identifizierten Cyplocksins in der Lage sind, *in vitro* die Bindung von Cytohesin an PIP₃-haltige Membranen zu inhibieren.

6. Methoden

6.1 Allgemeine Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren

6.1.1 Abtrennung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen

Die Abtrennung von Proteinen aus nukleinsäurehaltigen Lösungen erfolgte mittels Phenol-Chloroform-Extraktion. Hierzu wurde die Lösung mit einem Volumen equilibriertem Phenol versetzt, gevortext und zur schnelleren Phasentrennung für 3 min bei 21.000 rcf zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und zur Beseitigung von Phenolresten mit einem Volumen Chloroform versetzt. Es wurde erneut gevortext und zentrifugiert. Aus der oberen wässrigen Phase wurden die Nukleinsäuren präzipitiert (Protokoll 6.1.2).

6.1.2 Fällung von Nukleinsäuren

Die Präzipitation von Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaOAc-Lösung für DNA bzw. einem halben Volumen 6 M NH₄OAc-Lösung für RNA sowie drei Volumen Ethanol. Bei kleinen Nukleinsäuremengen wurde 1 µl Glykogen zugeben. Die Lösung wurde für 10 min auf -80°C (DNA) bzw. für 5 min auf Raumtemperatur (RNA) gestellt und bei 4°C und 21.000 rcf für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 21.000 rcf und Raumtemperatur wurde der Überstand abgenommen, das Pellet an der Luft 1 bis 2 min getrocknet und in einem geeigneten Volumen Wasser aufgenommen.

6.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration wässriger Nukleinsäurelösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Aus der gemessenen OD₂₆₀ konnte über das Lambert-Beer-Gesetz die Nukleinsäurekonzentration berechnet werden. Dabei wurde wie folgt kalkuliert: Ein OD₂₆₀-Wert von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA oder 33 µg/ml ssRNA bzw. ssDNA (mit einer Länge von über 40 Nukleotiden) oder 20 µg/ml Oligomer (mit einer Länge bis zu 40 Nukleotiden). Für die Berechnung der Molarität wurde eine durchschnittliche Masse von 330 g/mol pro Nukleotid angenommen.

6.1.4 Gelfiltration

Um nicht inkorporierte NTPs bzw. dNTPs und Salze aus nukleinsäurehaltigen Lösungen zu entfernen, wurden MicroSpin G-25 Säulen nach Anleitung des Herstellers verwendet.

6.1.5 5'-Dephosphorylierung von Nukleinsäuren mit alkalischer Phosphatase

Die 5'-Dephosphorylierung von Nukleinsäuren erfolgte durch fünfzehnminütige Inkubation von 150 pmol DNA/RNA mit 17 U alkalischer Phosphatase (CIAP), 1x BSA und 1x CIAP Puffer sowie bei RNA 20 U RNasin bei 37°C. Es wurden weitere 8,5 U CIAP hinzugegeben und 15 min bei 55°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 250 pmol EDTA und zehnmütiges Erhitzen auf 75°C gestoppt. Die dephosphorylierten Nukleinsäuren wurden durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt (Protokoll 6.1.1), mit Ethanol gefällt (Protokoll 6.1.2) und in 20 µl Wasser aufgenommen.

6.1.6 5'-Phosphorylierung von dephosphorylierten Nukleinsäuren

Zur radioaktiven Markierung wurden dephosphorylierte Nukleinsäuren (Protokoll 6.1.5) in Gegenwart von γ -[³²P]-ATP sowie T4-Polynukleotidkinase 45 min bei 37°C kinasiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 pmol EDTA gestoppt, mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt und gelfiltriert (Protokoll 6.1.4). Anschließend wurden die kinasierten Nukleinsäuren mit Ethanol gefällt (Protokoll 6.1.2) und in 20 µl Wasser resuspendiert.

20 µl-Ansatz:	x µl	RNA/DNA (10 pmol)
	2 µl	T4-PNK Puffer, 10x
	3 µl	γ - ³² P-ATP (10 µCi/µl)
	2 µl	T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl)
nur bei RNA:	0,3 µl	RNasin
	ad 20 µl	Wasser

6.1.7 DNA Amplifikation

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können einzel- und doppelsträngige DNA Sequenzen gezielt amplifiziert werden^[131]. Grundlage hierfür ist die zyklische Wiederholung von Denaturierung der DNA, Anlagerung sequenzspezifischer gegenläufiger Oligodesoxynukleotide (Primeranlagerung) und enzymatischer Kettenverlängerung des Gegenstranges durch eine thermostabile DNA-Polymerase.

PCR-Ansatz (100 µl):

- x µl DNA-Templat
- 1 µl 5'-Primer (100 µM)
- 1 µl 3'-Primer (100 µM)
- 10 µl 10x Taq Polymerase Puffer (Promega)
- 12 µl MgCl₂ (25 mM)
- 0,8 µl dNTP-Mix (25 mM pro dNTP)
- 0,5 µl Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)
- ad 100 µl H₂O

Ein Ansatz ohne DNA-Templat diene der Kontrolle auf Kontamination mit Fremd-DNA.

Ein Amplifikationszyklus umfaßt folgende Schritte:

1. Denaturierung: 60 s bei 94°C
2. Primeranlagerung: 60 s bei 60°C
3. Polymerase-Kettenverlängerung: 90 s bei 72°C

Nach einigen Zyklen wurden Proben entnommen und auf einem 2,5%igen Agarosegel analysiert (Protokoll 6.2.1). Bei ausreichender Amplifikation wurde die Reaktion gestoppt. Der PCR-Ansatz wurde Phenol/Chloroform extrahiert (Protokoll 6.1.1) und in Ethanol gefällt (Protokoll 6.1.2).

6.1.8 *In vitro* Transkription

Die Synthese von RNA erfolgte durch *in vitro* Transkription eines DNA-Templats mit Hilfe der DNA-abhängigen RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7:

Transkriptionsansatz (100 µl):

- 10 µl DNA-Templat
- 10 µl NTP-Mix (25 mM pro NTP)
- 5 µl DTT (100 mM)
- 1 µl RNasin (40 U/µl)
- 2 µl T7 RNA-Polymerase (25 U/µl)
- 25 µl MgCl₂ (100 mM)
- 20 µl 5x Transkriptionspuffer (200 mM Tris/HCl, pH 7,9)
- 27 µl H₂O

Für radioaktive Transkriptionen (*body labeling*) wurde dem obigen Ansatz 3 µl [α -³²P]-GTP (10 mCi/ml) zugesetzt.

Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde das DNA-Templat durch Zugabe von 1 µl DNase I (Konzentration 10 U/µl) für 10 min bei 37°C verdaut. Nach Zugabe von 50 µl Wasser und 50 µl EDTA-Stammlösung (0,5 M) wurde die RNA gefällt (Protokoll 6.1.2) und mittels denaturierender PAGE (Protokoll 6.2.2) gereinigt.

6.1.9 GMPS-Transkription

5'-GMPS modifizierte RNA, die für 5'-Biotinylierung eingesetzt wurde, wurde per *in vitro* GMPS-Transkription des dsDNA Templats durch T7 RNA-Polymerase synthetisiert:

GMPS-Transkriptionsansatz (100 µl):

- 6,4 µl GMPS (150 mM)
- 10 µl DNA-Templat (Produkt einer 100 µl PCR)
- 10 µl NTP-Mix (25 mM pro NTP)
- 10 µl DTT (100 mM)
- 1 µl RNasin (40 U/µl)
- 10 µl T7 RNA-Polymerase (~50 U/µl)
- 25 µl MgCl₂ (100 mM)
- 20 µl 5x Transkriptionspuffer (200 mM Tris/HCl, pH 7,9)
- 7,6 µl H₂O

Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde das DNA-Templat durch Zugabe von 0,25 µl DNase I (Konzentration 10 U/µl) für 10 min bei 37°C verdaut. Anschließend wurde die RNA gefällt (Protokoll 6.1.2) und mittels zweifacher Gelfiltration (Protokoll 6.1.4) gereinigt.

6.1.10 5'-Biotinylierung von RNA

Nach GMPS-Transkription und Abtrennung von überschüssigem, freiem GMPS wurde die RNA in folgendem Mix für 3 Minuten bei 80°C denaturiert:

Denaturierungsmix (360 µl):

- 116 µl GMPS-Transkription (gelfiltrierte RNA)
- 100 µl Harnstoff (8,3 M)
- 1 µl RNasin (40 U/µl)
- 40 µl 10x TE-Puffer (500 mM Tris/HCl, pH 7,9, 300 mM EDTA)
- 100 µl H₂O

Nach weiteren 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden 40 µl EZ-Link Iodoacetyl-PEO₂ Biotin (ein Krümel, gelöst in DMF) hinzupipettiert und 2 Stunden bei 40°C inkubiert (im Dunkeln schüttelnd bei 300 rpm). Anschließend wurde die RNA gefällt (Protokoll 6.1.2) und mittels denaturierender PAGE gereinigt (Protokoll 6.2.2).

