

Modulierung der Guaninnukleotid Austauschfaktoren Tiam1 und Vav1 durch RNA-Aptamere

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr.rer.nat)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen
Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von Dipl.-Chem. Björn Niebel
aus Sebnitz

Bonn 2011

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Famulok
2. Gutachter: Prof. Dr. Günter Mayer

Tag der Mündlichen Prüfung: 10.11.2011
Erscheinungsjahr: 2011

Teile dieser Arbeit wurden vorab veröffentlicht:

Niebel B., Lentz C., Pofahl M., Mayer G., Hoerauf A., Pfarr K.M., Famulok M. (2010). ADLOC: an aptamer-displacement assay based on luminescent oxygen channeling. *Chemistry*. **16**(36):11100-7.

Niebel B., Weiche B., Mueller A.L., Li D.Y., Karnowski N., Famulok M. (2011). A luminescent oxygen channeling biosensor that measures small GTPase activation. *Chem Commun (Camb)*. **47**(26):7521-23.

Folgenden Personen gebührt mein persönlicher Dank:

Prof. Dr. Michael Famulok

Ihm möchte ich für das Vertrauen in meine Arbeit, die gewährte Freiheit beim Forschen, die hervorragende Ausstattung des Forschungslabors und der sehr guten wissenschaftlichen Betreuung danken.

Prof. Dr. Günter Mayer

Ein großer Dank für die Beantwortung jeglicher SELEX-Fragen, dem Interesse an meiner Arbeit und der Begutachtung der Doktorarbeit.

Prof. Dr. Jörn Piel und Prof. Dr. Gerd Bendas

Für die Bereitschaft die vorliegende Arbeit zu begutachten. Der Arbeitsgruppe von Prof. Bendas danke ich überdies für die freundliche Einweisung in die Benutzung des Fluorimeters.

PD Dr. Anton Schmitz

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit und vieler wertvoller Tips.

Dr. Aymelt Itzen

Vielen Dank für die praktische und theoretische Hilfe bei Fragestellungen rund um die Kinetik von Guaninnukleotid-Austauschprozessen und der freundlichen Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

Volker Böhnert, Julia Haseleu, Finnja Glaue, Steven Kessels, Christopher Jacobs, Lukas Schwach, Nora Karnowski, Mohamed Hussein, Christine Wosnitza und Michael Hons

Ob Praktikant oder Diplomand, ich hoffe ihr habt etwas bei mir gelernt! Vielen Dank für eure tatkräftige Mitarbeit.

Dr. Sven Jan Freudenthal

Für seine Hilfe bei organisatorischen Fragen aller Art.

Volkmar Fieberg

Neben zahlreichen Plasmidpräparationen und Klonierungen als Auftragsarbeiten von FKS habe ich sehr viel über das Leben der Westerwälder gelernt - Jean-Pierre Valance möchte ich exemplarisch nennen.

Jan, Falk, Ben, Mo

Für die außerordentlich fruchtbaren wissenschaftlichen Diskussionen, der entspannten Büro-Atmosphäre und dem nie enden wollenden Nachschub an bunter Gelatine.

Jeff

Special thanks go to Jeff Hannam for not only showing me the Yorshire Dales and John Yeadons Place but for countless entertaining lunchings, motivating coffee breaks, scientific advices and for providing me with small molecules.

dem gesamten AK

Für die vielen gemeinsam verbrachten Stunden.

Meinen Eltern und Verwandten

Für die fortwährende Unterstützung und das Vertrauen in mich.

Wiebke, Leni, Gretchen, Lilly, Miss Money Penny

Für eure Liebe.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	xi
Tabellenverzeichnis	xv
Abkürzungsverzeichnis	xvii
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Chemische Biologie und Chemische Genetik	3
2.2 Aptamere als Werkzeuge der Chemischen Biologie	4
2.3 Rho GTPasen	9
2.4 Der Rho-GEF Tiam1	13
2.5 Der Rho-GEF Vav1	16
3 Ziele der vorliegenden Arbeit	21
4 Ergebnisse	23
4.1 Tiam1	23
4.1.1 Expression und Aufreinigung der Tiam1-Konstrukte	23
4.1.2 Expression und Aufreinigung von Rac1/Rac2	25
4.1.3 Tiam1 _{1033–1406} als Zielstruktur der <i>in vitro</i> Selektion	25
4.1.4 SELEX-Bibliothek	26
4.1.5 Das Selektionsschema	26
4.1.6 Charakterisierung der gefundenen Sequenzen	29
4.1.7 Sekundärstrukturvorhersage	32
4.1.8 K91	32

4.1.9	K91 Minimalmotiv	34
4.1.10	Einfluss der Aptamere K11, K91 und K103 auf den Tiam1-beschleunigten Nukleotidaustausch	37
4.1.11	Zusammenfassung Tiam1 _{1033–1406} Aptamere	39
4.1.12	Aptamer-Verdrängungsassays	41
4.1.13	Luminescence Oxygen Channeling als Basis für einen Aptamer-Verdrängungsassay (ADLOC)	42
4.1.14	Etablierung ADLOC	42
4.1.15	Durchführung ADLOC im Hochdurchsatz	46
4.1.16	Screening-Ergebnis	47
4.1.17	Eliminierung von Falsch-Positiven	48
4.1.18	Tiam1-beschleunigter Guaninnukleotid-Austausch zur Validierung der Hitsubstanzen	50
4.1.19	Struktur-Wirkungs-Beziehungen der identifizierten Hits	54
4.2	Vav1	57
4.2.1	Vav1 als Zielprotein einer <i>in vitro</i> Selektion	57
4.2.2	Expression und Aufreinigung der Vav1-Konstrukte	57
4.2.3	SELEX-Bibliothek	59
4.2.4	Das Selektionsschema	59
4.2.5	Charakterisierung der Monoklone	60
4.2.6	Vergleich der Aptamere und <i>in silico</i> Sekundärstrukturberechnung	61
4.2.7	Charakterisierung der Monoklone im Nukleotid-Austauschassay	64
4.2.8	Charakterisierung der Aptamere im Phosphorylierungsassay	66
4.2.9	Charakterisierung der Aptamere im LOC-basierten Phosphorylierungsassay	68
4.2.10	Zusammenfassung Vav1-Aptamere	70
4.3	GTPase-Aktivierungssensor	72
4.3.1	Einleitung	72
4.3.2	Aufbau des Assays	72
4.3.3	Etablierung des Rac1 Sensors	73

5 Diskussion	77
5.1 Tiam _{1033–1406} -spezifische Aptamere: <i>in vitro</i> Selektion und Charakterisierung	77
5.2 K91 als Werkzeug zur Identifikation chemischer Sonden	85
5.3 Vav1-spezifische Aptamere: <i>in vitro</i> Selektion und Charakterisierung . .	91
5.4 GTPase-Aktivierungssensor	102
6 Ausblick	103
7 Material und Methoden	105
7.1 Material	106
7.1.1 Geräte	106
7.1.2 Verbrauchsmaterialien	107
7.1.3 Chemikalien	107
7.1.4 Standards und Kits	109
7.1.5 Enzyme	110
7.1.6 Nukleotide	110
7.1.7 Synthetische Oligodesoxynukleotide	110
7.1.8 Plasmide	111
7.1.9 Bakterien und Zelllinien	112
7.1.10 Antikörper	113
7.2 Analytische Methoden	113
7.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	113
7.2.2 Coomassie-Färbung (Brilliant Blau G 250)	114
7.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	114
7.2.4 Photometrische Bestimmung nach Lambert-Beer	114
7.2.5 Photometrische Bestimmung nach Bradford	115
7.2.6 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	115
7.2.7 Immunologische Detektion von Proteinen (Western Blot)	116
7.2.8 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	116
7.2.9 Gelfiltration durch MicroSpin G-25	117
7.2.10 Phenol-Chloroform Extraktion	118
7.2.11 Präzipitation von Nukleinsäuren	118
7.2.12 Agarose-Gelelektrophorese	118

INHALTSVERZEICHNIS

7.2.13	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	119
7.2.14	Sequenzierung von DNA	120
7.2.15	Sequenzierung von Monoklonen der Selektionen	121
7.2.16	Test auf RNasen	121
7.2.17	Dot-Blot	121
7.2.18	HABA Kompetitionsassay	121
7.2.19	Untersuchung der Sekundärstruktur von RNA	122
7.2.20	Filterbindung	122
7.3	Manipulation von Nukleinsäuren	123
7.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	123
7.3.2	<i>In vitro</i> Transkription	125
7.3.3	Herstellung 5'-markierter RNA über GMPS-Transkription	125
7.3.4	Herstellung von 5'-Biotin- und 5'-Fluorescein-markierter RNA	126
7.3.5	Reverse Transkription und PCR in einem Ansatz	127
7.3.6	5'-Dephosphorylierung von Nukleinsäuren	128
7.3.7	5'-Phosphorylierung von Nukleinsäuren	128
7.3.8	Ligation von doppelsträngiger DNA	128
7.4	Biochemische Methoden	129
7.4.1	Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i>	129
7.4.2	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	129
7.4.3	Aufschluss mittels French Press	129
7.4.4	Affinitätschromatographie	130
7.4.5	Ionenaustauschchromatographie	131
7.4.6	Präparative Gelfiltration	132
7.4.7	Entsalzung	132
7.4.8	Präparativer Nukleotidaustausch an Rho-GTPasen	132
7.5	SELEX	133
7.5.1	Eine kurze Einführung	133
7.5.2	Biotinylierung	136
7.5.3	Herstellung der Selektionsmatrix	137
7.5.4	Selektionsverlauf	138
7.6	Substanzbibliothek	140
7.6.1	Organisation der Substanzbibliothek	140

7.6.2	z'-Wert Bestimmung	140
7.6.3	Screening	140
7.7	Allgemeiner Umgang mit Bakterienkulturen	142
7.7.1	Plattenkultur	142
7.7.2	Flüssigkultur	142
7.7.3	Anlegen von Dauerkulturen	142
7.7.4	Bestimmung der Bakterienkonzentration in Flüssigkulturen . . .	143
7.7.5	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien	143
7.8	Allgemeiner Umgang mit eukaryontischen Zelllinien	143
7.8.1	Arbeiten mit eukaryontischen Zellen	143
7.8.2	Bestimmung der Zell-Vitalität	144
7.8.3	Transfektion von eukaryontischen Expressionsvektoren	144
7.8.4	Gesamtproteinextrakt aus Zellen (Zelllysate)	144
7.8.5	<i>in vitro</i> GTP γ S Beladung von Zelllysate	144
7.8.6	<i>Pull-down</i> von Rac1-GTP	145
7.9	Biophysikalische Methoden	145
7.9.1	<i>Luminescent Oxygen Channeling</i>	145
7.9.2	Luminescent Oxygen Channeling als Basis eines Aptamer- Verdrängungsassays	146
7.9.3	<i>Luminescent Oxygen Channeling</i> als Basis eines Phosphorylierungs- assays	147
7.9.4	<i>Luminescent Oxygen Channeling</i> als Basis eines GTPase-Aktivierungs- sensors	149
7.9.5	Kinetische Untersuchung des Nukleotid-Austauschs an Rac1- /Rac2	150
8	Anhang	153
8.1	Primersequenzen der verkürzten K91-Konstrukte	153
8.2	Proteinsequenzen	154
8.3	Vektorkarten	159
8.4	Abkürzungen für Nukleobasen und Aminosäuren	163
Literatur		165

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis

2.1	Vorwärts-und rückwärts gerichteter Ansatz in der Chemischen Genetik	5
2.2	SELEX-Schaubild	7
2.3	GTPase Zyklus	10
2.4	Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts durch Rho-GTPasen	11
2.5	Tiam1 – ein Multidomänen Protein	14
2.6	Tiam1 als Vermittler von <i>upstream</i> -Signalen	15
2.7	Vav1 – ein Multidomänen Protein	17
2.8	NFAT-Aktivierung in T-Zellen durch Vav1	19
4.1	SDS-PAGE-Analyse der Aufreinigung von Tiam1 _{1033–1406}	24
4.2	Übersicht der verwendeten Tiam1-Konstrukte	26
4.3	Nukleinsäurebibliothek B50	26
4.4	Das Selektionsschema für Tiam1 _{1033–1406}	27
4.5	Filterbindungsexperiment der angereicherten Nukleinsäurebibliothek	29
4.6	Übersicht der monoklonalen Sequenzen	30
4.7	Filterbindungsexperiment K11, K91 und K103	31
4.8	Sequenzvergleich K11, K91 und K103	31
4.9	<i>in silico</i> Sekundärstrukturvorhersage für K11, K91 und K103	33
4.10	Spezifitätsmessung von K91	34
4.11	Einfluss von K91 auf Tiam1/Rac1-Komplexformation	35
4.12	Übersicht der <i>in silico</i> berechneten Faltungen des Aptamers K91	36
4.13	Tiam1-beschleunigter Nukleotidaustausch an Rac2*mGDP in Anwesenheit von K11, K91 und K103	38
4.14	Tiam1-beschleunigte Assoziation von mantGDP an Rac2*GDP in Anwesenheit von K11, K91 und K103	40

4.15	ADLOC-Crosstitration von K91 und Tiam1	44
4.16	ADLOC-Optimierung mit BSA, Tween 20, Heparin und DMSO	45
4.17	Exemplarische 384well-Platte des ADLOC Hochdurchsatzscreening	47
4.18	Identifizierung von LOC-spezifischen Falsch-Positiven	48
4.19	Einfluss von RNasen auf LOC-Signal	50
4.20	Tiam1-beschleunigte Assoziation von mantGDP/BodipyGDP an Rac2	51
4.21	Einfluss von Tween 20 auf die Nukleotid-Assoziation	51
4.22	IC ₅₀ -Bestimmung der beiden Hits cg2:4-B3 und cg4:7-E2	53
4.23	Kompetitive Filterbindung K91/Tiam1 mit cg2:4-B3 und cg4:7-E2	53
4.24	Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Hitsubstanz cg2:4-B3	55
4.25	Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Hitsubstanz cg4:7-E2	56
4.26	Übersicht der verwendeten Vav1-Konstrukte	58
4.27	Filterbindungsanalyse der Vav1-Selektionen	60
4.28	Übersicht aller sequenzierten Monoklone der Vav1-Selektionen	62
4.29	Filterbindungsanalysen der affinsten Monoklone der Vav1-Selektionen	63
4.30	K _D -Wert-Bestimmung der Vav1-Aptamere	63
4.31	<i>in silico</i> Sekundärstrukturvorhersage der Aptamere V17, V21, V22 und 11	65
4.32	Vav1-beschleunigter Nukleotid-Austausch an Rac1*mGDP in Anwesenheit von Vav1-Aptameren	66
4.33	<i>in vitro</i> Phosphorylierung von Vav1 in Anwesenheit der Aptamere 11, V17, V21 und V22	67
4.34	LOC-basierter Phosphorylierungsassay	68
4.35	Vav1-Aptamere im LOC-basierten Phosphorylierungsassay	69
4.36	Einfluss des Aptamers V21 auf die Phosphorylierung von Vav1 _{134–564} (Y142F, Y160F, Y174F)-Mutanten	70
4.37	LOC-basierter GTPase-Aktivierungssensor	73
4.38	Optimierung des GTPase-Aktivierungssensors	74
4.39	Bestimmung des Quantifizierungslimits von Rac1*GTPγS	75
4.40	Bestimmung des Quantifizierungslimits von Rac1*GTPγS im Zelllysat	75
5.1	Konsensusmotiv von K11, K91 und K103	79
5.2	Minimalmotivsuche K91	82

5.3	Identifizierte Hitverbindungen des Tiam1 Screenings	90
5.4	Sequenzvergleich von Tiam1 DH/PAZ Domäne	92
5.5	Die Vav1 DH-Domäne im autoinhibierten Zustand	95
5.6	Intramolekulare Inhibition der GEF-Aktivität von Vav1	98
7.1	Mathematische Beschreibung des SELEX-Prozesses	135
7.2	Schema Luminescence Oxygen Channeling Experiment	148

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Tabellenverzeichnis

4.1	Selektionsbedingungen Tiam1 _{1033–1406}	28
4.2	Vav1 Selektionsbedingungen	59
5.1	k_{obs} -Werte der Dissoziationsexperimente	84
5.2	k_{obs} -Werte der Assoziationsexperimente	84
7.7	Synthetische Oligonukleotide	110
7.8	Übersicht der verwendeten Plasmide.	112
7.9	Bakterienstämme.	112
7.10	Verwendete Antikörper	113
7.11	Bestandteile der verwendeten SDS-PAGE-Gele	114
7.12	Extinktionskoeffizienten der Nukleotide in $L M^{-1}cm^{-1}$	120
7.13	Standard PCR-Protokoll	124
7.15	Standard-Transkription (TK)	125
7.16	GMPS-Transkription	126
7.17	5'-Markierungsreaktion	126
7.18	RT-PCR Ansatz	127
7.20	Streptavidin-Dynabeads Bindungskapazitäten	137
7.21	Kopplung des Selektionstargets an Streptavidin-Dynabeads	138
7.22	3-Schritt Screening Protokoll für Bibliothek cg1-4, KR, Endkonzentration Substanzen: 10 μM	141
7.23	4-Schritt Screening Protokoll für Bibliothek cg5-6, Endkonzentration Substanzen: 30 μM	141
7.24	Aptamer-Verdrängungsassay Pipettierschritte	146
7.25	LOC-Phosphorylierungsassay Pipettierschritte	149

TABELLENVERZEICHNIS

7.26 GTPase-Aktivierungssensor Pipettierschritte 150

Abkürzungsverzeichnis

Å ²	1·10 ⁻²⁰ m ²
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
°C	Grad Celsius
aa	Aminosäure
ADLOC	Aptamer-Verdrängungsassay basierend auf <i>luminescence oxygen channeling</i>
APS	Ammoniumpersulfat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMS	Dimethylsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GST	Glutathion-S-Transferase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
h	Stunde
HEK	Menschliche embryonale Nierenzellen

TABELLENVERZEICHNIS

IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
K_M	Michaelis-Menten Konstante
L	Liter
LB	Luria-Bertani
LOC	<i>Luminescence oxygen channeling</i>
M	Molar
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney Epithelzellen
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
nm	Nanomolar
nt	Nukleotid(e)
PSL	photostimulated luminescence, absolut gemessene Radioaktivität
rpm	rounds per minute bzw. Umdrehungen pro Minute
RFU	relative Fluoreszenz
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription gekoppelte PCR
s	Sekunde
S7	Sec7 Domäne
SCBT	Santa Cruz Biotechnology
SELEX	<i>Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment</i>
ss	single stranden, einzelsträngig
Tiam1	<i>T-lymphoma invasive and metastasis inducing protein 1</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin
TEV	<i>Tobacco Etch Virus NIa Protease</i>
Tyr142Phe	Vav1, Tyrosin an Position 142 mit Phenylalanin ausgetauscht
Tyr160Phe	Vav1, Tyrosin an Position 160 mit Phenylalanin ausgetauscht

Tyr174Phe	Vav1, Tyrosin an Position 174 mit Phenylalanin ausgetauscht
U/min	Umdrehungen pro Minute
üN	über Nacht
wt	Wildtyp eines Proteins

TABELLENVERZEICHNIS

1

Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war eine *in vitro* Selektion von spezifisch bindenden RNA-Aptameren gegen die Dbl-homologe Domäne der Rho-GEFs Tiam1 und Vav1. Da beide Proteine aufgrund ihres modularen Aufbaus und ihrer GEF-Aktivität zentrale Rollen als Adaptorprotein bzw. Kommunikationsmodul einnehmen, sind sie als Zielproteine für Aptamere außerordentlich gut geeignet. Einhergehend mit der spezifischen Bindung sollten die selektierten Aptamere die Guaninnukleotid-Austauschaktivität der beiden Austauschfaktoren blockieren. Im Rahmen eines chemisch biologischen Ansatzes ist abschließend der Frage nachgegangen worden, ob sich selektierte Aptamere als Werkzeuge zur Identifikation von Tiam1/Vav1-spezifischen chemischen Inhibitoren eignen.

Für Tiam1 gelang die Anreicherung von Aptameren mit einer Affinität im mittleren nanomolaren Bereich, dabei zeigte sich das affinste Aptamer K91 als selektiv bindend—die homologe Vav1-DH-Domäne wurde hierbei nicht erkannt. Durch kinetische Untersuchungen des Guaninnukleotid-Austauschs an der GTPase Rac2 ist überdies die Inhibition der GEF-Aktivität von Tiam1 durch die Aptamere K11 und K91 bewiesen worden. Im weiteren Verlauf der Arbeit konnte ein Aptamer-Verdrängungsassay basierend auf *luminescence oxygen channeling* etabliert werden. Ein Hochdurchsatzscreening mit der Arbeitskreis eigenen Substanzbibliothek führte zur Identifizierung von zwei Grundstrukturen, die den Tiam1-vermittelten Nucleotidaustausch an Rac2 mit einer IC_{50} kleiner als $100 \mu M$ inhibieren. Durch den Vergleich der Hitstrukturen mit chemisch-ähnlichen Verbindungen der Substanzbibliothek konnten erste Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet werden.

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die *in vitro* Selektion gegen die autoinhibierte sowie konstitutiv aktive DH-Domäne von Vav1 führte zur Anreicherung von Aptamersequenzen mit einer mittleren nanomolaren Affinität. Wiederum durch kinetische Messungen sind alle selektierten und spezifisch-bindenden Aptamere im Vav1-vermittelten Nukleotidaustausch an Rac1 charakterisiert worden. Im Kontrast zu Tiam1 war keine Sequenz in der Lage die GEF-Aktivität von Vav1 zu inhibieren. Jedoch gelang der Nachweis, dass die beiden selektierten Aptamere V21 und V22 die Src-Kinase vermittelte Phosphorylierung des katalytisch wichtigen Tyr174 erhöhen. Da die Phosphorylierung von Tyr174 mit der Aktivierung der DH-Domäne von Vav1 einhergeht, sind die selektierten Aptamere indirekt an einer Modulierung der GEF-Aktivität beteiligt.

Der letzte Teil der Arbeit beschreibt die Entwicklung eines GTPase-Aktivierungssensors, der sich durch einen homogenen, sensitiven und robusten Aufbau auszeichnet. Ebenfalls basierend auf *luminescence oxygen channeling* erlaubt dieser die Detektion von kleinsten Mengen aktiver Rho-GTPase Rac1 im Zelllysate. Ferner deuten Vorversuche mit anderen kleinen GTPasen daraufhin, dass sich der Sensor universell einsetzen lässt.

2

Einleitung

2.1 Chemische Biologie und Chemische Genetik

Die Chemische Biologie kann als eine interdisziplinäre Wissenschaft verstanden werden, die sich aus mehreren wissenschaftlichen Teilgebieten wie der Biochemie, Pharmakologie, Bioorganischen Chemie, Zellbiologie u.a. während der letzten Jahre und Jahrzehnte entwickelt hat. Das Verständnis der Chemischen Biologie liegt in der Manipulation von biologischen Systemen durch chemische Ansätze. Durch die rasante Entwicklung neuartiger Methoden, die ungeahnte Möglichkeiten eröffnen, um komplexe biologische Prozesse zu verstehen, hat sich die Chemische Biologie als ein eigenständiger Wissenschaftszweig etabliert. Herausragende neu entwickelte Methoden sind z.B. MudPIT (*Multidimensional Protein Identification Technology*¹), eine HPLC-gekoppelte Massenspektrometrie-Anwendung, die eine bis dato nicht da gewesene Präzision und Schnelligkeit bei der Analyse eines gesamten Proteoms erlaubt. Neben der reinen quantitativen Analytik wurde durch das *activity-based protein profiling* (AB-PP) der Weg zur gleichzeitigen Untersuchung verwandter Enzyme eines Proteoms geebnet.² Etwa zur gleichen Zeit ist das Konzept der bioorthogonalen Reaktion entwickelt worden, das eine außerordentliche Selektivität bei der chemischen Markierung von Biomolekülen innerhalb eines zellulären Umfeldes ermöglicht.³ Besonders die so genannte *Click*-Reaktion hat sich in diesem Zusammenhang unentbehrlich gemacht.⁴ Inspiriert vom Splicing der Inteine entwickelte Stephen Kent die chemische Methode der *Native chemical ligation*.⁵ Einen weiteren Meilenstein im Bereich der Chemischen Biologie setzte 2001 das Labor von Peter Schultz mit der Erweiterung des

genetischen Codes in *E.coli*.⁶ Die Chemische Genetik, ein Teilgebiet der Chemischen Biologie, befasst sich mit der Aufklärung und Manipulation von biologischen Signalwegen und Interaktionen durch den Einsatz von chemischen Sonden (*small molecules*). Durch spezifische und hoch affine *small molecules* können Zielproteine im zellulären Umfeld studiert werden und im Gegensatz zu Manipulationen auf der DNA/RNA-Ebene (*knock out*/RNAi) lassen sich spezifisch Proteindomänen adressieren.⁷ Weitergehend eröffnen chemische Sonden einen komplementären Weg zum *knock out* Ansatz, um ein bestimmtes Genprodukt zu untersuchen, da sich aufgrund von Redundanzen bzw. Adaptorfunktionen des Zielproteins unterschiedliche Phänotypen ergeben können.⁸ Eine der größten Hürden innerhalb der Chemischen Genetik stellt die Bereitstellung der *small molecules* dar. Im Wesentlichen lassen sich zwei unterschiedliche Herangehensweisen zur Identifikation von spezifisch bindenden niedermolekularen Substanzen beschreiben (siehe Abb. 2.1): Der vorwärtsgerichtete Ansatz basiert auf einer Hypothese, die meist im Rahmen eines Zellkultur-basierten Hochdurchsatzscreenings durch die Identifikation einer Substanz, die einen bestimmten Phänotyp hervorruft, bewiesen werden soll. Erst im weiteren Verlauf wird die genaue Identität der Zielstruktur/Zielprotein bestimmt. Der rückwärtsgerichtete Ansatz nimmt ein Zielprotein zum Anlass, um unter Hochdurchsatzbedingungen nach Verbindungen zu suchen, die eine spezifische Bindung zeigen. Erst danach wird der Phänotyp bestimmt.⁹ Für den rückwärts gerichteten Ansatz ergeben sich einige Voraussetzungen, die essentiell für den Erfolg sind. Das Zielprotein muss in ausreichender Menge bereitstehen, d.h. es sollte möglichst in löslicher Form heterolog exprimierbar sein. Die Aktivität nach der Aufreinigung ist sicherzustellen, ferner muss ein Hochdurchsatzkompatibler Aktivitätstest bereitstehen. Besonders ein ausreichend robuster Assay, der sich für Hochdurchsatzanwendungen eignet, ist aber oftmals nicht vorhanden.

2.2 Aptamere als Werkzeuge der Chemischen Biologie

Aptamere sind kurze einzelsträngige Nukleinsäureliganden (ssRNA oder ssDNA), die spezifisch und mit einer hohen Affinität eine Vielzahl von molekularen Zielstrukturen erkennen.¹¹ Die Methode der *in vitro* Selektion wurde 1990 zeitgleich von drei unabhängigen Forschergruppen beschrieben.^{12,13,14} Das Selektionsverfahren taucht seitdem unter dem Akronym SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential*

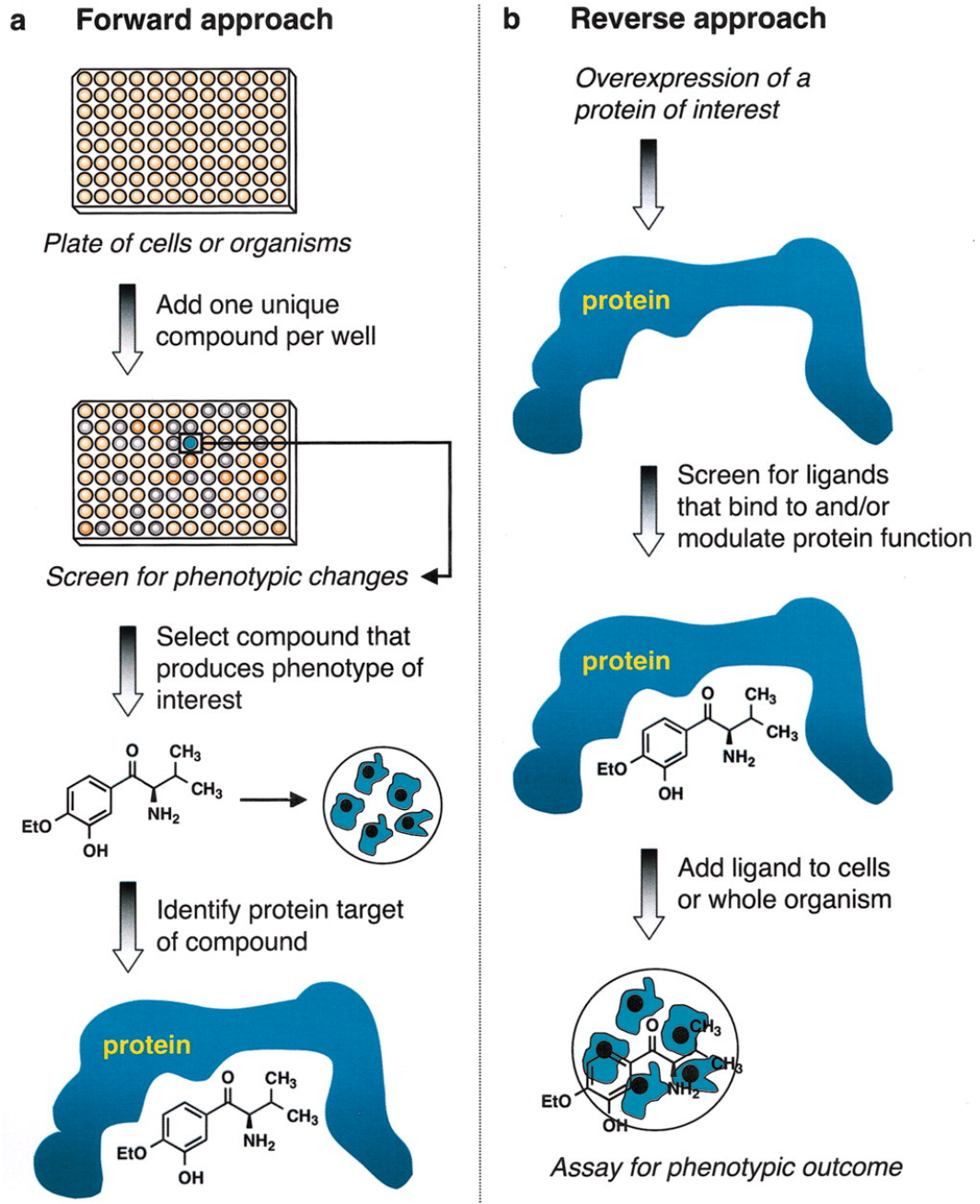


Abbildung 2.1: (a) Der vorwärtsgerichtete Ansatz durchsucht eine Substanzbibliothek nach Verbindungen, die bestimmte phänotypische Veränderungen hervorrufen und identifiziert am Ende die Zielstruktur. (b) Der rückwärtsgerichtete Ansatz setzt die Überexpression eines Zielproteins voraus, für das in einer Substanzbibliothek nach Verbindungen gesucht wird, die die Aktivität modulieren. Zum Schluss wird durch Anwendung der gefundenen Verbindung der entsprechende Phänotyp studiert.¹⁰

2. EINLEITUNG

enrichment) im wissenschaftlichen Sprachgebrauch auf. Die am Ende des SELEX-Experiments gefundenen hoch affinen Liganden werden Aptamere genannt.

Den zentralen Bestandteil der *in vitro* Selektion nimmt die kombinatorisch synthetisierte dsDNA Nukleinsäurebibliothek (20-200 bp) ein, die bis zu 10^{15} verschiedene Sequenzen beinhaltet und somit einen riesigen Sequenz- und Strukturpool abdeckt, da jede einzelne Nukleinsäuresequenz eine definierte dreidimensionale Faltung aufweist.¹¹ Durch flankierende konstante Regionen lässt sich die randomisierte Region der Bibliothek enzymatisch amplifizieren und bei einer ssRNA Selektion transkribieren. Im Selektionsschritt werden Bibliothek und Zielstruktur (Protein, Peptid, Farbstoff, Cofaktor, Zellsubpopulation¹⁵) zusammen inkubiert. Nach der Abtrennung nicht bindender Sequenzen werden die Binder amplifiziert und für einen nächsten Selektionszyklus vorbereitet (siehe Abb. 2.2). Dieser Prozess wiederholt sich 6-20 mal, bis abschließend eine Sequenzierung der verbliebenen Sequenzen durchgeführt wird. Die sich anschließende Charakterisierung der Aptamersequenzen offenbart die Vorteile dieser Ligandenklasse: Aptamere binden sehr häufig ihre Zielstrukturen im unteren nanomolaren Bereich. Damit haben sie eine ähnliche Affinität wie monoklonale Antikörper zu ihren Antigenen.¹⁴ Des Weiteren kann ihre Bindung sehr spezifisch sein.^{16,17} Interessanterweise zeigen viele Aptamere, die gegen Proteine selektiert wurden, einen inhibierenden Einfluss auf deren Aktivität,¹¹ wobei die Proteinoberfläche, die ein Aptamer adressiert zwischen 500 und 1000 Å² liegt, also im Bereich einer Antikörper F_o-Wechselwirkung angesiedelt ist.¹¹ Die Bindung an ihre Zielstrukturen ist gekennzeichnet durch einen adaptiven Charakter, der von π - π -Wechselwirkungen zwischen den Nukleobasen und planaren Einheiten (z.B. Guanidinium-Funktionen) geprägt ist.¹⁸ Aptamere haben sich besonders im letzten Jahrzehnt als Werkzeuge der Chemischen Biologie einen Namen machen können, nicht zuletzt durch ihre relativ einfache Zugänglichkeit und breite Anwendbarkeit. Neben *in vitro* Anwendungen wie Nukleinsäure-basierter Sensoren für niedermolekulare Substanzen¹⁹ oder neuartiger Nukleinsäuren mit katalytischen Aktivitäten (*Aptazyme*),²⁰ sind Aptamere ebenfalls für die Untersuchung von zellulären Ereignissen geeignet. Auch wenn die Selektion *in vitro* stattfindet, behalten doch viele Aptamere ihre Aktivität in der Zelle bei^{21,22} und machen die Untersuchung des Zielproteins intrazellulär möglich. Die Anwendung von Aptameren kann ebenfalls auf dem mRNA-Level stattfinden:

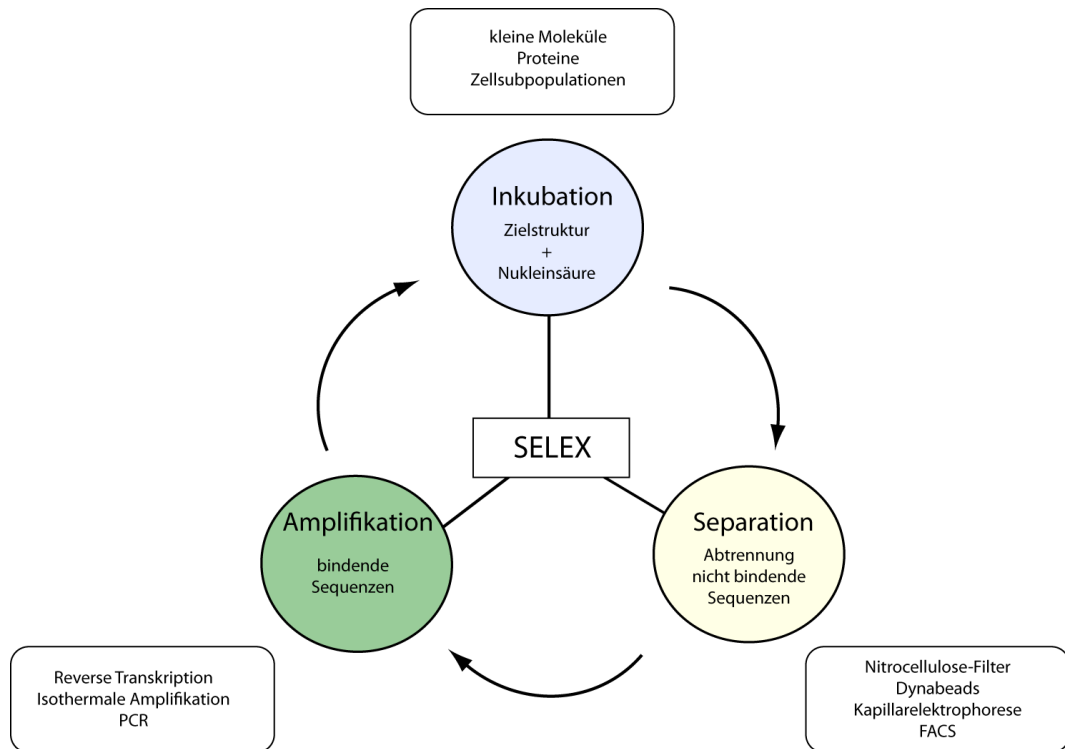


Abbildung 2.2: Das SELEX-Verfahren besteht im Wesentlichen aus 3 Schritten: Die Inkubation der Zielstruktur mit der Nukleinsäurebibliothek eröffnet jeden Zyklus. *In vitro* Selektionen sind für eine Vielzahl von Zielstrukturen beschrieben worden. Der zweite Schritt entscheidet oft über Erfolg oder Misserfolg, da die effektive Trennung von bindenden und nicht bindenden Sequenzen entscheidend ist. Auch hier sind eine Vielzahl an Methoden publiziert worden, um Sequenzen zu separieren. Der SELEX-Zyklus wird immer durch den Amplifikationsschritt beendet, wobei bei einer Selektion mit ssRNA typischerweise ein zusätzlicher RT-PCR Amplifikationsschritt einer PCR vorausgeht. Nach der Amplifikation der gebundenen Sequenzen kann eine erneute Inkubation mit der Zielstruktur erfolgen. Zwischen 6 und 20 mal wird der Selektionszyklus durchlaufen, bevor eine Klonierung und Sequenzierung der Gewinnersequenzen durchgeführt wird.

2. EINLEITUNG

analog zu Riboswitches in Bakterien können Aptamersequenzen innerhalb der 5'-UTR der mRNA inseriert werden. Die Translation der mRNA ist danach durch die Zugabe des Aptamer-Liganden (zellpermeable Verbindung) steuerbar.²³ Den Sprung zum Arzneistoff hat bis jetzt nur das RNA-Aptamer NX1838 (vermarktet unter dem Namen Macugen) geschafft. Es ist ein Angiogenese Inhibitor, das als Antagonist die *vascular endothelial growth factor* (VEGF)-Isoform VEGF₁₆₅ erkennt und bei der nassen Form der altersbedingten Maculadegeneration eingesetzt wird.²⁴ Eine Vielzahl von weiteren Aptameren wird derzeit in klinischen Phasen innerhalb der USA getestet.²⁵ Während der letzten Jahre konnte eine wichtige Brücke zwischen Aptamertechnologie und der Identifikation von *small molecules* geschlagen werden. Ein großer Vorteil von niedermolekularen Substanzen ist ihre unkomplizierte Anwendbarkeit und quasi unbegrenzte Bereitstellung durch chemische Synthesen. Die Struktur und Sequenz eines spezifischen Aptamers beinhaltet immer Informationen über die Zielstruktur. Durch das Auslesen dieses „Täterwissens“ lassen sich spezifische *small molecules* für das Zielepitop des Aptamers identifizieren. Der Umweg über das Aptamer zur niedermolekularen Verbindung erscheint im ersten Moment unsinnig, jedoch ergeben sich bei einer genaueren Betrachtung einige Vorteile. Eine Voraussetzung für den rückwärts gerichteten Ansatz zur Identifikation einer niedermolekularen Verbindung ist ein stabiler Hochdurchsatz-kompatibler Assay. Dies ist bei langsamen Kinetiken oder instabilen Reaktionspartnern oft ein großes Problem. Des Weiteren können auf der Grundlage von funktionalen Assays nur Hitverbindungen gefunden werden, die die ausgelesene Aktivität um einen bestimmte Wert beeinflussen (Hit-Schwelle). Existieren jedoch alternative Zielepitope für Hitverbindungen, die sich durch eine affine Bindung aber geringere Inhibition/Aktivierung auszeichnen, so werden diese sehr wahrscheinlich nicht gefunden.²⁶ Mit der Selektion von funktionalen Aptameren für kinetisch langsame Zielproteine können die aufgeführten Problematiken umgangen werden. Zum einen ist kein funktionaler Assay für das Hochdurchsatzverfahren notwendig, da das Aptamer im Vorfeld auf Inhibition/Aktivierung des Zielproteins getestet wird und zum anderen lassen sich alle Verbindungen identifizieren, die das Aptamer vom Zielprotein verdrängen. Aufgrund der relativ großen Interaktionsfläche des Aptamers von 500 - 1000 Å²¹¹ kann im Prinzip eine vielfach größere Aktivitätsoberfläche des Proteins durch die Screeningsubstanzen „abgetastet“ werden. Dies kann besonders bei Protein-Protein-Interaktionen, die oft als *undruggable* gelten, von

Vorteil sein.²⁷ Zusätzlich lassen sich etablierte Aptamer-Verdrängungsassays zeitnah auf andere Aptamer/Protein-Paare anpassen, sodass ein zeitaufwändiges Optimieren für jedes neue Screeningprojekt entfallen kann. Das erste Beispiel eines Aptamer-Verdrängungsassays wurde von Hartig *et. al* beschrieben.²⁸ Ein an das Hammerhead-Ribozym fusioniertes Aptamer kann dabei Zielprotein-abhängig das Ribozym ein- oder ausschalten. Durch den Austausch der Aptamerdomäne lässt sich das System modular für eine Vielzahl von Aptamer-Protein-Systemen nutzen. Ein Aptamer-Verdrängungsassay, der auf Fluoreszenz-Polarisation basiert, stellte die Basis für die Entdeckung des Cytohesin-Inhibitors SecinH3 dar.^{29,30} Des Weiteren konnte durch die Immobilisierung des Zielproteins und nachfolgender Inkubation und Detektion des Aptamers mit dem Nukleinsäurefarbstoff Ribogreen ein weiterer Assay entwickelt werden.¹⁵ Ein auf *luminescence oxygen channeling*-basierter Aptamer-Verdrängungsassay (ADLOC) kann ebenfalls weitgehend universell eingesetzt werden.³¹ Die Entwicklung dieses Assays ist Teil der vorliegenden Arbeit.

2.3 Rho GTPasen

Kleine GTPasen mit einem mittleren Molekulargewicht von 20 kDa gehören zur Gruppe der GTP-bindenden Proteine (G-Proteine). Sie sind in der Lage Guanosintriphosphat zu binden und es zu Guanosindiphosphat zu hydrolysieren. Dabei existieren sie in zwei stabilen Konformationen: der aktiven GTP-gebundenen Form, die über die *switch*-Regionen Effektorenproteine bindet und aktiviert, sowie der inaktiven GDP-gebundenen Konformation. Ihre Aktivität unterliegt einer strengen Regulation: durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) wird die intrinsische Hydrolyseaktivität beschleunigt und es kommt zur Spaltung von GTP zu GDP. Daraufhin findet eine Konformationsänderung statt, die das G-Protein in einen unproduktiven Zustand versetzt. GDP-Dissoziations-Inhibitoren (GDIs) lösen die GTPase von der Membran und verharren mit ihr im Zytosol bis GDI-Dissoziationsfaktoren (GDFs) eine erneute Membranrekrutierung ermöglichen.³² Die Beladung der GDP-gebundenen Form wird durch die Interaktion mit Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) beschleunigt (siehe Abb. 2.3).

Die Familie der Rho (Ras homolog)-GTPasen ist eine Subfamilie der aus über 50 Vertretern bestehenden Ras Superfamilie. Neben der Rho-Familie existieren noch

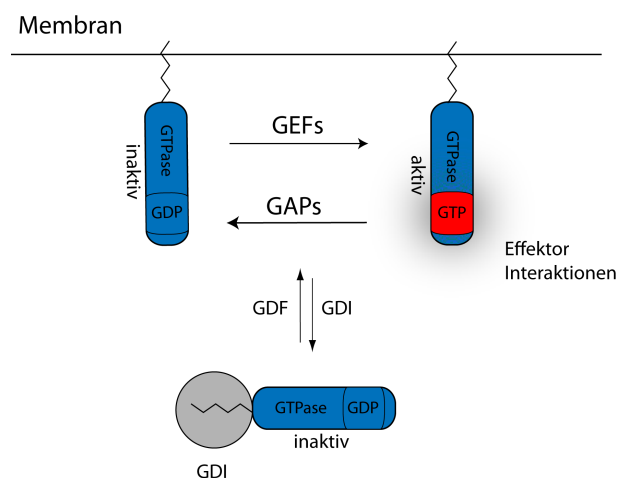


Abbildung 2.3: Rho-GTPasen werden durch Fettsäure-Anker in der Zellmembran immobilisiert. Durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) wird die intrinsische GTPase-Aktivität erhöht, Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) beschleunigen den Austausch von GDP zu GTP. Die temporäre Translokation ins Zytoplasma erfolgt durch GDP-Dissoziations-Inhibitoren (GDIs) bzw. wieder zurück an die Membran durch GDI-Dissoziationsfaktoren (GDFs).

die Ras, Arf, Ran und Rab Subfamilien.³³ Rac, Rho und Cdc42 als Vertreter der Rho-GTPasen sind wichtige Schalterproteine beim Zellwachstum, der Morphologie, der Zellbeweglichkeit und der Organisation des Zytoskeletts. Des Weiteren nehmen sie Einfluss auf Transformation und Metastasierung.³⁴

Eine Vielzahl von Effektorproteinen bindet Rac, Rho und Cdc42 in ihrer aktiven Konformation und vermittelt dabei Effekte auf das Aktin-Zytoskelett. Serin/Threonin Kinasen, darunter die Rho-Kinase ROCK α (RhoA-binding kinase α) haben hierbei besonderes Interesse geweckt, da durch die GTPase Bindung ihre Aktivität erhöht wird.^{35,36} Die aktivierte Rho-Kinase kann die Myosin-Binde-Untereinheit der leichten Kette von Myosin (MLC) phosphorylieren,³⁷ was zu einer Interaktion von Myosin mit Aktin-Filamenten und schlussendlich zur Bildung von Stressfasern führt.³⁸ Rac und Cdc42 haben einige gemeinsame Effektoren, die für die Regulation des Aktin-Zytoskeletts von Bedeutung sind. Die Interaktion der Serin/Threonin Kinase Pak1 mit Cdc42-GTP und Rac-GTP führt zur Erhöhung der Beweglichkeit von Fibroblasten.³⁹ WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) dient als Protein-Hub für Rac und Cdc42, um den Arp2/3 (Aktin verwandtes Protein 2/3)-Komplex zu binden, der sich

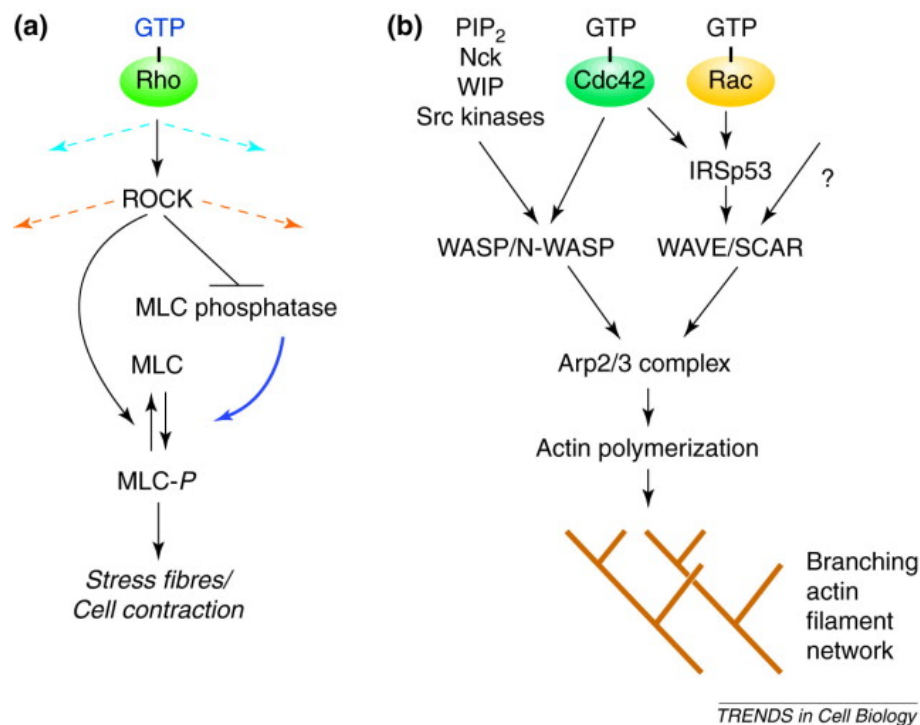


Abbildung 2.4: (a) Rho-GTP interagiert mit dem Effektor ROCK (*Rho-associated protein kinase*) der daraufhin die leichte Kette von Myosin phosphoryliert und eine Interaktion zu Aktin-Filamenten aufbaut, die zum Aufbau von Stressfasern führen. (b) Cdc42-GTP bzw. Rac-GTP sind in der Lage direkt oder über IRSp53 mit WAVE zu interagieren und über die p21 Untereinheit des Arp2/3-Komplexes Änderungen des Aktin-Zytoskeletts auszulösen. Ebenfalls führt die direkte Interaktionen von Cdc42-GTP mit WASP/N-WASP zur Bindung an die p21 Untereinheit des Arp2/3-Komplexes und damit zu Zytoskelettänderungen.³⁷

zur Nukleation von Aktin in Lamellipodien befindet.⁴⁰ Die Aktivierung von N-WASP durch Cdc42 rekrutiert den Arp2/3-Komplex zur vorderen Migrationsfront, wo es zur Formation von Filopodien kommt (siehe Abb. 2.4).⁴⁰

Rho-GTPasen sind häufig Ziele von bakteriellen Toxinen, die einen aktivierenden oder inaktivierenden Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett des Wirts haben.⁴¹ *Cytotoxic necrotizing factor 1* (CNF1) aus *E.coli* aktiviert RhoA, Cdc42 und Rac.⁴² Das Toxin erhöht in kultivierten Zellen die Anzahl an Stressfasern und fokalen Kontakten. *Clostridium botulinum exoenzyme* (C3) inhibiert Rho durch ADP-Ribosylierung,⁴³ wohinge-

2. EINLEITUNG

gen *Clostridium* Toxine A und B durch Glycosylierung der Rho-GTPasen zur Inhibition führen.⁴⁴ Des Weiteren vermag das bakterielle Protein *Vibrio parahaemolyticus type III secreted effector* (VopS) durch Adenylierung Rho-GTPasen zu blockieren.⁴⁵ Ein sehr interessanter Mechanismus kann bei dem Salmonellen Toxin SopE beobachtet werden, das die *Switch* II und I Regionen bindet und dabei einen Nukleotidaustausch erzwingt. Sehr überraschend zeigt die Struktur frappierende Übereinstimmungen mit dem Tiam1/Rac1-Komplex.⁴⁶

Unerwartet sind in menschlichen Tumorgeweben in Kontrast zu Ras-Isoformen kaum mutierte Rho-GTPasen identifiziert worden, wohl aber konnten erhöhte Expressionslevel nachgewiesen werden.⁴⁷ Eine der wenigen Rho-GTPasen, die in einigen Tumoren Mutation aufweist, ist Rac1.⁴⁸ Eine alternative Splice-Variante Rac1b, die nicht mehr in der Lage ist an RhoGDI-Proteine zu binden, wurde in Darmkrebs-Geweben gefunden.⁴⁹ Rac-Proteine können in vielfältiger Weise Einfluss auf die Proliferation von Krebszellen nehmen. Sie regulieren z.B. den Zellzyklus durch Stimulation der Expression von Cyclin D1⁵⁰ und sind in der Lage *adherens junctions* abzubauen, um das Migrationspotential zu erhöhen. Im Gegensatz steigern sie aber die Ausbildung von epithelialen Zell-Zell-Kontakten. Der Effekt auf die maligne Transformation ist Zellart-spezifisch.⁵¹ Es lässt sich zusammenfassen, dass Rho-GTPasen in vielen Bereichen der Krebs-Entwicklung eine Rolle spielen, nicht nur bei der Migration und Invasion, sondern ebenfalls durch die Veränderung der Zellteilung, der Gentranskription,⁵² der Interaktion von Krebszellen mit dem umliegenden Stromagewebe und auf intrazelluläre Transportvorgänge.⁴⁷ Durch die vielfältigen, scheinbar gegensätzlichen Effekte, ist die Beurteilung des Einflusses von einzelnen Rho-GTPasen auf die Tumorentstehung und Progression ausgesprochen schwierig. Jedoch wird ihre Aktivität räumlich und zeitlich sehr präzise von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) und GTPase-aktivierenden Proteine (GAPs) reguliert. Es ist somit davon auszugehen, dass durch eine Manipulation dieser Kontrollproteine ein wesentlich genauerer Eingriff auf Rho-Signalwege möglich ist.

Ungeachtet dessen existieren zwei spezifische niedermolekulare Rac-Inhibitoren, der erste konnte *in silico* identifiziert werden.⁵³ Die Verbindung NSC23766 interagiert mit dem katalytisch wichtigen Trp56-Rest von Rac und blockiert mit einer IC₅₀ von circa 50 μ M den Tiam1 und Trio-vermittelten Guaninnukleotid-Austausch. Eine weitere

Substanz EHT1864 bindet alle Rac-Isoformen und führt zu einer Verdrängung des Nuklotids aus der Bindetasche der GTPase.⁵⁴

2.4 Der Rho-GEF Tiam1

Tiam1, ein für die Rho-GTPase Rac spezifischer Guaninnukleotid-Austauschfaktor der Dbl-Familie, wurde 1994 im Arbeitskreis von John Collard während *in vitro* Invasionsstudien in T-Zell Lymphomen entdeckt.^{55,56} Das Akronym Tiam1 steht für *T-lymphoma invasive and metastasis inducing protein 1*. Tiam1 ist ein Multidomänen-Protein: Der N-Terminus liegt myristyliert vor,⁵⁷ zwei PEST-Domänen und die N-terminale PH-Domäne folgen. Eine *coiled-coil* Region, die Ras-Bindedomäne,⁵⁸ eine PDZ-Domäne und C-terminal die für GEFs der Dbl-Familie charakteristische DHPH-Tandemdomäne schließen sich an. Eine N-terminale Trunkierung (N δ 352 bzw. C1199) erhöht die *in vitro* Aktivität und die *in vivo* Plasmamembran-Assoziation, analog zu anderen Vertretern (Vav,⁵⁹ proto-Dbl⁶⁰) der Dbl-Familie. Dies ist teilweise auf die erhöhte Stabilität zurückzuführen, da die PEST-Domänen zu einer beschleunigten Proteolyse führen (siehe Abb. 2.5).⁶¹

Die Membranlokalisation von Tiam1 wird durch die N-terminale PH-Domäne (PHn) mit der benachbarten *coiled-coil*-Region vermittelt. Tiam1 ist neben Ras-GRF1/2 der einzige Dbl-GEF, der eine zweite PH-Domäne neben der DHPH-Tandem-Konstruktion besitzt. Eine PHc-Mutante mit unveränderter GEF-Aktivität aber stark verringerter PI(3)P-Affinität zeigte eine unveränderte Membranlokalisation, war aber nicht mehr in der Lage Rac *in vivo* zu aktivieren.⁶² Ebenfalls ist die Rac-Aktivierung von der Tiam1-Membranrekrutierung abhängig, da bei einer Inhibition der PI3-Kinase in MDCK-Zellen keine Rac-Aktivierung mehr stattfinden kann.⁵¹ Das Rac-induzierte *membrane ruffling* sowie die Aktivierung des JNK-Signalweges ist in inaktiven PHn-Mutanten stark eingeschränkt.⁵⁷ Durch eine Mutation innerhalb der PHn-Domäne kommt es zur Hyperaktivität von Tiam1.⁶³ Die Regulation der GEF-Aktivität wird über Phosphorylierungen an Threonin-Resten durch die Ca²⁺ / Calmodulin-abhängige Kinase II gesteuert.⁶⁴ Des Weiteren spielen poly-phosphorylierte Inositollipide eine entscheidende Rolle bei der GEF-vermittelten Aktivierung von Rho-GTPasen.^{65,66,67} Dadurch dass die Mitglieder der Dbl-Familie gewebespezifisch exprimiert werden,

2. EINLEITUNG

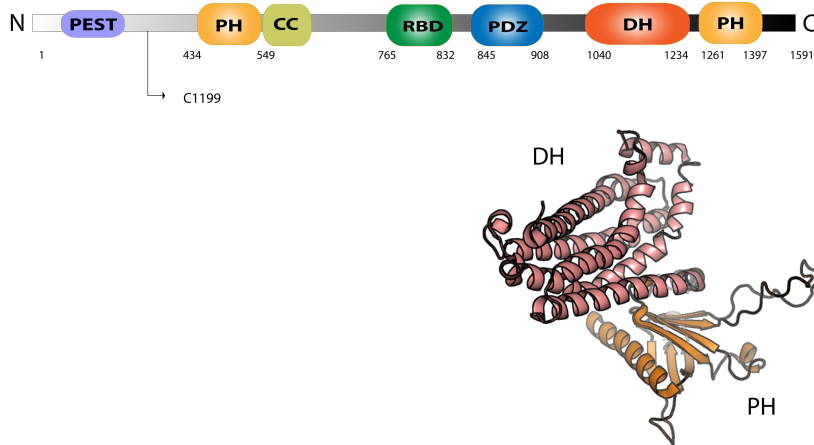


Abbildung 2.5: Tiam1 ist aus folgenden Domänen aufgebaut: Vom N-Terminus beginnend die PEST-Domäne (Name leitet sich von Aminosäurezusammensetzung ab); PH: Pleckstrin-homologe Domäne, CC: Coiled coil, RBD: Ras Binde Domäne, PDZ: Post synaptic density/Discs large/Zonula occludentes-1, DH: Dbl homolog, PH-pleckstrin homolog; Die C-terminale DH-Domäne ist ausschließlich aus α -Helices aufgebaut, ihre Konformation hat Ähnlichkeiten zu einem Liegestuhl; die C-terminale PH-Domäne ist aus α -Helices und β -Faltblättern aufgebaut.

um dort an zytoplasmatische und membran-assoziierte Proteine zu binden, wird eine hohe räumliche und zeitliche Kontrolle ihrer Aktivität ermöglicht. Eine der ersten direkten Interaktionen konnten für den Hyaluronsäurerezeptor CD44_{v3} und für das Zytoskelettprotein Ankyrin mit der PHn-CC-Region nachgewiesen werden.^{68,69}

Die Spezifität der *downstream*-Interaktionen zeigt die Interaktion des N-Terminus von Tiam1 mit dem Adaptorprotein IB2/JIP2, das als *Scaffold* für die p38 Map Kinase, den Rac1 Effektor MLK3 und MKK1 (Map Kinase Kinase 1) fungiert.⁷¹ Ebenfalls vermag Tiam1 den *Scaffold* IRSp53, der bevorzugt mit Rac1 und dem WAVE Komplex interagiert, zu binden.⁷² Weiterhin ist Tiam1 durch Assoziation mit Cdc42-Par3-Par6 bei der Ausbildung von neuronalen Polarisationserscheinungen wie der Spezialisierung von Neuronen beteiligt.⁷³ Die Tiam1-vermittelte Aktivierung von Rac1 durch Assoziation mit Par-3/Par-6/ α PKC zur Ausbildung von *tight junctions* in Epithelzellen scheint ebenfalls von großer Bedeutung zu sein.⁷⁴ Es konnte ferner eine Assoziation von Tiam1 mit der p21-Arc-Untereinheit des Arp2/3-Komplexes nachgewiesen werden, was zur *co*-Lokalisation von Tiam1 und dem Arp2/3-Komplex zu Orten der

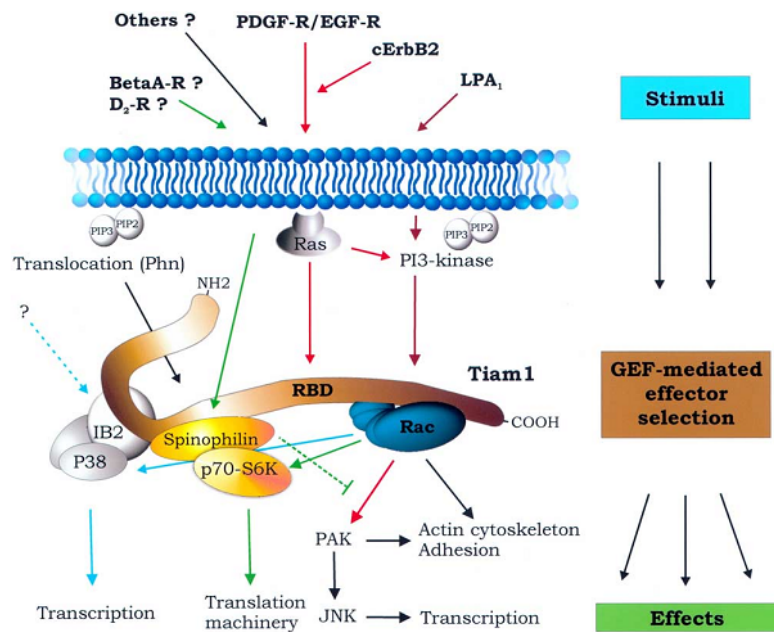


Abbildung 2.6: Tiam1 als Vermittler der Integration von *upstream*-Signalen zur spezifischen Aktivierung von *downstream*-Effekten. Die kanonischen Signalwege sind durch unterschiedliche Farbpfleile gekennzeichnet. BetaA-R: *L-adrenergic receptor*; D2-R: *dopamine-2 receptor*; EGF-R: *epidermal growth factor receptor*; JNK: *Jun N-terminal kinase*; LPA1: *lysophosphatidic acid receptor-1*; PDGF-R: *platelet-derived growth factor receptor*; PAK: *p21-activated kinase*; PHn: *N-terminal PH domain*; PI3-kinase: *phosphatidyl inositol 3-kinase*; PIP2: *phosphatidylinositol diphosphate*; PIP3: *phosphatidylinositol trisphosphate*; RBD: *Ras-binding domain*; p70S6K: *protein of 70kDa S6-kinase*.⁷⁰

Aktin-Polymerisation (z.B. epitheliale Zell-Zell Kontakte)⁷⁵ führt. Eine schematische Übersicht der Tiam1-vermittelten Integration von *upstream* Signalen zur spezifischen Aktivierung von *downstream* Effekten gibt Abbildung 2.6.

