

# Aptamerselektion zur Funktionsuntersuchung von zytosolischen Proteinen

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Katharina Fucik

aus

Trautenau, Tschechien

**Bonn, 2006**



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

1. Referent: Prof. Dr. Michael Famulok
2. Referent: Priv. Doz. Dr. Thomas Kolter
3. Referent: Prof. Dr. Joern Piel
4. Referent: Prof. Dr. Reinhart Büttner

Tag der Promotion: 20.12.06

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
<http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss> online elektronisch publiziert worden.

Erscheinungsjahr 2007



**„Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.“**

**Galileo Galilei (15.02.1564 - 08.01.1642 italienischer Physiker und Astronom)**



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>i</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Funktionsaufklärung von zytosolischen Proteinen.....	1
1.2 Aptamere .....	4
1.2.1 Applikation von Aptameren/Intrameren .....	7
1.3 „Scaffold“-Proteine in der Signaltransduktion .....	9
1.3.1 Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) Signalweg.....	10
1.3.2 Proteininteraktionsdomänen .....	11
1.4 Modulatoren der Cytohesine .....	13
1.4.1 CYTIP .....	16
1.4.2 KIAA0403, das humane Homolog zu IPCEF1 .....	17
1.5 LIM Interaktionsdomäne .....	18
1.5.1 Das multifunktionale FHL2 ( <i>Four-and-a-half-LIM only protein</i> ).....	20
<b>2 Aufgabenstellung .....</b>	<b>23</b>
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>25</b>
3.1 CC-Modulator CYTIP .....	25
3.1.1 Klonierung, Expression und Reinigung von CYTIP-Konstrukten .....	25
3.1.2 Aptamerselektion gegen CYTIP-PDZ und CYTIP-PDZCC .....	26
3.2 KIAA0403 (PIP3-E).....	30
3.2.1 Expression und Reinigung des KIAA0403-ΔN291 Konstruktes.....	31
3.2.2 Bindungsstudien durch Oberflächenplasmonresonanz (BIAcore).....	32
3.2.3 <i>In vitro</i> Selektion gegen das His <sub>6</sub> -KIAA0403-ΔN291-Konstrukt .....	34
3.2.4 Charakterisierung monoklonaler Aptamere .....	37
3.2.5 K21 und K61 .....	38
3.2.6 <i>In vitro</i> “Pull-down”-Assays.....	40
3.2.7 Kompetitionsstudien von K21 und K61 .....	41
3.2.8 Kompetitionsstudien von KIAA0403-ΔN291 und Cytohesin 1 .....	43
3.2.9 GDP/GTP Austausch-Assay .....	44
3.2.10 Klonierung und Expression der GST-KIAA-Konstrukte .....	45
3.2.11 Mutationsstudien der Konsensussequenz von K21.....	49
3.2.12 Zellkulturstudien in HeLa-Zellkultur.....	50
3.2.12.1 Luciferase MAP-Kinase Assays.....	51
3.2.12.2 Überexpression der KIAA0403-Konstrukte.....	52
3.3 FHL2.....	55
3.3.1 Expression und Aptamerselektion gegen His <sub>6</sub> -FHL2-LIM0+1 .....	55
3.3.2 Expression des GST-FHL2-Vollängenproteins .....	57
3.3.3 Biotinylierung und optimierte <i>in vitro</i> Selektion gegen His <sub>6</sub> -FHL2-LIM0+1 ..	58
3.3.4 <i>In vitro</i> Selektion gegen das GST-FHL2-Vollängenproteins .....	61
3.3.5 Sequenzierung und Charakterisierung monoklonaler Aptamere .....	62
<b>4 Diskussion und Ausblick.....</b>	<b>67</b>
4.1 CC-Binder.....	67
4.1.1 <i>In vitro</i> Aptamer Selektion gegen CYTIP .....	67
4.1.2 KIAA0403.....	70
4.1.3 <i>In vitro</i> Aptamer Selektion gegen KIAA0403 .....	71
4.1.4 K21 und K61 spezifisch bindende Aptamere .....	72
4.1.5 Zellkulturstudien und biologische Relevanz von KIAA0403.....	75
4.2 FHL2.....	78
4.2.1 <i>In vitro</i> Aptamerselektion gegen FHL2 .....	78
<b>5 Material .....</b>	<b>83</b>

5.1	Verwendete Geräte und Materialien .....	83
5.1.1	Geräte .....	83
5.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	84
5.1.3	Chemikalien.....	85
5.1.4	Enzyme und Proteine.....	86
5.1.5	Nukleotide, Aminosäuren und Radiochemikalien.....	87
5.2	DNA und Protein Standards.....	87
5.2.1	DNA Längenmarker .....	87
5.2.2	Protein Längenmarker .....	87
5.3	Kommerzielle Reaktionssysteme, Kits .....	87
5.4	Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen.....	88
5.4.1	Kulturmedien und Lösungen für Zellkulturarbeiten .....	88
5.4.2	Puffer- und Stammlösungen.....	89
5.5	Antikörper .....	90
5.6	Plasmide .....	91
5.6.1	Klonierung der SELEX-Bibliothek .....	91
5.6.2	Überexpression in Prokaryonten .....	91
5.6.3	Überexpression in Eukaryonten .....	92
5.6.4	Reporterplasmide für eukaryontische Zellkultur.....	92
5.7	Oligonukleotide.....	92
5.7.1	SELEX DNA-Bibliotheken.....	92
5.7.1.1	<i>SELEX-Bibliothek von Ulrich Wüllner</i> .....	92
5.7.1.2	<i>SELEX-Bibliothek E40 Ellington<sup>[70]</sup></i> .....	92
5.7.1.3	<i>SELEX-Bibliothek N20</i> .....	93
5.7.1.4	<i>SELEX-Bibliothek N25</i> .....	93
5.7.1.5	<i>SELEX-Bibliothek B80 und B50</i> .....	93
5.7.2	Aptamere .....	94
5.7.3	Primer .....	95
5.8	Bakterienstämme.....	96
5.9	Eukaryontische Zelllinien .....	96
<b>6</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>97</b>
6.1	Allgemeine Methoden im Umgang mit Proteinen .....	97
6.1.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	97
6.1.2	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen.....	98
6.1.3	Immunologische Detektion von Proteinen .....	99
6.1.3.1	<i>Western-Blot</i> .....	99
6.1.3.2	<i>Dot-Blot</i> .....	100
6.1.4	„Stripping“ von Nitrozellulosemembranen .....	100
6.1.5	Färbung von Proteingelen .....	100
6.1.5.1	<i>Coomassie-Färbung (Brilliant Blau G 250)</i> .....	101
6.1.5.2	<i>Silber-Färbung</i> .....	101
6.1.5.3	<i>Ponceau S Färbung</i> .....	102
6.1.6	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	102
6.1.6.1	<i>Photometrische Bestimmung nach Bradford</i> .....	102
6.1.6.2	<i>Fluoreszenzbasierende Bestimmung mittels NanoOrange<sup>®</sup></i> .....	102
6.1.7	Umpufferung und Konzentrierung proteinhaltiger Lösungen.....	103
6.1.7.1	<i>Dialyse</i> .....	103
6.1.7.2	<i>Gelfiltration</i> .....	103
6.1.7.3	<i>Größenausschluß Zentrifugation</i> .....	104
6.1.8	Biotinylierung von Proteinen .....	105
6.1.9	Kopplung biotilyierter Proteine/RNA an Dynabeads <sup>®</sup> .....	106

6.1.10	Proteinkopplung an Sepharose.....	106
6.1.11	Allgemeine chromatographische Methoden zur Proteinreinigung .....	108
6.1.11.1	Affinitätschromatographie über immobilisierte Metallionen.....	108
6.1.11.2	Affinitätschromatographie der GST-Fusionsproteine.....	109
6.1.12	Ionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose.....	111
6.2	Molekularbiologische Methoden.....	112
6.2.1	Allgemeine Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren.....	112
6.2.1.1	Phenol-Chloroform-Extraktion.....	112
6.2.1.2	Ethanolpräzipitation .....	112
6.2.1.3	Ammoniumacetatpräzipitation von RNA.....	113
6.2.1.4	Quantitative Nukleinsäurebestimmung .....	113
6.2.1.5	Agarose-Gelelektrophorese .....	114
6.2.1.6	Polyacrylamidgelelektrophorese .....	114
6.2.1.7	Isolierung von Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen .....	115
6.2.1.8	MicroSpin™ G-25.....	115
6.2.2	Enzymatische Methoden.....	116
6.2.2.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	116
6.2.2.2	Standard <i>in vitro</i> Transkription (TK).....	117
6.2.2.3	<i>In vitro</i> Transkription 1 .....	117
6.2.2.4	<i>In vitro</i> Transkription 2 .....	118
6.2.2.5	<i>In vitro</i> GMPS-Transkription .....	118
6.2.2.6	Biotinylierung der GMPS-RNA .....	119
6.2.2.7	DNaseI Hydrolyse .....	119
6.2.2.8	Reverse Transkription (RT).....	120
6.2.2.9	RT/PCR als „Eintopf“-Reaktion.....	120
6.2.2.10	5'-Dephosphorylierung von Nukleinsäuren .....	121
6.2.2.11	5'-Phosphorylierung dephosphorylierter RNA (Kinasierung) .....	122
6.3	Aptamere Selektion.....	122
6.3.1	Aptamere Selektion mit cyanobromidaktivierter Sepharose.....	122
6.3.2	Aptamere Selektion mit Dynabeads® .....	123
6.4	Klonierungsmethoden.....	124
6.4.1	Restriktionsverdau von doppelsträngiger DNA.....	124
6.4.2	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA Ligase .....	125
6.4.2.1	pGEM®-T Klonierung .....	125
6.4.2.2	T4-DNA Ligation der pET11a-, pGEX und pCMV-Tag 2B-Klonierung..	126
6.5	Bindungsstudien .....	126
6.5.1	Filterbindung an Nitrozellulosemembranen .....	126
6.5.2	Kompetitionsstudien der Aptamere K21 und K61.....	127
6.5.3	Kompetitionsstudie der His <sub>6</sub> -KIAA0403-ΔN291 und Cytohesin 1 Bindung.	127
6.5.4	Oberflächenplasmonresonanz (BIACORE).....	128
6.5.5	„Pull-down“-Experimente.....	129
6.5.6	GDP/GTP-Austausch an NΔ17ARF1 .....	130
6.6	Allgemeiner Umgang mit prokaryontischer Zellkultur .....	131
6.6.1	Plattenkultur .....	131
6.6.2	Flüssigkultur .....	131
6.6.3	Anlegen von Dauerkulturen.....	132
6.6.4	Bestimmung der Bakterienkonzentration in Flüssigkulturen .....	132
6.6.5	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien mittels CaCl <sub>2</sub> .....	132
6.6.6	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien.....	133
6.6.7	Rekombinante Proteinexpression in <i>E.coli</i> .....	133
6.6.7.1	Proteinexpression und Lyse der CYTIP-Konstrukte.....	133

6.6.7.2	<i>Proteinexpression und Lyse von His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291</i> .....	135
6.6.7.3	<i>Proteinexpression und Lyse der GST-KIAA0403-Konstrukte</i> .....	135
6.6.7.4	<i>Proteinexpression und Lyse des His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1</i> .....	136
6.6.7.5	<i>Proteinexpression und Lyse von GST-FHL2-Volllänge</i> .....	137
6.6.8	Plasmid-Präparation aus <i>E.coli</i> Bakterien .....	138
6.7	Eukaryontische Zellkultur .....	138
6.7.1	Allgemeiner Umgang mit eukaryontischer Zellkultur .....	138
6.7.2	Handhabung von Dauerkulturen .....	138
6.7.3	Transfektion von Plasmiden und Aptameren .....	138
6.8	SRE-Luciferase-Assay .....	138
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>138</b>
<b>8</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>138</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>138</b>
9.1	Proteinsequenzen (Aminosäuresequenz) .....	138
9.1.1	CYTIP Volllänge theoretisch .....	138
9.1.2	HIS <sub>6</sub> -CYTIP-PDZ .....	138
9.1.3	HIS <sub>6</sub> -CYTIP-PDZCC .....	138
9.1.4	HIS <sub>6</sub> -KIAA0403-ΔN291 .....	138
9.1.5	GST-KIAA0403 Volllänge .....	138
9.1.6	GST-KIAA0403-ΔN291 .....	138
9.1.7	GST-KIAA0403-ΔC125 .....	138
9.1.8	HIS <sub>6</sub> -FHL2 LIM0+1 .....	138
9.1.9	GST-FHL2 Volllänge.....	138
9.2	Vektorkarten.....	138
9.2.1	pET-15b Vektorsystem.....	138
9.2.2	pET-11a Vektorsystem.....	138
9.2.3	pET-28a(+) Vektorsystem.....	138
9.2.4	pGEX-Vektorsysteme .....	138
9.2.5	pGEM <sup>®</sup> -T Vektorsystem zur A-Überhangklonierung.....	138
9.2.6	pCMV Vektorsystem zur Eukaryontischen Überexpression.....	138
9.2.7	pEGFP-N1 für Luciferase Assays .....	138
9.3	Aptamerselektionsübersicht .....	138
9.3.1	His <sub>6</sub> -CYTIP-PDZ Selektion .....	138
9.3.2	His <sub>6</sub> -CYTIP-PDZCC Selektion.....	138
9.3.3	Biotin-His <sub>6</sub> -CYTIP-PDZ Selektion.....	138
9.3.4	Biotin-His <sub>6</sub> -KIAA0403-ΔN291 Selektion.....	138
9.3.5	His <sub>6</sub> -FHL2-LIM0+1 Selektion .....	138
9.3.6	Biotin-His <sub>6</sub> -FHL2-LIM0+1 Selektion und Schema .....	138
9.3.7	Biotin-GST-FHL2 Selektion und Schema .....	138
9.4	Biacore-Messung von dGRP1 .....	138
9.5	Filterbindungen Monoklone N20 und N25 .....	138
9.6	GST-Bindungs-Analyse von K21 und K61 .....	138
9.7	Mfold-Analyse der Punktmutationen von K21 .....	138
9.8	Präzipitationsassay des Selektionspuffer für die FHL2-Selektion.....	138
9.9	Filterbindungen His <sub>6</sub> -FHL2-LIM0+1 Selektion .....	138
9.10	Abkürzungsverzeichnis .....	138
9.11	Danksagungen.....	138

# 1 Einleitung

## 1.1 Funktionsaufklärung von zytosolischen Proteinen

Die menschliche Neugier und Faszination angesichts des komplexen Aufbaus des Lebens und der Geheimnisse seiner Funktionsweise haben von jeher die biomolekulare Forschung beflügelt. Nicht zuletzt durch die vollständige Sequenzierung des menschlichen Genoms im Jahre 2001<sup>[1]</sup> eröffnete sich den Wissenschaftlern ein völlig neuer Blickwinkel. Die große Herausforderung der Wissenschaft ist es, aus den Rohinformationen des in 30.000-40.000 Genen kodierten „Bauplans“, einen Zusammenhang der einzelnen Genprodukte in dem komplexen regulatorischen Geflecht biologischer Prozesse zu finden. Insbesondere die Art, Menge und Funktion der Proteine, die unter geregelten Bedingungen in einer Zelle exprimiert werden (Proteomik<sup>[2, 3]</sup>), ihr Zusammenspiel und potentielle Wechselwirkungen untereinander sind von großem Interesse. Zur Identifizierung und Funktionsaufklärung der Genprodukte, welche sich aus unterschiedlichen Spleißprodukten der mRNA ergeben, werden verschiedene Ansätze verfolgt.

Bei der Proteomik steht die Quantifizierung und Identifizierung der einzelnen Proteine oder Proteinpopulationen im Vordergrund. Hier kommen vor allem die zweidimensionale Gelelektrophorese<sup>[4, 5]</sup> und Massenspektrometrie<sup>[6, 7]</sup> zum Einsatz. Zur Identifikation von zellulären Interaktionspartnern existieren außerdem sehr gut etablierte Techniken, wie die „*yeast two hybrid*“-Strategie<sup>[8, 9]</sup>, die Koimmunopräzipitation<sup>[10, 11]</sup> und die Immunfluoreszenz-Mikroskopie<sup>[12]</sup>. Diese können erste Hinweise auf Proteinbindungspartner geben und somit Schlüsse auf Funktionalitäten zulassen.

Neben der Bestimmung der Proteinart sind zu deren Einordnung die Transkription und resultierende mRNA-Menge von enormer Bedeutung. Diese spezielle Art der Information liefert die „*microarray*“-<sup>[13-15]</sup>Technik, die in der Lage ist, gewebespezifisch sehr präzise Differenzialanalysen der mRNA zu erstellen, so dass ein Rückschluss von aktiven Genen auf bestimmte zelluläre Vorgänge gemacht werden kann. Der bei dieser Technik mögliche Vergleich von gesunden und kranken Gewebe/Zellen ist sehr informativ. Die Proteinmenge ist jedoch nicht direkt korrelierbar mit der entsprechenden mRNA-Menge der betrachteten Zelle. Diese Detailinformation ergibt sich bei der Verwendung von Antikörpern<sup>[16]</sup> mit Hilfe der Protein-„*microarray*“-Technik.

Die Bemühungen zur Funktionsaufklärung der Genprodukte werden durch Erkenntnisse der strukturellen Genomik<sup>[17-20]</sup> gestützt. Hierbei versucht man, ein erweitertes und präzises Verständnis der dreidimensionalen Faltstrukturen aller vom menschlichen Genom kodierten

Proteine zu erhalten. Aufgrund dieser Daten können dann Proteinfamilien, Proteindomänen und ihre Funktionsweise identifiziert werden, Abbildung 1.1.1.

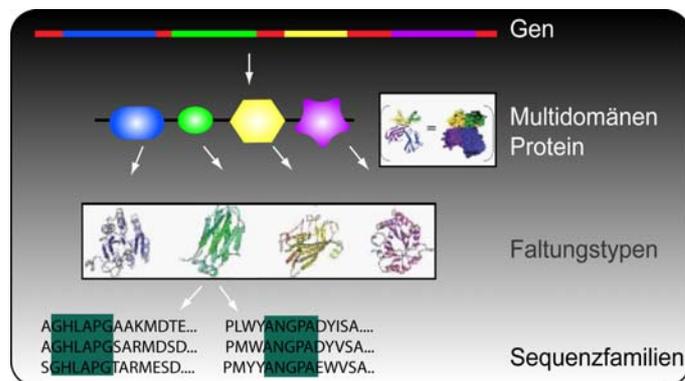


Abbildung 1.1.1: Von der Geninformation zum modularen Aufbau Multidomänenproteine und Rückschluss auf die Proteinfamilie<sup>[21]</sup>.

Methoden wie die Röntgenkristallographie<sup>[20]</sup> und die Kernresonanzspektroskopie<sup>[22]</sup> liefern die notwendigen Strukturinformationen, die für das tiefere Verständnis der Funktionsweise essenziell sind<sup>[23]</sup>. Diese Informationen können vor allem bei der späteren pharmazeutischen Entwicklung von Wirkstoffen von großem Vorteil sein. Die Entwicklung von QSAR-Modellen basierend auf der kristallographischen Struktur der Proteine ermöglicht ein rationaleres Vorgehen beim Design neuer Leitstrukturen<sup>[24]</sup>. Jedoch ist eine solche Art der Funktionsaufklärung (Korrelation von Proteinstruktur und Proteinfunktion) sehr mühsam und zum jetzigen Zeitpunkt von einem tiefen und einheitlichen Verständnis entfernt.

Eine der effektivsten Methoden zur Untersuchung einer ganz bestimmten Proteinfunktion im zellulären Kontext ist die direkte Inhibition durch Applikation von „*small-molecules*“, kleinen organischen Wirkstoffen mit hoher Spezifität und Affinität. Diese stehen jedoch in Anbetracht der Fülle von Proteinen nur für eine relativ kleine Population von Proteintargets zur Verfügung und werden durch aufwendige Screening-Verfahren, meist in der pharmazeutischen Industrie, unter hohem Material- und Ressourcenverbrauch aus sehr großen Substanzbibliotheken selektiert oder durch semirationales Design erhalten<sup>[25, 26]</sup>.

Zusätzlich stehen hier phänotypische Analysen zur Verfügung, die sich die Modifikation oder das Ausschalten der Genprodukte auf verschiedenen Ebenen, der Gene, mRNA und Proteine, mit Hilfe unterschiedlicher biotechnologischer Methoden zu Nutze machen und so die genetische Information in einen zellulären Zusammenhang stellen, Abbildung 1.1.2.

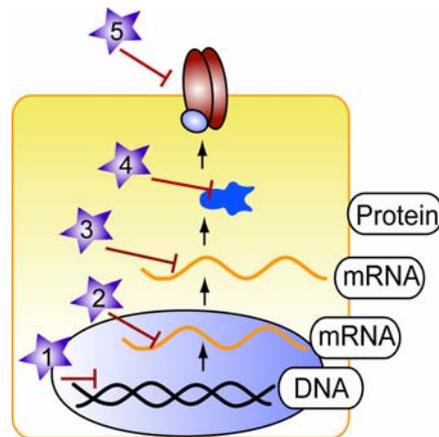


Abbildung 1.1.2 Manipulation der zellulären Erbinformation auf unterschiedlichen Ebenen. 1| Genetische Manipulation durch „Knockout“-Technologie auf der DNA-Ebene 2| Modulation der mRNA durch Antisense-Technologie 3| Abbau der mRNA mit Hilfe von siRNA oder Ribozymen 4| Inhibition der Genprodukte, Proteine durch kleine organische Moleküle, Intramere, Peptide 5| Ausschalten der extrazellulären Proteine durch kleine organische Moleküle, Aptamere, Peptide und Antikörper.

Eine Modulation der Genexpression wird bei der Konstruktion transgener Tiere unter Anwendung der „Knockout“-Strategie realisiert<sup>[27, 28]</sup>. Hierbei ist das zu untersuchende Genprodukt meist zu jeder Zeit in dem betroffenen Organismus ausgeschaltet, so dass die Funktionsuntersuchung in jedem Zelltyp stattfinden kann. Es können aber auch gewebe- und entwicklungsstadienabhängige „Knockouts“ zur weiteren spezifischen Untersuchung generiert werden. Nachteilig bei dieser Methode der Funktionsaufklärung ist einerseits die zeitaufwendige und arbeitsintensive Herstellung solcher Tiere, andererseits lassen sich die gewonnen Erkenntnisse nicht immer auf andere Systeme übertragen oder generalisieren. Auch können die phänotypischen Merkmale von den zuvor generierten *in vitro* Daten deutlich abweichen<sup>[27]</sup> und werden daher schwer interpretierbar. Generell spielen bei einem zu schwach ausgeprägten Phänotyp oft andere Effektoren eine Rolle. So ist der transgene Organismus zum Beispiel bei einer zu gravierenden Schädigung nicht mehr lebensfähig und die Funktionsweise des betreffenden Proteins zeichnet sich nur undeutlich oder gar nicht ab.

Die Techniken zur Modulation der mRNA, dem Gentranskript, sind in den letzten Jahren sehr intensiv weiterentwickelt worden. Die Verwendung von „*antisense*“ Oligonukleotiden (DNA)<sup>[29, 30]</sup> und Ribozymen<sup>[31]</sup> verhindert durch Hybridisierung das weitere Prozessieren der mRNA. Entweder wird so der Abbau der mRNA induziert (Rekrutieren der RNaseH) oder die Translationsmaschinerie inhibiert. Nachteilig wirken sich bei der „*Antisense*“-Methode jedoch eine erhöhte Zelltoxizität, geringe Stabilität und Spezifität aus<sup>[32]</sup>.

Die jüngste unter den Methoden zur mRNA Modulation ist die siRNA (*small interfering RNA*)<sup>[33-36]</sup>. Diese kurzen doppelsträngigen RNAs führen zeit- und kostensparend zu sehr spezifischer Degradation auf mRNA-Ebene. Jedoch ist die *in vivo* Applikation aufgrund der

Molekülgröße und Ladung des siRNA-Komplexes schwierig, so dass diese Methode zur Zeit hauptsächlich zur Targetvalidierung in Zellkulturstudien Anwendung findet<sup>[37]</sup>. Der große Unterschied zu den Gen-Knockout-Strategien ist die reversible Modulationen der mRNA-Transkripte in einem definierten Zeitrahmen, welche eine Zerstörung der mRNA und die Dezimierung der Endproduktkonzentration zur Folge hat. Genauso wie schon bei der Studie der transgenen Organismen macht dies eine Interpretation relativ schwierig, da bei der Untersuchung von größeren Proteinassoziationskomplexen das erzeugte Ungleichgewicht beim Fehlen des betreffenden Proteins unvorhersagbar kompensiert wird<sup>[38]</sup>. Auch eine Betrachtung einzelner Domänenfunktionalitäten ist nicht möglich.

Direkte Proteininhibitionsstrategien zur Funktionsaufklärung, die nicht auf ein radikales Ausschalten der zu untersuchenden Komponente bauen, sind bei solch einer Betrachtung im Vorteil. Hierbei sind vor allem kleine Moleküle, aber auch Antikörper, Peptide und so genannte Aptamere als Inhibitoren zu nennen. Diese können selektiv eine bestimmte Domäne oder das gesamte Protein ohne Auswirkung auf die Proteinkonzentration des Zellkompartiments ausschalten.

Auf das Potential und die damit verbundenen Probleme bei der Suche nach organischen targetspezifischen kleinen Molekülen wurde bereits hingewiesen. Eine weitere Klasse sehr spezifisch bindender Inhibitoren stellen monoklonale Antikörper dar. Diese sind jedoch aufgrund des reduzierenden zellulären Milieus nur extrazellulär einsetzbar und bei deren Generierung zeigt auch nur jeder 200ste eine inhibitorische Wirkung. Eine Lösung des Problems der limitierten Einsetzbarkeit versprach die Entwicklung von disulfidbrückenfreien Peptiden, Anticalinen und *single chain* Antikörperfragmente (*scFv*)<sup>[39, 40]</sup>, welche weniger Stabilitätsprobleme innerhalb der Zelle aufweisen. Jedoch ist die schwierigere zelluläre Applikation der Proteine und Peptide hierbei nachteilig. Weitere sehr spezifische Proteininhibitoren sind so genannte Aptamere oder Intramere. Bei ihnen handelt es sich um einzelsträngige hochaffine Nukleinsäuren, die sowohl extra- als auch intrazellulär inhibitorische Wirkung zeigen.

## 1.2 Aptamere

Als Aptamere (abgeleitet aus dem lateinischen *aptus* für passend und griechischen *meros* für Teil) bezeichnet man synthetische einzelsträngige DNA oder RNA Moleküle mit hochaffinen und spezifischen Bindungseigenschaften.

Die auf einem evolutiven Prozess basierende Aptamere Selektion wurde 1990 unabhängig von G. F. Joyce<sup>[41]</sup>, J. W. Szostak<sup>[42]</sup> und von L. Gold<sup>[43]</sup> entwickelt. Hierbei werden spezifisch

bindende Nucleinsäuren aus sehr großen kombinatorischen Nucleinsäurebibliotheken, mit einer Speziesanzahl von  $10^{12}$  bis  $10^{15}$ , in einer *in vitro* Selektion, aufgrund ihrer spezifischen Bindungseigenschaften an das Target, selektiert, Abbildung 1.2.1. Diese Methode wird auch als SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment*) bezeichnet.

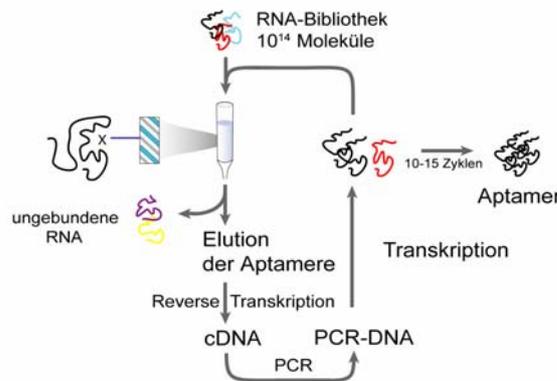


Abbildung 1.2.1: Schematische Darstellung des RNA Aptamerprozesses.

Die sehr große Diversität von Molekülen zu Beginn jeder SELEX wird durch einen randomisierten Bereich der Oligonucleotidbibliothek (variabel in der Länge) erreicht, welche die Speziesanzahl von maximal  $4^n$  ausmacht. Eine weitere Grundvoraussetzung dieser evolutiven Methode ist die Amplifizierbarkeit der Nucleinsäurebibliothek und die Anreicherung der bindenden Spezies durch ihre Affinität zum Target. Nach Inkubation der Nucleinsäurebibliotheken (DNA oder RNA) mit dem zu selektierenden Target werden die bindenden Spezies von den hauptsächlich ungebundenen abgetrennt. Hier stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung, von der Immobilisierung des Targets bis hin zur Trennung aufgrund physikoschemischer Eigenschaften der Target-Aptamerkomplexe<sup>[44-50]</sup>. Die eluierten Spezies werden anschließend mit Hilfe der PCR amplifiziert, bzw. bei Vorliegen von RNA zuerst mittels reverser Transkription in die entsprechende cDNA überführt. Die amplifizierte DNA (angereichert mit bindenden Spezies) bzw. die nach einem zusätzlichen Transkriptionsschritt erhaltene RNA, kann in einen erneuten Selektionszyklus mit dem Target inkubiert werden. Eine immer wiederkehrende Abfolge dieser Schritte ermöglicht es, unter einem vorgegebenen Selektionsdruck aus einer sehr diversen Bibliothek hochspezifische Aptamere mit einer Dissoziationskonstanten im niedrigen nanomolaren bis hohem pikomolaren Bereich zu selektieren.

Aptamere besitzen die Fähigkeit, sehr stabile dreidimensionale Strukturen auszubilden, welche die Faltung des Targets erkennen. Aufgrund ihrer sequenzabhängigen Faltung sind sie in der Lage, durch van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbildung und elektrostatische Interaktionen mit ihrem Target in eine spezifische Wechselwirkung zu treten und es sowohl *in*

*vitro* als auch *in vivo* durch diese Interaktion zu inhibieren. Ein prominentes Beispiel hierfür ist das Anti-Thrombin-Aptamer, das durch seine intramolekulare G-Quadruplexstruktur in der Lage ist, die thrombinkatalysierte Blutgerinnung zu unterdrücken, Abbildung 1.2.2 .

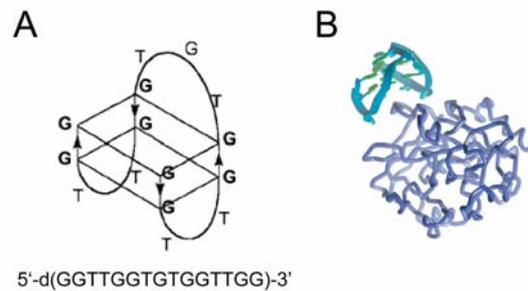


Abbildung 1.2.2: DNA Anti-Thrombin-Aptamer G-Quadruplexstruktur. A) Sequenz des Aptamers und schematische Struktur<sup>[51]</sup>. B) Thrombinaptamer (türkis) in spezifischer Wechselwirkung mit seinem Interaktionspartner (blau)<sup>[52]</sup>.

In vielen Fällen geschieht die Inhibition der Targetmoleküle durch eine sehr spezifische lokale Bindung der katalytisch aktiven Bindungstasche<sup>[53]</sup>. Es sind aber auch Beispiele bekannt, bei denen eine größere Proteinfläche abgedeckt wurde, wie beim Anti-NF- $\kappa$ B-Aptamer<sup>[54]</sup>. Aptamere zeigen hochselektive Eigenschaften, wie am Beispiel des PKC- $\beta$ II bindenden Aptamers gezeigt wurde, das sein Target mit einer nanomolaren Affinität gegenüber der Spleißvariante PKC- $\beta$ I bindet<sup>[55]</sup>. Ein weiteres Beispiel stellt das ERK-2 MAP-Kinase Aptamer dar, welches das phosphorylierte Protein von der unphosphorylierten Variante unterscheiden kann<sup>[56]</sup>. Das Anti-Cytohesin 2 Aptamer **K61**<sup>[57]</sup> besitzt ebenfalls ein sehr feines Diskriminierungsvermögen gegenüber dem zu 90 % homologen Cytohesin 1. Diese Eigenschaften machen die Aptamere besonders zur Funktionsaufklärung geeignet.

In der Zwischenzeit wurde eine große Vielzahl von Aptameren gegen verschiedenste Zielmoleküle selektiert. Unter anderem gehören dazu organische Moleküle<sup>[58, 59]</sup>, Aminosäuren<sup>[60, 61]</sup>, Peptide<sup>[62]</sup>, intra- bzw. extrazelluläre Proteine<sup>[63, 64]</sup> sowie Viren<sup>[65-67]</sup> und Parasiten<sup>[68]</sup>. Durch die Weiterentwicklung des SELEX-Prozesses zur automatisierfähigen Selektion durch Eulberg et al.<sup>[69]</sup>, Cox und Ellington<sup>[70-72]</sup> kann diese optimierte Methode für eine Hochdurchsatzselektion und Parallelisierung angewendet werden. Dies macht das SELEX-Verfahren als automatisierte Technik besonders für die industrielle Forschung und speziell für die Targetvalidierung sehr interessant. Aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften sind jedoch nicht alle Proteintargets für eine standardisierte Aptamerselektion geeignet, so dass immer noch eine individuelle Optimierung der Selektionsbedingungen erforderlich ist<sup>[73]</sup>. Bestimmte Proteinregionen, können eine Aptamerselektion auch nahezu unmöglich machen<sup>[74]</sup>, wie beispielsweise sehr acide oder sterisch gehinderte Domänen.

### 1.2.1 Applikation von Aptameren/Intrameren

Aufgrund der spezifischen, inhibitorischen Wechselwirkung der Aptamere sind diese geradezu prädestiniert für die *in vivo* Applikation. Vergleichbar mit dem Einsatz von Antikörpern [1.1] lassen sich hierbei extrazelluläre Proteine und Proteindomänen durch deren Inhibition untersuchen. Die relativ schlechte Pharmakokinetik, zurückzuführen auf eine geringe Nukleaseresistenz und schnelle Nierenausscheidung, machen eine *in vivo* Applikation jedoch komplizierter. Das Problem des schnellen Aptamerabbaus kann durch eine chemische Stabilisierung des Phosphatrückgrats, durch Einführen von Schutzgruppen an der 2'-Hydroxygruppe der Ribose (Fluoro- oder Methoxygruppen) sowie eines chemischen „capping“ der 5'- und 3'-Termini zum Schutz vor Endo- bzw. Exonukleasen unterbunden werden<sup>[75-77]</sup>. Die hier erzielten Serumhalbwertszeiten liegen typischerweise im Bereich von sechs Stunden bei Ratten und von neun bis zwölf Stunden bei Primaten<sup>[78, 79]</sup>. Allerdings kann eine chemische Modifikation zur Beeinträchtigung der Selektivität und Bindungsstärke des Aptamers führen. Am Beispiel des Anti-VEGF-Aptamers<sup>[80, 81]</sup> (*vascular endothelial growth factor*) konnte gezeigt werden, dass für eine weiterhin gute Affinität zwei natürliche Adenosine essentiell sind.

Eine weitere Möglichkeit zur Verlängerung der Serumhalbwertszeit besteht in der Verwendung von so genannten Spiegelmeren<sup>[82, 83]</sup>. Bei dieser RNA-Spezies handelt es sich um das L-konfigurierte Enantiomer, das von Nukleasen nicht als natürliches Substrat erkannt wird. Zur Vermeidung einer schnellen renalen Ausscheidung sollten die therapeutisch eingesetzten Moleküle eine Ausschlussgröße von mindestens 40 kD besitzen, um eine verlängerte Zirkulationszeit zu erhalten. Die Stabilisierung von Aptameren durch Konjugation mit hochmolekularem Polyethylenglykol (PEG) führte in mehreren Beispielen zu einer Verlängerung der biologischen Verfügbarkeit. Am Beispiel des Anti-Thrombin-Aptamers wurde in Ratten durch die Einführung des 40 kD PEG am 5'-Terminus eine Halbwertszeitverlängerung von 24 Minuten auf sechs Stunden erzielt, ohne einen Bindungsverlust hinnehmen zu müssen<sup>[74, 84]</sup>.

Intrazelluläre Aptamere, so genannte „Intramere“, ermöglichen es genauso wie kleine organische Moleküle, das Zielprotein selektiv im Zellinneren zu binden und im betreffenden zellulären Kompartiment zu inhibieren. Mehrere Studien demonstrierten, dass eine intrazelluläre Applikation von Aptameren ohne eine chemische Stabilisierung durch Expression des betreffenden Oligonukleotids<sup>[85, 86]</sup> oder durch Transfektion möglich ist<sup>[57]</sup>. Intrazellulär exprimierte Aptamere, die sich gegen das HIV-Rev und Tat richten, zwei

wichtige RNA-bindende Proteine beteiligt an der HIV-1 Replikation, wurden erfolgreich in Zellkultur inhibiert <sup>[87, 88]</sup>.

Ein weiteres erfolgreiches Beispiel stellt das Anti-B52 Aptamer dar, ein *Drosophila melanogaster* mRNA Spleißfaktor<sup>[89]</sup>. Transgene Mutanten mit sehr hohem oder extrem niedrigem Expressionsniveau leiden an Entwicklungsstörungen<sup>[90]</sup> oder sind nicht lebensfähig, wie im Falle der Deletionsmutanten<sup>[91]</sup>. Diese Effekte wurden erfolgreich neutralisiert, durch die Expression des spezifisch bindenden Aptamers in den Mutanten, die das B52 überexprimierten. Im Gegensatz dazu verursachte die *in vivo* Überexpression des Aptamers beim entsprechenden Wildtyp einen letalen Phänotyp, aufgrund der niedrigen Proteinmenge.

Theis et al.<sup>[57]</sup> konnten ein spezifisches Anti-Cytohesin 2 Aptamer (**K61**) selektieren, welches ohne ein weiteres Expressionssystem und ohne chemische Stabilisierung direkt in die Zellen transfiziert wurde, ohne dass ein gravierender Aptamerabbau zu detektiertem war (bis zu sechs Stunden nach Serumstimulation). Dabei war es mit Hilfe des **K61** Aptamers möglich, durch die Inhibition von Cytohesin 2 eine negative Regulation der MAPK Aktivierung und Unterbrechen der „*outside-in*“ Signaltransduktion zu erzielen.

Diese Beispiele verdeutlichen das große Potential der Intramere für die biologische Funktionsaufklärung zytoplasmatischer Proteine. Der Vorteil gegenüber der mRNA-Translationsinhibition bzw. des mRNA-Abbaus und transgener Tiermodelle lässt sich durch die individuelle, domänenspezifische Wechselwirkung erklären.

Die hochaffinen und spezifischen Bindungseigenschaften der Aptamere können aber auch in Form von Biosensoren zur molekularen Erkennung genutzt werden. Hierbei sind vor allem Anwendungen als Detektoren in der klinischen Diagnostik<sup>[92, 93]</sup> und zu Forschungszwecken in molekular arbeitenden Laboren zu erwähnen, wo sie zur Proteinidentifizierung und zur spezifischen Proteinreinigung als Affinitätsmatrix<sup>[94, 95]</sup> Verwendung finden. Der Einsatz der Aptamere *per se* in einer therapeutischen Applikation ist der nächste denkbare Schritt und wurde bei Indikationen wie Entzündungsprozessen, Krebs und bei der antikoagulativen Therapie bereits angegangen<sup>[96, 97]</sup>. Auch wenn diesbezüglich große Anstrengungen zur Anwendung der Aptamertechnologie als therapeutische Methode unternommen wurden, sind bis jetzt nur wenige Beispiele in der klinischen Phase<sup>[52]</sup> zu finden.

### 1.3 „Scaffold“-Proteine in der Signaltransduktion

Eine kontrollierte Signalweiterleitung, welche beispielsweise Zellwachstum, -teilung, Migration oder Adhäsion zur Folge hat, ist sehr wichtig zur Aufrechterhaltung der Zellebensfähigkeit. Bei der Übermittlung von extrazellulären Signalen ins Innere durch verschiedene chemische Botenstoffe, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren (EGF = *epidermal growth factor*, PDGF = *platelet-derived growth factor*)<sup>[98, 99]</sup> und Cytokine, binden diese spezifisch an transmembrane Rezeptoren, die aufgrund dieser Wechselwirkung zum Beispiel phosphoryliert werden oder dimerisieren. Dadurch findet eine Rekrutierung zytoplasmatischer Proteine an die Plasmamembran bzw. die Aktivierung weiterer Effektoren in der Signaltransduktionskaskade statt. Bei den rekrutierten Effektoren kann es sich um zytosolische Proteine, Lipidkinasen<sup>[100, 101]</sup>, Phosphatasen, Transkriptionsfaktoren oder andere enzymatisch aktive Proteine wie die GEFs (*guanine exchange factor*)<sup>[102]</sup>, GAPs (GTPase-aktivierenden Proteine)<sup>[101]</sup> bzw. Mitglieder einer wachsenden Familie von multifunktionalen Adapterproteinen<sup>[103]</sup> handeln.

Die intrazelluläre Signaltransduktion umfasst somit eine Vielzahl von Protein-Assoziationen, -wechselwirkungen und bedarf einer gezielten Kontrolle dieser Multiproteinkomplexe. Freie Diffusion einzelner Signalkomponenten, wie beispielsweise der Kinasen und ihrer Substrate, würden in einer unkontrollierten Wechselwirkung und Aktivierung resultieren und hätten nur eine geringe Signaleffizienz zur Folge, Abbildung 1.3.1 (A).

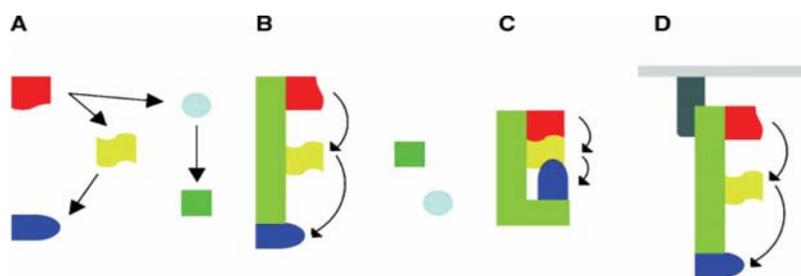


Abbildung 1.3.1: Schematisch dargestellte Funktionsweise der „Scaffold“-Proteine in der Signalvermittlung. A| Freie Diffusion der Kinasen und Substrate führt zur unkontrollierten Proteinwechselwirkung/Aktivierung (geringe Signaleffizienz). B| Die Bindung der Kinasen und Substrate an ein „Scaffold“-Protein (grün) ermöglicht eine kontrollierte Reihenfolge der Aktivierung (spezifisches Signal). C| Das „Scaffold“-Protein (grün) induziert eine allosterische Aktivierung der Interaktoren (Signalverstärkung). D| Interaktionen mit einem membranverankerten Adapterprotein (dunkel grün) des „Scaffold“-Proteins (grün) führen zur Lokalisierung des Signals.<sup>[104]</sup>

Möglichkeiten der Regulation bieten die subzelluläre Lokalisation und Aktivierung. „Scaffold“-Proteine (Gerüstproteine) übernehmen in diesem Zusammenhang den regulatorischen Part der lokalen Zusammenführung einzelner Interaktoren und forcieren somit eine gerichtete Protein-Protein-Interaktion (PPI). Dies führt zu einem spezifischen Signal, Abbildung 1.3.1 (B). Weiter kann die Signaltransduktion durch eine allosterische Aktivierung

der einzelnen Interaktoren aufgrund ihrer Bindung an das „*Scaffold*“-Protein verstärkt werden, Abbildung 1.3.1 (C). Die Beschränkung auf ein spezifisches Kompartiment und die lokale Wirkung des Signals wird durch eine weitere Wechselwirkung des „*Scaffold*“-Proteins mit beispielsweise membranständigen Adapterproteinen realisiert, Abbildung 1.3.1 (D). „*Scaffold*“-Proteine stellen somit eine Interaktionsplattform für PPI dar und dienen zu dessen Lokalisation als Anker-moleküle zum Aufbau größerer signalvermittelnder Proteinkomplexe, meist ohne eigene enzymatische Aktivität.

### 1.3.1 Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) Signalweg

Der mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) Signalweg ist ein Beispiel für die Übersetzung äußerer Signale durch aktivierte Zelloberflächenrezeptoren in intrazelluläre Transkriptionsfaktoren. Auf diese Weise wird unter anderem die Genexpression reguliert. Diese evolutiv sehr konservierte Signaltransduktionskaskade, die über den Ras-Raf-MEK-ERK/MAPK [*MEK* = MAPK und ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*) Kinase] Weg erfolgt, ist an fundamentale zelluläre Prozesse wie beispielsweise die Zellproliferation, -differenzierung, Apoptose und Migration beteiligt, Abbildung 1.3.2 (A).<sup>[105]</sup>

Zytosolische Proteine wie GRB2 (*growth factor receptor-bound protein*) und SOS (*son-of-sevenless*) vermitteln das Rezeptorsignal und aktivieren das kleine GTPase Protein Ras durch den katalytischen Austausch von GDP zu GTP. Dieses aktive GTP-Ras wiederum führt zur Aktivierung der Serin/Threonin Kinase Raf, die in einer Kaskade von Phosphorylierungen unterschiedlicher Kinasen wie der Raf, der MAPK, der ERK Kinase MEK und der ERK/MAPK endet und letztlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt.

Auch hier wird die Regulation der Kaskade beispielsweise durch das „*Scaffold*“-Protein KSR1 (*kinase suppressor of Ras-1*) kontrolliert, Abbildung 1.3.2 (B). KSR1 stellt in dieser Signalkaskade eine Interaktionsplattform, die alle Kinasen des ERK/MAPK Signalwegs bindet, wobei MEK permanent gebunden ist. Die Kinasen Raf-1 und ERK/MAPK interagieren wahrscheinlich in einer stimulierbaren Reihenfolge. Dadurch wird das von außen kommende Signal sehr kontrolliert vermittelt. Die Regulation des „*Scaffold*“-Proteins KSR1 selbst wird durch eine Fülle von Proteinen gewährleistet, die unter anderem dafür sorgen, dass es sich in seinem inaktiven Zustand im unlöslichen Zellkompartiment der Zelle in Assoziation mit 14-3-3 und IMP (*impedes mitogenic signal progation*) befindet. Die Stimulation von aktiviertem GTP-Ras bewirkt die Desphosphorylierung des Serins S392. Diese erfolgt aufgrund der Assoziation der Phosphatase-2A (PP2A) Untereinheit B mit A und C, welche permanent an KSR lokalisiert sind. Die Folge ist eine Abkopplung von 14-3-3 und die

Relokalisation von KSR zur Plasmamembran. Diese Funktion verdeutlicht noch einmal die wichtige Rolle der „Scaffold“-Proteine innerhalb der Signaltransduktion und auch den komplexen Bedarf ihrer eigenen Regulation.

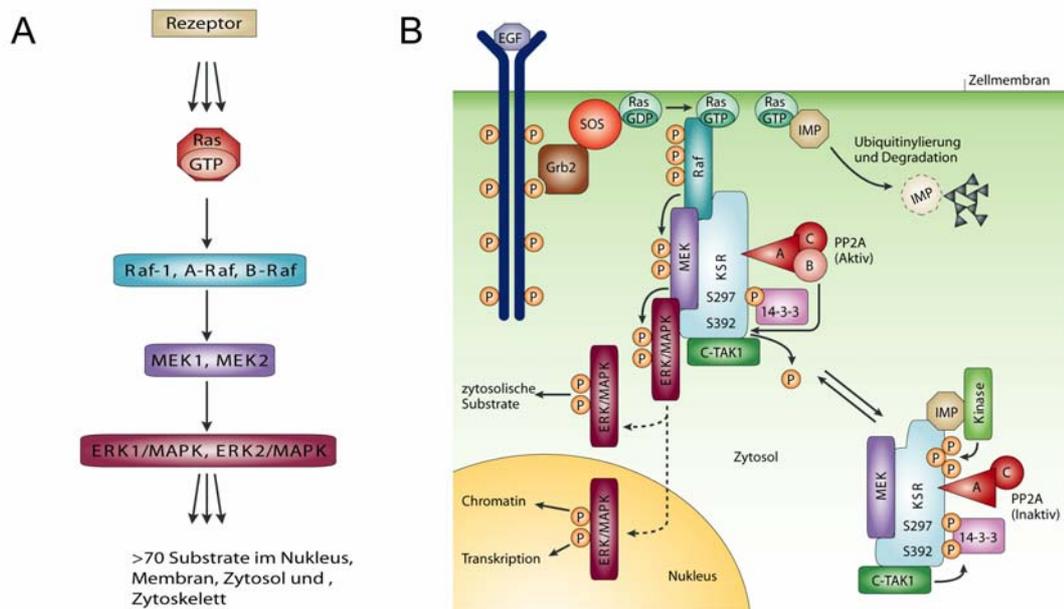


Abbildung 1.3.2: Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) Signalweg. A| Vereinfachte Darstellung der Signaltransduktion über die GTPase Ras, welche alle drei Isoformen von Raf (Raf1, A-Raf, B-Raf) aktiviert. Diese Aktivierung führt zu einer Kaskade von Phosphorylierungen der MAPK und ERK Kinase (MEK1 und 2) und ERK/MAPK, welcher Haupteffektor dieser Kaskade ist und mehr als 70 Substrate aktiviert. B| KSR regulierter Zyklus. Der inaktive Kinase Suppressor von Ras (KSR) befindet sich durch das 14-3-3 Protein und die Hyperphosphorylierung von IMP in einem tritonunlöslichen Kompartiment. Durch äußere Stimulation (EGF) erfolgt die Rekrutierung von GRB2 und SOS, welche wiederum das Ras aktivieren. GTP-Ras stimuliert die Protein Phosphatase-2A (PP2A) Untereinheit B und deren Bindung an Untereinheit A und C (permanent am KSR gebunden). Es folgt die Desphosphorylierung des Serin S392 und eine Relokalisation von KSR zur Plasmamembran. KSR ist es nun möglich, die Phosphorylierung von MEK durch Raf zu steuern und die Bildung des aktivierten ERK/MAPK zu beschleunigen, welches weitere Substrate phosphoryliert (Nuklear und Nichtnuklear). Die Inaktivierung von KSR erfolgt durch eine Ras-induzierte Phosphorylierung (nicht gezeigt), die Rephosphorylierung des Serins S392 durch C-TAKT (*Cdc25C-associated kinase-1*) und wahrscheinlich einer Assoziation und Phosphorylierung durch IMP.<sup>[105]</sup>

### 1.3.2 Proteininteraktionsdomänen

Zur effizienten Regulation und Zusammenführung unterschiedlicher Proteininteraktoren müssen „Scaffold“-Proteine die Fähigkeit besitzen, eine definierte Menge an Proteinen parallel zu binden. Zwei Faktoren, die Proteinbindungsdomänen und die zellulären Bedingungen (z.B. untergeordnete lokal vorkommende Effektoren), spielen hierbei eine entscheidende Rolle. PPI werden von modularen Interaktionsdomänen vermittelt. Prominente Beispiele hierfür sind die oft nach archeotypischen Genen und Proteinen bezeichneten Domänen wie SH2/SH3 (*src* Homologie)<sup>[100]</sup>, PDZ (PSD-95 = *postsynaptic density*, DlgA *Drosophila separate junction protein disc-large* und *tight junction protein ZO-1*)<sup>[106]</sup>, LIM (*lin-11*, *isl1* und *mec-3*) [1.5] und phosphotyrosinbindende Domäne (PTB)<sup>[100]</sup>. SH2/SH3 und

PTB erkennen und binden Proteine mit phosphorylierten Tyrosinseitenketten aber hauptsächlich jedoch Wachstumsfaktorrezeptoren. Protein-Lipid Interaktionen werden durch die Pleckstrin-Homologie (PH) Domäne ermöglicht, die mit Phosphatidylinositol-Lipiden interagieren, was zu einer Plasmamembranrekrutierung führt (Lokalisationskontrolle)<sup>[107]</sup>.

Weitere Interaktionsdomänen wie das PDZ Motiv und die „coiled coil“ Domänen (CC) sind in verschiedenen Signaltransduktionswegen involviert. Die PDZ-Domäne besteht aus ca. 90 Aminosäuren. Aufgrund ihrer Domänenstruktur eines  $\alpha$ - $\beta$ -Sandwiches aus fünf  $\beta$ -Faltblättern und zwei  $\alpha$ -Helices ist es ihr möglich, carboxyterminale Tripeptide (S/TXV) und Phosphatidylinositol-Lipide zu binden bzw. Homo- bzw. Heteromere auszubilden<sup>[108]</sup>, Abbildung 1.3.3 (A).

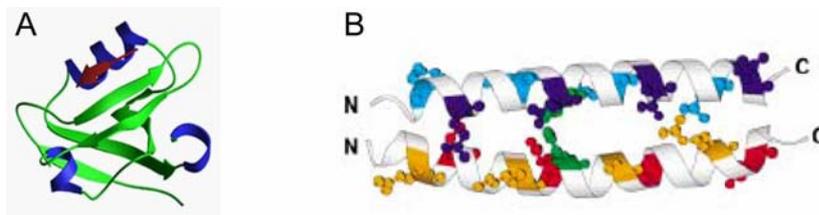


Abbildung 1.3.3: A|  $\alpha$ - $\beta$ -Sandwich-Faltstruktur der PDZ-Domäne von PSD-95 (*post-synaptic density protein 95*) gebunden am TKNYKQTSV Peptid<sup>[109]</sup>. B| Kristallstruktur des CC-Dimers GCN4 Leucin Zippers<sup>[110]</sup>.

Die CC-Domäne, ein sehr verbreitetes Strukturmotiv (3-5 % aller Proteine), ist typischerweise aus zwei bis fünf  $\alpha$ -Helices aufgebaut, Abbildung 1.3.3 (B). Zuerst von Crick<sup>[111]</sup> 1953 beschrieben, veröffentlichte Pauling und Corey im selben Jahr das Modell von  $\alpha$ -Keratin<sup>[112]</sup>. Es dauerte ganze 40 Jahre bis die Kristallstruktur von Albert et al.<sup>[113]</sup> am Beispiel des GCN4 Leucin Zippers publiziert wurde. Das CC Strukturmotiv ist in vielen bedeutenden Strukturproteinen zu finden ist, die beispielsweise in der Transkriptionskontrolle beteiligt sind. Viele Transkriptionsfaktoren besitzen neben einer Aktivierungs- (Regulierung) und einer basischen DNA-bindenden Domäne ebenfalls eine CC-Domänen. Eine inkorrekte Faltung der CC-Domäne und der damit einhergehende Funktionsverlust werden als ein möglicher Faktor der Krebsentstehung vermutet.

Beispielsweise bilden c-Fos und c-Jun, die Proteinprodukte aus den Proto-Onkogenen *c-fos* und *c-jun*, CC-Heteromere (Transkriptionsfaktor AP-1). Sie modulieren die Transkriptionsaktivität verschiedener Gene (Interleukine (IL-2, -3, -4, -5), TNF $\alpha$ , p53) als Antwort auf die Mitogenaktivierung (MAP-Kaskade)<sup>[114, 115]</sup>, wobei c-Fos selbst ein Substrat der MAP-Kinasen ist [1.3.1]. Die Phosphorylierung von c-Fos wird durch Erk-Kinasen vermittelt und verhindert dessen Degradation<sup>[115]</sup>. Im regulatorischen Element der Promotorregion des *c-fos* Gens finden sich eine Reihe von Bindestellen für sechs verschiedene Transkriptionsfaktoren,

u. a. für SRF (*serum response factor*) und TCF (*ternary complex factor*). Diese beiden Regionen werden unter dem Begriff „*serum response element*“ (SRE) zusammengefasst<sup>[116]</sup>. Aber auch andere signalvermittelnde Proteine wie die Familienmitglieder der kleinen Guanin Austauschfaktoren (GEF), der Cytohesine, verfügen mitunter über CC-Domänen, welche sowohl Homo-, als auch Heteromere ausbilden können. Laut neuester Publikationen werden sie zur Feinregulation und Modulation der Austauschaktivität benötigt<sup>[117-123]</sup> [1.4]. Diese komplexen Interaktionen der Cytohesine und die Beteiligung an verschiedenen Signaltransduktionen sind in weiten Teilen bisher nur unvollständig verstanden.

## 1.4 Modulatoren der Cytohesine

Die Familie der Cytohesine besteht aus vier Mitgliedern, Cytohesin 1<sup>[85, 124]</sup>, Cytohesin 2/ARNO (*ARF nucleotide binding site opener*)<sup>[125]</sup>, GRP1 (*general receptor for phosphoinositides 1*)/ARNO 3<sup>[126]</sup> und Cytohesin 4<sup>[127]</sup>, den kleinen BFA (Brefelin A, Pilztoxin) insensitiven GEFs. Das modular aufgebaute Cytohesin besteht aus einer N-terminalen CC-Domäne, welche als Interaktionsplattform zur Bildung von Homo- und Heteromeren dient [1.3.2]. Die zentrale katalytisch aktive Sec7 Domäne (ca. 200 Aminosäuren) ist für den Nukleotidaustausch (GDP→GTP) an ARFs<sup>[102]</sup> (ADP-Ribosylierungsfaktoren) zuständig. Bei den ARFs handelt es sich um molekulare Schalter mit sechs Isoformen in Säugern, die zur Superfamilie der kleinen Ras GTPasen gehören. Mitglieder dieser Familie können zwischen einer inaktiven GDP- und einer aktiven GTP-gebundenen Form wechseln. Ihre Hauptfunktion liegt in der Regulation des Vesikeltransports<sup>[128]</sup>. C-terminal besitzen die Cytohesine eine PH-Domäne (Membranrekrutierung) [1.3.2] und eine weitere polybasische Domäne, Abbildung 1.4.1.

Sie sind in unterschiedlichen biologisch wichtigen Funktionalitäten eingebunden, die von der Regulation der  $\beta$ 2 Integrin Adhäsion<sup>[119]</sup> über die Kontrolle der Zytoskelettremodellierung<sup>[129, 130]</sup> und des Vesikeltransports<sup>[128]</sup> bis hin zur Regulation des MAP-Signalwegs<sup>[57, 131]</sup> reichen. Nähere Untersuchungen konnten eine Lokalisation dieser Proteinklasse sowohl im Zytoplasma, als auch an der Plasmamembran bestätigen, Tabelle 1.4.1.

ARF GEF	Membranlokalisierung	Funktion	Interaktionspartner	BFA Antwort
Cytohesin 1	Plasmamembran	Regulation der $\beta 2$ Integrin Adhäsion, synaptische Transmission	ARF1	resistent
Cytohesin 2/ ARNO	Plasmamembran, Endosom	Remodellierung des Aktinzytoskeletts, Desensibilisierung G-proteingekoppelter Rezeptoren, Aktivierung der $Ca^{2+}$ -regulierten Exozytose, Regulierung der dendritischen Verzweigung und Zellmigration, MAPK Signalweg assoziiert	ARF1-3, ARF6	resistent
GRP1/ARNO3	Plasmamembran	Wachstumshormonsignalübertragung	ARF1, ARF6	resistent
Cytohesin 4	nb	nb	ARF1; ARF5	resistent

Tabelle 1.4.1: Cytohesinfamilie der kleinen ARF spezifischen GEFs, welche eine Homologie zum Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) Protein Sec7 aufweisen. GEF, *guanine exchange factor*, BFA, Brefelin A, ARNO, *ARF nucleotide binding site opener*, GRP1, *general receptor for phosphoinositides 1*<sup>[102]</sup>, nb, nicht bekannt.

Trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet sind einige Aspekte der Feinregulation, wie z.B. der Membranrekrutierung und der spezifischen Unterscheidung zwischen einzelnen ARF-Mitgliedern, noch weitgehend unverstanden. Die Entdeckung der CC-Binder und Modulatoren als mögliche „*Scaffold*“-Proteine zur Feinregulierung und Lokalisation der Cytohesinvermittelten biologischen Vorgänge, stellt ein weiteres Bindeglied im großen regulatorischen Geflecht dar, Abbildung 1.4.1.

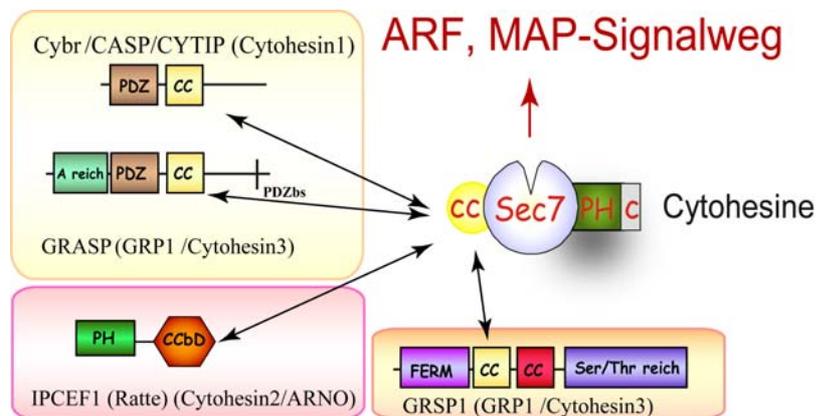


Abbildung 1.4.1: CC-Binder und Modulatoren der Cytohesin Familie. Vertreter der einzelnen Familien sind Cybr/CASP/CYTIP und GRASP, welche eine PDZ- und CC-Domänenstruktur aufweisen und zwei weitere unabhängige CC-Modulatoren unterschiedlicher Domänenkonstellation IPCEF1 und GRSP1. In Klammern ist das jeweilig gefundene GEF aus dem „*yeast two hybrid*“-Screening aufgeführt. ARF, *ADP-ribosylation factor*, MAP, *mitogene activated protein*, Cybr, *cytohesin binder and regulator*, CASP, *cytohesin associated scaffold protein*, GRASP, *GRP1-associated scaffold protein*, IPCEF1, *interaction protein for cytohesin exchange factors 1*, GRSP1, *GRP1 signaling partner*, CC, *coiled coil*, PH, *pleckstrin homology*, CCbd, *Coiled coil binding domain*, FERM, *protein 4.1, ezrin, radixin, moesin*.

In den letzten Jahren wurden Cytohesinregulatoren drei unterschiedlicher Proteinfamilien bezüglich ihrer Domänenstruktur klassifiziert. Zur ersten Proteinfamilie gehören Cybr<sup>[117]</sup>, CASP<sup>[118]</sup>, CYTIP<sup>[119]</sup> und GRASP<sup>[122]</sup>, die sich durch ihre zelltypspezifische Expression und den Grad der Homologie unterscheiden. IPCEF1<sup>[120, 121]</sup> und GRSP1<sup>[123]</sup> sind zwei weitere unabhängige CC-Modulatoren mit einer unterschiedlichen Domänenzusammensetzung, wobei IPCEF1 keine CC-Domäne zur Cytohesininteraktion besitzt, sondern eine CC-binde Domäne. Die Funktion der CC-Binder und Modulatoren ist im Detail noch nicht verstanden. Bisher ist nur bekannt, dass sie in der Lage sind, ihren Cytohesinpartner zur Plasmamembran zu rekrutieren und/oder ihre Fähigkeit des GDP/GTP Austauschs *in vitro* zu beschleunigen (Cybr/IPCEF1). Dies konnte für IPCEF1 auch in COS-Zellen nachgewiesen werden. Sie wurden alle unabhängig voneinander durch verschiedene Arbeitsgruppen für jeweils ein spezifisches Cytohesin im „*yeast two hybrid*“-Screeningverfahren entdeckt. Einige, insbesondere CASP, CYTIP und IPCEF, zeigten in Überexpressionsexperimenten und „Pull-down“ Studien eine ähnliche Affinität gegenüber Cytohesin 1-3. GRASP wiederum soll nur für Cytohesin 2 und 3 spezifisch sein. Cybr und GRSP1 sind nie auf ihre Spezifität gegenüber den anderen Familienmitgliedern getestet worden, Tabelle 1.4.2. Cytohesin 4 ist in diesem Zusammenhang ebenfalls noch nicht getestet worden.

Bezeichnung	Funktion	Interaktionspartner	Referenz
Cybr*	Beschleunigung der Austauschrate an ARF1 <i>in vitro</i>	Cytohesin 1†	Tang et al. <sup>[117]</sup>
CASP*	Lokalisierung zum Golgi-Apparat, Rekrutierung der Cytohesine zur Plasmamembran nach EGF Stimulation	} Cytohesin 1 Cytohesin 2/ARNO GRP1/ARNO 3	Mansour et al. <sup>[118]</sup>
CYTIP**	Relokalisation von Cytohesin 1 ins Zytosol; Unterbindung der LFA1 vermittelten Zelladhäsion nach Phorbol ester Stimulation		Boehm et al. <sup>[119]</sup>
IPCEF1 (Ratte)	Beschleunigung der Austauschrate an ARF6 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	Cytohesin 1 Cytohesin 2/ARNO GRP1/ARNO 3	Venkateswarlu et al. <sup>[120, 121]</sup>
GRASP	Rekrutierung von GRP1 zur Plasmamembran	Cytohesin 2/ARNO GRP1/ARNO 3	Nevrivy et al. <sup>[122]</sup>
GRSP1	Rekrutierung von GRP1 zur Plasmamembran nach Insulin Stimulation	GRP1/Arno 3†	Klarlund et al. <sup>[123]</sup>

Tabelle 1.4.2: Übersicht coiled-coil-Domänenbinder verschiedener kleiner GEFs. \*Identisch auf Aminosäurebasis, \*\*Unterscheidung in einer Punktmutation. † aus *yeast two hybrid* keine weiteren Cytohesine getestet, Cybr, *cytohesin binder und regulator*, CASP, *cytohesin associated scaffold protein*, GRASP, *GRP1-associated scaffold protein*, IPCEF1, *interaction protein for cytohesin exchange factors 1*, GRSP1, *GRP1 signaling partner*.

### 1.4.1 CYTIP

Boehm et al.<sup>[119]</sup> konnten den CC-Binder CYTIP (*cytohesin interacting protein*), ein humanes zytosolisches Protein (40 kD), als neuen Interaktionspartner von Cytohesin 1 identifizieren. Hierbei weist das Expressionsprofil auf ein verstärktes Vorkommen in den Lymphknoten, der Milz und den peripheren Leukozyten im Blut, jedoch auch auf eine schwach ausgeprägte Expression im Thymus bzw. Knochenmark hin. Es gehört zur Gruppe der humanen PSCDBP (*Pleckstrin Homologie, Sec 7 und coiled-coil Domane binding protein*), unter welchen die GenBank-Einträge der nahezu identischen HE, B3-1, Cybr<sup>[117]</sup> und CASP<sup>[118]</sup> Proteine zu finden sind. Im Gegensatz zu CYTIP wird CASP hauptsächlich in Gehirn, Herz und Lunge exprimiert und führte in Zellstudien (COS-1) zur Rekrutierung von Cytohesin 1-3 zur Plasmamembran. Dagegen kommt Cybr in Milz, Thymus und Lymphknoten vor und zeigte *in vitro* eine Erhöhung der GEF-Aktivität an ARF1.

Die modulare Domänenzusammensetzung, bestehend aus einer N-terminalen PDZ-Domäne (Plasmamembranrekrutierung), einer leucinreichen *coiled coil* Domäne (CC) (PPI mit Cytohesinen) und einer C-terminalen „Mystery“-Domäne (unbekannte Funktion), weist auf ein Gerüstprotein hin, das verschiedene Funktionalitäten ausüben kann. Im Zusammenhang mit Cytohesin 1 konnte gezeigt werden, dass CYTIP bei Überexpression den Informationsfluss der Lymphozytenadhäsion durch ein gezieltes Abfangen von Cytohesin 1 unterbrechen kann (Zellstudien in Jurkat)<sup>[119]</sup>.

Das kleine GEF Cytohesin 1 spielt eine zentrale Rolle in der Signaltransduktionskaskade der Lymphozytenadhäsion bei der Immunantwort. Hierbei konnte in Arbeiten von Kolanus et al.<sup>[124]</sup> gezeigt werden, dass durch ein extrazelluläres Signal (z.B. durch Cytokine wie Interleucine (IL) oder TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ )) Cytohesin 1 zur Plasmamembran rekrutiert wird, wobei die katalytisch aktive Sec7-Domäne direkt mit der  $\beta$ 2-Integrinuntereinheit (CD18) interagiert und zur Aktivierung des LFA1 (*leucocyte functional antigen-1*) führt. Als Folge dieser Wechselwirkung findet die Bindung der extrazellulären Domäne an ICAM1 (*intercellular adhesion molecule 1*) und schließlich die Zelladhäsion statt. Weiter konnten Perez et al.<sup>[132]</sup> den Einfluss von Cytohesin 1 auf die Integrinvermittelte Stimulation des MAP-Signalweges<sup>[132, 133]</sup> nachweisen. Die Wechselwirkung von LFA-1 mit ICAM-2 führt zur Aktivierung der Proteinkinase C und zur Phosphorylierung der polybasischen C-terminalen Domäne. Hierdurch wird die Expression wichtiger Gene der T-Zellaktivierung und -differenzierung reguliert. CYTIP wiederum ist durch die äußere Stimulation mit Phorbolestern bezüglich seiner Zelllokalisierung induzierbar. Bei der Überexpression beider Interaktionspartner CYTIP und Cytohesin 1 führt diese zur

Relokalisation ins Zytosol. Dadurch ist eine Stimulation des  $\beta$ 2-Integrin und damit verbunden eine Zelladhäsion nicht mehr möglich. Zur Plasmamembranrekrutierung ist jedoch eine intakte PDZ-Domäne notwendig. Somit gibt es einen ersten Hinweis auf die Funktionsweise von CYTIP, das als negativer Effektor an Cytohesin 1 die Lymphozytenadhäsion reguliert. Weitere Untersuchungen konnten die Überexpression beider Proteine in reifenden dendritischen Zellen zeigen, bestätigt durch Hofer et al.<sup>[134]</sup>. Die genaue Regulation von CYTIP und Cytohesin 1 ist noch weitgehend unverstanden. Auch die *in vitro* nachgewiesene unselektive Wechselwirkung mit drei Mitgliedern der Cytohesine und dessen biologische Relevanz bedarf weiterer Untersuchungen. Hier bietet sich die Intramertechnologie zur Funktionsaufklärung durch die sequenzielle Inhibierung der einzelnen Domänen an, wie sie auch schon von Blind et al.<sup>[135]</sup> und Mayer et al.<sup>[85]</sup> zur Funktionsaufklärung von LFA-1 bzw. Cytohesin 1 angewendet wurde. Mayer et al.<sup>[85]</sup> konnten durch ein inhibitorisch wirksames Anti-Cytohesin 1 Aptamer den klaren Zusammenhang von Cytohesin 1 in der LFA-1 vermittelten Adhesion feststellen. Das intrazellulär exprimierte Aptamer (transgener Vaccinia Virus) richtete sich spezifisch gegen die katalytisch aktive Sec7 Domäne. Dabei ist das **M69** in der Lage, die großen von den kleinen GEFs zu unterscheiden, nicht jedoch die nahen Verwandten Cytohesin 1 und 2. Die resultierenden biologischen Effekte der Inhibition von Cytohesin 1 schlagen sich direkt in fehlendem Adhäsionsvermögen und Zytoskelettremodellierung nieder.