6.1.11 3'-Fluoresceinmarkierung von RNA

1,5 nmol *in vitro* transkribierte RNA (in 20 µl Wasser) wurden in eine Dreischrittreaktion nach Wu et al.^[95] eingesetzt (siehe Abbildung 3.12). Im ersten Schritt wurde die Ribose am 3'-Ende der RNA durch Natriumperiodat (NaIO₄) selektiv oxidiert. Hierzu wurde die RNA zu 20 µl einer wässrigen Natriumperiodatlösung (600 mM NaOAc, pH 5,4; 20 mM NaIO₄) pipettiert und zwei Stunden bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die RNA gefällt (Protokoll 6.1.2) und in 70 µl Wasser aufgenommen.

Der zweite Schritt, die Kondensationsreaktion, wurde durch Zugabe von Fluorescein-5'-thiosemicarbazid (0,26 mg in 20 µl DMF) und 10 µl 3 M NaOAc (pH 5,4) gestartet und für zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln durchgeführt (Gesamtvolumen 100 µl).

Anschließend wurde die RNA durch Zugabe von Natriumcyanoborhydrid (213 µg in 10 µl Acetonitril) für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln reduziert.

Die fluoresceinmarkierte RNA wurde gefällt (Protokoll 6.1.2) und im Dunkeln durch denaturierende PAGE aufgereinigt (Protokoll 6.2.2).

6.1.12 Reverse Transkription und Amplifikation von cDNA (RT-PCR)

Um nach Selektion die RNA-Bibliothek erneut amplifizieren zu können, wurden die RNA-Template mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. In einer Eintopfreaktion wurde die cDNA durch PCR amplifiziert (RT-PCR).

RT-PCR Ansatz (100 µl):

- x µl RNA-Templat (0,5 pmol)
- 3 µl dNTP-Mix (25 mM pro dNTP)
- 4 µl 5x First Strand Puffer (Invitrogen)
- 10 µl 10x Taq DNA-Polymerase Puffer (Promega)
- 6 µl MgCl₂ (25 mM)
- 2 µl DTT (100 mM)
- 2 µl 5'-Primer (100 mM)
- 2 µl 3'-Primer (100 mM)
- 1 µl Superscript II (200 U/µl)
- 1 µl Taq DNA-Polymerase (5U/µl)
- ad 100 µl H₂O

Vor der Zugabe von Superscript II und Taq DNA-Polymerase wurde der Ansatz für 10 Minuten auf 65°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Die Transkription erfolgte für 10 Minuten bei 54°C. Durch fünfzehnminütiges Inkubieren auf 70°C wurde die reverse Transkriptase inaktiviert. Die anschließenden Amplifikations-Zyklen erfolgten in folgenden Schritten:

1. Denaturierung: 60 s bei 94°C
2. Primeranlagerung: 60 s bei 60°C
3. Elongation: 90 s bei 72°C

Nach 8 Zyklen wurde die Reaktion gestoppt, mittels Agarose-Gelelektrophorese (Protokoll 6.2.1) analysiert, die erhaltene DNA aufgereinigt (Protokoll 6.1.1) und gefällt (Protokoll 6.1.2).

6.2 Gelelektrophoresen und Elution aus Gelen

6.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Für die analytische Auftrennung von DNA wurden je nach Länge der zu trennenden Fragmente 0,5-2,5%ige (w/v in 1x TBE Puffer) Agarosegele verwendet. Hierzu löste man eingewogene Agarose durch vorsichtiges Erhitzen im Mikrowellenofen in 1x TBE Puffer. Nach Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration: 1 µg/ml) wurden die Agaroselösungen in vorbereitete horizontale Gelschiffchen gegossen. Zur besseren Auftragung wurden die DNA-Proben mit Agarosegel-Beladungspuffer versetzt und zusammen mit einem geeigneten Längenstandard auf das Gel geladen. Bei einer Spannung von 197 V wurden die DNA-Fragmente aufgetrennt. Die Dokumentation der Gele erfolgte durch Anregung bei 366 nm im UV-Transilluminator und Photographie.

6.2.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die präparative Aufreinigung der RNA- sowie DNA-Bibliotheken erfolgte mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Hierzu wurden je nach Länge der aufzutrennenden Moleküle 1,5 mm dicke, 8%ige Gele der Trennlänge 15-30 cm verwendet.

Als Laufpuffer dient 1x TBE. Nach einem fünfzehnminütigem Vorlauf bei 370 V wurden die Taschen mit Laufpuffer gespült. Die Proben wurden mit mindestens einem halben Volumen Auftragspuffer versetzt und für eine Minute bei 95°C denaturiert. Als Marker wurden Bromphenolblau und Xylencyanol verwendet, die bei einer definierten Gelkonzentration ein konstantes Laufverhalten zeigen. Die Elektrophorese erfolgte bei 370 V. Die Nukleotide wurden durch Fluoreszenzlöschung im UV-Licht bei 254 nm nachgewiesen. Bei radioaktiven Proben wurde bei -20°C ein Phosphorimagerscreen aufgelegt und exponiert, der anschließend am Phosphorimager ausgelesen und dokumentiert wurde.

Zusammensetzung 8%iges denaturierendes PAGE-Gel (50 ml):

- 16 ml Bisacrylamid/Acrylamid (25%) in 8,3 M Harnstoff
- 29 ml 8,3 M Harnstoff
- 5 ml 8,3 M Harnstoff in 10x TBE
- 400 μ l APS, 10%
- 20 μ l TEMED

6.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die analytische Trennung von Proteinen erfolgte in denaturierenden SDS-PAGE-Gelen.

Diese setzten sich auch einem Sammel- und einem Trenngel zusammen. Das Sammelgeldiente zur Fokussierung der aufgetragenen Proteine, das Trenngel zur Separierung der Proteine nach ihrem spezifischen Molekulargewicht.

Zunächst wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation (30 min) wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen.

Die Proteinproben wurden direkt vor dem Auftragen mit SDS-Ladepuffer versetzt und für eine Minute bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte bei 175 V in Glycin-SDS-Elektrophoresepuffer.

SDS-Ladepuffer:

- 4,3 ml Wasser
- 0,5 ml 1 M Tris/HCl, pH 6,8
- 0,8 ml Glycerol
- 1,6 ml SDS, 10%
- 0,4 ml 2-Mercaptoethanol
- 0,4 ml Bromphenolblau, 0,05%

Trenngel (12%):

1700 µl	Wasser
1250 µl	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
2000 µl	Bis-Acrylamid (30%)
50 µl	SDS, 10%
<hr/>	
25 µl	APS, 10%
2,5 µl	TEMED

Sammelgel (4%):

1220 µl	Wasser
500 µl	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
270 µl	Bis-Acrylamid (30%)
10 µl	SDS, 10%
<hr/>	
10 µl	APS, 10%
2,5 µl	TEMED

10x Glycin-SDS-Elektrophoresepuffer:

2 M	Glycin
250 mM	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
1%	SDS

pH-Wert von 8,9 mit NaOH/HCl einstellen

ad 1000 ml Wasser

6.2.4 Isolierung von Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen

Zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen wurden nach Visualisierung die entsprechenden Banden ausgeschnitten, in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und zerkleinert. Die passive Elution erfolgte nach Zugabe von 0,3 M Natriumacetat-Lösung im Thermomixer bei 65°C für 1,5 Stunden (alternativ bei Raumtemperatur über Nacht). Die Gelstücke wurden mittels Filtration mit silanisierter Glaswatte abgetrennt und die Nukleinsäuren gefällt (Protokoll 6.1.2).

6.3 Methoden zur Bakterienkultivierung

6.3.1 Abschätzung der Bakterienkonzentration in Flüssigkulturen

Über die Messung der Absorption läßt sich die Bakterienkonzentration von Flüssigkulturen abschätzen, deren Dichte größer als 10^6 Zellen/ml ist. Die mathematische Beschreibung der optischen Absorption erfolgt durch das Lambert-Beersche Gesetz:

$$\lg \frac{I_{A_{600}}}{I} = A_{600} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

I_A = Intensität der einfallenden Strahlung

I = Intensität der gemessenen Strahlung

A_{600} = Absorption bei 600 nm

ε = molarer Absorptionskoeffizient

c = Konzentration

d = Länge der Meßstrecke

Für *E. coli* gilt näherungsweise: $1 A_{600} \approx 8 \cdot 10^8$ Zellen/ml.

6.3.2 Klonierung von PCR-Produkten

Die Klonierung von PCR-Produkten wurde mit dem pGem[®]-T Vektor-System nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden die PCR-Produkte ohne Aufreinigung eingesetzt.