Während der initialen zellulären Transformation durch das Onkogen Ras spielen Rac,⁷⁶ sowie PI3K⁷⁷ entscheidende Rollen. Durch die Ras-Bindedomäne kann Tiam1 direkt mit aktivem Ras interagieren und unabhängig von der PI3K-Aktivität Rac aktivieren.⁵⁸ Die Relevanz dieser Domäne zeigt sich in der Resistenz von Tiam1 *knock-out* Mäusen gegenüber Ras-induziertem Hautkrebs.⁷⁸ Jedoch deutet das vereinzelte Auftreten von malignen Tumoren auf den Verlust von intermolekularen Adhäsionen durch die Unterbrechung des Tiam1/Rac-Signalweges hin. In der Tat führen die Signalwege in MDCK-Zellen für Tiam1/Rac und Ras zu gegensätzlichen Effekten, da der Ras (V12)-induzierte epithelial-mesenchymale Übergang durch Tiam1/Rac negativ reguliert wird.⁵⁷ Die persistente Ras-Aktivierung hat neben dauerhaften Raf/MAP Signalen zur Folge, dass das Transkriptionslevel von Tiam1 sinkt, sich die Aktivität von Rac verringert und reziprok die Rho-GTPase aktiviert wird.⁷⁶ Des Weiteren korreliert die Expression von Tiam1 bei Brustkrebs Carcinomen und Magenkrebs invers mit dem Fortschreiten der Krankheit.^{79,80} Tiam1 wird ebenfalls bei Prostata Carcinomen als ein Prognose-Marker angesehen.⁸¹

Tiam1 ist in mehreren Signalwegen aktiv und der genetische *knock-out* bei Mäusen bewirkt auf der einen Seite ein verlangsamtes Ras-induziertes Tumorwachstum und auf der anderen Seite entwickeln sich wenige Tumore besonders invasiv. Diese scheinbaren Gegensätze machen Tiam1 als Zielprotein für eine gezielte Inhibition der GEF-Domäne durch Aptamere/*small molecules* besonders attraktiv, da durch sie die exakte Adressierung der GTPase-Aktivierung–im Gegensatz zum genetischen *knock-out* bzw. siRNA-vermittelten *knock-down* möglich wird.

2.5 Der Rho-GEF Vav1

Vav1, ein in hämatopoetischen Zellen exprimiertes Protein, gehört neben den homologen Vav2 und Vav3 ebenfalls zur Dbl-Familie der Rho-GEFs. Es wurde 1989 bei der Suche nach Proteinen, die NIH3T3-Zellen transformieren können, entdeckt.⁸² Vav1 besitzt am N-Terminus eine Calponin-homologe Domäne (CH), die bei Calcium Transportvorgängen eine Rolle spielt. Es folgt die für die Regulierung der GEF-

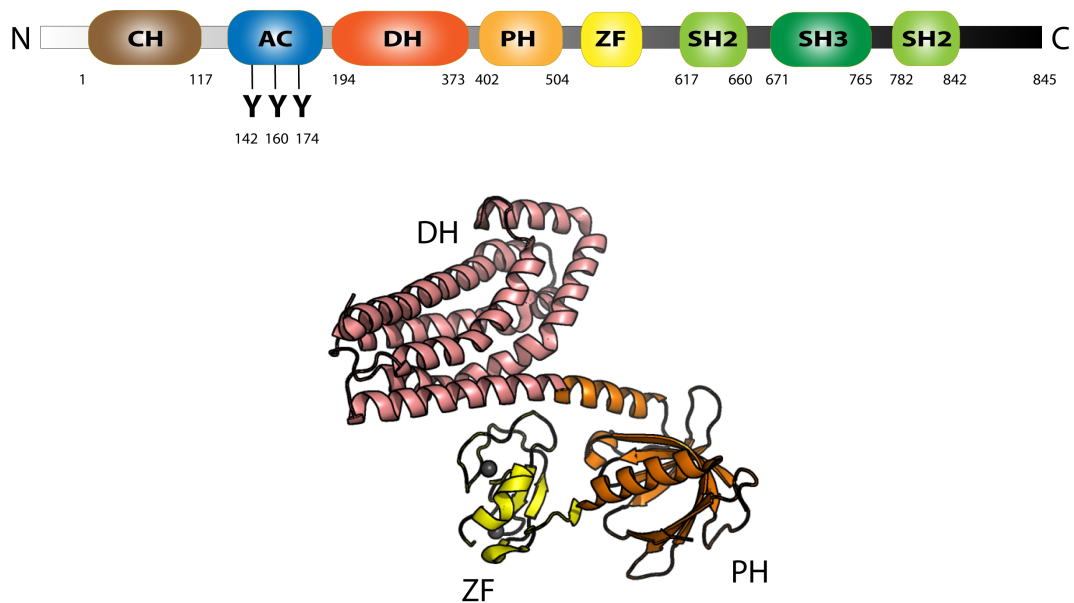


Abbildung 2.7: Vav1 ist aus folgenden Domänen aufgebaut: Vom N-Terminus beginnend; CH: Calponin homolog, AC: Acidic region, DH: Dbl homolog, PH: Pleckstrin homolog, ZF: Zinkfinger bzw. CRD: Cystein reiche Domäne, SH2: Src homolog 2, SH3: Src homolog 3: Die DH-Domäne ist analog zu Tiam1 ausschließlich aus α -Helices aufgebaut, ihre Konformation hat Ähnlichkeiten zu einem Liegestuhl; die PH-Domäne wird von einer Cystein reichen Domäne flankiert, die im Verlauf der Guaninnukleotid-Austauschaktivität die Konformation der DH-Domäne stabilisiert.

Aktivität kritische AC(Acidic)-Region. Diese beinhaltet das innerhalb einer autoinhibitorische Helix liegende Tyr174, das Vav1 zum bislang einzigen Dbl-GEF macht, dessen Austauschaktivität durch Tyrosin-Phosphorylierung reguliert wird.⁸³ Es schließt sich die für Dbl-GEFs typische DHPH-Tandemdomäne an,⁸⁴ die C-terminal von einer Cystein-reichen Domäne flankiert wird, deren Funktion die Stabilisierung der DH-Domäne ist. Diese ungewöhnliche Interaktion ist vermutlich einer der Gründe für die unspezifische Austauschaktivität an Rac, Cdc42 und RhoG.⁸⁵ Die GEF-Aktivität wird weiterhin sehr stringent durch autoinhibitorische Interaktionen der CH-Domäne intramolekular reguliert.⁸⁶ Der C-Terminus besteht aus den Protein-Protein-Interaktionsdomänen SH2-SH3-SH2, wobei diese Anordnung ungewöhnlich ist und nur von dem Adaptorprotein Grb2, das Rezeptor Tyrosin Kinasen (TRKs) mit Ras-GEFs verbindet,⁸⁷ geteilt wird (siehe Abb. 2.7).

2. EINLEITUNG

Vav1 leitet T-Zell-Rezeptor (TCR) Signale an unterschiedliche *downstream* Signalkaskaden weiter.⁸⁸ Hervorzuheben ist vor allem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*), der mitverantwortlich ist für die Produktion von IL-2 und einer Vielzahl anderer Signale der Immunantwort (siehe Abb. 2.8).⁸⁹ Nach der T-Zell-Aktivierung kommt es durch cytosolische Tyrosin-Kinasen der Src-Familie zur Phosphorylierung der ITAMs (*immunoreceptor tyrosine activation motifs*). Über ihre SH2-Domäne interagiert die T-Zell spezifische Tyrosin-Kinase Zap-70 mit den phosphorylierten ITAMs, was schlussendlich zur Phosphorylierung von *downstream* Signalproteinen wie Vav1 führt. Durch die Aktivierung von Rac1 werden Aktin-Zytoskelettänderungen ausgelöst, die für die NFAT-Aktivierung notwendig sind.⁹⁰

Während der Interaktion von T-Zellen mit Antigen-präsentierenden Zellen kommt es zur Ausbildung der so genannten immunologischen Synapse, die sich durch eine Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts bilden kann.⁹¹ Durch die Aktivierung der Rho-GTPasen Rac1, Cdc42 und RhoG sind verschiedene Wege zur Umstrukturierung des Zytoskeletts möglich: Rac1 kann PIP5K aktivieren,⁹² deren Produkt PIP₂ Talin und Vinculin aktivieren kann, beides Proteine die das Aktin-Zytoskelett mit der Zellmembran verbinden. Durch Cdc42 ist eine Aktivierung von WASP möglich, das für die Aktin-Polymerisation in T-Zellen wichtig ist.⁹³

Der N-Terminus von Vav1 besitzt keinerlei katalytische Funktionen, es konnte jedoch der Nachweis erbracht werden, dass für eine NFAT-Aktivierung dieser komplett vorhanden sein muss.⁹⁵ Der Verlust der N-terminalen regulatorischen Bereiche (N δ 186) geht mit einer konstitutiv-aktiven, phosphorylierungs-unabhängigen Austauschaktivität einher, die direkt mit der Transformationsaktivität korreliert.⁹⁶ Durch die C-terminale Anordnung der SH3-SH2-SH3-Kassette sind Interaktionen mit Adaptorproteinen möglich, die hauptsächlich zu einer Translokalisierung von Vav1 führen. Beispielsweise muss Vav1 über die SH2-Domäne in B-Lymphozyten mit dem CD19 Rezeptor interagieren, um effizient von IgM-assoziiertem Syk phosphoryliert zu werden.^{97,98} In T-Zellen nimmt Vav1 eine Vielzahl von Interaktionen mit unterschiedlichen Adaptoren wahr, um durch die T-Zell spezifische Kinase Zap-70 phosphoryliert zu werden. Unter anderem gelingt durch die Interaktion von Vav1 mit Grb2, das gleichzeitig mit dem CD28 Rezeptor interagiert, eine Lokalisation an die Zellmembran, sodass die Phosphorylierung durch Zap-70 effektiv ablaufen kann.⁹⁹

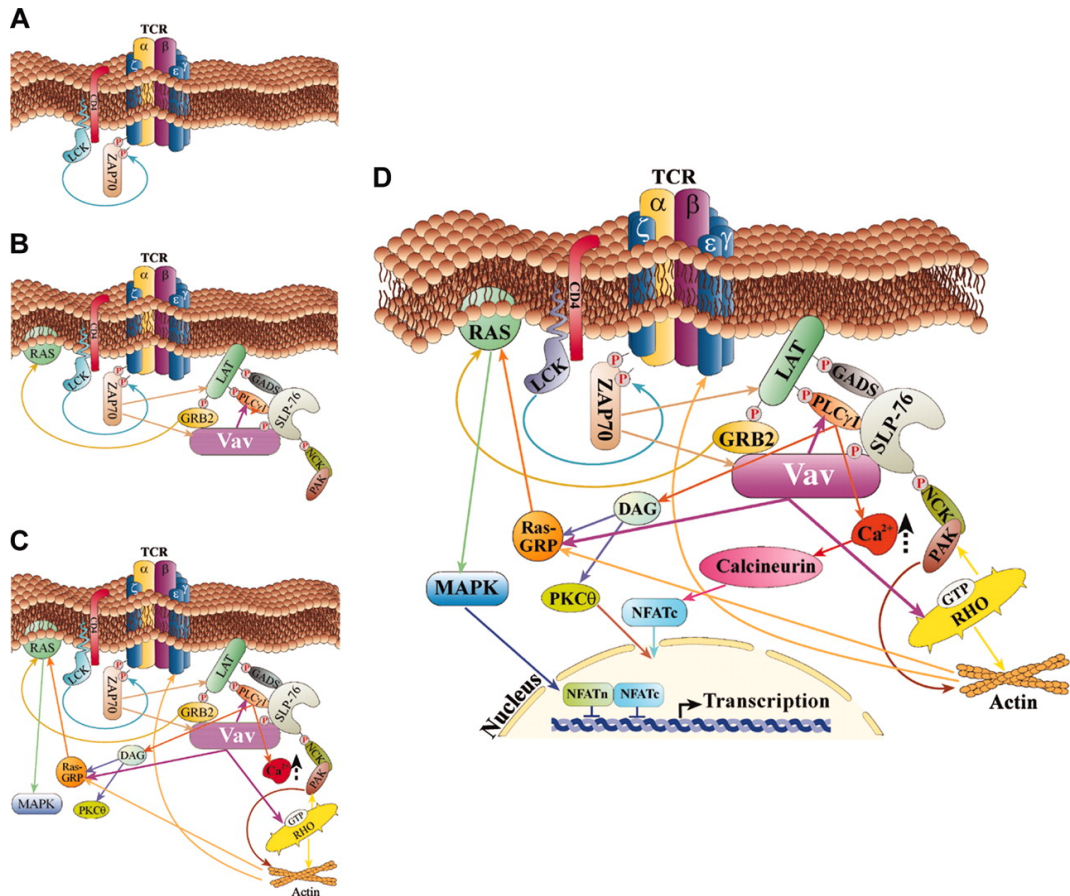


Abbildung 2.8: Übersicht der Vav1-Signalwege die zu Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts und des Ca²⁺-Flusses und schlussendlich zur NFAT-Aktivierung führen. (A) T-Zell Rezeptor Aktivierung und Stimulation der Tyrosin Kinase Zap-70 (B) durch Tyrosin-Phosphorylierung werden Vav1 und andere Adaptorproteine aktiviert, es kommt zur Assoziation. (C) Nach TCR-Stimulation aktiviert Vav1 Rac und ist bei der Aktivierung von Ras und dem Ca²⁺-Fluss beteiligt. (D) zusammenfassendes Schaubild der Vav1-vermittelten Aktivierung von NFAT in T-Zellen.⁹⁴

2. EINLEITUNG

Die Phosphorylierung von Vav1 in T-Lymphozyten ist darüber hinaus beeinträchtigt, wenn das Adaptorprotein LAT fehlt.¹⁰⁰ Eine weitere Regulierung der Vav-Aktivität in B- und T-Zellen erfolgt durch die BLNK/Slp76-Familie, die als reine Adaptorproteine angesehen werden.¹⁰¹ Neben der Aktivierung von Rho-GTPasen scheint Vav1 ebenfalls den Ras/Raf/Mek/Erk Signalweg zu beeinflussen und damit zusätzliches Transformationspotential zu entfalten.^{102,103,104,105} Des Weiteren weist die Expression des hämatopoetischen Signalübertragungsproteins Vav1 in Melanomen,¹⁰⁶ Adenocarcinomen¹⁰⁷ und Neuroblastomen¹⁰⁸ auf eine Dysregulation der normalen Zellproliferation hin.

Die einzige bekannte Verbindung, die einen Einfluss auf den Guaninnukleotid-Austausch von Vav1 ausübt ist Azathioprin, das während Organtransplantationen eingesetzt wird. Dessen Metabolit 6-Thio-GTP bindet als GTP-Mimetikum an eine Vielzahl von kleinen GTPasen. Außer Rac1/2 vermag es diese nach einer CD3/CD28 Stimulation jedoch nicht zu inhibieren.¹⁰⁹ Die unterschiedlichen Toxizitäten und Effizienzen werden mit der Aktivität der Thiopurin-Methyltransferase begründet.¹¹⁰

Vav1 ist ein komplex aufgebautes Protein, das durch die SH2-SH3-Module Aufgaben als Adaptorprotein übernimmt und gleichzeitig eine ungewöhnlich regulierte GEF-Aktivität aufweist. Die differenzierte Beurteilung von GEF-abhängigen und GEF-unabhängigen Prozessen erscheint schwierig¹¹¹ und ist im Falle von *knock-out* Modellen durch die *Scaffold* Funktion von Vav1 wahrscheinlich nicht objektiv.⁸ Darüberhinaus führen Mutationsstudien mit der konstitutiv aktiven Y174F Mutante¹¹² zu einem verfälschten Bild, da negative Regulatoren (z.B. die Tyrosin Phosphatase SHP-1¹¹³) Vav1 nicht mehr binden können. Ferner sei erwähnt, dass durch die gegebene Redundanz der Vav1-Proteine eine Beurteilung von *knock-out*- bzw. *knock-down*-Modellen ebenfalls heikel ist. Vav1 scheint somit ein geeignetes Zielprotein zu sein, um mit Hilfe von spezifischen niedermolekularen Inhibitoren den Einfluss der GEF-Aktivität auf zelluläre Funktionen von Vav1 zu studieren. Sowohl die Aktivierung durch Tyr-Phosphorylierung, als auch die einzigartige Interaktion der Zinkfinger-Domäne im Verlauf des Guaninnukleotid Austauschs wären als Angriffspunkte für die Entwicklung eines *small molecules* denkbar.

3

Ziele der vorliegenden Arbeit

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Selektion und Charakterisierung von spezifisch bindenden Aptameren für die Dbl-homologe Domäne der Rho-GEFs Tiam1 und Vav1. Da beide Austauschfaktoren fundamental wichtige Rho-GTPasen aktivieren und ihre Relevanz bei verschiedenen Krebserkrankungen als gesichert gelten darf, erlauben spezifische Aptamer-Inhibitoren weitere Einblicke in GEF-abhängige Prozesse. Die Anwendung der Aptamere in Zellkultur-basierten Experimenten bzw. *in vivo* gestaltet sich aufgrund von Nukleasen nicht selten schwierig, sodass im weiteren Verlauf herausgefunden werden sollte, ob sich die selektierten Aptamere als Werkzeuge nutzen lassen, um spezifische chemische Inhibitoren für die Dbl-homologe Domäne der beiden GEFs zu identifizieren. Die Verwirklichung dieses Ziels erforderte die Etablierung eines modular aufgebauten Aptamer-Verdrängungsassays. Schlussendlich sollte eine weitergehende Charakterisierung der identifizierten Hitverbindungen folgen.

3. ZIELE DER VORLIEGENDEN ARBEIT

4

Ergebnisse

4.1 Tiam1

4.1.1 Expression und Aufreinigung der Tiam1-Konstrukte

Das katalytisch aktive Konstrukt Tiam1_{1033–1406} (DHPH-Tandemdomäne) sollte für die *in vitro* Selektion in *E.coli* exprimiert und aufgereinigt werden. Ausgehend vom bakteriellen Expressionsplasmid pProExHtb-Tiam1_{1033–1406}, das freundlicherweise Prof. John Sondek (UC Chapel Hill, North Carolina, USA¹¹⁴) zur Verfügung stellte, wurden BL21 (DE3) Tuner Zellen transformiert. Durch den N-terminalen Hexahistidinanker konnte das exprimierte Protein über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie (siehe 7.4.4) sehr effektiv aufgereinigt werden, wobei die verbliebenen Verunreinigungen abschließend über einen starken Anionenaustauscher (siehe 7.4.5) entfernt werden konnten. Die Analyse im SDS-PAGE-Gel zeigt ein homogenes Protein auf der erwarteten Höhe (siehe Abb. 4.1). Dieses wurde für die Biotinylierung (siehe 7.5.2) und schließlich für die *in vitro* Selektion eingesetzt. Durch eine TEV-Protease-Erkennungssequenz zwischen dem N-terminalen Hexahistidinanker und Tiam1_{1033–1406} bestand die Möglichkeit den Affinitätsanker abzutrennen.

4. ERGEBNISSE

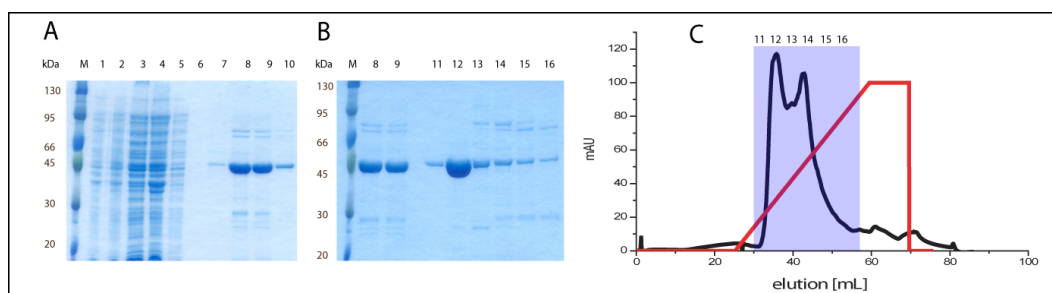


Abbildung 4.1: SDS-PAGE-Analyse der Aufreinigung von Tiam1_{1033–1406} und das dazugehörige Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie: **M:** Proteinlängensstandard, **1:** vor Induktion, **2:** nach 7 h Expression, **3:** löslicher Anteil, **4:** unlöslicher Anteil, **5:** Überstand nach Inkubation mit Ni-NTA Matrix, **6:** Waschfraktion Ni-NTA, **7:** Elution mit 50 mM Imidazol, **8:** Elution mit 100 mM Imidazol, **9:** Elution mit 500 mM Imidazol, **10:** Elution mit 500 mM Imidazol, **11-16:** Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie **C:** Anionenaustauschchromatographie, UV Absorption bei 280 nm in schwarz und Leitfähigkeit in rot, der markierte Bereich in blau verdeutlicht die analysierten Fraktionen im SDS-PAGE-Gel

Auch wenn die isolierte DH-Domäne von Tiam1 (Tiam1_{1033–1255}) katalytisch inaktiv ist, so müssen selektierte Aptamere auf eine Bindung getestet werden. Zur Expression wurde der prokaryontische Expressionsvektor pET SUMO eingesetzt, der das Fremdgen über einen TA-Überhang aufnehmen kann. Ebenfalls besitzt dieser Vektor neben einem Löslichkeits-verbesserndem SUMO-tag eine N-terminale Hexahistidinsequenz zur Aufreinigung über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Nach diesem ersten Aufreinigungsschritt konnte der His₆-SUMO-tag durch einen SUMO-Protease-Verdau und einer zweiten Ni-NTA-Affinitätschromatographie abschließend entfernt werden. Die SDS-PAGE Analyse ergab eine Reinheit von mindestens 80 %.

Die Aptamer-Selektion sollte zuerst gegen die katalytisch aktive DHPH-Domäne von Tiam1 erfolgen. Trotzdem erschien es sinnvoll die isolierte C-terminale PH-Domäne (Tiam1_{1255–1400}, PHc) ebenfalls zur Verfügung zu haben, etwa um genauere Bindungsstudien mit selektierten Aptameren durchführen zu können. Die PHc-Domäne wurde aus dem Konstrukt pProExHtb-Tiam1_{1033–1406} (siehe 7.3.1) herausamplifiziert und über BamHI und EcoRI Schnittstellen in den Vektor pGEX-TEV inkloziert. Durch die Expression als GST-Fusionsprotein konnte Tiam1_{1255–1400} über eine GSH-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Das GST wurde abschließend

über einen TEV-Protease-Verdau abgetrennt. Die finale Aufreinigung des geschnittenen Proteins erfolgte über eine Kationenaustauschchromatographie. Die Analyse durch SDS-PAGE zeigt eine Reinheit von mindestens 90 % nach dem TEV-Verdau.

4.1.2 Expression und Aufreinigung von Rac1/Rac2

Die Rho-GTPase Rac1 wird spezifisch von Tiam1 *in vivo* aktiviert, sie sollte aufgereinigt werden, um die Aktivität der Tiam1-Konstrukte in GEF-Austauschassays untersuchen zu können. Zur Verfügung standen zwei pGEX-Konstrukte: Rac1_{1–192} sowie Rac1_{1–184}. Das verkürzte Rac1 wurde freundlicherweise von Andre Schönichen, MPI Dortmund zur Verfügung gestellt. Dieses Konstrukt hatte an Stelle der Thrombin-Schnittstelle eine TEV-Erkennungssequenz. Beide Konstrukte konnten über eine GSH-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Die Abtrennung des GST erfolgte problemlos durch einen TEV- bzw. Thrombin-Verdau.

Die Rho-GTPase Rac2, eine Isoform von Rac1, mit einer deutlich erhöhten intrinsischen Austauschaktivität¹¹⁵ ist exprimiert worden, um den GEF-beschleunigten Nukleotidaustausch durch Tiam1 besser verfolgen zu können. Das Gen wurde über TA-Überhänge in einen pET SUMO Vektor inkloniert und konnte aufgrund des N-terminalen Hexahistidinankers mit Hilfe einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Der SUMO-tag des Fusionsproteins wurde nicht abgeschnitten, da die Abspaltung nicht ohne Aktivitätseinbußen durchgeführt werden konnte.

4.1.3 Tiam1_{1033–1406} als Zielstruktur der *in vitro* Selektion

Tiam1 wurde 1994 als invasives Gen in T-Lymphozyten identifiziert.⁵⁵ Das Genprodukt ist ein aus 5 Domänen aufgebautes 1591 Aminosäuren langes cytosolisches Protein, welches zu den Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) der Rho GTPasen gezählt wird. Die für Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF) der Rho GTPasen typische Tandem-Anordnung der DH-und PH-Domäne wurde als Zielstruktur für die *in vitro* Selektion ausgewählt. Aufgrund der biologischen Relevanz dieser Domäne sollten Aptamere als Inhibitoren weitere Einblicke in die GEF-abhängigen Prozesse von Tiam1 gewähren. Eine Übersicht der aufgereinigten Tiam1-Konstrukte gibt Abbildung 4.2.

4. ERGEBNISSE

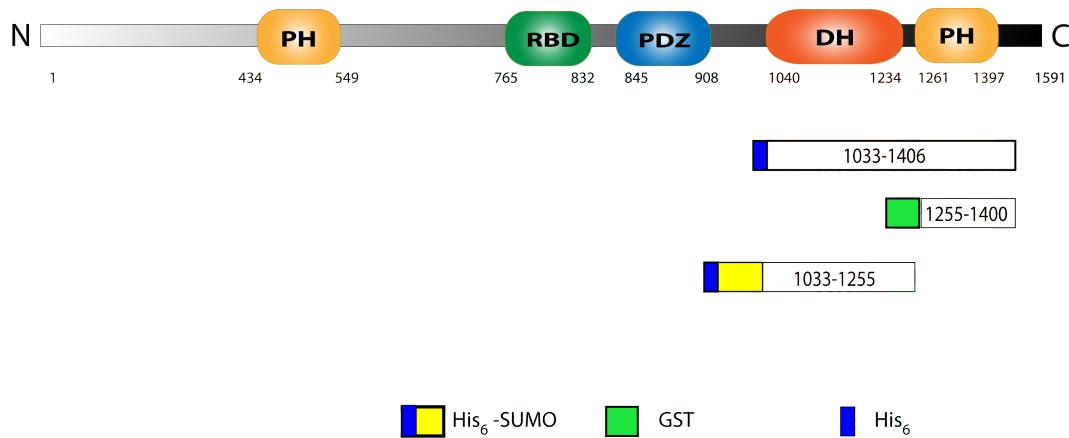


Abbildung 4.2: Tiam1 Domänenübersicht und aufgereinigte Konstrukte: **PHn:** N-terminale Pleckstrin-homologe Domäne; **RBD:** Ras Binde Domäne; **PDZ:** PSD95, *Drosophila septate junction protein disc-large*, ZO-1-Domäne; **DH:** Dbl-homologe Domäne; **PHc:** C-terminale Pleckstrin-homologe Domäne; die Aminosäuren-Nummerierung basiert auf dem Datensatz Q13009 der Proteindatenbank UniProtKB.

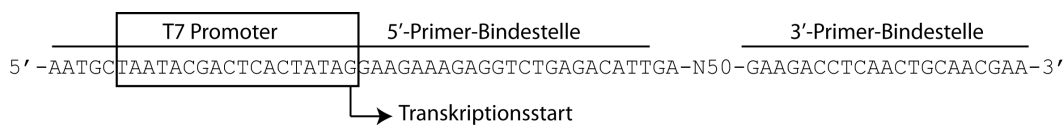


Abbildung 4.3: DNA-Sequenz der B50 Bibliothek, Primer-Bindestellen und T7 Promotersequenz sind gekennzeichnet.

4.1.4 SELEX-Bibliothek

Die *in vitro* Selektion wurde mit einer 116 bp langen synthetisch hergestellten DNA-Bibliothek (B50 Bibliothek, Design: Prof. G. Mayer) durchgeführt. Der zentrale randomisierte Bereich hatte eine Länge von 50 Nukleotiden, die theoretische Diversität lag in der Größenordnung von 10^{14} . Der T7 Promoter wurde während der PCR (siehe 7.3.1) über den 5'-Primer eingeführt, sodass eine *in vitro* Transkription zur Synthese der entsprechenden 96 Basen langen RNA-Bibliothek möglich wurde.

4.1.5 Das Selektionsschema

Das Selektionsschema kann schematisch in Abbildung 4.4 nachverfolgt werden. Vor dem ersten Selektionsszyklus wurde in einem Filterbindungsexperiment (siehe 7.2.20)

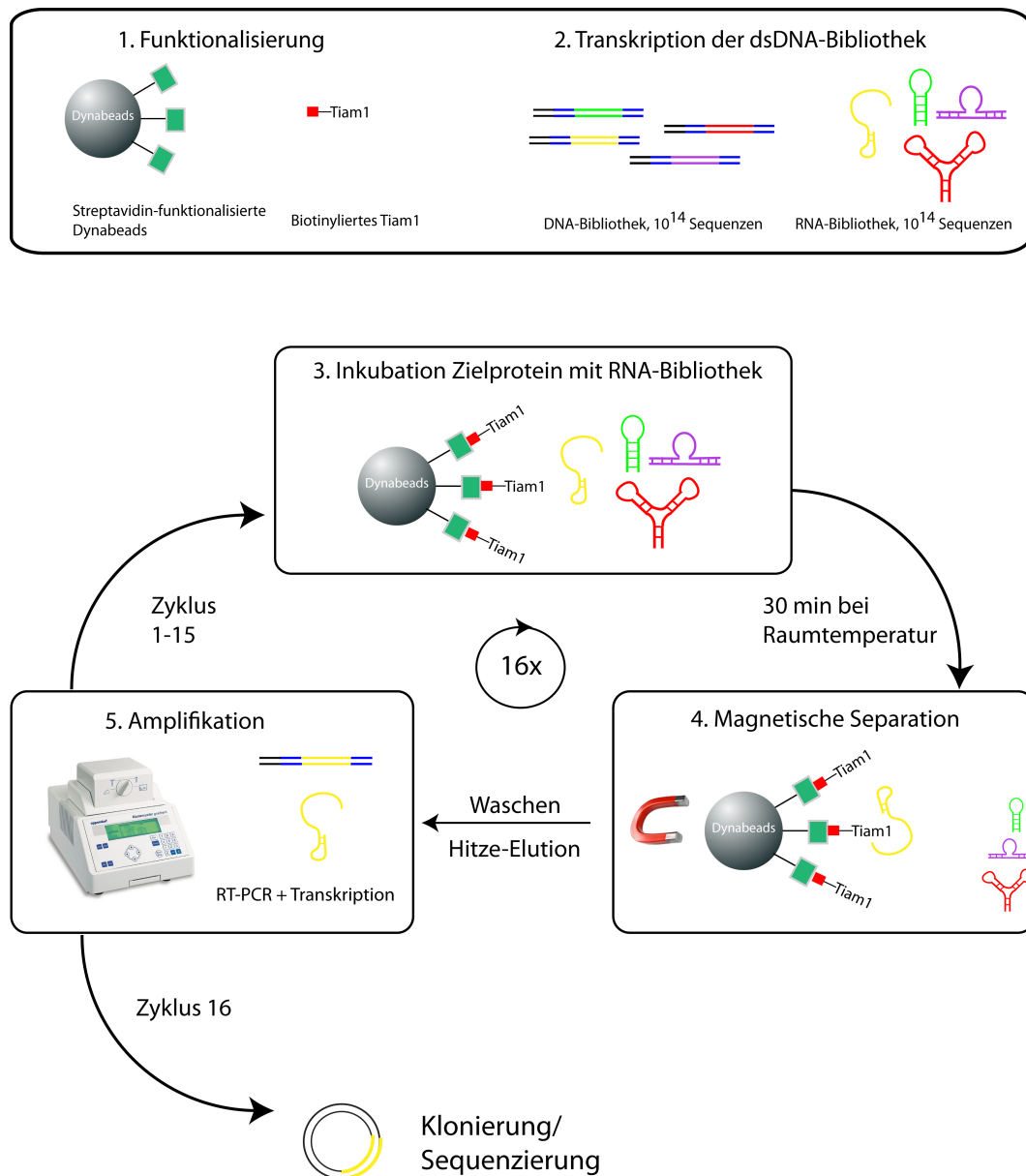


Abbildung 4.4: Das Selektionsschema für Tiam1_{1033–1406}: **(1.)** Tiam1_{1033–1406} ist über den Biotinanker auf Streptavidin-funktionalisierte Dynabeads immobilisiert worden. **(2.)** Die B50 DNA-Bibliothek wurde mittels PCR amplifiziert und durch eine *in vitro* Transkription in die RNA-Bibliothek umgeschrieben. **(3.)** Der erste Zyklus beginnt durch eine 30 minütige Inkubation der RNA-Bibliothek mit den Tiam1_{1033–1406}-gekoppelten Dynabeads. **(4.+5.)** Nach der magnetischen Separation werden die gebundenen Sequenzen Hitze-eluiert und über eine RT-PCR mit anschließender *in vitro* Transkription für den nächsten Zyklus vorbereitet. Nach 16 Zyklen wurden die Sequenzen der abschließenden RT-PCR über eine TA-Klonierung in einen pCR2.1 TOPO-Vektor eingebracht und sequenziert.

4. ERGEBNISSE

mit intern [^{32}P]-markierter RNA (siehe 7.3.2) die Affinität der RNA-Ausgangsbibliothek zum Selektionsziel Tiam1_{1033–1406} (*target*) untersucht. Es konnte keine messbare Affinität im Konzentrationsbereich 0 - 1,2 μM festgestellt werden. Im ersten Selektionszyklus wurde ein 5facher Überschuss RNA zu Protein eingesetzt. Die genauen Bedingungen für jeden Zyklus sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Eine detaillierte Beschreibung der *in vitro* Selektion ist dem Abschnitt 7.5 zu entnehmen. Nach 12 Selektionszyklen wurde die Bibliothek in einem Filterbindungsexperiment auf Anreicherung von bindenden Sequenzen überprüft. Es konnte nur eine schwache Anreicherung detektiert werden, sodass das Selektionsexperiment unter stringenteren Bedingungen bis Zyklus 16 fortgesetzt wurde. Abschließend fand erneut eine Affinitätsbestimmung durch ein Filterbindungsexperiment statt. Nachdem eine deutliche Anreicherung von bindenden Sequenzen nach Zyklus 16 bestätigt werden konnte wurde das RT-PCR-Produkt über TA-Überhänge in den Vektor pCR2.1 TOPO kloniert und sequenziert.

Tabelle 4.1: Selektionsbedingungen Tiam1_{1033–1406}: pmol Protein bezieht sich auf die Menge Protein, die immobilisiert wurde, wobei eine Kopplungseffizienz der Streptavidin-Biotin-Interaktion von 100 % angenommen wurde.

Zyklus	pmol Protein	pmol RNA	Waschschritte	PCR-Zyklen
1	600	3000	2x 150 μL	8
2	300	500	3x 200 μL	10
3	300	100	4x 200 μL	10
4	300	100	4x 200 μL	11
5	300	100	4x 200 μL	10
6	300	100	4x 200 μL	10
7	300	100	4x 200 μL	10
8	300	100	4x 200 μL	10
9	300	100	4x 200 μL	8
10	300	100	4x 200 μL	8
11	150	50	4x 200 μL	10
12	150	50	4x 200 μL	10
13	100	100	10x 200 μL	10
14	80	100	12x 200 μL	10
15	60	100	14x 200 μL	11
16	40	100	16x 200 μL	11

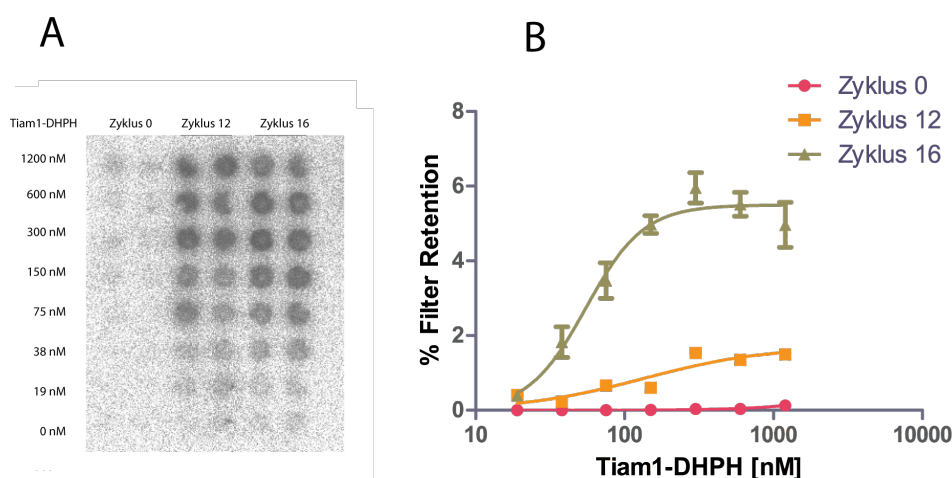


Abbildung 4.5: A: Filterbindungsexperiment mit intern $[^{32}\text{P}]$ -markierter RNA der Selektionszyklen 0, 12 und 16; B: Konzentrationsabhängige Auftragung der normalisierten Filterretentionswerte des in A gezeigten Experiments.

4.1.6 Charakterisierung der gefundenen Sequenzen

Um die Bindungseigenschaften aller sequenzierten Monoklonen zu beurteilen, wurden sie während der *in vitro* Transkription intern mit α - $[^{32}\text{P}]$ -GTP markiert (siehe 7.3.2). Die Transkription konnte hierbei nicht mit den im Vektor einklonierten Sequenzen stattfinden, da sich *upstream* zum Insert innerhalb des Vektors pCR2.1 TOPO ein zusätzlicher T7 Promoter befindet. Es wurden deshalb zuerst alle Sequenzen aus dem Vektor herausamplifiziert und das doppelsträngige PCR-Produkt für alle *in vitro* Transkriptionen eingesetzt. Da die Ausbeute der radioaktiven Transkription nicht quantifiziert wird, ist es nicht möglich präzise K_D -Werte zu ermitteln, jedoch lassen sich erste Abschätzungen hinsichtlich der Affinität machen. Eine Übersicht aller erhaltenen Sequenzen und deren K_D -Wert-Abschätzung auf der Grundlage von jeweils einer Duplikat-Filterbindung sind in Abbildung 4.6 zu sehen.

4. ERGEBNISSE

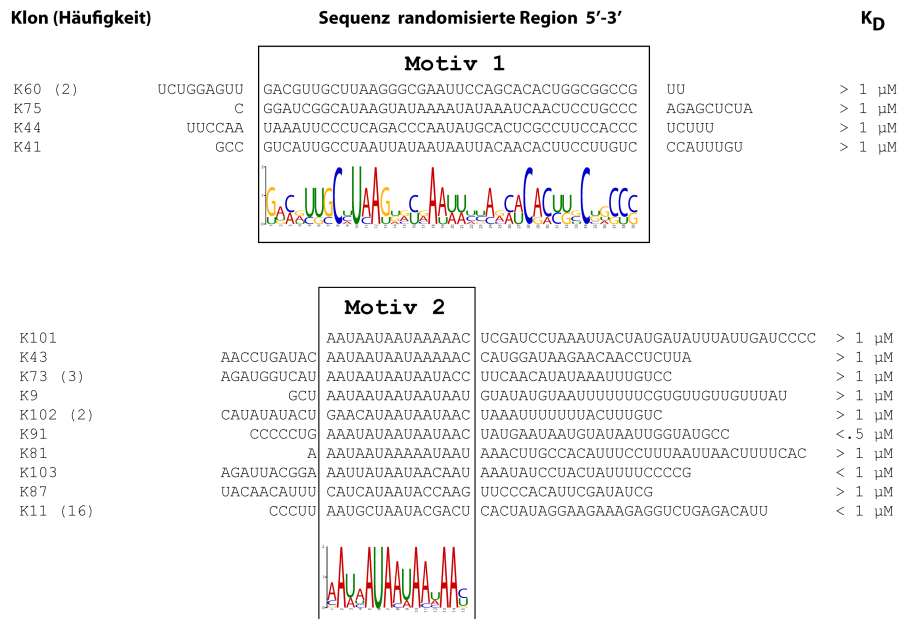


Abbildung 4.6: Die nach Selektionszyklus 16 erhaltenen Sequenzen, deren Häufigkeit und eine erste Abschätzung der Affinität nach einem Filterbindungsexperiment von intern [32 P]-markierten Sequenzen mit Tiam1_{1033–1406}.

Alle Sequenzen innerhalb des randomisierten Bereichs wurden auf Konsensusmotive¹¹⁶ analysiert und entsprechend gruppiert. Motiv 1 besteht aus einem 39 Nukleotide langen Bereich mit einer Sequenzidentität von 15 %. Die enthaltenen Klone K41, K44, K60 und K75 zeichnen sich durch geringe Affinitäten aus (K_D -Wert > 1 μ M). Das zweite AU-reiche Konsensusmotiv wird von der Mehrzahl aller sequenzierten Klone geteilt, es ist 15 Nukleotide lang und weist eine Sequenzidentität von 33 % auf. Die Gewinner-Sequenz K11 weist neben K91 und K103 den niedrigsten K_D -Wert für Tiam1_{1033–1406} auf. Im Anschluss an die Gruppierung der Sequenzen war eine genaue Bestimmung der Dissoziationskonstanten der affinesten Monoklone K11, K91 und K103 notwendig. Nach der *in vitro* Transkription wurde die RNA am 5'-Ende dephosphoryliert und anschließend mit γ -[32 P]-ATP kinasiert und über ein PAGE-Gel aufgereinigt (siehe 7.2.8). Für die 5'-Markierung wird eine definierte Stoffmenge RNA (150 pmol) eingesetzt, sodass sich für die Filterbindung eine genaue RNA-Konzentration einstellen lässt. Dies ist wiederum für eine genaue K_D -Wert Bestimmung kritisch. Im gezeigten Experiment (siehe 4.7) sind ca. 5 nM 5'-radioaktiv-

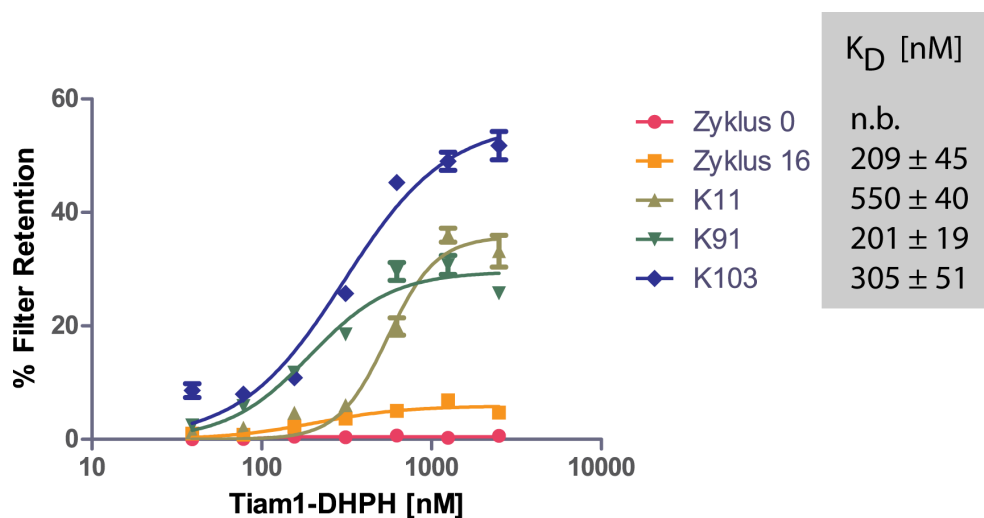


Abbildung 4.7: Filterbindungsexperimente der affinsten Monoklone K11, K91 und K103. Es sind circa 5nM 5'-[32 P]-markierte RNA in jedem Experiment eingesetzt worden. n.b.: nicht bestimmt.

markierte RNA eingesetzt worden, um aus den Filter-Retentionen die jeweilige Dissoziationskonstante bestimmen zu können. Um einen Einfluss des 5'-Triphosphates auf die Bindung an Tiam1_{1033–1406} auszuschließen, wurden im Vorfeld dephosphorylierte Klone in einer kompetitiven Filterbindung mit intern [32 P]-markierten Proben getestet. Alle 3 Sequenzen waren in der Lage die intern [32 P]-markierten Sequenzen zu verdrängen.

Mit einem K_D -Wert von circa 200 nM besitzt Klon K91 die höchste Affinität. Im

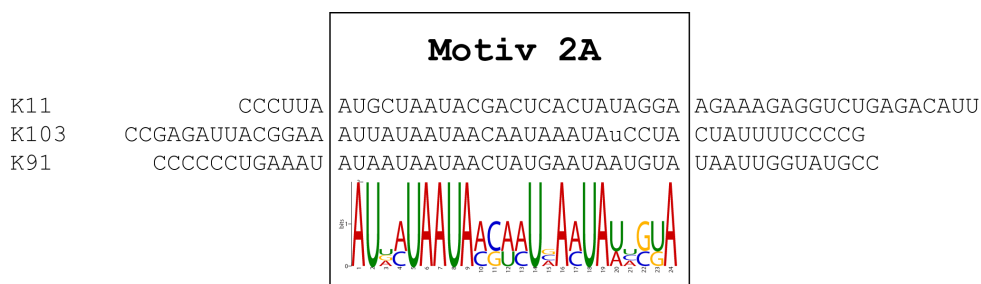


Abbildung 4.8: Sequenzvergleich der affinsten Monoklone K11, K91 und K103 zur Identifikation eines gemeinsamen Konsensusmotivs

Wesentlichen liegen alle gemessenen Dissoziationskonstanten im mittleren nanomolaren Bereich. Dadurch lag die Vermutung nahe, dass sich alle drei Sequenzen über das ermittelte Konsensusmotiv 2 einen weitaus größeren Bereich teilen. Um dieser Frage nachzugehen wurde erneut ein Sequenzvergleich durchgeführt. Es konnte ein erweitertes Konsensusmotiv identifiziert werden (siehe Abb. 4.8).

4.1.7 Sekundärstrukturvorhersage

Nach der Charakterisierung der Monoklone in Filterbindungsstudien sollten die Sekundärstrukturen von K11, K91 und K103 *in silico* berechnet werden. Hierfür wurde der Algorithmus von M.Zuker¹¹⁷ angewendet, um die energetisch niedrigste Konformation der RNA-Aptamere zu finden. Da der gegenseitige Einfluss von ein- und zweiwertigen Metallionen auf die RNA-Faltung noch nicht vollkommen verstanden ist, wurden mfold Berechnungen nur in Anwesenheit von 1 M NaCl bei 37 °C durchgeführt. Vor allem bei K11 und K91 liegen die konstanten Primerbindungsregionen basengepaart vor, was vermuten lässt, dass sie keinen bedeutenden Einfluss auf die Zielstrukturbindung haben (siehe Abb. 4.9). Diese Beobachtung kann bei der großen Mehrheit von *in vitro* selektierten Aptameren gemacht werden.¹¹⁸ Ebenfalls sehr ähnlich liegen die Basen des Konsensusmotivs bei K91 und K11 innerhalb einer Stamm-Schleife-Struktur ungepaart vor – im Kontrast zur K103-Struktur. Die erhaltenen Strukturvorhersagen sind insofern wichtig, als dass sie die Basis für Verkürzungsexperimente (siehe 4.1.9) waren.

4.1.8 K91

Die *in vitro* Selektion ist mit dem DPHH-Konstrukt von Tiam1 durchgeführt worden, damit stellte sich die Frage, ob das Aptamer K91 neben seiner höchsten Affinität aller getesteten Monoklone ebenfalls spezifisch an die katalytische DH-Domäne bindet oder die C-terminale PH-Domäne erkennt. Zuerst sollte die Spezifität untersucht werden, dabei war es von großem Interesse, ob K91 die sehr homologe DH-Domäne des Rho-GEFs Vav1 erkennt. Durch eine Bindungsstudie mit His₆-S7-Arno (Cytohesin-2) war zum einen die Affinität/Spezifität zu nicht verwandten Guaninnukleotid-Austauschfaktoren, in diesem Fall Arf-GEFs, bestimmbar und zum anderen konnte

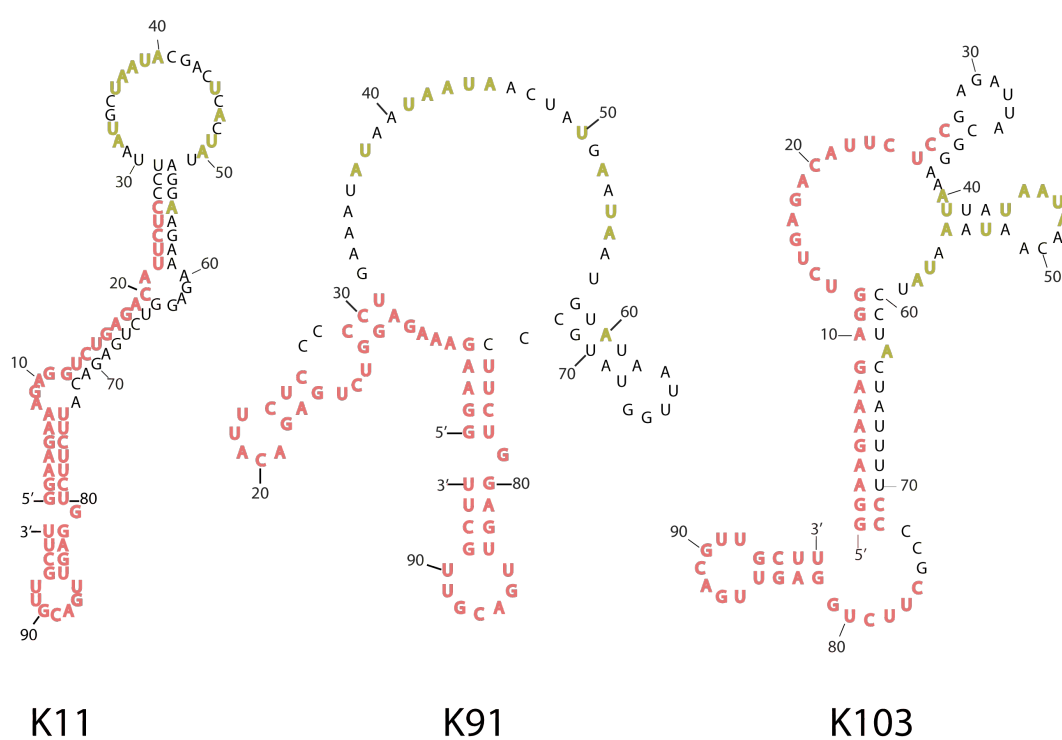


Abbildung 4.9: mfold *in silico* Sekundärstrukturvorhersage von K11, K91 und K103. Rot gekennzeichnet sind die konstanten Primerregionen. Die identischen Positionen des gemeinsamen Sequenzmotivs 2A wurden grün markiert.

4. ERGEBNISSE

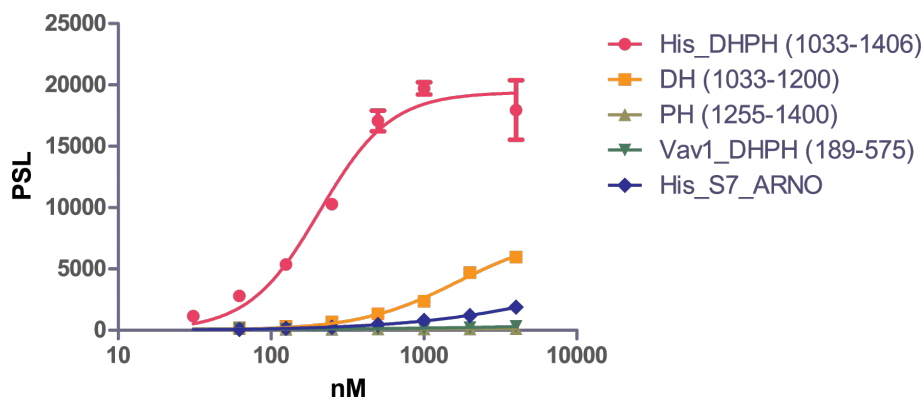


Abbildung 4.10: Filterbindungsexperimente zur Bestimmung der Spezifität der K91-Tiam1₁₀₃₃₋₁₄₀₆-Interaktion; circa 5 nM des 5'-[³²P]-markierten K91 wurden in jedem Experiment eingesetzt.

der Einfluss des N-terminalen His-tags auf die Bindung von K91 an Tiam1₁₀₃₃₋₁₄₀₆ untersucht werden (siehe Abb. 4.10). Im weiteren Verlauf der Aptamer-Charakterisierung sollte K91 im Tiam1-beschleunigten Guaninnukleotid-Austausch an Rac1 auf Inhibition getestet werden. Deshalb stellte sich die Frage, ob das Aptamer im Stande ist den Komplex aus GTPase und Austauschfaktor bzw. die GTPase allein zu binden.

Auf der Grundlage der Spezifitätsmessungen konnte der Beweis erbracht werden, dass K91 spezifisch Tiam1₁₀₃₃₋₁₄₀₆ bindet und dabei gleichzeitig zwischen dem homologen Rho-GEF Vav1 diskriminiert. Weiterhin kann durch die signifikant verringerte Bindung von K91 an Tiam1₁₀₃₃₋₁₄₀₆ in Anwesenheit der GTPase Rac1 ein Bindungs epitop an der Kontaktfläche der beiden Proteine in Betracht gezogen werden (siehe Abb. 4.11).

4.1.9 K91 Minimalmotiv

Durch die Länge von 94 nt besitzt das Aptamer K91 eine molare Masse von circa 31 kDa, die Massendifferenz zum Zielprotein Tiam1₁₀₃₃₋₁₄₀₆ mit 45 kDa ist dadurch klein. Um das Aptamer als Werkzeug zur Identifizierung von niedermolekularen Substanzen einzusetzen, sind in einem Aptamer-Verdrängungsexperiment, das auf Fluoreszenzpolarisation basiert, signifikante Massendifferenzen zwischen den Bindungspartnern nötig. Der kleinere, Fluorophor-markierte Ligand muss eine möglichst große Änderung seiner Rotationsgeschwindigkeit nach der Bindung erfahren.

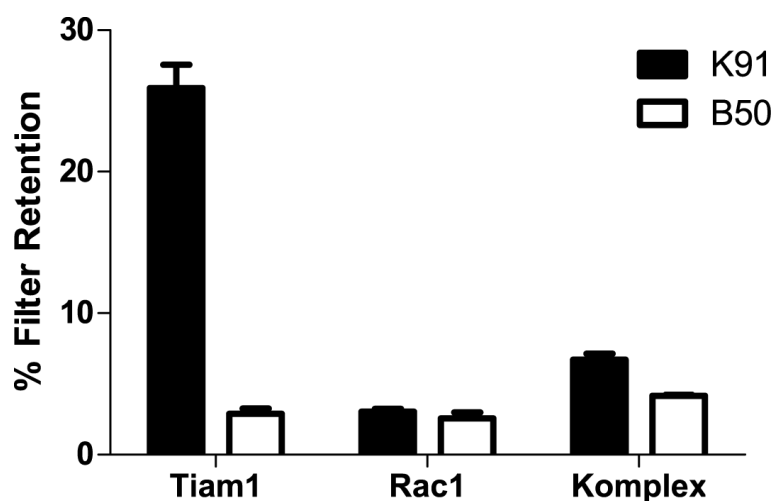


Abbildung 4.11: Filterbindungsexperiment mit konstanten Proteinkonzentrationen von jeweils $1 \mu\text{M}$; 5nM $5'$ - ^{32}P -markiertes K91 wurde in jedem Experiment eingesetzt.

Ein erfolgreiches Fluoreszenzpolarisationsexperiment ist mit den Größenverhältnissen (31/45 kDa) sehr unwahrscheinlich. Aus diesem Grund wurde auf Grundlage der *in silico* berechneten Strukturen das Aptamer verkleinert. Dies geschah durch PCR mit entsprechend veränderten Primerpaaren aus der Vollängensequenz der K91 DNA. Die beiden energieärmsten Konformationen von K91 sind so verkürzt worden, dass die zentralen Stammregionen (siehe Abb. 4.12) als wichtige Strukturelemente der Bindung erhalten geblieben sind. Alle verkürzten Sequenzen wurden nach der $5'$ -Dephosphorylierung mit γ - ^{32}P -ATP kinasiert und über ein PAGE-Gel aufgereinigt. Die ermittelten K_D -Werte basieren auf mind. 2 unabhängigen Filterbindungsanalysen mit circa 5-10 nM $5'$ - ^{32}P -markierter RNA. Wie erwartet hat die $3'$ -Verkürzung um 14 nt in Faltung 1A kaum Einfluss auf die Affinität zu Tiam1. Überraschend hat die Deletion der kompletten Stammregion III (Faltung 2A) ebenfalls keinen Einfluss auf die Bindungsaffinität von K91 zu Tiam1. Im Gegensatz kommt es jedoch durch Deletion der Stammregion I bis U38 zum 4fachen Affinitätsverlust. Eine weitere Verkürzung bis U41 führt zum kompletten Wegfall der Bindung. Es lässt sich zusammenfassen, dass K91 bei analoger Affinität zu Tiam1₁₀₃₃₋₁₄₀₆ bis auf 67 nt verkürzt werden kann (Faltung 2A).

4. ERGEBNISSE

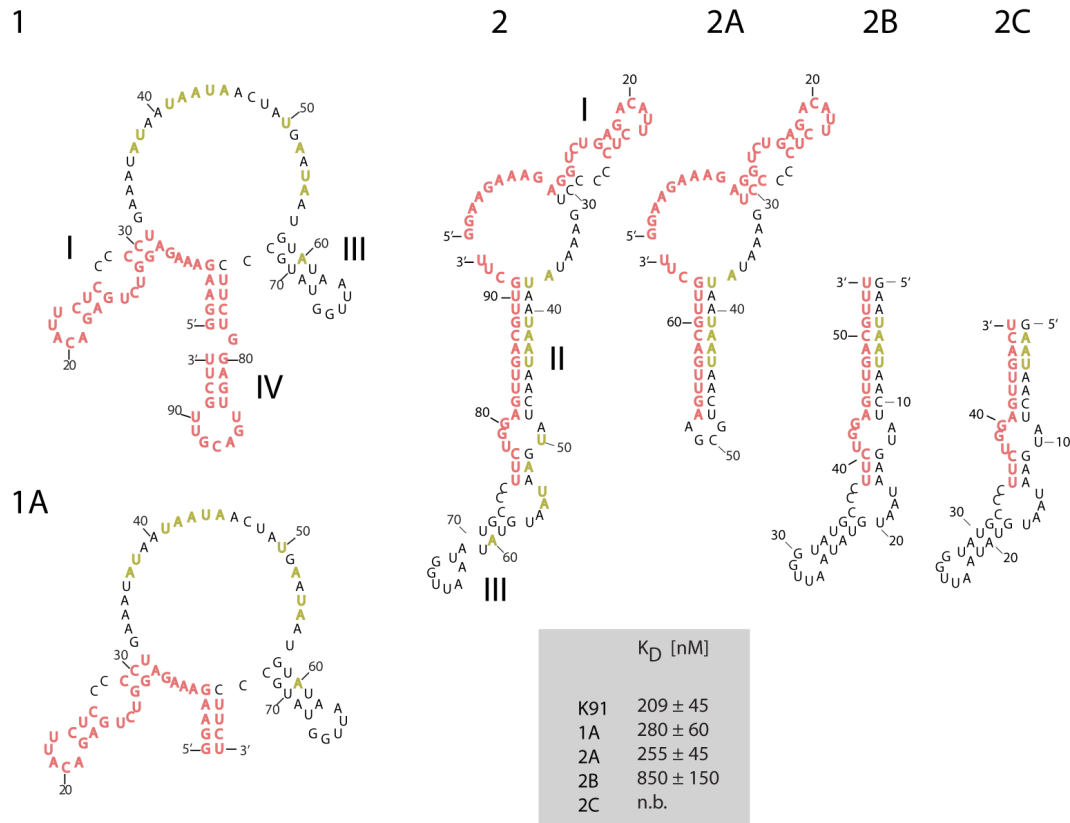


Abbildung 4.12: Übersicht der *in silico* berechneten energieärmsten Faltungen 1 + 2 des Aptamers K91; Faltung 1 besitzt insgesamt drei Stammstrukturen: I, III und IV; Faltung 2 hat die gleichen Stammstrukturen I und III, besitzt jedoch zusätzlich Stamm II; Basierend auf den *in silico* Berechnungen wurde das Aptamer folgendermaßen verkürzt: Struktur 1 wurde am 3'-Ende um 14 Nukleotide verkürzt (1A); von Struktur 2 wurde Stamm I deletiert (2B), bzw. zusätzlich Stamm II verkürzt (2C), des Weiteren wurde eine Struktur ohne Stamm III mit einem GPNR-Tetraloop am Ende der Stammstruktur II generiert. Dunkelrot: konstante Primerregionen, dunkelgrün: invariable Nukleotide des Konsensusbereichs der Klone K11, K91 und K103. n.b.: nicht bindend.