### 1.4.2 KIAA0403, das humane Homolog zu IPCEF1

KIAA0403 (auch bekannt als PIP3-E mit 21 zusätzlichen Aminosäuren) ist ein noch unbekanntes, im Rahmen des „*human brain-clone projects*“ identifiziertes Protein. Es weist eine 85 %ige Homologie zum CC-Modulator IPCEF1 (Datenbankeintrag: AJ536192)<sup>[120]</sup> auf. IPCEF1, ein zytosolisches Rattenprotein, wurde zum ersten Mal von Venkateswarlu beschrieben<sup>[120, 121]</sup> und als Interaktionspartner zum humanen Cytohesin 2 entdeckt. Trotz der Entdeckung aus einer Gehirn cDNA Bibliothek zeigte das Expressionsprofil von IPCEF1 ein ubiquitäres Vorkommen in Milz, Lunge, Hoden und weniger ausgeprägt in den Nieren. Im Gegensatz zu den anderen CC-Bindern und Modulatoren ist es das einzige mit einer N-terminalen PH-Domäne. PH-Domänen, wie sie auch bei den Cytohesinen vorkommen, sind für ihre Affinität zu Phosphatidylinositolphosphat (PIP) bekannt. In *in vitro* Analysen konnte ein Zusammenhang dieser Domäne mit der erhöhten Austauschrate der Cytohesine an ARFs festgestellt werden<sup>[136]</sup>. Cytohesin 1, - 2 und GRP1 zeigen alle eine sehr starke Affinität zu PIP<sub>3</sub>, wobei die GRP1 PH-Domäne zusätzlich eine sehr gute Diskriminierung bezüglich des

PIP<sub>2</sub> und PIP<sub>3</sub> mit deutlicher Bevorzugung (Faktor 650) des Triphosphats zeigt<sup>[137]</sup>. Im Gegensatz dazu konnte bei der PH-Domäne des IPCEF1 keine spezifische Bindung an Phosphatidylinositol-Lipide (*in vitro* Studie) gezeigt werden, obwohl in entsprechenden Zellkulturstudien (NRK Zellen) die Beobachtung einer Kolo-kalisation von Cytohesin 2 und IPCEF1 im Zytosol und Membranrekrutierung nach EGF Stimulation gemacht wurde. Die Interaktion beider Proteine konnte auf die CC-Domäne von Cytohesin 2 und den 121 C-terminalen Aminosäuren von IPCEF1 (CC- bindende Domäne) zurückgeführt werden. Ferner zeigte Venkateswarlu, dass IPCEF1 die GEF-Aktivität von Cytohesin 2 an ARF6 *in vitro* und in Zellkultur steigert. Der wesentliche Unterschied zu den übrigen Modulatoren liegt in der für die Interaktion verantwortlichen Domäne, Abbildung 1.4.1.

ARF6 und der GDP/GTP Austauschfaktor Cytohesin 2 spielen eine wesentliche Rolle in der Regulierung der Endozytose, in der Reorganisation des Aktinzytoskeletts und im Vesikeltransport<sup>[102]</sup>. Sie sind an der Epithelzellmigration durch die „*downstream*“ Aktivierung von RAC 1 und Phospholipase D (PLD) beteiligt<sup>[138]</sup>. Eine weitere biologisch relevante Funktion von Cytohesin 2 wurde von M. Theis<sup>[57]</sup> und I. Gsandtner<sup>[131]</sup> nachgewiesen. Hierbei führt das Ausschalten von Cytohesin 2 zu einer negativen Regulation und Unterbrechung des Mitogenaktivierten Protein Kinase (MAPK) Signalweges im „*outside-in signaling*“ [1.2.1].

Wie im Falle von CYTIP [1.4.1] stellt sich auch hier die Frage nach der Regulation dieser bedeutenden, aber auch sehr vielseitigen biologischen Mechanismen. Ist KIAA0403 in diese eingebunden und wie erfolgt die Regulation im Detail. Fragen bezüglich der Lokalisation, Interaktion, Distribution und enzymatischer Aktivität sind zu beantworten.

## 1.5 LIM Interaktionsdomäne

Protein-Protein-Interaktionen sind, wie schon am Beispiel der CC-Modulatoren gezeigt [1.4], essentiell für die vielfältige Regulation wichtiger zellulärer Prozesse. Hierbei sind die Aminosäuresequenzen für prominent interagierende Domänen wie die CC-<sup>[139, 140]</sup>, die PDZ-<sup>[106]</sup> und die LIM-Domänen<sup>[141, 142]</sup> hoch konserviert und somit leicht als Interaktionsdomäne zu identifizieren. Die LIM-Domänen wurden zum ersten Mal in drei entwicklungsbiologisch relevanten Transkriptionsfaktoren LIN-11 (*C. elegans*) ISL-1 (*Rattus norvegicus*) und MEC-3 (*C. elegans*)<sup>[143-145]</sup> beschrieben und sind bis heute nur in Eukaryonten, nicht aber in Prokaryonten gefunden worden. Die hoch konservierte Konsensussequenz der 135 humanen LIM Domänen (60 Aminosäuren) lässt sich wie folgt beschreiben: CX<sub>2</sub>CX<sub>16-23</sub>C/HX<sub>2/4</sub>C/H/EX<sub>2</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>14-21</sub>C/HX<sub>1/2/3</sub>C/H/D/EX (X beliebige Aminosäure). Sie enthält zwei Zn<sup>2+</sup> koordinierende Zinkfinger, Abbildung 1.5.1 (A). Die dreidimensionale Struktur der

cystein- und histidinreichen Domäne konnte vielfach für verschiedene LIM-Proteine bestimmt werden, wobei die in Abbildung 1.5.1 (C) dargestellte NMR-Struktur als repräsentativ gilt<sup>[146]</sup>. Die LIM-Domäne setzt sich aus zwei orthogonal verlaufenden antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern zusammen, wobei der Carboxyterminus des Zinkfingermotivs in einer  $\alpha$ -Helix endet.

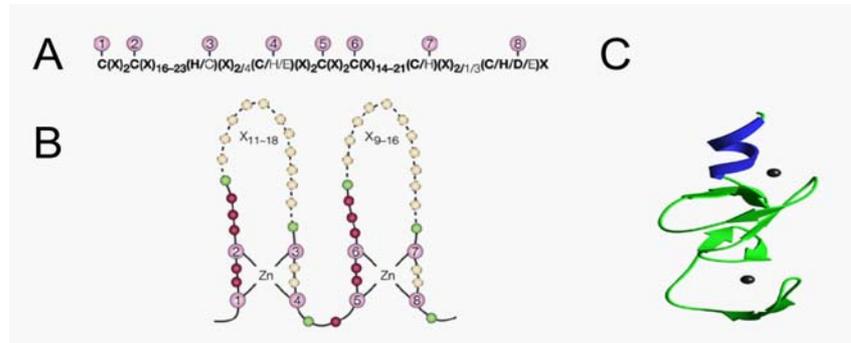


Abbildung 1.5.1: Konservierte Aminosäuresequenz (A), Topologie (B)<sup>[141]</sup> und dreidimensionale NMR Struktur (C) der LIM Domänen. A| Dargestellt ist die konservierte Aminosäuresequenz der LIM Domänen. Die hervorgehobenen Aminosäuren (AS) 1-8 repräsentieren die zinkbindenden Reste, basierend auf den bekannten humanen 135 LIM Domänen. Die nicht hervorgehobenen AS markieren beobachtete Abweichungen <10 %. B| Topologie der Zinkkoordination. Die zinkbindenden AS sind durch nummerierte pinkfarbene Kugeln, semikonservierte aliphatische AS in grün dargestellt. Die restlichen nicht konservierten AS mit nicht variablen AS Abstand sind magentafarben. Der variable AS Abstand ist durch gelbe Perlen mit einem X gekennzeichnet, wobei das X für eine beliebige AS steht. C| Repräsentative dreidimensionale Faltstruktur der zweiten LIM Domäne von CRP2<sup>[146]</sup>. Die tetrahedral koordinierenden Zinkkationen sind als schwarze Kugeln dargestellt.

Trotz einer auffallend großen Homologie zum DNA-bindenden Zinkfinger des Typs GATA<sup>[147]</sup> konnte bis heute keine DNA-interagierende Aktivität nachgewiesen werden. Dennoch stellen die LIM-Domänen als Protein-Protein Interaktionsplattformen, genauso wie die CC-Domäne der CC-Modulatoren [1.4], eine Schlüsselrolle in den verschiedensten biologischen Prozessen dar und können unter anderen mit Umstrukturierungen des Aktinzytoskeletts und der Transkriptionsmaschinerie in Verbindung gebracht werden. Zum einen kommen sie in „*Scaffold*“-Proteinen [1.3] vor, wobei ihre Funktion darin besteht, unterschiedliche Proteine in die räumliche Nähe zu einem aktiven Proteinkomplex zusammenzuführen. Zum Anderen können sie ebenso als Kompetitoren (Kontrolle der biologischen Aktivität durch Konkurrenz der Bindungspartner) und Autoinhibitoren (konformelle Regulation der Proteinaktivität durch intramolekulare LIM Domäneninteraktionen) dienen<sup>[141, 142]</sup>. In Abbildung 1.5.2 sind die wichtigsten Vertreter der humanen LIM-Domänen Proteine aufgeführt. Hierbei unterscheidet man die „*LIM only*“ Proteine, beispielsweise CRP (*cysteine-rich proteins*) und FHL2 (*Four-and-a-half-LIM only protein 2*) von den „*Scaffold*“-Proteinen, welche einzig aus LIM-Domäneneinheiten aufgebaut sind.

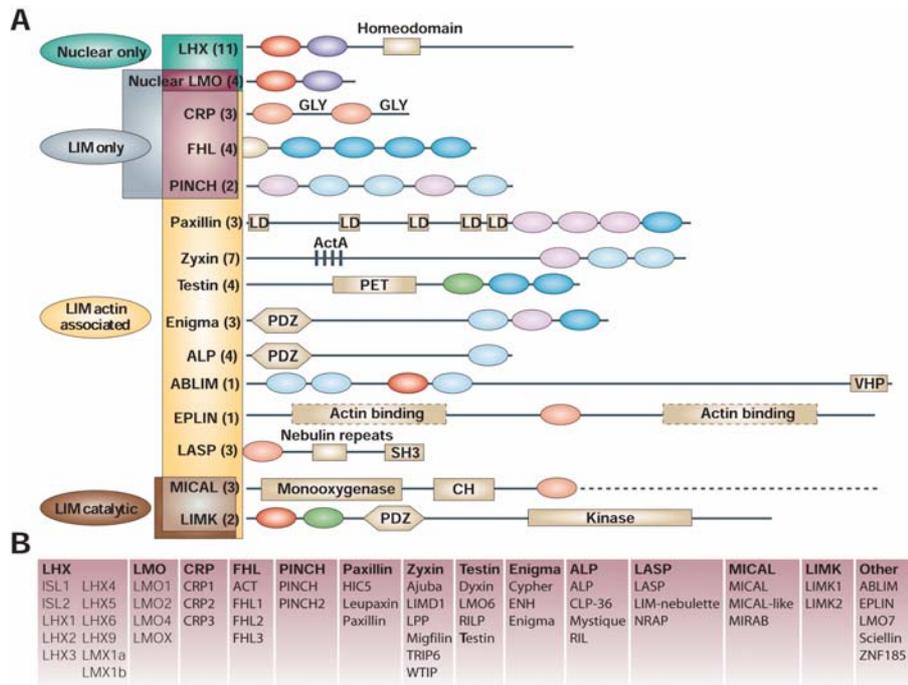


Abbildung 1.5.2: Humane LIM Proteine<sup>[141]</sup>. A| Dargestellt sind die am besten charakterisierten LIM-Proteinfamilien, wobei die Anzahl der bekannten Mitglieder in Klammern aufgeführt ist. Diese sind weiter in Kategorien der allgemeinen Charakteristika zusammengefasst und farbig hervorgehoben. Weiter sind die Domänenzusammensetzung schematisch aufgeführt, welche unter anderem die individuellen LIM-Domänen, farbige ovale Formen, und andere Domänen wie die Aktin Bindedomäne, Monooxidase und Kinasen beinhalten, rechteckige Formen. Unterbrochene Linien bedeuten einen nicht konservierten Abschnitt der Proteine. B| Auflistung der identifizierten LIM-Domänen Proteinfamilienmitgliedern.

### 1.5.1 Das multifunktionale FHL2 (*Four-and-a-half-LIM only protein*)

FHL2 (*Four-and-a-half-LIM only protein 2*) gehört zur Klasse der humanen „LIM only“ Proteine. Charakteristisch für diese Proteinklasse sind die viereinhalb LIM-Domänen, die auch in den vier weiteren Mitgliedern FHL1, FHL3, FHL4 und ACT (*activator of CREM in Testis*) vertreten sind. Die Mitglieder der FHL Familie werden gewebespezifisch exprimiert und erfüllen hierbei verschiedene Funktionen in der Myogenese<sup>[148, 149]</sup>, Kardiogenese, Spermatogenese<sup>[150]</sup> oder als Koaktivatoren des Androgenrezeptors<sup>[151]</sup>. FHL1, FHL2 und FHL3 werden hauptsächlich in Skelett- und Herzmuskel exprimiert. FHL4 und ACT kommen vermehrt im Hoden vor<sup>[150, 152]</sup>.

FHL2 wurde unabhängig von zwei Forschungsgruppen entdeckt<sup>[153, 154]</sup> und konnte in den letzten Jahren in Zusammenhang mit verschiedensten zellulären Prozessen der Genexpressionsregulation, Zelladhäsion, Zellmobilität, Zytoskelettremodellierung und Signaltransduktion gebracht werden<sup>[155]</sup>, Abbildung 1.5.3.

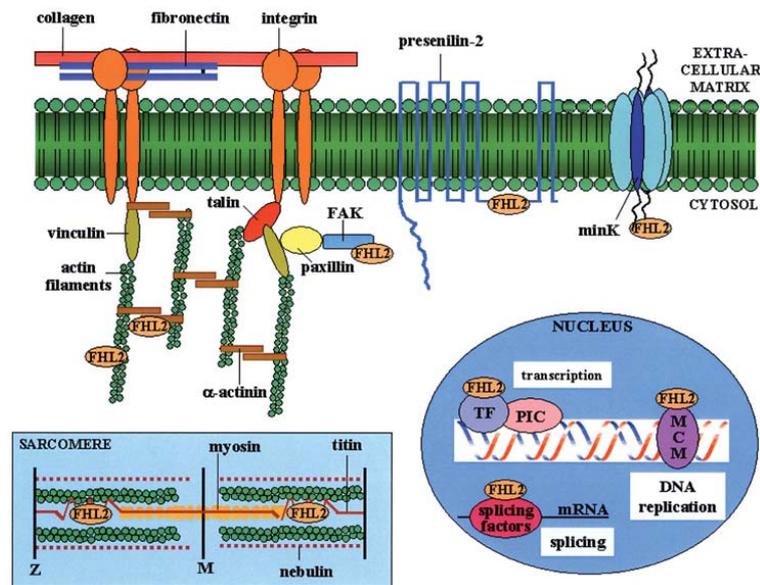


Abbildung 1.5.3: Das multifunktionale FHL2 ist an einigen Beispielen in einer schematisierten Zelle in den unterschiedlichen zellulären Kompartments mit seinen Interaktionspartnern und vermittelnden Funktionen dargestellt. FHL2 interagiert im Zytoplasma mit der Proteinklasse der Integrine, Presenilin 2 und spannungsabhängigen  $K^+$  Ionenkanälen. Durch seine Interaktion mit Signaltransduktoren wie ERK2 und der Adenylzyklase beeinflusst FHL2 die Signalübertragung und Genexpression. Es wird weiterhin vermutet, dass FHL2 auch am RNA-„*splicing*“, der DNA-Replikation und Reparatur durch eine Interaktion mit den entsprechenden an diesen Prozessen beteiligten Proteinen zu tun hat. Darüberhinaus kann FHL2 auch mit Strukturproteinen wie dem  $\beta$ -Aktin, Aktin und Titin wechselwirken.<sup>[155]</sup>

Aufgrund seiner LIM-Domänenstruktur ist FHL2 in der Lage, mit 50 verschiedenen zytosolischen Proteinen<sup>[155]</sup> unterschiedlicher Proteinklassen Homo- bzw. Heterodimere zu bilden. Ausgewählte Beispiele der Interaktionspartner und der bevorzugten wechselwirkenden Domäne sind in Tabelle 1.5.1 aufgeführt.

Prominente Interaktionspartner sind unter anderem Armadillo repeats<sup>[156]</sup>, PDZ-<sup>[157]</sup> und zytosolische Domänen der Integrine<sup>[158]</sup>. Sie sind ebenfalls in der Lage, wie in Abbildung 1.5.3 dargestellt, als Transkriptionskofaktoren zu fungieren und somit die Genexpression zu beeinflussen. FHL2, welches sowohl als Transkriptionskoaktivator<sup>[156, 159]</sup> (Proteinwechselwirkungen mit  $\beta$ -Catenin und Rho), als auch Korepressor<sup>[157]</sup> (Interaktion mit dem promyelocytischen Leukämie-Zinkfingerprotein, PLZF) fungieren kann, spielt vermutlich bei der Onkogenese verschiedener Krebsarten eine wichtige Rolle<sup>[151, 156, 160]</sup>.

Zielprotein	Interagierende Domänen		Referenz
	FHL2	Partner	
<b>Rezeptoren</b>			
Integrine $\alpha_{3A}$ , $\alpha_{3B}$ , $\alpha_{7A}$ , $\alpha_{3\beta}$			Samson T. et al. <sup>[161]</sup>
Integrine $\beta_{1A}$ , $\beta_{1D}$ , $\beta_2$ , $\beta_{3A}$ , $\beta_6$			Wixler V. et al. <sup>[158]</sup>
minK	LIM1-4	C-terminale 63 AS	Krishnamurthy et al. <sup>[162]</sup>
Presenilin-2	Alle Domänen	AS 269-298	Tanahashi et al. <sup>[163]</sup>

<b>Strukturproteine</b>			
$\alpha$ -Aktin ACTA1	LIM3+4 stark; LIM1+2 schwach	Nicht getestet	Coghill et al. <sup>[164]</sup>
Titin	Nicht getestet	N2B	Lange S. et al. <sup>[165]</sup>
<b>Enzyme</b>			
Adenylatzyklase	Nicht getestet	Nicht getestet	Lange S. et al. <sup>[165]</sup>
ERK2	>1 LIM Domäne	AS 12-358	Purcell N.H. et al. <sup>[166]</sup>
<b>Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren</b>			
ACT	Nicht getestet	Nicht getestet	Fimia G. M. et al. <sup>[152]</sup>
Androgenrezeptor	LIM1/2+LIM1-2	Gesamtes Protein	Muller J. M. et al. <sup>[151]</sup>
$\beta$ -Catenin	LIM1-4	AS N-terminale 132+	Martin B. et al. <sup>[167]</sup>
FHL1, FHL2, FHL3			[161], [165], [152]
c-FOS	Nicht getestet	Nicht getestet	Morlon A. et al. <sup>[168]</sup>
FOXO1	LIM2	AS 1-150	Yang Y. et al. <sup>[169]</sup>
c-JUN	Nicht getestet	AS 1-100	Morlon A. et al. <sup>[168]</sup>
PLZF	LIM1-4	POZ plus RD2	McLoughlin P. et al. <sup>[157]</sup>
SKI	LIM1/2+LIM1	AS 99-274	Chen D. et al. <sup>[170]</sup>

Tabelle 1.5.1: Ausgewählte Beispiele der FHL2 Interaktionspartner. AS = Aminosäuren.

Abgesehen von der reichhaltigen Interaktionsplattform der LIM-Domänen kann unter anderem das Molekulargewicht von 32 kD ein Grund für die diversen Funktionsweisen sein. Dieses liegt unterhalb der kritischen Grenze für einen aktiven Kerntransport und führt vermutlich zu einem passiven Pendeln zwischen Zytoplasma und Kern. FHL2 konnte sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert werden. Jedoch gehen einige Forschungsgruppen davon aus, dass die subzelluläre Verteilung von FHL2 stimullusabhängig ist. Serum und Serumkomponenten, Lysophosphatsäure und Sphingosin-1-phosphat konnten eine Kernlokalisierung von FHL2 in einem ROCK/Rho GTPase abhängigen Signalweg herbeiführen<sup>[159, 168]</sup>.

Trotz der Fülle der Interaktionspartner für FHL2 sind die direkten Zusammenhänge und molekularen Mechanismen immer noch weitgehend unverstanden. Dies betrifft vor allem die Rolle von FHL2 in der Onkogenese. Interpretationen aufgrund des Transkriptionslevels in Tumorzelllinien erweisen sich meist als schwierig und geben nur erste Hinweise<sup>[171]</sup>. Es bleibt auch die mechanistische Frage zu klären, wie ein Homodomänenprotein mit keiner weiteren katalytisch aktiven Domäne zwischen den vielen Interaktionspartnern diskriminieren kann eine solche Vielfalt biologisch relevanter Funktionalitäten regulieren kann. Eine Erklärung aufgrund zellspezifischer Expression und Lokalisation von FHL2, genauso wie die subzelluläre Konzentration der verschiedenen Interaktionspartner, könne eine mögliche Regulation dieser Interaktionen bieten. Die Feinregulierung, welche die selektive Wechselwirkung von FHL2 und dem jeweiligen Interaktionspartner ermöglicht, bleibt weiter aufzuklären.

## 2 Aufgabenstellung

Die Beteiligung der kleinen GEFs, den Cytohesinen, an der Regulation wichtiger zellulärer Prozesse, wie der Zellproliferation und -differenzierung, der integrinvermittelten Zelladhäsion<sup>[119]</sup>, Vesikeltransport<sup>[129, 130]</sup> und nicht zuletzt bei der Mitwirkung an der MAP-vermittelten Signaltransduktion<sup>[57, 131]</sup> [1.3.1], ist in der Literatur mehrfach beschrieben worden, Tabelle 1.4.1. Fragen nach ihrer Feinregulation konnten ansatzweise durch die Entdeckung der CC-Modulatoren zum ersten Mal beantwortet werden. Für CYTIP [1.4.1] konnte gezeigt werden, dass die Lymphozytenadhäsion durch ein gezieltes Abfangen des GEFs Cytohesin 1 unterbrochen werden kann<sup>[119]</sup>. Der Regulationsmechanismus von CYTIP ist jedoch weiterhin unbekannt und sollte in dieser Arbeit mit Hilfe der Intramertechnologie in Adhäsions-Assays untersucht werden<sup>[85]</sup>. Hierzu sollten spezifisch bindende Aptamer selektiert werden.

Weiterhin sollte das Protein KIAA0403 [1.4.2], mit noch unbekannter Funktion, in einen biologischen Kontext gebracht werden. Es galt nachzuweisen, dass das KIAA0403 als humanes Homolog zu IPCEF1 ebenfalls ein Mitglied der CC-bindenden Modulatoren ist. IPCEF1, ein zytosolisches Rattenprotein, wurde von Venkateswarlu<sup>[120, 121]</sup> als Cytohesin 2 CC-Modulator zum ersten Mal erwähnt und verfügt über die Fähigkeit, vergleichbar mit den anderen Regulatoren [1.4], alle Cytohesine zu binden und die Cytohesin 2 Austauschaktivität an ARF6 (*in vitro/Zellkultur*) zu modulieren. Mit Hilfe eines selektierten Aptamers sollte der biologische Zusammenhang von KIAA0403 und Cytohesin 2 analog zu Theis et al.<sup>[57]</sup> im zellulären MAP-Kinase Assays untersucht werden.

Außerdem sollte in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Büttner (GRK804) mit Hilfe eines selektierten Aptamers, die Wechselwirkung von FHL2 [1.5.1] mit weiteren Transkriptionsfaktoren in Zellkultur untersucht werden. FHL2, welches unter anderem auch als Transkriptions-Koaktivator<sup>[151]</sup> bei der Rho vermittelnden Signaltransduktion beteiligt ist, wird mit der Onkogenese in Zusammenhang gebracht. Korrelationsstudien der Expressionslevel und Kernlokalisationsstudien von FHL2 und Rho in gesundem und malignem Prostatagewebe verschiedener Stadien<sup>[151]</sup>, deuten auf eine Beteiligung bei der malignen Tumorprogression hin. Hier stellt sich die Frage, ob das vielseitige FHL2 in diesem Kontext als Transkriptions-Koaktivator von Zielgenen, welche die Proliferation und Migration voranschreiten lassen, mitverantwortlich ist und ob diese sich durch eine gezielte Inhibition von FHL2 unterbinden lässt.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 CC-Modulator CYTIP

#### 3.1.1 Klonierung, Expression und Reinigung von CYTIP-Konstrukten

Zur funktionalen Charakterisierung des Proteins CYTIP<sup>[119]</sup> sollten im ersten Schritt RNA-Aptamere selektiert werden. Hierfür wurde zunächst das Zielprotein rekombinant in *E.coli* exprimiert und mit Hilfe einer N-terminalen Hexahistidininfusionssequenz (His<sub>6</sub>-Tag) affinitätschromatographisch gereinigt. Aufgrund der Zytotoxizität des Volllängenproteins CYTIP für das Wirtsbakterium *E.coli* (unpublizierte Daten AK Kolanus) wurden die nicht toxischen CYTIP-Konstrukte „CYTIP-PDZ“ und „CYTIP-PDZCC“ verwendet. Das CYTIP-PDZ-Konstrukt<sup>1</sup> besitzt eine isolierte PDZ-Domäne (105 Aminosäure, pI = 6,93; 11,6 kD), während das CYTIP-PDZCC-Konstrukt aus einer N-terminalen PDZ- und CC-Domäne (164 Aminosäuren, pI = 7; 17,2 kD) besteht. Das „CYTIP-PDZCC“ Proteinkonstrukt wurde zunächst in den Expressionsvektor (pET11a) mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag kloniert [6.4.1, 6.4.2.2, Anhang 9.2.2] und die Expression beider CYTIP-Konstrukte in *E.coli* etabliert. Anschließend erfolgte die affinitätschromatographische Proteinreinigung mit „nitrilotriacetic acid“ (NTA)-chelatisierten Ni<sup>2+</sup>-Kationen [6.1.11.1].

Die isolierte His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ-Domäne konnte aus einem Liter LB Kultur *E.coli* BL21 (DE3) nach Expression und Reinigung mit einer Ausbeute von 2,2 mg erhalten werden.

Die Expression und Reinigung des neu klonierten His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC-Konstruktes stellte sich problematisch dar. In Expressionsstudien unter der Verwendung von unterschiedlichen *E.coli*-Stämmen konnte festgestellt werden, dass das Konstrukt exprimierbar, jedoch in unlöslichen „inclusion bodies“ vesikulär eingeschlossen wird, so dass eine native Reinigung schwierig war. Zur Lösung dieses Problems wurde die Proteinexpression optimiert. Durch Veränderung des Induktionszeitpunktes, durch Temperaturabsenkung und vor allem der Erhöhung der Sauerstoffzufuhr wurde eine native Reinigung ermöglicht. Aus insgesamt 13 L LB Kultur *E.coli* BL21 (DE3) konnte nach Lyse und Reinigung [6.6.7.1, 6.1.11.1] 2,6 mg (0,2 mg/L) des rekombinanten Proteins His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC erhalten werden. Diese Menge war ausreichend für eine Aptamere Selektion. Bei der rekombinanten Proteinexpression des His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC-Konstruktes ist hauptsächlich die CC-Domäne für die Anreicherung des Proteinkonstruktes in „inclusion bodies“ verantwortlich. Aus der Literatur ist bekannt, dass

---

<sup>1</sup> Das Expressionsplasmid pET15b His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ wurde freundlicherweise von Prof. Dr. W. Kolanus (Universität Bonn) zur Verfügung gestellt.

sie ist für mono- und heteromere Interaktionen verantwortlich ist<sup>[119]</sup> [1.3] und bei höheren Proteinkonzentrationen zur Präzipitation führt.

Nach der Proteinreinigung beider CYTIP-Konstrukte wurde die Konzentration und der Reinheitsgrad mit Hilfe der in [6.1.6.1] beschriebenen Bradford-Analyse und nachfolgender SDS-PAGE Analyse [6.1.1] bestimmt. Der Reinheitsgrad beider Proteine lag bei ca. 90 %, mit einer geringen Restkontamination bei 28 kD, Abbildung 3.1.1 (A/2; B/1).

Zur weiteren Absicherung der Identität der rekombinant hergestellten CYTIP-Proteine wurden diese in Western-Blotanalysen [6.1.3.1] mit einem spezifischen Antikörper gegen die PDZ-Domäne untersucht, Abbildung 3.1.1 (A/2; B/2). Schließlich wurden 112 nmol His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ (3,5 ml Sepharose) und 17 nmol His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC (1,5 ml Sepharose) zur Aptamerselektion an cyanogenbromidaktivierte Sepharose (Selektionsmatrix) gekoppelt [6.1.10].

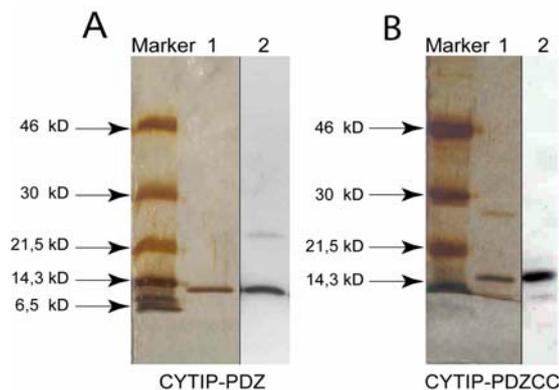


Abbildung 3.1.1: Analyse der rekombinanten CYTIP-Proteine His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ (A) und His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC (B) nach der Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie. A| His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ (1: 250 ng) erscheint in der SDS-PAGE Analyse nach Silberfärbung homogen. Im immunologischen Nachweis der PDZ-Domäne (2: 50 ng) ist zusätzlich eine kleine Restkontamination zu sehen ist. B| His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC (1: 250 ng) weist nach Silberfärbung eine kleine Restkontamination auf (28 kD). Der immunologische Nachweis der PDZ-Domäne (2: 75 ng) bestätigt die Anwesenheit der PDZ-Domäne.

### 3.1.2 Aptamerselektion gegen CYTIP-PDZ und CYTIP-PDZCC

Der Aptamerselektionsprozess zur Generierung targetspezifisch interagierender einzelsträngiger Nukleinsäuren [1.2] basiert auf einem evolutiven Anreicherungsprinzip der bindenden Spezies. Dieser setzt sich aus fünf Hauptschritten zusammen die wiederholt durchlaufen werden:

- 1) Transkription der DNA-Bibliothek
- 2) Inkubation der RNA-Bibliothek mit dem entsprechendem Target
- 3) Separation der gebundenen von den in Lösung verbleibenden RNA-Spezies
- 4) Reverse Transkription (RT) zur cDNA-Bibliothek
- 5) Amplifikation durch PCR

Vor Beginn der Selektion steht die Wahl der RNA-Bibliothek und der Bedingungen, die für den Verlauf eine große Rolle spielen. Zur Aptamers Selektion wurde für die Targets His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ und His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC die synthetische DNA Bibliothek von U. Wüllner [5.7.1.1] gewählt. Sie besteht aus einer 37 Nukleotide langen randomisierten Region und wird von zwei konstanten Regionen und einem 5'-T7-Promotor flankiert (Gesamtlänge: 72 Nukleotide). Der Selektions-Bindepuffer sollte möglichst den natürlichen Bedingungen entsprechen, somit wurde ein PBS-Puffer pH 7,4 mit einem Zusatz von 3 mM Magnesiumchlorid gewählt.

Der erste Zyklus beider CYTIP-Selektionen wurde mit 10 nmol der transkribierten und PAGE-gereinigten RNA-Bibliothek [6.2.1.6] durchgeführt, um den Protein-Domänen eine möglichst hohe Diversität an RNA-Sequenzen (ca. 10<sup>14</sup> Spezies) anzubieten. In den späteren Zyklen wurde diese Menge auf 2 nmol reduziert. Nach erfolgter Faltung der RNA wurde diese zusammen mit den immobilisierten Proteinen His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ bzw. -PDZCC inkubiert. Durch einen anschließenden Waschschriff wurden die gebundenen RNA-Sequenzen von den ungebundenen Spezies getrennt, wobei das Waschvolumen den Selektionsdruck bestimmte. Nach Elution der gebundenen RNA (Guanidiumhydrochlorid) schloss sich eine Fällung der RNA [6.2.1.2], die RT-Reaktion [6.2.2.8] und PCR-Amplifikation [6.2.2.1] mit den entsprechenden Reinigungsschritten an. Nach erneuter Transkription [6.2.2.2] und PAGE-Gelreinigung [6.2.1.7] der RNA-Bibliothek konnte ein neuer Selektionszyklus begonnen werden, [6.3, 6.3.1, Anhang 9.3.1, 9.3.2].

Der Verlauf der Selektion wurde anhand der Analyse von Filterbindungen mit radioaktiv endmarkierter RNA kontrolliert. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der unspezifischen Wechselwirkung von Proteinen mit Nitrozellulose. Komplexierte Aptamere bleiben ebenso wie die Proteine auf der Membran zurück, während ungebundene die Nitrozellulose passieren.

Eine Präselektionsstrategie sollte ab dem dritten Selektionszyklus (His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ) bzw. von Beginn an (His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC) zur Entfernung von matrixbindenden RNA-Sequenzen dienen. Hierzu wurde die RNA-Bibliothek vor dem eigentlichen Selektionsschritt mit der inaktivierten Cyanogenbromidsepharose (Präselektionsmatrix) inkubiert. Trotz des Zusatzes eines unspezifischen Kompetitors Heparin (2,5µg/µL) und steigendem Waschvolumen der Selektionsmatrix von Zyklus zu Zyklus [Anhang 9.3.1, 9.3.2], nach sieben (His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ) bzw. zehn Selektionszyklen (His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC) in beiden Fällen nur matrixbindende RNA-Sequenzen angereichert werden, Abbildung 3.1.2.

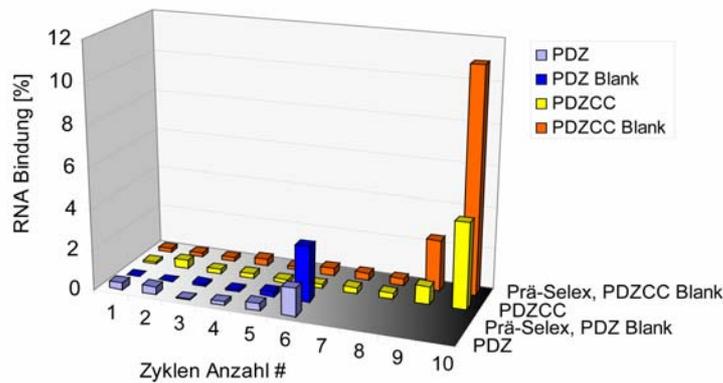


Abbildung 3.1.2: Selektionsverlauf von His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ und -PDZCC, über 6 bzw. 10 Selektionszyklen. Die Anreicherung von matrixbindenden Aptameren ist ab Zyklus 6 bzw. 9 an der inaktivierten Präselektionsmatrix (PDZ-Blank und PDZCC-Blank) erkennbar.

Zur Vermeidung einer erneuten Anreicherung von matrixbindenden RNA-Sequenzen wurde in den weiteren drei Selektionsversuchen gegen His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ eine Vielzahl von Optimierungen vorgenommen [Anhang 9.3.3].

Eine wesentliche Veränderung betraf die Selektionsstrategie. Diesmal kamen zwei unterschiedliche RNA-Bibliotheken N20 und E40 mit jeweils verschiedenen langen randomisierten Bereichen von 20 und 40 Nukleotiden zum Einsatz, welche ein breites Spektrum an RNA-Spezies mit unterschiedlichstem Faltungsverhalten anbieten sollten.

Die RNA-Gesamtmenge wurde im ersten Zyklus von 10 nmol auf 0,4 nmol (Faktor 25) drastisch reduziert. Im Zuge dessen wurde die His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ Proteinmenge entsprechend auf 0,24 nmol bei der E40<sup>[70]</sup>- bzw. 0,5 nmol bei der N20-Selektionen angepasst.

Zur Vermeidung einer erneuten Anreicherung von matrixbindenden RNA-Sequenzen wurde auch die Kopplungsstrategie in Anlehnung an die automatisierte Selektion von Cox et al.<sup>[70]</sup> verändert. Diesmal wurden streptavidinderivatisierte magnetische Partikel eingesetzt [6.1.9], wobei zur Immobilisierung des Proteintargets dieses biotinyliert wurde [6.1.8]. Bei dieser Kopplung wird die starke nicht kovalente Wechselwirkung von Biotin und Streptavin ausgenutzt. Je nach Selektionsstrategie wurde das Target entweder direkt (Selektion mit der E40-RNA-Bibliothek, RNA-Target-Inkubation 30 min.) oder erst nach RNA-Inkubation (2 h, N20-RNA-Bibliothek) an die streptavidinderivatisierten magnetischen Partikel immobilisiert. Die Trennung der gebundenen von den nicht gebundenen RNA-Sequenzen wurde anschließend mit Hilfe eines Magneten durchgeführt. Die Elution der gebundenen RNA erfolgte wiederum durch eine kurze Hitzedenaturierung in Wasser (80°C für 2 min.). Die folgende reverse Transkription und Amplifikation wurde zu einem RT-PCR-Reaktionsschritt ohne Zwischenreinigung optimiert [6.2.2.9]. Dadurch konnte der Verlust von RNA deutlich minimiert werden.

Ein weiterer wesentlicher Optimierungspunkt umfasste die *in vitro* Transkription der N20 DNA-Bibliotheken. Diese wurde im Gegensatz zum bisherigen Vorgehen mit einer verkürzten Inkubationszeit von nur 20 min. bei 37°C in einem Tris-Puffer [6.2.2.3] durchgeführt. Anschließend wurde die RNA-Bibliothek sofort zur Selektion eingesetzt, so dass ein zusätzlicher Faltungsschritt nicht notwendig war.

Auf den Zusatz von  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-GTP, die Selektionskontrolle durch radioaktive Markierung der RNA und Gelreinigung, wurde zugunsten einer kürzeren Zykluszeit verzichtet. Diese konnte so von zwei Tagen auf wenige Stunden reduziert werden. Bei Einsatz der N20-RNA-Bibliothek diente eine Verlängerung der Inkubationszeit von 30 min. auf 2 h zur Einstellung des Reaktionsgleichgewichts und sollte auch weniger affinen RNA-Spezies die Möglichkeit bieten, an das Target zu komplexieren.

In beiden Selektionen [Selektionsschema Anhang 9.3.3] konnten keine targetspezifischen RNA-Binder angereichert werden, Abbildung 3.1.3. Filterbindungsanalysen der angereicherten N20-RNA-Bibliothek der Zyklen sieben und neun ergaben Matrixbinder. Im Gegensatz zur in Lösung selektierten N20-RNA-Bibliothek, zeigt die angereicherte E40 RNA-Bibliothek weder an das präsentierte Target noch an die Kontrollproteine eine Bindung. Eine zur Methodvalidierung durchgeführte Kontrollselektion hingegen konnte erfolgreich mit einem angereicherten RNA-Pool gegen Lysozym (Sigma) nach je sechs Zyklen beendet werden, Abbildung 3.1.3 (F). Dieses Ergebnis schließt eine fehlerhafte Selektionstechnik und RNase-Kontamination aus. Dies lässt den Schluss zu, dass die ausgewählte Proteindomäne für eine Aptamers Selektion schwierig zu handhaben ist. Ein Grund könnte in der Faltung der isolierten PDZ-Domäne liegen. Besonders acide Regionen erschweren aufgrund von Abstoßungskräften des negativ geladenen Phosphatrückgrats der RNA eine Selektion. Der theoretisch berechnete pI 6,93 der PDZ-Domäne deutet allerdings auf eine eher negative Ladung bei pH 7,4 (-1,8 theoretisch berechnete Gesamtladung) hin.

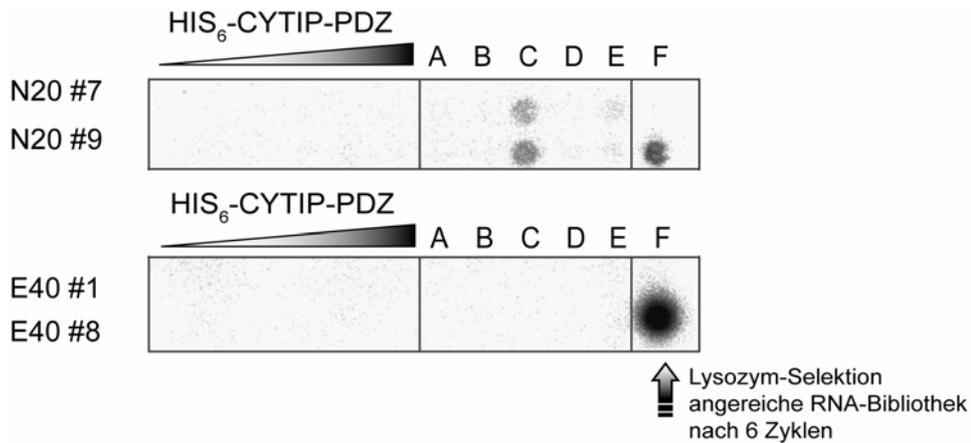


Abbildung 3.1.3: Filterbindung der optimierten His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ Selektionen mit der N20 und E40 RNA-Bibliothek. His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ ist in steigender Konzentration von 0-500 nM mit den radioaktiv markierten RNA-Bibliotheken inkubiert und analysiert worden. Die Kontrollproteine A-E (A: Lysozym; B: FHL2-LIM0+1, C: Streptavidin, D: Cytohesin 1 und E: PAZ) sind jeweils in einer Konzentration von 500 nM eingesetzt worden. Die parallel durchgeführten Lysozym-Kontrollselektionen der jeweiligen RNA-Bibliotheken N20 und E40 konnten nach sechs Zyklen erfolgreich beendet werden und sind in der Spalte F bei einer Lysozymkonzentration von 500 nM zu sehen.

### 3.2 KIAA0403 (PIP3-E)

Parallel zur Aptamerselektion von CYTIP<sup>[119]</sup> wurde mit der Untersuchung eines weiteren humanen Proteins, KIAA0403, begonnen. Es wird angenommen, dass dieses aufgrund seiner Homologie zu IPCEF1<sup>[120]</sup> (85 %) genauso wie CYTIP zu der übergeordneten Gruppe der neu entdeckten CC-bindenden Modulatoren [1.4] zählt.

KIAA0403 (EMBL/Gen-Bank<sup>TM</sup>/DDBJ Datenbank-Nummer: BAA23699; PIP3-E mit 21 zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren, Datenbank-Nummer: NP\_056368) ist ein im Rahmen des „human brain-clone projects“ identifiziertes Protein mit bisher unbekannter biologischer Funktion und Relevanz. Das Protein besteht aus 416 Aminosäuren, besitzt eine N-terminale PH-Domäne und weist ein Gesamtgewicht von 46,62 kD (pI 6,91) auf, siehe Abbildung 3.2.1. Interaktionsstudien mit den zur Verfügung stehenden Cytohesinen (Cytohesin 1, Cytohesin 2 und dem einzigen Drosophila Cytohesin homologen dGRP1) und Funktionsaufklärung mittels der Aptamer/Intramerttechnologie, wurden angewandt, um die noch unbekannt Funktion, biologische Relevanz und Familienzugehörigkeit des humanen Proteins KIAA0403 aufzuklären.

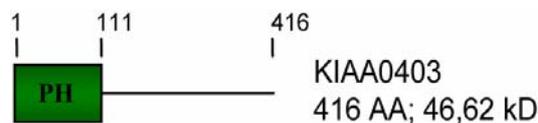


Abbildung 3.2.1 Schematische Darstellung des humanen Proteins KIAA0403. Die N-terminale PH-Domäne (PH; AA1-AA111) ist durch ein grünes Rechteck symbolisiert.

### 3.2.1 Expression und Reinigung des KIAA0403- $\Delta$ N291 Konstruktes

Aufgrund der 85 %igen Homologie zum zytosolischen Rattenprotein IPCEF1<sup>[120]</sup> wird die für die Proteinwechselwirkung der Cytohesin CC-Domäne bei KIAA0403 im Bereich der 121 C-terminalen Aminosäuren vermutet. Deshalb wurde die Deletionsmutante KIAA0403- $\Delta$ N291 (AA292-AA416)<sup>2</sup> zur Untersuchung des humanen Proteins mittels SPR-Bindungsstudien (*surface plasmon resonance*; BIAcore) und zur weiteren Aptamers Selektion verwendet.

Für die Affinitätschromatographische Proteinreinigung wurde eine Hexahistidinsequenz an den N-Terminus fusioniert und das so modifizierte  $\Delta$ N291-Konstrukt (C-terminale 125 AA + His-Tag 20 AA; pI: 10; 17kD) in *E.coli* (DE3) exprimiert. Die Proteinexpression konnte nach der in [6.6.7.2] beschriebenen Methode durchgeführt werden. Die anschließende Lyse [6.6.7.2] und Affinitätschromatographische Reinigung [6.1.11.1] wurde aufgrund der hohen Tendenz zur Präzipitation in einem Hochsalzpuffer durchgeführt. Dennoch konnte die Präzipitation nicht vollständig verhindert werden. Aus diesem Grund konnten aus einer 4 L Expressionskultur und den optimierten Reinigungsbedingungen nur 1,25 mg (0,31 mg/L) Protein hergestellt werden. Wie in Abbildung 3.2.2 zu sehen konnte das Protein in einer Reinheit von über 90 % erhalten werden, so dass von weiteren Reinigungsschritten abgesehen wurde. Die Proteinmenge, Reinheit und Konzentration von 15,03  $\mu$ M war für alle weiterführenden Untersuchungen ausreichend. Die Identität des Proteins wurde auf DNA-Ebene durch Sequenzierung des Expressionsplasmids bestätigt [Anhang 9.1.4]. Zur weiteren Verwendung in Interaktionsstudien [6.5.4], zur Aptamers Selektion [6.3.2] und zu Filterbindungsuntersuchungen [6.5.1] wurde das His<sub>6</sub>-KIAA0403- $\Delta$ N291 vorab durch Dialyse in die entsprechenden Puffer überführt. Diese Proteinlösung wurde zur Präzipitationsvorbeugung sofort dem entsprechenden Assay zugeführt [6.1.7.1].

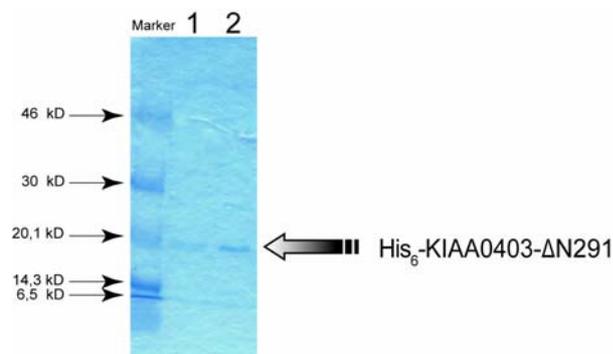


Abbildung 3.2.2: Analyse des His<sub>6</sub>-KIAA0403- $\Delta$ N291 nach der Affinitätschromatographie. His<sub>6</sub>-KIAA0403- $\Delta$ N291 (1: 250 ng; 2: 1250 ng) erscheint bei der SDS-PAGE Analyse nach Coomassie Färbung (Brilliant Blau) homogen.

<sup>2</sup> Das Expressionsplasmid pET28a KIAA0403- $\Delta$ N291 für die rekombinante Proteinexpression wurde freundlicherweise von Prof. Dr. D. J. Patel (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York) zur Verfügung gestellt.

#### 3.2.2 Bindungsstudien durch Oberflächenplasmonresonanz (BIAcore)

Nach erfolgreicher Expression und Reinigung von His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 wurde die isolierte Domäne auf ihre Bindungseigenschaften untersucht. Hierbei wurden Mitglieder der Cytohesin Familie und andere CC-Domänen enthaltende Proteine getestet.

Die Bindungscharakterisierung erfolgte *in vitro* mit den jeweiligen rekombinanten Proteinen durch Oberflächenplasmonresonanz [6.5.4]. Mit Hilfe dieser äußerst sensitiven Technik kann die Massenveränderung an einem Goldchip durch ein quantenphysikalisches Phänomen detektiert werden, das über einen optischen Detektor sichtbar gemacht wird. Die Plasmonresonanz wird durch die Totalreflektion von polarisiertem Licht in der Chipoberfläche induziert und resultiert in einem Schattenwurf des reflektierten Lichts, welcher sich proportional zur Belastung an der Chipunterseite verändert. Bei den Bindungsstudien wird einer der zu untersuchenden Bindungspartner stabil auf der Chipoberfläche immobilisiert. Nach Injektion des anderen Partners über eine integrierte Flusszelle wird die Massenzunahme beobachtet.

Das für erste Interaktionsstudien verwendete Protein Cytohesin 2 und in den weiteren Bindungsuntersuchungen verwendete His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 wurden zunächst mittels der EDC/NHS Kopplungschemie kovalent an die Oberfläche eines CM5-Chips (Biacore) immobilisiert [6.5.4]. Die Kopplungsreaktion erfolgte durch das Aktivieren der Dextran-carboxylsäurefunktionen auf der Chipoberfläche und der anschließenden Reaktion primärer Aminofunktionen der Proteine unter der Ausbildung einer Amidbindung. Die noch aktiven Säurefunktionen auf der Chipoberfläche wurden nach der Kopplung quantitativ mit einem Überschuss Ethanolamin blockiert. Parallel wurde eine Referenzoberfläche hergestellt, welche unter den gleichen Aktivierungs- und Absättigungsbedingungen mit Ethanolamin, allerdings in Abwesenheit des zu untersuchenden Proteins, hergestellt wurde.

Für die Bindungsstudie der isolierten His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 Domäne (Analyt) mit dem potentiellen Interaktionspartner Cytohesin 2 (Ligand) ergab die Kopplung an die Chipoberfläche einen Wert von 500 „*Response units*“ (RU), wobei 1 RU der Masse von 1 pg/mm<sup>2</sup> des immobilisierten Proteins entspricht. Durch die Injektion des Analyten in steigender Konzentration (10-1000 nM) war es möglich, kinetische Daten (Geschwindigkeitskonstanten und Dissoziationskonstanten) zu bestimmen. Hierbei konnte am immobilisierten Cytohesin 2 mit His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 eine konzentrationsabhängige Zunahme der „*response*“ beobachtet werden, Abbildung 3.2.3 (A). Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante wurde die Bindung im Gleichgewicht (in RU) logarithmisch gegen die steigende Konzentration des Analyten aufgetragen. Unter der Annahme eines „*steady-state*“-

Modells und sigmoidalen Verlaufs konnte der  $K_D$ -Wert der Kurve am Wendepunkt bestimmt werden. Die Dissoziationskonstante von Cytohesin 2 und His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 betrug  $32,5 \pm 9,6$  nM, Abbildung 3.2.3 (B). Diese starke Wechselwirkung des isolierten His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 an ihrem Interaktionspartner Cytohesin 2 liegt also im niedrigen nanomolaren Bereich und bestätigt die Homologie zum Rattenprotein IPCEF1.

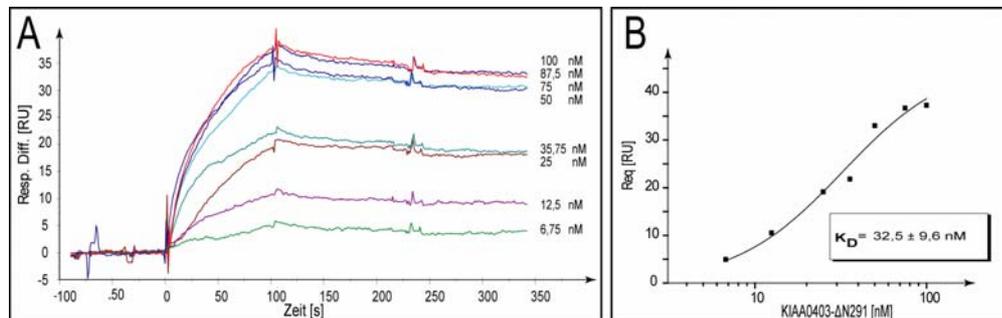


Abbildung 3.2.3 Biacore-Bindungsstudie der Proteinwechselwirkung des Analyten His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 und des immobilisierten Liganden Cytohesin 2. A| Dargestellt sind die normalisierten Bindungskurven des His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291-Proteins in steigender Konzentration auf einer Cytohesin 2 derivatisierten Oberfläche, 50μL/min Flussrate, Injektionszeit 100s. B| Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) wurde die Bindungsantwort im Gleichgewicht gegen die steigende Proteinkonzentration aufgetragen.

Nachfolgend wurden weitere Bindungsstudien durchgeführt, in denen zwei weitere Mitglieder der Cytohesinfamilie auf ihre Bindungsfähigkeiten mit His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 untersucht wurden. Hierfür wurde das His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 mit einer Dichte von 633 RU an die Chipoberfläche gekoppelt. Es konnten ebenso starke konzentrationsabhängige Proteinwechselwirkungen mit Cytohesin 1<sup>3</sup> ( $K_D = 73,8 \pm 6,1$ nM), Abbildung 3.2.4 (A/B) und dem Drosophila homologen dGRP1<sup>4</sup> ( $K_D = 51,8 \pm 11,8$ nM) nachgewiesen werden, Abbildung 3.2.4 (C) [Anhang 9.4].

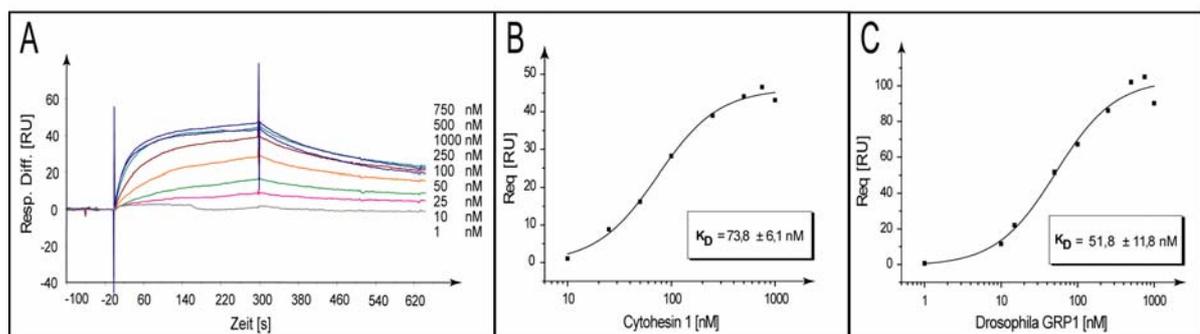


Abbildung 3.2.4: Biacore-Bindungsstudien der Proteinwechselwirkung des immobilisierten His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 und der Analyten Cytohesin 1 und dGRP1. A| Normalisierte Bindungskurven der Cytohesin 1 Wechselwirkung in steigender Konzentration auf einer His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 derivatisierten Oberfläche, 50μL/min Flussrate, Injektionszeit 300s. B und C| Aus den Biacorestudien wurden zur Dissoziationskonstantenbestimmung ( $K_D$ ) die Bindungsantwort im Gleichgewicht gegen die steigende Proteinkonzentration des Analyten Cytohesin 1 aus (A) und Drosophila dGRP1 [9.4] aufgetragen.

<sup>3</sup> Das rekombinante Protein wurde freundlicherweise von Frau I. Grüne (AK Famulok) zur Verfügung gestellt.

<sup>4</sup> Das rekombinante Protein wurde freundlicherweise von Herr M. Hafner (AK Famulok) zur Verfügung gestellt.

Durch weitere qualitative Messungen konnte festgestellt werden, dass die Interaktion der isolierten His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 Domäne auf die Cytohesinfamilie limitiert ist, Tabelle 3.2.1, da das CC-Domänenprotein His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC (4 μM) in der höchsten eingesetzten Konzentration nicht erkannt wurden. Weitere Kontrollproteine wie das GEF EFA6-Sec7 (0,4 μM) zeigten ebenfalls bei einer Konzentration von 4 μM keine Bindung.

Weiterhin konnte der Nachweis erbracht werden, dass His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 keine Affinität zur Cytohesin 2-Sec7- und Sec7PH-Domäne (4 μM) besitzt und sich die Wechselwirkung auf deren CC-Domäne zurückführen lässt. Im weiteren Verlauf werden die 125 C-terminalen Aminosäuren von KIAA0403 als CC-bindende Domäne bezeichnet. Eine Homologie zu den CC-Domänen der Familie der Cytohesine und zum CC-Modulator CYTIP ist jedoch nicht gegeben. Aus den kinetischen Bindungsstudien lässt sich folgern, dass es sich bei dem Protein KIAA0403 tatsächlich um ein neues Mitglied der CC-Binder [1.4] handeln kann.

Analyt	Ligand: Cytohesin 2 K <sub>D</sub> [nM]	Analyt	Ligand: His <sub>6</sub> -KIAA0403-ΔN291 K <sub>D</sub> [nM]
His <sub>6</sub> -KIAA0403-ΔN291	32,54 ± 9,60 nM	Cytohesin 1	73,8 ± 6,1 nM
		dGRP1 (Drosophila)	51,8 ± 11,8 nM
		Cytohesin 2-Sec7; -Sec7PH	Keine Bindung
		CYTIP-PDZCC, EFA6-Sec7	Keine Bindung
		ARF1, CYTIP-PDZ	Keine Bindung

Tabelle 3.2.1 Zusammenstellung der Dissoziationskonstanten und Bindungscharakteristika aus den kinetischen und quantitativen Daten der Biacore-Messungen.

### 3.2.3 *In vitro* Selektion gegen das His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291-Konstrukt

Zur Funktionsaufklärung mittels Aptamertechnologie wurde gegen das ΔN291-Konstrukt der CC-bindenden Domäne von KIAA0403 selektiert. Die Selektion wurde gemäß der optimierten Methode (Kapitel 3.1, Abschnitt 3.1.2) und in Anlehnung an die automatisierten Selektion von Cox et al.<sup>[70]</sup> mit streptavidinderivatisierten magnetischen Partikeln durchgeführt.

Aufgrund des hohen isoelektrischen Punkts des rekombinanten Proteins (pI = 10) wurde die Kopplungsmenge entsprechend auf 48 pmol Protein pro Zyklus reduziert, die RNA-Menge im ersten Zyklus jedoch bei 400 pmol beibehalten. Dies entsprach einem RNA-Proteinverhältnis von ca. 8 [6.3.2, Anhang 9.3.4]. Die Präzipitationsneigung des Proteins während der Inkubation mit der RNA-Bibliothek konnte durch dessen Immobilisation im Bindungspuffer (1 x PBS, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) unterbunden werden. Durch die Auswahl der N20- und N25-RNA-Bibliotheken mit einem sehr kurzen randomisierten Bereich von 20 bzw. 25 Nukleotiden (Gesamtlänge: 71 Nukleotide) sollten starke RNA-Binder mit stabiler Faltung im niedrigen nanomolaren Bereich selektiert werden.

Vor Beginn der Selektion wurde eine Biotinylierung des His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291-Konstrukts durchgeführt [6.1.8] und dieses an streptavidinderivatisierte magnetische Partikel immobilisiert [6.1.9]. Zur Proteinquantifizierung wurden der Überstand (nach der Kopplung), die Waschfraktionen und die derivatisierten Partikel durch kompetitive Elution mit freiem Biotin unter denaturierenden Bedingungen wiedergewonnen und im Western-Blot unter der Verwendung eines spezifischen Biotinantikörpers identifiziert [6.1.9, 6.1.3].

Die Kopplungsreaktion des biotinylierten KIAA0403-Konstrukts an die streptavidinderivatisierten magnetischen Partikel verläuft mit einer nahezu 100 %igen Effizienz. Das Ausbleiben einer Proteinbande bei 17 kD im Vergleich zu A, Abbildung 3.2.5 (B-D), bestätigt dies. Aufgrund der sehr starken Wechselwirkung von Biotin und Streptavidin ist jedoch die kompetitive Elution trotz eines 50fachen Biotin-Überschusses und stark denaturierender Bedingungen nicht vollständig, Abbildung 3.2.5 (F).



Abbildung 3.2.5 Immunologischer Nachweis der Biotinylierung und Kopplung des His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291-Konstrukts. Aufgetragen sind jeweils das dialysierte Protein vor der Kopplung (A: 5μL; Gesamtmenge 1μg), der Überstand nach der Kopplung (B: 5μL), drei aufeinanderfolgende Waschschritte (C, D, E: 5μL) und die Elution (F: 40μL beads: mit 0,8μg Gesamtprotein gekoppelt). Als Längenmarker diente eine biotinylierte Proteinleiter von 10-200 kD (Cell Signaling).

Die Aptamer Selektion, Abbildung 3.2.6 erfolgte nach folgendem Schema:

Nach einer verkürzten Transkription (Phosphatpuffer) [6.2.2.4] wurden 10 % des gesamten Transkriptionsansatzes mit dem immobilisierten His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 Proteins inkubiert. Anschließend erfolgte die Separation der komplexierten RNA-Sequenzen mittels eines Magneten. Das nachfolgende Waschen der Matrix mit steigenden Waschvolumina erzeugte den nötigen Selektionsdruck. Abschließend wurden die gebundenen RNA-Sequenzen durch kurze Hitzedenaturierung eluiert und ohne weitere Vorbehandlung vollständig in die nachfolgende RT-PCR-Reaktion eingesetzt [6.3.2, Anhang 9.3.4]. Zur Vermeidung von matrixbindenden RNA-Sequenzen wurde ab dem dritten Selektionszyklus gegen die geblockten streptavidinderivatisierten magnetischen Partikel vorselektiert. Die angereicherten RNA-Bibliotheken aus dem Selektionszyklus sieben und neun wurden mit α-[<sup>32</sup>P]-GTP radioaktiv transkribiert [6.2.2.4] und weiter durch Filterbindungsanalysen charakterisiert [6.5.1].

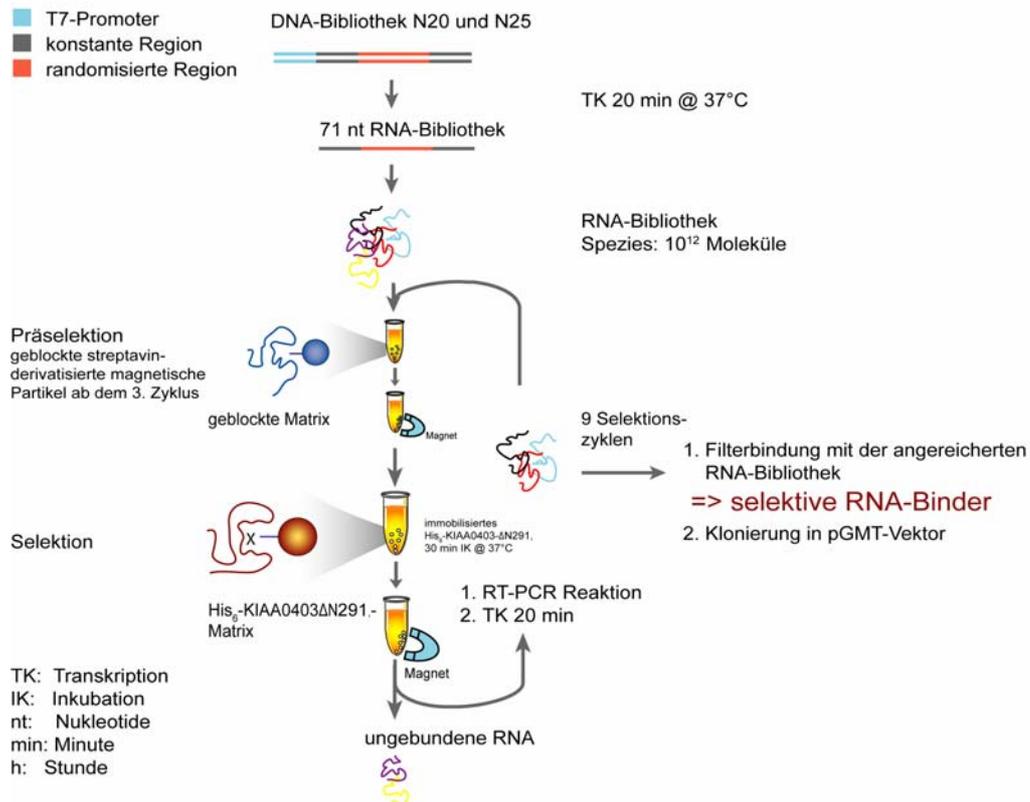


Abbildung 3.2.6: Schema der *in vitro* Selektion von Aptameren an His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 mit zwei gleich langen RNA-Bibliotheken N20 und N25. Nach Transkription der dsDNA-Bibliotheken für 20 min. entstanden RNA-Bibliotheken von 71 Nukleotiden. Diese wurde für 30 min. mit immobilisiertem KIAA0403-ΔN291 inkubiert bzw. ab dem dritten Zyklus einer Präselektion gegen underivatisierte geblockte Partikel unterzogen. Nach neun Zyklen wurde die Selektion beendet und die angereicherten Bibliotheken in Filterbindungsexperimenten untersucht.

Die in Abbildung 3.2.7 dargestellte Filterbindungsanalyse der angereicherten Bibliotheken ergab eine konzentrationsabhängige Bindung an His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 nach neun (N20) beziehungsweise nach sieben Selektionsrunden (N25). Diese wurden zur weiteren Analyse kloniert und sequenziert [6.4.2.1].

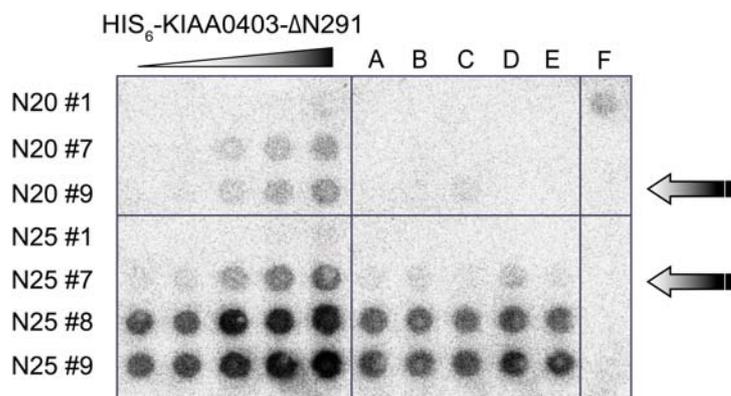


Abbildung 3.2.7: Filterbindung der angereicherten RNA-Bibliotheken N20 und N25 aus der His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 Selektion. His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 ist in steigender Konzentration (0-500 nM) mit radioaktiv markierter RNA-Bibliothek inkubiert und analysiert worden. Die Kontrollproteine A-E (A: Lysozym; B: FHL2 LIM 0+1, C: Streptavidin, D: Cytohesin 1 und E: CYTIP-PDZ) sind jeweils in der höchsten Konzentration (500 nM) aufgetragen. Als Transkriptionskontrolle F wurde das Lysozym-Aptamer aus der N20-Selektion verwendet.

### 3.2.4 Charakterisierung monoklonaler Aptamere

Aus der Sequenzierung der N20 Selektion ging hervor, dass fünf RNA-Sequenzen aus insgesamt zwölf identisch (Abbildung 3.2.8 (C)) und vier Sequenzen, bis auf eine Punktmutation außerhalb der randomisierten Region, gleich waren (Abbildung 3.2.8 (A/B)). Alle drei Populationen A-C besitzen einen großen G-reichen Konsensusbereich und stellen 67 % der Gesamtpopulation dar. Die restlichen Monoklonen unter (D) sind individuelle Sequenzen.

Das Ergebnis der zwölf Monoklonensequenzierungen aus der N25-RNA-Bibliothek ergab nur sechs korrekt sequenzierte und individuelle Spezies, Abbildung 3.2.8. Ein Vergleich der unterschiedlichen Sekundärstrukturen der einzelnen N25 Monoklonen mit Hilfe der mfold Software<sup>[172]</sup> ergab ebenfalls keine Ähnlichkeiten auf struktureller Ebene.

