

Inhibition von Cytohesinen führt zu hepatischer Insulinresistenz

Dissertation

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

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von

Dipl.-Chem Markus Hafner

aus Bonn,

2007

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

1. Referent: Prof. Dr. Michael Famulok
2. Referent: Priv.-Doz. Dr. Thomas Kolter
3. Referent: Prof. Dr. Jörn Piel
4. Referent: Prof. Dr. Waldemar Kolanus

Tag der Promotion: 15.06.2007

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

M. Hafner, A. Schmitz, I. Grüne, S.G. Srivatsan, B. Paul, W. Kolanus, T. Quast, E. Kremmer, I. Bauer und M. Famulok, Inhibition of cytohesins by SecinH3 leads to hepatic insulin resistance, *Nature*, **2006**, 444, 941

Meinen Eltern, in Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	2
2.1	SIGNALTRANSDUKTION VON REZEPTORTYROSINKINASEN	3
2.1.1	<i>Der Insulinsignalweg</i>	5
2.1.1.1	Phosphatidylinositol-3-Kinase	5
2.1.1.2	Proteinkinase B (Akt/PKB).....	6
2.1.1.3	Mitogenaktivierte Proteinkinase-Signalweg (MAPK) und G-Proteine	6
2.1.1.4	SREBP1-c	7
2.1.2	<i>Deregulierter Insulinsignalweg</i>	8
2.1.2.1	Insulinrezeptorknockout in der Leber	9
2.2	CYTOHESINE UND ARF-GTPASEN	10
2.2.1	<i>ARF-GTPasen</i>	10
2.2.2	<i>GEFs und Cytohesine</i>	12
2.3	FUNKTIONSAUFKLÄRUNG VON PROTEINEN UND „CHEMICAL GENOMICS“	15
3	AUFGABENSTELLUNG	21
4	ERGEBNISSE	22
4.1	FLUORESZENZPOLARISATIONSBASIERTER SCREEN FÜR CYTOHESIN-2 INHIBITOREN	22
4.1.1	<i>Fluoreszenzpolarisation</i>	22
4.1.2	<i>Der Fluoreszenzpolarisationsassay</i>	23
4.1.3	<i>Einführung des Fluorophors an das Aptamer</i>	24
4.1.4	<i>Vorbereitung des Screens</i>	25
4.1.4.1	Expression von Cytohesin-2.....	25
4.1.4.2	Polarisationsmessungen mit markiertem Aptamer	26
4.1.4.3	Screen für aptamerverdrängende kleine Moleküle	27
4.1.5	<i>Hit-Validierung</i>	29
4.1.5.1	Versuch einer ersten Abschätzung einer K_D aus dem Verdrängungsassay	29
4.1.5.2	Oberflächenplasmonresonanz (surface plasmon resonance SPR)	30
4.1.6	<i>In vitro GDP/GTP-Austauschassay</i>	32
4.2	ZELLBASIERTE ASSAYS	33
4.2.1	<i>Toxizität</i>	33
4.2.2	<i>SRE-Luciferase-Assays in HeLa-Zellen</i>	34
4.2.3	<i>Quantitative RT-PCR in HepG2</i>	36
4.2.4	<i>Lokalisierung von FoxO-EGFP in HepG2-Zellen</i>	39
4.2.5	<i>GGA3-Pulldown Experimente</i>	40
4.2.6	<i>siRNA Experimente</i>	40
4.2.6.1	Lipofektion von siRNAs gegen die Cytohesine-1-3	41
4.2.6.2	Elektroporation mit Rechteckwellen	42

Inhaltsverzeichnis

4.2.6.3	Lipofektion von siRNAs gegen ARF1 und ARF6	43
4.2.7	<i>Golgi Färbungen</i>	44
4.2.8	<i>Rezeptordichte an der Zelloberfläche</i>	46
4.3	MAUS	47
4.3.1	<i>Nachweis von SecinH3 in der Leber</i>	47
4.3.2	<i>Genexpression</i>	48
4.3.3	<i>Serumparameter</i>	50
5	DISKUSSION	51
5.1	SCREENING MIT FLUORESZENZPOLARISATION.....	51
5.2	SECINH3 IST EIN WERKZEUG ZUR UNTERSUCHUNG DER FUNKTION DER CYTOHESINE IN DER SIGNALTRANSDUKTION	52
5.2.1	<i>MAPK</i>	52
5.2.2	<i>Cytohesine sind fundamental wichtig für die Signalweiterleitung vom Insulinrezeptor</i>	54
5.3	INHIBITION VON CYTOHESINEN IN DER MAUS FÜHRT ZU HEPATISCHER INSULINRESISTENZ	57
5.4	SECINH3 LIEFERT HINWEISE ZUM WIRKMECHANISMUS DER CYTOHESINE.....	60
6	MATERIAL UND METHODEN	65
6.1	ALLGEMEINE METHODEN IM UMGANG MIT PROTEINEN	65
6.1.1	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	65
6.1.2	<i>Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen</i>	66
6.1.3	<i>Immunologische Detektion von Proteinen (Western-Blot)</i>	67
6.1.4	<i>„Stripping“ von Nitrozellulosemembranen</i>	69
6.1.5	<i>Färbung von Proteingelen</i>	70
6.1.5.1	<i>Coomassie-Färbung (Brilliant Blau G 250)</i>	70
6.1.5.2	<i>Silber-Färbung</i>	70
6.1.6	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration</i>	72
6.1.6.1	<i>Photometrische Bestimmung nach Warburg und Christian</i>	72
6.1.6.2	<i>Photometrische Bestimmung nach Bradford</i>	72
6.1.7	<i>Dialyse und Gelfiltration zum Pufferwechsel</i>	73
6.1.8	<i>Chromatographische Methoden der Proteinreinigung</i>	73
6.1.8.1	<i>Affinitätschromatographie über immobilisierte Metallionen (IMAC) an einer FPLC</i>	74
6.1.8.2	<i>Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose</i>	75
6.2	ALLGEMEINER UMGANG MIT NUKLEINSÄUREN	76
6.2.1	<i>Phenol-Chloroform-Extraktion</i>	76
6.2.2	<i>Ethanol-Präzipitation</i>	76
6.2.3	<i>Agarosegelelektrophorese</i>	77
6.2.4	<i>Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	77
6.2.5	<i>Isolierung von Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen</i>	78
6.2.6	<i>Quantifizierung von Nukleinsäuren</i>	79

6.2.7	<i>Polymerasekettenreaktion</i>	80
6.2.8	<i>GMPS-Transkription</i>	82
6.2.9	<i>Fluoreszenzmarkierung der RNA</i>	83
6.3	IN VITRO METHODEN	83
6.3.1	<i>Organisation der Substanzbibliotheken</i>	83
6.3.2	<i>Fluoreszenzpolarisationsmessungen und Screening</i>	84
6.3.3	<i>Oberflächenplasmonresonanz</i>	85
6.3.4	<i>GDP/GTP-Austausch an Arf-Proteinen</i>	85
6.4	EUKARYONTISCHE ZELLKULTUR	87
6.4.1	<i>Allgemeiner Umgang mit eukaryontischer Zellkultur</i>	87
6.4.2	<i>Handhabung von Dauerkulturen</i>	87
6.4.3	<i>Transfektion von Plasmiden in HeLa-Zellen</i>	88
6.4.4	<i>SRE-Luciferase Assay</i>	88
6.4.5	<i>Lokalisierungen von FoxO-EGFP in HepG2-Zellen</i>	89
6.4.6	<i>ARF6-Aktivierungsassay</i>	89
6.4.7	<i>RNA-Isolierung und quantitative PCR</i>	90
6.4.8	<i>siRNA-Transfektion</i>	91
6.4.8.1	<i>Lipofektion</i>	91
6.4.8.2	<i>Elektroporation mit Rechteckwellen</i>	91
6.4.9	<i>Golgi-Färbungen mit siRNAs und kleinen Molekülen</i>	92
6.4.10	<i>Rezeptordichte an der Oberfläche von HepG2-Zellen</i>	93
6.5	MAUSEXPERIMENTE	93
6.5.1	<i>Extraktion und Massenspektrometrischer Nachweis von SecinH3 aus Mäuselebern</i>	93
6.5.2	<i>Genexpression in Mäuselebergewebe</i>	94
6.5.3	<i>Serumparameter</i>	95
6.6	MATERIAL	96
6.6.1	<i>Geräte</i>	96
6.6.2	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	98
6.6.3	<i>Chemikalien</i>	98
6.6.4	<i>Nukleotide</i>	101
6.6.5	<i>Enzyme und Proteine</i>	101
6.6.6	<i>DNA- und Protein Längenstandards</i>	102
6.6.6.1	<i>DNA-Standards</i>	102
6.6.6.2	<i>Protein Standards</i>	103
6.6.7	<i>Kulturmedien, Lösungen und Puffer</i>	103
6.6.7.1	<i>Kulturmedien und Lösungen für Zellkulturarbeiten</i>	103
6.6.7.2	<i>Vorratslösungen und Puffer</i>	104
6.7	KOMMERZIELLE REAKTIONSSYSTEME	106
6.7.1	<i>Plasmide</i>	107
6.7.2	<i>Oligonukleotide</i>	107

Inhaltsverzeichnis

6.7.2.1	Primer	107
6.7.2.2	Aptamere und Bibliothek I-N40	107
6.7.2.3	siRNA	108
6.7.3	<i>Zelllinien</i>	109
7	LITERATUR	110
8	ANHANG - ERGEBNISSE DES SCREENS	121
9	DANKSAGUNG	125

1 Zusammenfassung

G-Proteine sind eine wichtige Klasse von Regulatoren in allen lebenden Systemen. Sie werden durch Guanosinnukleotidaustauschfaktoren (GEFs) aktiviert, die den Austausch von GDP durch GTP katalysieren. Diese Aktivität macht GEFs zu attraktiven Zielen, um krankheitsrelevante G-Protein-kontrollierte Signalnetzwerke zu modulieren. GEF-Inhibitoren sind daher interessante Werkzeuge sowohl zur Aufklärung der Funktion dieser Proteine als auch zur therapeutischen Intervention. Bisher existiert allerdings nur ein bekannter niedermolekularer Inhibitor für GEFs, das Pilztoxin Brefeldin A (BFA).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Aptamerverdrängungsscreen entwickelt, um kleine Moleküle zu finden, die Cytohesine binden und sowohl *in vitro*, als auch in Zellkultur in verschiedenen Assays inhibieren. Cytohesine sind kleine GEFs für ADP-Ribosylierungsfaktoren (ARFs), die bei der Zytoskelettorganisation, der Integrinaktivierung, der Integrinsignalweiterleitung und auch im MAPK-Signalweg eine Rolle spielen.

Die gefundenen kleinen Moleküle binden *in vitro* spezifisch die katalytische Sec7-Domäne der Cytohesine mit Dissoziationskonstanten im hohen nanomolaren Bereich und inhibieren ihre GEF-Funktion mit mikromolaren Inhibitionskonstanten ohne zwischen den Cytohesinen verschiedener Spezies zu diskriminieren.

Anwendung von SecinH3, einem kleinen Molekül, das in einem Screen für Cytohesin-1-Inhibitoren gefunden wurde, in Leberzellkultur, hat gezeigt, daß Cytohesine mit dem Insulinrezeptorkomplex assoziieren und fundamental wichtig für den Insulinsignalweg sind. Mäuse, die mit SecinH3 gefüttert wurden, zeigen erhöhte Expression glukoneogenetischer Gene und reduzierte Expression glykolytischer, fettsäure- und ketonkörpermetabolismusassoziierter Gene. Als Konsequenz ist der Glykogengehalt der Leber signifikant reduziert und der Organismus versucht durch erhöhte Insulinsekretion ins Serum diesen Effekt zu kompensieren. Somit resultiert die Inhibition von Cytohesinen in hepatischer Insulinresistenz. Da Insulinresistenz eine der frühesten pathologischen Veränderungen bei Diabetes Typ 2 ist, zeigen die vorliegenden Resultate das Potential der Anwendung von kleinen Molekülen in der Analyse der komplexen Faktoren, die zur molekularen Pathogenese dieser Krankheit beitragen.

2 Einleitung

Das Überleben und Vermehren jedes Organismus, sei es des einfachsten Bakteriums bis hin zum Menschen ist abhängig davon, daß die in der DNA gespeicherte Information präzise und zum richtigen Zeitpunkt dupliziert, in RNA transkribiert und daraufhin in Proteine translatiert wird.

Dazu ist ein komplexes Zusammenwirken eben dieser Genprodukte erforderlich. Im Menschen rechnet man mit ca. 30.000 proteinkodierenden Genen¹ und durch alternatives Splicing mit einer wesentlich höheren Anzahl an Proteinen. Das Zusammenspiel dieser vielen Proteine zu verstehen, ist eine zentrale Herausforderung für die Molekularbiologie. Neben dem gewonnenen Verständnis der Funktionsweise des Lebens ist es damit möglich die Ursachen einer Vielzahl von Krankheiten aufzuklären und Grundlagen für deren Therapie zu schaffen. Viele Krankheiten, z. B. Diabetes Typ 1² und verschiedene Krebsarten³ können direkt auf Veränderungen, bzw., wie im Fall von Alzheimer und Huntington, auf Missfaltungen oder Aggregation von Proteinen zurückgeführt werden. Vergleich der Gensequenzen gesunder und kranker Menschen, der systematisiert durch das HapMap-Projekt (*Haplotype Map project*) durchgeführt wird^{4, 5}, kann krankheitsrelevante Gene aufspüren. Dabei stellt man fest, daß viele komplexe Krankheiten mit Veränderungen von Komponenten verschiedener Signalwege assoziiert sind.

Im Gegensatz zu Einzellern sind multizelluläre Organismen viel stärker auf eine funktionierende und zuverlässige Kommunikation zwischen einzelnen Zellen und Geweben angewiesen, um den Stoffwechsel und das Wachstum zu koordinieren und sich damit auf die Umgebung anzupassen. Fehlerhafte Kommunikation wiederum führt zu krankhaften Veränderungen der Organismen, wie Krebs, allgemeinen Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes oder zu Fehlentwicklung des gesamten Organismus. Die korrekte Entwicklung eines Organismus beziehungsweise Reaktion auf Veränderungen in der Umwelt benötigen die Ausführung eines komplexen Programms der Aktivierung und Unterdrückung von spezifischen Genen in spezifischen Zellpopulationen und zu präzise definierten Zeitpunkten.

Viele dieser Reaktionen werden von extrazellulären Signalmolekülen wie Wachstumsfaktoren und Hormonen, die an Zelloberflächenrezeptoren docken, gesteuert. Sie lösen daraufhin eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die letztlich eine Veränderung in der Genexpression bzw. dem Stoffwechsel der betroffenen Zelle auslösen.

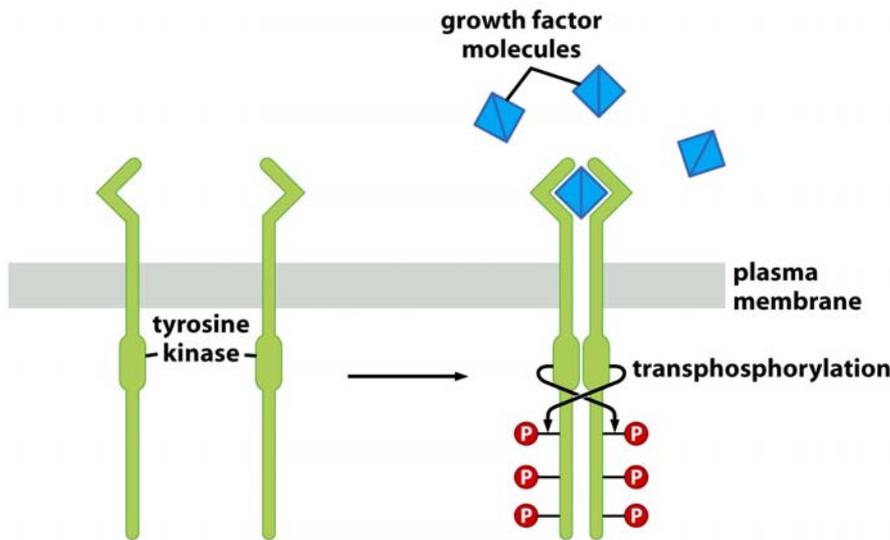


Figure 5-15 The Biology of Cancer (© Garland Science 2007)

Garland Science, 2007).

Abbildung 2: Nach Aktivierung und Dimerisierung des Rezeptors wird die Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors stimuliert und es folgt eine Transphosphorylierung an cytoplasmatischen Tyrosinresten des Rezeptors, an die verschiedene SH2-Domänen tragende Proteine binden können und das Signal weiterleiten (aus R. Weinberg, *Cancer*,

Nach Bindung des Liganden wird die Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors stimuliert, die dann zur Transphosphorylierung an bestimmten cytoplasmatischen Tyrosinresten des Rezeptors führt (Abbildung 2).

An diese Phosphotyrosine werden Proteine, meistens Adaptoren, die SH2-Domänen tragen, rekrutiert, die dann die Signalweiterleitung über verschiedene Signalwege wie den Ras/MAPK-Weg oder den PI3K-Akt-Weg vermitteln (s. Abbildung 3).

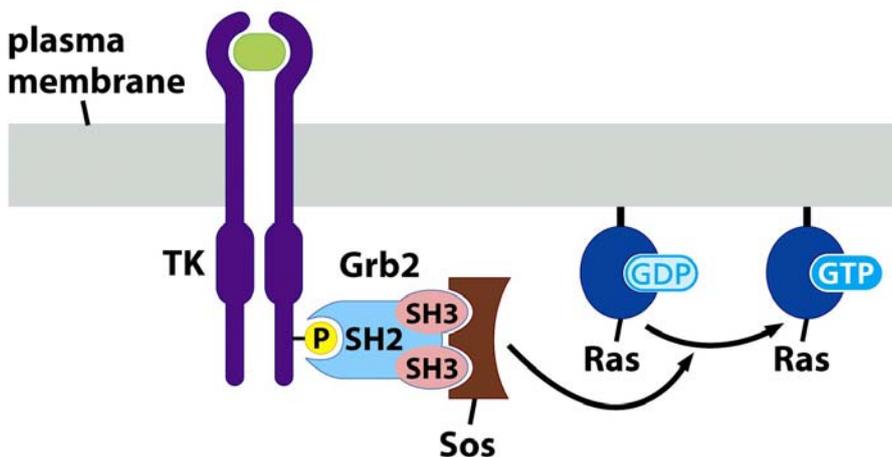
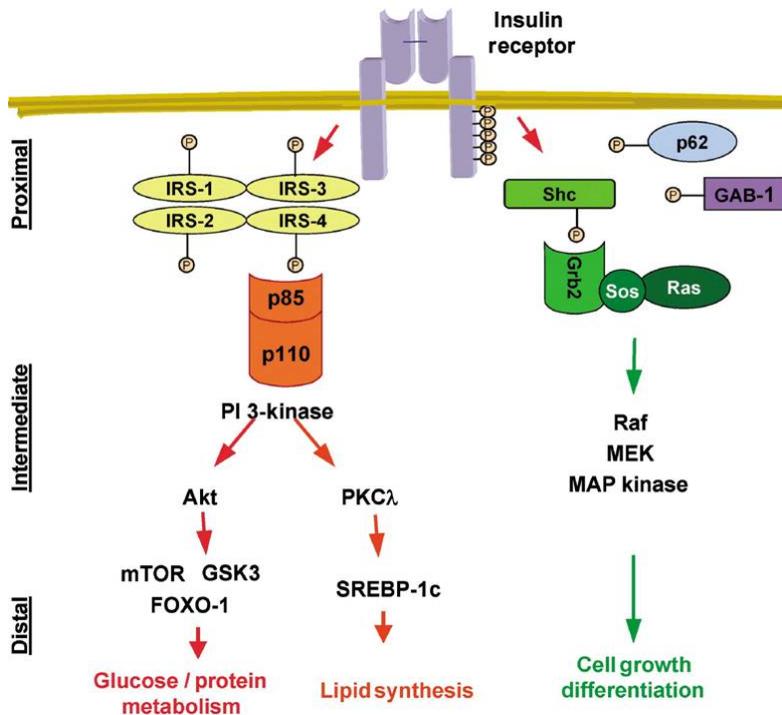


Figure 6-12a The Biology of Cancer (© Garland Science 2007)

Abbildung 3: An die aktivierten und phosphorylierten RTK binden Adaptoren, hier Grb2, das wiederum SOS aktiviert, das Ras aktiviert. Diese Bindung wird über verschiedene SH2-Domänen vermittelt. Die Adaptoren enthalten SH3-Domänen, die wiederum die Rekrutierung anderer Proteine ermöglichen (aus R. Weinberg, *Cancer*, Garland Science, 2007).

2.1.1 Der Insulinsignalweg

Ein prototypischer wachstumsfaktorgesteuerter Signalweg ist der Insulinsignalweg. Er wird ausgelöst durch die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor (IR) auf der Plasmamembran. Nach Ligandenbindung transphosphorylieren sich die intrazellulären Domänen des dimeren Rezeptors,



was einerseits zu einer Erhöhung der Tyrosinkinaseaktivität^{8, 9} und andererseits zu einer Rekrutierung verschiedener Substrate an den Rezeptor führt (s. Abbildung 4).

Abbildung 4: Der Insulinsignalweg (aus Biddinger und Kahn¹⁰). Der Insulinsignalweg beeinflusst viele zelluläre Prozesse, die den Zucker-, Protein und Fettstoffwechsel umfassen, ebenso wie Zellwachstum und -differenzierung. Dies unterstreicht Breite, Komplexität und Bedeutung des Insulinsignalwegs.

Unter den 10 bekannten Substraten befindet sich die Insulinrezeptorsubstratfamilie (IRS), die aus vier Mitgliedern (IRS1-4) besteht¹¹⁻¹⁵. Andere Substrate sind unter Anderem Shc, Cbl, p62dok und Gab-1¹⁶⁻²⁰. Nach Phosphorylierung docken Proteine, die eine SH2-Domäne besitzen, an diese Adaptern und werden dadurch ihrerseits aktiviert oder assoziieren mit anderen stromabwärts gelegenen Signalmolekülen und initiieren damit eine komplexe Kaskade an Ereignissen.

2.1.1.1 Phosphatidylinositol-3-Kinase

Eines der Schlüsselmoleküle im Insulinsignalnetzwerk ist die Phosphatidylinositol-3-Kinase^{21, 22} (PI3K) (s. Abbildung 4). Die PI3K ist ein Heterodimer aus einer regulatorischen, p85²³, und einer katalytischen, p110, Untereinheit. Die p85 beinhaltet verschiedene Domänen, die mit anderen Proteinen interagieren können, unter Anderem zum Beispiel mit den IRS-Proteinen. Die PI3K erfüllt in der Signaltransduktion verschiedene Aufgaben, wovon die wichtigste die Phosphorylierung von Phosphoinositiden an der 3'-Position ist²⁴. An die verschiedenen PIPs

können Proteine, die eine PH-Domäne besitzen, binden und ändern damit entweder ihre subzelluläre Lokalisation oder werden aktiviert.

Daß die PI3K im Insulinsignalweg eine fundamentale Bedeutung hat, erkennt man daran, daß alle Insulineffekte auf den Glukosetransport und –metabolismus sowie auf die Lipogenese durch Inhibitoren bzw. dominant-negative Mutanten der PI3K unterdrückt werden^{21, 25}.

Wichtige von der PI3K aktivierte Proteine sind Serin/Threonin-Kinasen wie die PKC oder die PDK1, die ihrerseits die Proteinkinase B^{21, 25} (Akt oder PKB) phosphoryliert und damit aktiviert.

2.1.1.2 Proteinkinase B (Akt/PKB)

Die Akt wirkt ihrerseits wieder auf zahlreiche intrazelluläre Proteine. Sie phosphoryliert und deaktiviert damit die Glykogensynthasekinase 3 (GSK3)²⁶, was eine Aufhebung der Repression, also eine Stimulation der Glykogenproduktion bedeutet. Zusätzlich wird von der Akt die Transkriptionsfaktorenfamilie FoxO phosphoryliert, was ihre Translokation aus dem Nukleus ins Cytoplasma stimuliert und damit die Transkription von verschiedenen Genen der Gluconeogenese wie der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) oder der Glucose-6-phosphatase²⁷ (G6P) verhindert. Die insulinstimulierte Glukoseaufnahme durch Aktivierung des GLUT4-Transporters²⁸ wird ebenfalls durch die Akt vermittelt.

Insulin reguliert über die Akt nicht nur den Zuckerstoffwechsel, sondern auch die Proteinsynthese, hier durch Aktivierung des Proteins *mammalian target of rapamycin* (mTOR) und zwar durch Phosphorylierung und folgende Inhibierung des mTOR-Repressors TSC2. mTOR reguliert, assoziiert an Raptor, die p70 ribosomale S6-Kinase, die das ribosomale S6-Protein und damit die Ribosombiosynthese aktiviert²⁹⁻³¹.

Neben der Akt stimuliert die PI3K auch die Aktivierung der atypischen Varianten der PKC, die ebenso wie die Akt für die Glukoseaufnahme bedeutsam sind, denn Überexpression der PKC λ resultiert in einer insulinunabhängigen Translokation von GLUT4 an die Plasmamembran, während dominant-negative Mutanten der PKC λ die Glukoseaufnahme hemmen³²⁻³⁴.

2.1.1.3 Mitogenaktivierte Proteinkinase-Signalweg (MAPK) und G-Proteine

Ein weiterer fundamentaler Signalweg, der von Insulin aktiviert wird, ist der MAP-Kinase-Signalweg^{35, 36}. Die nach Stimulation an den Insulinrezeptor rekrutierten Adaptoren Shc, Gab1 und auch die IRS binden ein weiteres Adaptorprotein, Grb2, das den Austauschfaktor für das kleine G-Protein Ras, SOS, bindet und aktiviert.

G-Proteine der Ras-Überfamilie sind monomere kleine GTP-bindende Proteine, die zwischen einem aktiven GTP-gebundenen AN-Zustand und einem inaktiven GDP-gebundenem AUS-Zustand wechseln. Die Aktivierung von Ras-Proteinen erfolgt über so genannte Guanosinnukleotidaustauschfaktoren (*guanosine exchange factors*, GEF), die den Austausch von GDP durch GTP katalysieren (s. Abbildung 5). Daraufhin ändert sich die Konformation der GTPasen und sie sind in der Lage andere Proteine wie verschiedene Kinasen zu aktivieren, die weiter stromabwärts in der Signalkaskade sind. Da die GTPasen eine sehr schwache intrinsische Hydrolyseaktivität besitzen, bleiben sie so lange aktiv, bis so genannte GTPase aktivierende Proteine (GAPs) die Hydrolyse des GTP zu GDP katalysieren (s. Abbildung 5).

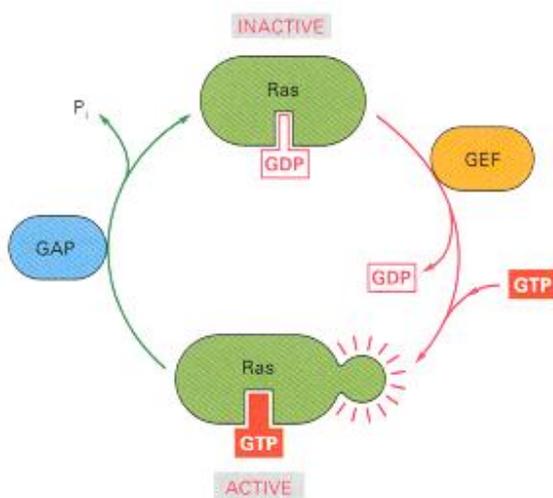


Abbildung 5: Der Ras-Zyklus als prototypischer Lebenszyklus einer kleinen GTPase. Im inaktiven Zustand liegt Ras GDP-gebunden vor. Guanosinnukleotidaustauschfaktoren (GEFs) katalysieren den Austausch des GDP durch ein GTP, womit Ras in seinen aktiven Zustand überführt wird. Die intrinsische GTPase-Aktivität der kleinen GTPasen reicht nicht, um GTP zu hydrolysieren. Erst nach Interaktion mit einem GTPase-aktivierenden Protein (GAP) wird das GTP zu GDP hydrolysiert und Ras in seinen inaktiven Zustand überführt.

Aktiviertes Ras startet eine Phosphorylierungskaskade an verschiedenen Kinasen, Raf, MEK und als letztes ERK, die verschiedene Substrate im Cytoplasma phosphorylieren, bzw. in den Nukleus translozieren und dort durch Phosphorylierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren die Expression von so genannten „*immediate early genes*“ stimulieren.

2.1.1.4 SREBP1-c

Der Einfluß von Insulin auf die Expression von Genen des Glukosemetabolismus scheint im Großen und Ganzen über die Transkriptionsfaktoren der FoxO-Familie gesteuert zu werden. Im Gegensatz dazu wird der Einfluß auf den Lipidstoffwechsel über die Transkriptionsfaktoren Sterolregulatorisches Element Bindendes Protein (SREBP) vermittelt³⁷⁻³⁹.

Die in Leber- und Fettgewebe überwiegend vorliegende Isoform SREBP-1c ist in der Lage das gesamte Programm der Fettsäuresynthese zu aktivieren und ist auch, zwar weniger als FoxO, in der Lage die Genexpression von Zuckerstoffwechselgenen zu steuern.

Insulin reguliert die SREBPs auf allen Ebenen: ihre Gentranskription, ihre posttranslationale Modifizierung und ihre Aktivität^{40, 41}.

2.1.2 Deregulierter Insulinsignalweg

Die fundamentale Bedeutung der von den RTKs ausgehenden Signalwege für den Stoffwechsel und die Entwicklung eines Organismus bedeutet aber auch, daß bei Deregulation von Komponenten dieser Signalwege diverse Erkrankungen, insbesondere Krebs oder Stoffwechselerkrankungen wie *Diabetes mellitus* auftreten werden.

Diabetes mellitus ist nach Herz-Kreislauferkrankungen und Krebs die führende Todesursache in den USA und anderen Industrienationen. Diese Krankheit entsteht, wenn Insulin entweder nicht in genügenden Mengen sezerniert wird oder die Zielzellen nicht effizient genug stimuliert. Als Konsequenz steigen die Blutglukosewerte und man spricht von Hyperglykämie. Trotz des abnorm hohen Blutglukosespiegels fangen die Zellen an zu „hungern“, denn die insulinstimulierte Glukoseaufnahme wird verhindert. Die gleichzeitig erhöhte Triacylglycerolhydrolyse, Fettsäureoxidation und Ketonkörperbildung resultieren in einer stark erhöhten Belastung des Organismus.

Man unterscheidet grob zwischen zwei verschiedene Formen von Diabetes: dem insulinabhängigen Diabetes Typ 1, der am häufigsten in der Jugend auftritt und dem Diabetes Typ 2, dem sogenannten Altersdiabetes.

Diabetes Typ 1 tritt auf, wenn die β -Zellen des Pankreas, die Insulin sezernieren, zugrundegehen oder defekt sind, meistens aufgrund einer Autoimmunreaktion. Die Symptome von Diabetes Typ I können mit der Verabreichung von Insulin behandelt werden, denn die Zellen der Zielgewebe des Insulins reagieren normal auf die Hormonstimulation, im Gegensatz zu denen von Patienten mit Diabetes Typ 2, von dem 90 % der Diabetiker betroffen sind. In den USA sind 18 % der Menschen über 65 Jahren von dieser Krankheit betroffen. Welche Rolle eine genetische Prädisposition spielt ist nicht klar, aber es ist eine klare Korrelation zwischen Fettleibigkeit und dem Ausbruch der Krankheit vorhanden. Die Symptome werden offensichtlich durch die Unfähigkeit der Zielgewebe, auf Insulin zu reagieren, erzeugt.

Eine Vorstufe der Entwicklung von Diabetes Typ 2 scheint ein Syndrom zu sein, das man als metabolisches Syndrom bezeichnet und das gekennzeichnet ist durch Insulinresistenz^{10, 42-47} und Fettleibigkeit⁴⁸.

Mit Insulinresistenz bezeichnet man eine Gruppe von Symptomen zu denen Glukoseintoleranz, Dyslipidemie und Bluthochdruck gehören und damit einher geht ein stark erhöhtes Risiko für Diabetes Typ 2, Herz-Kreislauf-erkrankungen, Krebs und anderen Erkrankungen mit sich bringen.

Die Verbreitung des metabolischen Syndroms nimmt in den westlichen Industrienationen mit einer alarmierenden Geschwindigkeit zu. In den USA sind zum Beispiel 27 % der erwachsenen Bevölkerung davon betroffen. 50 % der stark übergewichtigen Kinder haben dieses Syndrom schon entwickelt¹⁰.

Es ist zwar viel bekannt über die Ursachen von Fettleibigkeit und Diabetes Typ 2, dennoch sind die molekularen und pathophysiologischen Faktoren, die diese Erkrankungen mit der Insulinresistenz verknüpfen, nicht wirklich verstanden.

Um die Bedeutung der einzelnen Komponenten des Insulinsignalwegs bei der Entwicklung dieser Krankheit zu verstehen, wurden in der vergangenen Zeit verschiedene Strategien wie genetischer Knockout und RNA-Interferenz angewendet.

Es wurden dabei sowohl die proximalen Komponenten des Insulinsignalwegs, wie die Rezeptoren und die Insulinrezeptorsubstrate, als auch die intermediären (PI3K, Akt) und distalen Komponenten (SREBP1c, FoxO) gewebespezifisch ausgeknockt. Dabei zeigt sich ein sehr komplexes Bild der Beiträge der einzelnen Gene und Gewebe zur Entwicklung der Krankheit.

2.1.2.1 Insulinrezeptorknockout in der Leber

Während der komplette Knockout des Insulinrezeptors Insulinresistenz in allen Geweben erzeugt und zu unkontrolliertem Diabetes und Tod führt, erzeugt der gewebespezifische Knockout des IR unterschiedliche Insulinresistenzsyndrome.

Der IR wurde bisher in Mäusen in allen wichtigen Zielgeweben von Insulin ausgeschaltet: in Leber⁴⁹ (LIRKO), Muskel (MIRKO)⁵⁰⁻⁵², Fett (FIRKO)⁵³⁻⁵⁵, den β -Zellen der Pankreas (β IRKO)^{56, 57}, im vaskulären Endothel (VENIRKO)⁵⁸, in Neuronen (NIRKO)^{59, 60} und im Hypothalamus (HIRKO)⁶¹. Dabei manifestieren sich entsprechend der unterschiedlichen physiologischen Funktionen der Gewebe ganz unterschiedliche Symptome.

Die Leber spielt im Zucker- und Fettstoffwechsel des Organismus eine zentrale Rolle und hepatische Insulinresistenz wird als hauptverantwortlich bei der Entwicklung der „Hunger-Hyperglykämie“ angesehen. Um den Beitrag der Leber bei der Entwicklung von Insulinresistenz und Diabetes Typ 2 besser abschätzen zu können wurden in Mäusen Leberinsulinrezeptorknockouts (LIRKO) konstruiert⁴⁹. Der Verlust des Insulinsignalwegs in der Leber führt dazu, daß die Mäuse im gehungerten Zustand eine milde und im gefütterten Zustand eine ausgeprägte

Hyperglykämie entwickeln, trotzdem der Insulinspiegel im Serum im Vergleich zu Kontrolltieren bis zu 20-fach erhöht ist. Die Veränderungen in der Glukosetoleranz scheinen durch die Unfähigkeit der Leber, die Gluconeogenese zu stoppen, hervorgerufen zu werden. Bei der stark veränderten Genexpression bei LIRKO-Mäusen werden unter Anderem die zwei Schlüsselenzyme der Gluconeogenese, die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) und die Glukose-6-Phosphatase erhöht exprimiert.

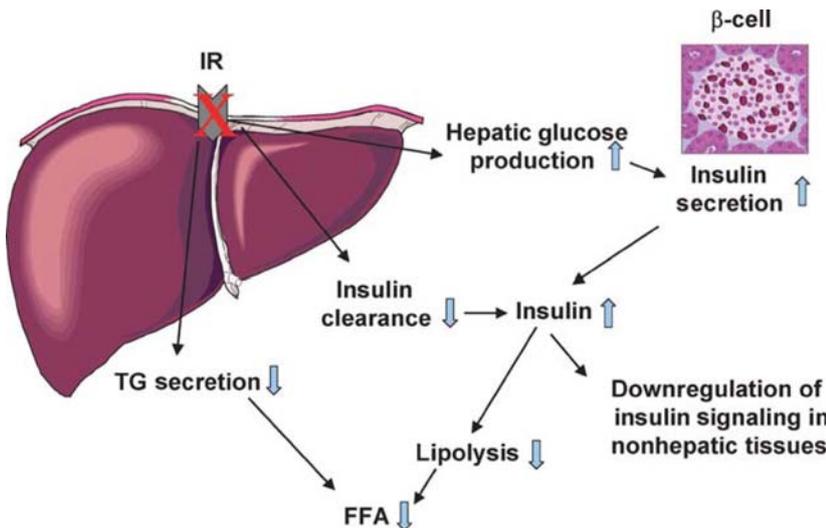


Abbildung 6: Physiologie der rein hepatischen Insulinresistenz (aus Biddinger und Kahn¹⁰). Knockout des IR in der Leber ist mit erhöhter hepatischer Glukoseproduktion und gesenktem Insulinabbau verbunden und führt damit zu Hyperinsulinämie und erhöhter peripherer Insulinresistenz bei gleichzeitig gesenkter Triglyceridsekretion. Das resultiert letztlich in Hyperglykämie mit gesenkten freien Fettsäuren und Triglyceriden.

Zusätzlich zur Glukoseintoleranz haben LIRKO-Mäuse einen gesenkten Triglyceridspiegel sowie weniger freie Fettsäuren im Serum. Dies wird einerseits durch erniedrigte Sekretion von Triglyceriden durch stark gesenkte Fettsäuresynthese bei fehlendem Insulinsignal, sowie durch gesenkte Lipolyse hervorgerufen. Die physiologischen Effekte der hepatischen Insulinresistenz nach Insulinrezeptorknockout werden in Abbildung 6 zusammengefaßt.

2.2 Cytohesine und ARF-GTPasen

2.2.1 ARF-GTPasen

ADP-Ribosylierungsfaktoren (ARF) sind monomere GTPasen und gehören zur Ras-Superfamilie. In Säugerzellen wurden sechs verschiedene ARF-GTPasen identifiziert. Die Hauptfunktion der ARF-Proteine besteht in der Regulation des Vesikeltransports, es wurde auch eine Beteiligung an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts und Interaktionen mit Enzymen des Phospholipidmetabolismus (PI-Kinasen, PLD) nachgewiesen⁶².

Einzelne ARF-Proteine regulieren in unterschiedlichen Zellkompartimenten unterschiedliche Teile des Vesikeltransports. So sind ARF1-3 im Golgi-Apparat und den Endosomen aktiv und

ARF6 an der Plasmamembran. ARF4 und -5 werden mit dem Trans-Golgi-Netzwerk in Verbindung gebracht^{63, 64}.

Wie alle Ras-GTPasen ist auch ARF ein molekularer Schalter, der entweder in einer inaktiven GDP- oder einer aktiven GTP-gebundenen Form vorliegt. Dabei katalysieren Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF) die Dissoziation von GDP aus dem Komplex mit ARF. Ein GTP tritt daraufhin in die freie Nukleotidbindestelle ein und aktiviert ARF. Der Austausch findet an der Oberfläche von Membranen statt, an die sowohl ARF-GDP, als auch der Austauschfaktor rekrutiert werden (s. Abbildung 7). Die Rekrutierung von ARF-GTP findet über eine Myristoylgruppe statt, die sich am Ende einer N-terminalen 17 aa α -Helix befindet. Wird ARF um diese Helix verkürzt (Δ 17ARF), geht die Fähigkeit zur Membranassoziation vollständig verloren⁶⁵.

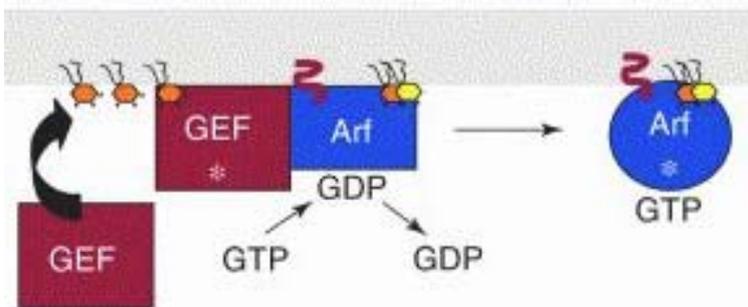


Abbildung 7: Aktivierung von PH-Domänenhaltigen Guanosinaustauschfaktoren führt zu deren Aktivierung und Translokation zur Membran, wo sie den Austausch von GDP zu GTP an ARFs katalysieren, die dadurch wiederum aktiviert werden.

Der Guaninnukleotidaustausch⁶⁶ führt zu einer Exposition verschiedener hydrophober Reste an der Oberfläche von ARF-GTP, welche zusätzlich mit der Membran in Wechselwirkung treten und dadurch die Assoziation verstärken⁶⁷. Gleichzeitig erfolgt die Bindung von sog. „coat“-Proteinen wie Clathrin oder COPI. Daraufhin knospt sich die Membran aus und Vesikel werden abgeschnürt. Nach Ablösung des Vesikels erfolgt die Deaktivierung von ARF-GTP durch Hydrolyse zu GDP. Hierzu ist die Assoziation von sog. „GTPase aktivierenden Proteinen“ (GAP) notwendig, da die intrinsische GTPase-Aktivität von ARF sehr niedrig ist⁶⁸.

ARF-GEF werden nach ihrem Molekulargewicht in große und kleine GEF unterteilt. Dabei regulieren die großen GEF den Vesikeltransport im ER-Golgi System, während die kleinen GEF im Endosomen-Plasmamembran System aktiv sind⁶⁹. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der humanen ARF-GEF und deren intrazellulären Lokalisierung.

Austauschfaktor	Masse [kD]	ARF- Spezifität	Lokalisierung	Referenz
BIG1/2**	190/200	ARF1,-3	Golgi	Yamaji et al. ⁷⁰
GBF1**	206	ARF1,-3,-5	Golgi	Claude et al. ⁷¹
EFA6**	71	ARF6	PM	Franco et al. ⁷²
ARF GEP 100**	100	ARF6	Zellperipherie	Someya et al. ⁷³
Cytohesin-1*	47	ARF1	PM, Golgi	Kolanus et al. ⁷⁴
Cytohesin-2*	47	ARF1,-6	PM	Chardin et al. ⁷⁵
Cytohesin-3*	47	ARF1,-6	PM	Franco et al. ⁷⁶
Cytohesin-4*	47	ARF1,-6	n.b.	Ogasawara et

Tabelle 1: Übersicht der verschiedenen ARF-GEF in *homo sapiens*. n.b.: nicht bestimmt; (**) großes GEF; (*) kleines GEF. PM: Plasmamembran.