4.1.10 Einfluss der Aptamere K11, K91 und K103 auf den Tiam1-beschleunigten Nukleotidaustausch

Die Beschleunigung des Nukleotidaustauschs an der GTPase Rac1 durch Tiam1_{1033–1406} lässt sich über Fluoreszenzmessungen mit 3′-/2′-Methylantraniloyl-markiertem GDP (mantGDP) nachverfolgen.¹¹⁹ Dabei kommt es nach Assoziation des markierten Nukleotids zu einer Erhöhung der mant-Fluoreszenz. Es konnte gezeigt werden, dass die Modifizierung an der 3′-bzw. 2′-Position der Ribose von Guaninnukleotiden die Aktivität der Reaktionspartner (GTPase, GEF) nicht oder nur minimal beeinflusst.¹²⁰ Für die kinetische Untersuchung des GEF-katalysierten Nukleotidaustauschs wird häufig die GTPase mit dem markiertem Nukleotid vorbeladen. Durch die Zugabe eines hohen molaren Überschusses an nicht-markiertem Nukleotid kann formal eine niedrigere Reaktionsordnung angenommen werden, da die Rückreaktion der Reassoziierung von markiertem Nukleotid vernachlässigbar ist. Die intrinsische Austauschaktivität von Rac1 ist mit einer Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{off}) von $0,7 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$ sehr langsam.¹¹⁵ Sie lässt sich durch einen 50fachen molaren Überschuss von Tiam1_{1033–1406} auf $36 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$ steigern. Da für die Charakterisierung der Aptamere eine möglichst kleine Konzentration an Tiam1_{1033–1406} eingesetzt werden sollte, um im Aptamerüberschuss arbeiten zu können, machte die sehr langsame Kinetik eine zuverlässige Bestimmung von Aptamereffekten unmöglich. Es wurde daraufhin die Isoform Rac2 für alle Austauschmessungen verwendet, die mit einer intrinsischen Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten von $1,2 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$ ähnlich langsam wie Rac1 austauscht, jedoch kann durch Zugabe eines 50fachen molaren Überschusses von Tiam1_{1033–1406} eine 138fache Erhöhung des k_{off} beobachtet werden.¹¹⁵ Zuerst wurden Dissoziationsmessungen von mantGDP-beladenem Rac2 (Rac2*mGDP) durchgeführt. Alle Messungen fanden aufgrund der besseren Sensitivität an einem Fluoreszenz-Spektrometer (PerkinElmer LS55) statt. Zu Beginn musste ein vernünftiger Konzentrationsbereich von Tiam1_{1033–1406} und Rac2*mGDP gefunden werden, der eine Charakterisierung der Aptamere ermöglicht. Konzentrationen von 100 nM Rac2*mGDP und 700 nM Tiam1_{1033–1406} ergaben für die Dissoziationsexperimente ausreichende Signalunterschiede. Tiam1 konnte unter diesen Bedingungen die intrinsische k_{off} um den Faktor 4 erhöhen. Im Anschluss sollte der Einfluss der Aptamere auf den Tiam1-beschleunigten Nukleotid-Austausch untersucht werden. Vor

4. ERGEBNISSE

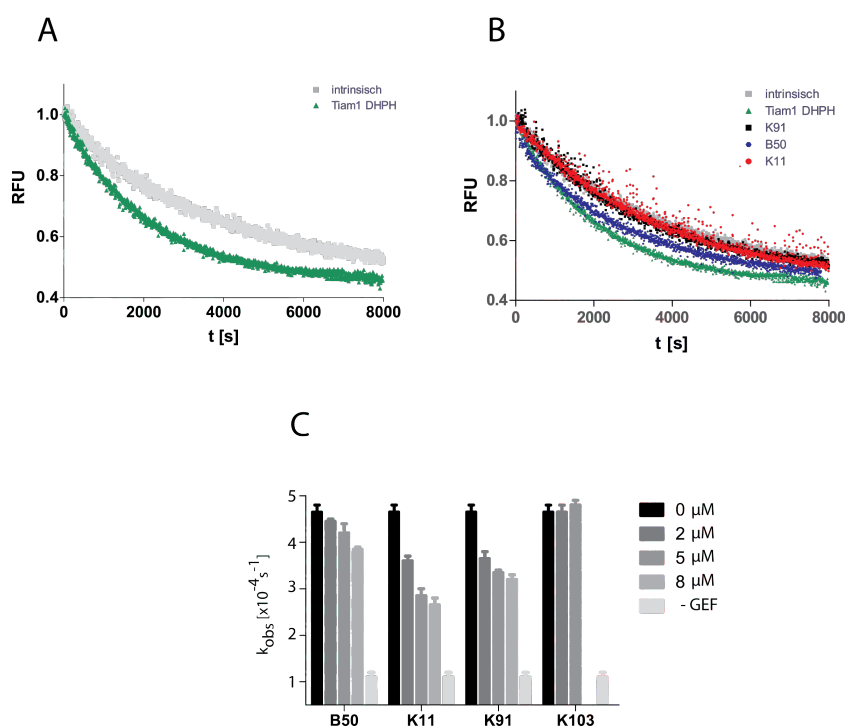


Abbildung 4.13: Tiam1-beschleunigter Nukleotidaustausch. **(A)** Intrinsischer Nukleotidaustausch von 100 nM Rac2*mGDP und Tiam1-beschleunigter (770 nM); **(B)** Tiam1-beschleunigter (770 nM) Nukleotidaustausch in Anwesenheit von 8 μM B50 RNA-Bibliothek, K11, K91 und K103 und 50 μM GTP; **(C)** die durch eine exponentielle Kurvenanpassung erhaltenen Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{obs} .

der Messung musste jedoch sichergestellt werden, dass die Aptamere im Austauschpuffer (30 mM Tris, 50 mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, pH 7,8) an Tiam1_{1033–1406} binden. Durch Filterbindungsexperimente konnten keine signifikanten Affinitätseinbußen zum Selektionspuffer (1x PBS, 3 mM $MgCl_2$, pH 7,6) festgestellt werden. Des Weiteren stellte ein RNase-Test die Integrität der eingesetzten Aptamere sicher.

Die in Abbildung 4.13 aufgeführten Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten lassen für die Aptamere K11 und K91 eine konzentrationsabhängige Abnahme bis 8 μM erkennen. Eine ebenfalls leicht abnehmende Tendenz ist bei der B50 Bibliothek als unspezifische Negativkontrolle zu erkennen. Einzig Klon K103, der als spezifischer Tiam1_{1033–1406}-Binder mit einer K_D von circa 350 nM gefunden wurde, beeinflusst den Guaninnukleotid-Austausch nicht. Auch wenn im Dissoziationsexperiment ein inhibierender Einfluss auf den Tiam1-beschleunigten Austausch durch K11 und

K91 nachweisbar war, so sind die absoluten Werte der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten sehr klein. Zusätzlich zeigt die nicht-bindende B50 Kontrolle einen schwachen inhibitorischen Effekt. Damit ein Aktivitätsverlust von Rac2 während des Beladens mit mantGDP ausgeschlossen werden konnte, sind alle Aptamere ebenfalls in einem Tiam1-beschleunigtem Assoziationsexperiment von mantGDP an Rac*GDP getestet worden. Im Wesentlichen ist zu erwarten, dass die Geschwindigkeitskonstanten für die Dissoziation und Assoziation bei identischen GTPase Konzentrationen ähnlich groß sind. Diese Tatsache lässt sich durch die langsame Nukleotidfreisetzung als geschwindigkeitsbestimmender Schritt und einer folgenden schnellen Nukleotid-Reassoziierung verstehen (Dr. Aymelt Itzen, persönliche Mitteilung). Für die Assoziation wurden die Konzentrationen von Rac2*GDP auf $2 \mu\text{M}$ vergrößert und für Tiam1_{1033–1406} auf 220 nM verringert. Somit ließen sich die eingesetzten Aptamere in einem kleineren Konzentrationsbereich untersuchen. MantGDP lag mit 400 nM im Überschuss zur GTPase vor. Die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} sind in Abbildung 4.14 aufgeführt. Die intrinsische Geschwindigkeitskonstante k_{obs} wurde zu $13 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt und ist somit um den Faktor 10 größer als die gemessene Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{off} mit $1,2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Dies ist nicht verwunderlich, da die eingesetzte Rac2*GDP Konzentration mit $2 \mu\text{M}$ 20fach höher war als Rac2*mGDP im Dissoziationsexperiment. Derweil erhöhte Tiam1_{1033–1406} die gemessene k_{obs} um den Faktor 7 auf $88 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

4.1.11 Zusammenfassung Tiam1_{1033–1406} Aptamere

Im vorangegangenen Kapitel ist der Einfluss der gegen Tiam1_{1033–1406} selektierten Aptamere auf den Guaninnukleotid-Austausch untersucht worden. Dabei zeigte sich ein inhibitorischer Effekt auf die Tiam1-beschleunigte Dissoziation von vorbeladenem Rac2*mGDP sowie der Assoziation von mantGDP an Rac2*GDP. Es ist daher davon auszugehen, dass die beiden Aptamere K11 und K91 neben ihrer spezifischen Bindung an Tiam1_{1033–1406} dessen GEF-Aktivität inhibieren. Da das Aptamer K91 den größten inhibitorischen Effekt im Assoziationsexperiment zeigte und ferner den niedrigsten K_D -Wert aller Klone besaß, sollte es für alle weiteren Studien verwendet werden. Im Rahmen eines chemisch-biologischen Ansatzes stellen Aptamere vielseitige Werkzeuge dar, um Zielstrukturen zu untersuchen. Oft lassen sich selektierte

4. ERGEBNISSE

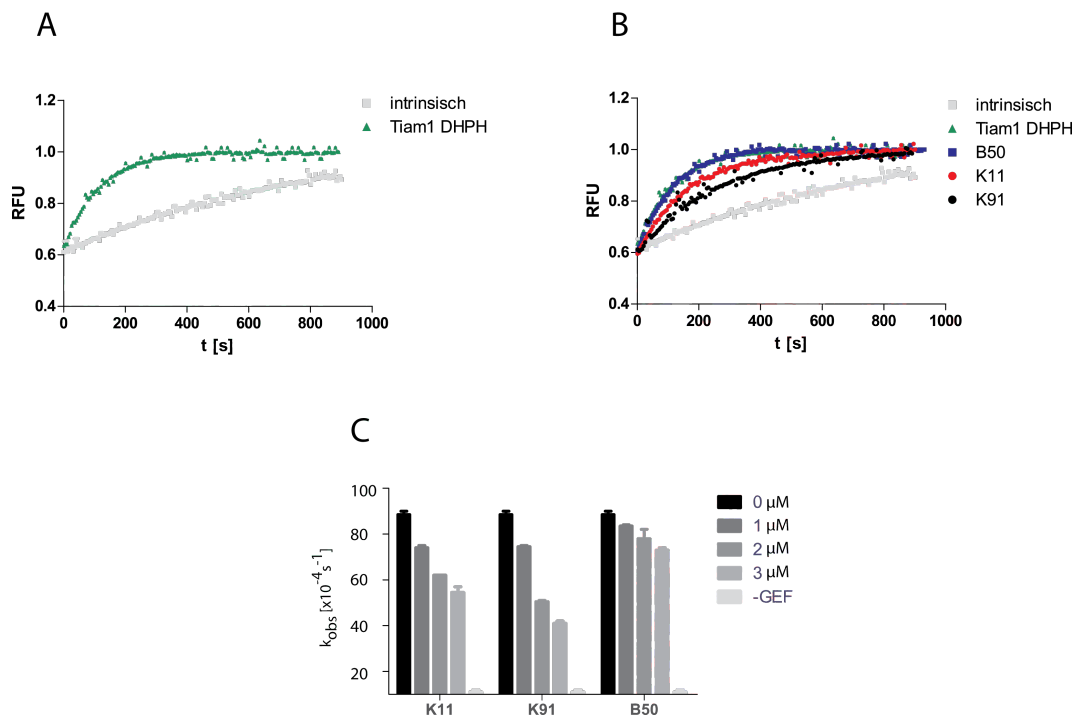


Abbildung 4.14: Tiam1-beschleunigte Assoziation von mantGDP an Rac2*GDP; **(A)** Intrinsische und Tiam1-beschleunigte (220 nM) Assoziation von mantGDP (400 nM) an Rac2*GDP (2 μM) **(B)** Tiam1-beschleunigte (220nM) Assoziation von mantGDP (440 nM) an Rac2*GDP (2 μM) in Anwesenheit von jeweils 3 μM B50 RNA-Bibliothek, K11 und K91; **(C)** Alle Kurven wurden einfach exponentiell ausgewertet und die hieraus erhaltenen k_{obs} dargestellt. Die angegebenen Geschwindigkeitskonstanten sind aus mindestens 2 unabhängigen Messungen gemittelt worden.

Aptamere in Zellkultur-basierten Experimenten anwenden. Als so genanntes Intramer (**Intrazelluläres Aptamer**) können sie durch Interaktion und Inhibition des Zielproteins weitere *downstream*-Effekte verursachen. Ein Nachteil der Intramertechnologie ist speziell bei unmodifizierten RNA-Aptameren die Integrität innerhalb der Zelle, da eine Vielzahl an intrazellulären RNA-Abbauwegen existiert.¹²¹ Es ergeben sich häufig Ungereimtheiten über die tatsächliche intrazelluläre Stabilität, auch wenn über RT-PCR-Untersuchungen eine grobe Abschätzung der Halbwertszeit möglich ist. Aus diesem Grund bedient man sich einer weiteren Aptamer-Anwendung: die Verdrängung von der Zielstruktur durch niedermolekulare Substanzen (*small molecules*) eröffnet einen alternativen Weg zum klassischen Aktivitäts-basierten Hochdurchsatzscreening. Die genaue Herangehensweise bei der Etablierung eines Aptamer-Verdrängungsassays ist Gegenstand der folgenden Kapitel.

4.1.12 Aptamer-Verdrängungsassays

Werden Aptamere als Werkzeuge zur Identifizierung von niedermolekularen Substanzen eingesetzt, so wird die Bindung zu ihrem Zielprotein in so genannten Aptamer-Verdrängungsassays als *Read-out* verwendet. Die generelle Machbarkeit konnte mit unterschiedlichen Ansätzen schon mehrfach eindrucksvoll bewiesen werden.^{28,30,15} Es galt nun, auf der Grundlage von etablierten Assayformaten, einen Aptamerverdrängungs-Assay für das Tiam1_{1033–1406}-spezifische Aptamer K91 zu entwickeln und mit diesem eine 18000 Verbindungen zählende Substanzbibliothek nach Hitsubstanzen zu durchsuchen. Den geringsten experimentellen Aufwand erfordert ein Fluoreszenzpolarisations-basierter Aptamer-Verdrängungsassay.³⁰ Das Aptamer wird am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzmarker versehen und durch die Anregung mit polarisiertem Licht kann ein direktes Auslesen der Rotationsgeschwindigkeit erfolgen. Diese ist u.a. abhängig von der Größe des Fluorophor-markierten Biomoleküls und somit außerordentlich gut geeignet, um binäre Komplexbildungen zwischen einem Aptamer-Protein-Paar anzuzeigen. Im Verlauf der Etablierung dieses Systems für K91-Tiam1_{1033–1406} konnten jedoch keine Bedingungen gefunden werden, die ein stabiles Auslesen des Bindungszustandes erlaubten. Vermutlich sind die Größenunterschiede zwischen K91 (31 kDa) und Tiam1_{1033–1406} (45 kDa) zu gering, um einen signifikanten Unterschied in der Fluoreszenz Polarisation zu messen. Aus diesem Grund sollte ein weiterer etablierter Aptamer-Verdrängungsassay getestet wer-

4. ERGEBNISSE

den. Ein ELISA-ähnlicher Ansatz setzt zuerst die Immobilisierung des Zielproteins an Mikrotiterplatten voraus, bevor nach Zugabe der RNA und einem Waschschrift das gebundene Aptamer durch Interkalation des Nukleinsäure-Farbstoffs Ribogreen nachgewiesen werden kann.¹⁵ Ebenfalls gelang es nicht dieses System für das Auslesen einer stabilen K91-Tiam1_{1033–1406}-Bindung zu optimieren. Vermutlich adsorbiert das Protein vorzugsweise in einer suboptimalen Orientierung, sodass die Aptamerbindung verhindert wird. Aufgrund der negativen Befunde musste eine komplett neue Richtung eingeschlagen werden, um die Etablierung eines K91-Tiam1 Aptamer-Verdrängungsassays zu erreichen.

4.1.13 Luminescence Oxygen Channeling als Basis für einen Aptamer-Verdrängungsassay (ADLOC)

Luminescence oxygen channeling ist eine homogene Nanopartikel-basierte Methode, um Interaktionen zwischen immobilisierten Biomolekülen zu detektieren. Der Assay besteht im Wesentlichen aus zwei Komponenten: So genannte Donorbeads verfügen über eine mit Photo-Sensibilisatoren beschichtete Oberfläche, die nach Anregung mit Laserlicht (680 nm) Singulett-Sauerstoff generiert. Dieses energetisch angeregte Sauerstoffmolekül ist nun in der Lage eine Chemilumineszenz auf den so genannten Akzeptorbeads auszulösen, was wiederum durch eine Beschichtung mit einem Gemisch aus Thioxen, Anthracen und Rubren möglich wird. Durch die kurze Lebensdauer von etwa 4 μ s in wässrigem Medium¹²² kann der Singulett-Sauerstoff bis zu 200 nm entfernte Akzeptorbeads erreichen. Um mit diesem System Bindungen nachzuweisen, können verschiedene Funktionalisierungen auf den Donor- und Akzeptorbeads ausgenutzt werden, wie z.B. Streptavidin, GSH, Ni-NTA. Die zu analysierenden Biomoleküle lassen sich über entsprechende Affinitätsanker wie Biotin, GST oder einen Hexahistidinrest koppeln. Im Falle einer Interaktion der Analyten befinden sich beide *Beads* in räumlicher Nähe, sodass der nach Bestrahlung mit 680 nm entstehende Singulett-Sauerstoff auf den Akzeptorbeads eine Lumineszenz auslösen kann.

4.1.14 Etablierung ADLOC

Für den ADLOC (*Aptamer Displacement based on Luminescence Oxygen Channeling*)-Assay wurden Streptavidin-konjugierte Donorbeads und *anti*-FITC IgG konjugierte

Akzeptorbeads eingesetzt. Somit sollte das Protein über einen Biotin-Anker an die Donorbeads und das Aptamer über ein 5'-terminales Fluorescein an die Akzeptorbeads gekoppelt werden. Die Funktionalisierung des 5'-Endes von K91 mit Fluorescein wurde über das Einführen eines GMPS-Starter-Nukleotids am 5'-Ende (siehe 7.3.3) und der anschließenden *in vitro* Kopplung mit 5'-Iodoacetamidofluorescein durchgeführt. Die initialen Experimente bei der Etablierung des LOC-basierten Assays konzentrierten sich auf das Ermitteln der idealen Konzentrationen an Biotin-Tiam1_{1033–1406} und 5'-FITC-K91, um ein möglichst großes Messfenster zur Verfügung zu haben. Es ergeben sich nämlich bei zu geringer oder zu großer Konzentration jedes Analyten entweder eine Unter- oder Übersättigung der Oberfläche der *Beads*, was zu einer dramatisch verringerten Signalthöhe führt (*Hook*-Effekt). Durch Crosstritration von Biotin-Tiam1_{1033–1406} und 5'-FITC-K91 wurden die Konzentrationen für eine maximale Diskriminierung zwischen bindendem K91-Aptamer und der nicht-bindenden B50-Bibliothek ermittelt (siehe Abb. 4.15). Es ergaben sich folgende optimale Konzentrationen: 5'-FITC-K91: 1 nM, Biotin-Tiam1_{1033–1406}: 88 nM. Zusätzlich führte die Erhöhung der Donor- und Akzeptorbeads Konzentration auf 66 µg/mL zu einem deutlich stabileren Signal (siehe Abb. 4.15).

Weiterhin mussten im Hinblick auf ein Hochdurchsatzscreening die Einflüsse von BSA, Tween 20 und Heparin untersucht werden. Bovines Serum Albumin (BSA) trägt dazu bei unspezifische Wechselwirkungen des Proteins und der RNA an der Mikrotiterplattenoberfläche und zwischen den *Beads* zu verringern. Gleichzeitig sollte die Konzentration an BSA jedoch so gering wie möglich gehalten werden, um eine theoretisch mögliche Interaktion mit den Screening-Substanzen zu unterbinden. Es konnte mit einer Konzentration von 0,3 mg/mL BSA (4,8 µM) ein guter Kompromiss gefunden werden (siehe Abb. 4.16). Darüber hinaus sollte im Vorfeld eines jeden Hochdurchsatzscreenings die Verwendbarkeit von nichtionischen Detergenzien wie Tween 20 oder Triton X100 in Erwägung gezogen werden. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass chemische Verbindungen, die in Substanzbibliotheken vorliegen oft durch einen bloßen Aggregationseffekt eine biologische Aktivität zeigen.¹²³ Um dies auszuschließen sollten stets Detergenzien im Screening-Ansatz vorhanden sein. Wie Abbildung 4.16 zeigt wurden Konzentrationen an Tween 20 von 0,001 und 0,01 % (w/v) vom System akzeptiert. Diese Detergenzienkonzentrationen liegen weit unter der kritischen Mizellbildungskonzentration (cmc) von etwa 0,1 % (Wasser).¹²⁴

4. ERGEBNISSE

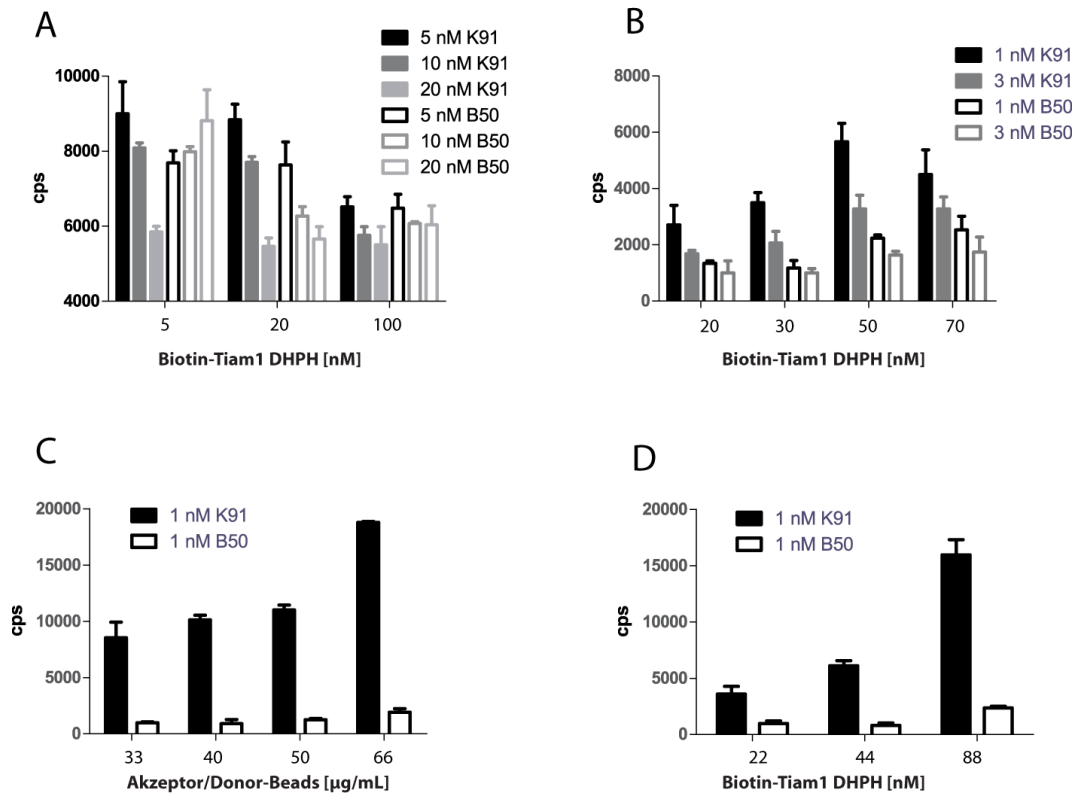


Abbildung 4.15: ADLOC-Crosstitrationsexperimente (A) Annäherungstitration von K91 und Tiam1_{1033–1406} bei einer *Bead*-Konzentration von 40 µg/mL, es lässt sich erkennen, dass tendenziell Aptamer-Konzentrationen kleiner 10 nM und Protein-Konzentrationen kleiner als 100 nM zu einem maximalen Signal führen. (B) Wiederholung der Crosstiteration bei geringerer Aptamer-Konzentration, eine optimale Konzentration liegt somit bei 50 nM Protein und 1 nM Aptamer vor. (C) Titration der *Bead*-Konzentration mit 50 nM Protein und 1 nM Aptamer. Es lässt sich eine Maximierung des Signals bei 66 µg/mL erkennen. (D) Erneute Titration des Proteins bei einer *Bead*-Konzentration von 66 µg/mL. Experimente A und B repräsentieren jeweils 1 Triplikatmessung. 2 unabhängige Messungen sind in C und D dargestellt.

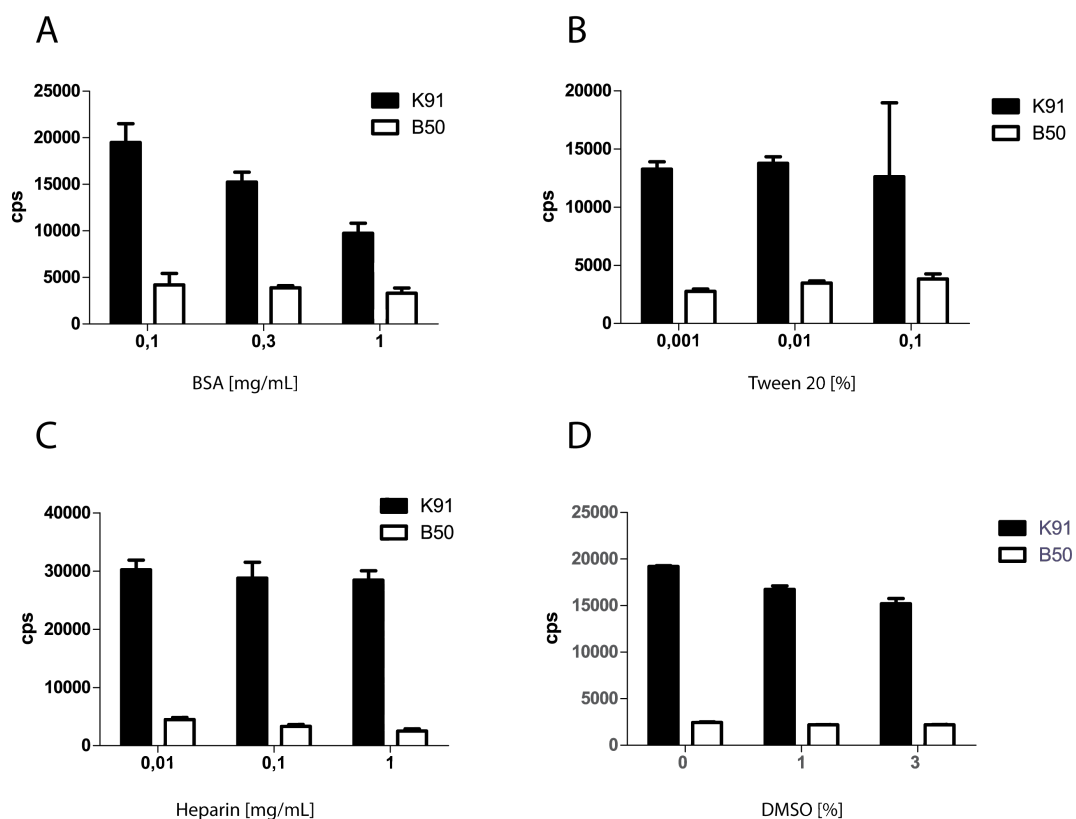


Abbildung 4.16: ADLOC-Optimierungen mit 88 nM Tiam1_{1033–1406}, 1 nM Aptamer und 66 µg/mL Donor- und Akzeptorbeads. (A) Einfluss von BSA zwischen 1 und 0,1 mg/mL auf das LOC-Signal (B) Einfluss von Tween 20 zwischen 0,1 und 0,001 % auf das LOC-Signal (C) Einfluss von Heparin auf das LOC-Signal (D) Einfluss von DMSO auf das LOC-Signal. Alle gezeigten Experimente spiegeln 2 unabhängige Duplikatmessungen wider.

Abschließend galt es rauszufinden, wie tolerant das System auf DMSO reagiert, da alle zu testenden Substanzen in 100 % DMSO vorlagen. Es konnte eine weitgehend stabile Interaktion von Tiam1_{1033–1406} mit K91 bis zu einer Konzentration von 3 % DMSO nachgewiesen werden. Es ist eine möglichst geringe Konzentration an organischem Lösungsmittel angestrebt worden, da Tiam1_{1033–1406} in Filterbindungsstudien und Austauschexperimenten bei hohen DMSO-Konzentrationen (10 %) deutliche Aktivitätseinbußen zeigte.

4.1.15 Durchführung ADLOC im Hochdurchsatz

Die Arbeitskreis eigene 18000 Verbindungen zählende Substanzbibliothek, die den Lipinski-Regeln für wirkstoffähnliche Strukturen gehorchte,¹²⁵ sollte mit ADLOC auf spezifische Tiam1₁₀₃₃₋₁₄₀₆-Inhibitoren durchsucht werden. Das Screening wurde in zwei Abschnitte eingeteilt, im ersten (13000 Verbindungen) lag die Endkonzentration der Substanzen bei 10 μM in 1 % DMSO. Im zweiten Abschnitt erhöhte sich die Substanzkonzentration auf 30 μM in 3 % DMSO. Alle Substanzen sind im Vorfeld auf eine Konzentration von 1 mM in 100 % DMSO verdünnt worden, es befanden sich jeweils 80 bzw. 88 Substanzen auf einer *96well* Mikrotiterplatte. Diese wurde innerhalb von 2h von -80 °C auf Raumtemperatur gebracht. Ein Tecan Freedom Evo Pipettierroboter vermischte 3 μL Substanz der Mutterplatte mit 97 μL 1x Screening-Puffer. Anschließend wurden jeweils 5 μL Substanzverdünnungen aus insgesamt 4 Substanzplatten auf die ersten 22 Spalten einer 384 Poxiplatte pipettiert. Die letzten beiden Spalten sind mit jeweils 5 μL 1x Screening-Puffer + 3 % DMSO aufgefüllt worden. Danach wurden 5 μL eines frisch verdünnten Tiam1/K91-Mixes in die ersten 23 Spalten pipettiert, die letzte Spalte beinhaltet die Tiam1/B50-Negativkontrolle zur Bestimmung des z' -Wertes. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die in 1x Screening-Puffer vorgemischten Beads lichtgeschützt hinzupipettiert und die gesamte Platte mit einer Folie luftdicht verschlossen. Es erfolgte vor der 2 stündigen Inkubationsphase bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss eine 1 minütige Zentrifugation bei 1000 x g in der Plattenzentrifuge. Vor dem Messvorgang im Plattenleser Berthold Mithras LB 940 wurde die Screening-Platte für 10 min im Gerät bei 25 °C vorinkubiert. Die Messung im AlphaScreen-Modus erfolgte bei einer Anregungs- und Emissionsdauer von 0,5 s. Für jede Platte wurde aus 16 Einzelmessungen der Positiv (DMSO)- und Negativ (B50 Bibliothek)-Kontrolle der z' -Wert bestimmt. Die erhaltenen Werte variierten zwischen 0 und 0,6. Bei suboptimalen Werten ($z' < 0,5$) erfolgte eine zweite Messung nach einer über Nacht Inkubation. Alle Substanzen, die ein Signal kleiner gleich 40 % des Ausgangssignals der Positivkontrolle zeigten, wurden als Hit klassifiziert. Diese Grenze entsprach, je nach z' -Wert, einer Verringerung des Signals um 3 bis 5 Standardabweichungen der Positivkontrolle. Eine exemplarische Auswertung ist in Abbildung 4.17 gezeigt.

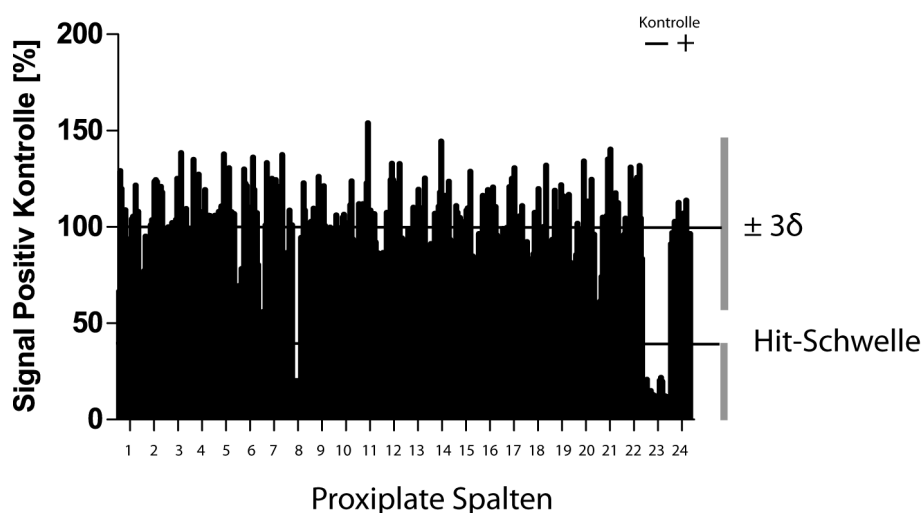


Abbildung 4.17: Exemplarische 384well-Platte des ADLOC Hochdurchsatzscreenings, Spalte 1-22 ist mit Testsubstanzen befüllt, Spalten 23+24 beinhalteten die 16 Positiv- und Negativkontrollen, die definierte HITSchwelle lag bei 40 % des Ausgangssignals der Positivkontrolle, die 3fache Standardabweichung der Positivkontrolle ist unter $\pm 3\sigma$ eingezeichnet worden, in Spalte 8 lässt sich eine Hitsubstanz erkennen.

Im zweiten Screening-Abschnitt wurden 5000 Verbindungen mit einer erhöhten Konzentration von $30\ \mu\text{M}$ in 3 % DMSO getestet. Das Pipettierprotokoll wurde insofern geändert, dass die RNA zuerst zu den Verbindungen hinzupipettiert wurde und somit kein Vormischen des Proteins mit der RNA mehr stattfand. Eine Übersicht beider Protokolle kann unter 7.6.3 nachgelesen werden.

4.1.16 Screening-Ergebnis

Für die ersten 13000 Verbindungen ergaben sich 63 Primärhits, die das LOC-Signal um mehr als 60 % reduzierten. Des Weiteren wurden 59 Verbindungen in die engere Auswahl einbezogen, die $\pm 5\%$ auf der HITSchwelle lagen. Im zweiten Screeningabschnitt konnten insgesamt 137 Primärhits aus 5000 Verbindungen identifiziert werden, die die Signalhöhe um 60 % verringerten. Da sich durch das kleine Volumen des Assayaufbaus bereits kleinste Pipettierungenauigkeiten stark auf das Signal auswirken, sind alle gefundenen Substanzen erneut auf ihre Inhibition per Hand nachgetestet worden. Erwartungsgemäß zeigten circa 70 % aller Hits in diesem ersten Validierungsexperiment keine Aktivität mehr.¹²³

4. ERGEBNISSE

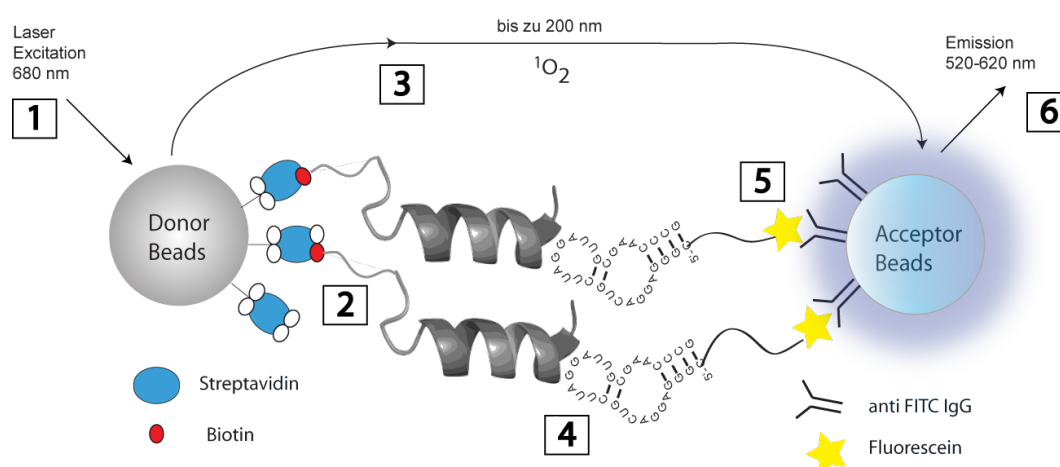


Abbildung 4.18: Identifizierung von LOC-spezifischen Falsch-Positiven und deren Häufigkeit; (1) Substanzen, die mit der Anregungswellenlänge von 680 nm interferieren; sehr selten (2) Biotin-Mimetika sind ebenfalls in der Lage das LOC-Signal zu beeinflussen; sehr selten (3) Singulett-Sauerstoff Quencher können speziell bei höheren Substanzkonzentrationen problematisch werden; selten (4) Neben den Hitverbindungen sind Falsch-Positive vorstellbar, die das Aptamer binden. Weiterhin gehören Proteasen- bzw. RNAsen-kontaminierte Substanzproben zu der am häufigsten gefundenen Klasse von Falsch-Positiven; häufig (5) Substanzen mit einer hohen Affinität zu den *anti-FITC* IgG-funktionalisierten Akzeptorbeads; selten (6) farbige Substanzen, die mit dem Messwellenlängenbereich von 520-620 nm interferieren, sind durch ihre Farbigkeit schnell zu identifizieren; selten.

4.1.17 Eliminierung von Falsch-Positiven

Um Primärdaten von Screening-Artefakten zu befreien, müssen unter anderem Falsch-Positive Substanzen identifiziert werden. Falsch-Negative Primärhits sind ebenfalls problematisch, jedoch ist deren Eliminierung im vorgestellten LOC-basierten Hochdurchsatzexperiment schlichtweg unmöglich.

Es wurden nun Schritt für Schritt alle identifizierten Hitsubstanzen auf mögliche Interferenzen mit dem Assaysystem untersucht (siehe Abb. 4.18). Substanzen, deren Eigenemission mit der Messwellenlänge zusammenfiel (6, Abb. 4.18), konnten über die Farbigkeit (blau) identifiziert, sowie durch die Benutzung des AlphaScreen TruHits-Pakets verifiziert werden. Dieses beinhaltet Streptavidin-Donorbeads und biotinylierte Akzeptorbeads, die sofort nach dem Mischen interagieren und einen Streptavidin-Biotin-Komplex ausbilden, der ein sehr starkes LOC-Signal generiert.

Durch die Anwesenheit einer Verbindung, die mit der Emissionwellenlänge interferiert, fällt das Signal konzentrationsabhängig. Es fielen insgesamt 6 Verbindungen durch ihre blaue Farbe aus der KR-Bibliothek auf, bei denen eine Interferenz mit der Emissionswellenlänge stattfindet (KR1:16-F11; KR1:16-G11; KR1:16-H11; KR1:17-A2; KR1:17-B2; KR1:17-C2). Verbindungen, die durch eine rote Farbe potentiell mit der Anregung bei 680 nm interferieren wurden nicht gefunden. Eine Vorinkubation der Streptavidin-Donorbeads aus dem TruHits Paket mit den gefundenen Primärhits lassen potentielle Biotin-Mimetika (2, Abb. 4.18) auffallen, da diese Bindungsstellen am Streptavidin besetzen und somit nach dem Hinzufügen der biotinylierten Akzeptorbeads zu einer deutlichen Signalverringerng führen. Es wurden ebenfalls keine Biotin-Mimetika identifiziert. Verbindungen, die mit den Akzeptorbead-Konjugaten *anti*-FITC-IgG interagieren sind ebenfalls denkbar (5, Abb. 4.18). Sie lassen sich relativ leicht durch Inkubation von FITC-konjugierten Donorbeads mit *anti*-FITC-IgG-konjugierten Akzeptorbeads identifizieren (*FITC Detection Kit*). Es wurde hierbei eine Verbindung in der Substanzbibliothek gefunden (cg1:2-A10). Der nach der Anregung der Donorbeads entstehende Singulett-Sauerstoff kann ebenfalls mit Substanzen wechselwirken und zu einem schnelleren Übergang in den Triplettzustand führen. Substanzen dieser Interferenzklasse stechen nicht durch Farbigekeit ins Auge, sie lassen sich jedoch mit Hilfe des TruHits-Pakets aussortieren. Nach der Vorinkubation der Donor-und Akzeptorbeads führen diese Verbindungen zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme des Messsignals. Es konnten insgesamt 5 starke Singulett-Sauerstoff Quencher in der Substanzbibliothek gefunden werden (cg1:28-G2; cg5:28-A2; cg5:28-B2; cg5:28-F2, cg5:28-H2). Die letzte Klasse von möglichen Interferenzsubstanzen (4, Abb. 4.18) bezieht sich auf von außen eingebrachte Verunreinigungen. Hierbei sind vor allem Proteasen und RNasen zu nennen, die eine Signalreduktion bewirken, indem sie einen der Interaktionspartner abbauen. Durch die sehr geringe RNA-Konzentration von 1 nM sind besonders RNasen eine gefährliche Quelle für Falsch-Positive, da sie ubiquitär sind und im Prinzip nur durch eine ständige Präsenz von RNase Inhibitoren eliminiert werden können. Die Identifizierung von RNasen im Screening-Ansatz lässt sich entweder über eine Inkubation von kleinen Mengen (20 pmol) RNA mit der verdünnten Substanz und einer anschließenden Analyse im Agarose-Gel durchführen, oder durch eine Vorinkubation der Substanz mit circa 20 U RNasin und einem anschließendem LOC-Experiment beweisen (siehe Abb. 4.19).

4. ERGEBNISSE

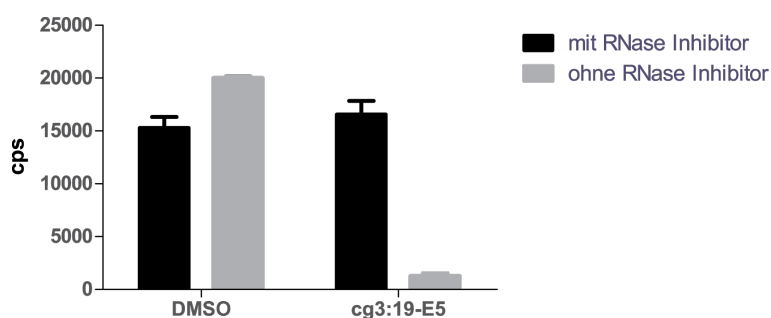


Abbildung 4.19: RNase-kontaminierte Substanzverdünnung wurde mit RNase-Inhibitor inkubiert und anschließend im LOC-Assay vermessen, Konzentrationen: 88 nM Biotin-Tiam1_{1033–1406}, 1 nM 5'-Fluorescein-K91, 66 µg/mL *Bead-Mix*, 1 % DMSO.

Es stellte sich heraus, dass die Kontamination mit RNasen die bei weitem häufigste Falsch-Positiv-Quelle gewesen ist. Insgesamt fielen 17 Substanzverdünnungen durch eine RNase-Kontamination auf, die während des Verdünnens in die Substanz gelangt sein müssen, da beim Testen der unverdünnten Bibliothekssubstanz keine Aktivität beobachtet wurde.

4.1.18 Tiam1-beschleunigter Guaninnukleotid-Austausch zur Validierung der Hitsubstanzen

Nachdem 29 Substanzen als Falsch-Positive auffielen, sollten die verbliebenen Hits in einem *in vitro* Guaninnukleotid-Austauschassay untersucht werden. Analog zur Aptamercharakterisierung wurden Assoziationsexperimente mit Fluoreszenz-markierten Guaninnukleotiden durchgeführt. Da die Bibliothekssubstanzen nur in kleinen Mengen vorhanden sind, mussten alle funktionalen Tests in Mikrotiterplatten stattfinden. Anstelle von mantGDP wurde BodipyGDP^{126,127} eingesetzt, das durch einen fast sechsmal höheren Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 96000 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ im Vergleich zur mant-Gruppe, zu intensiveren Fluoreszenzsignalen führt. Zusätzlich lässt sich BodipyGDP im sichtbaren Bereich anregen (488 nm), was zur Folge hat, dass sich potentiell weniger Interferenzeffekte durch UV-aktive Substanzen ergeben. Das Bodipy-Fluorophor ist ebenfalls über die 2'-/3'-Position der Ribose gekoppelt. Um die Assoziation von mantGDP und BodipyGDP vergleichen zu können, wurden die k_{obs} unter identischen Bedingungen berechnet (siehe Abb. 4.20). Zusätzlich erfolgte

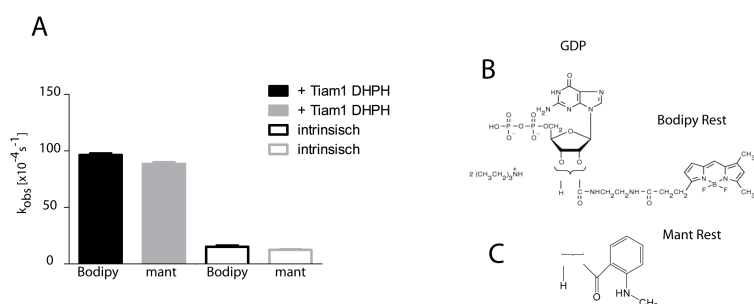


Abbildung 4.20: Tiam1-beschleunigte Assoziation von mantGDP bzw. BodipyGDP an Rac2, **(A)** Berechnete k_{obs} aus zwei unabhängigen Messungen der Tiam1_{1033–1406}-beschleunigten Nukleotid-Assoziation von 400 nM mantGDP/BodipyGDP an 2 μ M Rac2*GDP **(B)** Struktur BODIPY® FL 2’-/3’-O-(N-(2-aminoethyl)urethan) **(C)** Struktur mantGDP 2’-/3’-O-(N’-Methylantraniloyl)guanosine-5’-O-diphosphat.

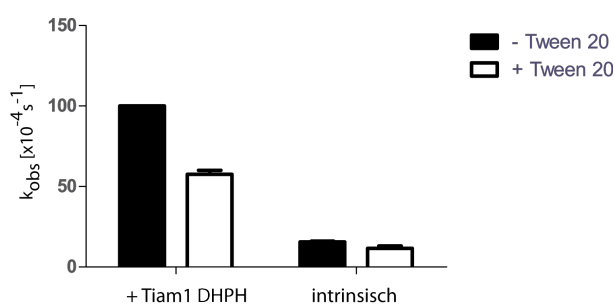


Abbildung 4.21: Einfluss von 0,001 % Tween 20 auf die k_{obs} der Tiam1-beschleunigten Assoziation von BodipyGDP an Rac2*GDP.

eine Messung in Anwesenheit von 0,001 % Tween 20, um die Stabilität des Nukleotid-Austauschs in Anwesenheit von Detergenzien zu bestimmen. Die Vergleichsmessungen offenbarten ähnlich große Geschwindigkeitskonstanten für mantGDP und BodipyGDP, sodass sich die Verwendung von BodipyGDP nicht nachteilig auswirken sollte. Der Zusatz von 0,001 % Tween 20 führte indes zur 30 %igen Verringerung der Geschwindigkeitskonstante der BodipyGDP-Assoziation. Trotz der Aktivitätseinbußen sollte Tween 20 bei der Untersuchung der Hits eingesetzt werden, da sich dadurch Substanzen, die durch eine unspezifische Aggregation die Enzymreaktion inhibieren, leichter aussortieren lassen.¹²³

Um einen Überblick der Inhibitionseigenschaften der Hits zu bekommen, wurden alle Substanzen bei 100 μ M (1 % DMSO, 0,001 % Tween 20) getestet. Es stell-

4. ERGEBNISSE

te sich dabei heraus, dass 80 % (30) keinen Effekt im funktionalen Assay zeigten. Sechs Verbindungen führten zu einer Verringerung der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten um 20 %. Bei zwei Substanzen konnte eine höhere Inhibition des Guaninnukleotid-Austauschs beobachtet werden. In der folgenden Auflistung aller getesteten Hitsubstanzen werden die gemessenen LOC-Signale des Screenings in Klammern mit aufgeführt.

- **Kein Effekt im Austauschexperiment bei 100 μM :** cg1:23-A4 (15 %), cg1:24-C3 (47 %), cg2:11-B3 (45 %), cg2:11-H6 (46 %), cg3:7-H3 (49 %), cg3:19-B9 (39 %), cg3:23-A3 (35 %), cg4:17-H7 (35 %), cg4:26-G2 (43 %), cg4:29-A9 (38 %), cg6:2-A5 (15 %), cg6:15-F6 (15 %), cg1:20-A1 (47 %), cg1:28-G2 (42 %), cg3:11-A3 (46 %), cg3:16-A11 (43 %), cg1:22-A7 (49 %), cg2:8-B3 (50 %), cg2:13-G8 (47 %), cg2:27-B3 (46 %), cg3:2-E9 (47 %), cg3:12-G11 (50 %), cg3:21-A7 (43 %), cg4:4-H5 (48 %), cg4:9-B3 (50 %), cg4:10-D8 (50 %), cg4:11-H9 (47 %), cg4:15-A10 (46 %), cg4:23-G10 (48 %), cg4:31-F10 (49 %)
- **20 %ige Verringerung k_{obs} bei 100 μM :** cg1:1-E7 (49 %), cg1:24-E11 (48 %), cg2:3-H2 (50 %), cg3:11-A3 (46 %), cg4:24-G10 (48 %), cg5:5-B9 (29 %)
- **> 40 %ige Verringerung k_{obs} bei 100 μM :** cg2:4-B3 (50 %), cg4:7-E2 (56 %)

Nachdem 2 Substanzen identifiziert wurden, die eine Inhibition größer gleich 40 % bei 100 μM zeigten, sollte der IC_{50} -Wert abgeschätzt werden.

Für die Verbindung cg2:4-B3 konnte eine IC_{50} von $60 \pm 5 \mu\text{M}$ ermittelt werden. Die IC_{50} von cg4:7-E2 wurde zu $100 \pm 12 \mu\text{M}$ bestimmt. Nach der Charakterisierung in einem Fluoreszenz-basierten Nukleotidaustausch, sollte weiterführend untersucht werden, inwieweit die Verbindungen in der Lage sind das gebundene K91 in einem Filterbindungsexperiment zu verdrängen. Um dieser Frage nachzugehen, sind 1 nM 5'-[^{32}P]-K91-Aptamer und 1 μM Tiam1₁₀₃₃₋₁₄₀₆ mit steigenden Konzentrationen der Hitsubstanzen inkubiert und filtriert worden (siehe Abb. 4.23).

Es konnte gezeigt werden, dass die Verbindungen cg2:4-B3 und cg4:7-E2 in der Lage sind in einem LOC-unabhängigen Experiment das Aptamer vom Protein zu verdrängen, wobei bei cg4:7-E2 der Effekt nur marginal zu sein scheint.

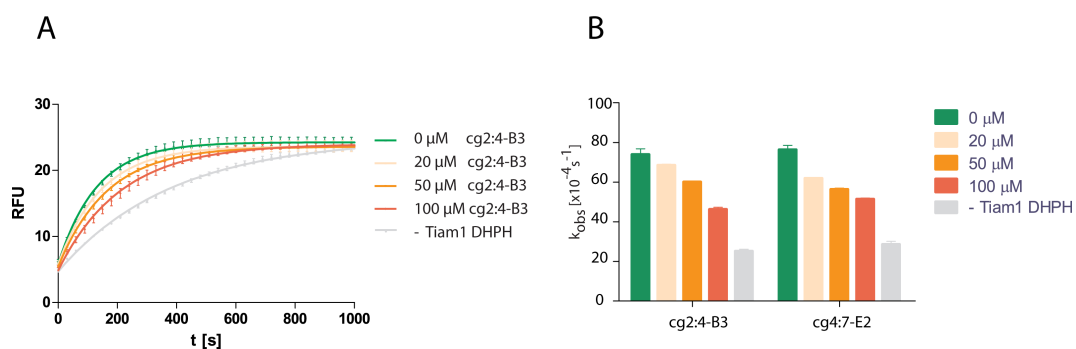


Abbildung 4.22: Tiam1-beschleunigte Assoziationsreaktion von BodipyGDP an Rac2*GDP bei steigenden Substanzkonzentrationen. Die erhaltenen k_{obs} -Werte wurden zur Abschätzung eines IC_{50} -Wertes für cg2:4-B3 und cg4:7-E2 verwendet. **(A)** Tiam1-beschleunigte Assoziation von BodipyGDP an Rac2*GDP mit steigender Konzentration von cg2:4-B3. **(B)** Übersicht der berechneten Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} der Tiam1-beschleunigten Assoziation von BodipyGDP an Rac2*GDP. Alle Reaktionen fanden bei einer konstanten DMSO-Konzentration von 1% statt. (n=2)

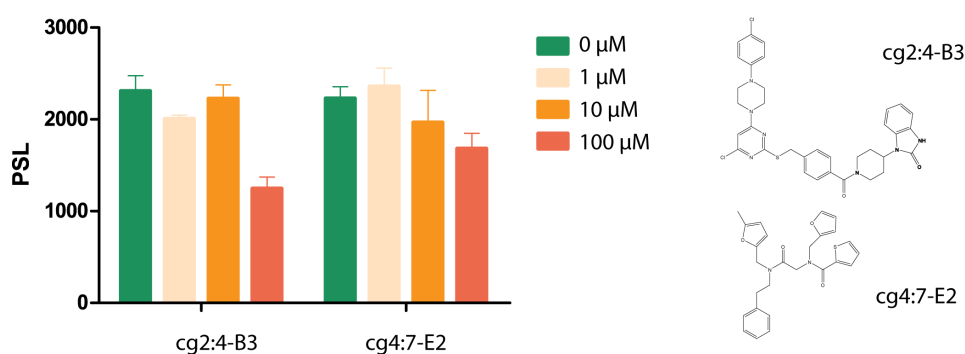
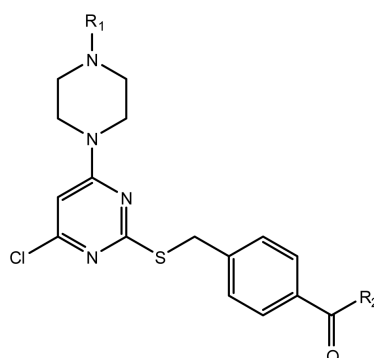


Abbildung 4.23: Kompetitive Filterbindung von K91 mit Tiam1_{1033–1406} in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen an cg2:4-B3 und cg4:7-E2, alle Experimente fanden bei 1% DMSO und 0,001% Tween 20 statt. Die Ergebnisse sind in 2 unabhängigen Filterbindungen bestätigt worden.

4.1.19 Struktur-Wirkungs-Beziehungen der identifizierten Hits

Um einzelne Strukturelemente der gefundenen Substanzen miteinander vergleichen zu können und ihren Beitrag zur Aktivität im Guaninnukleotid-Austauschassay zu ermitteln, wurde eine Suche nach verwandten Strukturen innerhalb der Substanzbibliothek durchgeführt. Des Weiteren konnte durch die Diplomarbeit von Barbara Albertoni¹²⁸ auf die freie Säure der Verbindung cg2:1-D9 zurückgegriffen werden, die im Rahmen eines Screenings gegen die PAZ-Domäne aus dem menschlichen Argonaute Protein identifiziert worden ist. Die Auflistung in der folgenden Abbildung ist nicht vollständig, sie soll jedoch verdeutlichen welche funktionelle Gruppen für die Aktivität essentiell sind. Es kann davon ausgegangen werden, dass die freie Säurefunktion ($R_2=OH$) für die Aktivität im Guaninnukleotid-Austausch mit verantwortlich ist (siehe Abb. 4.24). Unabhängig vom Rest R_1 inhibieren alle Säuren die Tiam1-Austauschaktivität. Ferner muss davon ausgegangen werden, dass die Bibliotheksverbindung cg2:4-B3 mit der freien Säure verunreinigt sein muss. Die neu synthetisierte Verbindung cg2:4-B3 zeigte eine erheblich geringere Inhibition als die Bibliotheksverbindung cg2:4-B3 im Austauschassay. Zusätzlich war die neu synthetisierte freie Säure von cg2:4-B3 ebenfalls in der Lage den Nukleotidaustausch zu inhibieren. Die zweite Hitstruktur cg4:7-E2 ist aufgrund der deutlich geringeren Inhibitionseigenschaften nur mit einer weiteren strukturell sehr ähnlichen Bibliotheksverbindung verglichen worden. Es ließ sich zeigen, dass der Rest R_1 aromatisch sein muss, denn ein Austausch mit Tetrahydrofuran führt zum Aktivitätsverlust (siehe Abb. 4.25).



	R ₁	R ₂	GNE
cg2:4-B3 (synthetisiert)			
cg2:4-B3, freie Säure (synthetisiert)			
cg2:1-D9, freie Säure (synthetisiert)			
cg2:4-C4 (Bibliothek)			
cg2:4-B4 (Bibliothek)			
cg2:1-C9 (Bibliothek)			
cg2:4-A3 (Bibliothek)			
cg2:4-A3, freie Säure (synthetisiert)			
cg2:4-A3, Amid mod. (synthetisiert)			

Abbildung 4.24: Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Hitsubstanz cg2:4-B3; GNE: Guaninnukleotid-Austausch, grüner Balken: IC₅₀ < 60 μM, gelber Balken: IC₅₀ < 100 μM, roter Balken: keine Aktivität im Guaninnukleotid-Austausch messbar. Substanzen, bei denen eine Neusynthese erfolgte, sind entsprechend gekennzeichnet.

4. ERGEBNISSE

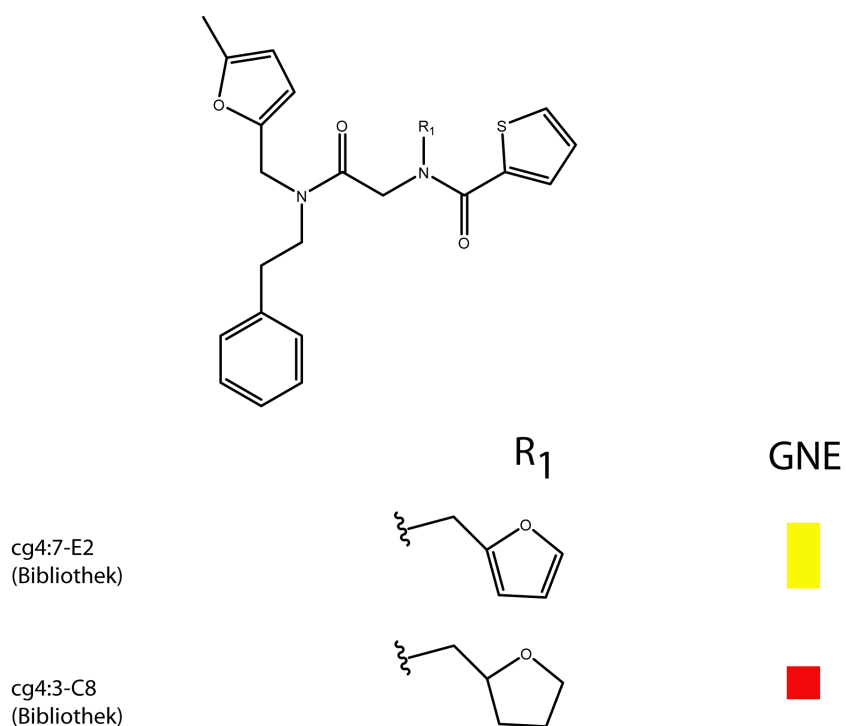


Abbildung 4.25: Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Hitsubstanz cg4:7-E2; GNE: Guaninnukleotid-Austausch, gelber Balken: $IC_{50} < 100 \mu M$, roter Balken: keine Aktivität im Guaninnukleotid-Austausch messbar.