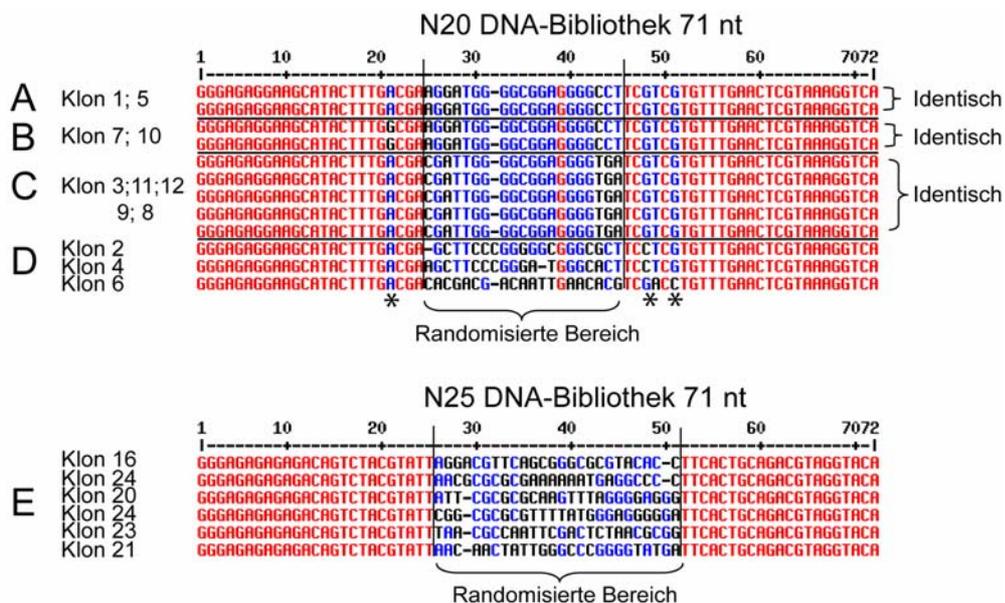


Abbildung 3.2.8: Sequenzvergleich der Monoklonen aus den angereicherten RNA-Bibliotheken N20 und N25 durch das Programm MultAlign<sup>[173]</sup>. Der randomisierte Bereich ist jeweils durch eine Trennlinie gekennzeichnet. Die in roten Lettern dargestellten Sequenzen sind bei allen Monoklonen identisch, blau gekennzeichnete Sequenzen weisen die größte Häufigkeit im selektierten Pool auf und schwarze individuell auftretende Nucleotide. Die mit einem Stern gekennzeichneten Nucleotide sind Punktmutationen im konstanten Bereich der N20 RNA-Bibliothek.

Weiterführende Charakterisierungen der Monoklonen aus der N20-Selektion mit Hilfe von Filterbindungsexperimenten ergaben eine spezifische und konzentrationsabhängige Targetbindung der RNA-Moleküle K2, K4 und K6, Abbildung 3.2.9 (A). Die drei häufigsten Spezies A-C zeigten eine deutliche Wechselwirkung mit dem His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291-Konstrukt, genauso wie eine Affinität zu freiem Streptavidin. Dieses Verhalten deutet auf eine Kreuzreaktivität der RNA-Binder hin, die für spätere funktionale Studien störend ist. Zu weiteren kinetischen Bindungsstudien wurden aus diesem Grund die spezifisch bindenden Monoklonen K2, K4 und K6 ausgewählt.

### 3 Ergebnisse

Die Charakterisierung der N25 Monoklon ergab, dass alle Monoklon eine spezifische Wechselwirkung mit ihrem Target und keine Affinität zu den Kontrollproteinen besaßen, Abbildung 3.2.9 (B). Für weitere Bindungsstudien wurden nur Monoklon ausgewählt, die im Konzentrationsbereich von 0-500 nM eine Sättigung zeigten (K16, K21, K23 und K24). K20 und K22 entsprachen hierbei nicht den Auswahlkriterien.

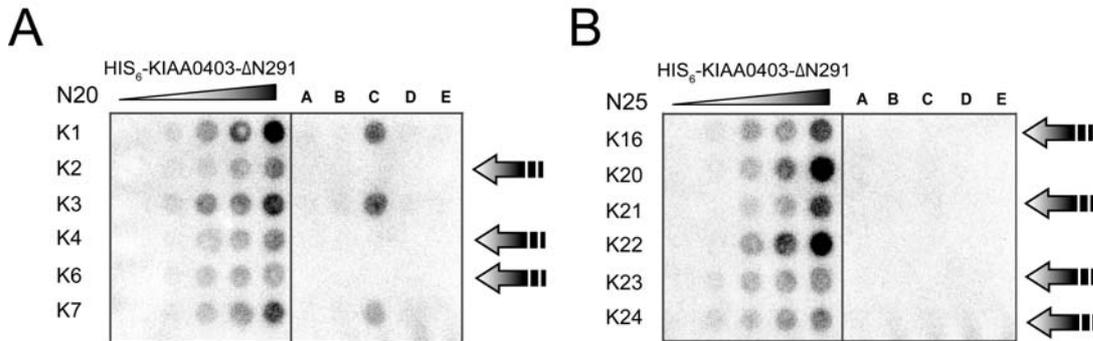


Abbildung 3.2.9: Filterbindung repräsentativer Monoklonen der N20 RNA-Bibliothek K1-K4; K6 und K7 (A) und der individuellen RNA-Sequenzen K16 und K20-24 (B) der N25 RNA-Bibliothek aus der His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 Selektion. His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 ist in steigender Konzentration (0-500 nM) mit den radioaktiv markierten Monoklonen inkubiert und analysiert worden. Die Kontrollproteine A-E (A: Lysozym; B: FHL2 LIM0+1, C: Streptavidin, D: Cytohesin 1 und E: CYTIP-PDZ) sind in der höchsten Konzentration (500 nM) eingesetzt worden.

#### 3.2.5 K21 und K61

Die Analyse der Monoklon-Filterbindungen beider Selektionen ergab die Sequenz **K21** (N25 RNA-Bibliothek) mit einer Dissoziationskonstante von  $78 \pm 23$  nM mit den besten Bindungseigenschaften, Abbildung 3.2.10 (A). Anschließende Filterbindungsstudien schlossen eine Affinität gegen die CC-Domänen des Proteinkonstruktes His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC und des Cytohesin 1 aus. Die Cytohesin 2-Sec7-Domäne wurde ebenfalls nicht erkannt, Abbildung 3.2.10 (B).

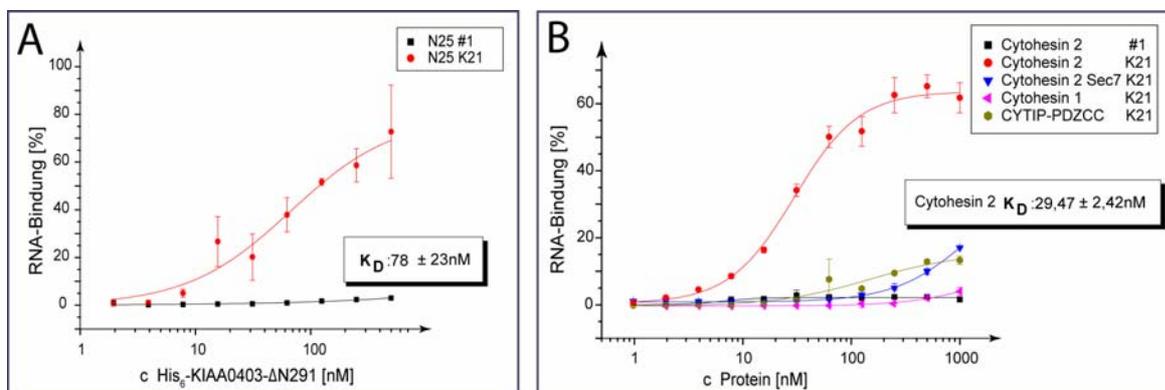


Abbildung 3.2.10: Filterbindungsanalysen der unselektierten RNA-Bibliothek N25 und von **K21**. A) Die RNA-Bindung in % ist gegen die steigende Konzentration von His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 in einem Bereich von 0-500 nM dargestellt. B) Filterbindungsanalyse des selektierten Aptamers **K21**. Die Aptamerbindung in % ist gegen die steigende Konzentration von Cytohesin 2, Cytohesin 2 Sec7-Domäne, Cytohesin 1 und CYTIP-PDZCC (0-1000 nM) aufgetragen.

Gleiches galt für die Wechselwirkung mit Lysozym, His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ, Streptavidin und His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1, Abbildung 3.2.9 (B). Interessanterweise vermochte **K21** auch Cytohesin 2, den Interaktionspartner von KIAA0403 mit einer ähnlichen Affinität ( $K_D = 29,47 \pm 2,42$  nM) zu erkennen, nicht jedoch das zu 90 % homologe Cytohesin 1.

Dieses Ergebnis führte zu intensiveren Untersuchungen dieses speziellen Bindungsphänomens. Hierzu wurde auch das **K61** Aptamer verwendet, selektiert und charakterisiert von Dr. M. Theis<sup>[57]</sup> gegen Cytohesin 2. Aus Filterbindungsstudien ging hervor, dass **K61** ebenfalls in der Lage ist, selektiv und mit sehr guter Affinität an das KIAA0403- $\Delta$ N291 Konstrukt zu binden ( $K_D = 21,46 \pm 0,69$  nM), genauso wie sein ursprüngliches Target Cytohesin 2 ( $K_D = 79,62 \pm 5,35$  nM), Abbildung 3.2.11.

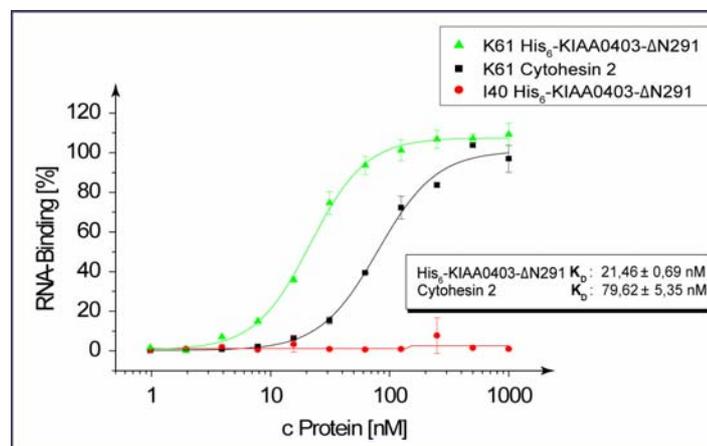


Abbildung 3.2.11: Filterbindungsanalysen der unselektierten RNA-Bibliothek I40 und des Aptamers **K61**. Die RNA-Bindung in % ist gegen die steigende Proteinkonzentration von His<sub>6</sub>-KIAA0403- $\Delta$ N291 und Cytohesin 2 in einem Bereich von 0-1000 nM dargestellt. Die  $K_D$ -Wert für His<sub>6</sub>-KIAA0403- $\Delta$ N291 beträgt  $21,46 \pm 0,69$  nM, für Cytohesin 2  $79,62 \pm 5,35$  nM. Als Negativkontrolle wurde die unselektierte I40 RNA-Bibliothek gegen die steigende Konzentration von His<sub>6</sub>-KIAA0403- $\Delta$ N291 aufgetragen.

Bei dem **K61** Aptamer handelt es sich um eine 82 Nukleotide lange RNA-Sequenz. Diese konnte in einer „Counter-Selektion“ aus der I40 RNA-Bibliothek mit einem randomisierten Bereich von 40 Nukleotiden identifiziert werden, spezifisch gegen Cytohesin 2. Bei dieser Selektionsmethode wurde die angereicherte Bibliothek nach 15 Selektionszyklen noch zusätzlich gegen Cytohesin 1 vorselektiert, um eine gezielte Anreicherung von spezifischen Cytohesin 2 Bindern zu erreichen<sup>[57]</sup>. Literaturbekannt ist ein Diskriminierungsfaktor von 35, mit welchem **K61** zwischen den beiden Spezies unterscheiden kann. Zwischen den Interaktionspartnern KIAA0403 und Cytohesin 2 ist es **K61** jedoch nicht möglich.

Beide Aptamere **K21** und **K61**, welche gegen zwei völlig unterschiedliche Proteine aus zwei verschiedenen RNA-Bibliotheken selektiert wurden, weisen in der Primärsequenz nur eine Gemeinsamkeit auf. Sie teilen sich ein Konsensusmotiv aus den sechs Nukleotiden **CUAUUG**, Abbildung 3.2.12. Hinweise auf ein gemeinsames Faltungsmuster konnten durch

mfold-Vergleiche nicht gefunden werden. Die von mfold als energetisch begünstigte Faltung von **K21** weist nach einer offenen Struktur einen stabilen „stem-loop“ von sieben Nukleotiden auf, Abbildung 3.2.12 (A). Dieser geht in einen Bulge (21 Nukleotide) über, welcher in einer stabilen „Hairpin“-Struktur endet und teilweise durch die Konsensussequenz gebildet wird. Im Vergleich dazu zeigt die Struktur von **K61** ein anderes Faltungsmuster, Abbildung 3.2.12 (B). Die Konsensussequenz befindet sich hierbei ungepaart in einer „loop“-Region. Um eine eindeutige Aussage zur tatsächlichen Struktur treffen zu können, müssten weitere Charakterisierungen in Form von Probings<sup>[174]</sup> durchgeführt werden.

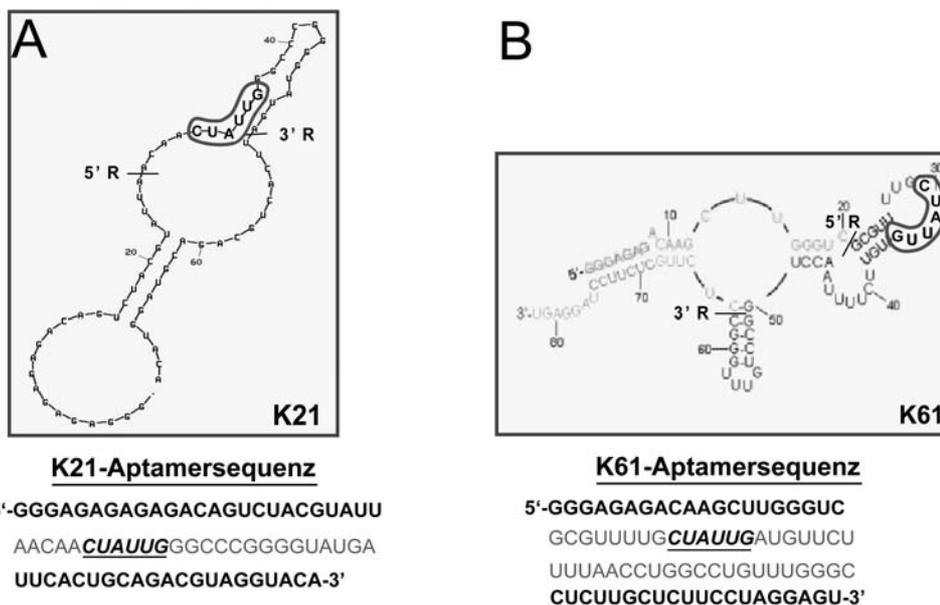


Abbildung 3.2.12: Mfold Strukturen und Aptamersequenzen von **K21** (A) und **K61** (B). In den mfold Darstellungen<sup>[172]</sup> beider Aptamere ist der randomisierte Bereich (R) durch eine Trennlinie zur konstanten Region gekennzeichnet. Die Konsensussequenz in beiden Strukturen ist durch größere Buchstaben und eine zusätzliche Markierung hervorgehoben. Zum Sequenzvergleich wurden die Aptamersequenzen noch einmal aufgeführt, wobei der randomisierte Bereich grau unterlegt ist und die Konsensussequenz in schwarzer kursiver Schrift unterstrichen ist.

### 3.2.6 *In vitro* „Pull-down“-Assays

Zur weiteren Charakterisierung des **K21** Aptamers wurden „Pull-down“-Assays etabliert. Bei diesem Assay werden die entsprechenden Proteine, His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 und Cytohesin 2 mit Hilfe der biotinylierten Aptamere aus der Proteinlösung herausgezogen [6.5.5] und im Western-Blot [6.1.3.1] nachgewiesen. Als Kontrollen wurden **K61**, seine unselektierte RNA-Bibliothek I40 und ein Cytohesin 1 spezifisches Aptamer **M69**<sup>[85]</sup> eingesetzt.

Für den His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 „Pull-down“-Assay wurden 33 pmol der biotinylierten RNA mit dem Protein in Lösung unter Selektionsbedingungen (1 x PBS; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) inkubiert und anschließend durch Immobilisierung an die streptavidinderivatisierten magnetischen Partikel aus der Reaktionslösung entfernt. Nach Waschen und Elution aus der Matrix wurde His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 mittels seiner fusionierten N-terminalen Hexahistidinsequenz im

immunologischen Nachweis detektiert, Abbildung 3.2.13 (A). **K21** konnte das rekombinante His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 Protein nach visueller Abschätzung zu ca. 80 % aus der Reaktionslösung ziehen. Ein ähnliches Verhalten konnte auch bei **K61** beobachtet werden. Die unselektierte I40 RNA-Bibliothek zeigte jedoch auch eine gewisse Affinität zu His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291, wobei diese in den vorangegangenen Filterbindungen nicht so ausgeprägt war, Abbildung 3.2.10. Weitere Kontrollexperimente mit dem biotinylierten **M69** Aptamer und Wasser schlossen eine unspezifische Matrixbindung aus.

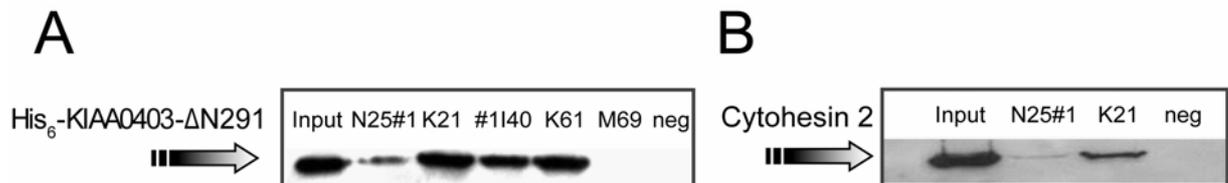


Abbildung 3.2.13 „Pull-down“ Assay mit dem rekombinant gereinigten His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 (A) und Cytohesin 2 (B). A| Western-Blot mit Inputkontrolle von 10 pmol, 30% des Gesamtproteins und je 50% der „Pull-down“-Elutionen aus der biotinylierten N25 und I40 RNA-Bibliothek, der Aptamere **K21**, **K61**, **M69** und Negativkontrolle (keine biot. RNA) wurden aufgetragen. B| 10 pmol 30% des Gesamtproteins Cytohesin 2 und je 50% der „Pull-down“ Elutionen aus der biotinylierten RNA-Bibliothek und K21 sind aufgetragen.

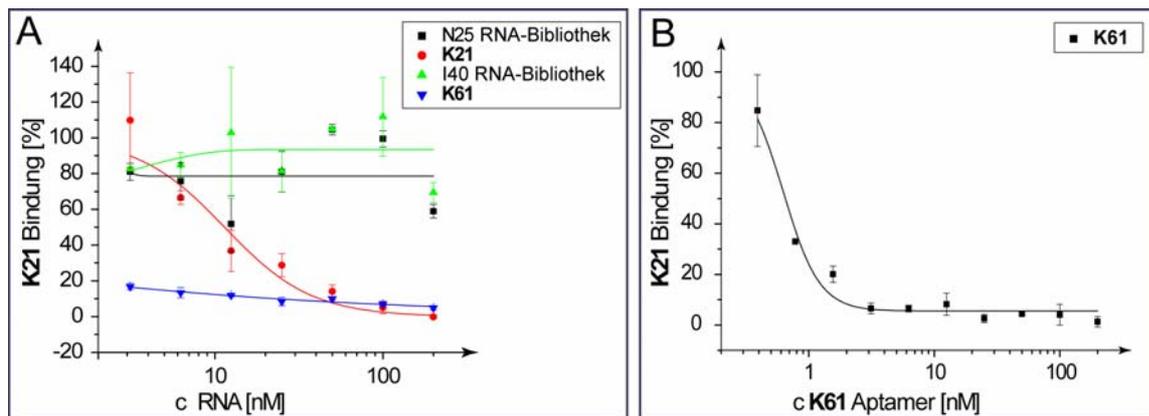
Aufgrund der Proteingröße von Cytohesin 2 (47 kD) wurde das biotinylierte Aptamer (33 pmol) und die Kontroll-RNA-Bibliothek für den „Pull-down“-Assay vorab immobilisiert. Nach Inkubation von Cytohesin 2 mit dem immobilisierten Aptamer bzw. der RNA-Bibliothek konnte **K21** in guter Diskriminierung zur unselektierten RNA-Bibliothek das Protein Cytohesin 2 komplexieren. Dieses wurde in Western-Blots mittels eines spezifischen Cytohesin 2 Antikörpers detektiert. Die Ausbeute war im Vergleich zum **K21** His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 „Pull-down“-Assay schlechter (visuell abgeschätzt 10%), Abbildung 3.2.13 (B). Gründe hierfür könnten die Proteingröße und mögliche sterische Effekte sein. Aber auch zu kurze Inkubationszeiten und daraus resultierende kinetische Effekte könnten hierbei eine Rolle gespielt haben.

Weiterhin konnten die „Pull-down Assays“ als zweiter unabhängiger Bindungstest bestätigen, dass das **K21** Aptamer beide Interaktionspartner KIAA0403 und Cytohesin 2 bindet. Es handelt sich also nicht um ein Filterbindungsartefakt.

### 3.2.7 Kompetitionsstudien von **K21** und **K61**

Zur Untersuchung der Bindungsepitope beider Aptamere **K21** und **K61** wurden Kompetitionsstudien [6.5.2] an His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 und Cytohesin 2 mit radioaktiv 5'-markierten Aptameren in Gegenwart der korrespondierenden unmarkierten RNA-Sequenzen in steigender Konzentration durchgeführt. Hierbei wurde die Konzentration des jeweiligen Proteins konstant bei 100 nM (His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291) bzw. bei 150 nM (Cytohesin 2)

gehalten. Dies entsprach etwa der Dissoziationskonstante der jeweiligen Bindung. Die Titration der unmarkierten RNA wurde in einem Bereich von 3-200 nM durchgeführt. Die RNA-Bibliotheken N25 und I40 zeigten weder bei der Inkubation mit dem radioaktiv markierten **K21** Aptamer und His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291, Abbildung 3.2.14 (A), noch mit **K61** und Cytohesin 2, Abbildung 3.2.15 (A), einen kompetitiven Effekt. Unmarkiertes **K21** hingegen zeigt bei der Konkurrenz mit sich selbst um die His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291-Bindungsstelle in einem Konzentrationsbereich von 3-200 nM die erwartete konzentrationsabhängige Bindungsabnahme, Abbildung 3.2.14 (A).



Kompetitionsstudie an His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291

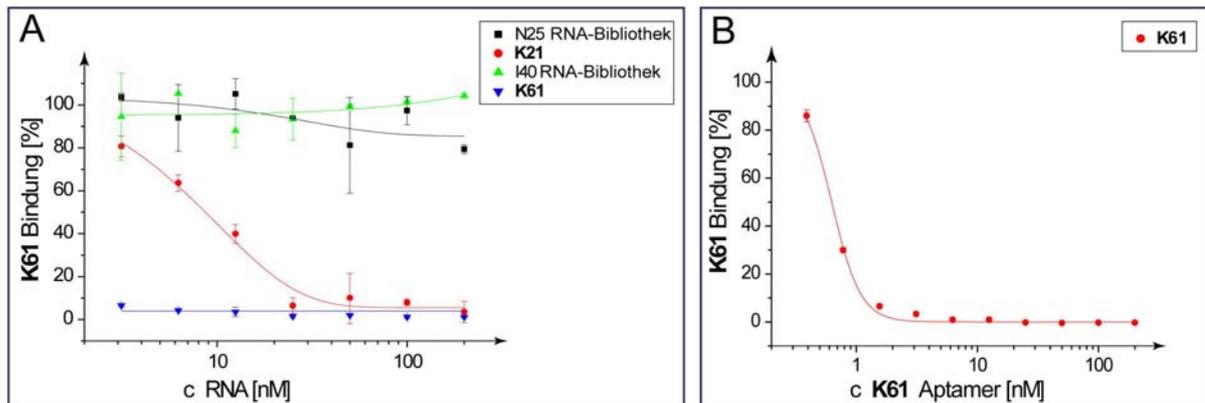
Abbildung 3.2.14: Kompetitionsstudien des radioaktiv markierten **K21**, 100nM His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 und der unmarkierten Aptamere **K21** und **K61**. Die **K21** Aptamerbindung ohne Kompetitor wurde auf 100% Bindung normiert. A) Aufgetragen ist die **K21** Aptamerbindung gegen die steigende Konzentration der unmarkierten Aptamere **K21** und **K61** in einem Bereich von 3-200 nM. Als negative Bindungskontrolle wurden die nicht markierten RNA-Bibliotheken N25 und I40 eingesetzt. B) Wiederholung der **K21**-Kompetition mit unmarkiertem **K61** im Bereich von 0,4-200 nM.

Unmarkiertes **K61** vermag ebenfalls radioaktiv markiertes **K21** von seiner Bindungsstelle zu verdrängen. Bei einer Konzentration von 3 nM waren mehr als 80 % der radioaktiv markierten RNA verdrängt. Dies bedeutet, dass **K61** innerhalb der His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 Aminosäuresequenz das gleiche oder ein überlappendes Bindungssepitop wie **K21** besitzt. Die erneute Titration des unmarkierten **K61** in Konkurrenz mit dem radioaktiv markierten **K21** in einem niedrigeren Konzentrationsbereich von 0,4-200 nM macht ebenfalls den konzentrationsabhängigen Abfall der Aptamerbindung deutlich, Abbildung 3.2.14 (B). Bei der Umkehrung des Konkurrenzexperimentes mit Cytohesin 2 war es auch hier möglich eine konzentrationsabhängige Bindungsabnahme des radioaktiven **K61** durch unmarkiertes **K21** zu beobachten, Abbildung 3.2.15 (A).

Die Bindungssepitope beider Aptamere **K61** und **K21** an Cytohesin 2 sind wie bei His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 entweder gleich oder in großen Teilen überlappend, so dass eine Konkurrenz stattfinden kann. Bei der Titration mit unmarkierten und markiertem **K61**,

konnte schon bei einer Konzentration von 3 nM eine vollständige Konkurrenz erzielt werden. Durch eine erneute Titration in einem kleineren Konzentrationsbereich (0,4-200 nM) konnte auch hier ein konzentrationsabhängiger Abfall der Aptamerbindung gezeigt werden, Abbildung 3.2.15

(B).



Kompetitionsstudie an Cytohesin 2

Abbildung 3.2.15: Kompetitionsstudien des radioaktiv markierten **K21**, 150 nM Cytohesin 2 und der unmarkierten Aptamere **K61** und **K21**. Die **K61** Aptamerbindung ohne Kompetitor wurde auf 100% Bindung normiert. A| Aufgetragen ist die **K61** Aptamerbindung gegen die steigende Konzentration der unmarkierten Aptamere **K21** und **K61** im Bereich von 3-200 nM. Als Negativkontrolle wurden die unselektierten, nicht markierten RNA-Bibliotheken N25 und I40 eingesetzt. B| Wiederholung der **K61**-Kompetition mit unmarkierten **K61** im niedrigerem nM Bereich (0,4-200 nM).

Zusammenfassend lässt sich als Ergebnis der Aptamer-Kompetitionsstudien festhalten, dass beide Aptamere **K21** und **K61** in der Lage sind, sich gegenseitig sowohl an der CC-bindenden Domäne des His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 Konstrukts als auch an Cytohesin 2 zu verdrängen. Dies lässt darauf schließen, dass beide Aptamere die gleichen oder überlappenden Regionen auf beiden rekombinanten Proteinen erkennen.

### 3.2.8 Kompetitionsstudien von KIAA0403-ΔN291 und Cytohesin 1

Weiter wurde mittels Filterbindungen [6.5.3] der Einfluss von Cytohesin 1 auf die **K21** Aptamerbindung an KIAA0403-ΔN291 untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Cytohesin 1, welches keine Affinität zum **K21** Aptamer besitzt, in der Lage war, die **K21**-His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 Interaktion konzentrationsabhängig mit einem  $K_I$  von  $1,29 \pm 0,44 \mu\text{M}$  zu inhibieren, Abbildung 3.2.16.

Es sind vor allem die CC-Domänen des Cytohesins 1 und 2, welche sich auf Aminosäureebene stark unterscheiden. KIAA0403 ist es dennoch möglich, beide Proteine zu erkennen. Jedoch wird dieser wahrscheinlich sehr kleine strukturelle Unterschied vom **K21** Aptamer nicht toleriert.

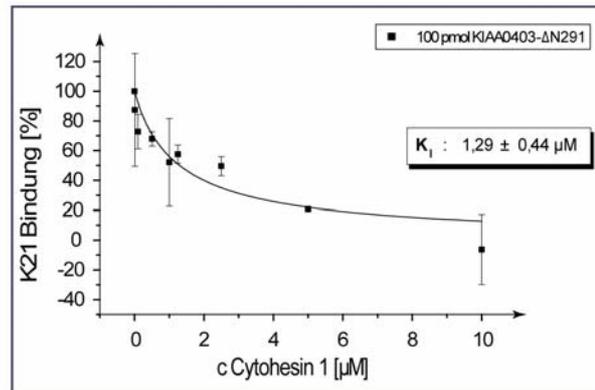


Abbildung 3.2.16: Kompetitionsstudie des radioaktiv markierten **K21**, 100 nM His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 und Cytohesin 2. Die **K21** Aptamerbindung ohne Kompetitor wurde auf 100% Bindung normiert. Aufgetragen ist die **K21** Aptamerbindung gegen eine steigende Konzentration von Cytohesin 1 (0,01-1 µM). Die ermittelte Inhibitionskonstante der Competition beträgt  $1,29 \pm 0,44 \mu\text{M}$ .

### 3.2.9 GDP/GTP Austausch-Assay

Zur weiteren Charakterisierung von **K21** [3.2.5] wurden GDP/GTP Austausch-Assays durchgeführt. Hierbei sollte untersucht werden ob **K21** einen Einfluss auf die katalytische Aktivität der Sec7-Domäne<sup>[175]</sup> besitzt. Alle Mitglieder der Cytohesin Familie besitzen die Fähigkeit, an ARF-Proteinen den GDP/GTP Austausch zu katalysieren und diese in die aktive Konformation zu überführen<sup>[129, 176]</sup> [1.4], Abbildung 3.2.17.

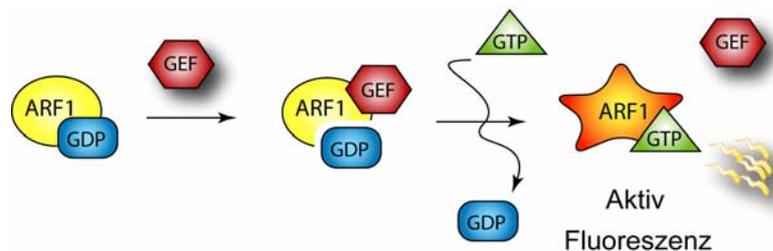


Abbildung 3.2.17: Schematische Darstellung des GDP/GTP Austausches an ARF, wobei das GEF (*Guanosin Exchange Factor*) als Katalysator aufgrund seiner Sec7-Domäne fungiert. Durch die Proteinwechselwirkung kommt es zu einer Reorganisation des ARF-Proteins, wobei das GDP aus dem Komplex entlassen wird und die Aufnahme von GTP stattfinden kann.

Der GDP/GTP Austausch induziert eine Reorganisation der ARF-β-Faltblattstruktur<sup>[175]</sup>. Aufgrund der Konformationsänderung zeigt ARF im GTP-gebundenen Zustand bei Anregung (280 nm) eine höhere Fluoreszenz als in GDP gebundenem Zustand<sup>[175, 177]</sup>. Dies wird durch das Tryptophan W78 im katalytischen Zentrum gesteuert<sup>[177]</sup>. Bei den Messungen wurde mit der NΔ17ARF1-Mutante, einer löslichen Variante ohne Myroystoylrest und hydrophobes N-terminales Ende, gearbeitet. Die GDP/GTP Austauschreaktion konnte über den Anstieg der Tryptophanfluoreszenz im GTP-gebundenen Zustand des ARF-Proteins verfolgt werden [6.5.6]. Die Zugabe des **K21** Aptamers in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (0,5 und 1 µM) verursachte keine Veränderung in der Austauschaktivität vom Cytohesin 2 an ARF1,

Abbildung 3.2.18 (A). Lediglich in einer hohen Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  konnte eine Inhibition festgestellt werden. Der gleiche Effekt wurde allerdings auch bei der N25 RNA-Bibliothek beobachtet. Dies deutet auf eine generelle aptamerunabhängige, unspezifische Wechselwirkung aufgrund der hohen RNA-Konzentration hin, Abbildung 3.2.18 (B).

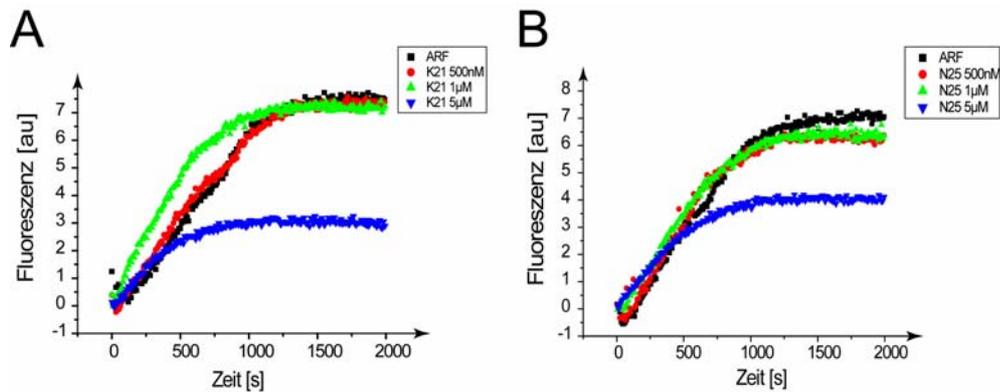


Abbildung 3.2.18: GDP/GTP-Austausch von Cytohesin 2 an N $\Delta$ 17Arf1. Aufgetragen ist die gemessene Fluoreszenz gegen die Zeit. A) Austauschreaktion von Cytohesin 2 (50 nM) an N $\Delta$ 17Arf1 (1  $\mu\text{M}$ ) mit steigender Konzentration des **K21** Aptamers (0,5, 1, 5  $\mu\text{M}$ ). B) Kontrollaustauschreaktion mit der N25 RNA-Bibliothek. Reaktionsbedingungen: 1 x PBS pH 7,4, 4mM MgCl<sub>2</sub>; 200  $\mu\text{L}$  Reaktionsvolumen; 37°C.

In diesem Testsystem konnte nachgewiesen werden, dass **K21** den GDP/GTP Austausch von Cytohesin 2 an ARF nicht inhibiert oder strukturelle Veränderungen der katalytisch aktiven Cytohesin 2 Sec-7 Domäne bewirkt. Die Ähnlichkeit zu **K61** wird durch dieses Ergebnis noch deutlicher, da es ebenso keine inhibitorischen Fähigkeiten bezüglich des GDP/GTP vermittelnden Austausches besitzt<sup>[57]</sup>.

### 3.2.10 Klonierung und Expression der GST-KIAA-Konstrukte

Für weitere Charakterisierungen und Epitopuntersuchungen wurde die Klonierung und Expression des KIAA0403 Volllängenproteins als Glutathion-S-Transferase Fusionsprotein etabliert. Zur Epitopkontrolle wurde auch die CC-bindende Domäne, welche schon zur Aptamerselektion verwendet wurde, als GST-KIAA0403- $\Delta$ N291-Konstrukt kloniert [6.4]. Weiterhin wurde das korrespondierende GST-KIAA0403- $\Delta$ C125-Konstrukt nach der in [6.4] beschriebenen Methode durch Restriktionsverdau [6.4.1] mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI und Ligation [6.4.2] in einen pGEX-2T Expressionsvektor kloniert<sup>5</sup>, siehe Abbildung 3.2.19.

<sup>5</sup> Das Volllängenplasmid KIAA0403 für die Klonierungen wurde freundlicherweise von Prof. Dr. W. Kolanus (Universität Bonn) zur Verfügung gestellt.

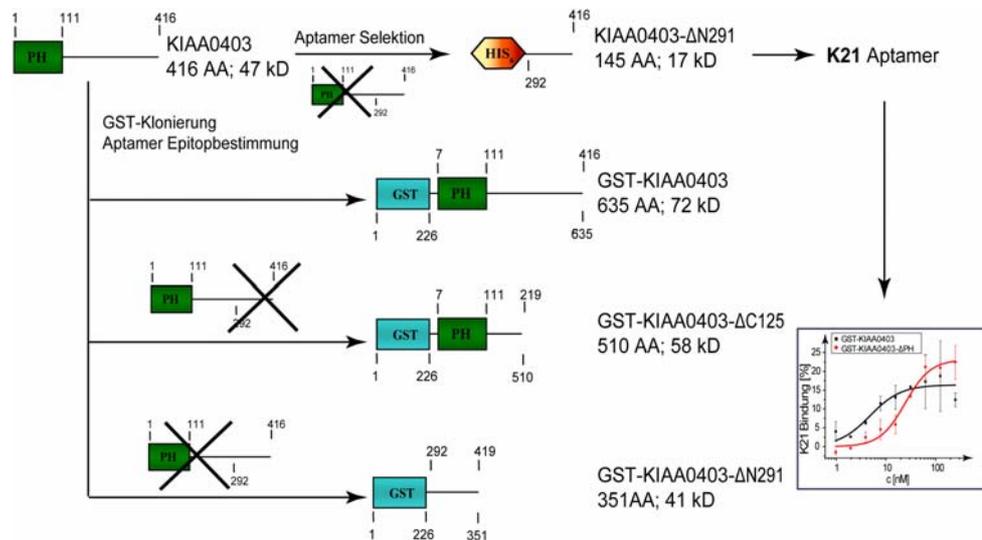


Abbildung 3.2.19: Schematische Darstellung der GST-KIAA0403-Konstrukte zur Epitopbestimmung und Verifizierung der Filterbindungsdaten. Die zur Affinitätschromatographie verwendeten Fusionstags sind als rotes Hexagon für die Hexahistidinaminosäuresequenz und als blaues Rechteck für die Glutathion-S-Transferase (GST) dargestellt. Die N-terminale PH Domäne von KIAA0403 ist schematisch als grünes Rechteck gekennzeichnet.

Die Einführung des 26 kD großen Fusionsproteins Glutathion S-transferase (GST) am N-Terminus der zu exprimierenden Proteine sollte einerseits zur affinitätschromatographischen Reinigung der rekombinanten Proteine dienen, andererseits aber auch die Löslichkeit steigern.

Die Proteinexpression der GST-Fusionsproteine von KIAA0403 konnte nach Optimierung der Expressionszeit und der Sauerstoffzufuhr nach der in [6.6.7.3] beschriebenen Methode durchgeführt werden. Die anschließende Lyse des GST-KIAA-ΔN291- und -ΔC125-Konstrukts [6.6.7.3] und die affinitätschromatographische Reinigung [6.1.11.2] wurden aufgrund der hohen Tendenz zur Präzipitation in dem schon für das His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 Protein optimierten Hochsalzpuffer durchgeführt. Das Glutathion wurde nach der Proteinreinigung umgehend mittels NAP-Säulen [6.1.7.2] entfernt und beide Proteinkonstrukte im Hochsalzpuffer aufbewahrt. Zur Reinigung des GST-KIAA0403 Volllängenproteins wurde die Lyse in einem Phosphatpuffer durchgeführt, welcher in allen Reinigungsschritten benutzt wurde [6.1.11.2]. Anschließend wurde zur Abtrennung von basal exprimierten GST eine zusätzliche Ionenaustauschchromatographie durchgeführt [6.1.12]. Eine derartige Behandlung war bei der Proteinreinigung der Deletionsproteine nicht erforderlich.

Nach der zweiten Reinigung konnte das Fusionsvolllängenprotein mit einer kleinen Restkontamination durch GST erhalten werden, Abbildung 3.2.20. Die anschließende Umpufferung in den KIAA0403 Hochsalzpuffer diente zur Vorbeugung gegen Präzipitation.

Die Deletionsmutanten GST-KIAA-ΔN291 und -ΔC125 konnten ausreichend in einer Proteinausbeute von 36 μg (6,05 μM; ΔN291) und 500 μg (14,6 μM; ΔC125) aus 1 L LB

Kultur B121 (DE3) *E.coli* (zwei Ansätze: 0,5 L) erhalten werden. Die Gesamtmenge des GST-KIAA0403 Volllängenproteins betrug 200 µg aus der gleichen Ansatzgröße mit einer Konzentration nach Anreicherung von 12 µM. Wie in Abbildung 3.2.20 zu sehen entspricht der Reinheitsgrad über 90 %, so dass diese Proteinpräparationen für die Filterbindungsuntersuchungen verwendet werden konnte. Die Identität der neu klonierten Proteine wurde auf DNA-Ebene durch die Sequenzierung des Expressionsplasmids bestätigt [Anhang 9.1.5, 9.1.6, 9.1.7]. Zur weiteren Verwendung für die Bestimmung der Aptamer-Bindungsdomäne in Filterbindungsuntersuchungen [6.5.1] wurden die GST-Proteine vorab durch Dialyse in die entsprechenden Puffer überführt und zur Präzipitationsvorbeugung unverzüglich verwendet [6.1.7.1].

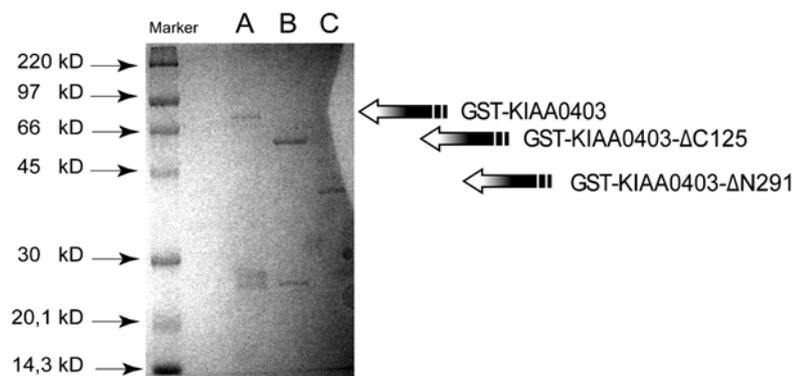


Abbildung 3.2.20: Analyse der GST-KIAA0403 Proteinkonstrukte. A| Das GST-KIAA0403-Volllängeprotein weist nach Affinitäts- und Ionenchromatographie (700 ng) noch kleine Restkontamination durch GST (26 kD) auf. B| Bei GST-KIAA0403-ΔC125 ist nach Affinitätschromatographie ebenfalls eine kleine GST Restkontamination vorhanden (510 ng). C| GST-KIAA0403-ΔN291 (750 ng) erscheint mittels SDS-PAGE Analyse nach Coomassie Färbung (Brilliant Blau) homogen.

Das **K21** Aptamer zeigte wie erwartet, eine sehr gute Affinität zu seinem ursprünglichen Target GST-KIAA0403-ΔN291 mit einem  $K_D$ -Wert von  $24,51 \pm 3,90$  nM. Eine fünffach stärkere Interaktion im niedrigen nanomolaren Bereich konnte mit dem GST-KIAA0403 Volllängenprotein ( $K_D = 4,8\text{nM} \pm 1,47$  nM) beobachtet werden, Abbildung 3.2.21 (A). Interessanterweise vermochte **K21** ebenso die Deletionsmutanten GST-KIAA0403-ΔC125, die keine CC-bindende Domäne aufweist, mit vergleichbarer Affinität ( $K_D = 18,16 \pm 3,62$  nM) zu binden, Abbildung 3.2.21 (B).

Diese Ergebnisse lassen eine Schlussfolgerung auf ein konkretes Bindungs epitop von **K21** innerhalb des KIAA0403 Proteins nicht zu. Dennoch handelt es sich bei den Aptamerinteraktionen um eine spezifische Wechselwirkung. **K21** zeigte in Kontroll-experimenten weder eine Interaktion mit der isolierten Glutathion-S-Transferase<sup>6</sup>, noch war es in der Lage, ein weiteres Kontroll-GST-Fusionsprotein (GST-Innexin3-Loop<sup>6</sup>) zu erkennen.

<sup>6</sup> Das rekombinante Protein wurde freundlicherweise von Herr M. Knieps (AK Famulok) zur Verfügung gestellt.

### 3 Ergebnisse

Dieses Ergebnis schließt eine unspezifische Affinität zum GST aus. Eine Homologie der KIAA0403 GST-Konstrukte auf Aminosäureebene besteht ebenfalls nicht [9.6].

Der Sättigungsabfall der Filterbindungen von ursprünglich 80% (His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291), Abbildung 3.2.10, auf max. 20% bei den GST-KIAA0403-Konstrukten könnte verschiedene Ursachen haben. Es könnte auf ein Faltungsproblem der RNA bzw. der Proteinkonstrukte hindeuten, so dass nur ein kleiner Teil der Gesamtpopulation binden kann.

Um Näheres über das Bindungsepitop zu erfahren, welches wahrscheinlich in der Zwischenregion der beiden Deletionsmutanten zu suchen wäre, müssten weitere Deletionsmutanten kloniert und in Filterbindungs-Assays untersucht werden.

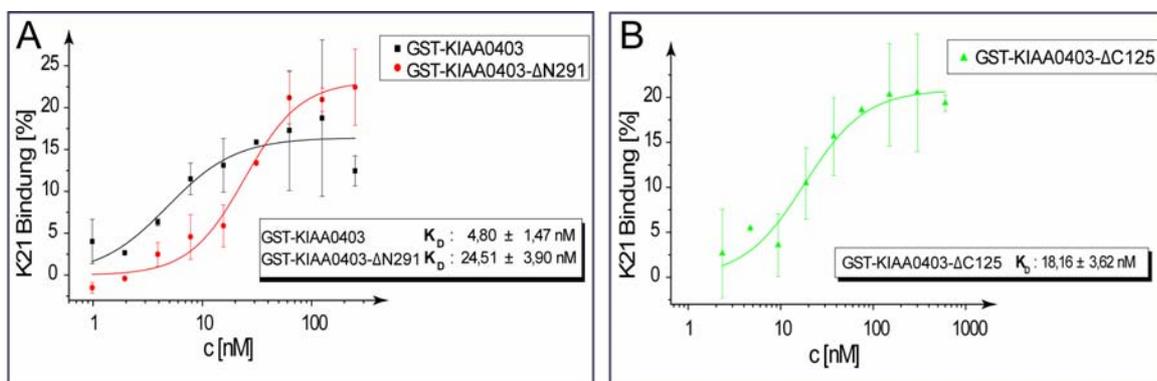


Abbildung 3.2.21 Filterbindungsanalysen des Aptamers **K21** mit den rekombinanten GST-Proteinen, KIAA0403 Volllänge, des KIAA0403-ΔN291- und KIAA0403-ΔC125-Konstrukts. Die Aptamerbindung in % ist gegen die steigende Proteinkonzentration von GST-KIAA0403 Volllänge und GST-KIAA0403-ΔN291 in (A) bzw. GST-KIAA0403-ΔC125 in (B) in einem Bereich von 0-1000 nM dargestellt. Aus der Auftragung ergeben sich die  $K_D$ -Werte für GST-KIAA0403 Volllänge von  $4,80 \pm 1,47$  nM, GST-KIAA0403-ΔN291 von  $24,51 \pm 3,90$  nM und  $18,16 \pm 3,62$  nM für GST-KIAA0403-ΔC125.

Bei der Filterbindungsanalyse des **K61** Aptamers mit den GST-KIAA0403 Fusionsproteinen stellte sich heraus, dass auch **K61** nicht in der Lage war, zwischen den beiden Deletionsproteinen KIAA0403-ΔN291 und -ΔC125 zu diskriminieren. **K61** vermochte das GST-KIAA0403 Volllängenprotein in einer sehr guten Affinität zu binden ( $K_D = 4,68 \pm 2,27$  nM), vergleichbar mit der des **K21** Aptamers. Die Aptamer-Protein Interaktion von **K61** und dem GST-KIAA0403-ΔN291 Protein lag mit einer Dissoziationskonstanten von  $50,77 \pm 2,82$  nM im nanomolaren Bereich und ist um einen Faktor drei stärker als die Wechselwirkung des GST-KIAA0403-ΔC125-Konstrukt ohne die CC-bindende Domäne ( $K_D = 175,3$  nM  $\pm$  23,1 nM), Abbildung 3.2.22. Bei diesen Filterbindungen war die Sättigung im Gegensatz zu den vorherigen Bindungsstudien um den Faktor vier höher, sie betrug 80%.

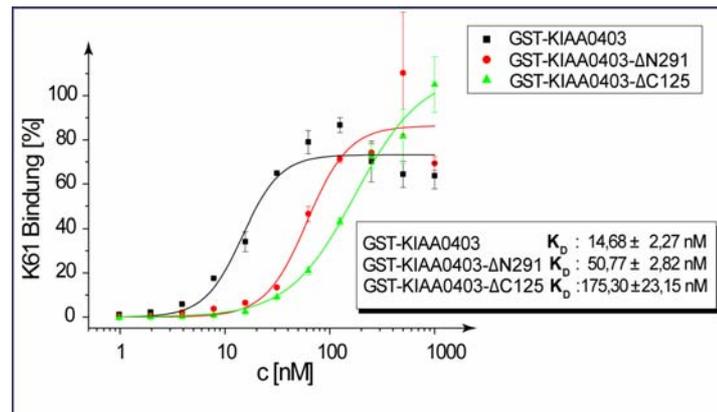


Abbildung 3.2.22: Filterbindungsanalysen des Aptamers **K61** mit den rekombinanten GST-Proteinen, KIAA0403 Volllänge, des KIAA0403-ΔN291- und KIAA0403-ΔC125-Konstrukts. Die Aptamerbindung in % ist gegen die steigende Proteinkonzentration von GST-KIAA0403 Volllänge, GST-KIAA0403-ΔN291 und GST-KIAA0403-ΔC125 in einem Bereich von 0-1000 nM dargestellt. Die aus der Auftragung ermittelten Dissoziationskonstanten der Aptamerinteraktionen ergeben sich zu  $14,68 \pm 2,27$  nM für GST-KIAA0403 Volllänge,  $50,77 \pm 2,82$  nM für GST-KIAA0403-ΔN291 und  $175,30 \pm 23,15$  nM für das GST-KIAA0403-ΔC125-Konstrukt.

Wie beim **K21** Aptamer war eine eindeutige Bindungszuordnung aus der **K61** Epitopanalyse nicht möglich. Beide Aptamere **K21** und **K61** zeigen das gleiche Bindungsverhalten mit ähnlich guter Affinität ohne weitere Diskriminierung an den getesteten GST-Fusionsproteinen. Weitere Untersuchungen der gemeinsamen Konsensussequenz sollte Aufschluss geben, ob diese Region für die Interaktion essentiell ist.

### 3.2.11 Mutationsstudien der Konsensussequenz von K21

In weiteren *in vitro* Untersuchungen sollte das gefundene Konsensusmotiv **CUAUUG** durch Punktmutationen analysiert werden, um einen konkreten Zusammenhang des Motivs zum Aptamerbindungsverhalten herzustellen. Das Auswahlkriterium der Punktmutationspositionen stellten die aus mfold-Analysen vorhergesagten zweidimensionalen Foldstrukturen dar. Diese sollten nach Möglichkeit einen großen strukturellen Unterschied zur ursprünglichen vorhergesagten **K21** Aptamerstruktur aufweisen. Hierbei wurden die einzelnen Purinbasen und Pyrimidinbasen durch die korrespondierenden Purin- und Pyrimidinbasen ersetzt und die Positionen mit dem größten Unterschied ausgewählt [32 (P2), 33 (P3), 34 (P4); Anhang 9.6]. Zu Vergleichszwecken wurden auch Doppelmutanten an den Positionen 32;33 (P2+3) und 33;34 (P3+4) generiert, Abbildung 3.2.23 (B). Das **K21** und die Punktmutanten wurden als synthetische DNA von der Firma Metabion bezogen, wobei die original **K21** Aptamersequenz zur Sequenzverifizierung diente. Nach der T7-Promoterintegration mittels PCR (N25.47- und N25.21-Primer) [5.7.1.4, 6.2.2.1] wurde die RNA durch T7-Transkription [6.2.2.2] generiert. Anschließend wurde durch Dephosphorylierung [6.2.2.10] und erneuter

Phosphorylierung mit radioaktiv markiertem  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]-ATP [6.2.2.11], die Filterbindungsanalysen ermöglicht. Die eingesetzte synthetische **K21** Aptamersequenz zeigte die gleiche Affinität zum His<sub>6</sub>-KIAA0403- $\Delta$ N291 Proteinkonstrukt wie das aus der Selektion und Klonierung generierte **K21** Aptamer, Abbildung 3.2.23 (C). Alle Punktmutanten dagegen zeigten eine sehr viel schlechtere Wechselwirkung. Hierbei ist auch zu erwähnen, dass sich die Sättigung bei den Punkt- und Doppelmutanten um den Faktor vier reduziert hat. Der Grund könnte eine instabile RNA Faltung sein, bedingt durch die Punktmutationen. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass die identifizierte Konsensussequenz **CUAUUG** der **K21** und **K61** Aptamere bei **K21** essentiell für die Interaktion mit dem His<sub>6</sub>-KIAA0403- $\Delta$ N291 Protein ist.

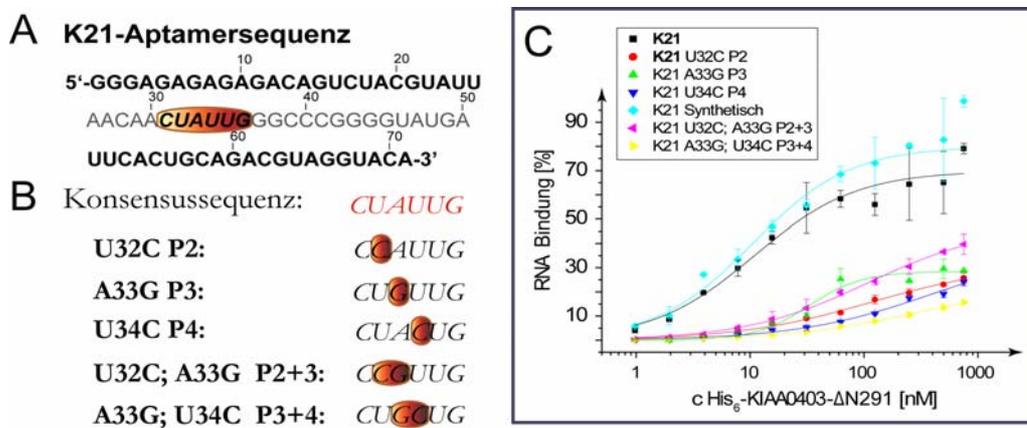


Abbildung 3.2.23: A| **K21** Aptamersequenz mit der punktmutierenden Konsensussequenz **CUAUUG**. Der konstante Bereich ist durch fett gedruckte Letter gekennzeichnet, wobei die Konsensussequenz farblich hervorgehoben ist. B| Die Punktmutationen an Position 32, 33 und 34, wie auch die Doppelmutanten der Positionen 32;33 und 33;34 sind durch Unterlegung der betroffenen Nukleotide verdeutlicht. C| Filterbindungsanalyse der Punktmutanten P2-P4 und Doppelmutanten P2+3 und P3+4. Die Aptamerbindung in % ist gegen die steigende Proteinkonzentration von His<sub>6</sub>-KIAA0403- $\Delta$ N291 in einem Bereich von 0-1000 nM dargestellt.

Alle Daten aus den *in vitro* Bindungsstudien präsentieren ein sich wiederholendes Bild. Beide Aptamere **K21** und **K61** zeigen ein auffällig ähnliches Bindungsverhalten. Dies könnte auf ein vergleichbares Faltungsverhalten in einer bestimmten Region oder Domäne beider Proteine hindeuten, welche sich aber in der Aminosäuresequenz deutlich unterscheiden.

### 3.2.12 Zellkulturstudien in HeLa-Zellkultur

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Charakterisierung des selektierten Aptamers **K21**, welches in allen *in vitro* Experimenten eine sehr große Ähnlichkeit mit dem **K61** Aptamer<sup>[57]</sup> aufwies, waren weiterführende Untersuchungen in eukaryontischer Zellkultur.

Theis et al.<sup>[57]</sup> konnten anhand von Transfektionsexperimenten des **K61** Aptamers in HeLa-Zellen eine negative Regulation der MAPK-regulierten Genexpression feststellen. Eine Inhibierung von Cytohesin 2, nicht jedoch von Cytohesin 1, mit Hilfe von Aptameren oder

einer spezifischen siRNA resultierte in der Reduktion der Erk1/-2 Phosphorylierung. Die Folge war eine Blockierung der serumstimulierten Expression von SRE-regulierten Genen. Der MAP-Signalweg reguliert eine Fülle unterschiedlicher Gene, unter anderem auch den Transkriptionsfaktor c-Fos [1.3, 1.3.1]. Die stimulierbare Expression von c-Fos durch Mitogene oder Wachstumsfaktoren wird unter anderem durch das „*serum response element*“ (SRE) vermittelt, welches in der Promotorregion des c-Fos Genes enthalten ist<sup>[178, 179]</sup>.

Das neu selektierte **K21** Aptamer sollte ebenso wie **K61** in HeLa-Zellkultur einen ähnlichen Effekt als MAP-Signalweginhibitor aufweisen, da alle *in vitro* Bindungsstudien auf identische Charakteristika der Aptamere hindeuten. Eine regulatorische Beteiligung des humanen KIAA0403 CC-Binders an der MAPK-Aktivität ist aufgrund der *in vitro* Bindungsdaten mit den Cytohesinen [3.2.2] und der Aptamerwechselwirkung [3.2.5, 3.2.7] sehr wahrscheinlich und wurde weiter untersucht. Die Existenz der Cytohesinmitglieder 1-3 und KIAA0403 (PIP3-E) konnte in ersten Vorversuchen durch „Real time“ PCR-Experimente mit spezifischen Sonden (ABgen) nachgewiesen werden [M. Hafner, unpublizierte Daten].

Cytohesin 2 ist nicht ausschließlich für die Signalweiterleitung verantwortlich, sondern in weiteren biologischen Prozessen wie der Aktinzytoskelettremodellierung, der Aktivierung der Ca-regulierten Exozytose, der Regulierung der dendritischen Verzweigung und der Zellmigration beteiligt [1.4]. Bedenkt man diese Multifunktionalität des Proteins muss der Assay so geplant werden, dass nur die Signaltransduktion erfasst wird.

### 3.2.12.1 Luciferase MAP-Kinase Assays

Die inhibitorischen Eigenschaften des **K21** Aptamers im MAP-Signalweg wurden mittels eines von Dr. M. Theis etablierten Luciferase-Assays<sup>[57]</sup> untersucht.

Zur Analyse der SRE-kontrollierten Genexpression wurde die Luciferase als Reporter gen in HeLa-Zellstudien eingesetzt. Das Strukturgen der Luciferase steht hierbei im Plasmid SRE-Luc unter der Kontrolle des „*serum response element*“ [5.6]. Dieses Plasmid wurde mit dem **K21** Aptamer, bzw. mit der unselektierten N25 RNA-Bibliothek als Negativkontrolle co-transfiziert. Das Aptamer wurde in diesem Assay mit steigender Konzentration (0,25 bis 3 pmol) appliziert, wobei die RNA-Menge durch den Zusatz der N25 Bibliothek konstant gehalten wurde. Dadurch sollten unspezifische Effekte aufgrund unterschiedlicher RNA-Mengen unterbunden werden. Zur Normierung des Lumineszenzsignals auf die Transfektionseffizienz wurde zusätzlich das Plasmid pEGFP-N1 [5.6] verwendet. Dieses Strukturgen des „*enhanced green fluorescent protein*“ (EGFP) steht unter der Kontrolle eines humanen Cytomegalovirus (CMV) Promotors, welcher nicht stimulierbar ist. Mit Hilfe einer

zusätzlichen Normierung des Lumineszenzsignales auf die Gesamtproteinkonzentration konnten weitere Schwankungen in der Lysiseffizienz ausgeglichen werden.

Wie in Abbildung 3.2.24 (A) zu erkennen, führte die Transfektion von **K21**, wie auch schon für **K61** beschrieben<sup>[57]</sup>, zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition der serumstimulierten Luciferase Expression. Der endogene Luciferaselevel konnte aufgrund der Transfektion von 3 pmol Intramer auf 18 % (bezogen auf die Poolkontrolle 100 %) gesenkt werden. Dies entspricht dem unstimulierten Kontrollwert der Hintergrundexpression in Abwesenheit des Aptamers.

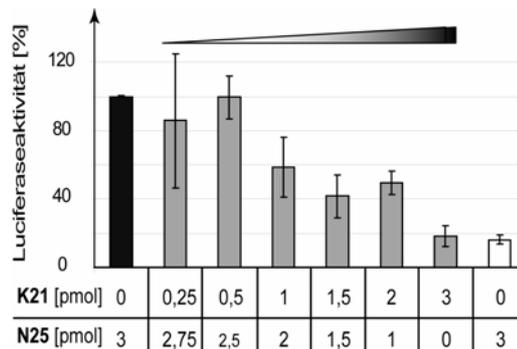


Abbildung 3.2.24: Luciferase Assay durchgeführt im 24-Well-Format in HeLa-Zellkultur mit 200ng GFP-Plasmid, 800ng Luciferase-Plasmid und 4µL Metafectene. Die RNA Menge wurde mit 3 pmol pro Reaktion konstant gehalten. **K21** wurde in steigender Konzentration titriert und mit N25-Bibliothek aufgefüllt. Die normierte Luciferase Aktivität (gegen GFP und totale Proteinkonzentration) wurde gegen die steigende Konzentration von **K21** aufgetragen.

Die HeLa-Zellkulturdaten bestätigen zusätzlich die Aussagen der zuvor beschriebenen *in vitro* Daten. **K21** und **K61**, Aptamere aus zwei voneinander unabhängigen Selektionen an KIAA0403, einem CC-Binder, bzw. an seinem Interaktionspartner Cytohesin 2, zeigen nahezu identische Bindungs- und Inhibitionsverhalten. Eine Funktionsaufklärung von KIAA0403 mit Hilfe des **K21** Aptamers ist aufgrund seiner Affinität zum Target und seines Interaktionspartners Cytohesin 2 nicht möglich.

Die Frage nach der Rolle des KIAA0403 bei der seruminduzierten Signaltransduktion bleibt weiter unbeantwortet. Jedoch sind folgende Szenarien mit KIAA0403 als positiver Effektor (Verstärker) des Cytohesin 2 vermittelten Signaltransduktionsweges oder als negativer Regulator vergleichbar mit CYTIP [1.4.1] denkbar.

#### 3.2.12.2 Überexpression der KIAA0403-Konstrukte

In Überexpressionsstudien von KIAA0403 sollte die Hypothese überprüft werden, dass der CC-Binder an der MAPK-Aktivität als weiterer Regulator beteiligt ist. Eine Reduktion oder Aktivierung der Erk1/-2 Phosphorylierung sollte bei der Aufklärung der biologischen Relevanz von KIAA0403 in der MAP-Signalkaskade helfen. Aufgrund der Tatsache, dass

kein kommerzieller Antikörper gegen KIAA0403 erhältlich ist, wurde das Volllängenprotein und die schon zuvor eingesetzten Deletionsmutanten KIAA0403- $\Delta$ N291 und KIAA0403- $\Delta$ C125 zur späteren Immunodetektion [6.1.3.1] mit einer FLAG-Peptidsequenz am N-Terminus fusioniert (pCMV-Vektorsystem) [6.4.1, 6.4.2.2, Anhang 9.2.6].

Erste Experimente in HeLa-Zellkultur [6.7.3] zeigten, dass das überexprimierte KIAA0403 Volllängeprotein von 47,2 kD Länge (A/B 2) nach nur 15 min. Stimulation mit fetalen Rinderserum (FCS) mehr als zur Hälfte abgebaut wurde, Abbildung 3.2.25 (A und B). Die Deletationsmutante KIAA0403- $\Delta$ N291 (15,8 kD; A 3, B4) konnte sogar nur noch in einem der beiden Stimulationsassays nachgewiesen werden. Bei der Überexpression der KIAA0403- $\Delta$ C125 Deletationsmutante (32,8 kD; A 4; B 5) wurde hingegen kein Proteinabbau beobachtet. Die im Anschluss durchgeführte Ladekontrolle mittels spezifischer Antikörper gegen Aktin, Abbildung 3.2.25 (A) und 14-3-3, Abbildung 3.2.25 (B) [5.5], beides nicht stimulierbare Proteine, schließen Ladefehler aus. Aufgrund des schnellen Abbaus der überexprimierten KIAA0403-Konstrukte konnte keine eindeutige Aussage zum Erk1/2 Phosphorylierungsgrad gemacht werden.

In mehreren, unabhängig durchgeführten Experimenten konnte das Phänomen des Proteinabbaus reproduzierbar beobachtet werden und könnte auf unterschiedliche Ursachen zurückzuführen werden. Zum Einem ist der Abbau bzw. die generell geringe Überexpression eines kleinen Konstruktes wie KIAA0403- $\Delta$ N291 ein bekanntes Phänomen, da diese oft zu Fehlfaltung neigen und daher abgebaut werden<sup>[180]</sup>. Zum Anderem wäre es jedoch denkbar, dass aufgrund der Stimulation und der Weiterleitung des Signals das überexprimierte KIAA0403 Volllängeprotein gezielt abgebaut wird, wobei die Deletionsmutante KIAA0403- $\Delta$ C125 davon offenbar nicht betroffen ist.

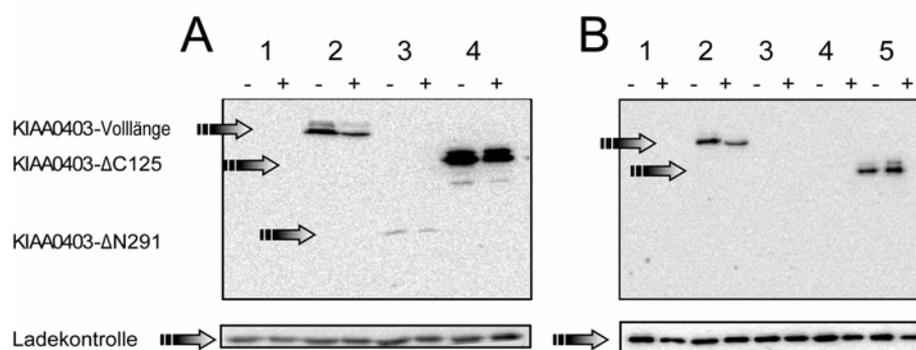


Abbildung 3.2.25: Immunologischer Nachweis der KIAA0403 Überexpression in HeLa-Zellen. Aufgetragen sind jeweils 10  $\mu$ L der HeLa-Lysaten mit überexprimiertem KIAA0403-Volllängeprotein, der Deletationskonstrukte  $\Delta$ N291,  $\Delta$ C125 (2,5 $\mu$ g) und prokaryontischem Kontrollplasmid (2,5 $\mu$ g). A| Aufgetragen sind Lysate, welche ohne oder mit FCS für 15 min. behandelt wurden (1: pET11a; 2: KIAA0403-Volllänge, 3: - $\Delta$ N291, 4:  $\Delta$ C125) und die entsprechende Ladekontrolle,  $\alpha$ -Aktin. B| Gezeigt ist ein zweiter, unabhängig durchgeführter Überexpressionsassay, wobei jeweils nicht stimulierte und stimulierte Proben aufgetragen wurden (1: pET11a; 2: KIAA0403-Volllänge, 3: - $\Delta$ N291, 4: pET11a, 5:  $\Delta$ C125), mit der entsprechenden Ladekontrolle 14-3.3.

### 3 Ergebnisse

Zur Klärung des beobachteten Proteinsabbaus wurden weitere Überexpressionsexperimente von KIAA0403 [6.7.3] und den Deletionsmutanten mit einem Proteasominhibitor MG-132 (Endkonzentration 20  $\mu$ M, 0,2 % DMSO, CalBiochem) durchgeführt. Dieser wurde eine Stunde vor der eigentlichen FCS Stimulation zugegeben. Als negative Expressionskontrolle wurde das prokaryontische Kontrollplasmid pET11a (2,5 $\mu$ g) und die jeweiligen KIAA0403 Expressionsplasmide (2,5  $\mu$ g) mit DMSO (Endkonzentration 0,2%) inkubiert.

Durch die Zugabe des Inhibitors konnte der Abbau des KIAA0403-Volllängenprotein nur geringfügig (9%) inhibiert werden, Abbildung 3.2.26, (B). Einen deutlich stärkeren Effekt zeigte sich jedoch bei der Deletionsmutante KIAA0403- $\Delta$ N291 (15,8 kD; A 5/6), deren Abbau zu 39% gehemmt wurde. Bei der KIAA0403- $\Delta$ C125 Deletationsmutante (32,8 kD; A 7/8) konnte hingegen kein Abbau festgestellt werden. Die Zugabe des Inhibitors bewirkte einen akkumulierenden Effekt, was jedoch auch auf eine stärkere Expression deuten könnte. Die höhermolekularen Proteinbanden, welche in der Western-Blotanalyse detektiert wurden, weisen eventuell auf eine Ubiquitylierung hin, Abbildung 3.2.26, (A) 2/3 und 7/8.

