

Peptid-Aptamere als spezifische Inhibitoren der ErbB2-Rezeptortyrosinkinase

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt im

Fachbereich 14
Biochemie, Chemie und Pharmazie

der

Johann-Wolfgang-Goethe Universität
Frankfurt am Main

von

Christian Kunz

aus

Mutterstadt

Frankfurt am Main
Oktober 2005

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei *Prof. Dr. Bernd Groner* für die Möglichkeit bedanken, die vorliegende Doktorarbeit in seiner Gruppe durchführen zu dürfen. Ferner danke ich Herrn Groner für Ratschläge und Unterstützung, die er mir in diesem Projekt zu Teil werden lies.

Mein Dank gilt auch *PD Dr. Winfried Wels*, als mein Betreuer des Georg-Speyer-Hauses und *Prof. Dr. Bernd Ludwig*, der mich seitens der Johann-Wolfgang-Goethe Universität betreute und im Laufe des gesamten Studiums stets ein offenes Ohr für die Probleme der Studenten hatte.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und In diesem Zusammenhang speziell *Andrea Belaus, Nadine Böcher, Boris Brill, Claudia Bürger, Natalia Delis, Sylvane Desrivieres, Maresa Eck, Christina Gewinner, Marcin Jankiewicz, Sabrina Kraemer, Kerstin Nagel-Wolfrum, Nahomi Palomino-Castro, Carrie Shemanko, Vida Vafaizadeh, Astrid Weiß* und *Ilka Wittig*. Ein besonderes Dankeschön an *Corina Heinz* für die tolle Unterstützung in jeglicher Hinsicht, wodurch es mir gelang manche Problemstellung professioneller anzugehen und gewisse Vorurteile gegenüber unseren nordwestlichen Landesnachbarn ein wenig abzubauen.

Ferner möchte ich auch *Michael Humbert, Benjamin Dälken* und *Robert Pick* an dieser Stelle nennen, mit denen ich gemeinsam diesen Weg vom ersten Semester an gegangen bin. Aber auch alle Kollegen im Georg-Speyer-Haus die dazu beigetragen haben eine tolle Arbeitsatmosphäre zu schaffen. Im Besonderen *Cord Hartmann, Christoph Königs* und *Jens Tiefenbach* für hilfreichen Diskussionen und Korrekturen.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei *meiner Familie* und meiner Freundin bedanken. Ihr habt mich während der ganze Zeit der Doktorarbeit immer unterstützt, und in besonders stressigen Phasen konnte ich mir sicher sein, dass ihr auf mich eingeht und mir hilft auch die nächste Hürde zu nehmen.

Abkürzungsverzeichnis

3-AT	3-Amino-1, 2, 4-triazol		IR	Insulin receptor
Abb.	Abbildung		Jak	Janus kinase
Amp	Ampicillin		MAPK	Mitogen activating protein kinase
APS	Ammoniumpersulfat		Memo	Mediator of ErbB2-driven motility
Aptamer	gr. Apta = passend; meros = Teilchen		MMP	Matrix metallo protease
as	Aminosäuren		mTOR	Target of rapamycin
ATP	Adenine triphosphate		NDF	Neu differentiation factor
bp	Basenpaare		NGF	Neuronal growth factor
BSA	Bovine serum albumine		NP-40	Nonidet P-40
BTC	Betacelluline		NRG	Neureguline
CCP	clatherin coated pits		OD ₂₆₀	Optische Dichte bei 260 nm
CDK	Cycline dependent kinase		PAO	Phenylarsinoxid
cDNA	Komplementäre DNA		PCR	Polymerase chain reaction
CIP/KIP	Cycline dependent kinase inhibitor		PDGFR	Platelet derived growth factor receptor
CIP	Calf Intestine Phosphatase		PEG	Polyethylenglycol
DAG	Diacylglycerol		PH	pleckstrin homology domain
DMEM	Dublecco's modified eagle medium		PI-3K	Phosphoinositol-3 kinase
DMSO	Dimethylsulfoxide		PIP ₂	Phosphoinositol-diphosphate
DNA	Desoxyribonucleinsäure		PKB/AKT	Protein kinase B
DTT	Dithiothreitol		PLC- γ	Phospholipase C
ECL	Enhanced chemiluminescence		POD	Peroxidase
EGF	Epidermal growth factor		RALT	receptor associated late transducer
ErbB	Erythroblastosis retrovirus		RNA	Ribonucleinsäure
FCS	Fetal calf serum		RTK	Receptor tyrosine kinase
GEF	GTP exchange factor		SH2	Src homology domain
GRB-2	Growth factor receptor bound protein-2		SOS	Son of Sevenless
GSK3 β	Glykogen synthase kinase		STAT	Signal transducers and activators of transcription
GST	Glutathion-S-transferase		TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
HER	Human epidermal growth factor receptor		TGF α	Transforming growth factor
HRG	Heregulin		TKI	Tyrosine kinase inhibitor
HRP	Horseraddish peroxidase		VEGF	Vascular endothelial growth factor
HSP90	Heat shock protein 90		v/v	Volumen/Volumen
IPTG	Isopropyl-1-thio-D-galactosid		w/v	Masse/Volumen

Zusammenfassung

In einer Vielzahl von Tumoren begründet sich die maligne Transformation der Zellen in einer Überexpression der ErbB2-Rezeptortyrosinkinase. Aufgrund der erhöhten ErbB2-Rezeptordichte auf der Zelloberfläche wird durch die Aktivierung des Rezeptors eine starke Proliferation der Zellen ausgelöst, welche invasiv in gesundes Gewebe eindringen. Dieses starke Wachstum wird über die Aktivierung ErbB2-vermittelter Angiogenese sichergestellt und lässt sich durch die Verwendung von Chemotherapeutika nicht aufhalten. Auf diese Weise können sich diese malignen Zellen durch Metastasierung im ganzen Körper verteilen, was sich in einer 5 Jahres-Überlebensrate der Patienten von 5 % widerspiegelt. Die Inhibition der ErbB2-Rezeptor-Tyrosinkinase stellt somit durch ihre Rolle in der Tumorprogression, ein relevantes Ziel der modernen Tumormedizin dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde die ErbB2-Tyrosinkinasedomäne in einem Hefe Zwei-Hybrid System verwendet, um spezifische Interaktionspartner zu isolieren, die mit der Funktion der Kinase interferieren. Bei den potentiellen Inhibitoren handelt es sich um Peptid-Aptamere. Dies sind randomisierte Peptide aus 12 bis 42 Aminosäuren, die in einer konstringierten Konformation in ein Gerüstprotein eingebaut sind. Als Gerüstprotein wurde das intrazelluläre Protein Thioredoxin verwendet, dessen aktives Zentrum als Schleife aus der Proteinstruktur ragt. In dieses aktive Zentrum wurden die randomisierten Peptide inseriert und für die Interaktion mit der Tyrosinkinase präsentiert. Durch die Klonierung einer optimierten Peptid-Aptamer Bibliothek gelang es einen Pool von 2×10^8 unterschiedlichen Peptiden zu konstruieren.

Aus dieser Bibliothek konnten durch das Hefe Zwei-Hybrid System Peptid-Aptamere isoliert werden, die spezifisch mit dem ErbB2-Rezeptor interagierten. Diese in der Hefe gezeigte Interaktion wurde *in vitro* in GST-Pulldown und *in vitro* Co-IP Experimenten bestätigt. Damit die Funktion der Aptamere in Krebszellen analysiert werden konnte, wurden die Peptid-Aptamere über die lentivirale Transduktion und Proteintransduktion effizient in Zielzellen eingebracht. Mit Hilfe der Aptamer-Transduktion konnte die Rezeptor-Aptamer Interaktion durch Co-IP und Co-Lokalisationsuntersuchungen auch in ErbB2-exprimierende Zellen, wie SKBr3 und NIH#3.7, bestätigt werden.

Zur Funktionsanalyse wurden die Aptamere ferner in MCF7 Zellen eingebracht und dort durch HRG die Aktivierung von ErbB2/ErbB3-Heterodimeren induziert. Diese Heterodimere übertragen über den PKB/AKT-Signalweg ein anti-apoptotischen Signal in die Zelle, welches zur Chemoresistenz-Entwicklung dieser Zellen beiträgt. Die ErbB2-induzierte Aktivierung des PKB/AKT-Signalweges konnte durch die Aptamer-Applikation verhindert werden. Im Folgenden wurden die Aptamere in MCF7 her2 Zellen transduziert. Bei MCF7 her2 Zellen handelt es sich um MCF7 Zellen, die stabil mit ErbB2 transfiziert wurden. Die daraus resultierende Überexpression des ErbB2 Rezeptors führt über die Induktion des AKT-Signalweges zur Resistenz der Zellen gegenüber Chemotherapeutika-Behandlung, wie Taxol. Durch Applikation der Aptamer wurden MCF7 her2 Zellen für die Taxol-Behandlung resensitiviert. Auf diese Weise wurden in der vorliegenden Arbeit Peptid-Aptamere isoliert, die mit der ErbB2-induzierter Chemoresistenz interferierten und damit in Kombination mit einer Taxol-Behandlung eine alternative Therapiemöglichkeit bieten.

1	EINLEITUNG	9
1.1	ORGANISATION UND KOORDINATION DER SIGNALÜBERMITTLUNG IM ORGANISMUS	9
1.2	DIE STRUKTUR UND FUNKTION DER ERBB-REZEPTORFAMILIE	10
1.2.1	Überblick über die Familie der Rezeptortyrosinkinasen	10
1.2.2	Die Domänenstruktur der ErbB-Rezeptorfamilie	11
1.2.3	Die Liganden der ErbB-Rezeptoren	12
1.2.4	Die Struktur der ErbB-Rezeptoren	13
1.2.4.1	Der extrazelluläre Teil der Rezeptoren	13
1.2.4.2	Der intrazelluläre Teil der Rezeptoren	15
1.2.5	Die Aktivierung der ErbB-induzierten Signalwege	16
1.2.6	Die Ligand-induzierte Endozytose der ErbB-Rezeptoren	19
1.2.7	Die Degradation des ErbB2-Rezeptors	21
1.2.8	Das RALT Protein als endogener Inhibitor des ErbB2-Rezeptors	21
1.3	DIE PHYSIOLOGISCHE FUNKTION DES ERBB2-REZEPTORS IM ORGANISMUS	22
1.4	DER ERBB2-REZEPTOR ALS ONKOGEN UND SEINE RELEVANZ ALS ZIEL IN DER TUMORTHERAPIE	23
1.4.1	Allgemeine Voraussetzungen der Tumorbildung	23
1.4.2	Die Rolle des ErbB2-Rezeptors in der Tumorbildung	24
1.4.2.1	Unabhängigkeit gegenüber Wachstumssignalen nach ErbB2-Amplifikation	25
1.4.2.2	Insensitivität gegenüber Anti-Wachstumsfaktoren nach ErbB2-Amplifikation	25
1.4.2.3	Apoptose-Inhibition durch den ErbB2-Rezeptor	26
1.4.2.4	ErbB2-induziertes endloses Teilungsvermögen	27
1.4.2.5	ErbB2-induzierte Angiogenese	27
1.4.2.6	ErbB2-vermittelte Gewebeinvasion und Metastasierung	28
1.5	DER ERBB2-REZEPTOR ALS ZIELSTRUKTUR FÜR THERAPIEN IN DER TUMORMEDIZIN	30
1.5.1	Der extrazelluläre Teil als Angriffspunkt in der monoklonalen Antikörpertherapie	30
1.5.2	Tyrosinkinase Inhibitoren als spezifische Krebstherapeutika	31
1.5.3	Die Verwendung von Hsp90-Inhibitoren in der ErbB2 Therapie	31
1.5.4	Methodik zur Entwicklung neuer potentieller Inhibitoren	32
1.6	ZIELSETZUNG DER DOKTORARBEIT	33
1.6.1	Die Notwendigkeit der Anwendung alternativer Strategien zur ErbB2-Inhibition	33
1.6.2	Ein System zur Isolation von potentiellen ErbB2-Inhibitoren	34
1.6.3	Applikationsmöglichkeiten von Aptameren für mögliche klinische Anwendungen	34
1.6.4	Zielsetzung der Doktorarbeit	36
2	MATERIAL & METHODEN	37
2.1	VERWENDETES ARBEITSMATERIAL	37
2.1.1	Chemikalien und Materialien	37
2.1.2	Lösungen und Puffer	38
2.1.3	Plasmide	40
2.1.3.1	Hefe-Expressionsplasmide	40
2.1.3.2	Bakterielle Expressionsplasmide	40
2.1.3.3	Eukaryotische Expressionsplasmide	41
2.1.4	PCR-Primer	41
2.1.4.1	Primer für Hefe-Expressionsplasmide	41
2.1.4.2	Primer für bakterielle Expressionsplasmide	42
2.1.4.3	Primer für eukaryotische Expressionplasmide	42
2.1.5	DNA-Restriktions- und DNA-modifizierende Enzyme	42
2.1.6	Antikörper	42
2.1.6.1	Primärantikörper	42
2.1.6.2	Sekundärantikörper	43
2.2	VERWENDETE ZELLEN UND IHRE ANZUCHTMETHODEN	43
2.2.1	Verwendeter Hefe-Stamm	43
2.2.2	Verwendete Bakterienstämme	43
2.2.3	Unterschiedliche Säugerzelllinien	44
2.2.4	Anzuchtmethoden	44
2.2.4.1	Lösungen und Medien für <i>S. cerevisiae</i> Zellen	44
2.2.4.2	Lösungen und Medien für <i>E. coli</i> Stämmen	45
2.2.4.3	Lösungen und Medien für Säugerzellen	45
2.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	46
2.3.1	Polymerase-Chain-Reaction (PCR)	46
2.3.2	Enzymatische Behandlung der DNA	47

2.3.2.1	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen – der Restriktions-verdau	47
2.3.2.2	Dephosphorylierung von DNA-5' Enden	47
2.3.3	<i>Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegel-Elektrophorese</i>	47
2.3.4	<i>Ligation von DNA-Fragmenten</i>	48
2.3.5	<i>Transformation von Plasmiden in E.coli Zellen</i>	48
2.3.5.1	Herstellung transformationskompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	48
2.3.5.2	Transformation in chemokompetenten Zellen	49
2.3.5.3	Transformation in elektrokompetenten Zellen	49
2.3.5.4	Transformation der Bibliothek-Vektoren in superkompetenten Zellen (Peptid-Aptamer-Bibliothek Amplifikation)	50
2.3.6	<i>Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli Zellen</i>	50
2.3.6.1	Plasmid-Isolierung in analytischem Maßstab (Mini-Präparation)	50
2.3.6.2	Plasmid-Isolierung in präparativem Maßstab (Maxi-Präparation)	50
2.3.6.3	Plasmid-Isolierung nach der Bibliothek-Amplifikation (Giga-Präparation)	51
2.3.7	<i>Isolierung von Plasmid-DNA aus S. cerevisiae Zellen</i>	51
2.3.8	<i>Photometrische Bestimmung der Konzentration DNA-Lösungen</i>	51
2.3.9	<i>Klonierung der randomisierten Peptid-Aptamer-Bibliothek</i>	51
2.3.9.1	Insertion einer Glycin-Linkersequenz in das aktive Zentrum des Thioredoxins	51
2.3.9.2	Zweitstrangsynthese des randomisierten DNA-Templates und die weiteren Schritte der Klonierung	52
2.4	DAS HEFE ZWEI-HYBRID SYSTEM	53
2.4.1.1	Transformation von Plasmiden in <i>S. cerevisiae</i> Zellen	54
2.4.1.2	Transformation der Bibliothek-Vektoren in <i>S. cerevisiae</i> Zellen	55
2.4.1.3	Co-Transformation und Tropfplatten zur Aptamer-Spezifitätsanalyse	55
2.4.1.4	Aptamer-Sequenzanalyse mit ScanSite 2.0	56
2.5	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	56
2.5.1	<i>Expression und Aufreinigung von Proteinen</i>	56
2.5.1.1	Herstellung von Hefe-Proteinextrakten unter denaturierenden Bedingungen	56
2.5.1.2	Proteinexpression und Aufreinigung unter nicht denaturierenden Bedingungen in <i>E. coli</i> Zellen	57
2.5.1.3	Proteinexpression und Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen in <i>E. coli</i>	57
2.5.2	<i>Proteinkonzentrationsbestimmungen durch Bradford</i>	58
2.5.3	<i>Isolation spezifischer Proteine aus Zellextrakten durch Antikörper (Immunopräzipitation)</i>	59
2.5.4	<i>Proteintransfer auf PDVF Membranen (Western Blot)</i>	59
2.5.5	<i>Detektion von Proteinen mit Hilfe von Chemolumineszenz</i>	60
2.5.6	<i>In vitro Bindungsanalysen durch GST-Pulldown-Experimente</i>	60
2.5.7	<i>In vitro Bindungsanalysen durch in vitro Co-IP</i>	61
2.5.8	<i>In vivo Interaktionsanalysen durch Co-Immunopräzipitation</i>	61
2.5.9	<i>In vivo Interaktionsanalysen mit Hilfe von fluoreszenzmarkierter Antikörper (Immunfluoreszenz)</i>	62
2.6	METHODEN DER ZELLKULTUR	62
2.6.1	<i>Kultivieren von Säugerzellen</i>	62
2.6.2	<i>Zellernte</i>	63
2.6.3	<i>Transiente Transfektionen von eukaryotischen Zellen</i>	63
2.6.3.1	Transfektionen durch CaPO ₄	63
2.6.3.2	Transfektionen mit Lipofectamine	63
2.6.4	<i>Stabile Transfektionen von eukaryotischen Zellen</i>	64
2.6.5	<i>Virale Transduktion von eukaryotischen Zellen</i>	65
2.6.5.1	Generation von Virusüberständen	65
2.6.5.2	Virale Transduktion von Zielzellen	65
2.6.6	<i>Proteintransduktion von eukaryotischen Zellen</i>	66
2.6.7	<i>FACS-Messungen</i>	66
2.6.8	<i>Der AKT-Phosphorylierungsversuch</i>	67
2.6.9	<i>Der Weich-Agar Versuch</i>	67
2.6.10	<i>Der Zytotoxizitätsversuch</i>	68
2.6.11	<i>Nachweis der Expressionsinduktion mittels Luciferase-Versuch</i>	69
2.6.12	<i>Proliferationsnachweis mittels XTT-Versuch</i>	69
3	ERGEBNISSE	70
3.1	ISOLIERUNG POTENTIELLER TYROSINKINASE INHIBITOREN MIT HILFE DES HEFE ZWEI-HYBRID SYSTEMS	71
3.1.1	<i>Das GAL4-DBD-Fusionskonstrukt</i>	71
3.1.2	<i>Das GAL4-TAD-Fusionskonstrukt</i>	73
3.1.2.1	Amplifikation der 20mer Peptid-Aptamer-Bibliothek	73
3.1.2.2	Konstruktionsoptimierung der neuen randomisierten 12mer Aptamer-Bank	75
3.1.3	<i>Screening nach ErbB2-Kinase-interagierenden Peptid-Aptameren im Hefe Zwei-Hybrid System</i>	80
3.1.3.1	Hefe Zwei-Hybrid Screens einer 20mer Peptid-Bibliothek	80

3.1.3.2	Verifizierung der Aptamer-Kinase-Interaktion durch Selektion unter stringenteren Bedingungen.....	81
3.1.3.3	Sequenzanalyse der isolierten Peptid-Aptamere aus der 20mer Plasmid-Bank.....	82
3.1.3.4	Hefe Zwei-Hybrid Screens mit der gesamten Kinase Domäne und der 12mer Peptid Bibliothek.....	84
3.1.3.5	Identifizierung von bekannten Motiven in den Aptamer-Sequenzen.....	86
3.2	APTAMER-BINDUNGSANALYSE UND EVALUATION EINES ENDOGENEN ERBB2-INHIBITORS ALS ALTERNATIVE ZUR APTAMER-APPLIKATION.....	87
3.2.1	<i>Optimierung der Bindungsaffinität von Aptamer KD_g 11</i>	87
3.2.2	<i>Optimierung der Bindungsaffinität von Aptamer KD II7</i>	91
3.2.3	<i>Alternative Inhibitionsstrategie durch einen endogenen Inhibitor</i>	92
3.2.4	<i>Qualitative Bindungsanalyse zur Verifizierung der Interaktion zwischen Aptamer und ErbB2</i>	96
3.3	PEPTID-APTAMER APPLIKATION DURCH VERSCHIEDENE TRANSDUKTIONVERFAHREN.....	98
3.3.1	<i>Peptid-Aptamer Applikation durch virale Transduktion</i>	98
3.3.1.1	Expression von Aptameren in bakteriellem Trx über virale Transduktion.....	99
3.3.1.2	Virale Aptamer Transduktion und Expression in humanem Thioredoxin als Gerüstprotein.....	100
3.3.2	<i>Peptid-Aptamer Applikation durch Protein-Transduktion</i>	102
3.3.2.1	Expression mittels T7-Promotor im pET-Expressionsvektor.....	103
3.3.2.2	Aptamer-Expression mittels Taq-Promotor im pFLAG-Expressionsvektor.....	105
3.4	CHARAKTERISIERUNG DER APTAMER-REZEPTOR INTERAKTION.....	107
3.4.1	<i>Bindungsanalyse der aufgereinigten Peptid-Aptamere mit ErbB2 durch in vitro Co-IP</i>	108
3.4.1.1	Optimierung der aufgereinigten Peptid-Aptamer Konstrukte.....	108
3.4.1.2	Spezifitätskontrolle der Rezeptor-Aptamer Interaktion durch rekombinante Aptamer-Konstrukte.....	112
3.4.2	<i>Bindungsanalyse der Peptid-Aptamere in vivo</i>	113
3.4.2.1	Bindungsanalyse nach Aptamer Proteintransduktion mittels Co-IP.....	113
3.4.2.2	Bindungsanalyse nach Aptamer Proteintransduktion mittels Co-Lokalisation im CSLM.....	114
3.5	FUNKTIONALE ANALYSE DER ISOLIERTEN PEPTID-APTAMERE.....	117
3.5.1	<i>Interferenz mit ErbB2-induziertem transformierten Zellwachstum</i>	117
3.5.1.1	Interferenz durch virale Transduktion in NIH#3.7 Zellen.....	118
3.5.1.2	Tet-induzierbare Aptamer Expression in NIH#3.7 Zellen.....	119
3.5.2	<i>AKT-Phosphorylierungsversuch</i>	123
3.5.2.1	AKT-Inhibition nach Transfektion der Peptid-Aptamere.....	124
3.5.2.2	AKT-Inhibition durch lentivirale Transduktion.....	124
3.5.2.3	AKT-Inhibition durch Proteintransduktion.....	125
3.5.3	<i>Zytotoxizitätsversuche in humanen Krebszellen</i>	126
3.5.3.1	Analyse der Chemoresistenz von MCF7 her2 Zellen.....	127
3.5.3.2	Sensitivierung von Taxol-resistenten MCF7 her2 Zellen durch lentivirale Aptamer-Transduktion.....	128
3.5.3.3	Sensitivierung von Taxol-resistenten MCF7 her2 Zellen durch Aptamer-Proteintransduktion.....	131
4	DISKUSSION	134
4.1	PEPTID-APTAMERE ALS NEUE INHIBITORKLASSE.....	135
4.1.1	<i>Aptamer-Präsentation im Gerüstprotein Thioredoxin</i>	136
4.1.2	<i>Die Konstruktion der optimierten 12mer Aptamer-Bank</i>	137
4.1.3	<i>Das Hefe Zwei-Hybrid System als Screening-System zur Isolation von Peptid-Aptamere</i>	139
4.2	MÖGLICHKEITEN DER AFFINITÄTSSTEIGERUNG VON APTAMEREN.....	140
4.2.1	<i>Ansatzpunkte zur Optimierung des Screening-Systems</i>	141
4.2.2	<i>Optimierung der Bindungsaffinität der isolierten Peptid-Aptamere</i>	142
4.2.3	<i>Analyse endogener Inhibitoren</i>	143
4.3	VERSCHIEDENE APPLIKATIONSFORMEN ZUR VERWENDUNG VON PEPTID-APTAMEREN.....	144
4.3.1	<i>Einsatz der lentiviralen-Transduktionstechnik zur Evaluation der Aptamer-Funktion</i>	144
4.3.2	<i>Einsatz der Protein-Transduktionstechnik zur Evaluation der Aptamer-Funktion</i>	146
4.4	ANALYSE DER APTAMER FUNKTIONALITÄTSUNTERSUCHUNGEN.....	148
4.5	WEITERFÜHRENDE ÜBERLEGUNGEN ZUR APTAMER-APPLIKATION.....	151

I Einleitung

I.1 Organisation und Koordination der Signalübermittlung im Organismus

Die Organisation und das Überleben eines Organismus bedürfen der Koordination von Wachstum, Differenzierung und Aufrechterhaltung der verschiedenen Kompartimente. Die einzelnen Bereiche müssen die Möglichkeit haben, autonom zu agieren und trotzdem, durch abgestimmtes Zusammenwirken, eine Einheit formen.

Im Körper wird dieses Zusammenspiel durch verschiedene Signale erreicht, welche die Zelle, als kleinste autonome Einheit, beeinflussen. Wachstumsfaktoren wie z.B. der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) zählen zu diesen Signalen. Treffen sie auf die Zellen, sind sie in der Lage mit Rezeptoren in der Membran der Zellen zu interagieren. Diese Interaktion löst eine Konformationsänderung aus, die den intrazellulären Teil des Rezeptors aktiviert. Auf diese Weise gelingt es ein Signal außerhalb der Zelle ins Zellinnere weiterzuleiten.

Die Aktivierung des intrazellulären Teils des Rezeptors stellt den Ausgangspunkt für die Aktivierung verschiedener Proteine dar. Da der Rezeptor mehrere Proteine aktivieren kann, diese wiederum eine Vielzahl von anderen Proteinen aktivieren, wird das ursprüngliche Signal um ein Vielfaches verstärkt. Es bildet sich eine Signalkaskade, welche schließlich zur Aktivierung von Faktoren im Zellkern führt, die direkt auf die Informationen der DNA zugreifen und das Ablesen der Zielgene bewirken.

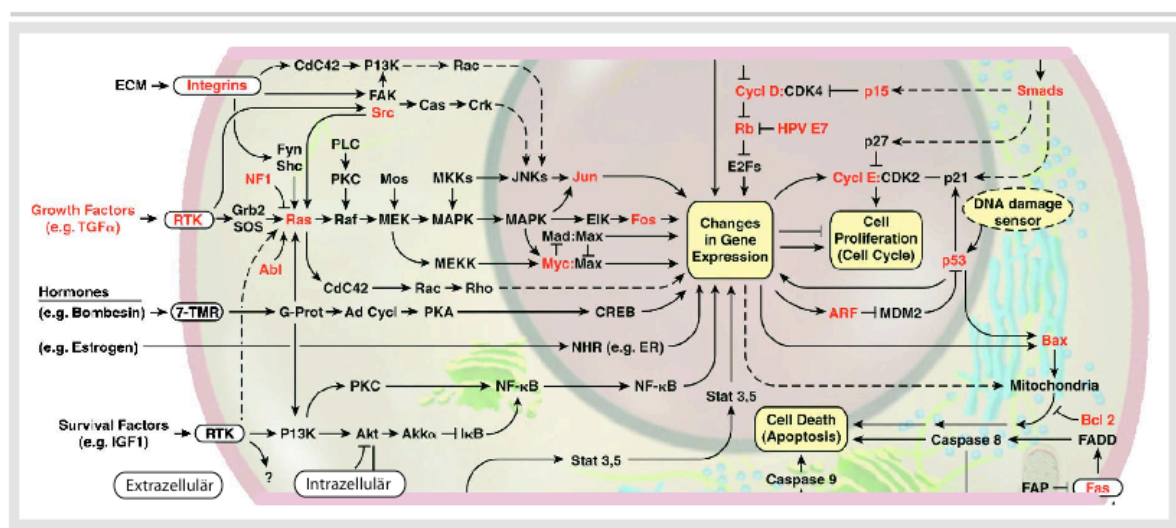


Abb.1.1 | Einflüsse auf die Zelle durch äußere Signale und deren Reizweiterleitung in den Zellkern
 Übersicht über die unterschiedlichen äußeren Signale, wie Wachstumsfaktoren und Hormone und ihre Signalübertragung in die Zellen durch spezifische Rezeptoren. Hier sind die wichtigsten Signalwege dargestellt, die zur Proliferation, Wachstumsinhibition und Apoptose führen.¹

Wie in *Abb. 1.1* dargestellt ist, müssen verschiedene Reize, die auf die Zelle einwirken, verarbeitet und in komplexen Interaktionsnetzwerken aufeinander abgestimmt werden. In den folgenden Abschnitten soll anhand des ErbB2 Rezeptors, einer Rezeptortyrosinkinase (RTK) der ErbB-Familie, aufgezeigt werden, wie die Aktivierung eines Proteins über verschiedene Signalkaskaden zu multiplen Reizantworten in der Zelle führt. Außerdem werden die Folgen eines Ungleichgewichts in diesem ausgewogenen Zusammenspiel deutlich gemacht.

1.2 Die Struktur und Funktion der ErbB-Rezeptorfamilie

1.2.1 Überblick über die Familie der Rezeptortyrosinkinasen

Im eukaryotischen Organismus ist eine Vielzahl von Rezeptoren auf der Zelloberfläche exponiert, die aufgrund ihrer Liganden, ihrer biologischen Funktion und ihrer Primärstruktur in verschiedene Gruppen eingeteilt werden können.

Der ErbB2-Rezeptor (HER2/Neu) gehört zur Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen (RTK) ². Diese Proteinfamilie besitzt eine intrinsische Kinase in ihrem zytoplasmatischen Teil, welche die γ -Phosphorylgruppe des ATP auf die Hydroxylgruppe von Tyrosinen der Zielproteine überträgt. Die Rezeptoren dieser Familie können aufgrund ihrer Strukturunterschiede in Typ I und Typ II RTKs unterteilt werden.

Typ-I-RTKs kommen als Monomer in der Zellmembran vor. Die Ligandenbindung führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch die Dimerisierung der Monomere initiiert wird. Diese Dimerisierung führt zur Aktivierung der Tyrosinkinasedomäne im zytoplasmatischen Teil der Rezeptoren. Die Kinase des einen Monomers phosphoryliert jeweils spezifische Tyrosinreste im zytoplasmatischen Teil des anderen Monomers, ein Vorgang, der als Kreuzphosphorylierung bezeichnet wird. Zu dieser Rezeptorklasse gehören z.B. die Mitglieder der ErbB-Familie, der PDGFR (Platelet-Derived Growth Factor Receptor), oder der M-CSFR (Cystis Fibrosis Receptor).

Typ-II-RTKs werden als einzelnes Peptid synthetisiert, welches glykosyliert und in eine α - und β -Kette gespalten wird. Die α -Kette stellt den extrazellulären Teil des Rezeptors dar, die β -Kette die Transmembrandomäne mit der Tyrosinkinase im zytoplasmatischen Teil. Sowohl die α - und β -Kette als auch beide Monomere sind über Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Somit liegen sie auf der Zelle als Rezeptordimere vor und werden nicht wie Typ-I-RTKs durch Liganden-induzierte Dimerisierung aktiviert. Zu dieser Rezeptorklasse gehören z.B. der Insulin-R, oder der IGF-1R (Insulin Growth Factor-1 Receptor).

1.2.2 Die Domänenstruktur der ErbB-Rezeptorfamilie

In Säugetieren gibt es vier Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie, den ErbB1- (EGFR), ErbB2 (HER2/Neu)-, ErbB3 (HER3)- und ErbB4 (HER4)-Rezeptor. Alle Mitglieder der Familie besitzen die gleiche Domänenstruktur, die N-terminal mit der Liganden-bindenden Domäne 1 (L1 oder Domäne I) beginnt. An diese Domäne schließen sich im extrazellulären Bereich der Rezeptoren die Cystein-reiche Domäne 1 (CR1 oder Domäne II), die Liganden-bindende Domäne 2 (L2 oder Domäne III) und die Cystein-reiche Domäne 2 (CR2 oder Domäne IV) an. Eine α -helikale Transmembrandomäne (TM) verbindet den extrazellulären und intrazellulären Teil der Rezeptoren. Im intrazellulären Teil befindet sich die Tyrosinkinasedomäne (TK), an welche sich der C-terminale Teil der Rezeptoren anschließt. In diesem Teil befinden sich spezifische Tyrosinreste, die nach Aktivierung der Rezeptoren von der Kinasedomäne phosphoryliert werden und den Ausgangspunkt verschiedener Signalkaskaden darstellen.

Die verschiedenen Domänen der unterschiedlichen ErbB-Rezeptoren weisen zum Teil große Homologien auf ². Dies wird vor allem in der Tyrosinkinasedomäne mit Werten zwischen 68-83 % besonders deutlich ² (Abb. 1.2). Der ErbB3-Rezeptor besitzt eine geringere Homologie in der Kinasedomäne. Die Unterschiede in dieser Region führen zu einer nicht-funktionalen Tyrosinkinase des Rezeptors, der somit nur als Heterodimer Signale in die Zelle weiterleiten kann. Der extrazelluläre Teil der Rezeptoren hingegen ist divergenter, wobei die Homologien dennoch zwischen 42 und 53 % liegen. Die Erklärung liegt in den unterschiedlichen Liganden, die von den verschiedenen Rezeptoren präferentiell gebunden werden. Die verschiedenen Liganden induzieren je nach Rezeptor-Subtyp unterschiedliche Signalkaskaden in der Zelle, die über den C-terminalen Teil der Rezeptoren ausgelöst werden und sich in den relativ geringen Homologien von 8-28 % dieser Domäne widerspiegeln.





























	ErbB1	ErbB2	ErbB3	ErbB4
L1		 50 %	 38 %	 48 %
CR1		 42 %	 47 %	 51 %
L2		 50 %	 42 %	 44 %
CR2		 45 %	 53 %	 52 %
TM		 76 %	 53 %	 52 %
TK		 83 %	 68 %	 80 %
CT		 23 %	 8 %	 28 %

Abb. 1.2 | **Homologien unter den Mitgliedern der ErbB-Familie**

Die Rezeptoren besitzen zwei Liganden-bindende Domänen (L1 und L2) und zwei cysteinreiche Domänen (CR1 und CR2) im extrazellulären Teil, eine einzelne α -helikale Trans-membrandomäne (TM) und eine intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne (TK). Die Prozentzahlen stellen die Homologien im Vergleich zu ErbB1 dar ².

I.2.3 Die Liganden der ErbB-Rezeptoren

Die verschiedenen ErbB-Rezeptoren besitzen aufgrund der unterschiedlichen extrazellulären Domänen präferentielle Bindungspartner. Diese Liganden werden im Folgenden vorgestellt.

So binden z.B. EGF (epidermal growth factor – siehe *Abb. 1.3*), TGF α (transforming growth factor) und Amphiregulin, nur an ErbB1 (EGFR); NDF (neu differentiation factor), NRG (neuregulin) und Heregulin binden nur an ErbB3 und ErbB4; BTC (betacellulin) und Epiregulin binden an ErbB1 und ErbB4 ³.

Alle ErbB-Liganden leiten sich von Vorläufern ab, die über ihren C-terminalen Teil als Typ-I Membranproteine in der Membran von Zellen der extrazellulären Matrix verankert sind. Diese werden extrazellulär gespalten, wodurch die löslichen Liganden freigesetzt werden ⁴.

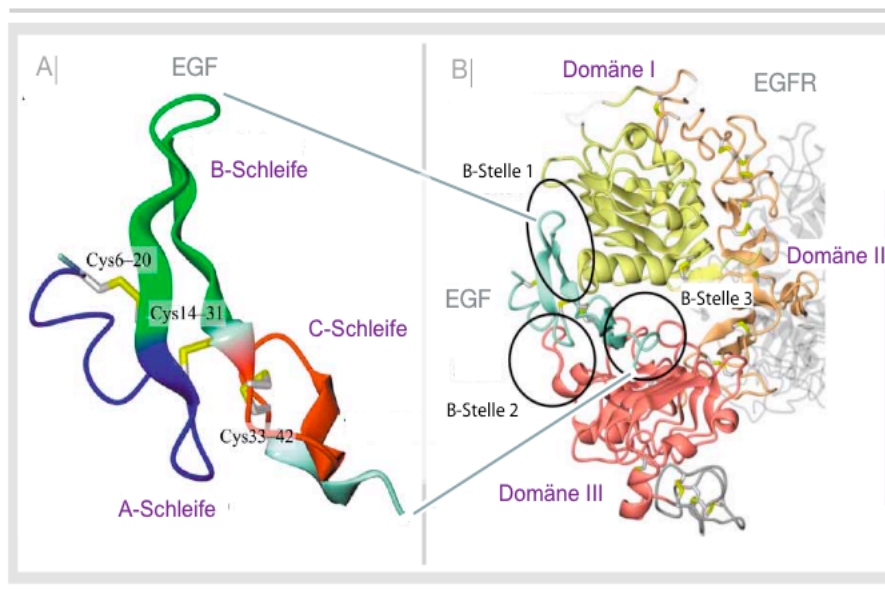


Abb. 1.3 | Struktur und Bindung des ErbB-Liganden

A| Exemplarisch für die Struktur der Liganden ist EGF dargestellt. EGF ist stabilisiert durch eine β -Faltblatt Struktur aus A-, B- und C-Schleife, die über 3 Disulfidbrücken (gelb) interagieren.

B| EGF im Komplex mit seinen Bindungsstellen (B-Stelle 1-3) in der extrazellulären Domäne I (gelb) und III (rot) des EGFR; ⁵ als Vorlage der Abbildung.

Die ErbB-Liganden besitzen eine EGF-Domäne, die aus 45-55 Aminosäuren besteht. In ihrer Sequenz befinden sich sechs Cystein-Reste, die drei Disulfidbrücken bilden und die Sekundärstruktur zu drei Schleifen formen (*Abb.1.3 – A*). Die B-Schleife interagiert mit Bindungsstelle 1 in Domäne I des EGFRs, die A-Schleife mit Bindungsstelle 2 in Domäne III und die C-Schleife mit Bindungsstelle 3 in Domäne III (*Abb.1.3 – B*). Durch Variationen in der Aminosäuresequenz der Interaktionspunkte kann die unterschiedliche Präferenz der verschiedenen Liganden zu bestimmten Rezeptor-Subtypen erklärt werden. Beispielsweise bindet Neuregulin den ErbB3 und ErbB4 Rezeptor u.a. mit Hilfe von fünf N-terminalen Aminosäureresten, die im Fall des EGFR für die Bindung keine Rolle spielen ⁵.

1.2.4 Die Struktur der ErbB-Rezeptoren

1.2.4.1 Der extrazelluläre Teil der Rezeptoren

Die Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie weisen im extrazellulären Teil eine gemeinsame Feinstruktur auf, deren Nomenklatur bereits in Kap. 1.2.2 eingeführt wurde. In *Abb. 1.4* sind die Kristallstrukturen des extrazellulären Teils des inaktiven EGFR, des durch EGF aktivierten EGFR und des ErbB2-Rezeptors dargestellt [Burgess, 2003 #237].

Im inaktiven EGFR Rezeptor (*Abb. 1.4-A*) interagieren Domäne II und Domäne IV über zwei β -Faltblatt-Schleifen miteinander. Die beiden Liganden-bindenden Domänen sind dadurch weit voneinander getrennt, wodurch der Rezeptor in einer selbstinhibierenden Konformation vorliegt. Im EGF-Molekül sind die EGFR-Interaktionspunkte durch 40 Å voneinander getrennt. Der Spalt zwischen Domäne I und Domäne III des EGFRs weist eine Länge von 60 Å auf. Aufgrund der Ligandenbindung (EGF in der *Abb. 1.4*) an Domäne I und Domäne III, wird der Spalt zwischen den beiden Liganden-bindenden Domänen auf 40 Å verkürzt. Durch diese EGF-induzierte Konformationsänderung wird die Interaktion der Domänen II und IV aufgebrochen und eine Drehung der Domäne I und II um 130° (*Abb. 1.4-B*) durchgeführt. Auf diese Weise geht der Rezeptor in einen offenen, aktivierten Zustand über.

Im Liganden-gebundenen, offenen Zustand ist der EGFR in der Lage, mit einem anderen aktivierten Rezeptormonomer zu interagieren. Die Peptidschleife in Domäne II, welche durch die Ligandenbindung nicht mehr mit Domäne IV interagiert, kann mit der analogen Peptidschleife des anderen EGFR-Monomers in Wechselwirkung treten (*Abb. 1.4-D*). Die aus diesem Grund als Dimerisierungsschleife⁵ bezeichnete β -Faltblattstruktur ist allerdings nicht der einzige Grund für die Dimerbildung, da diese durch zwei weitere Bindungsstellen in Domäne II stabilisiert wird (durch Sterne in der *Abb. 1.4* gekennzeichnet). Weitere Interaktionspunkte in Domäne IV tragen durch Wechselwirkung mit Domäne IV des zweiten Monomers zur weiteren Stabilisierung des Dimers bei. Mutationen in dieser Bindungsregion verhindern eine Aktivierung der zytoplasmatischen Tyrosinkinasedomäne [Saxon, 1999 #240], wodurch die Relevanz dieser Interaktionen für die Dimerstabilisierung verdeutlicht wird.

Die Struktur des ErbB2 Rezeptors (*Abb. 1.4-C*) ähnelt stark der Struktur des EGFR nach EGF-Bindung. Die Erklärung hierfür liegt in der direkten Interaktion von Domäne I und III durch elektrostatische Wechselwirkungen. Somit ist kein Ligand erforderlich um die 130° Konformationsänderung auszulösen. Zusätzlich wird diese offene Konformation durch Unterschiede im Interaktionsbereich von Domäne II und IV begünstigt. Drei der sieben konservierten Aminosäurereste, welche für die autoinhibitorische Konformation bei ErbB1 und ErbB3 verantwortlich sind, unterscheiden sich im ErbB2-Rezeptor⁶. Diese beiden strukturellen Unterschiede des ErbB2-Rezeptors, im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der ErbB-Familie, führen zur konstitutiv offenen Konformation des Rezeptors und sind ein Grund für das hohe onkogene Potential dieses Proteins.