2.2.2 GEFs und Cytohesine

Die kleinen Guanosinnukleotidaustauschfaktoren für die ARFs, Cytohesine, sind eine in Metazoa hochkonservierte Klasse von Proteinen. Man findet sie in Organismen vom Fadenwurm über *Drosophila melanogaster* bis hin zu *Homo sapiens* (s. Abbildung 8).

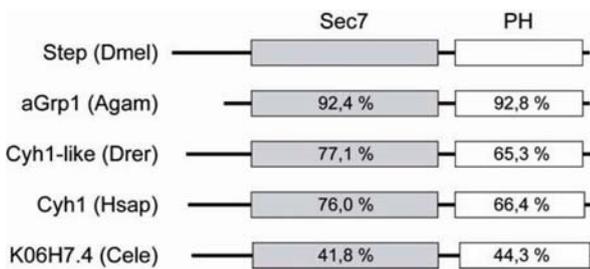


Abbildung 8: Cytohesine sind in Metazoa hochkonserviert (aus Fuß et al.⁷⁸). Die Sec7-Domäne (grau) und die PH-Domäne (weiß) sind von der Taufliege *Drosophila melanogaster*, der Malaria mücke *Anopheles gambiae*, dem Zebrafisch *Danio rerio*, dem Mensch *Homo sapiens* über den Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* zu über 40 % identisch.

In Säugern kennt man vier Mitglieder der Cytohesin-Familie: Cytohesin-1⁷⁹, Cytohesin-2 (ARNO)⁷⁵, Cytohesin-3 (GRP1/ARNO3)^{76,80,81} und Cytohesin-4⁷⁷.

Cytohesine sind 47 kD große multifunktionale Proteine bestehend aus einer Sec7-Domäne (~ 200 Aminosäuren), die den GDP/GTP-Austausch an ARFs katalysiert, einer PH-Domäne (Pleckstrin-Homologie, ~100 Aminosäuren), die über Bindung von PIPs die Bindung an die Membran ermöglicht, einer coiled-coil-Domäne (~ 60 Aminosäuren), welche als Interaktionsplattform für andere Proteine fungiert, und einer C-terminalen-Domäne (~ 30 Aminosäuren), in der sich im Falle von Cytohesin-1 und -2, und -4 PKC-Phosphorylierungsstellen befinden (s. Abbildung 9).

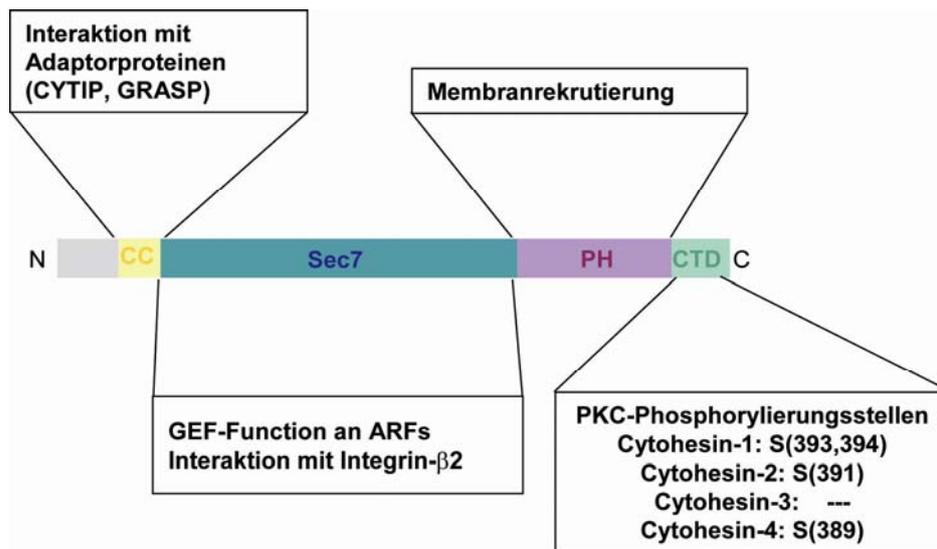


Abbildung 9: Struktur der Cytohesine mit den Interaktionspartnern der einzelnen Domänen. Gelb: Coiled-coil-Domäne mit den möglichen Interaktionspartnern Cybr⁸², CYTIP⁸³, CASP⁸⁴ und IPCEF1⁸⁵; blau: Sec7-Domäne mit den möglichen Interaktionspartnern Arf1/5/6, ARD1⁸⁶, und LFA-1⁸⁷; violett: PH-Domäne, Interaktion mit PIPs; grün: C-terminale Domäne mit Phosphorylierungsstellen.

Cytohesine werden mit verschiedenen fundamentalen biologischen Funktionen in Zusammenhang gebracht, wie Zellausbreitung⁸⁷, Adhäsion⁷⁴, Chemotaxis⁸⁸, Proteintransport^{89, 90} und Umstrukturierung des Zytoskeletts⁹¹.

Kolanus et al⁷⁴ haben gezeigt, daß Cytohesin-1 in Immunzellen nach Stimulation mit Chemokinen direkt mit der intrazellulären Domäne der β 2-Untereinheit (CD18) von LFA-1

(*Leukocyte functional antigen-1*) interagiert und dadurch dessen Bindung an ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) unterstützt und daher von fundamentaler Bedeutung im „inside-out signaling“ sind⁶⁶.

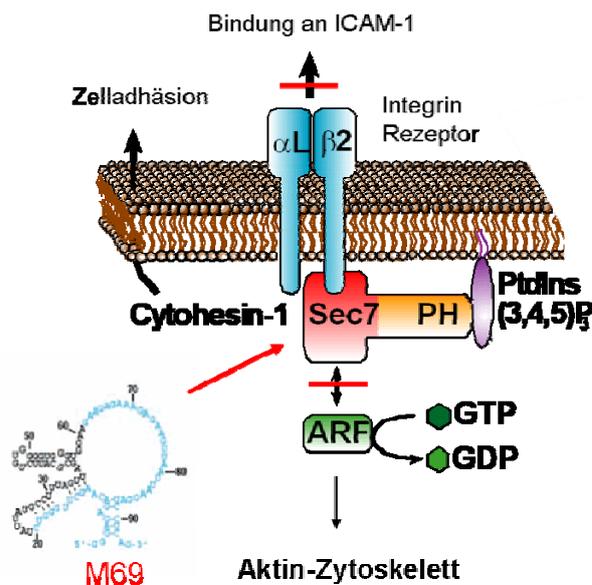
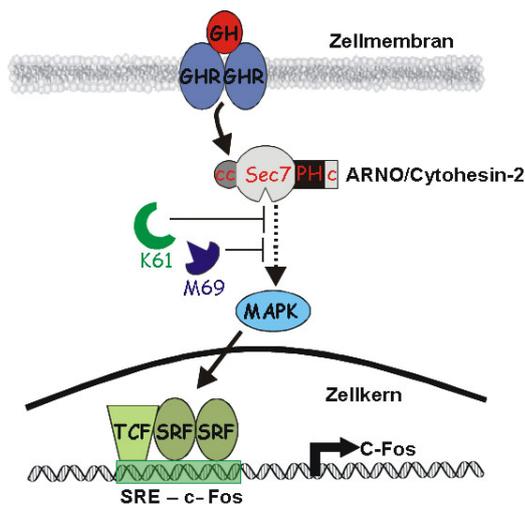


Abbildung 10: Modell für die Interaktion von Cytohesin-1 mit LFA-1 und die Inhibierung durch das M69-Aptamer. Durch Bindung von M69 an Cytohesin-1 wird sowohl die Interaktion von LFA-1 (Integrinrezeptor) an ICAM-1 als auch der Austausch von GDP zu GTP an Arf-Proteinen inhibiert.

Mit der austauschinaktiven Mutante von Cytohesin-1 (E157K) wurde gezeigt, daß ein funktionierender GDP/GTP-Austausch für die Zelladhäsion nötig ist⁸⁷. Dieses Resultat wird

bestätigt durch den Einsatz des Aptamers M69, selektiert von G. Mayer et al⁹², der spezifisch die Sec7-Domäne von Cytohesinen bindet und sie inhibiert, aber mit großen GEF wie dem Gea2⁹³ aus Hefe nicht interagiert.

Von Perez et al⁹⁴ wurde gezeigt daß Cytohesin-1 ebenso im „outside-in signaling“ der Immunzellen eine zentrale Rolle spielt. Die Stimulation von LFA-1 führt zu einer Aktivierung der MAP-Kaskade und darauf folgender Produktion von Interleukin-2 und anderen Chemokinen. Antikörper die den C-Terminus von Cytohesin-1 blockieren inhibieren diese Signaltransduktion.



Eine fundamentale Eigenschaft der Cytohesine scheint ihre Bedeutung für Signaltransduktion von verschiedenen Rezeptoren zu sein.

Abbildung 11: Modell für die Rolle von Cytohesin-2 als ein Effektor der serumvermittelten Aktivierung über den MAPK-Signalweg. Die Applikation des Aptamers K61 oder einer für Cytohesin-2 spezifischen siRNA führt zu einer Inhibition der Stimulation der Transkriptionsaktivierung von c-Fos. Abkürzungen: GH = growth hormone, GHR = growth hormone receptor, TCF = ternary complex factor, SRF = serum response factor⁹⁵.

Durch den Einsatz eines weiteren Aptamers, K61⁹⁵, das spezifisch Cytohesin-2 bindet, wurde gezeigt, daß in HeLa-Zellen der MAP-Signalweg über Cytohesin-2 läuft. Die Inaktivierung von Cytohesin-2 durch das K61-Aptamer oder das Pan-Cytohesin-Aptamer M69 oder einer entsprechenden siRNA bzw. der Überexpression der nicht austauschfähigen Mutante Cytohesin-2 (E156K⁹⁶) führt zu einer Inhibition der Stimulation der Transkriptionsaktivierung durch das Serum Response Element (SRE) (s. Abbildung 11).

Ihre Rolle als Effektoren in von Rezeptortyrosinkinasen vermittelten Signalwegen wird durch Überexpressionsstudien weiter unterstützt: In Adipocyten wird überexprimiertes Cytohesin-2 nach Insulinstimulation an die Zellmembran⁹⁷ rekrutiert, wo es mit überexprimiertem ARF1 kolokalisiert und die Aktivierung der Phospholipase D ermöglicht⁹⁸.

Die Cytohesine spielen nicht nur eine Rolle in der von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) vermittelten Signaltransduktion, denn es wurde gezeigt, daß Cytohesine zusammen mit den ARFs mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren^{99, 100}, mit ATPasen¹⁰¹, sowie nuklearen Rezeptoren¹⁰² interagieren.

Viele der Erkenntnisse zur Funktion von ARFs verdankt man dem Einsatz des bisher einzigen bekannten Inhibitors für GEFs, dem Pilzmetaboliten Brefeldin A. Er inhibiert den von Sec7-Domänen katalysierten GDP/GTP-Austausch an Arf-Proteinen (ADP-Ribosylierungsfaktoren)^{103, 104} an der Golgimembran. Beim Austausch bindet die Sec7-Domäne an den Arf-GDP-Komplex. Dadurch kommt es zu einer Umfaltung im Protein und GDP kann gegen GTP ausgetauscht werden¹⁰⁵.

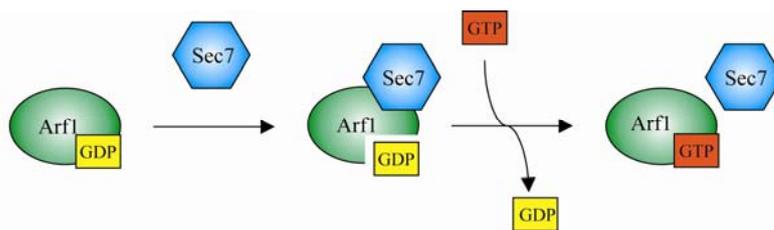


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Austausches von GDP zu GTP an Arf1 katalysiert durch die Sec7-Domäne. Die Sec7-Domäne bindet an Arf-GDP. Dadurch kommt es zu einer Umfaltung des Proteins; das GDP wird aus dem Komplex entlassen und GTP kann eintreten.

Brefeldin A bindet gleichzeitig an die Sec7-Domäne und Arf und friert den ternären Arf-GDP-Sec7-Komplex ein^{106, 107}. Dabei hat BFA eine Präferenz für die ARF-Sec7-Komplexe, die mit Sec7-Domänen großer GEFs mit einer Größe von ungefähr 200 kD wie BIG1¹⁰⁸ oder Gea2⁹³ gebildet werden. Die kleinen GEFs mit einer Größe von ca. 50 kD wie die Cytohesine werden von BFA erst nach Einführung von Punktmutationen gehemmt¹⁰⁹. In analoger Weise wäre daher die Entwicklung eines kleinen Moleküls, das die kleinen GEFs hemmt sehr instruktiv.

Die Untersuchung der Cytohesine in Zellkultur hat bisher ergeben, daß diese Proteinklasse in diversen zellulären Funktionen eine wichtige Rolle spielt. Bisher fehlt eine umfassende und vereinigende Erklärung, wie die sehr diversen Funktionen von diesen kleinen Proteinen ausgeführt werden können. Dazu kann die konzertierte Anwendung verschiedener Methoden der Funktionsaufklärung von Proteinen weiterhelfen.

2.3 Funktionsaufklärung von Proteinen und „chemical genomics“

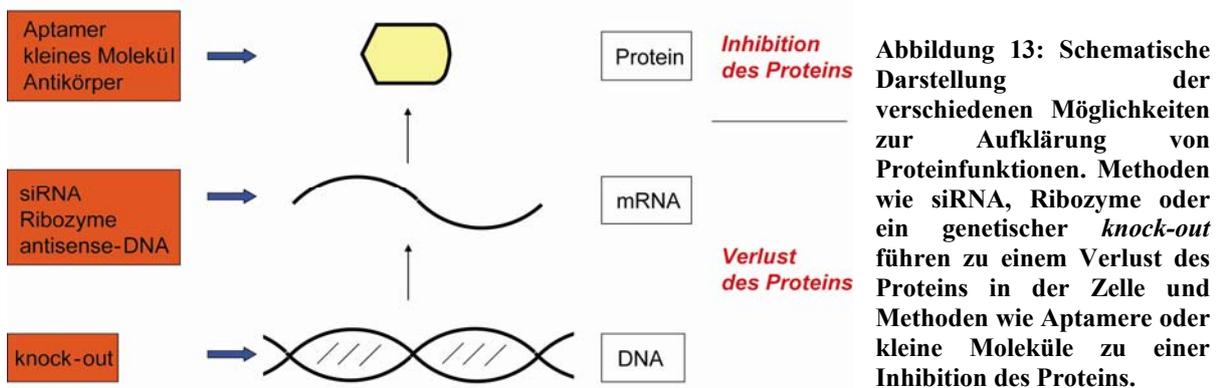
Ein erster Schritt zu einer Funktionsaufklärung von Proteinen ist es, mit Hilfe verschiedener Methoden wie der Realtime-PCR^{110, 111}, Northern-Blots¹¹², Microarrays¹¹³, zweidimensionaler Gelelektrophorese und der Massenspektrometrie¹¹⁴, das vom Organ und dem Entwicklungsstadium eines Organismus abhängige Expressionsprofil zu bestimmen, da verschiedene Proteine in verschiedenen Geweben unterschiedliche Aufgaben übernehmen. Protein-Protein-Interaktionspartner können mit TAP (*tandem affinity purification*)¹¹⁵, Koimmunopräzipitation und „*yeast two-hybrid screens*“^{116, 117} gefunden werden. Dadurch können bisher unbekannte

Einleitung

Proteine eventuell in einen bekannten Proteinkomplex eingeordnet werden. Allerdings liefern diese Methoden nur begrenzte Information über eine mögliche Funktion.

Eine Möglichkeit, Aufschluß über die Funktion eines Gens bzw. seines Produkts zu finden, ist eine *loss of function*-Analyse, bei der der nach Verlust bzw. Inhibition des Proteins entstehende Phänotyp charakterisiert wird.

Das kann auf verschiedenen Ebenen durchgeführt werden: durch gezielte Mutation oder Deletion des Gens¹¹⁸⁻¹²⁰, durch Abbau der mRNA durch siRNA^{121, 122}, Ribozyme¹²³⁻¹²⁵/DNAzyme^{126, 127}, antisense Oligonukleotide^{128, 129} und durch direkte Inhibierung der Proteine mit kleinen Molekülen^{130, 131}, Antikörpern¹³² oder Aptameren^{133, 134} (Abbildung 13).



Beim genetischen *knock-out* werden, überwiegend in Mäusen und Fruchtfliegen als Modellsysteme für den Menschen^{135, 136}, gezielt Gene durch Deletion innerhalb der Genomsequenz ausgeschaltet und der resultierende Phänotyp untersucht¹³⁷⁻¹⁴⁰.

Das Expressionsprofil eines Gens wird verändert durch drei gut etablierte Methoden, die zu einer Degradation (oder Blockierung) der mRNA führen und damit die Translation des Proteins verhindern: antisense Deoxynukleotide (antisense Technologie), Ribozyme und siRNA (*small interfering RNA*).

Die „antisense Technologie“ basiert auf der Hybridisierung von DNA-Oligonukleotiden (15-20 Nukleotide lang) mit der komplementären mRNA oder pre-mRNA-Sequenz, was zu einer RNaseH vermittelten Spaltung des mRNA/DNA-Hybrids führt¹⁴¹. Den ersten Hinweis, daß antisense Oligonukleotide für eine spezifische Geninhibition genutzt werden können, erbrachten 1978 Zamecnik und Stephenson^{142, 143}, indem sie mit einem 13-mer Oligonukleotid die Vermehrung des *Rous sarcoma* Virus inhibierten.

Ribozyme sind katalytisch wirksame RNA-Moleküle, die so konstruiert werden können, daß sie sequenzspezifisch andere RNA-Moleküle spalten. Die Fähigkeit von RNA als Katalysator zu

dienen, konnte zum ersten Mal am Beispiel des selbstsplicende Group1-Introns von *Tetrahymena thermophila* gezeigt werden¹⁴⁴. Die zum gezielten Ausschalten eines Gens am häufigsten verwendeten Ribozyme sind das Hammerhead-Ribozym und das Hairpin-Ribozym¹⁴⁵, die beispielsweise dazu verwendet wurden, um HIV-LTR¹⁴⁶ zu inhibieren.

RNA Interferenz (RNAi) als Mechanismus der posttranskriptionalen Genunterdrückung wurde als erstes für *Neurospora crassa*¹⁴⁷ und *Caenorhabditis elegans*¹⁴⁸ beschrieben. Dabei wird doppelsträngige RNA von einer RNaseIII (Dicer) in 21-22 nt lange doppelsträngige RNA Fragmente gespalten, wovon ein Strang komplementär zur Ziel-mRNA ist. Dieser wird in einen Multiproteinkomplex namens RISC (*RNA induced silencing complex*) inkorporiert und sorgt dafür, dass die mRNA abgebaut wird¹⁴⁹. Die Genomik wurde von dieser Technik revolutioniert, als Tuschl et al¹⁵⁰ zeigen konnten, daß 21 nt lange synthetische und damit leicht zugängliche und designbare doppelsträngige RNA mit einem 3'-Überhang (siRNA) zur mRNA-Degradation führt.

Für die gezielte Inhibierung von Funktionen einzelner Proteine und ihrer Domänen ohne in das Expressionsprofil der Zelle einzugreifen werden Werkzeuge wie Peptidaptamere, DNA/RNA-Aptamere, Antikörper und kleine organische Moleküle verwendet.

Monoklonale Antikörper erkennen ihr Zielmolekül zwar mit sehr hoher Affinität und können es auch gut inhibieren, sind aber meist auf extrazelluläre Proteine beschränkt, da es im reduktiven Milieu des Zytoplasmas oft zu Missfaltungen und Aggregation kommen kann¹⁵¹.

Peptidaptamere sind konstruierte Proteine, die meistens mit anderen Proteinen wechselwirken, bestehend aus einer variablen Peptidregion, die von beiden Seiten mit einem Protein-Scaffold (Gerüst) verbunden ist¹⁵². Da sie proteinähnlich sind, stellen sie gute Kandidaten für eine Interaktion mit einem anderen Protein dar. Das erste Beispiel eines Peptidaptamers, welches zur Funktionsaufklärung genutzt wurde, stammt von Geyer et al¹⁵³ und sollte den Zellzyklusstop hemmen. Es wurden Gene identifiziert, die in diesem Signalweg eine Rolle spielen, darunter auch bis dato unbekanntes, wie das CBK1 Produkt.

Nukleinsäureaptamere sind RNA oder auch DNA Moleküle, die in der Lage sind, ihr Zielmolekül mit hoher Affinität und Spezifität, vergleichbar mit der eines Antikörpers zu binden¹⁵⁴. Sie können schnell durch *in vitro* Selektion aus hochdiversen (10^{16} verschiedene Sequenzen) RNA- oder DNA-Bibliotheken für fast jedes beliebige Zielmolekül identifiziert werden^{155, 156}, vorausgesetzt es ist *in vitro* zugänglich. In einigen Fällen konnte gezeigt werden, daß Aptamere auch die biologische Funktion eines Proteins inhibieren. Zudem ist es möglich, sie gezielt gegen bestimmte Domänen eines Proteins⁹² oder auch verschiedenen Konformationen zu selektieren^{95, 157}. Beispiele für Aptamere, die die biologische Funktion ihres Zielproteins inhibieren, sind die

oben erwähnten cytohesinbindenden Aptamere K61 und M69^{92, 158} oder die HIV-Replikation inhibierenden Aptamere gegen die viralen Rev- und Tat-Proteine^{159, 160}. Sie können genau wie siRNAs oder Ribozyme nur durch Expressionsvektoren oder Transfektion in Zellen eingebracht und stabilisiert werden, was die potentielle Anwendbarkeit in der Therapie einschränkt. Das einzige Aptamer, das bisher die klinische Phase III abgeschlossen hat, das VEGF-Aptamer, das für die topische Behandlung von „*Age-Related Macular Degeneration*“ (AMD) zugelassen ist¹⁶¹.

Im Allgemeinen schwieriger zu generieren als Aptamere, aber dafür wesentlich leichter intrazellulär und *in vivo* anwendbar, da sie leichter membrangängig und stabiler als Nukleinsäuren sind, sind kleine organische Moleküle. Deren Stärke sowohl zeit- und dosis- als auch ortskontrolliert zelluläre Komponenten zu binden und zu inhibieren, kann für therapeutische wie für Aufklärungszwecke genutzt werden.

In der „*chemical biology*“ oder „*chemical genetics*“ werden biologisch aktive Moleküle zur gezielten Aufklärung von Genfunktionen und molekularen Mechanismen in biologischen Systemen genutzt. Die systematische Anwendung dieser Methode wurde durch die Entwicklung des Konzepts des Zielproteins als Rezeptor eines kleinen Moleküls^{162, 163} Anfang des 20. Jahrhunderts ermöglicht. Dies wiederum führte zu der Annahme, daß man für jedes Protein eine Substanz als Bindungspartner identifizieren könnte¹⁶⁴, die auch sehr einfach sein konnte, wie Aspirin oder Saccharin, die interessante biologische Effekte zeigen^{165, 166}.

Das gezielte Auffinden von kleinen inhibitorischen Molekülen für ein beliebiges Protein ist durch die Notwendigkeit großer Zahlen von verschiedenen Molekülen schwierig. Üblicherweise werden Bibliotheken mit tausenden bis hin zu Millionen verschiedener Verbindungen in Hochdurchsatzscreens getestet, wobei die Zusammenstellung der Bibliothek entscheidenden Einfluß auf das Ergebnis hat. Sind keine Hinweise auf die Struktur der Inhibitoren vorhanden, benutzt man diversitätsorientierte Bibliotheken, die eine Kollektion an Molekülen enthalten, die möglichst unterschiedliche Strukturelemente enthalten. Kennt man schon eine Leitstruktur, oder einen Inhibitor für ein sehr verwandtes Protein, stellt man möglichst viele Analoga dieser Struktur in einer fokussierten Bibliothek zusammen^{167, 168}. Die verwendeten kleinen Moleküle sollten auf jeden Fall zellgängig, wasser- oder DMSO (Dimethylsulfoxid)-löslich sein und bevorzugt den Lipinski-Regeln folgen^{169, 170}, also nicht mehr als fünf Wasserstoffbrücken-donoren, nicht mehr als zehn Wasserstoffbrückenakzeptoren, eine molare Masse von weniger als 500 Da und einen logP-Wert von weniger als 5 haben. Die langwierige Synthetisierung dieser Bibliotheken hat sich durch die Weiterentwicklung der kombinatorischen Chemie¹⁶⁷, genauso wie das Design von fokussierten Bibliotheken durch die Verfügbarkeit von Kristallstrukturen für die

Zielproteine und die Möglichkeit Bindungsstellen für kleine Moleküle *in silico*¹⁷¹ zu simulieren, stark beschleunigt.

Es gibt zwei generelle Ansätze zur Entwicklung eines Screeningsystems (Abbildung 14). Die erste Methode hat das Ziel, einen Liganden für ein isoliertes Protein zu finden und dann dessen Effekt *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Dies wird als „*reverse chemical genetics*“ bezeichnet. Der zweite Ansatz untersucht den globalen Effekt eines Moleküls auf ein biologisches System *in vivo* oder in Zellkulturexperimenten. Dies wird als „*forward chemical genetics*“ bezeichnet.

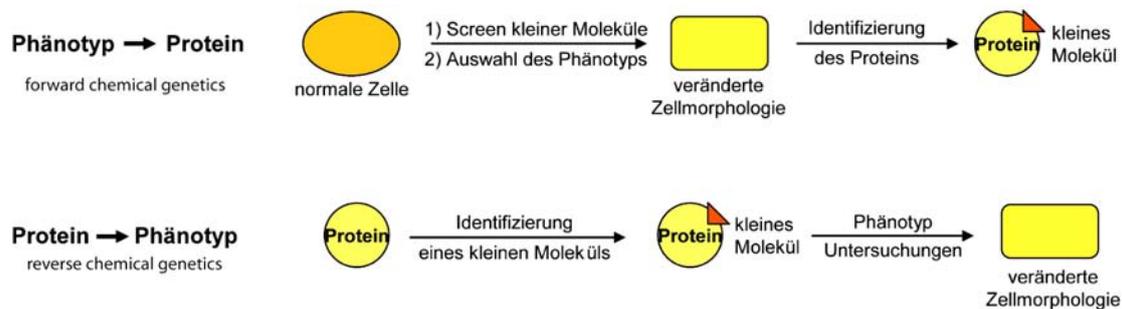


Abbildung 14: Schematische Darstellung der beiden Vorgehensweisen zur Identifizierung biologisch aktiver Moleküle. Phänotyp → Protein: Eine normale Zelle wird mit einer Bibliothek an kleinen Molekülen gescreent und nach einem vorher definierten Phänotyp (hier: veränderte Zellmorphologie) selektiert. Anschließend wird das dafür verantwortliche Protein identifiziert. Protein → Phänotyp: Für ein isoliertes Protein wird ein kleines Molekül identifiziert und anschließend der phänotypische Effekt dieser Substanz *in vivo* untersucht.

Phänotyp-basierende Screenings sind in Bakterien bis hin zu humanen Zellen durchgeführt worden^{172, 173}. Die erste erfolgreiche Anwendung von „*chemical genetics*“ durch Kino et al¹⁷⁴ (1987) war die Entdeckung des Calcineurins als Bindungspartner des „*FK506 binding proteins*“ (FKBP) durch Applikation des Immunsuppressors FK506, der in *Streptomyces I* gefunden wurde und die Fähigkeit besitzt, die Interleukin-2 Produktion zu inhibieren. Calcineurin wurde als Zielprotein in den T-Zellrezeptor initiierten Signalweg eingeordnet. Die Methode der „*forward chemical genetics*“ ist allerdings auf solche Proteine beschränkt, die einen bestimmten Phänotyp regulieren, wie z.B. Zellteilung, Apoptose oder Zelladhäsion. Die Identifikation des inhibierten Proteins wird u. A. durch DNA-Microarrays¹⁷⁵ oder „*yeast two hybrid screens*“^{116, 117} durchgeführt.

Die Aufklärung der Funktion eines bestimmten gegebenen Proteins kann anhand der phänotypischen Effekte der Applikation des inhibitorischen Liganden stattfinden („*reverse chemical genetics*“). So wurden Liganden für diverse Kinasen^{176, 177}, Phosphatasen¹⁷⁸, Proteasen¹⁷⁹ oder Oberflächenrezeptoren¹⁸⁰ entdeckt. Ein Inhibitor für MEK1 (Mitogen aktivierte

Einleitung

Protein Kinase) wurde identifiziert und benutzt, um die Funktion dieser Kinase im Tumorzellwachstum zu definieren¹⁸¹.

3 Aufgabenstellung

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollten neue Einblicke in die Funktionsweise der Cytohesine, einer Familie von kleinen Guanosinaustauschfaktoren (GEFs) für ARFs gefunden werden. Die Erforschung der physiologischen Funktion der Cytohesine ist erschwert, da bisher keine Knockoutmaus beschrieben ist. Der einzige bekannte niedermolekulare Inhibitor für GEFs ist ein Pilztoxin, Brefeldin A (BFA), der allerdings nur die Klasse der sogenannten großen GEFs inhibiert, während die einzigen bekannten Inhibitoren der Cytohesine Aptamere sind, die nur unter Schwierigkeiten in Zellkultur bzw. *in vivo* eingesetzt werden können. Daher waren die meisten Untersuchungen der Cytohesine bisher auf Überexpressions- bzw. RNAi-Studien in Zellkultur beschränkt.

In einem ersten Schritt sollten aus einer diversitätsorientierten Bibliothek wirkstoffähnliche Substanzen gefunden werden, die Cytohesin-2 inhibieren. Dazu sollte ein Kompetitionsassay entwickelt werden, der das Aptamer K61 als Sensor nutzt, um Substanzen zu finden, die die Bindung von K61 an Cytohesin-2 stören und damit unter Umständen die GEF-Funktion inhibieren.

Diese Substanzen sollen zunächst *in vitro* charakterisiert werden und zusammen mit Substanzen, die in einem von I. Grüne parallel gegen die Sec7-Domäne von Cytohesin-1 durchgeführten Screen gefunden wurden, in zellbasierten Assays eingesetzt werden. Dabei soll insbesondere die Rolle von Cytohesinen in Signalwegen untersucht werden, die von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) wie dem Insulinrezeptor (IR) bzw. dem EGF-Rezeptor (EGFR) ausgehen.

Weiterführendes Ziel ist der Einsatz der kleinen Moleküle in einem Mausmodell, um die Aussagen, die in zellbasierten Assays getroffen wurden, zu validieren und einen Einblick in die physiologische Bedeutung der Cytohesine über den Phänotyp zu gewinnen, den Mäuse bei Inhibition von Cytohesinen entwickeln.

4 Ergebnisse

4.1 Fluoreszenzpolarisationsbasierter Screen für Cytohesin-2 Inhibitoren

4.1.1 Fluoreszenzpolarisation

Wenn Fluorophore mit planar polarisiertem Licht angeregt werden, emittieren sie in derselben Ebene, vorausgesetzt die Moleküle bleiben während der Anregungszeit stationär¹⁸². Dieses Phänomen wird Fluoreszenzpolarisierung genannt. Rotiert oder bewegt sich ein Molekül aber während des angeregten Zustandes, ändert sich die Ebene der Polarisation des emittierten Lichts, es wird depolarisiert.

Die Fluoreszenzpolarisierung ist definiert als Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten gemessen parallel und senkrecht zur Einstrahlungsebene des polarisierten Lichtes und wurde quantitativ das erste Mal 1926 von F. Perrin¹⁸³ beschrieben:

$$P = \frac{I_{II} - I_I}{I_{II} + I_I}$$

Formel 1: Definition der Fluoreszenzpolarisierung mit: I_{II} = Fluoreszenzintensität parallel zur Anregungsebene und I_I = Fluoreszenzintensität senkrecht zur Anregungsebene

Die „Perrin-Gleichung“¹⁸³ (s. Formel 2) fasst die Abhängigkeit der Fluoreszenzpolarisierung von der molekularen Mobilität eines Moleküls zusammen:

$$\left(\frac{1}{P} - \frac{1}{3} \right) = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \left(1 + \frac{\tau}{\phi} \right) \quad \phi = \frac{\eta V}{RT}$$

Formel 2: Perrin-Gleichung mit: P_0 = limitierende Polarisation des Fluorophors (ohne Rotation) τ = Lebenszeit des angeregten Zustands; ϕ = Rotationskorrelationszeit; η = Viskosität der Flüssigkeit; V = molekulares Volumen des fluoreszierenden Moleküls; R = allg. Gaskonstante; T = Temperatur.

Im Wesentlichen wird die Polarisation durch das Verhältnis zwischen der Lebenszeit der Fluoreszenz (τ) und der Geschwindigkeit, mit der ein Molekül während der Anregung und Emission rotiert (ϕ)¹⁸⁴, bestimmt. P_0 ist die maximal mögliche Polarisation des Fluorophors. Die Polarisation ist antiproportional abhängig von der Lebenszeit des angeregten Zustandes. Je länger die Lebenszeit ist, desto mehr Zeit hat das Fluorophor zu rotieren und desto kleiner wird die Polarisation. Die Rotationskorrelationszeit setzt sich zusammen aus der Viskosität der Flüssigkeit (η), der Temperatur (T), der allgemeinen Gaskonstante (R) und dem Volumen des

Moleküls (V). Sind Viskosität und Temperatur konstant, ist die Polarisation direkt proportional zum Volumen des Moleküls. Je größer ein Molekül ist, desto langsamer kann es sich bewegen und umso weniger Möglichkeit besteht, im angeregten Zustand das eingestrahlte polarisierte Licht zu depolarisieren.

Fluoreszenzpolarisierung kann benutzt werden, um die Bindung oder Dissoziation zweier Moleküle zu beobachten, vorausgesetzt daß sich dabei die Masse bzw. das Volumen des Komplexes stark ändert, das fluoreszenzmarkierte Molekül also mit einem idealerweise viel größeren, bzw. schwereren Molekül interagiert.

FP-Messungen wurden in der Molekularbiologie zur Untersuchung von Rezeptor-Ligand-¹⁸⁵, Protein-Protein-¹⁸⁶ und Protein-DNA/RNA-Wechselwirkungen¹⁸⁷ eingesetzt. Es sind Literaturbeispiele bekannt, in denen Fluoreszenzpolarisierung erfolgreich zur Identifikation kleiner Moleküle genutzt wurde, die eine Protein-Protein oder eine Protein-DNA-Interaktion inhibieren können^{178, 188, 189}.

4.1.2 Der Fluoreszenzpolarisationsassay

Modifiziert man ein Aptamer mit einem Fluorophor, sollte es im freien Zustand (Abbildung 15A) eine niedrigere Polarisation zeigen als gebunden an das Zielprotein (Abbildung 15B). Diesen Signalunterschied kann man zur Identifikation kleiner Moleküle, die die Interaktion zwischen Aptamer und Protein stören, nutzen. Idealerweise reduzieren diese Substanzen die Polarisation wieder auf den Ursprungswert des freien Aptamers (Abbildung 15C).

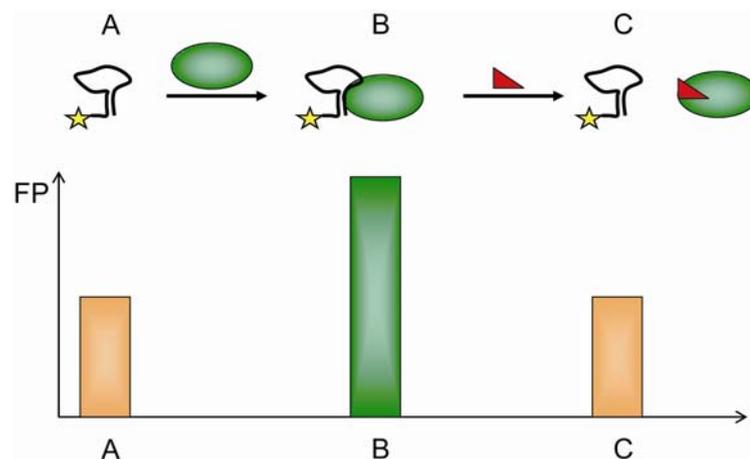


Abbildung 15: Fluoreszenzpolarisationsassay: A: niedrige Polarisation des freien Aptamers (oranger Balken); B: höhere Polarisation durch Bindung des Proteins (grüner Balken); C: niedrige Polarisation eines von einem kleinen Molekül verdrängten Aptamers (oranger Balken).

Ergebnisse

Das Fluorophor kann an beliebigen Stellen des Aptamers z.B. am 5'-oder 3'-Ende oder innerhalb der Sequenz eingeführt werden. Dabei darf weder die stabile Faltung des Aptamers noch dessen Bindung an das Zielprotein beeinflusst werden.

Die Polarisationsdifferenz zwischen gebundenem und freiem Zustand des Aptamers wird maximiert, wenn das Fluorophor eine kurze Lebenszeit des angeregten Zustands hat und wenn durch die Wahl eines kurzen Linkers der sogenannte „Propellereffekt“ vermieden wird.

Wir haben uns für die Einführung einer Fluoresceingruppe über einen C₂-Linker am 5'-Ende des Aptamers K61s entschieden.

4.1.3 Einführung des Fluorophors an das Aptamer

Das Aptamer K61s wurde an der 5'-Position fluoreszenzmarkiert. Dazu wurde bei der *in vitro* Transkription durch die T7-RNA-Polymerase, deren Toleranz gegenüber Modifikationen¹⁹⁰⁻¹⁹² des Starternukleotids genutzt wurde, Guanosinmonophosphothioat (GMPS) zugesetzt, dessen Sulfhydrylgruppe anschließend mit Iodoacetamidfluorescein derivatisiert wurde.

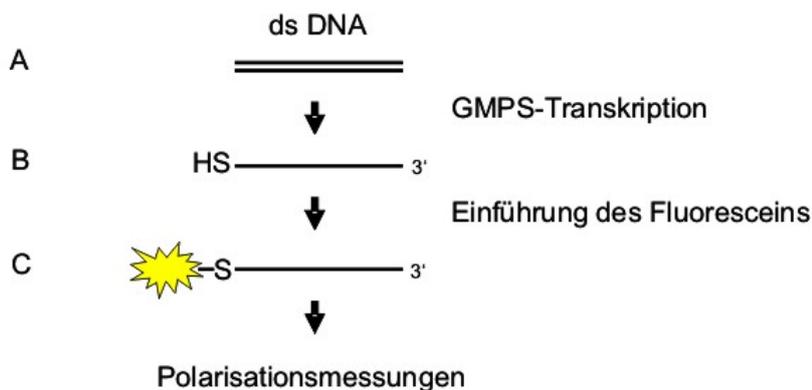


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Schritte zur Einführung eines Fluoreszenzmoleküls am 5'-Ende der RNA: A: PCR zur Erzeugung doppelsträngiger DNA; B: GMPS-Transkription zur Einführung einer reaktiven Sulfhydrylgruppe; C: Nukleophile Substitution des Iodids am Fluorophor durch die Sulfhydrylgruppe.

Die Effizienz, mit der die GMPS-Gruppe und damit auch das Fluorophor integriert werden konnte, wurde abschließend mit Hilfe von Absorptionsmessungen bestimmt

Parallel zu einem Screen für Inhibitoren der Sec7-Domäne von Cytohesin-1, der von I. Grüne durchgeführt wurde¹⁹³ und auf dem Aptamer M69, das nicht zwischen den Sec7-Domänen der kleinen GEF diskriminiert, als Sensor basierte, wurde K61s, das spezifisch Cytohesin-2 bindet, für einen Fluoreszenzpolarisationscreen verwendet.

4.1.4 Vorbereitung des Screens

Es mußte sichergestellt werden, daß das Aptamer K61s geeignet ist, um im Fluoreszenzpolarisationsassay zum Screenen von niedermolekularen Cytohesininhibitoren eingesetzt zu werden. Dazu muß die Polarisationsdifferenz zwischen freiem und gebundenem Aptamer ausreichend hoch sein, um einen möglichst hohen Z' -Wert zu gewährleisten; ebenso muß die Interaktion zwischen fluoreszenzmarkiertem K61s und Cytohesin-2 spezifisch sein.

4.1.4.1 Expression von Cytohesin-2

Es wurde geplant eine Bibliothek von 2.500 Substanzen zu screenen. Dazu wurden mindestens 30 mg Cytohesin-2 benötigt. Es wurde versucht diese Menge in einer Aufreinigung herzustellen, um sicherzugehen, daß die Resultate des Screens nicht durch unterschiedliche Qualität von Proteinchargen verfälscht werden.

5 l Flüssigmediumkultur wurden angeimpft mit einem *E. coli* BL21DE3-Stamm, der ein pET-11d-Plasmid, das ein N-terminal hexahistidingetagtes Cytohesin-2-Konstrukt kodiert, trägt. Die Proteinexpression wurde mit IPTG induziert und die Aufreinigung in zwei Schritten, zuerst mit Ni-NTA-Chromatographie und danach mit Anionenaustauschchromatographie an einer FPLC durchgeführt.

Es wurden 80 mg reines Cytohesin-2 erhalten (s. Abbildung 17).