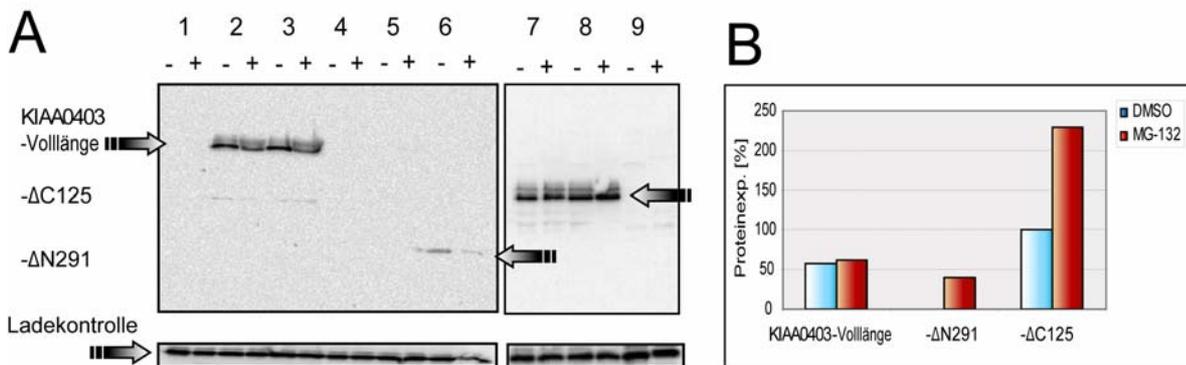


Abbildung 3.2.26 Immunologischer Nachweis der KIAA0403 Überexpression mit und ohne Proteasominhibitorzugabe (MG-132). Aufgetragen sind jeweils 10  $\mu$ L aus HeLa-Lysaten mit überexprimierten KIAA0403-Volllänge und Deletationskonstrukten - $\Delta$ N291 und - $\Delta$ C125 (2,5 $\mu$ g) und prokaryontischen Kontrollplasmid (2,5 $\mu$ g). A| Es sind jeweils nicht stimulierte und stimulierte Proben aufgetragen (1: pET11a DMSO; 2/3: KIAA0403-Volllänge DMSO/MG-132, 4: pET11a DMSO, 5/6: KIAA0403- $\Delta$ N291 DMSO/MG-132, 7: pET11a DMSO, 8/9: KIAA0403- $\Delta$ C125 DMSO/MG-132), mit der entsprechenden Ladekontrolle 14-3-3. B| Die normierte Proteinexpression (Pipetierkontrolle und unstimulierte Probe) der mit DMSO und MG-132 behandelten HeLa Zellen wurden aufgetragen.

Obwohl es noch weiterer Untersuchungen bedarf, deutet dieses erste Ergebnis auf einen kontrollierten Proteinabbau hin. Ein von außen stimulierbarer Abbau des KIAA0403 Proteins, welches im zellulären Umfeld mit großer Wahrscheinlichkeit in Interaktion mit Cytohesin 2 vorliegt, könnte den positiven MAP-Effektor Cytohesin 2 gezielt freisetzen und für die Signalübertragung verfügbar machen.

## 3.3 FHL2

FHL2 (Four and a Half LIM domain) gehört zu der Klasse der humanen „LIM only“ Proteine, welche sich durch ihr doppeltes Zinkfingermotiv auszeichnet und aus vier ein halb LIM-Einheiten aufgebaut ist [1.5.1] (EMBL/Gen-Bank™/DDBJ Datenbank-Nummer: NP\_001441, auch bekannt als DRAL, SLIM3). Das Protein kommt sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vor. Es ist in der Lage, mittels Proteinwechselwirkungen Homo- bzw. Heterodimere mit PDZ-Domänen<sup>[157]</sup>, Armadillo repeats<sup>[156]</sup> und den zytosolischen Domänen der Integrine<sup>[158]</sup> zu bilden, sowie als Transkriptionskofaktor zu fungieren. Es wird ein Zusammenhang zur fortschreitenden Onkogenese verschiedener Krebsarten vermutet<sup>[151, 156, 160]</sup>.

Im Rahmen einer GRK 804-Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Büttner sollte die Rolle von FHL2 in der Onkogenese mit Hilfe der Aptamertechnologie untersucht werden. Ein gezielt entwickeltes Aptamer könnte hierbei eine Transkriptionshemmung der FHL2 koaktivierenden Zielgene des Rho GTPase vermittelnden Signalwegs herbeiführen<sup>[159]</sup>. Diese Gene werden u. a. für Proliferation und Migration der Tumorzellen verantwortlich gemacht. Ein inhibitorisch wirkendes Aptamer könnte somit zur Verlangsamung des Tumorwachstums führen.

Hierbei sollten zunächst Aptamere gegen die ersten zwei LIM-Domänen FHL2-LIM0+1 selektiert werden, da diese maßgeblich an der Interaktion mit Rho<sup>[159]</sup> beteiligt sind und zu dessen Aktivierung und Relokalisation in den Zellkern führen. Zu weiteren Kontrollzwecken wurde zusätzlich das FHL2-Volllängenprotein als GST-Fusionsprotein rekombinant exprimiert und affinitätschromatographisch gereinigt.

### 3.3.1 Expression und Aptamerselektion gegen His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1

Das für die Selektion von Aptameren benötigte Expressionsplasmid zur rekombinanten FHL2-LIM0+1 Proteinexpression wurde zur Einführung des Hexahistidinpeptids für die affinitätschromatographische Reinigung freundlicherweise von Lucia Gullotti (AK Prof. Dr. R. Büttner, Universität Bonn) in einen pET15b Expressionsvektor kloniert. Anschließend erfolgte die Transformation in *E.coli* B121 Lys S [6.6.6]. Das Proteinkonstrukt mit dem zur Reinigung eingeführten Fusionspeptid besteht aus 107 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 12,7 kD und einen berechneten pI von 6,27, Abbildung 3.3.1 (A).

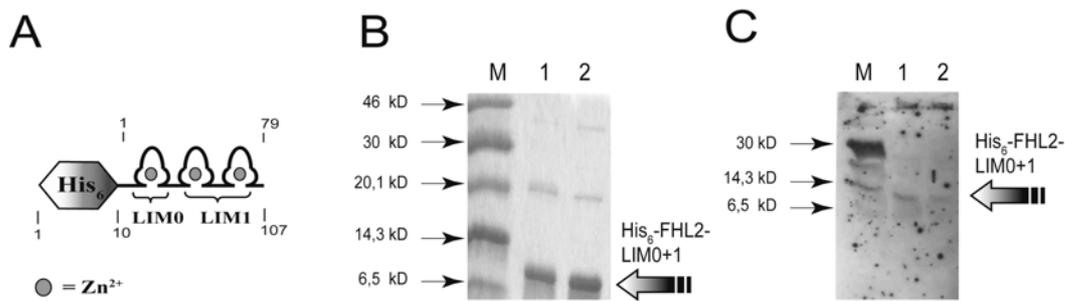


Abbildung 3.3.1: A) Schematische Darstellung des His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 Konstrukts, wobei das Hexahistidinfusionspeptid als Hexagon und das komplexierte Zn<sup>2+</sup> als Kreis symbolisiert ist. B) und C) Analyse des rekombinanten His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 Konstrukts nach Affinitätschromatographie. B) His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 (1: 2 µg; 2: 4 µg) erscheint in der SDS-PAGE Analyse nach Coomassie-Färbung neben dem Di- und Trimer homogen. C) Der immunologische Nachweis des His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 Konstrukts (1: 250 ng; 2: 125 ng) bestätigt die Identität der gereinigten Proteins.

Das His<sub>6</sub>-FHL2-Konstrukt konnte mit guter Ausbeute von 1,1 mg/L (drei 2 L LB *E.coli* BL21 Lys S Kulturen) nach Lyse und Reinigung erhalten werden [6.6.7.4, 6.1.11.1]. Die Reinheit des Proteinskonstruktes wurde mit Hilfe der SDS-PAGE-Analyse und der Coomassie-Färbemethode auf über 95% bestimmt, wobei auch die entsprechenden Di- und Trimere zu sehen waren, Abbildung 3.3.1 (B). Nach der Verifizierung in der Western-Blotanalyse [6.1.3.1] mit dem spezifischen primären Antikörper gegen das Volllängen-FHL2 Protein [5.5] wurde das His<sub>6</sub>-FHL2-Konstrukt zur Aptamerselektion an cyanogenbromidaktivierte Sepharose gekoppelt (22,65 µM) [6.1.10], Abbildung 3.3.1 (C).

Die Aptamerselektion wurde entsprechend der His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ- und His<sub>6</sub>CYTIP-PDZCC-Selektion [3.1.2] unter gleichen Bedingungen und mit der gleichen Bibliothek (Ulrich Wüllner [5.7.1.1]) durchgeführt. Zur Gewährleistung einer stabilen Proteinfaltung wurde der Selektionspuffer mit einem Zusatz von ZnSO<sub>4</sub> zur Endkonzentration von 0,1 mM versehen [6.3.1, Anhang 9.3.5].

Obwohl zur Entfernung von Matrixbindern ab dem dritten Zyklus gegen underivatisiertes Matrixmaterial vorselektiert wurde, konnte eine Anreicherung dieser im siebten Zyklus nicht verhindert werden, Abbildung 3.3.2. Aufgrund dieser Anreicherung wurde die Selektionsstrategie nach sechs Runden geändert, wobei der sechste angereicherte Zyklus diesmal mit ungekoppeltem Target inkubiert wurde. Die Trennung der bindenden RNA-Spezies erfolgte mittels Nitrocellulosefilter im Filterbindungsexperiment [6.5.1]. Das rekombinante Protein wurde in einem Verhältnis von 1 zu 10 mit der angereicherten radioaktiv markierten RNA-Bibliothek inkubiert und anschließend in einem Filterbindungssassay von den ungebundenen Sequenzen separiert. Anschließend wurde die Nitrocellulose zerkleinert und die RNA durch einen denaturierenden Schritt mit

Guanidiumhydrochlorid und kurze Hitzeeinwirkung wiedergewonnen und weiter in der folgenden RT- und PCR-Reaktion eingesetzt [6.2.2.8, 6.2.2.1].

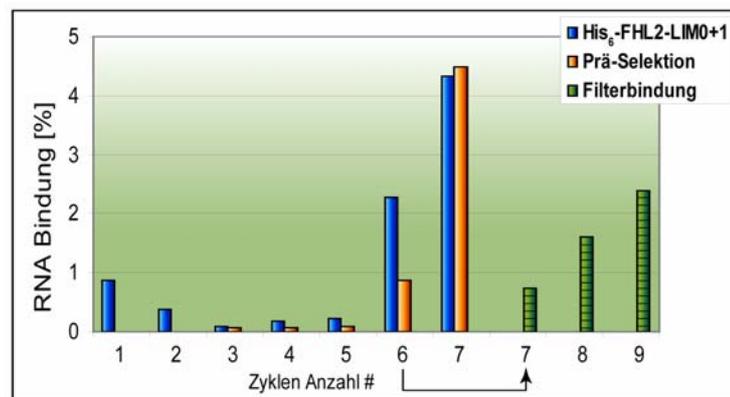


Abbildung 3.3.2: Selektionsverlauf von His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 vor und nach Selektionsstrategieänderung durch Matrixwechsel. Nach sieben Zyklen wurde eine Anreicherung von spezifischen matrixbindenden Aptameren detektiert (an der immobilisierten RNA an der Prä-Selektionsmatrix zu erkennen) Die angereicherte RNA-Bibliothek aus dem Zyklus sechs wurde weiter mit Hilfe der Filterbindungen auf Nitrozellulose selektiert.

Trotz des Matrixwechsels war es nach drei weiteren Selektionszyklen nicht möglich, aus der angereicherten Bibliothek (6. Zyklus) spezifische RNA-Proteinbinder zu erhalten, Anhang [9.9], obwohl in der Filterbindung ein Bindungsanstieg im Selektionsverlauf zu beobachten war, Abbildung 3.3.2. Dieser kann auf eine unspezifische Wechselwirkung der selektierten RNA-Bibliothek mit der Nitrozellulose zurückgeführt werden.

Zur Vermeidung einer erneuten Anreicherung von matrixspezifischen RNA-Molekülen wurden bei den weiteren Selektionen unterschiedlich lange RNA-Bibliotheken verwendet bzw. andere Separationsmethoden verfolgt. Diesmal wurde auch das rekombinante GST-FHL2 Volllängenprotein zur Aptamerselektion verwendet.

### 3.3.2 Expression des GST-FHL2-Volllängenproteins

Zur Aptamerselektion wurde das Volllängenprotein zunächst rekombinant exprimiert. Hierzu wurde es zur späteren affinitätschromatographischen Reinigung mit einem GST-Tag fusioniert<sup>7</sup>. Das GST-FHL2-Volllängenfusionsprotein (508 Aminosäuren) besitzt ein Molekulargewicht von 58,86 kD und einen theoretischen pI von 7,16, Abbildung 3.3.3 (A). Die Verwendung von GST-Fusionsproteinen hat den Vorteil, dass die meisten rekombinanten Proteine löslicher und besser in *E.coli* exprimierbar sind. Dennoch war die Proteinexpression aufgrund der bekannten Proteineigenschaften [1.5.1] erschwert. Die Tendenz von FHL2 Homodimere<sup>[157]</sup> auszubilden, führte wahrscheinlich zu unlöslichen „inclusion bodies“,

<sup>7</sup> Der GST-FHL2-Vektor wurde freundlicherweise von Prof. Dr. R. Schüle (Universität Freiburg) zur rekombinanten Proteinexpression und Aptamerselektion zur Verfügung gestellt.

welche unter nativen Bedingungen nicht aufgeschlossen werden können. Durch Expressionsoptimierungen, hauptsächlich durch Kultivierung in kleinerem Volumen (max. 400 mL LB-*E.coli* Kulturen), späte Induktion, Temperaturabsenkung und erhöhte Sauerstoffzufuhr durch höhere Schüttelfrequenzen, wurde der Einschluss des rekombinanten Proteins verlangsamt und die native Reinigung ermöglicht. Der Zusatz von 0,05 mM ZnSO<sub>4</sub> in das LB-Medium sollte die korrekte Proteinfaltung fördern. Aus insgesamt 2 L LB Kultur *E.coli* JM83 konnten nach Lyse und Reinigung [6.6.7.5, 6.1.11.2] 1,65 mg (0,83 mg/L) des rekombinanten Proteins erhalten werden. Die Konzentration wurde bewusst niedrig gehalten (2,55 µM), um eine Präzipitation zu vermeiden. Mit Hilfe der Bradford-Analyse [6.1.6.1] und der SDS-PAGE Analyse [6.1.1] wurde die Konzentration und der Reinheitsgrad (über 95 %) bestimmt, Abbildung 3.3.3 (B). Die Identität des GST-FHL2-Volllängenproteins konnte durch einen immunologischen Nachweis mit einem spezifischen primären Antikörper [5.5, 6.1.3.1] verifiziert werden.

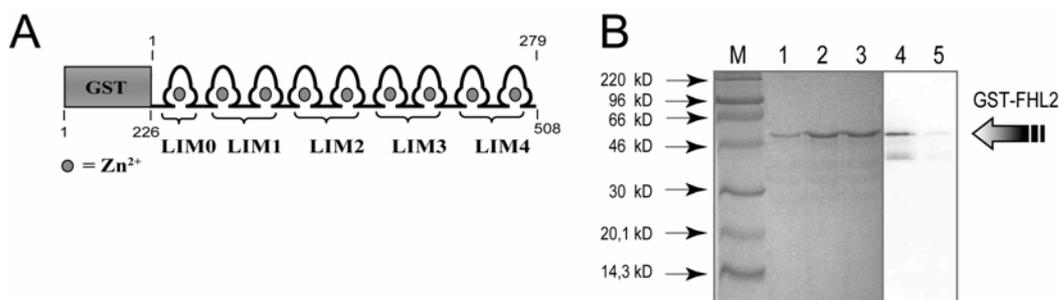


Abbildung 3.3.3: A) Schematische Darstellung des GST-FHL2 Konstrukts, wobei die Glutathion-S-Transferase (GST) als Rechteck und das komplexierte Zn<sup>2+</sup> als Kreis symbolisiert sind. B) Analyse des rekombinanten GST-FHL2-Volllängenproteins nach Affinitätschromatographie und Dialyse in einen Phosphatpuffer. Das GST-FHL2-Volllängenprotein (1: 0,5 µg; 2+3: 1,5µg) erscheint in der SDS-PAGE Analyse nach Coomassie-Färbung homogen. Der immunologische Nachweis (4: 40 ng; 5: 20 ng) bestätigt die Identität des gereinigten Proteins, wobei eine kürzere Abbruchbande bei der höheren Konzentration, Bahn 4 zu erkennen ist.

### 3.3.3 Biotinylierung und optimierte *in vitro* Selektion gegen His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1

Mit dem Ziel, matrixunabhängige Aptamere für His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 und das GST-FHL2 Volllängenprotein zu erhalten, wurden genauso wie bei der His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ- und der His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 Selektion [3.1.2, 3.2.3] die Proteine biotinyliert und die Selektion mit Hilfe von streptavidinderivatisierten magnetischen Partikeln durchgeführt.

Das His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1-Konstrukt und das GST-FHL2 Volllängenprotein wurden nach Biotinylierung [6.1.8] an mit BSA geblockten Partikeln gekoppelt [6.1.9]. Zum Nachweis der Proteinkopplung wurde ein immunologischer Nachweis des Biotintags im Western-Blot [6.1.3] durchgeführt. Für die Analyse von His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 wurden hierzu die Lösungen der kombinierten Waschschriffe und die Eluate aus der kompetitiven Reaktion der

derivatisierten Partikel mit Biotin aufgetragen, Abbildung 3.3.4 (A/C). Das biotinylierte GST-FHL2-Volllängenprotein wurde ebenso unmittelbar nach der Biotinylierungsreaktion im Western-Blot kontrolliert [6.1.3], Abbildung 3.3.4 (B/C). Hierbei ist zu erkennen, dass bei dem relativ großen Protein von 58,86 kD nach der Entfernung des Biotinylierungsreagenzes (Micro Biospin 6) ein kleiner Teil des Proteins auf der Säule verbleibt. Die veränderte Proteinkonzentration wurde im späteren Selektionsprozess berücksichtigt.

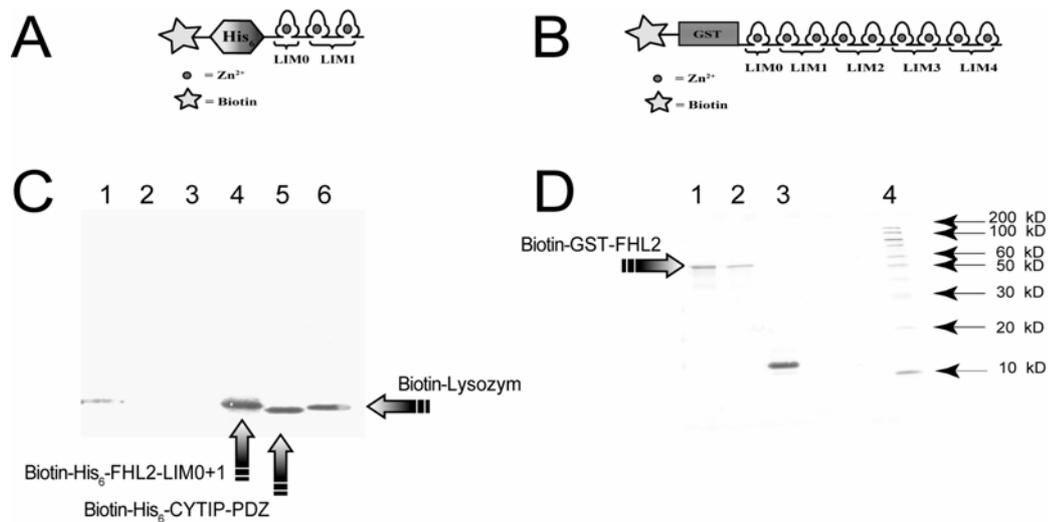


Abbildung 3.3.4 A und B| Schematische Darstellung der biotinylierten His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 und GST-FHL2 Konstrukte. Das Biotin ist als Stern, die Hexahistidinsequenz als Hexagon, die Glutathion-S-Transferase als Rechteck und das komplexierte Zn<sup>2+</sup> als Kreis symbolisiert. C und D| Immunologischer Nachweis der Biotinylierung und Kopplung des His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 Konstrukts (A) und GST-FHL2 Volllängenprotein (B). C| Waschschritte der Kopplung von His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 (1: 5µL), His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ (2: 5µL), Lysozym (3: 5µL) und 40µL beads der kompetitiv eluierten biotinylierten Proteine FHL2-LIM0+1 (4: 4µg), His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ (5: 4µg), Lysozym (6: 0,8µg) sind aufgetragen. D|. Aufgetragen ist jeweils das biotinylierte GST-FHL2 Volllängenprotein vor der Bio-Rad P6 Umpufferung (1: 2µL; 0,375µg), vor der Kopplung (2: 2µL; 0,25µg), sowie die Kontrollbiotinylierung von Lysozym (3: 1µg). Als Längenmarker diente ein biotinylierter Proteinstandard von 10-200 kD (Cell Signaling) 4.

Für die erneute His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 Aptamer Selektion wurden diesmal zwei leicht unterschiedliche Selektionsprozesse angewandt, wie auch schon bei His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ [3.1.2]. Mit Hilfe der unterschiedlich langen RNA-Bibliotheken von 90 (E40) und 71 (N20) Nukleotiden, des Matrixwechsels zu streptavidinderivatisierten magnetischen Partikeln und durch eine zusätzliche Variante der Inkubation des freien biotinylierten Proteins mit der RNA-Bibliothek in Lösung sollte eine bessere Basis für die Anreicherung von bindenden RNA-Spezies geschaffen werden.

In der ersten Aptamerselektion (E40 RNA-Bibliothek) wurde das Target immobilisiert angeboten und der Selektionsverlauf radioaktiv kontrolliert. Mit einer Gesamtmenge von 0,4 nmol (Endkonzentration 0,4µM) wurde die RNA-Bibliothek im ersten Zyklus in einem Verhältnis von 1:1,69 (0,24 nmol) eingesetzt. Die RNA-Menge wurde in den nachfolgenden

Selektionszyklen auf ein Zehntel (0,04 nmol) reduziert und die RNA-Protein-Inkubationszeit mit 30 min. beibehalten. Zur Vermeidung von Matrix-Bindern wurde ab dem 5. Zyklus gegen das immobilisierte His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ vorselektiert [6.3.2, Anhang 9.3.6].

Es ist nicht ganz auszuschließen, dass durch die nicht kovalente Interaktion des biotinderivatisierten Proteins mit dem Streptavidin einige wichtige Bindungsepitope sterisch blockiert werden und so unzugänglich sind. Aufgrund dessen wurden zwei weitere Selektionsversuche durchgeführt, bei denen die RNA-Bibliotheken E40 und N20 (1. Zyklus: 0,4 nmol; 0,4 µM) in Lösung mit dem freien Target (0,5 nmol) inkubiert und anschließend mit Hilfe des Magneten aus der Lösung gezogen wurden [6.3.2, Anhang 9.3.6].

Trotz der Optimierungen konnten aus keiner der drei Selektionen gegen His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 spezifische RNA-Binder selektiert werden. Die Selektionskontrolle der E40 RNA-Bibliothek aus der immobilisierten His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 Selektion weist keinen Anstieg der Radioaktivität auf, Abbildung 3.3.5 (A). Im Gegensatz dazu führte die parallel durchgeführte Selektion mit biotinyliertem Lysozym schon nach sechs Zyklen zu spezifischen Bindern. Die Inkubation des freien biotinylierten Proteins mit derselben E40 RNA-Bibliothek brachte hingegen Nitrozellulosebinder hervor, Abbildung 3.3.5(B). Diese Selektionsbedingungen haben somit vermehrt zu einer Anreicherung von Bindern geführt, welche offensichtlich in ihrer Amplifikation begünstigt waren und den Selektionsprozess überdauert haben, obwohl sie keine Affinität zum Targetprotein zeigten („*selfish*“-RNA ohne Bezug zum Protein).

Die N20 Selektion hingegen scheint kein geeignetes FHL2-Bindungsmotiv zu enthalten. Die Kontrollselektion gegen Lysozym konnte wiederum erfolgreich nach dem siebten Zyklus beendet werden. Die ersten 1 ½ LIM Domänen scheinen kein günstiges Bindeepitop für eine erfolgreiche Anreicherung von RNA-Bindern zu besitzen.

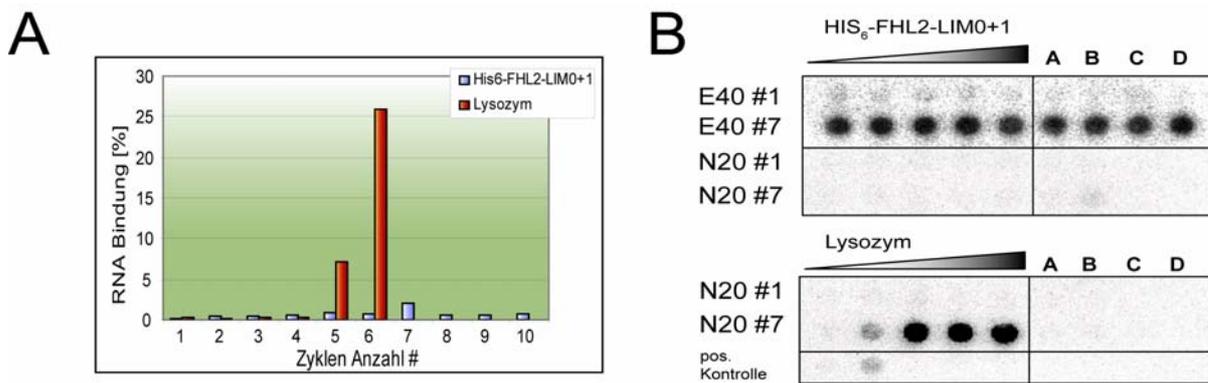


Abbildung 3.3.5 Selektionsverlauf der Biotin-His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 Selektion mit streptavidinderivatisierten magnetischen Partikeln. A| Radioaktiver Bindungsverlauf der E40 RNA-Bibliothek inkubiert mit dem immobilisierten Biotin-His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1, Selektionskontrolle durch biotinyliertes Lysozym. B| Filterbindung der unselektierten und angereicherten RNA-Bibliotheken E40 und N20. His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 ist in steigender Konzentration von 0-500 nM mit den radioaktiv markierten RNA-Bibliotheken inkubiert und analysiert worden. Die Kontrollproteine A-D (A: Lysozym; B: Streptavidin, C: His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ und D: PAZ) sind jeweils in der höchsten Konzentration (500 nM) aufgetragen worden. Die Kontrollselektion mit der unselektierten und angereicherten N20 RNA-Bibliothek wurde mit steigender Konzentration von Lysozym aufgetragen, wobei die Kontrollproteine (A: Lysozym; B: Streptavidin, C: His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ und D: PAZ) in höchster Konzentration (500nM) eingesetzt worden sind. Als Positivkontrolle wurde das Lysozym-Aptamer aus der E40-Selektion mit aufgetragen.

### 3.3.4 *In vitro* Selektion gegen das GST-FHL2-Volllängenproteins

Um das eigentliche Ziel zu erreichen, Aptamere gegen die ersten LIM0+1 Domänen zu erhalten, welche für die Proteinwechselwirkung mit Rho verantwortlich sind, wurde die Selektionsstrategie und das Target geändert. Für einen weiteren Selektionsversuch wurde das Volllängenprotein FHL2 verwendet, wobei eine höhere Wahrscheinlichkeit bestand spezifisch bindende RNA-Spezies anzureichern. Nach einer erfolgreichen Selektion könnten mit Hilfe von Mutationsstudien und einer gezielten Reselektionen gegen die LIM0+1 spezifische Aptamere erhalten werden.

Nach den bisherigen Ergebnissen der vorangegangenen His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 Selektionen mit kürzeren RNA-Bibliotheken und zwei unterschiedlichen Selektionsmethoden wurde eine entsprechend längere RNA-Bibliothek zur Aptamerevolution verwendet. Mit einem randomisierten Bereich von 50 (B50) bzw. 80 (B80) Nukleotiden und einer Gesamtlänge von 96 bzw. 126 Nukleotiden besitzen die neuen RNA-Bibliotheken eine höhere strukturelle Varianz. So soll die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, auch bei dem relativ schwierigen Target FHL2 einen passenden Binder zu finden. Weiterhin wurde zum Vergleich („*proof of concept*“) auch eine kürzere RNA-Bibliothek (N25) ausgewählt. Die Kopplungs- und Selektionsstrategie der vorherigen Selektionsversuche wurde beibehalten [3.3.3] und das biotinylierte GST-FHL2 Volllängenprotein in Lösung mit den entsprechenden RNA-Bibliotheken inkubiert. Die RNA-Bibliothek (1. Zyklus: 0,4 nmol) wurde in 11-fachem

Überschuss zum biotinylierten GST-FHL2 Vollängenprotein (0,035 nmol) eingesetzt [6.3.2, Anhang 9.6].

Aus beiden Selektionen der B50 und B80 RNA-Bibliothek konnte eine Anreicherung von bindenden Sequenzen in Filterbindungsstudien aus dem Zyklus neun (B50) und acht (B80) festgestellt werden, wobei die angereicherte B50 RNA-Bibliothek unspezifische Binder enthielt, Abbildung 3.3.6, (A/B). Beide angereicherte RNA-Bibliotheken zeigen auch eine Affinität zu den ersten beiden LIM-Domänen vom His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 Proteinkonstrukt, Abbildung 3.3.6 (A/B: B und C). Diese Bindungseigenschaft könnte auf monoklonaler Ebene weiter ausgeprägt vorkommt und ist weiter zu untersuchen. Die Kontrollselektion der wesentlich kürzeren N25 Bibliothek führte schon nach fünf Zyklen zu starken RNA-Bindern, welche sowohl eine Affinität zum FHL2-Target sowie eine Interaktionen mit der Streptavidinmatrix und anderen Kontrollproteinen zeigten, Abbildung 3.3.6, (C). Somit wurden nur die angereicherten RNA-Bibliotheken aus den Selektionszyklen acht (B80) und neun (B50) zur weiteren Charakterisierung sequenziert<sup>8</sup>.

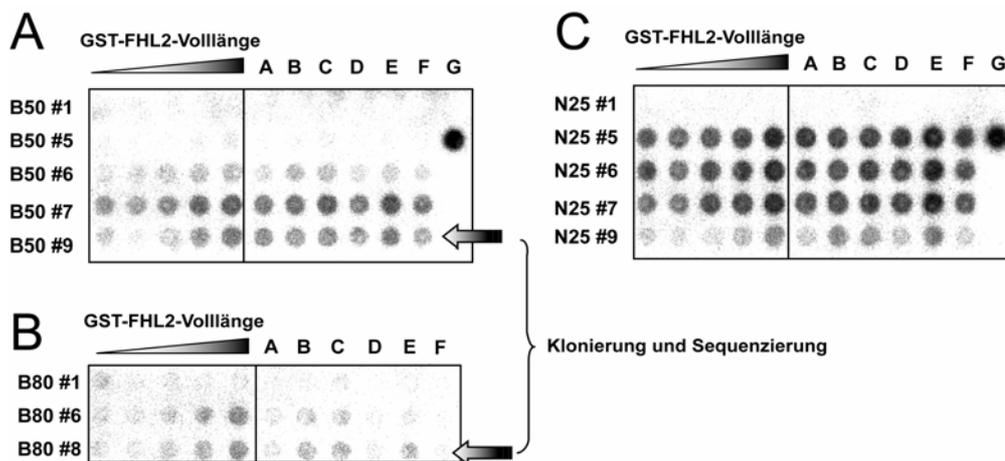


Abbildung 3.3.6: Filterbindung der unselektierten und angereicherten RNA-Bibliotheken B50 (A), B80 (B) und N25 (C). Das GST-FHL Vollängenprotein ist in steigender Konzentration von 0-500 nM mit den radioaktiv markierten RNA-Bibliotheken inkubiert und analysiert worden. Die Kontrollproteine A-F (A: Lysozym; B: FHL2 LIM 0+1, C: FHL2 LIM 0+1 [neue Charge] D: Streptavidin, E: Cytohesin 1 und F: His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ) sind jeweils in der höchsten Konzentration von 500nM eingesetzt worden. Als Transkriptionskontrolle G wurde das Lysozym-Aptamer aus der N20-Selektion mit aufgetragen. Die mit dem Pfeil markierten angereicherten RNA-Bibliotheken wurden in einen pGEM<sup>®</sup>-T Vektor kloniert.

### 3.3.5 Sequenzierung und Charakterisierung monoklonaler Aptamere

Nach der Klonierung und Sequenzierung von je zehn Klonen der angereicherten B50 und B80 RNA-Bibliotheken konnten folgende repräsentative Bibliothekszusammensetzungen beobachtet werden:

<sup>8</sup> Sequence Laboratories Goettingen GmbH

Aus der B50 Selektion waren zwei RNA-Sequenzen je zweimal vorhanden (A: Klon 13; 21; B: Klon 15; 16), Abbildung 3.3.7. Die restlichen Monoklonen unter C (Klon: 18; 19; 20; 22; 23; 24) stellten individuelle Sequenzen ohne erkennbaren Konsensus dar.

Das Ergebnis aus der angereicherten B80 RNA-Bibliothek ergab vier identische Spezies (B: Klon 4; 6; 10; 11). Dies entspricht 40% der sequenzierten RNA-Binder. Des Weiteren gab es vier einzelne Individuen ohne erkennbares Konsensusmotiv (A: Klon 1; 2; 3; 7) und weitere zwei stark verkürzte RNA-Spezies (C: Klon 5 und 12), Abbildung 3.3.7. Der randomisierte Bereich des Monoklons 5 verkürzte sich auf 50 Nukleotide, wohingegen sich die Verkürzung des Monoklons 12 auf nur 66 Nukleotide belief. Beide Sequenzen konnten sich durch einen klaren Vorteil beim Selektionsprozess durchsetzen, entweder durch eine starke Bindung an das Target oder durch bessere Bedingungen bei der Amplifikation, RT-Reaktion oder Transkription.

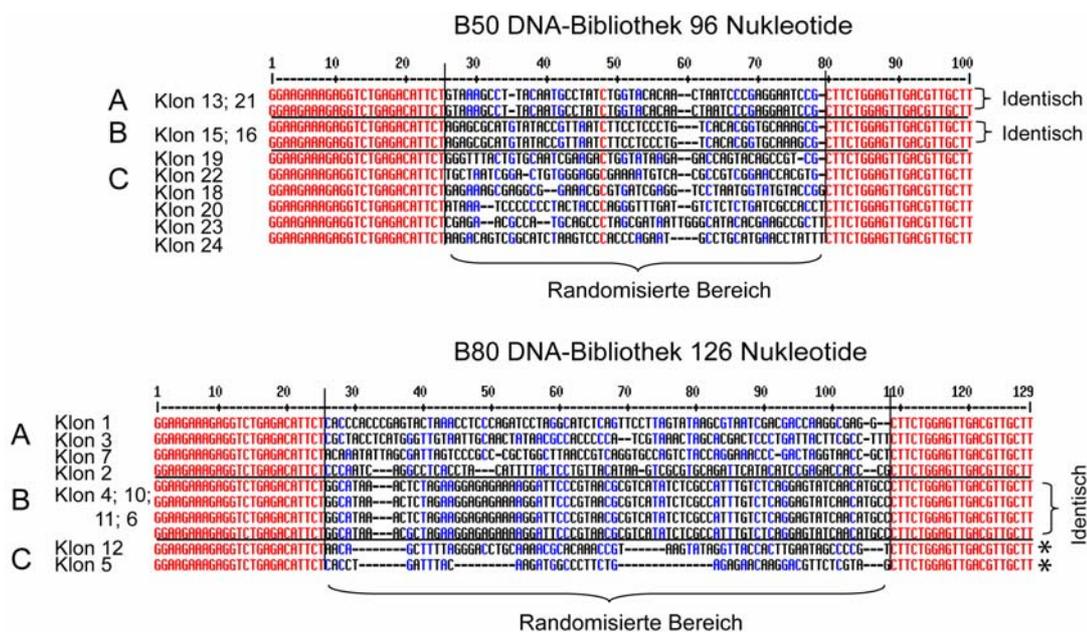


Abbildung 3.3.7: Sequenzvergleich der Monoklonen aus den angereicherten RNA-Bibliotheken B50 und B80 mittels MultAlign<sup>[173]</sup>. Der randomisierte Bereich ist jeweils durch eine Trennlinie gekennzeichnet. Die in roten Lettern dargestellten Sequenzen sind bei allen Monoklonen identisch, blau gekennzeichnete Sequenzen weisen die größte Häufigkeit im selektierten Pool auf und schwarze individuelle Nukleotide. Die mit einem Stern gekennzeichneten Monoklonen sind drastisch verkürzte RNA-Individuen.

Tatsächlich zeigte sich in Monoklonstudien, dass aus der B50 Selektion das **K16** Aptamer, das doppelt vertreten war, mit zwei weiteren individuellen RNA-Molekülen dem **K3** und **K12** Aptamer (B80-Selektion) die besten Bindungseigenschaften besaßen. Diese zeigten eine gute Affinität zum GST-FHL2 Volllängeprotein und auch eine etwas geringere Bindung zur isolierten FHL2-LIM0+1 Domäne, Abbildung 3.3.8. Der Monoklon **K12** ist die bereits vorher erwähnte RNA-Spezies, welche im randomisierten Bereich 14 Nukleotide durch den Selektionsprozess verloren hat. Dieser wurde durch seine gute Affinität zum Target und durch

seine Faltungseigenschaften aus der B80 RNA-Bibliothek evolviert und hat sich wahrscheinlich durch einen Trunkierungsprozess beispielsweise in der PCR gebildet.

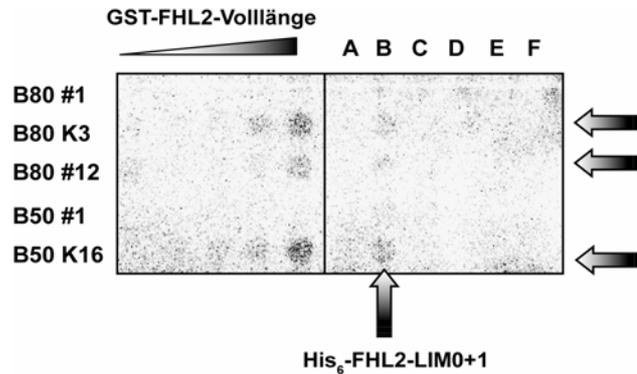


Abbildung 3.3.8: Filterbindung der unselektierten RNA-Bibliotheken B80 und B50 und der „Gewinner-Monoklone K1, K12 und K16 aus der GST-FHL2 Volllänge Selektion. Das GST-FHL2 Volllängenprotein ist in steigender Konzentration von 0-500 nM mit den radioaktiv markierten RNA-Bibliotheken und Einzelsequenzen inkubiert und analysiert worden. Die Kontrollproteine A-E (A: Lysozym; B: FHL2 LIM 0+1, C: Streptavidin, D: Cytohesin 1, E: His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ und F: GST-Protein) sind jeweils in der höchsten Konzentration von 500nM eingesetzt worden. Die mit dem Pfeil markierten Monoklone sind erfolgreich selektiert worden.

In weiterführenden Filterbindungsstudien [6.5.1] mit endmarkierten RNA-Sequenzen [6.2.2.11] wurden Dissoziationskonstanten von zwei Aptameren im niedrigen mikromolaren Bereich bestimmt. Eine vollständige Sättigung der Kurven konnte aufgrund der limitierten Höchstproteinkonzentration von 2,5  $\mu$ M nicht erzielt werden, Abbildung 3.3.9. Die ermittelten Dissoziationskonstanten des **K12** Aptamers ( $K_D = 0,72 \pm 0,06 \mu$ M) und des **K16** Aptamers ( $K_D = 0,87 \pm 0,26 \mu$ M) können daher nur als Richtwerte behandelt werden.

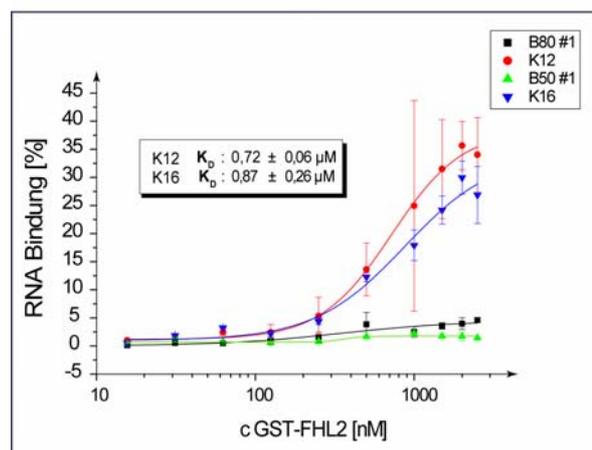


Abbildung 3.3.9: Filterbindungsanalysen des Aptamers **K12** und **K16** Aptamers mit dem GST-FHL2 Volllängenprotein. Die Aptamerbindung in % ist gegen die steigende Proteinkonzentration von GST-FHL2 Volllängenproteins in einem Bereich von 15-2500 nM dargestellt. Die Dissoziationskonstanten der Aptamerinteraktionen betragen  $0,72 \pm 0,06 \mu$ M für das **K12** Aptamer, und  $0,87 \pm 0,26 \mu$ M für **K16**.

Mfold-Faltungsberechnungen sagen für beide Aptamere vergleichbare Faltungsmuster voraus, Abbildung 3.3.10 (A) und (B). Jedoch müssten weitere Minimalmotivbestimmungen dieses Faltungsmuster bestätigen.

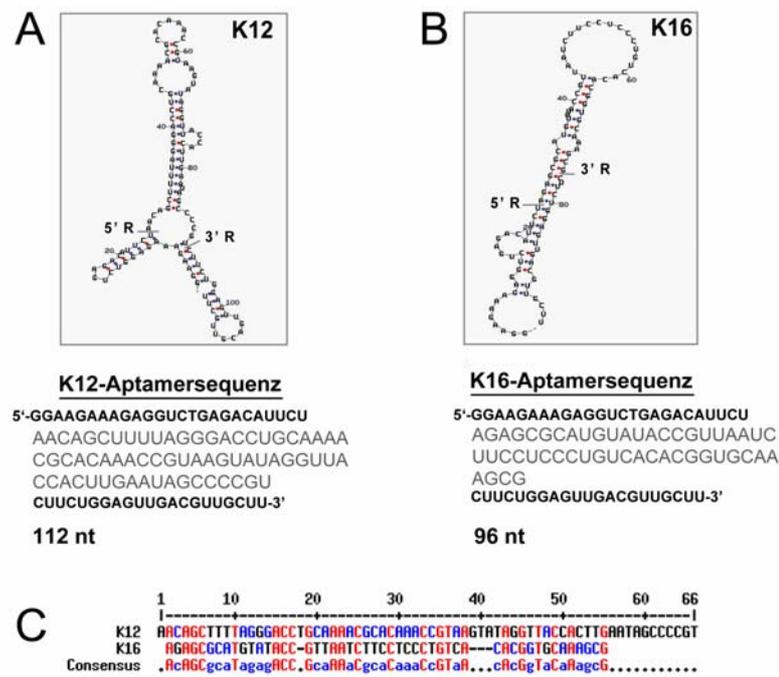


Abbildung 3.3.10: mfold Strukturen<sup>[172]</sup> und Aptamersequenzen von **K12** (A) und **K16** (B), sowie das Allignment der randomisierten Bereiche (C). In den mfold-Darstellungen beider Aptamere ist der randomisierte Bereich durch eine Trennlinie zur konstanten Region gekennzeichnet. Zur weiteren Verdeutlichung wurden die Aptamersequenzen aufgeführt. Der randomisierte Bereich ist von der konstanten Region durch eine graue Unterlegung farblich abgegrenzt. In (C) ist das MultAlign<sup>[173]</sup> der randomisierten Region beider Aptamere dargestellt. Die in roten Lettern dargestellten Nukleotide sind bei beiden Monoklonen identisch, blau gekennzeichnete Nukleotide weisen die größte Häufigkeit auf und schwarze individuelle Nukleotide.

Trotz der relativ schlechten Bindung im niedrigen mikromolaren Bereich sollte vor einer weiteren Selektion die biologische Wirksamkeit in Zellkulturstudien überprüft werden. Diese Ergebnisse sollten zur Entscheidung beitragen, welche Strategie zur weiteren Verbesserung der Aptameraffinität und zum Erhalt von spezifischen FHL2-LIM0+1 Bindern geführt werden sollte. Weiterführende zelluläre Assays zur Funktionsaufklärung von FHL2 und Inhibitionsstudien der Aptamere **K12** und **K16** wurden von Lucia Gulotti etabliert und durchgeführt. Die ersten Ergebnisse aus Kotransfektionsstudien der Aptamere in einem Luciferasereporterassay (G5E1b-Luc), basierend auf der seruminduzierten Translokation von Gal-FHL2 in den Nukleus, konnten keinen inhibitorischen Effekt der Aptamere zeigen. Es sind weitere Optimierungen der Aptamerbindungseigenschaften durch eine Reselektion auf der Basis der selektierten Aptamere zu einer effektiven FHL2-Inhibition nötig.



## 4 Diskussion und Ausblick

### 4.1 CC-Binder

Die Klasse der kleinen Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF) ist an einer Reihe verschiedener Signalkaskaden und Funktionalitäten [1.4] beteiligt. Es ist vor allem die Beteiligung am Vesikeltransport, der Zelladhäsion oder Expressionskontrolle, welche diese Proteinfamilie interessant und die klare Zuordnung der biologischen Funktion und ihrer Regulation bedeutsam macht. Ein möglicher Regulationsmechanismus basiert auf der zellspezifischen Expression der Cytohesin-Mitglieder. Cytohesin 1 wurde zuerst in Zellen des Immunsystems beschrieben<sup>[127, 181]</sup>, während Cytohesin 2 ubiquitär vorliegt<sup>[182]</sup>. In den letzten Jahren konnte eine Reihe von Interaktoren (CC-Binder und Modulatoren) [1.4] entdeckt werden, welche aufgrund ihrer CC-Domäne in Wechselwirkung mit allen Mitgliedern der Cytohesine treten können und alle bis auf CYTIP<sup>[119, 183]</sup> die GDP/GTP Austauschrate an den beteiligten ARF-GTPasen modulieren. Hierbei ist jedoch der direkte Zusammenhang der Effektoren, ihre eigene Regulation und Rolle in den jeweiligen Signalkaskaden noch weitgehend unbekannt. KIAA0403 wurde zum ersten Mal bei der Entdeckung des zytosolischen Rattenproteins IPCEF1<sup>[120, 121]</sup> mit den CC-Modulatoren in Zusammenhang gebracht und galt bis dahin als „theoretisches“, im Rahmen des „*Human brain-clone projects*“ identifiziertes Protein mit unbekannter Funktion. Seine 85% Homologie macht es zu einem potentiellen neuen Mitglied der CC-Binder und Modulatoren.

#### 4.1.1 *In vitro* Aptamer Selektion gegen CYTIP

Die Selektion von spezifisch bindenden Aptameren gegen die Proteindomänen PDZ (105 AS, pI = 6,93) und PDZCC (164 AS, pI = 7) des CC-Binders CYTIP [3.1.2] zur weiteren Studie der zellulären Funktion, erwies sich trotz verschiedener Selektionsstrategien und dem Einsatz unterschiedlicher RNA-Bibliotheken verschiedener Länge als schwierig. Das Volllängenprotein konnte hierbei nicht zur Selektion herangezogen werden, da die Expression des rekombinanten Proteins aufgrund seiner Zytotoxizität im Wirtsbakterium *E.coli* nicht möglich war.

In den ersten Selektionsversuchen wurden beide CYTIP-Proteindomänen immobilisiert (kovalente Kupplung an cyanogenbromidaktiverer Sepharose), mit der RNA-Bibliothek inkubiert und zur Affinitätstrennung der bindenden Spezies verwendet. Keine der beiden parallel durchgeführten Selektionen mit der RNA-Bibliothek von U. Wüllner, welche eine Gesamtlänge von 72 und einen randomisierten Bereich von 37 Nukleotiden [5.7.1.1] besitzt,

konnte erfolgreich durchgeführt werden. In beiden Fällen wurden RNA-Sequenzen angereichert, die bevorzugt die geblockte Sepharose erkannten. Gegenmaßnahmen wie eine vorangegangene Präselektion und der Einsatzes von Heparin ( $2,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) führten zu keinen spezifischen RNA-Bindern. Gründe für das Scheitern einer Aptamerselektion können aufgrund des komplexen Ablaufes [1.2] vielfältiger Natur sein<sup>[73]</sup> und sind schwierig zu analysieren.

Die Verwendung von Sepharose oder Agarose als Trägermaterial für das zu selektierende Proteintarget ist eine gängige Methode, um die gebundenen RNA-Sequenzen von den ungebundenen affinitätschromatographisch zu trennen<sup>[49, 50]</sup>. Dies ist jedoch problematisch, wie das Beispiel der CYTIP-Selektionen zeigte [3.1.2]. Im Fall der CYTIP-Selektionen, aber auch bei der FHL2-LIM0+1 Selektion [3.3.3] konnte das Trägermaterial aufgrund der limitierten Proteinmenge nur teilweise derivatisiert werden. Vor der eigentlichen Kopplung wurde es durch eine kontrollierte Prähydrolyse deaktiviert bzw. anschließend geblockt [3.1.1, 6.1.10]. Hierbei wurde in Kauf genommen, dass bei der Aptamerselektion nicht nur das Target, sondern auch ein sehr großer Überschuss geblockter Matrix präsentiert wurde. Eine vorgeschaltete Präselektionsstrategie, bei welcher es zum Abfangen der matrixbindenden Spezies kommen sollte, war bei beiden Selektionen gegen CYTIP-PDZ/PDZCC, aber auch bei der Selektion von FHL2-LIM0+1 nicht effizient genug.

Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Präselektion bestünde in der Verlängerung von Inkubationszeiten der RNA (15 min.) mit der geblockten Matrix bzw. eine weitere Verdoppelung des Matrixvolumens zur Verringerung der Matrixbinder. Eine zusätzliche Option wäre die affinitätschromatographische Abtrennung ohne Inkubation, bei der die Ausbildung eines Bindungsgleichgewichts erschwert wird. Auf diese Weise könnte es zu einem besseren Target/Matrixbinder Verhältnis kommen. Letztendlich könnte auch das Design der RNA-Bibliothek für eine bevorzugte Anreicherung von matrixbindenden Sequenzen ausschlaggebend sein. Auffällig ist, dass bei drei verschiedenen Selektionen unterschiedlicher Proteindomänen ein nahezu gleiches Anreicherungsprofil der Matrixbinder zu beobachten war. Ein bevorzugtes Strukturmotiv innerhalb der RNA-Bibliothek, das sich wahrscheinlich zusätzlich durch eine bessere Amplifizierbarkeit auszeichnet, scheint plausibel. Weiter müssen auch Waschvolumina, Salzkonzentrationen und der Einsatz von Kompetitoren wie Heparin als mögliche Fehlerquellen betrachtet werden.

Der Verzicht auf eine Trägermatrix und die Trennung der Protein-Aptamer-Komplexe mittels ihrer physikochemischen Eigenschaften, beispielsweise durch „*electrophoretic mobility shift assays*“ (EMSA)<sup>[44, 45]</sup> oder der Kapillarelektrophorese (CE)<sup>[46, 47]</sup> sind geeignete

Lösungsansätze zur Vermeidung von Matrixbindern. Hierbei stellt jedoch die Optimierung der Trennung bzw. der technische Aufwand einen erhöhten Zeitaufwand dar. Ein Kompromiss beider Extrema, der kovalenten Immobilisierung des Targets bzw. dem Verzicht auf eine Trägermatrix, bietet die Proteinimmobilisierung an streptavidinderivatisierte magnetische Partikel<sup>[49, 70]</sup>. Diese kann aufgrund der nicht kovalenten Bindungsart auch nach der Targetinkubation mit der RNA-Bibliothek erfolgen. Besonders bei Proteinmangel ist diese Technik von Vorteil, da die Targetkonzentration sehr gering gehalten werden kann. Die Trennung der Protein-RNA-Komplexe wird mit Hilfe eines Magneten durchgeführt. Die Anreicherungsproblematik von Streptavidinbindern kann bei dieser Methode über sehr kurze Inkubationszeiten der Partikel bzw. genauso wie bei der Sepharose über eine Präselektion reguliert werden.

Dies war ausschlaggebend für die Wahl dieser nicht kovalenten Kopplungsstrategie, die in den nächsten zwei Selektionen von CYTIP-PDZ verfolgt wurde. Hierbei musste die PDZ-Domäne vorab biotinyliert werden. Eine Selektion wurde mit dem immobilisierten Protein samt entsprechender Präselektion durchgeführt, die Inkubationszeiten blieben unverändert. Bei der zweiten Selektion wurde die Möglichkeit der freien Target-RNA Inkubation ausgenutzt, um auch sterisch gehinderte Positionen des Proteins anzusprechen. Dazu wurde auch die Inkubationszeit verlängert. Des Weiteren wurden technische Prozessabläufe, wie die RT-PCR und Transkription der Bibliothek in Anlehnung an die automatisierte Selektion nach Cox et al.<sup>[70]</sup> optimiert. Die optimierten Selektionen wurden mit unterschiedlich langen RNA-Bibliotheken E40 und N20 (randomisierte Bereiche von 40 und 20 Nukleotiden) zur Bereitstellung einer größeren Diversität durchgeführt. Zur Kontrolle der Selektionsbedingungen und des technischen Ablaufs wurde parallel mit der in der Literatur beschriebenen Bibliothek von Ellington E40<sup>[93]</sup> (randomisierte Bereiche von 40) gegen Lysozym selektiert. Trotz der vielfachen Optimierungen wurden in beiden Fällen keine targetspezifischen RNA-Binder angereichert, wohingegen die Kontrollselektion gegen Lysozym erfolgreich nach sechs Zyklen beendet werden konnte. Eine fehlerhafte Selektionstechnik kann somit ausgeschlossen werden. Dies lässt den Rückschluss zu, dass das ausgewählte Proteintarget, die CYTIP PDZ-Domäne, ein schwierig zu selektierendes Proteinkonstrukt darstellt. Ungünstige Proteineigenschaften wie die sehr kompakte PDZ-Faltung, welche aus fünf  $\beta$ -Faltblättern und  $\alpha$ -Helices zu  $\alpha$ - $\beta$ -Sandwich aufgebaut ist, bieten den RNA-Sequenzen womöglich wenig geeignete Bindungsmöglichkeiten. Der theoretisch berechnete isoelektrische Punkt von 6,93 weist zusätzlich auf eine negative Gesamtladung des

Proteins (unter physiologische Bedingungen) hin. Dies führt zu Abstoßungskräften, die die Selektion erschweren können.

Weitere Versuche zur Evolvierung eines spezifischen CYTIP-PDZ bzw. CYTIP-PDZCC Binders sollten aufgrund der gezeigten Domäneneigenschaften in erster Linie weitere Optimierungen des Selektionsprozess, der Pufferbedingungen und der Waschvolumina beinhalten. Außerdem besteht die Möglichkeit, durch die Verwendung länger RNA-Bibliotheken und das Präsentieren von komplexeren Strukturen einen geeigneten Binder zu finden. Eine alternative Möglichkeit bietet die Klonierung eines weiteren CYTIP-Proteinkonstrukts, das bessere Proteineigenschaften für eine Aptamers Selektion besitzt.

### 4.1.2 KIAA0403

Mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz-Technologie (BIAcore) [3.2.2] wurde gezeigt, dass KIAA0403 tatsächlich ein neues Mitglied der CC-Binder sein könnte. Es konnte eine eindeutige Protein-Protein Interaktion der C-terminalen 125 Aminosäuren von KIAA0403 mit den zur Verfügung stehenden rekombinant exprimierten und gereinigten Mitgliedern der Cytohesinfamilie (Cytohesin 1 und 2) und mit dem einzigen Drosophilaanalogon dGRP1 bestimmt werden. Alle Dissoziationskonstanten lagen im niedrigen nanomolaren Bereich, Tabelle 4.1.1.

Interaktionspartner	K <sub>D</sub> [nM]
Cytohesin 1	73,8 ± 6,1
Cytohesin 2	32,5 ± 9,6
dGRP1	51,8 ± 11,8

Tabelle 4.1.1: Dissoziationskonstanten der Cytohesinwechselwirkung mit dem humanen KIAA0403.

Weiterhin konnte auch die Zuordnung der interagierenden Cytohesin-Domäne durch Ausschlussbindungsexperimente eindeutig auf die CC-Domäne eingegrenzt werden. Weitere Bindungsstudien konnten eine unspezifische Wechselwirkung mit anderen CC-Domänen wie der des CC-Binders CYTIP und des großen GEFs EFA6 ausschließen. Sie wiesen auch auf eine Fähigkeit zur Homomerisierung hin, welche bereits bei der rekombinanten Proteinexpression durch gravierende Präzipitationsphänomene aufgefallen war.

Diese *in vitro* Bindungsstudien gaben den ersten Hinweis, dass es sich bei KIAA0403, auch als PIP3-E bezeichnet (N-terminal +21 AS; Proteindatenbank), um ein neues potentielles Mitglied der CC-Binder und Modulatoren handeln kann. Die wechselwirkungsvermittelnde Domäne von KIAA0403 zeigt allerdings keine Homologie zu den bekannten CC-Domänenmotiven der Cytohesineffektoren.

Klarheit über die Wechselwirkung könnten weitere funktionale Studien bringen. So wären Koimmunpräzipitationen<sup>[10, 11]</sup> und Immunfluoreszenz-Mikroskopie<sup>[12]</sup> zwei Möglichkeiten, diese *in vitro* Protein-Protein Wechselwirkung zu bestätigen. Jedoch konnte aufgrund des hierfür benötigten spezifischen Antikörpers gegen KIAA0403, welcher kommerziell nicht erhältlich ist, diese Strategie in Zellkultur nicht verfolgt werden. Einzig in der Überexpression von KIAA0403 mit einem „tag“ könnte diese spezifische Interaktion nachgewiesen werden. Diese Strategie wurde bei den späteren zellulären Studien aus den genannten Gründen gewählt. Auch das Zurückgreifen auf Kolo-kalisation der überexprimierten fluoreszierenden Fusionsproteine wäre eine Alternative, um die Interaktion in Zellkultur zu bestätigen. Dennoch muss bei den Überexpressionsstudien bedacht werden, dass die Zellen durch das zu untersuchende Protein, oder in diesem Fall durch zwei Proteine, sehr großem Stress ausgesetzt werden. Daher kann es in der Zelle auch zu Fehllokalisation und daraus resultierenden Fehlinterpretationen kommen.

### 4.1.3 *In vitro* Aptamer Selektion gegen KIAA0403

Parallel zur Aptamerselektion von CYTIP wurde mit der Untersuchung des humanen zytosolischen Proteins KIAA0403 begonnen. Mit dem Ziel der Funktionsaufklärung wurde gegen das  $\Delta$ N291-Konstrukt (C-terminale 125 AS, pI: 10) der CC-bindenden Domäne selektiert [3.2.3]. Die Aptamerselektion wurde nach der optimierten Selektionsmethode und der neuen Kopplungsstrategie von CYTIP-PDZ durchgeführt. Zur Anwendung kam das biotinylierte Protein und zwei relativ kurze RNA-Bibliotheken N20 und N25 (randomerisierte Bereich: 20 und 25 Nukleotide), die nach neun (N20) bzw. nach sieben Selektionsrunden (N25) zu einer erfolgreich Anreicherung führten. Die Selektion wurde aufgrund des großen Präzipitationspotentials von KIAA0403 an immobilisiertem Protein durchgeführt und zur Vorbeugung von streptavidinbindenden RNA-Sequenzen eine zusätzliche Präselektion gegen das Matrixmaterial vorgenommen. Dennoch kam es bei der N20 Bibliothek zu einer parallelen Anreicherung von streptavidinbindenden Sequenzen, welche sich auf der Monoklonebene in Streptavidin- und Targetbinder separierten.

Die Anreicherung von Streptavidinbindern bei Verwendung der N20 Bibliothek scheint im Vergleich mit der CYTIP-PDZ Selektion ein bibliothekspezifisches Problem zu sein. Auch hier war die Präselektion nicht effektiv. Der sehr kurze randomerisierte Bereich, der wenig Spielraum bietet (4 Nukleotide langer *stem* im konstanten Bereich), enthält demnach starke streptavidinerkennende Faltungsmotive. Diese scheinen bei der Selektion im Vorteil zu sein. Das gleiche Phänomen konnte auch bei der DNA-Bibliothek von U. Wüllner beobachtet

werden. Trotz des Anbietens verschiedener Targets, CYTIP-PDZ und –PDZCC, sowie FHL2-LIM0+1 konnten immer nur RNA-Sequenzen isoliert werden, die bevorzugt an die Cyanobromidsepharose banden. Um dieses Problem zu minimieren könnte man zusätzlich zur Präselektion auch mit einem System wechselnder Trägermaterialien arbeiten und nach je drei Selektionszyklen die Matrix ändern.

### 4.1.4 K21 und K61 spezifisch bindende Aptamere

Aus beiden Aptamer Selektionen gegen die CC-Bindedomäne von KIAA0403 konnte das **K21** Aptamer (N25 Selektion) mit der besten Dissoziationskonstante von  $78 \pm 23$  nM erhalten werden [3.2.5]. Anschließende Filterbindungen schlossen eine Affinität zu Kontrollproteinen wie die CYTIP-PDZ-Domäne, FHL2 LIM0+1, Lysozym und Cytohesin 1 aus. Weiter war das selektierte Aptamer **K21** in der Lage, auch den Interaktionspartner von KIAA0403, das Cytohesin 2, mit einer ähnlich hohen Affinität zu erkennen, Tabelle 4.1.2. Dieses Ergebnis gab den ersten Hinweis auf eine Gemeinsamkeit beider Interaktionspartner auf der Proteinebene. Weitere Untersuchungen dieses Aptamerbindungsphänomens zeigten eine Verbindung zum **K61** Aptamer, ein von Dr. M. Theis<sup>[57]</sup> gegen Cytohesin 2 selektiertes Aptamer, das ein ähnliches Bindungsverhalten aufwies, Tabelle 4.1.2.

Aptamere	His <sub>6</sub> -KIAA0403-ΔN291 K <sub>D</sub> [nM]	Cytohesin 2 K <sub>D</sub> [nM]
<b>K21</b>	$78 \pm 23$	$29,5 \pm 2,4$
<b>K61</b>	$21,5 \pm 0,7$	$79,6 \pm 5,4$

Tabelle 4.1.2: Dissoziationskonstanten der Aptamere **K21** und **K61** bezüglich der Bindungspartner His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 und Cytohesin 2.

Dieses Bindungsverhalten konnte auch in einer weiteren, unabhängigen *in vitro* Bindungsstudie, dem „Pull-down“-Assay, verifiziert werden [3.2.6]. Dieses Kontroll-experiment schließt einen technischen Fehler im Bindungsassay aus. Es ist ungewöhnlich, dass zwei Aptamere, die gegen zwei auf Aminosäuresequenz völlig unterschiedliche Proteine und mit zwei verschiedenen RNA-Bibliotheken selektiert worden sind, ein ähnliches Bindungsverhalten zeigen. Eine näherer Betrachtung und Analyse beider Sequenzen ergab nur eine einzige Gemeinsamkeit: Beide Aptamere enthalten ein Konsensusmotiv, das im randomisierten Bereich aus sechs Nukleotiden **CUAUUG** besteht. Jedoch zeigten sich keine weiteren Gemeinsamkeiten der postulierten Faltung (mfold) beider Aptamere. Diese Vorhersage bezieht sich jedoch nur auf die energetisch begünstigte Struktur auf zweidimensionaler Ebene, so dass weitere Übereinstimmungen möglich wären.

In Wettbewerbsstudien [3.2.7] wurde festgestellt, dass beide Aptamere, **K21** und **K61**, an beiden Targets in der Lage sind, sich gegenseitig von dem jeweiligen Bindungspartner konzentrationsabhängig zu verdrängen. So konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass sie gleiche oder zumindest überlappende Bindungs epitope aufweisen. Darüber hinaus konnte die Bindung zwischen dem GEFs Cytohesin 1 und dem CC-Binder KIAA0403- $\Delta$ N291 konzentrationsabhängig mittels des **K21** Aptamers inhibiert werden ( $K_I$  von  $1,29 \pm 0,43 \mu\text{M}$ ) [3.2.8].

Eine Epitopzuordnung der Aptamere mit Hilfe der KIAA0403 Deletions-GST-Konstrukte [3.2.10] konnte aufgrund der widersprüchlichen Filterbindungsergebnisse nicht erfolgen, Tabelle 4.1.3. Für eine eindeutige Bindungs epitopbestimmung, welche für KIAA0403 tendenziell in der Zwischenregion der beiden Deletionskonstrukte zu finden wäre, müssten weitere Deletionskonstrukte kloniert und in Filterbindungs-Assays untersucht werden.

Aptamere	GST-KIAA0403-Volllänge $K_D$ [nM]	- $\Delta$ N291 $K_D$ [nM]	- $\Delta$ C125 $K_D$ [nM]
<b>K21</b>	$4,8 \pm 1,5$	$24,5 \pm 3,9$	$18,2 \pm 3,6$
<b>K61</b>	$14,7 \pm 2,3$	$50,8 \pm 2,8$	$175 \pm 23$

Tabelle 4.1.3: Dissoziationskonstanten der Aptamer **K21** und **K61** bezüglich des GST-KIAA0403-Vollängenproteins und Deletionsmutanten - $\Delta$ N291 und - $\Delta$ C125.

Es konnte auch gezeigt werden, dass der Cytohesin 2 katalysierte GDP/GTP-Austausch an ARF1, genauso wie im Falle des **K61**, nicht durch Anwesenheit des **K21** Aptamers beeinflusst wird [3.2.9]. Eine Wechselwirkung des **K21** Aptamers mit der katalytisch aktiven Sec7-Domäne konnte schon zuvor in Filterbindungen ausgeschlossen werden. Die Wechselwirkung des Aptamers in weiterer Anwesenheit von KIAA0403 wurde hingegen nicht untersucht. Hier wäre es interessant zu sehen, in wieweit der CC-Binder in der Lage ist, die Austauschreaktion zu modulieren (vergleichbar zum homologen IPCEF1<sup>[120, 121]</sup>), bzw. welchen Einfluss hierbei die Aptamere spielen würde.

Beide Aptamere, **K21** und **K61**, besitzen nach Analyse der generierten *in vitro* Daten ein ähnliches Verhalten, so dass das gefundene Konsensusmotiv *CUAUUG* von **K21** in der weiteren *in vitro* Untersuchung durch Punktmutationen verändert wurde. Hierbei wurden jeweils einzelne Punktmutationen an der Position 32, 33 und 34 eingebracht, sowie zwei Kombinationen aus Einzelmutationen in Position 32+33 und 33+34 generiert. Diese wiesen in mfold-Strukturanalysen, im Vergleich zur Originalsequenz des Aptamers **K21**, ein unterschiedliches Faltungsverhalten auf. In Filterbindungsanalysen konnte eine deutliche Reduktion der Bindung aller Mutanten nachgewiesen werden. Die Sättigung ist dabei bei allen Mutanten im Vergleich zur Originalsequenz deutlich gesunken. Dies deutet stark auf

eine Fehlfaltung hin. Somit gibt es einen deutlichen Hinweis, dass die Konsensussequenz des **K21** Aptamers bezüglich seiner Bindung an die Deletionsmutanten KIAA0403- $\Delta$ N291 essentiell ist. Zur weiteren Verifizierung dieser Daten müsste jedoch auch das **K61** Aptamer unter den gleichen Gesichtspunkten untersucht und punktmutiert werden.

Zusammenfassend belegen die Aptamercharakteristika, dass beide Aptamere gleiche oder großflächig überlappende Bindungsepitope haben und dadurch deren Kompetition an beiden Proteintargets ermöglicht wird. Trotz zweier unterschiedlicher Selektionen an zwei verschiedenen Proteinen konnte das **K21** Aptamer evolviert werden, welches die gleichen *in vitro* Eigenschaften aufweist wie **K61**. In GDP/GTP Austausch-Assays des Cytohesin 2 an ARF1 wurde ebenfalls kein Unterschied zu **K61** festgestellt. Punktmutationsstudien zeigten, dass die Konsensussequenz entscheidend für die spezifische Bindung von **K21** an KIAA0403 sein muss.

Es konnte auch gezeigt werden, dass es möglich ist, mit dem **K21** Aptamer die Cytohesin 1 Wechselwirkung mit KIAA0403 zu unterbinden, welche wie bei allen CC-Bindern und Modulatoren durch die CC-Domäne vermittelt wird. Cytohesin 1 und -2 sind zu 90% identisch<sup>[57]</sup>, wobei die größten Unterschiede an den Termini der Proteine und in der Übergangsregion zwischen der Coiled-coil- und der Sec7-Domäne zu finden sind<sup>[184]</sup>. **K21** und **K61** sind in der Lage, sehr selektiv zwischen den beiden GEF-Familienmitgliedern zu diskriminieren. Deren Bindungsepitop wird ausgehend vom **K61** bei Cytohesin 2 zwischen der CCSec7-Region vermutet. Die Tatsache, dass Cytohesin 2 und KIAA0403 gebunden werden, lässt vermuten, dass diese beiden Bindungsepitope genauso wie die Aptamere eine Gemeinsamkeit zu besitzen scheinen, welche jedoch nicht in der Primärstruktur zu finden ist. Kristallisationsstudien beider Proteine könnten dieses Bindungsverhalten möglicherweise aufklären.

Die bisherigen *in vitro* Ergebnisse können aufgrund der sehr spezifischen Wechselwirkung beider Aptamer als Hinweis auf eine regional ähnliche dreidimensionale Faltstruktur beider Proteine, der CC-bindenden Domäne KIAA0403- $\Delta$ N291 und Cytohesin 2 gedeutet werden. Kristallstrukturuntersuchungen und Mutationsstudien der beteiligten rekombinanten Proteine würden in weiteren *in vitro* Experimenten weitere Informationen liefern. Ein „Domain-Swapping“ der beteiligten CC- und Sec7 Domänen beider Proteinspezies Cytohesin 1 und 2 untereinander (Proteinkonstrukt: Cytohesin 1-CC-Cytohesin-2-Sec7 und umgekehrt), könnten weiteren Aufschluss geben.

### 4.1.5 Zellkulturstudien und biologische Relevanz von KIAA0403

In der weiterführenden Charakterisierung von **K21** wurden Untersuchungen in eukaryontischer Zellkultur durchgeführt [3.2.12]. Denn erst durch diese unabhängige Bestätigung der Charakteristika kann von einem gleichen Verhalten der beiden Aptamere gesprochen werden.