6.3.3 Transformation kompetenter Zellen und Selektion rekombinanter Klone

Zu 10 µl Ligationsansatz (siehe Protokoll 6.3.2) wurden 100 µl frisch aufgetaute kompetente Zellen gegeben und 20 min auf Eis gestellt. Nach 50 Sekunden Inkubation bei 37°C und 2 min auf Eis wurde 500 µl vorgewärmtes SOC-Medium hinzugegeben und der Ansatz eine Stunde auf 37°C gewärmt. Auf einer LB-Ampicillin-Platte (siehe Kapitel 7.5.1) wurden 300 µl ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden selektiert und in jeweils 5 ml flüssigem LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese Übernachtskulturen wurden zur Gewinnung von Plasmid-DNA benutzt (Protokoll 6.3.4).

6.3.4 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus einer 5 ml Übernachtskultur wurde das QiaPrep Miniprep Kit nach Protokoll des Herstellers verwendet. Die Elution erfolgte mit zweimal 25 µl Tris/HCl Puffer (10 mM, pH 8.5), welcher auf 65°C vorgewärmt wurde.

6.3.5 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen von Plasmid-DNA wurden von den Firmen SeqLab Laboratories sowie GATC Biotech durchgeführt. Hierzu wurde der Sequenzierprimer M13-FP verwendet (Sequenzen s. Anhang).

6.4 Allgemeine Methoden im Umgang mit Proteinen

6.4.1 Färbung von Proteingelen

6.4.1.1 Silberfärbung

Zur Silberfärbung wurden SDS-PAGE-Gele zunächst für 10 min in Lösung 1 (30% Ethanol, 10% Essigsäure) fixiert, für weitere 10 min in Lösung 2 (0,4 M Natriumacetat, 0,5% Glutaraldehyd, 0,1% Natriumthiosulfat, 30% Ethanol) zur Vernetzung geschwenkt und anschließend für 20 min in Wasser gewaschen. Die Färbung erfolgte dann durch 10 min Inkubation in Lösung 3 (0,1% Silbernitrat, 25% Formaldehyd). Anschließend wurde für 10 min in Lösung 4 (2,5% Na₂CO₃, 40% Formaldehyd) entwickelt. Die Entwicklung wurde durch 5-minütiges Schwenken in 5% Essigsäure gestoppt, 5 min in Wasser gewaschen und 5 min in 10% Glycerin imprägniert. Die so behandelten Gele wurden anschließend auf feuchtes Whatmanpapier übertragen, mit Folie abgedeckt und bei 80°C im Gelrockner getrocknet.

6.4.1.2 Coomassie-Färbung (Brilliant Blau G250)

SDS-PAGE-Gele wurden zur Coomassie-Färbung zunächst für 15 min in Fixierlösung (30% Ethanol, 10% Essigsäure) anschließend ca. 30 min in Coomassie-Lösung (375 mg Coomassie Brilliant Blue, 125 ml Isopropanol, 50 ml Essigsäure, 300 ml Wasser) geschwenkt. Durch Schwenken in Entfärber-Lösung (10% Essigsäure, 30% Isopropanol)

wurden die Gele soweit anfärbt, bis die gewünschten Proteinbanden mit ausreichendem Kontrast zu identifizieren waren. Die Gele wurden anschließend auf feuchtes Whatmanpapier übertragen, mit Folie abgedeckt und bei 80°C im Geltdrockner getrocknet.

6.4.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

6.4.2.1 Photometrische Bestimmung über UV-Extinktion

Diese Methode basiert auf der UV-Absorption der Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan sowie Phenylalanin bei 280 nm. Durch Nukleinsäureverunreinigungen hervorgerufene Störungen wurden durch Messung bei 260 nm eliminiert. Die Proteinkonzentration wurde durch die Formel von Warburg und Christian berechnet^[132, 133]:

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

6.4.2.2 Photometrische Bestimmung nach Bradford

Zur Photometrischen Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford^[134] wurde der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue G250 eingesetzt, welcher an basische und aromatische Aminosäurereste bindet und in gebundener Form eine höhere Absorption bei 595 nm besitzt als der freie Farbstoff.

Unter Verwendung einer Referenzkonzentrationsreihe von Rinderserumalbumin (BSA) (0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 mg/ml) wurde eine Eichkurve erstellt. Die zu bestimmende Proteinprobe wurde soweit verdünnt, daß die geschätzte Konzentration zwischen 0,25 und 2,5 mg/ml lag.

Für die Messung wurde in einer durchsichtigen 96-Loch Mikrotiterplatte 10 µl Proteinlösung (BSA-Reihe bzw. zu bestimmende Proteinlösung) mit 10 µl 1x PBS vermischt. Im Handel erhältliche konzentrierte Bradford-Reagenzlösung wurde 1:4 mit Wasser verdünnt, 200 µl dieser Verdünnung pro Loch hinzugegeben und durch kurzes Schütteln mit den vorgelegten Proteinlösungen durchmischt. Anschließend wurde im Fluoroscan die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentration aus der Absorption erfolgte mit Hilfe der BSA-Eichkurve.

6.5 *In vitro* Methoden

6.5.1 Filterbindungsexperimente

Um Dissoziationskonstanten von Protein/RNA Komplexen zu bestimmen wurden Filterbindungsexperimente durchgeführt. Hierzu wurde eine Konzentrationsreihe an Protein mit konstanter Menge an radioaktiv transkribierter oder 5'-kinasierter RNA für 30 Minuten bei 37°C in Bindungspuffer inkubiert. Währenddessen wurde die Nitrozellulosemembran für 10 Minuten in Kathodenpuffer inkubiert und kurz mit Bindungspuffer gewaschen. 20 µl der inkubierten Ansätze wurden abfiltriert und viermal mit 200 µl Bindungspuffer gewaschen. Die Nitrozellulosemembran mit den zurückgehaltenen Protein-RNA Komplexen wurde getrocknet und die Radioaktivität am Phosphorimager quantifiziert. Die Dissoziationskonstanten wurden anschließend mit dem Programm OriginPro bestimmt.

Im Falle kompetitiver Filterbindungsexperimente wurde radioaktiv markiertes Aptamer zusammen mit Protein und einer Konzentrationsreihe von zu testendem Kompetitor für 30 Minuten bei 37°C in Bindungspuffer inkubiert. Der weitere Versuchsablauf erfolgte wie zuvor beschrieben.

6.5.2 Screening der Substanzbibliothek

Für das Screening wurden schwarze 96-Loch Mikrotiterplatten (half-area, mid-binding; Greiner) verwendet. Über Nacht wurden bei 4°C 40 µl Cytohesin-1 Stocklösung pro Loch inkubiert:

Cytohesin-1 Stocklösung:

0,8 µM Cytohesin-1
3 mM MgCl₂
1x PBS

Vor dem Verteilen der Proteinlösung auf die Mikrotiterplatte wurde die Stocklösung 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert, um mögliche Proteinaggregate zu entfernen. Für Negativ-Kontrollmessungen wurden einige Löcher freigelassen.

Nach der Inkubation wurden die Platten komplett ausgeschüttet und auf einem Papiertuch vorsichtig ausgeklopft, um restliche Tröpfchen zu entfernen. Anschließend wurden alle

Löcher zweimal mit 100 µl Bindungspuffer (1x PBS, 3 mM MgCl₂) gewaschen und wie zuvor wieder entleert.

Direkt danach wurden per Pipettierroboter (Tecan, Freedom Evo) pro Loch 25 µl RNA-Compound-Mix auf die Mikrotiterplatte verteilt und bei Raumtemperatur 30 min inkubiert.

RNA-Compound-Mix:

0,4 µM Aptamer #6.10

3 mM MgCl₂

1x PBS

0,001% Tween20

10% DMSO

100 µM Compound

Wie zuvor wurde die Platte anschließend wieder entleert und zweimal mit 100 µl Bindungspuffer gewaschen.

Per Hand wurden anschließend 100 µl RiboGreen-Meßlösung (1:4000 Verdünnung Quant-iT RiboGreen in TE-Puffer, nach Angaben des Herstellers) in jedes Loch pipettiert und 2 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln leicht schüttelnd inkubiert (bei 300 rpm).

Nach der Inkubation wurde die Fluoreszenzintensität gemessen.

6.5.3 Messung von Fluoreszenzintensität im Screening

Die Fluoreszenzintensität im RiboGreen basierten Screening wurde mit einem Mithras Mikrotiterplattenleser LB 940 (BertholdTech) aufgezeichnet. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 485 nm, die Emission wurde bei 535 nm gemessen (bei Standardeinstellung des Geräts). Die Aufbereitung der Daten erfolgte mit der Geräte-Software MikroWin2000.