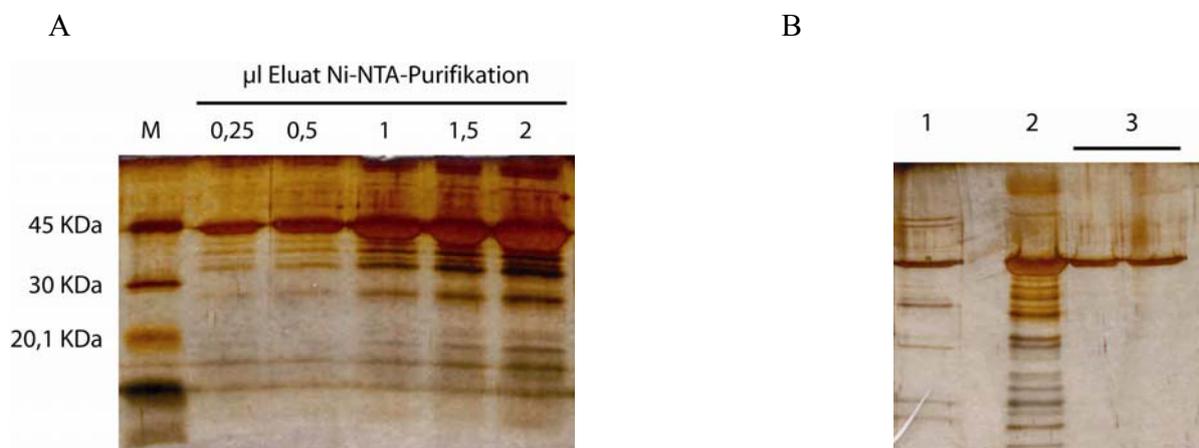


Abbildung 17: Silberfärbungen von SDS-Polyacrylamidgelenen nach Ni-NTA-Aufreinigung und anschließender Anionenaustauschchromatographie. A: Nach Ni-NTA-Aufreinigung erhält man noch stark verunreinigtes Protein, das bei einer Länge von ca. 45 kDa läuft. B: Nach Ionenaustauschchromatographie erhält man ausschließlich reines Cytohesin-2 (Lane 3), das auf gleicher Höhe mit einer unabhängig aufgereinigten Cytohesin-2-Probe läuft (Lane 1). Lane 2: Cytohesin-2 nach Ni-NTA-Aufreinigung.

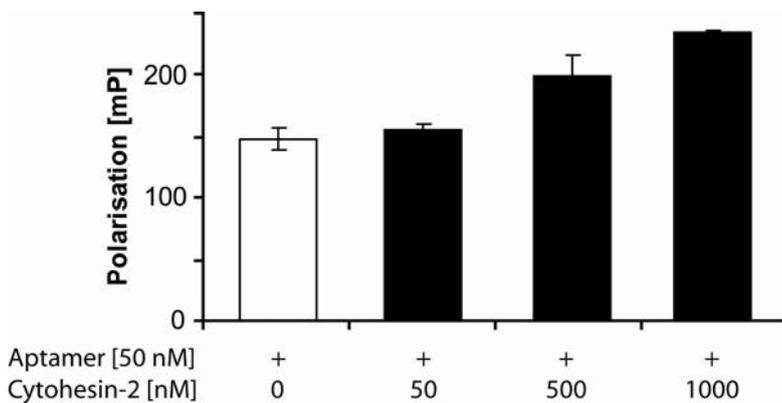
4.1.4.2 Polarisationsmessungen mit markiertem Aptamer

Als Puffer für den Screen wurde PBS, pH 7,4, mit 3 mM MgCl₂ gewählt. In diesem Puffer wurde das Aptamer K61 selektiert. Darüberhinaus ist ein neutraler bzw. schwach basischer pH für eine optimale Fluoreszenz des Fluorescein nötig.

Es wurde mit planar polarisiertem Licht einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und die Emission bei 520 nm ausgelesen.

Zuerst wurde die Konzentration an Aptamer gesucht, bei der eine stabile Polarisation gemessen wird (Daten nicht gezeigt), denn bei Konzentrationen nahe an der Detektionsgrenze der Fluoreszenz treten Probleme mit der Reproduzierbarkeit der Messung auf. Es zeigte sich, daß 50 nM des Aptamers eine ideale Konzentration waren.

Anschließend wurden Polarisationsmessungen mit K61s und steigenden Konzentrationen von

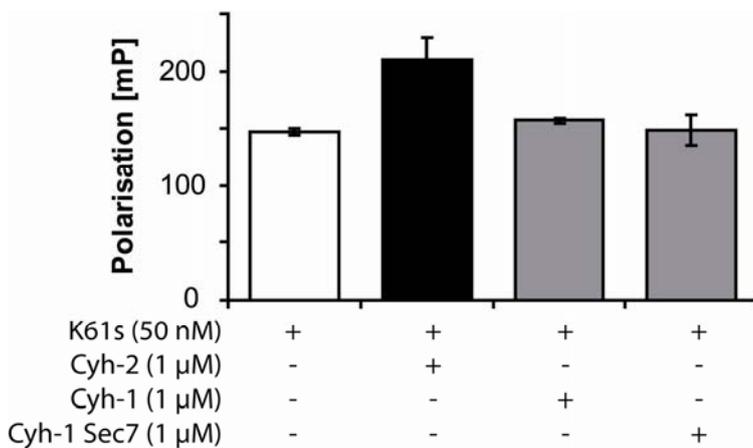


Cytohesin-2 durchgeführt (s. Abbildung 18).

Abbildung 18: Polarisation des fluoreszenzmarkierten Aptamers K61s, erhöht sich dosisabhängig durch Zugabe von steigenden Mengen von Cytohesin-2.

50 nM freies Aptamer hatte eine Polarisation von 150 mP.

Bei Anwesenheit von 50 nM Protein veränderte sich die Polarisation kaum merklich. Erst zehnfacher Überschuss an Cytohesin-2 erhöhte die Polarisation des Aptamers auf ca. 200 mP, was sich durch Zugabe von 20fachem Überschuss an Protein auf ca. 220 mP weiter steigern ließ.



Weiter mußte festgestellt werden, ob die Interaktion des Aptamers mit Cytohesin-2 bei diesen hohen Konzentrationen spezifisch bleibt.

Abbildung 19: K61s ist spezifisch für Cytohesin-2. Zugabe von 1 µM Cytohesin-2 steigert die Polarisation des fluoreszenzmarkierten Aptamers um 50 mP (schwarzer Balken). Nach Zugabe von 1 µM Cytohesin-1 oder seiner Sec7-Domäne kann man keine Interaktion detektieren (graue Balken)

Dazu wurden Cytohesin-1 bzw. dessen Sec7, die in Filterbindungsexperimenten beide nicht von K61s gebunden werden, in 20fachem Überschuß zu fluoreszenzmarkiertem Aptamer zugegeben und die Polarisation gemessen. Beide Kontrollproteine erhöhten die Polarisation nicht (s.Abbildung 19).

K61s ist eine verkürzte Variante des Aptamers K61. Als weiterer Spezifitätsnachweis wurde geprüft ob fluoreszenzmarkiertes K61s das gleiche Bindungsepitop erkennt wie das unmarkierte Aptamer K61.

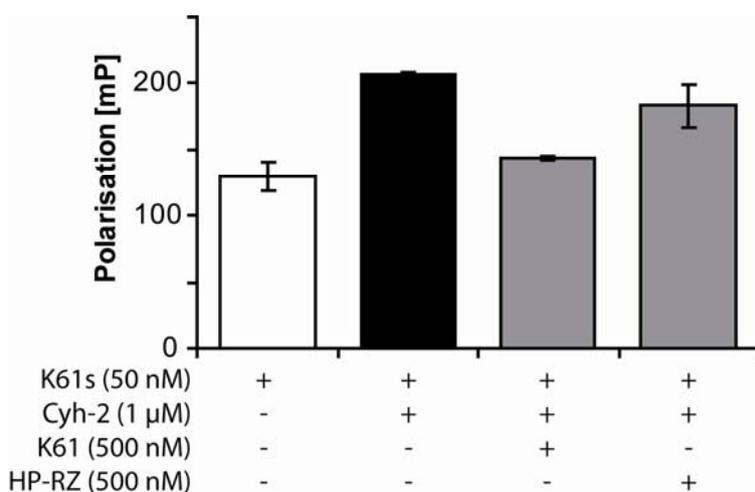


Abbildung 20: 500 nM unmarkiertes Aptamer K61 verdrängen fluoreszenzmarkiertes K61s, während unmarkierte Hairpinribozym-RNA nur schwach die Interaktion von K61s und Cytohesin-2 stört.

Dazu wurde mit einem 10fachem Überschuß an unmarkiertem K61 versucht, K61s von Cytohesin-2 zu verdrängen (s. Abbildung 20). Man erkennt, daß die Polarisation von K61s in Anwesenheit von K61 wieder auf den Ursprungswert zurückkehrt. Als Kontrolle wurde Hairpin-Ribozym-RNA, die nicht mit Cytohesin-2 interagiert, zugegeben. RNA alleine war nicht in der Lage den spezifischen Komplex aufzulösen.

4.1.4.3 Screen für aptamerverdrängende kleine Moleküle

Es wurde eine Substanzbibliothek von 2.500 verschiedenen kleinen Molekülen, die die Lipinskieregeln^{170, 194} erfüllen und damit wirkstoffähnlich sind, auf ihre Fähigkeit hin getestet, den Komplex aus fluoreszenzmarkiertem K61s und Cytohesin-2 zu trennen. Das Pipettieren wurde mit Hilfe eines Tecan Freedom Evo Pipettierroboters durchgeführt. Die kleinen Moleküle waren in einer Konzentration von 1 mM gelöst in DMSO in Gruppen von je 88 Stück in insgesamt 29 96-Wellplatten vorgelegt. 2,5 µl der gelösten kleinen Moleküle wurden anschließend in eine 384-Wellplatte überführt, je zweimal für eine Messung mit fluoreszenzmarkiertem Aptamer und je zweimal für eine Messung mit Aptamer und Protein (s.Abbildung 21). Anschließend wurden 47,5 µl einer 50 nM Aptamerlösung in PBS bzw. 47,5 µl einer 50 nM Aptamerlösung vorinkubiert mit 1000 nM Cytohesin-2 zugegeben, 15 min bei 37°C inkubiert und die Polarisation vermessen.

Ergebnisse

	RNA	RNA + Protein
Messung 1	+ Substanz	+ Substanz
Messung 2	+ Substanz	+ Substanz

Abbildung 21: Aufteilung der Felder einer 384-Wellplatte

Für jede 384-Wellplatte wurde der Z' -Wert berechnet aus jeweils einer Achtfachbestimmung der Polarisation des Aptamer im Vergleich zur erhöhten Polarisation des Aptamer-Proteinkomplexes. Platten für die der Z' -Wert unter 0,5 lag wurden neu pipettiert und vermessen. Exemplarisch zeigt Abbildung 22 das Ergebnis des Screens für Box 18; die Ergebnisse des gesamten Screens befinden sich im Anhang.

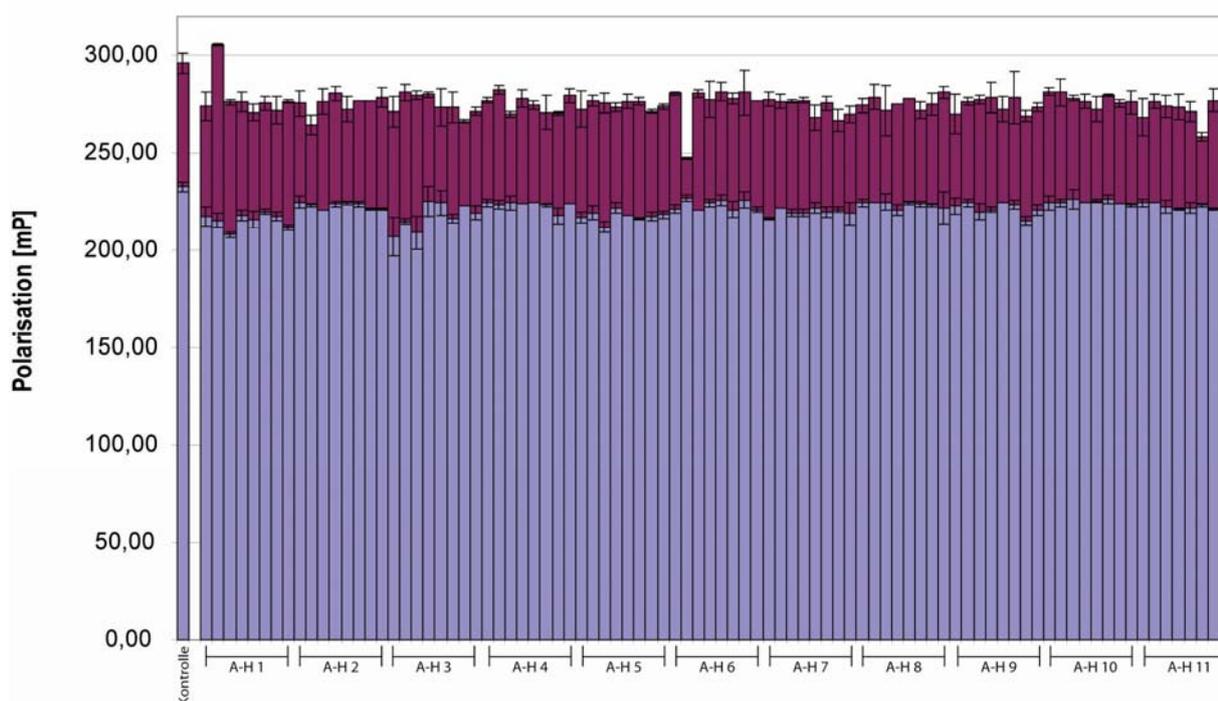


Abbildung 22: Beispiel einer Box mit 88 untersuchten Verbindungen (Box Nr. 18). Die Höhe der blauen Balken zeigt die Polarisation von 50 nM des Aptamers K61s in Gegenwart von 50 μ M des kleinen Moleküls alleine und die Höhe der roten Balken die Polarisation des Aptamer in Gegenwart von 500 nM Cytohesin-2 und 50 μ M des kleinen Moleküls. Als Hits kommen Substanzen in Frage, die den Polarisationsunterschied von hier ca. 50 mP um mindestens 50 % senken. Aus dieser Box käme Substanz B6 in Frage. Die kompletten Ergebnisse des Screens befinden sich im Anhang.

Substanzen, die den Polarisationsunterschied von Aptamer und Aptamer-Proteinkomplex auf unter 50% gesenkt haben (s. Abbildung 22) wurden als potentielle Cytohesin-2-Binder angesehen und weiter untersucht (Abbildung 23).

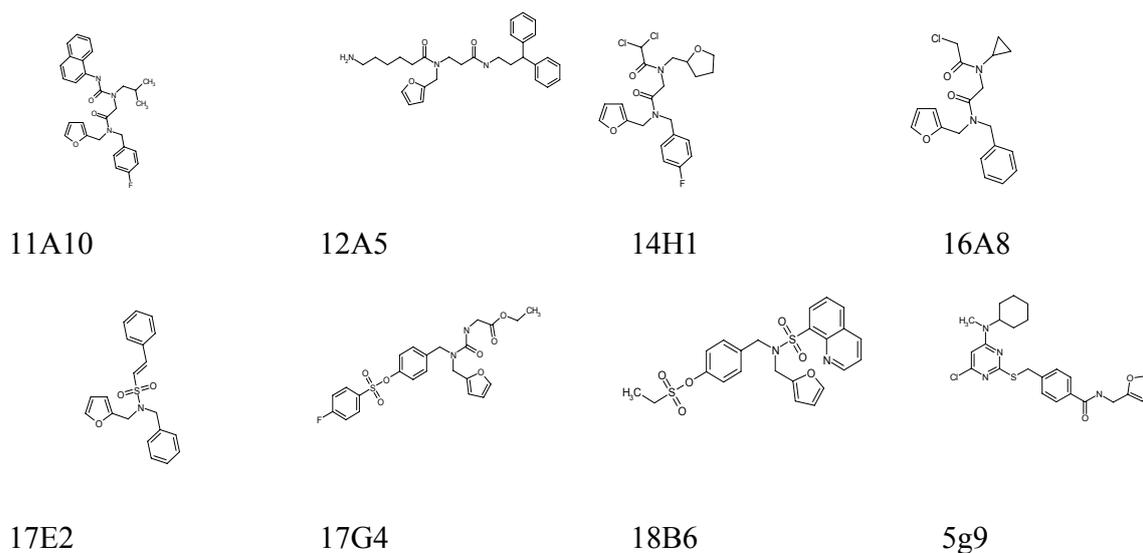


Abbildung 23: Acht Substanzen, die in die Hit-Validierung eingesetzt wurden. Diese Substanzen hatten im Verdrängungsassay den Polarisationsunterschied auf unter 50% gesenkt.

4.1.5 Hit-Validierung

Im Primärscreen waren acht Substanzen aufgefallen, die potentielle Binder von Cytohesin-2 waren. Dieser Effekt mußte bestätigt werden und es mußte darüber hinaus sichergestellt werden, dass die Verbindungen spezifisch Cytohesin-2 und nicht generell Proteine oder Nukleinsäuren binden und es sollten erste quantitative Aussagen über die Wechselwirkung getroffen werden.

4.1.5.1 Versuch einer ersten Abschätzung einer K_D aus dem Verdrängungsassay

Diese Substanzen wurden noch einmal im Verdrängungsassay getestet, um ihren Effekt zu bestätigen und gleichzeitig quantitative Aussagen über die Wechselwirkung mit Cytohesin-2 zu treffen. Dazu wurden die Substanzen in Konzentrationen von 50 bis 500 μM zum Komplex aus 50 nM Aptamer und 1000 nM Cytohesin-2 zugegeben (Abbildung 24). Sechs der Moleküle reduzierten die Polarisationsdifferenz konzentrationsabhängig; allerdings war selbst bei 500 μM keines in der Lage, das K61s komplett vom Cytohesin-2 zu verdrängen. Eine zuverlässige K_D läßt sich aus diesen Daten nicht abschätzen, da noch keine Sättigung zu beobachten war.

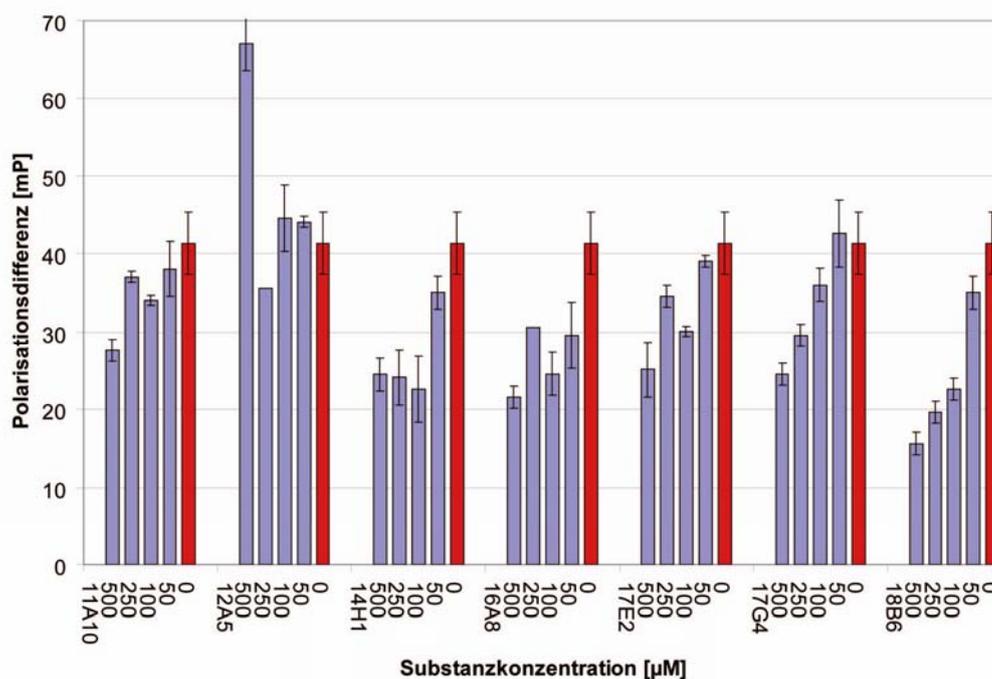


Abbildung 24: Rescreen von sieben Verbindungen, die im Primärscreen als Hits identifiziert wurden, im Verdrängungsassay. Die Substanzen wurden im Konzentrationsbereich von 50 – 500 µM titriert und die Polarisationsdifferenz zwischen 50 nM des fluoreszenzmarkierten Aptamer K61s alleine und im Komplex mit 500 nM Cytohesin-2 aufgetragen.

4.1.5.2 Oberflächenplasmonresonanz (surface plasmon resonance SPR)

Als nächstes wurde die Wechselwirkung der sieben Substanzen, die im Primärscreen gefunden wurden, mit Cytohesin-2 alleine untersucht, um eine spezifische Bindung nachzuweisen. Der Nachweis erfolgt mittels SPR an einem BIACore 3000-Gerät. Dabei handelt es sich um eine Methode, bei der Bindungsereignisse in Echtzeit verfolgt werden können. Durch die Bindung eines Analyten an eine mit Liganden derivatisierte Oberfläche kommt es dort zu einer Konzentrierung. Dies führt zu einer lokalen Änderung des Brechungsindex. Diese Änderung kann über die Messung der Oberflächenplasmonresonanz nachgewiesen werden. Eine erfolgte Bindung wird in *response units* (RU, Response Einheiten) angegeben (s. 6.3.3). Es wurden 2.000 ru Cytohesin-2, sowie die Sec7-Domäne von Cytohesin-1 und BSA als Kontrollen an einer Cyclodextranmatrix immobilisiert.

Als Laufpuffer wurde PBS pH 7.4 mit 3 mM MgCl₂ und 0.1 % DMSO verwendet. Als Regenerationspuffer wurde NaOH, max. 10 mM, verwendet

Da injiziertes Aptamer M69, das die Sec7-Domänen von Cytohesin-1 und -2 bindet, Bindung in den Flußzellen, die mit Cytohesin-1-sec7 sowie mit Cytohesin-2 derivatisiert waren zeigte, war sichergestellt, daß die Proteine auf der Chipoberfläche stabil waren.

Im nächsten Schritt wurden 5 μM der Substanzen gelöst im Laufpuffer injiziert, um die Moleküle zu finden, die an Cytohesin-2 binden, aber nicht an BSA. Dabei zeigte sich, daß die drei Moleküle, die überhaupt Bindung an Cytohesin-2 zeigten auch an die sec7-Domäne von Cytohesin-1 gebunden haben.

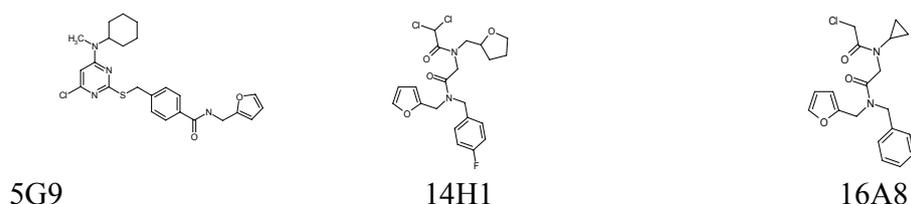


Abbildung 25: Die Moleküle 5G9, 14H1 sowie 16A8 binden im BIAcore an Cytohesin-2, sowie die sec7-Domäne von Cytohesin-1 aber nicht an BSA, das als Kontrollprotein diente.

Als nächstes wurden diese Substanzen in Konzentrationen von 1, 2,5 und 5 μM titriert, um die Stärke der Bindung zu bestimmen (s. Abbildung 26).

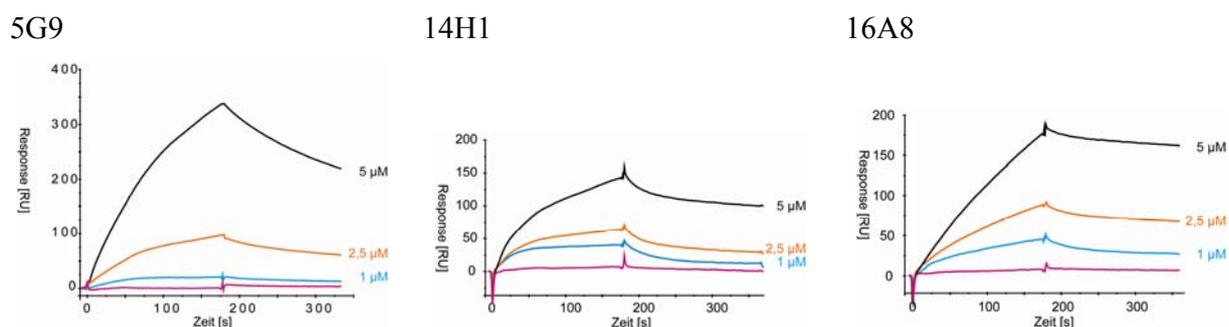
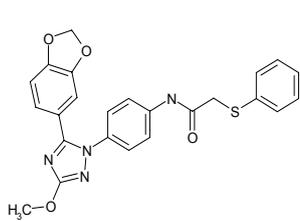


Abbildung 26: Titration von 5G9, 14H1 und 16A8 in drei verschiedenen Konzentrationen (5 μM , schwarz; 2,5 μM , orange; 16A8, blau) auf eine Flußzelle, auf der Cytohesin-1-Sec7 immobilisiert war, um die Dissoziationskonstante zu bestimmen. Alle drei Substanzen binden in der Konzentration von 5 μM nicht an eine Referenzzelle auf der BSA immobilisiert wurde (magenta).

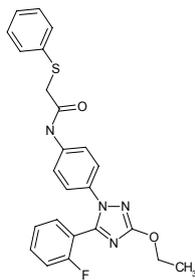
Es wurde versucht, die Bindungskonstante durch einen sogenannten kinetischen Fit, bei dem die Assoziationsraten und die Dissoziationsraten aller Kurven betrachtet werden, zu bestimmen. Die sehr niedrige Dissoziationsrate, die alle Substanzen zeigten, machte allerdings eine Analyse aller Kurven unmöglich. Daher wurde die Bindungskonstante durch einen „single-curve-fit“ bestimmt. 5G9 und 14H1 binden mit K_{D} s von 100 – 500 nM und zeigen keinerlei Diskriminierung zwischen den sec7-Domänen von Cytohesin-1 und -2, während 16A8 ebenfalls eindeutig spezifisch Cytohesine gegenüber BSA bindet, aber die fast nicht vorhandene Dissoziation der Verbindung eine quantitative Analyse unmöglich gemacht hat.

4.1.6 In vitro GDP/GTP-Austauschassay

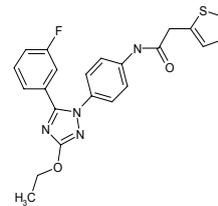
In zwei unabhängigen aptamerbasierenden Screens, einmal mit dem Aptamer M69 und der sec7-Domäne von Cyh-1, sowie mit K61s und Cyh-2 wurden kleine Moleküle identifiziert (Dissertation Imke Grüne sowie Abschnitt 4.1), die an Sec7-Domänen kleiner GEFs binden, ohne zwischen den Cytohesinen zu diskriminieren. Sec7-Domänen sogenannter großer GEFs, wie die Sec7-Domäne von EFA6 oder des aus Hefe isolierten Gea2, werden um mindestens eine Größenordnung schlechter gebunden.



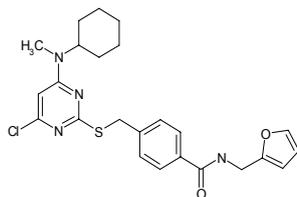
SecinH3



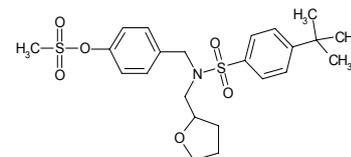
SecinD4



SecinH4



5G9



18B7

Abbildung 27: SecinH3, H4 und D4 wurden von I. Grüne als Cytohesin-1 bindende kleine Moleküle identifiziert und in einem *in vitro* Austauschassay auf ihre Sec7-inhibierenden Eigenschaften getestet. 5G9 bindet hochaffin an Cytohesin-1 und -2. 18B7 diente als nichtbindende Kontrolle, um unspezifische Effekte auszuschließen.

Die Substanzen, die spezifisch mit Cytohesin-Sec7s interagieren wurden „Secin“, ein Akronym für **Sec7-inhibitor** genannt.

Da die Sec7-Domäne katalytisch wirksam ist, wurde in einem *in vitro*-System (s. 6.3.4) die Fähigkeit der von I. Grüne als identifizierten Binder SecinH3, H4 und D4, sowie dem von mir identifizierten 5G9, das mit ca. 100 nM an Cytohesin-1 und -2 bindet getestet, den Austausch von GDP/GTP an ARF1 zu inhibieren (s. Abbildung 27 und Tabelle 2).

Alle Substanzen, die in den Verdrängungsassays als spezifische Binder für Cytohesine identifiziert wurden, inhibierten auch den Cytohesin-1-katalysierten GDP/GTP-Austausch an

ARF1. 5G9 inhibierte Cytohesin-1 genauso gut wie das große GEF Gea2, während die Secine den Austausch von Gea2-Sec7 an ARF1 ca. 15-fach schwächer inhibieren.

	IC ₅₀ Cyh1-Sec7	IC ₅₀ Gea2-Sec7
SecinH3	4,2+/-1,7 µM	65+/-7 µM
SecinD4	2,6+/-0,6 µM	36,5+/-5 µM
SecinH4	2,0+/-0,8 µM	66+/-3 µM
5G9	4,6+/-1 µM	3,5+/-3
18B7	> 50 µM	>250 µM

Tabelle 2: IC₅₀-Werte für verschiedene Sec7-inhibierende Verbindungen. Die Secine inhibieren den Cyh1-Sec7-katalysierten Austausch von GDP/GTP an ARF1 mit IC₅₀-Werten von ca. 2-4 µM und sind spezifisch für kleine GEFs, denn der Austausch von Gea2-Sec7 an ARF1 wird ca. 15-30 mal schwächer inhibiert. 5G9 inhibiert beide untersuchten GEFs mit ähnlichen IC₅₀-Werten.

4.2 Zellbasierte Assays

Einer der größten Vorteile von kleinen organischen Molekülen gegenüber Aptameren ist deren Potential, von Zellen ohne vorherige Transfektion aufgenommen werden zu können. Daher wurden die identifizierten Secine sofort in Zellkultur getestet.

4.2.1 Toxizität

Um auszuschließen, daß die Effekte, die die Secine in Zellkultur zeigen, auf einen unspezifischen toxischen Effekt der Substanzen selbst oder ihrer Metabolite zurückzuführen sind, wurde in einem kommerziell erhältlichen MTT-Assay ihre cytotoxische Wirkung getestet.

LD ₅₀	nach 24 h	nach 48 h	nach 72 h
SecinH3	141+/-8 µM	128+/-10 µM	47+/-11 µM
SecinD4	142 +/- 12 µM	120 +/- 40 µM	7,6 +/-2,9 µM
SecinH4	>>150 µM	>>150 µM	>>150 µM
5G9	>>150 µM	>>150 µM	30+/-10 µM
18B7	>>150 µM	46 +/- 7 µM	<20 µM

Tabelle 3: Toxizität der Secine und der Negativkontrolle 18B7 auf HeLa-Zellen über einen Zeitraum von 72 h. Die LD₅₀ wurde in einem MTT-Assay bestimmt.

Nach 24 Stunden zeigte keine Substanz eine akute Toxizität; nach 48 h hatte die in vorherigen Experimenten als Kontrolle dienende Verbindung 18B7 eine LD₅₀ von 46 µM. SecinH3, SecinD4 und 5G9 inhibierten nach 72 h deutlich die Zellproliferation (s. Tabelle 3).

Da der Zeitrahmen, in dem Zellen mit den Secinen in Kontakt kamen, in den folgenden Versuchen maximal 24 h betragen hat, konnte somit ein unspezifischer toxischer Effekt ausgeschlossen werden.

4.2.2 SRE-Luciferase-Assays in HeLa-Zellen

Der MAP-Signalweg reguliert eine Fülle unterschiedlicher Gene, unter denen der Transkriptionsfaktor c-Fos eine wichtige Stellung einnimmt. Die Expression von c-Fos nach Stimulation durch Mitogene oder Wachstumsfaktoren wird u. a. durch das „*serum response element*“ (SRE) vermittelt, welches in der Promotorregion des *c-Fos* Genes enthalten ist^{195, 196}.

Die kleinen Guaninnukleotid-Austauschfaktor Cytohesin-1 und -2 sind an der MAP-Signalweg-kontrollierten Regulation der Genexpression in verschiedenen Zelltypen beteiligt. Dabei erfolgt eine Cytohesin-1 vermittelte Kontrolle in T-Zellen in Abhängigkeit von LFA-1^{94, 197}, während M. Theis zeigen konnte, daß in HeLa-Zellen die von Wachstumsfaktoren stimulierte Aktivierung des „*Serum Response Element*“ (SRE) über Cytohesin-2 erfolgt¹⁵⁸.

Zur Analyse der SRE-kontrollierten Genexpression wurde ein Assay genutzt, der auf Luciferase als Reporter gen basiert. Das Strukturgen von Luciferase liegt dabei unter der Kontrolle des SRE im Plasmid SRE-Luc. Dieses Plasmid wurde in HeLa-Zellen transfiziert. Um das Lumineszenzsignal auf die Transfektionseffizienz normieren zu können wurde das Plasmid pEGFP-N1 cotransfiziert. Dieses Plasmid enthält das Strukturgen des „*enhanced green fluorescent protein*“ (EGFP) unter der Kontrolle eines Cytomegalovirus (CMV) Promotors.

HeLa-Zellen wurden 12 h nach Transfektion der Reporterplasmide für weitere 12 h serumfrei kultiviert und in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen der Secine mit 10 % FCS für 6 h stimuliert. Anschließend wurde die Luciferase-Aktivität bestimmt. In Abbildung 28 kann man erkennen, daß die Secine konzentrationsabhängig die Expression der Luciferase inhibieren und zwar mit IC₅₀-Werten von 5 – ca. 20 µM. Das steht in gutem Einklang mit den Werten, die man für die inhibitorische Wirkung der Secine im GDP/GTP-Austauschassay *in vitro* findet.

Die Negativkontrolle 18B7 zeigt ebenso wie *in vitro* keinen Effekt.

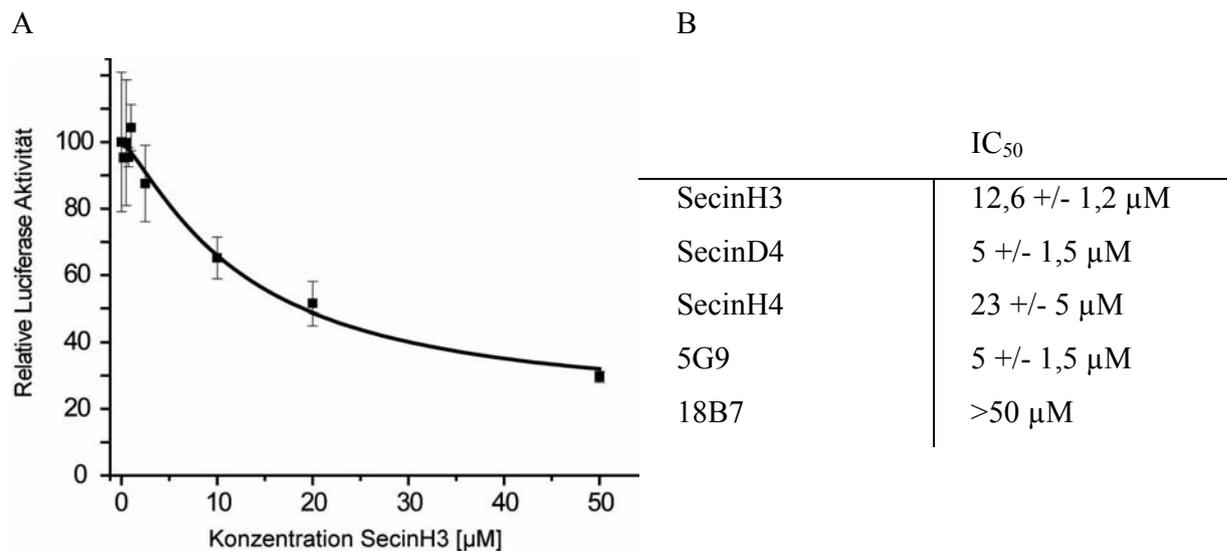
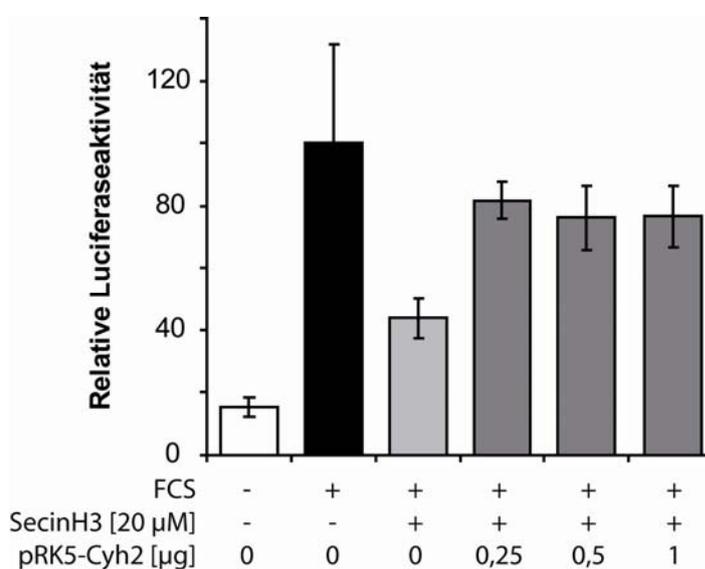


Abbildung 28: Secine inhibieren in HeLa-Zellen die serumstimulierte Transkription eines Luciferasekonstrukts, das unter der Kontrolle eines SRE-Promotors steht. **A:** SecinH3 inhibiert die SRE-kontrollierte Transkription dosisabhängig. Es ergibt sich eine IC₅₀ von 12,6 µM (n=3). **B:** IC₅₀-Werte der verschiedenen Secine. 18B7 diente als Negativkontrolle. Normiert wurde das Luciferasesignal auf die Expression von EGFP, unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

Durch Überexpression von Cytohesinen hat man eine Möglichkeit festzustellen, ob der Effekt der Secine auf die MAP-Signalkaskade spezifisch durch die Interaktion mit Cytohesinen zustande kommt. Eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration von Cytohesin-2 sollte den Effekt der



Secine spürbar vermindern, wenn die Secine nah an ihrer IC₅₀ eingesetzt werden, denn dann werden kleine Unterschiede einen maximalen Effekt ausmachen.

Abbildung 29: Überexpression von Cytohesin-2 in HeLa-Zellen unterdrückt teilweise den Effekt von SecinH3. Zusätzlich mit den Reporterplasmiden SRE-Luc und pEGFP-N1 wurden steigende Mengen des unter CMV-Kontrolle stehenden Plasmids pRK5-Cyh2 transfiziert, das für Cytohesin-2 kodiert. Die transfizierte Plasmidmenge wurde mit einem pRK5-Leerplasmid konstant gehalten. Stimuliert wurde mit 10 % FCS über einen Zeitraum von 6 h (n=3).

Abbildung 29 zeigt, daß Erhöhung der intrazellulären Cytohesin-2 Konzentration durch Überexpression den Effekt von SecinH3 teilweise unterdrückt. Die Luciferaseaktivität wird von 40 % auf ca. 80 % des serumstimulierten Wertes erhöht. Transfektion größerer Mengen des

Ergebnisse

Cytohesin-2-kodierenden Plasmids haben keinen zusätzlichen Effekt, was darauf hindeutet, daß SecinH3 entweder einen unspezifischen Effekt aufweist, bzw. die Inhibition der anderen Cytohesine (1, 3 und 4) eine Rolle in der Signaltransduktion spielen könnte.

In FCS findet man eine ganze Reihe an verschiedenen Wachstumsfaktoren und Mitogenen. Um herauszufinden, über welchen Rezeptor die Cytohesin-vermittelte Aktivierung des SRE in HeLa-Zellen vermittelt wird, wurde die Luciferaseaktivität nach Stimulierung mit 40 ng/ml EGF, IGF, PDGF oder VEGF mit der Stimulierung durch Serum verglichen (Abbildung 30A). Von den verwendeten Wachstumsfaktoren konnte in HeLa-Zellen nur EGF das SRE aktivieren.

SecinH3 war in der Lage die Signaltransduktion nach Stimulation mit 20 ng/ml EGF dosisabhängig mit einer IC_{50} von ca. 1,5 μ M zu inhibieren (s. Abbildung 30B).

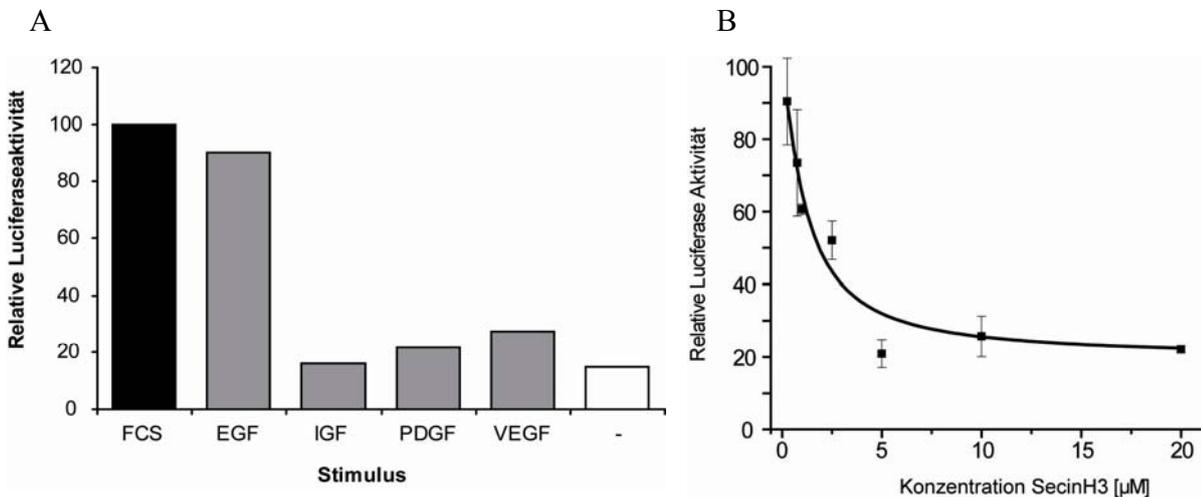


Abbildung 30: A: 40 ng/ml EGF stimuliert in HeLa-Zellen die Transkription eines unter der Kontrolle des SRE-Promotors stehenden Luciferase-Konstrukts genauso effektiv wie die Zugabe von 10 % FCS. Andere Wachstumsfaktoren (ebenfalls 40 ng/ml) stimulieren in HeLa-Zellen die MAP-Kaskade nicht. B: SecinH3 inhibiert in HeLa-Zellen die EGF-stimulierte Transkription eines Luciferase-Konstrukts mit einer IC_{50} von ca. 1,5 μ M. EGF: 20 ng/ml. Normiert wurde das Luciferasesignal auf die Expression von EGFP, unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

4.2.3 Quantitative RT-PCR in HepG2

Da in allen vorhergegangenen Versuchen die Secine ähnliche Eigenschaften und Inhibitionskonstanten gezeigt haben, wurde für die weiteren Versuche als bestcharakterisierter ausschließlich SecinH3 weiterverwendet und als nichtbindende Negativkontrolle D5, die strukturell sehr eng mit SecinH3 verwandt ist.