Die Familie der Cytohesine ist an einer Reihe von zellulären Prozessen beteiligt, z. B. der Zytoskelettremodellierung<sup>[185]</sup>, Regulierung des Zelltransports und Signaltransduktion. Theis et al.<sup>[57]</sup> konnten zeigen, dass die Cytohesine bei der Transkriptionsaktivierung, vermittelt durch die Stimulation des „*Serum Response Element*“ (SRE), eine Rolle spielen. Durch die Lipofektion des Intramers **K61** konnte nachgewiesen werden, dass die stimulierbare Erk1/-2 Phosphorylierung reduziert wurde. Dies resultierte in der Blockierung der serumstimulierten Expression des SRE-regulierten Gens. Die Beteiligung von Cytohesin 2 an der MAPK-Aktivität in Nichtimmunzellen (HeLa-Zellen) wurde weiter durch Überexpressionsexperimente und siRNA-Technologie nachgewiesen. Eine Beteiligung von Cytohesin 1 konnte hierbei ausgeschlossen werden.

Der Einsatz des **K21** Aptamers in Transfektionsexperimenten diente zur Bestätigung der *in vitro* Daten und führte wie erwartet zur konzentrationsabhängigen Inhibition der serumstimulierten Luciferase Expression in HeLa-Zellkultur, Abbildung 4.1.1. Die Existenz des KIAA0403-Proteins in HeLa-Zellen wurde zuvor durch *real time* PCR Experimente nachgewiesen (M. Hafner, unveröffentliche Daten). Der endogene Luciferase-Level konnte bei einer Gesamtmenge des **K21** Intramers von 3 pmol bis auf den Level der Hintergrundexpression zurück reguliert werden. Wie bei **K61** kann im Falle des **K21** ebenfalls von einer vollständigen Inhibition der SRE-kontrollierten Genexpression gesprochen werden [3.2.12.1]. Es hat sich wiederum gezeigt, dass **K21** auch in seiner Funktion als Intramer die gleichen Charakteristika wie **K61** aufweist und im etablierten Luciferase-Assay von Dr. Theis nicht vom inhibitorischen **K61** Effekt zu unterscheiden ist.

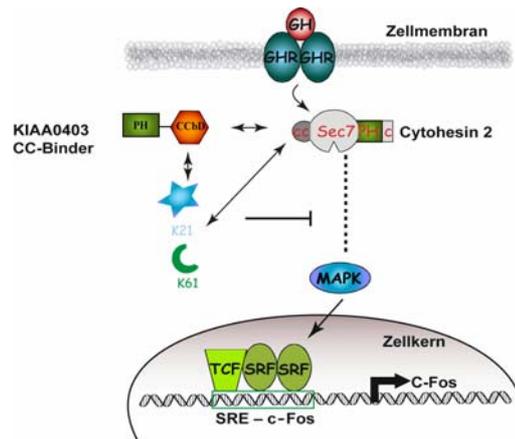


Abbildung 4.1.1: Modell des Zusammenspiels von Cytohesin 2 als Effektor und KIAA0403, dem CC-Binder in der serumvermittelnden Aktivierung über den MAP-Signalweg. Die Applikation der Intramere **K21** und **K61** führt zu einer Inhibition der Stimulation der Transkriptionsaktivierung von c-Fos, wobei die Regulation noch ungeklärt ist. (GH = *growth hormone*, GHR = *growth hormone receptor*, TCF = *ternary complex factor*, SRF = *serum response factor*).

Die Hypothese, dass beide Proteine KIAA0403 und Cytohesin 2 eine domänenspezifische Gemeinsamkeit haben könnten, wird auch durch die Zellexperimente weiter unterstützt. Eine Beteiligung des CC-Binders KIAA0403 an der Regulation der serumvermittelnden Transkriptionsaktivierung von c-Fos ist aufgrund der KIAA0403-Cytohesin 2-Wechselwirkung sehr wahrscheinlich. Jedoch kann dies durch die fehlende Diskriminierung beider Intramere durch deren Einsatz zu nicht geklärt werden.

Zur weiteren Funktionsaufklärung wurde deshalb auf eine andere Technik zurückgegriffen. Mit Hilfe der Überexpressionsstudien des KIAA0403-Volllängenproteins und der Deletionskonstrukten in HeLa-Zellkultur sollte die Frage geklärt werden, ob der CC-Binder an der MAPK-Aktivität in einer regulatorischen Funktion beteiligt ist. Hierzu sollte aus dem Phosphorylierungsgrad der stimulierbaren Erk1/-2 Phosphorylierung auf die MAPK-Aktivität geschlossen werden. Auch die Applikation der Aptamere **K21** und **K61** in so genannten *Rescue*-Experimenten würde weitere Informationen zur regulatorischen Funktion des CC-Binders liefern. Beispielsweise sollte erkennbar sein, ob eine Bindung beider Proteine für die Transkriptionsaktivierung erforderlich ist oder nicht.

Die Überexpression von KIAA0403 konnte jedoch aufgrund eines vermuteten induzierten Proteinabbaus keine weiteren Hinweise zur Aufklärung der biologischen Relevanz von KIAA0403 in der MAP-Signalkaskade liefern. In mehreren unabhängig durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass es nach einer Stimulationszeit von 15 min. (FCS) zum Abbau des KIAA0403 Volllängenproteins und des KIAA0403- $\Delta$ N291-Konstruktes (CC-bindenden Domäne) kommt, während die korrespondierende KIAA0403- $\Delta$ C125

Deletionsmutante davon nicht betroffen ist. Durch den Einsatz des Proteasominhibitors MG-132 konnte dieser gezielte Abbau unterbunden werden. So ist es denkbar, dass die Proteininteraktion beider Partner (Cytohesin 2/KIAA0403) aufgrund der äußeren Stimulation durch ein aktives Entfernen des CC-Binders, das Cytohesin 2 seine Funktion als positiver Effektor im MAP-Signalweg erst ermöglicht wird, Abbildung 4.1.2. KIAA0403 könnte wie der CC-Binder CYTIP als negativer Regulator des Cytohesin 2 fungieren, und für dessen Lokalisation sorgen. Dies müsste durch weitere Kollaborationsuntersuchungen bestätigt werden.

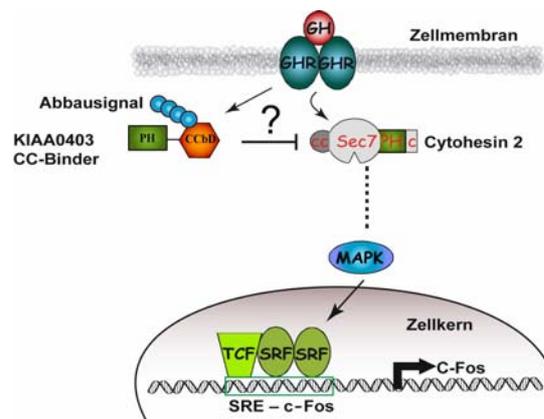


Abbildung 4.1.2: Modell für die Rolle des CC-Binders KIAA0403 in einer regulatorisch induzierten Abbaureaktion als Folge der serumvermittelnden Aktivierung des MAP-Signalwegs. Durch einen gezielten Abbau des CC-Binders wird die Interaktion zum Cytohesin 2 unterbunden. Die Übertragung des Signals kann ungehindert vermittelt werden. (GH = *growth hormone*, GHR = *growth hormone receptor*, TCF = *ternary complex factor*, SRF = *serum response factor*).

Diese Hypothese gilt es mit zukünftigen Fragestellungen und Experimenten zu belegen. Zum einen steht hier die Verwendung der siRNA-Technologie<sup>[33-36]</sup> zum gezielten Ausschalten des gesamten Proteins zur Verfügung. Nach der aufgestellten Hypothese sollte das Ausschalten von KIAA0403 keine Veränderung der Transkriptionsaktivität bewirken. Zum anderen ist auch der Einsatz von kleinen organischen Molekülen als domänenspezifische KIAA0403 Inhibitoren denkbar. Durch die Verwendung des **K21** Aptamers könnte dieser zur Konvertierung in ein kleines wirkstoffähnliches Molekül für ein Hochdurchsatzscreening (HTS)-Assay großer Substanzbibliotheken genutzt werden<sup>[186, 187]</sup>. Der aptameranaloge Inhibitor besitzt entscheidende Vorteile, wie Membrangängigkeit, Synthetisierbarkeit, breitere Einsatzfähigkeit und bessere Möglichkeiten der *in vivo* Applikation. Auf der Ebene der organischen Moleküle lassen sich Leitstrukturen besser optimieren, welche letztendlich zwischen beide Proteinpartner KIAA0403 und Cytohesin 2 diskriminieren könnten, eine Fähigkeit die beide Aptamere **K21** und **K61** nicht besitzen.

### 4.2 FHL2

FHL2 (Four-and-a-half-LIM only protein 2) gehört zur Klasse der humanen „LIM only“ Proteine. Mit seinen viereinhalb LIM-Domänen ist es in der Lage, mit 50 bisher charakterisierten zytosolischen Proteinen<sup>[155]</sup> in Wechselwirkung zu treten und unterschiedlichste Funktionen zu vermitteln. Hierbei sind Interaktionen mit PDZ-Domänen<sup>[157]</sup>, Armadillo repeats<sup>[156]</sup> und mit den zytosolischen Domänen der Integrine<sup>[158]</sup> zu nennen. Seine Funktionen als Korepressor<sup>[157]</sup> und auch als Transkriptions-Koaktivator<sup>[151, 159, 168]</sup> bei der Rho vermittelnden Signaltransduktion machen es zu einem sehr interessanten multifunktionalen Protein. Die Regulation der vielfältigen Interaktionen und die Zusammenhänge in den einzelnen biologisch relevanten Prozessen sind noch nicht hinreichend geklärt. Hinweise auf eine Beteiligung von FHL2 in der Onkogenese konnten durch Korrelationsstudien der Expressionslevel und Kernlokalisierung von FHL2 und Rho in verschiedenen Stadien maligner Prostatagewebe<sup>[159]</sup> beobachtet werden und lassen eine funktionale Bedeutung in der malignen Tumorprogression vermuten. Darüber hinaus konnte in Zellkulturstudien (NIH 3T3) gezeigt werden, dass die induzierbare Nukleustranslokation von FHL2 durch RhoA, RhoB und RhoC vermittelt wird<sup>[159]</sup>. Es sollte primär der Frage nachgegangen werden, ob FHL2 als Transkriptionskoaktivator von Zielgenen für die Tumorgenese von malignem kolorektalem Krebs mitverantwortlich ist und diese bei der Proliferation und Migration begünstigt.

RhoA wird in größeren Populationen von verschiedenen Darmkrebsarten überexprimiert<sup>[188]</sup>. In Zellkulturstudien konnte ein Zusammenhang der RhoA Aktivität mit dem invasiven Fortschreiten eines Tumors<sup>[189]</sup> nachgewiesen werden. Die Entwicklung eines Inhibitors, in diesem Fall eines spezifischen Aptamers, sollte helfen, die Wechselwirkung von FHL2 mit weiteren Transkriptionsfaktoren in Zellkultur zu untersuchen.

#### 4.2.1 *In vitro* Aptamerelektion gegen FHL2

Die ersten Aptamerelektionen wurden zunächst gegen die ersten N-terminalen 1 ½ LIM-Domänen von FHL2 (FHL2-LIM0+1) durchgeführt, da diese maßgeblich an der Interaktion mit der GTPase RhoA<sup>[159]</sup> beteiligt sind. Die bei der ersten Aptamerelektion verwendete RNA-Bibliothek von U. Wüllner [5.7.1.1] und die Immobilisierungsstrategie des rekombinanten Proteins an Cyanogenbromidsepharose führte, wie schon in der CYTIP-PDZ und -PDZCC Aptamerelektion diskutiert, nach sieben Zyklen zu matrixbindenden Sequenzen.

Der anschließende Versuch eines Matrixwechsels zur Nitrozellulosemembran und einer Veränderung der RNA-Target-Inkubation (freies Protein in Lösung) bewirkte ebenfalls keine Anreicherung von spezifisch bindenden Sequenzen. Nach weiteren drei Selektions-runden konnten nur stark matrixbindende RNA-Spezies evolviert werden, so dass von dieser Selektionsstrategie abgesehen wurde [3.3.1]. Das Anreicherungsproblem von matrixbindenden RNA-Spezies bei der Verwendung von proteinderivatisierter Sepharose wurde schon bei der Aptamerselektion der CYTIP-Domänen PDZ und PDZCC sehr ausführlich diskutiert [4.1.1].

Die RNA-Bibliothek und Trägermatrix erwies sich unabhängig vom Target zum dritten Mal als ungeeignet, so dass die Bibliothekauswahl und Kopplungsstrategie bei den nächsten Selektionsversuchen sorgfältig ausgewählt wurde. So wurde als Kopplungs- und Trennungsstrategie auf streptavidinderivatisierte magnetische Partikel zurückgegriffen, da der Matrixwechsel auf Nitrozellulose ebenfalls zu Problemen in der Anreicherung von matrixbindenden Spezies geführt hatte.

Mit dem Ziel, matrixunabhängige Aptamere für die ersten beiden N-terminalen Domänen LIM0+1 zu erhalten, wurde somit entsprechend der CYTIP-PDZ und KIAA0403 Selektion auf die Biotinylierung des Proteins und die Trennung der bindenden RNA-Sequenzen von den ungebundenen Spezies mit Hilfe der Streptavidin magnetischen Partikeln durchgeführt. Die Verwendung von zwei unterschiedlich langen RNA-Bibliotheken mit 20 und 40 Nukleotiden im randomisierten Bereich (N20 und E40) und von Variationen in der Inkubation mit der RNA-Bibliothek (Proteinimmobilisierung) führte trotz des Strategiewechsels nicht zum Erfolg.

Die zur Methodenüberprüfung durchgeführte Kontrollselektion gegen Lysozym konnte hingegen erfolgreich beendet werden. Wie schon bei der CYTIP-PDZ Selektion sprechen diese Ergebnisse auch hier dafür, dass die physikochemischen Proteineigenschaften der N-terminalen Domänen LIM0+1 (pI: 6,27) und die Proteinfaltung die Aptamerselektion nicht begünstigen. Der theoretisch berechnete isoelektrische Punkt weist auf eine negative Gesamtladung des Proteins unter physiologische Bedingungen hin. Somit wird die Selektion durch Abstoßungskräfte erschwert. Eine weitere Optimierung des Selektionsprozess, der Salzkonzentration und der Waschvolumina ist nötig, um gute Binder gegen diese beiden Domänen zu evolvieren.

Aufgrund dessen wurde ein alternativer Weg zur Funktionsuntersuchung von FHL2 eingeschlagen. Hierzu wurde das GST-Volllängenprotein (pI 7,54) zur Aptamerselektion eingesetzt, wobei eine größere Angriffsfläche für ein spezifisch bindendes Aptamer

geschaffen wurde. Ausgehend von diesen bindenden RNA-Sequenzen könnte durch Mutationsstudien und anschließende Reselektion ein Aptamer gegen die LIM0+1 Domäne selektiert werden.

Die Erfahrung aus der vorangegangenen FHL2-LIM0+1 Selektion gab Anlass zur Verwendung einer längeren RNA-Bibliothek mit je 80 (B80) und 50 (B50) Nukleotiden im randomisierten Bereichen bei der FHL2-Volllängenprotein Selektion. Die höhere strukturelle Varianz sollte spezifische Binder hervorbringen. Zum Vergleich wurde eine viel kürzere RNA-Bibliothek (N25) verwendet, welche schon bei der KIAA0403 Selektion erfolgreich eingesetzt wurde. Die Kopplungs- und Selektionsstrategie wurde entsprechend den KIAA0403 Selektionsversuchen und angelehnt an die automatisierte Methode von Cox et al.<sup>[70]</sup> beibehalten, mit Ausnahme der freien Inkubation des Proteins. Durch beide Selektionen konnte eine Anreicherung von bindenden Sequenzen erzielt werden, wobei die kürzere N25 RNA-Bibliothek zu gemischten Aptameren führte, welche Matrix- und gleichzeitig Proteinaffinität zeigten. Auf monoklonarer Ebene konnte das **K16** Aptamer aus der B50 Selektion (20% der Gesamtpopulation) und eine weitere individuelle RNA-Sequenz, das **K12** Aptamer (B80-Selektion) als beste Binder evolviert werden. Die Dissoziationskonstanten beider Aptamere liegen hierbei im niedrigen mikromolaren Bereich, Tabelle 4.2.1.

Aptamere	GST-FHL2 Volllänge
<b>K12</b>	$0,72 \pm 0,06 \mu\text{M}$
<b>K16</b>	$0,87 \pm 0,26 \mu\text{M}$

Tabelle 4.2.1: Dissoziationskonstanten der Aptamer **K12** und **K16** bezüglich der GST-FHL2-Volllänge.

Es konnte auch die erhoffte, wenn auch gering ausgeprägte Affinität gegen die isolierte His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 Proteindomäne detektiert werden. Aufgrund dieser Affinität liegt die Vermutung nahe, dass das Bindungsepitop beider Aptamere eventuell zwischen den Domänen LIM1 und LIM 2 zu finden ist. Dieses müsste jedoch durch weitere Proteindeletionsstudien bestätigt werden. Auffällig ist auch, dass der Monoklon **K12**, ursprünglich aus der B80 Selektion stammend, durch den Selektionsprozess gut 14 Nukleotide verloren hat. Der Trunkierungsprozess könnte eine Folge der enzymatischen Reaktionen der PCR, Transkription oder RT-PCR sein. Die gute Affinität zum Target und seine Faltungseigenschaften, welche höchstwahrscheinlich Strukturen bevorzugen, die zu enzymatischen Fehlern und dem Aussparen von Nukleotiden führen, könnten diese RNA Spezies hervorgebracht haben. Nach mfold-Strukturstudien besitzen beide Aptamere eine ähnliche Faltstruktur, welche einen langen „*stem-loop*“ innerhalb ihrer randomisierten

Region aufweist [3.3.5]. Diese Aptamerstruktur ist sehr gut für weitere *in vitro* Deletions- bzw. Mutationsstudien geeignet. Durch das Weglassen der konstanten Regionen und das Trunkieren des langen „stem-loops“ könnten stärker affine Bindungsmotive hervorgebracht werden. Jedoch sollte durch erste Zellkulturstudien abgeklärt werden, ob nicht schon diese verhältnismäßig langen Aptamere die Proteininteraktion von FHL2 und RhoA und die anschließende Nukleustranslokation und Transkriptionskoaktivierung inhibieren könnten.

Weiterführende zelluläre Assays zur Funktionsaufklärung mit Hilfe der selektierten Aptamere **K12** und **K16** wurden von Lucia Gulotti<sup>9</sup> durchgeführt. Erste Ergebnisse aus Kotransfektionsstudien in einem Luciferasereporterassay (G5E1b-Luc), welcher auf der seruminduzierten Kerntranslokation von Gal-FHL2 und Rho basiert, konnten keinen inhibitorischen Effekt der Aptamere zeigen. Weitere Optimierungen der Aptamerbindungseigenschaften sind somit zur effektiven FHL2-Inhibition unabdingbar. Hier sind als nächste Schritte vor allem Minimalmotivbestimmungen zu nennen. Aber auch Mutationsstudien und eine anschließende Reselektion gegen das eigentliche FHL2-Konstrukt LIM0+1 sind zu bedenken. So könnte es möglich sein, mit den Aptameren in einen nanomolaren Affinitätsbereich zu kommen. Das auf diese Weise entwickelte Aptamer kann aber nicht nur als Inhibitor in Zellkulturexperimenten genutzt werden, sondern beispielsweise auch als Biosensor (Antikörperersatz) zur molekularen Erkennung zum Einsatz kommen. Zahlreiche Beispiele belegen die Anwendung von Aptameren als Detektoren in der klinischen Diagnostik<sup>[92, 93]</sup>. Charlton et al.<sup>[190]</sup> konnten in einem der ersten Beispiele ein mit Technetium markiertes [<sup>99m</sup>Tc] DNA Aptamer (zwei hybridisierte DNA-Oligonukleotide; Aptamer und „Splint“ Oligo, welches zusätzlich mit Valyphosphonat konjugiert ist) gegen die humane neutrophile Elastase (hNE) *in vivo* (Tiermodell) zur Bilddiagnostik einsetzen. In einem weiteren Beispiel beschreiben Hicke et al.<sup>[191]</sup> die Verwendung eines Fluoreszenz- und [<sup>99m</sup>Tc]-Technetium markierten, chemisch stabilisierten RNA Aptamers TTA1<sup>[192]</sup>, welches sich gegen das extrazelluläre Matrixprotein Tenascin-C richtet. Dieses Protein spielt unter anderem eine wesentliche Rolle in der Angiogenese, Embryonalentwicklung, Wundheilung und im Tumorwachstum. Es konnte gezeigt werden, dass das modifizierte Aptamer sehr schnell von solidem Tumorgewebe wie Brustkrebs, Glioblastom, Lungen- und Kolonkarzinom aufgenommen wurde. Die ebenso schnelle Ausscheidung (gute Pharmakokinetik) führte zu einer sehr guten Einsetzbarkeit als Visualisierungs- und Tumormarkierungsreagenz *in vivo*. Ein weiteres erfolgreiches Beispiel konnte von Drolet et al.<sup>[193]</sup> vorgestellt werden. Hierbei wurde in einem ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent*

---

<sup>9</sup> Arbeitskreis Prof. Dr. R. Büttner

*Assay*) ähnlichen Format, der so genannten ELONA (*Enzyme-linked oligonucleotide assay*), mit einem Anti-VEGF-Aptamer die Proteinkonzentration in biologischen Proben sehr effizient bestimmt.

Der Einsatz des selektierten Aptamers in einer therapeutischen Applikation wäre ein weiterer denkbarer Schritt und wurde bei Indikationen wie dem Entzündungsprozess, Krebs und der Antikoagulationstherapie verfolgt<sup>[96, 97]</sup>. Jedoch besitzt das Aptamer als Nukleinsäure einige Eigenschaften, welche sich nachteilig auf seine Stabilität im Organismus und seine Bioverfügbarkeit auswirken, welche es zu überwinden gilt [1.2.1].

Pegaptanib (Macugen®) ist ein erfolgreicher Vertreter dieser Arzneistoffgruppe. Dabei handelt es sich um ein Anti-VEGF-Aptamer, welches als erstes einer klinischen Testung unterliegt (Eyetechnopharmaceuticals und Pfizer)<sup>[194, 195]</sup>. VEGF gilt als positiver Regulator bei der Angiogenese und als potentiell Target bei der Behandlung von AMD (*age-related macular degeneration*)<sup>[80, 81]</sup>.

## 5 Material

### 5.1 Verwendete Geräte und Materialien

#### 5.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Agarose Gelkammer	Fisher Scientific
Autoklaven; Tecnoclav 50 3850EL; 5075EL	Tecnomara-Fedegari
Blot Apparatur; Trans-Blot SEMI-DRY	Systec
Brutschrank	Bio-Rad
Entwicklermaschine; TR	Binder
FPLC-Kühlschrank; Unichromat1500	Optimax
FPLC-System; ÄKTA	UniEquip
Gefriertrockner; CT 110	Amersham Biosciences
Geiger-Müller-Zählrohr; Series900mini-I	Heto
Geltrockner; Model 583	Morgan
Handcounter; LB122	Bio-Rad
Hybridisierungsöfen; Si20H	Berthold
IMAC-Säulen; HiTrap-Chelating	Stuart-Scientific
HP Mikropipetten; research	Amersham Biosciences
Inkubationsschüttler; innova 4430	Eppendorf
Inkubatorschrank; HeraCell	New Brunswick Scientific
Ionenaustauschsäule; BioScaleQ 5 mL	Heraeus
Leersäule HR 16/10	Bio-Rad
Lichtmikroskop; Axiovert25	Amersham Biosciences
Mikropipetten; research	Zeiss
Transferpette B 5-50µL; 30-300µL	Eppendorf
Multidispenser	Brand
Neubauer Zählkammer; T728.1	Eppendorf
Oberflächenplasmonresonanz; Biacore3000	Roth
PAGE-Apparatur; Mini-Protean 3 Cell	Biacore
PCR-Cycler; Personal Cycler	Bio-Rad
T Gradient	Biometra
T3 Thermocycler	Biometra
pH-Meßgerät; pH-Meter	Biometra
Phosphorimager; FLA-3000	ionoLab
Photometer; BioMate3	Fujifilm
Pipettierhilfen; Easypet	ThermoSpectronic
Accu-Jet	Eppendorf
Real-Time PCR Cycler; iCycler iQ5	Brand
Reinstwasseranlage; Easy pure UV/UF	Bio-Rad
Röntgenfilme; BioMax MR	Barnstead
Sonifikatorstab; Sonoplus HD70	Kodak
Spannungsquellen; E865; E833; E802	Bandelin
Speed-Vac; Concentrator 5301	Consort
Spektroskope; Luminoscan	Eppendorf
Varioscan	Thermo
Sterilbank, Antares	Thermo
	Kendro

HeraSafe	Heraeus
Sterilisierbrenner; Vulcan	Heraeus
Szintillationszähler; winSpectral 1414	Perkin Elmer
Thermoblock; Block Heater	Stuart-Scientific
Thermomixer; comfort	Eppendorf
Tischschüttler; 3017	GFL
Überkopfschüttler; Reax2	Heidolph
UV-Transilluminator	Bio-Rad
VersaDoc Imaging System	Bio-Rad
Vortexer; 7-2020	NeoLab
Waagen; JL-200, BL1500S, BP 211D, Chyo Balance	Sartorius
Wasserbad; 1008	GFL
Zentrifugen; 5804R; 5810R; 5417C	Eppendorf
Biofuge 15R	Heraeus
J2-Mi	Beckman

## 5.1.2 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
BD Biosciences; BD Falcon Petri-Schalen	BD Biosciences
BD Falcon Kulturplatten 6-, 12-, 24-, 96-well	BD Biosciences
BD Falcon Pipetten 50, 25, 10, 5, 2 mL	BD Biosciences
BD Falcon Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup>	BD Biosciences
Centricon <sup>®</sup> YM-3, YM10	Millipore
Centriplus <sup>®</sup> YM-3, YM10, YM50	Millipore
CM5-Chip	Biacore
Dynabeads <sup>®</sup> M-280 Streptavidin	Dynal Biotech
Dialyseschläuche (MW cut of: 6-8 kDa)	Spectrum
Einwegspritzen	Chirana-Prema / Braun
Glaswolle, silanisiert	Serva
Hyperfilm ECL	Amersham
Kanülen	Terumo
Kryoröhrchen	Roth
MicroBiospin <sup>®</sup> 6 Chromatographiesäulen	Bio-Rad
MicroSpin G-25 Säule	Amersham Biosciences
Nitrozellulosemembran (Filterbindung); Protran 0,45 µm	Schleicher & Schuell
Nitrozellulosemembran (Western-Blot); Protran 0,1 µm	Schleicher & Schuell
Petrischalen	Nunclon
Polyprepsäule	BioRad
Reaktionsgefäße (1.5 mL u. 2.0 mL)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (PCR 0.2 u. 0.5 mL)	Eppendorf
Skalpelle	Bayha
Spitzen für Mikropipetten	Peske, Biozym
Spritzenvorsatzfilter	QualiLab
Sterilfiltrationsaufsätze	Nalgene
Ultra-Free MC 45µm	Millipore
Whatman-Filterpapier (3MM: 0,34mm; GB003: 0,8mmGB005: 1,2mm)	Schleicher & Schuell
Zentrifugenröhrchen (15 mL)	Roth
Zentrifugenröhrchen (50 mL)	Roth

### 5.1.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren zur Synthese, von analytischer Qualität, oder höherem Reinheitsgrad. Wasser wurde an einer Easy pure UV/UF Reinstwasseranlage vollentsalzt mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, über Nacht inkubiert und autoklaviert.

Artikel	Hersteller
β-Mercaptoethanol	Sigma
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dynabeads; M280 Streptavidin	Dynal Biotech
Agar	Sigma
Agarose, Electrophoresisgrade	Invitrogen
6-Aminohexansäure	Merck
Ammoniumacetat	Merck
Ampicillin-Na-Salz	Sigma
Aprotinin	Sigma
Benzamidin	Merck
Bis-Acrylamide; Rotiphorese	Roth
Bradford-Reagenzlösung	Bio-Rad
Bromphenolblau	Merck
Chloroform	Merck
CNBr-aktivierte Sepharose 4B	Amersham Biosciences
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
EDC/NHS Kopplungsreagenzien	Biacore
Essigsäure (99,8 %)	Merck
Ethanol abs.	Merck
Ethanolamin	Biacore
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA); Titriplex II	Calbiochem
EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin	Pierce
Formaldehyd (36 %)	Fluka
Formamide	Fluka
Glycerin	Roth
Glycogen	Roche
Glutaraldehyd	Sigma
Glutathion Sepharose™ 4B	Amersham Biosciences
Guanidiniumhydrochlorid	Sigma
Guanosine-5'-thiophosphat-Dinatriumsalz	EMP Biotech GmbH
Harnstoff	Calbiochem
Heparin	Sigma
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	Roth
Imidazol	Merck
Isopropanol	Merck
Isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranosid (IPTG)	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Kanamycin	Sigma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Konservierer für Wasserbäder	Roth
Leupeptin	Sigma
L-Gluthathion reduziert	Sigma

Magermilchpulver	TIP
Magnesiumchlorid	Merck
Metafectene	Biontex
MG-132, Proteosominhibitor	Calbiochem
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Riedel-de Haën
Natriumhydroxid	Merck
Natriumthiosulfat	Merck
NAP-Säulen	Amersham Biosciences
Ni-NTA Superflow	Qiagen
NP-40 (Igepal)	Fluka
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Calbiochem
Ponceau S	Sigma
Pefablok ® SC 76307; Serinprotease Inhibitor	Fluka
Roti-Phenol für Extraktionen	Roth
Salzsäure (37 %)	Merck
Silbernitrat	Merck
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100 ®	Merck
X-Gal	Sigma
Xylencyanol	Merck

### 5.1.4 Enzyme und Proteine

Artikel	Hersteller
Anorg. Pyrophosphatase	Roche
BamH I	New England Biolabs
Bovine Serum Albumine (BSA)	Calbiochem
Calf Intestine Alkaline Phosphatase	New England Biolabs
DNaseI	Roche
EcoR I	New England Biolabs
Lysozym	Sigma
NdeI	New England Biolabs
<i>Pfu</i> Turbo® DNA Polymerase	Stratagene
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	AG Famulok
Pyrophosphatase	New England Biolabs
Reverse Transkriptase: SuperScript II	Invitrogen
RNasin Ribonuklease Inhibitor	Promega
Taq DNA-Polymerase	Promega, AG Famulok
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
T4 Polynukleotidkinase (PNK)	New England Biolabs
T7 RNA-Polymerase	Stratagene, AG Famulok

### 5.1.5 Nukleotide, Aminosäuren und Radiochemikalien

Artikel	Hersteller
dNTPs	Roche, Mannheim
NTPs	Roche, Mannheim
$\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-GTP (Aktivität 3000 Ci/mmol)	PerkinElmer
$\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP (Aktivität 3000 Ci/mmol)	PerkinElmer

## 5.2 DNA und Protein Standards

### 5.2.1 DNA Längenmarker

Artikel	Hersteller	Fragmentlängen (Bp)
peqGOLD 100 bp	peq-Lab	1031; 900; 800; 700; 600; 500; 400; 300; 200; 100; 80
peqGOLD	peq-Lab	10000; 8000; 6000; 5000; 4000; 3500; 3000; 2500; 2000; 1500; 1200; 1031; 900; 800; 700; 600; 500; 400; 300; 200; 100

### 5.2.2 Protein Längenmarker

Zur besseren Längenzuordnung der rekombinant hergestellten Proteine wurden kommerzielle SDS-Protein-Längenstandards (Amersham Biosciences) der folgenden Zusammensetzung verwendet:

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

## 5.3 Kommerzielle Reaktionssysteme, Kits

Artikel	Hersteller
HRP-Detektionssystem (ECL-Reagenz)	Amersham Biosciences
Immobilon <sup>TM</sup> Western	Millipore
Luciferase Assay System	Promega
NanoOrange <sup>®</sup>	Molecular Probes

MinElute™ Gel Extraction Kit	Qiagen
PCR-Purification Kit	Qiagen
Plasmid Mini, Midi, Maxi Kit	Qiagen
pGEM®-T Vector system	Promega
QIAquick® Nucleotide Removal Kit	Qiagen
ReadyMix™ REDTAQ™ PCR Reaction Mix with MgCl <sub>2</sub>	Sigma
VenorGeM®	Minerva biolabs

## 5.4 Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen

### 5.4.1 Kulturmedien und Lösungen für Zellkulturarbeiten

Artikel	Hersteller
DMSO HYBRI-Max	Sigma
Minimum Essential Medium Eagel (EMEM)	Cambex
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco Life Technologies
Trypsin/EDTA (1x)	Gibco Life Technologies
<b>LB-Medium pH 7,0:</b>	<b>Konzentration</b>
Trypton	1% (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl in H <sub>2</sub> O (dest.) und 20 min. autoklavieren	1 % (w/v)
<b>SOB-Medium:</b>	<b>Konzentration</b>
Trypton	2% (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	0,05 % (w/v)
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O (dest.) und 20 min. autoklavieren	10 mM
<b>SOC-Medium:</b>	<b>Konzentration</b>
SOB Medium	
Glucose	20 mM
<b>Ampicillin-Stammlösung:</b>	<b>Konzentration</b>
Na-Ampicillin in 50 % Ethanol lösen, bei -20°C gelagert	100 mg/mL
<b>Kanamycin-Stammlösung:</b>	<b>Konzentration</b>
Kanamycin in H <sub>2</sub> O (dest.) lösen, bei -20°C gelagert	30 mg/mL
<b>IPTG-Stammlösung:</b>	<b>Konzentration</b>
IPTG in H <sub>2</sub> O (dest.) lösen, bei -20°C gelagert	1M

### 5.4.2 Puffer- und Stammlösungen

Alle Lösungen wurden mit autoklaviertem DEPC-Reinstwasser angesetzt und mit Hilfe von Spritzenvorsatzfiltern bzw. Flaschenfilteraufsätzen sterilfiltriert.

<b>Puffer</b>	<b>Hersteller</b>
Reporter Lysispuffer	Promega
Superscript II RT-Puffer	Invitrogen
T4-Ligase Puffer	New England Biolabs
T4-PNK Puffer	Stratagene
Transkriptionspuffer	Stratagene
<b>Ammoniumacetat-Lösung:</b>	<b>Konzentration</b>
NH <sub>4</sub> OAc	6 M
<b>Aprotinin-Lösung:</b>	<b>Konzentration</b>
Aprotini in H <sub>2</sub> O (dest.) lösen, bei -20°C gelagert	5 mg/mL
<b>Dithiothreitol-Lösung:</b>	<b>Konzentration</b>
Dithiothreitol mit H <sub>2</sub> O (dest.) lösen und bei -20°C gelagert	100 mM
<b>Denat. PAGE-Gelpuffer:</b>	<b>Konzentration</b>
TBE in 8,3 M Harnstoff	1 x
<b>EDTA-Lösung, pH 8:</b>	<b>Konzentration</b>
EDTA (Titriplex II)	0,5 M
<b>Ethidiumbromid-Lösung:</b>	<b>Konzentration</b>
Ethidiumbromid	10 mg/mL
<b>Leupeptin-Lösung:</b>	<b>Konzentration</b>
Leupeptin mit H <sub>2</sub> O (dest.) lösen und bei -20°C gelagert	2,5 mg/mL
<b>Magnesiumchlorid-Lösung:</b>	<b>Konzentration</b>
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	100 mM
<b>Natriumacetat-Lösung, pH 5,4:</b>	<b>Konzentration</b>
NaOAc	3 M
<b>Phosphat-Lösung nach Sørensen, pH 7,4:</b>	<b>Konzentration</b>
Lösung A: NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,2 M
Lösung B: Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,2 M
Durch Mischung von 23 mL der Lösung A und 77 mL der Lösung B ergeben sich 100 mL einer 200 mM Phosphatpufferlösung mit dem pH 7,4.	

<b><i>Pfu</i> DNA-Polymerase PCR-Puffer, 10x:</b>	<b>Konzentration</b>
Tris/HCl pH 9,0	200 mM
KCl	100 mM
MgSO <sub>4</sub>	15 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100 mM
Triton X-100	1% (v/v)
BSA (Nuklease frei)	1mg/mL

<b><i>Taq</i> DNA-Polymerase PCR-Puffer, 10x:</b>	<b>Konzentration</b>
Tris/HCl pH 9,0	100 mM
KCl	500 mM
MgCl <sub>2</sub>	15 mM
Triton X-100	1% (v/v)

<b>TE-Puffer, pH 7,5; (10x):</b>	<b>Konzentration</b>
Tris	100 mM
EDTA-Lösung pH 8 auf 1 L Puffer	10 mM

<b>TBE-Puffer, pH 8; (10x):</b>	<b>Konzentration</b>
Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA-Lösung pH 8 auf 1 L Puffer	2 mM

<b>PBS-Puffer, pH 7,4; (10x):</b>	<b>Konzentration</b>
NaCl	1470 mM
KCl	27 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	43 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14 mM

<b>Phenylmethylsulfonylfluorid-Lösung:</b>	<b>Konzentration</b>
PMSF mit Ethanol lösen und bei -20°C gelagert	100 mM

## 5.5 Antikörper

<b>Bezeichnung</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-Biotin-FITC-Konjugat monoklonal aus Ziege	Fluoresceinisothiocyanate spezifisch Anti-Biotin	1:1000 5% BSA, PBS	Sigma
Biotin/HRP	spezifisch Anti-Biotin	1:1000	Cell signaling
Cyt2-21; monoklonal aus Maus	prim. Antikörper spezifisch Anti-ARNO	1:400 5% BSA TBST	Sigma
α-Aktin monoklonal aus Kanninchen	prim. Antikörper spezifisch Anti-Aktin	1:5000 5% BSA TBST	Santa Cruz Biotechnology
α-FHL2-11-134 monoklonal aus Maus	prim. Antikörper spezifisch Anti-FHL2	1:2000 5% BSA TBST	AG Büttner
FLAG 2M monoklonal aus Maus	prim. Antikörper spezifisch Anti-FLAG	1:1000 3% BSA TBST	Sigma

Bezeichnung	Verwendung	Verdünnung	Hersteller
PDZ 2F9 monoklonal aus Ratte	prim. Antikörper spezifisch Anti-PDZ	1:20 5% BSA TBST	AG Kolanus
phospho P42/P44 monoklonal aus Kanninchen	prim. Antikörper spezifisch ERK1/2	1:1000 5% BSA TBST	Cell signaling
Penta His <sup>TM</sup> monoklonal aus Maus	prim. Antikörper spezifisch Anti-5His	2 ng 5% BSA TBST	Qiagen
Streptavidin/HRP	prim. Antikörper spezifisch Anti-Biotin	1:200 2% MP TBST	DacoCytomation
14-3-3 monoklonal aus Kanninchen	prim. Antikörper spezifisch Anti-14-3.3	1:10 000 5% BSA TBST	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Kanninchen-Immunglobulin aus Ziege	sekundärer Antikörper Peroxidase konjugiert	1:10 000 5% MP TBST	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Ratten-Immunglobulin aus Ziege	sekundärer Antikörper Peroxidase konjugiert	1:10 000 5% MP TBST	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Maus-Immunglobulin aus Ziege	sekundärer Antikörper Peroxidase konjugiert	1:10 000 5% MP TBST	Santa Cruz Biotechnology

MP= Milchpulver

## 5.6 Plasmide

### 5.6.1 Klonierung der SELEX-Bibliothek

Bezeichnung	Resistenz	Hersteller
pGEM <sup>®</sup> -T	Ampicillin	Promega

### 5.6.2 Überexpression in Prokaryonten

Bezeichnung	Resistenz	TAG	Hersteller
pET15b-CYTIP Volllänge	Ampicillin	His-Tag	Novagen; AG Kolanus
pET15b-CYTIP AA1-203	Ampicillin	His-Tag	Novagen; AG Kolanus
AA1-240	Ampicillin	His-Tag	Novagen; AG Kolanus
pET15b-CYTIP PDZ			
AA71-166	Ampicillin	His-Tag	Novagen; AG Kolanus
pET11a-CYTIP PDZCC			
AA71-214	Ampicillin	His-Tag	Novagen
pET15b-FHL2 LIM0+1	Ampicillin	His-Tag	Novagen; AG Büttner
pET28-KIAA0403-ΔN291	Kanamycin	His-Tag	Novagen; AG Patel
pGEX-4T-1 FHL2	Ampicillin	GST-Tag	Amersham Biosciences; AG Büttner
pGEX-2T-KIAA0403			
Volllänge AA1-409	Ampicillin	GST-Tag	Amersham Biosciences
ΔC125 AA1-284	Ampicillin	GST-Tag	Amersham Biosciences
ΔN291 AA284-409	Ampicillin	GST-Tag	Amersham Biosciences

### 5.6.3 Überexpression in Eukaryonten

Bezeichnung	Resistenz	TAG	Hersteller
pCMV-2B-KIAA0403			Stratagene
Volllänge AA1-409	Kanamycin	FLAG-Tag	
$\Delta$ C125 AA1-284	Kanamycin	FLAG-Tag	
$\Delta$ N291 AA284-409	Kanamycin	FLAG-Tag	
pRK5-IG-PIP3-E	Kanamycin	IGG	AG Kolanus

### 5.6.4 Reporterplasmide für eukaryontische Zellkultur

Bezeichnung	Resistenz	Referenz/Hersteller
SRE-Luc	Ampicillin	Liao et al., 1997 <sup>[196]</sup>
pEGFP-N1	Kanamycin	Clontech

## 5.7 Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) und Metabion international AG (München) bezogen.

### 5.7.1 SELEX DNA-Bibliotheken

Die T7-Promotorregion ist zur Verdeutlichung bei allen Bibliotheken unterstrichen. Der Buchstabe N bezeichnet ein unbekanntes Nukleotid.

#### 5.7.1.1 SELEX-Bibliothek von Ulrich Willner

**dsDNA Bibliothek (MWG):**

5'-GGGGAGCTCGGTACC-N<sub>37</sub>-AAGGATCCTCTGCAAAGCTT-3'

**5'-Primer:**

5'-CGGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGGAGCTCGGTACC-3'

**3'-Primer:**

5'-AAGCTTTGCAGAGGATCCTT-3'

**RNA Sequenz: 72 mer**

5'-GGGGAGCUCGGUACC-N<sub>37</sub>-AAGGAUCCUCUGCAAAGCUU-3'

#### 5.7.1.2 SELEX-Bibliothek E40 Ellington<sup>[70]</sup>

**sDNA Bibliothek (Metabion):**

5'-GATAATACGACTCACTATAGGGATAGGATCCACATCTACGTATTA-N<sub>40</sub>-TTCAGTGCAGACTTGACGAAGCTT

**5'-Primer E40.41:**

5'-GATAATACGACTCACTATAGGGATAGGATCCACATCTACGT-3'

**3'-Primer E40.24:**

5'-AAGCTTCGTCAAGTCTGCAGTGAA-3'

**RNA Sequenz: 90 mer**

5'-GGGAUAGGAUCCACAUCUACGUAUUA-N<sub>40</sub>-UUCACUGCAGACUUGACGAAGCUU

**5.7.1.3 SELEX-Bibliothek N20****dsDNA Bibliothek (Metabion):**

5'-AATCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAAGCATACTTTGACGA-N<sub>20</sub>-TCGTCGTGTTTGAAGTCA-3'

**5'-Primer N20.40:**

5'-AATCG TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAAGCATACTT-3'

**3'-Primer N20.21:**

5'-TGACCTTTACGAGTTCAAACA-3'

**RNA Sequenz: 71mer:**

5'-GGGAGAGGAAGCAUACUUUGACGA-N<sub>20</sub>-UCGUCGUGUUUGAACUCGUAAAGGUCA-3'

**5.7.1.4 SELEX-Bibliothek N25****dsDNA Bibliothek (Metabion):**

5'-AATGCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGAGACAGTCTACGTATT-N<sub>25</sub>-TTCAGTGCAGACGTAGGTACA-3'

**5'-Primer N25.47:**

5'-AATGCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGAGACAGTCTACGTATT-3'

**3'-Primer N25.21:**

5'-TGTACCTACGTCTGCAGTGAA-3'

**RNA Sequenz: 71mer**

5'-GGGAGAGAGACAGUCUACGUAUU-N<sub>25</sub>-UUCACUGCAGACGUAGGUACA-3'

**5.7.1.5 SELEX-Bibliothek B80 und B50****dsDNA Bibliothek (Metabion) B80:**

5'-AATGCTAATACGACTCACTATAGGAAGAAAGAGGTCTGAGACATTCT-N<sub>80</sub>-CTTCTGGAGTTGACGTTGCTT-3'

**RNA Sequenz: 126mer:**

GGAAGAAAGAGGUCUGAGACAUUCU-N<sub>80</sub>-CUUCUGGAGUUGACGUUGCUU-3'

**dsDNA Bibliothek (Metabion) B50:**

5'-AATGCTAATACGACTCACTATAGGAAGAAAGAGGTCTGAGACATTCT-N<sub>50</sub>-CTTCTGGAGTTGACGTTGCTT-3'

**RNA Sequenz: 96mer:**

GGAAGAAAGAGGUCUGAGACAUUCU-N<sub>50</sub>-CUUCUGGAGUUGACGUUGCUU-3'

Die Primer für beide Bibliotheken **B80** und **B50** sind aufgrund des Designs gleich.

**5'-Primer B80.45:**

5'-AATGCTAATACGACTCACTATAGGAAGAAAGAGGTCTGAGACATT-3'

**3'-Primer B80.21:**

5'-AAGCAACGTCAACTCCAGAAG-3'

## 5.7.2 Aptamere

Der randomisierte Bereich aller Aptamere ist fett unterlegt. Übereinstimmungen in der Sequenz sind zusätzlich durch eine kursive unterstrichene Schrift gekennzeichnet. Eingeführte Punktmutationen im randomisierte Bereich sind Grau unterlegt.

### Anti-KIAA0403-CCbd-Aptamer

**K21** (RNA: 71 mer):

5'-GGGAGAGAGAGACAGUCUACGUAUUAACAACCUAUUGGGCCCGGGGUAUGA  
UUCACUGCAGACGUAGGUACA-3'

### Punktmutationen K21

**P2 K21 U 32 C** (RNA: 71mer):

5'-GGGAGAGAGAGACAGUCUACGUAUUAACAACCAUUGGGCCCGGGGUAUGA  
UUCACUGCAGACGUAGGUACA-3'

### Punktmutationen K21

**P3 K21 A 33 G** (RNA: 71mer):

5'-GGGAGAGAGAGACAGUCUACGUAUUAACAACUGUUGGGCCCGGGGUAUGA  
UUCACUGCAGACGUAGGUACA-3'

### Punktmutationen K21

**P4 K21 U 34 C** (RNA: 71mer):

5'-GGGAGAGAGAGACAGUCUACGUAUUAACAACCUACUGGGCCCGGGGUAUGA  
UUCACUGCAGACGUAGGUACA-3'

### Punktmutationen K21

**P2+3 K21 UA 32 33 CG** (RNA: 71mer):

5'-GGGAGAGAGAGACAGUCUACGUAUUAACAACCCGUUGGGCCCGGGGUAUGA  
UUCACUGCAGACGUAGGUACA-3'

### Punktmutationen K21

**P3+4 K21 AU 33 34 GC** (RNA: 71mer):

5'-GGGAGAGAGAGACAGUCUACGUAUUAACAACUCUGUGGGCCCGGGGUAUGA  
UUCACUGCAGACGUAGGUACA-3'

### Anti-ARNO Aptamer von Dr. M. Theis<sup>[57]</sup>

**K61** (RNA: 82mer):

5'-GGGAGAGACAAGCUUGGGUCGCGUUUUGCUAUUGAUGUUCUUUUAACC  
UGGCCUGUUUGGGCCUCUUGCUCUUCCUAGGAGU-3'

### Anti-GEF Aptamer von Dr. G. Mayer<sup>[85]</sup>

**M69** (RNA: 94mer)

5'-GGGAGAGACAAGCUUGGGUCUAUUAUGCCUUUAGCUAGCGCAUUCUGU  
GGGGUGGGUGGAAGAAGAGAAAGAGAAGUUAUUAAGGAUCCUCAG-3'

**Anti-FHL2-Volllänge-Aptamer****K3** (RNA: 126mer):

5'-GGAAGAAAGAGGUCUGAGACAUUCUCGCUACCUCAUGGGUUGUAAUUGCA  
 ACUAUAACGCCACCCCAUCGUAAACUAGCACGACUCCUGAUUACUUCGC  
 CUUUCUUCUGGAGUUGACGUUGCUU-3'

**Anti-FHL2-Volllänge-Aptamer****K12** (RNA:112mer):

5'-GGAAGAAAGAGGUCUGAGACAUUCUAAACAGCUUUUAGGGACCUGCAAAAC  
 GCACAAACCGUAAGUAUAGGUUACCACUUGAAUAGCCCGUCUUCUGGAGU  
 UGACGUUGCUU-3'

**Anti-FHL2-Volllänge-Aptamer****K16** (RNA:96mer):

5'-GGAAGAAAGAGGUCUGAGACAUUCUAGAGCGCAUGUAUACCGUAAUCUU  
 CCUCCUGUCACACGGUGCAAAGCGCUUCUGGAGUUGACGUUGCUU-3'

**5.7.3 Primer**

Die T7-Promotorregion ist zur Verdeutlichung unterstrichen. Bei den Klonierungsprimern ist die Endonukleaseschnittstelle jeweils durch einen Keil gekennzeichnet. Weitere nachfolgende Start- und Stopkodons und eine eingeführte Hexahistidinsequenz sind kursiv dargestellt.

**5'-Primer I-39 für K61:**

TCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGACAAGCTTGGGTC

**3'-Primer I-20 für K61:**

ACTCCTAGGAAGAGCAAGAG

**5'-Primer für M69:**

5'-TCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGACAAGCTTGGGTC-3'

**3'-Primer für M69**

5'-CTG AGG ATC CTT AAT TAA CT-3'

***Klonierung CYTIP PDZCC (AS71-214) pET11a*****5'-Primer:** NdeI *HIS-Tag* Primer

5'-GGCAAGC CATATG *CATCATCACCACCATCAC* TCCTGGTCTCAAAGAAAGC-3'

**3'-Primer:** BamHI *Stopkodon* Primer

5'-CG GGATCC *CTA TTCCAAACTGGGGCAATTAG*-3'

***Klonierung KIAA0403Volllänge (AS1-409) pGEX-2T; pCMV-2B*****5'-Primer:** BamHI *Startkodon* Primer

5'-GAT GGATCC *ATGAGTCGGAGGAGGATATCGTGT*-3'

**3'-Primer:** EcoRI *Stopkodon* Primer

5'-GAT GAATTC *TCA AATGGAATTTTCAACAGAGGGAG*-3'

**Klonierung KIAA0403-ΔN291 CCbd-Domäne (AS284-409) pGEX-2T; pCMV-2B****5'-Primer: BamHI Startkodon Primer**5'-GAT **GGATCC** ATGGAGAAGCTGTACAAATCATTAGAG-3'**3'-Primer: EcoRI Stopkodon Primer**5'-GAT **GAATTC** TCA AATGGAATTTTCAACAGAGGGGAG-3'**Klonierung KIAA0403-ΔC125 (AS284-409) pGEX-2T; pCMV-2B****5'-Primer: BamHI Startkodon Primer**5'-GAT **GGATCC** ATGAGTCGGAGGAGGATATCGTGT-3'**3'-Primer: EcoRI Stopkodon Primer**5'-GAT **GAATTC** TCA TTCATCATCTTCAGACACTTTTG-3'

## 5.8 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> -Stamm	Genotyp	Referenz
BL 21 DE3	hsdS gal (λcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)	Sambrook et al., 2001 <sup>[197]</sup>
BL21 (DE3) pLys S F	dcm ompT hsdS(τB- mB-) gal λ(DE3) [pLysS]	Sambrook et al., 2001 <sup>[197]</sup>
BL21 DH10B	Δ(mrr-hsd RMS-mcrBC) mcrA recA1	Sambrook et al., 2001 <sup>[197]</sup>
JM83	ara, Δ(lac – proAB), rpsL,(strr), thi, Φ80, lacZΔM15	Vieira und Messing et al., 1982

## 5.9 Eukaryontische Zelllinien

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
HeLa	Humane Zelllinie mit epithelartiger Morphologie aus Patienten mit Cervix-Karzinom	Tyndall et al., 1965 <sup>[198]</sup>

## 6 Methoden

### 6.1 Allgemeine Methoden im Umgang mit Proteinen

#### 6.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Biomoleküle (Proteine) lassen sich abhängig von Ladung, Molekulargewicht und Konformation mittels Gelelektrophorese trennen. Bei der diskontinuierlichen, eindimensionalen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese<sup>[199]</sup> erfolgt die Trennung unter denaturierenden Bedingungen, wobei das Detergenz SDS unspezifisch mit den Proteinen wechselwirkt und alle nicht kovalenten Wechselwirkungen aufhebt. Die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel hängt dann nur noch vom Molekulargewicht des Proteins und dem Vernetzungsgrad des Gels ab.

Das SDS-Gel setzt sich aus einem Trenn- und Sammelgel zusammen, wobei die Trennung der Proteine nach ihrem spezifischen Molekulargewicht im ersteren geschieht. Das Sammelgel dient hierbei nur zur Fokussierung der Proteine. Zur Herstellung eines Gels (7.5 x 6 cm) wird zuerst das Trenngel aus den entsprechenden Vorratslösungen hergestellt, mit APS und TEMED versetzt und die Lösung zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen. Für die Polymerisation (ca. 30 min.) wird die Lösung mit Isopropanol überschichtet. Danach wird der Alkohol durch Abdekantieren entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen, so dass für die Fokussierung der Proteine eine ca. 1 cm lange Laufstrecke entsteht.

Die Proteinproben wurden mit 4x SDS-Probenpuffer für 5 min. bei 95°C erhitzt, abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 170 Volt in SDS-Gelelektrophoresepuffer (30-45 min.).

<b>Trenngel (12,5 %):</b>	<b>Konzentration</b>
Tris/HCl Lösung, pH 8,8	375 mM
SDS	0,1 % (w/v)
Bis-Acrylamid (30 % (v/v))	12,5 % (v/v)
APS (10 % (w/v))	0,05 % (w/v)
TEMED	0,05 % (w/v)
<b>Sammelgel (4 %):</b>	<b>Konzentration</b>
Tris/HCl Lösung, pH 6,8	125 mM
SDS	0,1 % (w/v)
Bis-Acrylamid (30 % (v/v))	4 % (v/v)
APS (10 % (w/v))	0,05 % (w/v)
TEMED	0,1 % (w/v)
<b>SDS-Gelelektrophoresepuffer, pH 8,9; (10 x):</b>	<b>Konzentration</b>
Tris	250 mM
Glycin	14,4 % (w/v)
SDS	1% (w/v)

**SDS-Probenpuffer, pH 6,8; (4x):**

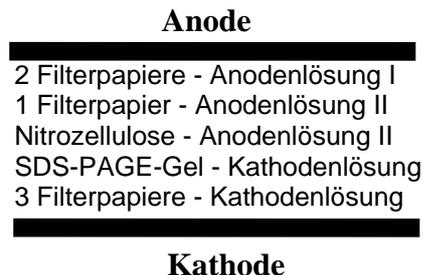
	<b>Konzentration</b>
Tris	33 mM
Glycerin	21 % (v/v)
SDS	4 % (w/v)
DTT	21 % (w/v)
Bromphenolblau	Spatelspitze

mit H<sub>2</sub>O (dest.) lösen und bei -20°C gelagert

**6.1.2 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen**

Zur immunologischen Detektion [6.1.3] der jeweiligen rekombinanten Proteine His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ, -PDZCC, KIAA0403-Konstrukte, His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 und GST-FHL2-Volllängenprotein, der mit Hilfe der Aptamere erhaltenen „Pull-down“-Eluate [6.5.5] und aus der eukaryontischen Zellkultur gewonnenen Zelllysate [6.7.3], wird ein Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen durchgeführt. Der Proteintransfer erfolgte in einer Semi-Dry-Blot Apparatur unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems.

Nach Abtrennung der Proteine im SDS-PAGE [6.1.1] wird das SDS-Polyacrylamidgel, die Nitrozellulosemembran (Protran 0,1 µm) und mehrere Filterpapiere (Whatman, GB005: 1,2mm) im entsprechenden Elektrodenpuffer äquilibriert und nach folgendem Schema zwischen den Elektroden angeordnet:



Der Proteintransfer findet bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> Blotgröße in 60 min. statt. Eine anschließende Blotkontrolle mit Ponceau S-Lösung [6.1.5.3], einer unspezifischen Färbung aller transferierten Proteine, gibt Auskunft über die Effizienz der Übertragung. Zur weiteren immunologischen Detektion wird die Nitrozellulosemembran mit Wasser entfärbt.

**Anodenlösung I, pH 10,5:**

	<b>Konzentration</b>
Tris	300 mM
Methanol	20 % (v/v)

**Anodenlösung II, pH 10,4:**

	<b>Konzentration</b>
Tris	25 mM
Methanol	20 % (v/v)

**Kathodenlösung, pH 7,5:**

	<b>Konzentration</b>
6-Aminohexansäure	40 mM
Methanol	20 % (v/v)

### 6.1.3 Immunologische Detektion von Proteinen

Die immunologische Detektion der zu untersuchten, immobilisierten Proteine erfolgte unter der Verwendung von spezifischen Antikörpern.

#### 6.1.3.1 *Western-Blot*

Die in der Proteintransfermethode [6.1.2] präparierte Nitrozellulose wird zunächst mit einem spezifischen Antikörper (primär) für das zu detektierende Protein inkubiert. Zur Signalverstärkung wird die Nitrozellulose anschließend mit einem weiteren sekundären Antikörper inkubiert, der zuvor mit Meerrettichperoxidase konjugiert wurde. Die Detektion erfolgt durch das Auftreten einer Chemilumineszenzreaktion. Durch die Spaltung eines ECL-Substrats mit Hilfe der konjugierten Peroxidase werden Photonen emittiert, welche zur Belichtung eines lichtempfindlichen Films führen.

Die Nitrozellulosemembran [6.1.2] wird nach erfolgreichem Proteintransfer mit TBS-Puffer abgespült und zur Absättigung freier Bindungsstellen 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C auf einem Tischschüttler bei 60 Upm mit Blockierlösung behandelt. Nach zweimaligen Waschen mit TBST-Puffer (je 10 min.) wird die Membran mit primärem Antikörper (Verdünnung im AKB-Puffer) für 1-2 h auf einem Tischschüttler bei Raumtemperatur inkubiert [5.5]. Anschließend wird die Nitrozellulosemembran zwei Mal mit TBST-Puffer (je 10 min.) gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (Verdünnung im AKB-Puffer) für 1-2 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln weiter inkubiert. Zum Abschluss erfolgt ein dreimaliges Waschen mit TBST-Puffer (je 10 min.).

Die Detektion der Lumineszenz erfolgt durch den Zusatz von 1-2 mL ECL-Reagenzes für 3 min. gemäß den Herstellerangaben. Entsprechend der Lumineszenzintensität wird ein Röntgenfilm für 5 Sekunden bis 1 h exponiert und anschließend entwickelt. Optional wurde die Nitrozellulose direkt elektronisch mittels eines Transiluminators (Bio-Rad) ausgelesen und ausgewertet.

<b>TBS-Puffer, pH 7,4 (10x):</b>	<b>Konzentration</b>
Tris	1 M
NaCl; 55ml HCl konz. auf 1 L Puffer	1,5 M
<b>TBST-Puffer, pH 7,4 (1x):</b>	<b>Konzentration</b>
1x TBS-Puffer	
Tween 20	0,05 % (v/v)
<b>Blockierlösung:</b>	<b>Konzentration</b>
1x TBST-Puffer	
Magermilchpulver	5% (w/v)
<b>AKB-Puffer:</b>	<b>Konzentration</b>
1x TBST-Puffer	
BSA oder Magermilchpulver siehe [5.5]	2-5% (w/v)

### 6.1.3.2 Dot-Blot

Zur Detektion biotinmarkierter Proteine werden diese punktförmig in aufsteigender Konzentration auf eine Nitrozellulosemembran (Protran 0,1  $\mu\text{m}$ ) aufgetragen, wobei zum Vergleich die nicht biotinylierten Proben als negativ Kontrolle dienen. Nach einer Trocknungszeit von ca. 30 min. wird der Dotblot zur Absättigung freier Bindungsstellen 1 h bei Raumtemperatur auf einem Tischschüttler (60 Upm) mit Dot-Blotpuffer behandelt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Puffer (je 10 min.) wird die Membran mit Anti-Biotin-FITC-Konjugat (Verdünnung im Dotblot-Puffer), im Dunkeln für 1 h auf einem Tischschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. [5.5]. Anschließend wird die Nitrozellulosemembran ein Mal mit Dotblot-Puffer und zwei Mal mit PBS-Puffer (je 10 min.) gewaschen. Die Detektion erfolgt mittels des Phosphor/Fluoreszenz-Imagers durch Fluoreszenzanregung bei 473 nm und Messung der Emission im Wellenlängenbereich von 520 nm.

<b>Dot-Blotpuffer:</b>	<b>Konzentration</b>
PBS-Puffer	1x
BSA	10mg/mL

### 6.1.4 „Stripping“ von Nitrozellulosemembranen

Durch das so genannte „*Stripping*“-Verfahren ist es möglich die spezifisch gebundenen Antikörper von der Nitrozellulosemembran zu entfernen. Dadurch kann die Membran zur mehrfachen Detektion mit unterschiedlichen primären Antikörpern verwendet werden.

Membranen mit gebundenen Antikörpern werden nach der Detektion zuerst mit TBST-Puffer gewaschen und anschließend 30 min. bei 50°C im Hybridisierungssofen unter leichtem Schwenken mit „*Stripping*“-Puffer inkubiert. Anschließend wird der Puffer verworfen und die Membran drei Mal mit TBST-Puffer (je 10 min.) gewaschen. Die Membran kann wieder zur weiteren immunologischen Proteindetektion [6.1.3] benutzt werden.

<b>„Stripping“-Puffer, pH 6,7:</b>	<b>Konzentration</b>
Tris	62,5 mM
$\beta$ -Mercaptoethanol	100 mM
SDS	2 % (w/v)

### 6.1.5 Färbung von Proteingelen

Zur Anfärbung der durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese [6.1.1] aufgetrennten Proteine, werden standardmäßig zwei Verfahren angewendet. Zu einem wird die Coomassie-Blau-Färbungsmethode verwendet, mit welcher Proteine quantitativ durch unspezifische Interaktion des Färbemittels bis zu einer Konzentration von 0,3  $\mu\text{g}$  detektiert<sup>[200]</sup> werden können. Zum anderen kommt die Silber-Färbung zum Einsatz. Diese Methode ist ca. 100-fach sensitiver und kann Proteine bis zu 2 ng detektieren, erfolgt jedoch nicht quantitativ<sup>[201]</sup>.

### 6.1.5.1 Coomassie-Färbung (*Brilliant Blau G 250*)

Bei der Coomassie-Blau-Färbemethode werden die SDS-Proteingele 20-30 min. bei Raumtemperatur auf einem Tischschüttler (60 Upm) in Coomassie-Lösung geschwenkt. Anschließend werden diese zur Entfernen der Hintergrundfärbung eine Stunde mit Entfärber-Lösung inkubiert und zwecks Aufbewahrung auf ein angefeuchtetes Whatman-Papier im Geltdrockner (1 h bei 80°C im Vakuum) getrocknet.

<b>Coomassie-Lösung:</b>	<b>Konzentration</b>
Essigsäure	10 % (v/v)
Methanol	40 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blue G250 mit H <sub>2</sub> O (dest.) lösen	16 Pastillen

<b>Entfärber-Lösung:</b>	<b>Konzentration</b>
Essigsäure	10 % (v/v)
Methanol	30 % (v/v)
mit H <sub>2</sub> O (dest.) lösen	

### 6.1.5.2 Silber-Färbung

Bei der Silber-Färbemethode werden die SDS-Proteingele nach einer Abfolge von mehreren Schritten, Tabelle 6.1.1, mit einer Silbernitratlösung inkubiert und anschließend entwickelt. Die Detektionsmethode basiert auf der Reduktion des Silbernitrats zu elementarem Silber, welche nur in den proteinhaltigen Zonen des Gels stattfindet. Die Proteine werden so durch eine rötlich-braune Färbung sichtbar. Die Silber-Färbung wird wie folgt durchgeführt:

<b>Schritt</b>	<b>Dauer [min.]</b>	<b>Puffer/Reagenz/Lösung</b>
1. Fixieren	10	Lösung 1
2. Vernetzen	10	Lösung 2
3. Waschen	20	H <sub>2</sub> O (dest.)
4. Färben	10	Silbernitratthaltige Lösung 3
5. Entwickeln	10	Lösung 4
6. Stoppen	5	5 % (v/v) Essigsäure
7. Waschen	5	H <sub>2</sub> O (dest.)
8. Imprägnieren	5	10 % (v/v) Glycerin

Tabelle 6.1.1 Silber-Färbung von SDS-Proteingelen

Die SDS-Proteingele werden in der oben aufgeführten Reihenfolge in Glasschalen auf einem Tischschüttler mit den jeweiligen Puffern inkubiert und anschließend zur Aufbewahrung wie bei der Coomassie-Blau-Färbung [6.1.5.1] getrocknet.

<b>Lösung 1:</b>	<b>Konzentration</b>
Ethanol	30 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

<b>Lösung 2:</b>	<b>Konzentration</b>
Ethanol	30 % (v/v)
Natriumacetat	0,4 M
Glutaraldehyd	0,5 % (v/v)
Natriumthiosulfat	0,1 % (w/v)

<b>Lösung 3:</b>	<b>Konzentration</b>
Silbernitrat	0,1 % (w/v)
Formaldehyd (36%)	3 $\mu$ M

<b>Lösung 4:</b>	<b>Konzentration</b>
Natriumcarbonat	2,5 % (w/v)
Formaldehyd (36%)	4,8 $\mu$ M

### 6.1.5.3 Ponceau S Färbung

Zur Proteintransferkontrolle der Nitrozellulosemembran [6.1.2] können die Proteine über eine Ponceau S Färbung nachgewiesen werden.

Die Färbung erfolgte durch Inkubation mit Ponceau S Färbelösung für 30 min. bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln.

## 6.1.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

### 6.1.6.1 Photometrische Bestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford<sup>[202]</sup> basiert auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie-Blau an basische und aromatische Aminosäurereste. Hierbei kommt es zur Absorption der gebundenen Farbstoffmoleküle bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 595$  nm, welche stärker als beim freien Farbstoff ist.

Zur Konzentrationsbestimmung kommt das im Handel erhältliche, konzentrierte Bradford-Reagenz zum Einsatz (1:5 Verdünnung mit Wasser). Die Proteinproben unbekannter Konzentration, sowie die BSA-Referenzkonzentrationsreihe (0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25 1,5; 1,75; und 2  $\mu$ g/ $\mu$ L) werden in einer durchsichtigen 96-well Platte mit flachem Boden vorgelegt. Anschließend werden die Proteinlösungen mit 200  $\mu$ L verdünnter Bradford-Lösung versetzt, für 10 sek. gerüttelt und die Absorption bei  $\lambda = 595$  nm gemessen.

Die Konzentrationsbestimmung der unbekanntenen Proteinproben erfolgt durch die Umrechnung der Absorption mittels der zuvor bestimmten BSA-Eichkurve.

### 6.1.6.2 Fluoreszenzbasierende Bestimmung mittels NanoOrange<sup>®</sup>

Im Gegensatz zur Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford<sup>[202]</sup> erfolgt die Quantifizierung der Proteinen nach NanoOrange<sup>®</sup> mit dem gleichnamigen Farbstoff. Die NanoOrange<sup>®</sup>-Färbemethode basiert auf der Verstärkung der Fluoreszenz durch Bindung des Farbstoffes an Proteine (unspezifische Wechselwirkung). Der größte Vorteil dieser Methode

liegt in ihrer Sensitivität und der Unempfindlichkeit gegenüber unterschiedlichen Puffersystemen.

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

## **6.1.7 Umpufferung und Konzentrierung proteinhaltiger Lösungen**

### **6.1.7.1 Dialyse**

Bei der Dialyse handelt es sich um eine schonende Methode zur Veränderung der Pufferbedingungen von Proteinlösungen. Unter der Verwendung von Dialyseschläuchen mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 6-8 kD ist es möglich Puffersalze und niedermolekulare Kontaminationen zu entfernen.

Hierzu wird der entsprechend dem Proteinlösungsvolumen zugeschnittene Dialyseschlauch in einer 5 mM EDTA-Lösung zwei Mal aufgekocht und 15 min. bei Raumtemperatur abgekühlt. Der gequollene Dialyseschlauch wird mit der gewünschten Proteinlösung befüllt, versiegelt und für 15 h oder über Nacht bei 4°C gegen 1 L des Zielpuffers dialysiert. Anschließend wird der Schlauch in 0,5 L frischen Zielpuffer überführt und erneut für 6 h bei 4°C dialysiert.

Nach diesem Verfahren wurden die rekombinant gereinigten Proteine His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ, His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC, His<sub>6</sub>-FHL2 LIM0+1 [6.1.10] für die Aptamere Selektion in den Kopplungspuffer der Selektionsmatrix (cyanogenbromidaktivierte Sepharose) überführt.

Das zur Präzipitation neigende His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 Konstrukt wurde zur Aufbewahrung sofort nach der chromatographischen Reinigung [6.1.11.1] in einen Hochsalzpuffer dialysiert und bei -80°C gelagert.

Der Reinheitsgrad aller Proteine wurde nach der Dialyse erneut auf einem SDS-PAGE analysiert und die Konzentration nach den in [6.1.6] angegebenen Methoden bestimmt werden.