6.5.4 Herstellung von Liposomen

Um die für die Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR) benötigten Liposomen zu erhalten wurden zunächst β -Palmitoyl- γ -oleoyl-L- α -phosphatidylcholin (POPC) und Dioleoyl-L- α -phosphatidyl-DL-glycerol (DOPG) in Chloroform (je 10 µg/µl) sowie Dipalmitoyl-L- α -Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphatheptaamoniumsals (PIP₃) in

Wasser (1 µg/µl) gelöst. Aus diesen Stock-Lösungen wurden PIP₃-haltige und PIP₃-freie Ansätze in folgender Zusammensetzung vorbereitet:

- PIP₃-haltig: 60% POPC (30 µl), 35% DOPG (17,5 µl), 5% PIP₃ (25 µl)
- PIP₃-frei: 60% POPC (30 µl), 40% DOPG (20 µl)

Um im PIP₃-haltigen Ansatz die wäßrige und die Chloroform Phase zu vereinen wurden 67 µl Methanol hinzugegeben. Beide Ansätze wurden gut vermischt und in der Speedvac bis zur Trockne eingedampft. Anschließend wurde jeder Ansatz in 500 µl Bindungspuffer gelöst, für 10 s im Ultraschallbad sonifiziert, sechsmal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37°C direkt wieder aufgetaut. Die so vorgeformten Vesikel wurden durch elfmaliges Pressen durch einen Extruder (0,1 µm Porengröße) in ihrer Größe homogenisiert.

6.5.5 Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie

Mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie wurden an einem Biacore 3000 Gerät kinetische Bindungsdaten gemessen. Bei dieser Messung wird über eine Veränderung des Resonanzwinkels eines von einem Goldchip reflektierten Lichtstrahls in Echtzeit eine Massenänderung auf der Goldoberfläche gemessen. Ist auf dem Chip z.B. ein Protein immobilisiert, so können bei Injektion eines in Lösung vorliegenden, bindenden Interaktionspartners, indirekt über die Massenänderung, die kinetischen Bindungsparameter dieser Interaktion bestimmt werden.

Für die Charakterisierung der Wechselwirkung von Proteinen mit PIP₃-haltigen Vesikeln wurde der Biacore L1 Chip verwendet. Seine Goldoberfläche ist mit einer alkylierten Dextranmatrix beschichtet, deren lipophilen Gruppen mit Vesikeln interagieren und sie so nicht-kovalent immobilisieren können^[135]. Dieser Chip wurde zunächst bei einer Flußrate von 20 µl/min für eine Minute mit 20 mM des Detergenz 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS) in Wasser gespült, um Verunreinigungen von vorhergehenden Messungen zu entfernen.

Vor der Messung wurden zwei Flußzellen präpariert, eine als Meßzelle (mit PIP₃-haltigen Vesikeln), die andere als Referenzzelle (mit PIP₃-freien Vesikeln). Dazu wurden vorbereitete Vesikellösungen (Protokoll 6.5.4) 1:2,33 mit Bindungspuffer (1x PBS, 3 mM MgCl₂) verdünnt (~0,5 µM), der auch als Laufpuffer der Messungen diente. 60 µl dieser Vesikel-Verdünnungen wurden bei einer Flußrate von 5 µl/min in die jeweilige Flußzelle injiziert (Meßzelle: PIP₃-haltige Vesikel, Referenzzelle: PIP₃-freie Vesikel). Anschließend

wurden die Flußzellen bei einer Flußrate von 100 µl/min mit 20 µl einer 50 mM wäßrigen NaOH-Lösung gewaschen und bei einer Flußrate von 10 µl/min auf eine Stabilisierung der Basislinie gewartet.

Anschließend wurde die Messung bei Injektion(en) der Analytlösung(en) auf beide Flußzellen durchgeführt und die Werte der Referenzzelle von den Werten der Meßzelle subtrahiert. Dadurch werden unspezifische Bindungen, die in beiden Zellen auftreten, aus dem resultierenden Sensogramm eliminiert. Durch abschließende Injektion von 20 mM CHAPS konnten alle Vesikel vollständig von der Chipoberfläche entfernt werden, so daß für weitere Messungen der selbe Chip verwendet werden konnte.

Die Auswertung der gemessenen Sensogramme erfolgte mit der BIAevaluation Software.

7. Materialien

7.1 Geräte

Gerät	Hersteller, Typ
Agarose Gelkammer	Fisher Scientific
Autoklav	Systec, 3850 EL
Elektrophoreseapparaturen	BioRad
Extruder	Avanti Polar Lipids
Fluoroskan	Ascent FL, Labsystems
Geiger-Müller-Zählrohr	Berthold. LB 122
Geldokumentationssystem	BioRad
Glaswatte, silyliert	SERVA Electrophoresis
Inkubationsschüttler	Innova, 4430
Kühlschränke 4°C	Liebherr, Vinothek
-20°C	AEG, Arctis
-80°C	Heraeus; HFU 86-450
Magnetrührer	IKA Laborgeräte
Mikropipetten	Eppendorf, research
Mikrotiterplattenleser	Mithras LB 940, BertholdTech
Mikrowellenofen	Bosch
Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskop	Biacore 3000
PCR-Thermocycler	Biometra, Personal Cycler
pH-Meter	WTW, inoLab pH Level 1
Phosphorimager	Fujifilm, FLA-3000
Reinstwasseranlage	Werner; Easy pure UV/UF
Spannungsgeräte	Consort E802, E865
Sterilbank	Bio Flow, Antaras
Szintillationszähler	Perkin-Elmer/Wallac
Thermoblock	Stuart Scientific
Thermoschüttler	Eppendorf, Thermomixer comfort
Ultraschallbad	Bandelin, Sonorex Super RK106
Ultrazentrifuge	Beckmann; J2 MI

UV-Spektrometer	Thermo Spectronic, Biomate 3
Vortexer	Neolab 7-2020
Waagen	Chyo, JL-200
	Satorius; BL 1500 S
Wärmeschrank	WTC Binder
Wasserbad	GFL
Zentrifugen	Eppendorf 5804-R/5417C

7.2 Chemikalien

Alle Chemikalien waren, sofern nicht anders angegeben, vom höchsten erhältlichen Reinheitsgrad und wurden nicht weiter gereinigt.

Reagenz	Hersteller
Acrylamid 25% (19:1)	Roth
Acrylamid 30% (37,5:1)	Roth
Agar	Sigma
Agarose	Invitrogen
Ammoniumacetat	Merck
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich
Ammoniumsulfat	Merck
Ampicillin Natriumsalz	Sigma-Aldrich
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Merck
CHAPS	Merck
Chloroform	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat·2H ₂ O	Merck
Dipalmitoyl-L- α -Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat Heptaammonium Salz	Calbiochem
Dithiothreitol (DTT)	Roth
DOPG	Sigma
Essigsäure	Riedel de Haën
Ethanol (100%)	Merck

Ethidiumbromid	Roth
E74thylendiamintetraacetat (EDTA)	Calbiochem
Glucose	Sigma
Glycerin	Roth
Glykogen	Roche
Harnstoff	Roth
Hefeextrakt	Sigma
Heparin	Sigma
HEPES	Roth
Iodoacetyl-LC-Biotin	Pierce
Isopropanol	Riedel de Haën
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydroxidlösung	Merck
Magnesiumacetat	Roth
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Methanol	Merck
N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin (TEMED)	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdihydrogenphosphat·H ₂ O	Merck
Natriumhydroxid	Merck
NHS aktivierte Sepharose	GE Healthcare
Phenol (stabilisiert mit TE, pH 8.0)	Roth
POPC	Sigma
Salzsäure (36%)	Riedel de Haën
tRNA	Roche
Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan (Tris)	Roth
Trypton	Sigma
Tween20	Merck
Triton X-100	Merck
Xylencyanol	Merck

7.3 Nukleotide und Radiochemikalien

Produkt	Hersteller
dNTPs	Roche
NTPs	Roche
[γ - ³² P]-ATP	NEN du Pont
[α - ³² P]-ATP	NEN du Pont

7.4 Enzyme und Proteine

Enzym, Protein	Hersteller
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	NEB
DNase I	Roche
RNase H	GibcoBRL
RNasin (Ribonuklease Inhibitor)	Promega
Rinderserumalbumin (BSA)	NEB
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen
T4 Polynukleotidkinase	NEB
T7 RNA-Polymerase	Stratagene
Taq DNA-Polymerase	Nicole Kuhn

7.5 Medien, Stammlösungen und Puffer

Alle Medien, Lösungen und Puffer wurden mit Reinstwasser angesetzt und je nach Reagenz autoklaviert oder mit Hilfe von Spritzenvorsatzfiltern bzw. Flaschenfilteraufsätzen sterilfiltriert. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte durch Zugabe von Natriumhydroxid oder Salzsäure.

7.5.1 Medien

LB-Medium pH 7,0	Trypton	1% (w/v)
	Hefeextrakt	0,5% (w/v)
	NaCl	1% (w/v)
	NaOH	1 mM

Für die entsprechenden Agarnährböden wurden 2% (w/v) Agar hinzugegeben. Für die Herstellung von Ampicillin-haltigen LB-Platten wurde ein 250 ml Ansatz für 20 min bei 120°C autoklaviert. Nachdem das autoklavierte Medium auf unter 60°C abgekühlt war, wurden 250 µl Ampicillinlösung (50 µg/ml) hinzugegeben und die LB-Ampicillin-Lösung auf ca. 25 Kulturplatten verteilt (~10 ml/Platte). Die ausgekühlten, erhärteten Platten wurden kopfüber bei 4°C gelagert.