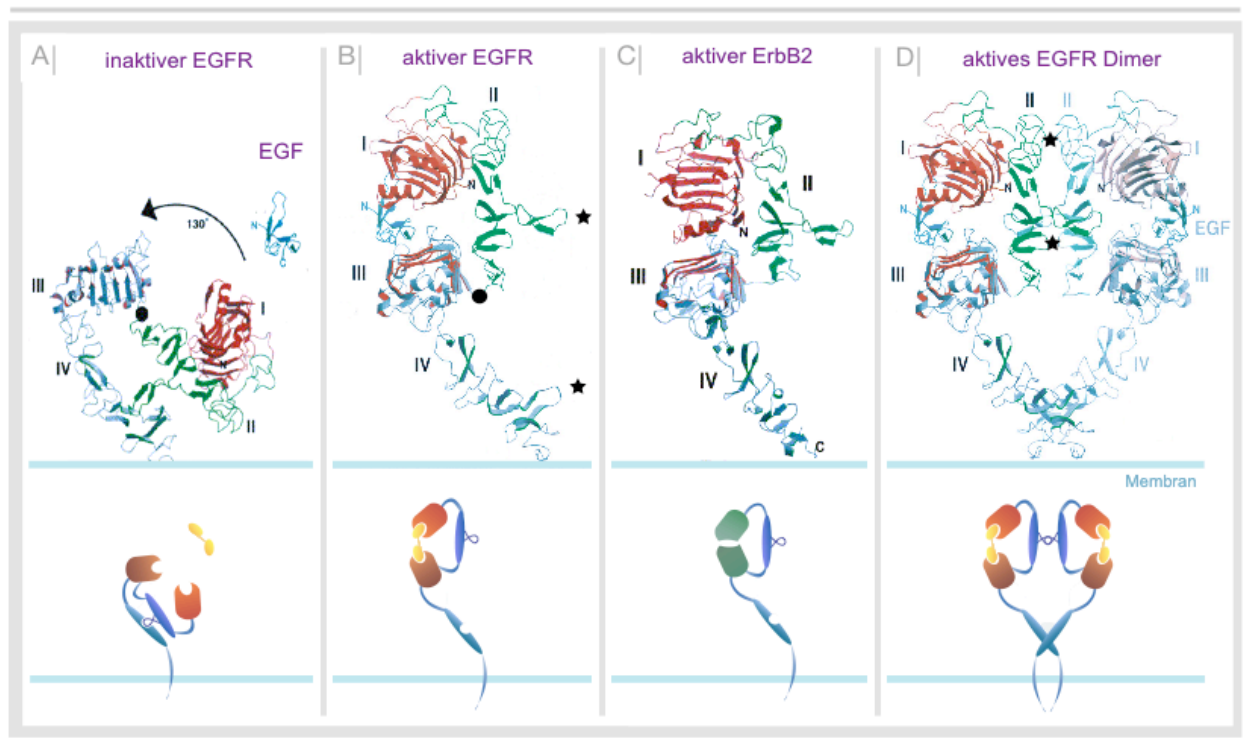


Abb. 1.4 | **Kristallstrukturen der extrazellulären ErbB-Domänen**

Die obere Zeile der Abb. zeigt die Kristallstrukturen, die untere Zeile die dazugehörigen schematischen Darstellungen des N-terminalen Teils von EGFR/ErbB1 und ErbB2 ⁷.

- A | Struktur des EGFR im geschlossenen Zustand; Domäne II und IV interagieren miteinander über Dimerisationsschleife in Domäne II; durch EGF Bindung an Domäne I und III, wird die Interaktion von II und IV aufgebrochen und eine 130° Rotation um einen Drehpunkt (•) überhalb Domäne III induziert
- B | Struktur des EGFR im offenen Zustand; EGF ist an Domäne I und III gebunden; durch Rotation sind Interaktionsschleifen (★) für anderes aktiviertes Monomer zugänglich
- C | Struktur des ErbB2 Rezeptor; Domäne I und III interagieren ohne Ligand miteinander, wodurch der Rezeptor eine ständig offene Konformation annimmt
- D | Struktur des EGFR Homodimer; Interaktionen in Domäne II und IV führen zur Dimerisierung der Monomere; Interaktionsstellen sind in B | mit ★ markiert; weitere Interaktionsstellen in Domäne II stabilisieren das Rezeptordimer (★)

Der ErbB2-Rezeptor besitzt immer die offene, aktivierte Konformation und sollte somit durch Interaktion mit einem anderen ErbB2-Monomer zu einer konstitutiven Aktivierung von ErbB2 führen. Diese Homodimerisierung konnte unter physiologischen Expressionsspiegeln nicht nachgewiesen werden. Gleiches gilt für den ErbB3-Rezeptor ⁸. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in den oben beschriebenen Interaktionsflächen liegen. Die EGFR-Homodimerbildung wird durch mehrere Interaktionsstellen stabilisiert, welche im ErbB2 Rezeptor nicht zur Verfügung stehen. Durch die reduzierte Zahl an Interaktionspunkten scheint es ErbB2-Homodimeren unter physiologischen Bedingungen nicht möglich die Dimerbildung zu stabilisieren. Eine ErbB2-Überexpression könnte jedoch dazu führen, dass das Bindungsgleichgewicht zu Gunsten eines Homodimers verschoben wird ⁷.

Der ErbB2-Rezeptor ist unter physiologischen Bedingungen in der Lage, mit anderen Mitgliedern der ErbB-Familie zu interagieren. Er ist der bevorzugte Partner dieser Heterodimerisierung und führt als aktives ErbB2/ErbB3-Dimer zur stärksten Signalantwort in der Zelle⁹. Auch diese Beobachtung lässt sich mit den Interaktionspunkten der beiden Monomere erklären. So könnten die Bindungsoberflächen von ErbB2 und ErbB3 nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip zueinander passen. Dadurch wäre eine effiziente Homodimerisierung nicht möglich und eine Heterodimerisierung würde präferentiell stattfinden.

1.2.4.2 Der intrazelluläre Teil der Rezeptoren

ErbB-Rezeptoren besitzen im Anschluss an den extrazellulären Teil eine α -helikale Transmembrandomäne, welche den Rezeptor in der Zellmembran verankert. Im intrazellulären Teil besitzen die Rezeptoren eine Tyrosinkinasedomäne, die nach Dimerisierung spezifische Tyrosinreste im C-terminalen Teil des anderen Monomers phosphoryliert - ein Vorgang, der als Kreuzphosphorylierung bezeichnet wird.

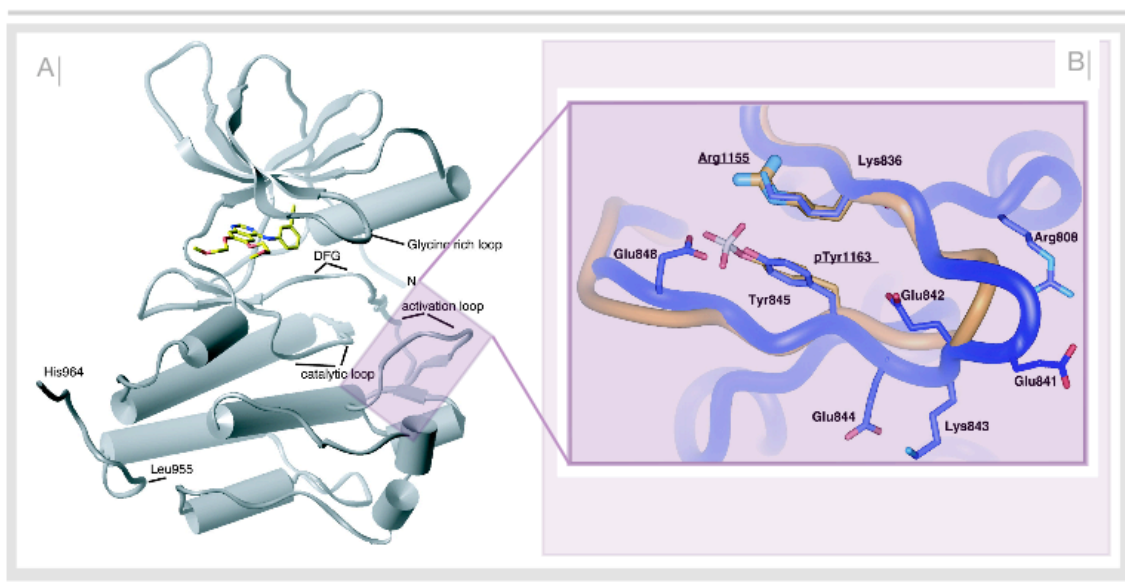


Abb. 1.5 | Die Kristall-Struktur der EGFR Tyrosinkinase Domäne

- A| Kristallstruktur der gesamten EGFR-Tyrosinkinasedomäne mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib (gelb) in der ATP Bindungsstelle; die aktivierende und katalytische Schleife sind gekennzeichnet.
- B| Vergrößerte Ansicht der aktivierenden Schleife der EGFRK (blau) im Vergleich mit der analogen Schleife der IRK (orange) nach Phosphorylierung. Die Aktivierungsschleife der EGFRK ist fast deckungsgleich mit der analogen Schleife der IRK im aktivierten Zustand. Diese Beobachtung spricht für eine Tyrosinkinase im EGFR mit intrinsischer Aktivität¹¹.

Die meisten RTK Kinasedomänen (z.B. Insulinrezeptor) sind katalytisch inaktiv, bis durch Liganden-induzierte Rezeptordimerisierung die Aktivierungsschleife der Kinasedomäne phosphoryliert und dadurch aktiviert wird. Ohne Phosphorylierung nimmt der Aktivierungsloop

eine Konformation ein, bei der katalytisch wichtige Aminosäurereste unzugänglich angeordnet sind und die Substratbindung dadurch verhindert wird¹⁰. Die Phosphorylierung induziert eine Konformationsänderung, die diesen autoinhibitorischen Zustand aufhebt. Die Aktivierungsschleife der EGFR-Tyrosinkinasedomäne (EGFRK) gleicht im nicht phosphorylierten Zustand jedoch vielmehr dem phosphorylierten, aktivierten der anderen RTKs¹¹ (*Abb. 1.5-B*). Ein unmodifizierter Tyrosinrest (Y845) nimmt die exakte Position des Phosphotyrosins (pY1163) in der Struktur des aktivierten Insulinrezeptorkinase (IRK) ein. Nahe gelegene, saure Aminosäureseitenketten scheinen diese Konformation zu stabilisieren, ohne dass eine Notwendigkeit zur Phosphorylierung von Y845 besteht. Aus diesen Beobachtungen ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die EGFR Tyrosinkinase ständig aktiv ist. Durch die Rezeptor Dimerisierung werden die Substrate in räumliche Nähe gebracht, was schließlich zur Induktion der verschiedenen Signalkaskaden führt.

In *Abb. 1.5 A* sind neben der Aktivierungsschleife noch weitere, für eine aktive Tyrosinkinase essentielle Strukturmerkmale gekennzeichnet. Als Co-Kristall in dieser Struktur ist der Tyrosinkinaseinhibitor (TKI) Erlotinib dargestellt. Dieses ATP-Analogon bindet an die ATP-Bindungsstelle der Kinase und verhindert so die Phosphorylgruppen-Übertragung auf die Substrate der Kinase. Wichtig für die Koordination der ATP-Bindung ist das *DFG*-Motiv, welches ebenfalls in der *Abb.* benannt ist.

Die essentielle Bedeutung der katalytischen Schleife der EGFRK zeigt sich in der evolutionär starken Konservierung dieses Motivs unter den Rezeptortyrosinkinasen, welches sich in seiner Struktur von den analogen Schleifenstrukturen der IRK und der Fibroblast Growth Factor Receptor Tyrosinkinase (FGFRK) nur um $0,1 \text{ \AA}$ unterscheidet.

1.2.5 Die Aktivierung der ErbB-induzierten Signalwege

Im Anschluss an die Tyrosinkinasedomäne befinden sich im C-terminalen Teil des Rezeptors spezifische Tyrosine als Substrate der Tyrosinkinasedomäne. Die Phosphorylierung dieser Tyrosine stellt den Ausgangspunkt für die verschiedenen Signalkaskaden dar, die den Reiz in die Zelle weiterleiten. Die Mitglieder der ErbB Familie können durch verschiedene Substratbindungsstellen unterschiedliche Signalkaskaden initiieren. Die phosphorylierten Tyrosine sind in *Abb. 1.6* gezeigt und stellen Bindungsstellen für Proteine mit SH2- (Src homology 2) oder PTB (Phosphotyrosine binding) Domänen dar. Zu diesen Proteinen zählen Adapter-Proteine (z.B. GRB-2, -7 und Shc), Kinasen (z.B. Src, Chk und PI3K (Phosphoinositol-3-Kinase)), aber auch Phosphatasen (z.B. SHP-1 und -2), Transkriptionsfaktoren (z.B. Signal Transducer and Activator of Transcription = Stat) und E3-Ligasen (z.B. Cbl).

Die Bindung der unterschiedlichen Signalmoleküle und die damit ausgelösten Signalkaskaden sind die zweite Ebene der Reizweiterleitung nach der Ligandenbindung. Die dritte Ebene besteht in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und/oder der Regulation verschiedener Effektormoleküle durch sekundäre Modifikationen. Im Folgenden soll anhand von drei Beispielen

deutlich gemacht werden, wie die Aktivierung der Rezeptoren durch Wachstumsfaktoren über verschiedene Signalkaskaden zur Proliferation der Zellen führt.

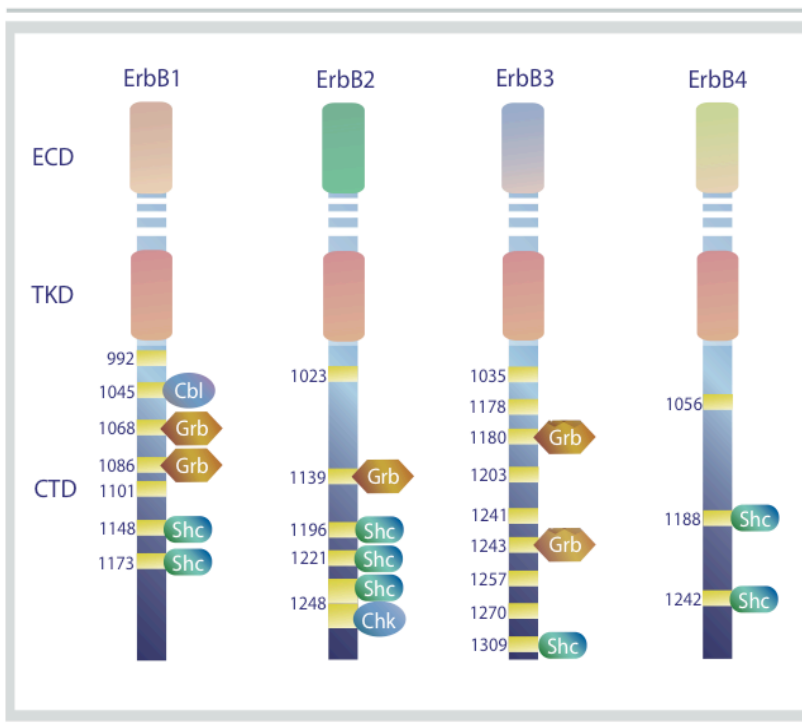


Abb. 1.6 | Phosphotyrosine und ihre Interaktionspartner im C-terminalen Teil der Rezeptoren

Die verschiedenen Phosphotyrosine in der C-terminalen Domäne (CTD) der ErbB Rezeptoren. Die extrazelluläre (ECD) und Tyrosinkinase Domäne (TKD) sind schematisch dargestellt. Exemplarisch sind diverse Bindungspartner der Phosphotyrosine gezeigt und mit welchem Phosphotyrosin sie interagieren¹².

Eine proliferationsfördernde Signalkaskade wird über das Adapter-Protein GRB2 (Growth Factor Receptor Bound Protein 2) ausgelöst. GRB2 bindet über die SH2-Domäne u.a. an das Phosphotyrosin pY1139 des ErbB2 Rezeptors und ist der Ausgangspunkt des MAP-Kinase (Mitogen-activated Protein Kinase) Signalweges. GRB2 ist ein typischer Vertreter der Adapter-Proteine, besitzt eine SH2-Domäne und zwei SH3-Domänen und nimmt eine zentrale Rolle im Signalweg zum Ras-Onkoprotein ein. GRB2 ist über die SH2-Domäne mit dem aktivierten Rezeptor assoziiert und bindet über beide SH3-Domänen an SOS (humanes Homolog zu Son of Sevenless von *Drosophila melanogaster*), einen GEF (GTP-Exchange Factor), der Ras in die aktive GTP-bindende Form überführt. In dieser Form kann Ras an die Serin-/Threoninkinase Raf binden. Die Bindung bewirkt bei Raf-Proteinen eine Konformationsänderung, die sie so für aktivierende Kinasen zugänglich machen. Raf ist die erste in einer Folge von spezifischen Serin-/Threoninkinasen, welche die MAP-Kinase-Kaskade (siehe Abb. 1.7) bilden und schließlich zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren im Zellkern führen. Im Fall des MAPK-Signalweges handelt es sich hierbei um die Transkriptionsfaktoren Jun und Fos, die durch Phosphorylierung aktiviert werden, dimerisieren und für die Transkription von c-Myc verantwortlich sind. Die Aktivierung von c-Myc bewirkt beispielsweise die Interaktion von Jab1 mit p27^{Kip1}, einem Mitglied der CIP/KIP (cyclin-dependent kinase inhibitors)-Familie. Durch diese Kopplung wird der gesamte Komplex ins Zytoplasma geschleust und dort in Proteasomen degradiert¹³. Das Protein p27^{Kip1} verhindert die Bildung von Cyklin E/CDK 2 (cyclin-dependent kinase 2)-Komplexen, die von Zellen benötigt werden, um den G₁-Restriktionspunkt des

Zellzyklus zu überwinden ¹⁴. Die Degradation dieses Kinaseinhibitors führt zur Aktivierung des Zellzyklus und zur Proliferation der Zellen.

Das zweite Beispiel für ErbB2-aktivierte Signalkaskaden ist die STAT-Signalkaskade. Die STAT-Proteine sind konstitutiv an ErbB2 assoziiert und werden durch Rezeptordimerisierung von Src phosphoryliert. Die Phosphorylierung ermöglicht es diesen Transkriptionsfaktoren zu dimerisieren. In der dimerisierten Form gelangen STAT-Proteine in den Zellkern und aktivieren dort die Transkription spezifischer Zielgene ¹⁵, die ebenfalls mit der Proliferation (z.B. Cyclin D1 oder Myc) des ErbB2-Rezeptors in Verbindung stehen.

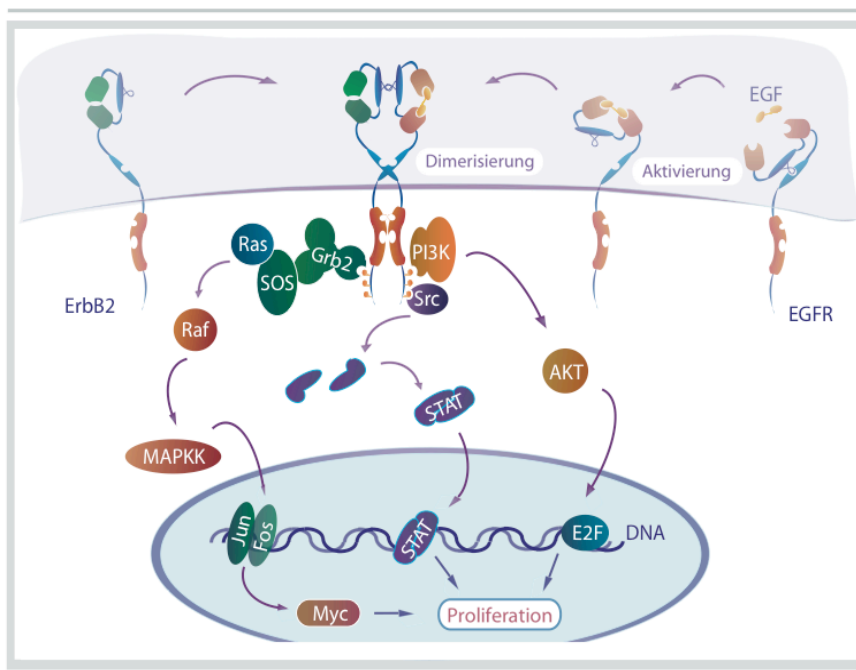


Abb. 1.7 | Proliferationsfördernde, ErbB-vermittelte Signalkaskaden

Schematische Darstellung der intrazellulären Bindungspartner von ErbB-Rezeptoren und die durch ihre Aktivierung ausgelösten Signalkaskaden. Es sind nur die wichtigsten Signalkaskaden dargestellt, wobei ihre Proliferationsfördernde Aktivität hervorgehoben wurde.

Ein weiterer für die Proliferation essentieller ErbB2-vermittelter Signalweg ist die PI3K/AKT-Kaskade. PI3-Kinase ist aus zwei verschiedenen Untereinheiten aufgebaut, p85 als regulatorisches Element, welches an Phosphotyrosine bindet und p110, als katalytische Untereinheit mit Kinaseaktivität ¹⁶. Diese Kinase phosphoryliert membranständiges Phosphoinositoldiphosphat (PIP₂) zu -triphosphat (PIP₃). PKB/AKT (Protein Kinase B) ist nun über ihre PH (Pleckstrin Homologie) Domäne in der Lage, an PIP₃ zu binden und wird durch diese Bindung aktiviert. PKB/AKT-Aktivierung führt zu einer erhöhten Expression der Transkriptionsfaktoren SP1 und E2F, was zu einer verstärkten Expression der D-Cykline und damit zur Aktivierung des Zellzyklus und der Proliferation führt. Eine aktive AKT führt des Weiteren zur Inhibition von GSK3β (Glykogen Synthase Kinase-3β). GSK3β ist für die Degradation der D-Cykline verantwortlich, die auf diese Weise durch AKT stabilisiert werden. So kann über den PI3K/AKT Signalweg der Zellzyklus transkriptional und durch sekundäre Modifikationen aktiviert werden ¹⁷.

Der ErbB2 Rezeptor induziert jedoch nicht nur die Proliferation der Zellen, sondern führt zu komplexen Signalantworten, die ihn zu einem potenten Onkoprotein werden lassen können.

Diese Signalantworten und ihre Rolle in der Tumorpromotion werden detailliert in Abschnitt 1.4.2 besprochen.

1.2.6 Die Ligand-induzierte Endozytose der ErbB-Rezeptoren

Die Art der ErbB2-induzierte Signalweiterleitung ist jedoch nicht nur durch die verschiedenen Liganden definiert, sondern auch durch den Ort ihrer Aktivierung.

Im nicht-induzierten Zustand befindet sich der Rezeptor in organisierten Membranstrukturen, den so genannten Caveolen (siehe *Abb. 1.8*). Diese Kompartimente werden u.a. durch Caveolin geformt und haben die Funktion eine effiziente Reizweiterleitung zu garantieren, was über zwei Mechanismen erreicht wird. Zum einen werden die einzelnen Rezeptormonomere in räumliche Nähe zu einander gebracht, zum anderen sind Substrate der Rezeptoren in diesen Kompartimenten lokalisiert und ermöglichen so die effiziente Signalaktivierung.

Nach Aktivierung der ErbB-Rezeptoren in den Caveolen wird präferentiell PLC- γ aktiviert. Das PLC- γ -Substrat PIP₂ (Phosphoinositoldiphosphat) ist zu 50 % in diesen Membranstrukturen lokalisiert und ermöglicht dadurch, dass eine PLC- γ -Aktivierung zu einer direkten Signalweiterleitung über PIP₂ in der Zelle führt ¹⁸.

Nach Aktivierung verlassen die Rezeptordimere die Caveolen (*Abb. 1.8-1*) und werden in Vesikeln, den clathrin-coated pits (CCP), endozytiert (*Abb. 1.8-2 und -3*). Durch die Endozytose der Rezeptordimere wird die Aktivierung der Signalkaskaden nicht unterbrochen. Im Fall des EGFR konnte gezeigt werden, dass verschiedene Kaskaden erst nach der verlassen der Caveolen aktiviert werden. So wird z.B. der MAPK-Signalweg vornehmlich an der Zelloberfläche aktiviert und behält diese Aktivität auch nach dem Endozytosevorgang bei. Die Aktivierung des PI3K-Signalweges erfolgt hingegen später, so dass ein Signal erst im frühen Endosom zu detektieren ist.

Der Vorgang der Endozytose selbst ist ein regulierter Prozess und wird im Fall des EGFR durch die Bindung der E3-Ligase c-Cbl an Phosphotyrosin 1045 des Rezeptors initiiert. E3-Ligasen übertragen aktiviertes Ubiquitin von E2-Enzymen auf Zielproteine. Bei Ubiquitinylierung wird das Ubiquitin Molekül kovalent mit einem Lysin des Rezeptors verknüpft. Es werden zwei Arten von Ubiquitinylierung unterschieden, Mono- und Poly-Ubiquitinylierung. Werden Ubiquitine über Lysin 48 zu Poly-Ubiquitin verknüpft, ist dies ein Signal für die Proteasom-abhängige Degradierung des Proteins. Mono-Ubiquitinylierung und Lysin 63-verknüpfte Poly-Ubiquitinylierung führen zur Endozytose oder subnuklearen "trafficking" ¹⁹ der konjugierten Proteine.

Im Fall des EGFR führt die c-Cbl Bindung zur Mono-Ubiquitinylierung. Diese Mono-Ubiquitine dienen als Bindungsstelle für Eps15, welches für die Bildung der Clathrin-umhüllte Vesikel (CCP) verantwortlich ist und schließlich zur Endozytose des Rezeptors führt ²⁰. c-Cbl stellt ferner einen Bindungspartner für CIN85 (Cbl-interacting protein of 85 kD) dar, dessen Interaktion dazu führt, dass der EGFR poly-ubiquitinyliert wird ²¹. Diese Poly-Ubiquitinylierung ist das Signal für den

lysosomalen Abbau des Rezeptors. c-Cbl bleibt während dieses Prozesses am Rezeptor assoziiert, um zu vermeiden, dass Isopeptidasen die Ubiquitylierung abgespalten. Dies hätte den Rücktransport des Rezeptors zur Zelloberfläche zur Folge.

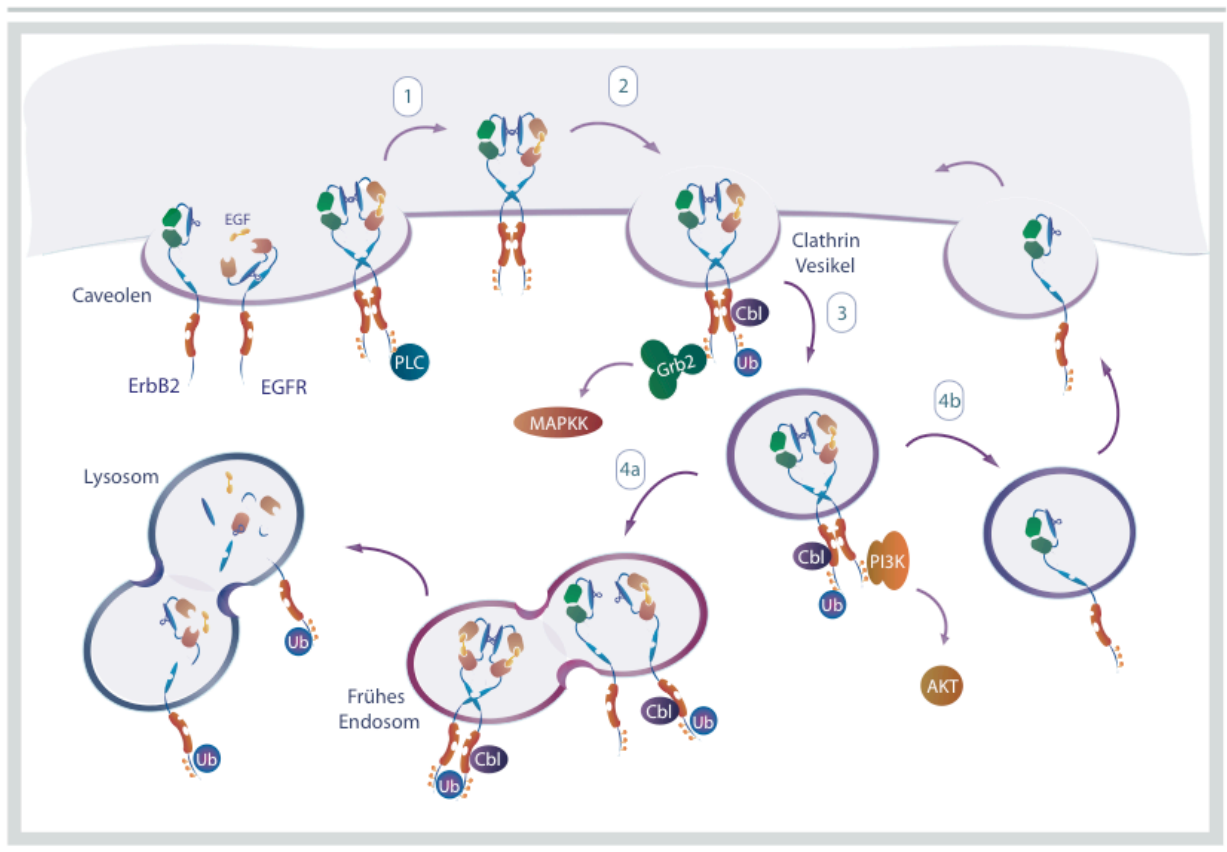


Abb. 1.8 | Ligand-induzierte Endozytose der ErbB-Rezeptoren

Ligand aktivierte Rezeptoren verlassen die Caveolen und werden durch Clathrin-umhüllte Vesikel endozytiert. Bei Homodimeren ist mit der Kopplung von c-Cbl an das Rezeptordimer, die dadurch ausgelöste Ubiquitylierung (Ub) und dessen Abbau im Lysosom gekoppelt (unten links). Bei Heterodimeren dissoziieren die Dimere bei niedrigen pH-Werten im frühen Endosom und gelangen als Monomere zurück zur Zelloberfläche (rechts). Auf diese Weise erfolgt bei Heterodimeren keine Abnahme der Rezeptordichte auf der Zelle (für die Abb. wurde als Vorlage²² verwendet).

Der ErbB2-Rezeptor wird nicht durch c-Cbl ubiquityliert. Im frühen Endosom werden die Rezeptordimere durch den erniedrigten pH-Wert getrennt. Der EGFR wird durch lysosomalen Abbau degradiert ((Abb. 1.8-4a) und der ErbB2 Rezeptor zur Zelloberfläche zurücktransportiert (Abb. 1.8-4b). Auf diese Weise können weiterhin Signalkaskaden induziert und die Reizintensität mit gleicher Stärke weitergeleitet werden.

1.2.7 Die Degradation des ErbB2-Rezeptors

Der ErbB2-Rezeptor wird im Gegensatz zum EGFR nicht lysosomal abgebaut, jedoch unterläuft auch er degradierende Prozesse, welche mit dem Abbau des Rezeptors im Proteasom enden.

Der ErbB2 Rezeptor benötigt, um die volle Aktivierung zu erlangen, die Bindung an die Chaperone Hsp90 (Heat shock protein 90 kD) bzw. Hsp70. Diese Hitzeschock Proteine unterstützen in einem ATP-abhängigen Prozess, die richtige Faltung des Rezeptors. Hsp70 scheint die richtige Struktur der Proteine zu Beginn ihrer Faltung zu promovieren, Hsp90 hingegen ist für die terminale physiologische Proteinfaltung verantwortlich.

Im Komplex mit Hsp90 bindet auch das C-terminale Hsc70 interagierende Protein (CHIP) an ErbB2. CHIP ist eine E3-Ligase, die zur Poly-Ubiquitylierung und infolge dessen zum Abbau des Rezeptors führt²³. CHIP bindet über seine TPR (Tetratricopeptide repeats) an den c-Terminus der Hitzeschockproteine und konkurriert mit Co-Chaperonen wie Hip oder Hop, um die Bindung an Hsp90. Diese Co-Chaperone unterstützen die Hitzeschock Proteine in ihrer Funktion Klientproteine richtig zu falten. So bindet beispielsweise Hip an die ATPase Domäne von Hsp70 und unterstützt die Faltung durch Erhöhung der Affinität von Hsp70 für ADP^{24, 25}.

Die Co-Chaperone liegen in wesentlich höheren Konzentrationen in der Zelle vor als CHIP, so dass es präferentiell zur physiologische Proteinfaltung der Proteine kommt²⁶. Ist jedoch die physiologische Faltung des Proteins nicht mehr möglich, beispielsweise durch die Hemmung von Hsp90 durch Geldamycin, welches die ATP-Bindungsstelle des Proteins blockiert, führt dies zum verstärkten Abbau der Klientproteine [Citri, 2002 #172].

Somit kontrolliert CHIP die physiologische Proteinfaltung. Dauert diese zu lange, oder ist gar nicht mehr möglich, werden sie durch CHIP ubiquityliert und in Folge dessen degradiert. Im Unterschied jedoch zum EGFR wird der ErbB2 Rezeptor durch CHIP nicht mono-, sondern poly-ubiquityliert, was einen proteasomalen und nicht lysosomalen Abbau zur Folge hat. Zu den Rezeptoren, die auf diese Weise durch CHIP abgebaut werden, zählen außer ErbB2 noch der Glucokortikoidrezeptor und CFTR (Cystis-Fibrosis transmembrane-conductance regulator). Der Rezeptorabbau dient im Gegensatz zum EGFR, also nicht der Beendigung der ErbB-induzierten Signalkaskaden. Somit muss es andere Mechanismen geben die Intensität und Dauer der Signalkaskaden zu kontrollieren.

1.2.8 Das RALT Protein als endogener ErbB2-Inhibitor

Die Signalaktivität des ErbB2-Rezeptors kann nicht durch Rezeptorabbau beendet werden. Aus diesem Grund gibt es für Protoonkogene wie den ErbB2 Rezeptor andere Sicherheitsmechanismen, mit deren Hilfe die Signalstärke des Rezeptors reguliert wird. Im Fall des ErbB2 Rezeptors wird ein „Feedback“-Mechanismus durch das RALT Protein verwendet, um die Reizintensität zu steuern.

Das RALT (receptor associated late transducer) Protein wurde von Fiorentino *et al.*²⁷ als ErbB2-Interaktionspartner mittels Hefe Zwei-Hybrid Screen isoliert und ist auch unter dem Namen Mig-6 bekannt. Das RALT Protein wird durch EGF Stimulation exprimiert und ist in der Lage, ErbB2 induzierte Signalkaskade zu blockieren. Ferner revertiert diese Blockade den transformierten Phänotyp von ErbB2-überexprimierenden NIH 3T3 Zellen. Durch diese und weitere Experimente wurde die These aufgestellt, dass es sich bei RALT, um einen endogenen „Feedback“-Inhibitor handelt, der durch die Interaktion mit der Kinasedomäne ErbB2 inhibiert und damit zu einer Beendigung der ErbB2 induzierten Signalkaskaden führt. Auf diese Weise lässt sich eine zu starke ErbB2-Aktivierung verhindern. Ferner ist der RALT-Expressionsspiegel in Brustkrebszelllinien (SKBr3, BT474, u.a.) stark reduziert, was mit Resistenz dieser Zelllinien gegenüber gezielter ErbB2-Therapie (Kap. 1.5.1) korreliert²⁸. Die stabile RALT-Expression in SKBr3-Zellen führt dazu, dass die Zellen für die ErbB2-spezifische Therapie in Form des α ErbB2-Antikörpers Herceptin[®] sensitiviert und dadurch in ihrer Proliferation gehemmt werden. In Zukunft könnte der RALT Expressionsstatus als prognostischer Biomarker herangezogen werden, um eine Aussage über den Wirkungsgrad gezielter ErbB2 Therapie treffen zu können.

1.3 Die physiologische Funktion des ErbB2-Rezeptors im Organismus

Die Analyse der physiologische Funktion des ErbB2-Rezeptors erfolgte durch Untersuchungen an knock-out (k.o.) bzw. transgenen Mäusen. So konnte gezeigt werden, dass ErbB2 k.o. Mäuse einen ähnlichen Phänotyp besitzen, wie ErbB4- und Neuregulin k.o. Mäuse. Neuregulin aktiviert den ErbB4-Rezeptor, der daraufhin in der Lage ist, als Heterodimer mit ErbB2, Signalkaskaden in der Zelle zu aktivieren. Diese Neuregulin-induzierte Signalkaskaden sind essentiell für die Entwicklung epithelialer Organe, sowie die Funktionsfähigkeit neuronaler Effektorzellen, wie Schwannsche Zellen oder neuromuskuläre Verknüpfungen. Des Weiteren werden Herzmuskelzellen in ihrer Entwicklung gestört, so dass diese k.o. Mäuse im embryonalen Stadium an einer Fehlfunktion des Herzens sterben. Der Ventrikel dieser Mäuse ist undifferenziert und nicht in der Lage sich zu dehnen^{29,30}. Der ErbB2-Rezeptor scheint allerdings auch im adulten Organismus die Funktion der Herzmuskelzellen zu steuern, was in kardialen Nebenwirkungen von ErbB2-spezifischer Tumortherapie, wie z.B. Herceptin[®] deutlich wird. Im adulten Organismus ist der ErbB2-Rezeptor aber auch in einer Reihe anderer Gewebetypen zu finden. So wird er unter anderem in der Haut, besonders in der mittleren und oberen Epidermis, aber auch im gastrointestinalen Epithel, im Epithel der Brust und der Ovarien exprimiert³¹. Wie am Beispiel von Herceptin[®] deutlich wird, ist bei einer spezifischen Inhibition des ErbB2-Rezeptors mit Nebenwirkungen in den ErbB2-exprimierenden Gewebetypen zu rechnen. Die Relevanz des ErbB2-Rezeptors als Zielprotein in der spezifischen Krebstherapie wird jedoch in den folgenden Abschnitten ausführlich dargestellt.

1.4 Der ErbB2-Rezeptor als Onkogen und seine Relevanz als Ziel in der Tumorthherapie

1.4.1 Allgemeine Voraussetzungen der Tumorbildung

Bei der Tumorbildung entartet eine normale Körperzelle, wodurch es zu unkontrolliertem Wachstum und zur Metastasierung kommen kann. Die Wege, wie aus Mutationen einer einzelnen Zelle ein komplexer Tumor entstehen kann, sind unterschiedlich. Die zellulären Voraussetzungen für diesen Prozess sind jedoch dieselben und wurden von Hanahan und Weinberg zusammengefasst ¹ (*Abb. 1.10*).

Eine normale Körperzelle ist in ihrem Wachstum auf Signale aus ihrer Umgebung angewiesen. In Tumorzellen wird diese Abhängigkeit durch verschiedene Wege durchbrochen und die Zelle kann sich unkontrolliert teilen (*Abb. 1.10-1*). In normalen Zellen wäre dies bis zu einem gewissen Maß auch durch ein Überangebot von Wachstumsfaktoren möglich. Jedoch tritt jetzt ein zweiter Sicherheitsmechanismus auf, der durch Kontakt zu Nachbarzellen ausgelöst wird. Diese vermitteln der proliferierenden Zelle wachstumsinhibitorische Signale (*Abb. 1.10-2*), gegen welche die Tumorzelle unempfindlich ist. Der Körper besitzt auch in diesem Stadium noch die Möglichkeit mit Hilfe des Immunsystems, den programmierten Zelltod, die Apoptose, in den entarteten Zellen auszulösen. Die Tumorzelle kann jedoch verschiedene Mechanismen entwickeln, um diese Apoptose-Induktion zu blockieren (*Abb. 1.10-3*).

Eine differenzierte Körperzelle besitzt eine begrenzte Anzahl an Teilungszyklen und ist dadurch wahrscheinlich nicht in der Lage einen komplexen Tumor zu bilden. Im Körper befinden sich jedoch Zellen, die sich unbegrenzt teilen können, wie beispielsweise die hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Kommt es in Stammzellen zu proliferationsfördernden Mutationen, sind die Grundlagen für neoplastisches Wachstum, eine Vorstufe der Tumorbildung, gelegt. Es besteht allerdings eine kontroverse Auffassung darüber, ob differenzierte Zellen dieses unendliche Teilungsvermögen durch Mutationen wiedererlangen können (*Abb. 1.10-5*).

Bei Tumorgewebe handelt es sich, um stark proliferierende Zellen, die einen enormen Nährstoffverbrauch aufweisen und aus diesem Grund auf ein gut organisiertes System der Nährstoffversorgung angewiesen sind. Ab einer Tumorgöße von ungefähr 2 mm³ ³², reicht die Nährstoffversorgung durch das Blutsystem des Körpers nicht mehr aus, so dass Tumore die Fähigkeit entwickeln müssen durch Angiogenese ein eigenes Blutsystem zu generieren, um ihre Versorgung sicherzustellen (*Abb. 1.10-4*). Durch dieses Blutsystem ist es einzelnen Tumorzellen auch möglich sich im gesamten Organismus zu verteilen und an anderen Stellen des Körpers Metastasen zu bilden (*Abb. 1.10-6*).



Abb. 1.10 | Voraussetzungen der Tumorbildung

Schematische Darstellung über Faktoren, die eine normale Zelle zu einer Tumorzelle entarten lassen. Zellen müssen durch Mutationen diese Eigenschaften erlangen, um sich zu einem komplexen Tumor zu entwickeln: 1. Selbstversorgung mit Wachstumsfaktoren; 2. Insensitivität gegenüber Anti-Wachstumsfaktoren; 3. Inhibition der Apoptose; 4. Anhaltende Angiogenese; 5. Unbegrenzte Teilungsvermögen; 6. Gewebeinvasion und Metastasierung (Schema aus ¹⁾)

In den folgenden Kapiteln wird an verschiedenen Beispielen gezeigt, wie durch ErbB2-Signalkaskaden eine normale Zelle diese Eigenschaften erlangen und damit einem komplexen Tumor bilden kann.

1.4.2 Die Rolle des ErbB2-Rezeptors in der Tumorbildung

Die Aktivität von Wachstumsfaktor-Rezeptoren wurde das erste Mal 1984 von Downward *et al.* ³³ mit menschlichen Krebsformen in Verbindung gebracht. Er entdeckte bei Sequenzvergleichen starke Homologien zwischen dem EGFR und dem viralen Onkogen *v-erbB* des Avian erythroblastosis Retrovirus. Durch weitere Sequenzvergleiche mit *erbB-1*, das für den EGFR codiert, wurde in Nerventumoren bei Ratten ein dem EGFR verwandtes, 185-kD großes Phosphoprotein entdeckt, das Neu-Onkoprotein. Unabhängig davon konnte das menschliche Homolog von *neu*, *erbB-2*, identifiziert werden ³⁴.

Im Laufe weiterer Untersuchungen konnte die Amplifikation und/oder Überexpression des *erbB2*-Gens in Brust-, Blut-, Lungen-, Gehirn-, Nieren-, Prostatakrebs und gynäkologischen Krebsformen nachgewiesen werden. Von entscheidender Rolle ist das Gen sowohl in Brust- als auch in Prostata-Krebs, in denen es bei 30 % der Patienten überexprimiert ist. Die starke Überexpression korreliert mit schlechten Überlebenschancen der Patienten, da nur 5 % der Patienten die ersten fünf Jahre nach der Diagnose überleben ³⁵. Die Gründe für die schlechten

Überlebenschancen dieser Patienten, liegen in der für ErbB2 charakteristischen Aktivierung bestimmter Signalübertragungswege und deren Intensität.

In den folgenden Abschnitten wird anhand des Weinberg Schemas (*Abb. 1.10*) beschrieben, wie der ErbB2-Rezeptor die unterschiedlichen Voraussetzungen der Tumorbildung erreichen kann und diese am Ende dieses Kapitels bildlich in *Abb. 1.11* zusammengefasst.

1.4.2.1 Unabhängigkeit gegenüber Wachstumssignalen nach ErbB2-Amplifikation

Eine Möglichkeit die Abhängigkeit von Wachstumssignalen aufzuheben besteht in der Ausbildung autokriner Proliferationsschleifen (autocrine loops), wobei die Krebszelle sich selbst oder Nachbarzellen zur Produktion von Wachstumsfaktoren anregt, und dadurch ungehemmt proliferieren kann. So produzieren die ErbB2-überexprimierenden Brustkarzinomzellen MDA MB 453 den Wachstumsfaktor Heregulin, der zur Aktivierung von ErbB2/ErbB3-Heterodimeren führt ³⁶. Ein ähnlicher Effekt kann in anderem Brustkrebszelllinien durch autokrines Prolactin erreicht werden. Die dadurch aktivierte Janus Kinase 2 (Jak2) führt zur Phosphorylierung des ErbB2-Rezeptors und zur Aktivierung des MAPK-Signalweges ³⁷.