### **6.1.7.2 Gelfiltration**

Nach der affinitätschromatographischen Trennung mussten die rekombinanten Proteine His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ und His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC [6.1.11.1] zur Verbesserung ihres Reinheitsgrades einer Ionenaustauschchromatographie unterzogen werden [6.1.12]. Hierzu musste die Ionenstärke der Proteinlösungen erst einmal für die nachfolgende Proteinreinigung erniedrigt werden. Diese Entsalzung erfolgte unter Verwendung einer Gelfiltrationssäule Econo-Pac P6 (Bio-Rad) an einem FPLC-System. Drei mL Proteinlösung wurden bei einer Flussrate von

1 mL/min. als mobile Phase auf die Säule injiziert, wobei ein Niedrigsalzpuffer als Laufpuffer diente. Der Verlauf des Pufferaustauschprozesses konnte durch Detektion der Leitfähigkeit und der UV-Absorption bei 280 nm verfolgt werden. Vor dem weiteren Reinigungsprozess wurden die Proteine erneut auf einem SDS-PAGE [6.1.1] analysiert.

Für die Entsalzung und Umpufferung der rekombinanten GST-Proteine GST-FHL2 Volllänge in einen zur Selektion geeigneten Phosphat und Lagerpuffer [6.1.11.2] und GST-KIAA0403-Konstrukte in den KIAA0403-Hochsalzpuffer [6.1.11.2], wurden NAP-Säulen (NAP-5, NAP-10 und NAP-25) verwendet. Die Proteinproben wurden auf eine vorher mit Puffer äquilibrierte Säule aufgetragen und anschließend dem entsprechenden Puffer eluiert. Das dabei zum Einsatz kommende Prinzip der Größenausschlussfiltration beruht auf der Tatsache, dass kleine Moleküle (z.B. Salze) länger auf der Säule verbleiben als größere Proteine, welche eine wesentlich kürzere Retentionszeit besitzen. Die Vorgehensweise wird am Beispiel einer NAP-5-Säule kurz erläutert. Die Säule wurde zuerst mit 10 mL des gewünschten Puffers äquilibriert und anschließend die Probe in einem Volumen von insgesamt 500  $\mu$ L aufgetragen. Nach vollständigem Einlaufen der Proteinprobe in die Säule wurde mit 1 mL (NAP-10: 1.5 mL, NAP-25: 3,5 mL) Puffer eluiert.

Für die Entsalzung, Umpufferung und Abtrennung vom Biotinylierungsreagenz wurde bei den biotinylierten rekombinanten Proteinen His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ-, His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1- und GST-FHL2-Volllänge [6.1.8] Micro Biospin<sup>®</sup> 6 Gelfiltrations Säulen (Bio-Rad) verwendet. Hierbei wurden die Säulen (Ausschlussgrenze 6 kD) mit dem entsprechenden SELEX-Puffer vier Mal mit 500  $\mu$ L äquilibriert und anschließend durch zentrifugieren für eine Minute (3100 Upm) vom überschüssigem Puffer befreit. Die Proteinprobe konnte in einem maximalen Volumen von je 10-75  $\mu$ L aufgetragen und durch das sich anschließende zentrifugieren (zwei min. bei 3100 Upm) im neuen Puffer erhalten werden.

### **6.1.7.3 Größenausschluß Zentrifugation**

Zur Aptamers Selektion [6.3], Plasmonresonanzbindungsstudien [6.5.4] und Filterbindungsstudien [6.5.1] mussten die beteiligten Proteine in einer Mindestkonzentration 2,5  $\mu$ M vorliegen. Zur Konzentrierung wurden Filtersysteme der Firma Millipore Centrikon<sup>®</sup> YM-3, YM10 (Volumen 0,1 bis 2,5ml) und Centriplus<sup>®</sup> YM-3, YM10, YM50 (Volumen 2 bis 15ml) verwendet. Durch verschiedene Filter mit einer jeweiligen Ausschlussgrenze von 3, 10 und 50 kD werden mit Hilfe der Zentrifugation (maximale Belastung 5000 x g) größere Proteine aufkonzentriert, wobei kleinere Moleküle die Membran passieren können. Nach einer entsprechenden Zentrifugation für 15 min. bis 3 h bei 4°C konnten die Proteinlösungen in einem deutlich verminderten Volumen gewonnen werden.

### 6.1.8 Biotinylierung von Proteinen

Eine Möglichkeit zur Detektion, Reinigung und Wiedergewinnung von Proteinen besteht in der Markierung mit dem wasserlöslichen Vitamin Biotin. Der Biotin-,tag“ kann in den entsprechenden Versuchen durch eine spezifische Wechselwirkung mit Avidin und Streptavidin nachgewiesen, beziehungsweise an einer Avidin- oder Streptavidinmatrix immobilisiert werden. Zur spezifischen Markierung von primären Aminen wird das Sulfo-NHS-LC-Biotin Reagenz (Pierce) in einem fünffachen Überschuss gegenüber dem zu biotinylierenden Protein eingesetzt. Dabei ist zu beachten dass das Protein möglichst in einem Phosphatpuffer pH 7,4 (1x PBS) vorliegt. Tris-Puffer, Zusätze von BSA, oder ähnlichen Reagenzien, welche zu einer Nebenreaktion bei der Biotinylierung führen könnten, sind zu vermeiden, siehe Abbildung 6.1.1.

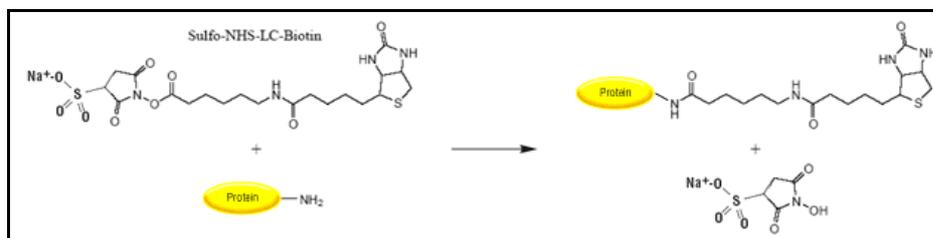


Abbildung 6.1.1: Reaktionsgleichung einer Biotinylierungsreaktion von Proteinen.

Die Biotinylierungsreaktion wird nach folgendem Standardprotokoll durchgeführt:

Die zu biotinylierenden Proteine werden vorerst in einen phosphathaltigen Puffer (1 x PBS) mittels kommerziell erhältlichen Biospin<sup>®</sup> 6 Gelfiltrations Säulen (Bio-Rad) überführt [6.1.7.2]. Diese Methode konnte erfolgreich ohne größeren Proteinverlust für His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ, His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1, GST-FHL2-Volllängeprotein und Lysozym (Kontrollprotein) angewendet werden (Kontrolle mittels SDS-PAGE Analyse [6.1.1]). Die einzige Ausnahme bildete das His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 Protein, welches aufgrund von Präzipitationserscheinungen mit Hilfe der Dialyse in den entsprechenden 1 x PBS-Puffer überführt werden musste [6.1.7.1].

Die frisch hergestellte wässrige Lösung des Sulfo-NHS-LC-Biotin Reagenzes (Pierce; 10 μg/μL; M= 556,59g/mol) wird in einem fünffachen Überschuss zu den jeweilig umgepufferten, mit Eis gekühlten Proteinenlösungen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 25 min. bei 4°C wird das Reaktionsgemisch weitere 25 min. bei Raumtemperatur reagieren lassen. Das Überschüssige Reagenz wird anschließend wieder mit Hilfe der Gelfiltration (Biospin<sup>®</sup> 6 Gelfiltrations Säulen; Bio-Rad) [6.1.7.2], oder im Falle des KIAA0403-ΔN291 mittels Dialyse [6.1.7.1] entfernt.

Zur Kontrolle der Biotinylierungsreaktion wird ein Dot-Blot [6.1.3.2] unter Verwendung eines fluoreszenzmarkierten spezifischen Antikörpers (Anti-Biotin-FITC-Konjugat [5.5]) durchgeführt.

### 6.1.9 Kopplung biotylierter Proteine/RNA an Dynabeads®

Bei den Dynabeads® M-280 (10mg/mL,  $6-7 \times 10^8$  Partikel) handelt es sich um paramagnetische Polystyrenkugeln, welche auf der hydrophoben Oberfläche kovalent gebundenes Streptavidin präsentieren. Durch die sehr starke Wechselwirkung des Biotin-Reagenzes mit dem an der Oberfläche fest verankerten Streptavidin, kommt es zur Kopplung an die Festphase. Aufgrund der magnetischen Eigenschaften des Trägermaterials lässt sich die neu derivatisierte Matrix mit Hilfe eines Magneten bequem vom Puffer trennen und waschen. Diese Materialeigenschaften und einfache Handhabbarkeit stellen ideale Bedingungen zur Abtrennung von biotinylierten Komplexen aus einer Reaktionslösung dar, welche vorzugsweise für die RNA-Selektion [6.3.2] und „Pull-down“-Experimenten [6.5.5] verwendet wurden.

Vor der Kopplungsreaktion müssen die Dynabeads® in den für die Kopplung vorgesehenen Kopplungspuffer überführt werden. Dies geschieht mit Hilfe eines eigens für diese Anwendungen konzipierten Magneten. Die Matrix wird fünf Mal mit einer ihres Volumens entsprechende Menge PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit dem Kopplungspuffer äquilibriert (zwei Mal). Die vorgesehene Menge der zu koppelnden Proteine [6.3.2, Anhang 9.3.3, 9.3.4, 9.3.6] oder biotinylierter RNA [6.5.5] wird mit Dynabeads® versehen und je nach Anforderung fünf (Aptamerselektion in Lösung von His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ, His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1, GST-FHL2) bzw. 30 min. im Überkopfschüttler bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die Aptamerselektion [6.3.2, Anhang 9.3.3, 9.3.4, 9.3.6] und die „Pull-down“-Experimente werden die erfolgreich gekoppelten Proteine/Aptamere von den ungebundenen Spezies durch zweimaliges Waschen mit den entsprechenden Kopplungspuffer entfernt und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Für den immunologischen Kopplungsnachweis der Proteine wird anschließend eine kompetitive Elution mit 40µL derivatisierten Dynabeads® (0,1µg/µL Protein/Dynabeads®) mit freiem Biotin (50 facher Überschuss) und 10µL SDS-Ladepuffer (4 x) [6.1.1] durchgeführt. Die Probenlösung wird 7 min. bei 95°C erhitzt, kurz zentrifugiert und der Überstand auf ein denaturierendes SDS-PAGE aufgetragen. Der Nachweis erfolgte mittels Western-Blotanalyse [6.1.3.1] und einem Streptavidin-HRP-Antikörperkonjugats zur direkten Detektion.

#### Kopplungspuffer, pH7,4 :

#### Konzentration

PBS	1 x
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	1,5 - 3 mM
BSA	1 µg/µL
DTT	1 - 5 mM

### 6.1.10 Proteinkopplung an Sepharose

Zur Aptamerselektion [6.3.1] müssen die unter 6.1.11.1 affinitätschromatographisch gereinigten rekombinanten Proteine an einer Trägermatrix immobilisiert werden. Zu diesem Zweck wurde cyanbromidaktivierte Sepharose 4B (Amersham Bioscience) herangezogen und

mit den entsprechenden Proteinen derivatisiert. Die Kopplungsreaktion zwischen der primären Aminofunktion und den Hydroxylgruppen der Sepharose erfolgt durch die Aktivierung mit Cyanbromid zum Isoharnstoff, siehe auch Abbildung 6.1.2.

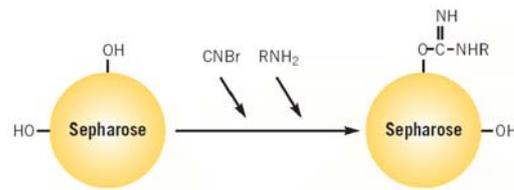


Abbildung 6.1.2: Kopplungsreaktion der primären Amine an die Trägermatrix Sepharose

Zur Herstellung folgender Matrices, wurden die entsprechenden Mengen der gefriergetrockneten Sepharose eingewogen und in 1 mM HCl-Lösung aufgequollen, Tabelle 6.1.2.

	His <sub>6</sub> -CYTIP-PDZCC	His <sub>6</sub> -CYTIP-PDZ	His <sub>6</sub> -FHL2-LIM0+1
CNBr-aktivierte Sepharose [g]	0,429	1	0,771
Sepharose Volumen SV [mL]	1,5	3,5	2,7
1 mM HCl-Lösung [mL]	3,43	8,00	6,17
Proteinkonzentration [µM]	11	54	30

Tabelle 6.1.2: Verwendete Sepharosemenge und Volumina für die Proteinkopplung von .

Die aufgeschlemmte Sepharose wurde in Polyprepinweg Säulen (Bio-Rad) überführt und anschließend (200 mL pro g Sepharose) in mehreren Durchgängen mit 1 mM HCl-Lösung gewaschen. Dieser Schritt diente zur Aktivierung und Reinigung von Herstellungsrückständen der Sepharose. Anschließend wurde die Sepharose auf den Kopplungspuffer mit fünf Säulenvolumen (SV) äquilibriert. Durch einen zusätzlichen Prähydrolyseschritt mit dem Kopplungspuffer (3 h Inkubation bei 4°C im Überkopfschüttler) wurde die Anzahl der kopplungsfähigen Gruppen reduziert. Dies führte zu einer homogeneren Kopplung der Proteine. Nach der Prähydrolyse wurde die Matrix zwei min. bei 300 Upm zentrifugiert, der Überstand verworfen und anschließend mit den umgepufferten Proteinenlösungen [6.1.7.1] für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die derivatisierte Matrix mit 5 SV Kopplungspuffer gewaschen. Zur Absättigung der nicht reagierten, aktivierten Hydroxygruppen wurde die Sepharose im Fall von His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC mit einer 1 M Glycinlösung oder bei His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ und His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 mit einem 0,1 M Tris-Puffer, pH 8 für 2 h ruhend bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen mit jeweils abwechselnd fünf SV Waschpuffer I und Waschpuffer II (zwei Mal). Abschließend wurden die derivatisierten Matrices mit zehn SV 1 x PBS-Puffer gewaschen, in einem SV 1 x PBS resuspendiert und bei 4°C gelagert. Zur Detektion der Kopplungseffizienz wurden nach den Kopplungs- bzw. Waschschritten Proben zur späteren SDS-PAGE Kontrolle entnommen [6.1.1].

## 6.1.11 Allgemeine chromatographische Methoden zur Proteinreinigung

### 6.1.11.1 Affinitätschromatographie über immobilisierte Metallionen

Die Reinigung von rekombinanten Proteinen aus *E.coli*-Organismen wird meist mit Hilfe so genannter „tags“, kleinen Peptiden (Hexahistidin [His<sub>6</sub>]<sup>[203]</sup> oder FLAG-Fusionspeptid [DYKDDDDK]<sup>[204]</sup>) oder ganzen Proteinen (Glutathion-S-transferase GST<sup>[205]</sup>, Maltosebindeprotein) durchgeführt. Durch eine hochaffine spezifische Bindung der „tags“ an ein Trägermaterial können die Proteine aus dem Bakterienlysat affinitätschromatographisch gereinigt werden.

Nach Expression der rekombinanten Proteine His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ, His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC, His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 und His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 [6.6.7.1, 6.6.7.2, 6.6.7.4] wurde die Proteinreinigung mit Hilfe des His<sub>6</sub>-Fusionspeptids (0,84 kD) ermöglicht. Gute Proteinausbeuten und Reinheit konnte durch die spezifische Wechselwirkung des His<sub>6</sub>-Fusionspeptids mit Nickelkationen auf einer *Nitrilotriaceticacid* (NTA)-Agarose Matrix erzielt werden, Abbildung 6.1.3. Die Proteine konnten nach Abtrennung aller Kontaminationen spezifisch mit Imidazol eluiert werden.



Abbildung 6.1.3: Aufbau der *Nitrilotriaceticacid* (NTA)-Agarose Matrix (Qiagen).

Für die affinitätschromatographische Reinigung von His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ, His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC und His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 wurden die Lysate direkt an die kommerziell erhältlichen HiTrap Chelating-Fertigsäule 1 mL mittels des ÄKTA-FPLC Systems immobilisiert (max. 0,5 mL/min., 40 mL Lysat). Diese mussten im Vorhinein mit Nickelkationen beladen werden. Nach der vollständigen Immobilisierung der rekombinanten Proteine konnten die Abtrennung der *E.coli*-Kontaminationen durch Waschen mit einem zwanzigfachen des Säulenvolumens erzielt werden (1 mL/min.). Durch den Zusatz von 20-40 mM Imidazol im Waschpuffer wurde der Proteinreinheitsgrad um ca. 10 % gesteigert. Die Elution erfolgte mit 250 mM Imidazol im Elutionspuffer bei einer Flussrate von 1 mL/min. Zur Vermeidung von Proteindegradierung, wurden dem Elutionspuffer unmittelbar vor der Verwendung Proteaseinhibitoren PMSF, Leupeptin, Aprotinin und Benzamidin zugesetzt. Hierbei musste das His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 direkt nach der affinitätschromatographischen Trennung aufgrund der starken Präzipitationstendenz in einen Niedersalzpuffer dialysiert [6.1.7.1] werden.

Das rekombinante His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291-Proteinen wurde nach der entsprechenden Expression und Lyse [6.6.7.2] durch den Zusatz von 20 mM Imidazol und 2 mL Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose (äquilibriert mit Lysispuffer) gereinigt. Nach Inkubation für 12 h bei 4 C im Überkopfschüttler erfolgte die Trennung des Zielproteins im Batch-Verfahren

(Polyprepinweg-Bio-Rad Säulen). Die Kontaminationen konnten durch Waschen mit Waschpuffer (20 SV) abgetrennt werden, wobei die Elution mit 250 mM Imidazol (7 SV) erfolgte. Das Protein wurde aufgrund einer erhöhten Präzipitationsgefahr nach der affinitätschromatographischen Trennung mittels NAP-Gelfiltrationssäulen [6.1.7.2] umgehend in den KIAA0403-Hepespuffer überführt.

#### **His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ/ -PDZCC, His<sub>6</sub>-FHL2 LIM0+1**

<b>Wasch-/Elutionspuffer, pH 8:</b>	<b>Konzentration</b>
Tris	100 mM
NaCl	300 M
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	3 mM
Imidazol (His <sub>6</sub> -CYTIP-PDZ)	40 mM
Imidazol (His <sub>6</sub> -CYTIP-PDZCC)	20 mM
Imidazol (His <sub>6</sub> -FHL2-LIM0+1)	40 mM
DTT	1 mM
Glycerin	10 % (v/v)
Imidazol zur Elution	230 mM
PMSF	0,1 M
Aprotinin	0,5 µg/mL
Leupeptin	1 µg/mL
Benzamidin	Spatelspitze

#### **His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 Niedrigsalz-Puffer, pH 8,5: Konzentration**

Tris	50 mM
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	3 mM
DTT	5 mM
Glycerin	10 % (v/v)

<b>His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 Wasch-/Elutionspuffer, pH 7,4:</b>	<b>Konzentration</b>
Hepes/KOH	25 mM
KCL	1 M
Imidazol	20 mM
DTT	1 mM
Glycerin	10 % (v/v)
Imidazol zur Elution	230 mM

<b>His<sub>6</sub>-KIAA0403-Hepespuffer, pH 7,4:</b>	<b>Konzentration</b>
Hepes/KOH	25 mM
KCL	1 M
DTT	1 mM
Glycerol	10 % (v/v)

#### **6.1.11.2 Affinitätschromatographie der GST-Fusionsproteine**

Ein weiteres sehr gut etabliertes System zur affinitätschromatographischen Reinigung ist die Fusion des zu exprimierten Proteins an den C-Terminus der Glutathion S-transferase. Dieses Enzym, ein 26 kD schweres zytosolisches Protein aus dem parasitären Darmwurm

*Schistosoma japonicum*, zeigt eine besonders hohe Affinität zu Glutathion. Diese Eigenschaft wird in der affinitätschromatographischen Reinigung ausgenutzt<sup>[205]</sup>. Hierbei verwendet man eine Glutathionderivatisierte Sepharose, welche direkt mit dem Lysat inkubiert wird, in mehreren Waschfolgen von den Kontaminationen befreit und anschließend mit einer hohen Konzentration an freien nicht reduzierten Glutathion, kompetitiv eluiert wird, Abbildung 6.1.4.

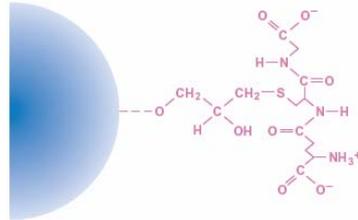


Abbildung 6.1.4: Darstellung des kovalenten gekoppelten Glutathions an die Sepharose (blaue Kugel). Die Kopplungsreaktion erfolgt über eine intermediäre Epoxidaktivierung.

Die optimierten Proteinreinigungen der GST-Fusionsproteine GST-KIAA0403 (-Volllänge, -ΔN291 und -ΔC125) und GST-FHL2-Volllänge erfolgten nach folgendem Protokoll bei 4°C.

Die zur Reinigung verwendeten Bakterienlysate wurden nach [6.6.7.3] und [6.6.7.5] hergestellt. Hierbei wurden die GST-KIAA-Fusionsproteine aus 20 mL Lysat [6.6.7.3] bzw. das GST-FHL2-Volllänge Proteins aus 10 mL Lysat [6.6.7.5] mit 250 µL (1 SV) Glutathion Sepharose™ 4B (333 µL einer 75 % Festphasenmischung) gereinigt. Die Glutathion Sepharose™ 4B wurde zuvor vier Mal mit den entsprechenden Puffern (KIAA0403-LB-Puffer oder FHL2-LB-Puffer [3 SV]) äquilibriert und drei min. bei 1000 Upm pelletiert. Zur Bindung der GST-Fusionsproteine aus dem Lysat an die Sepharose wurden die Lysatgemische über Nacht bei 4° im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden das Sepharose-Lysatgemisch in Polyprepereinweg-Bio-Rad Säulen transferiert und anschließend vier Mal mit je zwei SV der entsprechenden Lysispuffer und zehn Mal mit je zwei SV Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte in drei aufeinander folgenden Schritten. Zuerst wird die Sepharose zwei Mal mit Elutionspuffer (2 SV) in steigender Glutathionkonzentration (5 mM, 50 mM und 100 mM) versetzt und je 15 min. bei Raumtemperatur im Thermoschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Elutionen nach einer SDS-PAGE-Analyse [6.1.1] vereinigt, über Centrikons® konzentriert [6.1.7.3] und mittels NAP-Säulen [6.1.7.2] in den entsprechenden KIAA0403-Hepespuffer/FHL2-Phosphatpuffer überführt.

<b>GST-KIAA0403-Volllänge Waschpuffer, pH 7,4:</b>	<b>Konzentration</b>
PBS	1x
<b>GST-KIAA0403-Volllänge Elutionspuffer, pH 8:</b>	<b>Konzentration</b>
Tris	100mM
NaCl	500 mM
DTT	1 mM
Triton X-100	0,1 % (v/v)
Zusatz von reduziertem Glutathion	5, 50 und 100mM

**GST-KIAA0403- $\Delta$ N291 und - $\Delta$ C125 Waschpuffer, pH 7,4: Konzentration**

Hepes/KOH	25mM
KCl	1 M
DTT	1 mM
Glycerol	10 % (v/v)

**GST-KIAA0403- $\Delta$ N291 und - $\Delta$ C125 Elutionspuffer, pH 8: Konzentration**

Hepes/KOH	25mM
KCl	1 M
DTT	1 mM
Glycerol	10 % (v/v)

Zusatz von reduziertem Glutathion	5, 50 und 100mM
-----------------------------------	-----------------

**KIAA0403-Hepespuffer, pH 7,4: Konzentration**

Hepes/KOH	25mM
KCL	1 M
DTT	1 mM
Glycerol	10 % (v/v)

**FHL2-Waschpuffer, pH 7,4: Konzentration**

PBS	1x
ZnSO <sub>4</sub>	0,05 mM
NaCl	200 mM

**FHL2-Elutionspuffer, pH 8: Konzentration**

Tris	100mM
ZnSO <sub>4</sub>	0,05 mM
NaCl	500 mM
DTT	5 mM
Triton X-100	0,1 % (v/v)

Zusatz von reduziertem Glutathion	5, 50 und 100mM
-----------------------------------	-----------------

**FHL2-Phosphatpuffer, pH 7,4: Konzentration**

Phosphatpuffer [5.4.2]	11,11 mM
ZnSO <sub>4</sub>	0,05 mM
DTT	5 mM
Glycerol	10 % (v/v)

**6.1.12 Ionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose**

Die Ionenaustauschchromatographie basiert auf der reversiblen Adsorption von geladenen Molekülen an entgegengesetzt geladenen Gruppen einer stationären Phase. Die elektrostatischen Wechselwirkungen sind abhängig vom herrschenden pH-Wert und dem isoelektrischen Punkt (pI) des Proteins. Die Proteine werden daher gemäß ihrer unterschiedlichen pIs verschieden stark auf dem Material retardiert. Zur Auftrennung wurde ein Gradient zunehmender Ionenstärke eingesetzt.

Die in der vorliegenden Arbeit für die *in vitro* Selektion [6.3, 6.3.1] verwendeten Proteine His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ, His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC wurden nach der affinitätschromatographischen

Reinigung [6.1.11.1] zur Verbesserung des Proteinreinheitsgrades eines weiteres Reinigungsschrittes der Anionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose) unterzogen. Hierfür mussten die Proteinlösungen vorerst aus dem Elutionspuffer mittels der Econo-Pac P6 Gelfiltrations säule in einen Niedrigsalzpuffer (Q-Puffer) überführt werden [6.1.7.2]. Nach Injektion der Proteine auf eine BioScaleQ-Anionenaustauschersäule erfolgte die Trennung in einem Stufengradienten von 0-1 M Natriumchlorid bei einer Flussrate von 2 mL/min. Zu Beginn wurde mit 15 mL Startpuffer gewaschen und anschließend die Natriumchloridkonzentration über ein Volumen von 90 mL kontinuierlich auf eine Endkonzentration von 1 M gesteigert. Die entsprechenden Elutionsfraktionen wurden nach der Trennung mit 10 % (v/v) Glycerin versetzt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

<b>Q-Puffer, pH 8:</b>	<b>Konzentration</b>
Tris	50 mM
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	3 mM
DTT	1 mM
[Natriumchlorid	1 M]

## 6.2 Molekularbiologische Methoden

### 6.2.1 Allgemeine Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren

Alle Puffer und Lösungen für RNA-Arbeiten wurden mit H<sub>2</sub>O (bidest.) angesetzt, welches zuvor mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt worden ist. Hierzu wurde ein Liter H<sub>2</sub>O (bidest.) mit 2 mL DEPC versetzt und nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur für eine Stunde bei 120°C autoklaviert.

#### 6.2.1.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus nukleinsäurehaltigen Lösungen, wird diese mit einem Volumen Tris-gepuffertem Phenol versetzt, gut durchmischt (Vortexer) und 1 min. bei 14.000 Upm zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wird abgenommen, mit zwei Volumen Chloroform versetzt und erneut durchmischt und zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wird abermals abgenommen und die Nukleinsäuren mit Ethanol gefällt.

#### 6.2.1.2 Ethanolpräzipitation

In der zu fällenden Nukleinsäurelösung wird eine Natriumacetatkonzentration von 300 mM eingestellt. Anschließend wird das dreifache Volumen Ethanol zugegeben, die Lösung 5 min. bei -80°C abgekühlt und bei 14.000 Upm für weitere 20 min. (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Danach wird das Präzipitat durch die Zugabe von 100 µL 70% Ethanol gewaschen und erneut für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und der Niederschlags kurz für mindestens 2 min. an der Luft getrocknet. Das Präzipitat wird je nach Bedarf in einem geeigneten Volumen Wasser gelöst. Zur Fällung kleiner Nukleinsäuremengen wird vor der Ethanolzugabe die Lösung mit Glycogen versetzt.

### 6.2.1.3 Ammoniumacetatpräzipitation von RNA

In der zu fällenden Nukleinsäurelösung wurde eine Ammoniumacetatkonzentration von 600 mM eingestellt. Anschließend wird das dreifache Volumen Ethanol zugegeben und 10 min. bei 14.000Upm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Danach wird das Präzipitat durch die Zugabe von 100 µL 70% Ethanol gewaschen und erneut für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und der Niederschlags kurz für mindestens 2 min. an der Luft getrocknet. Das Präzipitat wird je nach Bedarf in einem geeigneten Volumen Wasser gelöst und zur PAGE-Gelreinigung mit PAGE-Ladepuffer versetzt [6.2.1.6].

### 6.2.1.4 Quantitative Nukleinsäurebestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen erfolgte durch photometrische Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $OD_{260}$ ). Für Nukleinsäuren unbekannter Sequenz bzw. für komplexe Gemische wird die in Tabelle 6.2.1 dargestellten empirischen Werte ( $f$ ), bezogen auf  $OD_{260} = 1$ , verwendet.

Nukleinsäure	Wert
doppelsträngige DNA	50 µg/mL
einzelsträngige DNA	40 µg/mL
einzelsträngige RNA	33 µg/mL

Tabelle 6.2.1: Konzentrationen von Nukleinsäuren bei einem  $OD_{260} = 1$

Als durchschnittliches Molekulargewicht eines Nukleotids werden 330 g/mol für DNA und 345 g/mol für RNA angenommen. Die Berechnung erfolgt nach:

$$c = \frac{f \times A \times OD_1}{n \times M_r} \quad [mM]$$

$f$	=	Verdünnungsfaktor
$A$	=	gemessener Absorptionswert
$OD_1$	=	Konzentration bei theoretischer OD von 1
$n$	=	Anzahl der Basen
$M_r$	=	durchschnittliches Molekulargewicht

Für kürzere Oligodesoxyribonukleotide mit bekannter Basensequenz werden die Konzentrationen aus der Summe der molaren Absorptionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) der einzelnen Basen berechnet. Dazu werden folgende Werte aus Tabelle 6.2.1.2 verwendet:

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

Tabelle 6.2.2: Molare Absorptionskoeffizienten der Nukleotidbasen.

Die Konzentration wird entsprechend nach folgender Gleichung berechnet:

$$c = \frac{OD_{260} \cdot f}{\sum \varepsilon \cdot d} \quad [\text{mM}] \quad \begin{array}{l} d = \text{Länge der Messstrecke [cm]} \\ \varepsilon = \text{molarer Absorptionskoeffizient [mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] \end{array}$$

Proteine und Phenol besitzen bei 280 nm ein Absorptionsmaximum. Der Quotient aus  $OD_{260}$  und  $OD_{280}$  gibt Aufschluss über die Reinheit einer Nukleinsäure-Präparation. Bei reinen Nukleinsäurelösungen liegt dieser Wert ca. bei 1,8 - 2; niedrigere Werte sind ein Hinweis auf Verunreinigung durch Proteine oder Phenol.

### 6.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zu analytischen Zwecken erfolgte die Auftrennung von DNA- und RNA-Molekülen in nicht-denaturierenden Agarosegelen<sup>[206]</sup>. Abhängig von der Größe der Oligonukleotide werden Gele mit 0,7 – 2,5 Gewichtsprozent Agarose hergestellt. Dazu wird die entsprechende Menge Agarose eingewogen und in 0,5 x TBE im Mikrowellenherd erwärmt. Pro 10 mL Lösung wird 1 µL Ethidiumbromidlösung (0,1 %) hinzugegeben und die noch warme Lösung blasenfrei in die vorbereitete Gelkammer bis zur Schichtdicke von 0,5 cm gegossen. Anschließend werden die entsprechenden Kämme für die Geltaschen eingesetzt. Nach erfolgtem Erstarren des Agarosegels werden die mit einem halben Volumen Auftragspuffer versetzten Nukleinsäureproben auf das Gel aufgetragen und die Moleküle bei einer Spannung von 6 – 8 V/cm getrennt. Als Längenstandard diente eine 100 bp- oder 10.000 bp-DNA-Leiter [5.2.1].

Aufgrund der Interkalation des Farbstoffs Ethidiumbromid in die Nukleinsäuremoleküle, konnten diese als fluoreszierende Banden mit einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 366 nm sichtbar gemacht und anschließend fotografiert werden.

Agarosegel-Beladungspuffer 6x	Konzentration
Glycerin	50% (v/v)
Tris/HCl pH 8,0	50 mM
EDTA pH 8,0	50 mM

### 6.2.1.6 Polyacrylamidgelelektrophorese

Die präparative Reinigung der transkribierten RNA [6.2.2.2] erfolgte durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese. Je nach Länge der zu trennenden Nukleinsäuremoleküle wurden 8-10%ige Gele mit einer Gelstärke von 1-1,5 mm und einer Trennstrecke von 15-50 cm hergestellt. Hierzu wurden denat. PAGE-Gelpuffer, Acrylamid 25 % (19:1) in 8,3 M Harnstoff und 8,3 M Harnstofflösung in den entsprechenden Verhältnissen vermischt. Die radikalische Polymerisation wurde durch Zugabe von 800 µL 10 % (w/v) APS-Stammlösung und 40 µL TEMED pro 100 mL Gellösung gestartet, wobei die Lösung sofort zwischen die Gelplatten gegossen und der Probenkamm eingesetzt wird. Nach einer 45-minütigen Polymerisation wurde der Probenkamm entfernt, die Probenaschen mit Wasser ausgespült, das Gel in die vertikale Gelapparatur eingesetzt und der Laufpuffer (1 x TBE) eingefüllt. Zur Equilibrierung der Ladungsträger wurde ein 15-minütiger Vorlauf bei 370 Volt (20 cm

Laufstrecke) durchgeführt und die Taschen mit Laufpuffer gründlich gespült. Zu den mit Ammoniumacetat gefällten Nukleinsäureproben [6.2.1.3] wurde ein halbes Volumen denat. PAGE-Auftragspuffer zugegeben, die Nukleinsäuren eine Minute bei 95°C denaturiert und sofort auf das Gel aufgetragen. Als grobe Längenmarker dienten die beiden Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol, die bei einer definierten Gelkonzentration ein konstantes Laufverhalten zeigen. Für die Trennung wurde die Spannung so reguliert, dass eine Geltemperatur von 45°C nicht überschritten wurde.

<b>Gel-Stocklösung - Konzentrat:</b>	Acrylamid	25 % (w/v),
	Bis-Acrylamid	2 % (w/v)
	Harnstoff	8,3 M
<b>Gel-Stammlösung - Verdüner:</b>	Harnstoff	8,3 M
<b>Gel-Stammlösung -10x Puffer:</b>	Harnstoff in 10x TBE	8,3 M

**Lösung B:** 10x TBE, 8.3M Harnstoff

**Lösung C:** 25% Acrylamid, 2% N,N'-Methylenbisacrylamid, 8,3M Harnstoff

**Lösung D:** 8,3 M Harnstoff

<b>Denat. PAGE-Auftragspuffer:</b>	<b>Konzentration</b>
Harnstoff	9 M
EDTA pH 8,0	50 mM
Bromphenolblau	Spatelspitze
Xylencyanol	Spatelspitze

### 6.2.1.7 Isolierung von Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen

Nach erfolgter Elektrophorese wird das Gel von den Trennscheiben abgelöst und beidseitig in Klarsichtfolie eingeschlagen. Die Detektion der RNA erfolgt auf einer Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator und UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm. Die entsprechend zu isolierende Bande kann anschließend mit einer sterilen Skalpellklinge ausgeschnitten werden. Radioaktiv markierte Nukleinsäuren werden durch kurze Exposition auf einem Röntgenfilm detektiert. Nach Entwicklung des Röntgenfilms wird dieser mit Hilfe eines Autorad-Markers passgenau unter das Gel gelegt, die gewünschte Bande ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Das Gelstückchen wird mit Hilfe einer Pipettenspitze zerkleinert und zwecks passiver Elution mit etwa 500µl 0,3 M Natriumacetatlösung versetzt. Nach 90 min. unter starkem Schütteln bei 65°C wird die Suspension über eine mit silanisierter Glaswolle gestopfte Spritzen abfiltriert. Anschließend können die Nukleinsäuren wie unter 6.2.1.2 beschrieben mit Ethanol gefällt werden.

### 6.2.1.8 MicroSpin™ G-25

Zur Entfernung nicht inkorporierter Nukleotide bzw. zur Entsalzung von Nukleinsäurelösungen wurden bei Volumina bis 50 µL MicroSpin™ G-25 Säulen, wie vom Hersteller beschrieben, verwendet.

## 6.2.2 Enzymatische Methoden

### 6.2.2.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Darstellung von doppelsträngigen DNA-Oligonukleotiden wurden die entsprechenden DNA-Template durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert. Die PCR-Reaktion führt zu einer exponentieller Vermehrung eines DNA-Templates zwischen zwei an den komplementären Strängen hybridisierenden Oligodesoxyribonukleotiden (Primer) [207-209]. Die Primer [5.7.3] wurden dabei mit Hilfe des Programms Oligo Calculator 3.02<sup>[210]</sup> so gewählt, dass sie ähnliche Schmelztemperaturen aufwiesen und keine Möglichkeit zur Bildung von Dimeren oder stabilen sekundären Faltungsmotiven vorhanden war. Die Amplifikation von einzelsträngigen oder doppelsträngigen DNA-Templaten erfolgte in Ansätzen von 100 µL bis maximal 200 µL in einem PCR-Thermocycler.

Ein typischer PCR-Ansatz mit *Taq* DNA-Polymerase enthielt 1x *Taq* PCR Puffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM Primer, 200 µM dNTPs, 1-10 nM DNA-Templat, 0,025 U/µL *Taq* DNA-Polymerase.

#### 1x *Taq* PCR Puffer, pH9:

	Konzentration
Tris-HCl	10 mM
KCl	50 mM
Triton® X-100	0,1 % (v/v)

Bei einem typischen PCR-Ansatz mit der *Pfu* DNA-Polymerase, wurden folgende Komponenten zusammengegeben: 1x *Pfu* PCR Puffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM Primer, 250 µM dNTPs, 1-10 nM DNA-Templat, 0,05 U/µL *Pfu* DNA-Polymerase.

#### 1x *Pfu* PCR Puffer, pH 8,8:

	Konzentration
Tris-HCl	20 mM
KCl	10 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 mM
Triton® X-100	0,1 % (v/v)
BSA nukleasefrei	0,1 mg/mL

Zur standardmäßigen PCR-Amplifikation wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

Schritt	Dauer	Temperatur
Denaturierung	50 s	94°C
Primer-Annealing	60 s	55°C
Polymerase-Reaktion	60 s	72°C
Heizdeckeltemperatur		110°C

Ein Ansatz ohne DNA-Templat diente als Negativkontrolle auf unspezifische Amplifikation oder Kontamination mit Fremd-DNA. Zur Überprüfung der Reaktion wurde nach verschiedenen Zyklen und am Ende der Reaktion ein 5 µL Aliquot des Ansatzes entnommen, mit 5 µL Agarose-Ladepuffer versetzt und auf ein Agarosegel [6.2.1.5] aufgetragen. Anschließend erfolgte eine Phenol- und Chloroformextraktion [6.2.1.1], um das zugesetzte

Enzym abzutrennen. Im weiterführenden Schritt wurde die dsDNA durch Ethanol-Präzipitation [6.2.1.2] gefällt und in einem entsprechenden Volumen aufgenommen. Zur Aptamers Selektion wurde die dsDNA aus der PCR-Reaktion direkt in die Transkription überführt [6.2.2.3, 6.2.2.4].

### 6.2.2.2 Standard *in vitro* Transkription (TK)

Zur Darstellung der benötigten RNA für die Aptamers Selektion [6.3.1] und entsprechende Filterbindungs- [6.5.1] und Pulldown-Experimente [6.5.5] wurde die DNA-abhängige RNA-Polymerase des T7-Bakteriophagen verwendet. Dazu wurde die dsDNA, welche einen T7-Promoter enthielt, mit der T7-RNA-Polymerase inkubiert.

Ein typischer Transkriptionsansatz enthielten 1x T7-Transkriptionspuffer, 2,5 mM NTPs, 4 U/mL IPP, 0,5 U/μL RNasin, 1-3 μM DNA-Templat, 0,25 U/μL T7-RNA-Polymerase (Stratagen, AK Famulok). Zur radioaktiver Markierung der synthetisierten RNA enthielten die Ansätze zusätzlich 0,01 μCi/μL (3,3 nM) α-[<sup>32</sup>P]-GTP. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 4 h oder über Nacht. Die Transkriptionsprodukte wurden anschließend mit Ammoniumacetat [6.2.1.3] gefällt, zum Abbau des DNA-Templats mit DNaseI [6.2.2.7] verdaut und über ein denaturierendes Polyacrylamidgel [6.2.1.6] gereinigt.

#### T7-Transkriptionspuffer (1x), pH8:

#### Konzentration

Tris-HCl	40 mM
NaCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	8 mM
DTT	20 mM
Spermidin	2 mM

### 6.2.2.3 *In vitro* Transkription 1

Die *in vitro* RNA-Herstellung für die Aptamers Selektion gegen His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ und His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 [6.3.2, Anhang 9.3.3, 9.3.6] und die entsprechende Filterbindungscharakterisierung [6.5.1] wurde genauso wie die unter 6.2.2.2 beschriebene TK mit Hilfe der DNA-abhängige RNA-Polymerase des T7-Bakteriophagen durchgeführt. Dazu wurden 10 μL aus einer 100 μL RT-PCR-Reaktion (typischerweise 1 μM dsDNA mit einem T7-Promoter) [6.2.2.9] mit 87 μL eines TK-Puffers und 3 μL einer T7-RNA-Polymerase/RNasin Enzym-Mix inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C je nach dsDNA-Bibliothek für 15 bis 40 min. Die Transkriptionsprodukte wurden ohne weitere Reinigung in der Aptamers Selektion verwendet.

#### TK-Puffer (1x), pH8:

#### Konzentration

Tris-HCl	40 mM
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	15 mM
DTT	5 mM
NTPs	2,5 mM

<b>T7-RNA-Polymerase/RNasin Enzym-Mix:</b>	<b>Konzentration</b>
T7-RNA-Polymerase 25 U/ $\mu$ L Stratagene	0,5 U/ $\mu$ L
RNasin 40 U/ $\mu$ L	0,4 U/ $\mu$ L

#### 6.2.2.4 *In vitro* Transkription 2

Bei der *in vitro* RNA-Herstellung für die Aptamersélection gegen His<sub>6</sub>-KIAA0403- $\Delta$ N291 und GST-FHL2-Volllänge [6.3.2, Anhang 9.3.4 9.3.7] und die entsprechende Filterbindungs-Assays [6.5.1] wurde entsprechend nach dem Protokoll der *in vitro* Transkription 1 [6.2.2.3] vorgegangen mit Ausnahme des Transkriptionspuffers.

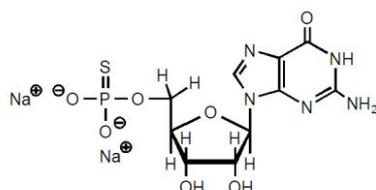
<b>TK-Puffer (1x), pH 8:</b>	<b>Konzentration</b>
Phosphatpuffer [5.4.2]	10 mM
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	15 mM
DTT	5 mM
NTPs	2,5 mM

#### 6.2.2.5 *In vitro* GMPS-Transkription

Zur späteren RNA-Biotinylierung [6.2.2.6] musste diese vorerst mit Hilfe der DNA-abhängigen T7-RNA-Polymerase und einem Zusatz von Guanosine-5'-thiophosphat-Dinatriumsalz GMPS (EMP Biotech GmbH) hergestellt werden, siehe Abbildung 6.2.1. Die Inkubation der dsDNA (integrierter T7-Promotor) mit der T7-RNA-Polymerase und GMPS-Reagenzes erfolgte bei 37°C für 4 h oder über Nacht.

Ein typischer GMPS-Transkriptionsansatz enthielt 1x TK-Puffer, 2,5 mM NTPs, 0,4 U/ $\mu$ L RNasin, 10  $\mu$ M DNA-Templat, 2,5 U/ $\mu$ L T7-RNA-Polymerase (AK Famulok) und 10 mM einer wässrigen GMPS-Lösung in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu$ L. Die Transkriptionsprodukte wurden anschließend einer Phenol-Chloroform-Extraktion [6.2.1.1] unterzogen, mit Ethanol [6.2.1.2] gefällt und über eine G-25-Gelfiltration [6.2.1.8] vom überschüssigen GMPS befreit. Anschließend wurde der gesamte Ansatz in die Biotinylierungsreaktion eingesetzt.

<b>TK-Puffer (1x), pH8:</b>	<b>Konzentration</b>
Tris-HCl	40 mM
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	25 mM
DTT	10 mM
NTPs	2,5 mM



M = 459,3 g/mol

Abbildung 6.2.1 Guanosine-5'-thiophosphat-Dinatriumsalz GMPS (EMP Biotech GmbH)

### 6.2.2.6 Biotinylierung der GMPS-RNA

Die Biotinylierung der gereinigten GMPS-RNA [6.2.2.5] erfolgte im basischen Milieu unter Verwendung von Harnstoff und des PEO-Iodoacetyl Biotin Reagenzes (Pierce), Abbildung 6.2.2. Ein typischer Biotinylierungsansatz enthielt 1x TE-Puffer, 2,075 M Harnstoff, 1,6 U/ $\mu$ L RNasin und den vollständigen GMPS-RNA-Ansatz aus einer 100  $\mu$ L Transkription (Gesamtvolumen 400  $\mu$ L). Nach einer Inkubationszeit von 3 min. bei 80°C wurde der Biotinylierungsansatz 5 min. auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 40  $\mu$ L PEO-Iodoacetyl Biotin Reagenzes (Krümel in DMF; Pierce) versetzt. Dieser wurde 2 h bei 40°C im Thermoschüttler bei 300 Upm leicht geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Ammoniumacetatfällung [6.2.1.3] und Aufreinigung mittels PAGE-Gel [6.2.1.6].

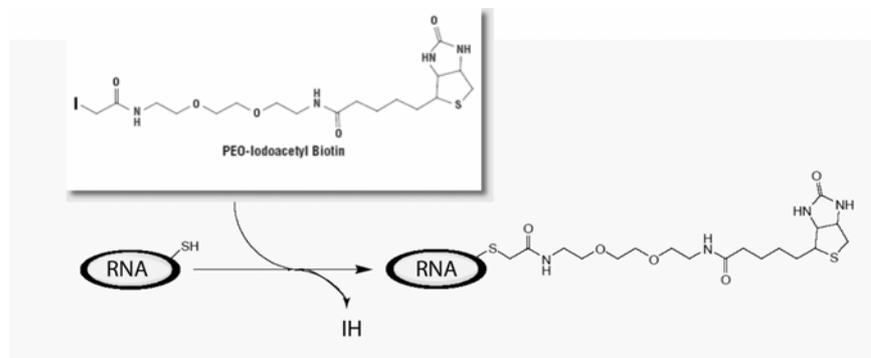


Abbildung 6.2.2 Biotinylierungsreaktion der GMPS-RNA mit dem PEO-Iodoacetyl Biotin Reagenz unter Abspaltung eines Iodwasserstoffs

#### TE-Puffer (1x), pH7,9:

#### Konzentration

Tris-HCl	50 mM
EDTA	30 mM

### 6.2.2.7 DNaseI Hydrolyse

Bei der DNaseI handelt es sich um eine Endonuklease, welche unspezifisch DNA-Einzel-, Doppelstränge und RNA-DNA-Hybride in Di-, Tri- und Oligonukleotide hydrolysiert. Nach der Transkription der entsprechenden RNA [6.2.2.2] wurde der gesamte Transkriptionsansatz einer Ammoniumacetatfällung [6.2.1.3] unterzogen und im DNaseI-Puffer aufgenommen. Typischerweise wurde eine 100  $\mu$ L Transkription nach der Fällung in 50  $\mu$ L des DNaseI-Puffer aufgenommen. Die wiederaufgenommene RNA wurde anschließend mit 0,04 U/ $\mu$ L DNaseI (RNase frei; New England BioLabs) bei 37°C (10 min.) im Wasserbad inkubiert. Der Verdauansatz konnte ohne weitere Aufarbeitung mit einem halben Volumen PAGE-Auftragspuffer für eine Minute bei 95°C erhitzt werden und zur präparativen Trennung auf ein Polyacrylamid-Gel zur Elektrophorese (PAGE) aufgetragen werden [6.2.1.6].

#### DNaseI-Puffer (1x), pH7,9:

#### Konzentration

Tris-HCl	40 mM
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	10 mM

### 6.2.2.8 Reverse Transkription (RT)

Durch die reverse Transkription (RT) wird ein DNA/RNA-Hybrid aus einem einzelsträngigen RNA Templat und einem 3'-Primer (synthetische DNA) erzeugt. Auf diese Weise wird ein zum RNA Templat komplementärer DNA Strang (cDNA) hergestellt, welcher sich in einem PCR-Schritt amplifizieren lässt.

Für die Aptamersélection von His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ, His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC und His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 [6.3.1] mit Hilfe der kovalent gekoppelten Proteine an einer cyanobromidaktivierten Matrix wurde die RT mit Hilfe der reversen Transkriptase Superscript II durchgeführt. Nach der denaturierenden Elution der RNA-Sequenzen mit Guanidiumchlorid [6.3.1], der anschließenden Phenol-Chloroform-Extraktion [6.2.1.1] und Ethanol-fällung [6.2.1.2] konnte die RNA in die RT-Reaktion überführt werden. Ein typischer reverser Transkriptionsansatz (100 µL Ansatz) wurde in zwei Teilschritten durchgeführt.

Zunächst wurde der RT-Mix I (50 µL) für 10 min. bei 42°C im Thermoschüttler inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde RT-Mix II zugegeben und gut gemischt. Die Reaktion erfolgte anschließend bei 42°C für weitere 50 min. Das DNA/RNA-Hybrid wurde anschließend durch Phenol-Chloroform-Extraktion und einer Ethanol-fällung [6.2.1.1, 6.2.1.2] vom Enzym gereinigt und in H<sub>2</sub>O (dest.) resuspendiert. Der gesamte RT-Ansatz wurde für die folgende RCR-Amplifikation verwendet [6.2.2.1].

<b>RT-Mix I:</b>	<b>Konzentration</b>
RT-Puffer (Invitrogen)	1x
DTT	10 mM
dNTP Mix	0,2 mM
Superscript II RT (Invitrogen)	4 U/µL
<b>RT-Mix II:</b>	<b>Konzentration</b>
RT-3'-Primer	2µM
RNA Templat	aus SELEX

### 6.2.2.9 RT/PCR als „Eintopf“-Reaktion

Für die Aptamersélection der biotinylierten Proteine His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ, His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291, His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 und GST-FHL2 Volllänge [6.3.2] wurde die reverse Transkription (Superscript II Enzym; Invitrogen) und die PCR-Amplifikation (*Taq*-Polymerase; Promega) als „Eintopf-Reaktion“ im PCR-Cycler durchgeführt. Hierbei wurde die gebundene RNA-Bibliothek, aus den Aptamersélectionen, an proteinderivatisierten magnetischen Partikeln in 55 µL Wasser resuspendiert und 3 min. bei 80°C eluiert. Anschließend wurden 50 µL Eluat mit 48,5 µL RT-PCR Mix vereinigt und für weitere 5 min. bei 65°C zur Hybridisierung des 3'-Primers inkubiert. Es folgte eine rasche Abkühlung auf 4°C für eine Minute und die Zugabe von 1,5 µL des RT-Enzym Mix. Die PCR-Amplifikation wurde nach dem folgenden Temperaturprogramm durchgeführt:

Schritt	Dauer	Temperatur	
cDNA-Synthese	10 min.	54°C	
Inaktivierung SuperScript II	15 min.	70°C	
Denaturierung	60 s	94°C	16-20 Zyklen
Primer-Annealing	60 s	55°C-60°C	
Polymerase-Reaktion	90 s	72°C	
Heizdeckeltemperatur		110°C	

RT-PCR Mix (1 x):	Konzentration
PCR-Puffer (Promega)	1x
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	1,5 mM
RT-Puffer (Invitrogen)	0,2x
DTT	2 mM
dNTP Mix	0,3 mM
5' - und 3' -Primer (MWG, Metabion)	1 µM

RT-Enzym Mix (1x):	Konzentration
Taq-Polymerase	2,5 U/µL
Superscript II RT (Invitrogen)	2 U/µL

### 6.2.2.10 5'-Dephosphorylierung von Nukleinsäuren

Die alkalische Phosphatase CIAP (*calf intestine alkaline phosphatase*) hydrolysiert spezifisch die 5'-terminale Phosphoesterbindung von RNA- oder DNA-Molekülen. Diese wurde eingesetzt um eine radioaktive Endmarkierung mit Hilfe von  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP [6.2.2.11] durchführen zu können oder die intramolekulare Religation von Vektoren bei der Klonierung zu verhindern [6.4].

Ein typischer 50 µL CIAP Ansatz zur Dephosphorylierung enthielt 1x CIAP-Puffer, 1 µg/µL BSA, 0,4 U/µL RNasin und 3 µM RNA. Hierzu wurden die Nukleinsäuren bei 37°C für 15 min. mit 0,17 U/µL CIAP-Enzym inkubiert. Nach erneuter Enzymzugabe von 38 U wurde der Dephosphorylierungsansatz abermals bei 55°C für 15 min. inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von EDTA-Lösung zur Endkonzentration von 5 mM. Abschließend wurde das Enzym bei 75°C (15 min.) inaktiviert und es folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion [6.2.1.1] und Ethanolpräzipitation [6.2.1.2]. Das resultierende Pellet wurde anschließend in H<sub>2</sub>O (dest.) resuspendiert.

CIAP-Puffer (10x), pH 7,9:	Konzentration
Tris-HCl	100 mM
NaCl	500 mM
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	100 mM
DTT	10 mM
ATP	10 mM

### 6.2.2.11 5'-Phosphorylierung dephosphorylierter RNA (Kinasierung)

Zur radioaktiven Endmarkierung für Filterbindungsanalysen [6.5.1] wurden 5'-terminal dephosphorylierte RNA-Moleküle unter Verwendung der T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK) mit  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP phosphoryliert. Dazu wurde mit T4-PNK für 45 min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Ein typischer 20  $\mu\text{L}$  Kinasierungsansatz enthielt 1x T4-PNK-Puffer (New England Biolabs), 1,5  $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$   $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP, 1 U/ $\mu\text{L}$  RNasin, 1 U/ $\mu\text{L}$  T4-Polynukleotidkinase (New England Biolabs), und 10 pmol dephosphorylierte RNA.

Durch Zugabe von 1  $\mu\text{L}$  0,5 M EDTA (pH 8,0) zur Endkonzentration von 25 mM wurde die Reaktion gestoppt und anschließend die Nukleinsäure mit Ammoniumacetat [6.2.1.3] und Ethanol gefällt [6.2.1.2]. Die Abtrennung von nicht inkorporiertem  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP erfolgte entweder über ein PAGE-Gel [6.2.1.6] oder durch Gelfiltration über G25-Sephadex Microspinsäulen nach Herstellerangaben.

## 6.3 Aptamerselektion

### 6.3.1 Aptamerselektion mit cyanobromidaktivierter Sepharose

Zur Aptamer Selektion von His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ, His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC und His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 [Anhang 9.3.1, 9.3.2, 9.3.5] wurde die RNA-Bibliothek durch *in vitro* Transkription [6.2.2.2] in Gegenwart von  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-GTP aus der dsDNA-Bibliothek von Ulrich Wüllner [5.7.1.1] erhalten, mit DNaseI verdaut [6.2.2.7], Ethanolpräzipitiert [6.2.1.3] und über ein PAGE-Gel [6.2.1.6] gereinigt. Anschließend wurde die RNA-Bibliothek durch De- und Renaturierung gefaltet. Hierzu wurde die RNA für 2 min. in 1 x PBS [5.4] auf 95°C erhitzt und nach Zugabe von 3 mM Magnesiumchlorid (His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 zusätzlich 0,1 mM ZnSO<sub>4</sub>) für 15 min. (37°C) gefaltet. Im Fall der His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 Selektion wurde im Vorhinein die ZnSO<sub>4</sub>-Konzentration auf RNA-Präzipitation austitriert [Anhang 9.8]. Es folgte die Inkubation mit der Präselektionsmatrix, geblockte Cyanogenbromidsepharose [6.1.10] (His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ und His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 ab dem dritten Zyklus) im Selektionspuffer mit RNasin (0,8 U/ $\mu\text{L}$ ) und DTT (1 mM) bei 37°C für 30 min. Nach Überführen in Polyprepeinwegsäulen (Bio-Rad) wurde mit Selektionspuffer gewaschen und der Durchfluss sowie der erste Waschschrift (100  $\mu\text{L}$ ) vereinigt. Ab dem 3. Zyklus wurde bei His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC die präselektierete RNA-Bibliothek noch zusätzlich mit 2,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  Heparin als Kompetitoren versetzt und anschließend 30 min. bei 37°C mit den derivatisierten Matrizes inkubiert [6.1.10]. Nach Waschen (steigende Menge mit steigender Zyklenzahl, [Anhang 9.3.1, 9.3.2, 9.3.5]) mit Selektionspuffer wurde die RNA erst mit 200  $\mu\text{L}$  Elutionspuffer 5 min. bei 37°C inkubiert und anschließend ein weiteres Mal mit 200  $\mu\text{L}$  Elutionspuffer eine Minute bei 90°C erhitzt und weiter 5 min. bei 37°C inkubiert. Die Eluate wurden im Szintillationszähler einzeln quantifiziert, vereinigt und mit Phenol-Chloroform extrahiert, sowie Ethanol präzipitiert [6.2.1.1, 6.2.1.2]. Anschließend erfolgte eine reverse Transkription und Amplifikation mittels

PCR [6.2.2.8, 6.2.2.1] und der Zyklus konnte erneut beginnen. Im ersten Zyklus wurden jeweils 10 nmol der RNA-Bibliothek verwendet, welche sich in dem nachfolgenden Zyklen reduzierte, siehe Anhang 9.3.1, 9.3.2 und 9.3.5.

<b>Selektionspuffer (1 x), pH 7,4:</b>	<b>Konzentration</b>
PBS Lösung	1 x
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	3 mM
(ZnSO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O His <sub>6</sub> -FHL2-LIM0+1	0,1 mM)

<b>Elutionspuffer (1 x), pH 7,4:</b>	<b>Konzentration</b>
Tris/HCl Lösung	30 mM
Guanidium Hydrochlorid	6 M
EDTA	2 mM

### 6.3.2 Aptamerselektion mit Dynabeads®

Zur Aptamer Selektion der Proteine His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ, His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291, His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 und GST-FHL2 Volllänge [Anhang 9.3.3, 9.3.4, 9.3.6, 9.3.7] wurden verschiedene RNA-Bibliotheken B50, B80, E40, N20, N25 [5.7.1.5, 5.7.1.2, 5.7.1.3, 5.7.1.4] und zwei Transkriptionsstrategien verwendet.

Zum Einem wurde die E40 RNA-Bibliothek<sup>[70]</sup> wie schon unter 6.3.1 beschrieben radioaktiv transkribiert und in definierter Menge in die Selektion zur Inkubation mit den immobilisierten, biotinylierten His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ und His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 gegeben. Zum Anderem wurden die restlichen Bibliotheken in einer kürzeren *in vitro* Transkription [6.2.2.3, 6.2.2.4] entweder in einem Tris- oder Phosphatpuffer generiert und anschließend sofort ohne Aufreinigung (10%) mit den biotinylierten oder schon immobilisierten biotinylierten Proteinen inkubiert. Vor der eigentlichen Aptamerselektion mussten die Proteine mit einem Biotinlinker versehen werden [6.1.8] und gegebenenfalls an die streptavidinderivatisierten magnetischen Partikel (Dynabeads®) gekoppelt werden [6.1.9]. Nach Inkubation im Selektionspuffer mit DTT (1 mM, bzw. 5 mM bei GST-FHL2 Volllänge) für 30 min. (2 h bei His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ in Lösung) bei 37°C, wurden die komplexierten RNA-Spezies abgetrennt. Dies geschah entweder direkt an den magnetischen Partikel aus der Reaktionslösung mit einem Magneten, oder nach Inkubation der freien biotinylierten Proteine für 5 min. mit den geblockten magnetischen streptavidinderivatisierten Partikeln (250 µg). Es folgte eine definierte Anzahl von mehreren Waschschrinen [Anhang 9.3.3, 9.3.4, 9.3.6, 9.3.7] und die Elution der RNA-Binder in Wasser unter kurzer Hitzedenaturierung bei 80°C (2 min.). Diese konnte ohne weitere Reinigungsschritte in die kombinierte RT-PCR-Reaktion [6.2.2.9] überführt werden. Es folgte die *in vitro* Transkription wie oben beschrieben und der Selektionszyklus konnte erneut beginnen.

Selektionspuffer (1 x), pH 7,4:	Konzentration
---------------------------------	---------------

PBS Lösung	1 x
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O (His <sub>6</sub> -KIAA0403-ΔN291, His <sub>6</sub> -CYTIP-PDZ)	1,5-3 mM
(ZnSO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O GST-FHL2, His <sub>6</sub> -FHL2-LIM0+1)	0,05-0,1 mM)
(BSA bei den Inkubationen in Lösung)	1 μg/μL)

## 6.4 Klonierungsmethoden

### 6.4.1 Restriktionsverdau von doppelsträngiger DNA

Restriktionsendonukleasen katalysieren die hydrolytische Spaltung von Phosphodiesterbindungen an definierten, meist palindromischen Erkennungssequenzen, innerhalb eines DNA-Doppelstranges. In der vorliegenden Arbeit wurde die CYTIP Domäne PDZCC zur Aptamerselektion [6.3.1] aus dem Original pET15b-CYTIP-Volllängeplasmid kloniert. Hierfür wurden die Endonukleasen NdeI und BamHI zum Restriktionsverdau der PCR-Amplifikate und dem pET11a-Plasmid verwendet, wobei das Hexahistidininfusionspeptid zur affinitätschromatographischen Reinigung über den 5'Primer eingeführt worden ist.

Für die weiterführenden Filterbindungs-Assays des selektierten **K21** Aptamers [6.5.1] und Überexpressionsstudien in eukaryontischer Zellkultur [6.7.3] wurde eine Klonierung des KIAA0403 Vollängenproteins, sowie der CC-binde Domäne KIAA0403-ΔN291 und der korrespondierenden Deletationsmutanten KIAA0403-ΔC125 aus dem IG-KIAA0403-Plasmid<sup>10</sup> vorgenommen. Für die Klonierung in die „multiple cloning site“, des pGEX-Vektors zur Expression der GST-Fusionsproteine und einen pCMV-Tag 2B Vektor (FLAG-Fusionspeptid) zur Proteinüberexpression in Eukaryonten wurden die Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI verwendet.

Zu diesem Zweck wurden jeweils zwei Primerpaare mit den entsprechenden Endonuklease-schnittstellen entworfen [5.7.3] und von MWG als synthetische DNA bezogen. Die entsprechenden Deletationskonstrukte CYTIP-PDZCC, KIAA0403-ΔN291 und -ΔC125 bzw. das Vollängenprotein konnten aus den Originalplasmiden via PCR [6.2.2.1] nach folgendem Schema mit der *Pfu*-Polymerase im *Pfu*-PCR Puffer amplifiziert werden.

Schritt	Dauer	Temperatur	
Denaturierung	60 s	94°C	
Denaturierung	50 s	94°C	} 30 Zyklen
Primer-Annealing	50 s	55°C	
Polymerase-Reaktion	120 s	72°C	
Abschluss	10 min.	72°C	
Heizdeckeltemperatur		110°C	

Nach Phenol-Chloroform-Extraktion [6.2.1.1] und Ethanolpräzipitation [6.2.1.2] erfolgte der Restriktionsverdau in einem 50 μL-Ansatz.

Für die CYTIP-PDZCC Klonierung wurden hierfür 45 μg mit je 182 U NdeI und BamHI mit 1 x BSA in einem BamHI-Puffer (New England Biolabs) bei 37°C für 4 h inkubiert. Das für

<sup>10</sup> Das Plasmid wurde freundlicher Weise von Prof. Dr. W. Kolanus zur Verfügung gestellt.

die Klonierung benötigte linearisierte pET11a-Plasmid konnte in einem weiteren Verdauansatz von 11 µg mit je 330 U NdeI und BamHI bei 37°C für 4 h erhalten werden. Zur Vermeidung einer intramolekularen Religation des Vektors wurde anschließend eine Dephosphorylierung [6.2.2.10] durchgeführt. Bei der abschließenden Reinigung wurden sowohl die verdauten Vektoren als auch die DNA über das MiniElut-Kit (Qiagen), gemäß der Herstellerangaben, vorgenommen. Die Reaktionskontrolle erfolgte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese [6.2.1.5].

Für die Klonierung der KIAA0403-Konstrukte konnten 6 µg der entsprechenden dsDNA mit je 16 U BamHI und EcoRI sowie 1 x BSA (New England Biolabs) in einem EcoRI-Puffer (New England Biolabs) bei 37°C für 16 h über Nacht verdaut werden. Die Linearisierung der Vektoren pGEX und pCMV-Tag 2B wurde ebenfalls über Nacht bei 37°C in einem EcoRI-Puffer (New England Biolabs) mit 16 U BamHI, 16 U EcoRI und 1 x BSA (New England Biolabs) in einem Gesamtvolumen von 50 µL vorgenommen. Um die intramolekulare Religation des Vektors zu vermeiden wurde wie oben erwähnt eine Dephosphorylierung [6.2.2.10] durchgeführt und aufgearbeitet.

## 6.4.2 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA Ligase

Die T4-DNA Ligase ist für die Katalyse von Phosphodiesterknüpfungen zwischen endständigen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen doppelsträngiger DNA verantwortlich. Hierdurch können rekombinante Plasmide erzeugt werden, die anschließend in *E.coli* Bakterien transformiert [6.6.6] werden. Die rekombinanten Plasmide dienen einerseits zur Vereinzelung der selektierten RNA-Bibliotheken aus den Selektionsprozessen [6.4.2.1], andererseits zur rekombinanten Expression der einzelnen His<sub>6</sub>-, GST-Fusionsproteine von CYTIP, KIAA0403 [6.6.7], sowie zu Überexpressionszwecken in eukaryontischer Zellkultur.

### 6.4.2.1 pGEM<sup>®</sup>-T Klonierung

Zur Monoklonalanalyse der durchgeführten Aptamerselektionen [6.3] wurden die angereicherte RNA-Bibliothek als cDNA in ein pGEM<sup>®</sup>-T Vektorsystem (Promega) [5.6.1] kloniert. Hierbei wurden 50 ng linearisiertes pGEM<sup>®</sup>-T Plasmids (0,05 pmol) mit 1 pmol (1 µL) cDNA direkt aus der PCR in Gegenwart der 100 U T4 DNA-Ligase inkubiert. Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10 µL mit 1x Rapid Ligation Buffer (Promega) nach Herstellerangaben für 2 h bei Raumtemperatur. Zur Kontrolle dienten Ligationsansätze ohne Insert (Kontrolle auf Religation des Plasmids) sowie ohne Insert und Enzym (Kontrolle auf Restkontamination mit ungeschnittenem Plasmid).

Die Selektion der so erhaltenen rekombinanten Klone erfolgte durch das in der „multiple-cloning site“ (MCS) enthaltene lacZ-Gen, welches für β-Galaktosidase kodiert. Durch die Ligation der cDNA-Bibliothek innerhalb des Strukturgens, kann in den rekombinanten Klonen nur eine inaktive Variante dieses Enzyms exprimiert werden. Als Folge kann ein zum

Medium zugesetzter Profarbstoff (X-Gal) nicht mehr gespalten werden [6.6.1]. Klone auf der Plattenkultur, die ein rekombinantes Plasmid enthalten, erscheinen somit farblos, religierte nichtrekombinante Plasmide, jedoch blau. Ein weiteres Selektionskriterium ist die Antibiotikaresistenz, welche nur diejenigen Bakterienkolonien wachsen lässt welche auch ein funktionsfähiges Plasmid inkorporiert haben.

### 6.4.2.2 T4-DNA Ligation der pET11a-, pGEX und pCMV-Tag 2B-Klonierung

Die Ligation des amplifizierten und verdauten CYTIP-PDZCC-DNA-Konstruktes [6.4.1] erfolgte mit 0,15 µg des linearisierten pET11a Vektors (0,033 pmol) mit einem dreißigfachen Überschuss der doppelsträngigen DNA in einem T4-DNA-Ligasepuffer (New England Biolabs) im Gesamtvolumen von 50 µL. Vor der Zugabe von 2000 U T4-DNA-Ligase wurde die Reaktionslösung für 10 min. auf 40°C erwärmt und anschließend für fünf min. bei 4°C abgekühlt. Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Transformation [6.6.6] in den DH10b *E.coli* Stamm.

Für die Ligation der amplifizierten und verdauten KIAA0403-DNA-Konstrukte [6.4.1] wurden 0,4 µg des linearisierten Vektors pGEX (0,24 pmol) und 0,34 µg pCMV (0,24 pmol) mit je einem dreifachen oder sechsfachen Überschuss der doppelsträngigen DNA und dem T4-DNA-Ligasepuffer (New England Biolabs) in einem Volumen von 10 µL vereinigt. Die weitere Ligation und Transformation erfolgte wie oben bei der CYTIP-Klonierung beschrieben.

## 6.5 Bindungsstudien

### 6.5.1 Filterbindung an Nitrozellulosemembranen

Zur RNA-Bibliotheksanalyse nach der Aptamers Selektion wurde 1 nM <sup>32</sup>P- markierte RNA [6.2.2.3, 6.2.2.4] aus der Inkorporierung von α-[<sup>32</sup>P]-GTP herangezogen. Bei der Bestimmung von Bindungskonstanten in Lösung wurde 1 nM <sup>32</sup>P-endmarkierte RNA [6.2.2.11] verwendet. Die jeweiligen RNA-Spezies wurden mit steigenden Konzentrationen der entsprechenden Proteine in ihrem speziellen Bindungspuffer in einem Volumen von 25 µL in einer 96-well Mikrotiterplatte für 30 min. (37°C) im Wasserbad inkubiert. Die RNA/Protein Komplexe wurden mit Hilfe eines Minifold I (Schleicher & Schuell) auf einen Nitrozellulosefilter (Protran, 0,45µm, Schleicher & Schuell) aufgebracht und anschließend mit 1000 µL Selektionspuffer [6.3.1, 6.3.2] gewaschen. Die Quantifizierung der gebundenen RNA erfolgte durch einen PhosphorImager (Fujifilm; FLA-3000) und die Datenpunkte mit der Funktion „Logistic“ des Programms Origin<sup>®</sup> 6.1 (OriginLab Corporation) ausgewertet.