4.2 Vav1

4.2.1 Vav1 als Zielprotein einer *in vitro* Selektion

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit stand das Protein Vav1 im Fokus einer Aptamers Selektion. Vav1 gehört ebenfalls zur Klasse der Rho-GEFs, die sich durch eine DH-PH-Tandemdomäne auszeichnen. Es wird in hämatopoetischen Zellen exprimiert und ist dort besonders wichtig bei der T-Zell Entwicklung und Funktion.⁹⁴ Durch den modularen-Aufbau des Proteins besitzt Vav1 zusätzlich GEF-unabhängige Funktionen, die durch die Protein-Protein Interaktionsdomänen SH2 und SH3 vermittelte Adaptorfunktion soll exemplarisch genannt werden.^{129,130} Vav1 besitzt mit Vav2 und Vav3 zwei weitere Isoformen, die jedoch ubiquitär exprimiert werden. Eine Aptamers Selektion gegen die DH-Domäne von Vav1 ist insofern sehr interessant, da spezifisch bindende und GEF-inhibierende Aptamere die Möglichkeit eröffnen den Einfluss der Guaninnukleotid-Austauschaktivität auf die vielfältigen Funktionen von Vav1 zu untersuchen.

Die *in vitro* Selektion sollte gegen die funktionale GEF-Domäne von Vav1 durchgeführt werden. Die isolierte DH-Domäne muss jedoch im 50fachen Überschuss gegenüber der GTPase vorliegen, um im *in vitro* Nukleotid-Austausch eine Beschleunigung zu beobachten.¹³¹ Eine Erklärung liefert das Fehlen der Zinkfingerregion, da diese einen erheblichen Einfluss auf die Stabilisierung der DH-Domäne während des Nukleotid-Austauschs ausübt.⁸⁶ Da der Erfolg einer Aptamers Selektion im Vorfeld nicht bestimmt werden kann,¹⁵ sollten mehrere Selektionen gegen unterschiedliche GEF-Konstrukte parallel stattfinden. Es sind deshalb folgende Konstrukte aus *E.coli* aufgereinigt worden: Ein C-terminal Strep-*tag* markiertes Konstrukt Vav1₁₇₀₋₃₇₇, das die regulatorische Aminosäure Tyr174 enthält. Die C-terminal Strep-*tag* markierte isolierte DH-Domäne: Vav1₁₈₁₋₃₇₇. Das dritte Konstrukt Vav1₁₈₉₋₅₇₅ umfasste die DH-PH-ZF-Domänen und wurde als N-terminales GST-Fusionsprotein aufgereinigt. Des Weiteren wurden 200 μ g Vav1₁₇₀₋₃₇₇ durch eine Phosphorylierung von Tyr174 mit der Src-Kinase aktiviert, im Text als Vav* gekennzeichnet.

4.2.2 Expression und Aufreinigung der Vav1-Konstrukte

Die aufgereinigten Proteine Vav1₁₇₀₋₃₇₇ und Vav1₁₈₁₋₃₇₇ wurden freundlicherweise von Waldemar Kolanus (LIMES Institut, Molekulare Immunologie, Universität

4. ERGEBNISSE

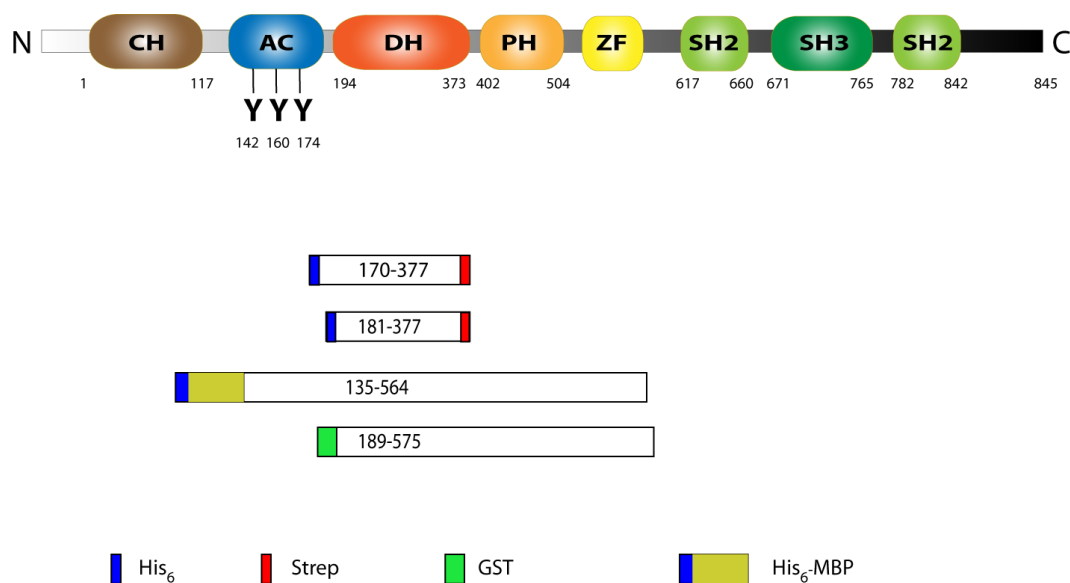


Abbildung 4.26: Vav1: Domänen und verwendete Konstrukte: **CH:** Calponin-homolog, **AC:** Acidic region, **DH:** Dbl homolog, **PH:** Pleckstrin homolog, **SH2:** Src homolog 2, **SH3:** Src homolog 3; die Aminosäuren-Nummerierung basiert auf dem UniProt KB-Datensatz P15498.

Bonn) zur Verfügung gestellt. Durch den C-terminalen Strep-tag, der eine Affinität von $2,7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ zu Streptavidin zeigt,¹³² musste kein Biotinanker *in vitro* eingeführt werden. Die Kopplung an die Streptavidin-Dynabeads (siehe 7.5.3) konnte somit direkt erfolgen. Das Konstrukt Vav1_{189–575} ist aus der menschlichen Vav1 cDNA durch eine PCR (siehe 7.3.1) herausamplifiziert und über BamHI/EcoRI in einen pGEX-TEV Vektor inkloniert worden (siehe 7.3.8). Es musste zusätzlich die Mutation M351T eingeführt werden, um die Ausbeute an löslichem Protein während der Expression in *E.coli* merklich zu erhöhen.¹³³ Die GEF-Aktivität bleibt von dieser Mutation unbeeinflusst. Der Expressionsvektor wurde schließlich in BL21 (DE3) Tuner Zellen transformiert. Die Expression wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,6 mit 0,2 mM IPTG induziert und für 20 h bei 22 °C fortgesetzt. Nach Zellaufschluss (siehe 7.4.3) und Zentrifugation unlöslicher Bestandteile wurde der lösliche Überstand über eine GSH-Affinitätschromatographie aufgereinigt (siehe 7.4.4). Der GST-Tag wurde über Nacht proteolytisch (TEV-Protease) abgespalten. Der abgetrennte Affinitätsanker konnte über eine zweite GSH-Affinitätsäule entfernt werden. Nach der abschlie-

ßenden Ni-NTA-Affinitätssäule, durch die eine Abtrennung von His₁₀-TEV gelang, wurde Vav_{189–575} biotinyliert, an Dynabeads gekoppelt (siehe 7.5.3) und bei 4 °C zwischengelagert.

4.2.3 SELEX-Bibliothek

Die *in vitro* Selektion fand mit der B50 Bibliothek statt (siehe 4.1.4).

4.2.4 Das Selektionsschema

Vor dem ersten Selektionsszyklus wurde die Affinität der RNA-Bibliothek zu den Zielproteinen Vav_{170–377}, Vav1*_{170–377}, Vav_{181–377} und Vav_{189–575} in einem Filterbindungsexperiment mit intern [³²P]-markierter RNA (siehe 7.3.2) untersucht. Für die isolierten DH-Konstrukte sind schwache Filterretentionen im Konzentrationsbereich 0-2 µM festgestellt worden. Jeweils 200 µg Protein wurden an 500 µL Streptavidin-Dynabeads gekoppelt (siehe 7.5.3). Die Selektion ist im ersten Zyklus mit einem 4fachen Überschuss RNA zu Protein begonnen worden. Die genauen Bedingungen für jeden Zyklus sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst. Die detaillierte Beschreibung der *in vitro* Selektion ist dem Abschnitt 7.5 zu entnehmen. Dadurch, dass auf eine PAGE-Aufreinigung der *in vitro* Transkription verzichtet wurde, war es möglich bis zu 3 Zyklen pro Tag zu durchlaufen und die gesamte Selektion innerhalb einer Woche zu beenden.

Tabelle 4.2: Selektionsbedingungen für Vav_{170–377} / Vav1*_{170–377} / Vav_{181–377}, n.b.: nicht bestimmt.

Zyklus	pmol Protein	pmol RNA	Waschschritte	PCR Zyklen
1	250	1000	2x 150 µL	10/10/10
2	250	n.b.	2x 200 µL	12/12/12
3	250	n.b.	3x 200 µL	12/12/17
4	250	n.b.	4x 200 µL	12/12/16
5	250	n.b.	5x 200 µL	12/12/16
6	250	n.b.	5x 200 µL	12/12/16
7	250	n.b.	5x 200 µL	12/12/16
8	250	n.b.	5x 200 µL	10/15/10
9	250	n.b.	5x 200 µL	8/10/8
10	250	n.b.	5x 200 µL	9/9/9
11	250	n.b.	5x 200 µL	8/8/9

4. ERGEBNISSE

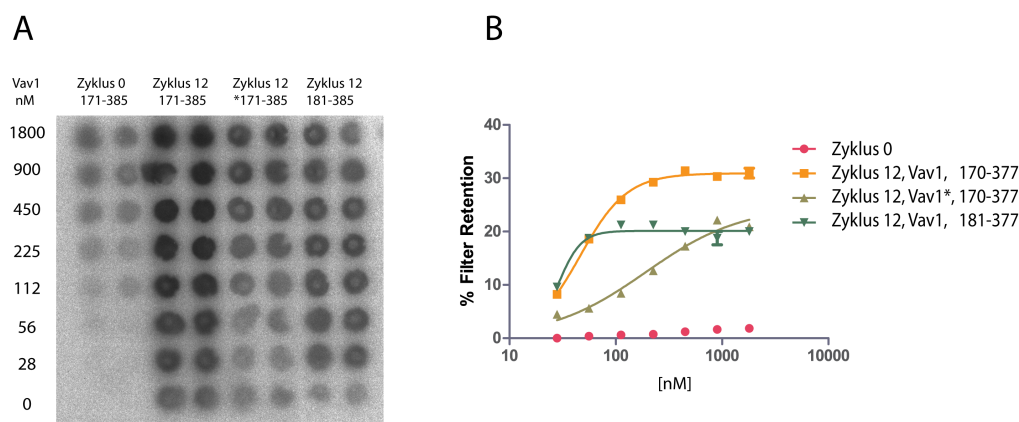


Abbildung 4.27: Filterbindungsanalyse der Vav1-Selektionen; **A:** intern [^{32}P]-markierte RNA der angegebenen Selektionsrunden wurde auf Bindung an das entsprechende Vav1-Konstrukt untersucht. **B:** Logarithmische Darstellung der in A erhaltenen Filterretentionen.

– Fortsetzung Selektionsbedingungen –

Zyklus	pmol Protein	pmol RNA	Waschschritte	PCR Zyklen
12	250	n.b.	5x 200 μL	7/8/9

Durch eine Filterbindungsanalyse mit intern [^{32}P]-markierter RNA konnte die Anreicherung von bindenden Sequenzen für Vav1_{170–377}, Vav1*_{170–377}, Vav1_{181–377} nach 12 Zyklen bestätigt werden (siehe Abb. 4.27). Im Gegensatz ließ sich keine Anreicherung für das Zielprotein Vav1_{189–575} beobachten (Daten nicht gezeigt). Die RT-PCR-Amplifikate des 12. Zyklus der drei erfolgreichen Selektionen wurden über TA-Überhänge in den Vektor pCR2.1 TOPO inkloniert und sequenziert (siehe 7.2.14).

4.2.5 Charakterisierung der Monoklone

Insgesamt sind 60 Monoklone aus 3 erfolgreichen Selektionen sequenziert, *in silico* verglichen¹¹⁶ und in Sequenzfamilien eingeteilt worden. Für die Filterbindungsstudien mussten alle Klone aus dem Klonierungsvektor herausamplifiziert werden (siehe 7.3.1). Die *in vitro* Transkription fand in Anwesenheit von [^{32}P]-GTP statt, sodass die intern-markierten Sequenzen direkt im Filterbindungsexperiment getestet und klassifiziert werden konnten. Die Analyse der Selektion gegen Vav1_{170–377} ergab 6 Klone

mit einer Affinität kleiner als $1 \mu\text{M}$. Für das phosphorylierte Konstrukt Vav1*_{170–377} konnte hingegen nur eine einzige Sequenz mit einer Affinität kleiner $1 \mu\text{M}$ gefunden werden. Ähnlich sah das Ergebnis für das kürzeste Konstrukt Vav1_{181–377} aus. Auch hier sind nur 2 Sequenzen in die engere Auswahl gekommen. Eine Übersicht aller erhaltenen Klone gibt Abbildung 4.28.

Anschließend erfolgte eine genaue Bestimmung der Affinität und Spezifität der affinsten Monoklone. Hierfür wurden die RNA Sequenzen V7, V16, V20, V21, V22, P10 und 11 am 5'-Ende dephosphoryliert und mit γ -[³²P]-ATP radioaktiv markiert. Wiederum sind Filterbindungsexperimente mit circa 1 nM markierter RNA und mehreren Kontrollproteinen durchgeführt worden. Die Spezifitätsuntersuchungen fanden bei einer konstanten Proteinkonzentration von $2 \mu\text{M}$ statt. Die Bindung der Kontrollproteine wurde als vernachlässigbar gewertet, wenn eine Filterretention von maximal 1/10 des Zielproteins bei der gegebenen Konzentration von $2 \mu\text{M}$ bestimmt werden konnte. Wie sich herausstellte, wies Klon V20 eine sehr geringe Filterretention von 2 % unter Sättigungsbedingungen mit Vav1_{170–377} auf. Es konnte somit nicht sichergestellt werden, dass V20 eine spezifische Bindung zeigt, was zum Ausschluss dieser Sequenz führte. Ebenfalls musste Klon P10 aussortiert werden, da sich die Gesamtretention unter Sättigungsbedingungen für Vav1_{170–377} und Vav1*_{170–377} von Streptavidin nicht unterschied. Eine nahezu quantitative Bindung an Vav1_{170–377} und Vav1_{181–377} konnte für Klon V22 beobachtet werden. Durch die ebenfalls hohe Bindung an die DH-Domäne von Tiam1 musste auch dieser Klon als spezifischer Vav1-DH-Binder ausscheiden. V7, der eine Gesamtretention von 50 % für Vav1_{170–377} und Vav1_{181–377} zeigte, fiel jedoch durch eine starke Bindung an die RasGEF-Domäne von RalGDS auf. Übrig blieben die Klone V16, V17, V21 und 11, die eine spezifische Bindung an das Selektions-*target* Vav1 zeigten. Die ermittelten K_D -Werte für die spezifischen Sequenzen sind in Abbildung 4.30 aufgeführt, sie lagen alle im mittleren nanomolaren Bereich.

4.2.6 Vergleich der Aptamere und *in silico* Sekundärstrukturberechnung

Da alle Aptamere eine ähnliche Affinität zu Vav1_{170–377} zeigten, lag die Vermutung nahe, dass sie ein Konsensusmotiv teilen. Es konnte durch einen Sequenzvergleich mit dem MEME-Webserver¹¹⁶ ein 10 Nukleotide langer C-reicher Bereich ermittelt werden, der von allen Klonen geteilt wird. Darüber hinaus stelle sich die Frage, ob

4. ERGEBNISSE

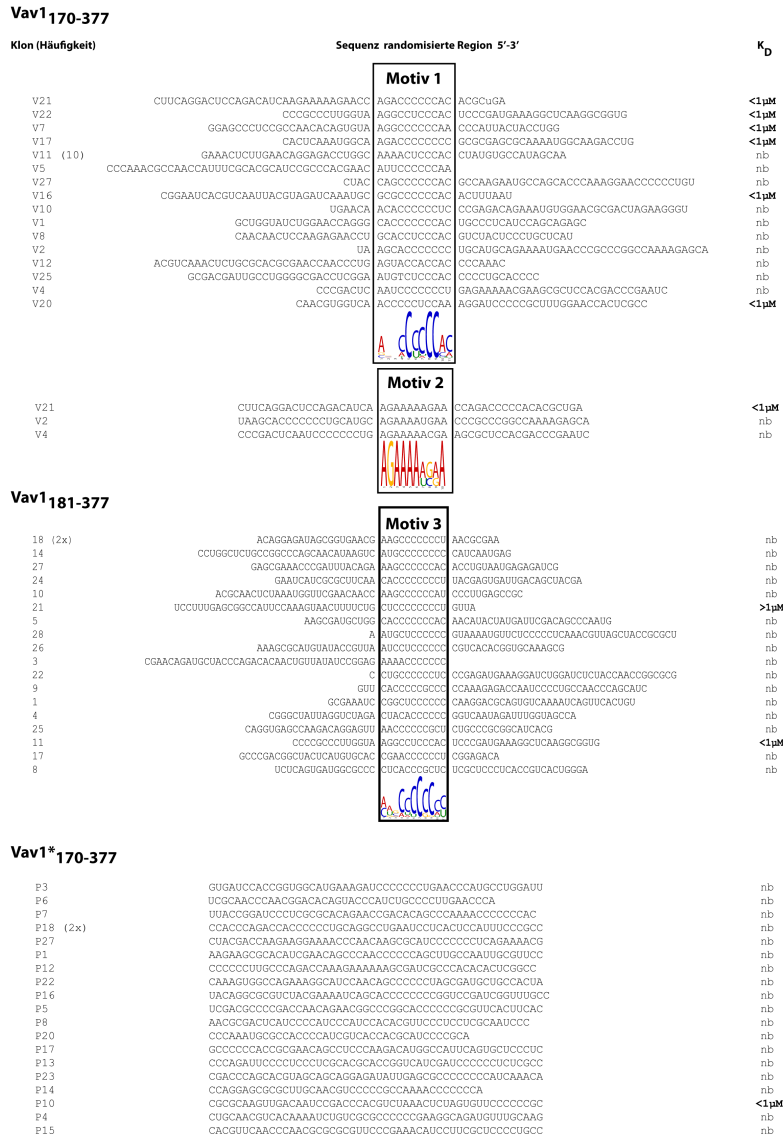


Abbildung 4.28: Übersicht aller sequenzierten Monoklone der Vav1-Selektions. Die Häufigkeit sowie eine Einteilung in Konsensusmotive und eine erste Abschätzung der Affinität nach einem Filterbindungsexperiment von intern [³²P]-markierten Sequenzen ist angegeben. nb = nicht bestimmbar im Konzentrationsbereich 0–2 µM.

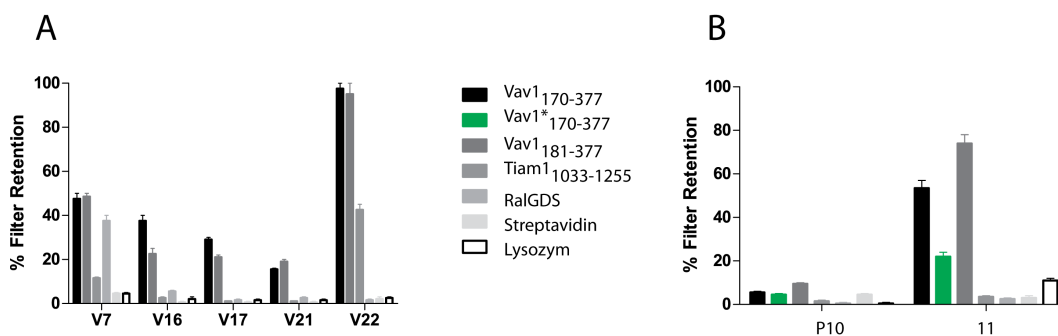


Abbildung 4.29: Die Spezifität der affinsten Monoklone für Vav1 wurde bei einer konstanten Proteinkonzentration von 2 μM untersucht. **(A)** Normierte Filterretentionen der eingesetzten Monoklone aus der Vav1₁₇₀₋₃₇₇-Selektion. **(B)** Normierte Filterretentionen der eingesetzten Monoklone aus der Vav1₁₈₁₋₃₇₇- und Vav1*₁₇₀₋₃₇₇-Selektion. (n=2)

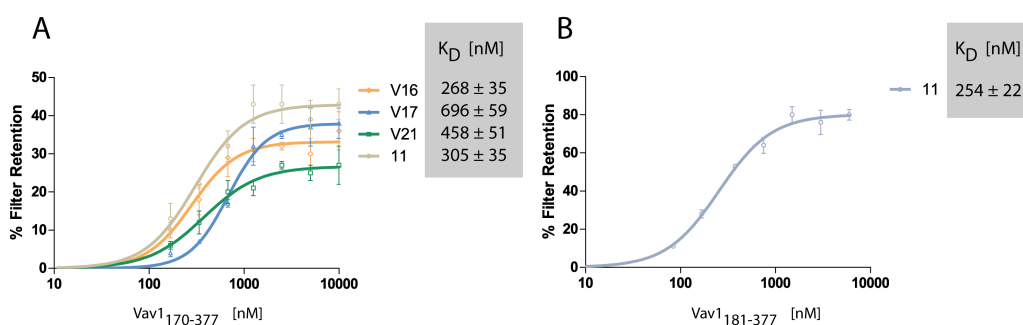


Abbildung 4.30: K_D -Wert-Bestimmung der Vav1-Aptamere **(A)** Aptamere der Vav1₁₇₀₋₃₇₇-Selektion und des Klons 11 **(B)** Aptamer der Vav1₁₈₁₋₃₇₇-Selektion. (n=3)

dieses Motiv bei der Bildung von Sekundärstrukturen beteiligt ist, d.h. ob es einzelsträngig oder Basen gepaart vorliegt. Abermals wurde eine *in silico* Faltungsanalyse der RNA durchgeführt. Der von M.Zucker entwickelte Algorithmus¹¹⁷ berechnet die energieärmste Konformation unter definierten Bedingungen: 1 M NaCl, 37 °C. Die energetisch günstigsten Faltungen sind in Abbildung 4.31 dargestellt.

4.2.7 Charakterisierung der Monoklone im Nukleotid-Austauschassay

Die isolierte DH-Domäne von Vav1 ist nicht in der Lage den Guaninnukleotid-Austausch an der Rho-GTPase Rac1 zu beschleunigen. Zur vollständigen Aktivität müssen die C-terminale PH- und ZF (Zinkfinger)-Domäne vorhanden sein, da diese die DH-Domäne während der Interaktion mit Rac1 stabilisieren.^{85,133}

Für die Guaninnukleotid-Austauschexperimente konnte somit nicht das für die Selektion eingesetzte Konstrukt Vav1₁₇₀₋₃₇₇ bzw. Vav1₁₈₁₋₃₇₇ verwendet werden. Stattdessen kam das Konstrukt Vav1₁₈₉₋₅₇₅ (M351T) zum Einsatz. Der Austausch-Assay sollte analog zu den Versuchen für Tiam1₁₀₃₃₋₁₄₀₆ aufgebaut werden. Die GTPase Rac1 wurde mit mantGDP vorbeladen (siehe 7.4.8), sodass die Dissoziation nach Zugabe eines 500fachen Überschusses GTP aufgezeichnet werden konnte. Alle Experimente sind mit 100 nM Rac1*mGDP, 200 nM Vav1₁₈₉₋₅₇₅ und 50 µM GTP durchgeführt worden. Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante der intrinsischen Austauschaktivität von Rac1 wurde zu $1,2 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$ bestimmt, was im Einklang mit publizierten Daten steht.¹¹⁵ Durch die Zugabe von 200 nM Vav1₁₈₉₋₅₇₅ ließ sich die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante auf $35 (\pm 2) \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$ erhöhen. Bevor die Aptamere im Austausch untersucht werden konnten, wurde die Integrität im Agarosegel sichergestellt. Das wichtigste Vorexperiment war hingegen eine Filterbindung der Aptamere mit dem GEF-aktiven Vav1-Konstrukt im Reaktionspuffer (40 mM HEPES, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, pH 7,4). Es konnte gezeigt werden, dass die Aptamere ebenfalls am längeren Vav1₁₈₉₋₅₇₅ binden und unter den veränderten Pufferbedingungen keine signifikanten Affinitätseinbußen auftraten (Daten nicht gezeigt). Die Aptamerstudien sollten mit hohen RNA-Konzentrationen begonnen werden, um eine zügige qualitative Aussage über die Inhibierungseigenschaften der Aptamere machen zu können. Es wurden daraufhin mit jeweils 4 µM Aptamer die Austauschexperimente durchgeführt und die erhaltenen Kurven über eine exponentielle Kurvenanpassung ausgewertet (siehe 4.32).

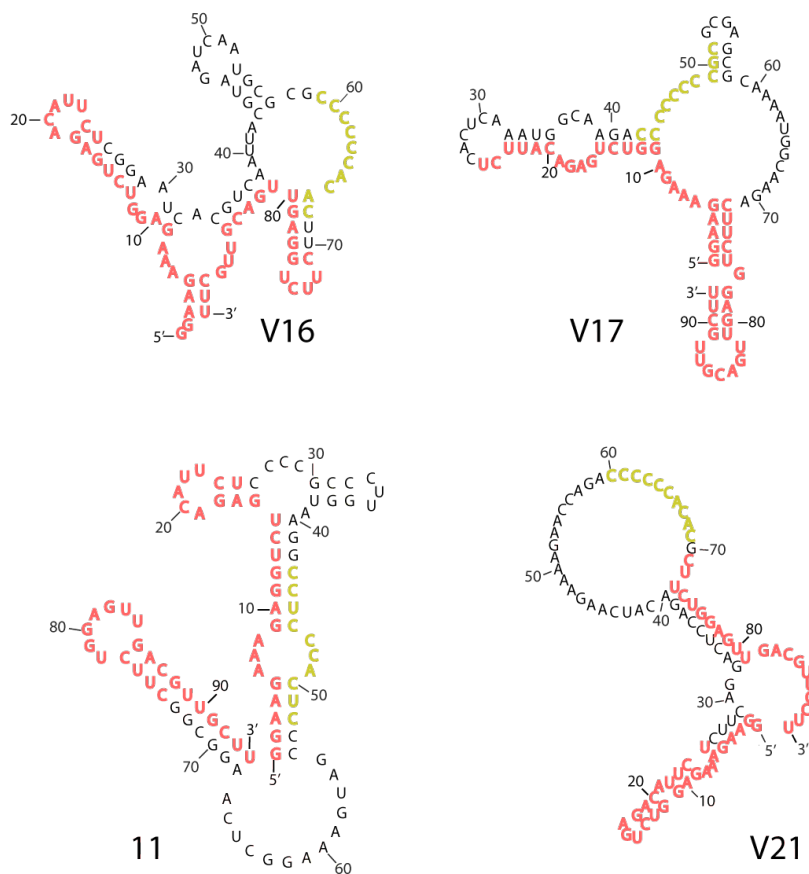


Abbildung 4.31: *in silico* Sekundärstrukturvorhersage der Vav1-Aptamere; dunkelrot sind die konstanten Primerbindestellen dargestellt; dunkelgrün wurde der C-reiche Konsensusbereich eingefärbt.

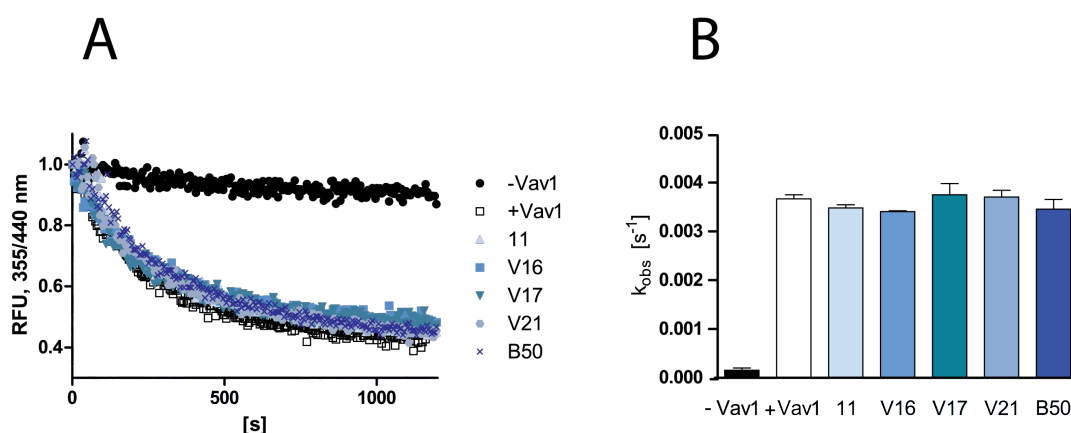


Abbildung 4.32: Vav1-beschleunigter Nukleotid-Austausch an Rac1*mGDP in Anwesenheit von Vav1-spezifischen Aptameren. **(A)** Fluoreszenzverlauf der Dissoziation von Rac1*mGDP durch Vav1_{189–575} in Anwesenheit von 4 μ M der angegebenen Aptamere **(B)** Der Kurvenverlauf in A wurde mit einer exponentiellen Funktion angeglichen und die entsprechenden Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten daraus berechnet (n=2).

Es stellte sich heraus, dass keines der Aptamere bei einer Konzentration von 4 μ M eine signifikante Verringerung der Austauschaktivität von Vav1_{189–575} bewirken konnte. Höhere Aptamerkonzentrationen sind nicht getestet worden, da sich im Vergleich mit Tiam1 unter identischen Konzentrationsbedingungen bereits eine Inhibition zeigte. Es muss davon ausgegangen werden, dass die gefundenen Aptamere die Vav1-GEF-Aktivität an Rac1 nicht beeinflussen.

4.2.8 Charakterisierung der Aptamere im Phosphorylierungsassay

Die Klone V16, V17 und V21 konnten im angereicherten Sequenzpool der *in vitro* Selektion gegen das Konstrukt Vav1_{170–377} identifiziert werden. Somit bestand ebenfalls die Möglichkeit, dass die N-terminale autoinhibitorische Helix, die unter anderem das regulatorische Tyr174 beinhaltet, von den Aptameren erkannt wird. Da die GEF-Aktivität von Vav1 sehr effektiv durch die Phosphorylierung von 3 Tyrosinresten (Y142, Y160, Y174) in der AC-Domäne reguliert wird,^{134,135} könnte eine Aptamerinteraktion durchaus zu einer Modulation dieser Phosphorylierung führen. Schlussendlich käme es dadurch ebenfalls zu einer Inhibition der Austauschaktivität von Vav1. Zur Klärung dieser Fragestellung sollte ein *in vitro* Phosphorylierungsassay

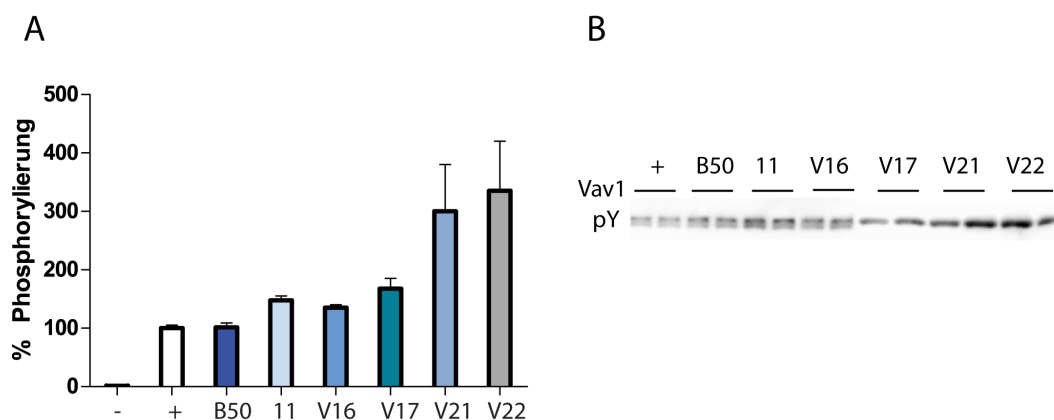


Abbildung 4.33: *in vitro* Phosphorylierung von 500 nM Vav1_{170–377} in Anwesenheit der Aptamere 11, V17, V21 und V22; **(A)** Western Blot Quantifizierung der Vav1_{170–377} Src-vermittelten Phosphorylierung, Nachweis über *anti*-pTyr-Antikörper, das Signal der B50-Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt. (-) entspricht ohne Kinase, (+) entspricht mit Kinase und ohne RNA. **(B)** Repräsentativer Western Blot nach Inkubation mit *anti*-pTyr-Antikörper.(n=2)

eingesetzt werden, der wie folgt aufgebaut war: Nach der Inkubation der Aptamere (1000 nM) mit Vav1_{170–377} (500 nM) wurde durch Zugabe von ATP (500 μ M) und Src-Kinase (50 nM) die Phosphorylierung von Tyr174 für 30 min durchgeführt. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit einem Überschuss EDTA sind die Proben über ein SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und über einen Western Blot mit einem *anti*-pTyr-Antikörper quantifiziert worden. Die ATP-Konzentration lag weit über dem K_M -Wert der Src-ATP Interaktion (circa 10 μ M).¹³⁶ Alle Western Blots Daten spiegeln Duplikate aus 2 unabhängigen Experimenten wider (siehe Abb. 4.33). Der Phosphorylierungsgrad von Tyr174 wird durch die Anwesenheit der Aptamere entgegen der Erwartung nicht kleiner, sondern steigt. Besonders eindrucksvoll ist dies bei Monoklon V21 und V22 zu erkennen. Auch wenn die Standardabweichungen hoch sind, so lässt sich ein Effekt für die Src-vermittelte Phosphorylierung von Vav1_{170–377} durch die Aptamere V21 bzw. V22 beobachten. Aufgrund der hohen Standardabweichungen sollten die Effekte der *in vitro* Phosphorylierung durch eine weitere Messmethode validiert werden.

4. ERGEBNISSE

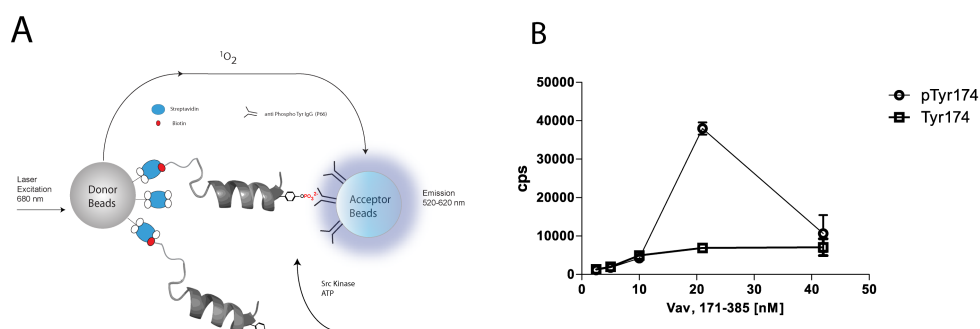


Abbildung 4.34: LOC-basierter Phosphorylierungsassay **(A)** Schematische Darstellung des Assayaufbaus: Das zu analysierende Substrat wird über eine Biotin-Streptavidin Interaktion auf den Donorbeads immobilisiert, nach der Phosphorylierung sind *anti*-pTyr-Antikörper-funktionalisierte Akzeptorbeads in der Lage mit dem Substrat zu interagieren, sodass ein LOC-Signal ausgelesen werden kann. **(B)** Titration von Vav₁₇₀₋₃₇₇ und Vav1*₁₇₀₋₃₇₇ zur Bestimmung der optimalen Donorbead-Beladung.

4.2.9 Charakterisierung der Aptamere im LOC-basierten Phosphorylierungsassay

Um den aktivierenden Effekt der Aptamere in einem homogenen Versuchsaufbau zu validieren, wurde ein weiteres Mal auf einen *luminescent oxygen channeling* (LOC)-basierten Assay (siehe 7.9.4) zurückgegriffen. Durch den C-terminalen Strep-tag von Vav₁₇₀₋₃₇₇ ließen sich Streptavidin-Donorbeads zur Immobilisierung und *anti*-pTyr-Antikörper-funktionalisierte Akzeptorbeads zur Erkennung von pTyr einsetzen. Nach der Phosphorylierung von Tyr174 kommt es somit zur Komplexbildung, die sich durch ein LOC-Signal auslesen lässt.

Zuerst wurde in einem Titrationsexperiment die optimale LOC-Konzentration von Vav₁₇₀₋₃₇₇ ermittelt (siehe Abb. 4.34). Es konnte ein Signalmaximum bei einer Konzentration von 20 nM des phosphorylierten Vav₁₇₀₋₃₇₇ beobachtet werden. Diese Substratmenge wurde für die folgenden Phosphorylierungsstudien als Endkonzentration im LOC-Experiment eingesetzt.

Wie in Abbildung 4.35 zu erkennen ist hat das LOC-Experiment einen relativ großen Hintergrund von 10000 cps. Nach der spezifischen Phosphorylierung der Aminosäure Tyr174 von Vav₁₇₀₋₃₇₇ mit 80 nM Src-Kinase und 500 μ M ATP werden in etwa 15000 cps erreicht. Deutlich zu erkennen ist der aktivierende Einfluss der Aptamere V22, V21, V17 und V16. Die Anwesenheit von BSA im Experiment

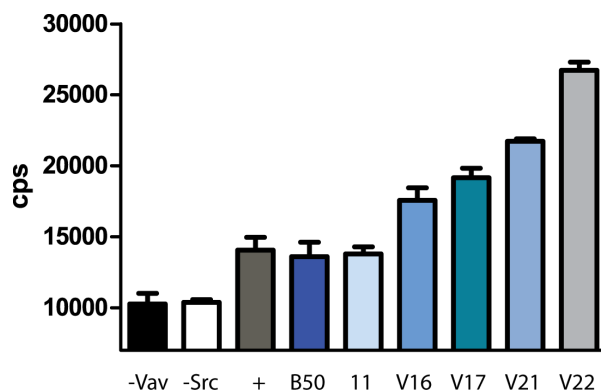


Abbildung 4.35: Charakterisierung von Vav1-Aptameren im LOC-basierten Phosphorylierungsassay. LOC-Signale der Src-vermittelten Phosphorylierung von Vav1_{170–377}. Probe (+) entspricht der Kontrolle ohne RNA; Alle Aptamere wurden bei einer konstanten Konzentration von 2 μ M eingesetzt.

ist von großer Bedeutung, da die Konzentrationen an Kinase und Substrat zum einen sehr klein sind, sodass unspezifische Adsorptionen an den Gefäßwänden einen großen Einfluss haben und BSA zum anderen einen aktivierenden Einfluss auf die Substratkonformation haben kann.¹³⁷ Aufgrund der Beobachtung, dass V21 als spezifisch bindendes Vav1-Aptamer einen aktivierenden Einfluss auf die Phosphorylierung von Tyr174 ausübt, sollte ebenfalls untersucht werden, ob die Phosphorylierung von Tyr142 und Tyr160 ebenfalls moduliert wird. Diese Möglichkeit scheint gegeben zu sein, da alle drei Tyr-Reste ein Src-Erkennungsmotiv besitzen. Um dieser Frage nachzugehen sind Punktmutanten generiert worden, bei denen das entsprechende Tyrosin durch ein Phenylalanin ersetzt wurde. Nach einer Biotinylierung der aufgereinigten Punktmutanten sind diese im LOC-basierten Phosphorylierungsassay analog eingesetzt worden. Zu Beginn konnte der aktivierende Effekt des Aptamers V21 auf das verlängerte Konstrukt Vav1_{134–564} bestätigt werden, wobei die Aktivierung bei einer identischen Aptamerkonzentration von 2 μ M wesentlich geringer ausfällt als bei Vav1_{170–377} (siehe Abb. 4.35). Es konnte eine Steigerung von circa 33 % im Vergleich zur nicht bindenden B50 Bibliothek gemessen werden (siehe Abb. 4.36). Des Weiteren konnte der durch Rosen *et al.*⁸⁶ postulierte Mechanismus, bei dem die Src-Kinase zuerst Tyr142 phosphorylieren muss, um eine effektive intramolekulare

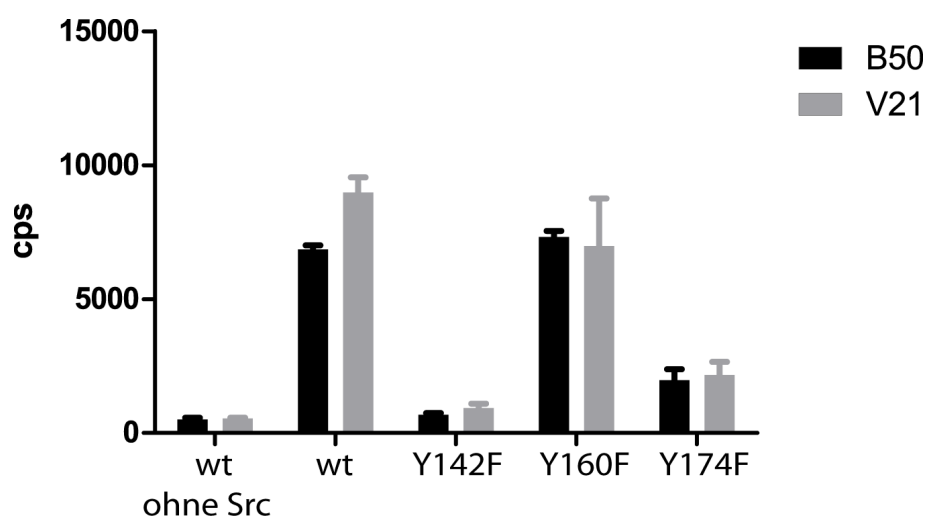


Abbildung 4.36: Einfluss des Aptamers V21 auf die Tyr-Phosphorylierung von Vav1_{134–564}(Y142F, Y160F, Y174F)-Mutanten: Vav1-Proteine wurden biotinyliert und analog im LOC-basierten Phosphorylierungsassay eingesetzt. Das Aptamer V21 bzw. der B50 Pool wurden bei 2000 nM getestet. Die Vav1-Konzentration lag bei allen Experimenten bei 20 nM.

Phosphorylierung von Tyr160 und vor allem Tyr174 zu erreichen, bestätigt werden. Dies wird bei der Tyr142Phe-Mutante deutlich. Daneben lassen die Messungen mit Tyr160Phe auf einen geringen Einfluss von Tyr160 auf das LOC-Signal schließen. Abschließend konnte durch Tyr174Phe gezeigt werden, dass die Position Tyr174 einen großen Beitrag zum LOC-Signal leistet. Der Einfluss der einzelnen Tyr-Reste auf die Gesamtytrophosphorylierung ließ sich untersuchen, auch wenn eine eindeutige Zuordnung des aktivierenden Einflusses von V21 nicht gelang. Jedoch kann auf der Grundlage aller Daten ein unspezifischer Einfluss auf die Kinaseaktivität von Src durch V21 ausgeschlossen werden.

4.2.10 Zusammenfassung Vav1-Aptamere

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die Selektion und Charakterisierung von Vav1-bindenden Aptameren beschrieben. Es konnten 4 Sequenzen identifiziert werden, die mit einer mittleren nanomolaren Affinität spezifisch die DH-Domäne von Vav1 erkennen und in der Lage sind verwandte Proteine wie Tiam1_{1033–1406} zu diskriminieren. Die RNA-Aptamere hatten bis zu einer Konzentration von 4 μ M keinen

Einfluss auf den Vav1-vermittelten Guaninnukleotid-Austausch an Rac1. Es konnte im Vorfeld gezeigt werden, dass das GEF-aktive Konstrukt Vav1_{189–575} im gleichen Maße gebunden wird, wie die isolierte DH-Domäne. Im weiteren Verlauf der Arbeit konnte jedoch ein aktivierender Effekt der Aptamere auf die Phosphorylierung von Y174 durch die Src-Kinase nachgewiesen werden. Durch Mutagenese-Studien ist zudem gezeigt worden, dass V21 keinen unspezifisch aktivierenden Einfluss auf die Kinase hat. Eine genaue Aussage, ob V21 nur die Phosphorylierung von Y174 und nicht der beiden anderen Reste Y142 und Y160 moduliert gelang jedoch nicht. In weiteren Studien wäre es sinnvoll die beobachteten Effekte in einem komplexeren Umfeld zu untersuchen. Die Aktivierung von Rac1 durch Vav1 in H358 Zellen ließe sich z.B. nutzen, um V21 weiter zu charakterisieren.¹³⁸

4.3 GTPase-Aktivierungssensor

4.3.1 Einleitung

Der Aktivierungszustand von kleinen GTPasen ist von enormer Bedeutung für Signalkaskaden innerhalb der Zelle, da diese als Prototypen eines binären Schalters verstanden werden können. Es konnte schon sehr früh gezeigt werden, dass diese Schalterproteine und besonders die kleine GTPase Ras eine wichtige Rolle bei der Entstehung und dem Verlauf von Krankheiten wie Krebs einnehmen.¹³⁹ Für die Bestimmung des Aktivierungszustandes werden Effektorproteine eingesetzt, die eine erhöhte Affinität zur GTP-gebundenen Form der GTPase zeigen. Diese Effektorproteine werden häufig als GST-Fusionsproteine bei *pull-down*-Experimenten eingesetzt.¹⁴⁰ Die Affinitäten der Effektor-GTPase-Interaktionen liegen im nanomolaren Bereich, für Pak1-Rac1 z.B. bei 30 nM,¹⁴¹ Raf1-Ras bei 50 nm.¹⁴² Da die Konzentration an endogener GTPase oft niedrig ist, müssen für *pull-down*-Experimente große Zellysatmengen eingesetzt werden. Erschwerend kommt hinzu, dass das mehrmalige Waschen der Affinitätsmatrix verbunden mit der recht aufwändigen Probenvorbereitung häufig zu einer fehlerhaften Bestimmung der GTPase Konzentration führt.

4.3.2 Aufbau des Assays

Im Verlauf dieser Arbeit wurde eine homogene *luminescent oxygen channeling*-basierte Methode zur Bestimmung der GTPase-Aktivität entwickelt, die sich durch ihre schnelle und robuste Arbeitsweise auszeichnet. Analog zum LOC-basierten Aptamer-Verdrängungsassay werden Streptavidin-Donorbeads verwendet. Diese dienen zur Kopplung der biotinylierten Effektorproteine. Die Akzeptorbeads sind mit Protein A funktionalisiert und erlauben dadurch die Immobilisierung von F_v-Antikörper-Fragmenten. Der Antikörper wurde so ausgewählt, dass er den C-Terminus der GTPase erkennt und somit nicht mit der Effektorbindung kollidiert (siehe pdb: 1E0A). Nach der Aktivierung, d.h. der Beladung mit GTP ist die GTPase in der Lage mit dem an den Donorbeads immobilisierten Effektor zu interagieren, um den tetrameren Komplex aus Akzeptor-GTPase-Effektor-Donor zu bilden und ein produktives LOC-Signal zu generieren (siehe Abb. 4.37).

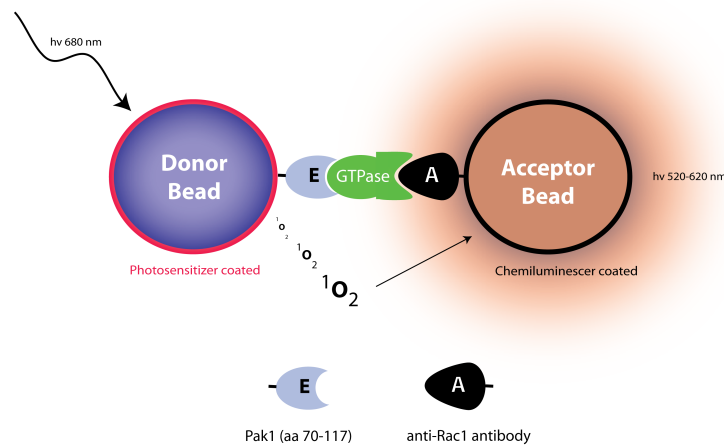


Abbildung 4.37: Schematischer Aufbau des Rac1-Aktivierungssensors: Streptavidin-Donorbeads koppeln an das biotinylierte Effektorprotein Pak1_{70–117}, Protein A Akzeptorbeads sind in der Lage den F_v -Bereich von spezifischen Antikörpern zu binden und dadurch die GTPase über den C-Terminus zu immobilisieren. Nach der Beladung (Aktivierung) mit GTP kann das Effektorprotein mit Rac1 wechselwirken und damit ein LOC-Signal auslösen.

4.3.3 Etablierung des Rac1 Sensors

Wie im Kapitel 4.1.14 schon erwähnt, muss eine gewisse Zeit darauf verwendet werden die optimalen Konzentrationen der Bindungspartner zu finden. Die optimale Oberflächenbeladung erlaubt eine produktive Interaktion, die sich durch ein Maximum im LOC-Signal bemerkbar macht. Werden Konzentrationen gewählt, die zur unvollständigen bzw. überfüllten Oberfläche führen, so sind die Interaktionen der Bindungspartner begrenzt. Um den so genannten Hook-Effekt zu vermeiden, ist deshalb ein sorgfältiges Austitrieren der optimalen Konzentrationen unerlässlich.

Die Bestimmung der optimalen Konzentrationen von Antikörper und Effektorprotein erfolgte mit *in vitro* GDP/GTP γ S-vorbeladenem Rac1 (siehe 7.4.8). Wie in Abbildung 4.38 zu erkennen liegt die optimale Antikörperkonzentration bei circa 7 nM. Ein direkter Vergleich zwischen GSH- und Streptavidin-Donorbeads sollte darüber hinaus Aufschluss geben, welcher Affinitätsanker für den Aktivierungssensor geeigneter ist. Es stellte sich heraus, dass biotinyliertes GST-Pak1_{70–117} bei weitem die bessere Wahl ist. Die optimale Konzentration lag bei beiden zwischen 50 und 100

4. ERGEBNISSE

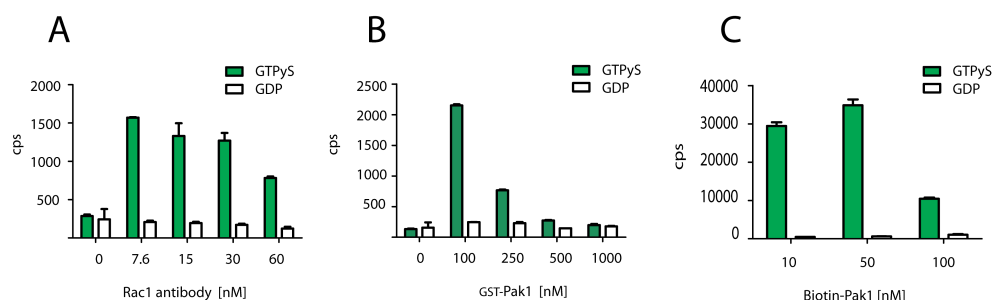


Abbildung 4.38: Bestimmung der optimalen Konzentrationen der Bindungspartner des GTPase-Aktivierungssensors nach *in vitro* Beladung von Rac1 mit GDP bzw. GTP γ S. **(A)** Titration der Antikörper Konzentration. **(B)** Vergleichende Bestimmung der optimalen Konzentration von GST-Effektorprotein Pak1_{70–117} mit GSH-Akzeptorbeads. **(C)** Bestimmung der optimalen Konzentration des biotinylierten Effektorproteins.

nM. Der direkte Vergleich bei der Bestimmung der Detektionsgrenzen von Rac1*GTP lässt ein weiteres Mal die Überlegenheit des biotinylierten Effektors erkennen. Die minimal detektierbare Konzentration der aktiven GTPase konnte zu 0,2 nM bestimmt werden.

Die *in vitro*-Beladung fand fast ausschließlich mit GTP γ S statt, um Hydrolyseinflüsse während der Optimierung auszuschließen. Ungeachtet dessen konnten vergleichbare Messwerte mit GTP-beladenem Rac1 erhalten werden (Daten nicht gezeigt). Um den LOC-basierten Aktivierungssensor unter stringenteren Bedingungen zu testen, wurden Untersuchungen mit Zelllysaten durchgeführt. Wie sich herausstellte kommt es durch die Anwesenheit von hohen Konzentrationen (> 1mg/mL) an Zelllysat zur Interferenz mit dem LOC-Signal. Dabei lässt sich eine Signalverringering um circa 50 % beobachten. Jedoch ließen sich, wenn auch mit einer geringeren Signalstärke, aussagekräftige Messungen machen. Es wurde endogenes Rac1, das in HEK293 überexprimiert wurde, *in vitro* mit GTP γ S beladen. Ein paralleles *pull-down*-Experiment erlaubte den direkten Vergleich mit dem LOC-Aktivierungssensor. Wie sich herausstellen sollte, konnte der LOC-Sensor um mehr als eine Größenordnung geringere Mengen an aktivem Rac1*GTP γ S nachweisen.

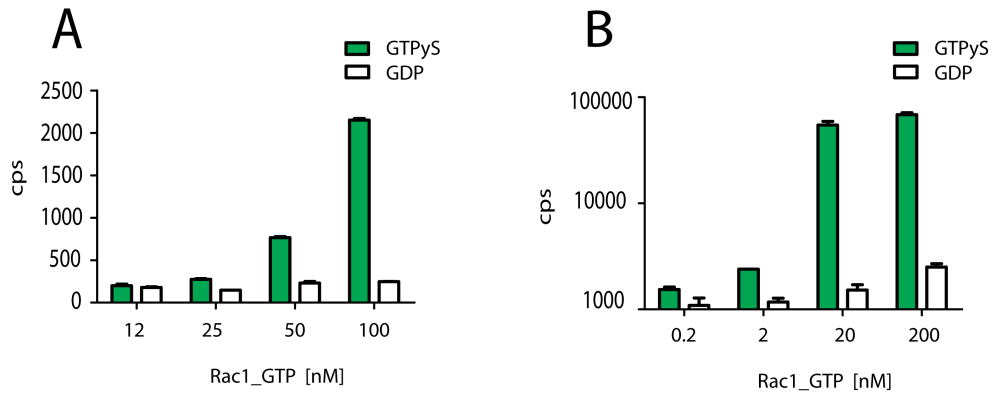


Abbildung 4.39: Bestimmung des Quantifizierungslimits von Rac1*GTP γ S. (A) GST-Pak1₇₀₋₁₁₇ funktionalisierte GSH-Donorbeads erreichten ein Quantifizierungslimit von Rac1*GTP γ S von circa 25 nM. (B) Streptavidin-Donorbeads wurden mit biotinylierten GST-Pak1₇₀₋₁₁₇ funktionalisiert. Es ergab sich eine Detektionsgrenze von 0,2 nM Rac1*GTP γ S.

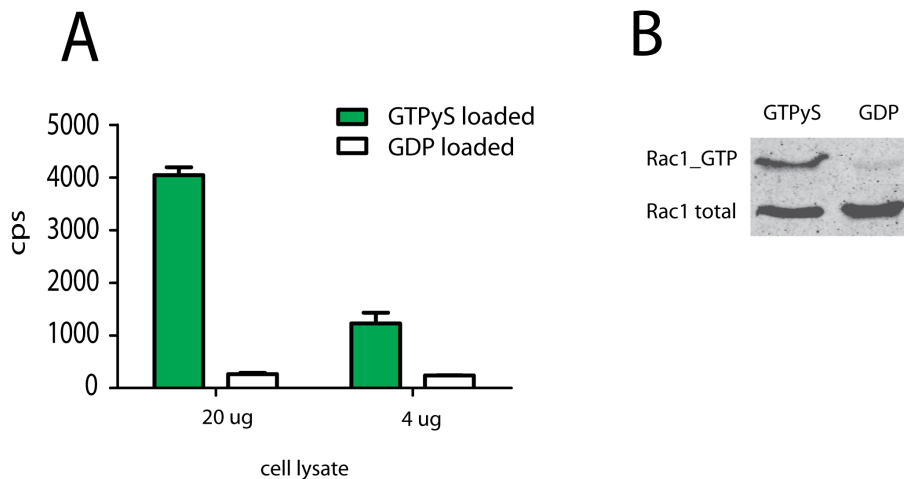


Abbildung 4.40: Bestimmung des Quantifizierungslimits von Rac1*GTP γ S im Zelllysate. (A) 20 bzw. 4 μ g Zelllysate des *in vitro* vorbeladenem Rac1 wurden im LOC-Assay vermessen. (B) 200 μ g des selben Zelllysates ist nach einem Rac1-pull-down mit biotinyliertem Pak1₇₀₋₁₁₇ über einen Western Blot quantifiziert worden.

4. ERGEBNISSE

5

Diskussion

5.1 Tiam1_{1033–1406}-spezifische Aptamere: *in vitro* Selektion und Charakterisierung

Rho-GEFs und im allgemeinen GEFs für Vertreter der Ras Superfamilie kleiner GT-Pasen sind als Zielproteine für *in vitro* Selektionen kaum beschrieben worden. Es lassen sich genau vier Veröffentlichungen finden: M69 für die Cytohesin-Familie,²² K61 als Cytohesin-2 spezifisches Aptamer¹⁴³ und das Peptid-Aptamer TRIP α für das Rho-GEF Trio¹⁴⁴ sowie ein davon abgeleitetes Peptid für das RhoGEF Tgat.¹⁴⁵ Noch weniger, nämlich nur drei Veröffentlichungen sind über GTPase-spezifische Aptamere erschienen.^{146,147,148} Davon beschreibt eine Studie die Selektion gegen den G-Protein gekoppelten Rezeptor für Neurotensin (NTS-1).¹⁴⁹ Aufgrund dieser Datenlage scheint ein SELEX-Prozess bei diesen Proteinen nicht ganz unproblematisch zu sein. Eine grobe Beurteilung von Zielproteinen wird oft durch die Berechnung des isoelektrischen Punktes (pI) vorgenommen. Es gilt dabei sehr vereinfacht, dass Proteine mit einem pI größer als 7 sich sehr gut für Aptamer-Selektionen eignen. Im Gegensatz kann man jedoch eine erfolgreiche Selektion nicht ausschließen, wenn der pI-Wert deutlich niedriger ist.²⁴ Den Beweis liefert Cytohesin-1 mit einem Wert von 5,4 (Uniprot Datensatz Q15438) das erfolgreich zur Aptamerselektion eingesetzt wurde.²² Es lässt sich spekulieren, ob nicht Faktoren wie Konformationsstabilität des Proteins, Vorbereitung und Dauer der Selektion weitaus wichtiger für den Erfolg sind.