Der ErbB2-Rezeptor nimmt durch seine Struktur eine Sonderstellung in der Familie der ErbB-Rezeptoren ein. Während EGFR, ErbB3 und ErbB4 durch spezifische Liganden eine offene Konformation annehmen, liegt ErbB2 immer in dieser offenen Konformation vor, kann allerdings bei physiologischem Expressionsspiegel keine Homodimere bilden. Bei einer Überexpression des Rezeptors kann sich das Bindungsgleichgewicht zugunsten von Homodimeren verschieben, was zur Aktivierung der ErbB2-spezifischen Signalkaskaden führt ^{7, 38} und damit zur Unabhängigkeit dieser Zellen gegenüber Wachstumsfaktoren.

1.4.2.2 Insensitivität gegenüber Anti-Wachstumsfaktoren nach ErbB2-Amplifikation

In normalem Gewebe gibt es eine Vielzahl von antiproliferativen Signalen, welche die Gewebhomeostase garantieren und das unkontrollierte Wachstum der Zelle verhindern. Diese Faktoren befinden sich in der extrazellulären Matrix, auf benachbarten Zellen, wirken aber auch als lösliche Faktoren. Einer der am besten untersuchten Vertreter der letztgenannten Gruppe ist TGF- β . Er bindet und aktiviert den TGF- β Rezeptor, eine Rezeptor-Serin/Threonin-Kinase, welche durch Phosphorylierung die Dimerisierung der Transkriptionsfaktoren Smad-2/3 und Smad-4 ermöglicht. Durch die Dimerisierung sind Smad-Proteine in der Lage in Nukleus zu wandern, um dort spezifische antiproliferative Proteine zu exprimieren. Als Zielgene dienen hierbei p15^{INK4B} und p21 Proteine. Diese Zellzyklusinhibitoren verhindern die Progression von der G1- zur S-Phase und damit die Proliferation der Zellen ¹.

Die Überexpression des ErbB2 Rezeptors führt zur verstärkten Aktivierung des ER81 Transkriptionsfaktors, welcher an der Expression eines Inhibitors des Smad-Signalweges (Smad-7) beteiligt ist ³⁹. Dieser Inhibitor bindet kompetitiv an den TGF- β Rezeptor und verhindert somit die Smad-2/3 und Smad-4 Aktivierung. Außerdem rekrutiert er die E3-Ligase Smurf-1 (Smad ubiquitination regulatory factor 1), welche zur Ubiquitinylierung und Degradation des TGF- β Rezeptors führt ⁴⁰. Auf diese Weise sind ErbB2-überexprimierende Tumoren unempfindlich gegenüber diesem antiproliferativen Signal und können ungehindert wachsen.

1.4.2.3 Apoptose-Inhibition durch den ErbB2-Rezeptor

Die Apoptose, der programmierte Zelltod, ist ein wichtiger Kontrollmechanismus des Organismus entartetes Wachstum zu kontrollieren. Der-ErbB2 Rezeptor vermittelt die Blockade der Apoptose hauptsächlich durch die Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges. Dieser Signalweg kann die Apoptose Induktion durch verschiedene Mechanismen blockieren. Eines der AKT-Zielproteine ist das pro-apoptotische Protein Bad, welches als Komplex mit Bcl-Proteinen in der Zelle vorliegt. Durch AKT-Phosphorylierung bindet das Adaptorprotein 14-3-3 an Bad und verhindert so die Bad/Bcl-Dimerisierung. Dadurch werden die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 bzw. Bcl-X_L freigesetzt und sichern das Überleben der Zelle ⁴¹.

AKT-Aktivierung sorgt auch für eine erhöhte Aktivität von NF- κ B, einem Transkriptionsfaktor, der für das Überleben von Zellen nach inflammatorischen Stimuli verantwortlich ist. NF- κ B liegt normalerweise als Komplex mit I κ B (Inhibitor of NF- κ B) in einer inaktiven Form vor. Die Phosphorylierung von I κ B durch I κ K (I κ B Kinase) führt zur Freisetzung von NF- κ B, der dadurch in der Lage ist, in den Zellkern zu wandern, um dort anti-apoptotische Zielgene zu exprimieren. AKT ist in der Lage I κ K zu aktivieren, um dadurch indirekt die Aktivierung von NF- κ B zu ermöglichen. NF- κ B führt zur Expression von anti-apoptotischen Genen, wie Bcl-X_L und zur Repression von Tumorsuppressorgenen wie PTEN ^{42, 43}. Weitere Ziele des PI3K/AKT-Signalweges sind pro-apoptotische Proteine, wie die durch Phosphorylierung inhibierte Caspase-9 und FKHR. FKHR (Foxo-1) ist ein Mitglied der Forkhead Transkriptionsfaktorfamilie und kann durch AKT-Phosphorylierung nicht mehr in den Zellkern gelangen, wodurch die Transkription von p27^{kip1} und pro-apoptotischen Proteinen, wie BIM und FAS Ligand abgeschaltet wird ⁴⁴.

Die PI3K/AKT-Signalkaskade ist also in der Lage die Apoptose-Induktion auf verschiedenen Ebenen zu stören, indem sie sowohl anti-apoptotische Proteine (Bcl-X_L) stimuliert, als auch pro-apoptotische (Bad, Caspase-9, FasL) hemmt. Ein wichtiger Aspekt in diesem Zusammenhang ist die Apoptose-Induktion durch Chemotherapie (z.B. Paclitaxel, Doxorubicin) in proliferierenden Zellen, wodurch der PI3K/AKT-Signalweg maßgeblich an der Chemoresistenz ErbB2-exprimierender Tumore beteiligt ist. ⁴⁵.

1.4.2.4 ErbB2-induziertes endloses Teilungsvermögen

Eine normale differenzierte Körperzelle ist in der Lage sich wenige Male zu teilen, wonach sie in einen Ruhezustand übergeht, der mit „Vergreisung“ (Seneszenz) bezeichnet wird. Der Krebszelle gelingt es, diesen Ruhezustand zu umgehen und sich unendlich oft zu teilen.

Eine molekulare Grundlage der unbegrenzten Zellteilung liegt in der Aktivität der Telomerase. Dieses Enzym synthetisiert die repetitiven, nicht kodierenden DNA-Sequenzen an den Enden der Chromosomen, den Telomeren. Ist die Telomerase nicht aktiv, verkürzen sich die Telomere bei jeder Zellteilung um eine Wiederholungseinheit. Auf diese Weise wird die Stabilität des Chromosomensatzes gefährdet, wodurch die Seneszenz der Zelle ausgelöst wird. Die Stammzellen des Körpers besitzen eine aktive Telomerase, eine Eigenschaft, die während der Differenzierung verloren geht und bei somatischen Zellen nicht vorhanden ist. Krebszellen können durch Entartung dieser Stammzellen entstehen. Krebszellen, die aus differenzierten Zellen entstanden sind, tragen oft zusätzliche Mutationen die zur Reaktivierung der Telomerase führen.

Im Fall des ErbB2 Rezeptors konnte gezeigt werden, dass er über den MAPK-Signalweg den Transkriptionsfaktor ER81 aktiviert, der u.a. für die Transkription der humanen Telomerase hTERT verantwortlich ist ⁴⁶. Es sind in diesem Fall also keine weiteren Mutationen notwendig, um die Telomerase zu aktivieren. Auf diese Weise können ErbB2-überexprimierende Krebszellen die unendliche Teilungsfähigkeit sicherstellen und entgehen dem Seneszenz-Prozess.

1.4.2.5 ErbB2-induzierte Angiogenese

Das Tumorgewebe ist ein stark proliferierendes Gewebe, welches durch seinen hohen Nährstoffverbrauch stark von der ständigen Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr über das Blutssystem abhängig ist. Ist die Zufuhr nicht ausreichend sichergestellt, wird das Gewebe hypoxisch und führt über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Hif-1 (Hypoxia-inducible factor 1) zur Proteinexpression verschiedener Faktoren, welche die Sauerstoffversorgung wieder sicherstellen. Physiologisch schützt dieser Mechanismus die Zellen vor Sauerstoffunterversorgung und die ansonsten induzierte Apoptose. In soliden Tumorgeweben entstehen durch die hohen Proliferationsraten solche hypoxischen Bedingungen in den Kernregionen des Tumors. Dies führt dazu, dass beispielsweise der Wachstumsfaktor VEGF (Vascular Epidermal Growth Factor) sekretiert wird, welcher die Angiogenese induziert.

Es wurde auch gezeigt, dass RTKs die Expression von VEGF induzieren. Dies ist im Fall des ErbB2-Rezeptors über mehrere Signalwege möglich. Eine Möglichkeit besteht in der Shc-vermittelten VEGF Expression ⁴⁷. Shc wird ursprünglich im kardiovaskulären System in der frühen Maus Embryogenese exprimiert und ist dort ein entscheidender Regulator der Herzentwicklung und der Entstehung der Hauptblutgefäße ⁴⁸. Eine andere Möglichkeit ist die

Aktivierung des mTOR (Target of Rapamycin)-Signalweges über AKT [Yen, 2000 #228]. Dieser Signalweg führt zur Expression der alpha Untereinheit von Hif-1, und damit zur Aktivierung von VEGF⁴⁹.

In Untersuchungen an Patienten mit Lungen- und Brustkrebs konnte gezeigt werden, dass eine starke VEGF-Expression mit einer stark reduzierten Überlebensrate der Patienten korreliert⁵⁰. Neben einer erhöhten Chemoresistenz (siehe Kap. 1.4.2.4) könnte die ErbB2-induzierte VEGF-Expression, einer der Gründe sein, warum Patienten mit ErbB2-überexprimierenden Brustkrebs besonders schlechte Überlebenschancen aufweisen.

1.4.2.6 ErbB2-vermittelte Gewebeinvasion und Metastasierung

Normale Zellen sind durch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte in ihrer Umgebung verankert und besitzen eine stark eingeschränkte Bewegungsfreiheit. Der Krebszelle gelingt es, diese Kontakte zu lösen, ohne die damit verbundene Apoptose auszulösen. Ferner aktiviert sie Signalwege, die zur verstärkten Migration der Krebszellen in das benachbarte Gewebe führen. Um in das umliegende Gewebe vordringen zu können, müssen die Krebszellen Proteasen sekretieren welche die benachbarten Zellen und extrazelluläre Matrix verdauen.

ErbB2-exprimierende Zellen erreichen eine erhöhte Beweglichkeit durch verschiedene Signalwege. Zum einen wird der PI3K-Signalweg aktiviert, welcher durch Aktivierung von Rac zu einer Umorganisation der Aktinfilamente, zur Aktivierung von Integrinen, zur Inhibition der Mikrotubulibildung und schließlich zur Bildung von Lamellipodien führt. Diese Lamellipodien dienen der Krebszelle dazu sich durch Integrin-vermittelter Zell-Matrix Kontakte fortzubewegen. Zum anderen wird durch ErbB2-vermittelte MAPK- und Src-Aktivierung diese Umorganisation des Zytoskeletts weiter koordiniert. Neuere Forschungsergebnisse belegen, dass die Aktivierung dieser Signalwege notwendig, jedoch nicht ausreichend für ErbB2-induzierte Migration ist. In diesem Zusammenhang konnte das Protein Memo (mediator of ErbB2-driven motility) isoliert werden, welches direkt von ErbB2 aktiviert wird und in den MTOC (Microtubuli organizing centers) die Extinktion der Microtubuli initiiert. Auf diese Weise ist die ErbB2-induzierte Memo-Aktivierung maßgeblich an der gerichtete Bewegung der Zelle beteiligt⁵¹.

Damit die Krebszelle in der Lage ist, in das umliegende Gewebe zu infiltrieren, sekretiert sie Enzyme, welche die extrazelluläre Matrix verdauen. Bei diesen Enzymen handelt es sich um Matrixmetalloproteasen (MMP). Die MMPs sind Zink-abhängige Proteasen, welche wie beispielsweise MMP-1 die Degradierung von Kollagen (häufigstes Protein im Körper) initiieren. Physiologisch werden MMPs in der embryonalen Entwicklung, im Gewebeumbau und der Wundheilung benötigt. Krebszellen verwenden MMPs, um das umliegende Gewebe aufzulösen, damit ihr ungehindertes Wachstum gesichert ist. Durch MMPs gelingt es ihnen auch, bei Metastasierung in die Blutgefäße zu gelangen und sich durch das Blutssystem im ganzen Körper zu verteilen.

Im Fall des ErbB2 Rezeptors führt die Aktivierung des ER81 Transkriptionsfaktors u.a. zur Expression von MMP-1 (Matrixmetalloprotease-1) ⁵². Damit sind ErbB2-überexprimierende Krebszellen in der Lage, durch MMP-Sekretion das umliegende Gewebe zu zerstören und sich aufgrund ihrer erhöhten Beweglichkeit durch Metastasen im gesamten Organismus zu verteilen.

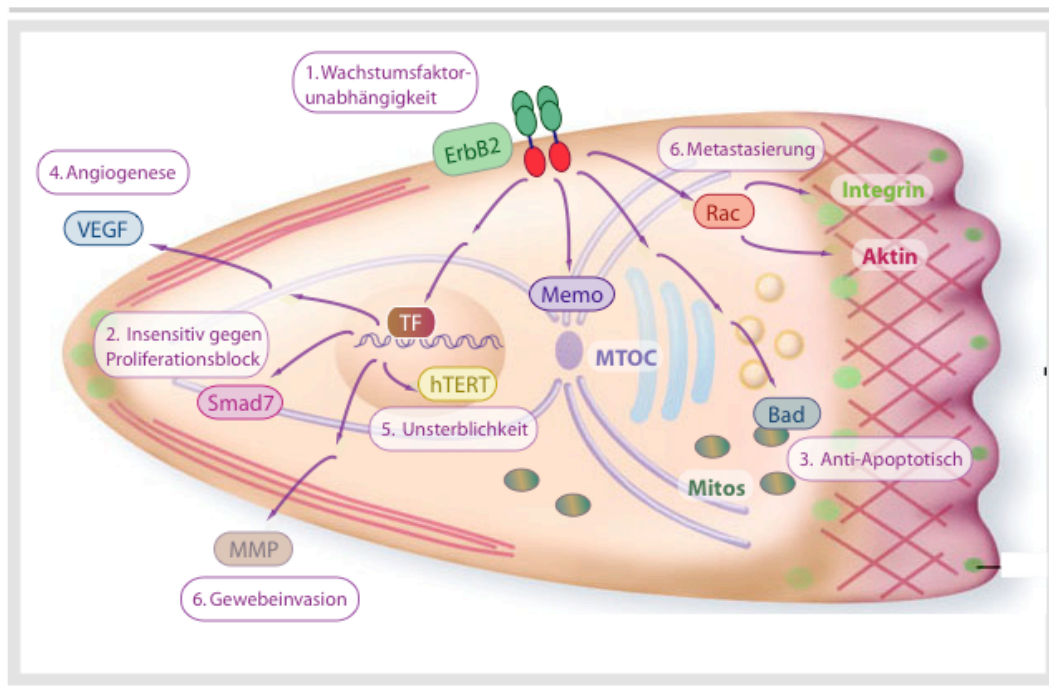


Abb. 1.11 | Übersicht über Tumor-induzierende Signaleigenschaften von ErbB2

Durch ErbB2-Überexpression kann es zur Liganden-unabhängigen Homodimerisierung des Rezeptors kommen und einer damit verbundenen unkontrollierten Proliferation der Zellen (1). Dem Proliferationsblock, der bei unkontrolliertem Wachstum durch TGF- β ausgelöst wird, kann ErbB2 durch Smad7-Induktion entgehen (2). Über Bad-Phosphorylierung wird Bcl-X_L aktiviert und verhindert so die Induktion der Apoptose (3). Die ErbB2-induzierte Shc-Aktivierung führt zur VEGF-Expression und stimuliert dadurch die Angiogenese (4). ErbB2 aktiviert das unbegrenzte Teilungsvermögen der Zellen durch die Expression von hTERT (5). Letztlich gelingt es ihm durch Rac Aktivierung und MMP Sekretion die Grundlagen für metastasierende Krebszellen zu schaffen (6).

In der Abb. 1.11 sind die unterschiedlichen ErbB-Effektormoleküle und ihre Funktion zusammengefasst. So kann ErbB2 durch Überexpression Homodimere bilden, um die Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren (1) zu umgehen. Ferner besitzt er durch die Expression von Smad 7 die Möglichkeit, TGF- β induzierte Proliferationsblockaden aufzuheben (2). Die Reaktivierung der Telomerase hTERT führt zu einer unbegrenzten Teilungsfähigkeit der Krebszellen (5). Durch die Phosphorylierung von Bad wird über den PI3K/AKT-Signalweg das Auslösen der Apoptose verhindert (3) und über VEGF Produktion die Angiogenese vorangetrieben (4). Die Angiogenese wird durch die Expression von MMPs weiter begünstigt und diese Proteasen ermöglichen es dem Tumor auch, andere Gewebe zu infiltrieren (6). Für

eine erhöhte Beweglichkeit in diesem Prozess sind Proteine wie Rac und Memo verantwortlich, die aus diesem Grund essentiell für die Metastasierung (6) des Tumors sind.

Die oben genannten Beispiele sind potentielle Möglichkeiten das aggressive Wachstum von ErbB2-positiven Krebsarten und deren Resistenz gegenüber Chemotherapie zu erklären. Die Signaleigenschaften der ErbB2-Effektorproteine sind ausreichend, um die verschiedenen Voraussetzungen eines vollausgebildeten Tumors zu erfüllen. Es bleibt jedoch dennoch ungeklärt, ob der ErbB2-Rezeptor allein diese stark entwickelten Tumore formen kann, ohne dass weitere genetische Defekte in der Zelle notwendig sind. Außerdem wurden in diesen Beispielen die Krebszellen analysiert und nur begrenzt auf die Interaktionen von Krebszellen mit Stroma- oder Immunzellen eingegangen. Diese spielen nach heutigen Erkenntnissen eine wesentliche Rolle in der Tumorentstehung und -promotion und müssen in der Therapie-Entwicklung berücksichtigt werden. Dennoch bleibt der ErbB2-Rezeptor durch die oben genannten Auswirkungen seiner Signalübertragung ein wichtiges Schlüsselprotein in der spezifischen Krebstherapie und die effiziente ErbB2-Inhibition ein essentieller Schritt in der Brustkrebsbekämpfung.

1.5 Der ErbB2-Rezeptor als Zielstruktur für Therapien in der Tumormedizin

1.5.1 Der extrazelluläre Teil als Angriffspunkt in der monoklonalen Antikörpertherapie

Die Verwendung des ErbB2-Rezeptors als Ziel der Tumorbehandlung soll am Beispiel eines monoklonalen Antikörpers gegen die extrazelluläre Domäne des ErbB2 näher erläutert werden. Bei dem Antikörper handelt es sich um Herceptin[®], einen humanisierten Antikörper, der aus mMuAb4D5 (anti-p185^{ErbB2} murine monoclonal antibody) entwickelt wurde⁵³. Das Epitop für die Antikörperbindung liegt in der Cystein-reichen Domäne II. Er ist dadurch nicht in der Lage, die ErbB2-vermittelten Signalkaskaden zu unterbinden, verursacht allerdings eine Rekrutierung der E3-Ligase c-Cbl, welche, analog zum EGFR, zum lysosomalen Abbau des Rezeptors führt⁵⁴. Die Herunterregulierung der Rezeptoranzahl führt zu einer Sensitivierung der Krebszellen für herkömmliche Tumortherapeutika (z.B. Taxol)⁵⁵, wodurch sich Synergien in der Kombinationstherapie ergeben⁵⁶. Ferner wird diskutiert, ob der Antikörper über seinen Fc-Teil in der Lage ist, das Immunsystem des Körpers gegen den ErbB2 Rezeptor zu aktivieren⁵⁷. Allerdings sprechen nur 50 % der ErbB2-positiven Brustkrebspatienten auf die Therapie an. Die dabei erzielten Effekte bedeuten jedoch nicht die Krebsheilung der therapierbaren Patienten, sondern stellen vielmehr eine lebensverlängernde Maßnahme von mehreren Monaten dar. Es

gibt bereits die nächste Generation von Antikörper-Therapeutika gegen den ErbB2-Rezeptor, ein Beispiel hierfür ist Omnitarg® (Pertuzumab). Dieser Antikörper besitzt ein anderes Wirkungsspektrum als Herceptin, obwohl er auch an den extrazellulären Teil des Rezeptors bindet. So konnte gezeigt werden, dass Omnitarg® im Gegensatz zu Herceptin, sowohl das Wachstum von Tumoren mit hohen-, als auch mit niedrigen ErbB2-Spiegeln inhibiert. Die Kristallstrukturanalyse des Antikörpers im Co-Kristall mit ErbB2 gab erste Hinweise über diese Divergenz der Wirkungsweise. Omnitarg® bindet an den Dimerisierungsloop von ErbB2 und verhindert so wahrscheinlich die Dimerisierung von Rezeptormonomeren. Dadurch wird die Aktivierung des Rezeptors verhindert, welche im Fall von Herceptin® nicht unterbunden wird. In wie weit Omnitarg® das Wirkungsspektrum von Herceptin® im klinischen Bereich erweitert ist jedoch bislang ungeklärt, da die Wirkung bisher nur in Tumormodellen untersucht wurde.

1.5.2 Tyrosinkinase Inhibitoren als spezifische Krebstherapeutika

Die Verwendung von extrazellulär-bindenden anti-ErbB2 Antikörpern ist jedoch nicht der einzige Ansatz, die Funktion dieser Rezeptoren zu inhibieren. So gibt es eine Reihe von Tyrosinkinase Inhibitoren (TKI), chemische Verbindungen, welche die Tyrosinkinase im zytoplasmatischen Teil blockieren. Der am weitesten entwickelte EGFR-Inhibitor dieser Art ist ZD 1839 (Gefitinib®, Iressa®), der im Jahr 2003 von der amerikanischen FDA (Food and Drug Administration) für die Behandlung von NSCLC (Non-small cell lung cancer) zugelassen wurde. ZD 1839 ist ein 4-Anilinoquinazolin Inhibitor, der die Purinstruktur des ATP imitiert und kompetitiv an die ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinasen bindet. Klinische Studien zeigen, dass allerdings nur etwa 10 % aller EGFR-positiven Patienten auf die Monotherapie ansprechen, mit einer durchschnittlichen Therapiewirkung von sieben Monaten. Die niedrigen Ansprechraten der Therapie haben damit zu tun, dass nur EGFR-überexprimierende Tumoren sensitiv gegenüber der Behandlung sind, die Mutationen in der Kinasedomäne aufweisen⁵⁸. Außerdem sind sehr grosse Inhibitormengen in der Therapie notwendig, da ZD 1839 mit den hohen ATP Spiegeln in der Krebszelle, um die ATP-Bindungsstelle konkurrieren muss. Die nächste Generation der Kinaseinhibitoren, wie CI-1033, inhibiert den EGFR und ErbB2 irreversibel, da sie kovalent in der ATP-Bindungsstelle binden und dadurch ein höheres wachstumsinhibitorisches Potential als ZD 1839 aufweisen. In wie weit sie einen höheren therapeutischen Nutzen haben in diesem Fall jedoch auch noch ungeklärt.

1.5.3 Hsp90-Inhibitoren in der ErbB2 Therapie

Eine weitere Möglichkeit, das Tumorwachstum ErbB2-überexprimierender Krebszellen zu hemmen, liegt in der Verwendung von Hsp90-Inhibitoren wie Geldamycin (Kap. 1.2.7). Es konnte gezeigt werden, dass es durch Geldamycin Behandlung zu einer effektiven Inhibition der

Proteinfaltung des ErbB2-Rezeptors kommt, wodurch dieser abgebaut wird und die Krebszelle ihr Onkoprotein verliert. Dieser Proteinabbau ist jedoch nicht spezifisch für ErbB2 und betrifft alle Klientproteine von Hsp90, wodurch es bei hoher Geldamycin Dosierung zu starken Nebenwirkungen kommt. Es erscheint daher sinnvoll, die wirkungsvolle Rezeptorherunterregulierung von Geldamycin mit der Spezifität von Kinaseinhibitoren zu kombinieren⁵⁹, wodurch additive Effekte in der ErbB2 Inhibition erreicht werden könnten.

1.5.4 Methodik zur Entwicklung neuer potentieller Inhibitoren

Eine alternative Methodik zur Identifizierung potentieller Protein-Inhibitoren bietet das Peptid-Aptamer System. Bei Peptid-Aptameren (griech. Apt = passen, meros = Teil) handelt es sich um Peptide aus 12 bis 42 Aminosäuren, die eine randomisierte Sequenz aufweisen⁶⁰. Die Größe von 12 bzw. 42 Aminosäuren ist nicht willkürlich gewählt, da bereits in verschiedenen Screening Systemen, wie der Phage-Display Methode⁶¹, gezeigt werden konnte, dass diese Größe ausreicht, um Inhibitoren mit Bindungskonstanten im nanomolaren Bereich zu generieren. Um die Halbwertszeit der Peptide zu erhöhen, können sie in Gerüstproteine eingebaut werden, welches es zusätzlich ermöglicht, den Peptiden eine definierte Struktur zu geben. Durch diese definierte Struktur können auch hydrophobe Aminosäuren für Protein-Protein-Interaktionen präsentiert werden, wodurch sich die Anzahl potentieller Bindungspartner beträchtlich erhöht. So ist es beispielsweise dadurch erst möglich hydrophobe Interaktionsstellen zu inhibieren.

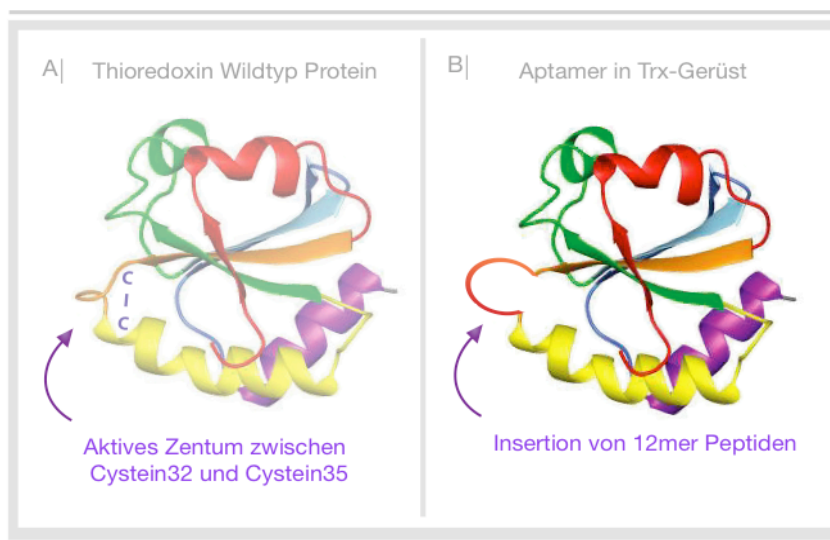


Abb. 1.12 | Struktur des Gerüstproteins Thioredoxin

A| Das Kernprotein des Thioredoxin besteht aus drei parallelen (rot, grün, orange) und zwei antiparallelen β -Faltblättern (blau), die von vier α -Helices umgeben sind; das aktive Zentrum befindet sich zwischen Faltblatt β_2 und Helix α_2 und ist dem umgebenden Medium exponiert; beiden Cysteine im aktiven Zentrum sind durch C-C kenntlich gemacht⁶².

B| Schematische Darstellung der inserierten Peptid-Aptamer.

Als Gerüst-Protein wurde oftmals das bakterielle Thioredoxin verwendet. Thioredoxin wird normalerweise ubiquitär in verschiedenen Organismen exprimiert. So auch in eukaryotischen Zellen und dient dort als Antioxidants, indem es reaktive Sauerstoffverbindungen (z.B. H_2O_2)

reduziert. Es besitzt jedoch auch verschiedene andere Funktionen, die mit Zellproliferation und Apoptose in Verbindung stehen ⁶³.

Das Kernprotein des Thioredoxins (*Abb. 1.12*) besteht aus drei parallelen und zwei antiparallelen β -Faltblättern, die von vier α -Helices umgeben sind. Die redox-aktive Disulfidbrücke im aktiven Zentrum des Proteins (Cys³²-Cys³⁵) ragt aus der dreidimensionalen Struktur heraus. Diese Tatsache war für die Verwendung von Thioredoxin als Gerüstprotein für Peptid-Aptamere von entscheidender Bedeutung. Die Peptid-Aptamere können in das exponierte aktive Zentrum des Thioredoxins kloniert werden, wodurch einerseits die biologische Aktivität des Proteins zerstört wird und andererseits die Peptide für die zu untersuchende Interaktion mit Zielproteinen nach außen präsentiert werden. Eine weitere wichtige Voraussetzung für die Verwendung von Thioredoxin als Gerüst war die Kenntnis der Struktur des Proteins, die durch Röntgenkristall-Strukturanalyse bereits 1975 ermittelt wurde ⁶². Die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur ermöglicht später die biomimetische Verbesserung der selektierten Peptid-Aptamere für die klinische Nutzung.

In einem Hefe Zwei-Hybrid System können Peptid-Aptamere selektiert werden, die spezifisch an die Tyrosinkinasedomäne des ErbB2 Rezeptors binden. Das Hefe Zwei-Hybrid System besitzt den Vorteil, dass es in einem eukaryotischen Organismus durchgeführt wird und daher ermöglicht, Interaktionspartner unter physiologischen Bedingungen zu identifizieren. Die Modifikationen denen die Proteine in diesem System unterliegen, sind ebenfalls denen des menschlichen Organismus ähnlich. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die detektierte Interaktionen in einem Hefe Zwei-Hybrid System sich anschließend in humanen Zellsystemen verifizieren lassen.

1.6 Zielsetzung der Doktorarbeit

1.6.1 Die Notwendigkeit der Anwendung alternativer Strategien zur ErbB2-Inhibition

Die in Kap. 1.4 diskutierten Charakteristika der Überaktivität des ErbB2-Rezeptors zeigen die Chance des Einsatzes von ErbB2-spezifischen Inhibitoren in der modernen Tumormedizin auf. Es wurden bereits verschiedene Ansatzpunkte der ErbB2-Rezeptor Inhibition erwähnt. So gibt es unterschiedliche Antikörper mit verschiedenen Epitopen, welche den Rezeptor im extrazellulären Teil blockieren, wie bereits am Beispiel von Herceptin[®] näher erläutert wurde (Kap. 1.5.1). Für den intrazellulären Teil beschränkt sich die Inhibition des Rezeptors durch verschiedene TKIs auf die Blockade der ATP-Bindungsstelle. Diese konkurrieren somit bei hohen intrazellulären ATP Spiegeln kompetitiv um die Bindung an den Rezeptor, was sich teilweise im niedrigen Wirkungsgrad dieser Pharmaka widerspiegelt (Kap. 1.5.2). Somit besteht aufgrund der relativ niedrigen therapeutischen Wirkung der existierenden Inhibitoren

Optimierungsbedarf in der Inhibition dieses Onkoproteins. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, neue Epitope für die Inhibition des Rezeptors zu finden, um mit Hilfe eines größeren Therapiespektrums, eine bessere ErbB2-spezifische Tumorbehandlung zu ermöglichen.

1.6.2 Ein System zur Isolation von potentiellen ErbB2-Inhibitoren

Mit Hilfe einer neuen Strategie der ErbB2-Inhibitorisolation sollten die bisherigen ErbB-Inhibitoren um eine Substanzklasse erweitert werden. Hierbei wurde das Aptamer-System verwendet, um aus einer randomisierten Peptid-Bibliothek, Aptamere zu isolieren, die mit einer hohen Affinität, spezifisch mit ErbB2 interagieren und in der Lage sind den Rezeptor zu inhibieren.

Für die Analyse von Protein-Protein Interaktionen stehen verschiedene Screening Systeme zur Verfügung. Für diesen Ansatz wurde das Hefe Zwei-Hybrid System ausgewählt, da es sich hierbei um ein einfaches eukaryotisches Screening System handelt, in dem sich Interaktionspartner unter physiologischen Bedingungen untersuchen lassen (Kap. 1.5.4). Dieses Screening System sollte auf zwei verschiedene Wege weiter optimiert werden. Zum einen galt es, die Transformationseffizienz in Hefen zu erhöhen, um eine größere Anzahl an potentiellen Inhibitoren screenen zu können. Zum anderen sollte die Aptamer-Bibliothek durch Neuklonierung optimiert werden, um mit Hilfe einer qualitativ hochwertigen Peptidbank die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, hochaffine ErbB2-Interaktionspartner zu isolieren. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollten die isolierten Aptamere in humanen Zelllinien auf ihr ErbB2-inhibitorisches Potential untersucht werden. Hierbei galt es sowohl den Mechanismus der Inhibition des Onkoproteins, als auch die Effekte auf das Wachstum von Krebszellen zu verifizieren. Neben Transfektion von Aptamer-kodierenden Plasmiden, sollte über den Einsatz von transduzierbaren Peptiden eine Möglichkeit der Aptamer-Applikation für eine effektive intrazelluläre Aptamer-Anreicherung erprobt werden.

1.6.3 Applikationsmöglichkeiten von Aptameren für mögliche klinische Anwendungen

Aptamere sind gegen intrazelluläre Proteine gerichtet, können jedoch die Zellmembran nicht penetrieren. Um jedoch eine spätere klinische Anwendung zu ermöglichen, sollten die Aptamere in der Lage sein, sich intrazellulär anzureichern. In dieser Arbeit wurde daher verschiedene Transduktionsmechanismen gewählt, um den Aptameren eine intrazelluläre Wirkung zu ermöglichen.

Die Lentivirale Transduktion (LT) erfolgt durch die Transduktion der Aptamer-DNA in einem lentiviralen Expressionsvektor. In einer speziellen Zelllinie wird der lentivirale Vektor mit Aptamerkonstrukten in replikationsinkompetente Viruspartikel verpackt, die in der Lage sind,

eukaryotische Zielzellen zu infizieren. Dort kann sich die virale DNA in das eukaryotische Genom integrieren und ermöglicht so eine stabile, dauerhafte Expression der Aptamer-Proteine. Diese Art der Transduktion erfolgt bei hohen Viruskonzentrationen mit annähernd 100 %, wodurch die Aptamer-Funktionsanalyse unter optimalen Bedingungen durchgeführt werden kann.

Die Applikation von Viren als Therapeutikum birgt jedoch Risiken. So ist die DNA-Insertion ins humane Genom nach viraler Transduktion nicht sequenzspezifisch, sondern von der translationalen Aktivität dieses Genomabschnitts abhängig. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass durch die virale Integration von Protoonkogenen der Virus zur Krebsentstehung beiträgt. Da die virale Infektion alle Zellen betrifft und es sich um eine stabile Expression handelt, wird das Risiko der Krebsentstehung nochmals erhöht. Es gibt verschiedene Strategien, dieses Problem zu umgehen, bisher lässt sich allerdings virus-induzierte Krebsentstehung nicht völlig ausschließen. Auf diese Weise bleibt die Verwendung von Viren als Therapeutikum auf spezielle Applikationen in der Gentherapie beschränkt und sollte in dieser Arbeit nur als Mittel der Aptamer-Funktionsanalyse verwendet werden.

Die Proteintransduktion (PT) ist ein Mechanismus, der noch nicht vollständig verstanden wird. Proteine, wie das HIV-Protein Tat, welche eine Proteintransduktionsdomäne (PTD) besitzen, können über eine Form der Macropinozytose in die Zelle gelangen⁶⁴ (Abb. 1.13).

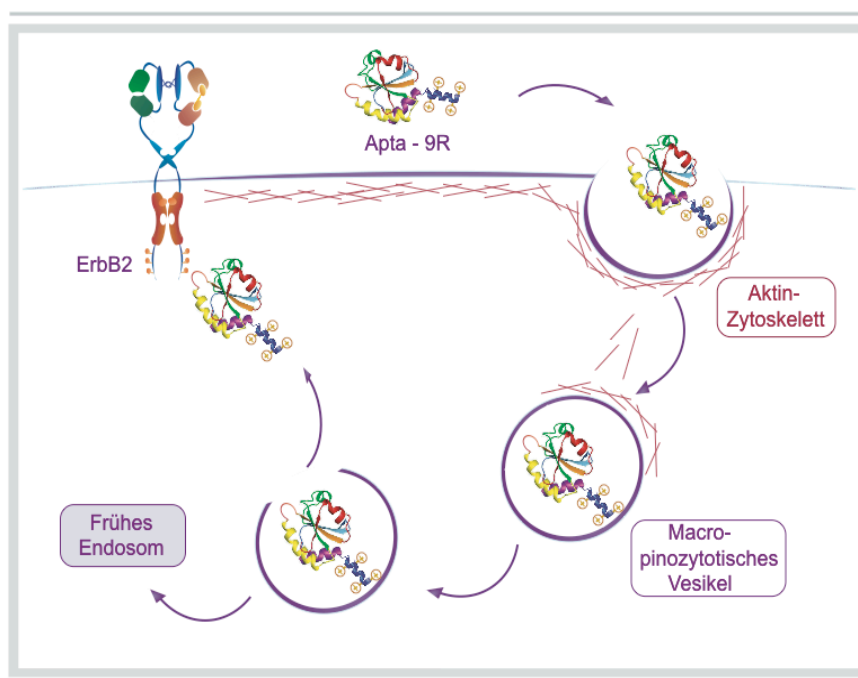


Abb. 1.13 | **Mechanismus der Proteintransduktion**

Die basische (+) PTD ermöglicht den Proteinen eine Interaktion mit der Zellmembran. Über den Aktin-vermittelten Prozess der Macropinozytose können die Proteine dann in die Zelle gelangen. Um die volle Funktion zu erlangen, müssen PTD-Proteine die Vesikel verlassen, ansonsten werden sie in Lysosomen abgebaut.

Die Peptidsequenzen in diesen PTDs bestehend aus minimal 9 Aminosäuren, sind hauptsächlich basischer Natur und scheinen mit negativen Ladungen von Heparinsulfatproteoglykanen auf der Zellmembran interagieren zu können. Die Interaktion mit diesen Glykanen führt zu einer Aktin-vermittelten Endozytose der Proteine. Die Proteine gelangen über einen bisher ungeklärten Mechanismus aus den macropinozytischen Vesikeln,

bevor sie das frühe Endosom erreichen. Freigesetzt ins Zytoplasma können sie an den Wirkort gelangen, im vorliegenden Fall an die Tyrosinkinasedomäne des ErbB2 Rezeptors. Da der Prozess der Macropinozytose von jeder Körperzelle durchgeführt wird, erlaubt die PT die Aufnahme von Proteinen mit 100 % Effizienz innerhalb von wenigen Minuten. Ein weiterer Vorteil ist die transiente Applikation. Da das Therapeutikum nicht stabil in das menschliche Genom integriert, ist die Anwendung der Aptamere als rekombinantes Protein risikofreier im Vergleich zur viralen Transduktion.

1.6.4 Zielsetzung der Doktorarbeit

Die Zielsetzung der Arbeit bestand in der Isolation von ErbB2-interagierenden Peptid-Aptameren in einem physiologischen Screening System. Die isolierten Aptamere sollten zur funktionalen Charakterisierung durch lentivirale- und Protein-Transduktion in Zielzellen eingebracht werden, um dort ErbB2-inhibitorische Effekte analysieren zu können. Die inhibitorischen Effekte der Aptamere sollten ferner mit Effekten bereits in Verwendung befindlicher ErbB2-Inhibitoren verglichen werden, um die Ergebnisse des verwendeten Aptamer-Ansatzes bewerten zu können. Dieser Vergleich sollte auch zeigen, ob Peptid-Aptamere sich als Alternative Strategie zur bisherigen ErbB2-Therapie anwenden lassen. Wie bereits erwähnt, ist die spezifische ErbB2-Therapie durch Verwendung unterschiedlicher Substanzklassen (Monoklonale Antikörper, TKI, usw.) weit fortgeschritten. Dennoch bieten die bisherigen Therapieansätze nicht die gewünschten Erfolgsraten am Patienten, so dass alternative Therapieformen von Nutzen sind. Das Peptid-Aptamer System bietet einen solchen alternativen Ansatz, indem es durch Interferenz mit jeglichen intrazellulären Protein-Protein Interaktionen in der Lage ist, neue Inhibitorklassen zu schaffen.