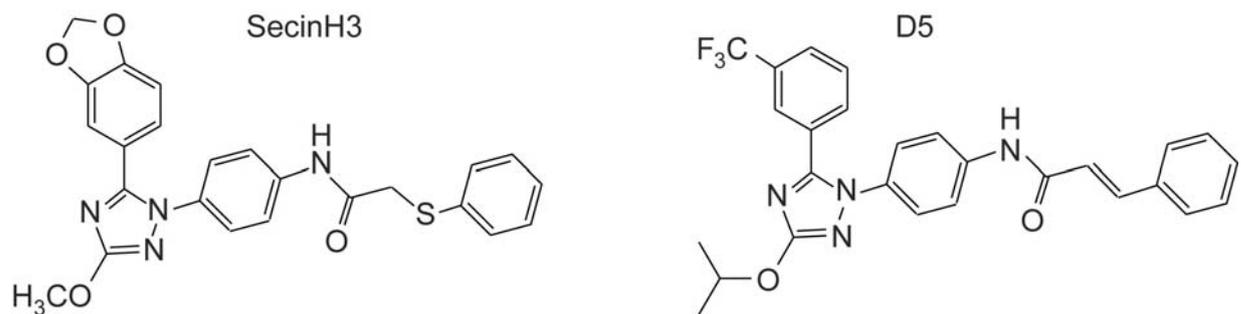


Abbildung 31: Strukturen von SecinH3 und der nichtbindenden Negativkontrolle D5, die strukturell sehr eng verwandt ist.

SecinH3 inhibiert in HeLa-Zellen die Signaltransduktion, die von serumstimulierten Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) ausgeht (s. 4.2.2). Im Speziellen wird die EGF-vermittelte Transkription von Genen, die unter Kontrolle des SRE-Promotors sind, inhibiert. Es ist daher naheliegend, daß Cytohesine auch bei der insulinvermittelten Signaltransduktion eine Rolle spielen könnten.

Um diese Frage zu beantworten, wurde das Zellsystem gewechselt. Im SRE-Luciferase-Assay wurde nachgewiesen, daß sich der MAP-Signalweg in HeLa-Zellen nicht durch Insulin stimulieren läßt (Daten nicht gezeigt).

Alle bisher in der Literatur beschriebenen Versuche zum Zusammenhang der Insulinsignaltransduktion und Cytohesinen wurden in Zelllinien durchgeführt, die den Insulinrezeptor überexprimieren¹⁹⁸, was wir vermeiden wollten, um auszuschließen, daß etwaige Effekte auf Artefakte der Überexpression zurückzuführen wären. Daher sind wir auf die Leberkarzinomzelllinie HepG2 umgestiegen, von der bekannt ist, daß sie sich durch Insulin stimulieren läßt¹⁹⁹.

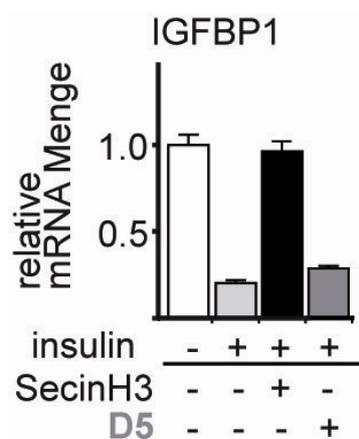


Abbildung 32: 12,5 μM SecinH3 (schwarzer Balken) unterdrücken den Insulineffekt (100 nM, Stimulation ÜN) (hellgrauer Balken) auf die Transkription von *IGFBP1*, während 25 μM der nichtbindenden Kontrolle D5 keinen Einfluß auf das Insulinsignal haben (dunkelgrauer Balken). mRNA-Mengen wurden mittels qRT-PCR bestimmt und auf die Expression des unregulierten Gens β -2-Microglobulin normiert.

Ein klassisches Zielgen, dessen Transkription durch Insulin reguliert wird, ist das *insulin-like growth factor binding protein-1* (*IGFBP1*). Insulin unterdrückt die Transkription dieses Gens durch Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren der Klasse Forkhead Box O (FoxO). Diese verlassen danach den Nukleus und translozieren ins Cytoplasma. Wir

Ergebnisse

stimulierten HepG2-Zellen, die 24 h serumdepriviert wurden für weitere 12 h in Anwesenheit von 12,5 μM SecinH3 mit 10 nM Insulin und bestimmten die mRNA-Menge von IGFBP1. Wir fanden, daß SecinH3 den Insulineffekt komplett unterdrückte (s. Abbildung 32).

Neben *IGFBP1* werden verschiedene Gene, die z. B. an der Gluconeogenese beteiligt sind und damit als Antwort des Organismus auf verringerte Nahrungszufuhr und bei Hunger stärker transkribiert werden, durch FoxOs reguliert. Daher untersuchten wir analog zu IGFBP1 die relative Transkriptionsmenge bei diesen weiteren Genen, die durch FoxO reguliert werden, mittels quantitativer RT-PCR

HepG2-Zellen wurden ebenfalls für 24 h serumfrei kultiviert, und danach für 12 h weitergehungert bzw. für 12 h mit 10 nM Insulin in Anwesenheit oder Abwesenheit von 12,5 μM des Inhibitors SecinH3 stimuliert (Abbildung 33).

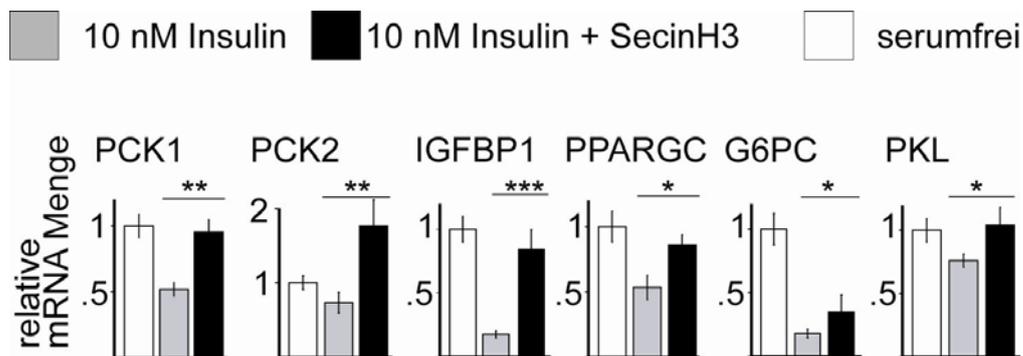
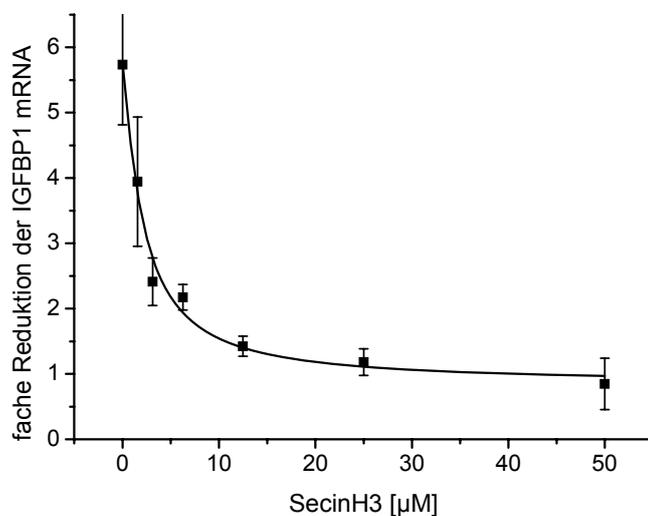


Abbildung 33: SecinH3 inhibiert die insulinvermittelte Transkriptionsrepression verschiedener FoxO-regulierter Gene in HepG2 Zellen. Die Zellen wurden für 24 h serumfrei kultiviert und in Gegenwart von 12,5 μM SecinH3 für 12 h mit 10 nM Insulin stimuliert. Die mRNA-Mengen wurden auf die Expression des unregulierten Gens β -2-Microglobulin normiert (n=3; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001)

Wie man in Abbildung 33 sieht, wird der Insulineffekt auf die Transkription der Zielgene durch SecinH3 unterdrückt.

Um einen unspezifischen Toxizitätseffekt von SecinH3 auszuschließen, sowie um zu versuchen eine IC_{50} zu bestimmen, wurde die Verbindung in einer weiteren Versuchsreihe konzentrationsabhängig titriert (Abbildung 34). SecinH3 inhibierte den Insulineffekt auf die Gentranskription in einer dosisabhängigen Weise, die für einen Inhibitor zu erwarten ist. Die IC_{50} -Werte für die verschiedenen Gene lagen zwischen 2,2 und 15 μM (Abbildung 34B). Die großen Unterschiede in diesen Werten lassen sich auf Unterschiede in den Promotorsequenzen der einzelnen Gene und damit der Beteiligung anderer Transkriptionsfaktoren, die für die Expression mehr oder weniger wichtig sind, zurückführen.

A



B

gene	IC ₅₀ [µM]
IGFBP1	2.2 +/- 1.0
PPARGC	7.3 +/- 1.3
G6PC	15.0 +/- 3.9
PCK1	10.4 +/- 2.5
PCK2	2.3 +/- 0.5
PKL	6.1 +/- 0.3

Abbildung 34: Dosisabhängige Reduktion der insulinabhängigen Unterdrückung der Transkription von FoxO-regulierten Genen durch SecinH3. HepG2 Zellen wurden 24 h serumfrei kultiviert und anschließend für 12 h in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen von SecinH3 mit 10 nM Insulin stimuliert. A: Titrationskurve für IGFBP-1 mRNA. Es ergibt sich eine IC₅₀ von ca. 2,2 µM (n=3). B: Aufstellung von verschiedenen IC₅₀ Werten für FoxO regulierte Gene.

4.2.4 Lokalisierung von FoxO-EGFP in HepG2-Zellen

Der Transkriptionsfaktor FoxO wird von der Akt (auch PKB genannt) direkt phosphoryliert. Danach bindet er an das Adapterprotein 14-3-3ζ und wird dadurch aus dem Nukleus ins Cytoplasma gebracht. Dort wird er von Phosphatasen wieder dephosphoryliert und kann in den Zellkern zurückkehren. Da wir nachweisen konnten, daß SecinH3 die Aktivierung der Akt inhibiert, sollte in der Konsequenz auch FoxO unphosphoryliert und damit im Zellkern verbleiben. Um das direkt nachzuweisen, haben wir ein Plasmid, das ein FoxO-EGFP Konstrukt unter der Kontrolle eines CMV-Promotors überexprimiert, in HepG2 eingebracht und die Zellen mit 100 nM Insulin in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen von SecinH3 stimuliert.

Abbildung 35 zeigt, daß FoxO in serumfrei kultivierten Zellen hauptsächlich im Zellkern lokalisiert ist. Nach Stimulation für 30 min mit 100 nM Insulin werden die FoxOs praktisch komplett ins Cytosol transportiert. Durch Zugabe von verschiedenen Konzentrationen von SecinH3 wird dieser Transport unterdrückt. Das Insulinsignal wird ebenfalls durch Inkubation mit einem Insulinrezeptorinhibitor (AGL2263) bzw. dem PI3K-Inhibitor Wortmannin komplett inhibiert.

Ergebnisse

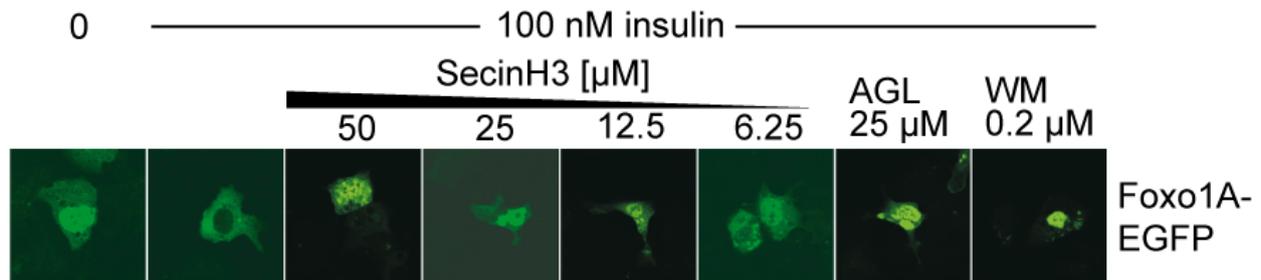
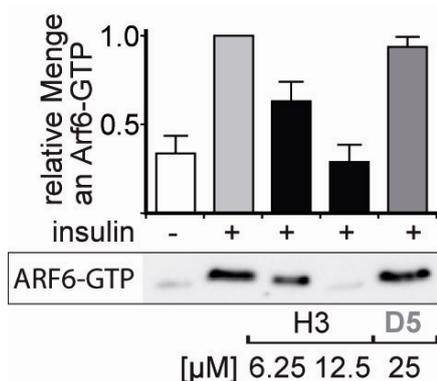


Abbildung 35: Lokalisation eines FoxO1A-EGFP Konstrukts in HepG2-Zellen. FoxO ist im unstimulierten Zustand im Kern lokalisiert (1. v. l.). Nach Stimulation mit 100 nM Insulin für 30 min wird sämtliches FoxO aus dem Kern ausgeschlossen (2. v. l.). Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von SecinH3 (3.-6. v. l.) verhindert die insulinabhängige Translokation. Behandlung mit dem Insulinrezeptorinhibitor AGL2263 sowie mit dem PI3K-Inhibitor Wortmannin unterdrückt ebenfalls das Insulinsignal.

4.2.5 GGA3-Pulldown Experimente

Es mußte sichergestellt werden, daß die Effekte von SecinH3 in Zellkultur auf eine Inhibition der Cytohesine zurückzuführen sind. Da weder die transkriptionellen Readouts, noch die Phosphorylierungsversuche an der Akt die Aktivität der Verbindung auf die Cytohesine direkt messen, haben wir versucht zu analysieren, ob SecinH3 die Aktivierung der ARFs in der lebenden Zelle beeinflusst.

GGA3 ist ein Adaptorprotein, dessen N-terminale Domäne spezifisch GTP-gebundene und nicht GDP-gebundene ARFs bindet. Wir haben ein GST-Fusionsprotein dieser N-terminalen Domäne an GST-Agarose gebunden und es dafür verwendet, aus Zelllysaten aktiviertes ARF-GTP abzufangen und dieses auf einem Immunoblot zu quantifizieren (s. Abbildung 36). Insulin führt zu einer dreifachen Erhöhung der Menge an aktiviertem ARF6, die in SecinH3-behandelten Zellen konzentrationsabhängig reduziert wurde, aber von der strukturell verwandten, aber nicht



mit Cytohesinen interagierenden Verbindung D5 nicht beeinflusst wurde.

Abbildung 36: Die insulinstimulierte ARF-Aktivierung in HepG2-Zellen wird durch SecinH3 inhibiert. 3 h serumfrei kultivierte Zellen wurden mit SecinH3 (schwarze Balken), DMSO oder der Negativkontrolle D5 (dunkelgrauer Balken) vorinkubiert und für 15 min mit 100 nM Insulin stimuliert. ARF-GTP wurde mit immobilisiertem GST-GGA3 Protein abgefangen und ARF6 wurde mittels Westernblot visualisiert (unten: repräsentativer Blot) und quantifiziert (oben: Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten).

4.2.6 siRNA Experimente

Um sicherzustellen, daß die Effekte, die SecinH3 im zellulären System zeigt keine generellen „off-target“-Effekte sind, sowie um das Cytohesin zu identifizieren, das für die Weiterleitung des Insulinsignals entscheidend ist, wurden siRNAs für die drei Cytohesine, die in HepG2 gefunden

werden können, transfiziert. Dabei wurden zwei verschiedene Methoden der Transfektion ausprobiert, die Lipofektion sowie die Elektroporation mit sogenannten Rechteckwellen.

4.2.6.1 Lipofektion von siRNAs gegen die Cytohesine-1-3

Die Lipofektion, also Transfektion mittels Liposomenbildnern, hier Oligofectamine der Fa. Invitrogen, von siRNAs, die kommerziell erhältlich sind, mußte für den spezifischen Knockdown der Cytohesine 1-3 (Sequenzen 6.7.2.3) optimiert werden. Es wurde zunächst die Knockdown-Zeit (24-72 h) und die eingesetzten Menge (25-200 pmol / $2 \cdot 10^4$ Zellen) sowie das Verhältnis aus Oligofectamine und siRNA optimiert (Daten nicht gezeigt).

Die resultierenden optimalen Knockdownbedingungen waren 100 pmol siRNA pro Loch einer 12-well-Platte mit einer Dichte von 30-40% konfluenten Zellen und einer Knockdownzeit von 72 h. Unter diesen Bedingungen konnte eine Reduktion sowohl der mRNAs (s. Abbildung 37, links) als auch der Proteine (s. Abbildung 37, rechts) der einzelnen Cytohesine auf ca. 30 % erreicht werden.

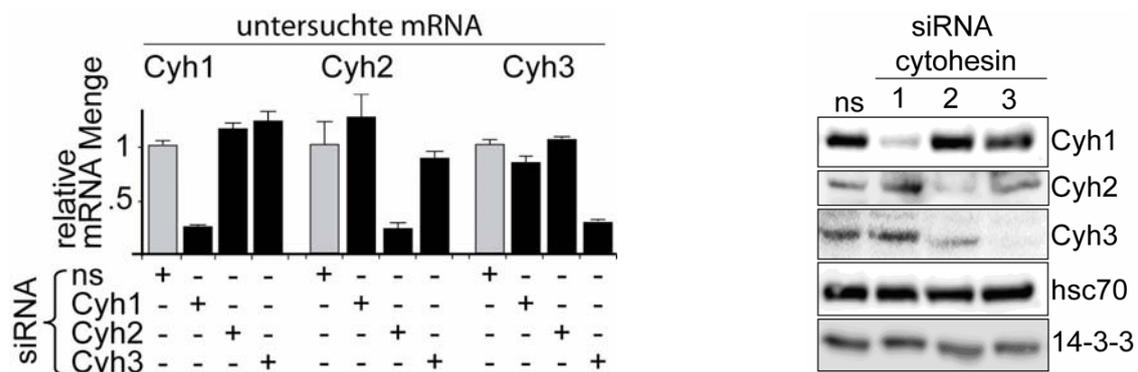


Abbildung 37: siRNAs gegen die Cytohesine-1-3 reduzieren sowohl die mRNA als auch die Proteine der korrespondierenden Gene spezifisch. Links: quantitative RT-PCR 72 h nach Transfektion von 100 pmol der angegebenen siRNA. Als Kontrolle diente eine siRNA (ns), die kein bekanntes Gen runterreguliert. Die Expression der Cytohesin-mRNAs wurde auf die Expression des unregulierten Gens β -2-Microglobulin normalisiert. Rechts: Die Proteinniveaus der einzelnen Cytohesine werden ebenfalls spezifisch durch die siRNAs reduziert. Gezeigt sind Immunoblots mit spezifischen Antikörpern für Cytohesine-1-3. Hsc70 und 14-3-3 dienen als Ladekontrollen.

Anschließend untersuchten wir, ob Insulin die Transkription des Modellgens *IGFBP1* immer noch effektiv unterdrücken konnte. 36 h nach Transfektion der siRNAs wurden die Zellen für 24 h serumfrei kultiviert und anschließend für 12 h mit Insulin stimuliert. Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden, zeigten die erwartete Unterdrückung der Transkription von *IGFBP1* (s. Abbildung 38), während Knockdown von Cytohesin-2 und -3 das Insulinsignal unterdrückt.

Ergebnisse

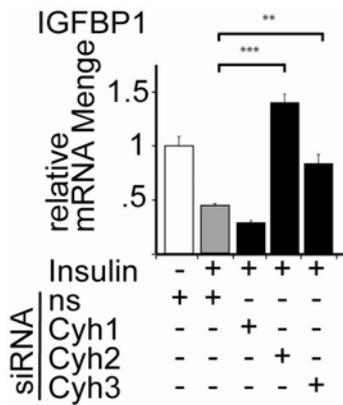
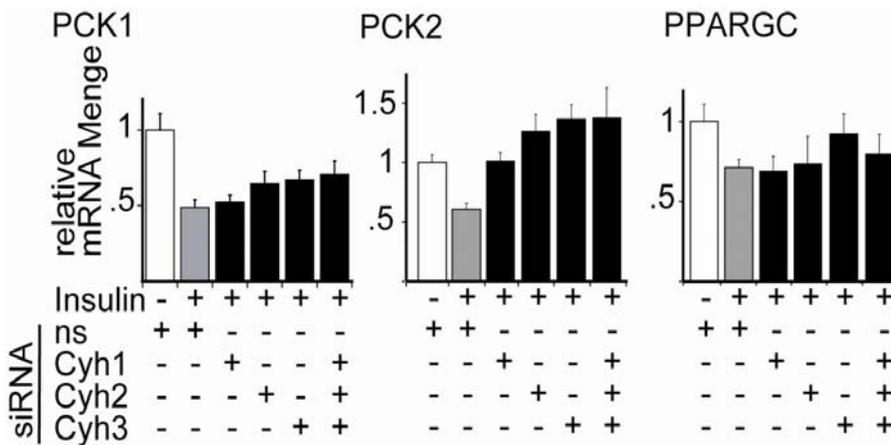


Abbildung 38: Reduktion der Menge an Cytohesin-2 und -3 durch RNAi resultiert in Unterdrückung des Insulinsignals. Cytohesin-1 knockdown scheint eine Verstärkung des Insulinsignals zu bewirken. Als Kontrolle diente eine siRNA (ns), die keine Homologie zu einem bekannten Gen zeigt (n=3; ** p < 0,01; * p < 0,001).**

Interessanterweise sind die Cytohesine in diesem Versuch nicht redundant. Knockdown von Cytohesin-1 bewirkt eine Verstärkung des Insulinsignals, da die Menge an *IGFBP1*-mRNA gegenüber der Kontrolle fast halbiert wird.

Abbildung 39: Lipofektion von siRNAs gegen Cyh-1-3 resultiert bei einigen FoxO-regulierten in einer Unterdrückung des Insulinsignals. Die Unterdrückung der Transkription durch Insulin wird bei PCK1 durch Transfektion von siRNAs gegen Cyh1 und Cyh2, bei PCK2 durch Transfektion von siRNAs gegen alle Cytohesine und bei PPARGC durch Knockdown von Cyh3 revertiert.



Transfektion von siRNAs gegen Cyh1 und Cyh2, bei PCK2 durch Transfektion von siRNAs gegen alle Cytohesine und bei PPARGC durch Knockdown von Cyh3 revertiert.

Daraufhin untersuchten wir, ob der Insulineffekt auf die Transkription einer Reihe anderer Gene,

die durch SecinH3 beeinflusst wurden, durch Knockdown von Cyh-2 und -3 ebenfalls unterdrückt wird (Abbildung 39). Wir fanden, daß sich bei der PCK2 das gleiche Muster wie bei IGFBP1 zeigte, während bei der PCK1 das Insulinsignal nur sehr schwach unterdrückt wurde, dafür aber unabhängig von der Cytohesinspezies. Bei dem PPARGC wiederum zeigt nur der Knockdown von Cytohesin-3 einen Effekt. Bei keinem dieser Gene konnte man die gleiche Verstärkung des Insulineffekts sehen, wie nach dem Knockdown von Cytohesin-1 auf die IGFBP1-mRNA. Ebenso wurde kein Effekt der siRNA auf die Transkription anderer Gene, wie *G6PC* und *PKL*, die von Insulin durch FoxO reguliert werden und bei denen der Insulineffekt durch SecinH3 (s. 4.2.3) inhibiert wird, festgestellt.

4.2.6.2 Elektroporation mit Rechteckwellen

Mit siRNAs, die mittels Lipofektion in HepG2-Zellen eingebracht wurden, konnte gezeigt werden, daß der Insulineffekt auf die Transkriptionskontrolle des von Insulin über FoxO regulierten Modellgens *IGFBP1* durch Cytohesin-2 und -3 weitergegeben wird (s. 4.2.6.1).

Allerdings waren die Resultate auf verschiedene andere Gene nicht so eindeutig wie bei der Verwendung des alle Cytohesine inhibierenden SecinH3s. Daher wurde eine andere Möglichkeit der Transfektion ausprobiert, nämlich die für kürzere Nukleotide effizientere Methode der Elektroporation mittels „Rechteckwellen“ (square waves).

Zunächst wurden wieder die Bedingungen der Transfektion optimiert, nämlich die siRNA-Menge (2,5 und 5 µg siRNA auf $4 \cdot 10^5$ HepG2-Zellen), die Inkubationszeit (48 und 72 h) und das Transfektionsprogramm (110 V für 20 ms; 250 V für 10 ms; oder 500 V für 5 ms) (Daten nicht gezeigt).

Die optimalen Bedingungen waren 2,5 µg siRNA für 72 h und ein Elektroschock von 500 V für 5 ms.

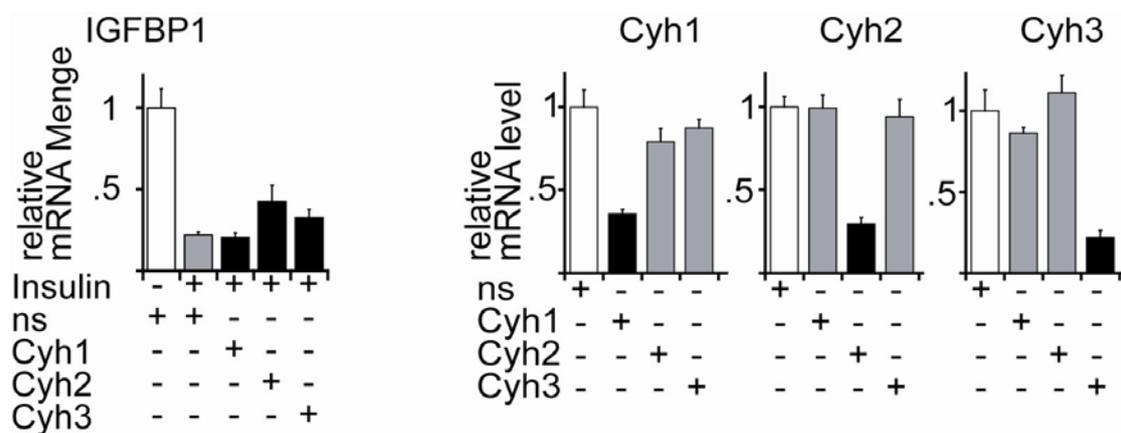


Abbildung 40: siRNAs für Cytohesin-2 und -3 mit "square waves"-Elektroporationsmethode in HepG2 eingebracht unterdrücken das Insulinsignal bei der Transkription von *IGFBP1* (links), wenn auch nicht so effektiv wie bei lipofizierten siRNAs (Abbildung 38). Die mRNA-Mengen der Cytohesine werden auf ca. 30 % spezifisch reduziert (rechts)

Prinzipiell konnten für die Transkription von *IGFBP1* die gleichen Ergebnisse gefunden werden wie bei der Lipofektion der siRNA, nämlich, daß bei Knockdown von Cytohesin-2 oder -3 das Insulinsignal schwächer wird und daß bei Knockdown von Cytohesin-1 das Insulinsignal verstärkt wird, wenn auch sehr schwach. Diese Effekte waren aber viel schwächer ausgeprägt und bei der Untersuchung des Transkriptionslevels der anderen Gene konnten die Effekte von SecinH3 ebenso wie bei der Lipofektion nicht reproduziert werden (s. 4.2.6.1).

4.2.6.3 Lipofektion von siRNAs gegen ARF1 und ARF6

Eine der zentralen, bisher bekannten Funktionen der Cytohesine ist die Katalyse des Austauschs von GDP zu GTP an Proteinen der ARF-Klasse. Es ist daher möglich, daß die

Signalweiterleitung nach Aktivierung der Cytohesine durch Insulin über die ARF-GTPasen läuft. Von Cytohesin-1 wird vermutet, daß es präferentiell an ARF1 austauscht, während Cytohesin-2 an ARF1 und ARF6 austauscht und Cytohesin-3 ARF6 bevorzugt. Daher haben wir versucht die Rolle von ARF1 und ARF6 mittels RNA-Interferenz zu untersuchen (Sequenz 6.7.2.3).

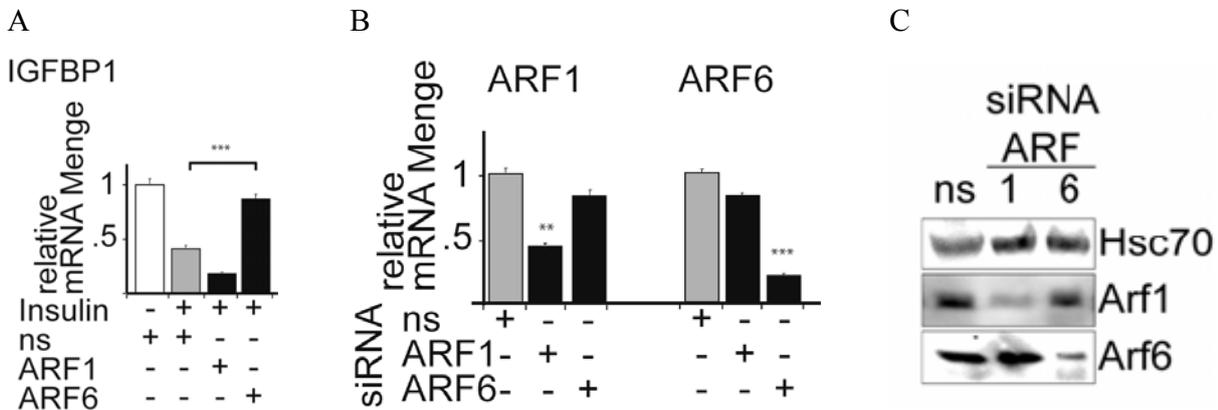


Abbildung 41: Das Insulinsignal wird über ARF6 weitergeleitet. Reduktion der Menge an ARF6 mittels RNAi unterdrückt den Insulineffekt auf die Transkription von IGFBP1 (A). siRNAs gegen ARF1 und ARF6 reduzieren nach 72 h spezifisch die mRNA-Menge (B), sowie die Proteinmenge (C) von ARF1 und ARF6. Die mRNA-Menge wurde mit quantitativer RT-PCR bestimmt und die Mengen auf das unregulierte β -2-Microglobulin-Gen normalisiert. Im Immunoblot diente Hsc70 als Ladekontrolle (n=3; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

Die siRNAs zeigen einen spezifischen Knockdown, wobei die siRNA für ARF1 dessen mRNA-Menge auf ca. 40 % und die siRNA für ARF6 dessen mRNA-Menge auf ca. 20 % reduziert. Der Effekt auf die Transkriptionsregulierung von *IGFBP1* durch Insulin ist allerdings sehr ausgeprägt. Knockdown von ARF6 unterdrückt das Insulinsignal genauso wie der Knockdown von Cytohesin-2 und -3 vollständig, während der Knockdown von ARF1 ähnlich wie der Knockdown von Cytohesin-1 eine Verstärkung des Insulinsignals bewirkt.

Daraus kann man folgern, daß das Insulinsignal über die Cytohesine-2 und -3 und ARF6 weitergeleitet wird.

4.2.7 Golgi Färbungen

Da SecinH3 alle Cytohesine und in hohen Konzentrationen auch große GEFs wie Gea2 inhibiert, die für die Integrität des Golgi-Apparats wichtig sind, muß sichergestellt werden, daß dieser bei Behandlung mit SecinH3 intakt bleibt, da ansonsten die Effekte des Moleküls eventuell Artefakte einer disintegrierenden Zelle darstellen könnten. Ebenso könnte die Verstärkung des Insulineffekts auf die Transkription von *IGFBP1* durch Insulin (4.2.6.1 und 4.2.6.3) beim

Knockdown von Cytohesin-1 und ARF1 ein solches Artefakt sein, da beide als mit dem Golgi-Apparat assoziiert gezeigt wurden.

Wie man in Abbildung 42 sieht, zerstört die Kontrollverbindung BFA, die ausschließlich große GEFs inhibiert, die Integrität des Golgi-Apparats schon bei einer Konzentration von 1 μM , während weder SecinH3 bei 25 μM noch die siRNAs für ARF1 und Cytohesin-1 einen nennenswerten Effekt auf dessen Stabilität haben. Damit kann ausgeschlossen werden, daß die Wirkung des kleinen Moleküls durch eine unspezifische Zerstörung des Golgi-Apparats erklärt werden kann.

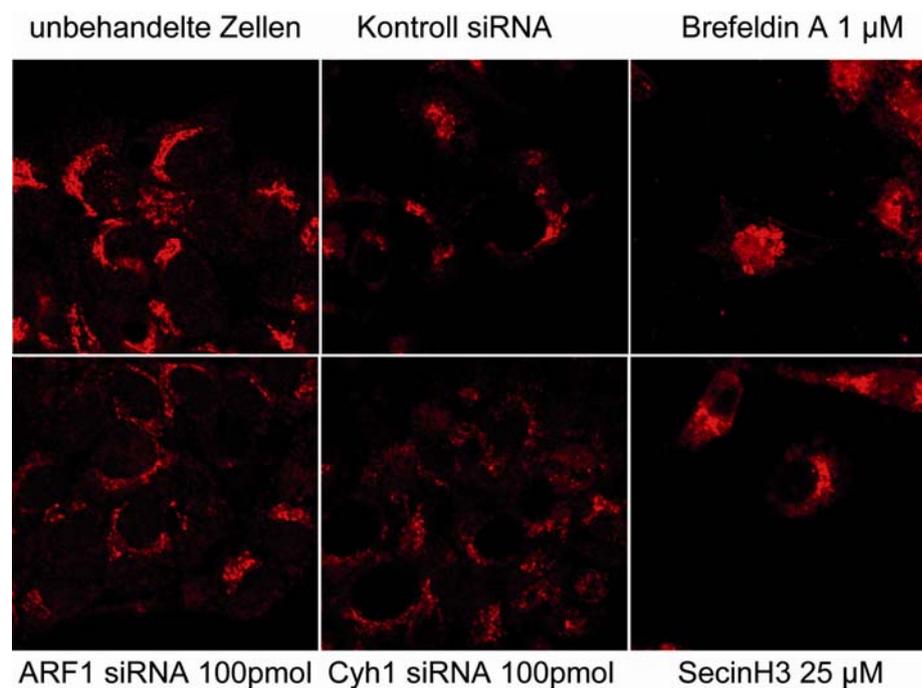
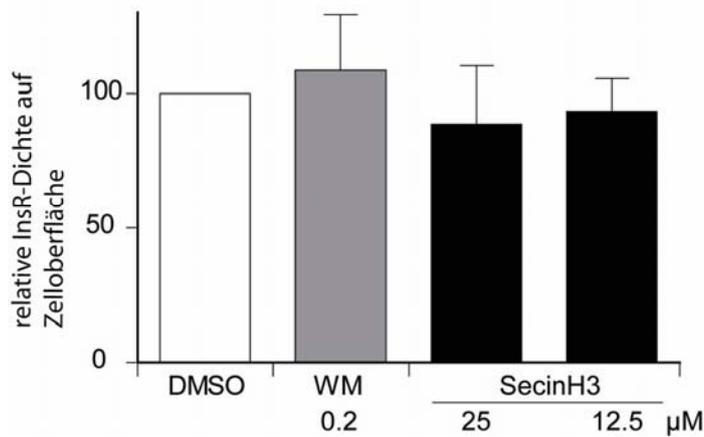


Abbildung 42: Weder SecinH3 noch die siRNAs gegen ARF1 und Cytohesin-1 zerstören den Golgi-Apparat in HepG2-Zellen. Der halbmondförmig um den Zellkern lokalisierte Golgi-Apparat wurde mit einem Anti-Giantin-Antikörper angefärbt. Secin H3 (unten rechts) zeigt bei 25 μM , einer Konzentration, die weit über der IC_{50} von 2,2 μM für die Inhibition des Insulinsignalwegs liegt keine nennenswerte Auflösung des Golgi-Apparates im Gegensatz zu BFA (oben rechts), einem Inhibitor für große ARF-GEFs. siRNAs für Cytohesin-1 und ARF1 bewirken ebenfalls keine Auflösung des Golgi-Apparates, was eine Störung des generellen Vesikeltransporteffekt vom Golgi-Apparat zur Membran als Erklärung für die Effekte der siRNAs ausschließt.

4.2.8 Rezeptordichte an der Zelloberfläche

Um auszuschließen, daß der SecinH3-Effekt auf die Signaltransduktion auf der Hemmung des ARF-vermittelten Rezeptortransport zur und von der Zelloberfläche beruht, wurde die Rezeptormenge auf HepG2-Zellen gemessen.

Dazu wurden Zellen übernacht in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von SecinH3 kultiviert, mittels Accutase™ (PAA) abgelöst und mit einem Antikörper, der spezifisch die IR α -



Kette erkennt angefärbt und im Cytometer gezählt (Abbildung 43).

Abbildung 43: Relative Insulinrezeptordichte auf der Oberfläche von HepG2-Zellen nach 12 h Inkubation mit SecinH3. Weder der PI3K-Inhibitor Wortmannin noch SecinH3 eingesetzt in Konzentrationen von 12,5 und 25 μ M haben einen Einfluß auf die Rezeptordichte.

SecinH3 hat keinen meßbaren Einfluß auf die Menge an

Insulinrezeptor, den HepG2-Zellen präsentieren, genausowenig wie Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs durch den PI3K-Inhibitor Wortmannin.

4.3 Maus

Durch die Zellkulturexperimente wurde nachgewiesen, daß SecinH3 zellgängig ist und spezifisch Cytohesine inhibiert. Diese Inhibition führt in der Leberzelllinie HepG2 zu einer Unterdrückung des Insulinsignalwegs. Das eröffnet die Möglichkeit die Rolle von Cytohesinen *in vivo* im Mausmodell zu testen, indem SecinH3 zum Mäusefutter gegeben wird. Das erste untersuchte Organ war die Leber, die über die Pfortader dem Verdauungstrakt am Nächsten ist.

4.3.1 Nachweis von SecinH3 in der Leber

Die Mäuse vom C57/Bl6-Stamm wurden für zwei Tage mit Standardmäusefutter dem 0,9 µmol/g SecinH3 beigemischt worden waren gefüttert. Um sicherzustellen, daß SecinH3 in der Mäuseleber unverändert vorliegt, wurde ein Chloroformextrakt von Mäuseleberhomogenat auf der HPLC aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert (s. 6.5.1). In der HPLC wurde ein Peak gefunden, der die Retentionszeit von SecinH3 hatte (nicht gezeigt) und in Kontrolleberextrakten, von Mäusen, die kein SecinH3 gefressen hatten, nicht vorlag (s. Abbildung 44A).

Dieser Peak wurde isoliert und im Massenspektrometer vermessen. Die Hauptpeaks konnte man $[\text{SecinH3}+\text{H}]^+$ und $[\text{SecinH3}+\text{Na}]^+$ zuordnen (s. Abbildung 44B).

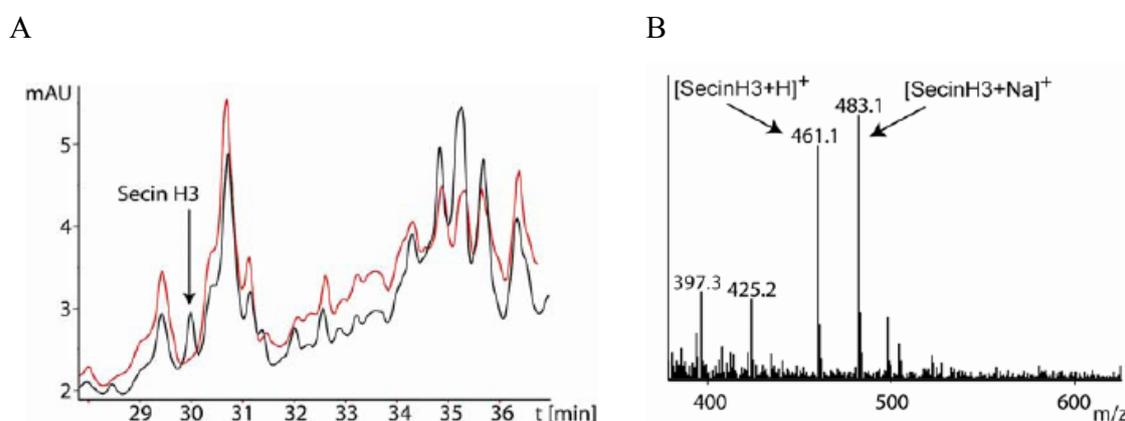


Abbildung 44: Mäuseleberhomogenate von Mäusen, die zwei Tage 0,9µmol/g Futter SecinH3 gefressen hatten, enthalten unverändertes SecinH3. (A) HPLC-Analyse von Chloroformextrakten von Leberhomogenaten von Mäusen, die kein SecinH3 (rote Linie) bzw. 0,9 µmol/g Futter SecinH3 (schwarze Linie) im Futter hatten. (B) Massenspektrum des Peak, der in der HPLC eine Retentionszeit von ca. 30 min hatte. Man findet ein Molekül mit der Masse von $[\text{SecinH3}+\text{H}]^+$ (461,1 u) sowie $[\text{SecinH3}+\text{Na}]^+$ (483,1 u).

4.3.2 Genexpression

Als nächstes wurden die weiteren Konsequenzen der Inhibition der Cytohesine und der damit verbundenen Inhibition der Aktivierung der Akt auf die Genexpression in der Leber untersucht. Neben *Igfbp1* wurde die Expression der Gene für die *Pyruvat carboxykinasen-1* und *-2* (*Pck1* und *Pck2*), der *Fructose-1,6-Bisphosphatase* (*Fbp2*) und der *Glucose-6-Phosphatase (katalytische Untereinheit)* (*G6pc*), die an der Gluconeogenese beteiligt sind, sowie der glykolytischen Enzyme *Hexokinase 2* (*Hk2*), der *Glucokinase* (*Gck*) und ihrem Regulator (*Gckr*) untersucht. Verglichen mit Mäusen, die das gleiche Futter ohne SecinH3 gefressen hatten, war die Expression der durch Insulin unterdrückten Gene für die Gluconeogenese in unterschiedlichem Maß erhöht. *Pck1* und *Pck2* wurden jeweils 1,2-fach stärker exprimiert, während sich die Expression von *Fbp2* und *G6pc* verdoppelte (s. Abbildung 45, grün markiert). Die insulinstimulierte Expression der Gene für die Glycolyse war dagegen in ebenfalls unterschiedlichem Maß reduziert (s. Abbildung 45, rot markiert). Die Menge der *Gck* wurde halbiert, die *Hk2* und der *Gckr* wurden 0,8 mal schwächer exprimiert, die *Pck1* 0,7 mal.