Die Aptamers Selektion sollte gegen die katalytisch aktive DHPH Domänenkassette von Tiam1 (Tiam1_{1033–1406}) durchgeführt werden, bei der die PH-Domäne einen regulatorischen Einfluss auf die GEF-Aktivität der DH-Domäne ausübt.^{150,62} Das Ziel der *in vitro* Selektion war die Evolvierung eines spezifisch bindenden, inhibitorischen RNA-Aptamers, das im weiteren Verlauf als Werkzeug zur Identifizierung einer chemischen Sonde dienen sollte. Nach der erfolgreichen Aufreinigung über eine Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie wurden durch eine Kopplungsreaktion mit NHS-Sulfo-Biotin lösungsmittelzugängliche primäre Amine biotinyliert. Prinzipiell lassen sich jedoch spezifische Tags einführen, über die eine selektive *in vitro* Biotinylierung mit der Biotin Ligase birA erfolgen kann.^{151,152} Die anschließende Immobilisierung des Proteins an Streptavidin-funktionalisierte magnetische Dynabeads ermöglicht eine sehr effektive und einfache Separation von bindenden und nicht bindenden Sequenzen¹⁵³ während der SELEX. Die eingesetzte RNA-Bibliothek mit einer 50 nt langen randomisierten Region stellte eine ausreichend große Sequenzdiversität von 10^{14} bereit. Es ließ sich im betrachteten Konzentrationsbereich von 0 - 1,2 μM keine Interaktion mit dem Zielprotein feststellen, sodass die Anfangskonzentration der Bibliothek mit 1 μM hoch gewählt wurde.¹⁵⁴ Nach 16 *in vitro* Selektionszyklen konnte in Filterbindungsanalysen ein K_D -Wert von circa 200 nM für die angereicherte Bibliothek bestimmt werden. Eine Anreicherung von Matrixbindern ließ sich ausschließen, da die Affinität zu Streptavidin bis 2 μM zu vernachlässigen war. Bei SELEX-Experimenten, die Nitrozellulose-Filter zur Abtrennung der nicht bindenden Sequenzen nutzen, werden dagegen sehr häufig Matrixbinder gegen die Nitrozellulose beobachtet, da sich die im Verhältnis zur Proteinoberfläche riesige Filtrationsoberfläche für hydrophobe Wechselwirkungen mit den Nukleobasen (vor allem Purinbasen) eignet.¹⁵⁵ Die *in silico* Analyse der monoklonalen Sequenzen mit dem MEME-Programm¹¹⁶ ergab eine Einteilung der Aptamere in 2 Sequenzfamilien. In Sequenzfamilie 1 fallen 15 % aller sequenzierten Monoklone (K41, K44, K60, K75). Sie besteht aus einem 39 nt langen Motiv, das sich durch eine kleinere Affinität als der angereicherte Pool auszeichnet ($K_D > 1 \mu\text{M}$). Möglicherweise sind diese Sequenzen besonders gut replizierbar, sodass sie im Verlauf der Selektion nicht abgereichert werden konnten. Die zweite Sequenzfamilie umfasste 75 % aller Monoklone, darunter K11, der als Gewinner der Selektion identifiziert werden konnte, und die affinsten Binder K91 sowie K103. Das gemeinsame Motiv besitzt eine Länge von 15 nt und hat

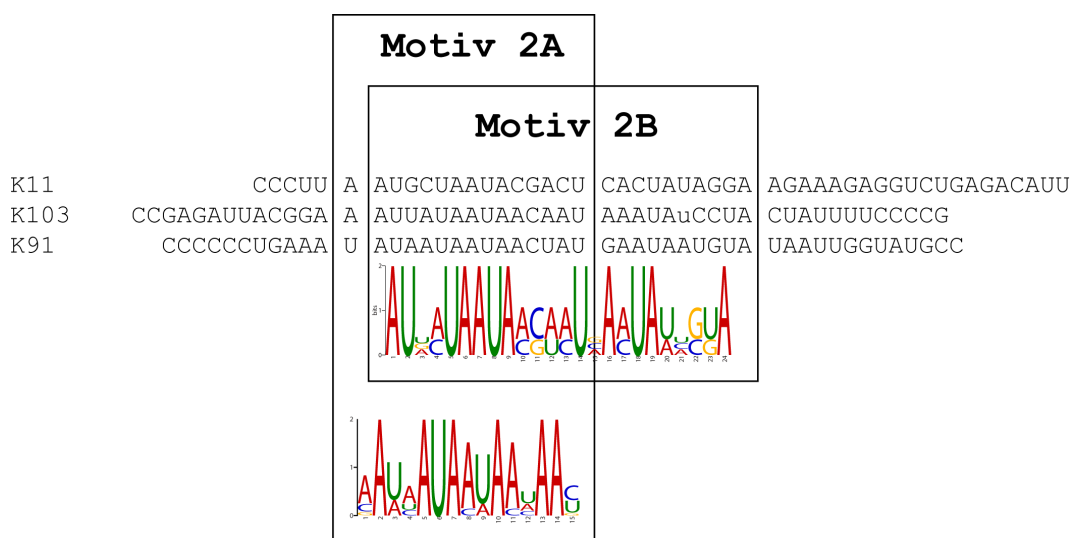


Abbildung 5.1: Sequenzmotiv 2B der affinsten Klone K11, K91 und K103 im Vergleich zum identifizierten Motiv 2A.

einen sehr hohen AU-Gehalt, der keine basengepaarte Struktur vermuten lässt, sondern auf eine ungepaarte Schleifenregion hindeutet. Die Präsenz von AU-reichen Bereichen innerhalb von Aptamersequenzen ist ungewöhnlich, aber nicht ausgeschlossen, wie das zur Zeit in der klinischen Phase befindliche Aptamer AS1411 zeigt. Es ist gegen Nucleolin, ein bcl-2-mRNA-bindendes Protein, gerichtet und besitzt ebenfalls einen hohen Anteil an AU-reichen Sequenzen.¹⁵⁶ Es wird vermutet, dass Nucleolin AU-reiche Bereiche der bcl-2 mRNA bindet, vor RNase Angriffen schützt und somit einen anti-apoptischen Einfluss ausübt.¹⁵⁷ Sogar funktionale RNA-Sequenzen lassen sich aus einem eingegengten Nukleotidpool evolvieren.^{158,159}

Der Sequenzvergleich von K11, K91 und K103 offenbarte ein erweitertes Konsensusmotiv (Motiv 2B) mit einer Sequenzidentität von 50 % (siehe Abb. 5.1). Die *in silico* Sekundärstrukturvorhersage (siehe Abb. 4.9) machte deutlich, dass bei K11 und der energieärmsten Struktur 2 von K91 der größte Teil des Konsensusmotivs in einem ungepaarten Schleifenbereich lag. Die Analyse von K103 ergab außer in den konstanten Regionen kaum einzelsträngige Bereiche. Das Konsensusmotiv befindet sich in einem AU-Stamm mit einer 7 nt langen Schleife. Interessanterweise sind Aptamere im speziellen und RNA im allgemeinen sehr häufig in der Lage mit ungepaarten Basen in ihren Schleifenstrukturen mit dem Bindungspartner zu interagieren bzw. über diese

5. DISKUSSION

Funktionalitäten zu vermitteln.^{160,161} In Anbetracht der niedrigsten Dissoziationskonstante von circa 200 nM wurde K91 ausgewählt, um die Spezifität zu bestimmen. Hierbei galt es vor allem herauszufinden, ob K91 ausschließlich die DH-Domäne oder ebenfalls die benachbarte PH-Domäne erkennt. Zusätzlich sollte geklärt werden inwieweit K91 verwandte Db1-GEFs wie Vav1 differenzieren kann. Der Nachweis der Spezifität erfolgte wiederum durch Filterbindungsanalysen mit folgenden Proteinen: Rho-GEF Vav1_{189–575}, Arf-GEF Cytohesin-2, DH-Domäne Tiam1_{1033–1255}, PH-Domäne Tiam1_{1255–1400}. Es konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass Vav1 als weiterer Vertreter der Db1-Familie der Rho-GEFs von K91 nicht gebunden wird, und dass das strukturell sehr unterschiedliche Cytohesin-2 keine Affinität zu K91 besitzt. Weiterhin scheint das Aptamer ausschließlich die DH-Domäne zu erkennen, da keine Bindung an die PH-Domäne detektiert werden konnte.

Den indirekten Nachweis, dass der N-terminale His-tag von Tiam1_{1033–1406} nicht an der Aptamerbindung beteiligt ist, erbrachte das ebenfalls mit einem Hexahistidinanker aufgereinigte Kontrollprotein Cytohesin-2. Hingegen ist der Affinitätsunterschied zwischen isolierter DH- und der Tandem DPH-Domäne nicht sofort offensichtlich. Dieser kann eventuell mit der sehr flexiblen C-terminalen α 11 Helix der DH-Domäne zusammenhängen.¹¹⁴ Diese Flexibilität wird durch die angrenzende PH-Domäne eingeschränkt und somit ist im Umkehrschluss von einer erhöhten Flexibilität in Abwesenheit der PH-Domäne auszugehen. Dieser Zusammenhang könnte für die geringere Affinität von K91 für die isolierte DH-Domäne sprechen.

Weiterführend war von Interesse, ob K91 ebenfalls den Komplex Rac1/Tiam1, der sich während des Nukleotidaustauschs bildet, zu binden vermag. Eine äquimolare Inkubation von Rac1 und Tiam1 mit dem Aptamer K91 führte dabei zum totalen Bindungsverlust (siehe Abb. 4.11). Auch wenn durch die geringe Affinität von Tiam1_{1033–1406} an Rac1*GDP, analog zu anderen GTPasen/GEF-Komplexen,^{162,163} nur von einer schwachen Komplexbildung auszugehen ist, so spricht dies dafür, dass das Bindungsepitop von K91 mit dem von Rac1 überlappt. Gleichermäßen ließe sich der Bindungsverlust nach der Rac1-Komplexbildung durch einen allosterischen Effekt auf das Bindungsepitop von K91 erklären.

Um das selektierte Aptamer K91 im weiteren Verlauf der Arbeit als Werkzeug zur Identifikation von niedermolekularen Verbindungen einzusetzen, sollte ein minimales Bindemotiv identifiziert werden. Die Grundlage der Minimalmotiv-Suche für K91

stellten die *in silico* berechneten energieärmsten Strukturen 1 und 2 (siehe Abb. 4.12) dar. Bei Struktur 1A wurde Stamm IV deletiert, wobei dieser nur von den konstanten Regionen gebildet wird. Eine Filterbindungsanalyse offenbarte keine Affinitätseinbußen zum Volllängen-Konstrukt, es ist somit davon auszugehen, dass der komplette 3'-Primerbindungsbereich nicht zur Stabilität bzw. Bindung an Tiam1₁₀₃₃₋₁₄₀₆ beiträgt. Weiterhin sollte die energieärmste Konformation 2 verkürzt werden, um Informationen über essentielle Nukleotidpositionen zu erhalten (siehe Abb. 5.2). Die Konsensussequenz lag bei Struktur 2 weitgehend in der Stammstruktur II, deshalb sollte diese schrittweise deletiert werden. Nach der internen Deletion der Basen 49-80 (Struktur 2A) und dem Insertieren eines GNRA-Tetraloops¹⁶⁴ verschlechterte sich die Affinität zu Tiam1₁₀₃₃₋₁₄₀₆ kaum, und es ist daher davon auszugehen, dass die Basen 49-60 der Konsensussequenz nicht zur Bindung beitragen. Diese Vermutung wird durch das Konstrukt 2B und 2C erhärtet. Ist Konstrukt 2B mit einer deutlich schlechteren K_D von 850 nM immerhin noch im Stande Tiam1₁₀₃₃₋₁₄₀₆ zu binden, so zeigt Struktur 2C keine Bindung mehr. Es kann deshalb die Beteiligung von A37-U48 an der Bindung zu Tiam1₁₀₃₃₋₁₄₀₆ als gesichert gelten. Zweifellos sind zur genauen Aufklärung der RNA-Sekundärstrukturen zusätzliche Untersuchungen notwendig, vor allem die chemische bzw. enzymatische Modifikation von Basen (*chemical und enzymatic probing*¹⁶⁵) in An- und Abwesenheit von Tiam1 (*footprinting*) wäre geeignet, um weitergehende Informationen zu erhalten.

Neben der groben Aufklärung der Sekundärstruktur sollte der Frage nachgegangen werden, ob die affinsten Aptamere K11, K91 und K103 die katalytische GEF-Funktion von Tiam1₁₀₃₃₋₁₄₀₆ beeinflussen. In der Literatur ist nur ein RNA-Aptamer beschrieben worden, das die Austauschfunktion eines GEFs inhibiert: M69 für die Cytohesin-Familie der kleinen Arf-GEFs.²² Die enzymatische Beschleunigung des Guaninnukleotid-Austauschs an GTPasen lässt sich über den Einsatz von radioaktiv- oder Fluorophor-markierten Nukleotiden am γ -Phosphat oder der 2'-bzw. 3'-Position der Ribose sicher bestimmen.^{119,127} Dabei weisen die Fluorophor-markierten Guaninnukleotide eine lösungsmittelabhängige Fluoreszenz auf, die im GTPase-gebundenen Zustand deutlich erhöht ist. Tiam1₁₀₃₃₋₁₄₀₆ zeigt *in vitro* eine spezifische Austauschaktivität an der GTPase Rac1 und den Isoformen Rac2/Rac3.¹¹⁵ Für die kinetischen Untersuchungen ist Rac2 eingesetzt worden, da der Tiam1₁₀₃₃₋₁₄₀₆-vermittelte

5. DISKUSSION

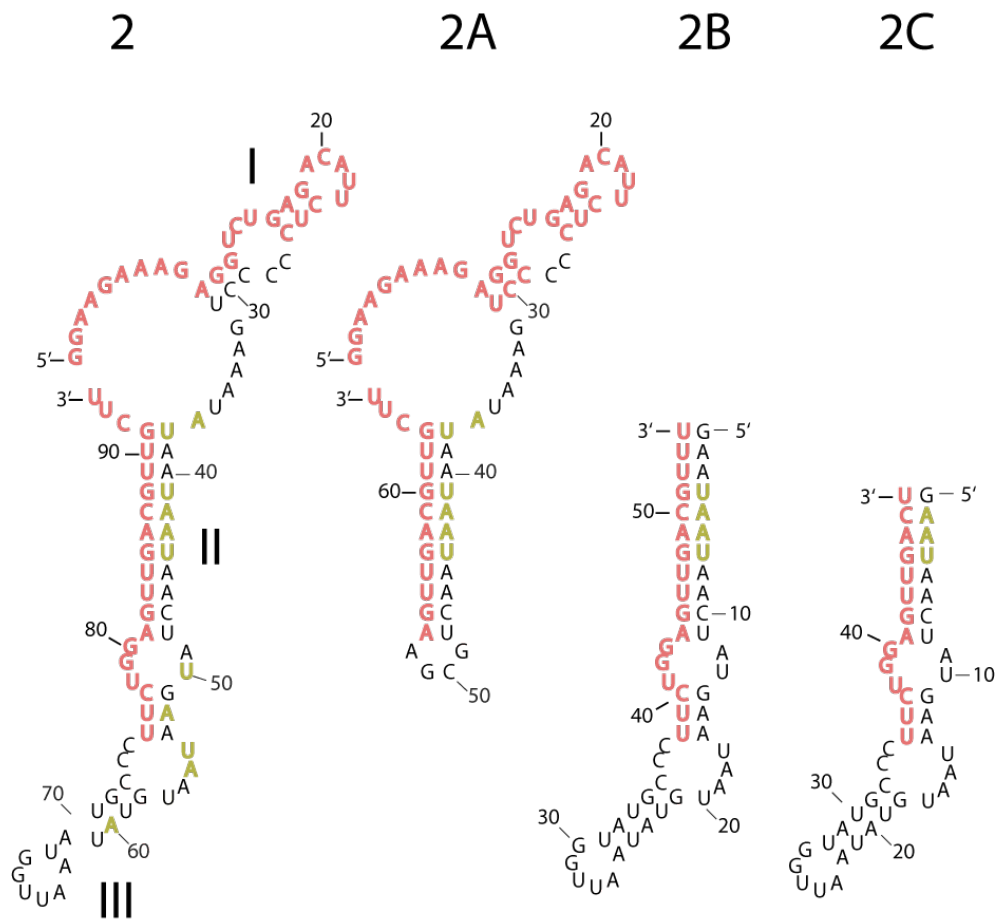


Abbildung 5.2: verkürzte K91-Konstrukte der Faltung 2 zur Aufklärung des Minimalmotivs.

5.1 Tiam1₁₀₃₃₋₁₄₀₆-spezifische Aptamere: *in vitro* Selektion und Charakterisierung

Austausch deutlich schneller als bei Rac1 abläuft.¹¹⁵ Im ersten Teil der Experimente wurde Rac2 mit mantGDP vorbeladen, die Verdrängung mit GTP erfolgte im Überschuss. Im Tiam1₁₀₃₃₋₁₄₀₆-beschleunigten Austausch zeigte K91 und K11 eine konzentrationsabhängige Verringerung der beobachteten Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{obs} über den unspezifischen Wert der B50-Bibliothek. K11 und K91 zeigten bei 8 μ M eine Verringerung der k_{obs} -Werte um 40 % bzw. 30 % (siehe Tabelle 5.1). Im Gegensatz ließ sich bei K103 bis zu einer Konzentration von 5 μ M keine Inhibition beobachten. Da die gemessenen k_{off} -Werte jedoch sehr klein waren, sollte zusätzlich die Assoziation an Rac2 untersucht werden, die keine Nukleotidvorbeladung der GTPase voraussetzt. Theoretisch sind die Geschwindigkeitskonstanten für Assoziation und Dissoziation bei identischen GTPase Konzentrationen gleich groß, da der geschwindigkeitsbestimmende Schritt fast immer die Freisetzung des Nukleotids ist (Dr. Aymelt Itzen, persönliche Mitteilung). Die Aptamere K11 und K91 zeigten wiederholt eine Inhibition des Nukleotidaustauschs–K11 reduzierte bei 3 μ M die k_{obs} um 38 % und K91 um 55 %. Die verkürzten Sequenzen K91_1A, K91_2A, K91_2B, K91_2C sind abschließend ebenfalls im Assoziationsexperiment untersucht worden (siehe Tabelle 5.2). Überraschend war nur K91_1A in der Lage den Tiam1-beschleunigten Nukleotidaustausch zu beeinflussen. Damit scheint klar zu sein, dass für die Inhibition das komplette Konsensusmotiv von A37-A60 genutzt wird. Diese Beobachtung steht im Kontrast zur Bindungsaffinität, da Struktur K91_2A eine ähnlich niedrige K_D wie K91 besitzt, aber durch die Deletion der Basen A49-G80 nur einen Teil der Konsensussequenz aufweist.

Tabelle 5.1: k_{obs} -Werte der Dissoziationsexperimente, n=2

Tiam1, [nM]	Probe	k_{obs} [10^{-4}s^{-1}]
0	intrinsisch	$1,3 \pm 0,2$
700	ohne RNA	$4,8 \pm 0,1$
700	B50 (8 μM)	$3,9 \pm 0,3$
700	K11 (8 μM)	$2,8 \pm 0,4$
700	K91 (8 μM)	$3,3 \pm 0,3$
700	K103 (5 μM)	$4,7 \pm 0,5$

Tabelle 5.2: k_{obs} -Werte der Assoziationsexperimente, n=2

Tiam1, [nM]	Probe	k_{obs} [10^{-4}s^{-1}]
0	intrinsisch	12 ± 3
220	ohne RNA	88 ± 5
220	B50 (3 μM)	78 ± 2
220	K11 (3 μM)	55 ± 5
220	K91 (3 μM)	40 ± 7
220	K91_1A (3 μM)	50 ± 4
220	K91_2A (3 μM)	75 ± 10
220	K91_2B (3 μM)	80 ± 7
220	K91_2B (3 μM)	76 ± 2

Der Nukleotidaustausch führt in jedem Fall zu einer transienten Komplexbildung zwischen GTPase und Tiam1. Diese Protein-Protein-Interaktion führt zum Verlust von über 2000 \AA^2 lösungsmittelzugänglicher Fläche.¹¹⁴ Im Durchschnitt sind Protein-Protein-Interaktionsflächen 800 \AA^2 groß. Es lassen sich vorgeformte Flächen nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip und Beispiele mit einem ausgeprägten adaptiven Charakter (*induced fit*) unterscheiden. Dabei werden kleine Flächen bevorzugt durch vorgeformte Flächen gebildet. Proteinkontakte, die während der Komplexbildung starke Konformationsänderungen erfahren, sind in der Regel viel größer ($> 1500 \text{\AA}^2$).¹⁶⁶ Neben permanenten Interaktionen wie z.B. Antikörper-Antigen sind transiente Interaktionen besonders bei Signalübertragungswegen für die spezifische und zeitlich begrenzte Interaktion wichtig. Sie zeichnen sich durch relativ kleine Bindungsenergien mit hohen k_{off} -Werten aus.¹⁶⁷ Da Tiam1 ein zeitlich und räumlich regulierter GEF

ist, kann die Interaktion mit der GTPase nur von kurzer Dauer sein und durch die große Kontaktfläche sind Konformationsänderungen innerhalb der DH-Domäne sehr wahrscheinlich. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Inhibition der GEF-Aktivität durch die vermutete Dynamik besonders anspruchsvoll ist. Es wurde bis jetzt kein erfolgreicher *in vitro* Guaninnukleotid-Austauschassay publiziert, der die Identifizierung von spezifischen Inhibitoren möglich macht. Die beschriebene Selektion und Charakterisierung von Tiam1_{1033–1406}-inhibierenden Aptameren beweist ein weiteres Mal die vor über 15 Jahren vorhergesagte Leistungsfähigkeit des SELEX-Verfahrens.¹¹ Vermutlich sind Aptamere durch ihre Flexibilität und Größe besonders geeignet dynamische Prozesse wie Protein-Protein-Interaktionen zu adressieren.

5.2 K91 als Werkzeug zur Identifikation chemischer Sonden

Aptamere lassen sich nicht nur als spezifisch bindende Liganden zur Untersuchung von Zielstrukturen, sondern ebenfalls als Werkzeug für die Identifikation von niedermolekularen Substanzen nutzen.^{168,30,15} Analog sollte das inhibitorische Aptamer K91 eingesetzt werden, um in einem so genannten Aptamer-Verdrängungsassay chemische Sonden zu identifizieren, die die GEF-Funktion von Tiam1_{1033–1406} blockieren. Ein auf Fluoreszenz Polarisation basierender Ansatz führte zur Identifikation des spezifischen Cytohesin-Inhibitors SecinH3.³⁰ Der Versuch diesen Ansatz für K91 und Tiam1 zu nutzen schlug jedoch fehl. Es konnten keine signifikanten Polarisationsunterschiede in An- und Abwesenheit des Zielproteins gemessen werden. Es stellt sich die Frage, warum diese Messmethode die Interaktion zwischen Tiam1_{1033–1406} und K91 nicht abbilden konnte. Die Modifizierung des 5'-Ende mit Fluorescein hatte keinen Einfluss auf die Affinität von K91 zu Tiam1, da in einer kompetitiven Filterbindung 5'-[³²P]-markiertes K91 quantitativ durch Zugabe von 5'-Fluorescein-K91 verdrängt werden konnte. Des Weiteren wäre denkbar, dass das gekoppelte Fluorescein nicht die globale Rotation des Aptamers sondern nur eine lokale Bewegung des Fluorophors (Propellereffekt) wiederzugeben vermag. Dadurch wäre eine Bindung von Tiam1_{1033–1406} an K91 quasi unsichtbar. Dieses Szenario wird, auch wenn eine Berechnung der theoretisch zu erwartenden Polarisation (Perrin-Gleichung) nicht durchgeführt wurde, aufgrund einer recht hohen Anfangspolarisation von circa 200

5. DISKUSSION

mP ausgeschlossen.¹⁶⁹ Die schlüssigste Erklärung basiert auf den Größenverhältnissen von markiertem Aptamer (31 kDa) und Tiam1_{1033–1406} (45 kDa). Aus der Perrin-Gleichung lässt sich ableiten, dass bei einer Rotationszeit \ll Lebenszeit des Fluorophors keine Depolarisationseffekte auftreten. Im Gegensatz führt eine Rotationszeit \gg Lebenszeit des Fluorophors zur vollständigen Depolarisation. Die Lebenszeit des angeregten Zustandes für Fluorescein ist circa 4 ns.¹⁷⁰ Somit sollte die mittlere Rotationszeit des Fluorophor-gekoppelten Aptamers im selben Zeitrahmen liegen. Leider sind genaue Rotationszeiten für das Aptamer schwierig zu erhalten, es soll daher nur grundsätzlich erwähnt werden, dass interagierende Komplexe bis zu einer Größe von 20 kDa mit Fluorescein-Reportern zuverlässig adressiert werden können.^{171,172} Ein möglicher Ausweg wäre die Verwendung von längerlebigen Fluorophor-Reportern, wie z.B. Übergangsmetallkomplexen.¹⁷³ Darüberhinaus hätte eine signifikante Verkleinerung des Aptamers wahrscheinlich zu detektierbaren Polarisationsänderungen nach der Bindung von Tiam1_{1033–1406} geführt. Jedoch konnte außer K91_1A, das mit 78 nt nicht wesentlich kleiner ist, keine verkürzte Struktur mit ähnlichen Inhibitions-eigenschaften wie K91 gefunden werden.

Ein homogener Versuchsaufbau bedeutet bei einer großen Anzahl von Messpunkten, speziell bei dem Screening von großen Substanzbibliotheken, oftmals Zeiterparnis und geringere Standardabweichungen. Eine Methode, die sich in den letzten Jahren auf dem Gebiet der Hochdurchsatzverfahren etabliert hat, stellt das sogenannte *Luminescence Oxygen Channeling* (LOC) dar.^{122,123} Das Messprinzip ähnelt dem von FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), da bei beiden ein strahlungsloser Energieübergang zwischen Donor- und Akzeptor stattfindet. Im Gegensatz zu FRET-Messungen ist jedoch die Immobilisierung der Interaktionspartner auf so genannte Donor- und Akzeptorbeads notwendig.

Durch den modularen Aufbau eines LOC-Experiments können unterschiedliche Funktionalisierungen für die Immobilisierung der Bindungspartner verwendet werden. Das Aptamer konnte ohne Affinitätseinbußen am 5'-Ende mit Fluorescein markiert und dadurch auf *anti-FITC-IgG*-funktionalisierten Akzeptorbeads verankert werden. Die Biotinylierung von Tiam1_{1033–1406} erlaubte die Immobilisierung auf Streptavidin-Donorbeads. Durch Titrationsexperimente ließen sich die optimalen Konzentrationen bestimmen: 1 nM K91 Aptamer sowie 88 nM Tiam1_{1033–1406} bei einer Beadkonzentration von 66 $\mu\text{g}/\text{mL}$ führten zu einem maximalen LOC-Signal mit einem K91/B50

-Signalverhältnis von circa 15. Die sehr geringe Konzentration des Aptamers bei einer theoretischen Bindungskapazität von 10-30 nM FITC (www.perkinelmer.com) ist auf den Größenunterschied des Aptamers zum sehr kleinen FITC-Molekül zurückzuführen. Eine weitere Besonderheit zur freien Interaktion in Lösung ist die im Vergleich zum K_D -Wert der Interaktion (circa 200 nM) wesentlich geringere Gesamtkonzentration beider Bindungspartner, die jedoch durch die Immobilisierung auf der Nanopartikeloberfläche zu einer vielfach höheren lokalen Konzentration führt.

Die für ein Hochdurchsatzverfahren notwendige Stabilität des LOC-Assays konnte bewiesen werden. Die berechneten z' -Werte lagen für 32 Replikate zwischen 0,5 und 0,7 und somit in einem Bereich, der für Screeningprozesse empfohlen wird (siehe 7.6.2).¹⁷⁴ Eine weitere Optimierung des LOC-Assays war notwendig, um die Stabilität gegenüber Detergenzien, DMSO und BSA zu erhöhen. Oft hat der Zusatz von BSA einen positiven Einfluss auf das Signal-Rausch-Verhältnis, da unspezifische Interaktionen unterdrückt werden. Im Tiam1/K91-System führte eine Erhöhung der BSA Konzentration von 0,1 auf 1 mg/mL (15 μ M) jedoch zu einem Signalverlust von circa 50 %. Es kann, da ein ähnlicher Signalabfall bei der unspezifischen B50-Probe sichtbar ist, von einem *Quenching*-Effekt innerhalb der Lumineszenz-Kaskade ausgegangen werden. Eine genauere Analyse dieser Beobachtung fand jedoch nicht statt. Der Zusatz des Glucosaminoglycans Heparin ist ebenfalls in der Lage unspezifische elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Bindungspartnern zu vermindern, da es durch seine hohe negative Ladungsdichte mit unspezifischen Aptamer-Wechselwirkungen konkurriert. Es ließen sich jedoch keine Effekte im Konzentrationsbereich zwischen 0,01 und 1 mg/mL beobachten. Durch die Helix-Anordnung der sulfatierten Saccharid-Einheiten von Heparin sind vor allem Helix-Sekundärstrukturen mit basischen Aminosäureresten als bevorzugte Heparin-Bindemotive in Proteinen identifiziert worden.¹⁷⁵ Durch den helikalen Aufbau der DH-Domäne sind somit unspezifische polare Wechselwirkungen zwischen K91 und Tiam1 auszuschließen. Da die meisten Substanzen in DMSO gelöst sind, stellt die Stabilität der Tiam1/K91 Interaktion gegenüber organischen Lösungsmitteln wie DMSO eine Grundvoraussetzung für ein Screening dar. Es konnte ein stabiles LOC-Signal bis 3 % DMSO nachgewiesen werden, zusätzlich wurde in Filterbindungsanalysen gezeigt, dass eine DMSO-Konzentration größer als 3 % zum Verlust der Bindung von K91 an Tiam1 führt. Weiterführend musste der Einfluss von Tween 20 untersucht

5. DISKUSSION

werden, da ohne den Einsatz von nichtionischen Detergenzien eine Reihe von niedermolekularen Substanzen durch einen unspezifischen Aggregationseffekt als Hitsubstanzen identifiziert werden können.¹⁷⁶ Auch hier zeichnete sich ein klarer Trend ab: Konzentrationen von maximal 0,01 % Tween 20 werden toleriert.

Das Screening der Substanzbibliothek wurde in 2 Etappen durchgeführt: die ersten 13000 Verbindungen sind bei einer Konzentration von 10 μM (1 % DMSO) und 3 Pipettierschritten getestet worden. Es konnten 122 Primärhits identifiziert werden, die das LOC-Signal um mindestens 50 % verringerten. Weitere 5000 Substanzen sind bei 30 μM (3 % DMSO) untersucht worden. Die z' -Werte variierten im ersten Abschnitt zwischen 0,6 und 0 während im zweiten Abschnitt z' -Werte zwischen 0,5 und 0,4 üblich waren. Es tauchten 137 Primärhits im zweiten Abschnitt auf. Die Hit-Häufigkeiten im Primärscreen lagen bei 0,9 % bzw. 2,7 %. Diese Werte sind im Einklang mit Ergebnissen von anderen Hochdurchsatzscreenings,¹⁷⁷ wobei Werte kleiner als 1 % der Standard bei Screens mit einer Substanzkonzentration von 10 μM zu sein scheinen. Die nachfolgende Prozessierung der Hitsubstanzen offenbarte eine nicht erwartete Problematik: Die Hälfte aller verifizierten Hitsubstanzen sind während der Probenvorbereitung mit RNasen in Kontakt gekommen, was zur Hydrolyse des eingesetzten RNA-Aptamers führte. Dieser Sachverhalt ist eine Konsequenz aus der extrem niedrigen RNA-Konzentration von 1 nM. Im Wesentlichen wurde die RNase-Problematik während der Screening-Vorbereitung völlig außer acht gelassen, da im Verlauf der Optimierungen kein einziges Mal Kontaminations-typische Signalabfälle gemessen wurden. Eine weiterführende Untersuchung der Hitverbindungen mit Hilfe von biotinyliertem FITC und Streptavidin-Donorbeads konnte LOC-spezifische Interferenzsubstanzen¹²³ herausfiltern (siehe 4.1.17). Die weiterführende Charakterisierung der gefundenen Substanzen sollte mit komplementären Methoden geschehen, um Interferenzen mit dem LOC-Assay sicher ausschließen zu können.

Daraufhin sind alle Hitsubstanzen in der Tiam1₁₀₃₃₋₁₄₀₆-beschleunigten Assoziationsreaktion von BodipyGDP an Rac2*GDP konzentrationsabhängig in Anwesenheit von 0,01 % Tween 20 untersucht worden. Bei 30 verbliebenen Hitsubstanzen (80 %) konnte kein Effekt im Guaninnukleotid-Austausch registriert werden. Insgesamt 6 Verbindungen zeigten jedoch eine schwache Inhibition (k_{obs} um 20 % reduziert) bei 100 μM . Am aussichtsreichsten verringerten die beiden Hits cg2:4-B3 und cg4:7-E2

konzentrationsabhängig die k_{obs} um 40 bzw. 60 % bei 100 μM . Zusätzlich wurde überprüft, ob cg2:4-B3 und cg4:7-E2 in der Lage sind [^{32}P]-markiertes K91 in einem Filterbindungsexperiment von Tiam1_{1033–1406} zu verdrängen (siehe Abb. 4.23). Es konnte bestätigt werden, dass sich das Aptamer durch beide Substanzen teilweise verdrängen lässt.

Die 4-Alkylamino-(2-Alkylthio)-Pyrimidin-Grundstruktur der identifizierten Verbindung cg2:4-B3 ist im Rahmen der Diplomarbeit von Barbara Albertoni identifiziert worden (siehe Abb. 5.3). Die Bibliothekssubstanz cg2:1-D9 zeigte eine Inhibition der siRNA-Bindung an die PAZ-Domäne des menschlichen Argonaute Proteins.¹²⁸ Es stellte sich jedoch heraus, dass nur die freie Säure und nicht das Amid von cg2:1-D9 Aktivität besitzt. Da es sich bei cg2:4-B3 ebenfalls um ein Amid handelt, könnten Syntheseverunreinigungen mit der freien Säure ebenfalls zur beobachteten Aktivität beitragen. Eine massenspektrometrische Analyse der Bibliothekssubstanz lieferte keine eindeutige Aussage, sodass nur durch eine Resynthese der Verbindung cg2:4-B3 sowie deren freier Säure der Problematik auf den Grund gegangen werden konnte. Es bewahrheitete sich die Vermutung, dass nur die freie Säure der Verbindung cg2:4-B3 eine messbare Aktivität im Guaninnukleotid-Austausch zeigt. Die zweite identifizierte Hitverbindung mit einer Glycin Diamid Grundstruktur zeigte im Guaninnukleotid-Austausch nur eine schwache Inhibition ($\text{IC}_{50} > 60 \mu\text{M}$). Die Verbindung übte weiterhin nur einen schwachen Einfluss auf die Verdrängung des Aptamers K91 aus (siehe Abb. 4.23). Wahrscheinlich besitzt cg4:7-E2 ein von cg2:4-B3 abweichendes Bindungsepitop.

Um weitere Einblicke in die Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu bekommen, sollten strukturell ähnliche Bibliothekssubstanzen auf ihren Einfluss im Tiam1_{1033–1406}-beschleunigten Guaninnukleotid-Austausch untersucht werden (siehe Abb. 4.24 4.25). Alle getesteten Verbindungen mit freier Säurefunktion (cg2:1-D9, cg2:4-B3, cg2:4-A3) waren in der Lage den Nukleotid-Austausch zu beeinflussen. Des Weiteren offenbarte die Verbindung cg4:3-C8, dass der Furanring an der Position R₁ einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität im Tiam1-beschleunigten Guaninnukleotid-Austausch hat.

Die von Barbara Albertoni charakterisierte freie Säure von cg2:1-D9 ist strukturell sehr ähnlich zur identifizierten Hitverbindung cg2:4-B3. Neben der ssRNA-Bindung an die PAZ-Domäne inhibiert diese den Tiam1_{1033–1406}-vermittelten Guanin-

5. DISKUSSION

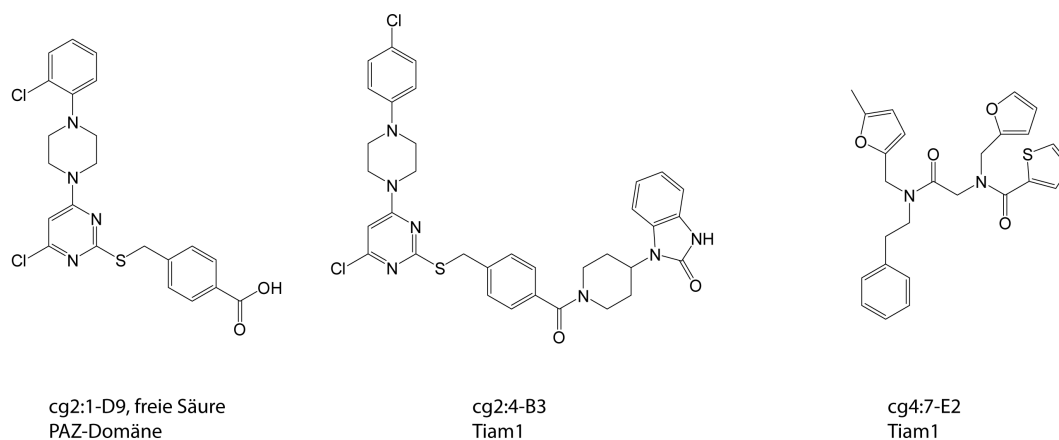


Abbildung 5.3: Identifizierte Hitverbindungen aus der Diplomarbeit von Barbara Albertoni¹²⁸ und dem K91-basierten ADLOC.

nukleotid-Austausch an Rac2 (siehe Abb. 4.24). Ein Aggregationseffekt kann trotz Anwesenheit von 0,001 % Tween 20 nicht ausgeschlossen werden. Zur genauen Aufklärung des Mechanismus der Inhibition wären besonders direkte Interaktionsmessungen wie Isotherme Titrationskalorimetrie oder Thermophorese-Messungen zwischen Hitverbindung und Protein aussagekräftig. Da die Hitverbindung cg2:4-B3 in allen Experimenten auf RNA-Strukturen/Bausteine (ADLOC, Filterbindung, Nukleotidaustausch) trifft, kann im Prinzip nicht ausgeschlossen werden, dass cg2:4-B3 RNA bindet. Schon sehr lange bekannt sind bestimmte Antibiotika, die spezifisch ribosomale RNA binden,¹⁷⁸ während Substanzen wie die Farbstoffe Ethidiumbromid oder TO-PRO unspezifisch in die RNA interkalieren.¹⁷⁹ Es konnten eine Vielzahl an chemischen Verbindungen identifiziert werden, die spezifisch definierte RNA-Strukturen erkennen.¹⁸⁰ Zur zweifelsfreien Bestätigung dieser These wären NMR-Studien oder FID-Experimente (*Fluorescent Intercalator Displacement*) geeignet.¹⁸¹

Die DH-Domäne von Tiam1 ist aus 9 α -Helices und vier 3_{10} -Helices, die einem „Chaise longue“ ähneln, aufgebaut. Die Helices 1, 2, 7 und 8 bilden die so genannten *conserved regions* 1-3 (CR1-3), die die invarianten Sequenzbereiche der homologen Mitglieder der DH-Familie darstellen.¹¹⁴ Durch die von Sondek *et al.* gelöste Kristallstruktur von Tiam1 DHPH im Komplex mit der GTPase Rac1 ist es möglich die für die Katalyse des Nukleotidaustauschs wichtigen Aminosäuren zu benennen. Besonders Lys1195, unterstützt von Gln1191 und Leu1198 sind für die Aktivität von

zentraler Bedeutung. Durch einen Sequenzvergleich von Tiam1_{1033–1406} mit der PAZ-Domäne des Argonaute Proteins lassen sich innerhalb der CR-3 Region Übereinstimmungen feststellen (siehe Abb. 5.4). Besonders um das katalytisch kritische Lys1195 sind konservierte Positionen erkennbar. Analog in der PAZ-Sequenz lassen sich die für die Bindung des 3'-Endes der siRNA verantwortlichen Thr305, Tyr309, Phe310, Arg313 und Tyr314¹⁸² mit der CR3-Region von Tiam1 DH überlagern. Auch wenn es keine strukturellen Gemeinsamkeiten gibt, so wäre es prinzipiell denkbar, dass durch eine ähnliche Oberflächenladung die gefundenen niedermolekularen Verbindungen cg2:4-B3 bzw. die freie Säure von cg2:1-D9 diese Sequenzmotive binden. Da bis zum jetzigen Zeitpunkt direkte Bindungsdaten (SPR, ITC etc.) von Tiam1_{1033–1406} mit cg2:4-B3 fehlen, kann jedoch nur spekuliert werden.

Die Aptamer-basierte Suche nach chemischen Sonden zur Inhibition der GEF-Aktivität von Tiam1 kann als eine aussichtsreiche Strategie angesehen werden. Die Zahl von bekannten niedermolekularen GEF-Inhibitoren ist bislang sehr beschränkt. Neben dem Inhibitor SecinH3, der die Sec7-Domäne der Arf-GEFs blockiert,²⁹ wurde vor kurzem eine Verbindung beschrieben, die die N-terminale Rho-GEF Domäne von Trio inhibiert.¹⁸³ Aufgrund ihrer vermuteten hohen Relevanz bei der Entgleisung von Signalkaskaden wird der Suche nach GEF-Inhibitoren viel Aufmerksamkeit geschenkt. Ein Charakteristikum von GEF-GTPase Interaktionen ist die sehr große Interaktionsfläche,¹⁸⁴ die von kleinen niedermolekularen Verbindungen nur unvollständig abgegriffen werden kann.²⁷ Dadurch ist der Ansatz über ein inhibitorisches Aptamer geeignete Inhibitoren zu finden sicherlich erfolversprechender, als direkte funktionale Assays. Im Durchschnitt ist nämlich ein Aptamer in der Lage eine Fläche von bis zu 1000 Å² zu erkennen,¹¹ dies zwar immer noch kleiner ist als die 2000-3000 Å² große Interaktionsfläche von GEF-GTPase Interaktionen, aber trotzdem erheblich größer als Interaktionsflächen mit kleinen Molekülen.²⁷

5.3 Vav1-spezifische Aptamere: *in vitro* Selektion und Charakterisierung

Vav1 ist ein 95 kDa großes Protein, das in hämatopoetischen Zellen und Krebszellen (z.B. Lungenkrebszelllinie H358) exprimiert wird, wo es bei der Signaltransduktion von enormer Bedeutung ist.¹³⁰ Es besitzt eine Vielzahl unterschiedlicher

5. DISKUSSION

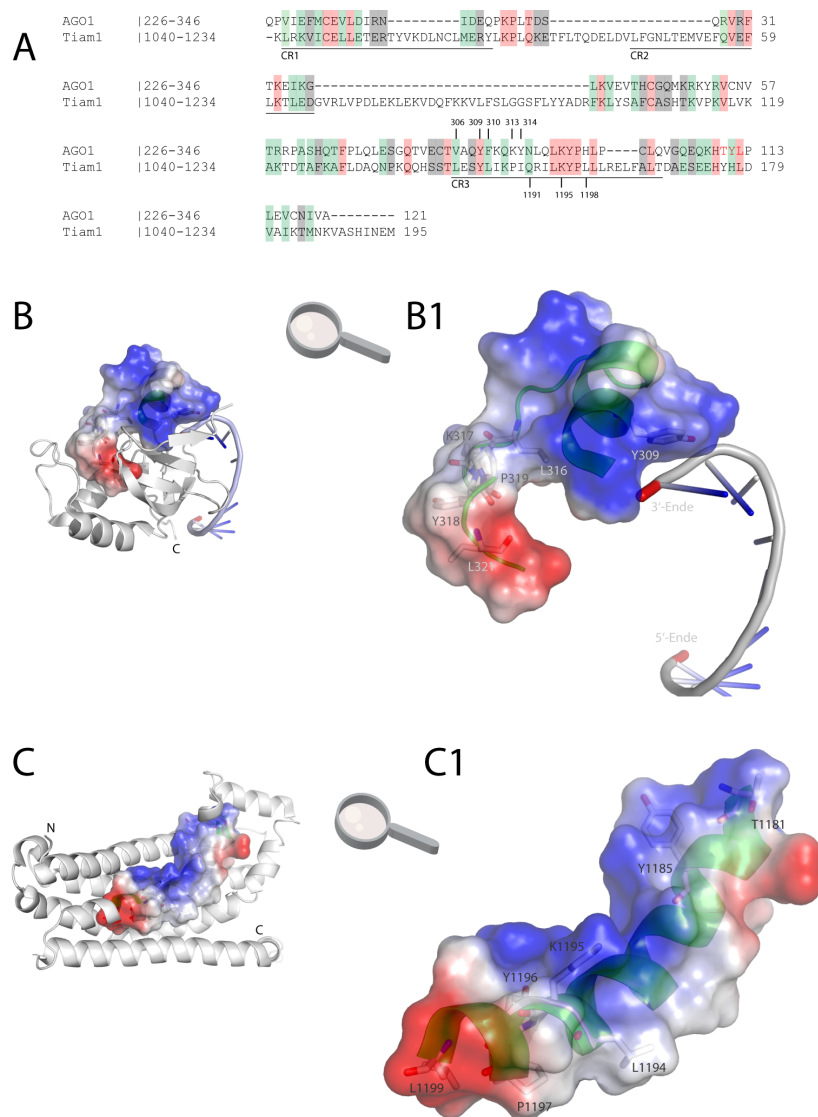


Abbildung 5.4: (A) Sequenzvergleich zwischen Tiam1 DH und PAZ Domäne aus Argonaute Protein (eIF2c1); CR1-3: Konservierte Bereiche der DH-Domäne, katalytisch wichtige Aminosäuren für den Guaninnukleotid-Austausch von Tiam1¹¹⁴ und der 3'-siRNA Bindung der PAZ-Domäne¹⁸² sind gekennzeichnet. Rot: sequenzidentisch, grün: Aminosäuren mit sehr ähnlichen Eigenschaften, blau: Aminosäuren mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften. (B) Darstellung der PAZ-Domäne mit gebundener siRNA (pdb: 1SI2). (B1) Darstellung der Oberflächenladung der PAZ-Domäne (aa 306-322). Blau: positive Ladung, rot: negative Ladung, weiß: neutral. Übereinstimmende Positionen mit der Tiam1-Sequenz sind als Stab-Modell dargestellt. (C) Darstellung der DH-Domäne von Tiam1 (pdb: 1FOE). (C1) Darstellung der Oberflächenladung der DH-Domäne (aa 1181-1199). Blau: positive Ladung, rot: negative Ladung, weiß: neutral. Übereinstimmende Positionen mit der PAZ-Sequenz sind als Stab-Modell dargestellt.

Domänen, wobei die Anwesenheit der DHPH-Tandemdomäne zur Einordnung in die Familie der Dbl-GEFs führt. Des Weiteren besitzt der C-Terminus ein SH2-SH3-SH2-Modul, um in vielfältiger Weise Protein-Protein Interaktionen aufzubauen. Die GEF-Aktivität ist nicht spezifisch auf einen Vertreter der Rho-GTPasen beschränkt, sondern lässt sich in der folgenden Reihenfolge nach absteigender Aktivität auflisten: Rac1>Cdc42>RhoA.⁸⁵ Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die intramolekulare Regulierung der GEF-Aktivität durch Src-Kinase-vermittelte Phosphorylierungen an 3 Tyrosinresten N-terminal zur DH-Domäne entscheidend sind.¹³¹ Die spezifische Adressierung der DH-Domäne von Vav1 mit dem Ziel einer Inhibition der GEF-Aktivität sollte durch eine Aptamerselektion verwirklicht werden. Durch die Anwesenheit der N-terminalen inhibitorischen Helix (siehe Abb. 5.5) ergab sich die Möglichkeit die autoinhibierte Konformation mit einem Aptamer zu stabilisieren.¹⁸⁵ Folgende Konstrukte sind für die Selektion eingesetzt worden: DH+Helix (Vav1₁₇₀₋₃₇₇), DH-Helix (Vav1₁₈₁₋₃₇₇), pTyr174 DH+Helix (Vav1*₁₇₀₋₃₇₇), sowie das GEF-aktive Konstrukt DH-PH-CRD (Vav1₁₈₉₋₅₇₅). Das Selektionsprotokoll basierte analog zur Tiam1-SELEX (siehe 4.1.5) auf einer Immobilisierung des Zielproteins auf Streptavidin-funktionalisierte Dynabeads. Durch das Vorhandensein eines C-terminalen Strep-Affinitätsankers mussten die isolierten DH-Domänen, im Gegensatz zum

Vav1₁₈₉₋₅₇₅-Konstrukt, nicht *in vitro* biotinyliert werden.¹⁸⁶ Die RNA-Bibliothek besaß einen 50 nt langen randomisierten Bereich, der von konstanten Primer-Bindesequenzen flankiert war (siehe Abb. 4.3). Zu Beginn der Selektion wurde die Affinität der Startbibliothek zum Zielprotein bestimmt. In einem Filterbindungsexperiment mit intern markierter [³²P]-RNA konnte bei der höchsten Konzentration (1,8 μ M) Vav1₁₇₀₋₃₇₇ eine erhöhte Retention von circa 1 % beobachtet werden. Die Selektion der kurzen DH-Konstrukte konnte aufgrund der hohen Stringenz innerhalb von einer Woche beendet werden. Die Selektion gegen das GEF-aktive Vav1₁₈₉₋₅₇₅ wurde zusätzlich nach dem Protokoll der Tiam1-SELEX (siehe 4.1.5) durchgeführt. Es gelang jedoch keine erfolgreiche Anreicherung von bindenden Sequenzen. Ein Grund dafür könnte die sich am C-Terminus befindende Cystein-reiche Domäne (CRD) sein, da sie möglicherweise im Verlauf der Selektion durch eine Redox-Empfindlichkeit (Disulfidbrücken) zu Konformationsänderungen neigt.¹⁸⁷ Prinzipiell sind jedoch Aptamere gegen Zinkfinger-Proteine bekannt.¹⁸⁸

Für alle 3 DH-Konstrukte ist es gelungen Sequenzen anzureichern, die sich durch eine erhöhte Affinität zum jeweiligen Vav1-Konstrukt auszeichnen. Die anschließende Charakterisierung der Monoklone in Filterbindungsexperimenten führte zu den folgenden Ergebnissen: Die Selektion gegen Vav1*₁₇₀₋₃₇₇ führte zu keinem spezifisch bindenden Monoklon, einzig Sequenz P10 zeigte eine Affinität im hohen nanomolaren Bereich. Durch eine geringe Filterretention (circa 5 % bei 2 μ M) und eine Affinität zu Streptavidin wurde P10 nicht weiter charakterisiert. Es lässt sich spekulieren, was für einen Einfluss die Phosphorylierung einer Aminosäure auf die SELEX ausübt. Sicherlich werden zusätzliche elektrostatische Wechselwirkungen aufgebaut, doch können diese den Misserfolg nicht erklären, da phosphorylierte Proteine *per se* nicht ungeeignet für *in vitro* Selektionen sind.¹⁹ Abermals nur eine einzige Sequenz wurde in der angereicherten Bibliothek der Selektion gegen Vav1₁₈₁₋₃₇₇ identifiziert. Der Klon 11 zeigte im Sättigungsbereich der Filterbindungsexperimente hohe Retentionswerte, die auf eine stabile Aptamer-Protein Wechselwirkung schließen lassen. Des Weiteren diskriminiert diese Sequenz Vav1 DH spezifisch von Tiam1 DH und ist ebenfalls in der Lage mit einer vergleichbaren Dissoziationskonstante an Vav1₁₇₀₋₃₇₇ zu binden. Diese Beobachtung wirft einen Schatten auf die Inhibition der GEF-Aktivität, da die N-terminale inhibierende Helix Aminosäurereste abschirmt, die für die GEF-Aktivität essentiell sind.¹³¹ Dadurch dass beide Vav-Konstrukte, die sich nur in der Präsenz dieser Helix unterscheiden, gleich gut gebunden werden, ist auszuschließen, dass katalytisch wichtige Aminosäuren von Klon 11 erkannt werden.

Die Analyse der angereicherten Bibliothek von Vav1₁₇₀₋₃₇₇ ergab 6 Sequenzen, die eine ausreichend hohe Affinität ($K_D < 1 \mu$ M) besaßen. Die Sequenz V20 zeigte im Sättigungsbereich Filterretentionen kleiner als 5%, sodass sie aussortiert wurde. Die verbliebenen Monoklone zeigten, mit Ausnahme von V7 und V22, eine im mittleren nanomolaren Affinitätsbereich spezifische Bindung an die DH-Domäne von Vav1. Auch wenn keine Dissoziationskonstanten für Vav1₁₈₁₋₃₇₇ bestimmt worden sind, so lassen die zu Vav1₁₇₀₋₃₇₇ vergleichbaren Retentionen im Filterbindungsexperiment auf ähnliche Affinitäten zum kürzeren Konstrukt schließen. Dies würde bedeuten, dass die N-terminale Helix keine bzw. nur wenige Interaktionen in der geschlossenen Konformation zum Aptamer unterhält. Interessanterweise befindet sich die inhibitorische Helix in einem Gleichgewicht zwischen offener und geschlossener Konformation. Dieses ist bei einem nicht-phosphoryliertem Tyr174 zu 90 % auf der

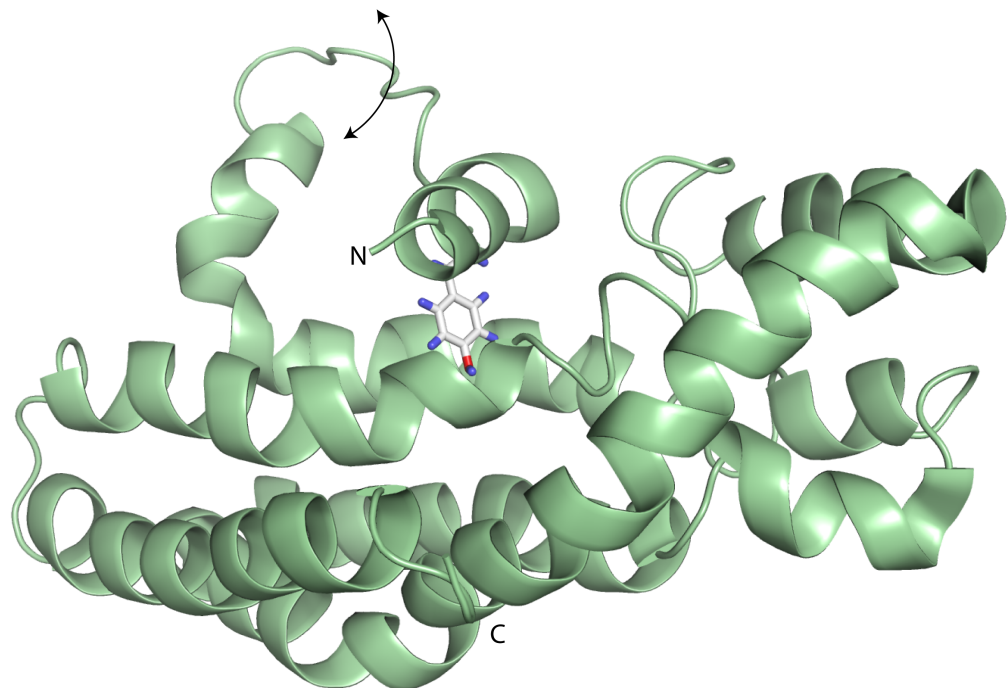


Abbildung 5.5: Im autoinhibierten Zustand der DH-Domäne kommt es zur Abschirmung der GTPase-GEF Interaktionsfläche durch eine Wechselwirkung von Tyr174 der N-terminalen Helix mit katalytisch relevanten Aminosäuren der DH-Domäne.

5. DISKUSSION

geschlossenen Seite,¹⁸⁵ was jedoch ebenfalls bedeutet, dass 10 % geöffnet vorliegen. Allein die Sequenz V21 zeigt eine höhere Filterretention mit Vav1_{181–377}, dies könnte auf eine stabilere Bindung im geöffneten Zustand der Helix hindeuten. Durch eine Sequenzanalyse der spezifischen Aptamere 11, V16, V17 und V21 konnte ein 10 nt langes C-reiches Konsensusmotiv ermittelt werden (siehe Abb. 4.28). Durch eine *in silico* Faltungsanalyse¹¹⁷ gelang es die Position dieses Motivs innerhalb der Sekundärstruktur zu lokalisieren. Abbildung 4.31 verdeutlicht, dass sich die gemeinsame Sequenz innerhalb einzelsträngiger Bereiche befindet. Die Ausnahme bildet Aptamer 11, dessen Motiv zum größten Teil in einer Stammstruktur vorliegt. Obgleich *in silico* Analysen durch ihre mathematischen Modelle nur annähernd arbeiten, so sind sie doch wertvolle Hilfsmittel, um erste Abschätzungen machen zu können. Hierbei scheinen sich die Aptamere der Selektion gegen Vav1_{170–377} anders evolviert zu haben als Klon 11. Es ist bei V16, V17 und V21 durch die großen ungepaarten Bereiche von einer adaptiven Bindung an das Zielprotein auszugehen.¹⁸ Zur zweifelsfreien Ermittlung der Sekundärstruktur sind jedoch Versuche mit chemischen Sonden (*chemical probing*) unablässig, besonders um die Unterschiede in An- und Abwesenheit des Zielproteins studieren zu können.¹⁶⁵

Anschließend sollte der Einfluss der Aptamere auf den Vav1_{189–575}-beschleunigten Guaninnukleotid-Austausch an Rac1 untersucht werden. Im Vorfeld wurde sichergestellt, dass das Vav1_{189–575}-Konstrukt von den Aptameren mit einer vergleichbaren Affinität gebunden wird. Der intrinsische Austausch von 1 μM Rac1*mGDP konnte durch die Zugabe von 200 nM Vav1_{189–575} und 500 μM GTP um den Faktor 30 beschleunigt werden. Wie sich herausstellte war jedoch keines der Aptamere bis zu einer Konzentration von 4 μM in der Lage die Austauschaktivität von Vav1_{189–575} zu inhibieren. Dass die selektierten Aptamere keinen Einfluss auf die Austauschaktivität von Vav1 haben ist sicherlich überraschend, da für den nahen Verwandten Tiam1 eine Inhibition der Austauschaktivität durch das selektierte Aptamer K91 gelang. Der Mechanismus des Vav1-katalysierten Guaninnukleotid-Austauschs an Rac1 unterscheidet sich jedoch bemerkenswert von dem des Rho-GEF Familienmitglieds Tiam1. Während Tiam1 spezifisch für Rac1 ist besitzt Vav1 ein Spektrum an möglichen Substraten, neben Rac1 wird Cdc42 und RhoA akzeptiert.⁸⁵ Zusätzlich besitzt Vav1 durch die CRD-Domäne ein weiteres Modul zur Regulierung der katalytischen Aktivität. Während des Austauschs werden intramolekulare Interaktionen zwischen

DH- und CRD-Domäne aufgebaut, die einen stabilisierenden Effekt auf die Interaktion mit der GTPase haben. Entgegen der Tiam1-kritischen Interaktionen mit Trp56 von Rac1¹¹⁴ stabilisiert die CRD-Domäne eine Interaktion mit Asp65 aus der Switch II-Region,¹³³ eine zentrale Positionierung von Trp56 findet nicht statt. Dies erklärt, warum der Rac1 Inhibitor NCS23766, der einem *in silico* Screening gegen die Binde tasche von Trp56 in Rac1 entstammt,⁵³ die Vav1-beschleunigte Aktivierung von Rac1 nicht beeinflusst. Ebenfalls erklärt dies die Beobachtung, dass das Guanosin analog 6-Thio-GTP, ein Metabolit des Wirkstoffs Azathioprin, einen immunsuppressiven Effekt besitzt. Durch den sterischen Einfluss von GTPase-gebundenem 6-Thio-GTP auf wichtige Interaktionen mit der Switch II-Region von Rac1 kommt es zur spezifischen Inhibition der Vav1-Aktivität.^{189,109}

Eine weitere Besonderheit von Vav-Austauschfaktoren (Vav1-Vav3) ist die Regulierung der GEF-Aktivität durch Tyrosin-Phosphorylierungen innerhalb der N-terminal benachbarten AC/CH-Domäne (siehe Abb. 5.6).¹³¹ Eine Trunkierung dieses Bereichs führt zur Aktivierung des Proto-Onkogens Vav1.⁵⁹ Die katalytische DH-Domäne wird im inaktiven Zustand von einer autoinhibitorischen Helix (aa 167-178) abgeschirmt, sodass eine Komplexbildung zwischen GTPase und GEF nicht stattfinden kann.¹³⁴ Erst die Phosphorylierung von Tyr174 hebt diese Autoinhibition auf und die GEF-Aktivität von Vav1 wird hergestellt.¹³¹ Durch eine ungünstige Konformation von Tyr174 ist die Zugänglichkeit für Tyrosinkinase der Lck-Familie eingeschränkt, deshalb werden zuerst die beiden Reste Tyr142 und Tyr160 innerhalb der CH-Domäne, der ebenfalls eine negative Regulation der GEF-Aktivität zukommt, phosphoryliert (siehe Abb. 5.6). Dies führt zu einer Re-Organisation der CH-Domäne (Intra-Domänen Kooperativität) und somit zu einer besseren Kinase-Zugänglichkeit von Tyr174.⁸⁶

Die Aptamere V16, V17 und V21 stammen aus der Selektion gegen die autoinhibierte DH-Domäne von Vav1₁₇₀₋₃₇₇ und infolgedessen wäre es denkbar, dass das Ziel epitop zumindestens teilweise aus der autoinhibitorischen Helix besteht. Die Konsequenz einer Interaktion der autoinhibitorischen Helix mit dem Aptamer wäre wahrscheinlich eine noch schlechtere Kinase-Zugänglichkeit von Tyr174, sodass es zu einer Inhibition der Aktivierung käme. Da jedoch die Helix nicht starr mit der DH-Domäne verankert ist, sondern sich im Gleichgewicht zwischen offener und geschlossener Konformation befindet,¹⁸⁵ wäre analog zu Proteinaktivatoren eine Adressierung der

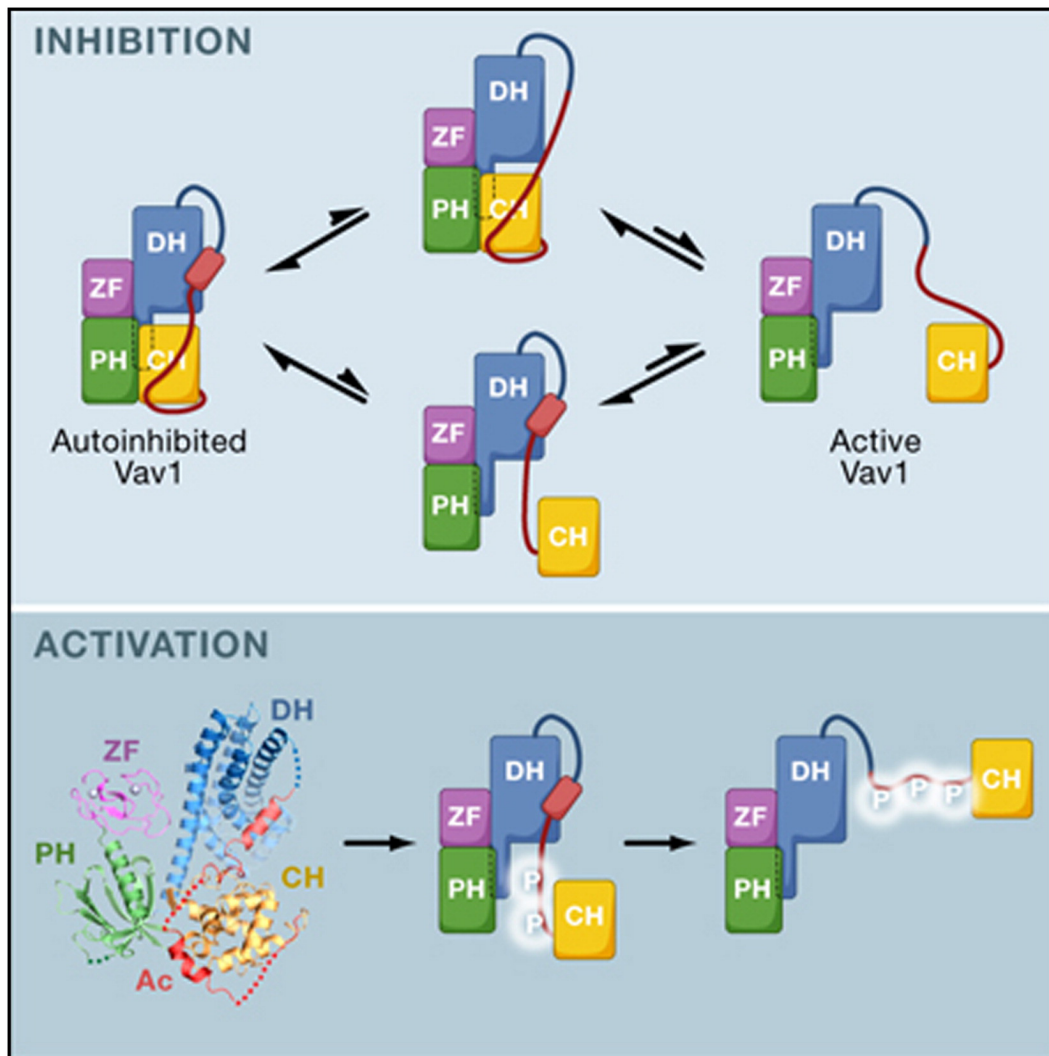


Abbildung 5.6: (Inhibition) Die DH-Domäne besitzt im autoinhibierten Zustand einen fest verankerten N-terminalen Bereich, der durch interaktionen mit der CH-Domäne und der PH-Domäne aufrecht erhalten wird. **(Activation)** Durch eine initiale Phosphorylierung von Tyr142 und Tyr160 werden die Wechselwirkungen zwischen CH- und dem Ac-Bereich geschwächt, sodass nur noch die inhibierende Helix um den Rest Tyr174 die GTPase-Interaktionsfläche der DH-Domäne abschirmt. Durch die Phosphorylierung von Tyr174 kann die GEF-Aktivität von Vav1 vollständig hergestellt werden.⁸⁶

offenen Helix möglich.¹⁹⁰ Zur Beantwortung dieser Frage wurde Vav1_{170–377} *in vitro* durch die Src-Kinase phosphoryliert und nach SDS-PAGE Auftrennung durch einen anschließenden immunologischen Nachweis von pTyr174 ausgewertet. Für eine qualitative Aussage wurden alle Aptamere bei 1 μM verglichen. Durch hohe Standardabweichungen im Western Blot wurde parallel die Phosphorylierung durch ein *luminescent oxygen channeling*-basiertes Experiment quantifiziert und der Einfluss der Aptamere bei 2 μM untersucht. Im Assay wurden Streptavidin-Donorbeads und *anti*-pTyr-IgG-markierte Akzeptorbeads verwendet (siehe 7.9.4). Da die gemachten Beobachtungen beider Experimente übereinstimmen, soll die Diskussion auf den Ergebnissen von Western Blot-Daten sowie LOC-Daten basieren. Das Aptamer 11, selektiert gegen die DH-Domäne ohne autoinhibitorische Helix, konnte als bindende Negativkontrolle eingesetzt werden. Des Weiteren sollte das unspezifische Aptamer V22, das in den Filterbindungsanalysen einen sehr stabilen Protein-RNA-Komplex bildete, als Vergleich herangezogen werden. Die ATP-Konzentration lag mit 5 mM weit über der K_M von ATP und Src,¹⁹¹ sodass eine Limitierung von ATP ausgeschlossen werden kann. Überraschend zeigte keines der getesteten Aptamere eine Inhibition der Phosphorylierung von Tyr174 durch die Src-Kinase. Wie schon erwähnt befindet sich die autoinhibitorische Helix in einem konformationellen Gleichgewicht zwischen offener und geschlossener Form, wobei sie im nicht-phosphorylierten Zustand zu 10 % auf der Seite der offenen Konformation liegt.¹⁸⁵ Um die Phosphorylierung zu inhibieren müsste das Aptamer einen dynamischen Zustand einfrieren können d.h. das ohnehin schon kleine Verhältnis von offener zu geschlossener Konformation von 1 zu 9 noch weiter reduzieren. Dies ist sicherlich nicht unmöglich, jedoch besitzen Ribonukleinsäuren durch Solvatationsprozesse und Assoziationen mit divalenten Kationen hohe konformationelle Freiräume.¹⁹² Die Flexibilität der Basen kann zu einer Vielzahl von energiearmen Faltungen führen,¹⁹³ was die Stabilisierung einer einzelnen Konformation erschweren dürfte.