2 Material & Methoden

2.1 Verwendetes Arbeitsmaterial

2.1.1 Chemikalien und Materialien

1 kb DNA-Leiter	BioLabs, Frankfurt am Main
100 bp DNA-Leiter	BioLabs, Frankfurt am Main
2-Butanol	Merck, Darmstadt
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
3-AT (aminotriazol)	Sigma, Steinheim
Acrylamidlösung mit 0,8 % Bisacrylamid (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Adeninsulfat	AppliChem, Darmstadt
Agarose	PeqLab, Erlangen
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt
Antipain	Sigma, Steinheim
Aprotinin	Sigma, Steinheim
APS	Sigma, Steinheim
Benzamidine	Sigma, Steinheim
Bradford-Reagenz	BIO-RAD, München
Bromophenol blau	Fluka, Buchs (CH)
DMSO (Dimethyl Sulfoxid)	Merck, Darmstadt
DOBA	BIO 101, Carlsberg (USA)
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Steinheim
ECL-Lösung 1 + 2	AmershamPharma, Freiburg
Emerald™ Tropix	Bredford, MA
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidium Bromid	Sigma, Steinheim
FCS (Fetal Calf Serum)	Gibco, Karlsruhe
Glyzerol	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	AppliChem, Darmstadt
IPTG	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	AppliChem, Darmstadt
KCl	Roth, Karlsruhe
Leupeptin	Sigma, Steinheim
Lithium Acetat	Sigma, Steinheim
MgCl ₂	Fluka, Buchs (CH)
Milchpulver	Ja, Köln
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaOH	AppliChem, Darmstadt
PAO (Phenylarsinioxid)	Sigma, Steinheim
Pefabloc	Sigma, Steinheim
PEG 4000	AppliChem, Darmstadt
Pepstatin	Sigma, Steinheim
PMS (Phenazinmethosulfat)	AppliChem, Darmstadt
Roti [®] -Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
TEMED	Sigma, Steinheim
Tris	AppliChem, Darmstadt
Triton-X 100	Fluka, Buchs (CH)
Tween 20	Fluka, Buchs (CH)
Uracil	Sigma, Steinheim
XTT (Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid)	AppliChem, Da
Zeocin™	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.2 Lösungen und Puffer

Anodenpuffer I:	300 mM Tris-HCl (pH 10,4) 20 % Methanol (v/v)	
Anodenpuffer II:	25 mM Tris-HCl (pH 10,4), 20% Methanol (v/v)	
Coldfish-Gelatine Blocking Solution:	0,5 % Coldfish gelatine (45%) = 1,1 ml/100ml BS; 0,1 % Ovalbumin = 0,1 g/100 ml BS; ad 100 ml PBS	
Comassielösung:	0,08% Coomassie G250 in 1,6% Phosphorsäure 8% Ammoniumsulfat 20 % Methanol	
DNA-Gel Ladepuffer (6x):	15 % Ficoll 25 mM EDTA Spatelspitze Bromphenolblau	
Kathoden-Puffer:	25 mM Tris-HCl pH 10,4 20 % Methanol 40 mM ϵ -Aminocapronsäure	
LiAc/TE/PEG:	100 mM LiAc pH7,5 (<i>steril filtriert</i>) 4 mM Tris-Acetat 100 mM EDTA 37 % PEG 4.000	
Lösung 1 für Chemokompetenz:	100 mM RbCl ₂ 50 mM MnCl ₂ 30 mM KaAc 10 mM CaCl ₂ 13 % Glycerol (v/v)	<i>pH 5,8; sterilfiltrieren</i>
Lösung 2 für Chemokompetenz:	10 mM MOPS (pH 7,0) 10 mM RbCl ₂ 75 mM CaCl ₂ 13 % Glycerol (v/v)	<i>pH 7,0; sterilfiltrieren</i>
Luciferase-Lysispuffer:	1 % Triton X 100 25 mM Glycylglycin (4°C) 15 mM MgSO ₄ 4 mM EGTA ad 200 ml dH ₂ O	Frisch hinzugeben: 1 ml/ml DTT
Luciferin:	2,97 g Glycylglycin 2,7 g ATP add 50 mg Luciferin (Promega) ad 900 ml dH ₂ O cave. light sensitive	adjust to pH 7,8
β -Gal Reaktionsbuffer:	100 mM Na-phosphate (pH 8,0) 1 mM MgCl ₂ 1x Galacton (4°C) ad 3 l dH ₂ O	
β -Gal Verstärker:	10 % Emerald (4°C) 0,2 M NaOH ad 10 ml dH ₂ O	
Lysispuffer (Bakterien):	50 mM Tris pH 7,5	<i>frisch hinzugeben:</i>

	5 mM EGTA 150 mM NaCl	10 µg/ml Leupeptin 10 µg/ml Aprotinin 1 mM Pefabock
Lysispuffer (Hefe):	100 mM Tris pH 8 1 mM EDTA 5 mM Mg Cl ₂ 20 % Glyzerol 0,1 % Triton-X 100	<i>frisch hinzugeben:</i> 0,1 M Mercapto-EtOH 1 mM Pefabloc 1 µg/ml Leupeptin 1 µg/ml Pepstatin
NP40-Lysispuffer:	20 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl 1 mM MgCl ₂ 1 % Nonidet-P40 10 % Glycerol	<i>frisch hinzugeben:</i> 1 mM NaVO ₃ 1 mM NaF 4 mg/ml PIC 5 mM Na ₄ Pyrophosphat
NP40-Waschpuffer:	20 mM HEPES pH 7,4 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % Nonidet-P40	<i>frisch hinzugeben:</i> 1 mM NaVO ₃ 1 mM NaF 4 mg/ml PIC 5 mM Na ₄ Pyrophosphat
PBS (1x):	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄	
RIPA:	50 mM Tris pH 8 150 mM NaCl 0,5 mM EDTA 1 mM DTT 1 % NP40 0,5% Na-desoxycholat 0,1 % SDS	<i>frisch hinzugeben:</i> 100 µl/ml Pefabloc 1 µg/ml Aprotinin 2 µg/ml Leupeptin 100 µM NaVa
SDS-PAGE Laufpuffer:	25 mM Tris 192-250 mM Glycin 0,1 % SDS	
SDS-PAGE Ladebuffer (5x):	100 mM Tris pH 6,8 200 mM DTT 4 % SDS 20 % Glyzerol 0,2 % Bromphenolblau	
TE (10x):	40 mM Tris-Acetat 1 M EDTA	
TBS (1x):	90 mM Tris-Borat 2 mM EDTA	
TBS-T:	TBS mit 0,05% Tween 20	
Tris Puffer:	1M pH 8,0; 1 M pH 8,6 und 1 M pH 6,6	
Triton-X 100 Puffer:	50 mM Tris pH 7,5 5 mM EGTA 150 mM NaCl 1 % Triton-X 100	<i>frisch hinzugeben:</i> 20 µM PAO 1 mM Pefabloc 10 µg/ml Leupeptin

2.1.3 Plasmide

2.1.3.1 Hefe-Expressionsplasmide

Name	Insert Resistenz	Referenz
pPC97 ErbB2 CT, KD _g , I, II	Bait-Konstrukte (Kinasedomäne des ErbB2) fusioniert mit Gal4 DNA-Bindungsdomäne amp; leu	Diese Arbeit
pGBKT ErbB2 KD _g	Bait-Konstrukte (Kinasedomäne des ErbB2) fusioniert mit Gal4 DNA-Bindungsdomäne amp; trp	Diese Arbeit
pAD Trx 20mer Bibliothek	20 mer Peptid-Aptamer Bibliothek inseriert in das Thioredoxingen mit Gal4-Aktivierungsdomäne amp; trp	F.Hoppe-Seyler, Heidelberg
pAD TrxL 12mer Bibliothek	12mer Peptid-Aptamer Bibliothek inseriert in das Thioredoxingen mit Gal4-Aktivierungsdomäne amp; trp	Diese Arbeit
pGAD linear 12mer Bibliothek	Lineare 12mer Peptid-Aptamer Bibliothek mit Gal4-Aktivierungsdomäne amp; leu	Clontech
pLam5	Humanes LaminC fusioniert mit Gal4 DNABindungsdomäne Matchmaker Yeast-Zwei-Hybrid Sytem amp; leu	Clontech
pTDI	Großes T-Antigen fusioniert mit Gal4Aktivierungsdomäne Matchmaker Yeast-Zwei-Hybrid Sytem amp; trp	Clontech

2.1.3.2 Bakterielle Expressionsplasmide

Name	Insert Resistenz	Referenz
pGex 4T3-Trx	GST fusioniert mit TrxA amp	F.Hoppe-Seyler, Heidelberg
pGex 4T3-KDI 1-3	GST fusioniert mit verschiedenen PeptidAptameren gegen ErbB2 KDI amp	Diese Arbeit
pGex 4T3-KDII 1-4	GST fusioniert mit verschiedenen PeptidAptameren gegen ErbB2 KDII amp	Diese Arbeit
pGex 4T3-KD _g 12.1	GST fusioniert mit PeptidAptamer gegen ErbB2 KD _g amp	Diese Arbeit
pET30a+-Trx-9R	Thioredoxin A mit 9 Arginin-PTD, His-Tag und T7-Promotor kan	Diese Arbeit
pET30a+-KDI1-9R	Aptamer 1 gegen KDI mit 9 Arginin-PTD, His-Tag und T7-Promotor kan	Diese Arbeit
pET30a+-KDII2-9R	Aptamer 2 gegen KDII mit 9 Arginin-PTD, His-Tag und T7-Promotor kan	Diese Arbeit
pET30a+-KD _g 12.1-9R	Aptamer 1 gegen KD _g mit 9 Arginin-PTD, His-Tag und T7-Promotor	Diese Arbeit
pFlag2-Trx-9R	Thioredoxin A mit 9 Arginin-PTD, His-Tag und Tac-Promotor amp	Diese Arbeit
pFlag2-KDI1-9R	Aptamer 1 gegen KDI mit 9 Arginin-PTD, His-Tag und Tac-Promotor amp	Diese Arbeit
pFlag2-KDII2-9R	Aptamer 2 gegen KDII mit 9 Arginin-PTD, His-Tag und Tac-Promotor amp	Diese Arbeit
pFlag2-KD _g 12.1-9R	Aptamer 1 gegen KD _g mit 9 Arginin-PTD, His-Tag und Tac-Promotor amp	Diese Arbeit

2.1.3.3 Eukaryotische Expressionsplasmide

Name	Insert Resistenz	Referenz
pRC/CMV-VP22-Trx	CMV Promotor; VP22-PTD fusioniert mit Thioredoxingen amp; G418	F. Hoppe-Seyler, Heidelberg
pRC/CMV-VP22-KDI I	CMV Promotor; Peptid-Aptamere 1 gegen KD I fusioniert mit VP22-PTD amp; G418	Diese Arbeit
pRC/CMV-VP22-KDII2	CMV Promotor; Peptid-Aptamere 2 gegen KD II fusioniert mit VP22-PTD amp; G418	Diese Arbeit
pRC/CMV-VP22-KD _g 12.1	CMV Promotor; Peptid-Aptamere 1 gegen KD _g fusioniert mit VP22-PTD amp; G418	Diese Arbeit
pRC/CMV-Flag-hTrx-WT-Socs	CMV Promotor; Humanes Thioredoxin-Socsbox Fusionsprotein mit Flag-Tag	Diese Arbeit
pRC/CMV-Flag-hTrx-KDII2-Socs	CMV Promotor; Peptid-Aptamere 2 gegen KD II in humanem Thioredoxin fusioniert mit Socs-Box	Diese Arbeit
pSiEW	Lenitviraler Vektor mit SFFV Promotor und EGFP Expression über IRES	M. Grez; Frankfurt
pSiEW-Flag-bTrx-WT	Lenitviraler Vektor mit SFFV Promotor getriebener Trx Expression und EGFP Expression über IRES	Diese Arbeit
pSiEW-Flag-bTrx-KD _g 1 I	Lenitviraler Vektor mit SFFV Promotor getriebener KD 1 I Expression und EGFP Expression über IRES	Diese Arbeit
pSiEW-Flag-bTrx-KD II7	Lenitviraler Vektor mit SFFV Promotor getriebener KD II7 Expression und EGFP Expression über IRES	Diese Arbeit
pSiEW-Flag-hTrx-KD 1 I	Lenitviraler Vektor mit SFFV Promotor getriebener KD 1 I Expression und EGFP Expression über IRES	Diese Arbeit
pSiEW-Flag-hTrx-KD II7	Lenitviraler Vektor mit SFFV Promotor getriebener KD II7 Expression und EGFP Expression über IRES	Diese Arbeit
pM2	Expressionsvektor für rTA	M. Grez, Frankfurt
pBI-EGFP	Tet-response Vektor mit bizystronischem CMV _{min} Promotor getriebener EGFP Expression	Clontech
pBI-EGFP-Trx	Tet-response Vektor mit bizystronischem CMV _{min} Promotor getriebener Trx und EGFP Expression	Diese Arbeit
pBI-EGFP-KD II7	Tet-response Vektor mit bizystronischem CMV _{min} Promotor getriebener KD II7 und EGFP Expression	Diese Arbeit

2.1.4 PCR-Primer

2.1.4.1 Primer für Hefe-Expressionsplasmide

Nr.	Name	Sequenz
P1	pPC-KDI-Sal-5'	tat gtc gac ctg gcc atc aaa gtg ctt gg
P2	pPC-KDI-Not-3'	tat gcg gcc gca gct gac cag cac gtt ccg agc ggc
P3	pPC-KDII-Sal-5'	tat gtc gac caa gag tcc caa cca tgt c
P4	pPC-KDII-Not-3'	tat gcg gcc gca cac aaa gcg ctg ggg gtc cc
P5	pPC-CT-Sal-5'	tat gtc gac cag cag aag atc cgg aag tac acg
P6	pPC-CT-Not-3'	tat gcg gcc gca gcc ctg ctg ggg tac cag ata ctc

Nr.	Name	Sequenz
P7	Trx-Linker sense	ttt ttt cgg tcc ggg ttt ggc cca tgg tta tgt taa cgg ggc tcg agg tgg cgg tcc gtt ttt
P8	Trx-Linker antisense	aaa aaa cgg acc gcc acc tcg agc ccc gtt aac ata acc atg ggc caa acc cgg acc gaa aaa
P9	Template 12mer Bibliothek	tat atc cat ggt 557 557 557 557 557 557 557 557 557 557 557 557 gct cga ggt tat ata aaa aag cgc gcg ctt ttt tgc gcg cgc

2.1.4.2 Primer für bakterielle Expressionsplasmide

Nr.	Name	Sequenz
P10	pET-Trx-Eco-5'	ttt gaa ttc cat atg agc gat aaa att att cac
P11	pET-Trx-Eco-3'	Ttt gaa ttc ggc cag gtt agc gtc gag
P12	pFlag-Xba-5'	cta gtc tag act agc tag cca tat gag cga taa aat tat tca
P13	pFlag-Bgl-3'	gga aga tct tca gtg gtg gtg gtg gtg gtc ctc gac cat atg cgg

2.1.4.3 Primer für eukaryotische Expressionplasmide

Nr.	Name	Sequenz
P14	pBi-EGFP-Mlu-5'	cga cgc gta tga cct ctc gcc gct ccg tga agt cgg g
P15	pBi-EGFP-Nhe-3'	cta gct agc cta ggc cag gtt agc gtc gag gaa ctc ttt caa ctg acc
P16	pSiEW-Sac-5'	tccccgcgatggattacaaggacgacgatgacaagacgctagcgataaaaattattcacctgactgacgac
P17	pSiEW-Sac-3'	tccccgcgcatatgctaggccagggttagcgtcgaggaactc

2.1.5 DNA-Restriktions- und DNA-modifizierende Enzyme

Die Enzyme wurden, wenn nicht anders vermerkt, von der Firma NewEngland BioLabs, Schwalbach verwendet.

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Primärantikörper

Spezifität Epitop	Isotyp	Hersteller
AKT	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling
EGFR	Kaninchen, Monoklonal	Santa Cruz (Sc-03)
EGFR	Maus, Monoklonal	Santa Cruz (Sc-120)
ErbB2 extrazellulär	Maus, monoklonal	Santa Cruz (Sc-120)
ErbB2 C-Terminus	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz (Sc-284)
ErbB2, FSP77	Maus, monoklonal	AG Wels
M2 Flag-Tag	Maus, monoklonal	Sigma

Spezifität Epitop	Isotyp	Hersteller
Gal4-DNA-Bindedomäne	Maus, monoklonal	NEB
His-Tag	Maus, monoklonal	Qiagen
pAKT Ser473	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling
pTyr,	Maus, monoklonal	Cell Signaling
Thioredoxin	Kaninchen, polyklonal	Sigma
Tubulin	Rabbit, polyklonal	Sigma

2.1.6.2 Sekundärantikörper

(A) Für Western Blot

Spezifität	Isotyp	Hersteller
α Kaninchen-HRP	Ziege, polyklonal	Amersham Biosciences
α Maus-HRP	Ziege, polyklonal	Amersham Biosciences

(B) Für Immunfluoreszenzfärbung

Spezifität	Isotyp	Hersteller
Alexa 488 α Kaninchen	Ziege, polyklonal	Molecular Probes
Alexa 546 α Kaninchen	Ziege, polyklonal	Molecular Probes
Alexa 594 α Kaninchen	Ziege, polyklonal	Molecular Probes
Alexa 633 α Kaninchen	Ziege, polyklonal	Molecular Probes
Alexa 488 α Maus	Ziege, polyklonal	Molecular Probes
Alexa 546 α Maus	Ziege, polyklonal	Molecular Probes
Alexa 633 α Maus	Ziege, polyklonal	Molecular Probes

2.2 Verwendete Zellen und ihre Anzuchtmethoden

2.2.1 Verwendeter Hefe-Stamm

Stamm	Genotyp	Referenz
KFI	MATa <i>trp1-901 leu2-3,112 his 3-200 gal4D gal80D LYS2::GAL1-HIS3 GAL2ADE2 met2::GAL7-lacZ SPAL10-URA3</i>	Butz, Denk <i>et al.</i> , 2000 ⁶⁵

2.2.2 Verwendete Bakterienstämme

Name	Verwendung	Genotyp
BI21 lysS	Proteinexpression	F- <i>ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm</i> (DE3) pLysS (CamR)
BI21 Codon+	Proteinexpression	F- <i>ompT hsdS(rB- mB-) dcm+ Tetr gal endA Hte [argU ileY leuW Camr]</i>
DHI0B	Elektroporation	F- <i>mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74 recA1 endA1 ara139 (ara, leu)7697 galU galK - rpsL (StrR) nupG</i>
Stb12	Virale Vektoren Ampl.	F- <i>mcrA (mcrBC-hsdRMS-mrr) recA1 endA1 lon gyrA96 thi supE44 relA1 - (lac-proAB)</i>
Top10	Virale Vektoren Ampl.	F- <i>mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74 recA1 ara139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>
XLI blue	Transformationen	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac F'proAB lacIqZDM15</i>

2.2.3 Unterschiedliche Säugerzelllinien

Name	Herkunft	ATCC-Nr.
A431	Epidermale Brustkrebszelllinie, isoliert von soliden Tumoren einer 85 Jahre alten Frau A-431, durch D.J. Giard, et al. Kultiviert in DMEM 10 % ++	CRL-1555
HEK 293T	Humane embryonale Nierenzellen transduziert mit SV40 large T antigen. Kultiviert in DMEM 10 % ++	CRL-11268
MCF7	Epitheliale adenokarzinoma Zellen, die verschiedene Charakteristika von differenziertem Brustepithelium besitzen, einschließlich der Fähigkeit Östradiol umzusetzen. Kultiviert in DMEM 10 % ++	HTB-22
MDA MB 453	MDA-MB-453 wurden 1976 von R. Cailleau <i>et al</i> von einer 48 Jahre alten Frau mit metastasierendem Brustkarzinom isoliert, welches ferner Lymphknoten, Hirn und Atemweg Metastasen aufwies. Kultiviert in DMEM 10 % ++	HTB-131
NIH 3T3	Bei NIH 3T3 Zellen handelt es sich um murine embryonale Fibroblasten. Kultiviert in DMEM 10 % ++	CRL-1658
NIH#3.7	NIH 3T3 Zellen stabil mit einem konstitutiv-aktiven ErbB2 Rezeptor (aktiv durch Punktmutation in der Transmembrandomäne) stabil-transfiziert. Kultiviert in DMEM 10 % ++ mit G418 (0,5 mg/ml)	--
Renca IZ EGFR bzw. ErbB2	Bei Renca-Zellen handelt es sich um Nierenkarzinom-Zellen von BALB/C-Mäusen, die spontan entstanden sind und 1973 isoliert wurden. Die Zellen wurden stabil mit ErbB2 bzw. EGFR transfiziert und in RPMI Medium mit Zeocin (0,25 mg/ml) und G418 (0,5 mg/ml) kultiviert. Zeocin wurde als Selektionsmarker für das lacZ Gen verwendet. G418 diente als Selektionsmarker für den EGFR bzw. ErbB2.	--
SKBr3	Bei SKBR3-Zellen handelt es um eine Brustkrebszelllinie, mit überexprimierten ErbB2-Rezeptor, die von einer kaukasischen Frau (Alter 43) mit Blutgruppe A. Die Zellen wurden in DMEM 10 % ++ kultiviert.	HTB-30

2.2.4 Anzuchtmethoden

2.2.4.1 Lösungen und Medien für *S. cerevisiae* Zellen

SD (Synthetic Dropout)-Medium:	1,7g YNB (Yeast Nitrogen Base) 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,59 g CSM
YPDA-Medium:	YPD-Medium der Firma Bio101 mit 10 mM Adenin

Die Medien wurden autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.

Die Anzucht der Hefen erfolgte in den entsprechenden Voll- oder Selektionsmedien bei 30°C für 24-40h. Die langfristige Lagerung erfolgte bei -80°C in YPDA-Medium mit 50% Glycerin.

2.2.4.2 Lösungen und Medien für *E. coli* Stämmen

LB-Medium	10 g	Bacto-Trypton
(Luria-Bertani)	5 g	Hefe-Extrakt
	10 g	NaCl (für Agarplatten 15 g Bacto-Agar dazugeben)
	ad 1 l	H ₂ O pH 7,0 mit 5 N NaOH eingestellt

Das Medium wurde autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.

SOC-Medium:	20 g	Bacto-Trypton
	5 g	Hefe-Extrakt
	0,5 g	NaCl
	10 ml	250 mM KCl
	ad 970 ml	H ₂ O pH 7,0 mit 5 N NaOH eingestellt

Das Medium wurde autoklaviert und mit 10 ml 1 M MgCl₂ und 20 ml 1 M Glucose (steril filtriert) vervollständigt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Mit Plasmiden transformierte *E.coli*-Stämme wurden über Nacht bei 37 °C und 200 upm in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (Boehringer, Mannheim) angezogen.

Die langfristige Lagerung erfolgte in 50 % Glycerin bei -80°C.

2.2.4.3 Lösungen und Medien für Säugerzellen

DMEM 10 % ++

Es wurde das DMEM (Dulecco's modified Eagle medium) Medium der Firma Gibco verwendet. Dem Medium wurden 10% hitzeinaktiviertes FCS (Fetal Calf Serum), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugegeben. FCS wurde zur Inaktivierung des Komplements vor Gebrauch 30 min. auf 56°C erhitzt.

RPMI

Das RPMI (Roswell Park Memorial Institute) Medium wurden analog zum DMEM Medium mit 10 % hitzeinaktiviertes FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und und 100 µg/ml Streptomycin vervollständigt.

OptiMEM

Das OptiMEM Medium der Firma Gibco wurde als serumreduziertes Medium für Lipofectamin2000 Transfektionen verwendet.

Die Säugerzellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ in der Atmosphäre kultiviert und alle 2-3 Tage mit Medium versorgt. Nachdem die Zellen bis zur Konfluenz gewachsen waren, wurden sie mit 1 ml Trypsin/EDTA pro Platte für 10 min inkubiert und in geeigneter weise verdünnt.

Die langfristige Lagerung erfolgte in FCS, welches 10 % DMSO beinhaltet bei -80 °C.

2.3 Molekularbiologische Methoden

Falls nicht anders vermerkt, wurden gängige Methoden sowie die Rezepte für Puffer aus Sambrook *et al.*, 1989, entnommen. Etwaige Modifikationen sind an entsprechender Stelle vermerkt.

2.3.1 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Spezifische DNA-Segmente wurden mit einem GeneAmp 9600 Thermocycler (Perkin Elmer, Weiterstadt) nach folgendem Ansatzschema amplifiziert (35):

PCR-Schema für Gen-Amplifikation bis 1 kb:

1 µl	dNTP-Mix (10 mM je Nukleotid)
25 pmol	je Primer (Sequenz der verwendeten Primer siehe Ergebnisteil)
0,5 µl	Native Ampli-Taq-Polymerase (Invitrogen)
5 µl	10x Ampli-Taq-Puffer (Invitrogen)
2 µl	MgCl ₂ (50 mM)
10 ng	Template-DNA
Ad 50 µl	dH ₂ O

PCR-Schema für Gen-Amplifikation über 1 kb:

1 µl	dNTP-Mix (10 mM je Nukleotid)
25 pmol	je Primer (Sequenz der verwendeten Primer siehe Ergebnisteil)
0,5 µl	Pfx-Platinum Polymerase (Invitrogen)
5 µl	10x Ampli-Taq-Puffer (Invitrogen)
5 µl	10x Enhancer Puffer (Invitrogen)
1 µl	MgSO ₄ (50 mM)
10 ng	Template-DNA
Ad 50 µl	dH ₂ O

Die Reaktion wurde in MikroAmpReaktionsgefäßen (Perkin Elmer) nach einminütigem Erhitzen auf 94°C folgendem Temperaturzyklus unterworfen:

1 min	95 °C	(Denaturierung der doppelsträngigen DNA)
0,5 min	62-72 °C	(Hybridisierung der Primer an Template, 5° unter T _m der Primer)
0,5-2 min	72°C	(Synthese: 1 min pro kb zu amplifizierende DNA)

Es erfolgten 30-40 Zyklen, die durch eine abschließende 10 min Synthesephase bei 72°C abgeschlossen wurden.

Bei schwierigen PCR Versuchen wurde eine „Touch-up“ PCR-Technik verwendet:

1 min	95 °C	(Denaturierung der doppelsträngigen DNA)
0,5 min	45°C	bei Schritt 1 (Temperatur 20 °C unter der T _m des Primers); dann plus 0,1-1 °C für jeden weiteren Schritt
0,5-2 min	72°C	(Synthese: 1 min pro kb zu amplifizierende DNA)

Es folgten 20-40 Zyklen und im Fall von 20 Zyklen eine weitere 3-Schritt PCR wie sie oben beschrieben wird

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, analysiert und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) aus dem Gel eluiert.

2.3.2 Enzymatische Behandlung der DNA

2.3.2.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen – der Restriktionsverdau

Doppelsträngige DNA kann durch Restriktionsendonukleasen an, für diese Nukleasen spezifischen Sequenzmotiven, geschnitten werden. Dazu wurden 1-10 Einheiten des jeweiligen Enzyms pro μg DNA in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer (New England BioLabs, USA) eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 1-16 h bei der vom Hersteller empfohlenen Inkubationstemperatur (meist 37°C). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 6x DNA-Ladepuffer abgestoppt, welcher gleichzeitig die Dichte der Probe erhöhte, so dass die Auftragung in Geltaschen erleichtert wurde.

2.3.2.2 Dephosphorylierung von DNA-5'Enden

Um die Selbstligation von linearisierten Vektoren in den nachfolgenden Klonierungen zu verhindern, wurden im Anschluss an den Restriktionsverdau 1-2 units Alkalische Phosphatase (New England BioLabs) pro μg DNA zugeben und für 0,5 h bei 37°C inkubiert. Die Alkalische Phosphatase entfernt 5'Phosphatgruppen, so dass eine Ligation nur noch mit dem Insert erfolgen kann, was die Ligationseffizienz erheblich erhöht.

2.3.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese (36) wurde zur Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten und zur Reinigung von PCR-Produkten eingesetzt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente zur Anode ist dabei proportional zur Größe, welche anhand eines DNA-Längenstandards (100 bp bzw. 1 kb-Leiter von GIBCO BRL, Eggenstein) abgeschätzt werden kann.

Es wurden 1%ige TAE-Gele verwendet (Auftrennungsbereich 0,5-6 kb), die mit 0,02 % (v/v) Ethidiumbromid versetzt wurden, welches in die DNA interkaliert und unter UV-Bestrahlung Licht emittiert. Der Gellauf erfolgte in Biorad Minikammern in 1xTAE-Puffer bei einer kontinuierlichen Spannung von 40-80 mV. Anschließend wurden die Fragmente unter UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht und mit einer Videokamera photographiert.

2.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation wurden verschiedene molare Verhältnisse von dephosphoryliertem Vektor und einzufügendem Insert eingesetzt (1:2 bis 1:10). Die Ligation erfolgte mit 1 µl T4-DNA-Ligase (New England BioLabs: 40 U/µl) in 10x Ligase-Puffer in einem 20 µl Gesamtansatz bei 16°C für 4-16 h.

Die Hälfte des Ligationsansatzes wurde anschließend für die Transformation von *E.coli* eingesetzt.

2.3.5 Transformation von Plasmiden in *E.coli* Zellen

Um neuklonierte Plasmide zu selektieren und zu vervielfältigen wurden sie in Bakterien eingebracht werden, eine Methodik die als Transformation bezeichnet wird.

2.3.5.1 Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Zellen

A) Chemokompetente Zellen (XL1-blue; HB 101, Stbl2, Top10, SURE):

E.coli- Zellen müssen zur Aufnahme von Fremd-DNA vorbereitet werden, was nach der Methode von Hanahan (1983) erfolgte.

600 ml Bakterienkultur wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,48-0,5 angezogen und die Zellen anschließend durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 2000 upm) geerntet. Die Zellen wurden in 200 ml kalter Lösung 1 resuspendiert und für 1-2 h auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden erneut durch Zentrifugation pelletiert und in 15 ml Lösung 2 resuspendiert. Aliquots von 200 µl der Bakteriensuspension wurden in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei - 80 °C gelagert.

B) Elektrokompente Zellen (DH10B):

Eine einzelne Kolonie der Zellen wurde über Nacht in 5 ml LB-Medium angezogen und am nächsten Tag in 500 ml LB bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 wachsen lassen. Die Zellen wurden

anschließend für 10-15 min auf Eis gekühlt und 20 min bei 5.000 g und 2 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden in 5 ml Eiswasser resuspendiert und zu 500 ml Eiswasser hinzugegeben. Es erfolgte erneut eine Zentrifugation und die Zugabe von 5 und 500 ml Eiswasser. Die Zellen wurden wie oben zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in der verbleibenden Flüssigkeit gelöst.

Die Zellen wurden zur Lagerung mit 10 % Glycerol versetzt, aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Die Transformationseffizienz dieser Zellen beträgt $\geq 10^9$ pro μg DNA.

2.3.5.2 Transformation in chemokompetenten Zellen

Die Hälfte eines Ligationsansatzes wurde zu 50 μl chemokompetenten Zellen (XL1-blue oder HB 101) gegeben, welche auf Eis aufgetaut wurden. Die Aufnahme der Fremd-DNA in die Zellen wurde durch Kältestreß (30 min auf Eis) und anschließendem Hitzeschock (90 s, 42°C) forciert. Die Zellen wurden kurz auf Eis abgekühlt und dann mit 500 μl LB-Medium (ohne Ampicilin) 0,5 h bei 37°C vorkultiviert. Das Ansatzvolumen wurde durch Zentrifugation (1 min, 3000 upm, Eppendorf-Tischzentrifuge) halbiert, auf LB-Agarplatten mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicilin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit den angewachsenen Kolonien konnten dann Flüssigkulturen inokuliert werden.

2.3.5.3 Transformation in elektrokompetenten Zellen

Die Transformation in elektrokompetente Zellen (DH10B) wurde zur Amplifikation von Plasmid-Präparationen aus Hefezellen und zur Plasmid-Bibliothek Amplifikation verwendet.

Die Elektroporations-Apparatur wird auf 2,5 kV und 25 μF eingestellt mit einem Pulse-Kontroller von 200 Ω . Es wurden 5 μl der Plasmid Präparation zu 70 μl eisgekühlten elektrokompetenten Zellen gegeben und für 1min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in vorgekühlte Elektroküvetten gegeben und wie oben beschrieben gepulst. Die Zellen wurden in 700 μl SOC-Medium aufgenommen und 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in 80 μl SOC-Medium aufgenommen und auf LB-amp Platten ausplattiert.

2.3.5.4 Transformation der Bibliothek-Vektoren in superkompetenten Zellen (Peptid-Aptamer-Bibliothek Amplifikation)

Zur Amplifikation der Bibliothek wurden die Vektoren in Max Efficiency DH10B kompetente Zellen der Firma GibcoBRL transformiert. Die Bibliothek besitzt eine Diversität von $2 \cdot 10^8$ cfu. Damit die Bibliothek in ihrer gesamten Komplexität von 3×10^9 amplifiziert wurde die pro Transformation einzusetzende Menge DNA wie folgt berechnet:

Der Bibliothek-Vektor besitzt eine Größe von 7 kb, wodurch sich die Menge von 0,2 pmol Plasmid pro μg ergibt. Somit sind in einem μg $1,2 \times 10^{11}$ Teilchen enthalten. Für die Amplifikation wurden 100 ng der Bibliothek in DH10B transformiert, um mit diesen $1,2 \times 10^{10}$ Plasmide die 25 fache Komplexität der Bibliothek abzudecken.

Die DH10B-Zellen können DNA in einem Bereich von 50 pg - 25 ng aufnehmen. Um diese Menge nicht zu überschreiten, wurden neun Transformationen mit je 11 ng pro 100 μl Zellen durchgeführt.

Die Aufnahme der Plasmide wurde durch 30 min Kältestreß auf Eis und 45 s Hitzeschock bei 42 °C gesteigert. Der Ansatz wurde 2 min auf Eis abgekühlt und mit SOC-Medium für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die neun Reaktionen wurden vereinigt, je 10 μl für eine 10^2 und 10^3 Verdünnung zur Berechnung der Transformationseffizienz entnommen und der Pool auf 40 ml Medium aufgefüllt. Es wurden je 400 μl Zellen pro LB-Platte (\varnothing 145 mm) ausplattiert und 100 LB-Platten insgesamt verwendet.

2.3.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* Zellen

2.3.6.1 Plasmid-Isolierung in analytischem Maßstab (Mini-Präparation)

Für analytische Zwecke wurde Plasmid-DNA mittels NucleoleoSpin Plasmid Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet wurden.

2.3.6.2 Plasmid-Isolierung in präparativem Maßstab (Maxi-Präparation)

Größere Mengen Plasmid-DNA wurden aus 200 ml Kulturen mittels des Qiagen Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen (Hilden) präpariert. Es wurde dabei nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.

2.3.6.3 Plasmid-Isolierung nach der Bibliothek-Amplifikation

Die Bakterien wurden nur kurze Zeit (6 h bei 37 °C) angezogen, damit Einzelkolonien isoliert werden konnten. Auf diese Weise blieb die Diversität der Bibliothek erhalten, da Klone, die durch das Gal4-TAD-Plasmid einen evolutionären Nachteil besitzen, nicht überwachsen werden konnten. Die mit pTrx-Bibliothek-Plasmide transformierten Klone wurden durch „Abscrapen“ der LB Platten geerntet und mit Hilfe des Plasmid Giga Kits die pTrx-Vektoren isoliert.

2.3.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* Zellen

Die DNA-Isolierung aus Hefezellen wurde mit Hilfe eines Hefe Plasmid Isolierungskit der Firma BIO 101 durchgeführt.

2.3.8 Photometrische Bestimmung der Konzentration DNA-Lösungen

Die Messung der Extinktion von DNA-Lösungen bei 260 und 280 nm gibt Auskunft über deren Konzentration und Reinheit. Eine OD_{260} entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Da aber auch aromatische Aminosäuren bei dieser Wellenlänge absorbieren wird zusätzlich die Extinktion bei 280 nm bestimmt, bei der Proteine stärker als DNA absorbieren. Ist der Quotient aus OD_{260} und OD_{280} kleiner als 1,8, so deutet dies auf Verunreinigungen mit Proteinen hin.

2.3.9 Klonierung der randomisierten Peptid-Aptamer-Bibliothek

2.3.9.1 Insertion einer Glycin-Linkersequenz in das aktive Zentrum des Thioredoxins

Die Klonierung der randomisierten Peptid-Aptamer Bibliothek wurde mit dem Gal4-TAD Vektor pAD-Trx mit leerem Thioredoxin (Trx) als Basis-Plasmid durchgeführt. In die *RsrII*-Restriktionsschnittstelle im aktiven Zentrum des Trx wurde eine Linker-Sequenz eingebracht, welche zwei weitere Restriktionsschnittstellen enthielt und für Glycine als flexible, Aptamer-flankierende Aminosäuresequenzen kodierte. Diese Linkersequenz wurde als Sense und Anti-Sense DNA-Oligonukleotid bei der Firma MWG bestellt und nach Doppelstrang-Annealing und *RsrII* Restriktionsverdau in den pAD-Trx Vektor eingefügt.

Für das Doppelstrang-Annealing wurden jeweils 5 pmol des sense und anti-sense DNA-Oligomers ad 50 µl TE-Wassers im Heizblock für 5 min auf 95 °C erhitzt und der Heizblock bei Raumtemperatur abkühlen lassen. Die Linkersequenz wurde über Nacht mit *RsrII* verdaut und in einem äquimolaren Mengenverhältnis in die Ligation mit *RsrII*-verdauten und CIP behandelten pAD-Trx eingesetzt. Die Richtigkeit der Insertion wurde mittels Sequenzanalyse sichergestellt.

2.3.9.2 Zweitstrangsynthese des randomisierten DNA-Templates und die weiteren Schritte der Klonierung

Das Template mit randomisierten DNA-Sequenzen wurde von der Firma Biospring, Frankfurt synthetisiert. Es beinhaltet eine 5' *NcoI* Schnittstelle, gefolgt von 36 randomisierten Basen (Kodondeinition: NNK; N = A,T,G,C; K = G,C), einer 3' *XhoI* Schnittstelle und einem Hairpin, der den Primer für die Zweitstrangsynthese beinhaltet.

Die Zweitstrangsynthese erfolgte durch eine Zwei-Schritt PCR mit 15 Zyklen. Der erste Schritt erfolgte für 1 min bei 94 °C und der 2. bei 60 °C für 1 min. Nach der Zweitstrangsynthese wurden die Polymerase durch Phenol/Chloroform und die DNA durch 80 % Ethanol (Endkonzentration) gefällt. Es folgte ein Restriktionsverdau mit *NcoI/XhoI* über Nacht bei 37 °C mit anschließender Phenol/Chloroform-Ethanol Aufreinigung.

Die einzelnen Schritte wurden mit Hilfe eines nativen 20 % Polyacrylamid Gels kontrolliert. Ferner wurde versucht die randomisierten DNA-Sequenzen, nach dem Verdau mit verschiedenen Methoden aus dem Gel zu isolieren. Die randomisierten DNA-Sequenzen waren jedoch zu klein, um effizient aufgereinigt werden zu können, so dass der Ansatz nach Aufreinigung des Restriktionsverdaus in den Ligationsansatz eingesetzt wurde. Dadurch lies sich jedoch nicht die exakte Konzentration an randomisierten Sequenzen im Ansatz durch DNA-Konzentrationsmessungen ermitteln, auch ein Mengenvergleich über ein Agarose-Gel war wegen der geringen Größe nicht möglich. Somit wurden verschiedene Vektor:Insert Mengenverhältnisse (1:1; 1:5; 1:10) auf die Anzahl an positiven Kolonien nach Elektroporation untersucht. Bei den Probe-Elektroporationen wurden des Weiteren verschiedene DNA-Mengen und DH10B Zellen in den Elektroporationsansatz eingesetzt, um die optimale Elektroporationseffizienz zu ermitteln. Von den gewachsenen Klonen wurden 20 auf das Vorhandensein des Inserts durch Restriktionsverdau und Sequenzanalyse untersucht.

Die Elektroporationen wurden mit einem Elektroporator der Firma PeqLab bei 1800 V, 15 µF und 350 Ohm durchgeführt. Die in der Elektroporation verwendeten DH10B Zellen wurden am Tag der Elektroporation kompetent gemacht, um eine bessere Elektroporationseffizienz zu erreichen. Pro Elektroporation wurden 70 µl DH10B und 250 ng Bibliothek-Ligationsansatz verwendet. Es wurden 90 Elektroporationen durchgeführt und die Zellen anschließend in 100 ml SOC Medium für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Die elektroporierten DH10B Zellen wurden durch entweder in 8 l LB-amp Medium bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen, oder auf 400 145-mm-LB-amp Platten (zu 50.000 Kolonien pro Platte) für 10 h ausplattiert. Um die Elektroporationseffizienz zu ermitteln wurden 1:100, 1:1000 und 1:10.000 Verdünnungen des Elektroporationsansatzes ausplattiert.

Beide Vorgehensweisen sollten sicherstellen, dass einzelne Klone nicht das Wachstum von anderen behindern und es dadurch zu einer Ungleichverteilung von Einzelklonen in der Bibliothek kommt. Die Bakterienzellen wurden von den Platten „gekratzt“ und für 1 h bei 5.000 x g abzentrifugiert. Die Plasmid-Isolierung erfolgte mittels Giga-Prep der Firma Qiagen (Hilden).

Die Qualität der randomisierten 12mer Peptid-Aptamer wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzanalyse von 96 Einzelklonen sichergestellt. Ferner wurde der gesamte Bibliothek-Pool verdaut und mit der ursprünglichen 20mer Peptidbibliothek verglichen.

2.4 Das Hefe Zwei-Hybrid System

Das Zwei-Hybrid System erlangte seit 1993 eine weite Verbreitung, da es erstmals ermöglichte Protein-Protein-Interaktionen in zellulären Systemen zu untersuchen⁶⁶. Das zentrale Element des Hefe Zwei-Hybrid System ist das Protein GAL4, ein Hefe-Transkriptionsfaktor, der aus einer DNA-Bindungsdomäne und einer Aktivierungsdomäne besteht. Um die Transkription auszulösen bedarf es nur der räumlichen Nähe der beiden Domänen. Diese Tatsache macht man sich in einem Zwei-Hybrid Screen zu nutze, indem man miteinander interagierende Proteine mit den beiden Domänen fusioniert und über die Wechselwirkungen der Fusionsproteine die Transkription auslöst. Im verwendeten Zwei-Hybrid System wurde die zu untersuchende Kinasedomäne des ErbB2-Rezeptors mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne und die GAL4-Aktivierungsdomäne mit den Aptameren fusioniert.

Treten Wechselwirkungen zwischen den zu untersuchenden Proteinen auf, werden über Promotoren Reportergene transkribiert. Im verwendeten Hefestamm KF1 kodieren diese Reportergene jeweils für ein Protein der Adenin-, Histidin- und Uracil-Biosynthese (ADE2, HIS3, URA3) und stellen bei Transkription das Wachstum auf den jeweiligen Selektivmedien sicher. Über die Stärke der Promotoren lässt sich die Stärke der Protein-Protein-Wechselwirkung bestimmen. Im vorliegenden Fall besitzt *ade2* einen starken, *his3* und *ura3* einen schwachen Promotor, wobei *ura3* durch den SPO13-Promotor reguliert wird, der ein negativ-regulatorisches Element enthält und nur durch starke Protein-Protein-Interaktionen aktiviert werden kann. Das *his3*-Gen wird basal transkribiert. Diese basale Transkription kann durch kompetitive Hemmung mit 3-Aminotriazol (3-AT) verhindert werden. In der Abb. 2.3 ist die praktische Vorgehensweise der Isolierung der Kinase-Interaktionspartner dargestellt.

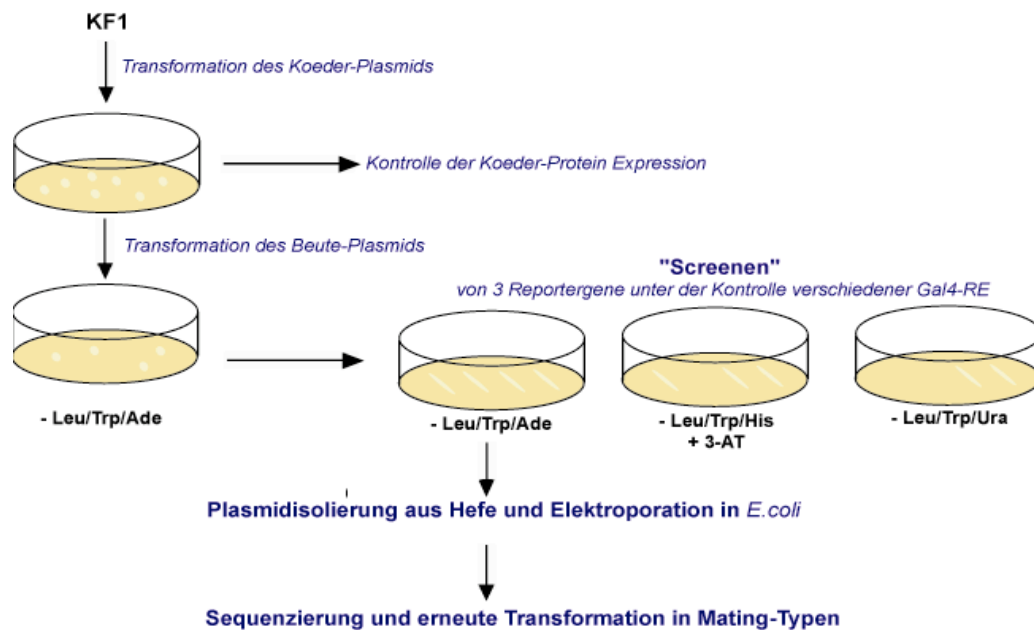


Abb. 2.1 | **Das Screening Protokoll zur Isolation der Peptid-Aptamere**

Im ersten Schritt des Screenings wird das Gal4-DNA-Plasmid in den Hefe-Stamm KF1 transformiert. Gal4-DNA-Plasmid-positive Klone werden im nächsten Schritt mit den Bibliothek-Vektoren transformiert und in einem Zwei-Hybrid Screen auf Aktivierung des Gens für die Adenin-Biosynthese selektiert. Die hierbei isolierten Klone werden im Folgenden auf die Aktivierung der anderen Reporter-Gene untersucht. Aus den gewachsenen Klonen werden die Bibliothek-Plasmide isoliert und in weiteren Experimenten, die Bindung der Aptamere am Zielprotein verifiziert.