SOB-Medium	Trypton	2% (w/v)
	Hefeextrakt	0,5% (w/v)
	NaCl	0,2% (w/v)
	MgCl ₂	10 mM
	MgSO ₄	10 mM

SOC-Medium	SOB-Medium	
	Glucose	20 mM

7.5.2 Puffer- und Stammlösungen

Ammoniumperoxodisulfat (APS)		10% (w/v)
Ampicillin-Stammlösung	in 50% Ethanol/Wasser	100 mg/ml
Agarosegel-Beladungspuffer, 6x	Glycerin	50% (v/v)
	Tris/HCl pH 8,0	50 mM
	EDTA pH 8,0	50 mM

Materialien

CIAP Puffer 10x	NaCl	500 mM
	Tris/HCl pH 7,9	100 mM
	MgCl ₂	100 mM
	DTT	10 mM
	ATP	10 mM
Denat. PAGE-Auftragspuffer	Harnstoff	9 M
	EDTA pH 8,0	50 mM
	Bromphenolblau	optional Spatelspitze
	Xylencyanol	optional Spatelspitze
Denat. PAGE-Gelpuffer	10x TBE in 8,3 M Harnstoff	
Elutionspuffer pH 7,5	KCl	200 mM
	MgCl ₂	1 mM
	HEPES	50 mM
	L-Arginin	10 mM
Ethidiumbromid-Stammlösung	in Ethanol	10 mg/ml
RT-Puffer pH 8,3, 5x	Tris/HCl	250 mM
	KCl	375 mM
	MgCl ₂	15 mM
Bindungspuffer pH 7,5	MgCl ₂	3 mM
	PBS	1x
Kathodenpuffer, pH 7,5	6-Amino-Hexansäure	40 mM
	Methanol	20% (v/v)
PBS, 10x	Tris-Base	890 mM
	Borsäure	890 mM
	EDTA pH 8,0	20 mM

T4 PNK Puffer pH 7,6, 5x	Tris/HCl	700 mM
	MgCl ₂	100 mM
	DTT	50 mM
TBE, 10x	Tris-Base	890 mM
	Borsäure	890 mM
	EDTA pH 8,0	20 mM

7.6 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
Einwegspritzen	Braun, Amefa
Falcon-Reaktionsgefäße (15 und 50 ml)	Roth
Glaswolle (silanisiert)	Serva
Kanülen	Terumo
Mikrotiterplatten, 96-Loch	Greiner
Parafilm	Pechiney
Petrischalen	Nunc
PolyPrep-Säulen	BioRad
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2,0 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (PCR 0,5 ml)	Eppendorf
Sensor Chip L1	Biacore
Sensor Chip SA	Biacore
Skalpelle	Bayha
Spitzen für Mikropipetten	Peske, Aindling
Spritzenvorsatzfilter	QualiLab
Sterilfiltrationseinheiten	Nalgene
Zentrifugenbecher für Ultrazentrifuge	Beckmann

7.7 Plasmide und Bakterienstämme

E. coli DH10B: S-mcrA,D(mrr-hsdRMS-mcrBC)
y80dlacZDM15 DlacX74, deoR, recA1,

endA1, araD139, D(ara, leu)7697,
galU, galKI, rpsL, nupG

Das verwendete Plasmid pGem[®]-T ist im Kit der Firma Promega enthalten.

7.8 Synthetische Oligodesoxynukleotide

Alle Oligodesoxynukleotide wurden bei der Firma Metabion in HPLC gereinigter Form erworben (Sequenzen s. Anhang).

7.9 Standards, Kits und Sonstiges

Bezeichnung	Hersteller
First Strand Puffer, 5x	Invitrogen
High-Range Rainbow Marker	Amersham Biosciences
Low-Range Rainbow Marker	Amersham Biosciences
Low Range RNA Marker	Fermentas
Micro Bio-Spin [®] Columns	Bio-Rad
MicroSpin G-25 Columns	Amersham Biosciences
QiaPrep Miniprep Kit	Qiagen
pGem [®] -T Vektor-System	Promega
peqGold 100bp Marker	peqLab
peqGold 1000bp Marker	peqLab
Quant-iT [™] RiboGreen [®] RNA Reagent	Molecular Probes
Taq DNA-Polymerase Puffer, 10x	Promega

8. Literaturverzeichnis

1. **Lander, E.S. et al.** Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 860-921 (2001).
2. **Venter, J.C. et al.** The sequence of the human genome. *Science*, 291, 1304-1351 (2001).
3. **International Human Genome Sequencing Consortium** Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431, 931-945 (2004).
4. **Beadle, G.W.** Biochemical Genetics. *Chemical Reviews*, 37, 15-96 (1945).
5. **Kabbani, N.** Proteomics of membrane receptors and signaling. *PROTEOMICS*, 8, 4146-4155 (2008).
6. **Lemmon, M.A. & Schlessinger, J.** Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141, 1117-1134 (2010).
7. **Sun, X.J. et al.** Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature*, 352, 73-77 (1991).
8. **Sun, X.J. et al.** Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature*, 377, 173-177 (1995).
9. **Lavan, B.E., Lane, W.S. & Lienhard, G.E.** The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem*, 272, 11439-11443 (1997).
10. **Lavan, B.E. et al.** A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem*, 272, 21403-21407 (1997).
11. **White, M.F.** The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem*, 182, 3-11 (1998).
12. **Gustafson, T.A., He, W., Craparo, A., Schaub, C.D. & O'Neill, T.J.** Phosphotyrosine-dependent interaction of SHC and insulin receptor substrate 1 with the NPEY motif of the insulin receptor via a novel non-SH2 domain. *Mol Cell Biol*, 15, 2500-2508 (1995).
13. **Baumann, C.A. et al.** CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature*, 407, 202-207 (2000).
14. **Wick, M.J., Dong, L.Q., Hu, D., Langlais, P. & Liu, F.** Insulin receptor-mediated p62dok tyrosine phosphorylation at residues 362 and 398 plays distinct roles for binding GTPase-activating protein and Nck and is essential for inhibiting insulin-stimulated activation of Ras and Akt. *J Biol Chem*, 276, 42843-42850 (2001).

15. **Lehr, S. et al.** Identification of major tyrosine phosphorylation sites in the human insulin receptor substrate Gab-1 by insulin receptor kinase in vitro. *Biochemistry*, 39, 10898-10907 (2000).
16. **Myers, M.G., Jr. et al.** IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 10350-10354 (1992).
17. **Skolnik, E.Y. et al.** The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science*, 260, 1953-1955 (1993).
18. **Vanhaesebroeck, B. et al.** Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem*, 70, 535-602 (2001).
19. **Workman, P., Clarke, P.A., Guillard, S. & Raynaud, F.I.** Drugging the PI3 kinome. *Nat Biotechnol*, 24, 794-796 (2006).
20. **Carpenter, C.L. & Cantley, L.C.** Phosphoinositide kinases. *Curr Opin Cell Biol*, 8, 153-158 (1996).
21. **Fukami, K., Inanobe, S., Kanemaru, K. & Nakamura, Y.** Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance. *Prog Lipid Res*, 49, 429-437 (2010).
22. **Wetzker, R. & Rommel, C.** Phosphoinositide 3-kinases as targets for therapeutic intervention. *Curr Pharm Des*, 10, 1915-1922 (2004).
23. **Haslam, R.J., Koide, H.B. & Hemmings, B.A.** Pleckstrin domain homology. *Nature*, 363, 309-310 (1993).
24. **Rebecchi, M.J. & Scarlata, S.** Pleckstrin homology domains: a common fold with diverse functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 27, 503-528 (1998).
25. **Lemmon, M.A. & Ferguson, K.M.** Molecular determinants in pleckstrin homology domains that allow specific recognition of phosphoinositides. *Biochem Soc Trans*, 29, 377-384 (2001).
26. **Kavran, J.M. et al.** Specificity and promiscuity in phosphoinositide binding by pleckstrin homology domains. *J Biol Chem*, 273, 30497-30508 (1998).
27. **Lemmon, M.A. & Ferguson, K.M.** Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J*, 350 Pt 1, 1-18 (2000).
28. **Lemmon, M.A., Ferguson, K.M. & Schlessinger, J.** PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell*, 85, 621-624 (1996).
29. **Pawson, T.** Protein modules and signalling networks. *Nature*, 373, 573-580 (1995).