Wie sich jedoch herausstellte, waren die Aptamere V21 und V22 in der Lage die Phosphorylierung von Tyr174 signifikant zu erhöhen. Das unspezifisch bindende V22 zeigt hierbei den größten Effekt auf die Tyr174-Phosphorylierung durch Src. Da V21 und V22 ein gemeinsames Konsensusmotiv teilen und sich in ihrer Aktivität gleichen, liegt die Vermutung nahe, dass beide Sequenzen ein ähnliches Bindungssepi-top erkennen. Die beobachtete Unspezifität von V22 könnte durch den evolutionären

Austausch von strukturell wichtigen Basen erklärt werden.¹⁹⁴ Diese Vermutung erhärtet sich bei der Betrachtung der *in silico* berechneten Sekundärstrukturen beider Aptamere (siehe Abb. 4.31). Das Konsensusmotiv der selektierten Vav1-Aptamere liegt bei V21 ungepaart vor, während es in V22 Teil einer Stammstruktur ist. Vertauscht man beide Motive, so liegt bei V22 dieses danach fast vollständig ungepaart vor, während V21 eine vollkommen andere Konformation–mit teilweise gepaartem Konsensusmotiv–einnimmt.

Die RNA/Protein-Bindung vollzieht sich fast immer durch einen so genannten *induced fit* Mechanismus, dieser gewährleistet während der RNA-Protein-Bindung eine hohe Spezifität und Affinität.¹⁹⁵ Durch GC-reiche Stammstrukturen besitzt V22 einen energiearmen Grundzustand (-35 kJ/mol vs V21: -10 kJ/mol), der während der Bindung zum Zielprotein zu einer suboptimalen Komplexierung führen könnte.¹⁹⁶ Neben der Spezifität scheint jedoch die Aktivierung der Phosphorylierung die ungewöhnlichste Eigenschaft von V21 und V22 zu sein. Spezifische RNA-basierte Agonisten sind bis jetzt nur rational auf der Grundlage von bekannten Aptamerstrukturen konstruiert worden.^{197,198} Durch die gezielte Adressierung einer aktiven Konformation ist dies möglich. Der aktivierende Effekt von V21 und V22 auf die Src-vermittelte Phosphorylierung von Tyr174 ist womöglich auf eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen offener und geschlossener Konformation der autoinhibitorischen Helix zurückzuführen.¹⁸⁵ Durch die Bindung des Aptamers an Vav1 könnten intermolekulare Wechselwirkungen (z.B. van der Waals, ionische Interaktionen bzw. Wasserstoffbrücken) dazu führen, dass sich besonders die unstrukturierten Bereiche zwischen aa 180-189 ordnen und damit Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Tyr174 und Lys322/Tyr209 schwächen.¹³¹ Eine direkte Interaktion der Aptamere mit Aminosäureresten, die an der Positionierung der Helix beteiligt sind, ist durch die fehlende GEF-Inhibition jedoch unwahrscheinlich. Eine bis jetzt nicht diskutierte Möglichkeit, um die erhöhte Phosphorylierung von Y174 in Anwesenheit von V21 und V22 zu erklären, ist die überproportionale Aktivierung der Src-Kinase, die sich in einer erhöhten Autophosphorylierung widerspiegelt. Prinzipiell werden Src-Kinasen entweder über die Dephosphorylierung eines autoinhibitorischen Tyr oder durch die Substratbindung an die Src-SH2 oder Src-SH3-Domäne aktiviert.¹⁹⁹ Die Autophosphorylierung konnte ebenfalls bestimmt werden, lediglich V22 zeigte einen um den Faktor 2 erhöhten Phosphorylierungsgrad, verglichen mit der nicht bindenden B50

Bibliothek (Daten nicht gezeigt). Dies könnte wiederum bedeuten, dass V22 ebenfalls die SH2 oder SH3-Domäne der Src-Kinase erkennt und damit zu einer erhöhten Kinaseaktivität beiträgt.

Aufgrund der Tatsache, dass Vav1 neben Tyr174 noch zwei weitere regulatorische Tyrosinreste (Tyr142, Tyr160) mit einem Src-Erkennungsmotiv besitzt, ist prinzipiell ein Einfluss des spezifischen Aptamers V21 auf diese beiden nicht auszuschließen. Durch eine Mutagenese-Studie mit Vav1_{134–564} wurden die jeweiligen Tyrosinreste zu Phenylalanin mutiert, um damit die Phosphorylierung positionsspezifisch untersuchen zu können. Ein LOC-Experiment mit Vav1_{134–564} wt bestätigte ein weiteres Mal den aktivierenden Effekt von V21 (siehe Abb. 4.36). Die Phosphorylierung von Vav1_{134–564} Tyr142Phe führte zu keinem auswertbaren Signal, was im Einklang mit dem postulierten Mechanismus der Vav1-Aktivierung ist.⁸⁶ Da Tyr142 am besten für die Src-Kinase zugänglich ist, kommt es zu einer initialen Komplexbildung, auf die eine intramolekulare Phosphorylierung von Tyr174 folgt. Durch den Wegfall dieses *access point* in der Tyr142Phe-Mutante ist die Src-Kinase nicht mehr in der Lage Vav1 effektiv zu binden. Die Untersuchung an Vav1_{134–564} Tyr160Phe offenbarte einen geringen Einfluss von Tyr160 auf die Gesamt-Phosphorylierung, da die gemessenen LOC-Werte keine Unterschiede zum Wildtyp zeigen. Des Weiteren lässt sich kein Einfluss des Aptamers V21 auf die Phosphorylierung dieser Mutante erkennen. Eventuell führt die Tyr160Phe Mutation zu einer günstigeren Konformation, die die Phosphorylierung von Tyr174 durch die Src-Kinase erleichtert. Zum Schluss konnte durch die Tyr174Phe Mutation die Relevanz von Tyr174 zur Phosphorylierungssignal bestätigt werden. Ein Einfluss von V21 auf die Phosphorylierung von Tyr142 und Tyr160 scheint nicht gegeben zu sein. Zusammenfassend lässt sich der Effekt von V21 auf die Phosphorylierung der drei wichtigen Vav1 Tyr-Reste 142, 160 und 174 wie folgt aufzeigen: Im konzertierten Ablauf der Src-vermittelten Phosphorylierung von Vav1_{134–564} kann bei einer Konzentration von 2 μ M V21 eine erhöhte Tyr-Phosphorylierung gemessen werden. Ein Einfluss von V21 auf die Phosphorylierung von Tyr142 und Tyr160 ließ sich mit den Punktmutanten Tyr142Phe und Tyr160Phe nicht beobachten. Es kann ebenfalls eine unspezifische Aktivierung der Src-Kinase durch V21 ausgeschlossen werden.

5.4 GTPase-Aktivierungssensor

Die Bestimmung der aktiven GTP-gebundenen Form einer kleinen GTPase in Zellysatenproben erfordert im allgemeinen ein *pull-down* Experiment mit spezifisch bindenden Effektorproteinen. Oftmals müssen für diese Assays 500 μg und mehr an Zellysate eingesetzt werden, um ausreichend große Signalunterschiede im abschließenden Western Blot zu detektieren. Durch die Entwicklung eines sensitiven und homogenen Assays zur Messung des Aktivierungszustands der Rho-GTPase Rac1 sollte die Grundlage für eine einfache Messung im Zellysate geschaffen werden. Der auf *luminescent oxygen channeling*-basierte Versuchsaufbau nutzt analog zu *pull-down* Experimenten die spezifische Interaktion zwischen einem Effektorprotein (Pak1_{70–117}) und der GTPase Rac1 aus (siehe Abb. 4.37). Durch die Immobilisierung des biotinylierten Effektors auf Streptavidin-Donorbeads und der GTPase auf *anti-Rac1*-IgG-funktionalisierte-Akzeptorbeads lassen sich hohe lokale Konzentrationen beider Bindungspartner generieren. Dies führt dazu, dass bereits kleinste Mengen der aktiven GTPase ausreichen, um durch eine Aufkonzentrierung auf den *Beads* ein LOC-Signal zu erzeugen. Der Aufbau des Sensors erlaubt einen einfachen Austausch des Antikörpers, um ebenfalls die GTP-Beladung von Cdc42 zu messen, da Pak1 neben Rac1 ebenfalls Cdc42 bindet.³⁹ Weiterhin deuten Vorversuche mit anderen GTPase/Effektor-Komplexen (Ras/Raf1, Arf6/GGA3) darauf hin, dass der Aktivierungssensor für andere Mitglieder der Ras-Superfamilie einsetzbar ist.²⁰⁰ Durch den *Quenching*-Effekt des Zellysates werden geringere Signalintensitäten gemessen. Hier lassen sich in Zukunft vielleicht so genannte AlphaLisa-Beads (PerkinElmer) einsetzen, die eine sehr definierte Emission bei 615 nm zeigen – im Kontrast zum breiten Emissionspeak zwischen 520 und 620 nm der AlphaScreen-Akzeptorbeads.

6

Ausblick

Die durch die Aptamerselktionen gegen die Rho-GEFs Tiam1 und Vav1 gewonnenen Einblicke lassen für weitergehende Studien einen großen Spielraum. Das *anti*-Tiam1_{1033–1406} Aptamer K91 unterstreicht die Machbarkeit einer Selektion von RNA-Aptameren zur Inhibition von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren. Zusätzlich konnte durch die Etablierung eines Aptamer-Verdrängungsassays der Bogen zu niedermolekularen Substanzen gespannt werden. Es bleibt abzuwarten wie die identifizierten Hitverbindungen in Zellkultur-basierten Experimenten endogenes bzw. überexprimiertes Tiam1 modulieren. Für die weitere Charakterisierung der Substanzen sind als nächstes Bindungsstudien durch ITC, Oberflächenplasmonresonanz oder Thermophorese zu empfehlen. Sicherlich sinnvoll wäre ebenfalls eine weitergehende Suche nach strukturell verwandten Molekülen mit einer besseren Inhibition des Guaninnukleotid-Austauschs. Die zu erwartenden Effekte der Inhibitoren in Zellkultur-basierten Versuchen können durch den Einfluss von Tiam1 auf Rac1 sehr anschaulich über Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts in z.B. Hek293 Zellen beobachtet werden („Membrane ruffles“).²⁰¹ Ein initiales Experiment wäre zuerst der pull-down von aktivem Rac1 in An- und Abwesenheit der Substanzen. Des Weiteren bleibt abzuwarten, inwieweit die Inhibition der DH-Domäne von Tiam1 eine Beeinflussung von anderen Signalwegen (z.B. Ras) nach sich zieht.⁷⁸

In zellulären Experimenten könnte ebenfalls das Vav1-spezifische Aptamer V21 weiter charakterisiert werden. Hier gilt es herauszufinden, wie stabil die RNA innerhalb der Zelle ist und ob sich die *in vitro* Beobachtungen im komplexeren Umfeld der Zelle bestätigen lassen. Der Transfer des Aptamers in die Zelle gelingt entweder über

einen viralen Shuttlevektor²² oder direkt durch Lipofektion der *in vitro* transkribierten RNA.¹⁴³ Die direkte Konsequenz von V21 ist neben der Erhöhung des Phosphorylierungsgrades eine erhöhte GEF-Aktivität von Vav1. Die Untersuchung der Rac1-Aktivierung nach einer Stimulation mit Wachstumsfaktoren setzt voraus, dass Rac1 nur durch Vav1 aktiviert wird. Für die Lungenkrebszelllinie H358 ist dies der Fall, Vav1 siRNA Experimente legen diesen Schluss nahe.¹³⁸ Somit sind diese Zellen ideal, um den Effekt des Vav1-spezifischen Aptamers V21 auf die Aktivierung von Rac1 zu untersuchen. Als Kontrollzelllinie sind H460 Zellen prädestiniert, da sie kein endogenes Vav1 besitzen und somit andere Guaninnukleotid-Austauschfaktoren zur Aktivierung von Rac1 einsetzen.¹³⁸ Zusätzlich könnte durch den Einsatz eines Src-Kinase Inhibitors der direkte Einfluss von Src auf die Phosphorylierung von Vav1 bewiesen und damit die Spezifität von V21 auf die Src-vermittelte Phosphorylierung sichergestellt werden.

Das Konzept des GTPase-Aktivierungssensors lässt sich auf weitere GTPase/Effektor Paare ausweiten. Sicherlich entscheidend für den weiteren Erfolg dieses neuen Messverfahrens ist die Akzeptanz und einfache Methodik. Die kommenden Jahre werden zeigen, ob *luminescent oxygen channeling* Messverfahren und mit ihnen die entsprechenden Messgeräte sich weiter durchsetzen werden.

7

Material und Methoden

7.1 Material

7.1.1 Geräte

Gerät; Typ	Hersteller
Agarose Gelkammer	Chemisches Institut, Uni Bonn
Blot Apparatur Transblot Semi-Dry	Biorad
Brutschrank	Binder
Brutschrank, eukaryontische Zellen	Hera Cell
Cafe Gourmet	Philips
FPLC	GE Healthcare
Geiger-Müller-Zählrohr; 900mini-I	Morgan
Geldoc	Biorad
Inkubationsschüttler; Innova 4430	New Brunswick Scientific
Mikropipetten; research	Eppendorf
Mikroplattenlesegerät; LB 940	Berthold
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Odyssey IR Western Blot Detection System	LI-COR Biosciences
PCR-Cycler; T3 Thermocycler	Biometra
pH-Messgerät; pH-Meter	IonoLab
Phosphorimager; FLA-3000	Fujifilm
Photometer; BioMate 3	ThermoSpectronic
Pipettierhilfe; Accujet	Brand
Reinstwasseranlage; Easy Pure UV/UF	Barnstead
Screens für Phosphorimager	Fujifilm
Spannungsquellen; E865; E833; E802	Consort
Sterilbank Bakterienkultur	Antares
Sterilbank eukaryontische Zellkultur	Heraeus
Thermoblock; Block Heater	Stuart Scientific
Thermomixer; comfort	Eppendorf
Tischschüttler; 3017	GFL
Tischzentrifugen 5804R, 5417R	Eppendorf
Überkopfschüttler; Reax2	Heidolph
Ultraschallbad Sonorex Super 10 P	Bandelin
UV-Transilluminator	Biorad
VersaDoc Imaging System	Biorad
Vortexer; 7-2020	NeoLab
Waagen; JL-200	Chyo Balance
Waagen; BL1500S, BP 211D	Sartorius
Wasserbad; 1008	GFL

– Fortsetzung Geräte –

Gerät; Typ	Hersteller
Zentrifuge für 96-Lochplatten; Z300K	Hermle
Zentrifugen; 5804R; 5810R; 5417C	Eppendorf

7.1.2 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
DC-Alufolien 20x20cm Kieselgel 60 F254	Merck
Einwegpipetten 2-50 mL	Falcon
Einwegspritzen	Braun
Glaswolle, silanisiert	Falcon
Kanülen	Terumo
MicroSpin G-25 Säule	GE Healthcare
Polyprepsäule	BioRad
Reaktionsgefäße; 1,5 & 2.0 mL	Eppendorf
Reaktionsgefäße; PCR 0,2 & 0,5 mL	Eppendorf
Skalpelle	Bayha
Spitzen für Mikropipetten	Biozym
Spritzenvorsatzfilter	QualiLab
Sterilfiltrationsaufsätze	Nalgene
Ultra-Free MC 45 μ m	Millipore
Whatman-Filterpapier	Schleicher und Schuell
Zellkulturflaschen	TPP
Zellkulturschalen	TPP
Zentrifugenröhrchen; 15 mL	Roth
Zentrifugenröhrchen; 50 mL	Roth
Zellkulturflaschen	TPP
Zellkulturschalen	TPP

7.1.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von analytischem oder höherem Reinheitsgrad. Wasser wurde einer Easy pure UV/UF Reinstwasseranlage (Barnstead) entnommen.

Reagenz	Hersteller
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma
2-Mercaptoethanol	Sigma
Agarose, <i>electrophoresis grade</i>	Invitrogen

7. MATERIAL UND METHODEN

- Fortsetzung Chemikalien -

Reagenz	Hersteller
Ammoniumperoxodisulfate (APS)	Sigma
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma
Bacto Trypton	Sigma
Bis-Acylamid; Rotiphorese	Roth
Borsäure	Roth
Bradford-Reagenzlösung	Biorad
Bromphenolblau	Merck
Chloramphenicol	Sigma
Chloroform	Merck
Coomassie Brilliantblau G250	AppliChem
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Dimethylsulfoxid	Sigma
Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat	KMF
DMEM Medium	PAA Laboratories
Essigsäure (99.8%)	Merck
Ethanol abs.	Merck
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma
Titriplex	Calbiochem
EZ-Link Sulfo-NHS-LC Biotin	Pierce
NHS Fluorescein	Pierce
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories
Glucose	Sigma
Glutathion reduziert	Sigma
Glycerin	Roth
Glycin	Applichem
Glykogen	Roche
Guanosin-5'-thiophosphat-di-Natriumsalz (GMPS)	Emp Biotech
Harnstoff	Calbiochem
Heparin	Sigma
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	Roth
Igepal CA630	Fluka
Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranosid (IPTG)	Sigma
Kaliumchlorid	Merck

– Fortsetzung Chemikalien –

Reagenz	Hersteller
Kanamycinsulfat	Sigma
Lipofectamin LTX	Invitrogen
Magermilchpulver	Sucofin
Magnesiumacetat-tetrahydrat	Fluka
Magnesiumchlorid	Merck
Metafectene	Biontex
N-N'-N'-N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdihydrogenphosphat-monohydrat	Fluka
PBS Puffer	PAA Laboratories
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Calbiochem
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma
Roti-Phenol für Extrakt	Roth
Salzsäure (37%)	Merck
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Merck
Trypsin/EDTA	Invitrogen
Xylencyanol	Merck

7.1.4 Standards und Kits

Artikel	Hersteller
100 nt RNA Leiter	Fermentas
1000 nt RNA Leiter	Fermentas
100 bp DNA Leiter	PeqLab
1000 bp DNA Leiter	PeqLab
FITC Detection Kit	PerkinElmer
Gel extraction Kit	Qiagen
Phosphotyrosine Detection Kit	PerkinElmer
Plasmid Miniprep Kit	Qiagen
Protein A Detection Kit	PerkinElmer
Rainbow Protein Marker high	GE Healthcare
Rainbow Protein Marker low	GE Healthcare
TruHits Kit	PerkinElmer

7.1.5 Enzyme

Enzym	Hersteller
Anorganische Pyrophosphatase	Roche
Calf Intestine Alkaline Phosphatase	Stratagene
DNase I	Roche
Lysozym	Sigma
Pfu Polymerase	AK Famulok
Reverse Transkriptase; Superscript II	Invitrogen
Rinderserumalbumin (BSA) RNase frei	Calbiochem
RNasin Ribonuclease Inhibitor	Promega
T4 Polynukleotidkinase	New England Biolabs
T7 RNA-Polymerase	AK Famulok
Taq Polymerase	AK Famulok

7.1.6 Nukleotide

Nukleotid	Hersteller
α -[³² P]-GTP	Perkin Elmer
γ -[³² P]-ATP	Perkin Elmer
dNTPs	Larova GmbH
NTPs	Larova GmbH
MantGDP	Jena Biosciences
GTP γ S	Jena Biosciences
GppNHP	Jena Biosciences
Bodipy FL GDP	Invitrogen

7.1.7 Synthetische Oligodesoxynukleotide

Die Oligodesoxynukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) in HPLC gereinigter Form bezogen.

Tabelle 7.7: Synthetische Oligonukleotide

Name	Sequenz 5'-3'
Fwd-Rac1-BamHI	CGCGGATCCGCATGCAGGCCATC AAGTGTGTGG
Rev-Rac1-EcoRI	CCGGAATTCTTACAACAGCAGGCATT

– Fortsetzung Oligonukleotide –

Name	Sequenz 5'–3'
	TTCTCTTC
Fwd-Rac2	ATGCAGGCCATCAAGTGTGTG
Rev-Rac2	CTAGAGGAGGCTGCAGGCGCG
Fwd-Tiam1-1033-1255	ATGCGACAGCTGTCGGATGCGG
Rev-Tiam1-1033-1255	TTACTCTCCCGTCTGCTCAGCAATCAG
Fwd-Tiam1-1255-1400- <u>BamHI</u>	CGCGGATCCGAGAAGAAAGAGGTTG
	CAGATCTGAG
Rev-Tiam1-1255-1400- <u>EcoRI</u>	CCGGAATTCTTATTTATCTCGCAG
	GATCGAATGC
Fwd-Vav1-189-575- <u>BamHI</u>	CGCGGATCCATGACAGAGT
	ATGACAAGCGCTGCTGC
Rev-Vav1-189-575- <u>EcoRI</u>	CCGGAATTCTTATAGTTCCT
	GGGAAATCTTGCCC
Fwd-Vav1-189-575- <u>M351T</u>	CACGCAGGAGGCGACGGAGAAGGAGAAC
Rev-Vav1-189-575- <u>M351T</u>	GTTCTCCTTCTCCGTTCGCCTCCTGCGTG
Fwd-Vav1-134-564- <u>Y142F</u>	GAGTGTAGGTGATGAAGACATCTTCAGTG
	GCCTGTCCGACC
Rev-Vav1-134-564- <u>Y142F</u>	GGTCGGACAGGCCACTGAAGATGTC
	TTCATCACCTACACTC
Fwd-Vav1-134-564- <u>Y160F</u>	AGGAGGATGAGGACCTGTTTGAC
	TGCGTGGAGAATGAGG
Rev-Vav1-134-564- <u>Y160F</u>	CCTCATTCTCCACGCAGTCAAACAG
	GTCCTCATCCTCCT
Fwd-Vav1-134-564- <u>Y174F</u>	GGAAGGCGACGAGATCTTTGA
	GGACCTCATGCGC
Rev-Vav1-134-564- <u>Y174F</u>	GCGCATGAGGTCCTCAAAGAT
	CTCGTCGCCTTCC

7.1.8 Plasmide

Alle aufgelisteten Plasmide sind mit Ausnahme des Vektors pCMV Tag2B prokaryontische Expressionsvektoren. Das pGEX-Expressionssystem (GE Healthcare) ermöglicht die Expression von N-terminalen GST-Fusionsproteinen, der pProExHTb-Vektor trägt wie der pET SUMO Vektor einen Hexahistidinanker am N-Terminus. Der Vektor pGEX-2T-TEV, bei dem die Thrombin-Protease-Erkennungssequenz mit einer TEV Proteaseschnittstelle ausgetauscht wurde, stammt aus der Arbeitsgruppe von Prof.

7. MATERIAL UND METHODEN

R. Goody (MPI Dortmund). Das Expressionsplasmid pGEX-2T-Pak1₇₀₋₁₁₇ wurde von Prof. Chernoff (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, USA) bezogen. Die pASK IBA 43+ Konstrukte sind von Prof. Waldemar Kolanus (LIMES, Bonn) zur Verfügung gestellt worden.

Tabelle 7.8: Übersicht der verwendeten Plasmide.

Rückgrat	Gen	Schnittstellen
pGEX-2T-TEV	Rac1, hs, 1-184	BamHI, EcoRI
pET SUMO	Rac2, hs, 1-192	TA Klonierung
pGEX-2T-TEV	Vav1, hs, 189-575	BamHI, EcoRI
pGEX-2T-TEV	Tiam1, mm, 1255-1400	BamHI, EcoRI
pPROEX HTb	Tiam1, mm, 1033-1406	NcoI, XhoI ¹¹⁴
pET SUMO	Tiam1, mm, 1033-1255	TA Klonierung
pCMV Tag2B	Rac1, hs, 1-192	BamHI, EcoRI
pGEX-2T	Pak1, hs, 70-117	BamHI, EcoRI
pMAL C1	Vav1, hs, 134-564	⁸⁶
pASK IBA	Vav1, 170-377, 181-377	Prof. Kolanus

7.1.9 Bakterien und Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Bakterienstämme und Zelllinien verwendet. Die *E.coli* Stämme sind kommerziell erhältlich. Die HEK (*human embryonic kidney*)-Zelllinie wurde von Prof. Walter (Bonn) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 7.9: Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp
XL1-Blue (Stratagene)	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F', proAB, lacI ^q ZΔM15Tn10 (Tet ^r)]
BL21(DE3) Tuner (Novagen)	F ⁻ , ompT, hsdS (r _B ⁻ m _B ⁻), dcm, Tet ^r , gal, λ(DE3)
BL21(DE3) Codon Plus RIL	F ⁻ , ompT, hsdS (r _B ⁻ m _B ⁻), dcm, Tet ^r , gal, λ(DE3), endA, Hte [argU ileY leuW Cam ^r]

7.1.10 Antikörper

Die verwendeten primären Antikörper sind in Tabelle 1.10 zusammengefasst. Angegeben sind die Bezeichnung des Antikörpers, das jeweilige Antigen und die verwendeten Verdünnungen des Antikörpers im Western Blot. Des Weiteren wurde die Bezugsquelle des Antikörpers aufgeführt.

Tabelle 7.10: Verwendete Antikörper

Name	Verdünnung	Bezugsquelle	Details
Rac1 C-Term./C-11	1/500	SCBT	polyklonal, Kaninchen
Rac1 C-Term.	1/1000	Millipore	polyklonal, Maus
anti Maus IgG /GAM-800	1/20000	Licor	polyklonal, Ziege
anti-Biotin-FITC, BN-34	1/2000	Sigma	monoklonal, Maus
pTyr (PY99)	1/2000	SCBT	monoklonal, Maus

7.2 Analytische Methoden

7.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die analytische Auftrennung von Proteingemischen wurde nach Laemmli²⁰² unter Verwendung denaturierender diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gele durchgeführt. Das Sammel- und Trenngel wurde wie folgt vorbereitet: Nach dem Mischen der Einzellösungen wurde durch die Zugabe von TEMED und APS die Polymerisation gestartet und das Gemisch zwischen 2 durch einen *Spacer* getrennte Glasplatten gegossen. Die Polymerisation des Trenngels erfolgte unter Luftabschluss durch Überschichten mit Isopropanol. Zur Denaturierung der zu analysierenden Proteine wurden alle Proben mit 4x SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Die Gelelektrophorese wurde in 1x Glycin-Laufpuffer für 45 min bei 150 V durchgeführt. Nach dem Lauf wurden die Gele entweder in Coomassie-Färbelösung gelegt oder durch ein mehrmaliges Waschen mit MilliQ Wasser für einen Transfer auf eine Nitrozellulosemembran vorbereitet.

Tabelle 7.11: Bestandteile der verwendeten SDS-PAGE-Gele

Lösung	Sammelgel (5 %)	Trenngel (12 %)
H ₂ O	5,5 mL	6,6 mL
30 % Acryl-Bisacrylamid	1,3 mL	8 mL
1,5 M Tris (pH 6,8)	1 mL	
1,5 M Tris (pH 8,8)		5 mL
10 % SDS	0,08 mL	0,2 mL
10 % APS	0,032 mL	0,2 mL
TEMED	0,015 mL	0,02 mL

7.2.2 Coomassie-Färbung (Brilliant Blau G 250)

Zur Anfärbung der durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine ist ausschließlich die Coomassie-Blau-Färbung angewendet worden. Die Proteingele wurden zuerst für 1 min in der Mikrowelle bei 600 W erhitzt, für 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend etwa 30 min mit Entfärbe-Lösung inkubiert. Die Gele kamen anschließend auf ein angefeuchtetes Whatman-Papier und wurden im Gelrockner getrocknet.

- **Coomassie-Lösung:** 10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol, Spatelspitze Coomassie Brilliant Blue G250.
- **Entfärbe-Lösung:** 10 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) Methanol.

7.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung verwendeten Methoden sind im Folgenden aufgeführt. Dabei wurde für Proteingemische in der Regel die Methode nach Bradford bevorzugt, während aufgereinigte Proteine photometrisch nach Lambert-Beer vermessen wurden.

7.2.4 Photometrische Bestimmung nach Lambert-Beer

Die Konzentrationsbestimmung nach Lambert-Beer basiert auf der UV-Absorptionsmessung der Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin eines Proteins bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280 \text{ nm}$ (A_{280}). Eine exakte Messung ist ausschließlich für

homogene Proteinlösungen möglich, da ansonsten Verunreinigungen den Absorptionwert verfälschen. Ebenso sollte sichergestellt werden, dass Nukleinsäuren als Verunreinigungen abgetrennt werden (siehe 7.2.10). Der molare Absorptionskoeffizient ϵ des zu bestimmenden Proteins lässt sich leicht durch Abzählen der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin berechnen. In der vorliegenden Arbeit wurden die molaren Absorptionskoeffizienten unter Verwendung des Programms Vector NTI (Invitrogen, Carlsbad, USA) bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde folgendermaßen berechnet:

$$A_{280} = c \cdot d \cdot \epsilon \quad (7.1)$$

A_{280} = Absorption bei 280 nm

ϵ = molarer Absorptionskoeffizient [$M^{-1}cm^{-1}$]

c = Konzentration [M]

d = Länge der Messstrecke [cm]

7.2.5 Photometrische Bestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford basiert auf der Bindung des sauren Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau an basische und aromatische Aminosäurereste. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des gebundene Farbstoff von $\lambda_{max} = 465$ nm auf $\lambda_{max} = 595$ nm. Zur Konzentrationsbestimmung wurden gleiche Volumina (je 3 μ L) an Proteinproben unbekannter Konzentration sowie eine Standardreihe an BSA-Proben in einer 96well Platte vorgelegt. Zu jeder Probe wurden 200 μ L einer 1x Bradford-Lösung der Firma Biorad pipettiert und die Absorption bei $\lambda = 595$ nm gemessen. Die Konzentrationsberechnung erfolgte anhand einer für die BSA-Standardreihe ermittelten Kalibriergerade. Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

7.2.6 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Der Proteintransfer von SDS-PAGE-Gelen auf Nitrozellulosemembranen erfolgte zur späteren immunologischen Detektion der Proteine. Verwendet wurde eine *Semi-Dry* Blot Apparatur (Biorad) mit diskontinuierliches Puffersystem. Für die *Semi-Dry* Methode wurden das SDS-Gel, die Nitrozellulosemembran und die Filterpapiere (Whatman, GB005) im entsprechenden Elektrodenpuffer äquilibriert und folgendermaßen

beginnend bei der Kathode angeordnet: 3 Filterpapiere in Kathodenlösung, das SDS-Gel in Kathodenlösung, die Nitrozellulose in Anodenlösung II, 1 Filterpapier in Anodenlösung II und zuletzt 2 Filterpapiere in Anodenlösung I. Der Transfer fand bei einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Blot für 45 min statt.

- **Anodenlösung I:** 300 mM Tris/HCl, 20 % (v/v) Methanol, pH 10,5.
- **Anodenlösung II:** 25 mM Tris/HCl, 20 % (v/v) Methanol, pH 10,5.
- **Kathodenlösung:** 40 mM 6-Aminohexansäure, 20 % (v/v) Methanol, pH 7,5.

7.2.7 Immunologische Detektion von Proteinen (Western Blot)

Die immunologische Detektion von Proteinen erfolgte auf Nitrozellulosemembranen unter Ausnutzung spezifischer Antigen-Antikörper-Interaktionen. Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (siehe 7.2.6) wurde diese mit Wasser abgespült und danach 1 h auf einem Tischschüttler in Blockierlösung inkubiert. Die Membran wurde zweimal mit 1x TBS-T (je 10 min) gewaschen und anschließend mit dem primären Antikörper in TBS-T über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit TBS-T Puffer (je 5 min) gewaschen und mit dem sekundären IRDye 800-gekoppelten Antikörper in TBS-T Puffer für 1 h am Tischschüttler inkubiert. Abschließend wurde dreimal mit TBS-T Puffer (je 5 min) und einmal mit TBS gewaschen bevor der Blot auf dem Odyssee Western Blot Detektionssystem bei 800 nm ausgelesen wurde.

- **TBS-T Puffer 10x:** 1 M Tris/HCl, 1,5 M NaCl, 5 % Tween 20, pH 7,4.
- **Blockierlösung:** 0,1 M Tris/HCl, 0,15 M NaCl, 0,5 % Tween 20, 3-5 % (w/v) Magermilchpulver/BSA, pH 7,4.

7.2.8 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur analytischen und präparativen Auftrennung von RNA- und DNA-Fragmenten lassen sich Polyacrylamid Gele nutzen, die aufgrund ihres Maschencharakters molmassenabhängige Wanderungsgeschwindigkeiten der negativen Nukleinsäuren während der Elektrophorese ermöglichen. Es wurden präparative Gele (Dicke 10 mm) und analytische Gele (Dicke 5 mm) mit einem Acrylamidgehalt von 10 % verwendet. Zum Gießen der Gele wurden Lösung A, B und C in einem Erlenmeyerkolben gut durchmischt bevor die Polymerisation durch Zugabe von TEMED und APS (10 %ig) gestartet wurde. Anschließend wurde das Gemisch zwischen zwei Glasplatten, die

mit entsprechenden Abstandshaltern und einem Kamm verbunden waren, gegossen. Nach minimal 30 min wurde das so vorbereitete Gel in die vertikale Elektrophoresekammer gespannt, die Taschen mit Laufpuffer gespült und für 5 min bei 370 V, 25 Watt ein Vorlauf gestartet. Die Proben wurden abschließend mit 2x Ladepuffer, dem die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol zugesetzt waren, vermischt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese fand bei einer konstanten Spannung von 370 V und 25 Watt pro Gel statt. Im Durchschnitt dauerte die Auftrennung 90 min, wobei die ausreichende Separation (~ 15 cm) der beiden Farbstoffmarker als Längenreferenz herangezogen wurde.

- **Lösung A:** 10x TBE in 8.3 M Harnstoff.
- **Lösung B:** 25 % Acrylamidlösung, 2 % N,N'-Methylenbisacrylamid in 8,3 M Harnstoff.
- **Lösung C:** 8,3 M Harnstoff.
- **PAGE-Ladepuffer:** 9 M Harnstoff, 50 mM EDTA, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,05 % (w/v) Xylencyanol, pH 8.
- **10x TBE:** 89 mM Tris/HCl, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8.

Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel beidseitig in Klarsichtfolie eingeschlagen und zur Visualisierung auf einer Kieselgel-Fertigplatte SIL G-25 mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm bestrahlt. Die aufgetrennten Nukleinsäuren wurden so sichtbar, die zu isolierende Bande konnten mit einer sterilen Skalpellklinge ausgeschnitten und in ein 2 mL Eppendorfgesäß überführt werden. Die erhaltenen Gelstückchen wurden mit Hilfe einer Pipettenspitze zerkleinert und zur passiven Elution mit einem Volumen von ca. 1 mL 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 7.2.11 beschrieben mit Ethanol gefällt und dann quantifiziert werden. Bei radioaktiven Proben wurden die Gele direkt auf einem Phosphorimagerscreen exponiert und dokumentiert.

7.2.9 Gelfiltration durch MicroSpin G-25

Zur Entfernung nicht inkorporierter Nukleotide bzw. zur Entsalzung von Nukleinsäure-Lösungen wurden bei Volumina bis 50 μ L MicroSpinTMG-25 Säulen, wie vom Hersteller beschrieben, verwendet.

7.2.10 Phenol-Chloroform Extraktion

Das Abtrennen von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen erfolgte durch eine Phenol/-Chloroform-Extraktion. Hierzu wurde der Lösung ein Volumenteil äquilibriertes Phenol zugesetzt, kräftig gevortext und zur schnelleren Phasentrennung bei 21000 x g zentrifugiert. Die nukleinsäurehaltige wässrige Oberphase wurde abgenommen und die darin enthaltenen Phenolreste mit zwei Volumen Chloroform versetzt, gevortext und für 1 min bei 21000 x g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde anschließend abgenommen, um die Nukleinsäuren zu präzipitieren (7.2.11).

7.2.11 Präzipitation von Nukleinsäuren

Die Präzipitation von Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumeneinheit 3 M NaOAc (pH 5,2) und 3 Volumeneinheiten 100 % Ethanol. Bei kleinen Nukleinsäuremengen oder kurzen Oligonukleotiden wurde zur Verbesserung der Präzipitation zusätzlich Glycogen (Endkonzentration: 2 µg/mL) zugegeben. Nach mehrmaligem Invertieren der Reaktionsgefäße und Inkubation bei -80 °C für 30 min bzw. bei -20 °C über Nacht wurde der Nukleinsäureniederschlag durch Zentrifugation (21000 x g/ 4 °C/ 30 min) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation und Entfernen des Überstands wurde das Pellet nach kurzer Lufttrocknung in einem geeigneten Volumen Wasser resuspendiert.

7.2.12 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Nukleinsäuren zur Analyse erfolgte unter anderem durch nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese. Es wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,5-2,5 % (w/v) in 0,5x TBE-Puffer verwendet, die mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1 µg/mL versetzt wurden. DNA-Proben wurden vor der Auftragung mit einem 6x Ladepuffer, RNA-Proben mit einem 2x Ladepuffer versetzt. Um das Molekulargewicht der aufgetrennten Nucleinsäuren bestimmen zu können, wurde zusätzlich ein Längenstandard aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei einer Spannung von 100 Volt in 0,5x TBE als Laufpuffer. Zur Visualisierung der Nukleinsäuren wurde das Gel auf einen UV-Transilluminator aufgelegt und mit UV-Licht (Wellenlänge 366 nm) bestrahlt. Da das zugesetzte Ethidiumbromid positiv geladen ist und entgegen der Nukleinsäurefront migriert, wurde die Elektrophorese nie länger als 30 min durchgeführt.

- **1x TBE-Puffer:** 8,9 mM Tris/HCl, 8,9 mM Borsäure, 0,2 mM EDTA-Lösung, pH 8,0.
- **6x DNA-Ladepuffer:** 50 mM Tris/HCl, 15 % (w/v) Ficoll (400), 6 mM EDTA, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, pH 8,3.
- **2x RNA-Ladepuffer:** 95 % Formamid, 0,025 % SDS, 0,5 mM EDTA.

7.2.13 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen erfolgte photometrisch bei einer Absorption von 260 nm. Da der Quotient OD_{260}/OD_{280} stark vom pH und dem Salzgehalt des Puffers abhängt, wurde dieser ausschließlich in TE Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) bestimmt.²⁰³ Es wurde ein Quotient größer als 1.8 für nicht kontaminierte Nukleinsäurelösungen festgelegt. Für Nukleinsäuren unbekannter Sequenz bzw. für komplexe Gemische wurden die folgenden empirischen Werte (F), bezogen auf $OD_{260} = 1$, verwendet.

$$c_{RNA,DNA} = \frac{OD \cdot F \cdot f}{\sum(nt) \cdot M_W} \quad (7.2)$$

$$c_{RNA,DNA} = \frac{OD \cdot f}{\sum(\epsilon)} \quad (7.3)$$

$c_{RNA,DNA}$: Konzentration der RNA/DNA in mM

OD_{260} : gemessene Absorption bei 260 nm

F: Multiplikationsfaktor, dsDNA = 50, ssDNA = 33, ssRNA = 40

f: Verdünnungsfaktor

$\sum(nt)$: Anzahl der Basen bzw. Basenpaare

M_W : Molekulargewicht je Base (330 g/mol) bzw. Basenpaar (660 g/mol)

ϵ : molarer Absorptionskoeffizient in $M^{-1}cm^{-1}$

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

Tabelle 7.12: Extinktionskoeffizienten der Nukleotide in $L M^{-1}cm^{-1}$

dNTPs	ϵ	NTPs	ϵ
dATP	15400	ATP	15200
dCTP	9000	CTP	7050
dGTP	13700	GTP	12100
dTTP	10000	UTP	8400

Bei fluoreszenzmarkierter RNA erfolgte die Konzentrationsmessung und Bestimmung der Effizienz der Markierung nach folgender Formel:

$$A_{RNA} = A_{260} - (A_{Fluorophor} \cdot CF_{260}) \quad (7.4)$$

$$(DOL) = \frac{(A_{RNA} \cdot \epsilon_{Fluorophor})}{(A_{Fluorophor} \cdot \epsilon_{RNA})} \quad (7.5)$$

A_{260} : Absorption der markierten Nukleinsäure bei 260 nm

$A_{Fluorophor}$: Absorption der markierten Nukleinsäurelösung beim Absorptionsmaximum des Fluorophores (Fluorescein: 492 nm)

CF_{260} : Korrekturfaktor berechnet sich aus $A_{260}/A_{Fluorophor}$ (Fluorescein: 0.3)

ϵ_{RNA} : molarer Absorptionskoeffizient der RNA in $L M^{-1}cm^{-1}$

$\epsilon_{Fluorophor}$: molarer Absorptionskoeffizient des Fluorophores in $L M^{-1}cm^{-1}$ (Fluorescein: 68000)

DOL: Labelingverhältnis, degree of labeling

7.2.14 Sequenzierung von DNA

Aus jeweils 2 mL einer *E.coli* üN Kultur wurden mit einem Mini-Prep Kit (Qiagen, Hilden, D) die Plasmide isoliert und zur Firma GATC (Konstanz, D) geschickt. Die Sequenzierprimer wurden so gewählt, dass der Abstand zwischen dem Primer-Hybridisierungsbereich und des zu sequenzierten DNA-Abschnittes ausreichend groß war (mind. 50 nt).

7.2.15 Sequenzierung von Monoklonen der Selektionen

Die mit dem TA Klonierungs Kit pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, USA) ligierten Plasmide wurden in kompetente *E.coli* TOP10 Zellen transformiert und auf Agar-Platten ausgestrichen. Zur Isolierung der Plasmide wurden 2 mL LB-Medium mit Einzelkolonien inokuliert, für 16 h kultiviert und anschließend mit Mini-Prep Kits (Qiagen) nach der Vorschrift des Herstellers isoliert. Die aufgereinigten Plasmide wurden von der Firma GATC sequenziert.

7.2.16 Test auf RNasen

Um eine Kontamination von Puffern mit RNasen, die die SELEX entscheidend stören können, zu vermeiden, wurden alle verwendeten Puffer auf RNase-Aktivität überprüft. Dazu sind 100 pmol RNA in 25 μL des entsprechenden Puffers für mindestens 30 min bei 37 °C inkubiert worden. Anschließend wurden die Proben mit Agarose-Ladepuffer versetzt und auf einem Agarose-Gel getrennt (siehe 7.2.12). Als Positiv-Kontrolle wurde die RNA mit etwas Speichel versetzt.

7.2.17 Dot-Blot

Ein einfacher Test, um die Biotinylierung eines Proteins nachzuweisen, stellt der Dot-Blot dar. Es werden kleinste Mengen (1-3 μL) Substanz auf eine Nitrozellulosemembran aufgetropft, nach dem Antrocknen wird analog zum Western Blot gewaschen und die Membran blockiert. Der immunologische Nachweis findet mit einem *anti*-Biotin-FITC-gekoppelten Antikörper statt. Zum Auslesen des Blots wird die Membran auf einen Fluoreszenz-Scanner (Fujifilm FLA 3000) gelegt.

7.2.18 HABA Kompetitionsassay

Die Quantifizierung eines biotinylierten Konjugates innerhalb eines Konzentrationsbereichs von circa 10 - 150 μM gelingt durch einen HABA Kompetitionsassay. HABA (4-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid) erfährt nach Komplexbildung mit Avidin eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 348 nach 500 nm. Aufgrund der schwachen Affinität zwischen HABA und Avidin ($K_D = 5 \cdot 10^{-6} \text{M}$) lässt sich HABA sehr leicht durch Biotin ($K_D = 1 \cdot 10^{-15} \text{M}$) aus dem Komplex verdrängen, was sich in einer verringerten Absorption bei 500 nm niederschlägt. Zur Quantifizierung der Biotinylierung wurden folgende Lösungen hergestellt:

- **HABA Reagenz:** 24,2 mg HABA auf 10 mL Wasser, Neutralisation mit 1 M NaOH, aliquotieren und weg frieren
- **HABA-Avidin-Reagenz:** 1,5 mg Avidin, 90 μ L HABA Reagenz, 3 mL 1x PBS Puffer, haltbar für 1 Woche bei 4 °C
- **Biotin Standard:** Standardlösungen im Konzentrationsbereich von 0 - 200 μ M

Jeweils 20 μ L Standard/Probe wird mit 80 μ L HABA-Avidin-Reagenz auf einer *96well* Mikrotiterplatte vermischt. Die Absorption wird bei 500 nm gemessen und anhand der Kalibrierkurve kann die Konzentration der Probe abgeschätzt werden.

7.2.19 Untersuchung der Sekundärstruktur von RNA

Zur Vorhersage von RNA-Strukturen wurde der Algorithmus *mfold* von M. Zuker¹¹⁷ verwendet. Das Programm lässt sich unter: <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form> nutzen.

7.2.20 Filterbindung

Eine experimentell einfach zu handhabende Methode, um DNA/RNA-Proteininteraktionen zu quantifizieren stellt die Filterbindungsanalyse dar.²⁰⁴ Die Grundlage der Methode bilden unterschiedliche Adsorptionseigenschaften der beiden Interaktionspartner: während freie Nukleinsäuren keine Retention auf der negativ geladenen Nitrozellulose erfahren, so zeigen Proteine bzw. Protein/Nukleinsäure-Komplexe eine unspezifische Retention. Für die Filterbindungsanalysen wurden entweder 5'-[³²P]-markierte RNA (siehe 7.3.7) für K_D -Messungen oder [³²P]-intern-markierte RNA (siehe 7.3.2) für Monoklontests eingesetzt. Alle Filterbindungen wurden in 1x PBS, 1mM MgCl₂, pH 7,6 bei Raumtemperatur durchgeführt. Folgendermaßen lief ein typisches Filterbindungsexperiment ab: 15 μ L eines 1,6x PBS, 1,6 mM MgCl₂ Puffers wurde in einer *96well* Platte vorgelegt. Anschließend wurden 5 μ L der entsprechenden Proteinverdünnung und 5 μ L der RNA-Verdünnung hinzupipettiert. Nach einer Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur wurden jeweils 20 μ L der Probe nach folgendem Schema auf die Membran aufgetragen. Die Nitrozellulosemembran wurde in Kathodenpuffer (siehe 7.2.6) für 10 min vorgewässert und danach 3x mit 1x PBS Puffer gewaschen bevor sie auf ein Whatmanpapier aufgelegt in der Filterbindungsapparatur arretiert wurde. Nach dem Anlegen des Wasserstrahlvakuum werden die entsprechenden Proben-wells 1x mit 200 μ L 1x PBS, 1 mM MgCl₂ vorgewaschen, bevor zeitnah 20 μ L des Protein/RNA-Mix aufgetragen und mit insgesamt 1000 μ L

1x PBS, 1mM MgCl₂ nachgewaschen wird. Die Membran kommt anschließend zur Dokumentation in eine Phosphorimager-Kassette und wird am folgenden Tag ausgelesen und mit dem Programm QuantityOne (Biorad, Hercules, USA) ausgewertet. Bei K_D-Wert-Bestimmungen war die Konzentration der radioaktiv markierten RNA nicht größer als 5 nM, um sicherzustellen, dass der größte Teil der RNA ungebunden vorliegt. Die erhaltenen Bindungskurven wurden auf der Grundlage einer Hill-Langmuir Sättigungsisotherme mit dem Programm GraphPad Prism 5 ausgewertet:

$$[PR] = \frac{B_{max} \cdot [P]}{[P] + K_D} \quad (7.6)$$

B_{max}: maximale spezifische Bindung

[P]: Konzentration des Proteins

[PR]: Konzentration Protein/RNA-Komplex

7.3 Manipulation von Nukleinsäuren

7.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient zur Amplifikation eines definierten Abschnittes eines DNA-Doppelstrangs. Der Bereich wird dabei durch die Wahl der Oligonukleotid-Primer-Paare bestimmt. Zusätzliche Restriktionsschnittstellen und Promotersequenzen lassen sich ebenfalls bequem über die Primer in die Zielsequenz einführen. Die Amplifikation von einzelsträngigen oder doppelsträngigen DNA-Templaten erfolgte zumeist in Ansätzen von 100 μL in einem PCR-Thermocycler.

Tabelle 7.13: Standard PCR-Protokoll

Lösung	Konzentration	Taq-PCR	Pfu-PCR
Taq Reaktionspuffer	10x	10 μ L	
Pfu Reaktionspuffer	10x		10 μ L
MgCl ₂	25 mM	10 μ L	8 μ L
5'-Primer	100 μ M	1 μ L	1 μ L
3'-Primer	100 μ M	1 μ L	1 μ L
dNTP-Mix	25 mM	0.8 μ L	0.8 μ L
Templat	1-10 μ M	1 μ L	3 μ L
Taq Polymerase	5 U/ μ L	1 μ L	
Pfu Polymerase	2,5 U/ μ L		1 μ L
MilliQ	auffüllen auf	100 μ L	100 μ L

- **Taq Reaktionspuffer 10x:** 100 mM Tris/HCl, 500 mM KCl, 1 % (v/v) Triton X-100, pH 9,0.
- **Pfu Reaktionspuffer 10x:** 200 mM Tris/HCl, 100 mM KCl, 1 % (v/v) Triton X-100, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 1 mg/mL BSA (Nucleasefrei), pH 8,8.

Das Standard-Programm einer PCR sah wie folgt aus:

1. Denaturierung	94 °C für 60 s
2. Primer-Anlagerung	60 °C für 60 s
3. Polymerase-Kettenverlängerung	72 °C für 60 s
	Wiederholung Schritt 1-3
4. finale Verlängerung	72 °C für 180 s

Es wurden durchschnittlich 15-20 Zyklen durchgeführt. Als Kontrollreaktion auf Kontamination mit Fremd-DNA diente eine Reaktion ohne Templat. Nachdem der PCR-Ansatz durch eine Phenol/Chloroformextraktion (siehe 7.2.10) aufgereinigt wurde, erfolgte eine Präzipitation der Nukleinsäuren (siehe 7.2.11). Die genaue Ermittlung der benötigten Zyklen sowie die Überprüfung der Länge der amplifizierten DNA erfolgten mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 7.2.12).

7.3.2 *In vitro* Transkription

Für die *in vitro* Transkription von doppelsträngigen DNA-Templaten wurde die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 verwendet. In der Regel wurden als dsDNA-Templat die DNA-Menge einer 100 μL PCR (circa 500-1000 ng) eingesetzt. Zur radioaktiven Markierung der RNA wurde 10-20 $\mu\text{Ci-}\alpha$ - $[^{32}\text{P}]$ -markiertes Guanosintriphosphat (3000 Ci/mmol) zugesetzt. Der Transkriptionsansatz wurde über Nacht, mindestens aber für 4 h bei 37 °C (45 min für radioaktive TK), im Thermomixer inkubiert, anschließend mit denaturierendem PAGE-Ladepuffer versetzt und entsprechend (siehe 7.2.8) durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgereinigt.

Tabelle 7.15: Standard-Transkription (TK)

Lösung	Konzentration	kalte TK	radioaktive TK
Transkriptionspuffer	5x	20 μL	10 μL
MgCl ₂	100 mM	25 μL	12,5 μL
DTT	100 mM	5 μL	2,5 μL
NTP-Mix	25 mM	5 μL	2,5 μL
α - $[^{32}\text{P}]$ -GTP			0,5 μL
RNasin	40 U/ μL	1 μL	0,5 μL
IPP		0,4 μL	0,2 μL
DNA	100-300 pmol	10 μL	5 μL
T7 RPOL	50 U/ μL	5 μL	2,5 μL
MilliQ	auffüllen auf	100 μL	50 μL

- **Transkriptionspuffer 5x:** 200 mM Tris/HCl, pH 7,9.

7.3.3 Herstellung 5'-markierter RNA über GMPS-Transkription

Zur Einführung von Fluoreszenz- oder Biotin-Markierungen am 5'-Ende der RNA wurde das entsprechende DNA-Templat in Gegenwart des Starternukleotids Guanosin-5'-monophosphorothioat (GMPS) transkribiert.²⁰⁵ Über das Thioat kann die gewünschte Markierung am 5'-Ende durch nucleophile Substitution eingeführt werden. Für die *in vitro* Transkription in Gegenwart von GMPS wurde ein 300 μL GMPS-Transkriptionsansatz über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Beendigung wurde Phenol/Chloroform extrahiert (siehe 7.2.10) und mit Ethanol (siehe 7.2.11) präzipitiert. Der Ansatz wurde anschließend in insgesamt 100 μL Wasser gelöst und zweimal über G25 Micro-Spin Säulen entsalzt (siehe 7.2.9).

Tabelle 7.16: GMPS-Transkription

Lösung	Konzentration	GMPS TK
Transkriptionspuffer	5x	60 μL
MgCl ₂	100 mM	75 μL
DTT	100 mM	15 μL
NTP-Mix	25 mM	15 μL
GMPS	100 mM	30 μL
RNasin	40 U/ μL	3 μL
IPP		1,2 μL
DNA	100-300 pmol	30 μL
T7 RPOL	50 U/ μL	15 μL
MilliQ	auffüllen auf	300 μL

7.3.4 Herstellung von 5'-Biotin- und 5'-Fluorescein-markierter RNA

Die RNA aus einer 300 μL GMPS-Transkription (siehe 7.3.3) wurde nach Aufarbeitung zur Kopplung von 5-Iodoacetamido-Fluorescein (5-IAF) bzw. EZ-Link Iodoacetyl-LC-Biotin (beide Pierce Protein Science) in folgendem Ansatz verwendet:

Tabelle 7.17: 5'-Markierungsreaktion

Lösung	Konzentration	Volumen
GMPS-RNA	10-100 μM	100 μL
Harnstoff	8 M	100 μL
TE-Puffer	10x	40 μL
RNasin	40 U/ μL	4 μL
Labelingreagenz	10 mM	40 μL
MilliQ	auffüllen auf	400 μL

- **TE-Puffer 10x:** 100 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8.

Vor der Zugabe der frisch in DMF verdünnten 10 mM Lösung des jeweiligen Labelingreagenz und RNasin wurde der Ansatz für 3 min auf 80 °C erhitzt und innerhalb von 10 min auf Raumtemperatur gebracht. Die Reaktion wurde bei 40 °C für 2 h unter leichtem Schütteln und im Falle von Fluoreszenzmarkierung unter Lichtausschluss inkubiert. Nach der Reaktion wurde die RNA mit Ethanol gemäß 7.2.11 präzipitiert und durch ein PAA-Gel aufgereinigt (siehe 7.2.8).

7.3.5 Reverse Transkription und PCR in einem Ansatz

Durch die reverse Transkription (RT) wird ein DNA-RNA-Hybrid, ausgehend von einem einzelsträngigen RNA-Templat und einem 3'-Primer, erzeugt. Der auf diese Weise hergestellte, zum RNA-Templat komplementäre DNA-Strang (cDNA) kann dann mittels PCR (siehe 7.3.1) amplifiziert werden. Bei RNA-Selektionen müssen die eluierten RNA-Sequenzen revers transkribiert und amplifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde die eluierte RNA mit Ethanol gefällt (siehe 7.2.11) und das Pellet in 50 μL MilliQ Wasser aufgenommen. Die gesamte RNA wurde in einen Ansatz pipettiert, der die Durchführung der reversen Transkription und PCR-Amplifikation in einem PCR-Gefäß erlaubte:

Tabelle 7.18: RT-PCR Ansatz

Lösung	Konzentration	Volumen
RT-Puffer	5x	20 μL
Taq-Puffer	10x	10 μL
DTT	100 mM	2 μL
5'-Primer	100 μM	1 μL
3'-Primer	100 μM	1 μL
dNTPs	25 mM	x μL
Eluierte RNA	<5 nM	50 μL
MilliQ auffüllen auf		98,5 μL

Der Ansatz wurde 10 min bei 65 °C inkubiert und dann auf Eis gestellt. Nach 1 Minute wurden Taq DNA-Polymerase (2,5 U) und Superscript II Reverse Transkriptase (2 U) zugegeben. In einem Thermocycler wurde folgendes Programm mit der gewünschten Zahl an PCR-Zyklen einprogrammiert:

1. 54 °C 10 min
2. 72 °C 15 min
3. 94 °C 1 min
5. 60 °C 1 min
6. 72 °C 1,5 min
7. Wiederholung 3-6

- **RT-Puffer 5x:** 250 mM Tris/HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, pH 8,3.

- **Taq PCR-Puffer 10x:** 100 mM Tris/HCl, 500 mM KCl, 1 % (v/v) Triton X-100, pH 9,0.

7.3.6 5'-Dephosphorylierung von Nukleinsäuren

Die Dephosphorylierung von 5'-RNA/DNA-Enden erfolgte durch die Inkubation von 150 pmol RNA/DNA mit 17 U CIAP (*calf intestine anorganic phosphatase*) bei 37 °C für 15 min. Nach erneuter Zugabe von 8,5 U Enzym wurde für weitere 15 min bei 55 °C inkubiert. Anschließend wurden 1 µL einer 0,5 M EDTA-Stammlösung zugegeben und der Reaktionsansatz für 10 min bei 75 °C inaktiviert. Zur Entfernung von Proteinen wurde der Ansatz mit Phenol extrahiert (siehe 7.2.10) und die dephosphorylierte DNA/RNA in Anwesenheit von 1 µg/mL Glycogen präzipitiert (siehe 7.2.11). Das Pellet wurde in 20 µL Wasser resuspendiert und ein Aliquot (3 µL) direkt für die 5'-Phosphorylierung (siehe 7.3.7) eingesetzt.