2.4.1.1 Transformation von Plasmiden in *S. cerevisiae* Zellen

Für Transformation von Plasmiden in Hefe wurde eine Streichholzkopf-große Kolonie des KF1-Stammes in 300 µl LiAc/TE-Puffer resuspendiert und für eine Minute bei Raumtemperatur mit 20.000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in LiAc/TE-Puffer aufgenommen und resuspendiert.

Transformationsansatz:

1 µg	Träger-DNA (Salmon Sperm DNA: 10 mg/ml)
1 µg	Plasmid
50 µg	Hefesuspension
300 µl	LiAc/TE/PEG

Der Transformationsansatz wurde 30 Minuten bei 30 °C und 15 Minuten bei 42 °C inkubiert und anschließend 2 min bei 3.000 upm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 120 µl Wasser resuspendiert und davon 70 µl auf DOBA –L ausplattiert. Die Hefen wurden 2 Tage bei 37 °C inkubiert.

2.4.1.2 Transformation der Bibliothek-Vektoren in *S. cerevisiae* Zellen

Die Hefekolonien, die das Gal4-DNAprotein enthielten, wurden für die Transformation der Bibliothek-Vektoren in 30 ml SD –L über Nacht kultiviert. Die gewachsenen Hefen wurden mit 250 ml YPDA bis zu einer OD_{600} von $0,5 \pm 0,1$ angezogen, 2 min bei 2.00 upm zentrifugiert und das Pellet zweimal mit Wasser und einmal mit LiAc/TE-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in 2 ml LiAc/TE aufgenommen.

Transformationsansatz:

2 µg	Bibliothek-DNA
18 µl	Träger-DNA (Salmon Sperm DNA: 10 mg/ml)
200 µl	Hefesuspension
1,2 ml	LiAc/TE/PEG-Puffer

Der Transformationsansatz wird 30 min bei 30 °C und 15 min bei 42 °C inkubiert.

Die Zellen wurden 5 min bei 3.500 upm zentrifugiert, die Zellen vereinigt und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10,5 ml Wasser resuspendiert und je 700 µl auf große (Ø145mm) DOBA – LTA Platten ausplattiert. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) der Zellen, die auf DOBA –LT Platten ausplattiert wurden konnte die Transformationseffizienz berechnet werden.

Die Transformationseffizienz wird berechnet indem man die Zahl der gewachsenen Kolonien (auf Platte sollten sich 30-300 Kolonien befinden) mit dem totalen Suspensionssvolumen multipliziert und durch das ausplattierte Volumen, durch den Verdünnungsfaktor und durch die verwendete Plasmidmenge teilt. Als Ergebnis erhält man die Anzahl der gewachsenen Kolonien pro µg DNA, wobei diese Zahl im Bereich der Diversität der Bibliothek liegen sollte, um die gesamte Bibliothek zu transformieren.

2.4.1.3 Co-Transformation und Tropfplatten zur Aptamer-Spezifitätsanalyse

Die Co-Transformationen in den Hefe-Stamm KF1 wurden mit den unterschiedlichen Gal4-TAD und Gal4-DNA-Plasmiden durchgeführt, um die Interaktion der im Hefe Zwei-Hybrid System isolierten Proteine zu verifizieren. Hierfür wurden je 1 µg des betreffenden pPC97-Gal4-DNA- und pAD-Gal4-TAD-Vektors analog der in Kap. 2.4.1.1 beschriebenen Vorgehensweise zur Hefe-Plasmid Transformation in den KF1-Stamm eingebracht und auf DOPA –LT Platten selektioniert.

Um eine quantitativere Aussage über die Stärke der Kinase-Aptamer Interaktion treffen zu können, wurden die verschiedenen Hefe-Klone über Nacht in SD –LT Medium angezogen, und auf eine OD_{600} von 0,7 eingestellt. Es wurden 1:10, 1:100 und 1:1.000 Verdünnungen hergestellt und auf DOPA –LT und DOPA –LTH Platten ausplattiert und das Wachstum der Hefe Zellen nach 2-5 Tagen analysiert.

2.4.1.4 Aptamer-Sequenzanalyse mit ScanSite 2.0

Die im Hefe Zwei-Hybrid System isolierten Peptid-Aptamere wurden mit Hilfe des ScanSite 2.0 Programms auf Konsensus-Sequenzen mit bekannten Interaktionspartnern untersucht.

Bisher waren nur Datenbanken zugänglich, die es erlaubten ganze Proteine oder Proteindomänen auf Homologien mit bekannten Proteinen zu untersuchen. Durch die Verwendung des Internet-Sequenzanalyseprogramms ScanSite 2.0 (<http://scansite.mit.edu/>) bestand jedoch die Möglichkeit, kurze Peptidsequenzen auf Homologien mit bekannten Interaktionspeptiden zu untersuchen. Das Programm führte einen Homologievergleich mit einer Datenbank durch, in der Peptidsequenzen aus Phage-Display Screeningsystemen mit unterschiedlichen Zielproteinen erfasst sind. Da diese Datenbank auf experimentellen Ergebnissen basiert, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass die prognostizierten Interaktionen experimentell reproduzierbar sind. Es sollte jedoch auch angemerkt werden, dass durch die experimentelle Grundlage nicht alle möglichen Interaktionen in der Datenbank auftauchen. So dienten beispielsweise Phage-Display Screens gegen die Kinasedomäne des EGFR als Informationsgrundlage, jedoch fehlen in der Datenbank diese Informationen über ErbB2. Trotzdem ist dieses Programm die einzige Möglichkeit in einer gegebenen Proteinsequenz nach speziellen Peptid-Motifsequenzen zu suchen, die für Protein-Protein Interaktionen Ausschlag gebend sind. Die *in silico* Screens konnten mit unterschiedlicher Stringenz durchgeführt werden, wobei eine hohe Stringenz bedeutet, dass die identifizierte Konsensussequenz mit der Peptidsequenz der Datenbank sehr genau übereinstimmt. Bei niedriger Stringenz können auch Peptidmotife identifiziert werden, die keine optimale Konsensussequenz aufweisen.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Expression und Aufreinigung von Proteinen

2.5.1.1 Herstellung von Hefe-Proteinextrakten unter denaturierenden Bedingungen

Die Proteinextrakte aus Hefe dienen dem Nachweis der Expression des Gal4-DNAproteins. Die positiven Klone der Gal4-DNAtransformation wurden in 5 ml SD –L über Nacht kultiviert und am nächsten Tag in 50 ml YPDA angezogen bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht wurde. Für den weiteren Versuch wurden 20 OD-Einheiten verwendet, welche mit Eis 5 min mit 1.000 g bei 4 °C zentrifugiert wurden. Das Pellet wurde mit kaltem Wasser gewaschen und der Ansatz erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert.

Der Hefe-Lysispuffer wurde auf 70 °C vorgewärmt und je 300 µl zu den gefrorenen Zellen gegeben. Ebenfalls vorgewärmte Glas-Beads (400 µl) wurden dem Ansatz beigefügt und dieser für 10 min bei 75 °C inkubiert. Da die Protease-Inhibitoren bei diesen Temperaturen nicht stabil sind, wurden nach jedem Schritt 25 µl Pefabloc (100x) hinzu gegeben. Nach 10 min wurden die Ansätze auf Eis gekühlt und einzeln für 1 min gevortext. Die lysierten Zellen wurden bei 4 °C für 5 min mit 14.000 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, auf Eis gelagert und das Pellet mit 100 µl Lysispuffer erneut bei 95 °C für 5 min inkubiert.

Der Ansatz wurde wie oben zentrifugiert und der Überstand mit dem ersten Überstand vereinigt. Es wurden 40 µl des Ansatzes gekocht, auf ein 12 prozentiges Gel aufgetragen und die Proteinexpression über Western Blot mit einem Antikörper gegen die Gal4-DNA-Bindedomäne nachgewiesen.

2.5.1.2 Proteinexpression und Aufreinigung unter nicht denaturierenden Bedingungen in *E. coli* Zellen

Zur Proteinproduktion wurden die Bakterien mit einem entsprechenden Expressionsvektor transformiert (hier pGex 3T3). und in 300 ml LB-Amp Medium OD₆₀₀ von ca. 0,5-0,7 angezogen. Da die Multiple Restriktions-Insertions-Schnittstelle („Multiple Cloning Site“) dieser Vektoren unter der Kontrolle eines vom Laktose-Operon abgeleiteten Promotor steht, kann die Expression durch IPTG induziert werden.

Nach der einstündigen Induktion der Proteinexpression mit IPTG wurden die Bakterien in einer Eppendorf-Zentrifuge bei 5.000 upm 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml kaltem Bakterien-Lysispuffer resuspendiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Pellet wurde im Wasserbad bei 37 °C wieder aufgetaut und das Einfrieren und Auftauen weitere zwei Male wiederholt. Die Lysate wurden auf Eis mittels Ultraschall im Sonifier behandelt. Es wurden pro Lysat 20-30 Pulse durchgeführt, um DNA zu zerstören. Nach 30 min Zentrifugation mit 10.000 g bei 4 °C, wurde der Überstand bei -80 °C eingefroren.

2.5.1.3 Proteinexpression und Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen in *E. coli*

Zur Expression und Herstellung von Proteinextrakten unter denaturierenden Bedingungen wurden chemokompetente BL21-lys mit pFlag bzw. pET30a Vektoren, welche die zu exprimierenden Aptamerkonstrukte kodieren, transformiert. Eine transformierte Kolonie wurde in LB-amp Medium über Nacht bei 37 °C und 200 upm im Schüttelinkubator angezogen. Die über Nacht Kultur wird in 250 ml LB-amp Medium überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Bei dieser OD₆₀₀ befanden sich die Bakterien in der logarithmischen

Wachstumsphase und wurden für 4 Stunden mit 1 mM IPTG bei 30 °C für die Expression der Aptamerkonstrukte induziert.

Nach 4 h wurden die Bakterien für 30 min bei 3.500 upm zentrifugiert und das Bakterienpellet in 20 ml Puffer Z (8 M Harnstoff in PBS) resuspendiert. Es erfolgte dreimaliges schallen für 2 min und eine erneute Zentrifugation für 30 min bei 10.000 upm.

Die Bakterienextrakte wurden über eine Sepharose-Säule aufgereinigt. Die Sepharose wurde mit Nickelsulfat beladen. Die Nickelionen interagieren spezifisch mit dem fünf fachen Histidin Tag der Aptamere und isolieren damit die exprimierten Aptamerkonstrukte aus dem Bakterienextrakt. Für diese Aufreinigung musste die Sepharose-Säule nach der Beladung mit Nickelsulfat mit Puffer Z equilibriert werden. Die Säule wurde nach der Equilibrierung mit dem Bakterienextrakt beladen, und nach zwei Elutionsschritten konnte das aufgereinigte Protein gewonnen werden. Der erste Elutionsschritt wurde mit 40 mM Imidazol in Puffer Z durchgeführt. Imidazol bindet kompetitiv mit dem 5 fach Histidin Tag an den Nickelionen und löst in dieser Konzentration unspezifisch an die Säule gebundene Proteine. Der Elutionsschritt der Aptamerkonstrukte erfolgt bei 250 mM Imidazol in Puffer Z. Die eluierten Fraktionen wurden mit Hilfe eines 15 prozentiges Coomassie SDS-Gel auf Reinheit und Proteinmenge untersucht.

Die eluierten Proteine werden auf eine Endkonzentration von 200 ng/µl Protein und 400 mM L-Arginin in PBS eingestellt. Es erfolgte eine Dialyse gegen 400 mM L-Arginin in PBS über Nacht bei 4 °C. Zur Rückfaltung der Proteine wurden alle zwei Stunden der Dialysepuffer gegen PBS ausgetauscht. Dies wurde sooft durchgeführt, bis der Dialysepuffer aus reinem PBS bestand. Die dadurch zurückgefalteten Proteine wurden aliquotiert und bei – 20 °C gelagert. Die Proteinkonzentration nach der Rückfaltung wurde über ein 15 prozentiges Coomassie SDS-Gel mit BSA-Mengenstandard bestimmt

2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmungen durch Bradford

Die Proteinkonzentration von Zellextrakten wurde mit einem kommerziell erhältlichen Nachweissystem (Bio-Rad-Versuch, Fa. BioRad, München) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Nachweis beruht auf einer unspezifischen Interaktion von Coomassie-Blau mit aromatischen Aminosäuren. 1 bis 10 µl eines Zellextraktes oder Proteinlösung wurden für 4 min bei RT mit 1 ml des 1:5 mit H₂O verdünnten Reagenz inkubiert und die Extinktion mit einem BioRad Spektrometer bei 595 nm bestimmt. Zur Erstellung einer Titrations-Eichkurve wurde ein BSA-Standard verwendet.

2.5.3 Isolation spezifischer Proteine aus Zellextrakten durch Antikörper (Immunopräzipitation)

Bei der Immunopräzipitation (IP) kann ein spezifisches Protein aus einem Totallysat isoliert werden. Dabei wird das Protein an einen spezifischen Antikörper gebunden, welcher wiederum über den F_c-Teil an Protein A bindet. Protein A ist an magnetische Beads der Firma Dyna (Prot.A Dyna-Beads) fixiert, die durch Anlegen eines magnetischen Feldes vom Totallysat getrennt werden können.

Die Zellyse wurde bei einer IP mit einem NP40-Lysispuffer durchgeführt. Zu Beginn der IP wurde der Antikörper (1 µg) zum Zellextrakt (0,5-1 mg Total-Protein) gegeben und für eine Stunde bei 4 °C auf einem auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe von 50 µl der Protein-A Dyna-Beads und eine erneute Inkubation für eine Stunde bei 4 °C. Die Beads wurden anschließend durch einen Magneten von der Lösung getrennt und 3 mal 5 min mit 1 ml NP40-Waschpuffer gewaschen. Abschließend wurden die Beads in 20 µl Waschpuffer aufgenommen und mit 10 µl Protein Ladepuffer für 2 min aufgeköcht. Die Proben wurden dann durch im Western Blot analysiert.

Die IP lässt sich nutzen, um die Interaktion zweier Proteine in der Zelle nachzuweisen. Hierfür wurden in der vorliegenden Arbeit Peptid-Aptamere in die Zellen transfiziert bzw. transduziert und die IP mit einem Antikörper gegen den ErbB2 Rezeptor, wie oben beschrieben durchgeführt. Im Western Blot konnten im Fall der Interaktion, die Aptamere mit einem spezifischen Antikörper detektiert werden. Bei dieser Variante der IP spricht man von Co-IP.

2.5.4 Proteintransfer auf PDVF Membranen (Western Blot)

Der Western Blot dient der qualitativen und quantitativen Bestimmung von Proteinen mittels spezifischer Antikörper.

Allgemein wurden die zu untersuchenden Proteinproben mit 4x Proteinladepuffer versetzt, um die Proteine zu denaturieren und damit die Proben in den Geltaschen absinken. Die Proben wurden auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und der Gellauf für 45 min bei konstanten 60 mA in einer Kammer der Firma Biorad durchgeführt.

Die Proteine im Trenngel wurden durch Transfer mittels Semi-Dry-Blot in 1 h bei konstanten 50 mA auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde zuvor für 1 min in Methanol aktiviert und danach 10 min mit bidest. Wasser gewaschen.

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran für 30 min in TBS-T mit 5 % Milchpulver bzw. 5 % BSA geblockt, um unspezifische Bindung des Antikörpers an der Membran zu verhindern. Es erfolgten 3 Waschschrte je 5 min mit 15 ml TBS-T und die Inkubation des 1. Antikörpers in 2-5 % BSA für 1 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C. Die Membran wurde wie oben dreimal mit

TBS-T gewaschen und mit dem 2. Antikörper an den eine Meeretisch-Peroxidase gekoppelt ist für 1 h bei 37 °C inkubiert. Der 1. Antikörper detektiert das zu untersuchende Protein, der 2. Antikörper den F_c-Teil des 1. Antikörpers.

Nach erneuten drei Waschschrritten erfolgte die Detektion der Peroxidase-Aktivität mit dem ECL-System der Firma Amersham Biosciences (detaillierte Beschreibung im folgenden Abschnitt).

2.5.5 Detektion von Proteinen mit Hilfe von Chemolumineszenz

Die Proteinbanden auf einem Western Blot wurden mit Hilfe des „ECL-detection-kit“ (Fa. Amersham, Braunschweig) sichtbar gemacht. Das HRP-Enzym (Horse radish peroxidase), welches an den 2. Antikörper gekoppelt ist, bewirkt eine chemische Reaktion mit dem in der ECL-Lösung vorhandenen HRP-Substrat (Luminol), wodurch Licht freigesetzt wird. Die Lichtentstehung tritt nur in den Bereichen auf, in denen die Antikörper mit dem zu untersuchenden Protein verbunden sind und können mit einem Röntgenfilm (Firma Fuji) nachgewiesen werden. Abhängig von der Stärke der Chemolumineszenz, die mit der Proteinmenge auf der PDVF-Membran korreliert, wurden Extinktionszeiten für die Belichtung des Röntgenfilms von 3 sec bis 15 min gewählt.

2.5.6 *In vitro* Bindungsanalysen durch GST-Pulldown-Experimente

In einem GST-Pulldown wurden die im Hefe Zwei-Hybrid System gefundenen Inhibitoren *in vitro* auf ihr Bindungsverhalten überprüft.

Hierfür wurden die Thioredoxin-Aptamere mit GST (Glutathion-S-Transferase) fusioniert und in *E. coli* wie in Kap. 2.5.1.2 angegeben exprimiert. Nach der Lyse der Bakterien wurde das GST-Fusionsprotein über Glutathion-Sepharose-Beads gereinigt. Die Beads wurden anschließend mit eukaryotischen Zelllysaten inkubiert, welche das Zielprotein enthalten. Das Zielprotein wird dann im Western Blot mittels spezifischem Antikörper detektiert.

Für jeden Pulldown Ansatz wurden 30 µl der Beads verwendet, welche vor dem Inkubieren mit den Bakterienlysaten 3 x 1 ml PBS gewaschen wurden. Die Beads wurden zur Überprüfung der Proteinexpression mit 100 µl GST-Aptamer-Lysat (Herstellung des Bakterienlysats siehe Abschnitt 2.?) ad 200 µl Lysispuffer für eine Stunde bei 4 °C inkubiert, anschließend dreimal mit Lysispuffer gewaschen und auf ein 12 prozentiges SDS-Gel aufgetragen.

Die Proteinmengen wurden mittels Coomassie-Färbung verglichen und gleiche Mengen im nachfolgenden Interaktionsversuch eingesetzt. In diesem Versuch wurde nach der einstündigen Inkubation bei 4 °C einmal mit Lysis- und zweimal mit Bindungspuffer gewaschen, 1 mg Renca- bzw. 0,5 mg SKBR3-Proteinextrakt (Herstellung des Proteinextrakts siehe Kap. 2.6.2) pro

Pulldown ad 200 μ l Bindungspuffer eingesetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Beads wurden am nächsten Tag dreimal mit 1 ml Bindungspuffer gewaschen und in 20 μ l SDS-Ladepuffer resuspendiert. Nach 5 min Aufkochen der Proben bei 95 °C und 3 minütigem Abzentrifugieren bei 14.000 upm, wurden 2/3 des Ansatzes auf ein 6 prozentiges und 1/3 des Ansatzes auf ein 12 prozentiges Gel aufgetragen. Im niedrigprozentigen Gel wurde der Rezeptor mittels Western Blot (Kap. 2.5.4) detektiert, und das hochprozentige Gel diente der Kontrolle der Aptamer-mengen.

2.5.7 *In vitro* Bindungsanalysen durch *in vitro* Co-IP

In diesem *in vitro* Bindungsversuch wurden die aufgereinigten Flag-9Arg-Aptamerproteine (Kap. 2.5.1.3) auf ihre Fähigkeit den ErbB2 Rezeptor zu binden überprüft.

Hierfür wurde der Rezeptor aus 0,5 mg Ganzzelextrakten von SKBr3 Zellen mittels IP (siehe Kap. 2.6.2) isoliert und für 1-2 h mit 0,5 μ g aufgereinigten Aptamerproteinen inkubiert. Der Inkubation folgten Waschschrirte mit 3 x 1 ml NP40-Bindungspuffer für je 5 min bei 4 °C. Im Folgenden wurden die Proben mit 4 x Proteinladepuffer aufgeköcht, auf ein 15 % Gel aufgetragen und eine PDVF Membran übertragen. Die Aptamere wurden im Western Blot (siehe Kap. 2.5.4) mit Hilfe eines Flag Antikörper (1:2.000 in 2 % BSA-TBST) detektiert.

2.5.8 *In vivo* Interaktionsanalysen durch Co-Immunopräzipitation

Für die Co-IP Versuche wurde Peptid-Aptamer Konstrukte in Zielzellen wie NIH#3.7 und SKBr3 transfiziert (Kap. 2.6.3), bzw. Protein-transduziert (Kap. 2.6.6). Die Zellen wurden nach 2 Tagen bzw. 4 h geerntet und in 100 μ l NP40-Lysispuffer für 15 min bei 4 °C lysiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 20.000 x g und 4 °C, wurde der IP-Antikörper (α ErbB2 AB bzw. α EGFR AB) für 1 h mit dem Zellextrakt inkubiert. Es folgte die Zugabe von je 10 μ l Protein-A DynaBeads, welche mit DynaBeads 1 ml Equilibrierungspuffer für 15 min gewaschen und mit 5 % BSA in NP40-Lysispuffer geblockt wurden. Die Inkubation mit den DynaBeads erfolgte für 1-2 h bei 4 °C auf dem Rotatorrad. Die Beads-Antikörper-Protein Komplexe wurden abschließend mit je 3 x 1 ml NP40-Waschpuffer für je 5 min gewaschen. Die Interaktionskontrolle erfolgte durch einen Western Blot (Kap.2.5.4) mit α Flag Antikörper.

2.5.9 *In vivo* Interaktionsanalysen mit Hilfe von fluoreszenzmarkierter Antikörper (Immunfluoreszenz)

Die Immunfluoreszenz Aufnahmen wurden zur Kontrolle der Proteintransduktion und *in vivo* Interaktion der Proteine verwendet. Hierzu wurden 1×10^5 Zellen auf einem Deckglas in einer 12-well Platte ausplattieren. Am nächsten Tag wurden die Proteintransduktionen für 3-5 Stunden mit $1 \mu\text{M}$ Aptamer-9xArg durchgeführt. Es erfolgten 2 Waschschrte mit 1ml PBS, die Inkubation mit 0,2 M Essigsäure („Acid Wash“: dient dem Entfernen von Proteinen die unspezifisch an die Zellmembran binden) für 5 Minuten auf Eis und erneut 2 Waschschrte mit PBS. Abschließend wurden die Zellen mit 95 % Methanol ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$) für 8-12 Minuten bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ fixiert. Die Deckgläser wurden getrocknet und mit Fettstift umrandet. Es erfolgten weitere Wasch- und Blockierungsschrte, mit PBS 2 x 10 Minuten, mit PBS-T (0,1% Tween) 1 x 20 Minuten und erneut mit PBS 2 x 10 Minuten. Das Blockieren erfolgte für 30 Minuten mit $30 \mu\text{l}$ Coldfish-Gelatine Blocking Solution (CFBS). Der 1. Antikörper ($m \alpha$ Flag 1:500; $r \alpha$ ErbB2 1:100) wurde in CFBS ü/N bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert.

Anschließend erfolgten weitere Waschschrte, je 3 x 10 Minuten und die Inkubation mit dem Fluoreszenz-markierten 2. Antikörper [αm Rhodamin (Alexa Fluor 546); αr FITC (Alexa Fluor 488) je 1:400]. Die Proben werden erneut mit PBS 3 x 10 Minuten gewaschen. Abschließend wurden die Deckgläser in destilliertem Wasser gespült, um PBS-Kristalle zu entfernen. Die Proben wurden in Moviol mit DAPI auf einem Objektträger aufgebracht und zum Trocknen über Nacht im Dunkeln aufbewahrt. Die Immunfluoreszenzanalyse erfolgte mit Hilfe eines Immunfluoreszenzmikroskops bzw. eines Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM).

2.6 Methoden der Zellkultur

2.6.1 Kultivieren von Säugerzellen

Die Säugerzellen wurden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 in wasserdampfgesättigter Atmosphäre (89 % Luftfeuchtigkeit) in BBD-6220 Brutschränke kultiviert. Dem jeweiligen Medium wurde FCS (10 % v/v), Glutamin (1 % v/v), Pen/Strep (1 % v/v) zugesetzt. Je nach Wachstumseigenschaften wurden die Zellen alle 3 bis 5 Tage in 10-cm Kulturschalen in verschiedenen Verhältnissen von 1:3 bis 1:15 passagiert.

Zur Passagierung wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen und mittels Trypsin-EDTA Lösung von der Zellkulturschale abgelöst. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurde die Zellen vereinzelt und in den verschiedenen Verdünnungsverhältnissen ausplattiert. Das Trypsin wird auf diese Weise von im Medium vorhandenen Trypsininhibitoren inaktiviert.

2.6.2 Zellernte

Die Säugerzellen (Renca, SKBR3) wurden bis zu 80 prozentigem Wachstum angezogen und die Platten zweimal mit 1x PBS gewaschen. Zu jeder Platte wurde 1 ml 1x PBS hinzu gegeben und die Platten auf Eis "gescrapt" (abkratzen der Zellen mit Zellschaber). Die Zellen wurden in einem Falcon-Röhrchen vereinigt und für 4 min mit 2.500 upm bei 4 °C zentrifugiert. Bei Ganzzellextrakten wurde ein im Triton-X-100 Extraktionspuffer zur Lysis verwendet. Die Zellen wurden in 50 µl dieses Puffers resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellfragmente wurden für 15 min bei 16.000 x g bei 4 °C pelletiert.

Das Pellet wurde verworfen und die Proteinkonzentration des Überstandes mit Bradford bestimmt. Bei Analyse von Phosphoproteinen wurden 50 µg Protein, bei der Analyse der gesamten Proteinmenge 20 µg verwendet.

2.6.3 Transiente Transfektionen von eukaryotischen Zellen

2.6.3.1 Transfektionen durch CaPO₄

Es wurden einen Tag vor der Transfektion 5 x 10⁶ 293T Zellen pro 10-cm Platte ausplattiert.

Bei einer achtstündigen Transfektion wurde der 1 ml Transfektionsansatz mit 3 ml DMEM 10 % ++ mit 33 mM Chloroquin verwendet. Bei einer Transfektion über Nacht wurden zu 1 ml Transfektionsansatz 9 ml DMEM 10% ++ mit 20 mM Chloroquin verwendet.

Der erste Teil des Transfektionsansatz beinhaltet 10 µg DNA des zu untersuchenden Proteins, 50 µl 2,5 M CaCl₂ und 430 µl dH₂O. Der zweite Teil des Transfektionsansatzes (500 µl HBS 2x) wurde unter „Blubbern“ von Luftblasen hinzu gegeben und das Blubbern für weitere 20 sek fortgeführt.

Nach Beendigung der Inkubation der Zellen mit dem Transfektionsansatz erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem DMEM 10 % ++. Nach weiteren 24-48 h konnte die Expression der transfizierten Konstrukte nachgewiesen werden.

2.6.3.2 Transfektionen mit Lipofectamine

Die Lipofectamine2000 Transfektionen wurden hauptsächlich in 12-well Platten wie folgt durchgeführt. Die zu transfizierenden Zellen wurden am Tag vor der Transfektion so ausplattiert, dass sie zur Transfektion zu 80 % konfluent gewachsen sind. Für den Transfektionsansatz wurden 4 µl Lipofectamine mit 50 µl Minimalmedium für 5 min inkubiert und danach mit 2 µg DNA ad 50 µl Minimalmedium gemischt, um den Ansatz für weitere 20 min bei RT zu

inkubieren. Die Zielzellen wurden anschließend für 6-8 h mit dem Lipofectamineansatz inkubiert und die Transfektionseffizienz nach 2 Tagen ermittelt.

2.6.4 Stabile Transfektionen von eukaryotischen Zellen

Die stabile Transfektion wurde zur Analyse der Peptid-Aptamer Wirkung verwendet. Hierbei werden transfizierte Plasmide durch Rekombination in das Genom von Zielzellen integriert und die erfolgreichen Rekombinationen über Wachstum unter Selektionsmedium selektioniert. Als Zielzellen wurden NIH#3.7 Zellen verwendet, die stabil den ErbB2 Rezeptor exprimieren und von seiner Funktion in ihrem Wachstum auf Weichagar, abhängig sind.

Als Expressionssystem für die Peptid-Aptamere wurde das induzierbare Tet-off System verwendet, da durch die Induktion der Aptamer-Expression, Effekte welche die Zellen in ihrem Wachstum beeinflussen minimiert werden. Im Tet-on System wird die Expression der Zielgene (im vorliegenden Fall der Peptid-Aptamere) durch die konstitutive Expression eines reversen Transaktivators kontrolliert. Dieser ist in der Lage nach Zugabe von Tetrazyklin (Doxozyklin) an spezifische DNA-Elemente (Tet-Response Elemente) zu binden und über seine VP16 Domäne die Transkription der Zielgene zu aktivieren.

In diesem System wurden sequenziell 2 stabile Transfektionen durchgeführt. Die erste mit dem pM2 Plamid, welches für den reversen Transaktivator kodiert und die zweite mit pBi-EGFP Plasmiden, in welche die Aptamer Konstrukte kloniert worden waren.

Für die 1. Transfektionen wurden die 2×10^5 NIH#3.7 Zellen pro 12-well Platte ausplattiert und die Plasmide pM2 und pBabe Puro mit *HindIII* bzw. *NotI* linearisiert. Die Transfektionen wurden mit Lipofectamin 2000 durchgeführt, wie in Kap. 2.6.3.2 beschrieben, wobei 1 μg von pM2 und 0,2 μg pBabe Puro pro Transfektion verwendet wurde.

Am zweiten Tag nach der Transfektion wurden die Zellen in 6-well Platten gesplitted und als zusätzlicher Selektionsmarker Puromycin in einer Konzentration von 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ins Wachstumsmedium gegeben. Nach 6-8 Tagen konnten Puromycin-resistente Einzelzellkolonien von der 6-well Platte in eine 96-well Platte überführt werden. Die Einzelzellkolonien wurden durch Pipettieren von 2 μl vorgewärmtes Trypsin von der Platte entfernt.

Die isolierten Einzelklone wurden auf ihre Induzierbarkeit mit Doxocyclin überprüft. Hierfür wurde transient ein Dox-induzierbares Luciferase Reporterkonstrukt und ein konstitutiv aktives β -Galaktosidase Reporterkonstrukt in die Zellen co-transfiziert. Für die Co-Transfektion wurden 2×10^5 NIH#3.7 rTA Zellen pro 12-well Platte ausplattiert und am darauf folgenden Tag mittels Lipofectamin 2000 1 μg Luciferasereporterplasmid und 0,2 μg β -Galaktosidase Vektor transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden jeweils mit und ohne Doxocyclin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) im Wachstumsmedium behandelt und der Luciferase Versuch 2 Tage nach der Transfektion durchgeführt.

Die induzierbaren NIH#3.7 rTA Zellen wurden für die 2. Transfektion mit den induzierbaren Aptamer-Vektoren pBi-EGFP/Apta verwendet. Die stabile Transfektion erfolgte wie oben beschrieben mit je 1 μg *Hind*III-linearisiertem pBI-EGFP-Apta Vektor und 0,2 μg *NotI*-linearisiertem pTK Hygromycin Vektor. Die Einzelzellklone wurden wie oben beschrieben isoliert und auf ihre Induzierbarkeit getestet. Die Induzierbarkeit wurde nach Doxozyklin-Zugabe durch EGFP Expression im Fluoreszenz Mikroskop und durch Western Blot Analyse mit einem Thioredoxin Antikörper zur Detektion der Aptamer Expression sichergestellt.

2.6.5 Virale Transduktion von eukaryotischen Zellen

2.6.5.1 Generation von Virusüberständen

Zur Produktion von Lentiviren wurde eine Dreifachtransfektion in 293T Zellen durchgeführt. Die Zellen befanden sich in einer Passage unter 20. Zur Expression der Aptamere in einem lentiviralen Vektor wurde der pSiEW Vektor verwendet. Zur Virusproduktion wurde zusätzlich der p8.91 und pMD2 Vektor verwendet. Diese drei Vektoren wurden in folgendem Verhältnis mit Hilfe der CaPO_4 Transfektion (Kap. 2.6.3.1) in die 293T Zellen eingebracht. Der pSiEW wurde mit 10 μg , p8.91 mit 6,5 μg und der pMD2 mit 3,5 μg in den Ansatz eingesetzt. Am 2. Tag nach der Transfektion wurde 5 ml Medium auf die Zellen gegeben, in welchem sich die Lentiviren anreicherten. Die Transfektionseffizienzen konnten anhand der Fluoreszenzmarkers EGFP, welcher über eine IRES mit der Expression der Aptamere verknüpft ist, bestimmt werden. Am 3. Tag erfolgte ein erneuter Mediumwechsel mit 5 ml frischen Medium. Die auf diese Weise gewonnenen Virusüberstände wurden als 1 ml Aliquots bei -80°C aufbewahrt.

2.6.5.2 Virale Transduktion von Zielzellen

Die Virusüberstände wurden mit Hilfe von 293T Zellen auf ihre Fähigkeit Zielzellen zu transduzieren überprüft und somit die Konzentration an Viren in der Lösung berechnet.

Für die Virustitration wurden 5×10^4 Zellen pro 24 well Platte ausplattiert und am folgenden Tag mit Verdünnungen der Virenüberstände behandelt (Verdünnungen: 1:1.000; 1:100; 1:10; 1:100 mit Polybrene). Zur besseren Transduktion wurden die Zellen für 90 min bei 5.000 upm zentrifugiert und für 3 Tage mit den Viren inkubiert. Am dritten Tag erfolgte die Transduktionseffizienzanalyse über die EGFP Fluoreszenz mit Hilfe des FACS Gerätes. Hierfür wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und in 400 μl PBS resuspendiert. Die Hälfte der Lösung wurde mit 200 μl Fixierlösung fixiert, die andere Hälfte wurde im Western Blot auf die Expression der Aptamere untersucht. Für die Titerberechnung wurde die Verdünnung gewählt, die 10-20 % positive Zellen enthielt.

Formel zur Titerberechnung:

Transduzierende Einheiten/ml (TE/ml) = (% positive Zellen/ 100 %) × Gesamtzellzahl × Verdünnung
Gesamtzellzahl = Zellzahl am Tag des Ausplattierens × $2^{\text{Tage nach Ausplattieren}}$ (2 = bei Verdoppelungszeit von 2)

Bsp.: Es wurden 5×10^4 293T Zellen ausplattiert und 3 Tage nach Transduktion die Transduktionseffizienz bestimmt, die bei einer Verdünnung von 1:500 bei 10,4 % lag:

TE/ml = $0,104 \times 4 \times 10^5 \times 500 = 2 \times 10^7$; MOI = 5,2

Über den berechneten Titer lässt sich die MOI (multiplicity of infection – Def.: Durchschnittliche Anzahl an Viren die benötigt werden, um eine einzelne eukaryotische Zelle zu infizieren = TE/ml durch Gesamtzellzahl) ermitteln: MOI = TE/ml durch Gesamtzellzahl.

2.6.6 Proteintransduktion von eukaryotischen Zellen

Die Proteintransduktion ermöglicht das Einbringen von Proteinen in Säugerzellen mit Hilfe eines Signalpeptides, das in der vorliegenden Arbeit in einer optimierten Form des HIV Tat-Transduktionspeptides (9x Arginin) verwendet wurde. Dieser 9 fache Arginin-Rest wurde an den C-Terminus des Thioredoxin-Gerüstproteins fusioniert und die Fusionsproteine, wie in Kap. 2.5.1.3 beschrieben, exprimiert und aufgereinigt. Die Proteinmengen nach der Aufreinigung wurden durch Coomassiegel mit BSA-Mengenstandarts und Bradford Versuch bestimmt.

Bei den durchgeführten Versuchen wurden Proteinmengen zwischen 1 und 3 μM verwendet. Die Proteintransduktion erfolgte mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Chloroquin für 3-5 h in Minimalmedium. Es konnte gezeigt werden, dass Chloroquin, welches intrazelluläre Vesikel zerstört, die durch einen Endozytoseprozess aufgenommenen 9xArg-Fusionsproteine ins Zytoplasma der Zelle freisetzt und dadurch zu erhöhten Konzentration an funktionalem Protein in der Zelle führt. Chloroquin ist jedoch toxisch für die Säugerzellen, so dass für jede verwendete Zelllinie ein Toxizitätsprofil erstellt wurde, mit dessen Hilfe eine Chloroquinkonzentration verwendet wurde, die unterhalb der Toxizitätsgrenze liegt.

2.6.7 FACS-Messungen

Die FACS („Fluorescence Activated Cell Sorter“) Messungen wurden mit einem Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson durchgeführt. Mit dieser Methode konnten sowohl die intrazelluläre EGFP Expression, als auch die Expression von Zelloberflächenproteinen in Zielzellen quantifiziert werden. Die EGFP Expression konnte direkt gemessen werden, für die Expression der Zelloberflächenproteine mussten die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt werden. In beiden Verfahren wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend geerntet.

Für die Detektion von Oberflächenproteinen wurde der Primärantikörper in einem Volumenverhältnis von 1:100 (10 $\mu\text{g/ml}$) in PBS mit 3 % FCS verdünnt, die pelletierten Zellen in

100 μ l PBS-Antikörpermischung resuspendiert und 30 min inkubiert. Nach einmaligem Waschen wurden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugiertem Sekundärantikörper (1:100 in PBS) für weitere 30 min im Dunkeln inkubiert. Die FACS-Analyse erfolgte nach einem erneuten Waschschrift und Resuspendierung in 500 μ l PBS.

Im FACS-Scan wurden die Zellen durch eine Kapillare in das Gerät eingezogen und dort von einem Argonlaser bestrahlt. Die Wellenlänge des emittierten Lichts ist von dem verwendeten Fluoreszenzfarbstoff abhängig. Das Licht wird von Sammellinsen eingefangen und über Spiegel und Filter zu Detektoren geleitet, welche Auskunft über Grösse (forward scatter, FSC), Granularität (sideward scatter, SSC) oder Fluoreszenz (fluorescence detector, FL) geben. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des Programmes CellQuest Pro (Becton Dickinson).

2.6.8 Der AKT-Phosphorylierungsversuch

Der Einfluss der isolierten Aptamere auf die Aktivierung des AKT-Signalweges wurde nach spezifischer Induktion mit HRG-1 β untersucht. Hierfür wurde die Methodik der Proteintransduktion angewandt.

Für den Versuch wurden 4×10^5 MCF Zellen pro 6 well Platte ausplattiert. Die exprimierten Aptamer-9Arg Fusionsproteine (Kap. 2.5.1.3) wurden auf Eis aufgetaut und 30 min bei 10.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Die MCF7 Zellen wurden mit 1-4 μ M 9xArg-Protein mit 100 mM Chloroquin für 4 h in Medium ohne FCS inkubiert und anschliessend mit HRG-1 β für 15 min stimuliert. Diese Induktion wurde wie oben beschrieben abgestoppt und die nicht transduzierten Proteine durch vier maliges Waschen mit PBS entfernt.

Die Zellernte erfolgte wie oben beschrieben (Kap. 2.6.2), wobei die Zellen in NP40-Lysispuffer aufgenommen wurden. Die Proteinmengen wurden mittels Bradford Reagenz bestimmt, abgeglichen und 60 μ g pro Probe auf ein 8 prozentiges SDS-Gel aufgetragen.

Im Western Blot wurde als 1. Antikörper pAKT (1:1000 in TBS-T mit 5 % BSA) und als 2. Antikörper anti Kaninchen-HRP (1:5000) verwendet wurde. Die auf der PDVF-Membran gebundenen Antikörper wurden nach der pAKT Statusanalyse mit einem Pierce Stripping Buffer entfernt und ein erneuter Western Blot mit einem total AKT durchgeführt, um gleiche Proteinmengen zu vergleichen.

2.6.9 Der Weich-Agar Versuch

Der Weich-Agar Versuch dient als Transformationskontrolle von Zellen. Die hierbei verwendeten NIH#3.7 sind NIH 3T3 Zellen, die durch den ErbB2 Rezeptor transformiert sind und von seiner Aktivität in ihrem Wachstum auf Weich-Agar abhängig sind.

Für den Weich-Agar Versuch wird eine Bodenschicht aus 0,5% LMP-Agar (Low Melting Agar) verwendet. Hierfür wurde 2 prozentiger LMP-Agar aufgewärmt und 1:4 mit warmem DMEM 10 % ++ Medium gemischt und 50 µl der Lösung in 96-well Platten ausplattiert. Zum Aushärten wurde die 96-well Platte für 10 min bei 4 °C inkubiert.

Als nächste Schicht wurde eine 0,3 prozentige Zellschicht verwendet. Hierfür wurden die Zellen auf 5×10^4 Zellen/ml eingestellt und bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. 3 prozentiger LMP-Agar wurde erwärmt und ebenfalls bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Für die Zellschicht wurden nun 100 µl 3 prozentiger LMP-Agar und 900 µl Zellen verwendet. Die vorbereitete 96-well Platte mit der Bodenschicht wurde mittels Eis weiter abgekühlt und die Zellschicht aufgebracht. Es ist wichtig, dass die Zellschicht schnell aushärtet, da die Zellen sonst absinken und auf der Bodenschicht wachsen. Das Wachsen auf der Bodenschicht ist auch im nicht-transformierten Zustand möglich und würde die Ergebnisse verfälschen. Es wurden von jedem Ansatz Triplets ausplattiert, wobei die Randbereiche der Platte wegen schnellen Austrocknens nicht benutzt wurden. Der Ansatz wird durch 100 µl Zellmedium pro 96-well vervollständigt. Das Zellwachstum erfolgte 7-14 Tage und wurde mit einem XTT-Versuch bestimmt.

2.6.10 Der Zytotoxizitätsversuch

Der Zytotoxizitätsversuch wurde mit MCF7 neo und MCF7 her2 Zellen durchgeführt. Beide Zelllinien wurden am Tag vor dem Versuch zu 5000 Zellen pro well in einer 24-well Platte ausplattiert.

Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an dem Zytostatikum Taxol (0,01; 0,04; 0,4; 4 µM) für 4 h mit 10 % Aktivkohle-gereinigtem FCS in DMEM Medium behandelt. Die Aktivkohlereinigung entfernt Steroide aus FCS, welche die Effekte des Zytostatikums inhibieren könnten. Ferner wurde ein Phenolrot-freies DMEM Medium verwendet, da Phenolrot als Steroid wirken kann. Die Zellen wurden 3 h vor und während der Taxol-Behandlung mit 2 µM aufgereinigten Peptid-Aptameren inkubiert, um den Effekt der Aptamere auf die Apoptose-Induktion zu untersuchen.

Das Zytostatikum und die Aptamere wurden nach 4 Stunden von den Zellen entfernt und durch normales Wachstumsmedium ersetzt. Es folgte eine Inkubation für 3 Tage, um die Taxol-Wirkung sicherzustellen. Taxol löst in sich teilenden Zellen Apoptose aus, indem es die Depolymerisation der Mikrotubuli während der Mitose verhindert. Die Wirkung der Zytostatika auf die Zellen wurde mit Hilfe eines XTT-Tests festgestellt (siehe Kap. 2.6.13).