30. **D'Souza-Schorey, C. & Chavrier, P.** ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nature reviews*, 7, 347-358 (2006).
31. **Grant, B.D. & Donaldson, J.G.** Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nature reviews*, 10, 597-608 (2009).
32. **Boshans, R.L., Szanto, S., van Aelst, L. & D'Souza-Schorey, C.** ADP-ribosylation factor 6 regulates actin cytoskeleton remodeling in coordination with Rac1 and RhoA. *Mol Cell Biol*, 20, 3685-3694 (2000).
33. **Nie, Z., Hirsch, D.S. & Randazzo, P.A.** Arf and its many interactors. *Curr Opin Cell Biol*, 15, 396-404 (2003).
34. **Donaldson, J.G. & Jackson, C.L.** Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr Opin Cell Biol*, 12, 475-482 (2000).
35. **Franco, M., Chardin, P., Chabre, M. & Paris, S.** Myristoylation of ADP-ribosylation factor 1 facilitates nucleotide exchange at physiological Mg²⁺ levels. *J Biol Chem*, 270, 1337-1341 (1995).
36. **Paduch, M., Jelen, F. & Otlewski, J.** Structure of small G proteins and their regulators. *Acta Biochim Pol*, 48, 829-850 (2001).
37. **Stearns, T., Willingham, M.C., Botstein, D. & Kahn, R.A.** ADP-ribosylation factor is functionally and physically associated with the Golgi complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 1238-1242 (1990).
38. **Donaldson, J.G., Finazzi, D. & Klausner, R.D.** Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature*, 360, 350-352 (1992).
39. **Goldberg, J.** Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell*, 95, 237-248 (1998).
40. **Sata, M., Moss, J. & Vaughan, M.** Structural basis for the inhibitory effect of brefeldin A on guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 2752-2757 (1999).
41. **Peyroche, A. et al.** Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol Cell*, 3, 275-285 (1999).
42. **Mossessova, E., Corpina, R.A. & Goldberg, J.** Crystal structure of ARF1*Sec7 complexed with Brefeldin A and its implications for the guanine nucleotide exchange mechanism. *Mol Cell*, 12, 1403-1411 (2003).
43. **Hafner, M. et al.** Inhibition of cytohesins by SecinH3 leads to hepatic insulin resistance. *Nature*, 444, 941-944 (2006).

44. **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*, 97, 2567-2572 (2000).
45. **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*, 146, 71-84 (1999).
46. **Franco, M. et al.** EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization. *EMBO J*, 18, 1480-1491 (1999).
47. **Someya, A. et al.** ARF-GEP(100), a guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor 6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 2413-2418 (2001).
48. **Kolanus, W. et al.** Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell*, 86, 233-242 (1996).
49. **Chardin, P. et al.** A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature*, 384, 481-484 (1996).
50. **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*, 95, 9926-9931 (1998).
51. **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*, 275, 3221-3230 (2000).
52. **Dixon, B., Mansour, M. & Pohajdak, B.** Assignment of human B2-1 gene (D17S811E) to chromosome 17qter by PCR analysis of somatic cell hybrids and fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 63, 42-44 (1993).
53. **Korthauer, U. et al.** Anergic T lymphocytes selectively express an integrin regulatory protein of the cytohesin family. *J Immunol*, 164, 308-318 (2000).
54. **Nagel, W., Schilcher, P., Zeitlmann, L. & Kolanus, W.** The PH domain and the polybasic c domain of cytohesin-1 cooperate specifically in plasma membrane association and cellular function. *Mol Biol Cell*, 9, 1981-1994 (1998).
55. **Santy, L.C., Frank, S.R., Hatfield, J.C. & Casanova, J.E.** Regulation of ARNO nucleotide exchange by a PH domain electrostatic switch. *Curr Biol*, 9, 1173-1176 (1999).
56. **Tang, P. et al.** Cybr, a cytokine-inducible protein that binds cytohesin-1 and regulates its activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 2625-2629 (2002).
57. **Boehm, T. et al.** Attenuation of cell adhesion in lymphocytes is regulated by CYTIP, a protein which mediates signal complex sequestration. *Embo J*, 22, 1014-1024 (2003).

58. **Mansour, M., Lee, S.Y. & Pohajdak, B.** 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*, 277, 32302-32309 (2002).
59. **Lim, J., Zhou, M., Veenstra, T.D. & Morrison, D.K.** The CNK1 scaffold binds cytohesins and promotes insulin pathway signaling. *Genes Dev*, 24, 1496-1506 (2010).
60. **Venkateswarlu, K.** Interaction protein for cytohesin exchange factors 1 (IPCEF1) binds cytohesin 2 and modifies its activity. *J Biol Chem*, 278, 43460-43469 (2003).
61. **Vitale, N. et al.** Specific functional interaction of human cytohesin-1 and ADP-ribosylation factor domain protein (ARD1). *J Biol Chem*, 275, 21331-21339 (2000).
62. **Weber, K.S. et al.** Cytohesin-1 is a dynamic regulator of distinct LFA-1 functions in leukocyte arrest and transmigration triggered by chemokines. *Curr Biol*, 11, 1969-1974 (2001).
63. **Geiger, C. et al.** Cytohesin-1 regulates beta-2 integrin-mediated adhesion through both ARF-GEF function and interaction with LFA-1. *EMBO J*, 19, 2525-2536 (2000).
64. **Hawadle, M.A., Folarin, N., Martin, R. & Jackson, T.R.** Cytohesins and centaurins control subcellular trafficking of macromolecular signaling complexes: regulation by phosphoinositides and ADP-ribosylation factors. *Biol Res*, 35, 247-265 (2002).
65. **Mazerolles, F., Barbat, C., Trucy, M., Kolanus, W. & Fischer, A.** Molecular events associated with CD4-mediated Down-regulation of LFA-1-dependent adhesion. *J Biol Chem*, 277, 1276-1283 (2002).
66. **Frank, S.R., Hatfield, J.C. & Casanova, J.E.** Remodeling of the actin cytoskeleton is coordinately regulated by protein kinase C and the ADP-ribosylation factor nucleotide exchange factor ARNO. *Mol Biol Cell*, 9, 3133-3146 (1998).
67. **Mayer, G. et al.** Controlling small guanine-nucleotide-exchange factor function through cytoplasmic RNA intramers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 4961-4965 (2001).
68. **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*, 4, 1083-1092 (2003).
69. **Theis, M.G. et al.** Discriminatory aptamer reveals serum response element transcription regulated by cytohesin-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 11221-11226 (2004).
70. **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*, 17, 3651-3659 (1998).
71. **Biddinger, S.B. & Kahn, C.R.** From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. *Annu Rev Physiol*, 68, 123-158 (2006).

72. **Fuss, B., Becker, T., Zinke, I. & Hoch, M.** The cytohesin Steppke is essential for insulin signalling in *Drosophila*. *Nature*, 444, 945-948 (2006).
73. **Hafen, E.** Cancer, type 2 diabetes, and ageing: news from flies and worms. *Swiss Med Wkly*, 134, 711-719 (2004).
74. **Bill, A. et al.** Cytohesins are cytoplasmic ErbB receptor activators. *Cell*, 143, 201-211 (2010).
75. **Elbashir, S.M. et al.** Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411, 494-498 (2001).
76. **Bramlage, B., Luzi, E. & Eckstein, F.** HIV-1 LTR as a target for synthetic ribozyme-mediated inhibition of gene expression: site selection and inhibition in cell culture. *Nucleic Acids Res*, 28, 4059-4067 (2000).
77. **Jackson, A.L. et al.** Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol*, 21, 635-637 (2003).
78. **Scacheri, P.C. et al.** Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 1892-1897 (2004).
79. **Qiu, S., Adema, C.M. & Lane, T.** A computational study of off-target effects of RNA interference. *Nucleic Acids Res*, 33, 1834-1847 (2005).
80. **der Maur, A.A. et al.** Direct in vivo screening of intrabody libraries constructed on a highly stable single-chain framework. *J Biol Chem*, 277, 45075-45085 (2002).
81. **Tuerk, C. & Gold, L.** Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249, 505-510 (1990).
82. **Ellington, A.D. & Szostak, J.W.** In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346, 818-822 (1990).
83. **Good, P.D. et al.** Expression of small, therapeutic RNAs in human cell nuclei. *Gene Ther*, 4, 45-54 (1997).
84. **Famulok, M., Blind, M. & Mayer, G.** Intramers as promising new tools in functional proteomics. *Chem Biol*, 8, 931-939 (2001).
85. **Lipinski, C.A.** Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 44, 235-249 (2000).
86. **Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W. & Feeney, P.J.** Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 46, 3-26 (2001).
87. **Bohacek, R.S., McMartin, C. & Guida, W.C.** The art and practice of structure-based drug design: a molecular modeling perspective. *Med Res Rev*, 16, 3-50 (1996).