SecinH3 inhibierte die insulinstimulierte Expression der Gene für die *Fettsäuresynthetase* (*Fasn*) und die *Acetoacetyl-CoA-Synthetase* (*Aacs*), die an der Triglyceridsynthese bzw. dem Ketonkörperstoffwechsel beteiligt sind. Die Expression zweier Enzyme der mitochondrialen β -Oxidation, die *Carnitin Palmytoyltransferase* (*Cpt1a*) und die *Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase* (*Hadha1*), die durch Insulin unterdrückt wird, war bei SecinH3-gefütterten Mäusen stimuliert (s. Abbildung 45).

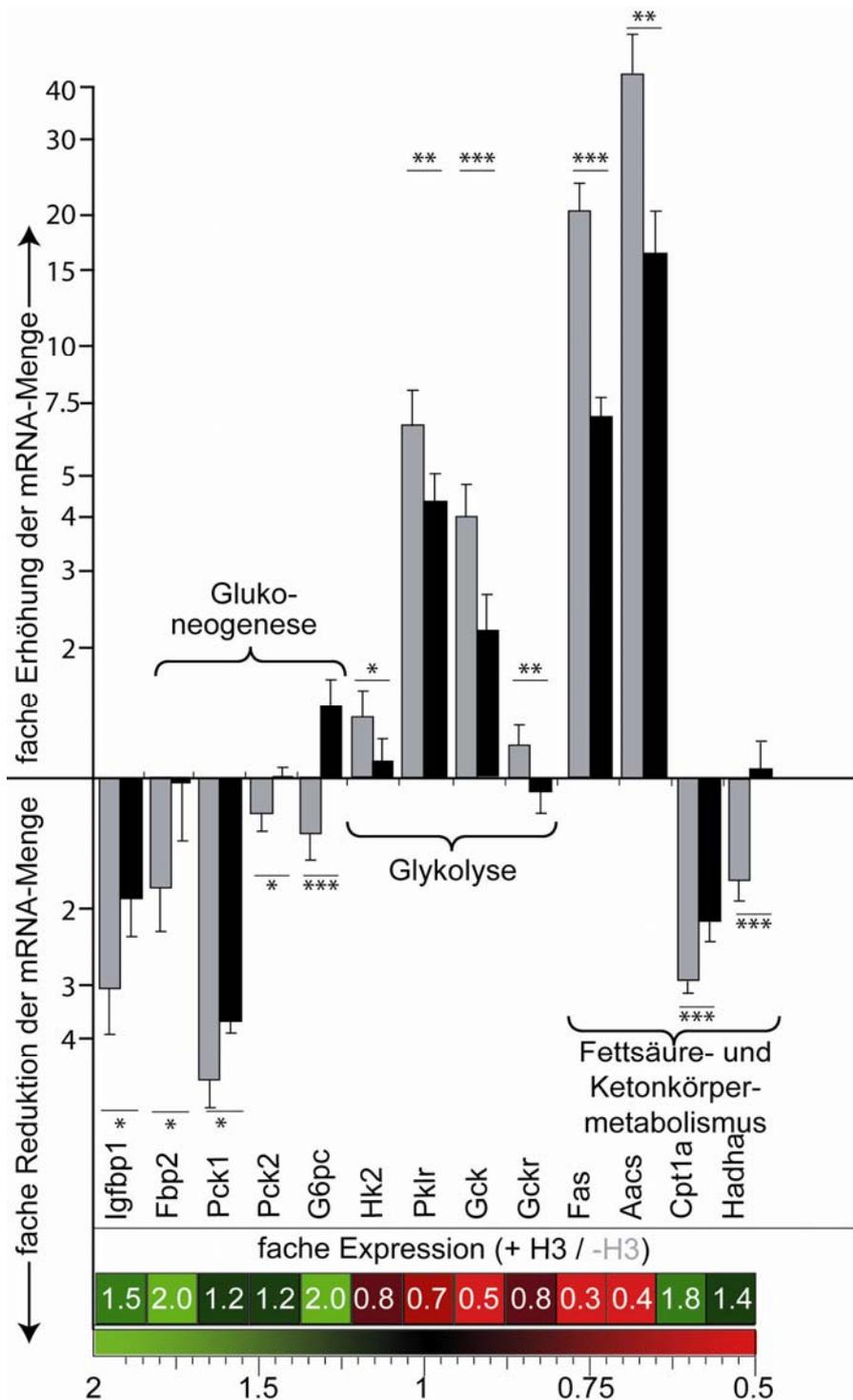


Abbildung 45: Effekt von SecinH3 auf die Expression von verschiedenen Genen des Zucker- und Fettstoffwechsels in der Leber verglichen mit 12 h gehungerten Mäusen (auf 1 gesetzt). Schwarze Balken: Mäuse, die für 2 Tage mit SecinH3 gefüttert wurden; Graue Balken: Normales Futter. Die Expression wurde auf die Expression des unregulierten Gens β -2-Microglobulin normalisiert (n=6; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001). Das Verhältnis der Genexpression in Gegenwart und in Abwesenheit von SecinH3 wurde gebildet und auf einer Farbskala kodiert. Grün kodiert sind Gene, deren Expression durch SecinH3 erhöht wird, rot kodiert sind Gene, deren Expression reduziert wird.

Ergebnisse

Neben der Genexpression aus Lebergewebe wurden auch die Genexpression in epididymalem Fett- sowie in Muskelgewebe untersucht. Dabei wurde bei Verfütterung von SecinH3 kein Effekt auf die Genexpression festgestellt.

4.3.3 Serumparameter

Die veränderte Expression von Genen (s. 4.3.2), die im Zucker- und Fettstoffwechsel der Leber eine wichtige Rolle spielen, sollte sich in veränderten Niveaus von im Metabolismus wichtigen Stoffen niederschlagen.

Analyse des Glykogengehalts der Leber zeigte, daß SecinH3 die Glykogensynthese inhibierte, bzw. den Glykogenabbau stimulierte (Abbildung 46A).

Gleichzeitig fanden wir, daß im Serum der Mäuse der Insulingehalt massiv und der Glucoselevel leicht erhöht waren (Abbildung 46B und C). Die Triglyceride und die freien Fettsäuren im Serum waren deutlich reduziert, während die Menge der Ketonkörper stark erhöht war (Abbildung 46D-F).

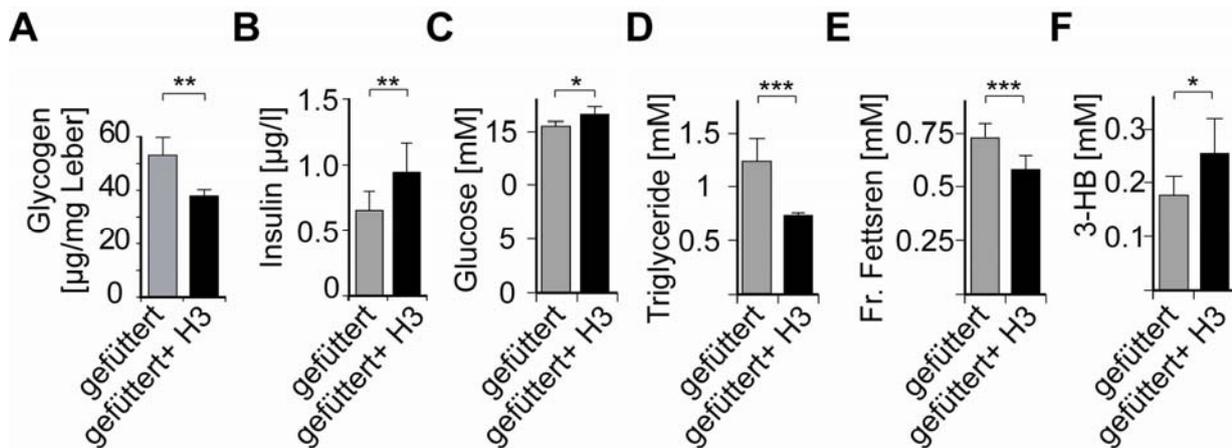


Abbildung 46: SecinH3 verändert den Metabolismus von Mäusen. A: Der Glykogengehalt in Lebern von SecinH3-gefütterten Mäusen ist im Vergleich zu Kontrollmäusen signifikant geringer (n=5); B-F: Serumparameter von SecinH3-gefütterten und Kontrollmäusen. B: der Insulingehalt im Serum wird durch Fütterung mit SecinH3 deutlich erhöht; C: der Glucosegehalt bleibt fast unverändert; D,E: die Menge an Triglyceriden sowie an freien Fettsäuren nimmt deutlich ab; F: Ketonkörper werden deutlich erhöht (n=8); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5 Diskussion

5.1 Screening mit Fluoreszenzpolarisation

Wir haben einen auf Fluoreszenzpolarisation basierenden Assay entwickelt, um Inhibitoren für die Cytohesinfamilie zu finden.

Imke Grüne hat das Aptamer M69, das den GDP/GTP-Austausch an ARFs mit einer IC₅₀ von ca. 1 µM inhibiert und die Sec7-Domäne von Cytohesin-1 verwendet, um Substanzen zu finden, die die inhibitorischen Eigenschaften des Aptamers besitzen, da sie es vom Protein verdrängen. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde das Aptamer K61s, das spezifisch ausschließlich Cytohesin-2 bindet, als Sensor verwendet, um kleine Moleküle zu finden, die Cytohesin-2 binden. Beide Screens wurden mit derselben von der Firma Comgenex (Ungarn) erworbenen diversitätsorientierten Substanzbibliothek durchgeführt.

Dabei wurden aus beiden Screens kleine Moleküle identifiziert, die Cytohesine mit Dissoziationskonstanten im hohen nanomolaren Bereich binden und auch den GDP/GTP-Austausch inhibieren (für den Screen K61s mit Cyh-2 s. 4.1.4.3 , 4.1.5.2 und 4.1.6; für den Screen siehe Dissertation I. Grüne, 2005 sowie Hafner et al.¹⁹³ und Tabelle 4).

Dissoziationskonstante K_d (nM)*			Inhibition des GDP/GTP Austauschs [†]		
Protein	Verbindung		Protein	IC ₅₀ (µM)	
	H3	H3bio		H3	D5
hCyt1-S7	200 ± 10	523 ± 26	hCyt1	5.4 ± 0.3	n.d. [‡]
hCyt2-S7	250 ± 5		hCyt2	2.4 ± 0.1	n.d. [‡]
hCyt3-S7	239 ± 17		hCyt3	5.6 ± 0.4	
			mCyt3	5.4 ± 0.6	
			steppke [§]	5.6 ± 0.2	
			yGea2-S7	65 ± 4.0	
hEFA6-S7	7,600 ± 200		hEFA6-S7	>100	
hSOS	n.d. [‡]		hSOS	n.d. [‡]	

Tabelle 4: Zusammenfassung der Dissoziationskonstanten von SecinH3 und seinem biotinylierten Derivat, sowie der Inhibitionskonstanten von SecinH3 für den GDP/GTP-Austausch. * bestimmt durch isothermale Titrationskalorimetrie † GDP/GTP-Austausch bestimmt durch Tryptophanfluoreszenzassay ‡n.d., nicht detektierbar; §Drosophila Homologes der Cytohesine; ||SOS-katalysierter GTP Austausch an humanem Ras wurde mit mant-GDP bestimmt (aus Hafner et al.¹⁹³)

Interessanterweise sind in beiden Screens jeweils unterschiedliche Hits gefunden worden. Von den beiden Aptameren K61s und M69 weiß man, daß sie unterschiedliche Stellen an den Cytohesinen binden. Während M69 ausschließlich die Sec7-Domäne bindet, benötigt K61s sowohl die Sec7-Domäne als auch die CC-Domäne, um zu binden. Da in den Verdrängungsassays nur Substanzen gefunden werden, die das Aptamer vom Protein verdrängen und Aptamere unterschiedliche Bindungsepitope besitzen war auch zu erwarten, daß die beiden Screens unterschiedliche Hits liefern würden.

Die aus dem Screen für Cyh-1-Inhibitoren gefundene ganze Reihe an verschieden substituierten 1,2,4-Triazol-Analoga haben die inhibitorischen und die Bindungseigenschaften des Aptamers M69 geerbt, denn sie inhibieren den GDP/GTP-Austausch im mikromolaren Bereich und sie diskriminieren in ihrer Bindung nicht zwischen den einzelnen Cytohesinen, auch nicht zwischen den Cytohesinen verschiedener Spezies, die hochkonserviert sind, wohl aber zwischen großen und kleinen Sec7-Domäne besitzenden GEFs. Ein weiterer Spezifitätsnachweis der gebundenen kleinen Moleküle ist, daß *in vitro* der GDP/GTP-Austausch eines anderen GEF/G-Protein-Pärchens, SOS/H-Ras nicht inhibiert wird. Die kleinen Moleküle, die mit K61s gefunden wurden unterscheiden sich in ihren Eigenschaften nicht von denen, die mit M69 gefunden wurden. Dies ist insofern erstaunlich, als das Aptamer K61s den GDP/GTP-Austausch nicht inhibiert sowie ausschließlich Cyh-2 bindet. Eventuell verändert sich die Konformation der Cytohesine nach Bindung der kleinen Moleküle in der Nähe des Bindungsepitops von K61s so stark, daß die Austauschfunktion inhibiert wird, ohne dabei allerdings das Bindungsepitop von M69 zu stören. Daß die kleinen Moleküle nicht mehr zwischen den Cytohesinen diskriminieren wird daran liegen, daß die Sec7-Domänen der Cytohesine sehr homolog sind (s. 2.2.2) und daher nur sehr komplexe und große Moleküle, wie es Aptamere sind, zwischen ihnen diskriminieren können.

Nach einleitender Charakterisierung aller dieser Cytohesin-inhibierenden Verbindungen wurde SecinH3 als aussichtsreichstes Molekül ausgewählt um für weiterführende Zellkulturstudien und im Mausmodell verwendet zu werden.

5.2 SecinH3 ist ein Werkzeug zur Untersuchung der Funktion der Cytohesine in der Signaltransduktion

5.2.1 MAPK

Das Aptamer K61 wurde von M. Theis verwendet, um nachzuweisen, daß Cytohesin-2 am MAPK-Signalweg beteiligt ist. K61 inhibierte die von wachstumsfaktorbindenden Rezeptoren

SecinH3 ist ein Werkzeug zur Untersuchung der Funktion der Cytohesine in der Signaltransduktion

über den MAPK-Signalweg stimulierte Transkription der sogenannten „immediate early genes“¹⁵⁸. Mittels siRNA wurde nachgewiesen, daß dieses Signal ausschließlich über Cytohesin-2 und nicht über Cytohesin-1 weitergeleitet wird. Überexpressionsstudien mit der katalytisch inaktiven Cyh-2 Mutante E156K lassen vermuten, daß eine intakte Sec7-Domäne wichtig für die Signaltransduktion ist, selbst wenn das Aptamer K61 den GDP/GTP-Austausch nicht inhibiert. Die kleinen Moleküle, die in den Screens gefunden wurden, sollten daher, vorausgesetzt sie sind zellgängig, ebenfalls den MAPK-Signalweg hemmen.

Im gleichen Assay, den M. Theis zur Charakterisierung seines Aptamers verwendet hatte, inhibierten die von uns gefundenen Cytohesin-Inhibitoren tatsächlich den MAPK-Signalweg. Unspezifische toxische Effekte wurden durch einen MTT-Assay ausgeschlossen. Es blieb daher noch übrig nachzuweisen, daß die an der Signaltransduktion beteiligten Kinasen nicht direkt von SecinH3 beeinflusst werden. Dies wurde durch einen von der Firma Invitrogen durchgeführten *in vitro*-Assay nachgewiesen (s. Tabelle 5).

Kinase	% Inhibition			Differenz zwischen Datenpunkten [Punkt 1 – Punkt 2]
	Datenpunkt 1	Datenpunkt 2	Mittel	
Akt1 (PKB α)	8	5	6	3
Akt2 (PKB β)	9	9	9	0
EGFR (ErbB1)	-3	-3	-3	0
ErbB2 (Her2)	-5	-1	-3	4
GSK3 β	3	-1	1	5
IGF1R	5	1	3	4
InsR	1	-1	0	2
MapK1 (Erk2)	2	3	3	1
MapK3 (Erk1)	-7	-5	-6	2
PDK1	-8	-1	-4	7

Tabelle 5: SecinH3 ist kein genereller Kinaseninhibitor. Die Inhibition der Kinasen wurde in Doppelbestimmung durch den SelectScreen™ Kinase Profiling Service der Firma Invitrogen gemessen. Gelb unterlegt sind Kinasen, die im PI3K/Akt-Signalweg (s.u. 5.2.2) eine wichtige Rolle spielen (aus Hafner et al.¹⁹³).

Zusätzlich wurde mit SecinH3 nachgewiesen, daß nicht nur die FCS-stimulierte Signaltransduktion inhibiert wird, sondern ganz spezifisch das von EGF initiierte Signal unterdrückt wird. Cytohesine spielen also bei der Signalweiterleitung über RTK eine fundamentale Rolle. Da mitogene Signale von vielen verschiedenen Faktoren in den MAPK-Signalweg integriert werden und die „Breitband“-Stimulation mit FCS sowohl von den Aptameren M69 und K61, als auch von den Cytohesin-Inhibitoren blockiert wird, ist die Vermutung naheliegend, daß Cytohesine sehr nahe an der Membran lokalisiert und für die

Funktion von verschiedenen RTKs wichtig sind. Alternativ können Cytohesine direkt an der Aktivierung der MAP-Kinasen selbst beteiligt sein, also genau an der Stelle, an der die verschiedenen von FCS aktivierten Signalwege integriert werden.

5.2.2 Cytohesine sind fundamental wichtig für die Signalweiterleitung vom Insulinrezeptor

Li et al.¹⁹⁸ haben in einer Zelllinie, die den Insulinrezeptor überexprimiert, gezeigt, daß nach Stimulation der Zellen mit Insulin ebenfalls überexprimiertes Cytohesin-2 an die Membran rekrutiert wird (s. Abbildung 47A). Durch Überexpression von Cyh-2E156K konnten sie nachweisen, daß für die insulinstimulierte ARF1-Aktivierung und Translokation an die Membran ein funktionierender GDP/GTP-Austausch nötig ist (s. Abbildung 47B).

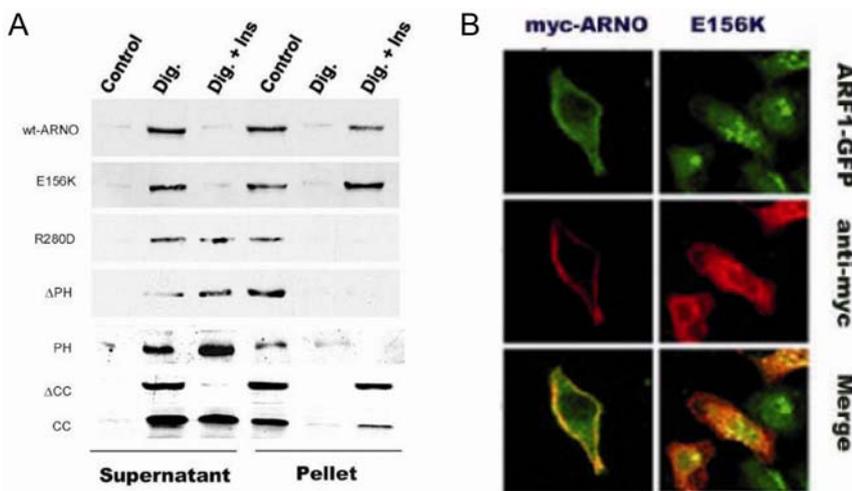


Abbildung 47: A: Überexprimiertes Cytohesin-2 (ARNO) wird in HIRcB-Zellen insulinabhängig an die Zellmembran rekrutiert. Die Membran wurde mit Digitoxin durchlässig gemacht und anschließend das Cytosol durch Zentrifugieren entfernt, so daß im Pellet nur die membranassoziierten Proteine übrig geblieben sind. Mutationen in der PH-Domäne (R280D) bzw. ihre Deletion (Δ PH) unterdrücken die insulinabhängige Membranassoziation (aus Li

et al.¹⁹⁸). B: Die Aktivierung und Membranrekrutierung von ARF1 benötigt eine intakte Sec7-Domäne von Cytohesin-2. Überexpression von myc-getaggtm Wildtyp-Cytohesin-2 führt zur Membranrekrutierung von GFP-getaggtm ARF1, während bei Überexpression von myc-getaggtm katalysedefizientem Cytohesin-2 (E156K) ARF1 im inaktiven Zustand im Cytosol bleibt (aus Li et al.¹⁹⁸).

Wie in Abschnitt 4.2.5 gezeigt wird durch Behandlung von Zellen mit SecinH3 der GDP/GTP-Austausch an ARFs *in vitro* gehemmt und durch Transfektion von ARF6-GFP in HepG2-Zellen konnten wir nachweisen, daß die insulinstimulierte Translokation von ARF6 an die Membran nach Aktivierung inhibiert wird (s. Abbildung 48).

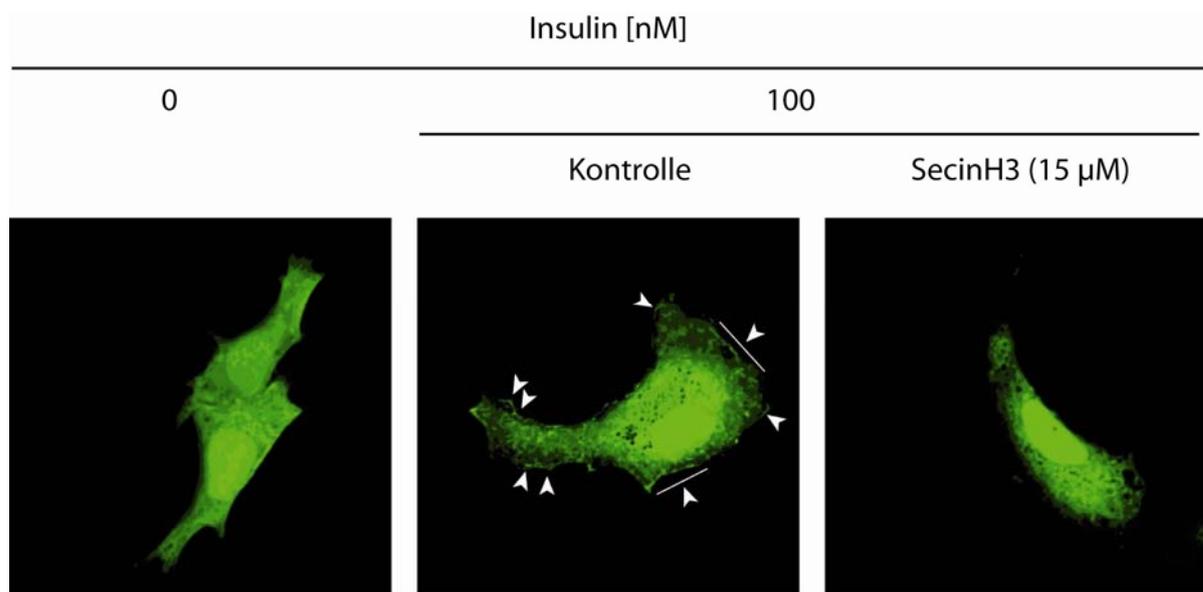


Abbildung 48: SecinH3 inhibiert die insulinstimulierte ARF6-GFP Membranrekrutierung. HepG2-Zellen wurden mit ARF6-GFP-Plasmid transfiziert, für 2 h mit 15 μM SecinH3 vorinkubiert und für 10 min mit 100 nM Insulin stimuliert (aus Hafner et al.¹⁹³).

Ein Hinweis, daß Cytohesine fundamental wichtig sind für den Insulinsignalweg stammte von genetischen Experimenten aus dem Labor von M. Hoch⁷⁸. Fliegen bei denen das *Drosophila*-Homologe der Cytohesine, *steppke*, durch Insertion von P-Elementen in das Gen vermindert exprimiert wurde (*step^{K/SH}*), zeigen einen ausgeprägten Größenphänotyp (s. Abbildung 49), ebenso wie Fliegen, denen das Insulinrezeptorsubstrat *chico* fehlt und die damit einen defekten Insulinsignalweg haben. Fliegenlarven, die SecinH3 gefressen haben werden wie *step^{K/SH}*-Larven ebenfalls deutlich kleiner als Wildtyparven, was ein zusätzlicher Hinweis auf die Spezifität des kleinen Moleküls ist und auch die Bedeutung der Cytohesine bei der Wachstumskontrolle unterstreicht.

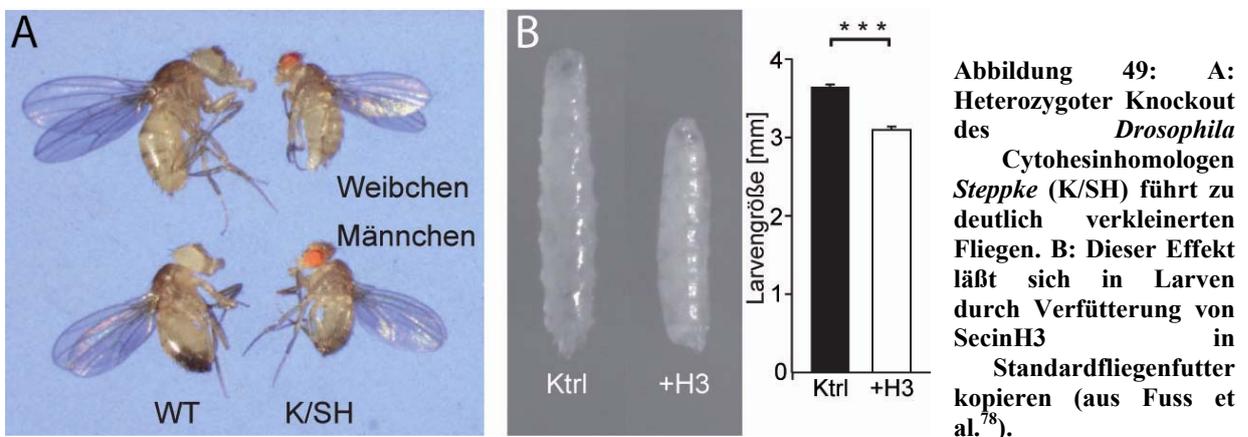


Abbildung 49: A: Heterozygoter Knockout des *Drosophila* Cytohesin homologen *Steppke* (K/SH) führt zu deutlich verkleinerten Fliegen. B: Dieser Effekt läßt sich in Larven durch Verfütterung von SecinH3 in Standardfliegenfutter kopieren (aus Fuss et al.⁷⁸).

Daher haben wir uns gefragt, ob die Cytohesine ebenfalls am Insulinsignalweg in Säugerzellen beteiligt sind und haben den Effekt von SecinH3 auf die Transkription des prototypischen insulinregulierten Gens *IGFBP1* in der humanen Leberzelllinie HepG2 bestimmt. SecinH3 hat das Insulinsignal mit einer IC_{50} von 2,2 μ M (s. 4.2.3) sehr effektiv unterdrückt. Da die Transkription von *IGFBP1* über FoxO-Transkriptionsfaktoren reguliert wird, die von der Akt, die wiederum von der PI3K aktiviert wird, im Zellkern direkt phosphoryliert werden und danach ins Cytoplasma transportiert werden, haben wir auch die Phosphorylierung dieser Proteine nach Insulinstimulation bestimmt (Abbildung 50).

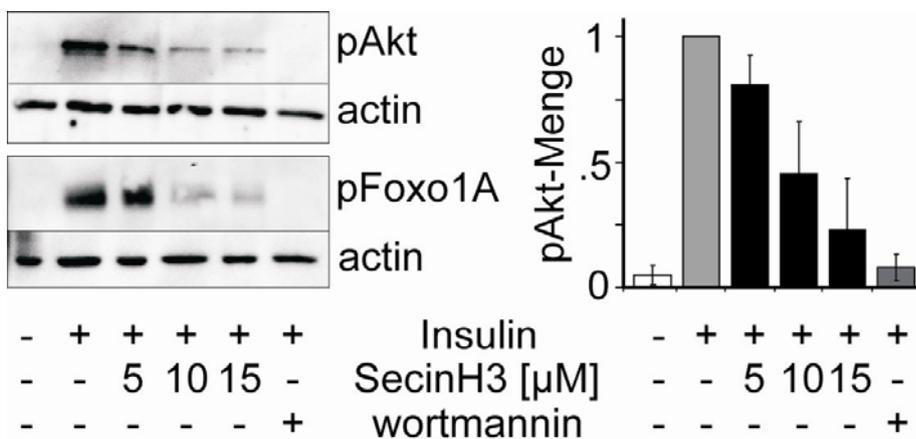


Abbildung 50: SecinH3 inhibiert dosisabhängig die insulinstimulierte Akt- und FoxO-Phosphorylierung. Serumdeprivierte Zellen wurden mit SecinH3, Wortmannin oder DMSO (Kontrolle) vorinkubiert und für 10 min mit 100 nM Insulin stimuliert. pAkt und pFoxO1A wurden im Immunoblot bestimmt. Actin diente als Ladekontrolle (links). Zur Quantifizierung der Inhibition wurde das pAkt-Signal auf Actin normiert (aus Hafner et al.¹⁹³).

Da die Phosphorylierung und Aktivierung der Akt und damit auch von FoxO, sowie dessen Translokation aus dem Cytoplasma (s. 4.2.4) dosisabhängig von SecinH3 inhibiert wird, konnten wir klar zeigen, daß die Cytohesine im von Insulin initiierten PI3K-Akt-FoxO-Signalweg wirken und zwar auf jeden Fall stromaufwärts der Akt.

Um den inhibitorischen Effekt von SecinH3 auf den Insulinsignalweg auf die Inhibition der Cytohesine zurückführen zu können, haben wir zusätzlich zum Einsatz einer strukturell verwandten nichtbindenden Kontrollverbindung, D5, in Zellkultur (s. 4.2.3 und 4.2.5) siRNA-Studien durchgeführt (4.2.6), bei denen wir die Menge der in HepG2 exprimierten Cytohesine-1 bis -3 mit spezifischen siRNAs (s. 4.2.6.1) reduziert haben. Unsere Resultate zeigen, daß für die Reduktion der Expression von *IGFBP1* nach Insulinstimulation die Cytohesine-2 und -3 wichtig sind, denn ihr Knockdown unterdrückt das Insulinsignal komplett, während der Knockdown von

Cytohesin-1 die insulinabhängige Repression der *IGFBP1*-Transkription nicht verhindert hat. Ebenso führt der Knockdown von ARF6 im Gegensatz zu dem von ARF1 mittels RNA-Interferenz zur Unterdrückung des Insulinsignals (s. 4.2.6.3).

Da FoxO-Transkriptionsfaktoren ebenfalls auf zellulären Streß reagieren und die Transfektion von Nukleinsäuren mittels Liposomen die Zellen streßt sowie einen großen Einfluß auf die zelluläre Membran selbst hat, könnte dies erklären, wieso die Zellen nicht mehr so stark auf Insulin reagieren (s. 4.2.6.1 und 4.2.6.2) und auch die Genexpression anderer FoxO-regulierter Gene nicht mehr eindeutig durch Cytohesine reguliert wird. Daher haben wir eine andere Methode der siRNA-Transfektion ausprobiert, nämlich Elektroporation mit „square waves“ (s. 4.2.6.2). Auf die Transkription von *IGFBP1* zeigte sich prinzipiell das gleiche Bild wie bei der Lipofektion, was die Beteiligung von Cytohesin-2 und -3 auf den Insulinsignalweg bestätigt, allerdings sah man auf die Genexpression anderer FoxO-regulierter Gene, die auch von SecinH3 beeinflusst werden, keinen Effekt. Der Grund dafür kann in der Tatsache zu suchen sein, daß alle Transfektionsmethoden die Zellen stressen und andere Signalwege, die unter Umständen auch auf den Promotoren der untersuchten Gene enden, moduliert werden.

Zusammengenommen zeigen alle diese Daten aber, daß SecinH3 den Insulinsignalweg spezifisch durch Inhibition der Cytohesine, genauer durch Inhibition von Cytohesin-2 und -3, unterdrückt und daß diese damit fundamental an dessen Funktion beteiligt sind.

5.3 Inhibition von Cytohesinen in der Maus führt zu hepatischer Insulinresistenz

Der große Vorteil von kleinen organischen Molekülen gegenüber Aptameren ist deren einfacher Einsatz *in vivo*, da man die Moleküle entweder oral durch Beimischung zum Futter bzw. durch Injektion geben kann.

Durch Zugabe von SecinH3 ins Kulturmedium wurde in der Hepatocytzelllinie HepG2 die insulinvermittelte Signaltransduktion, die über die Akt (s. Abbildung 50) läuft, blockiert und darüber hinaus die von Insulin regulierte Genexpression unterdrückt (s. 4.2), was ein klarer Hinweis darauf ist, daß SecinH3 membrangängig ist und dessen Einsatz im Mausmodell aussichtsreich. Da wir nach zweitägiger Verfütterung von 0,9 µmol/g Futter SecinH3 die Substanz in Mäuselebern mittels LC/MS nachweisen (s. 4.3.1, Abbildung 44) konnten, ist davon auszugehen, daß zumindest im Lebergewebe die Cytohesine inhibiert werden und man einen Phänotyp erwarten konnte.

Zunächst wurde die Phosphorylierung der Akt in Mäuselebern 10 min nach intraperitonealer Injektion von 100 µl einer 400 µg/ml Insulinlösung untersucht. SecinH3 reduzierte das auf Western Blots bestimmte pAkt-Signal in fünf unabhängigen Experimenten im Schnitt auf 60 % der Kontrollen, die kein SecinH3 gefressen hatten (s. Abbildung 51).

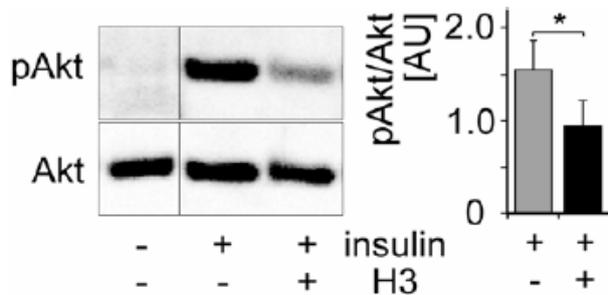


Abbildung 51: SecinH3 inhibiert die Akt-Phosphorylierung in Mäuselebern. Die Mäuse wurden durch intraperitoneale Injektion von 40 µg Insulin stimuliert und die Lebern nach 10 min entnommen. pAkt und Akt wurden durch Immunoblot detektiert (linke Seite) und deren Mengen quantifiziert und statistisch ausgewertet (rechte Seite, n=5; * p < 0,05) (aus Hafner et al.¹⁹³).

Ebenfalls analog zur Wirkung von SecinH3 in Zellkultur wird die Genexpression in Lebergewebe von Mäusen verändert und zwar nicht nur bei insulinregulierten Genen, die von FoxO-Transkriptionsfaktoren kontrolliert werden, sondern auch bei einer ganzen Reihe anderer Gene, die im Metabolismus eine Rolle spielen (s. 4.3.2, Abbildung 45). Gene, die an der Gluconeogenese beteiligt sind und daher durch das Insulinsignal unterdrückt werden sollten, werden nach Verfütterung von SecinH3 stärker exprimiert. Dagegen wird die Glykolyse durch Insulin stimuliert und von SecinH3 unterdrückt. Gleichzeitig wird die Expression von Genen, die die β-Oxidation stimulieren durch Secin H3 stimuliert und die Fettsäuresynthese unterdrückt. Diese Gene werden durch andere Arme des Insulinsignalwegs und über Transkriptionsfaktoren wie SREBP-1c kontrolliert. Zusammengenommen sprechen die Befunde der Genexpression dafür, daß das Lebergewebe nicht mehr auf das Insulin reagiert und sich im Hungerzustand befindet, obwohl *ad libitum* gefüttert wird. Offensichtlich wird jedes Insulinsignal blockiert und damit muß die Position der Cytohesine in der Signalkaskade sehr nah am Insulinrezeptor selbst lokalisiert sein.

Diese Interpretation wird gestützt durch den Vergleich der Genexpressionsdaten sowie der physiologischen Parameter von SecinH3-gefütterten Mäusen mit den von Michael et al. beschriebenen Mäusen, die einen Knockout des Insulinrezeptors in der Leber haben⁴⁹ (s. Tabelle 6). Diese Mäuse entwickeln ein komplexes Bild an Symptomen, das dem der hepatischen Insulinresistenz, einer wichtigen Vorstufe des Diabetes Typ 2 entspricht. Bei Insulinresistenz versucht der Organismus, die verringerte Empfindlichkeit gegen Insulin durch eine erhöhte Ausschüttung des Hormons zu kompensieren, damit der Blutglukosespiegel stabil bleibt. Bei

SecinH3-gefütterten Mäusen sinkt gleichzeitig als Folge der niedrigeren Expression der *Fas* die Menge an Triglyceriden und freien Fettsäuren im Serum, während die β -Oxidation und damit die Menge an Acetyl-CoA durch erhöhte Mengen an *Hadha* und *Cpt1a* steigt (s. 4.3.2 und 4.3.3., Abbildung 45 und Abbildung 46). Da gleichzeitig der Verbrauch an Acetoacetat durch niedrigere Expression der *Aacs* sinkt, steigt die Menge an Ketonkörpern.

Physiologische Parameter		
	SecinH3 / Kontrolle	LIRKO / Kontrolle
Glukose	1.1	1.7
Triglyceride	0.6	0.5
Freie Fettsäuren	0.8	0.8
Genexpression		
G6pc	2.0	2.6
Gck	0.5	0.1
Pklr	0.7	0.5

Tabelle 6: Vergleich von Genexpressionsdaten sowie von physiologischen Parametern von SecinH3-gefütterten Mäusen mit LIRKO-Mäusen⁴⁹.

Zusammengefaßt sind die Effekte der Verfütterung von SecinH3 in Mäusen auf Genexpression und die daraus folgenden physiologischen Veränderungen ähnlich zu denen eines Insulinrezeptor-Knockouts in der Leber (s. auch Tabelle 6), was zeigt, daß Cytohesine nicht nur fundamental wichtig für den Insulinsignalweg sind, sondern auch daß deren Inhibition durch ein kleines organisches Molekül zu hepatischer Insulinresistenz führt. Ohne die Verfügbarkeit eines spezifischen und potenten Inhibitors wäre dieses Resultat nur durch Cytohesin-Knockouts erreichbar gewesen. Die Konstruktion dieser Mäuse ist mühselig und es ist unklar, ob durch die offensichtliche Bedeutung (s. 4.2.2 und 5.2.1) der Cytohesine auch für andere von Rezeptortyrosinkinasen kontrollierten Signalwege, die Organismen überhaupt lebensfähig wären.

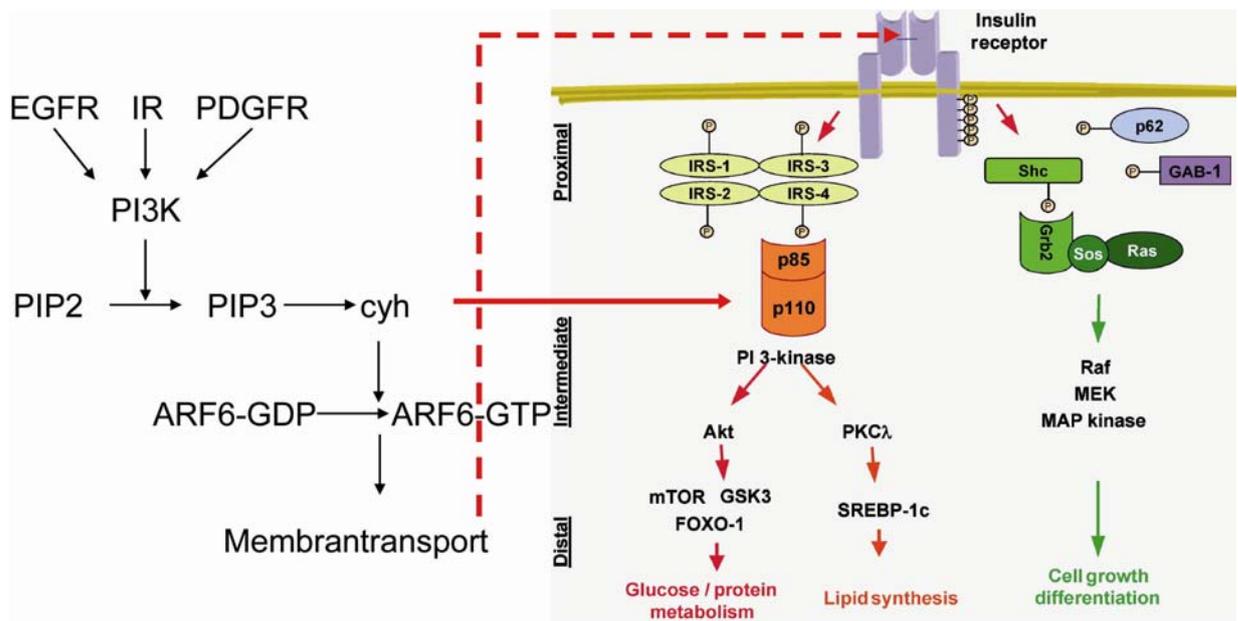
Insulinresistenz scheint eine der Ursachen der Entwicklung von Diabetes Typ 2 zu sein¹⁰. Allerdings sind die molekularen Mechanismen, die zu einer Unterdrückung des Insulinsignals führen, nicht wirklich bekannt. Man weiß, daß Knockout des Insulinrezeptors⁴⁹ sowie des Insulinrezeptorsubstrats 2 (IRS2)^{200, 201} oder die leberspezifische Expression einer aktiven FoxO1-Mutante²⁰² in transgenen Mäusen zu hepatischer Insulinresistenz führt. Allerdings sind bisher keine diabetischen Patienten mit Mutationen in diesen Genen bekannt²⁰³, was bedeutet, daß zusätzliche Faktoren in der Pathologie dieser Krankheit beteiligt sein müssen. Unsere Daten deuten darauf hin, daß Cytohesine einer dieser Faktoren sein könnten und daß deren Funktion

entscheidend für die Regulierung der Empfindlichkeit verschiedener insulinabhängiger Gewebe sein könnte.