- **CIAP Puffer 10x:** 100 mM Tris/HCl, 100 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, 10 mM DTT, 10 mM ATP, pH 7,9.

7.3.7 5'-Phosphorylierung von Nukleinsäuren

Zur radioaktiven 5'-Markierung von DNA/RNA wurden 10 pmol dephosphorylierte Nukleinsäure aus 7.3.6 mit 20 U der T4 Polynukleotidkinase und 30 µCi γ -[³²P]-ATP bei 37 °C für 45-60 min in einem Gesamtvolumen von 20 µL phosphoryliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µL einer 0,5 M EDTA Stammlösung gestoppt, die Nukleinsäuren präzipitiert (siehe 7.2.11) und in 50 µL Wasser aufgenommen. Nicht inkorporiertes ATP ist durch Gelfiltration mittels MicroSpin G-25-Säulen nach Angaben des Herstellers (siehe 7.2.9) entfernt worden.

- **T4 PNK Puffer:** 700 mM Tris/HCl, 100 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, 50 mM DTT, pH 7,6.

7.3.8 Ligation von doppelsträngiger DNA

Durch Ligation sind rekombinante Plasmide erzeugt worden, die anschließend in *E. coli* transformiert wurden. Es wurden im Durchschnitt 100 - 300 fmol verdauter, dephosphorylierter Vektor mit dem 1-10 fachen molaren Überschuss an verdautem PCR-Produkt mit 20 U T4 DNA-Ligase inkubiert. Die Ligation erfolgte in 1x Ligationpuffer für 4 h bei 22 °C. Als Kontrollreaktionen, die ebenfalls in die Transformation eingesetzt wurden, dienten Ligationsansätze ohne Insert (Kontrolle auf Religation

des Plasmids) und ohne Enzym sowie eine Transformationskontrolle mit ungeschnittenem Vektor.

- **Ligationspuffer 1x:** 50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/mL BSA, pH 7,8.

7.4 Biochemische Methoden

7.4.1 Plasmid-Präparation aus *E. coli*

Zur Propagation von Plasmiden wurde der *E. coli*-Stamm XL Blue verwendet. Zur Isolierung analytischer Mengen an Plasmid-DNA wurden 5 mL LB-Selektionsmedium mit dem entsprechenden Monoklon inokuliert und für 16 h bei 37 °C im Bakterien-schüttler bei 130 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 3000 x g) geerntet und die Plasmide mit Hilfe des Miniprep Kits (Qiagen, Hilden, D) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Zur Herstellung präparativer Mengen an Plasmid-DNA wurden 250 mL LB-Selektionsmedium angeimpft, nach 16 h Inkubation bei 37 °C durch Zentrifugation geerntet und mit dem Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, D) gemäß den Herstellerangaben aufgearbeitet.

7.4.2 Proteinexpression in *E.coli*

Für die heterologe Proteinexpression in *E.coli* wurde zuerst das entsprechende Plasmid (siehe 7.1.8) in den Expressionsstamm BL21 (DE3) Tuner transformiert. Eine Vorkultur (50-100 mL LB-Selektionsmedium) ist am nächsten Tag mit einem Monoklon inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 130 rpm kultiviert worden. Die Hauptkultur wurde mit 1/10 des Vorkulturvolumens angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,9 (0,6) angezogen, bevor die Expression durch Zugabe von 1 mM (0,2 mM) IPTG induziert wurde. Die Expression fand für 5 h (über Nacht) bei 37 °C (22 °C) statt. Die Zellen wurden abschließend für 30 min bei 6000 rpm vom Medium getrennt und das Zellpellet bis zur Verarbeitung bei -80 °C zwischengelagert.

7.4.3 Aufschluss mittels French Press

Das in 7.4.2 erhaltene Zellpellet wurde in 10 mL Lysepuffer je 1 g Zellpellet resuspendiert und anschließend bei einem Druck von 1500 psi in einer FrenchPress Zelle aufgeschlossen. Der Lauf wurde zweimal bei einer konstanten Temperatur von 4 °C durchgeführt.

7.4.4 Affinitätschromatographie

Einen sehr wichtigen Platz unter den Aufreinigungsverfahren von Proteinen nimmt die Affinitätschromatographie ein. Es handelt sich um ein Chromatographieverfahren, das auf einer spezifischen Wechselwirkung eines Liganden, der an das Protein fusioniert wurde, mit einer funktionalisierten Festphase beruht. Die Verunreinigungen des aufzureinigenden Proteingemisches werden gewaschen und abschließend kommt es nach Zugabe eines kompetitierenden Liganden zur Elution des Zielproteins. Die in dieser Arbeit exprimierten Proteine basieren auf den im Abschnitt 7.1.8 aufgeführten Expressionsplasmiden. Alle Proteine wurden im ersten Aufreinigungsschritt nach dem Zellaufschluss einer Affinitätschromatographie unterzogen.

Die Konstrukte Tiam1_{1033–1406}, Tiam1_{1033–1255}, Rac2_{1–192} und Vav1_{134–564} enthielten einen N-terminalen Hexahistidinanker, der die Aufreinigung über eine Ni-NTA (Ni²⁺-Nitrilotriessigsäure) Agarose-Matrix erlaubt. Das jeweilige Zellpellet aus einer 1 L Expression wurde in Lysispuffer resuspendiert und nach dem Aufschluss in der French Press (siehe 7.4.3) konnte das durch Zentrifugation (14000 g, 30 min, 4 °C) geklärte Lysat mit 1 mL equilibrierter Ni-NTA Agarose (Machery Nagel, Düren, D) für eine Stunde bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert werden. Die Suspension wurde anschließend in eine Polyprep-Säule (Biorad, Hercules, USA) überführt und mit dem 100-fachen Festphasenvolumen (100 mL) gewaschen. Abschließend wurde mit dem 5-fachen Matrixvolumen (5 mL) eine Stoßelution durchgeführt. Ein finaler Pufferwechsel an einer Äkta Prime FPLC-Anlage (GE Healthcare), der den Zweck hatte, das freie Imidazol abzutrennen, beendete die Metallaffinitätschromatographie.

- **Lysispuffer:** 300 mM NaCl, 30 mM Tris/HCl, 1 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 1 μ g/mL Aprotinin, 2,5 μ g/mL Leupeptin, pH 8.
- **Waschpuffer:** 300 mM NaCl, 30 mM Tris/HCl, 10 mM Imidazol, pH 8.
- **Elutionspuffer:** 300 mM NaCl, 30 mM Tris/HCl, 500 mM Imidazol, pH 8.

Die pGEX-Konstrukte Rac1_{1–192}, Vav1_{189–575} und Pak1_{70–117} wurden als Fusionsproteine mit einer N-terminalen Glutathion-S-Transferase (GST) exprimiert, die die Aufreinigung über eine GSH-Agarose-Matrix erlaubt. Das jeweilige Zellpellet aus einer 1 L Expression wurde resuspendiert und nach dem Aufschluss in der French Press konnte das durch Zentrifugation (14000 g, 30 min, 4 °C) geklärte Lysat mit 1-2 mL äquilibrierter Protino GSH-Agarose (Machery Nagel, Düren, D) für 90 Minuten bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Die Suspension wurde anschließend in eine

Polyprep-Säule (Biorad, Hercules, USA) überführt und mit dem 100-fachem Festphasenvolumen (100 mL) gewaschen. Abschließend wurde mit dem 5-fachem Matrixvolumen (5 mL) eine Stoßelution durchgeführt. Freies Glutathion ist abschließend über eine Entsalzungssäule an einer Äkta Prime FPLC-Anlage (GE Healthcare) abgetrennt worden.

- **Lysispuffer:** 150 mM NaCl, 30 mM Tris/HCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 µg/mL Aprotinin, 2,5 µg/mL Leupeptin, pH 8.
- **Waschpuffer:** 300 mM NaCl, 30 mM Tris/HCl, 3 mM MgCl₂, pH 8.
- **Elutionspuffer:** 300 mM NaCl, 30 mM Tris/HCl, 3 mM MgCl₂, 15 mM reduziertes Glutathion, pH 8.

Die pASK-Konstrukte Vav_{170–377} und Vav_{181–377} wurden mit einem N-terminalen His₆-tag und einem C-terminalen Strep-tag¹³² exprimiert, der die sehr schonende Aufreinigung über eine mit Strep-Tactin-funktionalisierte Festphase¹⁸⁶ ermöglicht. Nach der Zelllyse durch einen French Press Aufschluss wurde das Lysat durch Zentrifugation geklärt und mit 1,5 mL *high capacity* Strep-Tactin Sepharose (IBA GmbH, Göttingen, D) für 2 h bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Nach dem Überführen der Suspension in eine Polyprep-Säule (Biorad, Hercules, USA) wurde die Festphase mit 150 mL gewaschen. Die Elution des rekombinanten Proteins erfolgte durch eine Stoßelution.

- **Lysispuffer:** 1x PBS, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 µg/mL Aprotinin, 2,5 µg/mL Leupeptin, pH 7,6.
- **Waschpuffer:** 1x PBS, pH 7,6.
- **Elutionspuffer:** 1x PBS, 1 mM DTT, 2,5 mM Desthiobiotin, pH 7,6.

7.4.5 Ionenaustauschchromatographie

Die unterschiedlichen Nettoladungen von Proteinen ermöglichen eine Auftrennung von Proteingemischen durch unterschiedlich starke elektrostatische Wechselwirkungen mit einer geladenen Festphase. Die Methode lässt sich leicht mit Hilfe einer Äkta Prime FPLC-Anlage (GE Healthcare) automatisieren. Im Wesentlichen wird zwischen Kationenaustauscher und Anionenaustauscher unterschieden. Polysaccharide, die mit Sulfonsäuren modifiziert sind tragen über einen weiten pH-Bereich negative Ladungen und lassen sich somit als Kationenaustauscher verwenden, während mit

quartären Aminogruppen funktionalisierte Matrizen Anionenaustauscher darstellen. Für die weitere Aufreinigung des Konstruktes Tiam1_{1033–1406} wurde aufgrund des pI-Wertes (Nettoladung = 0) von 6,7 eine Aufreinigung mit einer Anionenaustauscher-Säule (MonoQ, GE Healthcare) in Betracht gezogen. Das nach der Ni-NTA erhaltene Protein wurde zuerst in Nidrigsalz-Puffer umgepuffert. Vor Benutzung wurde die verwendete MonoQ-Säule (Säulenvolumen: 1,2 mL) alternierend mit je 10 Säulenvolumen Nidrigsalz- und Hochsalz-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde unter Nidrigsalz das Protein auf die Säule injiziert (0,5 mL/min), sowie die UV-Absorption bei 280 nm detektiert. Der folgende Elutionsgradient verlief über 40 Säulenvolumen auf 100 % Hochsalz-Puffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min. Die UV₂₈₀-Peaks wurden gesammelt, im SDS-PAGE-Gel analysiert, hochreine Fraktionen vereinigt und nach einer Konzentrationsbestimmung (siehe 7.2.3) in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

- **Nidrigsalzpuffer:** 30 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 9.
- **Hochsalzpuffer:** 30 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, pH 9.

7.4.6 Präparative Gelfiltration

Gelfiltrationen wurden ebenfalls an der Äkta Prime FPLC-Anlage (GE Healthcare) mit vorgepackten HighLoad Superdex Säulen (Amersham Biosciences) durchgeführt. Vor der Injektion des Proteins wurde die Säule mit filtriertem (0,2 µm) und entgastem Laufpuffer equilibriert. Die isokratische Elution erfolgte mit 1,2 Säulenvolumen.

7.4.7 Entsalzung

Um niedermolekulare Substanzen aus den Aufreinigungsschritten abzutrennen oder eine Proteinlösung in ein anderes Puffersystem zu überführen wurden Entsalzungen durchgeführt. Dabei verwendet man feste Trägermaterialien, die eine Auftrennung nach Molmasse erlauben. Für alle Entsalzungen wurden Sephadex G25-Säulen (M_r: 5000) unterschiedlicher Dimensionen der Firma GE Healthcare verwendet. Es wurde ausschließlich an der Äkta Prime FPLC-Anlage (GE Healthcare) gearbeitet.

7.4.8 Präparativer Nukleotidaustausch an Rho-GTPasen

Aufgrund der intrinsischen GTP-Hydrolyseaktivität lassen sich Rac1 und Rac2 nur im GDP-gebundenem Zustand aufreinigen. Die kinetische Untersuchung des Nukleotidaustauschs lässt sich entweder durch eine Änderung der Tryptophan-Fluoreszenz

messen, oder aber durch den Einsatz von Fluoreszenz-markierten Mant-oder Bodipy-Nukleotiden realisieren. Nach Zugabe eines Überschusses an EDTA wird der GTPase das gebundene Mg^{2+} entzogen und gleichzeitig die Affinität zum gebundenen Nukleotid um mehrere Größenordnungen reduziert.²⁰⁶ Für den Nukleotidaustausch wurde die GTPase mit einem 10 fachen molaren Überschuss an EDTA und einem 20 fachen molaren Überschuss an Nukleotid in Austauschpuffer für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde ein 50 facher Überschuss an $MgCl_2$ hinzugegeben und der Reaktionsansatz auf Eis gestellt. Überschüssige, nicht gebundene Nukleotide sind über eine Entsalzungssäule an einer ÄKTA Prime FPLC Anlage entfernt worden. Eine Quantifizierung der Nukleotidbeladung fand nicht statt.

- **Nukleotid-Austauschpuffer:** 50 mM Tris/HCl, 200 mM $NH_4(SO_4)_2$, 5 mM DTT, 100 μ M $ZnCl_2$, pH 8

7.5 SELEX

7.5.1 Eine kurze Einführung

Der Prozess der *in vitro* Selektion besteht im Wesentlichen aus 3 Schritten: 1) Inkubation der Nukleinsäurebibliothek mit dem Zielmolekül, 2) Separation der bindenden Sequenzen vom nicht-bindenden Rest, 3) der Amplifikation der gebundenen Sequenzen folgt ein neuer Zyklus (Schritt 1). Wird der SELEX-Prozess mit ssDNA anstelle von RNA durchgeführt, so entfällt die bei Schritt 3 notwendige RT-PCR und *in vitro* Transkription, da die isolierten Sequenzen nach einer PCR und einer Strangtrennung für den nächsten Selektionszyklus vorbereitet werden. Jeder Schritt des Selektionsvorgangs soll im folgenden kurz theoretisch erklärt werden.

Eine Bibliothek aus bis zu 10^{15} verschiedenen Oligonukleotiden, die eine zentrale randomisierte Region und 2 flankierende konstante Regionen beinhaltet, lässt sich bequem im Labormaßstab über eine Festphasensynthese an einem DNA-Synthesizer herstellen. Die Länge der randomisierten Region richtet sich nach dem Selektionsziel: werden Aptamere als spezifisch bindende Liganden gesucht, so sind zwischen 20 und 60 Nukleotide die Norm.¹¹ Bei Selektionen, die auf bestimmte katalytische Merkmale der Liganden abzielen, werden 200 Nukleotide und mehr eingesetzt.²⁰⁷ Durch die praktische Begrenzung der Sequenzdiversität sollte ebenfalls zur Kenntnis genommen werden, dass randomisierte Regionen, die eine Länge von 25 Nukleotiden überschreiten nicht mehr über das komplette Sequenzspektrum verfügen.²⁰⁸ Vor

Beginn der Selektion wird die Affinität der Bibliothek zum Zielmolekül bestimmt. Es kann davon ausgegangen werden, dass die gemessene Affinität repräsentativ für den Großteil der Sequenzen ist.²⁰⁹ Der Erfolg einer *in vitro* Selektion kann bislang nicht vorher gesagt werden, da man die genauen Voraussetzungen, die eine Zielstruktur erfüllen muss nicht kennt. Trotzdem sind neben den unbekannt Variablen einige kritische Größen für den SELEX-Prozess mathematisch erfasst wurden.²¹⁰ Es lassen sich einige vereinfachte Vorhersagen treffen, die sich mit den Bedingungen für eine optimale Anreicherung der affinsten Sequenzen befassen.¹⁵⁴ Dabei steuern folgende Parameter maßgeblich den Erfolg der Anreicherung:

$$\epsilon = \frac{e_{ff}}{bg} \quad (7.7)$$

$$k = \frac{K_W}{K_{pool}} \quad (7.8)$$

ϵ : effektive Trennung von bindenden und nicht bindenden Sequenzen

e_{ff} : Effizienz der Trennung von bindenden und nicht bindenden Sequenzen

bg : Hintergrundbindung

k : Affinitätsverhältnis

K_W : Affinitätskonstante der affinsten Binder innerhalb der Bibliothek (*Winner*-Sequenzen)

K_{pool} : Affinitätskonstante der Ausgangsbibliothek

Die Anreicherung innerhalb des SELEX-Prozesses ist definiert als variabler Faktor der das Auftreten der affinsten Sequenzen innerhalb aller Sequenzen zwischen einzelnen Selektionsrunden vergleichbar macht. Die maximale Anreicherung E^{opt} lässt sich wie folgt ableiten:

$$E^{opt} = \left(\frac{1 + \sqrt{\epsilon k}}{\sqrt{\epsilon} + \sqrt{k}} \right)^2 \quad (7.9)$$

Wie aus Gleichung 7.9 ersichtlich ist die Anreicherung abhängig von ϵ und k sowie von der eingesetzten Protein P_t - und Nukleinsäurekonzentration L_t . Der Einfluss der Konzentrationen wird in Abbildung 7.1 verdeutlicht.

Des Weiteren ist das so genannte Signal-zu-Rausch-Verhältnis S , definiert als Quotient der im Separationsschritt wiedergewonnen Sequenzen in An- und Abwesenheit des Zielproteins, eine einfach zu messende Größe. Wiederum lassen sich in Abbildung 7.1 die Effekte unterschiedlicher Verhältnisse auf die maximale Anreicherung

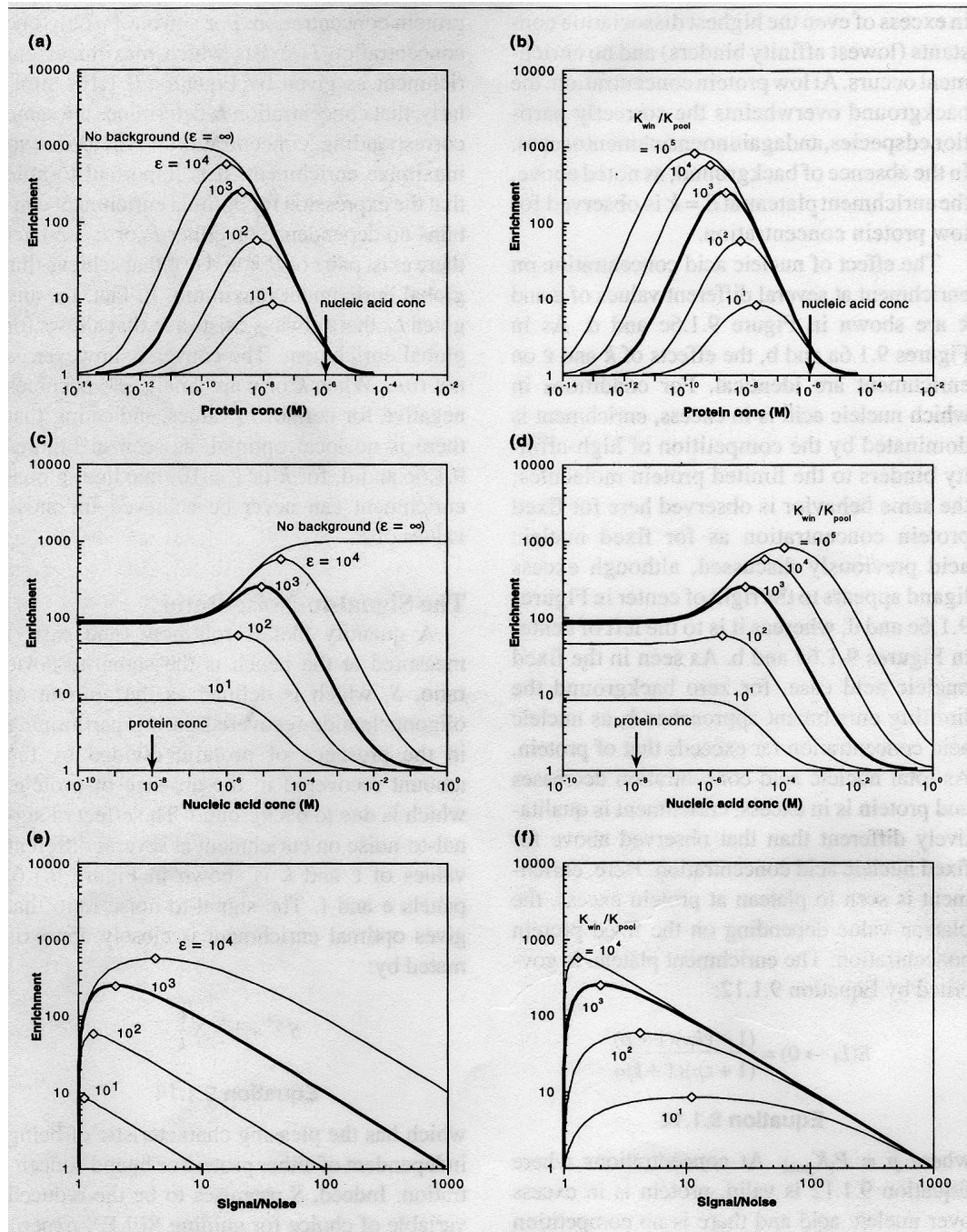


Abbildung 7.1: Anreicherung als Funktion der effektiven Trennung ϵ und dem Affinitätsverhältnis k . **(a)** und **(b)** stellen den Einfluss der Proteinkonzentration ($L_t = \text{konstant}$) auf die Anreicherung dar. Der Einfluss der Nukleinsäurekonzentration ($P_t = \text{konstant}$) ist in **(c)** und **(d)** abgebildet. Die Abhängigkeit der Anreicherung vom Signal-zu-Rausch Verhältnis ist unter **(e)** und **(f)** zu erkennen. Die optimalen Konzentrationsverhältnisse mit den im Text angegebenen mathematischen Annäherungen sind als offene Vierecke angedeutet. Die fett gedruckten Kurven repräsentieren identische Selektionsbedingungen: $P_t=10^{-8}\text{M}$, $L_t=10^{-6}\text{M}$, $K_{pool}=10^6\text{M}^{-1}$, $K_w=10^9\text{M}^{-1}$, $bg=0,1\%$.

verdeutlichen.

$$S^{opt} = 1 + \sqrt{\epsilon k} \quad (7.10)$$

S^{opt} : Signal-Rausch-Verhältnis, das zur optimalen Anreicherung führt

Wie man erkennen kann, haben weder Protein- noch Nukleinsäurekonzentration einen Einfluss auf das optimale Signal-zu-Rausch-Verhältnis. In Abbildung 7.1 wird zudem deutlich, dass sich für ϵ ein einfacher geometrischer Zusammenhang für die Bestimmung des optimalen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses nutzen lässt: man geht 1/10 der Distanz von der Y-Achse ($S=1$) zum Schnittpunkt mit der X-Achse ($S=\epsilon$) und addiert mit 1.

$$S^{opt} = 1 + \sqrt[10]{\epsilon} \quad (7.11)$$

Somit hat man eine Gleichung gefunden, die unabhängig von k wird. Sehr spannend erscheint ebenfalls die geringe Änderung der Anreicherung bei $S > 2$ (siehe Abb. 7.1), was den Schluss nahelegt dieses Signal-zu-Rausch-Verhältnis während des gesamten SELEX-Experiments beizubehalten. Im Hinblick auf eine Automatisierung lassen sich SELEX-Experimente somit relativ leicht steuern.

7.5.2 Biotinylierung

Für eine Kopplung an die Dynabead-Matrix wurde Tiam1_{1033–1406} an primären lösungsmittelzugänglichen Aminen biotinyliert. Dies geschah durch Reaktion von Tiam1_{1033–1406} mit einem 3fachen molaren Überschuss an NHS-LC-Sulfo-Biotin (Pierce Protein Science) in einem PBS-Puffer für 60 min bei 22 °C. Zur Beendigung der Reaktion wurde ein Überschuss an Tris/HCl pH 8 zugegeben und das gesamte Reaktionsgemisch auf eine Entsalzungssäule aufgetragen, um freies Biotinreagenz abzutrennen (siehe 7.4.7). Zur Überprüfung der Biotinylierung wurde ein *Dot-Blot* (siehe 7.2.17) zu Rate gezogen, bzw. die Biotinylierung über einen HABA Wettbewerbsassay (siehe 7.2.18) quantifiziert.

7.5.3 Herstellung der Selektionsmatrix

Als Selektionsmatrix für alle Selektionsexperimente wurden paramagnetische Beads (Dynabeads M-280 Streptavidin, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) mit einer Streptavidin-funktionalisierten Oberfläche eingesetzt. Im ersten Schritt wurden 500 μL Bead-Suspension (10 mg ($6\text{-}7 \cdot 10^8$) Beads /mL) gewaschen und in den Selektionspuffer überführt, bevor durch eine Inkubation (30 min, 22 °C) mit dem biotinylierten Protein die Kopplung stattfand. Die Kopplungseffizienz wurde nicht berechnet, dafür konnte durch ein Aufkochen eines Aliquots mit SDS-PAGE Ladebuffer und anschließender SDS-PAGE Analyse qualitativ die Kopplung überprüft werden. Der Hersteller der Beads gibt folgende Bindungskapazitäten an:

Tabelle 7.20: Streptavidin-Dynabeads Bindungskapazitäten

Bindungskapazität pro mL	
freies Biotin	600-900 pmol
biotinylierte Peptide	bis max. 200 pmol
biotinylierte Antikörper	bis max. 10 μg
biotinylierte ssDNA /ssRNA	bis max. 200 pmol

Die funktionalisierten Beads wurden bis zur Verwendung bei 4 °C zwischengelagert.

Tabelle 7.21:

Kopplung des Selektionstargets an Streptavidin-Dynabeads

Lösung	Volumen
Waschen der Beads	
1xPBS/1mM MgCl ₂ / pH 7,6	2x mit 500 μ L
1xPBS/1mM MgCl ₂ / 1mg/mL BSA, pH 7,6	2x mit 500 μ L
1xPBS/1mM MgCl ₂ , pH 7,6	2x mit 500 μ L
Kopplung	
100 μ g biotinyliertes Protein	500 μ L
Inkubation für 30 min bei 22 °C	
Waschen	
1xPBS/1mM MgCl ₂ / 1mg/mL BSA, pH 7,6	2x mit 500 μ L
1xPBS/1mM MgCl ₂ , pH 7,6	2x mit 500 μ L
Resuspendieren der Beads	
1xPBS/1mM MgCl ₂ / 1mg/mL BSA, pH 7,6	in 1500 μ L

7.5.4 Selektionsverlauf

Vor dem Beginn der Selektion wurden die Zielproteine Tiam1_{1033–1406}, Vav1_{170–377}, Vav1_{181–377}, Vav1*_{170–377} und Vav1_{189–575} in einem Filterbindungsexperiment (siehe 7.2.20) auf intrinsische RNA-Affinität getestet. Im Konzentrationsbereich 0-1200 nM konnte für Tiam1_{1033–1406} und Vav1_{189–575} keine Filterretention von α -[³²P]-internmarkierter RNA-Ausgangsbibliothek detektiert werden. Die kurzen Vav1-Konstrukte zeigten bei der höchsten getesteten Konzentration von 1,8 μ M eine leicht erhöhte Filterretention von 1 %. Die Selektionen gegen Tiam1_{1033–1406} und Vav1_{189–575} umfassten eine PAGE-Aufreinigung der in jedem Zyklus neu transkribierten RNA, wohingegen die SELEX gegen die kurzen Vav1-Konstrukte ohne PAGE-Aufreinigung der RNA auskam. Vor dem unmittelbaren Beginn wurden alle Puffer auf RNase-Kontamination getestet (siehe 7.2.16).

Tiam1_{1033–1406}, **Vav1**_{189–575}

Es wurden im ersten Selektionszyklus 3 nmol B50 RNA-Bibliothek mit 500 μ L (600 pmol) gekoppelten Dynabeads in 1x Selektionspuffer für 30 min bei 37 °C inkubiert. Während der Inkubation ist der Ansatz alle 5 min mit einer Pipette durchgemischt worden. Nach der magnetischen Separation der Beads wurden diese im ersten Zyklus

2x mit 200 μL 1x Selektionspuffer gewaschen und die gebundenen RNA Sequenzen abschließend mit 55 μL RNase-freiem MilliQ Wasser für 3 min bei 80 °C Hitze-eluiert. Das Eluat wurde direkt als Templat für die anschließende RT-PCR (siehe 7.3.5) eingesetzt. Nach Visualisierung der amplifizierten DNA im 2,5 %igen Agarose Gel wurde der RT-PCR Ansatz Phenol/Chloroform-gereinigt (siehe 7.2.10) und mit Ethanol präzipitiert (siehe 7.2.11). Das DNA-Pellet ist in 25 μL MilliQ Wasser aufgenommen worden, wobei 20 μL direkt in die folgende *in vitro* Transkription eingesetzt wurden (siehe 7.3.2). Nach 20 min Inkubation bei 37 °C wurde der gesamte Ansatz mit 2x PAGE-Ladepuffer vermischt und über ein 10 %iges PAGE-Gel aufgereinigt (siehe 7.2.8). Abschließend konnte die Konzentration der RNA über eine Absorptionsmessung bei 260 nm (siehe 7.2.13) bestimmt werden, bevor sich der Selektionszyklus durch die Inkubation der gekoppelten Dynabeads mit einer definierten RNA-Menge wiederholte. Der Verlauf der Selektion wird im Ergebnisteil unter 4.1.5 beschrieben.

Vav1_{170–377}, Vav1_{181–377}, Vav1*_{170–377}, Vav1_{189–575}

Es wurden im ersten Selektionszyklus jeweils 1 nmol B50 RNA-Bibliothek mit 500 μL (600 pmol) Vav1-gekoppelten Dynabeads in 1x Selektionspuffer bei 37 °C inkubiert. Für eine optimale Durchmischung der Beads wurde alle 5 min der Ansatz mit einer Pipette gemixt. Nach der magnetischen Separation wurden diese im ersten Zyklus 2x mit 200 μL 1x Selektionspuffer gewaschen, die gebundenen RNA Sequenzen wurden abschließend mit 55 μL RNase-freiem MilliQ Wasser für 3 min bei 80 °C Hitze-eluiert. Das Eluat wurde direkt als Templat für die anschließende RT-PCR (siehe 7.3.5) eingesetzt. Nach Visualisierung der amplifizierten DNA im 2,5 %igen Agarose Gel wurde der RT-PCR Ansatz Phenol/Chloroform-gereinigt 7.2.10 und mit Ethanol präzipitiert (siehe 7.2.11). Das DNA-Pellet wurde in 25 μL MilliQ Wasser aufgenommen, wobei 20 μL direkt in die folgende *in vitro* Transkription eingesetzt wurden 7.3.2. Nach 20 minütiger Inkubation bei 37 °C wurde 1/5 (20 μL) des Transkriptionsansatzes direkt in den zweiten Selektionszyklus eingesetzt. Der Verlauf der Selektion ist wiederum im Ergebnisteil unter 4.2.3 nachzulesen.

- **Selektionspuffer 1x:** 1x PBS, 1 mM MgCl_2 , pH 7,6

7.6 Substanzbibliothek

7.6.1 Organisation der Substanzbibliothek

Die laboreigene Substanzbibliothek umfasste 18000 niedermolekulare Substanzen, alle lagen als 1 mM Lösung in 100 % DMSO gelöst vor und worden bei -80 °C gelagert. Es wurden jeweils 88 Substanzen pro Screening-Platte zusammengefasst. Während des Screenings sind die jeweils benötigten Platten circa 2 h vor Beginn aus dem -80 °C Schrank geholt und bei Raumtemperatur aufgetaut worden.

7.6.2 z'-Wert Bestimmung

Die Güte und Relevanz eines Hochdurchsatzscreening lässt sich nach folgender Formel bestimmen:²¹¹

$$z' = 1 - \left[\frac{3 \cdot \sigma_p + 3 \cdot \sigma_n}{|\mu_p - \mu_n|} \right] \quad (7.12)$$

σ_p : Standardabweichung Positivkontrolle

σ_n : Standardabweichung Negativkontrolle

μ_p : Positivkontrolle

μ_n : Negativkontrolle

Ein z'-wert im Bereich zwischen 0,5 und 1 sollte für jeden Hochdurchsatzassay angestrebt werden. Z'-Werte deutlich unter 0,5 zeugen von erheblichen Instabilitäten des Assays und werden für ein Hochdurchsatzverfahren nicht empfohlen.

7.6.3 Screening

Die benötigten Substanzmengen (3 bzw. 9 μL der 1 mM Stammlösung) wurden durch den Pipettierroboter Tecan Evolution auf transparente *96well* Platten vorpipettiert. Danach wurde mit einer Mehrkanalpipette der Verdünnungspuffer per Hand hinzugegeben, wobei das Gesamtvolumen immer 100 μL betrug. Im folgenden Schritt sind 5 bzw. 4 μL der Substanzverdünnungen durch den Pipettierroboter in die ersten 22 Reihen einer PerkinElmer ProxiPlate 384 vorgelegt worden. Die letzten 2 Reihen beinhalteten DMSO-Kontrollen. In der Zwischenzeit konnten die Protein- und RNA-Lösungen in Roboter-Vorratsgefäße gefüllt werden, sodass zeitnah mit der roboter-gestützten Zugabe (4 bzw. 5 μL) der Protein- und RNA-Lösungen begonnen werden

konnte. Nach 30 min Inkubation wurden unter Lichtabschluss (Vorhang) die Donor-Akzeptor-Bead-Mischung (4 bzw. 5 μL) hinzugegeben. Nach dem letzten Pipettierschritt wurde die Screening-Platte für 1 min bei 1000 x g zentrifugiert, durch einen Klebefilm verschlossen und in absoluter Dunkelheit bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert. Danach wurde die Platte für 5 min im Plattenleser Berthold Mithras LB40 vorinkubiert und abschließend im AlphaScreen-Modus bei einer Anregungs- und Emissionsmesszeit von 0,5 s ausgelesen. Eine Zusammenfassung der Roboter-Pipettierschritte geben die folgenden Tabellen.

Tabelle 7.22: 3-Schritt Screening Protokoll für Bibliothek cg1-4, KR, Endkonzentration Substanzen: 10 μM

Schritt	Lösung	Volumen
1	3 μL der Substanzbibliothek (1 μM , 100 % DMSO) werden mit 97 μL Verdünnungspuffer 1 versetzt	5 μL
2	RNA (3 nM) und Tiam1 (120 nM) in 1x PBS/1 mM MgCl_2	5 μL
3	Donor-und Akzeptorbeads (180 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in 1x PBS/1 mM MgCl_2	5 μL

Tabelle 7.23: 4-Schritt Screening Protokoll für Bibliothek cg5-6, Endkonzentration Substanzen: 30 μM

Schritt	Lösung	Volumen
1	12 μL der Substanzbibliothek (1 μM , 100 % DMSO) werden mit 88 μL Verdünnungspuffer 2 versetzt	4 μL
2	RNA (4 nM) in 1x PBS/1 mM MgCl_2 vorgemischt	4 μL
3	Tiam1 (120 nM) in 1x PBS/1 mM MgCl_2 vorgemischt	4 μL
4	Donor-und Akzeptorbeads (240 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in 1x PBS/1 mM MgCl_2	4 μL

- **Verdünnungspuffer 1:** 1x PBS, 1 mM MgCl_2 , 0,03 mg/mL Heparin, 0,03 % Tween 20.
- **Verdünnungspuffer 2:** 1x PBS, 1 mM MgCl_2 , 0,04 mg/mL Heparin, 0,04 % Tween 20.

7.7 Allgemeiner Umgang mit Bakterienkulturen

Alle Arbeiten mit Bakterien wurden unter aseptischen Bedingungen im laminaren Luftstrom (Laminar Airflow) mit sterilen Glas- bzw. Plastikwaren durchgeführt. Glasspatel zum Ausplattieren von Bakterien wurden mit 80 % Ethanol über einer Bunsenbrennerflamme sterilisiert. Die Anzucht von *E. coli* Bakterien in Flüssigkultur erfolgte in sterilen Zentrifugenröhrchen (15 mL oder 50 mL) bzw. Erlenmeyerkolben. LB-Nährmedium wurde zur Sterilisation 20 min bei 120 °C autoklaviert. Die entsprechenden Agarnährböden wurden durch Zusatz von 2 % (w/v) Agar hergestellt. Selektionsmedien wurden durch Zusatz von Antibiotika unmittelbar vor dem Animpfen erhalten.

7.7.1 Plattenkultur

Die Anzucht von *E. coli* Bakterien erfolgte durch Ausstreichen von Flüssigkulturen auf sterilen LB-Agar-Platten. Zur Selektion wurden dem Medium das entsprechende Selektionsantibiotikum (Ampicillin: 100 µg/mL, Kanamycin: 25 µg/mL, Chloramphenicol: 50 µg/mL) zugesetzt. Die Inkubation der Bakterienkulturen erfolgt über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

7.7.2 Flüssigkultur

Mit einer Einzelkolonie wurden 50 mL LB-Selektionsmedium angeimpft und über Nacht (37 °C, 130 rpm) inkubiert. Diese Vorkultur wurde anschließend zum Animpfen einer Hauptkultur für die Proteinexpression oder zur Plasmidpropagation verwendet.

7.7.3 Anlegen von Dauerkulturen

Zwecks Lagerung und schneller Verfügbarkeit von Bakterien wurden Glycerin-Kulturen angelegt. Hierzu sind 500 µL einer Übernachtskultur in LB-Selektionsmedium mit 500 µL 2x Glycerin-Medium versetzt und bei -80 °C gelagert worden.

- **Glycerin-Medium 2x:** 25 mM Tris/HCl, 100 mM MgSO₄, 80 % (v/v) Glycerin, pH 8,9.

7.7.4 Bestimmung der Bakterienkonzentration in Flüssigkulturen

Mit Hilfe der Trübungsmessung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm (Optische Dichte, OD) lässt sich die Bakterienkonzentration von Flüssigkulturen bestimmen. Die mathematische Beschreibung der optischen Absorption erfolgt durch das Lambert-Beersche Gesetz (siehe 7.2.4). Für *E. coli* Bakterien kann näherungsweise eine Konzentration von 8×10^8 Zellen/mL für eine OD₆₀₀ von 1 angenommen werden.

7.7.5 Transformation kompetenter *E.coli* Bakterien

Bei der Transformation von *E. coli* wurden zwischen 1 und 100 ng Plasmid mit 100 μ L einer angetauten Suspension chemisch kompetenter Zellen vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 40 s auf 42 °C erhitzt, 2 min auf Eis abgekühlt und 300 μ L vorgewärmtes SOC-Medium hinzugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C im Thermomixer (900 U/min) ist die Zellsuspension auf LB-Agar-Selektionsplatten (siehe 7.7.1) ausgestrichen worden.

7.8 Allgemeiner Umgang mit eukaryontischen Zelllinien

7.8.1 Arbeiten mit eukaryontischen Zellen

Alle Arbeiten mit eukaryontischen Zellen wurden unter aseptischen Bedingungen unter einer Laminar-Air-Flow-Werkbank mit sterilen Plastik- bzw. Glaswaren durchgeführt. Die Kultivierung von HEK293-Zellen erfolgte im CO₂-Inkubator bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem 5 % igem CO₂/Luft-Gemisch. HEK293-Zellen wurden in DMEM Medium kultiviert, das mit L-Glutamin, 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS) versetzt worden war. Die Zellen sind im semi-konfluenten Zustand kultiviert und für die Versuchsansätze unter Verwendung einer Trypsin/EDTA Lösung und Aussaat der Zellen in frischem Grundmedium in entsprechenden Zelldichten ausplattiert worden. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauerkammer unter dem Mikroskop.

- **Phosphate Buffered Saline (PBS)-Puffer (steril):** 140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ und 1,75 mM KH₂PO₄, pH 7,4. Die fertige Lösung wurde bei 120 °C und 1,2 bar für 20 min autoklaviert.
- **Trypsin-EDTA-Lösung:** 0,05 % Trypsin, 0,53 mM EDTA in Hanks B.S.S (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

- **Grundmedium:** DMEM mit 4 g/L Glucose, Phenolrot (PAN-Biotech, Aidenbach, D) versetzt mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS)

7.8.2 Bestimmung der Zell-Vitalität

Die Zell-Vitalität wurde durch Trypan-Blau Ausschluss untersucht. Hierzu wurde eine Teilprobe der Zellsuspension nach Trypsinierung mit der gleichen Menge an Trypan-Blau-Lösung gemischt, um unter dem Lichtmikroskop lebende von geschädigten Zellen zu unterscheiden und in einer Neubauerkammer zu zählen. In tote oder geschädigte Zellen dringt der Farbstoff ein, sodass sie sich blau färben, während intakte Zellen sich gut an einer Doppelbrechung im Phasenkontrast unterscheiden lassen. Die Vitalität der Zellen wurde immer parallel zu den jeweiligen Versuchsansätzen überprüft.

7.8.3 Transfektion von eukaryontischen Expressionsvektoren

Die Zellen wurden in 10 cm Kulturschalen (78 cm² Grundfläche) bis zu einer Konfluenz von etwa 50 % kultiviert und mittels Lipofectamine LTX (Invitrogen) transfiziert. Das Verhältnis (15 µg Plasmid zu 45 µL Lipofectamine) von DNA zu Transfektionsreagenz wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers gewählt. Die Zellen wurden nach 24 h für die entsprechenden Experimente verwendet.

7.8.4 Gesamtproteinextrakt aus Zellen (Zelllysate)

Zur Herstellung eines Zelllysates wurden 80-90 % konfluent kultivierte Zellen auf Eis mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und anschließend in 1 mL PBS-Puffer abgeschabt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (400 x g/ 5 min) pelletiert, mit 500 µL Lysepuffer versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Der unlösliche Rückstand wurde (16000 x g/ 30 min/ 4 °C) abzentrifugiert und der Gesamtproteingehalt des Überstands durch einen Bradford-Assay (siehe 7.2.5) bestimmt.

- **Lysepuffer:** 50 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 % Igepal, 5 % Glycerin, 1mM PMSF, 1 µg/mL Aprotinin, 1 µg/mL Leupeptin, pH 7,5.

7.8.5 *in vitro* GTPγS Beladung von Zelllysate

500 µL des abzentrifugierten Zelllysates (siehe 7.8.4) aus Rac1-überexprimierenden HEK293 Zellen wurde mit 10 µL einer 0,5 M EDTA Lösung und 5 µL einer 10 mM GTPγS Lösung für 15 min bei 30 °C inkubiert. Die Nukleotidbeladung ist durch die

Zugabe von 32 μL 1 M MgCl_2 gestoppt worden. Die so präparierte GTPase wurde direkt in 7.9.4 eingesetzt.

7.8.6 Pull-down von Rac1-GTP

Die Quantifizierung der GTP-gebundenen Form der Rho-GTPase Rac1 lässt sich über eine spezifische Wechselwirkung mit dem Effektor PAK1 (*p21 activated kinase*) verwirklichen.¹⁴⁰ Dabei wird die Pak1-CRIB-Domäne (*Cdc42 Rac interactive binding*) als GST-Fusionprotein heterolog in *E.coli* aufgereinigt, um im Zelllysate die aktive GTPase zu binden und über eine GSH-Matrix vom Rest der zellulären Proteine abzutrennen. Der Nachweis von Rac1 erfolgt über einen Western Blot (siehe 7.2.6). Durch die relativ schwache Affinität von GST an Glutathion ($K_D \sim 50\mu\text{M}$)²¹² wurde die GST-CRIB Domäne zusätzlich biotinyliert (siehe 7.5.2), um den pull-down an einer Avidin-Festphase (Pierce Protein Science) durchführen zu können. Im Wesentlichen wurden 500 - 1000 μg frisches Zelllysate mit 30 μg biotinyliertem GST-PBD-Pak1 und 20 μL monomeres Avidin-Suspension in 500 μL Pak1 Bindepuffer für 1 h bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Danach werden die Reaktionsgefäße für 30 s bei 14000 x g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und insgesamt 3x mit 500 μL Pak1 Waschpuffer versetzt. Die übriggebliebenen *Beads* werden mit 20 μL Laemmli-puffer vermischt, 5 min bei 90 °C aufgeköcht und nach einer Zentrifugation für 20 s bei 14000 x g auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Nach der Auftrennung im SDS-PAGE-Gel (siehe 7.2.1) erfolgt der immunologische Nachweis durch eine Inkubation mit einem *anti-Rac1* Antikörper (siehe 7.1.10). Der mit dem Fluorophor IRDye800 konjugierte Sekundärantikörper *anti-Maus IgG* erlaubte das Auslesen des Blots am Odyssey IR Western Blot Dokumentationssystem.

- **Pak1 Bindepuffer:** 25 mM Tris/HCl, 30 mM MgCl_2 , 40 mM NaCl, 0,5 % Igepal, 1 mM DTT, pH 8.
- **Pak1 Waschpuffer:** 25 mM Tris/HCl, 30 mM MgCl_2 , 40 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 8.

7.9 Biophysikalische Methoden

7.9.1 Luminescent Oxygen Channeling

*Luminescent Oxygen Channeling*¹²² ist eine Nanopartikel-basierte Methode, um Größen unabhängige biomolekulare Interaktionen zu messen (siehe Abb. 7.2). Dies gelingt

durch einen zweistufigen Mechanismus: Im ersten Schritt werden durch eine Laseranregung von Donorbeads (Durchmesser circa 250 nm) Singulett-Sauerstoff Moleküle generiert, die eine relativ kurze Lebensdauer von 4 μs im wässrigen Medium zeigen. Diese Lebensdauer korreliert mit einer mittleren Diffusionsreichweite von circa 200 nm. Im zweiten Schritt kommt es bei einer räumlichen Nähe von so genannten Akzeptorbeads zu einer Reaktion der $^1\text{O}_2$ Moleküle mit einem Gemisch aus Thioxen-, Anthracene-, und Rubren-Derivaten auf der Bead-Oberfläche zur Lumineszenz.¹²³ Die Donor- und Akzeptorbeads können verschiedene Funktionalitäten tragen, die eine Immobilisierung der zu analysierenden Bindungspartner ermöglichen. Es stehen z.B. Streptavidin-, Ni-NTA-, GSH-, Protein A- Oberflächen zur Verfügung. Seit 1999 wird die Technologie von PerkinElmer unter dem Namen AlphaScreen[©] vermarktet. Die Beads sind lichtempfindlich, deshalb sollten alle Inkubationsschritte unter abgedunkelten Lichtverhältnissen stattfinden. Die Generierung und Relaxation der $^1\text{O}_2$ Moleküle ist ebenfalls temperaturabhängig, sodass alle Versuchsansätze im Gerät bei 25 °C für mindestens 10 min vorinkubiert wurden, bevor die Messung stattfand.

7.9.2 Luminescent Oxygen Channeling als Basis eines Aptamer-Verdrängungsassays

Die Etablierung eines Aptamer-Verdrängungsassays basierend auf *Luminescent oxygen channeling* wurde folgendermaßen durchgeführt: Das Protein sollte über einen Biotinrest (siehe 7.5.2) an Streptavidin-Donorbeads gekoppelt werden, während über ein Fluorescein-Label am 5'-Ende des Aptamers die Interaktion mit *anti-FITC-IgG*-Akzeptorbeads ausgenutzt wurde. Die entsprechenden funktionalisierten Beads wurden als so genanntes *FITC Detection Kit* von PerkinElmer bezogen. Die Pipettierschritte der einzelnen Lösungen sind in der folgenden Tabelle nachzulesen.

Tabelle 7.24: Aptamer-Verdrängungsassay Pipettierschritte

Lösung	Konzentration	Volumen
Puffer-Mix		
Heparin	20 mg/mL	0,3 μL
Tween 20	1 %	3
MgCl ₂	100 mM	4,5 μL
PBS	10 x	15 μL
MilliQ		127,2 μL
5 μL werden pro well vorgelegt		

Protein/RNA-Mix		
Biotin-Tiam1	20 μM	2 μL
FITC-RNA	450 nM	1 μL
PBS/1 mM MgCl_2	1x	147 μL
5 μL pro well		
Bead-Mix		
Streptavidin-Donor	5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	6 μL
anti-FITC-Akzeptor	5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	6 μL
1x PBS/1 mM MgCl_2	1x	138 μL
5 μL pro well und abschließend für 1 min bei 1000 rpm zentrifugieren		

Alle Messungen wurden mit dem Plattenlesegerät Berthold Mithras LB40 im AlphaScreen-Modus in weißen 384 ProxiPlate Mikrotiterplatten gemacht. Die Anregungs- und Emissionszeit betrug jeweils 0,5 s.

7.9.3 Luminescent Oxygen Channeling als Basis eines Phosphorylierungsassays

Die Analyse von Protein-Phosphorylierungen lässt sich typischerweise über spezifische Phospho-Antikörper realisieren. Nach der Auftrennung im SDS-PAGE Gel werden die Proben mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert und quantifiziert. Eine alternative Methode, um das Maß einer Phosphorylierung in der homogenen Lösung zu messen, bietet sich durch die Verwendung eines auf *luminescent oxygen channeling*-basierten Versuchsaufbaus an. Hierbei werden Kinase-Substrat (phosphoryliertes Protein) und der Phosphorylierungs-spezifische Antikörper auf Donor- und Akzeptorbeads immobilisiert. Ein LOC-Signal wird gemessen, wenn das phosphorylierte Substrat mit dem spezifischen Phospho-Antikörper interagiert, um beide Beads in eine räumliche Nähe zu bringen. Alle Messungen wurden mit dem Plattenlesegerät Berthold Mithras LB40 im AlphaScreen-Modus in weißen 384 ProxiPlate Mikrotiterplatten gemacht. Die Anregungs- und Emissionzeit betrug jeweils 0,5 s. Die *Beads* wurden als *Phosphotyrosine Assay Kit* von PerkinElmer bezogen. Im folgenden ist ein typisches Pipettierschema aufgezeigt:

A

	D	P1	P2	A
ADLOC	Streptavidin	Biotin-Protein	FITC-Aptamer	anti-FITC-IgG
Phosphorylierung	Streptavidin	Biotin-Protein		anti-pY-IgG
GTPase Sensor	Streptavidin	Biotin-Protein	anti-GTPase-IgG	Protein A

B

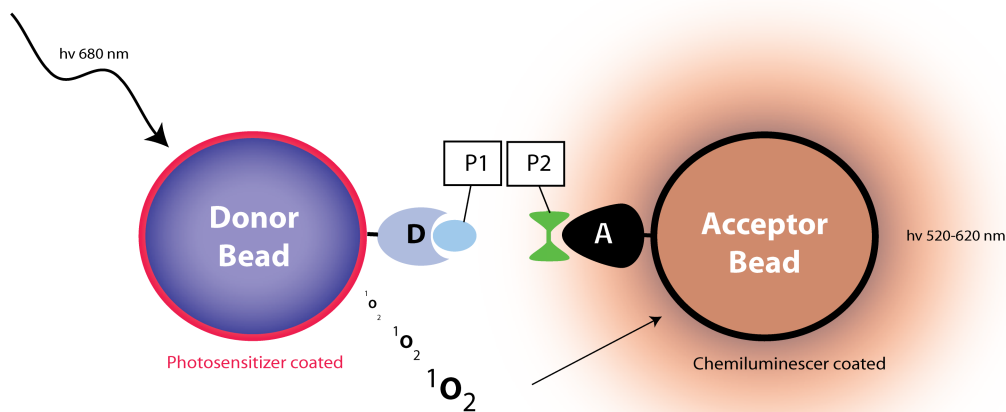


Abbildung 7.2: Allgemeines Schema eines *Luminescent Oxygen Channeling* Experiments: **(A)** Übersicht der verwendeten Funktionalitäten für den Aptamer-Verdrängungsassay, den Phosphorylierungsassay und den GTPase-Aktivierungssensor. **(B)** Molekül P1 und P2 interagieren miteinander, wodurch ebenfalls Donor- und Akzeptorbeads aufgrund der Wechselwirkung mit ihren Funktionalitäten A und D eine räumliche Nähe einnehmen. Durch eine Laser-Anregung wird auf den Donorbeads Singulett-Sauerstoff generiert, der bis zu 200 nm diffundiert und auf den Akzeptorbeads eine Lumineszenz auslöst.

Tabelle 7.25: LOC-Phosphorylierungsassay Pipettierschritte

Lösung	Konzentration	Volumen
in vitro Phosphorylierung		
Biotin-Vav _{134–564} /Vav _{170–377}	266 nM	6 μ L
BSA	10 mg/mL	16 μ L
ATP	10 mM	4 μ L
Src Kinase (Invitrogen)	800 nM	8 μ L
Src Puffer	5x	16 μ L
MilliQ		30 μ L
Inkubation 30 min @ 30 °C		
Vorlegen von 2 μ L 0,5 M EDTA in 384 ProxiPlate		
8 μ L der Reaktion werden zum Abstoppen in EDTA wells pipettiert		
Bead-Mix		
Streptavidin-Donor	5000 μ g/mL	5,6 μ L
anti-pY-Akzeptor	5000 μ g/mL	5,6 μ L
MilliQ		688,8 μ L
10 μ L pro well		
2 h Inkubation bei RT		

- **Src Reaktionspuffer 5x:** 200 mM Hepes, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, pH 7,6.

7.9.4 Luminescent Oxygen Channeling als Basis eines GTPase-Aktivierungssensors

Die Bestimmung der aktiven Form einer kleinen GTPase basiert auf der spezifischen Bindung von Effektorproteinen an die GTP-Konformation und kann folgendermaßen vollzogen werden: Der Effektor wird über einen Biotinanker auf Streptavidin-Donorbeads vorimmobilisiert. Die Akzeptorbeads sind mit Protein A funktionalisiert, sodass sie mit GTPase-spezifischen Antikörpern, die ausschließlich den polybasischen C-Terminus erkennen, funktionalisierbar sind. Nach der Zugabe von GTP-gebundener GTPase kommt es zur Bindung des Effektors, gleichzeitig erkennt der GTPase-spezifische Antikörper den C-Terminus, was am Ende zur Bildung eines trimeren Komplexes führt–und damit zu einem LOC-Signal. Alle Messungen wurden mit dem Plattenlesegerät Berthold Mithras LB40 im AlphaScreen-Modus in weißen 384 ProxiPlate Mikrotiterplatten gemacht. Die Anregungs- und Emissionszeit betrug

7. MATERIAL UND METHODEN

jeweils 0,5 s. Die Beads wurden als *Protein A Detection Kit* von PerkinElmer bezogen. Das Pipettierschema ist der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Tabelle 7.26: GTPase-Aktivierungssensor Pipettierschritte

Lösung	Konzentration	Volumen
Beladung Rac1 GTPase (Lösung A)		
Rac1	225 μM	1 μL
GDP bzw. GTP γS	10 mM	1 μL
EDTA	500 mM	1 μL
1x PBS		47 μL
15 min @ 30 °C		
Abstoppen mit 10 uL 1 M MgCl ₂	auf Eis	
GTPase/Effektor-Mix		
Lösung A		x μL
bzw. beladenes Zelllysate (siehe 7.8.5)		
Biotin-Pak _{170–117}	10 μM	1 μL
Pak Bindepuffer		auf 100 μL
90 min @ 4 °C		
Bead-Mix		
Streptavidin-Donor	5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	4 μL
Protein A-Akzeptor	5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	4 μL
Rac1 Antikörper (Santa Cruz)	0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2 μL
1x PBS/1 mM MgCl ₂	1x	190 μL
90 min @ 4 °C		
Je 10 μL beider Mischungen in 384 Proxiplate		
90 min @ 4 °C		

- **Pak Bindepuffer:** 25 mM Tris , 30 mM MgCl₂, 40 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,5 % Nonidet P-40, pH 8.

7.9.5 Kinetische Untersuchung des Nukleotid-Austauschs an Rac1/Rac2

Alle kinetischen Experimente zur Charakterisierung von Aptameren wurden an einem Fluoreszenz-Spektrometer (Perkin Elmer LS55) in 1 mL Quartz-Küvetten durchgeführt. Die intrinsische Nukleotidaustauschaktivität von Rac2 wurde in einem Dissoziationsexperiment mit 100 nM mantGDP-beladenem Rac2 (Rac2*mGDP) und ei-

nem 50 fachen molaren Überschuss an GTP in entgastem Reaktionspuffer gemessen. Die Tiam1_{1033–1406}-beschleunigte Dissoziation von Rac2*mGDP ist mit 770 nM Austauschfaktor bestimmt worden. Die Vav1_{189–575}-katalysierte Beschleunigung des Nukleotidaustauschs an Rac1*mGDP fand mit 200 nM Austauschfaktor statt. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen für die mant-Gruppe wurden auf 355 nm und 440 nm festgesetzt (Spaltbreite: 2,5 nm). Die Fluoreszenzwerte wurden als Funktion der Zeit aufgetragen und mit der folgenden mathematischen Formel approximiert:

$$F = F_{\infty} \cdot A e^{k_{obs} \cdot t} \quad (7.13)$$

F: Fluoreszenz

F_{∞} : Fluoreszenz im Gleichgewicht

A: Signalamplitude

k_{obs} : beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in s^{-1}

t: Zeit in s

Durch den hohen molaren Überschuss an GTP kann die Reassoziierung des mant-Nukleotids vernachlässigt werden. Es können unter der Annahme, dass $K_M \gg S_0$ die Progressionskurven durch eine exponentielle Abnahme mathematisch erfasst werden. Im Falle der GEF-stimulierten Dissoziationsreaktion kann ebenfalls das exponentielle Modell verwendet werden, da sich bei $K_M \gg S_0$ die Betrachtung der Kinetik vereinfacht und die Geschwindigkeit unabhängig von S_0 wird. Der Tiam1-beschleunigte Assoziationsvorgang von BodipyGDP¹²⁶ an Rac2 zur Untersuchung der niedermolekularen Substanzen fand im 100 μ L Maßstab statt. Die Messungen wurden am Plattenlesegerät Fluoroscanner Ascent FL durchgeführt. Ebenfalls unter der Annahme, dass der K_M -Wert größer als die Substratkonzentration ist, lassen sich durch eine exponentielle Auswertung der Assoziationsdaten k_{obs} -Werte bestimmen. Die intrinsische Assoziation wurde mit jeweils 2 μ M Rac2 und 400 nM mant-Nukleotid oder Bodipy-Nukleotid im entgastem Reaktionspuffer gemessen.

Tiam1_{1033–1406} wurde in den Assoziationsexperimenten in einer Konzentration von 220 nM eingesetzt. Für die Fluoreszenzmessungen der BodipyGDP-Assoziation ist das Wellenlängenpaar 488/525 nm verwendet worden.

- **Reaktionspuffer 1x:** 40 mM Hepes , 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,6.