88. **Karlsson, R., Katsamba, P.S., Nordin, H., Pol, E. & Myszka, D.G.** Analyzing a kinetic titration series using affinity biosensors. *Anal Biochem*, 349, 136-147 (2006).
89. **Sundberg, S.A.** High-throughput and ultra-high-throughput screening: solution- and cell-based approaches. *Curr Opin Biotechnol*, 11, 47-53 (2000).
90. **Zhang, J.H., Chung, T.D. & Oldenburg, K.R.** A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen*, 4, 67-73 (1999).
91. **Hafner, M. et al.** Displacement of protein-bound aptamers with small molecules screened by fluorescence polarization. *Nat Protoc*, 3, 579-587 (2008).
92. **Hartig, J.S. et al.** Protein-dependent ribozymes report molecular interactions in real time. *Nat Biotechnol*, 20, 717-722 (2002).
93. **Mayer, G., Faulhammer, D., Grattinger, M., Fessele, S. & Blind, M.** A RNA-based approach towards small-molecule inhibitors. *Chembiochem*, 10, 1993-1996 (2009).
94. **Weigert, F.** Über polarisiertes Fluoreszenzlicht. *Verh. d. D. Phys. Ges.*, 23, 100-102 (1920).
95. **Wu, T.P., Ruan, K.C. & Liu, W.Y.** A fluorescence-labeling method for sequencing small RNA on polyacrylamide gel. *Nucleic Acids Res*, 24, 3472-3473 (1996).
96. **Jones, L.J., Yue, S.T., Cheung, C.Y. & Singer, V.L.** RNA quantitation by fluorescence-based solution assay: RiboGreen reagent characterization. *Anal Biochem*, 265, 368-374 (1998).
97. **Goblyos, A., de Vries, H., Brussee, J. & Ijzerman, A.P.** Synthesis and biological evaluation of a new series of 2,3,5-substituted [1,2,4]-thiadiazoles as modulators of adenosine A1 receptors and their molecular mechanism of action. *J Med Chem*, 48, 1145-1151 (2005).
98. **Lewandowicz, A.M., Vepsäläinen, J. & Laitinen, J.T.** The 'allosteric modulator' SCH-202676 disrupts G protein-coupled receptor function via sulphhydryl-sensitive mechanisms. *Br J Pharmacol*, 147, 422-429 (2006).
99. **Meusel, M., Ambrozak, A., Hecker, T.K. & Gutschow, M.** The aminobarbituric acid-hydantoin rearrangement. *J Org Chem*, 68, 4684-4692 (2003).
100. **Trutnau, H.H.** New multi-step kinetics using common affinity biosensors saves time and sample at full access to kinetics and concentration. *J Biotechnol*, 124, 191-195 (2006).
101. **Cronin, T.C., DiNitto, J.P., Czech, M.P. & Lambright, D.G.** Structural determinants of phosphoinositide selectivity in splice variants of Grp1 family PH domains. *Embo J*, 23, 3711-3720 (2004).
102. **Cox, J.C., Rudolph, P. & Ellington, A.D.** Automated RNA selection. *Biotechnol Prog*, 14, 845-850 (1998).

103. **Cox, J.C. & Ellington, A.D.** Automated selection of anti-protein aptamers. *Bioorg Med Chem*, 9, 2525-2531 (2001).
104. **Famulok, M. & Mayer, G.** Intramers and aptamers: applications in protein-function analyses and potential for drug screening. *Chembiochem*, 6, 19-26 (2005).
105. **Green, L.S., Bell, C. & Janjic, N.** Aptamers as reagents for high-throughput screening. *Biotechniques*, 30, 1094-1096, 1098, 1100 passim (2001).
106. **Hollander, Z. & Katchalski-Katzir, E.** Use of monoclonal antibodies to detect conformational alterations in lactate dehydrogenase isoenzyme 5 on heat denaturation and on adsorption to polystyrene plates. *Mol Immunol*, 23, 927-933 (1986).
107. **Schwab, C. & Bosshard, H.R.** Caveats for the use of surface-adsorbed protein antigen to test the specificity of antibodies. *J Immunol Methods*, 147, 125-134 (1992).
108. **Soderquist, M.E. & Walton, A.G.** Structural changes in proteins adsorbed on polymer surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 75, 386-397 (1980).
109. **Drolet, D.W., Jenison, R.D., Smith, D.E., Pratt, D. & Hicke, B.J.** A high throughput platform for systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). *Comb Chem High Throughput Screen*, 2, 271-278 (1999).
110. **Paborsky, L.R., McCurdy, S.N., Griffin, L.C., Toole, J.J. & Leung, L.L.** The single-stranded DNA aptamer-binding site of human thrombin. *J Biol Chem*, 268, 20808-20811 (1993).
111. **Bridonneau, P. et al.** Purification of a highly modified RNA-aptamer. Effect of complete denaturation during chromatography on product recovery and specific activity. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 726, 237-247 (1999).
112. **Wong, E.H., Snowman, A.M., Leeb-Lundberg, L.M. & Olsen, R.W.** Barbiturates allosterically inhibit GABA antagonist and benzodiazepine inverse agonist binding. *Eur J Pharmacol*, 102, 205-212 (1984).
113. **Olsen, R.W. & Li, G.D.** GABA(A) receptors as molecular targets of general anesthetics: identification of binding sites provides clues to allosteric modulation. *Can J Anaesth* (2010).
114. **Holtkamp, M. & Meierkord, H.** Anticonvulsant, antiepileptogenic, and antiictogenic pharmacostategies. *Cell Mol Life Sci*, 64, 2023-2041 (2007).
115. **Gütschow, M., Hecker, T. & Eger, K.** A New One-Pot Synthesis of 5,5-Disubstituted Hydantoin from Diethyl Acetamidomalonates and Ureas. *Synthesis*, 1999, 410-414 (1999).
116. **Bazil, C.W. & Pedley, T.A.** Advances in the medical treatment of epilepsy. *Annu Rev Med*, 49, 135-162 (1998).

117. **Cravatt, B.F., Wright, A.T. & Kozarich, J.W.** Activity-based protein profiling: from enzyme chemistry to proteomic chemistry. *Annu Rev Biochem*, 77, 383-414 (2008).
118. **Gubbens, J. et al.** Photocrosslinking and click chemistry enable the specific detection of proteins interacting with phospholipids at the membrane interface. *Chem Biol*, 16, 3-14 (2009).
119. **Best, M.D.** Click chemistry and bioorthogonal reactions: unprecedented selectivity in the labeling of biological molecules. *Biochemistry*, 48, 6571-6584 (2009).
120. **Gubbens, J. & de Kroon, A.I.** Proteome-wide detection of phospholipid-protein interactions in mitochondria by photocrosslinking and click chemistry. *Mol Biosyst* (2010).
121. **Jessani, N. et al.** A streamlined platform for high-content functional proteomics of primary human specimens. *Nature methods*, 2, 691-697 (2005).
122. **Adam, G.C., Burbaum, J., Kozarich, J.W., Patricelli, M.P. & Cravatt, B.F.** Mapping enzyme active sites in complex proteomes. *J Am Chem Soc*, 126, 1363-1368 (2004).
123. **Okerberg, E.S. et al.** High-resolution functional proteomics by active-site peptide profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 4996-5001 (2005).
124. **Tanaka, Y., Bond, M.R. & Kohler, J.J.** Photocrosslinkers illuminate interactions in living cells. *Mol Biosyst*, 4, 473-480 (2008).
125. **Nagel, W. et al.** Phosphoinositide 3-OH kinase activates the beta2 integrin adhesion pathway and induces membrane recruitment of cytohesin-1. *J Biol Chem*, 273, 14853-14861 (1998).
126. **Knorr, T., Nagel, W. & Kolanus, W.** 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*, 267, 3784-3791 (2000).
127. **Arcaro, A. & Wymann, M.P.** Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem J*, 296 (Pt 2), 297-301 (1993).
128. **Venkateswarlu, K., Gunn-Moore, F., Tavare, J.M. & Cullen, P.J.** EGF- and NGF-stimulated translocation of cytohesin-1 to the plasma membrane of PC12 cells requires PI 3-kinase activation and a functional cytohesin-1 PH domain. *J Cell Sci*, 112 (Pt 12), 1957-1965 (1999).
129. **Meuillet, E.J. et al.** Specific inhibition of the Akt1 pleckstrin homology domain by D-3-deoxy-phosphatidyl-myo-inositol analogues. *Mol Cancer Ther*, 2, 389-399 (2003).

130. **Moses, S.A. et al.** In vitro and in vivo activity of novel small-molecule inhibitors targeting the pleckstrin homology domain of protein kinase B/AKT. *Cancer Res*, 69, 5073-5081 (2009).
131. **Saiki, R.K. et al.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491 (1988).
132. **Warburg, O. & Christian, W.** Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem. Z.*, 310, 384-421 (1942).
133. **Layne, E.** Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. *Methods Enzymol.*, 3, 447-454 (1957).
134. **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*, 72, 248-254 (1976).
135. **Danelian, E. et al.** SPR Biosensor Studies of the Direct Interaction between 27 Drugs and a Liposome Surface: Correlation with Fraction Absorbed in Humans. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43, 2083-2086 (2000).