5.4 SecinH3 liefert Hinweise zum Wirkmechanismus der Cytohesine

Der Insulinsignalweg in der Zelle wird gestartet durch die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor (IR). Dieser verändert seine Konformation und autophosphoryliert cytoplasmatische Tyrosinreste. Daraufhin binden die Insulinrezeptorsubstrate (IRS) an den IR und werden an bestimmten Tyrosinen phosphoryliert. Diese Phosphotyrosine dienen der p85-Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die stromabwärts liegende Ziele, wie z.B. die Akt aktiviert²⁰⁴, als Bindungsstellen.

Nach Aktivierung der PI3K werden Cytohesine über ihre PH-Domäne durch das gebildeten PIP₃ an die Membran rekrutiert²⁰⁵⁻²⁰⁷. Da Cytohesine ARFs aktivieren, die in verschiedenen Vesikeltransportwegen eminent wichtig sind, wäre eine einfache Erklärung des Effekts von SecinH3 auf den Insulinsignalweg daher eine Inhibition des Vesikeltransports zur und von der Membran. Dabei würde der Transport des Rezeptors gestört, weniger aktivierbarer Rezeptor an der Membran zur Verfügung stehen und daher das Insulinsignal unterdrückt (s. Abbildung 53, roter gestrichelter Pfeil). Das würde bedeuten, daß die Inhibition der Cytohesine keine spezifische Unterdrückung des Insulinsignalwegs, sondern eine Blockade des kompletten zellulären Transports bewirkt und die Bedeutung der Cytohesine für die Signaltransduktion allenfalls indirekt ist.



Biddinger, Ann. Rev. Physiol., 2006

Abbildung 52: Zwei mögliche Modelle des Wirkmechanismus von SecinH3. Cytohesine translozieren nach Bildung von PIP₃ durch die PI3K über ihre PH-Domäne an die Zellmembran und aktivieren dort ARFs, die am Vesikeltransport beteiligt sind. Wenn dieser Transport komplett unterbunden würde (gestrichelter Pfeil), wäre der Transport von Rezeptoren an der Membran gestört und die Empfindlichkeit gegenüber allen Wachstumsfaktoren stark reduziert. Eine zweite Möglichkeit ist, daß Cytohesine für die Aktivierung der PI3K wichtig sind (roter Pfeil) und die Insulinsignalkaskade damit direkt cytohesinabhängig ist.

Eine zweite Erklärung der Unterdrückung des Insulinsignalwegs wäre, daß Cytohesine für die Aktivierung der PI3K notwendig sind (s. Abbildung 52, roter Pfeil), denn an dieser Stelle teilt sich der Insulinsignalweg in den Akt/FoxO- und den PKCλ/SREBP-1-Arm auf, die beide von SecinH3 inhibiert werden (s. Abbildung 45 und Abbildung 46).

SecinH3 unterdrückt das Insulinsignal nicht durch Verringerung der Rezeptordichte an der Zelloberfläche wie Färbung mit einem Antikörper gegen die α-Kette des Insulinrezeptors ergeben haben (s.4.2.8, Abbildung 43).

Auch der erste Schritt des Insulinsignalwegs, die Autophosphorylierung des Rezeptors bleibt durch SecinH3 unbeeinflusst (s. Abbildung 53).

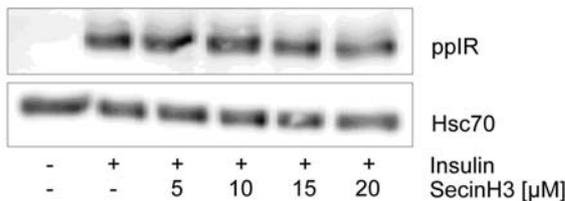


Abbildung 53: Die Autophosphorylierung des Insulinrezeptors wird durch SecinH3 nicht beeinflusst. HepG2-Zellen wurden 3h serumdepriviert und mit verschiedenen Konzentrationen an SecinH3 vorinkubiert. Stimuliert wurde mit 100 nM Insulin für 10 min (aus Hafner et al.¹⁹³)

Die Cytohesine müssen also nach dem Rezeptoraktivierungsschritt wirken.

Wir konnten zeigen, daß Cytohesine den direkt auf die Aktivierung des Insulinrezeptors folgenden Schritt, die Rekrutierung und Phosphorylierung der Insulinrezeptorsubstrate,

vermitteln (s. Abbildung 54). 15 μ M SecinH3 reduziert die Menge an phosphoryliertem IRS1 nach Stimulation mit Insulin signifikant (s. Abbildung 54A). Mittels Koimmunopräzipitation mit einem Antikörper gegen die β -Kette des IR konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß SecinH3 nach Insulinstimulation nicht nur an die Membran rekrutiert wird, wie bei Li et al.¹⁹⁸, sondern auch direkt mit dem Insulinrezeptorkomplex interagiert. Nach Insulinstimulation werden die Cytohesine-2 und -3 sowie das zu den Cytohesinen gehörige G-Protein, ARF6, mit dem IR koimmunopräzipitiert. Diese Assoziation kann durch SecinH3 unterdrückt werden (s. Abbildung 54B). Der Cytohesin-ARF6-Komplex ist nötig für die Bindung von IRS1 an den IR, denn die Menge an präzipitiertem IRS1 wurde ebenfalls durch SecinH3 reduziert.

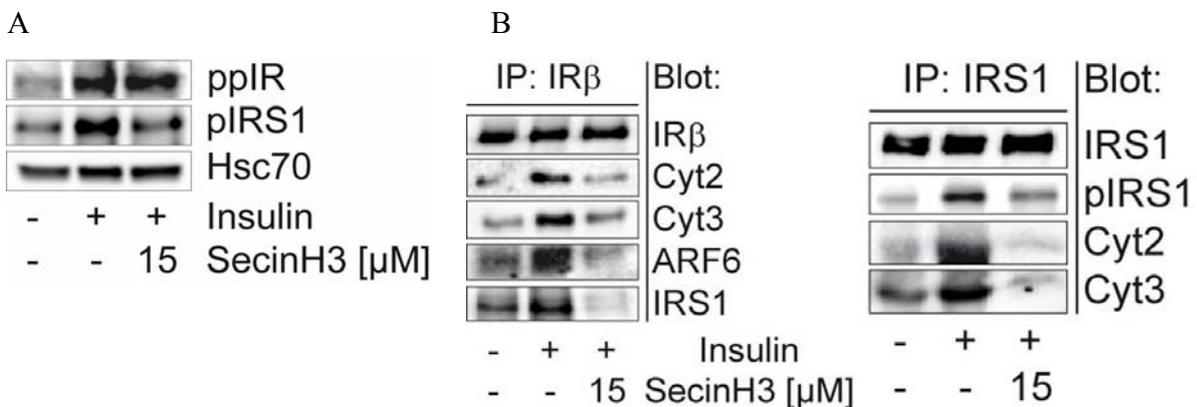


Abbildung 54: A: SecinH3 inhibiert die insulinstimulierte Phosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrats 1 (IRS1) in HepG2 nach Stimulierung mit 100 nM Insulin, während die Phosphorylierung des Insulinrezeptors (IR) unbeeinflusst bleibt. Hsc70 diente als Ladekontrolle. B: Cytohesine und ARF6 assoziieren nach Stimulierung mit Insulin mit dem Insulinrezeptorkomplex. SecinH3 unterdrückt diese Assoziation genauso wie die Rekrutierung von IRS1 an den IR (aus Hafner et al.¹⁹³)

Zusammengenommen bedeuten diese Resultate, daß Cytohesin-2 und -3 fundamental an den frühesten Schritten des Insulinsignalwegs beteiligt sind. Ein naheliegendes Modell würde sein, daß die insulinabhängige physische Assoziation des ARF6-Cytohesin-Komplexes an den IR notwendig für die Rekrutierung und Phosphorylierung der Insulinrezeptorsubstrate ist und damit für die Aktivierung des Insulinsignalwegs am Insulinrezeptor ist (s. Abbildung 55).

Eine der ersten über den Insulinrezeptorkomplex aktivierten stromabwärts liegenden Kinasen ist die PI3K. Von der PI3K wurde bisher angenommen, daß sie die Cytohesine aktiviert und damit die Aktivierung der ARFs ermöglicht. Unsere Resultate lassen einen positiven Rückkopplungsmechanismus vermuten, über den die Cytohesine einerseits die Aktivierung der PI3K durch die Rekrutierung des IRS erst ermöglichen, andererseits wie bisher bekannt durch die

PI3K selbst an die Membran rekrutiert werden und damit die Insulinsensitivität der Zelle erhöhen und für ihre weiteren Funktionen aktiviert werden.

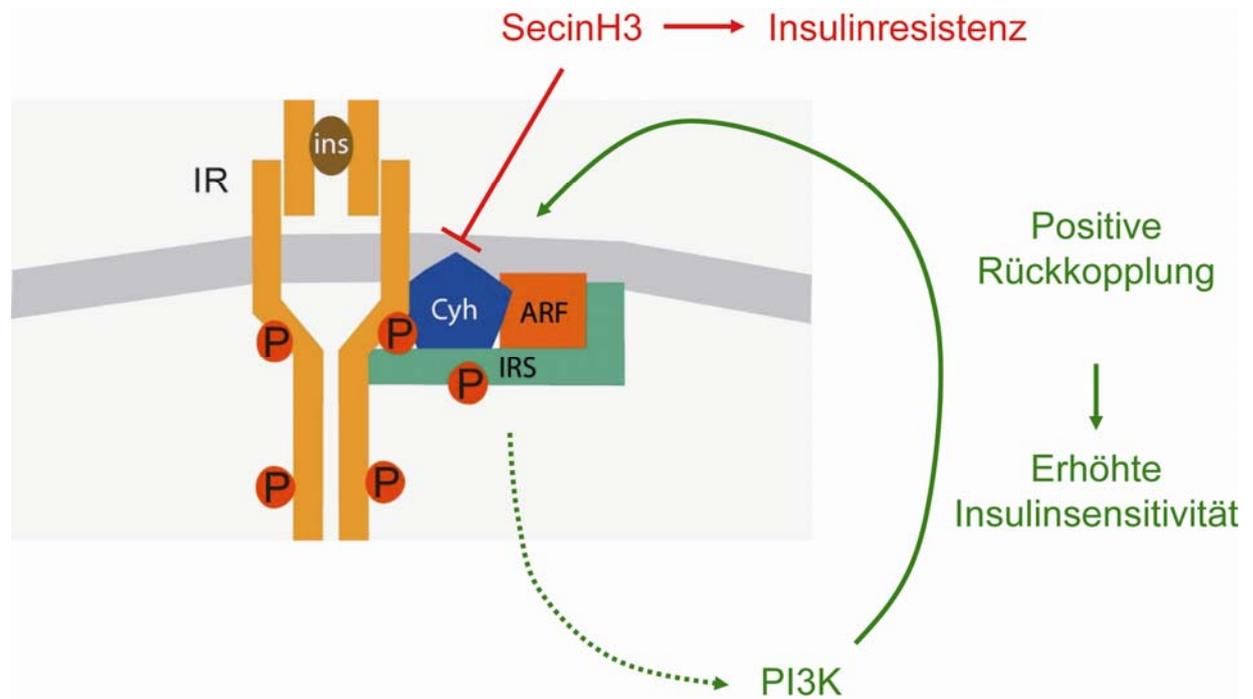


Abbildung 55: Modell der Funktion von Cytohesinen im Insulinrezeptorkomplex. Der Cytohesin-ARF-Komplex bindet an den aktivierten Rezeptor und diese Bindung ermöglicht die Rekrutierung von IRS an den transphosphorylierten Rezeptor und damit wiederum die Aktivierung von stromabwärts gelegenen Komponenten des Signalweges, wie der PI3K. Die PI3K wiederum führt zur Rekrutierung der Cytohesine an die Membran über deren Bindung an PIP₃. Dies würde einen positiven Rückkopplungsmechanismus darstellen, der eine erhöhte Insulinsensitivität zur Folge hat. Hemmung der Sec7-Domäne der Cytohesine durch SecinH3 verhindert diese Rückkopplung, da einerseits die Aktivierung der ARFs und andererseits die Bindung des Cytohesin-ARF-Komplexes und damit auch des IRS gehemmt wird. Damit wird durch Gabe von SecinH3 Insulinresistenz erzeugt.

6 Material und Methoden

6.1 Allgemeine Methoden im Umgang mit Proteinen

6.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch Gelelektrophorese lassen sich Biomoleküle abhängig von Ladung, Molekulargewicht und Konformation auftrennen. Dies erfolgte unter denaturierenden Bedingungen durch diskontinuierliche, eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese²⁰⁸. Das Detergenz SDS bindet unspezifisch an Proteine und zerstört hierbei alle nichtkovalenten Wechselwirkungen, so daß die native Konformation aufgelöst wird. Da viele Moleküle des anionischen SDS an ein Protein binden, wird die Eigenladung des Proteins überlagert; die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel hängt dann nur noch vom Molekulargewicht des Proteins und dem Vernetzungsgrad des Gels ab.

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

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

Trenngel (12,5 %): 10 ml

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

Sammelgel (4 %): 10 ml

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

SDS-Elektrodenpuffer: 10x

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

mit H₂O (dest.) auffüllen

SDS-Probenpuffer: 4x

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

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

6.1.2 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Ein Transfer auf Nitrozellulosemembranen wurde zum immunologischen Nachweis verschiedener Proteine durchgeführt. Der Proteintransfer erfolgte in einer Semi-Dry Blot Apparatur unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems.

Nach Trennung der Proteine im SDS-PAGE (6.1.1) wurde das Polyacrylamidgel, die Nitrozellulosemembran und die Filterpapiere (Whatman) im entsprechenden Elektrodenpuffer äquilibriert und gemäß dem folgenden Schema zwischen den Elektroden angeordnet:

Kathode**2 Filterpapiere - Kathodenlösung****Nitrozellulose - Anodenlösung II****1 Filterpapiere - Anodenlösung II****1 Filterpapiere - Anodenlösung I****Anode**

Der Transfer fand dann bei einer Stromstärke von 2 mA pro cm² Blotgröße in 20 min statt.

Anodenlösung I:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 1000 ml
Tris	121,14	300 mM	36,3 g

pH-Wert auf 10,5 einstellen, mit H₂O (dest.) auffüllen.

Anodenlösung II:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 1000 ml
Tris	121,14	25 mM	3,03 g

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

Kathodenlösung:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 1000 ml
Glycin	131,2	40 mM	5,2 g

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

6.1.3 Immunologische Detektion von Proteinen (Western-Blot)

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

Material und Methoden

Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (6.1.2) wurde diese mit TBS-Puffer abgespült und zur Absättigung freier Bindungsstellen 30 min auf einem Tischschüttler bei 60 Upm oder über Nacht bei 4° C mit Blockierlösung geblockt.

Nach Waschen mit WPT-Puffer inkubierte man die Membran mit primärem Antikörper, der in 10 ml AKB-Puffer verdünnt worden war, übernacht bei 4°C oder für 2 h bei RT unter leichtem Schwenken auf einem Tischschüttler.

Nun wurde 3x mit TBS-Puffer für jeweils 10 min gewaschen und mit dem sekundären Antikörper, der ebenfalls in 10 ml AKB-Puffer verdünnt worden war, für 1 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Zum Abschluß erfolgte dreimaliges Waschen mit WPT-Puffer, sowie 3x mit TBS für jeweils 10 min. Die Detektion wurde durch Versetzen mit 2 ml ECL-Reagenz für 3 min gemäß den Herstellerangaben durchgeführt werden. Die Lumineszenz wurde durch abphotographieren mit einer hochempfindlichen CCD-Kamera an einem VersaDoc 5000 (BioRad) detektiert. Die Bandenstärke konnte bei Bedarf mit dem Programm Quantity One (BioRad) quantifiziert werden.

TBS-Puffer: 10x

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

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

Blockierlösung:

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

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

WPT-Puffer:

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

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

AKB-Puffer:

Reagenz	Konzentration	benötigt für 40 ml
WPT-Puffer		40 ml
BSA	5 % (w/v)	2 g

6.1.4 „Stripping“ von Nitrozellulosemembranen

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

Membranen mit gebundenen Antikörpern wurden zunächst mit TBS-Puffer gewaschen und anschließend 30 min bei 50° C unter leichtem Schwenken mit Stripping-Puffer inkubiert. Nach Entfernen des Puffers wurde die Membran 3x mit TBS-Puffer für je 5 min gewaschen und konnte anschließend wieder zur immunologischen Proteindetektion (6.1.3) eingesetzt werden.

Stripping-Puffer:

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

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

6.1.5 Färbung von Proteingelen

6.1.5.1 Coomassie-Färbung (Brilliant Blau G 250)

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

Coomassie-Lösung:

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

Entfärber-Lösung:

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

6.1.5.2 Silber-Färbung

Die Silber-Färbung wird zur Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen verwendet. Diese ist aufwendiger als die in 6.1.5.1 beschriebene Coomassie-Färbung, aber ca. 10-fach sensitiver. Hierbei werden die Gele mit Silbernitrat inkubiert, welches im Verlaufe der Färbung zu elementarem Silber reduziert wird. Da dies nur in den proteinhaltigen Zonen des Gels stattfindet, kann eine rötlich-braune Färbung der Proteinbanden erzielt werden. Das folgende Protokoll wurde durchgeführt:

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

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

LÖS1

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

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

LÖS2

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

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

LÖS3

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

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

LÖS4

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

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

6.1.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

6.1.6.1 Photometrische Bestimmung nach Warburg und Christian

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

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

Die Proteinkonzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

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

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

6.1.6.2 Photometrische Bestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford²⁰⁹ basiert auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau an basische und aromatische Aminosäure-reste. Dabei absorbiert der gebundene Farbstoff bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595 \text{ nm}$ stärker als der freie Farbstoff.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde im Handel erhältliche, konzentrierte Bradford-Reagenzlösung 1:5 in Wasser verdünnt und Proteinproben unbekannter Konzentration, sowie die als Referenz verwendeten BSA-Proben (333; 500; 666; 1000; 1500; 2000; 3000 µg/ml) in einer

96-well Kulturplatte vorgelegt. Nun wurden 200 µl verdünnter Bradford-Lösung pro Vertiefung zugesetzt und die Absorption bei $\lambda = 595$ nm gemessen.

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

6.1.7 Dialyse und Gelfiltration zum Pufferwechsel

Zur Veränderung der Pufferbedingungen von Proteinlösungen wurden diese in einen für 12 h in Zielpuffer gequollenen Dialyseschlauch gefüllt und für 15 h bei 4° C gegen 1 L des Zielpuffers dialysiert. Anschließend wurde der Schlauch in 0,5 L frischen Zielpuffer überführt und erneut für 6 h bei 4° C dialysiert. Die Verwendung von Dialyseschläuchen mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 6-8 kD ermöglichte den schonenden Austausch von Puffersalzen und das Entfernen von Resten niedermolekularer Kontaminationen. Nach diesem Verfahren konnten die Proteine ARNO und Cytohesin-1 nach der chromatographischen Reinigung (6.1.8) in den gewünschten Assaypuffer überführt. Alle Proteine wurden nach der Dialyse erneut auf einem SDS-PAGE analysiert und die Konzentration nach den in 6.1.6 angegebenen Methoden bestimmt.

Eine alternative Methode des Pufferwechsels nach der chromatographischen Reinigung der Proteine wurde durch Verwendung der Gelfiltrationssäule Econo-Pac P6 (Bio-Rad) an einem FPLC-System durchgeführt. Hierzu wurden 3 ml Proteinlösung bei einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule injiziert. Als Laufpuffer diente der gewünschte Zielpuffer. Der Erfolg des Pufferaustausches konnte durch die Detektion der Leitfähigkeit und der UV-Absorption bei 280 nm beobachtet werden. Dabei wurden die Fraktionen mit der größten Absorption bei 280 nm vereint und vor der weiteren Bearbeitung auf einem SDS-PAGE (6.1.1) analysiert.

6.1.8 Chromatographische Methoden der Proteinreinigung

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

6.1.8.1 Affinitätschromatographie über immobilisierte Metallionen (IMAC) an einer FPLC

Die Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine mit Hexahistidin-Fusionsanteil aus *E. coli* ermöglicht eine hohe Proteinausbeute bei hoher Reinheit, da diese durch spezifische Wechselwirkung des His₆-Fusionsanteils mit Nickelkationen auf einer *Nitrilotriaceticacid* (NTA)-Agarose Matrix erfolgt²¹⁰. Die Proteine können nach Abtrennung aller Kontaminationen spezifisch mit Imidazol eluiert werden. Alle in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden nach diesem Verfahren gereinigt.

Dabei wurde nach Expression und das Lysat mit 15 mM Imidazol und 1 ml Ni²⁺-NTA Agarose (Qiagen) versetzt, die zuvor in Lysispuffer äquilibriert worden war. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 2 h bei 4° C im Überkopfschüttler. Das Gemisch wurde nun in eine HR 16/10 Leersäule von Amersham Biosciences gefüllt und an ein ÄKTA-FPLC System angeschlossen. Die Trennung des Zielproteins von den Kontaminationen konnte durch Waschen mit ca. 80 ml Waschpuffer erreicht werden und die Elution erfolgte mit 250 mM Imidazol in Elutionspuffer bei einer Flussrate von 1 ml/min. Zur Verhinderung von Proteindegradierung durch Proteasen wurden dem Elutionspuffer unmittelbar vor der Verwendung 0,5 mM PMSF, 0,5 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Aprotinin sowie eine Spatelspitze Benzamidin zugesetzt.

Für Trennungen im kleineren Maßstab (bis 0,5 L Zellkultur) bzw. für die Reinigung der verschiedenen ARNO-Domänen Konstrukte wurde direkt auf einer HiTrap Chelating-Fertigsäule immobilisiert, die zuvor mit Nickelkationen beladen worden war.

Waschpuffer:

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

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

Elutionspuffer:

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

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

6.1.8.2 Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose

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

Das in der vorliegenden Arbeit für den Fluoreszenzpolarisationsassay verwendete Cytohesin-2 wurde über Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose gereinigt. Dabei wurden die Proteine nach Vorreinigung über IMAC [6.1.8.1] in den Startpuffer der Q-Sepharose Trennung umgepuffert [6.1.7].

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

Startpuffer:

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

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

6.2 Allgemeiner Umgang mit Nukleinsäuren

6.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde durchgeführt, um Proteine aus nukleinsäurehaltigen Lösungen zu entfernen. Dazu wird die Lösung mit einem Volumen Tris-gepuffertem Phenol versetzt und durch vortexen gut durchmischt. Nach Zentrifugation für drei Minuten bei 14.000 rpm wurde die obere, wässrige Phase abgenommen und mit zwei Volumina Chloroform versetzt, um Phenol-Reste zu entfernen. Nach erneutem Schütteln und Zentrifugieren wurde wiederum die obere, wäßrige Phase abgenommen. Anschließend können die Nukleinsäuren mit Ethanol gefällt werden.

6.2.2 Ethanol-Präzipitation

Die Präzipitation von Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaOAc (pH 5.4) für DNA oder RNA und 3 Volumina EtOH. Bei kleinen Nukleinsäuremengen oder kurzen Nukleinsäuren wurde zur Verbesserung der Präzipitation zusätzlich Glycogen (Endkonzentration: 2 µg/mL) zugegeben. Nach mehrmaligem Invertieren der Reaktionsgefäße und Inkubation bei -80 °C für mindestens 10 min wurde der Nukleinsäureniederschlag durch Zentrifugation (14000 rpm, 4 °C, 15) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit auf -20 °C gekühltem 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation und Entfernen des Überstands wurde das Pellet nach kurzer Luftrocknung in einem geeigneten Volumen Wasser resuspendiert.

6.2.3 Agarosegelelektrophorese

Zu analytischen Zwecken erfolgte die Auftrennung von DNA- und RNA-Molekülen in nicht-denaturierenden Agarosegelen²¹¹. Abhängig von der Größe der Oligonukleotide wurden Gele mit 0,7 – 2,5 Gewichtsprozent Agarose hergestellt. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose eingewogen und in 0.5x TBE im Mikrowellenherd erwärmt. Pro 10 ml Lösung wurde 1 µl Ethidiumbromidlösung (0,1%) hinzupipettiert und die noch warme Lösung blasenfrei in die vorbereitete Gelkammer bis zu einer Schichtdicke von 0,5 cm gegossen. Anschließend wurden die entsprechenden Kämme für die Geltaschen eingesetzt. Nach erfolgtem Erstarren des Agarosegels wurden die mit einem Volumen Auftragspuffer versetzten Nukleinsäureproben auf das Gel geladen und die Moleküle bei einer Spannung von 6 – 8 V/cm aufgetrennt. Als Längenstandard diente eine 100 bp-Leiter (80 bp – 1000 bp) oder für Plasmide und lange Nukleinsäurefragmente eine 1000 bp-Leiter. Als Laufpuffer wurde 0.5x TBE verwendet.

Da der Farbstoff Ethidiumbromid in die Nukleinsäuremoleküle interkaliert, können diese als fluoreszierende Banden mit einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 366 nm sichtbar gemacht und anschließend photographiert werden.

10x TBE:

Tris/HCl, pH 8.0	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA-Lösung	2 mM

Agarose-Ladepuffer:

Glycerin	50% (v/v)
Tris	50 mM
EDTA pH 8.0	50 mM
Bromphenolblau	0.05% (w/v)
Xylencyanol	0.05 % (w/v)

6.2.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur präparativen Aufreinigung von Nukleinsäuren wurden denaturierende Polyacrylamidgelelektrophoresen durchgeführt. Je nach Länge der zu trennenden Oligonukleotide wurden 5 - 16%-ige Polyacrylamidgele hergestellt. Dazu wurden die

entsprechenden Anteile der Vorratslösungen zusammengegeben. Für die Aufreinigung von Nukleinsäuren wurden Gele mit einer Dicke von 1 - 1.5 mm und einer Trennstrecke von ca. 15 cm verwendet. Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von 400 µl 10% APS und 40 µl TEMED pro 100 ml Lösung gestartet. Die Gellösung wurde rasch zwischen zwei gereinigte Glasplatten (ca. 18 x 20 cm) gegossen, die durch entsprechende Abstandhalter voneinander getrennt sind. Für die Ausbildung der Geltaschen zum späteren Auftragen der Proben wird ein entsprechender Kamm eingesetzt. Nach der vollständigen Polymerisation (ca. 45 - 60 Minuten) wird das Gel in eine vertikale Gelapparatur eingesetzt, der Laufpuffer 1x TBE hinzugefügt und ein Vorlauf bei 320 - 350 V gestartet. Vor dem Auftragen der Proben werden die Taschen mit Laufpuffer gespült. Die Nukleinsäureproben werden vor dem Gellauf mit Auftragspuffer versetzt und für 1 Minute bei 95°C denaturiert. Als Längenreferenz dienen die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol, deren Laufverhalten in verschiedenen konzentrierten Gelen einer bestimmten Basenpaarlänge zugeordnet werden kann. Die Trennung erfolgt bei einer Spannung von 320 - 370 V.

Vorratslösung B: 10x TBE in 8.3M Harnstoff

Vorratslösung C: 25% Acrylamidlösung in 8.3M Harnstoff
2% N,N'-Methylenbisacrylamid

Vorratslösung D: 8.3 M Harnstoff

Polyacrylamid-Ladepuffer:

Harnstoff	9 M
EDTA pH 8.0	50 mM
Bromphenolblau	0.05% (w/v)
Xylencyanol	0.05% (w/v)

6.2.5 Isolierung von Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen

Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel beidseitig in Klarsichtfolie eingeschlagen und zur Visualisierung auf einer Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm beleuchtet. Im Falle der Reinigung fluoreszenzmarkierter RNA konnten die markierten Nukleinsäuren nach der Elektrophorese ohne mit einem Phosphorimager bei der Wellenlänge von 473 nm angeregt und bei 520 nm ausgelesen werden.

Die aufgetrennten Nukleinsäuren wurden so sichtbar, die zu isolierende Bande konnten mit einer sterilen Skalpellklinge ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt werden. Die erhaltenen Gelstückchen wurden mit Hilfe einer Pipettenspitze zerkleinert und zur passiven Elution mit etwa einem Volumen (ca. 500 µL) 0.3 M Natriumacetatlösung versetzt. Nach 90 min starkem Schütteln bei 65 °C wurden die zerkleinerten Gelstücke über mit silanisierter Glaswolle gefüllte Spritzen abfiltriert. Anschließend können die Nukleinsäuren wie unter 6.2.1.2 beschrieben mit Ethanol gefällt und dann quantifiziert werden.

6.2.6 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm.

Für kürzere Oligodesoxyribonukleotide mit bekannter Basensequenz wurden die Konzentrationen aus der Summe der molaren Absorptionskoeffizienten ϵ der einzelnen Basen berechnet. Dazu wurden folgende Werte verwendet.

dNTP	$\epsilon(\text{mM}^{-1}/\text{cm}^{-1})$	NTP	$\epsilon(\text{mM}^{-1}/\text{cm}^{-1})$
dATP	15400	ATP	15200
dCTP	9000	CTP	7050
dGTP	13700	GTP	12100
TTP	10000	UTP	8400

Die berechnet sich wie folgt:

$$c = \frac{\text{OD} \times f}{\sum \epsilon}$$

Bei fluoreszenzmarkierter RNA erfolgt die Konzentrationsbestimmung und Bestimmung der Effizienz der Markierung nach folgender Formel:

$$Konz_{RNA} = \frac{[A_{260} - (A_{492} \times 0,35)] \times V}{\epsilon_{RNA}}$$

$$\frac{\text{Fluorescein}}{\text{RNA}} = \frac{A_{492} \cdot x \cdot V \cdot MW_{\text{RNA}}}{\epsilon_{\text{Fluorescein}} \cdot x \cdot \text{Konz}_{\text{RNA}}}$$

Für Nukleinsäuren unbekannter Sequenz bzw. für komplexe Gemische wurden die in Tabelle 6.1 dargestellten empirischen Werte (F), bezogen auf $OD_{260} = 1$, verwendet²¹²:

Wert (F)	Nukleinsäure
50 µg/ml	doppelsträngige DNA
38 µg/ml	einzelsträngige DNA
38 µg/ml	einzelsträngige RNA

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

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

OD_{260} = Absorption bei 260 nm Wellenlänge

F = empirischer Wert bezogen auf $OD_{260} = 1$ [µg/ml]

V = Verdünnungsfaktor

n = Anzahl der Basen

M_{av} = durchschnittliches Molekulargewicht pro Nukleotid

6.2.7 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) führt zu exponentieller Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei an den komplementären Strängen hybridisierenden Oligodesoxyribonukleotiden (Primer)²¹³⁻²¹⁵. Die Primer [5.11.1] wurden dabei mit Hilfe des Programms Oligo Calculator 3.02 (<http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>) so gewählt, dass sie ähnliche Schmelztemperaturen aufwiesen und keine Möglichkeit zur Bildung von Primerdimeren oder stabilen sekundären Faltungsmotiven vorhanden war. Die Amplifikation

von einzelsträngigen oder doppelsträngigen DNA-Templaten erfolgte zumeist in Ansätzen von 100 μl in einem PCR-Thermocycler.

PCR-Programm:

Operation	Dauer	Temperatur
1. Initiale Denaturierung	120 s	95°C
2. Denaturierung	60 s	95°C
3. Primer- <i>Annealing</i>	60 s	50 – 70°C
4. Polymerase-Reaktion	60 s	72°C
5. finale Elongation	3 min	72°C
Heizdeckeltemperatur		110°C

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

PCR-Reaktion (100 μl):

Reagenz	Menge	Vorrat	Endkonzentration
PCR Puffer	10 μl	10x	1x
MgCl ₂	6 μl	25 mM	2,5 mM
5'-Primer	1 μl	100 μM	1 μM
3'-Primer	1 μl	100 μM	1 μM
dNTP Mix	0.8 μl	25 mM	0,2 mM
DNA Templat	1 μL	1 μM	10 nM
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0.5 μl	5 U/ μl	0,025 U/ μl
Wasser		aufgefüllt auf 100 μl	

Nach beendeter Reaktion wurde die Lösung, wie in Abschnitt 6.2.1.1 beschrieben, mit Phenol und Chloroform extrahiert, um die Polymerase abzutrennen. Anschließend kann die dsDNA durch Ethanol-Präzipitation gemäß 6.2.1.2 gefällt werden.

6.2.8 GMPS-Transkription

Zur Darstellung der benötigten RNA wurde die DNA-abhängige RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 verwendet. Dazu wurde die im vorangegangenen Abschnitt dargestellte dsDNA, welche einen T7-Promoter enthält, mit der T7 RNA-Polymerase inkubiert. In der Regel wurden 200 bis 300 pmol DNA in einem 100 µl Ansatz eingesetzt. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C für 4 Stunden. Die Transkription erfolgte mit einem Überschuß an GMPS (20 mM), um selektiv an der 5'-Position der RNA eine reaktive Schwefelgruppe einführen zu können.

Nach erfolgter Transkription wurde dem Ansatz 0,5 µl DNase I (1 U/µl) zugesetzt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dieser Schritt stellte sicher, dass nicht versehentlich das eingesetzte dsDNA-Templat an Stelle der RNA isoliert wurde. Dann erfolgte eine Ethanolpräzipitation der RNA, um das Volumen zu verringern. Anschließend wurde die RNA über eine G-25-Säule aufgereinigt, um nicht inkorporierte Nukleotide abzutrennen. Dann erfolgte eine Quantifizierung nach 6.2.1.6 der erhaltenen RNA-Menge, um einen entsprechenden Ansatz für die Einführung der Fluoreszenzgruppe berechnen zu können.

Transkriptions-Puffer 10x:

Tris pH 7.9	400 mM
Spermidin	68 mM
MgCl ₂	220 mM
Triton X-100	0.1% (v/v)

T7-Transkriptions-Ansatz (100 µl):

Reagenz	Menge	Vorrat	Endkonzentration
Transkriptions-Puffer	20 µl	5x	1x
NTP Mix	10 µl	25 mM	1 mM
IPP	1 µl	2 U/µl	0,02 U/µl
GMPS	20 µl	100 mM	20 mM
RNasin	7 µl	40 U/µl	3 U/µl
DNA Templat	200-300 pmol		1-3 µM
T7 RNA-Polymerase	5 µl	50 U/µl	2,5 U/µl
Wasser	aufgefüllt auf 100 µl		

6.2.9 Fluoreszenzmarkierung der RNA

Siehe Ergebnisse, Abschnitt 4.1.4.2 und 4.1.4.3.

Nach erfolgter GMPS-Transkription und Quantifizierung der RNA wurde diese mit Reaktionspuffer und 2M Harnstoff versetzt und für 3 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurde für 10 min auf Raumtemperatur abgekühlt und dann mit einem 200-fachen Überschuss an Iodoacetamidfluorescein (vorgelöst in DMF) versetzt und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die RNA mit Ethanol gefällt und dann zur Abtrennung des überschüssigen Fluoresceins über ein Polyacrylamidgel aufgereinigt.

Reaktionspuffer 10x:

Tris pH 7.5	500 mM
EDTA	50 mM

Reaktionsansatz für Fluoreszenzmarkierung (500 µl):

Reagenz	Menge	Vorrat	Endkonzentration
Reaktionspuffer	50 µl	10x	1x
SH-RNA			10 µM
Harnstoff	125 µl	8M	2 M
Iodoacetamidfluorescein	100 µl	10 mM	2 mM
Wasser	aufgefüllt auf 500 µl		

Nach Reinigung über ein Polyacrylamidgel wurde die fluoreszenzmarkierte RNA passiv eluiert, mit Ethanol gefällt und anschließend die Konzentration bestimmt.

6.3 In vitro Methoden

6.3.1 Organisation der Substanzbibliotheken

Die von Comgenex gelieferten Substanzen wurden alle als „dry film“ geliefert. Die Verbindungen wurden in DMSO zu einer Konzentration von 10 mM gelöst. Die Substanzen wurden in Boxen zu 88 zusammengefasst und anschließend mit DMSO zu einer Konzentration von 1mM verdünnt. Diese Verdünnung wurde direkt für das Screening verwendet.

6.3.2 Fluoreszenzpolarisationsmessungen und Screening

Siehe Ergebnisse, Abschnitt 4.1.4.2 und 4.1.4.3.

Die Fluoreszenzpolarisationsmessungen wurden an einem TecanUltra-Gerät gemessen. Das Fluorescein wurde mit polarisiertem Licht einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und die Emission von parallel sowie senkrecht polarisiertem Licht bei 520 nm vermessen.

Die Messungen wurden in schwarzen 386iger Lochplatten mit flachem Boden durchgeführt. Das Reaktionsvolumen war 50 µL und die Messtemperatur 37 °C. Die benötigten Substanzen wurden direkt zusammengegeben und dann vermessen.

K61s-System:

Puffer	1x PBS pH 7.5, 3 mM MgCl ₂
K61s-Aptamer	50 nM
Cytohesin2	1000 nM
Substanzen	50 µM

Für beide Systeme wurden jeweils die folgenden Reaktionen mit einem Pipettierroboter (Freedom Evo, TECAN) pipettiert:

RNA + DMSO

RNA + Protein + DMSO

RNA + Substanz

RNA + Protein + Substanz

Dazu wurden zuerst die kleinen Moleküle, bzw. DMSO in die 384er-Platte vorgelegt und mit den Mastermixen aus RNA und Protein in Puffer bzw. RNA in Puffer, die vorher hergestellt wurden, versetzt.

Die Fluoreszenzpolarisierung wurde sofort in einem Plattenreader (Ultra, TECAN) vermessen (Anregung 485 nm, Emission 520 nm) bei 37°C vermessen.

Als potentieller Hit wurde eine Substanz definiert, die einerseits die Polarisation der RNA unbeeinflusst lässt und andererseits die Polarisationsdifferenz zwischen proteingebundenem und freiem Aptamer um mehr als 50 % reduzieren konnte. Diese Substanzen wurden einem Re-Screen unterzogen, bei dem von jedem Hit mehrere Konzentrationen vermessen worden sind.

6.3.3 Oberflächenplasmonresonanz

Siehe Ergebnisse, Abschnitt 4.1.5.2.

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

Für die in Abschnitt beschriebene qualitative Charakterisierung der Interaktionen der identifizierten Substanzen mit Cytohesin-2-Sec7, Cytohesin-1-Sec7 und BSA wurden folgende Sensor-Chip-Oberflächen präpariert: Auf einem CM5-Chip wurden ca. 5000 RU der Proteine durch EDC/NHS-Kopplung nach Angaben des Herstellers gekoppelt. Dazu wurde eine 600 nM Lösung der Proteine in 50 mM Natriumacetat, pH 5.6 für 7 Minuten über die EDC/NHS-aktivierten Oberflächen geleitet. Die Substanzen wurden in Laufpuffer verdünnt (PBS pH 7,5, 3 mM MgCl₂, 0,5 % DMSO) und in einer Konzentration von 1 µM injiziert. Zur Regeneration wurde maximal 10 mM NaOH verwendet. Die Flussrate während des Kopplungsprozesses war 5 µL/min und während den Messungen 20 µL/min.

Die Substanzen wurden in Laufpuffer gelöst (Endkonzentration 0,5 %) in verschiedenen Konzentrationen auf die Chipoberfläche injiziert (Assoziationszeit 30 s, Dissoziationszeit 30 s, Flußrate 20 µl/s)

Die Auswertung der Dissoziationskonstanten erfolgte mit Hilfe des Programms BIAevaluation.

6.3.4 GDP/GTP-Austausch an Arf-Proteinen

Siehe Ergebnisse, Abschnitt 4.1.6.

Die GDP/GTP-Austauschassays mit den Arf-Proteinen wurden mit der löslichen Varianten von Arf1, ohne die C-terminale myristoylierte Helix, NΔ17Arf1, durchgeführt. Damit konnte auf die Durchführung des Assays in Lipidvesikeln verzichtet werden. Zur Detektion wurde die bei Amor et al.⁶⁶ und Macia et al.²¹⁶ beschriebene Änderung der Tryptophanfluoreszenz ($\lambda_{exc}=280$ nm; $\lambda_{em}=340$ nm) während der Austauschreaktion auf einem Spektrofluorometer (Thermo Electron) verfolgt. Im GTP gebundenen Zustand ist die Fluoreszenz zweier bestimmter Tryptophanreste höher als im GDP-gebundenen Zustand²¹⁷.

Das ARF1 wurde in Anwesenheit von EDTA für 15 min bei 37°C mit GDP beladen, da der Austausch in Abwesenheit von Magnesium auch ohne Katalyse stattfindet. Die Beladung wurde

Material und Methoden

durch Zugabe von MgCl_2 gestoppt. Während der Beladung von ARF1 wurden zu den Austauschfaktoren die Inhibitoren zugegeben und inkubiert. Das ARF1 wurde zugegeben und die Reaktion sofort durch Injektion von GTP gestartet und die Veränderung in der Fluoreszenz verfolgt. Dabei wurde mit einer Wellenlänge von 280 nm angeregt und bei 340 nm ausgelesen. Die Messungen wurden in einem Volumen von 200 μL in schwarzen 96-Lochplatten durchgeführt und mit einem Varioskan der Firma Thermo vermessen. Die Reaktion wurde für 15-20 min verfolgt. Aus der erhaltenen Kurve wurde nach folgender Formel die Austauschrate bestimmt:

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

I_F = Fluoreszenzintensität

A_0 = Anfangskonzentration

k_{exch} = Austauschrate

t = Zeit

Zur Bestimmung der Inhibitionskonstanten wurde die Austauschrate in Abwesenheit der zu vermessenden Substanz auf 100% gesetzt und dann die entsprechenden Austauschraten in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an Inhibitor auf diesen Prozentwert bezogen.

Folgende Reaktionsbedingungen wurden verwendet:

N Δ 17Arf1 1 μM

GEF 50 nM (Sec7-Domänen der Cytohesine);
400 nM (Gea2Sec7)

GDP 20 μM

EDTA 2 mM

MgCl_2 1 mM (Puffer1); 3 mM (Puffer2)

GTP 50 μM

Puffer1 50 mM HEPES pH 7.5, 120 mM KCl

Puffer2 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 300 mM NaCl

Bei der Bestimmung der enzymatischen Daten wurden nur die Anfangsgeschwindigkeiten der linearen Phase des Fluoreszenzanstieges berücksichtigt und ausgewertet. Folgende Versuchsbedingungen wurden verwendet.

6.4 Eukaryontische Zellkultur

6.4.1 Allgemeiner Umgang mit eukaryontischer Zellkultur

Siehe Ergebnisse, Abschnitt 4.2.

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

Die Kultivierung von adhärenenten HeLa und HepG2 Zellen erfolgte als Monolayer-Kultur in 75 cm²-Kulturflaschen mit Dulbecco's Mod Eagle Medium (DMEM) für die HeLa-Zellen und Earle's Mod Eagle Medium für die HepG2-Zellen ergänzt mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FCS) in einem Begasungsbrutschrank (37° C, 5 % CO₂).