7. MATERIAL UND METHODEN

8

Anhang

8.1 Primersequenzen der verkürzten K91-Konstrukte

B50 Bibliothek

5'-AAGCAACGTCAACTCCAGAAG -N50 -AGAATGTCTCAGACCTCTTTCTTC

B50-Fwd Primer-T7 Promoter

5'-AATGCTAATACGACTCACTATAGGAAGAAAGAGGTCTGAGACATT

B50-Rev Primer

5'-AAGCAACGTCAACTCCAGAAG

K91-Minimalmotiv 2A-Templat GNRA Tetraloop

3'-CTTCTTTCTCCAGACTCTGTAAGAGGGGGACTTTATATTATTAT

TGACGCTTCAACTGCAACGAA

K91-Minimalmotiv 2B-Fwd Primer

5'-AATCGTAATACGACTCACTATAGAATAATAACTATGAATAA

K91-Minimalmotiv 2B-Rev Primer

5'-AAACGTCAACTCCAGAAGG

K91-Minimalmotiv 2C-Fwd Primer

5'-AATCGTAATACGACTCACTATAGGAATAACTATGAATAAT

K91-Minimalmotiv 2C-Rev Primer

5'-AGTCAACTCCAGAAGG

8.2 Proteinsequenzen

His₆-Tiam1_{1033–1406}

Organismus: Maus

Masse: 46,4 kDa

ε: 35710

pI: 6,72

MSYYHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGAMGR₁₀₃₃QLSDADKLRKVICELLETERTYV KDLNCLMERYLKPLQKETFLTQDELVDVLFGNLTEMVEFQVEFLKTLEDGVRLVPDLEKLEKVDQFKKVLFSLGGSFLLYADRFLKLYSAFCASHTKVPKVLVKAKTDTAFKAFLDAQNPRQQHSSTLESYLIKPIQRVLKYPLLLRELFALTDAESEEHYHLDVAIKTMNKVASHINEMQKIHEEFGAVFDQLIAEQTGEKKEVADLSMGDLLLHTSVIWLNPPASLGKWKKEPELAAFVFKTAVVLVYKDGSKQKKKLVGSHRLSIYEEWDPFRFRHMIPTEALQVRALPSADAEANAVCEIVHVKSESEGRPERVFHLCCSSPESRKDFLKS VHSILRDKHRRQLLKTE₁₄₀₆

His₆-SUMO-Tiam1_{1033–1255}

Organismus: Maus

Masse: 39,4 kDa

ε: 11880

pI: 5,74

MGSSHHHHHHHGSLVPRGSASMSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLK VSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFKRQKEMDSLRFYDGIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQIGGMR₁₀₃₃QLSDADKLRKVICELLETERTYV KDLNCLMERYLKPLQKETFLTQDELVDVLFGNLTEMVEFQVEFLKTLEDGVRLVPDLEKLEKVDQFKKVLFSLGGSFLLYADRFLKLYSAFCASHTKVPKVLVKAKTDTAFKAFLDAQNPRQQHSSTLESYLIKPIQRVLKYPLLLRELFALTDAESEEHYHLDVAIKTMNKVASHINEMQKIHEEFGAVFDQLIAEQTGE₁₂₅₅

GST-Tiam1_{1255–1400}

Organismus: Maus

Masse: 42,5 kDa

ϵ : 61150

pI: 7,29

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFEL
GLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLE
GAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLN
GDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPOIDKY
LKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPKSDLVPRGSE₁₂₅₅KKEVADLSMGDL
LLHTSVIWLNPPASLGKWKKEPELAAFVFKTAVVLVYKDGSKQKKKLVG
SHRLSIYEEWDPFRFRHMIPTEALQVRALPSADAEANAVCEIVHVKSE
SEGRPERVFHLCSSPESRKDFLKSIVHSILRDKHRR₁₄₀₀

GST-Vav1_{189–575}

Organismus: Mensch

Masse: 71,7 kDa

ϵ : 72020

pI: 7,32

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFE
LLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAIEISML
EGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLN
GDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPOIDKYL
KSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPKSDLIEGRENLYFQSM₁₈₉TEYD
KRCCCLREIQQTEEKYTDTLGSIQQHFLKPLQRFLKPQDIEIIFINIEDL
LRVHTHFLKEMKEALGTPGAANLYQVFIKYKERFLVYGRYCSQVESASKH
LDRVAAAREDVQMKLEECSSQRANNGRFTLRDLLMVPMPQRVLKYHLLQEL
VKHTQEAMEKENLRLALDAMRDLAQCNEVVKRDNETLRQITNFQLSIENL
DQSLAHYGRPKIDGELKITSVERRSKMDRYAFLLDKALLICKRRGDSYDL
KDFVNLHSFQVRDDSSGDRDNKKWSHMFLIEDQGAQGYELFFKTRELKK
KWMEQFEMAISNIYPENATANGHDFQMFSFEETTSCACQMLLRGTFYQG
YRCHRCRASAHKECLGRVPPCGRHGQDFPGTM₅₇₅

8. ANHANG

His₆-Vav₁₇₀₋₃₇₇-Strep

Organismus: Mensch

Masse: 28 kDa

ε: 16650

pI: 6,74

RGSHHHHHHGAGDRGPEFG₁₇₀DEIYEDLMRSEPVSMPPKMTEYDKRCCCL
REIQQTEEKYTDTLGSIQQHFLKPLQRFLKPQDIEIIFINIEDLLRVH
THFLKEMKEALGTPGAANLYQVFIKYKERFLVYGRYCSQVESASKHLD
RVAAAREDVQMKLEECQRANNGRFTLRDLLMVPMQRVLYHLLQEL
VKHTQEAMEKENLRLALDAMRDLAQCNEVKRDN₃₇₇HGLSAWSHPQFEK

GST-Rac1₁₋₁₉₂

Organismus: Mensch

Masse: 47,8 kDa

ε: 63620

pI: 7,93

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLE
FPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDI
RYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDF
MLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQ
GWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSM₁QAIKCVVVG DGAVGKTCLLISYT
TNAFPGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPVNLGLWDTAGQEDYDRLRPLSYPQT
DVFLICFSLVSPASFENVRAKWYPEVRHHCPNTPILVGTKLDRDDKDTI
EKLKEKCLTPITYPQGLAMAKEIGAVKYLECSALTQRGLKTVFDEAIRAVL
CPPPVKKRKRKCLL₁₉₂

His₆-SUMO-Rac2₁₋₁₉₂

Organismus: Mensch

Masse: 34,8 kDa

ε: 23740

pI: 6,23

MGSSHHHHHHGSLVPRGSASMSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVS
DGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFKRQ GKEMDSLRF LYDGIRIQADQTPE
DLDMEDNDIIEAHREQIGGM₁QAIKCVVVG DGAVGKTCLLISYTT
NAFPGEYIPTVFDNYSANVMVDSKPVNLGLWDTAGQEDYDRLRPLSYPQT
DVFLICFSLVSPASYENVRAKWFPEVRHHCPSTPIILVGT KLDLRDDKDT
IEKLKEKKLAPITYPQGLALAKEIDSVKYLECSALTQRGLKTVFDEAIRA
VLCQPTRQQKRACSL₁₉₂

GST-PAK1₇₀₋₁₁₇

Organismus: Mensch

Masse: 31,8 kDa

ε: 46850

pI: 5,68

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGL
EFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVL
DIRYGVSR IAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH
PDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPQIDKYLKSSKYIA
WPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSM₇₀KERPEISLPSDFEHTI
HVGFDVAVTGEFTGMPEQWARLLQTSNITKS EQ₁₁₇

8. ANHANG

8.3 Vektorkarten

pGEX-1λT (27-4805-01)

Thrombin
 Leu Val Pro Arg Gly Ser Pro Glu Phe Ile Val Thr Asp
 CTG GTT CCG CGT GGA TCC CCG GAA TTC ATC GTG ACT GAC TGA CGA
 BamH I EcoR I Stop codons

pGEX-2T (27-4801-01)

Thrombin
 Leu Val Pro Arg Gly Ser Pro Gly Ile His Arg Asp
 CTG GTT CCG CGT GGA TCC CCG GGA ATT CAT CGT GAC TGA CTG ACG
 BamH I Sma I EcoR I Stop codons

pGEX-2TK (27-4587-01)

Thrombin Kinase
 Leu Val Pro Arg Gly Ser Arg Arg Ala Ser Val
 CTG GTT CCG CGT GGA TCC CCG GGA ATT CAT CGT GAC TGA
 BamH I Sma I EcoR I Stop codons

pGEX-4T-1 (27-4580-01)

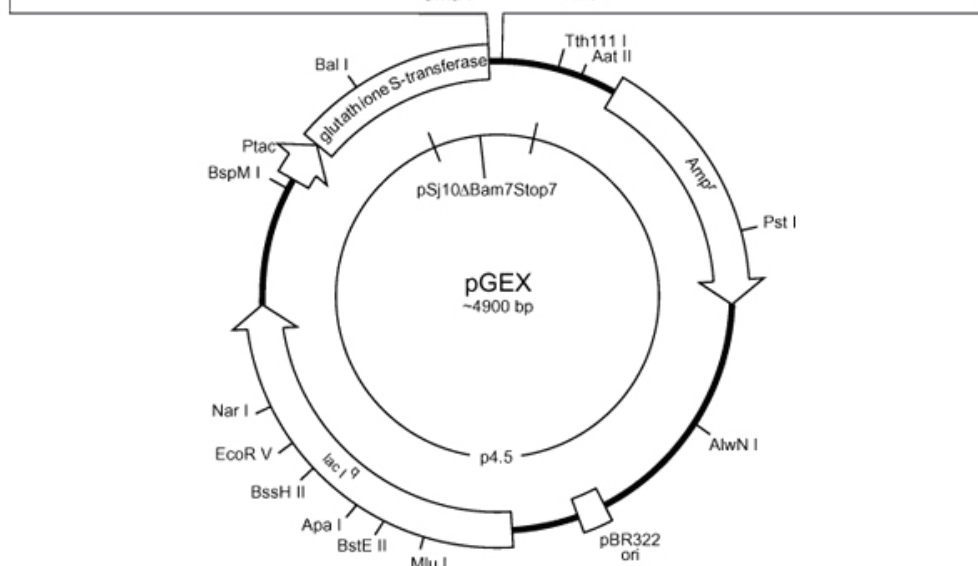
Thrombin
 Leu Val Pro Arg Gly Ser Pro Glu Phe Pro Gly Arg Leu Glu Arg Pro His Arg Asp
 CTG GTT CCG CGT GGA TCC CCG GAA TTC CCG GGT CGA CTC GAG CCG CCG CAT CGT GAC TGA
 BamH I EcoR I Sma I Sal I Xho I Not I Stop codons

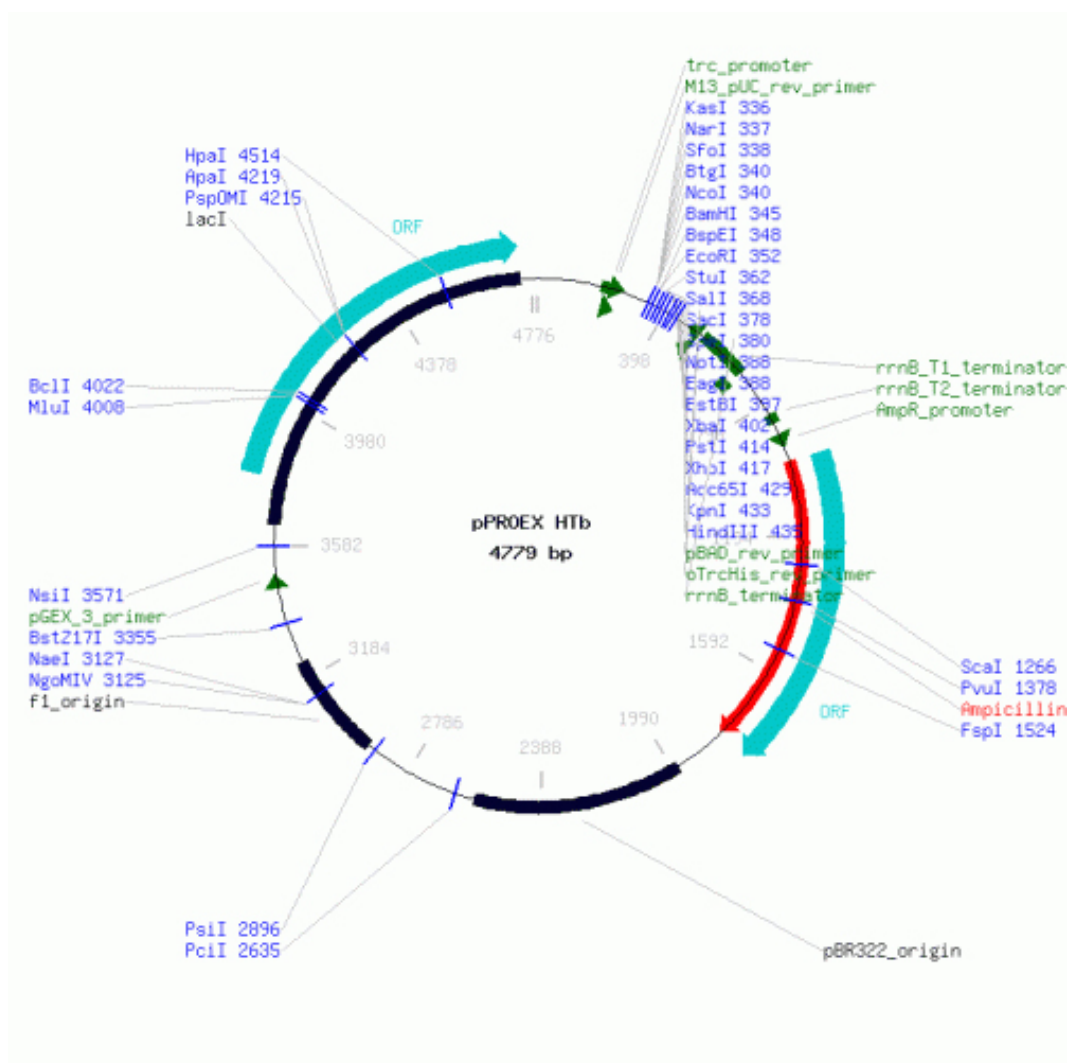
pGEX-4T-2 (27-4581-01)

Thrombin
 Leu Val Pro Arg Gly Ser Pro Gly Ile Pro Gly Ser Thr Arg Ala Ala Ala Ser
 CTG GTT CCG CGT GGA TCC CCA GGA ATT CCC GGG TCG ACT CGA GCG GCC GCA TCG TGA
 BamH I EcoR I Sma I Sal I Xho I Not I Stop codon

pGEX-4T-3 (27-4583-01)

Thrombin
 Leu Val Pro Arg Gly Ser Pro Asn Ser Arg Val Asp Ser Ser Gly Arg Ile Val Thr Asp
 CTG GTT CCG CGT GGA TCC CCG AAT TCC CCG GTC GAC TCG AGC GGC CGC ATC GTG ACT GAC TGA
 BamH I EcoR I Sma I Sal I Xho I Not I Stop codons







8. ANHANG

Multiple Cloning Site of pASK-IBA43plus

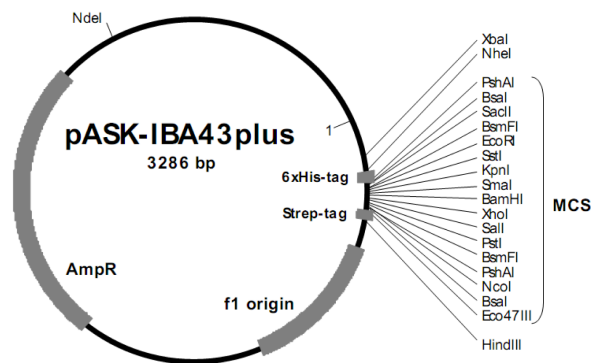
```

1      CCATCGAATGGCCAGATGATTAATTCCTAATTTTTGTTGACACTCTATCATTGATAGAGTTATTTTACCACCTCCCTATC 79
      forward primer

80     AGTGATAGAGAAAAGTGAATGAATAGTTCGACAAAAATCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAA 159
      XbaI
      link      6xHistidine-tag
      M  A  S  R  G  S  H  H  H  H  H  H  G  A  G  D  R  G  P  E  F  E  L  G  T  R  G
160    ATGGCTAGCAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGggccGGAGACCGCGGTCCCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGG 239
      NheI      BsaI      BsmFI      SstI      KpnI      BamHI
      PshAI      EcoRI      SmaI
      SacII

      link      Strep-tag
      S  L  E  V  D  L  Q  G  D  H  G  L  S  A  W  S  H  P  Q  F  E  K  *
240    ATCCCTCGAGGTCGACCTGCAGGGGACCATGGTCTCagggcTTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAATAATAAGCTTGAC 319
      XhoI      SalI      PstI      BsmFI      BsaI      Eco47III      HindIII
      PshAI
      NcoI

320    CTGTGAAGTGA AAAATGGCGCACATTGTGCGACATTTTTTTGTCTGCCGTTTACCCTACTCGCTCACGGATCTCCAG 399
      reverse primer
  
```



8.4 Abkürzungen für Nukleobasen und Aminosäuren

Internationaler Einbuchstabencode für Nukleobasen und Aminosäuren

Nukleobasen		Aminosäure	
A	Adenin	A	Ala Alanin
B	nicht A	B	Asx Aspartat oder Asparagin
C	Cytosin	C	Cys Cystein
D	nicht C	D	Asp Aspartat
G	Guanin	E	Glu Glutamat
H	nicht G	F	Phe Phenylalanin
K	G oder T	G	Gly Glycin
M	A oder C	H	His Histidin
N	A, C, G, oder T	I	Ile Isoleucin
R	A oder G	K	Lys Lysin
S	C oder G	L	Leu Leucin
T	Thymin	M	Met Methionin
U	Uracil	N	Asn Asparagin
V	nicht T	P	Pro Prolin
W	A oder T	Q	Gln Glutamin
Y	C oder T	R	Arg Arginin
*	Stopcodon	S	Ser Serin
		T	Thr Threonin
		V	Val Valin
		W	Trp Tryptophan
		X	beliebig
		Y	Tyr Tyrosin
		Z	Glx Glutamat oder Glutamin
		*	Ende

Literatur

- [1] M. P. Washburn, D. Wolters, and J. R. Yates, 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol*, 19(3):242–7, 2001. 3
- [2] Y. Liu, M. P. Patricelli, and B. F. Cravatt. Activity-based protein profiling: the serine hydrolases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(26):14694–9, 1999. 3
- [3] E. Saxon and C. R. Bertozzi. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science*, 287(5460):2007–10, 2000. 3
- [4] W. G. Lewis, L. G. Green, F. Grynszpan, Z. Radic, P. R. Carlier, P. Taylor, M. G. Finn, and K. B. Sharpless. Click chemistry in situ: acetylcholinesterase as a reaction vessel for the selective assembly of a femtomolar inhibitor from an array of building blocks. *Angew Chem Int Ed Engl*, 41(6):1053–7, 2002. 3
- [5] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, and S. B. Kent. Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science*, 266(5186):776–9, 1994. 3
- [6] L. Wang, A. Brock, B. Herberich, and P. G. Schultz. Expanding the genetic code of *Escherichia coli*. *Science*, 292(5516):498–500, 2001. 4
- [7] Z. A. Knight, B. Gonzalez, M. E. Feldman, E. R. Zunder, D. D. Goldenberg, O. Williams, R. Loewith, D. Stokoe, A. Balla, B. Toth, T. Balla, W. A. Weiss, R. L. Williams, and K. M. Shokat. A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling. *Cell*, 125(4):733–47, 2006. 4
- [8] Z. A. Knight and K. M. Shokat. Chemical genetics: where genetics and pharmacology meet. *Cell*, 128(3):425–30, 2007. 4, 20
- [9] B. R. Stockwell. Chemical genetics: ligand-based discovery of gene function. *Nat Rev Genet*, 1(2):116–25, 2000. 4
- [10] H. E. Blackwell and Y. Zhao. Chemical genetic approaches to plant biology. *Plant Physiol*, 133(2):448–55, 2003. 5

LITERATUR

- [11] L. Gold, B. Polisky, O. Uhlenbeck, and M. Yarus. Diversity of oligonucleotide functions. *Annu Rev Biochem*, 64:763–97, 1995. 4, 6, 8, 85, 91, 133
- [12] C. Tuerk and L. Gold. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249(4968):505–10, 1990. 4
- [13] D. L. Robertson and G. F. Joyce. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature*, 344(6265):467–8, 1990. 4
- [14] A. D. Ellington and J. W. Szostak. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346(6287):818–22, 1990. 4, 6
- [15] G. Mayer, D. Faulhammer, M. Grattinger, S. Fessele, and M. Blind. A RNA-based approach towards small-molecule inhibitors. *ChemBiochem*, 10(12):1993–6, 2009. 6, 9, 41, 42, 57, 85
- [16] R. D. Jenison, S. C. Gill, A. Pardi, and B. Polisky. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science*, 263(5152):1425–9, 1994. 6
- [17] P. Burgstaller, M. Kochoyan, and M. Famulok. Structural probing and damage selection of citrulline- and arginine-specific RNA aptamers identify base positions required for binding. *Nucleic Acids Res*, 23(23):4769–76, 1995. 6
- [18] T. Hermann and D. J. Patel. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science*, 287(5454):820–5, 2000. 6, 96
- [19] J. Liu, Z. Cao, and Y. Lu. Functional nucleic acid sensors. *Chem Rev*, 109(5):1948–98, 2009. 6, 94
- [20] B. J. Lam and G. F. Joyce. Autocatalytic aptazymes enable ligand-dependent exponential amplification of RNA. *Nat Biotechnol*, 27(3):288–92, 2009. 6
- [21] M. Blind, W. Kolanus, and M. Famulok. Cytoplasmic RNA modulators of an inside-out signal-transduction cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(7):3606–10, 1999. 6
- [22] G. Mayer, M. Blind, W. Nagel, T. Bohm, T. Knorr, C. L. Jackson, W. Kolanus, and M. Famulok. Controlling small guanine-nucleotide-exchange factor function through cytoplasmic RNA intramers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(9):4961–5, 2001. 6, 77, 81, 104
- [23] G. Werstuck and M. R. Green. Controlling gene expression in living cells through small molecule-RNA interactions. *Science*, 282(5387):296–8, 1998. 8
- [24] G. Mayer. The chemical biology of aptamers. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48(15):2672–89, 2009. 8, 77
- [25] A. D. Keefe, S. Pai, and A. Ellington. Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 9(7):537–50, 2010. 8

- [26] S. Yamazaki, L. Tan, G. Mayer, J. S. Hartig, J. N. Song, S. Reuter, T. Restle, S. D. Laufer, D. Grohmann, H. G. Krausslich, J. Bajorath, and M. Famulok. Aptamer displacement identifies alternative small-molecule target sites that escape viral resistance. *Chem Biol*, 14(7):804–12, 2007. 8
- [27] J. A. Wells and C. L. McClendon. Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces. *Nature*, 450(7172):1001–9, 2007. 9, 91
- [28] J. S. Hartig, S. H. Najafi-Shoushtari, I. Grune, A. Yan, A. D. Ellington, and M. Famulok. Protein-dependent ribozymes report molecular interactions in real time. *Nat Biotechnol*, 20(7):717–22, 2002. 9, 41
- [29] M. Hafner, A. Schmitz, I. Grune, S. G. Srivatsan, B. Paul, W. Kolanus, T. Quast, E. Kremmer, I. Bauer, and M. Famulok. Inhibition of cytohesins by SecinH3 leads to hepatic insulin resistance. *Nature*, 444(7121):941–4, 2006. 9, 91
- [30] M. Hafner, E. Vianini, B. Albertoni, L. Marchetti, I. Grune, C. Gloeckner, and M. Famulok. Displacement of protein-bound aptamers with small molecules screened by fluorescence polarization. *Nat Protoc*, 3(4):579–87, 2008. 9, 41, 85
- [31] B. Niebel, C. Lentz, M. Pofahl, G. Mayer, A. Hoerauf, K. M. Pfarr, and M. Famulok. AD-LOC: an aptamer-displacement assay based on luminescent oxygen channeling. *Chemistry*, 16(36):11100–7, 2010. 9
- [32] K. Kaibuchi, S. Kuroda, and M. Amano. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem*, 68:459–86, 1999. 9
- [33] Y. Takai, T. Sasaki, and T. Matozaki. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*, 81(1):153–208, 2001. 10
- [34] A. Hall. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 279(5350):509–14, 1998. 10
- [35] M. Amano, K. Chihara, K. Kimura, Y. Fukata, N. Nakamura, Y. Matsuura, and K. Kaibuchi. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science*, 275(5304):1308–11, 1997. 10
- [36] T. Matsui, M. Maeda, Y. Doi, S. Yonemura, M. Amano, K. Kaibuchi, S. Tsukita, and S. Tsukita. Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol*, 140(3):647–57, 1998. 10
- [37] A. J. Ridley. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci*, 114(Pt 15):2713–22, 2001. 10, 11
- [38] M. Chrzanowska-Wodnicka and K. Burridge. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol*, 133(6):1403–15, 1996. 10

LITERATUR

- [39] M. A. Sells, U. G. Knaus, S. Bagrodia, D. M. Ambrose, G. M. Bokoch, and J. Chernoff. Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr Biol*, 7(3):202–10, 1997. 10, 102
- [40] M. F. Carlier, A. Ducruix, and D. Pantaloni. Signalling to actin: the Cdc42-N-WASP-Arp2/3 connection. *Chem Biol*, 6(9):R235–40, 1999. 11
- [41] K. Aktories. Rho proteins: targets for bacterial toxins. *Trends Microbiol*, 5(7):282–8, 1997. 11
- [42] G. Schmidt, P. Sehr, M. Wilm, J. Selzer, M. Mann, and K. Aktories. Gln 63 of Rho is deamidated by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature*, 387(6634):725–9, 1997. 11
- [43] Y. Saito. [Analysis of the cellular functions of the small GTP-binding protein rho p21 with Clostridium botulinum C3 exoenzyme]. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 109(1):13–7, 1997. 11
- [44] I. Just, J. Selzer, M. Wilm, C. von Eichel-Streiber, M. Mann, and K. Aktories. Glucosylation of Rho proteins by Clostridium difficile toxin B. *Nature*, 375(6531):500–3, 1995. 12
- [45] M. L. Yarbrough, Y. Li, L. N. Kinch, N. V. Grishin, H. L. Ball, and K. Orth. AMPylation of Rho GTPases by Vibrio VopS disrupts effector binding and downstream signaling. *Science*, 323(5911):269–72, 2009. 12
- [46] G. Buchwald, A. Friebel, J. E. Galan, W. D. Hardt, A. Wittinghofer, and K. Scheffzek. Structural basis for the reversible activation of a Rho protein by the bacterial toxin SopE. *Embo J*, 21(13):3286–95, 2002. 12
- [47] F. M. Vega and A. J. Ridley. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett*, 582(14):2093–101, 2008. 12
- [48] S. L. Hwang, Y. R. Hong, W. D. Sy, A. S. Lieu, C. L. Lin, K. S. Lee, and S. L. Hwang. Rac1 gene mutations in human brain tumours. *Eur J Surg Oncol*, 30(1):68–72, 2004. 12
- [49] P. Jordan, R. Brazao, M. G. Boavida, C. Gespach, and E. Chastre. Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors. *Oncogene*, 18(48):6835–9, 1999. 12
- [50] E. Sahai and C. J. Marshall. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2(2):133–42, 2002. 12
- [51] E. E. Sander, S. van Delft, J. P. ten Klooster, T. Reid, R. A. van der Kammen, F. Michiels, and J. G. Collard. Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *J Cell Biol*, 143(5):1385–98, 1998. 12, 13

-
- [52] N. Tapon, K. Nagata, N. Lamarche, and A. Hall. A new rac target POSH is an SH3-containing scaffold protein involved in the JNK and NF-kappaB signalling pathways. *Embo J*, 17(5):1395–404, 1998. 12
- [53] Y. Gao, J. B. Dickerson, F. Guo, J. Zheng, and Y. Zheng. Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(20):7618–23, 2004. 12, 97
- [54] A. Shutes, C. Onesto, V. Picard, B. Leblond, F. Schweighoffer, and C. J. Der. Specificity and mechanism of action of EHT 1864, a novel small molecule inhibitor of Rac family small GTPases. *J Biol Chem*, 282(49):35666–78, 2007. 13
- [55] G. G. Habets, E. H. Scholtes, D. Zuydgeest, R. A. van der Kammen, J. C. Stam, A. Berns, and J. G. Collard. Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins. *Cell*, 77(4):537–49, 1994. 13, 25
- [56] F. Michiels, G. G. Habets, J. C. Stam, R. A. van der Kammen, and J. G. Collard. A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion. *Nature*, 375(6529):338–40, 1995. 13
- [57] P. L. Hordijk, J. P. ten Klooster, R. A. van der Kammen, F. Michiels, L. C. Oomen, and J. G. Collard. Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling. *Science*, 278(5342):1464–6, 1997. 13, 16
- [58] J. M. Lambert, Q. T. Lambert, G. W. Reuther, A. Malliri, D. P. Siderovski, J. Sondek, J. G. Collard, and C. J. Der. Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism. *Nat Cell Biol*, 4(8):621–5, 2002. 13, 16
- [59] S. Katzav, J. L. Cleveland, H. E. Heslop, and D. Pulido. Loss of the amino-terminal helix-loop-helix domain of the vav proto-oncogene activates its transforming potential. *Mol Cell Biol*, 11(4):1912–20, 1991. 13, 97
- [60] C. Vanni, P. Mancini, Y. Gao, C. Ottaviano, F. Guo, B. Salani, M. R. Torrasi, Y. Zheng, and A. Eva. Regulation of proto-Dbl by intracellular membrane targeting and protein stability. *J Biol Chem*, 277(22):19745–53, 2002. 13
- [61] S. Rogers, R. Wells, and M. Rechsteiner. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*, 234(4774):364–8, 1986. 13
- [62] M. A. Baumeister, L. Martinu, K. L. Rossman, J. Sondek, M. A. Lemmon, and M. M. Chou. Loss of phosphatidylinositol 3-phosphate binding by the C-terminal Tiam-1 pleckstrin homology domain prevents in vivo Rac1 activation without affecting membrane targeting. *J Biol Chem*, 278(13):11457–64, 2003. 13, 78

LITERATUR

- [63] R. Engers, T. P. Zwaka, L. Gohr, A. Weber, C. D. Gerharz, and H. E. Gabbert. Tiam1 mutations in human renal-cell carcinomas. *Int J Cancer*, 88(3):369–76, 2000. 13
- [64] I. N. Fleming, C. M. Elliott, F. G. Buchanan, C. P. Downes, and J. H. Exton. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates Tiam1 by reversible protein phosphorylation. *J Biol Chem*, 274(18):12753–8, 1999. 13
- [65] R. H. Insall and O. D. Weiner. PIP₃, PIP₂, and cell movement—similar messages, different meanings? *Dev Cell*, 1(6):743–7, 2001. 13
- [66] M. A. Lemmon, K. M. Ferguson, and C. S. Abrams. Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton. *FEBS Lett*, 513(1):71–6, 2002. 13
- [67] I. N. Fleming, A. Gray, and C. P. Downes. Regulation of the Rac1-specific exchange factor Tiam1 involves both phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent components. *Biochem J*, 351(Pt 1):173–82, 2000. 13
- [68] L. Y. Bourguignon, H. Zhu, L. Shao, and Y. W. Chen. Ankyrin-Tiam1 interaction promotes Rac1 signaling and metastatic breast tumor cell invasion and migration. *J Cell Biol*, 150(1):177–91, 2000. 14
- [69] L. Y. Bourguignon, H. Zhu, L. Shao, and Y. W. Chen. CD44 interaction with tiam1 promotes Rac1 signaling and hyaluronic acid-mediated breast tumor cell migration. *J Biol Chem*, 275(3):1829–38, 2000. 14
- [70] F. N. Van Leeuwen, C. Olivo, S. Grivell, B. N. Giepmans, J. G. Collard, and W. H. Moolenaar. Rac activation by lysophosphatidic acid LPA1 receptors through the guanine nucleotide exchange factor Tiam1. *J Biol Chem*, 278(1):400–6, 2003. 15
- [71] R. J. Buchsbaum, B. A. Connolly, and L. A. Feig. Interaction of Rac exchange factors Tiam1 and Ras-GRF1 with a scaffold for the p38 mitogen-activated protein kinase cascade. *Mol Cell Biol*, 22(12):4073–85, 2002. 14
- [72] B. A. Connolly, J. Rice, L. A. Feig, and R. J. Buchsbaum. Tiam1-IRSp53 complex formation directs specificity of rac-mediated actin cytoskeleton regulation. *Mol Cell Biol*, 25(11):4602–14, 2005. 14
- [73] T. Nishimura, T. Yamaguchi, K. Kato, M. Yoshizawa, Y. Nabeshima, S. Ohno, M. Hoshino, and K. Kaibuchi. PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nat Cell Biol*, 7(3):270–7, 2005. 14
- [74] A. E. Mertens, T. P. Rygiel, C. Olivo, R. van der Kammen, and J. G. Collard. The Rac activator Tiam1 controls tight junction biogenesis in keratinocytes through binding to and activation of the Par polarity complex. *J Cell Biol*, 170(7):1029–37, 2005. 14

- [75] J. P. Ten Klooster, E. E. Evers, L. Janssen, L. M. Machesky, F. Michiels, P. Hordijk, and J. G. Collard. Interaction between Tiam1 and the Arp2/3 complex links activation of Rac to actin polymerization. *Biochem J*, 397(1):39–45, 2006. 16
- [76] G. C. Zondag, E. E. Evers, J. P. ten Klooster, L. Janssen, R. A. van der Kammen, and J. G. Collard. Oncogenic Ras downregulates Rac activity, which leads to increased Rho activity and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*, 149(4):775–82, 2000. 16
- [77] P. Rodriguez-Viciana, P. H. Warne, A. Khwaja, B. M. Marte, D. Pappin, P. Das, M. D. Waterfield, A. Ridley, and J. Downward. Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell*, 89(3):457–67, 1997. 16
- [78] A. Malliri, R. A. van der Kammen, K. Clark, M. van der Valk, F. Michiels, and J. G. Collard. Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours. *Nature*, 417(6891):867–71, 2002. 16, 103
- [79] A. Stebel, C. Brachetti, M. Kunkel, M. Schmidt, and G. Fritz. Progression of breast tumors is accompanied by a decrease in expression of the Rho guanine exchange factor Tiam1. *Oncol Rep*, 21(1):217–22, 2009. 16
- [80] A. Walch, S. Seidl, C. Hermannstadter, S. Rauser, J. Deplazes, R. Langer, C. H. von Weyhern, M. Sarbia, R. Busch, M. Feith, S. Gillen, H. Hofler, and B. Lubber. Combined analysis of Rac1, IQGAP1, Tiam1 and E-cadherin expression in gastric cancer. *Mod Pathol*, 21(5):544–52, 2008. 16
- [81] R. Engers, M. Mueller, A. Walter, J. G. Collard, R. Willers, and H. E. Gabbert. Prognostic relevance of Tiam1 protein expression in prostate carcinomas. *Br J Cancer*, 95(8):1081–6, 2006. 16
- [82] S. Katzav, D. Martin-Zanca, and M. Barbacid. Vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells. *Embo J*, 8(8):2283–90, 1989. 16
- [83] P. Crespo, K. E. Schuebel, A. A. Ostrom, J. S. Gutkind, and X. R. Bustelo. Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature*, 385(6612):169–72, 1997. 17
- [84] K. L. Rossman, C. J. Der, and J. Sondek. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(2):167–80, 2005. 17
- [85] J. Rapley, V. L. Tybulewicz, and K. Rittinger. Crucial structural role for the PH and C1 domains of the Vav1 exchange factor. *EMBO Rep*, 9(7):655–61, 2008. 17, 64, 93, 96
- [86] B. Yu, I. R. Martins, P. Li, G. K. Amarasinghe, J. Umetani, M. E. Fernandez-Zapico, D. D. Billadeau, M. Machius, D. R. Tomchick, and M. K. Rosen. Structural and energetic

LITERATUR

- mechanisms of cooperative autoinhibition and activation of Vav1. *Cell*, 140(2):246–56, 2010. 17, 57, 69, 97, 98, 101, 112
- [87] T. Pawson and J. Schlessingert. SH2 and SH3 domains. *Curr Biol*, 3(7):434–42, 1993. 17
- [88] V. L. Tybulewicz. Vav-family proteins in T-cell signalling. *Curr Opin Immunol*, 17(3):267–74, 2005. 18
- [89] A. Rao, C. Luo, and P. G. Hogan. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol*, 15:707–47, 1997. 18
- [90] L. J. Holsinger, I. A. Graef, W. Swat, T. Chi, D. M. Bautista, L. Davidson, R. S. Lewis, F. W. Alt, and G. R. Crabtree. Defects in actin-cap formation in Vav-deficient mice implicate an actin requirement for lymphocyte signal transduction. *Curr Biol*, 8(10):563–72, 1998. 18
- [91] A. Grakoui, S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen, and M. L. Dustin. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*, 285(5425):221–7, 1999. 18
- [92] L. Kjoller and A. Hall. Signaling to Rho GTPases. *Exp Cell Res*, 253(1):166–79, 1999. 18
- [93] A. J. Thrasher. WASp in immune-system organization and function. *Nat Rev Immunol*, 2(9):635–46, 2002. 18
- [94] S. Katzav. Vav1: an oncogene that regulates specific transcriptional activation of T cells. *Blood*, 103(7):2443–51, 2004. 19, 57
- [95] J. Wu, S. Katzav, and A. Weiss. A functional T-cell receptor signaling pathway is required for p95vav activity. *Mol Cell Biol*, 15(8):4337–46, 1995. 18
- [96] J. L. Zugaza, M. A. Lopez-Lago, M. J. Caloca, M. Dosil, N. Movilla, and X. R. Bustelo. Structural determinants for the biological activity of Vav proteins. *J Biol Chem*, 277(47):45377–92, 2002. 18
- [97] X. Li, D. Sandoval, L. Freeberg, and R. H. Carter. Role of CD19 tyrosine 391 in synergistic activation of B lymphocytes by coligation of CD19 and membrane Ig. *J Immunol*, 158(12):5649–57, 1997. 18
- [98] L. M. O'Rourke, R. Tooze, M. Turner, D. M. Sandoval, R. H. Carter, V. L. Tybulewicz, and D. T. Fearon. CD19 as a membrane-anchored adaptor protein of B lymphocytes: costimulation of lipid and protein kinases by recruitment of Vav. *Immunity*, 8(5):635–45, 1998. 18
- [99] H. H. Kim, M. Tharayil, and C. E. Rudd. Growth factor receptor-bound protein 2 SH2/SH3 domain binding to CD28 and its role in co-signaling. *J Biol Chem*, 273(1):296–301, 1998. 18

-
- [100] T. S. Finco, T. Kadlecsek, W. Zhang, L. E. Samelson, and A. Weiss. LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity*, 9(5):617–26, 1998. 20
- [101] G. A. Koretzky, F. Abtahian, and M. A. Silverman. SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat Rev Immunol*, 6(1):67–78, 2006. 20
- [102] X. R. Bustelo, K. L. Suen, K. Leftheris, C. A. Meyers, and M. Barbacid. Vav cooperates with Ras to transform rodent fibroblasts but is not a Ras GDP/GTP exchange factor. *Oncogene*, 9(8):2405–13, 1994. 20
- [103] S. Katzav, G. Packham, M. Sutherland, P. Aroca, E. Santos, and J. L. Cleveland. Vav and Ras induce fibroblast transformation by overlapping signaling pathways which require c-Myc function. *Oncogene*, 11(6):1079–88, 1995. 20
- [104] M. Groysman, I. Hornstein, A. Alcover, and S. Katzav. Vav1 and Ly-GDI two regulators of Rho GTPases, function cooperatively as signal transducers in T cell antigen receptor-induced pathways. *J Biol Chem*, 277(51):50121–30, 2002. 20
- [105] T. R. Palmby, K. Abe, A. E. Karnoub, and C. J. Der. Vav transformation requires activation of multiple GTPases and regulation of gene expression. *Mol Cancer Res*, 2(12):702–11, 2004. 20
- [106] R. A. Bartolome, I. Molina-Ortiz, R. Samaniego, P. Sanchez-Mateos, X. R. Bustelo, and J. Teixido. Activation of Vav/Rho GTPase signaling by CXCL12 controls membrane-type matrix metalloproteinase-dependent melanoma cell invasion. *Cancer Res*, 66(1):248–58, 2006. 20
- [107] M. E. Fernandez-Zapico, N. C. Gonzalez-Paz, E. Weiss, D. N. Savoy, J. R. Molina, R. Fonseca, T. C. Smyrk, S. T. Chari, R. Urrutia, and D. D. Billadeau. Ectopic expression of VAV1 reveals an unexpected role in pancreatic cancer tumorigenesis. *Cancer Cell*, 7(1):39–49, 2005. 20
- [108] I. Hornstein, E. Pikarsky, M. Groysman, G. Amir, N. Peylan-Ramu, and S. Katzav. The haematopoietic specific signal transducer Vav1 is expressed in a subset of human neuroblastomas. *J Pathol*, 199(4):526–33, 2003. 20
- [109] D. Poppe, I. Tiede, G. Fritz, C. Becker, B. Bartsch, S. Wirtz, D. Strand, S. Tanaka, P. R. Galle, X. R. Bustelo, and M. F. Neurath. Azathioprine suppresses ezrin-radixin-moesin-dependent T cell-APC conjugation through inhibition of Vav guanosine exchange activity on Rac proteins. *J Immunol*, 176(1):640–51, 2006. 20, 97
- [110] R. Atreya, I. Atreya, and M. F. Neurath. Novel signal transduction pathways: analysis of STAT-3 and Rac-1 signaling in inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci*, 1072:98–113, 2006. 20

LITERATUR

- [111] A. Saveliev, L. Vanes, O. Ksionda, J. Rapley, S. J. Smerdon, K. Rittinger, and V. L. Tybulewicz. Function of the nucleotide exchange activity of vav1 in T cell development and activation. *Sci Signal*, 2(101):ra83, 2009. 20
- [112] M. Lopez-Lago, H. Lee, C. Cruz, N. Movilla, and X. R. Bustelo. Tyrosine phosphorylation mediates both activation and downmodulation of the biological activity of Vav. *Mol Cell Biol*, 20(5):1678–91, 2000. 20
- [113] C. C. Stebbins, C. Watzl, D. D. Billadeau, P. J. Leibson, D. N. Burshtyn, and E. O. Long. Vav1 dephosphorylation by the tyrosine phosphatase SHP-1 as a mechanism for inhibition of cellular cytotoxicity. *Mol Cell Biol*, 23(17):6291–9, 2003. 20
- [114] D. K. Worthylake, K. L. Rossman, and J. Sondek. Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1. *Nature*, 408(6813):682–8, 2000. 23, 80, 84, 90, 92, 97, 112
- [115] L. C. Haeusler, L. Hemsath, D. Fiegen, L. Blumenstein, U. Herbrand, P. Stege, R. Dvorsky, and M. R. Ahmadian. Purification and biochemical properties of Rac1, 2, 3 and the splice variant Rac1b. *Methods Enzymol*, 406:1–11, 2006. 25, 37, 64, 81, 83
- [116] T. L. Bailey and C. Elkan. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, 2:28–36, 1994. 30, 60, 61, 78
- [117] M. Zuker. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, 31(13):3406–15, 2003. 32, 64, 96, 122
- [118] M. C. Cowperthwaite and A. D. Ellington. Bioinformatic analysis of the contribution of primer sequences to aptamer structures. *J Mol Evol*, 67(1):95–102, 2008. 32
- [119] J. John, R. Sohmen, J. Feuerstein, R. Linke, A. Wittinghofer, and R. S. Goody. Kinetics of interaction of nucleotides with nucleotide-free H-ras p21. *Biochemistry*, 29(25):6058–65, 1990. 37, 81
- [120] S. E. Neal, J. F. Eccleston, and M. R. Webb. Hydrolysis of GTP by p21NRAS, the NRAS protooncogene product, is accompanied by a conformational change in the wild-type protein: use of a single fluorescent probe at the catalytic site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(9):3562–5, 1990. 37
- [121] J. Houseley and D. Tollervey. The many pathways of RNA degradation. *Cell*, 136(4):763–76, 2009. 41
- [122] E. F. Ullman, H. Kirakossian, S. Singh, Z. P. Wu, B. R. Irvin, J. S. Pease, A. C. Switchenko, J. D. Irvine, A. Dafforn, C. N. Skold, and et al. Luminescent oxygen channeling immunoassay: measurement of particle binding kinetics by chemiluminescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(12):5426–30, 1994. 42, 86, 145

-
- [123] J. B. Baell and G. A. Holloway. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J Med Chem*, 53(7):2719–40, 2010. 43, 47, 51, 86, 88, 146
- [124] W. U. Malik and O. P. Jhamb. Critical micelle concentration of some polyoxyethylated non-ionic surfactants and the effect of additives. *Colloid amp; Polymer Science*, 242(1):1209–1211, 1970. 43
- [125] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, and P. J. Feeney. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 46(1-3):3–26, 2001. 46
- [126] D. P. McEwen, K. R. Gee, H. C. Kang, and R. R. Neubig. Fluorescent BODIPY-GTP analogs: real-time measurement of nucleotide binding to G proteins. *Anal Biochem*, 291(1):109–17, 2001. 50, 151
- [127] J. Korlach, D. W. Baird, A. A. Heikal, K. R. Gee, G. R. Hoffman, and W. W. Webb. Spontaneous nucleotide exchange in low molecular weight GTPases by fluorescently labeled gamma-phosphate-linked GTP analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(9):2800–5, 2004. 50, 81
- [128] Barbara Albertoni. Synthesis and analysis of inhibitors of the binding of siRNA to the PAZ domain. *Diploma Thesis*, 2007. 54, 89, 90
- [129] M. Turner and D. D. Billadeau. VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nat Rev Immunol*, 2(7):476–86, 2002. 57
- [130] I. Hornstein, A. Alcover, and S. Katzav. Vav proteins, masters of the world of cytoskeleton organization. *Cell Signal*, 16(1):1–11, 2004. 57, 91
- [131] B. Aghazadeh, W. E. Lowry, X. Y. Huang, and M. K. Rosen. Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation. *Cell*, 102(5):625–33, 2000. 57, 93, 94, 97, 100
- [132] T. G. Schmidt, J. Koepke, R. Frank, and A. Skerra. Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J Mol Biol*, 255(5):753–66, 1996. 58, 131
- [133] A. Brooun, S. A. Foster, J. E. Chrencik, E. Y. Chien, A. R. Kolatkar, M. Streiff, P. Ramage, H. Widmer, G. Weckbecker, and P. Kuhn. Remedial strategies in structural proteomics: expression, purification, and crystallization of the Vav1/Rac1 complex. *Protein Expr Purif*, 53(1):51–62, 2007. 58, 64, 97
- [134] K. Abe, I. P. Whitehead, J. P. O’Byryan, and C. J. Der. Involvement of NH(2)-terminal sequences in the negative regulation of Vav signaling and transforming activity. *J Biol Chem*, 274(43):30410–8, 1999. 66, 97

LITERATUR

- [135] G. K. Amarasinghe and M. K. Rosen. Acidic region tyrosines provide access points for allosteric activation of the autoinhibited Vav1 Dbl homology domain. *Biochemistry*, 44(46):15257–68, 2005. 66
- [136] N. A. Flint, K. E. Amrein, T. Jascur, and P. Burn. Purification and characterization of an activated form of the protein tyrosine kinase Lck from an Escherichia coli expression system. *J Cell Biochem*, 55(3):389–97, 1994. 67
- [137] M. Abdel-Ghany, K. el Gendy, S. Zhang, and E. Racker. Control of src kinase activity by activators, inhibitors, and substrate chaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(18):7061–5, 1990. 69
- [138] G. Lazer, Y. Idelchuk, V. Schapira, E. Pikarsky, and S. Katzav. The haematopoietic specific signal transducer Vav1 is aberrantly expressed in lung cancer and plays a role in tumourigenesis. *J Pathol*, 219(1):25–34, 2009. 71, 104
- [139] M. Malumbres and M. Barbacid. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*, 3(6):459–65, 2003. 72
- [140] U. G. Knaus, A. Bamberg, and G. M. Bokoch. Rac and Rap GTPase activation assays. *Methods Mol Biol*, 412:59–67, 2007. 72, 145
- [141] G. Thompson, D. Owen, P. A. Chalk, and P. N. Lowe. Delineation of the Cdc42/Rac-binding domain of p21-activated kinase. *Biochemistry*, 37(21):7885–91, 1998. 72
- [142] P. H. Warne, P. R. Viciano, and J. Downward. Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature*, 364(6435):352–5, 1993. 72
- [143] M. G. Theis, A. Knorre, B. Kellersch, J. Moelleken, F. Wieland, W. Kolanus, and M. Famulok. Discriminatory aptamer reveals serum response element transcription regulated by cytohesin-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(31):11221–6, 2004. 77, 104
- [144] S. Schmidt, S. Diriong, J. Mery, E. Fabbrizio, and A. Debant. Identification of the first Rho-GEF inhibitor, TRIPalpha, which targets the RhoA-specific GEF domain of Trio. *FEBS Lett*, 523(1-3):35–42, 2002. 77
- [145] N. Bouquier, S. Fromont, J. C. Zeeh, C. Auziol, P. Larrousse, B. Robert, M. Zeghouf, J. Cherfils, A. Debant, and S. Schmidt. Aptamer-derived peptides as potent inhibitors of the oncogenic RhoGEF Tgat. *Chem Biol*, 16(4):391–400, 2009. 77
- [146] Y. Tanaka, K. Akagi, Y. Nakamura, and T. Kozu. RNA aptamers targeting the carboxyl terminus of KRAS oncoprotein generated by an improved SELEX with isothermal RNA amplification. *Oligonucleotides*, 17(1):12–21, 2007. 77
- [147] S. Jeong, S. R. Han, Y. J. Lee, J. H. Kim, and S. W. Lee. Identification of RNA aptamer specific to mutant KRAS protein. *Oligonucleotides*, 20(3):155–61, 2010. 77

- [148] S. E. Kurtz, K. Esposito, W. Tang, and R. Menzel. Inhibition of an activated Ras protein with genetically selected peptide aptamers. *Biotechnol Bioeng*, 82(1):38–46, 2003. 77
- [149] D. A. Daniels, A. K. Sohal, S. Rees, and R. Grisshammer. Generation of RNA aptamers to the G-protein-coupled receptor for neurotensin, NTS-1. *Anal Biochem*, 305(2):214–26, 2002. 77
- [150] A. M. Crompton, L. H. Foley, A. Wood, W. Roscoe, D. Stokoe, F. McCormick, M. Symons, and G. Bollag. Regulation of Tiam1 nucleotide exchange activity by pleckstrin domain binding ligands. *J Biol Chem*, 275(33):25751–9, 2000. 78
- [151] J. C. Cox, A. Hayhurst, J. Hesselberth, T. S. Bayer, G. Georgiou, and A. D. Ellington. Automated selection of aptamers against protein targets translated in vitro: from gene to aptamer. *Nucleic Acids Res*, 30(20):e108, 2002. 78
- [152] A. Tirat, F. Freuler, T. Stettler, L. M. Mayr, and L. Leder. Evaluation of two novel tag-based labelling technologies for site-specific modification of proteins. *Int J Biol Macromol*, 39(1-3):66–76, 2006. 78
- [153] L. J. Sooter, T. Riedel, E. A. Davidson, M. Levy, J. C. Cox, and A. D. Ellington. Toward automated nucleic acid enzyme selection. *Biol Chem*, 382(9):1327–34, 2001. 78
- [154] B. Vant-Hull, L. Gold, and D. A. Zichi. Theoretical principles of in vitro selection using combinatorial nucleic acid libraries. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*, Chapter 9:Unit 9 1, 2000. 78, 134
- [155] R. C. Conrad, L. Giver, Y. Tian, and A. D. Ellington. In vitro selection of nucleic acid aptamers that bind proteins. *Methods Enzymol*, 267:336–67, 1996. 78
- [156] S. Soundararajan, W. Chen, E. K. Spicer, N. Courtenay-Luck, and D. J. Fernandes. The nucleolin targeting aptamer AS1411 destabilizes Bcl-2 messenger RNA in human breast cancer cells. *Cancer Res*, 68(7):2358–65, 2008. 79
- [157] T. K. Sengupta, S. Bandyopadhyay, D. J. Fernandes, and E. K. Spicer. Identification of nucleolin as an AU-rich element binding protein involved in bcl-2 mRNA stabilization. *J Biol Chem*, 279(12):10855–63, 2004. 79
- [158] J. S. Reader and G. F. Joyce. A ribozyme composed of only two different nucleotides. *Nature*, 420(6917):841–4, 2002. 79
- [159] J. Rogers and G. F. Joyce. A ribozyme that lacks cytidine. *Nature*, 402(6759):323–5, 1999. 79
- [160] S. Thore, M. Leibundgut, and N. Ban. Structure of the eukaryotic thiamine pyrophosphate riboswitch with its regulatory ligand. *Science*, 312(5777):1208–11, 2006. 80

LITERATUR

- [161] M. Martick and W. G. Scott. Tertiary contacts distant from the active site prime a ribozyme for catalysis. *Cell*, 126(2):309–20, 2006. 80
- [162] C. Lenzen, R. H. Cool, H. Prinz, J. Kuhlmann, and A. Wittinghofer. Kinetic analysis by fluorescence of the interaction between Ras and the catalytic domain of the guanine nucleotide exchange factor Cdc25Mm. *Biochemistry*, 37(20):7420–30, 1998. 80
- [163] R. S. Goody and W. Hofmann-Goody. Exchange factors, effectors, GAPs and motor proteins: common thermodynamic and kinetic principles for different functions. *Eur Biophys J*, 31(4):268–74, 2002. 80
- [164] M. Costa and F. Michel. Rules for RNA recognition of GNRA tetraloops deduced by in vitro selection: comparison with in vivo evolution. *Embo J*, 16(11):3289–302, 1997. 81
- [165] C. Ehresmann, F. Baudin, M. Mougél, P. Romby, J. P. Ebel, and B. Ehresmann. Probing the structure of RNAs in solution. *Nucleic Acids Res*, 15(22):9109–28, 1987. 81, 96
- [166] L. Lo Conte, C. Chothia, and J. Janin. The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J Mol Biol*, 285(5):2177–98, 1999. 84
- [167] T. Pawson and P. Nash. Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev*, 14(9):1027–47, 2000. 84
- [168] P. Burgstaller, A. Jenne, and M. Blind. Aptamers and aptazymes: accelerating small molecule drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 5(5):690–700, 2002. 85
- [169] G. Gokulrangan, J. R. Unruh, D. F. Holub, B. Ingram, C. K. Johnson, and G. S. Wilson. DNA aptamer-based bioanalysis of IgE by fluorescence anisotropy. *Anal Chem*, 77(7):1963–70, 2005. 86
- [170] H. Elmgren. The fluorescence lifetime of free and conjugated fluorescein in various environments. *Journal of Polymer Science*, 18:815–822, 1980. 86
- [171] D. J. Wilbur, R. S. Norton, A. O. Clouse, R. Addleman, and A. Allerhand. Determination of rotational correlation times of proteins in solution from carbon-13 spin-lattice relaxation measurements. Effect of magnetic field strength and anisotropic rotation. *J Am Chem Soc*, 98(25):8250–4, 1976. 86
- [172] J. C. Owicki. Fluorescence polarization and anisotropy in high throughput screening: perspectives and primer. *J Biomol Screen*, 5(5):297–306, 2000. 86
- [173] X. Q. Guo, F. N. Castellano, L. Li, and J. R. Lakowicz. Use of a long-lifetime Re(I) complex in fluorescence polarization immunoassays of high-molecular-weight analytes. *Anal Chem*, 70(3):632–7, 1998. 86

- [174] J. H. Zhang, T. D. Chung, and K. R. Oldenburg. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen*, 4(2):67–73, 1999. 87
- [175] B. Mulloy, M. J. Forster, C. Jones, and D. B. Davies. N.m.r. and molecular-modelling studies of the solution conformation of heparin. *Biochem J*, 293 (Pt 3):849–58, 1993. 87
- [176] B. Y. Feng, A. Shelat, T. N. Doman, R. K. Guy, and B. K. Shoichet. High-throughput assays for promiscuous inhibitors. *Nat Chem Biol*, 1(3):146–8, 2005. 88
- [177] B. A. Posner, H. Xi, and J. E. Mills. Enhanced HTS hit selection via a local hit rate analysis. *J Chem Inf Model*, 49(10):2202–10, 2009. 88
- [178] D. Moazed and H. F. Noller. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature*, 327(6121):389–94, 1987. 90
- [179] P. N. Asare-Okai and C. S. Chow. A modified fluorescent intercalator displacement assay for RNA ligand discovery. *Anal Biochem*, 408(2):269–76, 2011. 90
- [180] J. R. Thomas and P. J. Hergenrother. Targeting RNA with small molecules. *Chem Rev*, 108(4):1171–224, 2008. 90
- [181] J. Zhang, S. Umemoto, and K. Nakatani. Fluorescent indicator displacement assay for ligand-RNA interactions. *J Am Chem Soc*, 132(11):3660–1, 2010. 90
- [182] J. B. Ma, K. Ye, and D. J. Patel. Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature*, 429(6989):318–22, 2004. 91, 92
- [183] N. Bouquier, E. Vignal, S. Charrasse, M. Weill, S. Schmidt, J. P. Leonetti, A. Blangy, and P. Fort. A cell active chemical GEF inhibitor selectively targets the Trio/RhoG/Rac1 signaling pathway. *Chem Biol*, 16(6):657–66, 2009. 91
- [184] Aymelt Itzen. Strukturelle und biochemische Einblicke in Mechanismen des Nukleotidaustauschs von Rab-Proteinen . *Dissertation*, 2007. 91
- [185] P. Li, I. R. Martins, G. K. Amarasinghe, and M. K. Rosen. Internal dynamics control activation and activity of the autoinhibited Vav DH domain. *Nat Struct Mol Biol*, 15(6):613–8, 2008. 93, 96, 97, 99, 100
- [186] N. Zwicker, K. Adelhelm, R. Thiericke, S. Grabley, and F. Hanel. Strep-tag II for one-step affinity purification of active bHLHzip domain of human c-Myc. *Biotechniques*, 27(2):368–75, 1999. 93, 131
- [187] S. Bandyopadhyay and R. M. Gronostajski. Identification of a conserved oxidation-sensitive cysteine residue in the NFI family of DNA-binding proteins. *J Biol Chem*, 269(47):29949–55, 1994. 93

LITERATUR

- [188] T. C. Weiss, G. G. Zhai, S. S. Bhatia, and P. J. Romaniuk. An RNA aptamer with high affinity and broad specificity for zinc finger proteins. *Biochemistry*, 49(12):2732–40, 2010. 93
- [189] R. Li and Y. Zheng. Residues of the Rho family GTPases Rho and Cdc42 that specify sensitivity to Dbp-like guanine nucleotide exchange factors. *J Biol Chem*, 272(8):4671–9, 1997. 97
- [190] K. Henzler-Wildman and D. Kern. Dynamic personalities of proteins. *Nature*, 450(7172):964–72, 2007. 99
- [191] T. Vang, K. Tasken, B. S. Skalhegg, V. Hansson, and F. O. Levy. Kinetic properties of the C-terminal Src kinase, p50csk. *Biochim Biophys Acta*, 1384(2):285–93, 1998. 99
- [192] D. E. Draper. A guide to ions and RNA structure. *RNA*, 10(3):335–43, 2004. 99
- [193] R. Micura and C. Hobartner. On secondary structure rearrangements and equilibria of small RNAs. *Chembiochem*, 4(10):984–90, 2003. 99
- [194] T. Iwazaki, X. Li, and K. Harada. Evolvability of the mode of peptide binding by an RNA. *Rna*, 11(9):1364–73, 2005. 100
- [195] F. Qin, Y. Chen, M. Wu, Y. Li, J. Zhang, and H. F. Chen. Induced fit or conformational selection for RNA/U1A folding. *Rna*, 16(5):1053–61, 2010. 100
- [196] N. Leulliot and G. Varani. Current topics in RNA-protein recognition: control of specificity and biological function through induced fit and conformational capture. *Biochemistry*, 40(27):7947–56, 2001. 100
- [197] C. M. Dollins, S. Nair, D. Boczkowski, J. Lee, J. M. Layzer, E. Gilboa, and B. A. Sullenger. Assembling OX40 aptamers on a molecular scaffold to create a receptor-activating aptamer. *Chem Biol*, 15(7):675–82, 2008. 100
- [198] S. Wang, J. R. Shepard, and H. Shi. An RNA-based transcription activator derived from an inhibitory aptamer. *Nucleic Acids Res*, 38(7):2378–86, 2010. 100
- [199] W. T. Miller. Determinants of substrate recognition in nonreceptor tyrosine kinases. *Acc Chem Res*, 36(6):393–400, 2003. 100
- [200] B. Niebel, B. Weiche, A. L. Mueller, D. Y. Li, N. Karnowski, and M. Famulok. A luminescent oxygen channeling biosensor that measures small GTPase activation. *Chem Commun (Camb)*, 2011. 102
- [201] F. Michiels, J. C. Stam, P. L. Hordijk, R. A. van der Kammen, L. Ruuls-Van Stalle, C. A. Feltkamp, and J. G. Collard. Regulated membrane localization of Tiam1, mediated by

- the NH₂-terminal pleckstrin homology domain, is required for Rac-dependent membrane ruffling and C-Jun NH₂-terminal kinase activation. *J Cell Biol*, 137(2):387–98, 1997. 103
- [202] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–5, 1970. 113
- [203] W. W. Wilfinger, K. Mackey, and P. Chomczynski. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*, 22(3):474–6, 478–81, 1997. 119
- [204] M. Yarus and P. Berg. On the properties and utility of a membrane filter assay in the study of isoleucyl-tRNA synthetase. *Anal Biochem*, 35(2):450–65, 1970. 122
- [205] G. Sengle, A. Jenne, P. S. Arora, B. Seelig, J. S. Nowick, A. Jaschke, and M. Famulok. Synthesis, incorporation efficiency, and stability of disulfide bridged functional groups at RNA 5'-ends. *Bioorg Med Chem*, 8(6):1317–29, 2000. 125
- [206] J. Tucker, G. Sczakiel, J. Feuerstein, J. John, R. S. Goody, and A. Wittinghofer. Expression of p21 proteins in *Escherichia coli* and stereochemistry of the nucleotide-binding site. *Embo J*, 5(6):1351–8, 1986. 133
- [207] R. R. Breaker. In Vitro Selection of Catalytic Polynucleotides. *Chem Rev*, 97(2):371–390, 1997. 133
- [208] J. Ciesiolka, M. Illangasekare, I. Majerfeld, T. Nickles, M. Welch, M. Yarus, and S. Zinnen. Affinity selection-amplification from randomized ribooligonucleotide pools. *Methods Enzymol*, 267:315–35, 1996. 133
- [209] D. Schneider, L. Gold, and T. Platt. Selective enrichment of RNA species for tight binding to *Escherichia coli* rho factor. *Faseb J*, 7(1):201–7, 1993. 134
- [210] D. Irvine, C. Tuerk, and L. Gold. SELEXION. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment with integrated optimization by non-linear analysis. *J Mol Biol*, 222(3):739–61, 1991. 134
- [211] J. H. Zhang, T. D. Chung, and K. R. Oldenburg. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen*, 4(2):67–73, 1999. 140
- [212] R. N. Armstrong. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol*, 10(1):2–18, 1997. 145