9. Anhang

9.1 Sequenzen

N30-Bibliothek:

5'-AATCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGAGAGACAGCTGTTCTT(N30)AGATTT
GTGAATTCGTAGGTACA-3'

unterstrichen: T7-Promotor

Primer für die N30-Bibliothek:

N30.44: 5'-AATCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGAGAGACAGCTGTTCTT-3'

unterstrichen: T7-Promotor

N30.20: 5'-TGTACCTACGAATTCACAAA-3'

#6.10 RNA:

5'-GGGAGAGAGAGACAGCUGUUCUUGUAGGCGUUAGAGCGGGCGGAUACCUAU
GUAGAUUUGUGAAUUCGUAGGUACA-3'

Sequenzierprimer M13-FP:

5'-TGTA AACGACGGCCAGT-3'

Monoklonale Sequenzen der Cytohesin-1 Selektion:

Streptavidin und unspezifisch bindende Sequenzen

#6.2 TCAATGGATATAGGGCGGAGGGAACGTCGTACGGA

#6.3 ACGGTAAGTGCGGGGGGAGTACCTGGCGT

#6.5 CGGTA--AGGGCGGAGGGGACTACAGGTTC

#6.18 TCGTGGAAGGGCGGAGGGGACTAC-GG

#6.20 TCATGGAAGGGCGGAGGGGACTAC-GG

#6.21 GTTTGGAAGTGCGGAGGAGGAGTACGGTGCGGA

Cytohesin bindende Sequenzen

#6.1 TAACTGGGTAGTGG-TTGGTGGGGTACTGCG

#6.4 AA ACTGGGTTGAGGATTGGAGGGAGTGCCG

#6.14 CTCACGGAAGGGCGGAGGGGAGTGCCACGG

#6.10 GTAGGCGTTAGAGCGGGCGGAACCTATGT

#6.16 GTAGGCGTTAGAGCGGGCGGAACCTATGT

#6.6 TTACTGAAGGGACGGNGGGGAGNACCACGG

#6.13 TTCTGGTTATAGGGCGGAGGGACTACCGGCG

unterstrichen: gemeinsames Motiv

9.2 Strukturen

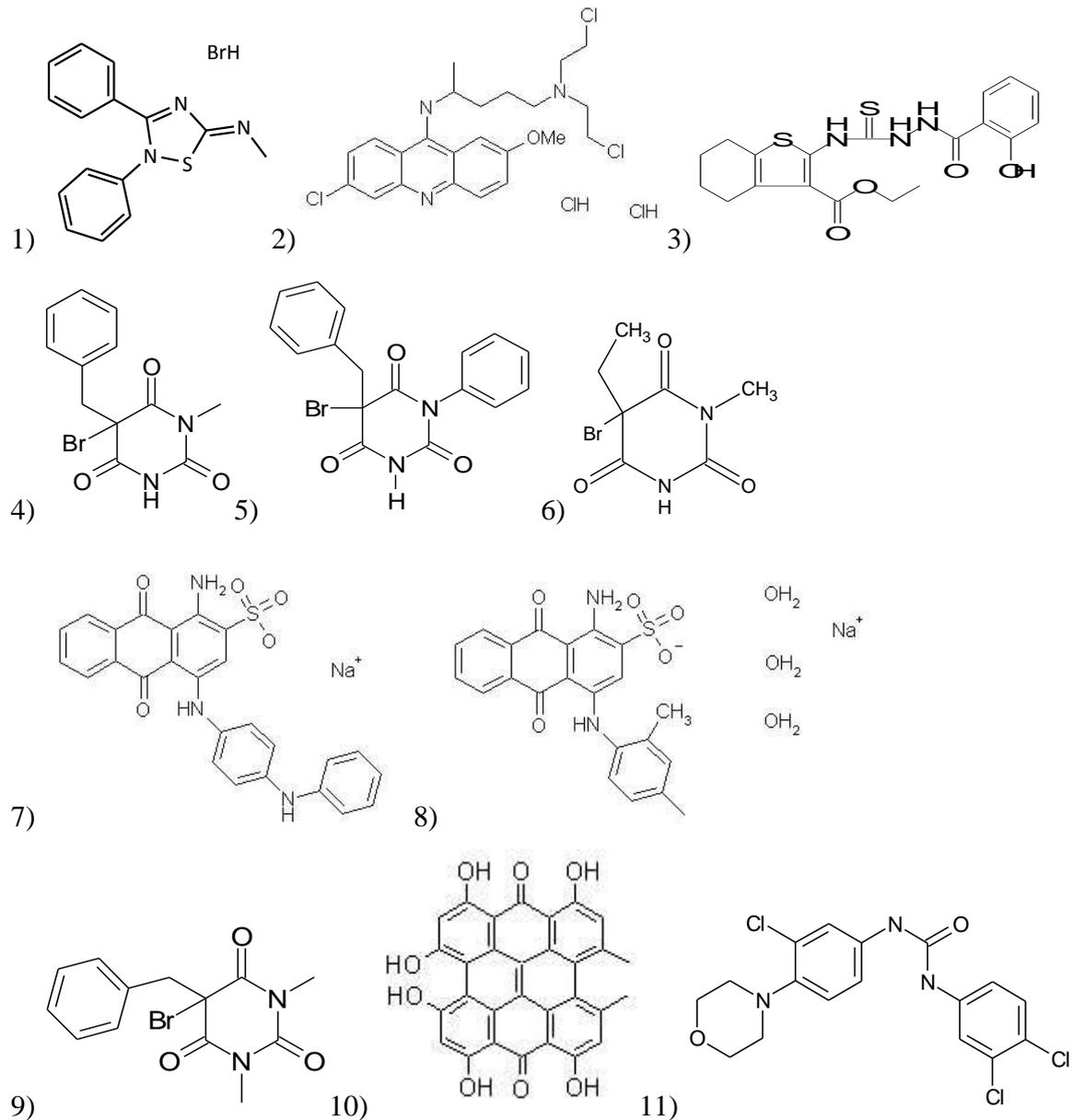


Abbildung 9.1 Strukturen der elf Hits nach dem Rescreening: 1) Tocris1400, 2) Fluka 81, 3) Gü196, 4) Gü729, 5) Gü730, 6) Gü753, 7) SWK17, 8) SWK21, 9) Gü783, 10) AA-0411, 11) CGX-0142599.

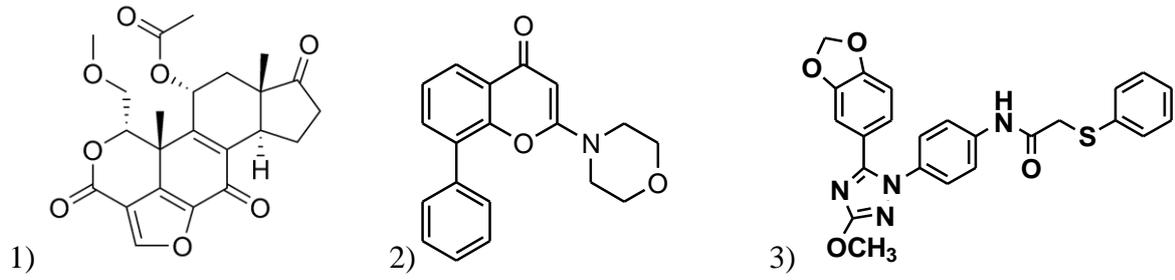


Abbildung 9.2 Strukturen verschiedener Arf-GEF-Inhibitoren: 1) Wortmannin, 2) LY294002, 3) SecinH3.

10. Abkürzungen

ABPP	<i>activity-based protein profiling</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BP	Bindungspuffer
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CIAP	<i>calf intestine phosphatase</i>
Cyplecksin	<u>Cy</u> tohesin <u>P</u> leckstrin-homologe Domänen <u>I</u> nhibitor
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DOPG	Diioleoyl-L- α -phosphatidyl-DL-glycerol
DTT	Dithiotreitol
<i>E. Coli</i>	Escherichia coli
EDTA	N,N,N',N'-Ethyldiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
FAM-TAMRA	Fluorescein/N,N'-Tetramethylrhodamin
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor (<i>guanine nucleotide exchange factor</i>)
GST	Glutathion-S-Transferase
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HTS	<i>high throughput screening</i>
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptorsubstrat

LTS	<i>low throughput screening</i>
NTP	Ribonukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PH	Pleckstrin-homolog
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
POPC	β -Palmitoyl- γ -oleoyl-L- α -phosphatidylcholin
PSL	Photostimulierte Lumineszenz
rcf	Relative Zentrifugalbeschleunigung
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RU	<i>response unit</i>
SAR	Struktur-Wirkungsbeziehung (<i>structure-activity relationship</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
SELEX	<i>systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>
SPR	Oberflächenplasmonresonanz (<i>surface plasmon resonance</i>)
ssDNA	einzelsträngige DNA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin
TE	Tris-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>enzyme unit</i>
UV	Ultraviolett