Zum Aussähen der Zellen in Kulturplatten oder zum Verdünnen wurde zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 mg Trypsin/ml) für 3 min im Brutschrank inkubiert. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 8 ml Vollmedium abgestoppt und die Zellen durch auf- und abpipettieren gut suspendiert. Die Zellen wurden spätestens bei einer optischen Konfluenz von ca. 90 % verdünnt, welche nach einer Verdünnung von 1:10 nach 3 Tagen Inkubation wieder erreicht werden.

Nach dem Verdünnen wurde mit Vollmedium wieder auf 40 ml aufgefüllt.

6.4.2 Handhabung von Dauerkulturen

Siehe Ergebnisse, Abschnitt 4.2.

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

Währenddessen wurde in 4 Cryoröhrchen 50 µl DMSO (HYBRI-Max) vorgelegt. Nach dem vollständigen Ablösen der Zellen wurden diese in 4 ml DMEM/10% FCS suspendiert. Je 1 ml

dieser Zellsuspension wurde dann in die Cryoröhrchen gegeben und gemischt und in einer Styroporbox bei -80°C langsam eingefroren. Anschließend wurden die Zellen in einem Zeldewar über flüssigem Stickstoff gelagert.

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

6.4.3 Transfektion von Plasmiden in HeLa-Zellen

Siehe Ergebnisse, Abschnitt 4.2.2.

Adhärenente HeLa Zellen wurden mit Plasmiden, Aptameren oder siRNAs unter Verwendung von Lipofektion transfiziert. Hierzu wurden ca. $6,5 \cdot 10^4$ Zellen (24-well Format) bzw. $3,25 \cdot 10^5$ Zellen (6-well Format) 18-24 h vor der Transfektion in Kulturplatten ausgesät. Anschließend wurden die zu ca. 80 % optisch konfluenten Zellen mit 1x PBS gewaschen und in serumfreiem DMEM für 1 h inkubiert. Währenddessen wurde sowohl das Transfektionsreagenz Metafectene in einem vierfachen Volumenüberschuß, bezogen auf die zu transfizierende Nukleinsäuremasse, als auch die Nukleinsäure(n) in einer 96-well Platte vorgelegt. Beide Lösungen wurden mit je 30 μl DMEM verdünnt, sofort vereint und 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde das Transfektionsgemisch direkt in den Kulturüberstand der Zellen gegeben und vorsichtig durchmischt. Nach weiteren 15 h Inkubation wurde das serumfreie DMEM durch FCS-haltiges Medium ersetzt. Diese Serumstimulation der Zellen erfolgte dann je nach Anwendung weiter 30 min bis 6 h.

6.4.4 SRE-Luciferase Assay

Siehe Ergebnisse, Abschnitt 4.2.2.

Im SRE-Luciferase Assay wurde die serumstimulierte Expression des Reporterenzym Luciferase in An- bzw. Abwesenheit von Effektoren bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen in 24-well Kulturplatten mit 1000 ng der Reporter Mischung, bestehend aus dem Reporterplasmid SRE-Luc und dem Plasmid pEGFP-N1 (siehe 5.10 und Anhang) im Massenverhältnis 4:1 kotransfiziert (s. 6.4.3). Alle verwendeten Plasmide wurden aus *E. coli* Bakterien präpariert, nach der Isolierung gefällt und in H_2O (dest.) resuspendiert. Nach Transfektion und Inkubation für 15 h in Abwesenheit von Serum, erfolgte die Stimulation der Zellen durch Zusetzen von 10 % FCS in DMEM. Nach weiteren 4-6 h Inkubation und zweimaligem Waschen mit 1x PBS erfolgte die Zellyse mit 200 μl Reporter-Lysispuffer (Promega) durch zweimaliges Einfrieren bei -80°C und Auftauen bei 37°C im Wasserbad. Nun

wurde das Lysat in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, zwecks Abtrennung der Zelltrümmer für 2 min bei 20.800 x g zentrifugiert und das klare Lysat in neue Gefäße überführt. Die EGFP-Fluoreszenzintensität ($\lambda_{ex}=485$ nm; $\lambda_{em}=520$ nm) wurde aus einem 110 μ l-Aliquot bestimmt wurde. Abschließend erfolgte die Bestimmung der Luciferase-Aktivität unter Verwendung des „*Luciferase Assay Systems*“ (Promega) aus einem 100 μ l Aliquot nach Herstellerangaben. Die Lumineszenzintensität wurde auf die EGFP-Fluoreszenzintensität und damit auf die Transfektionseffizienz normiert.

6.4.5 Lokalisierungen von FoxO-EGFP in HepG2-Zellen

Siehe Ergebnisse, Abschnitt 4.2.4.

Probendeckel (Durchmesser 15 mm) wurden in Ethanol gespült, abgeflammt und anschließend in eine 12-well-Platte gelegt. 10^5 HepG2-Zellen wurden ausgesät und übernacht in Vollmedium kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen in 1 ml serumfreies EMEM gegeben. Nun wurde der Transfektionsmix hergestellt. Dazu wurde 1 μ g FoxO-EGFP Plasmid in 50 μ l EMEM gelöst, gut gemischt, mit 3,5 μ l FuGeneHD (Roche) versetzt und die Mischung für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsmix tropfenweise zu den Zellen gegeben, die Platte vorsichtig geschüttelt und für 24 h im Brutschrank inkubiert.

Die Substanzen bzw. DMSO wurden zugegeben (0,2 % DMSO Endkonzentration) und für 2 h inkubiert bevor mit 100 nM Insulin für 30 min stimuliert wurde. Die Probendeckel wurden zweimal mit PBS und einmal mit Wasser abgespült. Anschließend wurden die Proben mit einem Tropfen GelMount auf Objektträgern befestigt und das Harz übernacht unter Lichtausschluß bei 4°C aushärten lassen. Mit einem konfokalen LSM wurden Zellen gesucht, die eine Fluoreszenz im EGFP-Bereich zeigen (Anregung 495 nm mit einem Laser, Emission 520 nm), photographiert und die Lokalisation von FoxO-EGFP untersucht.

6.4.6 ARF6-Aktivierungsassay

Siehe Ergebnisse, Abschnitt 4.2.5.

GGA3 ist ein Protein, das spezifisch die GTP-gebundene Form der ARFs bindet. Ein GST-Fusionskonstrukt der ersten 316 Aminosäuren von GGA3 wurde verwendet um das Verhältnis von aktiviertem GTP-gebundenen ARF6 zu inaktiven ARF6-GDP zu bestimmen.

Dazu wurden 10^7 Zellen in 120 mm Zellkulturschalen ausgesät und übernacht in Vollmedium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für weitere 24 h in

EMEM serumfrei kultiviert. Anschließend wurden die Inhibitoren in DMSO gelöst (Endkonzentration 0,2 % DMSO) zugegeben und für weitere 3 h kultiviert, bevor mit 100 nM Insulin für 10 min stimuliert wurde. Nun wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und mit einem Zellschaber in 1,5 ml Lysispuffer abgeerntet und zur Lyse für 20 min auf Eis inkubiert bevor zum Auflösen der Zellkerne 7 sek sonifiziert wurde (40 % Intensität bei Cycle 50). Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei voller Geschwindigkeit bei 4°C für 10 min abgetrennt und 1200 µl des Überstands mit GST-GGA3-Sepharose (50 µg Protein) für 2 h bei 4°C inkubiert. Nun wurde für 1 min bei 500 x g zentrifugiert, der Überstand mit den ungebundenen Proteinen verworfen und die GST-GGA3-Sepharose dreimal mit Lysispuffer gewaschen. Die Sepharose wurde bei 95°C mit 50 µl Lämmli-Puffer für 5 min inkubiert und die Proteine auf einem 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt. ARF6 wurde mittels Immunoblot mit einem Anti-ARF6-Antikörper (Santa Cruz) nachgewiesen und die Bande mit einer CCD-Kamera fotografiert und die Bandenintensität mit dem Programm Quantity One (BioRad) quantifiziert. Normiert wurde auf den ARF6-Gehalt im Zellysat.

Lysispuffer:

200 mM NaCl

50 mM Tris-HCl pH 7,5

10 mM MgCl₂

1% Triton X-100

0,1% SDS

0.5% Deoxycholat

5% Glycerol

Protease Inhibitor Mix (Serva)

6.4.7 RNA-Isolierung und quantitative PCR

Siehe Ergebnisse, Abschnitt 4.2.3.

Je 10⁵ HepG2 Zellen wurden in 12-well Zellkulturplatten ausplattiert und übernacht in EMEM/10% FCS kultiviert. Dann wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und weitere 24 h in serumfreiem EMEM inkubiert. Anschließend wurden die zu analysierenden Verbindungen in DMSO (Endkonzentration 0,2 %) zugegeben und die Zellen übernacht mit 10 nM Insulin stimuliert. Die RNA wurde mit dem AbsolutelyRNA Kit (Stratagene) nach den Angaben des Herstellers isoliert und in einem Endvolumen von 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

2,5 µg davon wurden für die cDNA-Synthese mit dem cDNA-Archive Kit (ABI) im 50 µl Maßstab nach Angaben des Herstellers verwendet. Die cDNA wurde 1:3 mit Wasser verdünnt und die quantitative PCR im 10 µl Maßstab mit genspezifischen TaqMan-Sonden (Applied Biosystems) und dem 2x TaqMan PCR MasterMix (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben durchgeführt. Alle Expressionslevel wurden auf die Expression des unregulierten β -2-Microglobulin normalisiert.

6.4.8 siRNA-Transfektion

Siehe Ergebnisse, Abschnitt 4.2.6.

Zwei Methoden der siRNA-Transfektion wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet, die Transfektion mit in Liposomen eingeschlossenen Nukleinsäuren, Lipofektion, und die Elektroporation mit „Rechteckwellen“, die für die Transfektion von kurzen Nukleinsäuren besser geeignet ist als die Elektroporation mit exponentieller Abnahme der Stromstärke.

6.4.8.1 Lipofektion

Siehe Ergebnisse, Abschnitt 4.2.6.1 und 4.2.6.3.

10^5 HepG2-Zellen wurden in Löcher einer 12-Well-Platte ausgesät und für 12 h anwachsen lassen. Anschließend wurde der siRNA-Transfektionsmix nach Angaben des Herstellers hergestellt. Dazu wurden 100 pmol siRNA in 50 µl EMEM (serumfrei) und 5 µl Oligofectamine (Invitrogen) in 5 µl EMEM (serumfrei) verdünnt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die zwei Lösungen vereinigt, durch vorsichtiges auf- und abpipettieren gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der siRNA-Mix wurde zu den Zellen zutropft und die Platte vorsichtig geschüttelt und für 36 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in serumfreiem EMEM für weitere 24 h kultiviert. Stimuliert wurde mit 10 nM Insulin für 12 h. Die RNA-Isolierung, cDNA-Präparation und quantitative PCR wurden wie in 6.4.7 durchgeführt.

6.4.8.2 Elektroporation mit Rechteckwellen

Siehe Ergebnisse, Abschnitt 4.2.6.2.

2×10^6 abgelöste und mit PBS gewaschene HepG2 Zellen wurden in 500 μ l OptiMEM (Gibco) aufgenommen und mit 2,5 μ g siRNA in einer Elektroporationsküvette mit einer Schichtdicke von 4 mm gemischt. Anschließend wurden die Zellen mit folgendem Programm elektroporiert:

1 Puls Rechteckwellen

500 V für 5 ms

Die Zellen wurden sofort in 2 ml vorgewärmten EMEM/10 % FCS aufgenommen und in einer 6-Well-Platte ausgesät und für 36 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in serumfreiem EMEM für weitere 24 h kultiviert. Stimuliert wurde mit 10 nM Insulin für 12 h. Die RNA-Isolierung, cDNA-Präparation und quantitative PCR wurden wie in 6.4.7 durchgeführt.

6.4.9 Golgi-Färbungen mit siRNAs und kleinen Molekülen

Siehe Ergebnisse, Abschnitt 4.2.7.

Probendeckel (Durchmesser 15 mm) wurden in Ethanol gespült, abgeflämmt und anschließend in eine 12-well-Platte gelegt. 10^5 HepG2-Zellen wurden ausgesät und übernacht in Vollmedium kultiviert. Die siRNAs wurden mittels Lipofektion wie unter 6.4.8.1 beschrieben transfiziert. Die Zellen wurden für 48 h in Vollmedium kultiviert, bevor sie für weitere 24 h in serumfreiem EMEM inkubiert wurden. Anschließend wurden zu Zellen, die nicht transfiziert wurden, um den Effekt der kleinen Moleküle auf die Integrität des Golgi-Apparats zu analysieren, die kleinen Moleküle in DMSO gelöst (0,2% Endkonzentration) gegeben und für 2 h inkubiert, bevor alle Zellen mit 100 nM Insulin für 30 min stimuliert wurden.

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gespült, und anschließend mit 4 % Paraformaldehyd, pH 7,4 für 20 min bei 4°C fixiert und zweimal mit PBS gewaschen. Der primäre Antikörper (anti-Giantin, aus Maus), gelöst 1:20 in PBS/1 % BSA wurde in einer Feuchtkammer auf die Probendeckel gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend der sekundäre Antikörper 1:50 in PBS/1 % BSA (anti-Maus, Cy5-Konjugat, Jackson ImmunoResearch) auf die Probendeckel gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Probendeckel wurden zweimal mit PBS und einmal mit Wasser abgespült. Anschließend wurden die Proben mit einem Tropfen GelMount auf Objektträgern befestigt und das Harz übernacht unter Lichtausschluß bei 4°C aushärten lassen. Mit einem konfokalen LSM (Olympus) wurden Zellen gesucht, die eine Fluoreszenz im roten Bereich zeigen (Anregung 590 nm mit Laser, Emission 620 nm), fotografiert und die Integrität des Golgi-Apparats untersucht.

6.4.10 Rezeptordichte an der Oberfläche von HepG2-Zellen

Siehe Ergebnisse, Abschnitt 4.2.8.

$2 \cdot 10^5$ HepG2-Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und für 12 Stunden in Vollmedium kultiviert. Anschließend wurden die Inhibitoren in DMSO gelöst zugegeben (Endkonzentration 0,2 % DMSO) und die Zellen für weitere 12 h inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 500 μ l Accutase (PAA) gelöst. 250 μ l der Zellsuspension wurden in FACS-Röhrchen bei 1.000 x g für 5 min bei 4°C abzentrifugiert, mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde der primäre Antikörper (anti-Insulinrezeptor Alpha-Kette, Santa Cruz) 1:20 gelöst in PBS mit 1 % BSA zugegeben und für weitere 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit 1,5 ml PBS gewaschen und anschließend der sekundäre Antikörper als Cy5-Konjugat 1:200, gelöst in PBS mit 1 % BSA, zugegeben und für weitere 20 min unter Lichtausschluß auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden noch einmal mit 1,5 ml eiskaltem PBS gewaschen und in 500 μ l PBS aufgenommen und anschließend in einem Cytometer (Beckman Coulter) der Prozentsatz der durch den Antikörper angefärbten Zellen bestimmt und normiert auf den Wert ohne Inhibitoren.

6.5 Mausexperimente

Siehe Ergebnisse, Abschnitt 6.5.

Die Experimente, die in der vorliegenden Arbeit an C57/Bl6N Mäuse (Charles River Laboratories) durchgeführten Experimente wurden von der Bezirksregierung Köln genehmigt. Die Mäuse wurden in einem pathogenfreien Mausstall bei einem 12 h Tag/Nacht-Zyklus gehalten und mit Standardfutter (19% Proteine, 3,3% Fett, 41,3% Kohlenhydrate; ssniff Spezialdiäten) *ad libitum* gefüttert.

6.5.1 Extraktion und Massenspektrometrischer Nachweis von SecinH3 aus Mäuselebern

Siehe Ergebnisse, Abschnitt 6.5.1.

C57/Bl6N-Mäuse wurden für zwei Tage mit Standardfutter für die Kontrollen bzw. Futter dem 0,9 μ mol/g SecinH3 zugegeben wurde gefüttert. Den Mäusen wurde unter Narkose die Leber entfernt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. 300 mg der Leber wurden in 1 ml PBS und 2 ml Chloroform aufgenommen und mit einem Polytron (Kinematica) homogenisiert und

30 min bei 4°C geschüttelt. Nachdem für 5 min bei 4.000 rpm zentrifugiert wurde, wurde die Chloroformphase abgetrennt und die wäßrige Phase nochmals mit 2 ml Chloroform für 30 min ausgeschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 4.000 rpm wurden die Chloroformextrakte vereinigt und das Chloroform in einer SpeedVac (Eppendorf) entfernt.

Der Rückstand wurde in 300 µl Methanol aufgenommen und für 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Methanolextrakt wurde in ein HPLC-Gefäß überführt und an einer HPLC an einer Nucleosil RP18 Säule (5 µm Porengröße; 10x0,4 mm Säulengröße) mit folgendem Gradienten vorgetrennt.

0-7 min: 70% H₂O, 30% Methanol

7-15 min: 40% H₂O, 60% Methanol

15-20 min: 100% Methanol;

Fraktionen 9-12 min wurden gesammelt und das Lösemittel an einer SpeedVac entfernt. Der Rückstand wurde in 50 µl Methanol aufgenommen und die Feintrennung an einer HPLC an einer MultoHigh RP18 Säule (Porengröße 5 µm; 125x2,0 mm Säulengröße) mit folgendem Gradienten durchgeführt.

0 min: 50% H₂O, 50% Methanol

5 min: 50% H₂O, 50% Methanol

25 min: 10% H₂O, 90% Methanol

25,1 min: 100% Methanol

SecinH3, das nach ca. 20 min eluiert wurde mittels Massenspektrometrie identifiziert.

6.5.2 Genexpression in Mäuselebergewebe

Siehe Ergebnisse, Abschnitt 4.3.2.

C57/B16N-Mäuse wurden für zwei Tage mit Standardfutter für die Kontrollen bzw. Futter dem 0,9 µmol/g SecinH3 zugegeben wurde gefüttert. Den Mäusen wurde unter Narkose die Leber entfernt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Aus ca. 30 mg Lebergewebe wurde mit Trizol[®] (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers die RNA präpariert und ca. 2,5 µg davon für die cDNA-Synthese mit dem cDNA-Archive Kit (ABI) im 50 µl Maßstab nach Angaben des Herstellers verwendet. Die cDNA wurde 1:3 mit Wasser verdünnt und die quantitative PCR im 10 µl Maßstab mit genspezifischen TaqMan-Sonden (Applied Biosystems) und dem 2x TaqMan PCR MasterMix (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben durchgeführt. Alle Expressionslevel wurden auf die Expression des unregulierten β-2-Microglobulin normalisiert.

6.5.3 Serumparameter

Siehe Ergebnisse, Abschnitt 4.3.3.

Nach Herauspräparierung der Leber aus C57/Bl6N-Mäusen, die für andere Experimente genutzt wurden, wurde das Blut der Maus gesammelt und nach 5-minütiger Gerinnungszeit für 5 min bei 500 x g zentrifugiert und das Serum abgenommen.

Aus dem Serum wurde das Insulin mittels ELISA (Ultrasensitive Mouse ELISA, DRG Instruments), die Blutglukose mittels Hexokinasase-Assay (Glucose (HK) Assay Kit, Sigma), das 3-Hydroxybutyrat mit einem Autokit 3HB (WAKO), die freien Fettsäuren mit dem NEFA C-Kit (WAKO) und die Triglyceride mit dem Triglyceride L-Type Kit (WAKO) nach Herstellerangaben enzymatisch bestimmt.

6.6 *Material*

6.6.1 **Geräte**

Gerät; Typ	Hersteller
Agarose Gelkammer	Fisher Scientific
Autoklaven; Tecnoclav 50 3850EL; 5075EL	Tecnomara-Fedegari Systec
Blot Apparatur; Trans-Blot SEMI-DRY	Bio-Rad
CCD-Kamera; VersaDoc 5000	Bio-Rad
Fluoreszenzplattenreader Varioskan	Thermo
FP-Plattenreader; Ultra	TECAN
FPLC-System; ÄKTA	Amersham Biosciences
Gefriertrockner; CT 110	Heto
Gelfiltrationssäule; Econo-Pac P6	Bio-Rad
Geltrockner; Model 583	Bio-Rad
Hybridisierungsöfen; Si20H	Stuart-Scientific
IMAC-Säulen; HiTrap-Chelating HP	Amersham Biosciences
Inkubationsschüttler; 4430	Innova
Inkubatorschrank; HeraCell	Heraeus
Ionenaustauschsäule; BioScaleQ 5 ml	Bio-Rad
Leersäule HR 16/10	Amersham Biosciences
Lichtmikroskop; Axiovert25	Zeiss
Lumineszenzreader; Ascent L	Thermo
Mikropipetten; research research-Multikanal 30-300µl Multidepenser	Eppendorf Eppendorf Eppendorf
Neubauer Zählkammer; T728.1	Roth
Oberflächenplasmonresonanz; Biacore3000	Biacore
PAGE-Apparatur; Mini-Protean 3 Cell	Bio-Rad
PCR-Cycler; Personal Cycler T Gradient	Biometra Biometra

T3 Thermocycler	Biometra
pH-Meßgerät; pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Phosphorimager; FLA-3000	Fujifilm
Photometer; Lambda 2S	Perkin Elmer
Pipettierhilfen; Easypet	Eppendorf
Accu-Jet	Brand
Pipettierroboter; Freedom Evo	TECAN
Real-Time PCR Cycler; iCycler iQ5	Bio-Rad
Reinstwasseranlage; Easy pure UV/UF	Barnstead
Sonifikatorstab; Sonoplus HD70	Bandelin
Spannungsquellen; E865; E833; E802	Consort
Spektrofluorometer;	Thermo
Speed-Vac; Concentrator 5301	Eppendorf
Sterilbänke; Antares	Kendro
HeraSafe	Heraeus
Sterilisierbrenner; Vulcan	Heraeus
Szintillationszähler; winSpectral 1414	Perkin Elmer
Thermoblock; Block Heater	Stuart-Scientific
Thermomixer; comfort	Eppendorf
Tischschüttler; 3017	GFL
Trockenschrank	WTB-Binder
Überkopfschüttler; Reax2	Heidolph
UV-Transilluminator; IDA	Raytest
Eagle Eye II	Stratagene
Vakuum-Pumpe; HydroTech	Bio-Rad
Vortexer; 7-2020	NeoLab
Waagen; JL-200 / MK-500C	Chyo Balance
BL1500S	Sartorius
Wasserbad; 1008	GFL
Zentrifugen; 5804R; 5810R; 5417C	Eppendorf
Biofuge 15R	Heraeus
J2-Mi	Beckman

6.6.2 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
Petri-Schalen	TPP
Kulturplatten 6-, 12-, 24-, 96-well	TPP
Einmalpipetten 50, 25, 10, 5, 2 ml	TPP
Zellkulturflasche 75 cm ²	TPP
Zentrifugenröhrchen 15, 50 ml	Falcon
CM5-Chip	Biacore
Cryoröhrchen	Roth
Dialyseschläuche (MW cut of: 6-8 kDa)	Spectrum
Einwegspritzen	Chirana-Prema / Braun
Extruder-Membranen (Polycarbonat)	Avestin
Glaswolle, silanisiert	Serva
Kanülen	Terumo
MicroSpin G-25 Säule	Amersham Biosciences
Nitrozellulosemembran (Filterbindung); Protran 0,45 µm	Schleicher & Schuell
Nitrozellulosemembran (Western-Blot); Protran 0,1 µm	Schleicher & Schuell
Polyprepsäule	BioRad
Reaktionsgefäße (1,5 ml u. 2,0 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (PCR 0,2 u. 0,5 ml)	Eppendorf
Skalpelle	Bayha
Spitzen für Mikropipetten	Peske, Biozym
Spritzenvorsatzfilter	QualiLab
Sterilfiltrationsaufsätze	Nalgene
Whatman-Filterpapier	Whatman
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	Roth
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Roth

6.6.3 Chemikalien

Reagenz	Hersteller
---------	------------

β-Mercaptoethanol	Sigma
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma
6-Aminohexansäure	Merck
Agar	Sigma
Agarose, Electrophoresisgrade	Invitrogen
Ammoniumacetat	Merck
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Ampicillin-Na-Salz	Sigma
Aprotinin	Sigma
Benzamidin	Merck
Bis-Acrylamide; Rotiphorese	Roth
Bradford-Reagenzlösung	Bio-Rad
Bromphenolblau	Merck
CHAPS	Sigma
Chloroform	Merck
CNBr-aktivierte Sepharose 4B	Amersham Biosciences
Coomassie Brilliant Blau G 250	Merck
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
EDC/NHS Kopplungsreagenzien	Biacore
EGF	Invitrogen
Essigsäure (99,8 %)	Merck
Ethanol abs.	Merck
Ethanolamin	Biacore
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA); Titriplex II	Calbiochem
Ficoll (400)	Merck
Formaldehyd (36 %)	Fluka
Formamide	Fluka
Glutaraldehyd	Sigma
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Glycogen	Roche

Material und Methoden

Guanidiniumhydrochlorid	Sigma
Harnstoff	Calbiochem
Heparin	Sigma
IGF	Invitrogen
Insulin	Sigma
Imidazol	Merck
Isopropanol	Merck
Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranosid (IPTG)	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Kanamycin	Sigma
KH_2PO_4	Merck
Konservierer für Wasserbäder	Roth
Leupeptin	Sigma
Lösungsmittel, organische	Merck, Riedel-de Haën, Kraemer & Martin
Magermilchpulver	TIP
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	ICN Biomedicals
Metafectene	Biontex
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Riedel-de Haën
Natriumhydroxid	Merck
Natriumthiosulfat	Merck
Ni-NTA Superflow	Qiagen
NP-40 (Igepal)	Fluka

Oligofectamine	Invitrogen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA)	Sigma
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Calbiochem
Roti-Phenol für Extraktionen	Roth
Salzsäure (37 %)	Merck
Silbernitrat	Merck
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	ICN Biomedicals
Triton X-100 [®]	Merck
tRNA (<i>E. coli</i>)	Roche
X-Gal	Sigma
Xylencyanol	Merck
Zitronensäure	Merck

Alle Chemikalien waren vom höchsten erhältlichen Reinheitsgrad.

6.6.4 Nukleotide

dNTP - Set	Roche, Mannheim
NTP - Set	Roche, Mannheim
GTP γ S	Sigma
GMPS	eigene Synthese

6.6.5 Enzyme und Proteine

Enzym	Hersteller
N Δ 17ARF1	AK Prof. Dr. Wieland
Anorg. Pyrophosphatase	Roche
Bovine Serum Albumine (BSA)	Calbiochem
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Stratagene
DNase I	Roche
Lysozym	Sigma
<i>Pfu</i> Turbo [®] DNA Polymerase	Stratagene
RNasin	Promega

Material und Methoden

T7-RNA-Polymerase	Stratagene
<i>Taq</i> -Polymerase	AK Famulok
Cytohesin-1 Antikörper (mAb 19) 1:20	AK Kolanus
Cytohesin-2 Antikörper 1:250	Sigma
Cytohesin-3 Antikörper (8B7) 1:20	AK Kolanus
ARF1 Antikörper	Biomol
ARF6 Antikörper	Santa Cruz
sekundäre Antikörper 1:10.000 (anti-Maus; anti-Kaninchen)	Santa Cruz
sekundärer Antikörper anti-Ratte	Dianova
anti-Insulinrezeptor (alpha-Kette)	Santa Cruz
sekundärer anti-Maus-Cy5-Konjugat	Jackson ImmunoResearch

6.6.6 DNA- und Protein Längenstandards

6.6.6.1 DNA-Standards

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

6.6.6.2 Protein Standards

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

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

6.6.7 Kulturmedien, Lösungen und Puffer

6.6.7.1 Kulturmedien und Lösungen für Zellkulturarbeiten

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

Material und Methoden

Ampicillin-Stammlösung:

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

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

Kanamycin-Stammlösung:

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

mit H₂O (dest.) lösen

IPTG-Stammlösung:

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

mit H₂O (dest.) lösen

6.6.7.2 Vorratslösungen und Puffer

Magnesiumchlorid-Lösung:

Reagenz	MW [g/mol]	Konzentration	benötigt für 250 ml
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	203,3	1 M	50,8 g

mit H₂O (dest.) lösen

Dithiothreitol-Lösung:

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

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

Phenylmethylsulfonylfluorid-Lösung:

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

mit Ethanol lösen und bei -20° C lagern

Ammoniumacetat-Lösung:

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

mit H₂O (dest.) lösen

Natriumacetat-Lösung:

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

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

EDTA-Lösung:

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

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

Ethidiumbromid-Lösung:

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

mit H₂O (dest.) auffüllen

Leupeptin-Lösung:

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

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

Aprotinin-Lösung:

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

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

TE-Puffer:

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

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

TBE-Puffer:

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

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

6.7 Kommerzielle Reaktionssysteme

Bezeichnung	Hersteller
AbsolutelyRNA-Kit	Stratagene
HRP-Detektionssystem (ECL-Reagenz)	Millipore
iQ SYBR-Green Supermix	Bio-Rad
iQ Supermix	Bio-Rad
Luciferase Assay System	Promega
cDNA Archive Kit	Applied Biosystems
PCR-Purification Kit	Qiagen
Plasmid Maxi Kit	Qiagen
RNA/DNA Kit	Qiagen

6.7.1 Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Verwendung	Reverenz/Hersteller
pGEM-4Z	Ampicillin	Sequenzierung	Promega
pEGFP-N1	Kanamycin	Reporterplasmid	Clontech
SRE-Luc	Ampicillin	Reporterplasmid	Liao et al., 1997 ²¹⁸
pRK-wtARNO	Ampicillin	Expression Eukaryonten	in Moser et al., 1993 ²¹⁹
N1-ARNO [E156K]	Kanamycin	Expression Eukaryonten	in Clontech
pET11d-ARNO	Ampicillin	Expression Prokaryonten	in Novagen
pET11a-Cyt1	Ampicillin	Expression Prokaryonten	in AK Prof. Dr. Kolanus

6.7.2 Oligonukleotide

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

6.7.2.1 Primer

Primer P-39F

5'-TCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGACAAGCTTGGGTC-3'

unterstrichen: T7-Promotor

Primer P-20I

5'-ACTCCTAGGAAGAGCAAGAG-3'

Primer K61S I

5'-AGGTAAAAGAACATCAAT

6.7.2.2 Aptamere und Bibliothek I-N40

Anti-Cytohesin-2 Aptamer K61 (RNA)

5'-GGGAGAGACAAGCUUGGGUCGCGUUUUGCUAUUGAUGUUCUUUUAACC
UGGCCUGUUUGGGCCUCUUGCUCUUCCUAGGAGU-3'

Material und Methoden

Anti-Cytohesin Aptamer M69 (RNA)

5'-GGGAGAGACAAGCUUGGGUCUAUUAUGCCUUUAGCUAGCGCAUUCUGU
GGGGUGGGUGGAAGAAGAGAAAGAGAAGUAAUUAAGGAUCCUCAG-3'

DNA-Startpool I-N40

5'-TCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGACAAGCTTGGGTC-N40-
CTCTTGCTCTTCCTAGGAGT-3'

unterstrichen: T7-Promotor

Anti-Cytohesin-2 Aptamer K61S (RNA)

5'-GGGUCGCGUUUUGCUAUUGAUGUUCUUUUAACCU-3'

6.7.2.3 siRNA

Cytohesin-1

sense [CGAUAUUGUCAGUGCAAUA]_{RNA}[TT]_{DNA}

antisense [UAUUGCACUGACAAUAUCG]_{RNA}[CT]_{DNA}

Cytohesin-2

sense [GGUUUAUCCUCACAGACAA]_{RNA}[TT]_{DNA}

antisense [UUGUCUGUGAGGAUAAACC]_{RNA}[AG]_{DNA}

Cytohesin-3

sense [GCAUGUUGUGCUCGGACAA]_{RNA}[TT]_{DNA}

antisense [UUGUCCGAGCACAACAUGC]_{RNA}[TT]_{DNA}

ARF1

sense [UGACAGAGAGCGUGUGAAC]_{RNA}[TT]_{DNA}

antisense [GUUCACACGCUCUCUGUCA]_{RNA}[TT]_{DNA}

ARF6

sense [CACCGCAUUAUCAAUGACC]_{RNA}[TT]_{DNA}

antisense [GGUCAUUGAUAAUGCGGUG]_{RNA}[TT]_{DNA}

6.7.3 Zelllinien

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
HeLa	humane epitheliale Zelllinie aus Patienten mit Cervix-Karzinom	Tyndall et al., 1965 ²²⁰
HepG2	humane epitheliale Zelllinie eines Leberkarzinoms	Knowles et al ²²¹

7 Literatur

1. Lander, E. S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921 (2001).
2. Malecki, M. T. & Klupa, T. Type 2 diabetes mellitus: from genes to disease. *Pharmacol Rep* 57 Suppl, 20-32 (2005).
3. van Slooten, H. J. et al. Mutations in exons 5-8 of the p53 gene, independent of their type and location, are associated with increased apoptosis and mitosis in invasive breast carcinoma. *J Pathol* 189, 504-13 (1999).
4. Syvanen, A. C. & Taylor, G. R. Approaches for analyzing human mutations and nucleotide sequence variation: a report from the Seventh International Mutation Detection meeting, 2003. *Hum Mutat* 23, 401-5 (2004).
5. Liu, T., Johnson, J. A., Casella, G. & Wu, R. Sequencing complex diseases With HapMap. *Genetics* 168, 503-11 (2004).
6. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* 298, 1912-1934 (2002).
7. Blume-Jensen, P. & Hunter, T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355 (2001).
8. Ablooglu, A. J. & Kohanski, R. A. Activation of the insulin receptor's kinase domain changes the rate-determining step of substrate phosphorylation. *Biochemistry* 40, 504-13 (2001).
9. Lebrun, C. et al. Antibodies to the extracellular receptor domain restore the hormone-insensitive kinase and conformation of the mutant insulin receptor valine 382. *J Biol Chem* 268, 11272-7 (1993).
10. Biddinger, S. B. & Kahn, C. R. From Mice to Men: Insights into the Insulin Resistance Syndromes. *Annu Rev Physiol* 68, 123-58 (2006).
11. Sun, X. J. et al. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 377, 173-7 (1995).
12. Sun, X. J. et al. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352, 73-7 (1991).
13. Lavan, B. E., Lane, W. S. & Lienhard, G. E. The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 272, 11439-43 (1997).
14. Lavan, B. E. et al. A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 272, 21403-7 (1997).
15. White, M. F. & Yenush, L. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Curr Top Microbiol Immunol* 228, 179-208 (1998).
16. Wick, M. J., Dong, L. Q., Hu, D., Langlais, P. & Liu, F. Insulin receptor-mediated p62dok tyrosine phosphorylation at residues 362 and 398 plays distinct roles for binding GTPase-activating protein and Nck and is essential for inhibiting insulin-stimulated activation of Ras and Akt. *J Biol Chem* 276, 42843-50 (2001).
17. Lehr, S. et al. Identification of major tyrosine phosphorylation sites in the human insulin receptor substrate Gab-1 by insulin receptor kinase in vitro. *Biochemistry* 39, 10898-907 (2000).

18. Gustafson, T. A., He, W., Craparo, A., Schaub, C. D. & O'Neill, T. J. Phosphotyrosine-dependent interaction of SHC and insulin receptor substrate 1 with the NPEY motif of the insulin receptor via a novel non-SH2 domain. *Mol Cell Biol* 15, 2500-8 (1995).
19. Boney, C. M., Gruppuso, P. A., Faris, R. A. & Frackelton, A. R., Jr. The critical role of Shc in insulin-like growth factor-I-mediated mitogenesis and differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. *Mol Endocrinol* 14, 805-13 (2000).
20. Baumann, C. A. et al. CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature* 407, 202-7 (2000).
21. Shepherd, P. R., Withers, D. J. & Siddle, K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 333 (Pt 3), 471-90 (1998).
22. Vanhaesebroeck, B. & Alessi, D. R. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 346 Pt 3, 561-76 (2000).
23. Inukai, K. et al. p85alpha gene generates three isoforms of regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-Kinase), p50alpha, p55alpha, and p85alpha, with different PI 3-kinase activity elevating responses to insulin. *J Biol Chem* 272, 7873-82 (1997).
24. Carpenter, C. L. & Cantley, L. C. Phosphoinositide kinases. *Curr Opin Cell Biol* 8, 153-8 (1996).
25. Cheatham, B. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol* 14, 4902-11 (1994).
26. Rommel, C. et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol* 3, 1009-13 (2001).
27. Nakae, J., Kitamura, T., Silver, D. L. & Accili, D. The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J Clin Invest* 108, 1359-67 (2001).
28. Kohn, A. D., Summers, S. A., Birnbaum, M. J. & Roth, R. A. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem* 271, 31372-8 (1996).
29. Gao, X. et al. Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. *Nat Cell Biol* 4, 699-704 (2002).
30. Inoki, K., Li, Y., Xu, T. & Guan, K. L. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev* 17, 1829-34 (2003).
31. Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J. & Guan, K. L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 4, 648-57 (2002).
32. Kotani, K. et al. Requirement of atypical protein kinase clambda for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol* 18, 6971-82 (1998).
33. Bandyopadhyay, G. et al. Effects of transiently expressed atypical (zeta, lambda), conventional (alpha, beta) and novel (delta, epsilon) protein kinase C isoforms on insulin-stimulated translocation of epitope-tagged GLUT4 glucose transporters in rat adipocytes: specific interchangeable effects of protein kinases C-zeta and C-lambda. *Biochem J* 337 (Pt 3), 461-70 (1999).
34. Bandyopadhyay, G. et al. Activation of protein kinase C (alpha, beta, and zeta) by insulin in 3T3/L1 cells. Transfection studies suggest a role for PKC-zeta in glucose transport. *J Biol Chem* 272, 2551-8 (1997).
35. Gille, H. et al. ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *Embo J* 14, 951-62 (1995).

36. Reusch, J. E. et al. Differential requirement for p21ras activation in the metabolic signaling by insulin. *J Biol Chem* 270, 2036-40 (1995).
37. Horton, J. D., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109, 1125-31 (2002).
38. Tontonoz, P., Kim, J. B., Graves, R. A. & Spiegelman, B. M. ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol* 13, 4753-9 (1993).
39. Yamamoto, T. et al. SREBP-1 interacts with hepatocyte nuclear factor-4 alpha and interferes with PGC-1 recruitment to suppress hepatic gluconeogenic genes. *J Biol Chem* 279, 12027-35 (2004).
40. Horton, J. D., Bashmakov, Y., Shimomura, I. & Shimano, H. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5987-92 (1998).
41. Shimomura, I. et al. Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13656-61 (1999).
42. Semenkovich, C. F. Insulin resistance and atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 116, 1813-1822 (2006).
43. Prentki, M. & Nolan, C. J. Islet {beta} cell failure in type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* 116, 1802-1812 (2006).
44. Shoelson, S. E., Lee, J. & Goldfine, A. B. Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116, 1793-1801 (2006).
45. Kadowaki, T. et al. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 116, 1784-1792 (2006).
46. Kasuga, M. Insulin resistance and pancreatic {beta} cell failure. *J. Clin. Invest.* 116, 1756-1760 (2006).
47. Gutierrez-Juarez, R. et al. Critical role of stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) in the onset of diet-induced hepatic insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116, 1686-1695 (2006).
48. Anderson, P. J. et al. Factor analysis of the metabolic syndrome: obesity vs insulin resistance as the central abnormality. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25, 1782-8 (2001).
49. Michael, M. D. et al. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell* 6, 87-97 (2000).
50. Cariou, B. et al. Cellular and molecular mechanisms of adipose tissue plasticity in muscle insulin receptor knockout mice. *Endocrinology* 145, 1926-32 (2004).
51. Bruning, J. C. et al. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* 2, 559-69 (1998).
52. Kim, J. K. et al. Redistribution of substrates to adipose tissue promotes obesity in mice with selective insulin resistance in muscle. *J Clin Invest* 105, 1791-7 (2000).
53. Bluher, M., Kahn, B. B. & Kahn, C. R. Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science* 299, 572-4 (2003).
54. Bluher, M., Patti, M. E., Gesta, S., Kahn, B. B. & Kahn, C. R. Intrinsic heterogeneity in adipose tissue of fat-specific insulin receptor knock-out mice is associated with differences in patterns of gene expression. *J Biol Chem* 279, 31891-901 (2004).
55. Bluher, M. et al. Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev Cell* 3, 25-38 (2002).
56. Gunton, J. E. et al. Loss of ARNT/HIF1beta mediates altered gene expression and pancreatic-islet dysfunction in human type 2 diabetes. *Cell* 122, 337-49 (2005).

57. Kulkarni, R. N. et al. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* 96, 329-39 (1999).
58. Vicent, D. et al. The role of endothelial insulin signaling in the regulation of vascular tone and insulin resistance. *J Clin Invest* 111, 1373-80 (2003).
59. Schubert, M. et al. Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3100-5 (2004).
60. Bruning, J. C. et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289, 2122-5 (2000).
61. Obici, S., Feng, Z., Karkanias, G., Baskin, D. G. & Rossetti, L. Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci* 5, 566-72 (2002).
62. Nie, Z., Hirsch, D. S. & Randazzo, P. A. Arf and its many interactors. *Curr Opin Cell Biol* 15, 396-404 (2003).
63. Jackson, C. L. & Casanova, J. E. Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol* 10, 60-7 (2000).
64. D'Souza-Schorey, C. & Chavrier, P. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 347 (2006).
65. Franco, M., Chardin, P., Chabre, M. & Paris, S. Myristoylation of ADP-ribosylation factor 1 facilitates nucleotide exchange at physiological Mg²⁺ levels. *J Biol Chem* 270, 1337-41 (1995).
66. Amor, J. C., Harrison, D. H., Kahn, R. A. & Ringe, D. Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP. *Nature* 372, 704-8 (1994).
67. Antony, B., Beraud-Dufour, S., Chardin, P. & Chabre, M. N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry* 36, 4675-84 (1997).
68. Moss, J. & Vaughan, M. Molecules in the ARF orbit. *J Biol Chem* 273, 21431-4 (1998).
69. Donaldson, J. G. & Jackson, C. L. Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr Opin Cell Biol* 12, 475-82 (2000).
70. Yamaji, R. et al. Identification and localization of two brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors in a macromolecular complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2567-72 (2000).
71. Claude, A. et al. GBF1: A novel Golgi-associated BFA-resistant guanine nucleotide exchange factor that displays specificity for ADP-ribosylation factor 5. *J Cell Biol* 146, 71-84 (1999).
72. Franco, M. et al. EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization. *Embo J* 18, 1480-91 (1999).
73. Someya, A. et al. ARF-GEP(100), a guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2413-8 (2001).
74. Kolanus, W. et al. Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell* 86, 233-42 (1996).
75. Chardin, P. et al. A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature* 384, 481-4 (1996).
76. Franco, M. et al. ARNO3, a Sec7-domain guanine nucleotide exchange factor for ADP ribosylation factor 1, is involved in the control of Golgi structure and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9926-31 (1998).
77. Ogasawara, M. et al. Similarities in function and gene structure of cytohesin-4 and cytohesin-1, guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors. *J Biol Chem* 275, 3221-30 (2000).