<b>Bindungspuffer (1 x), pH 7,4:</b>	<b>Konzentration</b>
PBS	1x
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	1,5 mM – 3 mM
DTT	1 mM – 5 mM
BSA	1µg/µL
Heparin	1µg/µL
RNAsin	1µL/100µL

<b>Selektionspuffer (1 x), pH 7,4:</b>	<b>Konzentration</b>
PBS	1x
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	1,5 mM – 3 mM
DTT	1 mM – 5 mM

### 6.5.2 Kompetitionsstudien der Aptamere K21 und K61

Zur Epitopbestimmung der Aptamere **K21** und **K61** wurden Kompetitionsstudien mit den radioaktiv endmarkierten Aptameren und unmarkierten RNA an His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 und Cytohesin 2 durchgeführt. Bei den Kompetitionsstudien handelt es sich um Filterbindungs-Analysen an einer Nitrozellulosemembran [6.5.1]. Hierbei wurden jeweils konstante Mengen der radioaktiv endmarkierten **K21** und **K61** Aptamere (1 nM) [6.2.2.11] und 100 pmol des frisch dialysierten His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 [6.1.7.1] bzw. 150 pmol des Interaktionspartners Cytohesin 2 (nahe der Dissoziationskonstanten) mit steigender Konzentration der unmarkierten Aptamere, bzw. der RNA-Bibliotheken für 30 min. bei 37°C unter Selektionsbedingungen im Bindepuffer inkubiert. Anschließend wurde nach der beschriebenen Filterbindungsmethode [6.5.1] verfahren.

<b>Bindungspuffer (1 x), pH 7,4:</b>	<b>Konzentration</b>
PBS	1x
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	1,5 mM
DTT	1 mM
BSA	1µg/µL
Heparin	1µg/µL
RNAsin	1µL/100µL

### 6.5.3 Kompetitionsstudie der His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 und Cytohesin 1 Bindung

Zur weiteren Charakterisierung des **K21** Aptamer wurde eine Kompetitionsstudie der **K21**-His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291-Bindung mit Cytohesin 1 in Form von Filterbindungsanalysen [6.5.1] durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde Cytohesin 1 in steigender Konzentration mit einer konstante Menge radioaktiv endmarkiertem **K21** Aptamer (1 nM) [6.2.2.11] und 100 pmol frisch dialysiertem His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 Protein [6.1.7.1] für 30 min. bei 37°C unter Selektionsbedingungen im Bindepuffer inkubiert. Weiter wurde nach der beschriebenen Filterbindungsmethode [6.5.1] verfahren.

<b>Bindungspuffer (1 x), pH 7,4:</b>	<b>Konzentration</b>
PBS	1x
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	1,5 mM
DTT	1 mM
BSA	1µg/µL
Heparin	1µg/µL
RNAsin	1µL/100µL

### 6.5.4 Oberflächenplasmonresonanz (BIAcore)

Die Oberflächenplasmonresonanz (Biacore) wurde als Echtzeituntersuchungsmethode zur Bestimmung der kinetischen Bindungsparameter von Proteinwechselwirkungen verwendet. Das Messverfahren dieser sehr sensitiven Methode beruht auf der Detektion einer Massenveränderung (Proteininteraktion zweier oder mehrerer Partner) an einem Goldchip durch die Verschiebung des Resonanzwinkels. Hierfür wird einer der zu untersuchenden Bindungspartner stabil auf der Chipoberfläche immobilisiert und mit dem entsprechenden Interaktionspartner versetzt.

Zur Untersuchung der Proteininteraktionen wurden jeweils Cytohesin 2 und His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 auf der Oberfläche eines CM5-Chips (Biacore) nach der EDC/NHS Kopplungsstrategie gemäß den Herstellerangaben immobilisiert. Zur Kopplung von Cytohesin 2 musste das rekombinante Protein (1 µM; von Dr. M. Theis zur Verfügung gestellt) zunächst in einen Natriumacetat-Puffer (10 mM; pH 5,0) überführt [6.1.7.1] werden. Anschließend wurde dieses in einem Gesamtvolumen von 16 µL in mehreren Injektionsschritten bei einer Flussrate von 5 µL/min. appliziert. Auf diese Weise konnte 500 RU Protein stabil auf dem Chip immobilisiert werden. Bei der Immobilisierung von His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 konnte das rekombinante Protein (15,03 µM) gleich im Hepes-Puffer (50 mM, pH 7) auf 0,2 µM verdünnt und zur Kopplung verwendet werden. Bei einer Flussrate von 3 µL/min. und der Injektion von 20 µL konnte das Protein mit 622 RU auf dem Chip gekoppelt werden. Zur weiteren kinetischen Messung an den präparierten Chipoberflächen wurden die zu untersuchenden Proteine in steigender Konzentration (1-1000 nM) bei einer Flussrate von 50 µL/min. in KIAA0403-Selektionspuffer (1 x PBS; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) injiziert, der ebenfalls als Laufpuffer diente. Bei der Titration von His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 wurde das Protein durch Dialyse [6.1.7.1] in den KIAA0403-Selektionspuffer überführt. Die Chipoberfläche konnte mit einem Gemisch aus 0,05% SDS und 5-15mM NaOH je nach Bedarf mit 5 µL Regenerationspulsen vollständig wiederhergestellt werden. Bei höheren NaOH Konzentrationen und öfteren Regeneration war ein merklicher Proteinverlust auf der Chipoberfläche zu verzeichnen. Alle erhaltenen Signale wurden auf eine Kontrolloberfläche normiert, die nach Aktivierung mit EDC/NHS lediglich mit Ethanolamin geblockt worden war. Die Dissoziationskonstanten (K<sub>D</sub>) wurden anschließend nach dem „steady-state“-Modell unter Verwendung der Biacore-Evaluierungssoftware berechnet.

### 6.5.5 „Pull-down“-Experimente

Zur Verifizierung der Filterbindungsdaten wurden verschiedene „Pull-down“-Experimente mit den biotinylierten Aptameren **K21**, **K61**, **M69** und den entsprechenden unselektierten RNA-Bibliotheken (N25 und I40) bzw. Wasser als Negativkontrolle durchgeführt. Hierfür mussten die entsprechenden RNA-Sequenzen durch GMPS-Transkription [6.2.2.5] und anschließender Kopplungsreaktion mit dem Biotinsubstrat hergestellt [6.2.2.6] werden. Die „Pull-down“-Assays basieren auf dem Bindungsereignis der biotinylierten RNA-Sequenzen an streptavidinderivatisierte magnetische Partikel. Das an der RNA komplexierte Protein wird nach der Inkubation aus der Bindungslösung mittels eines Magneten herausgezogen.

Für den His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 „Pull-down“-Assay musste das entsprechende Protein in den „Pull-down“-Bindepuffer dialysiert [6.1.7.1] werden. Das frisch dialysierte Protein (83,33 pmol, 2,5 facher Überschuss, Endkonzentration 1,67 μM) wurde direkt mit 33 pmol der biotinylierten Aptamere oder der biotinylierten RNA-Bibliothek für 30 min. in Selektionspuffer bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Das zusätzlich eingesetzte BSA (1μg/μL) sollte unspezifischen Wechselwirkungen der Aptamere entgegenwirken. Anschließend wurden die RNA-Proteinkomplexe mit Hilfe der vorher präparierten streptavidinderivatisierten magnetische Partikeln (0,2 mg oder 20 μL eines 1:1 Bindepuffergemischs) [6.1.9] im „Pull-down“-Bindepuffer für fünf min. bei 37°C inkubiert. Das Separieren der ungebundenen Proteine erfolgte mit einem Magneten. Es folgten drei Waschschrte (1 x 100 μL und 2x 50 μL) mit dem „Pull-down“-Bindepuffer. Die Elution des His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 wurde in 20 μL SDS-Ladepuffer 5 min. bei 95°C durchgeführt, wobei die Hälfte der Elution für die folgende Western-Blotanalyse [6.1.3] mit Hilfe eines spezifischen Pentahistidinantikörpers [5.5] (Qiagen) verwendet wurde.

Beim Cytohesin 2 „Pull-down“-Assay wurden 33 pmol des biotinylierten **K21** Aptamers beziehungsweise der biotinylierten unselektierten N25 RNA-Bibliothek vorab an streptavidinderivatisierten magnetische Partikeln gekoppelt. Zur Kopplung der biotinylierten RNA an 0,2 mg (20 μL 1:1 Bindepuffergemischs) streptavidinderivatisierte magnetische Partikel wurde das Reaktionsgemisch für 30 min. bei 37°C inkubiert und anschließend von den nicht gebundenen biotinylierten RNA-Sequenzen durch zweimaliges Waschen (40 μL) mit „Pull-down“-Bindepuffer getrennt. Nach Resuspension in 20 μL wurden 100 pmol des Cytohesin 2 in einer Endkonzentration von 2,22 μM (dreifacher Überschuss) mit den derivatisierten magnetischen Partikeln für weitere 30 min. bei 37°C inkubiert. Die Separierung des komplexierten Proteins erfolgte mit einem Magneten, wobei zwei Waschschrte (2x 50μL) mit dem „Pull-down“-Bindepuffer folgten. Die Proteinelution erfolgte analog zum His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 „Pull-down“. Die Hälfte der Elution wurde für die Western-Blotanalyse [6.1.3] mit Hilfe eines spezifischen Cytohesin 2 Antikörpers [5.5] verwendet.

**„Pull-down“-Bindepuffer (1x) , pH 7,4:**

	<b>Konzentration</b>
PBS	1x
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	1,5 mM
DTT	1 mM
BSA	1µg/µL
RNAsin	1µL/100µL

**6.5.6 GDP/GTP-Austausch an NΔ17ARF1**

Die GDP/GTP-Austauschreaktionen am ARF-Protein wurden alle mit der löslichen Variante (NΔ17ARF1) vorgenommen, so dass auf eine Verwendung von Vesikeln verzichtet werden konnte. Die Messungen beruhen auf der Tatsache, dass die Tryptophanfluoreszenz der ARF-Proteine im GTP-gebundenen Zustand höher ist als im GDP-gebundenen Zustand<sup>[177]</sup>.

Das ARF-Protein wurde vor seiner Verwendung in Anwesenheit von EDTA für 15 min. in PBS mit GDP beladen. Der GDP/GTP Austausch ist stark Magnesium abhängig, so dass bei Abwesenheit von Magnesium auch ohne Katalysator (GEFs) ein Austausch stattfinden kann. Die Beladung wurde schließlich durch die Zugabe von MgCl<sub>2</sub> gestoppt und anschließend in die Reaktionsmischung mit dem Austauschfaktor und des zu untersuchenden Aptamers bzw. N25 RNA-Bibliothek zugesetzt. Die GDP/GTP-Austauschreaktionen wurde einheitlich durch Injektion von GTP gestartet und die Veränderung der Fluoreszenz (Anregung: 280 nm; Emission 340 nm) gemessen. Ein typischer Ansatz wurde in einem Volumen von 200 µL in einer schwarzen 96iger Lochplatten durchgeführt und mit einem Varioskan der Firma Thermo vermessen. Die Reaktion wurde für 15-20 min. verfolgt. Aus der erhaltenen Kurve kann nach folgender Formel die Austauschrate bestimmt werden:

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

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

**GDP/GTP Austausch:**

	<b>Konzentration</b>
NΔ17Arf1	1 µM
GEF	50 nM
GDP	20 µM
EDTA	2 mM
MgCl <sub>2</sub>	4 mM
GTP	50 µM
1 x PBS (pH 7,4)	1x
K21	0,5-5 µM
N25-RNA Bibliothek	0,5-5 µM

## 6.6 Allgemeiner Umgang mit prokaryontischer Zellkultur

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

Das Kultivieren von *E. coli* Bakterien in Flüssigkultur erfolgte in sterilen Zentrifugenröhrchen (15 mL oder 50 mL) bzw. Erlenmeyerkolben (50-3000ml). Die Zentrifugation von Baktereinsuspensionen und Proteinlysaten erfolgte generell bei 4°C. Alle Nährmedien wurden 20 min. bei 120°C zur Sterilisation autoklaviert und bei 4°C gelagert. Selektionsmedien wurden frisch durch Zusatz von dem entsprechenden Antibiotikum unmittelbar vor Gebrauch hergestellt.

### 6.6.1 Plattenkultur

Die Anzucht von *E.coli* Bakterien erfolgte durch ein Ausstreichen von Flüssigkulturen auf sterilen LB-Agar-Platten [6.6.2], wobei durch einen Zusatz von Ampicillin (50 µg/mL) oder Kanamycin (30 µg/mL) im Nährmedium eine Selektion stattfand.

Für eine Farbselektion von rekombinanten Plasmiden aus der pGEM<sup>®</sup>-T Klonierung [6.4.2.1] (lacZ-Galaktosidase System) wurden zusätzlich zum Antibiotikum vor der Ausstreichung der Bakterien jeweils 20 µL einer 0,2 M IPTG- und 50 µL einer 2,5 %igen X-Gal-Lösung (w/v) ausgestrichen. Die Inkubation der Bakterienkulturen erfolgt über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

### 6.6.2 Flüssigkultur

Zum Anlegen von Flüssigkulturen wurden Einzelbakterienkolonien aus der Plattenkultur in 50 mL LB-Medium (50 µg/mL Ampicillin bzw. 30 µg/mL Kanamycin) angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 Upm kultiviert. Diese Vorkultur wurde anschließend zum Animpfen der Hauptkultur für die rekombinante Proteinexpression oder zur Plasmidpropagation verwendet.

#### LB-Medium pH 7,0:

	Konzentration
Trypton	1% (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl in H <sub>2</sub> O (dest.) und 20 min. autoklavieren	1 % (w/v)

LB-Agarnährböden werden durch den Zusatz von 2 % (w/v) Agar in das LB-Medium hergestellt.

### 6.6.3 Anlegen von Dauerkulturen

Zur Lagerung und schnellen Verfügbarkeit von transformierten Bakterien wurden Glycerin-Kulturen angelegt. Aus einer dichtgewachsenen Übernachtskultur wurden 750  $\mu\text{L}$  LB-Selektionsmedium mit 750  $\mu\text{L}$  Glycerin-Medium versetzt, invertiert und 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Glycerinkulturen wurden anschließend bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### Glycerin-Medium, pH 8:

	Konzentration
Tris	25 mM
Magnesiumsulfat	100 mM
Glycerin	65 % (v/v)

### 6.6.4 Bestimmung der Bakterienkonzentration in Flüssigkulturen

Mit Hilfe der Trübungsmessung bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 600 \text{ nm}$  lässt sich die Bakterienkonzentration der Flüssigkulturen bestimmen, deren Dichte größer als  $10^6$  Zellen/mL ist. Die mathematische Beschreibung der optischen Absorption erfolgt durch das Lambert-Beersche Gesetz.

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

$I_0$	= Intensität der einfallenden Strahlung
$I$	= Intensität der gemessenen Strahlung
$A_{280}$	= Absorption bei 280 nm
$\varepsilon$	= molarer Absorptionskoeffizient [ $\text{M} \cdot \text{cm}$ ] <sup>-1</sup>
$c$	= Konzentration [M]
$d$	= Länge der Messstrecke [cm]

Für *E.coli* Bakterien kann näherungsweise eine Konzentration von  $8 \times 10^8$  Zellen/mL für eine  $\text{OD}_{600}$  von 1 angenommen werden.

### 6.6.5 Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien mittels $\text{CaCl}_2$

Eine Steigerung der DNA-Permeabilität von Bakterienmembranen und somit eine effizientere Transformation der Bakterien lässt sich durch eine Behandlung der Zellen mit  $\text{CaCl}_2$  erreichen<sup>[211]</sup>.

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 400 mL LB-Medium mit 100 mL einer dichtgewachsenen Vorkultur (über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$ , 100 Upm) angeimpft und bei  $37^\circ\text{C}$  bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5-0,6 weiterkultiviert. Anschließend wurde die Kultur 60 min. auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation der Bakterien (8000 Upm, 10 min.) wird der Überstand verworfen, in 250 mL eisgekühlter 100 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung resuspendiert und nach weiteren 60 min. Inkubation auf Eis erneut pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in 50 mL eisgekühlter 100 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung resuspendiert und nach 90 min. bis zu 4 h auf Eis weiter inkubiert. Die so präparierten kompetenten Bakterien wurden entweder sofort transformiert oder nach Zusatz von Glycerol 15% (v/v) auf Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert (1 ml), mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 6.6.6 Transformation kompetenter *E.coli* Bakterien

Bei der Transformation von *E.coli* Zellen wurden 100-250 ng Plasmid mit 100  $\mu$ L einer Suspension kompetenter Zellen [6.6.5] vermischt und 20 min. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 37°C für 40 Sekunden, eine weitere kurze Inkubation auf Eis (2 min.) und die Zugabe von 500  $\mu$ L vorgewärmten LB-Medium. Nach der 45 minütigen Inkubation im Thermoschüttler (37°C, 300 Upm) wurde die Bakterienkultur 2 min. bei 4000 Upm zentrifugiert, der Überstand bis auf 100  $\mu$ L verworfen und die Zellen wieder resuspendiert. Verschiedene Volumina dieser Zellsuspension wurden entweder auf entsprechenden LB-Selektionsplatten ausgestrichen oder zur Animpfung von Flüssigkulturen verwendet.

### 6.6.7 Rekombinante Proteinexpression in *E.coli*

Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Proteinexpressionen erfolgten in *E.coli*-Expressionsstämmen BL21 (DE3), B121 (DE3) Lys S und JM83 [5.8]. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden Proteine entweder in einen Expressionsplasmidsystem kloniert, wie es bei CYTIP-PDZCC [6.4] und den KIAA0403 GST-Konstrukten der Fall war [6.4], oder freundlicherweise von anderen Arbeitsgruppen zur rekombinanten Proteinexpression zu Verfügung gestellt [5.6].

Die Transformation der Expressionsplasmide [5.6.3 und Anhang] erfolgte nach der in [6.6.6] beschriebenen Methode.

Im pET-Vektor liegt das Gen für die Zielproteine unter der Kontrolle des Bakteriophagen T7-Promotors<sup>[212, 213]</sup>. Im Gegensatz dazu wird beim pGEX-Expressionssystem die Proteinexpression anhand des tac-Promoters, ein optimierter lac-Promoter mit effizienteren RNA-Polymerase Bindung, kontrolliert<sup>[214]</sup>. Darüber hinaus enthalten die Expressionsplasmide ein lac-Repressorgen (lacI und lacI<sup>q</sup>), welcher zur Expressionskontrolle<sup>[215]</sup> dient. Durch dessen Bindung an den lac-Operator wird die rekombinante Proteinexpression in Abwesenheit des Induktors Allolactose unterdrückt.

Die Expression der Zielproteine wurde durch SDS-PAGE Analyse [6.1.1] kontrolliert. Hierzu wurden jeweils Aliquots (1 mL) der Zellkulturen vor und nach der Induktion entnommen, durch kurze Zentrifugation pelletiert und nach Erhitzen (2 min. bei 95°C) in 4 x SDS-Probenpuffer auf das Gel aufgetragen.

#### 6.6.7.1 Proteinexpression und Lyse der CYTIP-Konstrukte

Zur rekombinanten Proteinexpression wurden das pET15b His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ- und das pET11a His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC-Konstrukt in B121 (DE3) *E.coli* transformiert [6.6.6], auf LB/Amp-Agarplatten kultiviert und aus den Einzelkolonien Glycerinkulturen angelegt [6.6.3]. Aus der His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ-Glycerinkultur wurde die Expressionskultur entsprechend in 75 mL LB/Amp-Flüssigmedium (50  $\mu$ g/mL) angeimpft und über Nacht bei 37°C im

Bakterienschüttler bei 120 Upm inkubiert. Die Vorkultur wurde am nächsten Tag in 2 L LB/Amp-Flüssigmedium (50 µg/mL) überführt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8-0,9 weiterkultiviert. Zur Induktion der His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ Proteinexpression wurde IPTG (Endkonzentration 1 mM) zugegeben. Nach 3 h Kultivierung bei abgesenkter Temperatur von 35°C und 120 Upm wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min. bei 5000 Upm) geerntet. Die His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC Proteinexpression wurde nach Optimierung der Expressionsbedingungen wie folgt durchgeführt:

Die Vorkultur wurde aus His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC-Glycerinkultur in 75 mL LB/Amp-Flüssigmedium (50 µg/mL) angeimpft, über Nacht bei 37°C im Bakterienschüttler und höherer Schüttelrate (180 Upm) inkubiert. Anschließend wurde diese am nächsten Tag in 2 L LB/Amp-Flüssigmedium (50 µg/mL) verdünnt. Nach Erreichen der OD<sub>600</sub> von 1,3-1,5 erfolgte die Induktion mit IPTG (Endkonzentration: 2 mM). Es folgte weitere Kultivierung bei abgesenkter Temperatur (30°C) und 120 Upm, wobei die Bakterien nach drei Stunden durch Zentrifugation (10 min. bei 5000 Upm) geerntet wurden.

Die erhaltene Zellpellets aus beiden Expressionen wurden in 20 mL LB-Puffer resuspendiert und mit 0,2 mg/mL Lysozym versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min. auf Eis wurde das Lysat nach folgendem Sonifizierschema aufgeschlossen:

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

Anschließend wurden die unlöslichen Bakterienbestandteile 30 min. durch Zentrifugieren bei 5000 Upm abgetrennt und der Überstand aufbewahrt. Das Zellpellet wurde wieder in 5 mL Lysispuffer resuspendiert und erneut nach folgendem Programm sonifiziert:

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

Es folgte eine erneute Zentrifugation für 30 min. bei 5000 Upm, die Überstände wurden vereint und 3 x für je 1 h bei 20.000 Upm pelletiert, wobei nach jedem Zentrifugationsschritt der Überstand in eine neues Zentrifugenröhrchen überführt wurde. Das auf diese Weise erhalten Zelllysat wurde direkt in die unter [6.1.11.1] beschriebenen chromatographischen Trennungen eingesetzt.

**LB-Puffer His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ und -PDZCC, pH 7,3: Konzentration**

Tris	20 mM
NaCl	0,5 M
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	3 mM
Glycerin	10 % (v/v)
DTT	1 mM
Aprotinin	2 µg/mL
Leupeptin	1 µg/mL
PMSF	1 mM
Benzamidin	Spatelspitze

**6.6.7.2 Proteinexpression und Lyse von His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291**

Das pET28 KIAA0403-ΔN291 Plasmid wurde zur Proteinexpression in BI21 (DE3) *E.coli* transformiert [6.6.6], auf LB/Kanamycin-Agarplatten kultiviert und aus den Einzelkolonien Glycerinkulturen angelegt [6.6.3].

Die His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 Glycerinkultur wurde zum Animpfen des 50 mL LB/Kanamycin-Flüssigmediums (30µg/mL) verwendet und über Nacht bei 37°C bei 150 Upm inkubiert. Die Vorkultur wurde am nächsten Tag in einem Liter LB/Kanamycin-Flüssigmedium (30µg/mL) verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 kultiviert. Anschließend wurde die His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 Proteinexpression mit IPTG (Endkonzentration: 1 mM) induziert. Nach weiteren 3 h Inkubation bei einer leicht niedrigeren Temperatur (35°C) und 150 Upm, wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min. bei 5000 Upm) geerntet. Das Zellpellet wurde in 20 ml LB-Puffer resuspendiert und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Lyse und der Aufschluss des zytosolischen Proteins erfolgte nach dem in [6.6.7.1] beschriebenen Schema.

**LB-Puffer His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291, pH 7,4: Konzentration**

Hepes/KOH	25 mM
KCl	1 M
DTT	1 mM
Aprotinin	2µg/mL
Leupeptin	1µg/mL
Benzamidinhydrochlorid	1 Spatelspitze
NP-40 Igepal	0,5 % (v/v)
Glycerin	10 % (v/v)

**6.6.7.3 Proteinexpression und Lyse der GST-KIAA0403-Konstrukte**

Nach Optimierung der Expressionsbedingungen wurden die GST-KIAA0403 Volllänge, -ΔN291 und -ΔC125 nach der folgenden Methode exprimiert:

Aus der Monoklon-Selektion der transformierten BI21 (DE3) *E.coli* mit dem pGEX-2T-KIAA0403-Volllänge -ΔN291 und -ΔC125 auf LB/Amp-Agarplatten, wurden Einzelkolonie-Glycerinkulturen angelegt [6.6.3]. Diese wurden zur Anzucht der Bakterien in 100 mL LB/Amp-Flüssigmedium (50 µg/mL) verwendet und über Nacht bei 37°C im Bakterien-schüttler bei 140 Upm inkubiert. Die Vorkultur wurde am nächsten Tag in 500 mL LB-Amp-

Nährmedium verdünnt und zur OD<sub>600</sub> von 0,6 (37°C, 150 Upm) weiterkultiviert. Die Induktion erfolgte mit IPTG (Endkonzentration 1mM), wobei die Zellen noch weitere 3 h bei abgesenkter Temperatur (35°C) kultiviert wurden. Nach der Ernte (10 min. bei 5000 Upm) wurde das Zellpellet in 20 ml LB-Puffer resuspendiert und mit 0,2 mg/mL Lysozym versetzt. Es folgte eine Inkubation (60 min.) auf Eis mit anschließender Sonifizierung [6.6.7.1]. Eine grobe Trennung der Bakterienbestandteile wurde nach einer Minute Zentrifugation bei 5000 Upm erzielt und der Überstand zur Proteinreinigung nach [6.1.11.2] verwendet.

<b>LB-Puffer GST-KIAA0403-Volllänge, pH 7,4:</b>	<b>Konzentration</b>
PBS	1x
NaCl	200 mM
DTT	1 mM
Aprotinin	10µg/mL
Pefabloc	0,5 mM
Triton X-100	0,5 % (v/v)

<b>LB-Puffer GST-KIAA0403-ΔN291 und -ΔC125, pH 7,4:</b>	<b>Konzentration</b>
Hepes/KOH	25 mM
KCl	1 M
DTT	1 mM
Aprotinin	2µg/mL
Leupeptin	1µg/mL
Benzamidinhydrochlorid	1 Spatelspitze
NP-40 Igepal	0,5 % (v/v)
Glycerol	10 % (v/v)

### **6.6.7.4 Proteinexpression und Lyse des His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1**

Das pET15b FHL2-LIM0+1 Plasmid wurden in den BI21 (DE3) Lys S *E.coli* Stamm zur Proteinexpression transformiert [6.6.6], auf LB/Amp-Chloramphenicol-Agarplatten kultiviert und aus den Einzelkolonien Glycerinkulturen angelegt [6.6.3].

Aus der His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1-Glycerinkultur wurde in 75 mL LB/Amp-Chloramphenicol-Flüssigmedium (Ampizilin: 50 µg/mL; Chloramphenicol: 34 µg/mL) übergeimpft und über Nacht bei 37°C im Bakterienschüttler bei 150 Upm inkubiert. Die Vorkultur wurde am nächsten Tag in zwei Mal 1 L LB/Amp-Chloramphenicol-Flüssigmedium überführt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,7 weiterkultiviert. Die Induktion der FHL2-LIM0+1 Proteinexpression erfolgte mit IPTG bei einer Endkonzentration von 1 mM. Nach 3 h Kultivierung bei 37°C und 150 Upm wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min. bei 5000 Upm) geerntet. Das Zellpellet wurde in 20 mL LB-Puffer resuspendiert.

Die Lyse und der Aufschluss der zytosolischen Proteine erfolgte nach dem gleichen Schema wie bei den Hexahistidinmarkierten CYTIP-PDZ und CYTIP-PDZCC-Konstrukten [6.6.7.1].

**LB-Puffer FHL2, pH 7,3:****Konzentration**

Tris	20 mM
NaCl	0,5 M
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	3 mM
Glycerin	10 % (v/v)
DTT	1 mM
Aprotinin	2 µg/mL
Leupeptin	1 µg/mL
PMSF	1 mM
Benzamidin	Spatelspitze

**6.6.7.5 Proteinexpression und Lyse von GST-FHL2-Volllänge**

Nach Optimierung der Expressionsbedingungen wurde die Proteinexpression nach dem folgendem Schema durchgeführt:

Aus der Monoklon-Selektion transformierter JM83 *E.coli* mit dem pGEX-4T-1 FHL2 auf LB/Amp-Agarplatten, wurden von den Einzelkolonien Glycerinkulturen angelegt [6.6.3]. Aus diesen wurden entsprechend in 100 mL LB/Amp-Flüssigmedium (50 µg/mL) mit einem Zusatz an ZnSO<sub>4</sub> (0,05 mM) (FHL2-Volllänge Nährmedium) übergeimpft und über Nacht bei 37°C im Bakterenschüttler bei 160 Upm inkubiert. Die hohe Umdrehungszahl und der Zusatz an Zink führten zur besseren Löslichkeit und stabiler Proteinfällung. Die Vorkultur wurde am nächsten Tag in 900 mL FHL2-Volllänge Nährmedium verdünnt und weiter bei 37°C und 160 Upm bis zu einer OD600 von 1,2 weiterkultiviert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte mit IPTG bei einer Endkonzentration von 0,5 mM. Nach 2,5 h Kultivierung bei abgesenkter Temperatur von 28°C (180 Upm) wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min. bei 5000 Upm) geerntet. Das erhaltene Zellpellet wurde in 10 ml LB-Puffer resuspendiert und mit 0,2mg/mL Lysozym versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min. auf Eis wurde das Lysat nach dem in [6.6.7.1] beschriebenen ersten Sonifizierschemas aufgeschlossen. Eine grobe Trennung der Bakterienbestandteile wurde nach einer Minute Zentrifugation bei 5000 Upm erzielt und der Überstand zur Proteinreinigung nach [6.1.11.2] verwendet.

**LB-Puffer, pH 7,4:****Konzentration**

PBS	1x
NaCl	200 mM
ZnSO <sub>4</sub>	0,05 mM
DTT	5 mM
Pefabloc	0,12 mg/mL
Aprotinin	10 µg/mL
Triton X-100	0,5 % (v/v)

### 6.6.8 Plasmid-Präparation aus *E.coli* Bakterien

Zur Transformationskontrolle und Sequenzierung der eingebrachten Fremd-DNA [6.4.2.1, 6.4.2.2] wurde die Plasmid-DNA wieder aus *E.coli* Zellen isoliert. Des Weiteren wurde gereinigte Plasmid-DNA bei Transfektionsexperimenten in der eukaryontischen Zellkultur eingesetzt [6.7.3], wobei die Vermehrung in *E.coli* stattfand. Hierbei kam der *E.coli*-Stamm BL21 (DH10B) zum Einsatz [5.8].

Zur Isolierung analytischer Mengen der Plasmid-DNA wurden 5 mL einer Übernachtbakterienkulturen in LB-Selektionsmedium bei 37°C und 120 Upm kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min., 5000 Upm) pelletiert und die Plasmide mit Hilfe des *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers lysiert und isoliert.

Zur Herstellung präparativer Mengen wurde entsprechend eine größere Kultur von 250 mL LB-Selektionsmedium angeimpft, 12 h bei 37°C und 120 Upm kultiviert und durch Zentrifugation geerntet. Die Lyse und Reinigung erfolgt mit dem Qiagen *Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben.

## 6.7 Eukaryontische Zellkultur

### 6.7.1 Allgemeiner Umgang mit eukaryontischer Zellkultur

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

Die Kultivierung von adhärenenten HeLa Zellen [5.9] erfolgte als Monolayer-Kultur in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit „Minimum Essential Medium Eagle“ (EMEM) unter Stimulation mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FCS) in einem Begasungsbrutschrank (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>).

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

Dabei wurden die Zellen spätestens bei einer optischen Konfluenz von ca. 90 % verdünnt. Bei dem Verdünnungsfaktor von 1:10 war dies nach 3 Tagen Inkubation erreicht.

### 6.7.2 Handhabung von Dauerkulturen

Zur langfristigen Lagerung von eukaryontischen Zellen wurden Dauerkulturen angelegt. Die Zellen einer ca. 80 % optisch konfluenten 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche wurden zunächst mit 1x PBS (Gibco Life Technologies) gewaschen. Anschließend wurden 2 mL Trypsin/EDTA zugegeben

und kurz geschwenkt. Daraufhin wurde das Trypsin/EDTA wieder abgenommen und die Zellen mit dem zurückgebliebenen Trypsinfilm für 3-5 min. im Brutschrank inkubiert. Weiterhin wurden 4 Kryoröhrchen mit einer Lösung aus 200 µL DMSO (HYBRI-Max) und 400 µL FCS auf 4°C vorgekühlt. Nach dem vollständigen Ablösen der Zellen wurden diese in 5,6 mL auf 4°C vorgekühltem EMEM suspendiert. Je 1,4 mL dieser Zellsuspension wurden zum vorgelegten DMSO/10 % FCS hinzugegeben und gut gemischt. Anschließend konnten die so präparierten Kulturen bei -80°C für mehrere Monate gelagert werden. Zum Auftauen der Dauerkulturen wurden diese in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt (ca. 2 min.) und mit 40 mL vorgewärmten EMEM/10 % FCS verdünnt.

### 6.7.3 Transfektion von Plasmiden und Aptameren

Für die biologischen funktionalen Studien des humanen zytosolischen Proteins KIAA0403 wurden in Überexpressions- und Inhibitionsexperimenten HeLa Zellen mit Hilfe der Lipofektion transfiziert. Hierbei wurde für die Überexpression mit den entsprechend klonierten KIAA0403 pCMV-Plasmidkonstrukten (2,5 µg) [5.6.3, 6.4.2.2] bzw. zur Durchführung des Luciferase Assays die pEGFP-N1- und SRE-Luc Plasmide [5.6.4] parallel mit dem **K21** Aptamer und N25 RNA Bibliothek transfiziert. Die hierfür verwendeten Überexpressions- und Reporterplasmide wurden aus *E. coli* Bakterien präpariert [6.6.8], nach der Isolierung gefällt und in H<sub>2</sub>O (dest.) resuspendiert.

Für die Luciferase-Assays und Überexpressionsexperimente wurden ca.  $6,5 \times 10^4$  Zellen (24-well Format) bzw.  $3,25 \times 10^5$  Zellen (6-well Format) 18-24 Stunden vor der Transfektion in Kulturplatten ausgesät. Anschließend wurden die zu ca. 80 % optisch konfluenten Zellen mit 1x PBS gewaschen und eine Stunde in serumfreiem EMEM inkubiert. In der Zwischenzeit wurde sowohl das Transfektionsreagenz Metafectene in einem vierfachen Volumenüberschuss, bezogen auf die zu transfizierende Nukleinsäuremasse, als auch die Nukleinsäure(n) getrennt in einer 96-well Platte vorgelegt (Nukleinsäuregesamtvolumen 10 µl). Beide Lösungen wurden mit je 90 µL serumfreiem EMEM verdünnt, sofort vereint und mindestens 25 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Das Transfektionsgemisch wurde anschließend direkt in den Kulturüberstand der Zellen gegeben (beim Luciferase-Assay auf drei Wells aufgeteilt) und durch leichtes auf und abpipetieren vorsichtig durchmischt. Nach einer weiteren Inkubation von 15 h wurde das serumfreie EMEM durch FCS-haltiges Medium ersetzt, wobei es zur Serumstimulation der Zellen kam. Diese erfolgte für die Überexpression der KIAA0403 Volllänge und Deletationskonstrukte für weitere 15 min. mit anschließender Ernte mit heißem SDS-Ladpuffer (2x) bzw. bei der Durchführung des Luciferase-Assays bis zu fünf Stunden.

Zur Proteinabbaukontrolle wurde in einem zusätzlichen Überexpressionsexperiment eine Stunde vor der Serumstimulation ein Proteosominhibitor MG-132 in einer Endkonzentration von 20µM in 0,2 % DMSO zugesetzt. Nach Stimulation mit FCS folgte umgehend die Behandlung mit heißem SDS-Ladpuffer (2x) und weitere Western-Blotanalysen [6.1.3.1].

## 6.8 SRE-Luciferase-Assay

Mit Hilfe des SRE-Luciferase-Assays wurde die serumstimulierte Expression des Reporterenzym Luciferase in An- bzw. Abwesenheit von Effektoren bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die HeLa Zellen in 24-well Kulturplatten mit 1000 ng der Reporter Mischung, bestehend aus dem Reporterplasmid SRE-Luc (800 ng) und dem Plasmid pEGFP-N1 (200 ng) [5.6.4, Anhang 9.2.7] im Massenverhältnis 4:1, sowie den verschiedenen Effektoren ko-transfiziert [6.7.3]. Als Effektor wurde das **K21** Aptamer in unterschiedlichen Mengen (0,25-3 pmol) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente hierbei die unselektierte N25 RNA-Bibliothek. Zur Gewährleistung einer konstanten RNA-Menge wurde das Aptamer mit der RNA-Bibliothek aufgefüllt. Die verwendeten Reporterplasmide wurden aus *E. coli* Bakterien präpariert [6.6.8], nach der Isolierung gefällt und in H<sub>2</sub>O (dest.) resuspendiert. Die RNA-Aptamere konnte aus den entsprechenden DNA-Templaten unter Verwendung der T7-RNA Polymerase durch *in vitro* Transkription [6.2.2.2] erhalten und anschließend durch PAGE-Reinigung erhalten werden [6.2.1.6].

Nach Transfektion [6.7.3] und weitere Inkubation für 15 h in Abwesenheit von Serum, erfolgte die Stimulation der Zellen durch Zusatz von 10 % FCS (EMEM). Nach weiteren 5 h Inkubation und zweimaligem Waschen mit 1 x PBS erfolgte die Zelllyse. Hierbei wurden die Zellen mit 200 µL Reporter-Lysispuffer (Promega) durch zweimaliges Einfrieren (-80°C) und Auftauen (37°C), optional auch bei -20°C über Nacht aufgeschlossen. Anschließend erfolgte die Überführung der Lysate in Eppendorf-Reaktionsgefäße. Nach Abtrennung der Zelltrümmer durch Zentrifugation für 2 min. bei 14.000 Upm wurden 160 µL des klaren Lysats in eine schwarze 96-well Platte mit flachen Boden überführt wurde. Zur Normierung auf die Transfektionseffizienz wurde zuerst die EGFP-Fluoreszenzintensität ( $\lambda_{\text{ex}}=485$  nm;  $\lambda_{\text{em}}=520$  nm) bestimmt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Luciferase-Aktivität unter der Verwendung des „Luciferase Assay Systems“ (Promega), wobei 100 µL der Lysate in eine entsprechend weiße 96-well Platte vorgelegt werden mussten, nach Herstellerangaben. Zum Schluss wurde aus den verbliebenen 60 µL Lysat je 2 x 10 µL zur Doppelbestimmung der Gesamtproteinkonzentration nach Bradford [6.1.6.1] verwendet. Bei der Auswertung der Daten wurde die Lumineszenzintensität auf zwei Parameter normiert, die Gesamtproteinkonzentration und die EGFP-Fluoreszenzintensität (Transfektionseffizienz). Das verwendete Strukturgen pEGFP-N1 steht unter der Kontrolle des humanen Cytomegalovirus (CMV)-Promotors und ist von keiner Expressionskontrolle abhängig. Im Unterschied dazu steht das SRE-Luc Reporterplasmid SRE-Luc unter der Kontrolle des humanen „*serum response element*“ (SRE) Promotors und ist durch die FCS Stimulation aktivierbar. Die spektroskopischen Messungen erfolgten auf einem Varioscan und Luminoscan der Firma Tecan.

## 7 Zusammenfassung

Zur biologischen Einordnung der CC-bindenden Proteine CYTIP und KIAA0403 einem auf Genomebene neu entdeckten Vertreter, wie auch FHL2, einem vielseitigen Ko-Transkriptionsfaktor, wurde die Aptamertechnologie zur *in vitro* Selektion von einzelsträngigen inhibitorisch wirksamen RNA-Biopolymeren angewandt.

In der vorliegenden Arbeit werden mehrere Ansätze der *in vitro* Selektion aus unterschiedlich langen kombinatorischen RNA-Bibliotheken beschrieben, welche bei KIAA0403 (**K21** Aptamer) und FHL2 (**K12** und **K16** Aptamere) zu zwei erfolgreichen Anreicherungen von RNA-bindenden Spezies führten. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Aptamerselektion gegen das Protein CYTIP aufgrund targetspezifischer Gegebenheiten unter den angewandten Bedingungen nicht durchgeführt werden konnte.

Es wird das erste Beispiel eines Aptamers (**K21**) beschrieben, das aus einer unabhängigen Selektion gegen das verkürzte KIAA0403- $\Delta$ N291 evolviert wurde. Dieses verfügt dennoch ähnliche Bindungscharakteristika wie das zuvor von Theis et al.<sup>[57]</sup> selektierte **K61** Aptamer, das aus einer Cytohesin 2 Selektion hervorgegangen ist.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass KIAA0403, ein bis dahin nur theoretisch beschriebenes Protein unbekannter Funktion, ein neues Mitglied der CC-Binder ist und im nanomolaren Bereich eine ausgeprägte Wechselwirkung mit den getesteten Mitgliedern der Cytohesin Familie eingeht. Weiterführende Studien konnten belegen, dass **K61** ebenfalls eine targetspezifische Erkennung beider natürlich vorkommenden Partner besitzt. Letztendlich konnte die spezifische Bindung des **K21** Aptamers auf eine für die Interaktion essentielle Konsensussequenz von sechs Nukleotiden zurückgeführt werden, welche gemeinsam von beiden RNA-Spezies geteilt wird und wahrscheinlich für die Erkennung beider Proteine verantwortlich ist. Die Ergebnisse der Wettbewerbsstudien weisen auf ein sehr stark überlappendes Bindungssepitop der Aptamere auf beiden Interaktionspartnern hin, so dass unter Berücksichtigung der Protein-Protein Affinität der C-terminalen 125 Aminosäuren von KIAA0403 und der Cytohesin 2 CC-Domäne der Rückschluss auf eine ähnliche dreidimensionale Faltstruktur dieser Proteinregionen gezogen werden kann. Durch Überexpressionsstudien in HeLa-Zellen konnte darüber hinaus ein erster Hinweis auf die biologische Relevanz von KIAA0403 erlangt werden.



## 8 Literatur

1. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
2. Huber, L.A., *Is proteomics heading in the wrong direction?* Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(1): p. 74-80.
3. Stults, J.T. and D. Arnott, *Proteomics*. Methods Enzymol, 2005. **402**: p. 245-89.
4. O'Farrell, P.H., *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. J Biol Chem, 1975. **250**(10): p. 4007-21.
5. Pasquali, C., I. Fialka, and L.A. Huber, *Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins*. Electrophoresis, 1997. **18**(14): p. 2573-81.
6. Ho, Y., et al., *Systematic identification of protein complexes in Saccharomyces cerevisiae by mass spectrometry*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 180-3.
7. Figeys, D., L.D. McBroom, and M.F. Moran, *Mass spectrometry for the study of protein-protein interactions*. Methods, 2001. **24**(3): p. 230-9.
8. Stagljar, I., *Finding partners: emerging protein interaction technologies applied to signaling networks*. Sci STKE, 2003. **2003**(213): p. pe56.
9. Uetz, P., et al., *A comprehensive analysis of protein-protein interactions in Saccharomyces cerevisiae*. Nature, 2000. **403**(6770): p. 623-7.
10. McMahan, S.B., et al., *The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins*. Cell, 1998. **94**(3): p. 363-74.
11. Ohh, M., et al., *The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix*. Mol Cell, 1998. **1**(7): p. 959-68.
12. Daly, C.J. and J.C. McGrath, *Fluorescent ligands, antibodies, and proteins for the study of receptors*. Pharmacol Ther, 2003. **100**(2): p. 101-18.
13. Murphy, D., *Gene expression studies using microarrays: principles, problems, and prospects*. Adv Physiol Educ, 2002. **26**(1-4): p. 256-70.
14. Templin, M.F., et al., *Protein microarray technology*. Trends Biotechnol, 2002. **20**(4): p. 160-6.
15. Templin, M.F., et al., *Protein microarrays: promising tools for proteomic research*. Proteomics, 2003. **3**(11): p. 2155-66.
16. Hudelist, G., et al., *Use of high-throughput arrays for profiling differentially expressed proteins in normal and malignant tissues*. Anticancer Drugs, 2005. **16**(7): p. 683-9.
17. Chandonia, J.M. and S.E. Brenner, *The impact of structural genomics: expectations and outcomes*. Science, 2006. **311**(5759): p. 347-51.
18. Chandonia, J.M., T.N. Earnest, and S.E. Brenner, *Structural genomics and structural biology: compare and contrast*. Genome Biol, 2004. **5**(9): p. 343.
19. Mittl, P.R. and M.G. Grutter, *Structural genomics: opportunities and challenges*. Curr Opin Chem Biol, 2001. **5**(4): p. 402-8.
20. Burley, S.K., et al., *Structural genomics: beyond the human genome project*. Nat Genet, 1999. **23**(2): p. 151-7.
21. Breinbauer, R., I.R. Vetter, and H. Waldmann, *From protein domains to drug candidates-natural products as guiding principles in the design and synthesis of compound libraries*. Angew Chem Int Ed Engl, 2002. **41**(16): p. 2879-90.
22. Moseley, H.N. and G.T. Montelione, *Automated analysis of NMR assignments and structures for proteins*. Curr Opin Struct Biol, 1999. **9**(5): p. 635-42.
23. Montelione, G.T. and S. Anderson, *Structural genomics: keystone for a Human Proteome Project*. Nat Struct Biol, 1999. **6**(1): p. 11-2.

24. Hall, L.H. and L.M. Hall, *QSAR modeling based on structure-information for properties of interest in human health*. SAR QSAR Environ Res, 2005. **16**(1-2): p. 13-41.
25. Jayawickreme, C.K. and T.A. Kost, *Gene expression systems in the development of high-throughput screens*. Curr Opin Biotechnol, 1997. **8**(5): p. 629-34.
26. Rademann, J. and G. Jung, *Techview: drug discovery. Integrating combinatorial synthesis and bioassays*. Science, 2000. **287**(5460): p. 1947-8.
27. Pich, E.M. and M.P. Epping-Jordan, *Transgenic mice in drug dependence research*. Ann Med, 1998. **30**(4): p. 390-6.
28. Harris, S. and S.M. Foord, *Transgenic gene knock-outs: functional genomics and therapeutic target selection*. Pharmacogenomics, 2000. **1**(4): p. 433-43.
29. Thompson, J.D., *Applications of antisense and siRNAs during preclinical drug development*. Drug Discov Today, 2002. **7**(17): p. 912-7.
30. Taylor, M.F., K. Wiederholt, and F. Sverdrup, *Antisense oligonucleotides: a systematic high-throughput approach to target validation and gene function determination*. Drug Discov Today, 1999. **4**(12): p. 562-567.
31. Rossi, J.J., *Ribozymes, genomics and therapeutics*. Chem Biol, 1999. **6**(2): p. R33-7.
32. Bennett, C.F., *Efficiency of antisense oligonucleotide drug discovery*. Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 2002. **12**(3): p. 215-24.
33. Tuschl, T. and A. Borkhardt, *Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy*. Mol Interv, 2002. **2**(3): p. 158-67.
34. Dykxhoorn, D.M., C.D. Novina, and P.A. Sharp, *Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(6): p. 457-67.
35. Scherr, M., M.A. Morgan, and M. Eder, *Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells*. Curr Med Chem, 2003. **10**(3): p. 245-56.
36. Tuschl, T., et al., *Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro*. Genes Dev, 1999. **13**(24): p. 3191-7.
37. Mayer, G. and A. Jenne, *Aptamers in research and drug development*. BioDrugs, 2004. **18**(6): p. 351-9.
38. Gavin, A.C., et al., *Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 141-7.
39. der Maur, A.A., et al., *Direct in vivo screening of intrabody libraries constructed on a highly stable single-chain framework*. J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 45075-85.
40. Amstutz, P., et al., *In vitro display technologies: novel developments and applications*. Curr Opin Biotechnol, 2001. **12**(4): p. 400-5.
41. Robertson, D.L. and G.F. Joyce, *Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA*. Nature, 1990. **344**(6265): p. 467-8.
42. Ellington, A.D. and J.W. Szostak, *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*. Nature, 1990. **346**: p. 818-22.
43. Tuerck, C. and L. Gold, *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase*. Science, 1990. **249**: p. 505-10.
44. King, D.J., et al., *Combinatorial selection and binding of phosphorothioate aptamers targeting human NF-kappa B RelA(p65) and p50*. Biochemistry, 2002. **41**(30): p. 9696-706.
45. Kim, S.J., et al., *Selection and stabilization of the RNA aptamers against the human immunodeficiency virus type-1 nucleocapsid protein*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **291**(4): p. 925-31.
46. Mendonsa, S.D. and M.T. Bowser, *In vitro evolution of functional DNA using capillary electrophoresis*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(1): p. 20-1.

47. Berezovski, M., et al., *Nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures: a universal tool for development of aptamers*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(9): p. 3165-71.
48. Cox, J.C., et al., *Automated acquisition of aptamer sequences*. Comb Chem High Throughput Screen, 2002. **5**(4): p. 289-99.
49. Stoltenburg, R., C. Reinemann, and B. Strehlitz, *FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection*. Anal Bioanal Chem, 2005. **383**(1): p. 83-91.
50. Tombelli, S., M. Minunni, and M. Mascini, *Analytical applications of aptamers*. Biosens Bioelectron, 2005. **20**(12): p. 2424-34.
51. Kankia, B.I. and L.A. Marky, *Folding of the thrombin aptamer into a G-quadruplex with Sr(2+): stability, heat, and hydration*. J Am Chem Soc, 2001. **123**(44): p. 10799-804.
52. Thiel, K., *Oligo oligarchy-the surprisingly small world of aptamers*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(6): p. 649-51.
53. Bell, S.D., et al., *RNA molecules that bind to and inhibit the active site of a tyrosine phosphatase*. J Biol Chem, 1998. **273**(23): p. 14309-14.
54. Huang, D.B., et al., *Crystal structure of NF-kappaB (p50)2 complexed to a high-affinity RNA aptamer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(16): p. 9268-73.
55. Conrad, R., et al., *Isozyme-specific inhibition of protein kinase C by RNA aptamers*. J Biol Chem, 1994. **269**(51): p. 32051-4.
56. Seiwert, S.D., et al., *RNA aptamers as pathway-specific MAP kinase inhibitors*. Chem Biol, 2000. **7**(11): p. 833-43.
57. Theis, M.G., et al., *Discriminatory aptamer reveals serum response element transcription regulated by cytohesin-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(31): p. 11221-6.
58. Famulok, M., *Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules*. Curr Opin Struct Biol, 1999. **9**(3): p. 324-9.
59. Mannironi, C., et al., *In vitro selection of dopamine RNA ligands*. Biochemistry, 1997. **36**(32): p. 9726-34.
60. Geiger, A., et al., *RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(6): p. 1029-36.
61. Burgstaller, P., M. Kochoyan, and M. Famulok, *Structural probing and damage selection of citrulline- and arginine-specific RNA aptamers identify base positions required for binding*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(23): p. 4769-76.
62. Iwazaki, T., X. Li, and K. Harada, *Evolvability of the mode of peptide binding by an RNA*. Rna, 2005. **11**(9): p. 1364-73.
63. Lupold, S.E., et al., *Identification and characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen*. Cancer Res, 2002. **62**(14): p. 4029-33.
64. Pestourie, C., B. Tavitian, and F. Duconge, *Aptamers against extracellular targets for in vivo applications*. Biochimie, 2005. **87**(9-10): p. 921-30.
65. Pan, W., et al., *Isolation of virus-neutralizing RNAs from a large pool of random sequences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(25): p. 11509-13.
66. Wang, J., H. Jiang, and F. Liu, *In vitro selection of novel RNA ligands that bind human cytomegalovirus and block viral infection*. Rna, 2000. **6**(4): p. 571-83.
67. Gopinath, S.C., et al., *An RNA aptamer that distinguishes between closely related human influenza viruses and inhibits haemagglutinin-mediated membrane fusion*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 3): p. 479-87.
68. Goringer, H.U., M. Homann, and M. Lorger, *In vitro selection of high-affinity nucleic acid ligands to parasite target molecules*. Int J Parasitol, 2003. **33**(12): p. 1309-17.

69. Eulberg, D., et al., *Development of an automated in vitro selection protocol to obtain RNA-based aptamers: identification of a biostable substance P antagonist*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(4): p. e45.
70. Cox, J.C. and A.D. Ellington, *Automated selection of anti-protein aptamers*. Bioorg Med Chem, 2001. **9**(10): p. 2525-31.
71. Cox, J.C., et al., *Automated selection of aptamers against protein targets translated in vitro: from gene to aptamer*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(20): p. e108.
72. Cox, J.C., P. Rudolph, and A.D. Ellington, *Automated RNA selection*. Biotechnol Prog, 1998. **14**(6): p. 845-50.
73. Breaker, R.R., *Natural and engineered nucleic acids as tools to explore biology*. 2004. **432**(7019): p. 838-845.
74. Pendergrast, P.S., et al., *Nucleic acid aptamers for target validation and therapeutic applications*. J Biomol Tech, 2005. **16**(3): p. 224-34.
75. Lin, Y., et al., *Modified RNA sequence pools for in vitro selection*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(24): p. 5229-34.
76. Beaudry, A., et al., *In vitro selection of a novel nuclease-resistant RNA phosphodiesterase*. Chem Biol, 2000. **7**(5): p. 323-34.
77. Dougan, H., et al., *Extending the lifetime of anticoagulant oligodeoxynucleotide aptamers in blood*. Nucl Med Biol, 2000. **27**(3): p. 289-97.
78. Tucker, C.E., et al., *Detection and plasma pharmacokinetics of an anti-vascular endothelial growth factor oligonucleotide-aptamer (NX1838) in rhesus monkeys*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1999. **732**(1): p. 203-12.
79. Reyderman, L. and S. Stavchansky, *Pharmacokinetics and biodistribution of a nucleotide-based thrombin inhibitor in rats*. Pharm Res, 1998. **15**(6): p. 904-10.
80. Ghafour, I.M., D. Allan, and W.S. Foulds, *Common causes of blindness and visual handicap in the west of Scotland*. Br J Ophthalmol, 1983. **67**(4): p. 209-13.
81. Hyman, L., *Epidemiology of eye disease in the elderly*. Eye, 1987. **1** (Pt 2): p. 330-41.
82. Vater, A., et al., *Short bioactive Spiegelmers to migraine-associated calcitonin gene-related peptide rapidly identified by a novel approach: tailored-SELEX*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(21): p. e130.
83. Eulberg, D. and S. Klussmann, *Spiegelmers: biostable aptamers*. Chembiochem, 2003. **4**(10): p. 979-83.
84. Pieken, W.A., et al., *Structure-function relationship of hammerhead ribozymes as probed by 2'-modifications*. Nucleic Acids Symp Ser, 1991(24): p. 51-3.
85. Mayer, G., et al., *Controlling small guanine-nucleotide-exchange factor function through cytoplasmic RNA intramers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(9): p. 4961-5.
86. Famulok, M. and G. Mayer, *Intramers and aptamers: applications in protein-function analyses and potential for drug screening*. Chembiochem, 2005. **6**(1): p. 19-26.
87. Lee, S.W., et al., *Inhibition of HIV-1 in CEM cells by a potent TAR decoy*. Gene Ther, 1995. **2**(6): p. 377-84.
88. Symensma, T.L., et al., *RNA aptamers selected to bind human immunodeficiency virus type 1 Rev in vitro are Rev responsive in vivo*. J Virol, 1996. **70**(1): p. 179-87.
89. Shi, H., B.E. Hoffman, and J.T. Lis, *RNA aptamers as effective protein antagonists in a multicellular organism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(18): p. 10033-8.
90. Kraus, M.E. and J.T. Lis, *The concentration of B52, an essential splicing factor and regulator of splice site choice in vitro, is critical for Drosophila development*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(8): p. 5360-70.
91. Ring, H.Z. and J.T. Lis, *The SR protein B52/SRp55 is essential for Drosophila development*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(11): p. 7499-506.

92. Jayasena, S.D., *Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics*. Clin Chem, 1999. **45**(9): p. 1628-50.
93. Brody, E.N., et al., *The use of aptamers in large arrays for molecular diagnostics*. Mol Diagn, 1999. **4**(4): p. 381-8.
94. Romig, T.S., C. Bell, and D.W. Drolet, *Aptamer affinity chromatography: combinatorial chemistry applied to protein purification*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1999. **731**(2): p. 275-84.
95. Deng, Q., et al., *Retention and separation of adenosine and analogues by affinity chromatography with an aptamer stationary phase*. Anal Chem, 2001. **73**(22): p. 5415-21.
96. Gold, L., *Oligonucleotides as research, diagnostic, and therapeutic agents*. J Biol Chem, 1995. **270**(23): p. 13581-4.
97. Rimmele, M., *Nucleic acid aptamers as tools and drugs: recent developments*. Chembiochem, 2003. **4**(10): p. 963-71.
98. Hunter, T., *The role of tyrosine phosphorylation in cell growth and disease*. Harvey Lect, 1998. **94**: p. 81-119.
99. Hunter, T., *Signaling--2000 and beyond*. Cell, 2000. **100**(1): p. 113-27.
100. Pawson, T., M. Raina, and P. Nash, *Interaction domains: from simple binding events to complex cellular behavior*. FEBS Lett, 2002. **513**(1): p. 2-10.
101. Pawson, T., G.D. Gish, and P. Nash, *SH2 domains, interaction modules and cellular wiring*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(12): p. 504-11.
102. D'Souza-Schorey, C. and P. Chavrier, *ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(5): p. 347-58.
103. Leo, A., et al., *Adapters in lymphocyte signaling*. J Clin Invest, 2002. **109**(3): p. 301-9.
104. Dard, N. and M. Peter, *Scaffold proteins in MAP kinase signaling: more than simple passive activating platforms*. Bioessays, 2006. **28**(2): p. 146-56.
105. Kolch, W., *Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(11): p. 827-37.
106. Kay, B.K. and J.W. Kehoe, *PDZ domains and their ligands*. Chem Biol, 2004. **11**(4): p. 423-5.
107. Maffucci, T. and M. Falasca, *Specificity in pleckstrin homology (PH) domain membrane targeting: a role for a phosphoinositide-protein co-operative mechanism*. FEBS Lett, 2001. **506**(3): p. 173-9.
108. Fan, J.S. and M. Zhang, *Signaling complex organization by PDZ domain proteins*. Neurosignals, 2002. **11**(6): p. 315-21.
109. <http://pawsonlab.mshri.on.ca>
110. Mason, J.M. and K.M. Arndt, *Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications*. Chembiochem, 2004. **5**(2): p. 170-6.
111. Crick, F., *The Fourier transform of a coiled-coil*. Acta Crystallographica, 1953. **6**(8-9): p. 685-689.
112. Pauling, L. and R.B. Corey, *Compound helical configurations of polypeptide chains: structure of proteins of the alpha-keratin type*. Nature, 1953. **171**(4341): p. 59-61.
113. O'Shea, E.K., et al., *X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil*. Science, 1991. **254**(5031): p. 539-44.
114. O'Shea, E.K., R. Rutkowski, and P.S. Kim, *Mechanism of specificity in the Fos-Jun oncoprotein heterodimer*. Cell, 1992. **68**(4): p. 699-708.
115. Murphy, L.O., et al., *Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(8): p. 556-64.
116. Hazzalin, C.A. and L.C. Mahadevan, *MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch?* Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(1): p. 30-40.

117. Tang, P., et al., *Cybr, a cytokine-inducible protein that binds cytohesin-1 and regulates its activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(5): p. 2625-9.
118. Mansour, M., S.Y. Lee, and B. Pohajdak, *The N-terminal coiled coil domain of the cytohesin/ARNO family of guanine nucleotide exchange factors interacts with the scaffolding protein CASP*. J Biol Chem, 2002. **277**(35): p. 32302-9.
119. Boehm, T., et al., *Attenuation of cell adhesion in lymphocytes is regulated by CYTIP, a protein which mediates signal complex sequestration*. Embo J, 2003. **22**(5): p. 1014-24.
120. Venkateswarlu, K., *Interaction protein for cytohesin exchange factors 1 (IPCEF1) binds cytohesin 2 and modifies its activity*. J Biol Chem, 2003. **278**(44): p. 43460-9.
121. Venkateswarlu, K., *Analysis of the interaction between cytohesin 2 and IPCEF1*. Methods Enzymol, 2005. **404**: p. 252-66.
122. Nevriy, D.J., et al., *Interaction of GRASP, a protein encoded by a novel retinoic acid-induced gene, with members of the cytohesin family of guanine nucleotide exchange factors*. J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 16827-36.
123. Klarlund, J.K., et al., *Signaling complexes of the FERM domain-containing protein GRSP1 bound to ARF exchange factor GRP1*. J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 40065-70.
124. Kolanus, W., et al., *Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule*. Cell, 1996. **86**(2): p. 233-42.
125. Frank, S., et al., *ARNO is a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factor 6*. J Biol Chem, 1998. **273**(1): p. 23-7.
126. Frank, S.R., J.C. Hatfield, and J.E. Casanova, *Remodeling of the actin cytoskeleton is coordinately regulated by protein kinase C and the ADP-ribosylation factor nucleotide exchange factor ARNO*. Mol Biol Cell, 1998. **9**(11): p. 3133-46.
127. Ogasawara, M., et al., *Similarities in function and gene structure of cytohesin-4 and cytohesin-1, guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors*. J Biol Chem, 2000. **275**(5): p. 3221-30.
128. Franco, M., et al., *ARNO3, a Sec7-domain guanine nucleotide exchange factor for ADP ribosylation factor 1, is involved in the control of Golgi structure and function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(17): p. 9926-31.
129. Donaldson, J.G. and C.L. Jackson, *Regulators and effectors of the ARF GTPases*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(4): p. 475-82.
130. Vitale, N., et al., *Calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles requires the activation of ADP-ribosylation factor (ARF)6 by ARF nucleotide binding site opener at the plasma membrane*. J Cell Biol, 2002. **159**(1): p. 79-89.
131. Gsandtner, I., et al., *Heterotrimeric G protein-independent signaling of a G protein-coupled receptor. Direct binding of ARNO/cytohesin-2 to the carboxyl terminus of the A2A adenosine receptor is necessary for sustained activation of the ERK/MAP kinase pathway*. J Biol Chem, 2005. **280**(36): p. 31898-905.
132. Perez, O.D., et al., *Leukocyte functional antigen 1 lowers T cell activation thresholds and signaling through cytohesin-1 and Jun-activating binding protein 1*. Nat Immunol, 2003. **4**(11): p. 1083-92.
133. Shimizu, Y., *LFA-1: more than just T cell Velcro*. Nat Immunol, 2003. **4**(11): p. 1052-4.
134. Hofer, S., et al., *Dendritic cells regulate T-cell deattachment through the integrin-interacting protein CYTIP*. Blood, 2006. **107**(3): p. 1003-9.
135. Blind, M., W. Kolanus, and M. Famulok, *Cytoplasmic RNA modulators of an inside-out signal-transduction cascade*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3606-10.

136. Macia, E., S. Paris, and M. Chabre, *Binding of the PH and polybasic C-terminal domains of ARNO to phosphoinositides and to acidic lipids*. *Biochemistry*, 2000. **39**(19): p. 5893-901.
137. Klarlund, J.K., et al., *Distinct polyphosphoinositide binding selectivities for pleckstrin homology domains of GRP1-like proteins based on diglycine versus triglycine motifs*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(42): p. 32816-21.
138. Santy, L.C. and J.E. Casanova, *Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D*. *J. Cell Biol.*, 2001. **154**(3): p. 599-610.
139. Woolfson, D.N., *The design of coiled-coil structures and assemblies*. *Adv Protein Chem*, 2005. **70**: p. 79-112.
140. Lupas, A., *Coiled coils: new structures and new functions*. *Trends Biochem Sci*, 1996. **21**(10): p. 375-82.
141. Kadrmas, J.L. and M.C. Beckerle, *The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(11): p. 920-31.
142. Bach, I., *The LIM domain: regulation by association*. *Mech Dev*, 2000. **91**(1-2): p. 5-17.
143. Freyd, G., S.K. Kim, and H.R. Horvitz, *Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11**. *Nature*, 1990. **344**(6269): p. 876-9.
144. Pfaff, S.L., et al., *Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation*. *Cell*, 1996. **84**(2): p. 309-20.
145. Way, J.C. and M. Chalfie, **mec-3*, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans**. *Cell*, 1988. **54**(1): p. 5-16.
146. Konrat, R., et al., *Solution structure of the carboxyl-terminal LIM domain from quail cysteine-rich protein *CRP2**. *J Biol Chem*, 1997. **272**(18): p. 12001-7.
147. Sanchez-Garcia, I. and T.H. Rabbitts, *The LIM domain: a new structural motif found in zinc-finger-like proteins*. *Trends Genet*, 1994. **10**(9): p. 315-20.
148. Li, H.Y., et al., *Protein-protein interaction of *FHL3* with *FHL2* and visualization of their interaction by green fluorescent proteins (GFP) two-fusion fluorescence resonance energy transfer (FRET)*. *J Cell Biochem*, 2001. **80**(3): p. 293-303.
149. Morgan, M.J. and A.J. Madgwick, *The LIM proteins *FHL1* and *FHL3* are expressed differently in skeletal muscle*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **255**(2): p. 245-50.
150. Kong, Y., et al., *Cardiac-specific LIM protein *FHL2* modifies the hypertrophic response to beta-adrenergic stimulation*. *Circulation*, 2001. **103**(22): p. 2731-8.
151. Muller, J.M., et al., **FHL2*, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor*. *Embo J*, 2000. **19**(3): p. 359-69.
152. Fimia, G.M., D. De Cesare, and P. Sassone-Corsi, *A family of LIM-only transcriptional coactivators: tissue-specific expression and selective activation of *CREB* and *CREM**. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(22): p. 8613-22.
153. Morgan, M.J. and A.J. Madgwick, **Slim* defines a novel family of LIM-proteins expressed in skeletal muscle*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **225**(2): p. 632-8.
154. Genini, M., et al., *Subtractive cloning and characterization of *DRAL*, a novel LIM-domain protein down-regulated in rhabdomyosarcoma*. *DNA Cell Biol*, 1997. **16**(4): p. 433-42.
155. Johannessen, M., et al., *The multifunctional roles of the four-and-a-half-LIM only protein *FHL2**. *Cell Mol Life Sci*, 2006. **63**(3): p. 268-84.
156. Wei, Y., et al., *Identification of the LIM protein *FHL2* as a coactivator of beta-catenin*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(7): p. 5188-94.

157. McLoughlin, P., et al., *The LIM-only protein DRAL/FHL2 interacts with and is a corepressor for the promyelocytic leukemia zinc finger protein*. J Biol Chem, 2002. **277**(40): p. 37045-53.
158. Wixler, V., et al., *The LIM-only protein DRAL/FHL2 binds to the cytoplasmic domain of several alpha and beta integrin chains and is recruited to adhesion complexes*. J Biol Chem, 2000. **275**(43): p. 33669-78.
159. Muller, J.M., et al., *The transcriptional coactivator FHL2 transmits Rho signals from the cell membrane into the nucleus*. Embo J, 2002. **21**(4): p. 736-48.
160. Suzuki, H., et al., *Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer*. Nat Genet, 2004. **36**(4): p. 417-22.
161. Samson, T., et al., *The LIM-only proteins FHL2 and FHL3 interact with alpha- and beta-subunits of the muscle alpha7beta1 integrin receptor*. J Biol Chem, 2004. **279**(27): p. 28641-52.
162. Krishnamurthy, G., et al., *Developmental evolution of the delayed rectifier current IKs in canine heart appears dependent on the beta subunit minK*. Heart Rhythm, 2004. **1**(6): p. 704-11.
163. Tanahashi, H. and T. Tabira, *Alzheimer's disease-associated presenilin 2 interacts with DRAL, an LIM-domain protein*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(15): p. 2281-9.
164. Coghill, I.D., et al., *FHL3 is an actin-binding protein that regulates alpha-actinin-mediated actin bundling: FHL3 localizes to actin stress fibers and enhances cell spreading and stress fiber disassembly*. J Biol Chem, 2003. **278**(26): p. 24139-52.
165. Lange, S., et al., *Subcellular targeting of metabolic enzymes to titin in heart muscle may be mediated by DRAL/FHL-2*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 24): p. 4925-36.
166. Purcell, N.H., et al., *Extracellular signal-regulated kinase 2 interacts with and is negatively regulated by the LIM-only protein FHL2 in cardiomyocytes*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(3): p. 1081-95.
167. Martin, B., et al., *The LIM-only protein FHL2 interacts with beta-catenin and promotes differentiation of mouse myoblasts*. J Cell Biol, 2002. **159**(1): p. 113-22.
168. Morlon, A. and P. Sassone-Corsi, *The LIM-only protein FHL2 is a serum-inducible transcriptional coactivator of AP-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 3977-82.
169. Yang, Y., et al., *Suppression of FOXO1 activity by FHL2 through SIRT1-mediated deacetylation*. Embo J, 2005. **24**(5): p. 1021-32.
170. Chen, D., et al., *SKI activates Wnt/beta-catenin signaling in human melanoma*. Cancer Res, 2003. **63**(20): p. 6626-34.
171. Morgan, M.J. and S.A. Whawell, *The structure of the human LIM protein ACT gene and its expression in tumor cell lines*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **273**(2): p. 776-83.
172. <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna>.
173. <http://protein.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>.
174. Kettenberger, H., et al., *Structure of an RNA polymerase II-RNA inhibitor complex elucidates transcription regulation by noncoding RNAs*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(1): p. 44-8.
175. Goldberg, J., *Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching*. Cell, 1998. **95**(2): p. 237-48.
176. Moss, J. and M. Vaughan, *Molecules in the ARF orbit*. J Biol Chem, 1998. **273**(34): p. 21431-4.
177. Kahn, R.A. and A.G. Gilman, *The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein*. J Biol Chem, 1986. **261**(17): p. 7906-11.