2.6.11 Nachweis der Expressionsinduktion mittels Luciferase-Versuch

Mit Hilfe des Luciferase Versuchs wurde die Induzierbarkeit der in Kap. 2.6.4 beschriebenen NIH#3.7 rTA Zellen überprüft. Hierfür wurden die Zellen am 2. Tag nach der transienten Transfektion des Luciferasereporterkonstruktes mit PBS gewaschen und mit 60 ml Luciferase-Lysispuffer pro 12-well plate für 20 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden von der Platte abgekratzt und für 5 min bei 14.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Es wurden je Triplets aus 10 µl Zellextrakt für den Luciferase Versuch und Triplets aus 3 µl für den β-Galaktosidase Versuch in Mikrotiterplatten ausplattiert. 1 µl Zellextrakt wurde zum Messen der Proteinkonzentration mittels Bradford eingesetzt. Die Luciferase-Aktivität wurde über den Umsatz von Luciferin im Luminometer bestimmt. Der Zellextrakt für den β-Galaktosidase Versuch wurde für 30 min mit β-Galaktosidase Reaktionspuffer bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend im Luminometer gemessen. Die Luciferase-Werte wurden abschließend mit den β-Galaktosidase-Werten abgeglichen.

2.6.12 Proliferationsnachweis mittels XTT-Versuch

Der XTT-Versuch bestimmt die Menge an lebenden Zellen im Ansatz. Die Grundlage für die Messung ist die Umwandlung von Tetrazolium Salzen (z.B. XTT, MTT, usw.) durch die Succinat-Tetrazolium-Reduktase zu Formazan. Tetrazolium Salze besitzen eine schwache Rotfärbung, Formazan hingegen ist stark rot gefärbt. Die Succinat-Tetrazolium Reduktase ist eine Komponente des Atmungskettenkomplexes der Mitochondrien und nur in metabolisch intakten Zellen aktiv. Dadurch lässt sich die Rotfärbung des Zellmediums mit der Anzahl an lebenden Zellen korrelieren.

Das XTT Substrat wurde durch eine 1:50 Zugabe von PMS aktiviert und als 1:2 Verdünnung mit Medium zu 100 ml auf die Platten gegeben. Die XTT Messung erfolgt nach 3-5 h bei 490 nm im ELISA Reader.

3 Ergebnisse

Peptid-Aptamere sind kurze Peptide in einem Gerüstprotein die in der Lage sind, mit bestimmten Zielproteinen zu interagieren und diese in ihrer Funktion zu inhibieren. In der Vergangenheit konnten Peptid-Aptamere gegen intrazelluläre Proteine die an der Krebsentstehung beteiligt sind, wie z.B. cdk, eF1 α oder E6 von HPV⁶⁰ isoliert werden. Zur Aptamer-Isolierung wurde das Hefe Zwei-Hybrid-System bereits erfolgreich angewandt und sollte auch in dieser Arbeit verwendet werden. Ziel der Arbeit war es Peptid-Aptamere zu isolieren, die spezifisch mit der Kinase-Domäne des ErbB2-Rezeptors interagieren und dadurch deren Funktion inhibieren. Die Überexpression des ErbB2-Rezeptors lässt sich in 30 Prozent aller Brusttumore detektieren. Sie führt durch Resistenzentwicklung gegenüber konventioneller Chemotherapie dazu, dass die ersten fünf Jahre nachdem die Diagnose gestellt wurde, nur fünf Prozent der Patienten überleben. Aus diesem Grund ist eine spezifische ErbB2-Therapie unbedingt notwendig, wozu hier ein alternativer Ansatz aufgezeigt werden soll.

Die *Abb. 3.1* zeigt eine Übersicht der verschiedenen durchgeführten Arbeitsschritte der vorliegenden Doktorarbeit, wobei die Kapitel gekennzeichnet sind, in denen die Versuche aufgeführt sind.

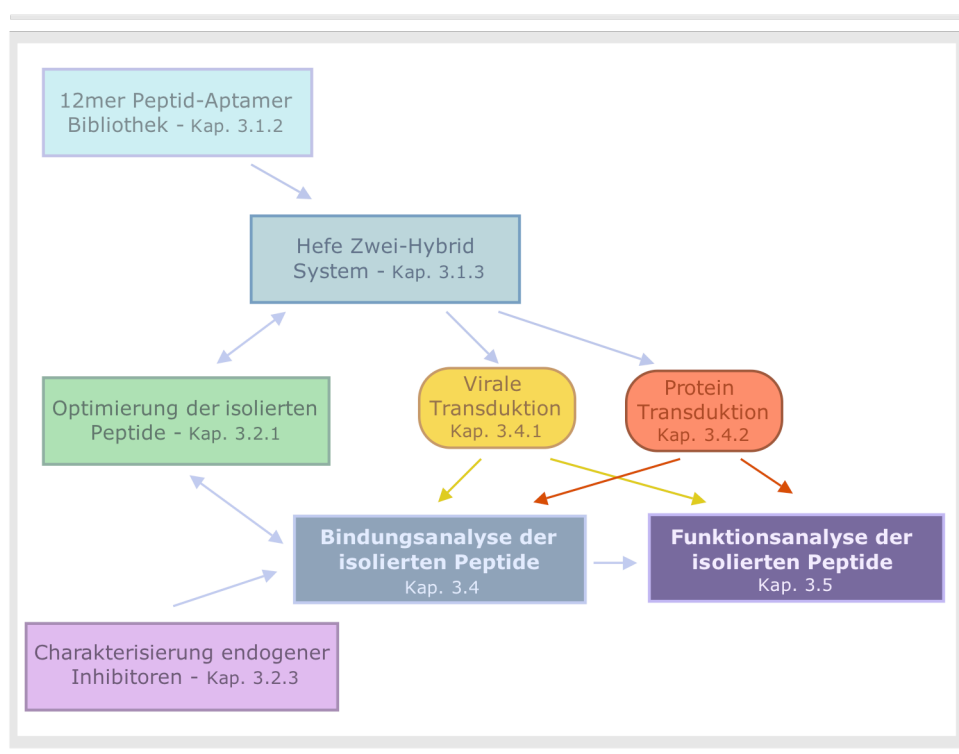


Abb. 3.1 | Arbeitsschritte zur Isolierung ErbB2-spezifischer Peptid-Aptameren

Die konstruierte 12mer Peptid-Bibliothek wurde in einem Hefe Zwei-Hybrid System auf Interaktionspartner mit der ErbB2-Tyrosinkinase Domäne untersucht. Verschiedene Verfahren wurden verwendet, um die Bindungsaffinität der Aptamere zu erhöhen. Ein endogener ErbB2-Inhibitor diente als alternativer Ansatz zur Aptamer-Applikation. Die Bindungs- und Funktionsanalyse der Aptamere erfolgte in humanen Krebszellen durch virale und Protein-Transduktion

3.1 Isolierung potentieller Tyrosinkinase Inhibitoren mit Hilfe des Hefe Zwei-Hybrid Systems

Die Peptid-Aptamere wurden in einem Hefe Zwei-Hybrid System in *Saccharomyces cerevisiae* auf die Interaktion mit einem bestimmten Zielprotein untersucht. Hierbei wird das jeweilige Zielprotein als Fusionsprotein mit der GAL4-DNA-Bindedomäne (GAL4-DBD) exprimiert. Die Aptamere als potentiellen Interaktionspartner werden mit der GAL4-Transaktivierungsdomäne fusioniert (GAL4-TAD). Bei Interaktion von Zielprotein und Peptid-Aptamer kommt es zur Transkription spezifischer auxotropher Reportergene, welches das Wachstum der Hefen auf unterschiedlichen Mangelmedien ermöglicht. Als Stamm für das Hefe Zwei-Hybrid System wurde der *S. cerevisiae* Stamm KF1 verwendet. Im Genom dieses Hefestammes sind drei Reportergene *ade2*, *his3* und *ura3* unter der Kontrolle von GAL4-UAS (upstream activating sequences) integriert.

3.1.1 Das GAL4-DBD-Fusionskonstrukt

Im durchgeführten Hefe Zwei-Hybrid Screen wurde die ErbB2-Tyrosinkinase als GAL4-DBD-Fusionskonstrukt in verschiedene Domänen unterteilt: die gesamte intrazelluläre Domäne, die gesamte Kinase Domäne, Kinase Domäne I und II (*Abb. 3.2*). Es konnte bereits von Hackel *et al.* gezeigt werden, dass ein ErbB2-Tyrosinkinase-Konstrukt, analog der gesamten Kinasedomäne dieser Arbeit, funktional in *S. cerevisiae* exprimiert und in einem Hefe Zwei-Hybrid Screen eingesetzt werden kann⁶⁷. Hackel *et al.* gelang es die Aktivität der Kinasedomäne in Hefe nachzuweisen und u.a. cDNA Klone zu isolieren, die für bekannte Interaktionspartner der Kinase kodieren. Die Unterteilung der ErbB2-Tyrosinkinase in zwei gleich große Domänen wurde außerdem für sinnvoll erachtet, da die heterologe Expression kleinerer Proteine in Hefe-Zellen im Allgemeinen geringere toxische Wirkungen aufweist und eine aktive Tyrosinkinase in der Hefe möglicherweise deren Wachstum außerhalb des Screening Systems beeinflusst. Ein weiterer Vorteil besteht darin die Region einzugrenzen, in welcher die Aptamere binden.

Die Klonierung der Konstrukte erfolgte durch Einsetzen der cDNA des ErbB2-Rezeptors in den retroviralen Vektor pSV2. Die mittels PCR amplifizierte DNA-Fragmente wurden über *SaI* und *NotI* in den Hefe Expressionsvektor pPC97 inseriert. Auf diese Weise konnten die unterschiedlichen ErbB2-Tyrosinkinasekonstrukte als GAL4-DBD-Fusionsprotein (GAL4-DBD: As 1-143) exprimiert werden.

Die *Abb. 3.2* zeigt eine schematische Darstellung der verwendeten ErbB2-Konstrukte im pPC97 Vektor (A | und B |). Über diesen Ansatz konnte die gesamte intrazelluläre Domäne (CT = 678-1254 as), die gesamte Kinase Domäne (KD_g = 720-987 as) und die zwei gleich großen

Fragmente der Kinase Domäne, KD I (720-852 as) und KDII (853-987 as) in das Hefe Zwei-Hybrid System eingesetzt werden. Nach einem *SalI/NotI* Verdau konnten die unterschiedlichen GAL4-DBD-Fusionskonstrukte nachgewiesen werden (C |). Alle Vektoren enthalten das Insert mit der erwarteten Größe. Die Konstrukte wurden mit Hilfe eines GAL4-Primers sequenziert und schließlich in den Hefe Stamm KF1 transformiert.

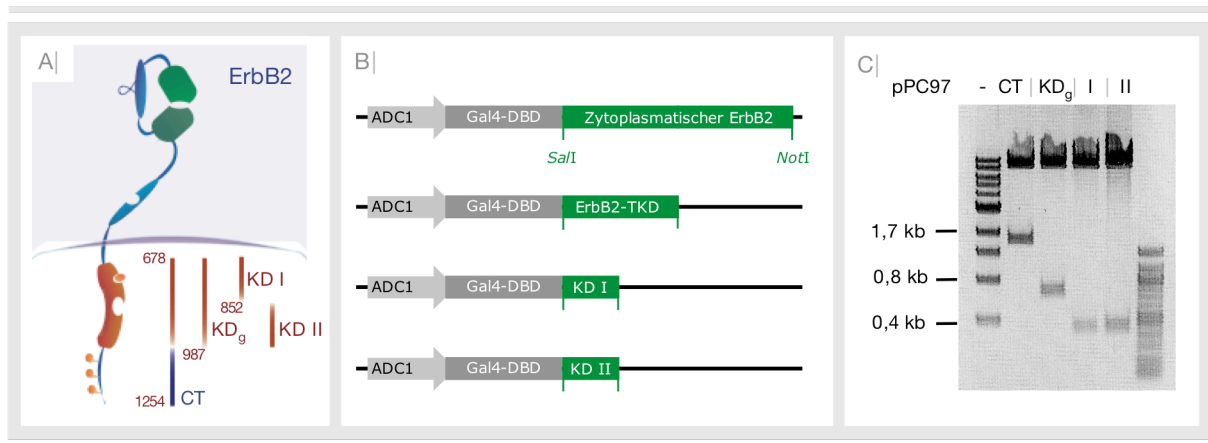


Abb. 3.2 | ErbB2-Konstrukte als GAL4-DBD-Fusion für den Hefe Zwei-Hybrid Screen

- A | Struktur des ErbB2 Rezeptors; der intrazelluläre Teil des Rezeptors wurde in vier Fragmente unterteilt: Intrazelluläre Domäne (CT = As 678-1254), gesamte Kinase Domäne (KD_g = As 720-987), Kinase Domäne I (KD I = As 720-852), Kinase Domäne II (KD II = As 853-987)
- B | Schematische Darstellung der GAL4-TAD-Konstrukte im Hefe-Expressionsvektor pPC97
- C | Restriktionsverdau der GAL4-DBD-Fusionskonstrukte mit *SalI* und *NotI*; gesamte intrazelluläre ErbB2 Domäne mit 1736 bp, die gesamte ErbB2 Kinasedomäne mit 800 bp und die Kinasedomäne unterteilt in zwei gleich grosse Fragmente (I und II) mit je 400 bp.

Die Expression der GAL4-DBD-Fusionsproteine wurde durch Analyse von Zellextrakten aus pPC97-transformierten KF1 nachgewiesen. Die Expression der unterschiedlichen GAL4-TAD-Konstrukte konnte in diesem Western Blot (Abb. 3.3), bis auf KD I, für alle Konstrukte sichergestellt werden. Die gesamte intrazelluläre Domäne (CT) zeigte eine geringere Expression als KD_g und KD II, welche gut exprimiert wurden. Durch die unterschiedliche Größe der Konstrukte ließ sich sicherstellen, dass es sich um eine spezifische Protein Detektion im Western Blot handelte.

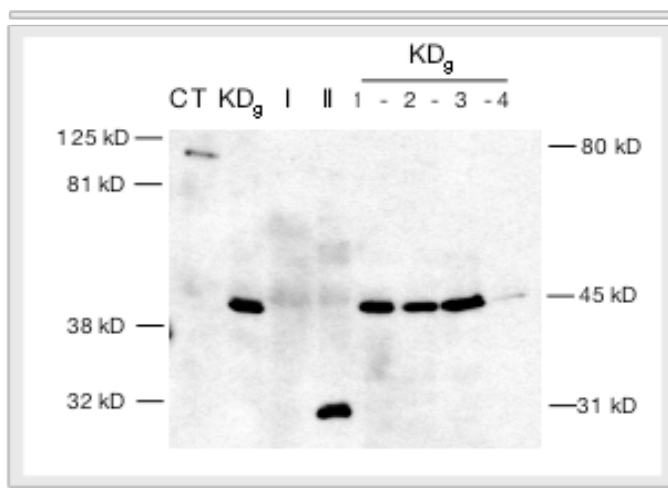


Abb. 3.3 | Expressionskontrolle der GAL4-TAD-Proteine im Hefe Stamm KF1

KF1 Proteinextrakte von verschiedenen Fusionskonstrukt-transformierten Hefe-Klonen wurden in einem 12 prozentigen Polyacrylamid-Gel über SDS-PAGE aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran übertragen und mit einem α GAL4-DBD Antikörper im Western Blot detektiert. Hierbei wurde die Expression der der gesamten intrazellulären Domäne (CT), der gesamten Kinase Domäne (KD_g) und KD II nachgewiesen.

Als Fazit der GAL4-DBD-Expression lässt sich sagen, dass es generell zur Expression der GAL4-DBD-Proteine kam, allerdings die Expression der gesamten intrazellulären Domäne deutlich gegenüber den anderen Konstrukten reduziert ist, da die Hefen möglicherweise Probleme bei der Expression von grossen humanen Proteinen haben.

3.1.2 Das GAL4-TAD-Fusionskonstrukt

Zur Konstruktion des zweiten Vektors für das Hefe Zwei-Hybrid-System wurden die Peptid-Aptamere in den pAD-Trx Vektor inseriert, um als Fusionsprotein mit der Transaktivierungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors (GAL4-TAD) exprimiert zu werden. Die randomisierten Sequenzen der Aptameren wurden in das aktive Zentrum (zwischen Cys³²-Cys³⁵) des bakterielle Gerüstprotein Thioredoxin inseriert, um sie als 12mer oder 20mer Peptide für die Interaktion mit dem Zielprotein in einer β -Faltblattschleife zu präsentieren. Das Gerüstprotein ist von entscheidender Bedeutung für gute Bindungsaffinitäten von Peptid-Aptamere und ermöglicht ferner die Exposition von hydrophoben Aminosäuren. Durch die Insertion der Aptamere in das aktive Zentrum des Proteins kann es als inert betrachtet werden und erfüllt nur den Zweck, die Peptide in einer stringenten Konformation zu präsentieren.

Die ursprüngliche 20mer Peptid-Aptamer Bibliothek wurde von den Kooperationspartnern der Gruppe Hoppe-Seyler, DKFZ Heidelberg zur Verfügung gestellt und besitzt eine Komplexität von 2×10^8 Peptid-Sequenzen. Bei der Klonierung der Bibliothek sollte durch eine spezielle Verwendung von DNA-Basen Triplets die Anzahl an Stopp-Kodons in den randomisierten Sequenzen verringert werden. Als Kodonverwendung für die Synthese der randomisierten Sequenzen wurde $(\text{NNK})_{20}$ gewählt, wobei N für A,T,G oder C und K für G oder C steht. Die verwendete Kodon Definition lässt nur UAG als Stopp-Kodon zu und nicht UAA oder UGA, wodurch die Anzahl der nicht vollständig exprimierten GAL4-TAD-Fusionsproteine reduziert wurde.

3.1.2.1 Amplifikation der 20mer Peptid-Aptamer-Bibliothek

Die 20mer Peptid-Bibliothek wurde amplifiziert, damit ausreichend grosse Mengen an Plasmiden für das Hefe Zwei-Hybrid System zur Verfügung standen. Bei der Amplifikation der Bibliothek im *E.coli*-Stamm DH10B wurden 9 Transformationen mit je 11 ng DNA durchgeführt, wobei eine Transformationseffizienz von $3,79 \times 10^7$ cfu/ μg DNA (cfu = colony forming unit; entspricht der Anzahl an Einzelklonen) erreicht werden konnte. Auf diese Weise konnte die Ausgangsbibliothek von 2×10^8 Peptid-Sequenzen in 4×10^8 Einzelklone transformiert werden, wodurch theoretisch alle Original-Peptid-Sequenzen doppelt in der amplifizierten Bibliothek vertreten sein sollten. Um die Qualität der Bibliothek nach Amplifikation zu überprüfen, wurde,

Thioredoxin und Aptamere über *Sall* und *NdeI* aus dem pAD-Trx Vektor geschnitten und mittels 2 % Agarose-Gel aufgetrennt (Abb. 3.4).

Durch die Klonierung von 20mer-Aptameren in Thioredoxin sollte ein 387 bp-großes DNA-Fragment ausgeschnitten werden, wobei das Thioredoxin Protein durch 327 bp, die Aptamere durch 60 bp kodiert sind. Dieses Fragment war als stärkste Bande im Gel sichtbar. Allerdings wurden nach dem Verdau noch weitere drei Banden unterschiedlicher Größe und Stärke im Agarose-Gel aufgetrennt. Die unterschiedliche Größe der Thioredoxin-Aptamer Inserts lässt sich mit der Art der Bibliothek Klonierung erklären.

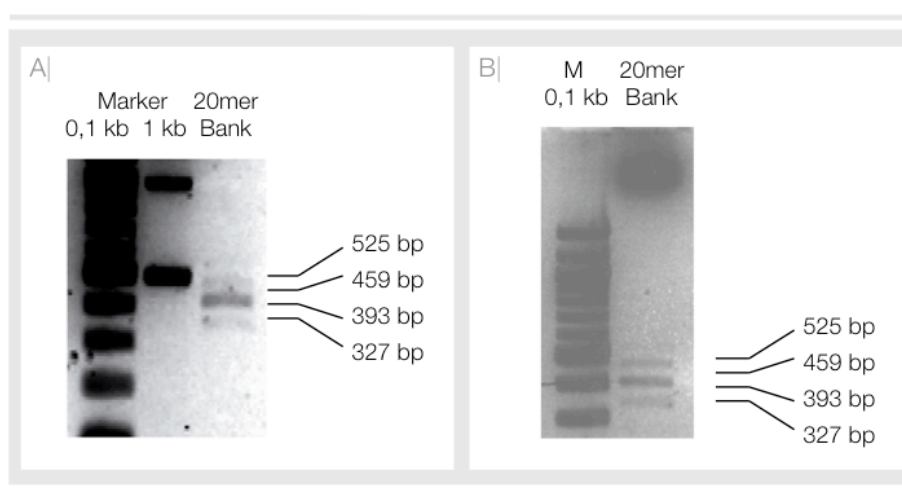


Abb. 3.4 | **Restriktionsverdau der 20mer Peptid-Bank**

- A | Verdau der Plasmid-Bibliothek nach der ersten Amplifikation. Durch *NdeI* und *Sall* Verdau wurde Thioredoxin mit Aptamer-Insert ausgeschnitten. Es sind vier Insert Banden unterschiedlicher Größe zu erkennen. In beiden Amplifikaten der Bibliothek sind vier Banden zu erkennen. Bei 327 bp handelt es sich um das leere Trx. Die stärkste Bande besitzt die Größe von 393 bp und kodiert für zwanzig inserierte Aminosäuren. Bei 459 bp wurde randomisierte DNA inseriert, die für 42 Aminosäuren kodiert und bei 525 bp handelt es sich um die Kodierung von 60 Aminosäuren.
- B | Die Amplifikation wurde wiederholt und die Plasmid-Bank analog verdaut.

Die Herstellung der Bibliothek erfolgte durch Insertion der randomisierten Sequenzen in eine einzelne *RsrII* Schnittstelle im aktiven Zentrum des Enzyms. Hierdurch konnten auch zwei oder drei Aptamer-Fragmente in den Bibliothek-Vektor kloniert worden sein, bzw. der Vektor auch ohne Insert ligiert werden. Die untere Bande des Gels entspricht dem leeren Thioredoxin, die beiden Banden mit 459 bp bzw. 525 bp dem Thioredoxin mit zwei bzw. drei Aptamer Fragmenten. Die Bande die Trx mit einem 60 bp Insert entspricht, ist jedoch am stärksten ausgeprägt, was darauf hindeutet, dass im Hefe Screen hauptsächlich 20mer Peptide untersucht wurden.

Nach mehreren Screeningversuchen wurde erneut die Amplifikation der Peptid-Bank erforderlich. Eine erneute Amplifikation einer Plasmid-Bibliothek hätte einen Qualitätsverlust durch Reduktion der Diversität zur Folge. Aus diesem Grund wurde die Peptid-Aptamer-Bibliothek neu konstruiert. Der Konstruktionsansatz wurde, im Vergleich zur bisherigen Bibliothek, an verschiedenen Stellen optimiert.

3.1.2.2 Konstruktionsoptimierung der neuen randomisierten 12mer Aptamer-Bank

Im Zuge der Neukonstruktion der Aptamer-Bibliothek wurden verschiedene Punkten optimiert, um den Anteil der richtig inserierten Oligonukleotide zu erhöhen, den Prozentsatz an Stopp-Kodons in den randomisierten Sequenzen zu erniedrigen und die Diversität zu erhöhen.

Über die einzelne *RsrII* Schnittstelle im aktiven Zentrum des Thioredoxins wurde eine flexible Linkerregion in das Gerüstprotein integriert, welche zwei zusätzliche Restriktionsschnittstellen, *NcoI* und *XhoI*, enthielt (Abb 3.5). Diese beiden Schnittstellen ermöglichten die gerichtete Klonierung der randomisierten Oligo-DNA Fragmente und sollten die Integration von zwei Aptamer-Fragmenten verhindern. Die inserierten Linker Sequenzen kodieren außerdem für je zwei Glycin-Reste, die 5'- und 3'- der randomisierten Sequenz. Auf diese Weise ist die Grundflexibilität der Aptamere durch Trx reduziert, wobei die für die Anpassung an das Zielprotein nötige Flexibilität erhalten bleibt (ausführliche Erklärung in Kap. 4.1.1).

Als randomisierte Sequenzen wurden im Gegensatz zum ursprünglichen Ansatz nicht 60 bp sondern nur 36 bp Fragmente verwendet, die für 12mer Aminosäuren kodieren. Durch die Verkürzung der randomisierten Sequenzen wurde bei der DNA-Oligonukleotidsynthese einen höheren Prozentsatz an richtig synthetisiertem Produkt erwartet, da der Prozentsatz an Stopp-Kodons von 62,5 % auf 37,5 % reduziert wird. Durch die geringere Diversität (10^{21} anstatt 10^{22}), wird ein höherer Prozentsatz an möglichen Aptamer-Sequenzen in der Peptid-Bank abgedeckt.

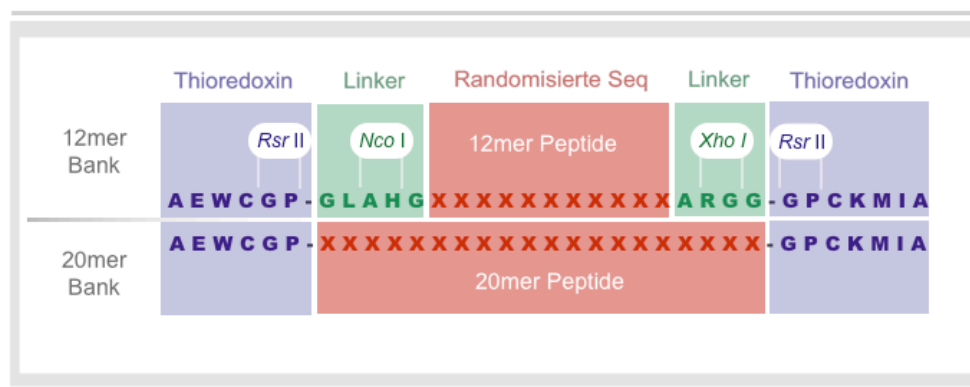


Abb. 3.5 | **Konstruktionsoptimierung der Peptid-Bank**

Die 12mer Bibliothek wurde durch die Insertion eines Glycin-Linkers mit 2 weiteren Restriktionsschnittstellen und durch die Verwendung von 12mer randomisierten Peptiden optimiert. Die Linker-Sequenzen wurden über die *RsrII* Schnittstelle eingefügt und anschließend die randomisierten Sequenzen über *NcoI/XhoI*. Im unteren Teil der Abbildung ist die 20mer Bibliothek dargestellt, in welche die randomisierten sequenzen über eine *RsrII* Schnittstelle eingefügt wurden. Randomisierte Sequenzen sind in rot, Linker Sequenzen in grün und Sequenzen des Trx-Gerüstproteins in blau dargestellt.

3.1.2.2.1 Klonierung und Amplifikation der randomisierten DNA Oligonukleotide in den GAL4-TAD Vektor

Als weiterer Optimierungsschritt wurde neben der Klonierungsstrategie und der Aptamer-Länge, die Methode für die Zweitstrangsynthese der DNA modifiziert. Bei der 20mer Library wurden die Oligonukleotide über ein 5´-/3´-Primerpaar für die Klonierung zum DNA-Doppelstrang aufgefüllt. Wird ein Primerpaar zur Doppelstrangsynthese eingesetzt, können durch die PCR bestimmte Klone bevorzugt amplifiziert werden, wodurch eine homogene Verteilung der randomisierten Oligonukleotide in der Bibliothek nicht gewährleistet ist. Um dies zu vermeiden wurde in der 12mer Bibliothek ein Hairpin an die randomisierten Einzelstrang-Oligonukleotide angefügt. Ein Vorteil der Verwendung eines Hairpins besteht darin, dass die Effektivität der Zweitstrangsynthese erhöhen werden kann. Der Hairpin ermöglicht es unter stringenteren Bedingungen die Zweitstrangsynthese durchzuführen und durch mehrere Zyklen einer Zwei-Schritt PCR die DNA-Doppelstrangsynthese zu optimieren. Hierbei wird die Einzelstrang-DNA lediglich zur Doppelstrang-DNA umgewandelt. Es findet jedoch keine Amplifikation der randomisierten Oligonukleotide und damit kein Diversitätsverlust der Bibliothek statt.

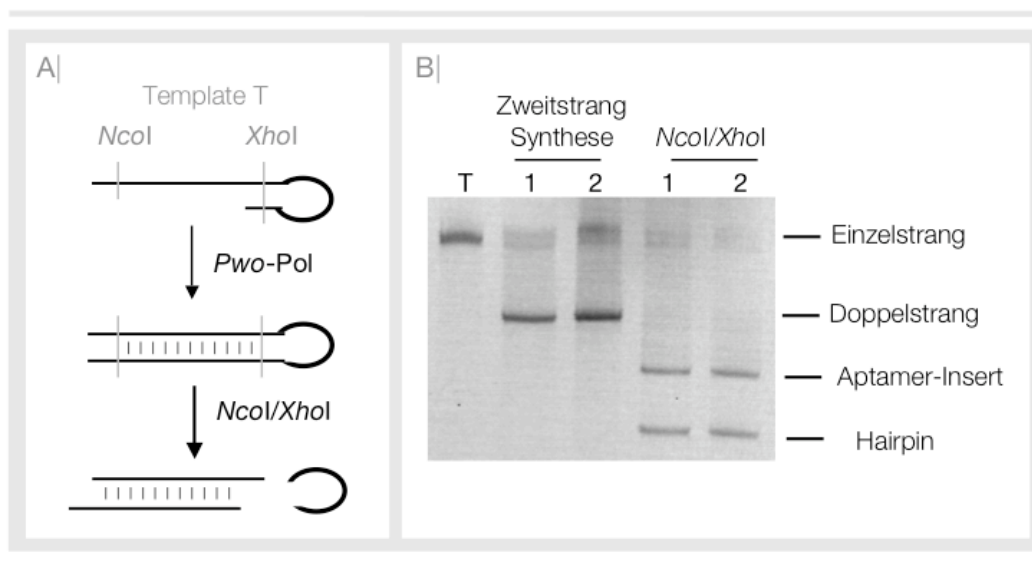


Abb. 3.6 | **Zweitstrang Synthese und Verdau der randomisierten Oligo-DNA Sequenzen**

- A | Vorbereitung der Oligonukleotide mit Hairpinstruktur zur Insertion in den Gal4-TAD-Vektor. Die Hairpin-Oligonukleotide mit randomisierten Sequenzen wurden mittels Pwo-Polymerase zum Doppelstrang aufgefüllt und durch *NcoI/XhoI* Verdau der Hairpin abgespalten. Die doppelsträngige DNA wurde in den Trx-Linker des Gal4-TAD Vektors eingesetzt
- B | Das 20 % Polyacrylamidgel zeigt den DNA-Einzelstrang (T) als Ausgangspunkt, die Zweitstrang Synthese und das Ergebnis des *NcoI/XhoI* geschnittenen Doppelstrangs mit der jeweiligen Aufreinigung der Oligo-Nucleotide vor und nach jedem Schritt. Das Gel zeigt ferner die DNA vor (1) und nach (2) der jeweiligen Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung

In der *Zwei-Schritt PCR* wurden die Einzelstrang-Oligonukleotide mit einer *Pwo*-Polymerase in zum Doppelstrang vervollständigt. Unter diesen Bedingungen gelang es, den DNA-Doppelstrang mit ca. 90 % Effizienz zu generieren. Es folgte eine Phenol/Chloroform Extraktion,

in der die Polymerase denaturiert wurde. Die amplifizierte DNA wurde durch 80 % Ethanol gefällt. Anschließend wurden die Fragmente in einem Restriktionsverdau mit *NcoI/XhoI* über Nacht geschnitten. Durch die geringe Größe der geschnittenen DNA Fragmente konnten diese nur über ein 20 prozentiges natives Polyacrylamid Gel elektrophoretisch aufgetrennt (PAGE) werden. Es gelang jedoch nicht die DNA quantitativ aus dem Acrylamidgel zu isolieren. Infolgedessen wurde die geschnittene DNA mit Phenol/Chloroform extrahiert und nach Ethanol-Fällung direkt in die Ligation eingesetzt. Die PAGE diente der Kontrolle der Zwei-Schritt PCR, des Verdau und der Aufreinigung (Abb. 3.6).

Die *Ligation* wurde mit verschiedenen DNA-Mengenverhältnissen durchgeführt. Das Vektor zu Insert Verhältnis von 10:1 führte zur höchsten Anzahl an Insert-positiven Klonen führte. Mit optimiertem Ligationsansatz wurde die DNA-Menge für die Elektroporation ermittelt, welche zur größtmöglichen Anzahl an *E. coli* Transformanten führte. So ergab eine Elektroporation von 230 μl DH10B elektrokompetenten Bakterien mit 1,5 μg Bibliothek-Ligationsansatz die höchste Anzahl an *E. coli* Transformanten ($1,2 \times 10^9$ cfu).

Die *Transformation* der Bibliothek in *E.coli* wurde in zwei unabhängigen Experimenten erfolgreich durchgeführt. Im ersten Ansatz wurde mit 75 Elektroporationen eine Komplexität der Bibliothek von insgesamt $2,5 \times 10^7$ cfu, im zweiten Ansatz mit 90 Elektroporationen eine Komplexität von insgesamt $1,2 \times 10^8$ cfu erreicht.

Zur *Amplifikation* der DNA wurden die einzelnen Elektroporationsansätze in 8 L LB-amp Medium bei 30°C inkubiert. Die Elektroporationen wurden somit in einer ausreichend großen Flüssigkultur angeimpft und die Bakterien bei einer OD_{600} von 0,5 zur Plasmid-Isolierung geerntet, um das Überwachsen von Einzelklonen zu vermeiden. Die Amplifikation erfolgte bei 30 °C, um das Auftreten von Mutationen zu minimieren.

Die optimierte Konstruktion der Bibliothek machte es möglich eine neue Plasmidbank zu generieren, die für GAL4-TAD-Trx Fusionsproteine mit 12mer randomisierten Aptamer-Sequenzen kodiert. Es galt nun die Qualität dieser Plasmid-Bank zu überprüfen.

3.1.2.2.2 Qualitätskontrolle der neuen 12mer Peptid-Bibliothek

Die Qualität der amplifizierten Plasmid-Bank wurde durch zwei Methoden sichergestellt. Zum einen wurde die gesamte Plasmid-Bank verdaut und die Insertgröße mit der 20mer Bibliothek verglichen (Abb. 3.7). Zum anderen wurden 96 Klone gepickt und durch Restriktionsverdau und Sequenzierung das Vorhandensein der inserierten randomisierten Sequenzen überprüft und die Diversität bestimmt (Abb.3.8).

Das in Abb. 3.7 A| dargestellte Agarosegel, diente der Kontrolle der einzelnen Klonierungsschritte. So zeigt sich im Vergleich mit dem Fragment des leeren Thioredoxin mit Glycin-Linker (Trx) nach einem *NdeI/XbaI* Verdau ein deutlicher Größenunterschied von 36 bp zum Trx mit Aptamer nach der Amplifikation (Lib). Es ist nur eine Bande in der Größe mit

inserterter randomisierter Sequenz zu erkennen, wodurch eine Religation mit dem leeren Vektor ausgeschlossen werden konnte. Ferner wurde in diesem Gel der Ligationsansatz (Lig) nach *NdeI/XbaI* Verdau aufgetragen.

In *Abb. 3.7 B* | wurde ein *NdeI/XbaI* Verdau der neuen 12mer Bibliothek (12mer) im Vergleich mit der 20mer Bibliothek (20mer), sowie leerem Thioredoxin mit *NcoI/XhoI* Linker (Trx) als Negativkontrolle und dem isolierten Aptamer KDI1 als Positivkontrolle durchgeführt. Die Bande der 20mer Bibliothek besitzt die gleiche Grösse wie die 12mer Bank, da durch die Insertion des Glycin-Linkers die gleiche Anzahl an Basen-Triplets in das Trx eingebracht wurde.

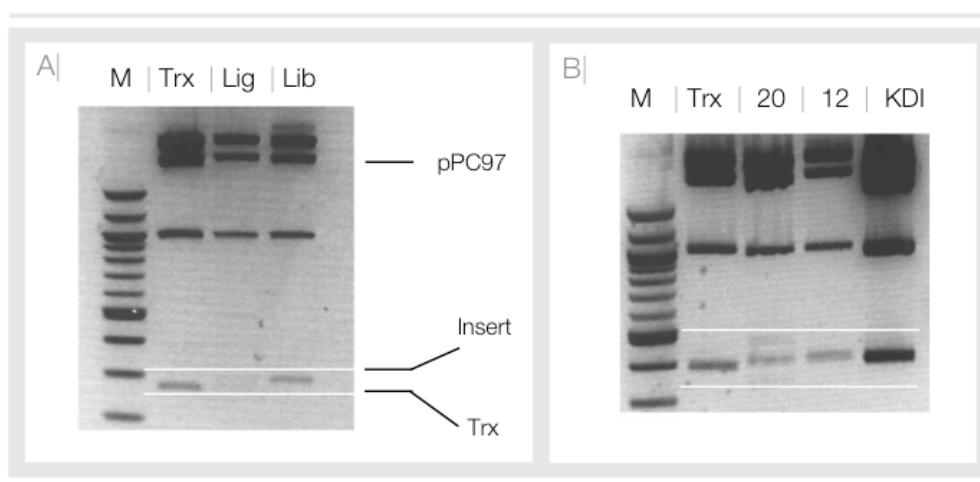


Abb. 3.7 | **Qualitätskontrolle der klonierten 12mer Plasmid-Bank**

- A | *NdeI/XbaI*-Doppelverdau von leerem pAD-Trx Vektor mit Linker (Trx), Ligationsansatz (Lig) und von amplifizierter pAD-12mer-Aptamer-Bank (Lib);
 B | Analoger Doppelverdau von leerem pAD-Trx (Trx), der pAD-20mer-Aptamer-Bank (20), der pAD-12mer-Aptamer-Bank (12) und einem 20mer Aptamer pAD-KDI1 als Positivkontrolle.

Durch die Optimierung der Bibliothek Klonierung ist es gelungen, hauptsächlich eine Kopie von randomisierte Oligonukleotid-Sequenzen in den GAL4-TAD-Vektor zu klonieren und nicht mehrere Kopien oder sogar leeren Vektor zu ligieren, wie dies in der original 20mer Bibliothek der Fall war. Durch die Klonierungsstrategie wurde die Insertion von zwei Aptamer-Fragmenten pro Vektor (entspricht einem 42 as Insert bei 20mer Bibliothek) ausgeschlossen. Da die Insertion von drei Kopien der randomisierten Sequenzen theoretisch möglich war, wurde die DNA von 96 Einzelklonen isoliert und analysiert.

Es wurden 96 pAD-Plamide, aus Einzelklonen nach Transformation der Aptamer-Bibliothek isoliert. Diese Plasmide wurden zunächst mit *NdeI/XbaI* verdaut (*Abb. 3.8*), um das Trx zur Größenanalyse aus dem pAD-Vektor zu scheiden. Durch den Doppelverdau konnte sichergestellt werden, dass jeder untersuchte Bibliotheksklon nach der Amplifikation die randomisierten Aptamer-Sequenzen enthielt. Ferner zeigte der Kontrollverdau, dass es sich bei den inserierten Sequenzen durchweg um DNA für 12mer Peptide handelt, im Gegensatz zur

20mer Bibliothek, die zum Teil auch doppelte und dreifache randomisierte Sequenzen enthält, oder Trx ohne Insert (Abb. 3.7).

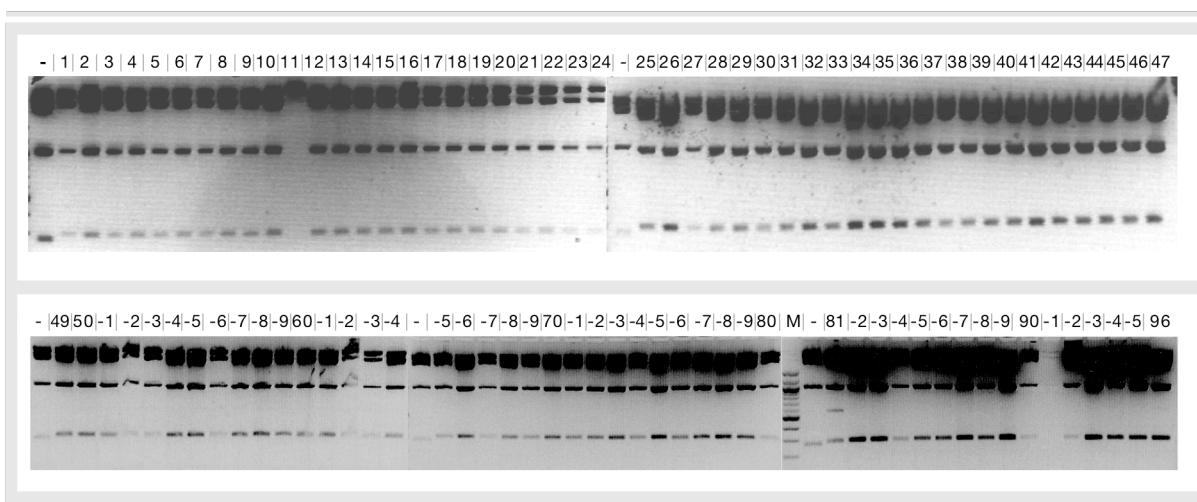


Abb. 3.8 | Restriktionsverdau von Einzelklonen nach Transformation der pAD-12mer Bank in *E. coli*
Nach Transformation der pAD-12mer-Bank in *E. coli* wurden 96 Einzelklone gepickt und die isolierte DNA mit *NcoI/XhoI* verdaut. Die 96 pAD-Plasmide zeigen einen deutlichen Größenunterschied zum leeren Thioredoxin mit Linker (-) und weisen alle die DNA für ein Insert aus 36 bp auf.

Die Kontrolle sowohl der Diversität, als auch der Qualität der Plasmid-Bank erfolgte nach Doppelverdau durch Sequenzierung der 96 Plasmiden. Die theoretische Diversität von randomisierten 12mer Peptiden liegt bei $1,2 \times 10^{21}$. Bei einer Plasmid-Bank mit einer Komplexität von 2×10^8 sollte, bei einer stochastischen Verteilung der verschiedenen Peptide, die Diversität der Plasmid-Bank ihrer Komplexität entsprechen. Dies lässt sich jedoch nur in Stichproben nachprüfen. Die sequenzierten Klone ergaben 64,0 % richtige Sequenzen, 26,0 % Stopp-Kodons und 10,0 % Leserasterverschiebung in den randomisierten Abschnitten.