78. Fuss, B., Becker, T., Zinke, I. & Hoch, M. The cytohesin Steppke is essential for insulin signalling in *Drosophila*. *Nature* 444, 945 (2006).
79. Dixon, B., Mansour, M. & Pohajdak, B. Assignment of human B2-1 gene (D17S811E) to chromosome 17qter by PCR analysis of somatic cell hybrids and fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 63, 42-4 (1993).
80. Langille, S. E. et al. ADP-ribosylation factor 6 as a target of guanine nucleotide exchange factor GRP1. *J Biol Chem* 274, 27099-104 (1999).
81. Korthauer, U. et al. Anergic T lymphocytes selectively express an integrin regulatory protein of the cytohesin family. *J Immunol* 164, 308-18 (2000).
82. Tang, P. et al. Cybr, a cytokine-inducible protein that binds cytohesin-1 and regulates its activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2625-9 (2002).
83. Boehm, T. et al. Attenuation of cell adhesion in lymphocytes is regulated by CYTIP, a protein which mediates signal complex sequestration. *Embo J* 22, 1014-24 (2003).
84. Mansour, M., Lee, S. Y. & Pohajdak, B. The N-terminal coiled coil domain of the cytohesin/ARNO family of guanine nucleotide exchange factors interacts with the scaffolding protein CASP. *J Biol Chem* 277, 32302-9 (2002).
85. Venkateswarlu, K. Interaction protein for cytohesin exchange factors 1 (IPCEF1) binds cytohesin 2 and modifies its activity. *J Biol Chem* 278, 43460-9 (2003).
86. Vitale, N. et al. Specific functional interaction of human cytohesin-1 and ADP-ribosylation factor domain protein (ARD1). *J Biol Chem* 275, 21331-9 (2000).
87. Geiger, C. et al. Cytohesin-1 regulates beta-2 integrin-mediated adhesion through both ARF-GEF function and interaction with LFA-1. *Embo J* 19, 2525-36 (2000).
88. Weber, K. S. et al. Cytohesin-1 is a dynamic regulator of distinct LFA-1 functions in leukocyte arrest and transmigration triggered by chemokines. *Curr Biol* 11, 1969-74 (2001).
89. Hawadle, M. A., Folarin, N., Martin, R. & Jackson, T. R. Cytohesins and centaurins control subcellular trafficking of macromolecular signaling complexes: regulation by phosphoinositides and ADP-ribosylation factors. *Biol Res* 35, 247-65 (2002).
90. Mazerolles, F., Barbat, C., Trucy, M., Kolanus, W. & Fischer, A. Molecular events associated with CD4-mediated Down-regulation of LFA-1-dependent adhesion. *J Biol Chem* 277, 1276-83 (2002).
91. Frank, S. R., Hatfield, J. C. & Casanova, J. E. Remodeling of the actin cytoskeleton is coordinately regulated by protein kinase C and the ADP-ribosylation factor nucleotide exchange factor ARNO. *Mol Biol Cell* 9, 3133-46 (1998).
92. Mayer, G. et al. Controlling small guanine-nucleotide-exchange factor function through cytoplasmic RNA intramers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4961-5 (2001).
93. Peyroche, A., Paris, S. & Jackson, C. L. Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast Gea1 protein. *Nature* 384, 479-81 (1996).
94. Perez, O. D. et al. Leukocyte functional antigen 1 lowers T cell activation thresholds and signaling through cytohesin-1 and Jun-activating binding protein 1. *Nat Immunol* 4, 1083-92 (2003).
95. Theis, M. G. et al. Discriminatory aptamer reveals serum response element transcription regulated by cytohesin-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11221-6 (2004).
96. Beraud-Dufour, S. et al. A glutamic finger in the guanine nucleotide exchange factor ARNO displaces Mg²⁺ and the beta-phosphate to destabilize GDP on ARF1. *Embo J* 17, 3651-9 (1998).
97. Venkateswarlu, K., Oatey, P. B., Tavaré, J. M. & Cullen, P. J. Insulin-dependent translocation of ARNO to the plasma membrane of adipocytes requires phosphatidylinositol 3-kinase. *Curr Biol* 8, 463-6 (1998).

98. Li, H. S. et al. The guanine nucleotide exchange factor ARNO mediates the activation of ARF and phospholipase D by insulin. *BMC Cell Biol* 4, 13 (2003).
99. Giguere, P. et al. ARF6 activation by Galpha(q) signaling: Galpha(q) forms molecular complexes with ARNO and ARF6. *Cell Signal* (2006).
100. 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).
101. Hurtado-Lorenzo, A. et al. V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway. *Nat Cell Biol* 8, 124 (2006).
102. Poirier, M. B. et al. Grp1, A Novel Repressor Of Thyroid Hormone Receptor Action That Prevents Dna-Binding. *Mol Endocrinol* (2005).
103. Donaldson, J. G., Finazzi, D. & Klausner, R. D. Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature* 360, 350-2 (1992).
104. Stearns, T., Willingham, M. C., Botstein, D. & Kahn, R. A. ADP-ribosylation factor is functionally and physically associated with the Golgi complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1238-42 (1990).
105. Goldberg, J. Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell* 95, 237-48 (1998).
106. Peyroche, A. P., S; Robineau, S; Acker, J; Cherfiles, J; Jackson, CL. Brefeldin A acts to stabilize and abortize Arf-GDP-Sec7 domain complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol. Cell* 3, 275-285 (1999).
107. Mossessova, E. C., RA; Goldberg, J. Crystal structure of ARF1*Sec7 complexed with Brefeldin A and its implications for the guanine nucleotide exchange mechanism. *Cell* 12, 1403-1411 (2003).
108. Morinaga, N. M., J; Vaughan, M. Cloning and expression of a cDNA encoding a bovine brain brefeldin A-sensitive guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12926-12931 (1997).
109. Sata, M. M., J; Vaughan, M. Structural basis for the inhibitory effect of brefeldin A on guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1752-2757 (1999).
110. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. & Griffith, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 10, 413-7 (1992).
111. Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. & Williams, P. M. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6, 986-94 (1996).
112. Alwine, J. C., Kemp, D. J. & Stark, G. R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5350-4 (1977).
113. Murphy, D. Gene expression studies using microarrays: principles, problems, and prospects. *Adv Physiol Educ* 26, 256-70 (2002).
114. Jensen, O. N., Larsen, M. R. & Roepstorff, P. Mass spectrometric identification and microcharacterization of proteins from electrophoretic gels: strategies and applications. *Proteins Suppl* 2, 74-89 (1998).
115. Puig, O. et al. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24, 218-29 (2001).
116. Causier, B. Studying the interactome with the yeast two-hybrid system and mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 23, 350-67 (2004).
117. Causier, B. & Davies, B. Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. *Plant Mol Biol* 50, 855-70 (2002).

118. Caterina, M. J. et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288, 306-13 (2000).
119. Kieffer, B. L. Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends Pharmacol Sci* 20, 19-26 (1999).
120. Zambrowicz, B. P. et al. Disruption and sequence identification of 2,000 genes in mouse embryonic stem cells. *Nature* 392, 608-11 (1998).
121. Kittler, R. et al. An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature* 432, 1036-40 (2004).
122. Berns, K. et al. A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature* 428, 431-7 (2004).
123. Qureshi, A. et al. Gene silencing of HIV chemokine receptors using ribozymes and single-stranded antisense RNA. *Biochem J* 394, 511-8 (2006).
124. Kowalski, P., Surowiak, P. & Lage, H. Reversal of different drug-resistant phenotypes by an autocatalytic multitarget multiribozyme directed against the transcripts of the ABC transporters MDR1/P-gp, MRP2, and BCRP. *Mol Ther* 11, 508-22 (2005).
125. Citti, L. & Rainaldi, G. Synthetic hammerhead ribozymes as therapeutic tools to control disease genes. *Curr Gene Ther* 5, 11-24 (2005).
126. Faulhammer, D. & Famulok, M. Characterization and divalent metal-ion dependence of in vitro selected deoxyribozymes which cleave DNA/RNA chimeric oligonucleotides. *J Mol Biol* 269, 188-202 (1997).
127. Li, J. et al. DNazymes targeting the icl gene inhibit ICL expression and decrease *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages. *Oligonucleotides* 15, 215-22 (2005).
128. Kalota, A. et al. 2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinonucleic acid (2'F-ANA) modified oligonucleotides (ON) effect highly efficient, and persistent, gene silencing. *Nucleic Acids Res* 34, 451-61 (2006).
129. Aboul-Fadl, T. Antisense oligonucleotides: the state of the art. *Curr Med Chem* 12, 2193-214 (2005).
130. Robert, F. et al. Chlorolissoclimides: New inhibitors of eukaryotic protein synthesis. *Rna* (2006).
131. Legraverend, M. & Grierson, D. S. The purines: Potent and versatile small molecule inhibitors and modulators of key biological targets. *Bioorg Med Chem* (2006).
132. Hoogenboom, H. R. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* 23, 1105-16 (2005).
133. Famulok, M. & Verma, S. In vivo-applied functional RNAs as tools in proteomics and genomics research. *Trends Biotechnol* 20, 462-6 (2002).
134. Proske, D. et al. Prion-protein-specific aptamer reduces PrPSc formation. *Chembiochem* 3, 717-25 (2002).
135. Bedell, M. A., Jenkins, N. A. & Copeland, N. G. Mouse models of human disease. Part I: techniques and resources for genetic analysis in mice. *Genes Dev* 11, 1-10 (1997).
136. Bedell, M. A., Largaespada, D. A., Jenkins, N. A. & Copeland, N. G. Mouse models of human disease. Part II: recent progress and future directions. *Genes Dev* 11, 11-43 (1997).
137. Gordon, J. W. & Ruddle, F. H. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 214, 1244-6 (1981).
138. Hasty, P. A., A; Bradley, A. Gene targeting, principles and practice in mammalian cells. *Gene Targeting (2nd edition): A practical approach* (2000).
139. McTaggart, S. & Al-Rubeai, M. Retroviral vectors for human gene delivery. *Biotechnol Adv* 20, 1-31 (2002).

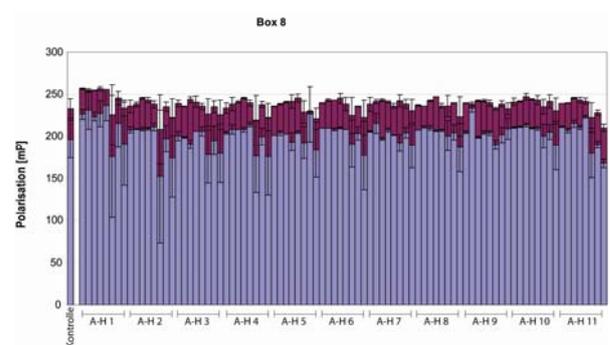
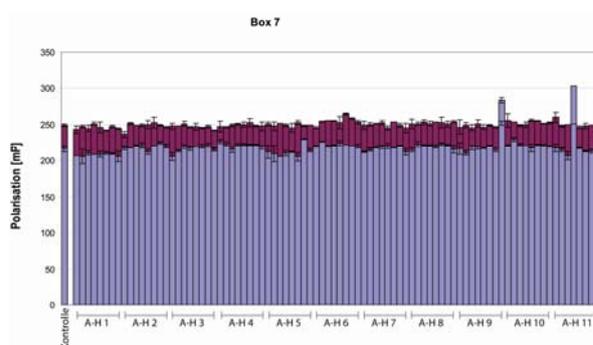
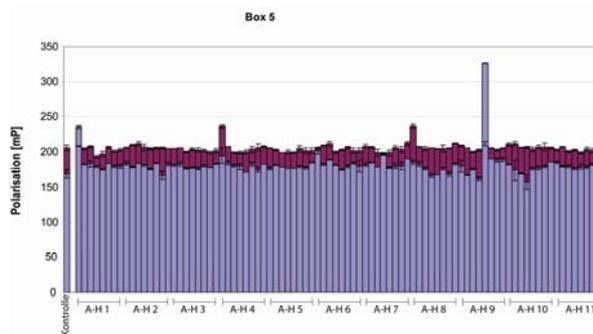
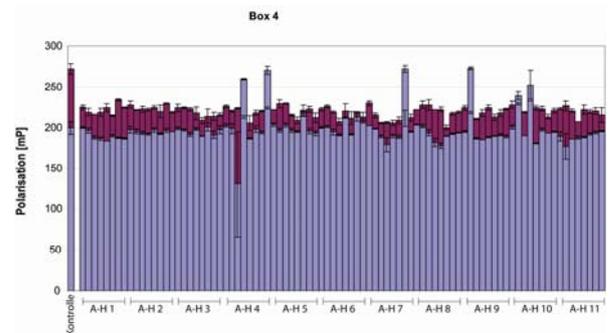
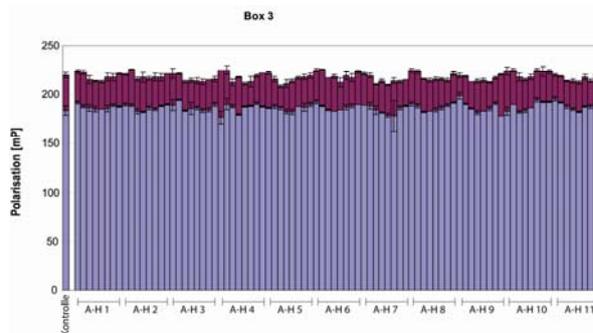
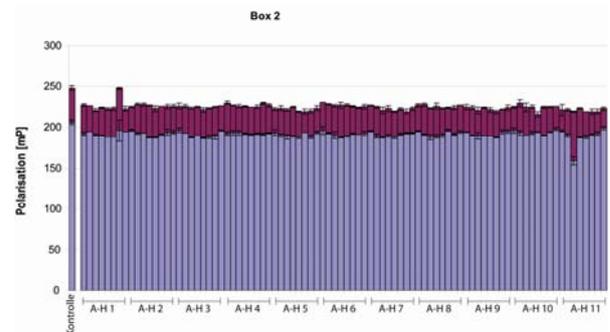
140. Galimi, F. & Verma, I. M. Opportunities for the use of lentiviral vectors in human gene therapy. *Curr Top Microbiol Immunol* 261, 245-54 (2002).
141. Crooke, S. T. Molecular mechanisms of antisense drugs: RNase H. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 8, 133-4 (1998).
142. Zamecnik, P. C. & Stephenson, M. L. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 280-4 (1978).
143. Stephenson, M. L. & Zamecnik, P. C. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 285-8 (1978).
144. Kruger, K. et al. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* 31, 147-57 (1982).
145. Buzayan, J. M., Hampel, A. & Bruening, G. Nucleotide sequence and newly formed phosphodiester bond of spontaneously ligated satellite tobacco ringspot virus RNA. *Nucleic Acids Res* 14, 9729-43 (1986).
146. Bramlage, B., Luzi, E. & Eckstein, F. HIV-1 LTR as a target for synthetic ribozyme-mediated inhibition of gene expression: site selection and inhibition in cell culture. *Nucleic Acids Res* 28, 4059-67 (2000).
147. Romano, N. & Macino, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol* 6, 3343-53 (1992).
148. Fire, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-11 (1998).
149. Tijsterman, M. & Plasterk, R. H. Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. *Cell* 117, 1-3 (2004).
150. Elbashir, S. M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-8 (2001).
151. der Maur, A. A. et al. Direct in vivo screening of intrabody libraries constructed on a highly stable single-chain framework. *J Biol Chem* 277, 45075-85 (2002).
152. Woodman, R., Yeh, J. T., Laurenson, S. & Ko Ferrigno, P. Design and validation of a neutral protein scaffold for the presentation of peptide aptamers. *J Mol Biol* 352, 1118-33 (2005).
153. Geyer, C. R., Colman-Lerner, A. & Brent, R. "Mutagenesis" by peptide aptamers identifies genetic network members and pathway connections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8567-72 (1999).
154. Famulok, M. & Mayer, G. Aptamers as tools in molecular biology and immunology. *Curr Top Microbiol Immunol* 243, 123-36 (1999).
155. Tuerk, C. & Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249, 505-10 (1990).
156. Ellington, A. D. & Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346, 818-22 (1990).
157. Seiwert, S. D., Stines Nahreini, T., Aigner, S., Ahn, N. G. & Uhlenbeck, O. C. RNA aptamers as pathway-specific MAP kinase inhibitors. *Chem Biol* 7, 833-43 (2000).
158. Theis, M. G. et al. Discriminatory aptamer reveals serum response element transcription regulated by cytohesin-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004).
159. Lee, S. W., Gallardo, H. F., Gaspar, O., Smith, C. & Gilboa, E. Inhibition of HIV-1 in CEM cells by a potent TAR decoy. *Gene Ther* 2, 377-84 (1995).
160. Symensma, T. L., Giver, L., Zapp, M., Takle, G. B. & Ellington, A. D. RNA aptamers selected to bind human immunodeficiency virus type 1 Rev in vitro are Rev responsive in vivo. *J Virol* 70, 179-87 (1996).

161. Lee, J. H. et al. A therapeutic aptamer inhibits angiogenesis by specifically targeting the heparin binding domain of VEGF165. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18902-7 (2005).
162. Ehrlich, P. Chemotherapeutics: Scientific principles, methods and results. *Lancet*, 445-451 (1913).
163. Travis, A. S. Science as receptor of technology: Paul Ehrlich and the synthetic dyestuffs industry. *Sci Context* 3, 383-408 (1989).
164. Schreiber, S. L. Chemical genetics resulting from a passion for synthetic organic chemistry. *Bioorg Med Chem* 6, 1127-1152 (1998).
165. McTavish, J. Aspirin in Germany: the pharmaceutical industry and the pharmaceutical profession. *Pharm Hist* 29, 103-115 (1987).
166. Kaufmann, G. P., PM. The discovery of saccharin: a centennial retrospect. *Ambix* 25, 191-207 (1978).
167. Schreiber, S. L. Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery. *Science* 287, 1964-9 (2000).
168. Young, S. S. & Ge, N. Design of diversity and focused combinatorial libraries in drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel* 7, 318-24 (2004).
169. Lipinski, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods* 44, 235-49 (2000).
170. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 46, 3-26 (2001).
171. Gao, Y., Dickerson, J. B., Guo, F., Zheng, J. & Zheng, Y. Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7618-23 (2004).
172. Norman, T. Genetic selection of peptide inhibitors of biological pathways. *Science* 285, 591-595 (1999).
173. Mayer, T. e. a. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* 286, 971-974 (1999).
174. Kino, T. e. a. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from streptomyces I. Fermentation, isolation and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot XL*, 1249-1255 (1987).
175. Hughes, T. e. a. Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell* 102, 109-126 (2000).
176. Powers, J. P. et al. Discovery and initial SAR of inhibitors of interleukin-1 receptor-associated kinase-4. *Bioorg Med Chem Lett* (2006).
177. Yarrow, J. C., Totsukawa, G., Charras, G. T. & Mitchison, T. J. Screening for cell migration inhibitors via automated microscopy reveals a Rho-kinase inhibitor. *Chem Biol* 12, 385-95 (2005).
178. Roehrl, M. H., Wang, J. Y. & Wagner, G. Discovery of small-molecule inhibitors of the NFAT--calcineurin interaction by competitive high-throughput fluorescence polarization screening. *Biochemistry* 43, 16067-75 (2004).
179. Kao, R. Y. et al. Characterization of SARS-CoV main protease and identification of biologically active small molecule inhibitors using a continuous fluorescence-based assay. *FEBS Lett* 576, 325-30 (2004).
180. Winn, M. et al. Discovery of novel p-arylthio cinnamides as antagonists of leukocyte function-associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 interaction. 4. Structure-activity relationship of substituents on the benzene ring of the cinnamide. *J Med Chem* 44, 4393-403 (2001).

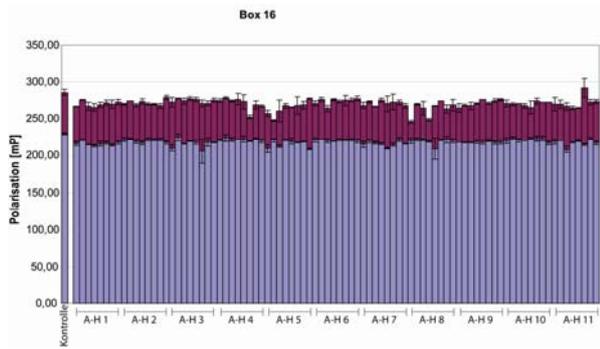
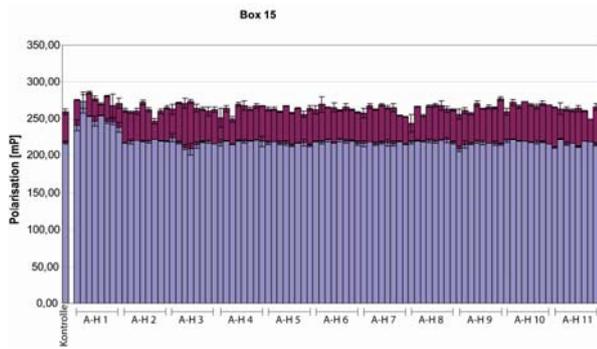
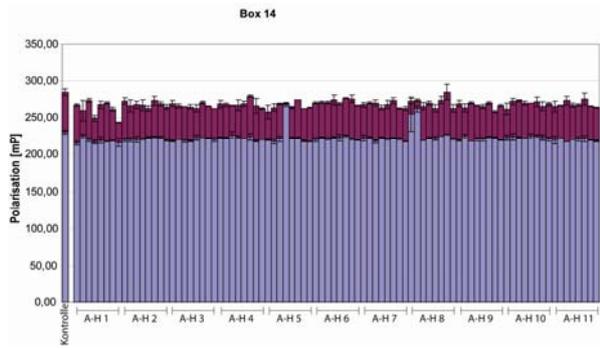
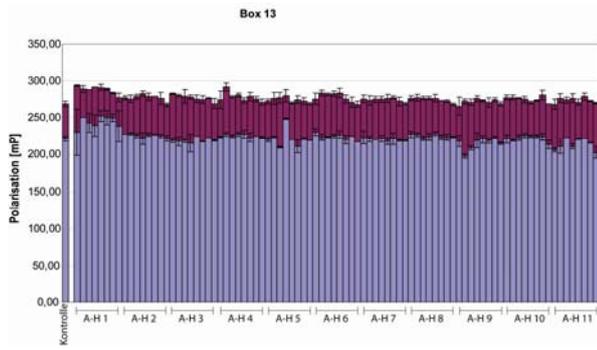
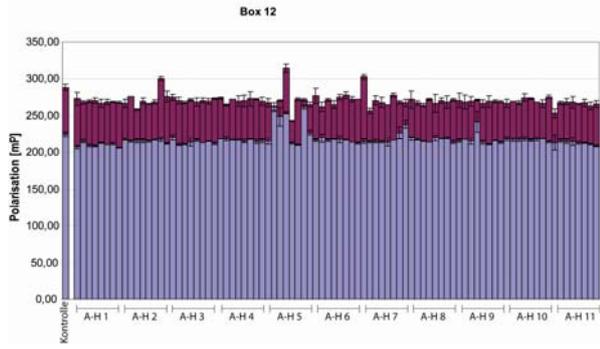
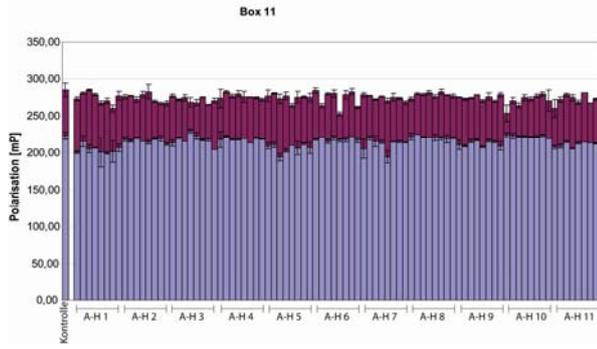
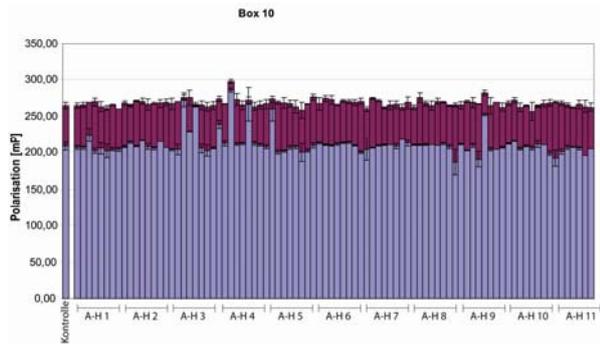
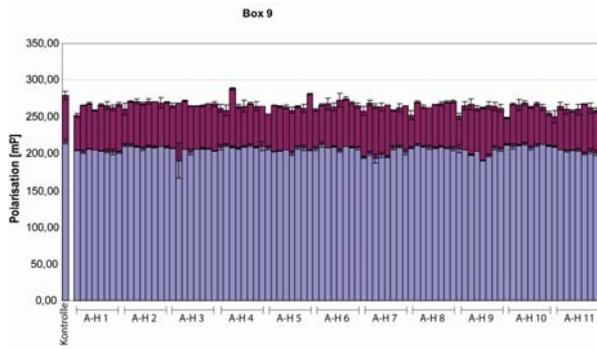
181. Sebolt, J. e. a. Blockade of the MAP kinase pathway supresses growth of colon tumors *in vivo*. *Nature Med* 5, 810-816 (1999).
182. Weigert, F. *Verh. d. D. Phys. Ges*, 100-102 (1920).
183. Perrin, F. Polarization de la lumiere de fluorescence: Vie moyenne de molecules dans l'etat excite. *J Phys Radium* 7, 390 (1926).
184. Owicki, J. C. Fluorescence polarization and anisotropy in high throughput screening: perspectives and primer. *J Biomol Screen* 5, 297-306 (2000).
185. Wu, P., Brasseur, M. & Schindler, U. A high-throughput STAT binding assay using fluorescence polarization. *Anal Biochem* 249, 29-36 (1997).
186. Knight, S. M., Umezawa, N., Lee, H. S., Gellman, S. H. & Kay, B. K. A fluorescence polarization assay for the identification of inhibitors of the p53-DM2 protein-protein interaction. *Anal Biochem* 300, 230-6 (2002).
187. Maurer, H. H. & Fritz, C. F. Toxicological detection of pholcodine and its metabolites in urine and hair using radio immunoassay, fluorescence polarisation immunoassay, enzyme immunoassay, and gas chromatography-mass spectrometry. *Int J Legal Med* 104, 43-6 (1990).
188. Rishi, V. et al. A high-throughput fluorescence-anisotropy screen that identifies small molecule inhibitors of the DNA binding of B-ZIP transcription factors. *Anal Biochem* 340, 259-71 (2005).
189. Jolley, M. Fluorescence polarization assays for the detection of proteases and their inhibitors. *J Biomol Screen* 1, 33 (1996).
190. Sengle, G. et al. Synthesis, incorporation efficiency, and stability of disulfide bridged functional groups at RNA 5'-ends. *Bioorg Med Chem* 8, 1317-29 (2000).
191. Pitulle, C., Kleinedam, R. G., Sproat, B. & Krupp, G. Initiator oligonucleotides for the combination of chemical and enzymatic RNA synthesis. *Gene* 112, 101-5 (1992).
192. Martin, C. T. & Coleman, J. E. T7 RNA polymerase does not interact with the 5'-phosphate of the initiating nucleotide. *Biochemistry* 28, 2760-2 (1989).
193. Hafner, M. et al. Inhibition of cytohesins by SecinH3 leads to hepatic insulin resistance. *Nature* 444, 941 (2006).
194. Lipinski, C. & Hopkins, A. Navigating chemical space for biology and medicine. *Nature* 432, 855-61 (2004).
195. Treisman, R. The serum response element. *Trends Biochem Sci* 17, 423-6 (1992).
196. Chai, J. & Tarnawski, A. S. Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *J Physiol Pharmacol* 53, 147-57 (2002).
197. Shimizu, Y. LFA-1: more than just T cell Velcro. *Nat Immunol* 4, 1052-4 (2003).
198. Li, H. S. et al. The Guanine Nucleotide Exchange Factor ARNO mediates the activation of ARF and phospholipase D by insulin. *BMC Cell Biol* 4, 13 (2003).
199. O'Brien R, M., Streeper, R. S., Ayala, J. E., Stadelmaier, B. T. & Hornbuckle, L. A. Insulin-regulated gene expression. *Biochem Soc Trans* 29, 552-8 (2001).
200. Kubota, N. et al. Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes* 49, 1880-9 (2000).
201. Withers, D. J. et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391, 900 (1998).
202. Nakae, J. et al. Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1. *Nat Genet* 32, 245-53 (2002).
203. Malecki, M. T. Genetics of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 68 Suppl1, S10-21 (2005).

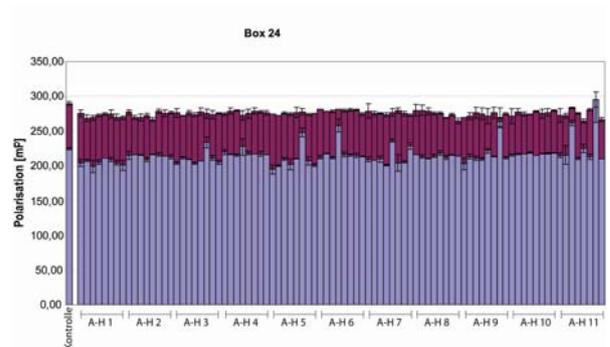
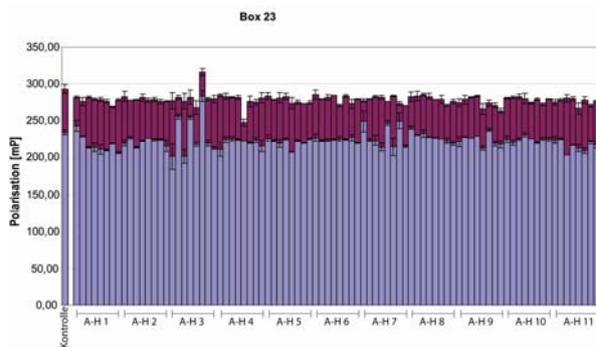
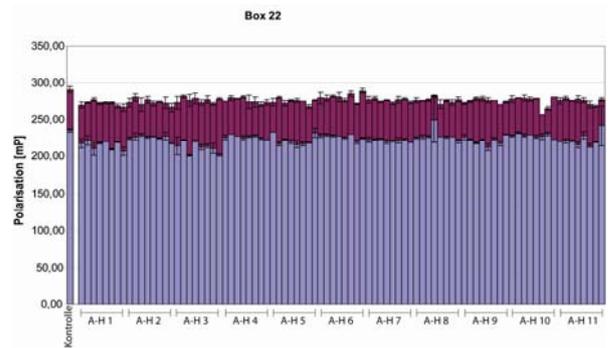
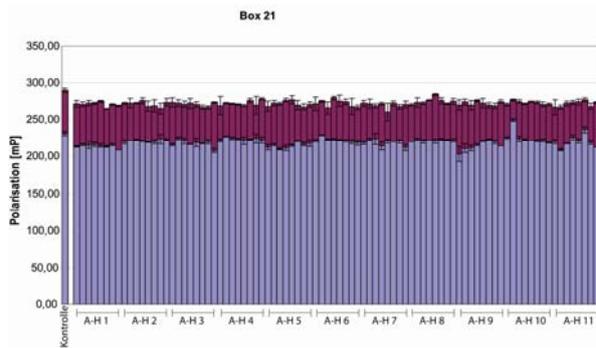
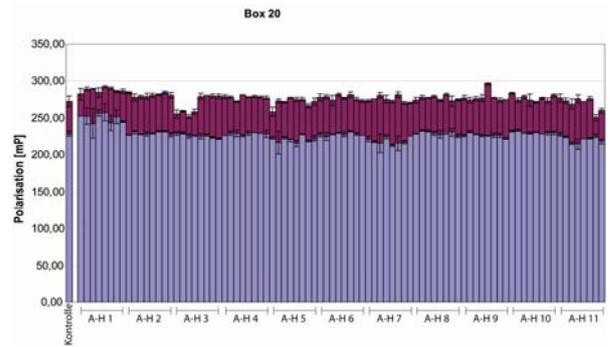
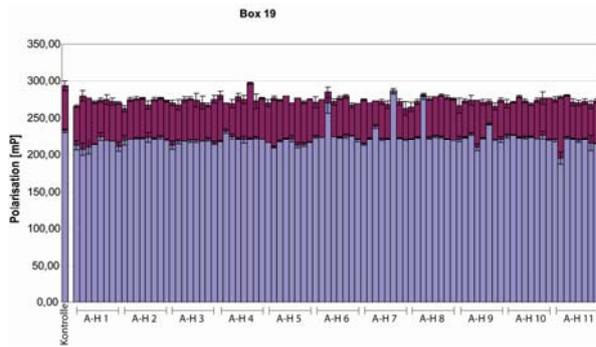
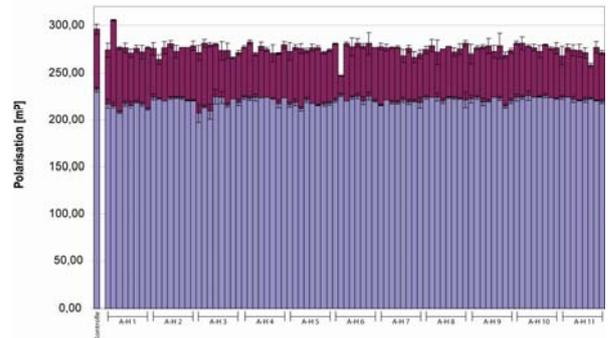
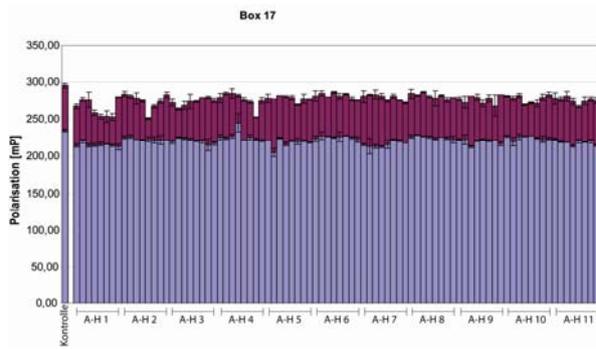
204. Knight, Z. A. et al. A Pharmacological Map of the PI3-K Family Defines a Role for p110alpha in Insulin Signaling. *Cell* 125, 733-47 (2006).
205. Klarlund, J. K. et al. Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains. *Science* 275, 1927-30 (1997).
206. Nagel, W. et al. Phosphoinositide 3-OH kinase activates the beta2 integrin adhesion pathway and induces membrane recruitment of cytohesin-1. *J Biol Chem* 273, 14853-61 (1998).
207. Nagel, W., Schilcher, P., Zeitlmann, L. & Kolanus, W. The PH domain and the polybasic c domain of cytohesin-1 cooperate specifically in plasma membrane association and cellular function. *Mol Biol Cell* 9, 1981-94 (1998).
208. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5 (1970).
209. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54 (1976).
210. Hochuli, E., Dobeli, H. & Schacher, A. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr* 411, 177-84 (1987).
211. J. Sambrook, E. F. F., T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 ed. (1989).
212. Sambrook, J. & Russell, D. W. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001).
213. Saiki, R. K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-4 (1985).
214. Saiki, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91 (1988).
215. Mullis, K. B. & Faloona, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-50 (1987).
216. Macia, E., Chabre, M. & Franco, M. Specificities for the small G proteins ARF1 and ARF6 of the guanine nucleotide exchange factors ARNO and EFA6. *J Biol Chem* 276, 24925-30 (2001).
217. Kahn, R. A. & Gilman, A. G. The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein. *J Biol Chem* 261, 7906-11 (1986).
218. 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* 272, 25951-8 (1997).
219. Moser, B. et al. Expression of transcripts for two interleukin 8 receptors in human phagocytes, lymphocytes and melanoma cells. *Biochem J* 294 (Pt 1), 285-92 (1993).
220. Tyndall, R. L., Jacobson, K. B. & Teeter, E. Characterization of HeLa cell and viral ribonucleic acid by oligonucleotide analysis. *Biochim Biophys Acta* 108, 11-7 (1965).
221. Knowles, B. B., Howe, C. C. & Aden, D. P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209, 497-9 (1980).

8 Anhang - Ergebnisse des Screens

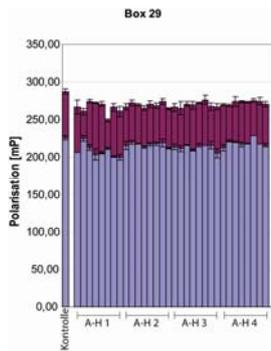
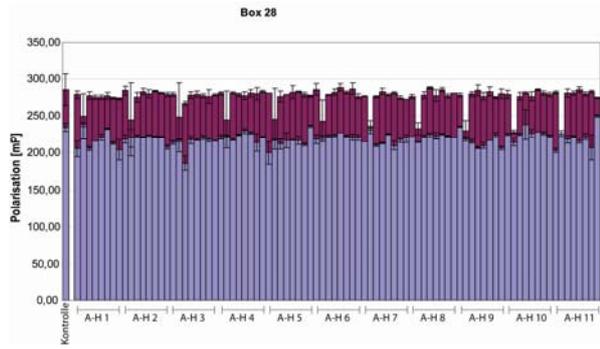
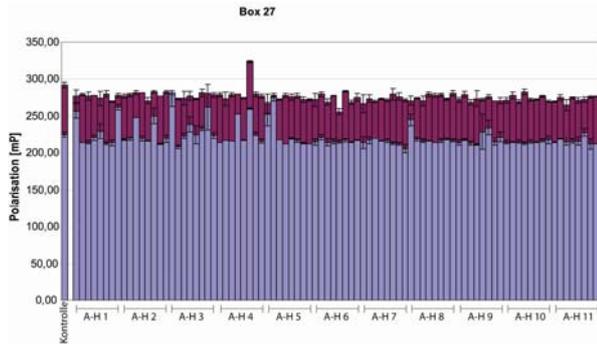
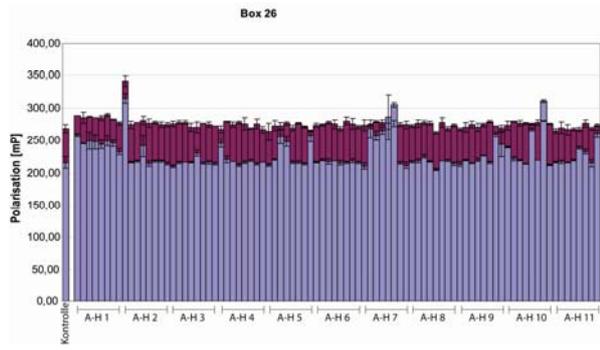
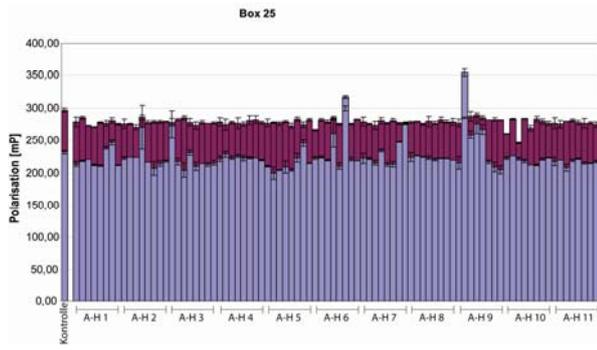


Anhang - Ergebnisse des Screens





Anhang - Ergebnisse des Screens



9 Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Michael Famulok für die Möglichkeit unter seiner Anleitung diese Doktorarbeit anzufertigen und für den Enthusiasmus, die Energie und den langen Atem bei der Betreuung dieses Projekts.

Ich möchte Prof. Dr. Waldemar Kolanus danken für die Möglichkeit Geräte in seinem Labor zu nutzen, für die langen und fruchtbaren Diskussionen, die dieses Projekt in die richtige Richtung gelenkt haben, sowie für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Prof. Dr. Jörn Piel und Priv.-Doz. Dr. Thomas Kolter danke ich dafür, daß sie sich freundlicherweise als Koreferenten zur Verfügung gestellt haben.

Besonderer Dank gilt meinem Laborkollegen aus der Zellkultur, Dr. Toni Schmitz, für seine Geduld und die Freundlichkeit mit der er mir zellbiologisches Arbeiten beigebracht hat und seine stets nüchterne und objektive Kritik meiner Ergebnisse. Ohne ihn wäre das Projekt nicht annähernd so weit gediehen. Nicht zuletzt hat er meinen Horizont durch unsere diversen Diskussionen nach dem Überfliegen der Tagesschau-Website sehr erweitert.

Meinen Laborkollegen Andrea, Martin, Goran, Elena, den beiden Stefans und allen Mitgliedern des AK Famulok danke ich für ihre Hilfsbereitschaft im Labor und die angenehme Atmosphäre in der Mittagspause sowie im Kaffeeraum.

Den Mitgliedern des AK Kolanus danke ich für einen sehr spaßigen 11.11. sowie für das lange Asyl während der Lüftungsarbeiten in unserem Labor und die freundliche Hilfe beim FACSen und beim Mikroskopieren.

Meine guten Freunden Matthias, Katharina, Frederick, Sabrina, Sebastian, Bianca, Ulli, Petra, Sandra, Jana, Frank und Imke haben mir die lange Zeit meines Studiums und der Promotion durch unzählige schöne Abende versüßt und mir damit immer wieder neue Energie für den Kampf am nächsten Morgen gegeben (ich hoffe ich habe niemanden vergessen, bzw. derjenige bekommt diese Arbeit nicht in die Hand).

Beata Magdalena hat mir die Zeit des Zusammenschreibens unvergeßlich gemacht.

Mein größter und innigster Dank gilt meiner geliebten Familie, die mich mein ganzes Leben voller Liebe begleitet hat und ohne deren Wärme und bedingungslose Unterstützung ich nie in der Lage gewesen wäre diese Arbeit anzufertigen.