178. Treisman, R., *The serum response element*. Trends Biochem Sci, 1992. **17**(10): p. 423-6.
179. Chai, J. and A.S. Tarnawski, *Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing*. J Physiol Pharmacol, 2002. **53**(2): p. 147-57.
180. Schubert, U., et al., *Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes*. Nature, 2000. **404**(6779): p. 770-4.
181. Meacci, E., et al., *Cytohesin-1, a cytosolic guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1745-8.
182. Chardin, P., et al., *A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains*. Nature, 1996. **384**(6608): p. 481-4.
183. Hofer, S., et al., *Dendritic cells regulate T-cell de-attachment through the integrin-interacting protein CYTIP*. Blood, 2005.
184. Jackson, C.L. and J.E. Casanova, *Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors*. Trends Cell Biol, 2000. **10**(2): p. 60-7.
185. 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, 2001. **11**(24): p. 1969-74.
186. Fang, X., et al., *Molecular aptamer for real-time oncoprotein platelet-derived growth factor monitoring by fluorescence anisotropy*. Anal Chem, 2001. **73**(23): p. 5752-7.
187. Hartig, J.S., et al., *Protein-dependent ribozymes report molecular interactions in real time*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(7): p. 717-22.
188. Fritz, G., I. Just, and B. Kaina, *Rho GTPases are over-expressed in human tumors*. Int J Cancer, 1999. **81**(5): p. 682-7.
189. Attoub, S., et al., *Leptin promotes invasiveness of kidney and colonic epithelial cells via phosphoinositide 3-kinase-, rho-, and rac-dependent signaling pathways*. Faseb J, 2000. **14**(14): p. 2329-38.
190. Charlton, J., J. Sennello, and D. Smith, *In vivo imaging of inflammation using an aptamer inhibitor of human neutrophil elastase*. Chem Biol, 1997. **4**(11): p. 809-16.
191. Hicke, B.J., et al., *Tumor targeting by an aptamer*. J Nucl Med, 2006. **47**(4): p. 668-78.
192. Hicke, B.J., et al., *Tenascin-C aptamers are generated using tumor cells and purified protein*. J Biol Chem, 2001. **276**(52): p. 48644-54.
193. Drolet, D.W., L. Moon-McDermott, and T.S. Romig, *An enzyme-linked oligonucleotide assay*. Nat Biotechnol, 1996. **14**(8): p. 1021-5.
194. Ishida, S., et al., *VEGF164-mediated inflammation is required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularization*. J Exp Med, 2003. **198**(3): p. 483-9.
195. *Preclinical and phase IA clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration*. Retina, 2002. **22**(2): p. 143-52.
196. Liao, J., et al., *Growth hormone regulates ternary complex factors and serum response factor associated with the c-fos serum response element*. J Biol Chem, 1997. **272**(41): p. 25951-8.
197. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 3 ed. 2001, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
198. Tyndall, R.L., K.B. Jacobson, and E. Teeter, *Characterization of HeLa cell and viral ribonucleic acid by oligonucleotide analysis*. Biochim Biophys Acta, 1965. **108**(1): p. 11-7.
199. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(259): p. 680-5.

200. Wilson, C.M., *Staining of proteins on gels: comparisons of dyes and procedures*. Methods Enzymol, 1983. **91**: p. 236-47.
201. Oakley, B.R., D.R. Kirsch, and N.R. Morris, *A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels*. Anal Biochem, 1980. **105**(2): p. 361-3.
202. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
203. Hochuli, E., H. Dobeli, and A. Schacher, *New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues*. J Chromatogr, 1987. **411**: p. 177-84.
204. Brizzard, B.L., R.G. Chubet, and D.L. Vizard, *Immunoaffinity purification of FLAG epitope-tagged bacterial alkaline phosphatase using a novel monoclonal antibody and peptide elution*. Biotechniques, 1994. **16**(4): p. 730-5.
205. Smith, D.B. and K.S. Johnson, *Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase*. Gene, 1988. **67**(1): p. 31-40.
206. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2 ed. 1989, Cold Spring Harbor: CSHL Press.
207. Saiki, R.K., et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985. **230**(4732): p. 1350-4.
208. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
209. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods Enzymol, 1987. **155**: p. 335-50.
210. <http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>.
211. Cohen, S.N. and A.C. Chang, *Recircularization and autonomous replication of a sheared R-factor DNA segment in Escherichia coli transformants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**(5): p. 1293-7.
212. Studier, F.W. and B.A. Moffatt, *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*. J Mol Biol, 1986. **189**(1): p. 113-30.
213. Tabor, S. and C.C. Richardson, *A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(4): p. 1074-8.
214. Donovan, R.S., C.W. Robinson, and B.R. Glick, *Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter*. J Ind Microbiol, 1996. **16**(3): p. 145-54.
215. Daniels, G.M. and S.G. Amara, *Selective labeling of neurotransmitter transporters at the cell surface*. Methods Enzymol, 1998. **296**: p. 307-18.

## 9 Anhang

### 9.1 Proteinsequenzen (Aminosäuresequenz)

#### 9.1.1 CYTIP Volllänge theoretisch

Das Volllängenprotein CYTIP besteht aus 359 Aminosäuren, besitzt ein Molekulargewicht von 40,01 kD und einen theoretischen pI von 7,33. Die PDZ-Domäne ist durch graue Buchstaben hervorgehoben und die CC-Domäne grau unterlegt. Die Mystery-Domäne mit unbekannter Funktion ist unterstrichen:

MSLQRLQLQHSSNGNLADFCAGPAYSSYSTLTGSLTMNDNRRIQMLADTVATLPRGRKQLALTRSSSLSDFSWSQRK  
LVTVEKQDNETFGFEIQSYRPQNQNACSSSEMFTLICKIQEDSPAHCAGLQAGDVLANINGVSTEGFTYKQVVDLIRSS  
GNLLTIETLNGTMIILKRTELEAKLQVLKQTLKQKWVEYRSLQLQEHRL LHGDAANCPSLENMDLDELDFGLPGP  
GPALVDRNRLSSESSCKSWLSSMTMDSSEGYQTCVSESSRGAFSRQSTDDDECDFIPKEGDDFLRRSSRRNRISINT  
SSGMSPLWEGNLSMFGTLPRKSRKGSVRKQLLKFIPLHRAVEEESRF

#### 9.1.2 HIS<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ

Das Hexahistidin CYTIP-PDZ Fusionsprotein besteht aus 105 Aminosäuren, besitzt ein Molekulargewicht von 11,58 kD und einen theoretischen pI von 6,93. Die Hexahistidinsequenz ist unterstrichen. Die PDZ-Domäne ist durch graue Buchstaben dargestellt:

MGSSHHHHHHHSSGLVPRGSHSWSQRKLVTVVEKQDNETFGFEIQSYRPQNQNACSSSEMFTLICKIQEDSPAHCAGLQ  
AGDVLANINGVSTEGFTYKQVVDLIRSSG

#### 9.1.3 HIS<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC

Das Hexahistidin CYTIP-PDZCC Fusionsprotein besteht aus 164 Aminosäuren, besitzt ein Molekulargewicht von 18,42 kD und einen theoretischen pI von 7,0. Die Hexahistidinsequenz ist unterstrichen. Die PDZ-Domäne ist durch graue Buchstaben dargestellt und die CC-Domäne grau unterlegt:

MHHHHHHSWSQRKLVTVVEKQDNETFGFEIQSYRPQNQNACSSSEMFTLICKIQEDSPAHCAGLQAGDVLANINGVST  
EGFTYKQVVDLIRSSGNLLTIETLNGTMIILKRTELEAKLQVLKQTLKQKWVEYRSLQLQEHRL LHGDAANCPSLE

#### 9.1.4 HIS<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291

Das Hexahistidin KIAA0403-ΔN291 Fusionsprotein besteht aus 145 Aminosäuren, besitzt ein Molekulargewicht von 16,62 kD und einen theoretischen pI von 10,0. Die Hexahistidinsequenz ist unterstrichen. Die KIAA0403 CCbd ist durch graue Buchstaben dargestellt:

MGSSHHHHHHHSSGLVPRGSHMEKLYKSLEQASLSPLGDRRSTPKKELRKSFVKRCKNPSINEKLHKIRTLNSTLKCK  
EHDLAMINQLLDDPKLTARKYREWKMNTLLIQDIYQQQRASPAPDDTDDTPQELKKSPSSPSVENSI

#### 9.1.5 GST-KIAA0403 Volllänge

Das GST-KIAA0403-Volllänge Fusionsprotein besteht aus 635 Aminosäuren, besitzt ein Molekulargewicht von 72,14 kD und einen theoretischen pI von 6,21. Die Aminosäuresequenz der Glutathion S-transferase ist durch graue Buchstaben gekennzeichnet:

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKTQSMAIRYIAD  
KHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHTVTHPDF  
MLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSM  
RRRISCKDLGHADCQGWLYKKKEKGSFLSNKWKKFVILKGSLSYWYSNQMAEKADGFVNLPDFTVERASECKK  
KHAFKISHPQIKTFYFAAENVQEMNVWLNKLGSAVIHQESTTKDEECYSESEQEDPEIAAETPPPHASQTQSLTAQQ  
ASSSSPSLSGTSYSFSSLENTVKTSSFPSSLSKERQSLPDTVNSLSAAEDEGQPITFAVQVHSPVPSEAGIHKALENSF  
VTSESGFLNSLSSDDTSSLSSNHDLTPDKPAGSKIMDKETKVSSEDEMEKLYKSLEQASLSPLGDRRSTPKKELR  
KSFVKRCKNPSINEKLHKIRTLNSTLKCKEHDLAMINQLLDDPKLTARKYREWKMNTLLIQDIYQQQRASPAPDD  
TDDTPQELKKSPSSPSVENSI

### 9.1.6 GST-KIAA0403-ΔN291

Das GST-KIAA0403-ΔN291 Fusionsprotein besteht aus 351 Aminosäuren, besitzt ein Molekulargewicht von 40,76 kD und einen theoretischen pI von 8,4. Die Aminosäuresequenz der Glutathion S-transferase ist durch graue Buchstaben gekennzeichnet:

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLQSMAIIRYIAD  
KHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRISYKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDF  
MLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSME  
KLYKSLEQASLSPLGDRRPSKKELRKSFKRCKNPSINEKLHKIRTLNSTLKCKEHLAMINQLLDDPKLTARKYR  
EWKVMNTLLIQDIYQQQRASPAPDDTDDTPQELKKSPSSPSVENSI

### 9.1.7 GST-KIAA0403-ΔC125

Das GST-KIAA0403-ΔC125 Fusionsprotein besteht aus 510 Aminosäuren, besitzt ein Molekulargewicht von 57,69 kD und einen theoretischen pI von 8,2. Die Aminosäuresequenz der Glutathion S-transferase ist durch graue Buchstaben gekennzeichnet:

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLQSMAIIRYIAD  
KHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRISYKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDF  
MLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSMS  
RRRISCKDLGHADCQGWLYKKKKEKGSFLSNKWKKFWVILKGSSELYWYSNQMAEKADGFVNLPDFTVRASECKK  
KHAFKISHPQIKTFYFAAENVQEMNVWLNKLGSAVIHQESTTKDEECYSESEQEDPEIAAETPPPHASQTQSLTAQQ  
ASSSSPSLSGTSYSFSSLENTVKTPSSFSSLSKERQSLPDTVNSLSAAEDEGQPITFAVQVHSPVPSEAGIHKALENSF  
VTSESGFLNSLSSDDTSSLSSNHDLTVDPKPAAGSKIMDKKEETKVSSEDE

### 9.1.8 HIS<sub>6</sub>-FHL2 LIM0+1

Das Hexahistidin FHL2 LIM0+1 Fusionsprotein besteht aus 107 Aminosäuren, besitzt ein Molekulargewicht von 12,67 kD und einen theoretischen pI von 6,27. Die Hexahistidinsequenz ist unterstrichen und die LIM0+1 ist durch graue Buchstaben gekennzeichnet:

MGHHHHHHHEFMTERFDCHHCNESLFGKKYILREESPYCVVCFETLFANTCEECKGPIGCDCKDLSYKDRHWHEACF  
HCSQCRNSLVDPFAAKEDQLLCTDCYSNEY

### 9.1.9 GST-FHL2 Volllänge

Das GST-FHL2-Volllänge Fusionsprotein besteht aus 508 Aminosäuren, besitzt ein Molekulargewicht von 58,86 kD und einen theoretischen pI von 7,16. Die Aminosäuresequenz der Glutathion S-transferase ist durch graue Buchstaben gekennzeichnet. Die LIM0 +1 sind unterstrichen:

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLQSMAIIRYIAD  
KHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRISYKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDF  
MLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPEF  
MTERFDCHHCNESLFGKKYILREESPYCVVCFETLFANTCEECKGPIGCDCKDLSYKDRHWHEACFHCSQCRNSLV  
DKPFAAKEDQLLCTDCYSNEYSSKCQECKKTIMPGTRKMEYKSSWHETCFICHRCQQPIGTKSFIPKDNQNFVPC  
YEKQHAMQCVQCKPITGGVITYREQPWHKECFVCTACRKQLSGQRFTARDDFAAYCLNCFCDLYAKKAGCTNPI  
SGLGGTKYISFEERQWHNDCFNCKKCSLSLVGRGFLTERDDILCPDCGKDI



## 9.2.4 pGEX-Vektorsysteme

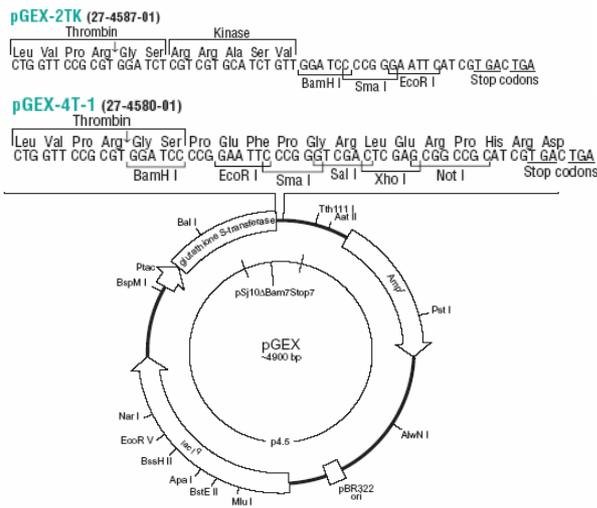


Abbildung 9.2.4: Vektorkarte des pGEX-Glutathione-S-transferase-plasmids.

## 9.2.5 pGEM<sup>®</sup>-T Vektorsystem zur A-Überhangklonierung

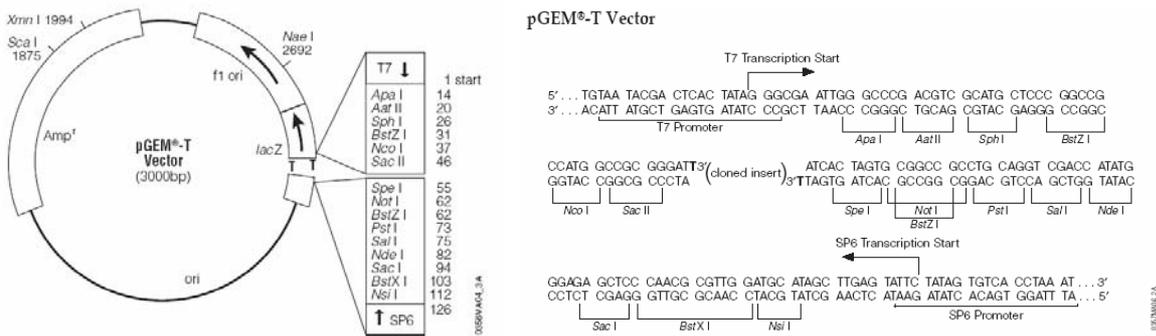


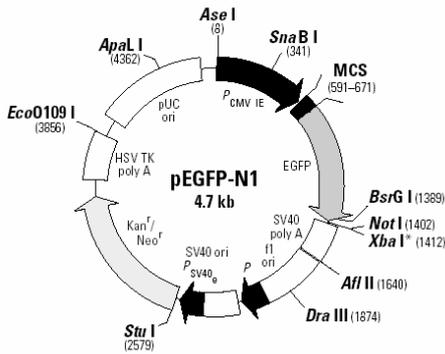
Abbildung 9.2.5: Vektorkarte des pGEM<sup>®</sup>-T-Vektorsystems.

## 9.2.6 pCMV Vektorsystem zur Eukaryontischen Überexpression



Abbildung 9.2.6: pCMV-Tag 2B Vektorsystem zur Eukaryontischen Proteinüberexpression mit einem FLAG-Tag

### 9.2.7 pEGFP-N1 für Luciferase Assays



**Multiple cloning site:**

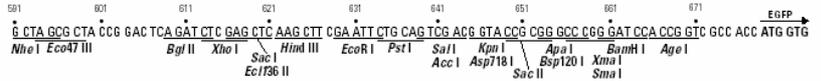


Abbildung 9.2.7 Vektorkarte und Multiple cloning site des pEGFP-N1 zur Überexpression des EGFP, dem grün fluoreszierenden Proteins.

## 9.3 Aptamerselektionsübersicht

### 9.3.1 His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ Selektion

<b>RNA-Bibliothek</b>	Ulrich Wülner, 37 Nukleotide im randomisierter Bereich		
<b>Matrix</b>	Cyanobromidaktivierte Sepharose 4B (Amersham Biosciences)		
<b>Kopplung</b>	CYTIP-PDZ ist kovalent an die aktivierte Sepharose über eine C-N Verknüpfung gebunden; Überschüssige Bindungsstellen der Sepharose wurden mit 0,1 M Tris-Puffer pH8 geblockt.		
<b>Separation</b>	Abtrennung der gebundenen von den ungebundenen RNA-Sequenzen wurde mit Bio-Rad Einwegsäulen durchgeführt		
<b>Binde-Puffer</b>	1 x PBS	pH 7,4	
	MgCl <sub>2</sub>	3 mM	
	DTT	1 mM	
	RNAsin	0,5µL/100µL	
<b>Inkuation</b>	30 min. bei 37 °C		
<b>Elutions-Puffer</b>	Guanidine Hydrochlorid 6 M pH 7,4; Tris/HCl 30 mM, EDTA 2 mM		
<b>Protein-Spezifikation</b>	105 AA; pI 6,93; M= 11580 g/mol		
<b>Konzentration</b>	Gebunden an 3,5 ml Sepharose: 31,86 µM		
<b>RNA-Faltung</b>	2 min. bei 95°C, 15 min. bei RT		
<b>RNA-Reinigung</b>	PAGE 8%		
<b>Transkription</b>	Über Nacht bei 37°C, Stratagen Transkriptionspuffer, Tris-Puffer		
<b>1 Zyklus</b>	RNA:	10 nmol	in 2000µL Bindepuffer 5 µM
	CYTIP-PDZ:	5,74 nmol	180µL matrix 2,87 µM
<b>Weitere Zyklen</b>	RNA:	1,78 nmol	620µL Bindepuffer 2,88 µM
<b>2-6</b>	CYTIP-PDZ:	1,78 nmol	56µL matrix 2,88 µM
<b>4-6</b>	Prä-Selektion:	112µL geblockten CNBr-Sepharose	

#	RNA [nmol]	Protein [nmol]	Matrix-Volumen Blank [µL]	Matrix-Volumen Selex [µL]	Verhältnis: Protein:RNA	Wasch-Volumen [SV]	RNA Prä-Selex [%]	RNA Elution [%]	Kompetitor Heparin [µg/µ]
1	10	5,74	-----	180	1:1,74	3,25	-----	0,34	-----
2	1,78	1,78	-----	56	1:1	6,25	-----	0,4	-----
3	1,78	1,78	112	56	1:1	8,9	0,12	0,04	-----
4	1,78	1,78	112	56	1:1	5,36	0,07	0,17	-----
5	1,78	1,78	112	56	1:1	21,4	0,24	0,37	-----
6	1,78	1,78	112	56	1:1	30	2,73	1,37	-----

Tabelle 9.3.1: Tabellarische Übersicht und Zyklenverlauf der Aptamerselektion von His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ.

### 9.3.2 His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC Selektion

<b>RNA-Bibliothek</b>	Ulrich Wülner, 37 Nukleotide im randomisierter Bereich		
<b>Matrix Kopplung</b>	Cyanobromidaktivierte Sepharose 4B (Amersham Biosciences) His <sub>6</sub> -CYTIP-PDZCC ist kovalent an die aktivierte Sepharose über eine C-N Verknüpfung gebunden; Überschüssige Bindungsstellen der Sepharose wurden mit 1M Glycin-Lösung geblockt. Separation der komplexierten von den ungebundenen RNA-Sequenzen wurde mittels Bio-Rad Einwegsäulen bewerkstelligt		
<b>Separation</b>			
<b>Binde-Puffer</b>	1 x PBS	pH 7,4	
	MgCl <sub>2</sub>	3 mM	
	DTT	1 mM	
	RNAsin	0,5µL/100µL	
<b>Inkuation</b>	30 min. bei 37 °C		
<b>Elutions-Puffer</b>	Guanidine Hydrochlorid 6 M pH 7,4; Tris/HCl 30mM, EDTA 2 mM		
<b>Protein-Spezifikation</b>	151 AA; pI 7,00; M= 17211,48 g/mol		
<b>Konzentration</b>	Gebunden an 1,5 ml Sepharose: 11,62 µM		
<b>RNA-Faltung</b>	2 min. bei 95°C, 15 min. bei RT		
<b>RNA-Reinigung</b>	PAGE 8%		
<b>Transkription</b>	Über Nacht bei 37°C, Stratagen Transkriptionspuffer, Tris-Puffer		
<b>1 Zyklus</b>	RNA:	10 nmol	in 700µL Bindepuffer 11,11 µM
	His <sub>6</sub> -CYTIP-PDZCC:	2,32 nmol	200µL matrix 2,58 µM
	Prä-Selektion:	300µL geblockten CNBr-Sepharose	
<b>Weitere Zyklen 2-10</b>	RNA:	2 nmol	270µL Bindepuffer 5,88 µM
	His <sub>6</sub> -CYTIP-PDZCC:	0,81 nmol	70µL matrix 2,46 µM
	Prä-Selektion:	140µL geblockten CNBr-Sepharose	

#	RNA [nmol]	Protein [nmol]	Matrix-Volumen Blank [µL]	Matrix-Volumen Selex [µL]	Verhältnis: Protein:RNA	Wasch-Volumen [SV]	RNA Prä-Selex [%]	RNA Elution [%]	Kompetitor Heparin [µg/µL]
1	10	2,32	300	200	1:4,3	4,5	0,19	0,11	-----
2	2	0,81	140	70	1:2,46	8	0,2	0,43	-----
3	2	0,81	140	70	1:2,46	12	0,17	0,21	-----
4	2	0,81	140	70	1:2,46	16	0,35	0,24	-----
5	2	0,81	140	70	1:2,46	16	0,16	0,19	2,5µg/µL
6	2	0,81	140	70	1:2,46	16	0,37	0,22	2,5µg/µL
7	2	0,81	140	70	1:2,46	16	0,36	0,3	2,5µg/µL
8	2	0,81	140	70	1:2,46	16	0,34	0,29	2,5µg/µL
9	2	0,81	140	70	1:2,46	16	2,49	0,86	2,5µg/µL
10	2	0,81	140	70	1:2,46	16	11	4,2	2,5µg/µL

Tabelle 9.3.2: Tabellarische Übersicht und Zyklenverlauf der Aptamers Selektion von His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC.

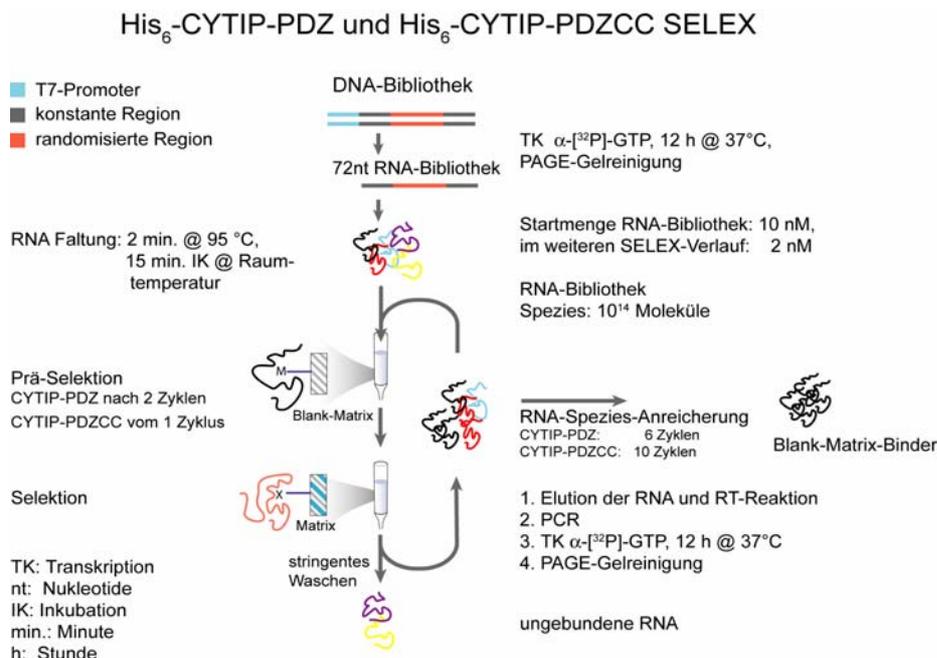


Abbildung 9.3.1: Schematische Darstellung der in vitro Selektion gegen His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ und His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC. Nach Transkription der dsDNA-Bibliothek mit α-[<sup>32</sup>P]-GTP entstand eine radioaktiv markierte RNA-Bibliothek von 72 Nukleotiden. Diese wurde mit His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ- und His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZCC-Sepharose inkubiert bzw. vor der eigentlichen Selektion einer Prä-Selektion gegen underivatisierte, geblockte Matrix unterzogen.

### 9.3.3 Biotin-His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ Selektion

<b>RNA-Bibliothek</b>	E40 und N20
<b>Matrix</b>	Streptavidinderivatisierte magnetische Partikel (Dynabeads®)
<b>Kopplung</b>	Biotinyliertes His <sub>6</sub> -CYTIP-PDZ ist nicht kovalent an die streptavidinderivatisierte magnetische Partikel gekoppelt
<b>Separation</b>	Separation der gebundenen von ungebundener RNA mittels Magneten
<b>Binde-Puffer E40</b>	1 x PBS MgCl <sub>2</sub> 3 mM DTT 1 mM RNAsin 0,5µL/100µL pH 7,4
<b>Binde-Puffer N20</b>	Binde-Puffer E40, Zusatz von 1µg/µL BSA
<b>Inkuation E40</b>	Gekoppeltes His <sub>6</sub> -CYTIP-PDZ an die Matrix, 30 min. bei 37 °C
<b>Inkuation N20</b>	In Lösung mit der RNA Bibliothek 2 Stunden bei 37 °C, 5 min. Inkubation mit Dynabeads®
<b>Waschen N20</b>	#1: 2 x 125µL; #2: 4 x 125µL; #3: 4 x 250µL; #4: 4 x 250µL bis #12
<b>Elution</b>	Wasser, 2 min. bei 80°C, Direkt in die RT-PCR
<b>Protein-Spezifikation</b>	105 AA; pI 6,93; M= 11580 g/mol
<b>Konzentration E40</b>	2,4 nmol [2,4µM]
<b>Konzentration N20</b>	0,5 nmol [0,5µM]
<b>RNA-Faltung E40</b>	2 min. bei 95°C, 15 min. bei RT
<b>N20</b>	-
<b>RNA-Reinigung E40</b>	PAGE 8%
<b>N20</b>	-
<b>Transkription E40</b>	Über Nacht bei 37°C, Stratagen Transkriptionspuffer, Tris-Puffer
<b>N20</b>	20 min.; Tris 40 mM pH 7,9, DTT 5 mM, NTP 2,5mM MgCl <sub>2</sub> 15 mM
<b>Prä-Selektion E40</b>	Ab dem 5 Zyklus 40µL FHL2 LIM0+1 2,4 nmol [2,37µM]
<b>N20</b>	Nein
<b>Kontroll-Selektion</b>	Lysozym 14 kD; 0,6 nmol in einer Gesamtkonzentration von 0,63µM Selektionsbedingungen und RNA-Konzentration wie bei E40 und N20

#	E40 RNA [nmol]	Protein [nmol]	Matrix-Volumen FHL2-LIM0+1 [ $\mu$ L]	Matrix-Volumen Selex [ $\mu$ L]	Verhältnis: Protein:RNA	Wasch-Volumen [SV]	RNA Elution [%]
1	0,4	0,24	-	40	1:1,69	100	0,68
2	0,04	0,24	-	40	1:0,17	100	0,1
3	0,04	0,24	-	40	1:0,17	200	0,12
4	0,04	0,24	-	40	1:0,17	400	0,18
5	0,04	0,24	40	40	1:0,17	800	0,69
6	0,04	0,24	40	40	1:0,17	800	0,61
7	0,04	0,24	40	40	1:0,17	800	0,72
8	0,04	0,24	40	40	1:0,17	800	1,01
9	0,04	0,24	40	40	1:0,17	800	0,48
10	0,04	0,24	40	40	1:0,17	800	0,23

#	N20 RNA [nmol]	Protein [nmol]	PCR Zyklen	Matrix-Volumen Selex [ $\mu$ L]	Verhältnis: Protein:RNA	Wasch-Volumen [SV]	RNA Elution [%]
1	0,4	0,5	18	40	1:1,25	2 x125	Keine Radioaktivität
2	TK komplett eingesetzt	0,5	20	40	-	4 x125	Keine Radioaktivität
3-12	TK komplett eingesetzt	0,5	ab #7: 16	40	-	4 x250	Keine Radioaktivität

Tabelle 9.3.3: Tabellarische Übersicht und Zyklenverlauf der Aptamers Selektion von Biotin-His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ.

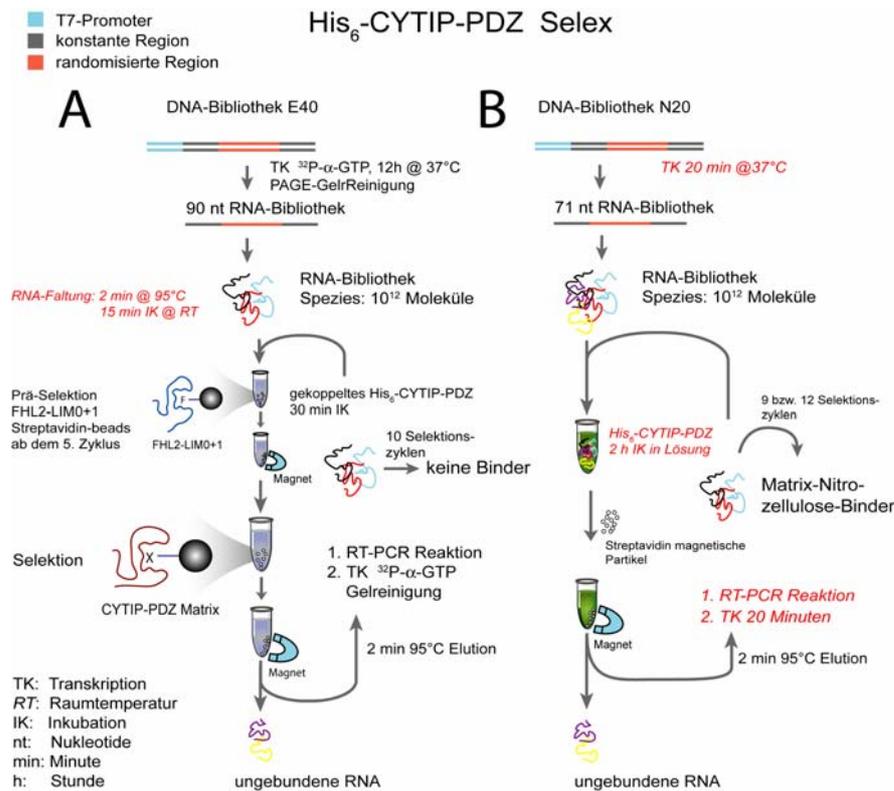


Abbildung 9.3.2: Schema der *in vitro* Selektion von Aptameren an His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ mit zwei Selektionsmethoden und zwei unterschiedlich langen RNA-Bibliotheken unter A) E40-Selektion und B) N20-Selektion. Die vorgenommenen Veränderungen sind jeweils in kursiver Schrift dargestellt. A) Nach radioaktiver RNA-Transkription entstand die E40-RNA-Bibliothek von 90 Nukleotiden. Diese wurde nach RNA-Faltung mit dem bereits immobilisierten Protein an streptavidinderivatisierte magnetischen Partikeln 30 min. inkubiert bzw. ab dem 5. Zyklus einer Präselektion gegen His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 unterzogen. B) Nach einer 20 minütigen Transkription entstand eine RNA-Bibliothek von 71 (N20) Nukleotiden. Diese wurden in Lösung mit dem biotinylierten His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ für zwei Stunden inkubiert und anschließend mit streptavidinderivatisierten magnetischen Partikeln aus dem Bindungspuffer entfernt.

### 9.3.4 Biotin-His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 Selektion

<b>RNA-Bibliothek</b>	N20 und N25
<b>Matrix Kopplung</b>	Streptavidinderivatisierte magnetische Partikel (Dynabeads®) Biotinyliertes His <sub>6</sub> -KIAA0403-ΔN291 ist nicht kovalent an die Dynabeads® gekoppelt Separation der komplexierten von den ungebundenen RNA-Sequenzen mittels eines Magneten
<b>Separation</b>	
<b>Binde-Puffer</b>	1 x PBS pH 7,4 MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM DTT 1 mM RNAsin 0,5μL/100μL
<b>Binde-Puffer</b>	Binde-Puffer N20, N25; Zusatz von 1μg/μL BSA
<b>Inkuation</b>	Gekoppeltes His <sub>6</sub> -KIAA0403-ΔN291 an der Matrix, 30 min. bei 37 °C
<b>Waschen</b>	#1: 2 x 125μL; #2: 4 x 125μL; #3: 4 x 250μL; #4: 4 x 250μL bis #12
<b>Elution</b>	Wasser, 2 min. bei 80°C, Direkt in die RT-PCR
<b>PCR-Zyklen</b>	#1-#6: 17 PCR Zyklen; ab #7: 15 PCR Zyklen
<b>Protein-Spezifikation</b>	145 AA; pI 10; M= 16629 g/mol
<b>Konzentration</b>	0,4 nmol [0,4μM]
<b>RNA-Faltung</b>	-
<b>RNA-Reinigung</b>	-
<b>Transkription</b>	20 min.; Phosphatpuffer 10 mM pH 7,4, DTT 5 mM, NTP 2,5mM MgCl <sub>2</sub> 15 mM
<b>Prä-Selektion</b>	Ab dem 3 Zyklus 40μL Blank: streptavidinderivatisierte magnetische Partikel geblockt mit BSA 1μg/μL

#	N20 N25 RNA [nmol]	Protein [nmol]	Prä-Selektions Matrix [µL]	Matrix-Volumen Selex [µL]	Verhältnis: Protein:RNA	Wasch-Volumen [SV]	RNA Elution [%]
1	0,4	0,048	----	40	1:8,33	2 x125	Keine Radioaktivität
2	TK komplett eingesetzt	0,048	----	40	----	4 x125	Keine Radioaktivität
3	TK komplett eingesetzt	0,048	40	40	----	4 x250	Keine Radioaktivität
4-9	TK komplett eingesetzt	0,048	40	40	-----	4 x250	Keine Radioaktivität

Tabelle 9.3.4: Tabellarische Übersicht und Zyklenverlauf der Aptamersélection von Biotin-His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291.

### 9.3.5 His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 Selektion

<b>RNA-Bibliothek</b>	Ulrich Wülner, 37 Nukleotide im randomisierter Bereich			
<b>Matrix Kopplung</b>	Cyanobromidaktivierte Sepharose 4B (Amersham Biosciences) His <sub>6</sub> -FHL2-LIM0+1 ist kovalent an die aktivierte Sepharose über eine C-N Verknüpfung gebunden; Überschüssige Bindungsstellen der Sepharose wurden mit 0,1 M Tris-Puffer pH8 geblockt.			
<b>Separation</b>	Separation der komplexierten von den ungebundenen RNA-Sequenzen wurde mittels Einwegsäulen (Bio-Rad) durchgeführt.			
<b>Binde-Puffer</b>	1 x PBS MgCl <sub>2</sub> DTT RNAsin	pH 7,4 3 mM 1 mM 0,5µL/100µL	ZnSO <sub>4</sub>	0,1 mM
<b>Inkuation</b>	30 min. bei 37 °C			
<b>Elutions-Puffer</b>	Guanidine Hydrochlorid 6 M pH 7,4; Tris/HCl 30 mM, EDTA 2 mM			
<b>Protein-Spezifika-tion Konzentration</b>	107 AA; pI 6,27; M= 12669,8 g/mol Gebunden an der Sepharose: 22,65 µM			
<b>RNA-Faltung</b>	Ja, 2 min. bei 95°C, 15 min. bei RT			
<b>RNA-Reinigung</b>	PAGE 8%			
<b>Transkription</b>	Über Nacht bei 37°C, Stratagen Transkriptionspuffer, Tris-Puffer			
<b>1 Zyklus</b>	RNA: His <sub>6</sub> -FHL2-LIM0+1:	10 nmol 4,53 nmol	in 2000µL Bindepuffer 200µL matrix	5 µM 2,27 µM
<b>Weitere Zyklen 2-7</b>	RNA: His <sub>6</sub> -FHL2-LIM0+1:	5,59 nmol 1,36 nmol	540µL Bindepuffer 60µL matrix	2,17 µM 2,27 µM
<b>3-7</b>	Prä-Selektion: 120µL geblockten CNBr-Sepharose			
	Matrixbinder nach 6 Zyklen; Matrixwechsel: Filtetbindungen mit Nitrozellulose			
<b>6-9</b>	RNA: His <sub>6</sub> -FHL2-LIM0+1:	0,25 nmol 0,025 nmol	50µL Bindepuffer	5 µM 0,5 µM

#	RNA [nmol]	Protein [nmol]	Matrix-Volumen Blank [ $\mu\text{L}$ ]	Matrix-Volumen Selex [ $\mu\text{L}$ ]	Verhältnis: Protein:RNA	Wasch-Volumen [SV]	RNA Prä-Selex [%]	RNA Elution [%]
1	10	4,53	-----	200	1:2,21	3,25	-----	0,86
2	1,3	1,36	-----	60	1:1	6,25	-----	0,39
3	1,3	1,36	120	60	1:1	8,3	0,06	0,09
4	1,3	1,36	120	60	1:1	9	0,07	0,17
5	1,3	1,36	120	60	1:1	11	0,09	0,22
6	1,3	1,36	120	60	1:1	15	0,86	2,28
7	1,3	1,36	120	60	1:1	30	4,49	4,32
7f	0,25	0,025	-----	Filter	1:10	1 mL	-----	0,74
8f	0,25	0,025	-----	Filter	1:10	1 mL	-----	1,61
9f	0,25	0,025	-----	Filter	1:10	1 mL	-----	2,38

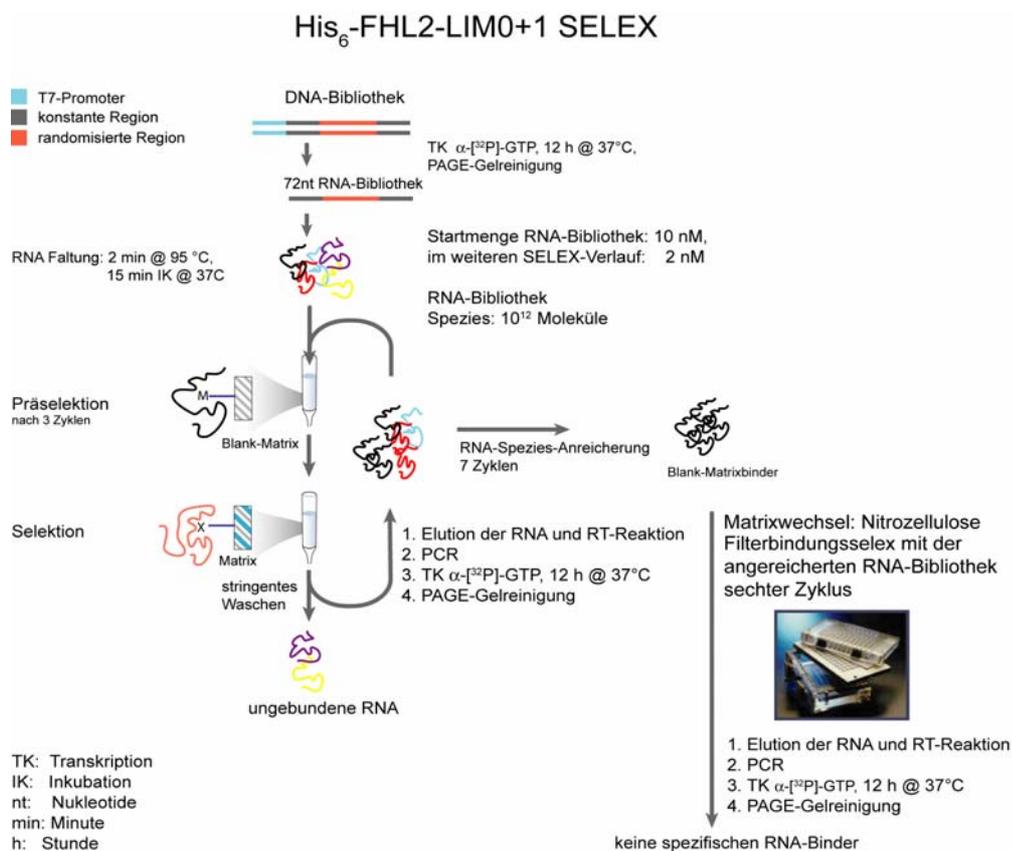
Tabelle 9.3.5: Tabellarische Übersicht und Zyklenverlauf der Aptamerselektion von His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1.

Abbildung 9.3.3 Schema der *in vitro* Selektion von His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1. Nach Transkription der dsDNA-Bibliothek mit [<sup>32</sup>P]- $\alpha$ -GTP entstand eine radioaktiv markierte RNA-Bibliothek von 72 Nukleotiden. Diese wurde mit His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1-Sepharose inkubiert bzw. vor dem eigentlichen Selektionsschritt einer Präselektion gegen underivatisierte Matrix unterzogen. Nach sieben Selektionszyklen konnten nur Matrixbindende Spezies selektiert werden, so dass ein Matrixwechsel zur Nitrozellulose und die angereicherte RNA-Bibliothek aus dem Zyklus sechs zur weiteren Selektion herangezogen wurden.



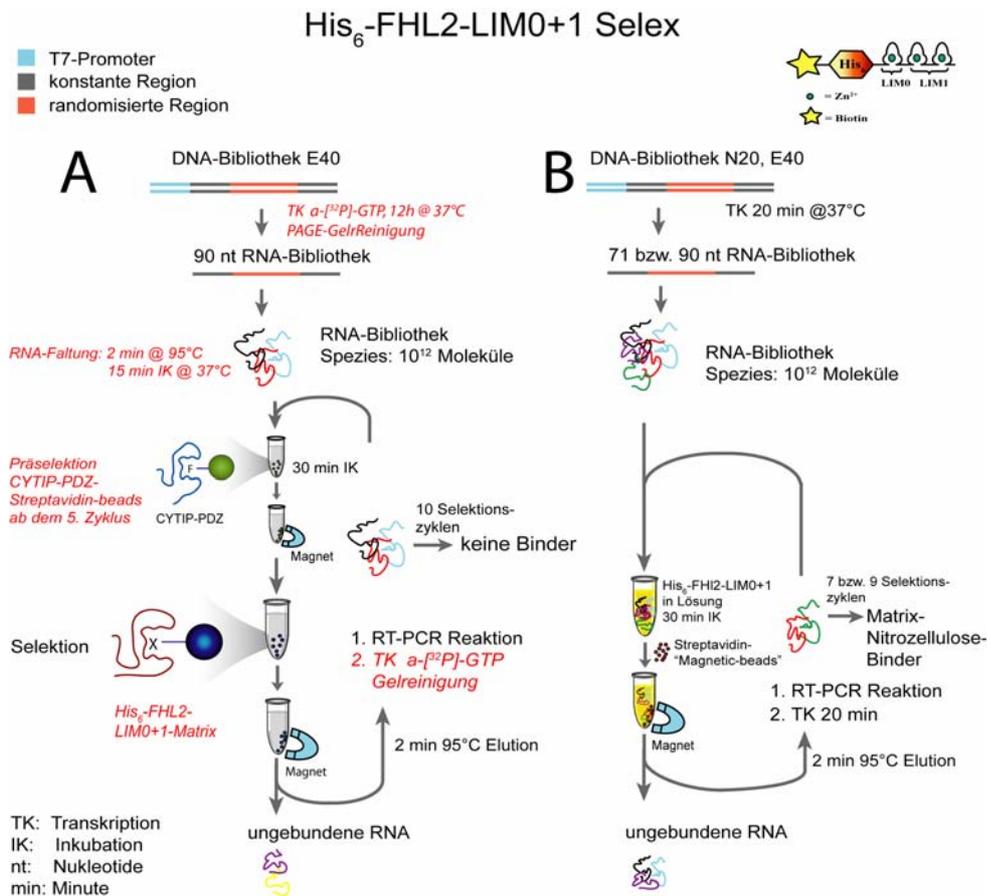


Abbildung 9.3.4: Schema der *in vitro* Selektion von Aptameren an His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 mit zwei unterschiedlichen RNA-Bibliotheken unter A) E40 und B) N20 und E40. Wesentliche Veränderungen im Selektionsschema sind kursiv. A) Nach Transkription der dsDNA-Bibliothek (α-[<sup>32</sup>P]-GTP) entstand eine radioaktiv markierte RNA-Bibliothek (90 Nukleotiden). Diese wurde nach RNA-Faltung mit gekoppelten biotinylierten His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 an magnetischen Partikeln 30 min. inkubiert bzw. ab dem 5. Zyklus einer Präselektion gegen His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ unterzogen. B) Nach einer schnellen Transkription der dsDNA-Bibliothek für nur 20 min. entstanden RNA-Bibliotheken von 71 (N20) und 90 (E40) Nukleotiden. Diese wurden in Lösung mit dem biotinylierten His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 für 30 min. inkubiert und anschließend mit streptavidin-derivatisierten magnetischen Partikel aus dem Bindepuffer entfernt.

### 9.3.7 Biotin-GST-FHL2 Selektion und Schema

<b>RNA-Bibliothek</b>	N25, B50 und B80			
<b>Matrix</b>	Streptavidinderivatisierte magnetische Partikel (Dynabeads®)			
<b>Kopplung</b>	Biotinyliertes GST-FHL2 ist nicht kovalent an die Dynabeads® gekoppelt			
<b>Separation</b>	Separation der komplexierten von den ungebundenen RNA-Sequenzen mittels eines Magneten			
<b>Binde-Puffer E40</b>	1 x PBS	pH 7,4	ZnSO <sub>4</sub>	0,05 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	BSA	1µg/µL
	DTT	5 mM		
	RNasin	0,5µL/100µL		
<b>Inkuation N25, B50, B80</b>	In Lösung mit der RNA Bibliothek 30 min. bei 37 °C, 5 min. Inkubation mit Streptavidin „Magnetic beads“			
<b>Waschen N25/E40</b>	#1: 2 x 125µL; #2: 4 x 125µL; #3: 4 x 250µL; #4: 4 x 250µL bis #9			
<b>Elution</b>	Wasser, 2 min. bei 80°C, Direkt in die RT-PCR			
<b>Protein-Spezifikation</b>	508 AA; pI 7,16; M= 58,86 kD			
<b>Konzentration</b>	0,035 nmol [0,35µM]			

<b>PCR Zyklen</b>	#1 - #6: 17 PCR Zyklen, ab #7 15 PCR Zyklen
<b>RNA-Faltung</b>	Nein
<b>RNA-Reinigung</b>	Nein
<b>Transkription N25</b>	20 min.; Phosphat 10 mM pH 7,4, DTT 5 mM, NTP 2,5mM MgCl <sub>2</sub> 15 mM
<b>B50, B80</b>	35 min.; Phosphat 10 mM pH 7,4, DTT 5 mM, NTP 2,5mM MgCl <sub>2</sub> 15 mM
<b>Prä-Selektion</b>	Ab dem 3 Zyklus 40µL Blank „Magnetic beads“ geblockt mit BSA 1µg/µL

#	N25/B50/B80 RNA [nmol]	Protein [nmol]	Prä-Selektions Matrix [µL]	Matrix-Volumen Selex [µL]	Verhältnis: Protein:RNA	Wasch-Volumen [SV]	RNA Elution [%]
1	0,4	0,035	-	40	1:11,42	2 x125	Keine Radioaktivität
2	TK komplett eingesetzt	0,035	-	40	-	4 x125	Keine Radioaktivität
3	TK komplett eingesetzt	0,035	-	40	-	4 x250	Keine Radioaktivität
4-12	TK komplett eingesetzt	0,035	40	40	-	4 x250	Keine Radioaktivität

Tabelle 9.3.7: Tabellarische Übersicht und Zyklenverlauf der Aptamerselektion von Biotin-GST-FHL2.

### GST-FHL2 Selex

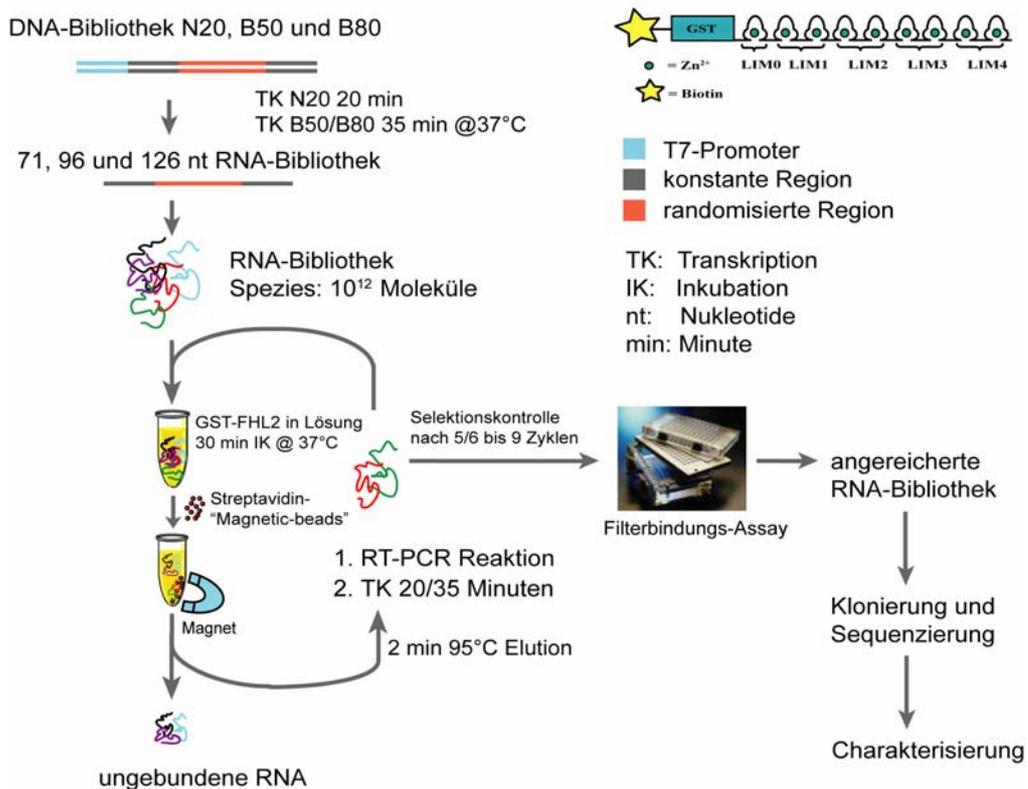


Abbildung 9.3.5: Schema der *in vitro* Selektion von GST-FHL2 mit drei unterschiedlich langen RNA-Bibliotheken unter N20, B50 und B80. Nach einer schnellen Transkription der dsDNA-Bibliothek für 20 bzw. 35 min. (Phosphatpuffer) entstanden RNA-Bibliothek von 71 (N20), 96 (B50) und 126 (E40) Nukleotiden. Diese wurden in Lösung mit biotinylierten GST-FHL2 für 30 min. inkubiert und anschließend mit streptavidinderivatisierten magnetischen Partikeln aus dem Bindepuffer gezogen. Nach Elution in Wasser, RT-PCR und Transkription folgte der nächste Zyklus. Nach 5/6 bzw. bis 9 Zyklen konnte die RNA in Filterbindungsexperimente eingesetzt werden und zur Klonierung/Sequenzierung verwendet werden.

## 9.4 Biacore-Messung von dGRP1

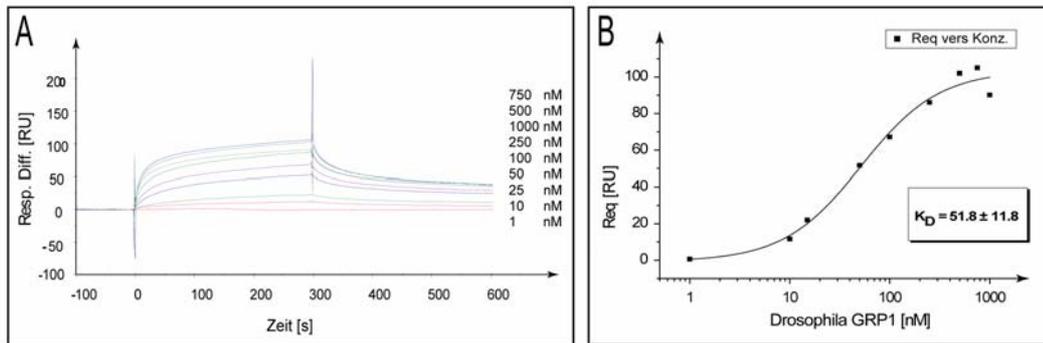


Abbildung 9.4.1 Biacore-Bindungsstudie des Analyten dGRP1 und des immobilisierten Liganden His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291. A) Dargestellt sind die normalisierten Bindungskurven des Drosophila Proteins dGRP1 dem Cytohesinanalogen in steigender Konzentration auf einer His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 derivatisierten Oberfläche, 50μL/min. Flussrate, Injektionszeit 300s. B) Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) wurde die Bindungsantwort im Gleichgewicht gegen die steigende Proteinkonzentration aufgetragen.

## 9.5 Filterbindungen Monoklone N20 und N25

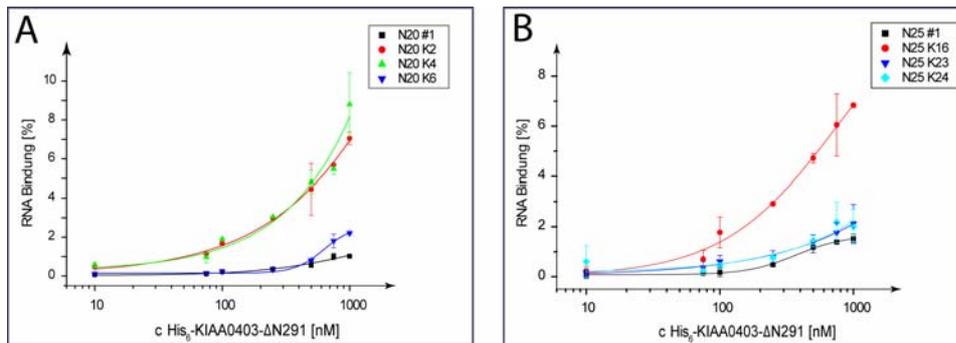


Abbildung 9.5.1: Filterbindung der unselektierten RNA-Bibliothek N20 #1 und N25 #1 und der Monoklone **K2**; **K4** und **K6**. (A) N25 Monoklone **K16**; **K23** und **K24** (B) aus der His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 Selektion. Aufgetragen ist die RNA-Bindung in % gegen die steigende Konzentration von His<sub>6</sub>-KIAA0403-ΔN291 in einem Bereich von 0-1000 nM.

## 9.6 GST-Bindungs-Analyse von K21 und K61

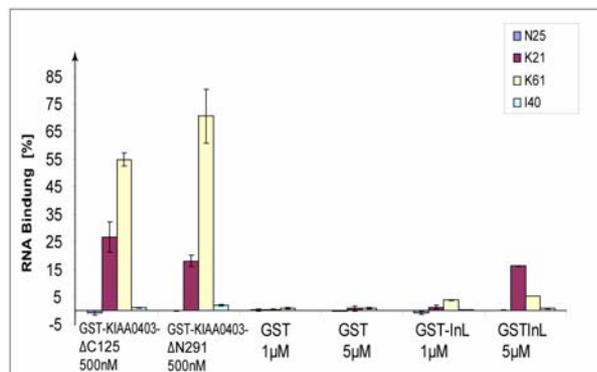


Abbildung 9.6.1: Filterbindungsanalyse der unselektierten RNA-Bibliothek N25 #1 und I40 und des **K21**- und **K61**-Aptamers auf GST Bindung. Aufgetragen ist die RNA-Bindung in % gegen die konstante Konzentration von GST-KIAA0403-ΔC125 (0,5 μM), GST-KIAA0403-ΔN291 (0,5 μM), GST in zwei Konzentrationen (1 und 5 μM) und einem Kontrollprotein GST-InL (InnexinLoop von M. Knieps; 1 und 5 μM).

## 9.7 Mfold-Analyse der Punktmutationen von K21

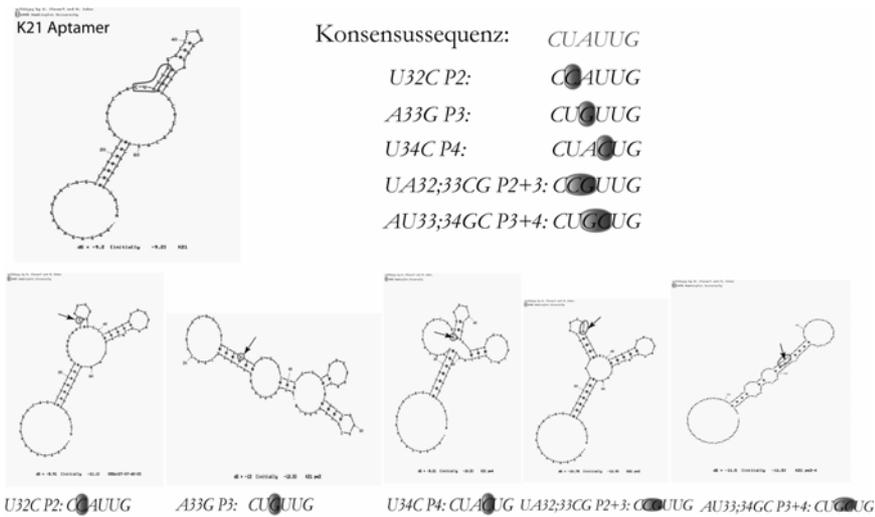


Abbildung 9.7.1: mfold-Analyse der Punktmutationen von K21

## 9.8 Präzipitationsassay des Selektionspuffer für die FHL2-Selektion

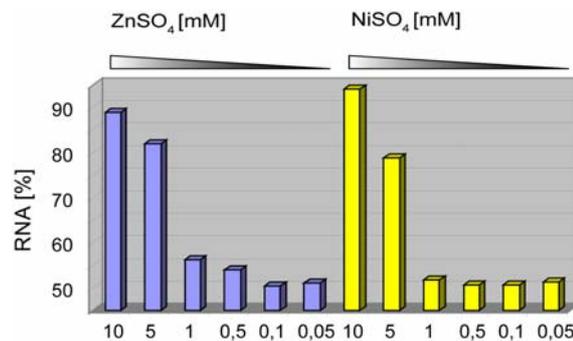


Abbildung 9.8.1: Präzipitationsassay der radioaktiv transkribierten unselektierten RNA-Bibliothek von U. Wüllner mit unterschiedlichen ZnSO<sub>4</sub> bzw. als positiv Kontrolle NiSO<sub>4</sub> Konzentrationen im Selektionspuffer (1 x PBS; 3 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4)

Zur Bestimmung der optimalen ZnSO<sub>4</sub> Konzentration für die FHL2 Aptamers Selektion wurde ein Präzipitationsassay mit der radioaktiv markierten unselektierten RNA-Bibliothek von Ulrich Wüllner (Endkonzentration von 5µM) in 100µL Selektionspuffer (1 x PBS; 3 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4) und einer steigenden Konzentration der ZnSO<sub>4</sub> bzw. NiSO<sub>4</sub> (positiv Kontrolle) von 0,05-10mM durchgeführt. Die unselektierte RNA-Bibliothek wurde in 1 x PBS pH 7,4 zunächst zwei min. auf 95°C erhitzt, anschließend mit 3 mM MgCl<sub>2</sub> versetzt und 15 min. bei RT inkubiert. Es folgte die Zugabe von unterschiedlichen ZnSO<sub>4</sub> bzw. NiSO<sub>4</sub>-Mengen und die weitere Inkubation bei 37°C und 300 Upm. Die Ansätze wurden anschließend bei 14.000 Upm für zehn min. zentrifugiert und die Hälfte in ein anderes Eppendorfreaktionsgefäß übergeführt. Nach der Radioaktivitätsmessung wurden die Werte Prozentual auf Gesamtmenge der Radioaktivität normiert und jeweils der untere Überstand graphisch dargestellt, Abbildung 9.8.1. Wie man sehr gut sehen kann beginnt eine massive Präzipitation der RNA erst bei Konzentrationen größer 1 mM.

## 9.9 Filterbindungen His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 Selektion

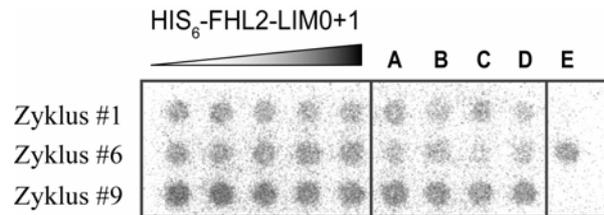


Abbildung 9.9.1 Filterbindung der unselektierten und angereicherten RNA-Bibliothek von Ulrich Wüllner aus der His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 Selektion. His<sub>6</sub>-FHL2-LIM0+1 ist in steigender Konzentration von 0-500 nM mit den radioaktiv markierten RNA-Bibliotheken inkubiert und analysiert worden. Die Kontrollproteine A-D (A: Lysozym; B: Streptavidin, C: His<sub>6</sub>-CYTIP-PDZ, D: PAZ) sind jeweils in der höchsten Konzentration von 500nM eingesetzt worden. Als Transkriptionskontrolle F wurde das Lysozym-Aptamer aus der His<sub>6</sub>-KIAA0403- $\Delta$ N291 N20-Selektion mit aufgetragen, zweite Well.



## 9.10 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
µmol	mikromol
°C	Grad Celsius
ABLIM	<i>actin-binding LIM protein</i>
ACT	<i>activator of cyclic AMP response element modulator (CREM) in the testis</i>
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AG	Arbeitsgruppe
ALP	<i>α-actinin-associated LIM protein</i>
AMD	<i>age-related macular degeneration</i>
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
ARF	ADP-ribosylierungsfaktor
ARNO	<i>ARF nucleotide binding-site opener</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
b	Basen
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel (1 Zerfall pro Sekunde)
BFA	Brefelin A
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CASP	<i>cytohesin associated scaffold protein</i>
CC	coiled-coil
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CH	<i>calponin homology</i>
Ci	Curie (3.7·10 <sup>10</sup> Bq)
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
CMV	Cytomegalovirus
cpm	<i>counts per minute</i>
CRE	<i>cAMP-response-element-binding protein (CREB) response element</i>
CREB	<i>cyclic AMP-responsive element-binding protein</i>
CRP	<i>cysteine-rich proteine</i>
C-TAKT	<i>Cdc25C-associated kinase-1</i>
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
Cybr	<i>cytohesin binder und regulator</i>
Cyt	Cytohesin
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat

dest.	destilliert
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMEM	Dulbecco's Mod Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
ds	<i>double stranded</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemilumineszenz</i>
EDTA	N,N,N',N'-Ethyldiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ELONA	<i>Enzyme-linked oligonucleotide assay</i>
EPLIN	<i>epithelial protein lost in neoplasm</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular-signal-regulated kinase</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS	fetales Kälberserum
FERM	<i>protein 4.1, ezrin, radixin, moesin</i>
FHL2	<b>F</b> our and a <b>H</b> alf <b>L</b> IM domane 2
fmol	femtomol
g	Gramm
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosin-5'-driphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GLY	<i>glycine rich region</i>
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein</i>
GRASP	<i>GRP1-associated scaffold protein</i>
GRP1	<i>general receptor for phosphoinositides 1</i>
GRSP1	<i>GRP1 signaling partner</i>
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
His <sub>6</sub> – Tag	Hexahistidin – Tag
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
hNE	humane neutrophilic elastase
HSP	<i>heat shock protein</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFN- $\gamma$	<i>interferon-<math>\gamma</math></i>
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
IMAC	<i>immobilized metallion affinity chromatography</i>
IMP	<i>impedes mitogenic signal progation</i>
ISL-1	<i>Insulin enhancer protein 1</i>
IPCEF1	<i>interaction protein for cytohesin exchange factors 1</i>
IPTG	Isopropylthiogalactosid

kb	Kilo Basenpaare
kD	Kilodalton
KGF	<i>keratinocyte growth factor</i>
KSR	<i>kinase supressor of Ras</i>
L	Liter
LASP	LIM and SH3 Protein
LFA	<i>lymphocyte function – associated antigen</i>
LIN-11	<i>Lineage protein 11</i>
LIMK	LIM Kinase
LHX	<i>LIM-homeodomain protein</i>
LIM	<u>L</u> in-11, <u>I</u> sl-1 and <u>M</u> ec-3
LMO	<i>LIM only</i>
M	Molar
mA	Milliampere
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MAPKAPK	<i>MAP-kinase activating protein kinase</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MEC-11	<i>Genprodukt mec-11</i>
MEK	<i>MAPK/Erk kinase</i>
mg	Milligramm
min.	Minuten
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSK	<i>mitogen- and stress-activated protein kinase</i>
MW	Molekulargewicht
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
nmol	Nanomole
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>
NP – 40	Nonidet P – 40
nt	Nukleotid
NTA	<i>Nitrilotriaceticacid</i>
NTP	Nukleotid-5'-triphosphat
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDZ	<b>PSD-95</b> = <i>postsynaptic density</i> , <b>DlgA</b> <i>Drosophila separate junction protein disc-large</i> und <i>tight junction protein ZO-1</i>
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PH	Pleckstrin Homologie
PINCH	<i>particularly interesting new cysteine and histidine-rich protein</i>
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PEG	Polyethylenglykol

PKC- $\beta$ II	<i>protein kinase C-<math>\beta</math>II</i>
PLD	Phospholipase D
PLZF	promyelocytischen Leukämie-Zinkfingerprotein
pM	Pikomolar
pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP2A	Protein Phosphatase-2A
PPI	Protein-Protein-Interaktion
PNK	Polynukleotidkinase
PSCDBP	Pleckstrin Homologie, Sec 7 und Coiled-coil Domänen bindende Proteine
PTB	Phosphotyrosine-bindende Domäne
QSAR	<i>quantitative structure-activity relationship</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	<i>Reverse transcription and polymerase chain reaction</i>
RU	<i>Response units</i>
SAGE	<i>serial analysis of gene expression</i>
scFv	<i>single chain variable fragment</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sek.	Sekunde
SELEX	<i>Systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>
SH2	<i>src</i> Homologie
si	<i>small interfering</i>
SIE	<i>sis-inducible element</i>
SOS	<i>son-of-sevenless</i>
SRE	<i>serum response element</i>
SRF	<i>serum response factor</i>
ss	<i>single stranded</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered saline
Tc	Technetium
TCF	<i>ternary complex factor</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin
TK	Transkription
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
tRNA	Transfer-RNA
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
U	<i>unit</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VHP	<i>villin head piece</i>

## 9.11 Danksagungen

Ich danke:

Herrn Prof. Dr. Michael Famulok, Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn, für die Betreuung dieser Dissertation und seine stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. med. Reinhart Büttner, Pathologisches Institut der Universitätsklinik Bonn und der PhD Studentin und GRK804 Stipendiatin Lucia Gullotti für die Kooperation und gute Zusammenarbeit im sehr interessanten Gemeinschaftsprojekt FHL2.

Herrn Priv. Doz. Dr. Thomas Kolter und Herrn Prof. Dr. Joern Piel, Kekulé-Institut für Organische Chemie, sowie Herrn Prof. Dr. med. Reinhart Büttner, Pathologisches Institut der Universitätsklinik Bonn für die Übernahme der Coreferate.

Der DFG für drei Jahre Förderung im Rahmen des Graduiertenkollegs 804 (GRK 804): „Analysis of cell functions by combinatorial chemistry and biochemistry“ und allen am GRK 804 beteiligten Professoren, Stipendiaten und Assoziierten für sehr spannende drei Jahre der interdisziplinären Zusammenarbeit, interessanten Einblicke in andere Forschungsgebiete und der dadurch entstandenen Kooperationen und Freundschaften.

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

Dr. Günter Mayer, Markus Hafner, Anna Jacobs und Andrea Rentmeister für das Korrekturlesen dieser Arbeit und der Unterstützung in der letzten Phase der Arbeit.

Meiner Familie, ohne deren Unterstützung und Förderung vieles nicht möglich gewesen wäre.

Schließlich meinem Lebensgefährten Matthias Christlieb, für seine Liebe, Geduld und Verständnis.