Die spezielle Kodon-Verwendung NNK erlaubt eine Reduzierung der Stopp-Kodons in den randomisierten Sequenzen auf 3,1 % pro Basen-Triplett ($N=4$, $K=2$, d.h. $NNK = 4 \times 4 \times 2 = 32$ verschiedene Basenvariationen pro Triplett, wobei ein Stopp-Kodon auftreten kann). Bei 12 randomisierten Basen-Tripletts addiert sich die Wahrscheinlichkeit auf 37,5 % Stopp-Kodons in den randomisierten Sequenzen. Mit 26 % Stopp-Kodons in den randomisierten Sequenzen liegt der Wert nach der Klonierung sogar deutlich unter dem erwarteten Wert von 37,5 %. Im Vergleich hierzu sind in der 20mer Bibliothek 62,5 % Stopp-Kodons in den randomisierten Sequenzen zu erwarten ($20 \times 3,125$ % pro Triplett). Allerdings besteht die Möglichkeit, dass die randomisierten Sequenzen der 20mer-Bank in falscher Orientierung inseriert werden. Ist dies der Fall, ist die Kodon-Definition KNN und es treten keine Stopp-Kodons in den Sequenzen auf. Auf diese Weise halbiert sich die Wahrscheinlichkeit von Stopp-Kodons in den randomisierten Sequenzen zu 31,5 %. Allerdings können bei dieser Kodon-Definition nicht mehr alle Aminosäuren kodiert werden. Die Aminosäuren Phe, Ser, Tyr, Cys, Trp, Ser, Lys, Thr, Met und Ile treten in den Bank nicht mehr auf. Ferner stehen für Leu, Arg und Asp nur noch die Hälfte

aller kodierenden Basen-Triplets zur Verfügung. Somit wird die Diversität der Peptid-Bank stark eingeschränkt, was gerade im Fall von Tyr als mögliches ErbB2-Tyrosinkinase Substrat besonders schwer zum Tragen kommt.

Als abschließendes Fazit der Klonierung und Amplifikation einer randomisierten Peptid-Bibliothek lässt sich sagen, dass durch die Verwendung von zwei zusätzlichen Schnittstellen, ausschließlich randomisierte DNA für 12mer Peptide inseriert wurde und das Auftreten von Aptamer-Dubletts und -Triplets vermieden werden konnte. Mit 64 % lag der Prozentsatz an korrekt inserierten Oligonukleotiden ohne Stopp-Kodon sogar über dem Wert der berechneten Wahrscheinlichkeit von 62,5%. Durch die beiden zusätzlichen Restriktionsenzyme tritt die DNA-Insertion in falscher Orientierung nicht mehr auf, wie dies bei der ursprünglich verwendeten 20mer Bibliothek möglich war. Die Falschinsertion führt zu einem erheblichen Diversitätsverlust da dadurch in der Hälfte aller Bibliotheksklone nur noch 10 der 20 möglichen Aminosäuren kodiert werden können. Auf diese Weise wurde durch die Optimierung der Aptamer-Bank die Qualität der Bibliothek im Vergleich zur ursprünglich verwendeten Peptid-Bank deutlich gesteigert.

3.1.3 Screening nach ErbB2-Kinase-interagierenden Peptid-Aptameren im Hefe Zwei-Hybrid System

Die Analyse der Aptamer-Bank auf ErbB2-Interaktionspartnern erfolgte mit Hilfe des Hefe Zwei-Hybrid Systems im Hefe Stamm KF1. Als GAL4-DBD-Fusionsproteine dienten die unterschiedlichen Konstrukte der ErbB2-Tyrosinkinase Domäne und als GAL4-TAD-Fusionsproteine die 20mer und 12mer Peptid-Aptamer Bank.

3.1.3.1 Hefe Zwei-Hybrid Screens einer 20mer Peptid-Bibliothek

Für die Interaktionsanalyse wurden KF1 Zellen mit GAL4-DBD-KDI- und GAL4-DBD-KDII-Vektoren transformiert und Hefeklone, die eine gute Expression der Fusionsproteine zeigten (*Abb. 3.3*), für die Transformation der 20mer Plasmidbank verwendet. Die Plasmidbank wurde mittels Transformation im Großansatz in KF1 Zellen eingebracht. Die Transformanten wurden zur Selektion auf Selektionsplatten ohne Leu, Trp und Ade ausplattiert.

Die Anzahl an transformierten Hefezellen lag in einem Bereich von $5,2 \times 10^6$ bis $7,5 \times 10^7$ Zellen, wobei 20 µg DNA pro Transformation eingesetzt wurden (*Tabelle 3.1*). Hieraus ergibt sich ein Mittelwert von $2,4 \times 10^7$ Transformanten und ein Gesamtwert von $1,7 \times 10^8$ Transformanten. Unter diesen Bedingungen wurden 10 % der gesamten Diversität der Bibliothek-Peptide pro Screen auf Interaktionen mit der ErbB-Kinase untersucht. Die Erkenntnis mit sieben durchgeführten Screens insgesamt nur 85 % der 20mer Aptamer Bibliotheken untersucht zu

haben, erforderte eine Optimierung der Screening Methode um höhere Transformations-Effizienzen zu erreichen. Diese Optimierung wurde anschließend mit der 12mer Plasmid-Bank durchgeführt (siehe Kap. 3.1.3.4)

Tabella 3.1 | Hefe Zwei-Hybrid Screens gegen die Kinasedomäne I und II

Transformations-Nr.	Kinase Domäne	Nr. der Kolonien auf –LTA	Transformationeffizienz ^o
1	I	--	$1,84 \times 10^7$
2	I	1*,2,3	$5,32 \times 10^6$
3	I	--	$1,57 \times 10^7$
4	I	4,5	$5,21 \times 10^7$
5	II	6,7*,8	$1,73 \times 10^6$
6	II	--	$7,35 \times 10^6$
7	II	9,10	$7,50 \times 10^7$

^o Transformationeffizienz in cfu/20 µg DNA

* Einzelklone die weiter analysiert wurden

Insgesamt konnten zehn Hefeklone isoliert werden, die eine Aptamer-ErbB2-Interaktion auf –LTA Medium zeigten. Die Aptamer KD I1 und KD II7 wurden für weitere Versuche verwendet.

3.1.3.2 Verifizierung der Aptamer-Kinase-Interaktion durch Selektion unter stringenteren Bedingungen

Zur Identifikation von Aptameren, die in der Lage sind mit der ErbB2-Kinase Domäne zu interagieren, wurden die Hefe-Transformanten auf Medium ohne Adenin ausplattiert. Um die Interaktion qualitativ zu beurteilen, wurden die Transformanten auf Medium ohne His und Ura ausplattiert, wodurch die Stringenz der Wachstumsbedingungen erhöht wurde. Das Wachstum auf Uracil-Mangelmedium tritt nur bei besonders starken Protein-Protein-Wechselwirkungen auf und wurde bei den isolierten Aptameren nicht festgestellt.

Bei Wachstum der Hefen auf His-freiem Medium kann die Stringenz durch Zugabe von 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) erhöht werden. Das His3-Genprodukt, welches an der Histidin-Biosynthese beteiligt ist, wird durch 3-AT inhibiert. Bei starker Kinase-Aptamer Interaktion im Hefe Zwei-Hybrid System wird His3 stark exprimiert. Nur eine hohe Expression erlaubt die His-Synthese trotz 3-AT Inhibition und das damit verbundene Wachstum der Hefezellen in His-Mangelmedium. Durch unterschiedlich hohe Konzentrationen von 3-AT kann somit die Stärke der ErbB2-Aptamer Interaktion näher bestimmt werden.

Nach dem Wachstum der Klone auf Selektionsmedium –LTA wurden die Klone sowohl auf Medium ohne Uracil bzw. ohne His mit unterschiedlichen 3-AT Konzentrationen ausplattiert. Unter den stringentesten Bedingungen, auf Ura-Mangelmedium, war kein Wachstum der Hefen möglich. Es zeigte sich, dass die Peptid-Aptamere 1, 2 und 3 gegen die KD I (*Abb. 3.9 – obere Zeile*) und 6, 8 und 9 gegen die KD II (*Abb. 3.9 – untere Zeile*) Wachstum auf –LTH

Selektionsmedium in Gegenwart von 10 mM 3-AT aufweisen, wohingegen die Aptamere bei höheren 3-AT Konzentrationen kaum Reporter-gen-Transkription auslösen konnten (nur noch spärliches Wachstum bei 15 mM 3-AT).

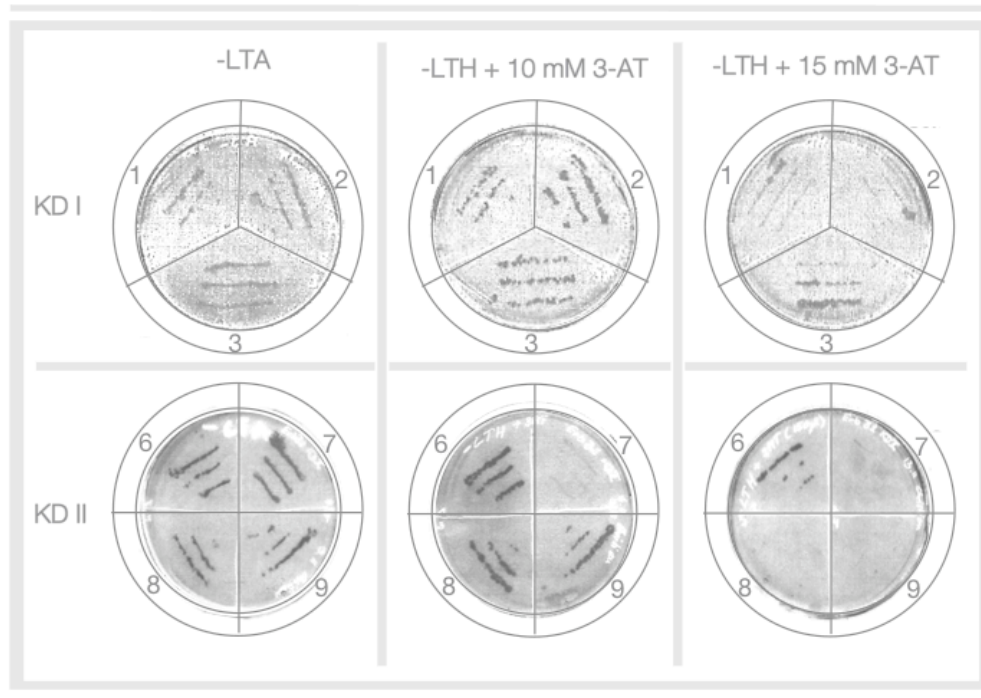


Abb. 3.9 | **Wachstum der isolierten Aptamere gegen KDI und KDII auf -LTA und -LTH**

Die drei Aptamere gegen KD I (1-3) und die vier Aptamere gegen KD II (6-9) wurden mit KD I- bzw. KD II-Plasmiden in KF1-Zellen co-transformiert und auf -LTA Platten ausgestrichen. Durch Stempeln wurden die Zellen auf -LTH +3AT (10 mM bzw. 15 mM) übertragen. Durch die Interaktion von KD und Aptamer wurde das Ade2- bzw. His3-Reporter-gen exprimiert, wodurch das Wachstum auf -LTA bzw. -LTH sichergestellt wurde. Das His3-Protein kann durch 3-AT inhibiert werden, was das Wachstum der Hefen auf -His Medium verhindert. Die Inhibition von His3 ist 3-AT konzentrationsabhängig, so dass bei hohen 3-AT Konzentrationen das Hefewachstum nur bei hoher His3 Expression durch eine starke Kinase-Aptamer Interaktion möglich ist.

Da die Aptamere generell in der Lage waren das Wachstum der Hefezellen -LTA, -LTH und -LTH + 10 mM 3-AT zu garantieren wurden ihre Sequenzen überprüft.

3.1.3.3 Sequenzanalyse der isolierten Peptid-Aptamere aus der 20mer Plasmid-Bank

Die Aptamer-DNA wurde aus den Hefen mit Hilfe eines Plasmidisolierungskits der Firma Bio 101 isoliert und in *E. coli* amplifiziert. Nach erneuter Plasmid-Isolierung aus *E. coli* wurden die Plasmide mit *Sall* und *NdeI* geschnitten (Abb. 3.10), um die Größe der inserierten Aptamere zu analysieren. Dieser Doppelverdau zeigte Aptamer-Inserts unterschiedlicher Größe.

Die Aptamere der KD I und Aptamer 8 und 9 der KD II besitzen die Größe von 393 bp, was Trx mit einer Peptid-Sequenz von 20 Aminosäuren entspricht. Die Aptamere 6 und 7 der KD II

besitzen ein Insert von 495 bp, was Trx mit einer Peptid-Sequenz von 40 Aminosäuren entspricht.

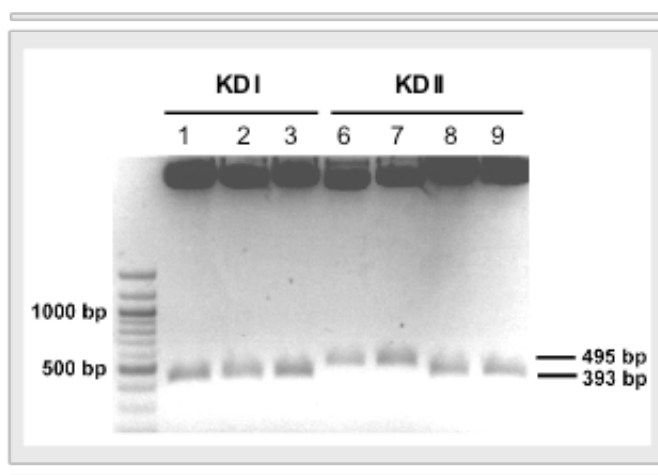


Abb. 3.10 | Restriktionsverdau des pTrx-Plasmids mit *SalI* und *NdeI*

Die drei Aptamere gegen KD I und die Aptamere 8 und 9 gegen KD II besitzen eine Größe von 393 bp, was für die Kodierung von Trx mit einem 20mer Aptamer spricht. Die Aptamere 6 und 7 von KD II besitzen eine Größe von 495 bp, womit es sich somit um doppelte Aptamer-Inserts handelt.

Die Plasmide wurden mit einem Primer, der am 5'-Ende der Trx-Sequenz bindet, sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in *Tabelle 3.2* zusammengefasst. Bei den fünf isolierten Aptameren aus den Hefe Zwei-Hybrid Screens gegen die Kinase Domäne I handelte es sich um Sequenzen, die für 20 bzw. 40 Aminosäuren kodieren, was die Ergebnisse des Verdau bestätigte. Einige Aptamere enthielten jedoch ein Stopp-Kodon zu Beginn der Sequenz (Apta 2, 3) oder nach 19 as (Apta 4). Dadurch kann nur ein bis zu diesem Stopp-Kodon translatiertes Thioredoxin entstehen, was für die Bindung an die ErbB2-Rezeptor-Kinase verantwortlich sein muss.

Tabelle 3.2 | Sequenzen der isolierten Aptamere der 20mer Bibliothek

Ziel	Aptamer	Aptamer-Sequenz
KD I	1	CGP-ALIMGCYVLVGTTPRVFRS-GPC
KD I	2	CGP-*CVRVRFVGCVMVAALREV-GPC
KD I	3	CGP-*CVRVRFVGCVMVAALREV-GPC
KD I	4	CGP-FLWILVTDMWNLAVWLSC*GPHISPWESSQVLCVGFISGL-GPC
KD I	5	CGP-YAGAWCDGEYFGVSLVLYSC-GPC
KD II	6	CGP-LMKPRVLYIAQF*WQNMPCEGPPFVRLHRN*WSTVGRO*VYA-GPC
KD II	7	AEWCGP-LNFYRGFLPNAVMASMLEVGPWFELLGLCGLAGHPLSSLRI-GPC
KD II	8	CGP-E*NSLPAQLRYWSSWLEQC*-GPC
KD II	9	CGP-LMPWLSW*QRNGSIS**FSF-GPC
KD II	10	CGP-WVSVCPHCAFVLGMTDLSGPAR*VCYRAAFSWIQASSDMV-GPC

Aptamer Sequenzen und Stopp-Kodons (*) zwischen Trx-Sequenzen CGP-XXX-GPC

Die Aptamere (Apta 6-10) aus den Hefe Zwei-Hybrid Screens, die mit der Kinasedomäne II isoliert wurden, bestehen aus zwei Aptameren mit 42mer Peptiden und drei Aptameren mit 20mer Peptiden, was ebenfalls mit dem Ergebnis des Doppelverdau übereinstimmt. Auch hier

ist auffällig, dass vier dieser Aptamere Stopp-Kodons enthalten. Nur im Fall von Aptamer 7 wird das Thioredoxin als Ganzes mit Insert transkribiert.

Durch die Tatsache, dass die meisten der isolierten Aptamere Stopp-Kodons enthielten, stellte sich die Frage, ob durch ein unvollständig-gefaltetes Trx, lediglich eine unspezifische Interaktion mit ErbB2 induziert wird. Aus diesem Grund wurden die Aptamere nicht weiter analysiert und nur vollständig exprimierte Aptamere (Apta I1 und I17) für weitere Versuche verwendet.

Es galt jedoch mehr Aptamere für Bindungs- und Funktionsanalysen zu isolieren. Da dies mit der 20mer Peptid-Bank trotz mehrfacher Screeningversuche nicht möglich war, wurde versucht das System durch eine Neukonstruktion der Plasmid-Bank zu optimieren. Diese neukonstruierte 12mer Bank ist detailliert in Kap. 3.1.2.2 beschrieben und wurde in den folgenden Hefe Zwei-Hybrid Screeningversuchen eingesetzt.

3.1.3.4 Hefe Zwei-Hybrid Screens mit der gesamten Kinase Domäne und der 12mer Peptid Bibliothek

Um weitere Aptamere mit einer möglicherweise höheren Affinität zu finden, wurde die optimierte 12mer Peptid-Bibliothek analog zu den bisherigen Screens mit der gesamten ErbB2-Kinasedomäne als GAL4-TAD-Konstrukt verwendet. Die gesamte Kinasedomäne wurde verwendet, um die richtige Faltung der Domäne zu garantieren. Ferner konnte durch die Verwendung eines ähnliches Konstruktes, die Aktivität der Kinasedomäne in Hefen nachgewiesen und physiologische Interaktionspartner isoliert werden^{27 67}. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass konzeptionell die Interaktionsanalyse von ErbB2-Tyrosinkinase Bindungspartnern im Hefe Zwei-Hybrid System möglich ist. Die Transformationseffizienzen lagen bei diesen Screening Versuchen zwischen 5×10^6 und 3×10^7 cfu und damit im gleichen Bereich wie die Effizienzen der 20mer Bank.

Trotz verschiedener Optimierungsversuche gelang es mit dem verwendeten Transformationsverfahren nicht, höhere Transformationseffizienten zu erzielen. Es nach mehrfach durchgeführter Hefe Zwei-Hybrid Screens nur drei Aptamere (Apta KD_g 11, 12, 13) isoliert werden, wobei zwei der isolierten Klone Stopp-Kodons in der Sequenz aufweisen.

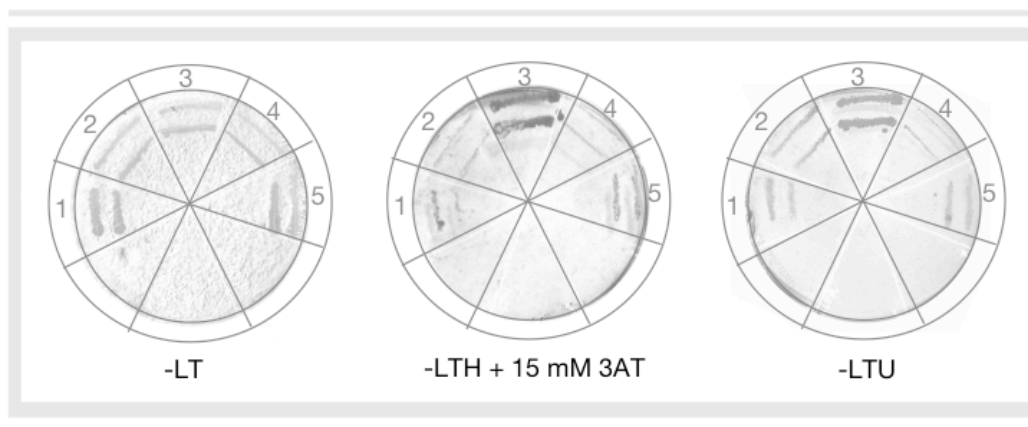
Es stellte sich die Frage nach dem Grund dieser geringen Ausbeute. Eine mögliche Erklärung liegt in der Wahl des Zielproteins. Bei ErbB2 handelt es sich um ein Membranprotein und die erzwungene Expression als GAL4-TAD-Fusionsprotein im Kern ist möglicherweise nicht vorteilhaft, so dass trotz Funktionsnachweis, keine optimalen Interaktionsbedingungen geschaffen werden konnten (Kap. 4.1.2). Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die im Trx-Gerüst induzierte Aptamer-Konformation mit bestimmten Zielproteinen besser interagiert als mit anderen (Kap. 4.1.1). Somit könnte durch ein anderes Gerüstprotein die Anzahl der möglichen Interaktionspartner erhöht werden.

Tabelle 3.3 | Isolierte Aptamere der neuen 12mer Bibliothek

Ziel	Aptamer	Aptamer-Sequenz
KD _g	11	CGP-GLAHG-VAIYTELPLTRM-ARGG-GPC
KD _g	12	CGP-GLAHG- <i>*DRFLRLWVSLG</i> -ARGG-GPC
KD _g	13	CGP-GLAHG- <i>RVGMRGSV*FRI</i> -ARGG-GPC

Aptamer-Sequenzen und Stopp-Kodons (*) in orange; Linker-Sequenz – GLAHG-XXX-ARGG; Trx-Sequenz – CGP-XXX-GPC

Nur Aptamer 11 zeigte einen durchgehenden Leserahmen, der für ein 12mer Peptid kodiert. Durch die Co-Transformation mit den Kinasedomänen des EGFR, IGF-1R und ErbB2 sollte die Spezifität der Aptamerbindung überprüft werden (Abb. 3.11). Die Hefen wurden zuerst auf –LT Platten ausgestrichen, um sicherzugehen, dass sowohl GAL4-TAD-, als auch das GAL4-DBD-Konstrukt transformiert wurden. Die weitere Selektion erfolgte durch überstempeln der –LT Platte auf –LTH +15 mM 3AT.

Abb. 3.11 | Spezifitätskontrolle von Aptamer KD_g 11 im Hefe Zwei-Hybrid System

Das isolierte Aptamer wurde nach Co-Transformation mit unterschiedlichen GAL4-DBD-Konstrukten auf die Spezifität der Bindung überprüft. An GAL4-DBD-Konstrukten wurden die EGFR-KD (1), die IGF-1R-KD (2), ErbB2-KD_g (3), ErbB2-KDI (4) und –KDII (5) verwendet, wobei Aptamer KD_g 11 nur mit ErbB2-KD_g interagiert

Das Überstempeln der Hefeklone von –LT auf –LTH und –LTU zeigte, dass Aptamer KD_g 11 nur mit der ErbB2-KD_g zur Reporteragen-Aktivierung führt. Es wurden auch ausreichend Hefen bei den anderen Co-Transformationen überstempelt, diese konnten allerdings nicht unter dem Selektionsdruck anwachsen. Das Wachstum von Hefezellen mit Aptamer KD_g 11 und ErbB2-KD_g auf -LTU deutete außerdem auf eine starke Aptamer-Kinase Interaktion hin. Im Vergleich dazu konnte keine Uracil Reporteragen-Aktivierung durch die Interaktion von Aptamer KD I1 und KD II7 mit ErbB2-KD gezeigt werden, was darauf hindeutet, dass Aptamer KD_g 11 spezifisch und mit hoher Affinität mit der ErbB2-Tyrosinkinase interagiert.

In den Experimenten mit der 12mer Aptamer-Bank im Hefe Zwei-Hybrid System konnten trotz ausreichend hoher Transformationseffizienz nur eine geringe Anzahl Klone aus der optimierten 12mer Bibliothek isoliert werden. Das isolierte Aptamer KD_g 11 zeigte jedoch in Hefe eine sehr

starke und spezifische Interaktion mit der ErbB2-Kinasedomäne. In weiteren Experimenten wurde diese Bindung weiter untersucht, um schließlich durch funktionale Versuche eine Aussagen über die Inhibition des ErbB2 Rezeptors treffen zu können.

3.1.3.5 Identifizierung von bekannten Motiven in den Aptamer-Sequenzen

Die im Hefe Zwei-Hybrid System isolierten Aptamere wurden mit Hilfe des ScanSite Programms (Kap. 2.1.4) auf Konsensussequenzen mit bekannten Interaktionspartnern untersucht. Diese Sequenzanalyse kann mit unterschiedlicher Stringenz durchgeführt werden. Bei einem solchen „*in silico*“ Screen mit hoher Stringenz werden nur bekannte Sequenzen in der Aptamer-Sequenz identifiziert, die eine optimale Konsensussequenz zur Originalsequenz aufweisen. Bei niedriger Stringenz werden auch minimale Konsensussequenzen identifiziert.

Die Ergebnisse der Sequenzanalyse sind in in der *Tabelle 3.4* zusammengefasst, wobei der *in silico* Screen mit einer mittleren Stringenz durchgeführt wurde.

Tabelle 3.4 | **Potentielle Phosphorylierungsstellen der isolierten Aptamere**

Aptamer	Aptamer-Sequenz mit potentieller Phosphorylierungsstelle	Potentieller Bindungspartner
KD _g 11	CGP-GLAHG-VAI Y TELPLTRM-ARGG-GPC	Src SH2
KD I 1	CGP-ALIMGC Y VLVGTPRWRFRS-GPC	PLC SH2
KD II 7	CGP-LNFYRGFLPNAVMASMLEVGPWFELLGLCGLAGHPLSSLRI-GPC	--

Trx Sequenzen – CGP-XXX-GPC, potentielle Phosphorylierungsstellen in der Aptamersequenz in orange; phosphorylierbares Tyrosin ist hervorgehoben

Das Aptamer KD_g 11 enthielt eine Phosphopeptid-Sequenz, die potentiell mit der Src-SH2 Domäne interagieren kann. In Aptamer KD I 1 konnte ein Phosphopeptid für eine potentielle Interaktion mit der PLC- γ -SH2 Domäne gefunden werden. Es besteht nun die Möglichkeit, dass diese Peptide als Substrat für den ErbB2-Rezeptor dienen und nach der Phosphorylierung an die identifizierten SH2-Domänen binden. Es wurde keine Phosphorylierungsstelle in Aptamer KD II 7 gefunden, da der Hefe Zwei-Hybrid Screen mit der Kinase Domäne II als GAL4-DBD-Konstrukt durchgeführt wurde, welches nicht das aktive Zentrum der Kinase beinhaltet. Somit konnte ein Interaktionspartner für den ErbB2-Rezeptor isoliert werden, der nicht, wie die anderen bisher bekannten ErbB2-Kinaseinhibitoren, das aktive Zentrum des Rezeptors bindet.

3.2 Aptamer-Bindungsanalyse und Evaluation eines endogenen ErbB2-Inhibitors als Alternative zur Aptamer-Applikation

Im Anschluss an die durchgeführten Hefe Zwei-Hybrid Screening-Versuche wurde in drei Bereichen parallel weitergearbeitet. Die isolierten Aptamere zeigten unter den stringentesten Screening-Bedingungen keine Interaktion mit ErbB2, wodurch versucht wurde, die Bindungsaffinität zu erhöhen. Als potentielle Alternative zur Aptamer-Applikation wurde der endogene ErbB2-Inhibitor RALT analysiert. Und die Interaktion der isolierten Aptamere mit ErbB2 wurde in weiteren Bindungsanalysen charakterisiert.

3.2.1 Optimierung der Bindungsaffinität von Aptamer KD_g 11

Die Wirkung der Aptamere ist u.a. entscheidend von der Stärke der Bindung dieser Peptidsequenzen am Zielprotein abhängig. Um eine bessere Aptamer-Wirkung zu erzielen, stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung die Bindungsaffinität zu erhöhen.

In Kap. 3.1.3.5 wurde beschrieben, dass in der Sequenz von Aptamer KD_g 11 durch ScanSite Analyse eine potentielle Phosphorylierungsstelle identifiziert wurde, welche an die Src-SH2 Domäne binden kann. Da das Aptamer an die Kinase Domäne von ErbB2 bindet, könnte das potentielle Phosphotyrosin nach Interaktion mit dem Rezeptor von der Kinase Domäne phosphoryliert werden. Das potentielle Phosphotyrosin für die Src-SH2 konnte nur durch einen Scan mit mittlerer Stringenz ermittelt werden, so dass das Aptamer vermutlich keine optimale Konsensus-Sequenz enthält. Es wurden nun verschiedene ErbB2-Substrate auf ihre Konsensussequenz untersucht. Da ErbB2 durch Kreuzphosphorylierung im Heterodimer Signalkaskaden aktiviert, wurden verschiedene Phosphorylierungsstellen des EGFR und ErbB3 auf Sequenz-Homologien untersucht. Die Sequenz-Homologien wurden dann mit der Sequenz des isolierten Aptamers verglichen.

Die *Tabelle 3.5* fasst unterschiedliche Substrate der ErbB2-Rezeptortyrosinkinase zusammen, wobei die Sequenzen nach Homologien angeordnet wurden. Generell wird die Bindung und Spezifität von Phosphopeptiden an ihre Interaktionspartner (z.B. SH2 Domäne) bestimmt durch etwa zehn Aminosäuren, die das phosphorylierbare Tyrosin (pTyr) umgeben. Auffällig bei den Sequenzen der endogenen ErbB2-Substrate ist, dass in den Sequenzen N-terminal von pTyr negativ geladene Aminosäurereste vermehrt auftreten, wobei C-terminal angrenzende Aminosäuren divergenter sind und keine Präferenz zeigen. Im unteren Teil der Tabelle ist das isolierte Aptamer KD_g 11 im Vergleich zu den endogenen Substraten dargestellt. Es wurde über Homologievergleiche versucht, Aminosäuren in der Aptamer-Sequenz durch Substrat-

spezifische Aminosäuren zu ersetzen, um die Bindungsaffinität zu erhöhen. Die Optimierung wurden in drei Stufen (A11 o1-3) durchgeführt.

Bei der Interaktion eines pTyr mit einer SH2 Domäne ist der N-terminale Teil des Phosphopeptids für die SH2-Bindung verantwortlich, der C-terminale Teil legt die Spezifität des Phosphopeptids fest. Durch die Übertragung dieses Prinzips auf das vorliegende Aptamer KD_g 11, wurden die überwiegend neutralen Aminosäuren im N-terminalen Teil durch negativ geladene Aminosäuren ersetzt. Aufgrund der Tatsache, dass der C-terminale Teil des Phosphopeptids für die Spezifität der Bindung verantwortlich ist, wurden nur kleine Veränderungen in diesem Bereich von Aptamer 11 vorgenommen.

Tabelle 3.5 | Übersicht über Phosphorylierungsstellen in ErbB1 und ErbB3 als unterschiedliche Substrate des ErbB2 Rezeptors

ErbB	pTyr	- 5	- 4	- 3	- 2	- 1	pTyr	+ 1	+ 2	+ 3	+ 4	+ 5
3	922	C	T	I	D	V	Y	M	V	M	V	K
3	1035	S	P	S	S	G	Y	M	P	M	N	Q
3	1270	A	S	E	Q	G	Y	E	E	M	R	A
3	1257	G	P	G	G	D	Y	A	A	M	G	A
1	1248	A	E	N	P	E	Y	L	G	L	D	V
1	1138	V	G	N	P	E	Y	L	N	T	V	Q
3	1200	D	E	E	Y	E	Y	M	N	R	R	R
3	1262	D	E	D	Y	E	Y	M	N	R	Q	R
3	1241	T	P	D	E	D	Y	E	Y	M	N	R
3	1178	D	E	D	E	E	Y	E	Y	M	D	Y
3	1203	L	E	E	L	G	Y	E	Y	M	D	V
Apta KD_g 11		H	G	V	A	I	Y	T	E	L	P	L
A11 o1		D	E	E	A	I	Y	E	E	M	P	L
A11 o2		D	E	E	A	E	Y	E	E	M	P	L
A11 o3		G	E	E	P	E	Y	E	E	L	P	L

Erste Spalte benennt den Rezeptor, die zweite die Lage des Phosphotyrosin (pTyr) in ErbB1 und ErbB3; A11 o1-3 sind die optimierten Sequenzen des original Aptamers KD_g 11

Neutrale Aminosäuren = grau; strukturegebende Aminosäuren = schwarz; polare Aminosäuren = blau; positiv-geladene Aminosäuren = orange; negativ-geladene Aminosäuren = grün; Tyrosine die von der ErbB2-Kinase phosphoryliert werden können = rot

Als erster Optimierungsschritt bei A11 o1 wurden die neutralen Aminosäuren in der 5'-Region gegen negativ-geladene Aminosäuren ersetzt. Die erhaltenen Sequenzen wurden durch eine ScanSite Analyse auf potentielle Phosphopeptide untersucht. Nach diesen Analysen wurden weitere Veränderungen in A11 o2 und o3 vorgenommen, bis eine ideale Konsensus-Sequenz

generiert werden konnte. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in *Abb. 3.12* und *Tabelle 3.6* zusammengefasst.

Die ScanSite Software detektierte die Lage des potentiellen Phosphopeptids, die mit der inserierten Aptamer-Sequenz übereinstimmt. Ferner analysiert ScanSite anhand der Aminosäuresequenz die Wahrscheinlichkeit der Oberflächenerreichbarkeit der Aminosäuren. Aminosäuren mit Werten über 1 sind wahrscheinlich an der Oberfläche des Proteins zu finden. Die wichtigsten Informationen, die aus dem Programm abgeleitet werden konnten sind jedoch die potentiellen Interaktionspartner des Phosphopeptids (*Tabelle 3.6*).

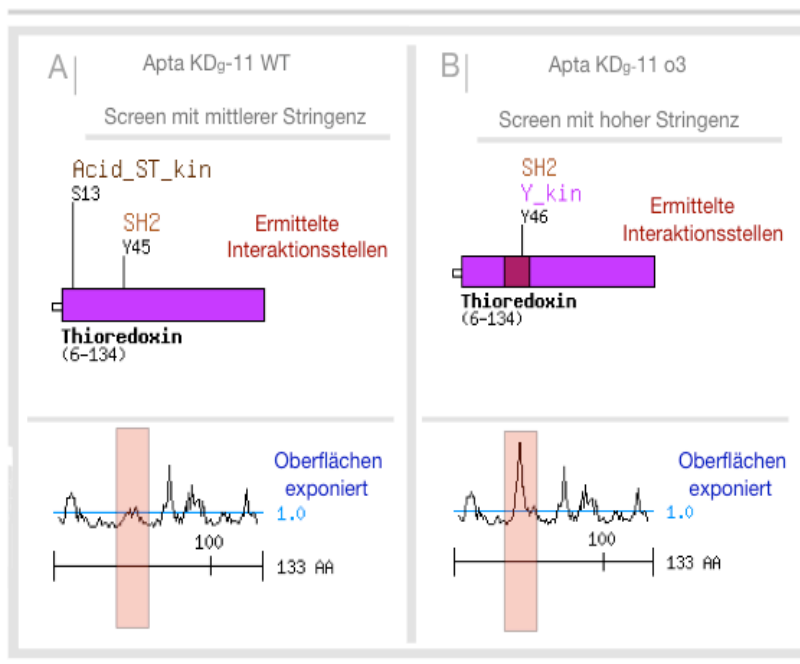


Abb. 3.12 | ScanSite Blast nach *in silico* Optimierung von A 11

A | Ursprüngliches Aptamer 11 in Trx nach einem ScanSite Blast mit mittlerer Stringenz; Im inserierten Aptamer konnte ein potentielles Phosphotyrosin (Y45) als Interaktionspartner der Src SH2-Domäne gefunden werden; das Aptamer zeigt eine geringe Oberflächen-Erreichbarkeit
B | Optimiertes Aptamer 11 in Trx nach einem ScanSite Blast mit hoher Stringenz; Im inserierten Aptamer konnte u.a. eine Phosphorylierungsstelle für die EGFR Kinase (Y46) Domäne gefunden werden; das Aptamer zeigt eine gute Oberflächen-Erreichbarkeit durch zusätzliches Prolin in der Sequenz

Die Optimierung der Aptamer KD_g 11 Sequenz durch Sequenzhomologie Analyse ergab u.a. ein potentielles Phosphopeptid für den EGFR. Der virtuelle Screen mit der Originalsequenz des Aptamers ergab nur bei mittlerer Stringenz eine Konsensussequenz mit einem Phosphopeptid, das in der Lage ist mit der SH2-Domäne von Src zu interagieren. Durch die Optimierung konnte eine bessere Konsensussequenz geschaffen werden, da das potentielle Phosphopeptid in einem virtuellen Screen mit hoher Stringenz identifiziert wurde.

Tabelle 3.6 | Ermittelte Interaktionspartner des potentiellen Phosphopeptids mit ScanSite

bak Trx – Aptamer KD_g 11 - WT	bak/hum Trx – Aptamer KD_g 11 – o3
Src-SH2 Domäne	EGFR-Kinase Domäne
	FGR-Kinase Domäne
	Src-Kinase Domäne
	Shc-SH2 Domäne
	Src-SH2 Domäne

Domänen sind danach sortiert, mit welcher Domäne das potentielle Phosphopeptid am besten interagiert

Es konnte eine optimale Konsensussequenz für ein Substrat der EGFR-Tyrosinkinase Domäne geschaffen werden. Die Konsensussequenzen für Substrate der ErbB2-Tyrosinkinase Domäne sind in dieser Datenbank nicht vorhanden, allerdings die der EGFR-Tyrosinkinase, welcher 83 % Homologie zur Kinasedomäne in ErbB2 aufweist. Die hohe Homologie dieser beiden Kinase Domänen macht eine Interaktion des Phosphopeptides mit beiden Rezeptoren wahrscheinlich. Die Optimierung zu A11-o3 führte somit nicht nur zu einer besseren Konsensussequenz des potentiellen Phosphopeptids für die ErbB2-Bindung. Durch den Austausch der hydrophoben gegen hydrophile Aminosäuren und der Verwendung eines zusätzlichen Prolins konnte auch die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, dass das Phosphopeptid auf der Oberfläche des Thioredoxins für die Bindung mit dem ErbB2 Rezeptor präsentiert wird.

Die optimierten Aptamer-Sequenzen KD_g o3 wurden über PCR in den Hefe Zwei-Hybrid GAL4-DBD Vektor kloniert und im Zwei-Hybrid System auf Interaktion mit der ErbB2 Tyrosinkinase überprüft.

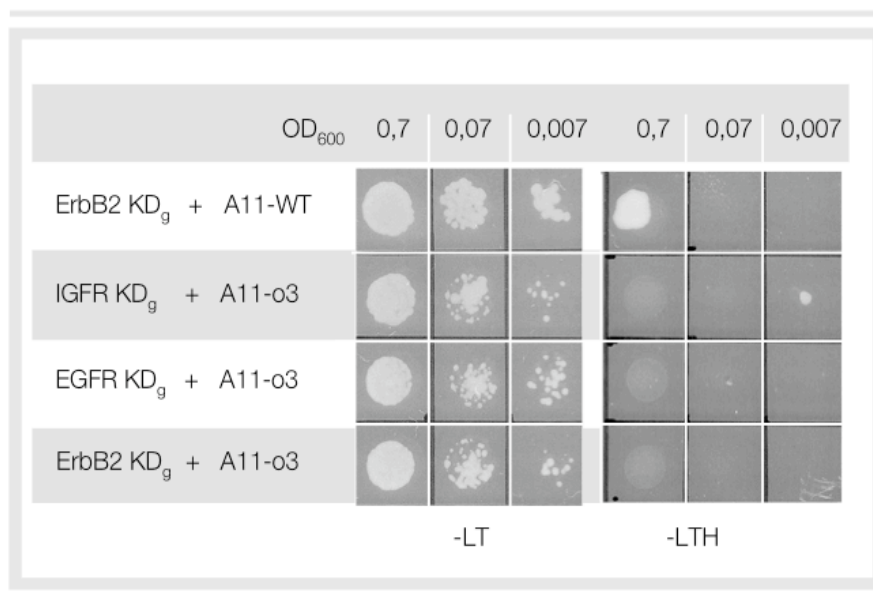


Abb. 3.13 | Interaktion des virtuell optimierten Aptamer KD_g 11 mit Tyrosinkinase Domänen verschiedener Rezeptoren

Tropfplatten von Hefekulturen nach Co-Transformation von A11-o3 mit den gesamten Tyrosinkinase Domänen von IGFR, EGFR und ErbB2 in den Hefestamm KF1; Transformanten wurden in Verdünnungen (OD₆₀₀ von 0,7-0,007) auf -LT und -LTH ausplattiert

Das optimierte Aptamer KD_g 11 o3 wurde mit der Tyrosinkinase Domäne von ErbB2, IGFR und EGFR in den Hefestamm KF1 co-transformiert. Nach ScanSite Analyse sollte das optimierte Aptamer die EGFR Tyrosinkinase Domäne (TKD) binden und dadurch potentiell auch die Bindung an ErbB2 ermöglichen. Die IGFR TKD wurde bei diesem Versuch als Negativkontrolle verwendet und zeigte keine Interaktion mit A11 o3. Allerdings konnte auch keine A11 o3 Interaktion mit EGFR oder ErbB2 detektiert werden.

Die Optimierung der Bindungsaffinität von Aptamer KD_g 11 brachte nicht die erwünschte Affinitätssteigerung. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass sich trotz optimaler Bindungsbedingung des Aptamers 11 o3 *in silico*, sich diese Ergebnisse nicht zwangsläufig experimentell verifizieren lassen. In diesem Fall eignet sich die ScanSite Analyse nicht als

Maßnahme zur Affinitätsoptimierung. Im folgenden Kapitel wird ein anderes Verfahren vorgestellt, um die Peptid-Protein Interaktion experimentell zu optimieren.

3.2.2 Optimierung der Bindungsaffinität von Aptamer KD II7

Um die Bindungsaffinität der Aptamere zu erhöhen, lassen sich durch Alanin-Austausch für die Bindung wichtige Aminosäuren ermitteln. Eine Synthese der Peptide mit Alanin an unterschiedlichen Positionen kann kommerziell durchgeführt werden (z.B. Pierce). Die synthetisierten Peptide werden anschließend zur Interaktionsanalyse auf Mikrotiterplatten fixiert und mit dem interagierenden Zielprotein inkubiert. Durch Detektion des Zielproteins mit fluoreszierendem Antikörper lassen sich die Bindungsaffinitäten der einzelnen Peptide mit dem Zielprotein ermitteln. Die Synthese einer solchen Peptid-Bank ist aber nur bei Peptiden bis 20 Aminosäuren möglich. Sind die für die Interaktion essentiellen Aminosäuren ermittelt, kann durch Verwendung analoger Aminosäuren eine bessere Aptamer-Zielprotein Interaktion generiert werden.

Der Alanin-Austausch wurde mit Aptamer II7 durchgeführt. Da es sich bei diesem Aptamer allerdings um ein 42mer Peptid handelt, musste für die Peptid-Synthese der Sequenz die Anzahl der Aminosäuren reduziert werden. Hierfür wurde das Aptamer überlappend in 12mer Aptamere unterteilt, um die minimale Bindungssequenz zu ermitteln. Die minimale Bindungssequenz konnte dann mit Hilfe einer Peptid-Bank in der die einzelnen Aminosäuren der Aptamersequenz durch Ala ausgetauscht sind, auf essentielle Aminosäuren untersucht werden.

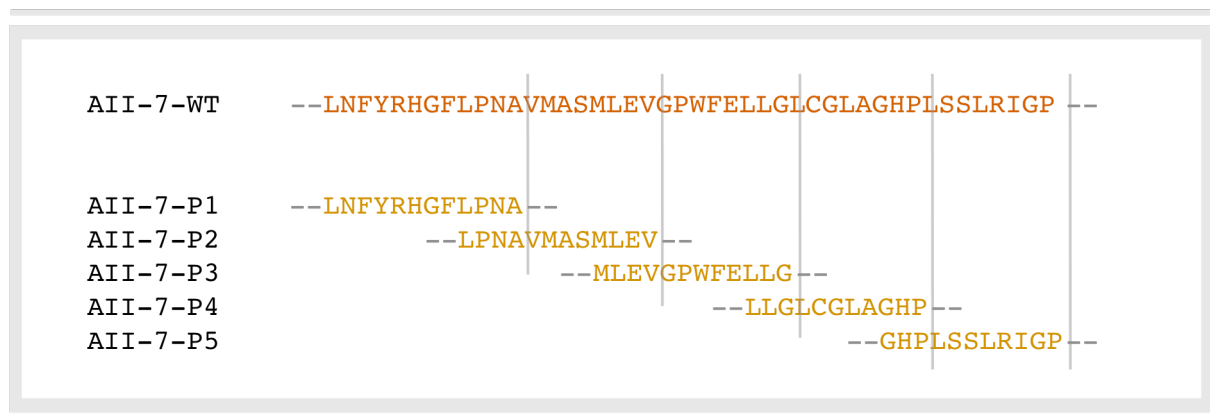


Abb. 3.14 | Unterteilung des 42mer Aptamers in fünf 12mer Aptamere

Die Sequenzen wurden als überlappende Sequenzen mittels PCR aus der Originalsequenz amplifiziert, erneut in Trx eingefügt und im Hefe Zwei-Hybrid System auf Interaktion mit ErbB2 untersucht.

Die Interaktion zwischen Aptamer und ErbB2 wurde in einem Hefe Zwei-Hybrid System untersucht. Die unterschiedlichen Aptamerkonstrukte wurden zusammen mit der ErbB2-Kinasedomäne II als GAL4-TAD Konstrukt in den Hefe-Stamm KF1 co-transfiziert. Durch

Wachstumsbestimmung auf verschiedenen Selektionsmedien wurde die Bindungsstärke ermittelt.

Die *Abb. 3.15* zeigt eine Tropfplatte. Hier wurden verschiedene Verdünnungen (OD_{600} von 0,7-0,007) einer Hefekultur aufgetropft, um das Wachstum der verschiedenen Transformanten auf Medium ohne His zu bestimmen. Als Positivkontrolle diente das original Aptamer II7 (Apta II7 WT), welches gut mit ErbB2 interagiert und durch Interaktion mit ErbB2 auf His-Mangelmedium wachsen kann. Wird jedoch das Aptamer verkürzt und in 12mer Peptide unterteilt, ist nur noch ein sehr schwaches Wachstum der Hefen bei P4 zu erkennen. Durch die starke Reduktion der Bindungsstärke bei P4 eignet sich dieses Konstrukt daher nicht für die Verwendung von Bindungsstudien durch Ala-Austausch.

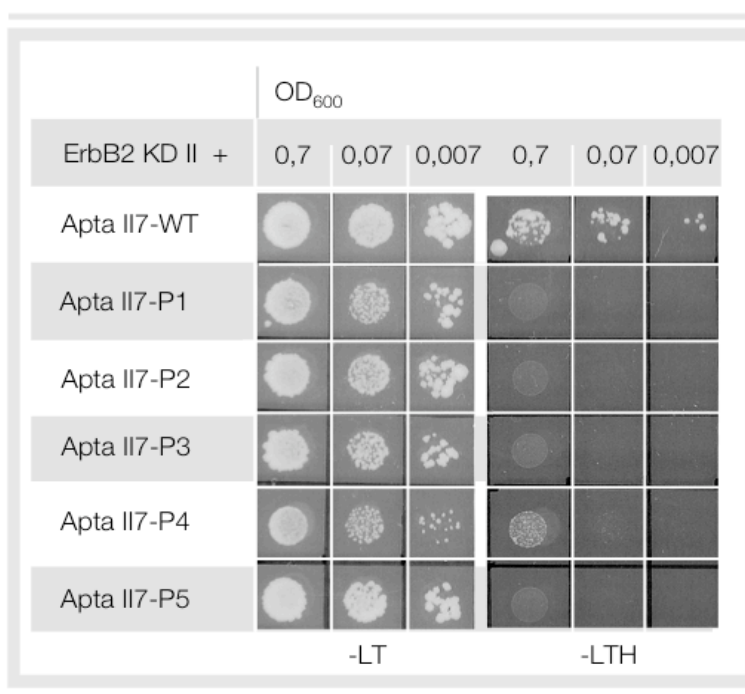


Abb. 3.15 | Interaktionsmessung der Aptamer-Konstrukte im Hefestamm KF1

Tropfplatten mit KF1 Transformanten die in einer Verdünnungsreihe aufgetragen wurden; die Zellen wurden auf -LT und -LTH Platten ausplattiert; als Positivkontrolle diente das original Apta II7; die Minimalbindungsregion für Apta II7 ist in Apta II7 P4 zu finden, wobei sich nur eine sehr schwache Interaktion detektieren ließ.

Auch dieses Verfahren der Bindungsoptimierung brachte nicht den gewünschten Erfolg, so dass in den weiteren Bindungs- und Funktionsanalysen mit den original Aptameren weiter gearbeitet wurde.

3.2.3 Alternative Inhibitionsstrategie durch einen endogenen Inhibitor

Die Verwendung von endogenen Inhibitoren stellt eine Alternative zur Aptamer-Applikation als potentiell Protein-Therapeutikum dar. Durch die Verwendung von endogenen ErbB2-Inhibitoren können diese in ihrer Funktion aber auch mit der Wirkungsweise der Aptamere

verglichen werden. Somit fungieren sie als Positivkontrolle in den durchgeführten funktionalen Versuchen.

Das RALT-Protein⁶⁸ wurde unabhängig von zwei Arbeitsgruppen als Interaktionspartner der ErbB2 bzw. EGFR TKD isoliert^(27, 67) und konnte als „Feedback“ Inhibitor des ErbB2 Signalweges charakterisiert werden (Kapitel 1.2.8). In der *Abb. 3.16* ist eine schematische Darstellung des RALT-Proteins gezeigt. Die ErbB2-Interaktionsdomäne von 40 Aminosäuren ist in orange hervorgehoben und weist bis auf zwei Aminosäuren eine identische Sequenz im humanen (RALT/Mig-6) und Ratten-Protein (Gene33) auf. Innerhalb dieser Sequenz konnte mit der ScanSite Software ein EGFR-interagierendes Peptid detektiert werden. Sowohl durch die Ergebnisse der Publikationen, als auch durch die Software Analyse scheint RALT durch eine direkte Interaktion mit der Tyrosinkinase seine Funktion in der Zelle zu erfüllen.

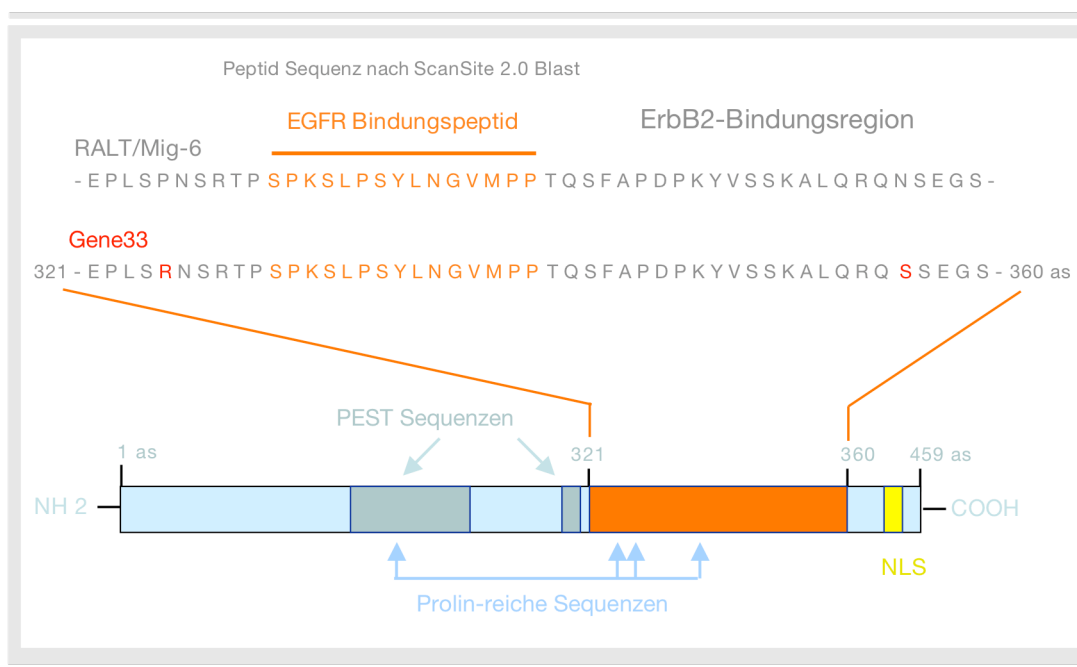


Abb. 3.16 | **Schematische Darstellung des RALT Proteins**

Übersicht über das RALT-Protein und dessen durch Homologievergleich gefundene Interaktionsdomänen (blau) und die durch Pulldown-Experimente ermittelte Bindungsregion des ErbB2 Rezeptors (orange); diese minimale ErbB2-Bindungsregion besteht aus 40 Aminosäuren (nach Anastasi *et al.*), in der durch ScanSite Blast ein EGFR-Bindungspeptid identifiziert werden konnte; im Vergleich mit dem homologen Protein aus der Ratte besitzt RALT/Mig-6 in der minimalen Bindungsregion bis auf zwei Aminosäuren (rot) eine identische Sequenz;

Zu Beginn der RALT-Analysen wurden die publizierten Daten der *in vivo* Bindungsexperimenten verifiziert. Für diese Versuche wurden unterschiedliche RALT-Konstrukte (gesamtes Protein und Protein unterteilt in zwei gleich grosse Hälften, Konstrukte von A. Makkinje⁶⁸) verwendet, wobei die Interaktion durch Co-IP und Co-Lokalisation untersucht wurde.

Nach der Transfektion der unterschiedlichen RALT Konstrukte in SKBr3 Zellen konnte die Expression des gesamten Proteins und der C-terminalen Region über einen Flag-Tag im Zelllysate durch Auftragen von 10 % der in die IP eingesetzten Proteinmenge, nachgewiesen

werden (Abb. 3.17 – 10 %). Durch Co-IP Experimente lies sich für das gesamte Protein (Ralt) eine schwache Interaktion mit dem ErbB2 Rezeptor detektieren, jedoch nicht mit dem C-terminalen Teil (CT). Die C-terminale Region des Protein beinhaltet die Aminosäuren 230 – 459 des Proteins und somit die prognostizierte ErbB2-Interaktionsdomäne (321 - 360 as). Als IP-Kontrolle wurde ein Western Blot mit α ErbB2 Antikörper durchgeführt. Mit Hilfe der Co-IP konnte die Interaktion des ganzen RALT Proteins mit ErbB2 bestätigt werden, allerdings nicht die Interaktion mit der prognostizierten ErbB2-Interaktionsdomäne.

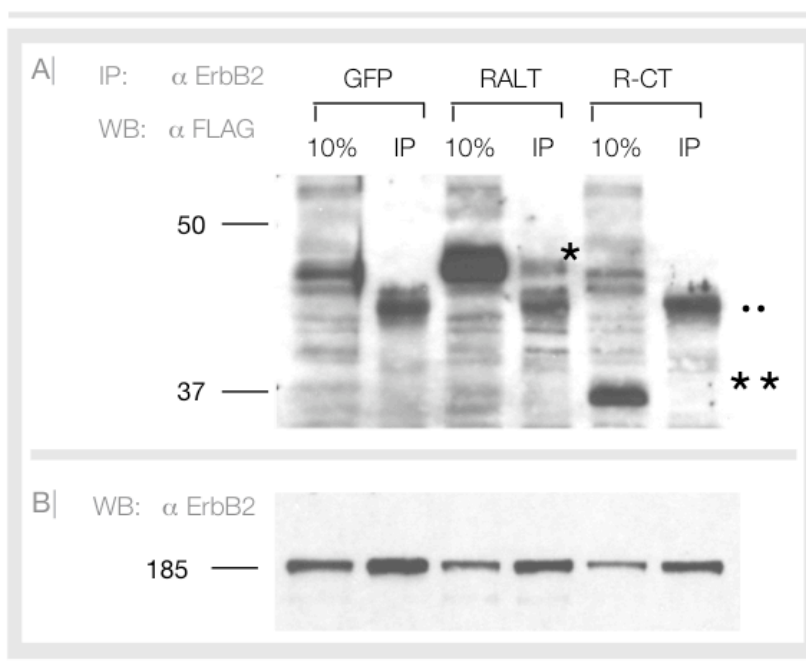


Abb. 3.17 | Co-IP Experimente nach RALT Transfektion in SKBr3 Zellen

A | SKBr3 Transfektionen mit GFP (Transfektionskontrolle und Negativkontrolle für die IP), mit dem gesamten RALT-Protein und dem C-terminalen Teil des Proteins (R-CT); Western Blot nach ErbB2-IP mit FLAG-Antikörper; Eine Interaktion mit ErbB2 konnte beim gesamten Protein (*) gezeigt werden, allerdings nicht bei R-CT (**); Die schwere Kette des IP-Antikörpers (**) tritt als unspezifische Bande auf
B | IP Kontroll Western Blot mit ErbB2 Rezeptor Antikörper

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden als weiterer *in vivo* Interaktionstest Co-Lokalisationsaufnahmen nach RALT Transfektion von MCF7 Zellen durchgeführt. Es konnte von Fiorentino *et al.* gezeigt werden, dass der ErbB2 Rezeptor durch das Aushungern gleichmäßig im Zytoplasma in Vesikel und in der Zellmembran verteilt ist (inaktiver ErbB2). Durch die Induktion mit HRG wird der Rezeptor endozytiert und lagert sich in Membranen um den Kern an (aktiver ErbB2)²⁷. Das RALT Protein interagiert nur mit aktiviertem ErbB2 Rezeptor, so dass für die Bindungsanalyse die Aktivierung des Rezeptors Voraussetzung ist. Für diese Co-Lokalisationsversuche wurden die RALT-Konstrukte in MCF7 Zellen transfiziert und diese nach 2 Tagen für 5 h ausgehungert. Anschließend erfolgte ein HRG-1 β Induktion für 20 min, die durch eiskaltes PBS abgestoppt wurde.

Die untersuchten MCF7 Zellen zeigten nach Aushungern eine gleichmäßige Verteilung des ErbB2 Rezeptor in der Zelle und wie erwartet nicht mehr in der Membran. Durch HRG Induktion kommt es zu einer Konzentration des Rezeptors um den Kern. Für das gesamte RALT Protein, das sich ebenfalls im Zytoplasma befindet, konnte nur nach HRG-Induktion eine Co-Lokalisation mit ErbB2 detektiert werden (Gelbfärbung bei aktivierten ErbB2 im merge). Dies stimmt mit den publizierten Ergebnissen überein, der RALT nur mit aktiviertem ErbB2 interagiert. Im Fall des C-

terminalen Teils (CT) lies sich keine eindeutige Aussage treffen. Das Protein verlagert nach Aktivierung des Rezeptors sich in Richtung der Kernregion. Dies scheint nicht mit der Interaktion mit dem Rezeptor einher zu gehen, da keine Überlagerung der Fluoreszenzen zu erkennen war (keine Gelbfärbung bei aktiviertem ErbB2 im merge).

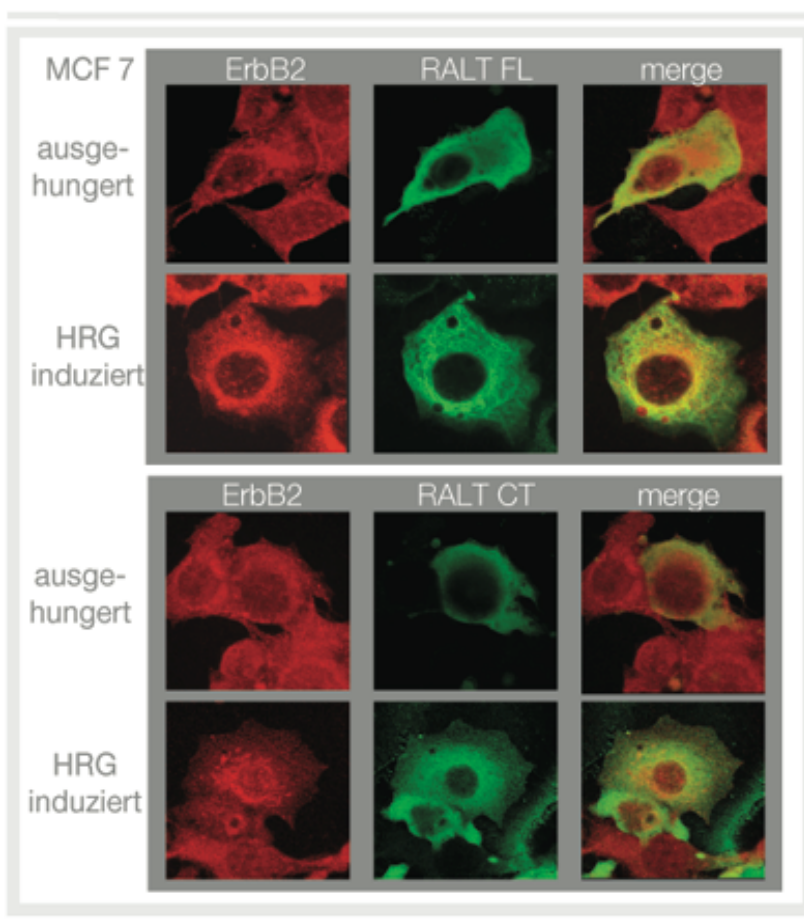


Abb. 3.18 | **Co-Lokalisationsaufnahmen nach RALT Transfektion in MCF7 Zellen**

Transfizierte MCF7 Zellen wurden für 5 h ausgehungert und dann für 20 min mit HRG-1 β induziert. Die rote Färbung zeigt ErbB2, die grüne Färbung RALT als ganzes Protein (FL) oder der C-terminale Teil (CT) mit potentieller ErbB2-Interaktionsdomäne. Die beiden Fluoreszenzen wurden übereinander gelagert (merge), um eine Interaktion der beiden Proteine detektieren zu können (gelbe Färbung). Diese Interaktion konnte für das ganze Protein nachgewiesen werden. Für die C-terminale Region ergab sich keine klare Aussage über eine Interaktion, da Ralt sich nach Induktion auch um den Kern anlagert, aber nicht mit ErbB2 zu interagieren scheint.

Auf diese Weise konnte durch beide *in vivo* Interaktionsversuche nur die Interaktion des ganzen Proteins mit ErbB2 nachgewiesen werden, die postulierte Bindungsregion zeigte jedoch keine Interaktion. Die Interaktionsversuche mit Fragmenten des RALT Proteins in der Publikationen von Fiorentino *et al.*^{27, 69} die eine Interaktion mit dem C-terminalen Teil des Proteins zeigten, wurden als *in vitro* Bindungsexperimente (GST-Pulldown) durchgeführt und nicht in eukaryotischen Expressionssystemen überprüft, so dass es sich hierbei um *in vitro* Artefakte handeln könnte. Die Identifikation eines EGFR-Kinasesubstrates deuten zwar darauf hin, dass das 40 aa RALT-Fragment für die ErbB2-Interaktion verantwortlich sein könnte, trotzdem kann der genau Mechanismus der Interaktion nur durch die Kristallstruktur von ErbB2 und RALT während der Bindung geklärt werden. In den Publikationen wurde das gesamte RALT-Protein für die Funktionsanalysen in Zelllinien verwendet, welches auch in den gezeigten Co-IP Experimenten mit ErbB2 interagiert und dadurch mit den den publizierten Ergebnissen übereinstimmt.

Somit besteht nur die Möglichkeit mit dem gesamten Protein als potentielles Therapeutikum zu arbeiten. Dies wurde nicht für sinnvoll erachtet, da es die Voraussetzungen für die Verwendung eines endogenen Inhibitors war, eine hohe ErbB2-Bindungsaffinität durch eine kleine Interaktionsdomäne zu erzielen (ausführlich in Kap. 4.3.2 diskutiert). Als Positivkontrolle für die Funktionsanalyse der Aptamere wurde statt dessen der EGFR/ErbB2-Tyrosinkinase Inhibitor PKI-166 (Novartis) verwendet. Er bietet den Vorteil einer einfachen Applikation und die Kenntnis pharmakologisch wichtiger Daten wie der IC_{50} (inhibitory concentration) Wert.

3.2.4 Qualitative Bindungsanalyse zur Verifizierung der Interaktion zwischen Aptamer und ErbB2

Die im Hefe Zwei-Hybrid System detektierte Interaktion der Aptamere mit der ErbB2-Kinasedomäne wurde in weiteren Interaktionsanalysen verifiziert. Als weitere Interaktionsanalyse wurde das GST-Pulldown Experiment verwendet. Dazu wurde Trx mit und ohne Aptamer als GST-Fusionsprotein exprimiert. Nach erfolgreicher Expressionskontrolle wurden die GST-Aptamer Fusionsproteine mit Glutathionbeads aufgereinigt und in den GST-Pulldown Experimenten eingesetzt. Bindet das Aptamer an den ErbB2-Rezeptor, so kann dieser entsprechend mit isoliert werden.

Der im Pulldown eingesetzte Rezeptor stammte aus Zellextrakten verschiedener Zelllinien. So wurden humane ErbB2-überexprimierende SKBr3 Brustkrebszellen verwendet. Parallel wurden in das Pulldown Experiment auch murine Renca Zellen eingesetzt, die stabil den humanen EGFR exprimieren. Die Renca Zellen exprimieren nur den humanen EGF-Rezeptor, so dass die Spezifität der untersuchten Aptamere im Western Blot überprüft werden kann. Würden die verwendeten Zellen noch andere ErbB-Rezeptoren exprimieren könnte nicht ausgeschlossen werden, dass das Aptamer gleichzeitig mit einem anderen Mitglied dieser Familie interagiert. SKBr3 Zellen wurden verwendet, da es sich hierbei humane Brustkarzinomzellen handelt, die den Rezeptor endogen überexprimieren und damit dem natürlichen Ziel, gegen welches die Aptamere gerichtet sind, am nächsten kommen.

Der GST-Pulldown in *Abb. 3.19 A* | wurde mit GST-Aptamer-Fusionsproteinen aus zwei unabhängigen Bakterienlysaten und ErbB2-enthaltenden Zellextrakt aus SKBr3 Zellen durchgeführt. Als Positivkontrolle für den Western Blot wurde 1 % des in den Pulldown eingesetzten Zellextraktes aufgetragen. Als Positivkontrolle für den Pulldown wurde ein Aptamer K, welches sowohl IGF-1R als auch ErbB2 bindet, als Kontrolle verwendet (Arbeit Andrea Belaus). Als Negativkontrolle wurde Thioredoxin ohne Aptamer-Insert aufgetragen, um sicherzustellen, dass detektierte Banden im Western Blot auf spezifische Aptamer-Rezeptor-Interaktionen hinweisen und nicht auf Gerüst-Protein Interaktion mit dem Rezeptor. Die Negativkontrolle zeigt eine schwache Bande auf der Höhe des Rezeptors. Thioredoxin wurde jedoch im Vergleich zu den Aptameren stets stärker exprimiert und in größerer Menge im

Pulldown eingesetzt. Vergleicht man die eingesetzten Aptamer-Mengen miteinander, wird deutlich, dass trotz geringerer Expression des Aptamers KDII 7 in beiden Lysaten eine ähnlich gute Bindung an den Rezeptor erreicht werden konnte wie die Positivkontrolle bzw. Aptamer KDI 1.

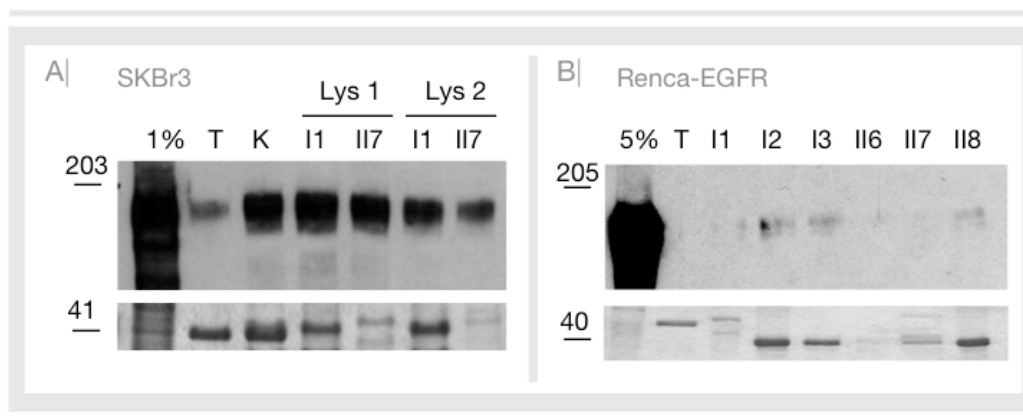


Abb. 3.19 | GST-Pulldown von Aptamer-Fusionsproteinen an ErbB Rezeptoren

SKBr3 Zellen exprimieren den ErbB2 Rezeptor, Renca EGFR Zellen ausschließlich den humanen EGFR; die Rezeptoren wurden mit α ErbB2 Antikörper (A) oder α EGFR Antikörper (B) detektiert. Die Coomassie Gele (untere Teil der Abb.) zeigen die eingesetzten Aptamer-Mengen; als Negativkontrolle für den Pulldown wurde Trx (T), als Positivkontrolle ein Kontrollaptamer (K) verwendet, bei welchem die Interaktion mit ErbB2 bereits nachgewiesen wurde.

- A| Der GST-Pulldown wurde mit KDI 1 bzw. KDII 7 GST-Aptamer durchgeführt, die aus zwei unabhängigen Bakterienlysaten (Lys 1 und 2) isoliert wurden. Die an Glutathion-Beads gebundenen Aptamere wurden mit Zelllysaten von SKBr3 Zellen (0,5 mg) inkubiert
- B| Der GST-Pulldown wurde analog zu A| mit GST-Aptamer KDI 1 bis 3 und KDII 6 bis 8 und Zelllysat aus Renca EGFR Zellen (1 mg) durchgeführt.

Der GST-Pulldown Versuch konnte des Weiteren genutzt werden, um die Spezifität der Aptamere zu überprüfen. In *Abb. 3.19 B|* wurde der gleiche Pulldown mit Zelllysat von Renca EGFR Zellen durchgeführt. Die Kinasedomäne von ErbB2 und von EGFR weisen eine Sequenzhomologie von 83 % auf. Aus diesem Grund eignete sich der EGFR, um die Spezifität der Aptamere zu untersuchen. Der Western Blot zeigte keine Interaktion von Aptamer KDI 1 und KDII 7 mit dem EGFR, was aufgrund der großen Homologie der beiden Rezeptoren für eine starke Spezifität dieser Aptamere spricht. Der Western Blot zeigte schwache Banden der Aptamere KDI 2 und 3 und eine ebenfalls schwache Bande bei Aptamer KDII 8. Diese Aptamere weisen Stopp-Kodons in ihrer Sequenz auf, was für die Annahme spricht, dass die nicht-vollständige Expression des Trx die physiologische Faltung des Proteins behindert, wodurch es unspezifisch mit anderen Proteinen interagiert (siehe Kap. 3.1.3.3). Aptamer KDII 6 lässt aufgrund der sehr geringen Expressionsspiegel keine Aussage über das Bindungsverhalten zu. Die Ergebnisse der verschiedenen GST-Pulldown Experimente konnten sowohl mit unterschiedlichen Aptamer-Lysaten als auch mit verschiedenen Rezeptorpräparationen aus diversen Zelllinien reproduziert werden.

Der GST-Pulldown wurde verwendet, um über die Bindungsaffinitäten und die Spezifität der Bindung der unterschiedlichen Aptamere an den Rezeptor zu überprüfen. Obwohl die Aptamere nur schwach exprimiert wurden, zeigten sie eine deutliche Interaktion mit ErbB2 im Vergleich zu Trx ohne Aptamer. Der Vergleich mit dem EGFR zeigte, dass es sich für Aptamer KD I1 und KD II7 um eine spezifische Interaktion mit ErbB2 handelte.

3.3 Peptid-Aptamer Applikation durch verschiedene Transduktionsverfahren

Die Interaktion der Aptamere KDI 1 und KDII 7 mit dem ErbB2 Rezeptor wurde bislang nur im Hefe Zwei-Hybrid System und *in vitro* nachgewiesen. Ob die Interaktion auch zur Inhibition des Rezeptors führt, sollte in ersten Versuchen durch transiente Transfektion von humanen Zellen untersucht werden. Die transiente Transfektion von SKBr3, MDA 453 und MCF7 lies sich jedoch nicht mit ausreichend hohen Effizienzen durchführen. Aus diesem Grund wurden lentivirale und Protein-Lentiviren benutzt, um die Aptamere effizient in Zielzellen einzubringen.

3.3.1 Peptid-Aptamer Applikation durch virale Transduktion

Mit Hilfe der Lentiviren wurde eine effiziente Transduktion und Expression der Peptid-Aptameren in Säugerzellen ermöglicht. Die RNA der Lentiviren kodierte u.a. für die verschiedenen Aptamer-Konstrukte und EGFP. Nach der reversen Transkription wurde die virale DNA über 5'- und 3'-LTR (Long-Terminal Repeats) in das Säuger genom inseriert und erlaubte die stabile Expression von Aptamer und EGFP.

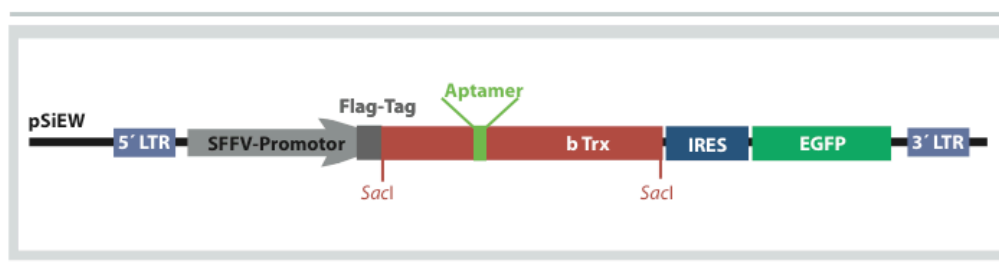


Abb. 3.20 | **Aptamer Expressionsvektor pSiEW für die lentivirale Transduktion**

Der Vektor ist in der Lage sich über LTR Sequenzen in das humane Genom zu integrieren; der SFFV Promotor stellt die Expression der Aptamere sicher, welche über eine IRES mit der EGFP Expression gekoppelt ist.

Als lentiviralen Expressionsvektor wurde der pSiEW-Vektor gewählt (Abb. 3.20). Der SFFV-Promotor stellt die Expression der Peptid-Aptamere sicher, welche über eine IRES Sequenz mit der Expression von EGFP gekoppelt ist. Auf diese Weise kann über die EGFP-Fluoreszenz die Transduktion der Zielzellen und die Transkription der Aptamere überprüft werden.

Um Lentiviren zu produzieren, wurden 293T Zellen mit pSiEW und zusätzlich mit Vektoren für die reverse Transkription (R8.91 – mit Pol, Gag, Tat und Rev) und das virale Hüllprotein (pMD2 – VSV-G) transfiziert. Die Viren wurden von den transfizierten 293T Zellen ins Medium abgegeben, in dem sie sich über 3 Tage angereichert wurden. Diese Viren wurden dann zur Infektion von ErbB2-exprimierender Zelllinien benutzt.

3.3.1.1 Expression von Aptameren in bakteriellem Trx über virale Transduktion

Nach viraler Transduktion von 293T Zellen ließ sich die Expression der Aptamere mit dem lentiviralen pSiEW-Vektor über einen Western Blot mit α Flag Antikörper (Abb. 3.21 B) nachweisen. Allerdings zeigten sich verminderte Expressionsspiegel der Aptamere im Vergleich zu Thioredoxin ohne Aptamer (in Western Blot wurde doppelt so viel Aptamer wie Thioredoxin Lysat eingesetzt).

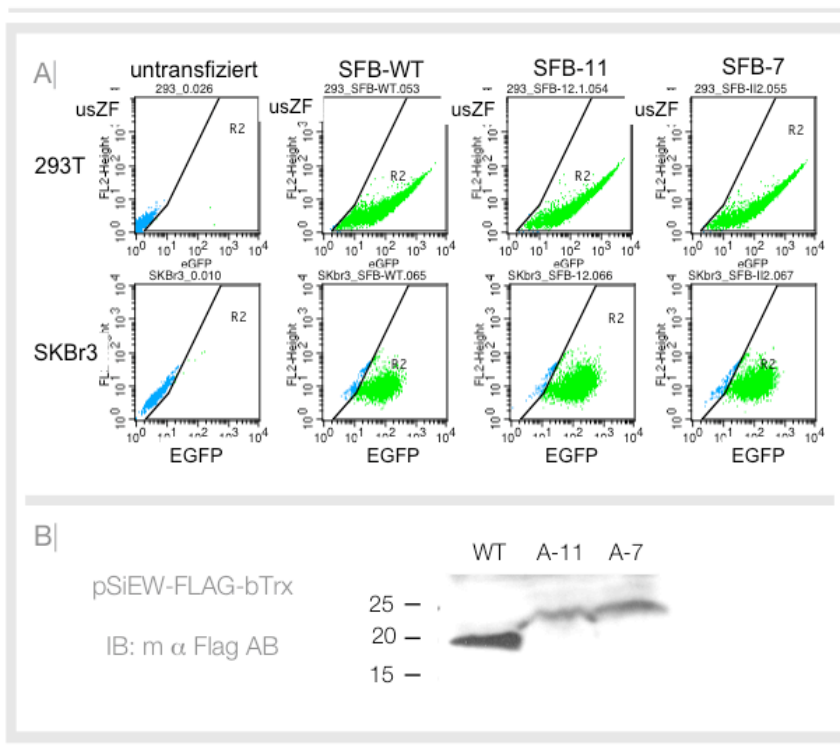


Abb. 3.21 | Transduktionseffizienz in verschiedenen Zelllinien

A) FACS-Analysen von 293T und SKBr3 Zellen, bei denen die Stärke der unspezifische Zellfluoreszenz (usZF) gegen die der EGFP Fluoreszenz aufgetragen wurde
 B) Die Hälfte der transduzierten 293T Zellen aus A) wurde für die FACS Analyse verwendet, die andere Hälfte wurde lysiert und im Western Blot auf die Expression der Aptamere überprüft.

Die virale Transduktion verschiedener Zielzellen zeigte auch, dass die Lentiviren alle hier verwendeten Zielzellen transduzieren können (293T, SKBr3, MCF7 WT/neo/her2, NIH3T3/#3.7). Es gab jedoch bei den Transduktionseffizienzen quantitative Unterschiede. Die besten Transduktionseffizienzen wurden mit 293T, MCF7 her2 und SKBr3 Zellen erreicht, die sich mit annähernd 100 % transduzieren ließen. Bei NIH#3.7 Zellen ließen sich hingegen nur Transduktionseffizienzen von 45-78 % erreichen. Dies könnte daran liegen, dass es sich bei diesen Zellen um eine Mauszelllinie handelt und die Transduktion der Lentiviren in humanen Zellen effizienter ist.

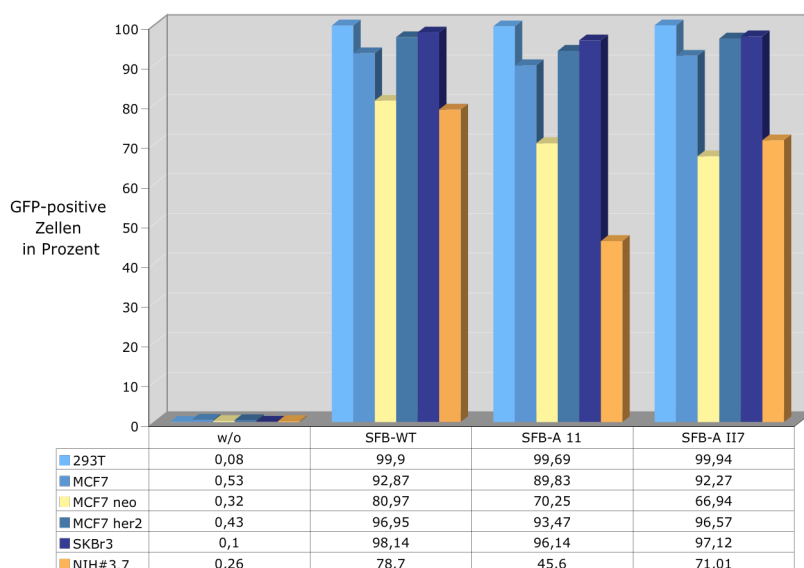


Abb. 3.22 | Bestimmung der Transduktions-effizienzen

Quantifizierung GFP-positiver Zellen nach den in Abb. 3.21 dargestellten FACS-Analysen; Zellen wurden mit leerem Trx (SFB-WT), Aptamer 11 (SFB-A11) und Aptamer II7 (SFB-AII7) transduziert, für die Transduktion wurden 293T, MCF7, MCF7 neo, MCF7 her2, SKBr3 und NIH#3.7 Zellen verwendet

Durch die lentivirale Transduktion gelang es, Aptamer-kodierende RNA effizient in humane Zellen einzubringen. Es ist anzumerken, dass die Aptamer-Expression im Vergleich zum Trx erniedrigt war und die Erhöhung der Aptamer-Expression die Funktionalität der Aptamere am Wirkort steigern würde.

3.3.1.2 Virale Aptamer Transduktion und Expression in humanem Thioredoxin als Gerüstprotein

Für die therapeutische Anwendung der Aptamere ist der Austausch des bakteriellen Trx als Gerüstprotein gegen das humane generell von Vorteil. Das humane Trx wird ubiquitär exprimiert und könnte als eukaryotisches Protein zu besseren Expressionsspiegeln führen. Eine Grundvoraussetzung für den Einsatz von humanem Trx ist dessen Struktur. Das humane Thioredoxin muss in der Lage sein die Peptid-Aptamere in der gleichen Weise zu präsentieren wie das bakterielle Trx. Aus diesem Grund wurden die Kristallstrukturen der beiden Proteine verglichen, welche eine fast deckungsgleiche Struktur aufweisen (Abb. 3.23).

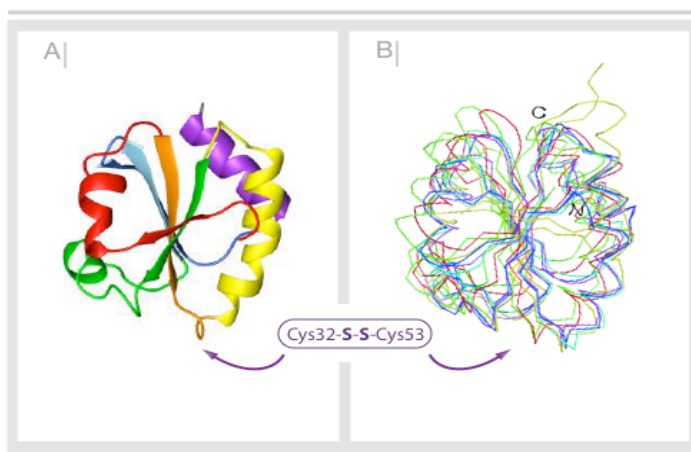


Abb. 3.23 | Überlagerte Kristallstruktur der Trx Proteine

A| Kristallstruktur des bakteriellen Trx mit Cys32 und Cys35 als aktives Zentrum (orange)

B| Überlagerung der Trx-Strukturen von verschiedenen Organismen. Das humane Trx ist in rot im oxidierten und in grün im reduzierten Zustand dargestellt. Das bakterielle Trx ist in dunkelblau dargestellt

70

Die Klonierung des humanen Trx erfolgte zum bakteriellen Trx in den pSiEW. Die Virusproduktion wurde ebenfalls analog der Produktion der Viren mit bakteriellem Trx als Gerüstprotein durchgeführt. In *Abb. 3.24* sind die Transduktionseffizienzen in verschiedene Zelllinien und die Aptamerexpression in 293T Zellen dargestellt.

Die Verwendung der pSiEW Vektoren mit humanem Trx erzielte ähnliche Transduktionseffizienzen in Zielzellen wie die Verwendung der pSiEW Vektoren mit bakteriellem Trx. Es konnte qualitativ eine Verbesserung der Expressionsspiegel der Aptamerkonstrukte im humanen Trx beobachtet werden. Durch Expressionsvergleich der leeren Trx-Konstrukte mit denen der Aptamere in beiden Gerüstproteinen, zeigte sich kein Unterschied im Expressionsspiegel bei humanem Trx. Bei bakteriellem Trx waren die Expressionsspiegel durch die Aptamer-Insertion wesentlich reduziert.

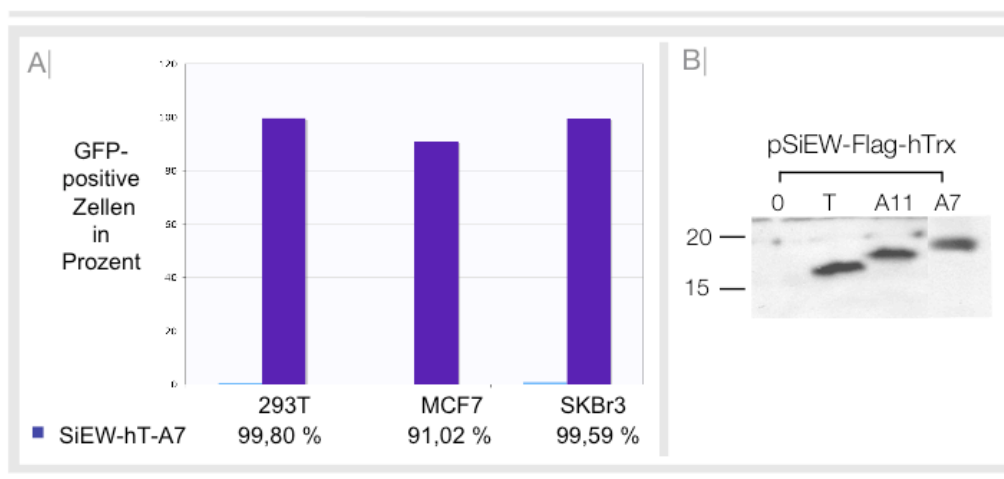


Abb. 3.24 | **Lentivirale Transduktion und Expression von Peptid-Aptameren im humanen Trx**

A) Transduktionseffizienzen des Aptamers II2 im humanen Trx als Gerüstprotein in 293T, MCF7 und SKBr3 Zellen

B) Western Blot der verschiedenen Aptamerkonstrukte im humanen Trx als Gerüstprotein nach lentiviraler Transduktion

Trotz ähnlicher räumlicher Struktur von bakteriellem und humanem Trx sollte durch Interaktionsanalysen sichergestellt werden, dass die Aptamere im neuen Gerüstprotein in der Lage sind, ErbB2 zu binden. Aus diesem Grund wurden parallel zu den oben gezeigten Versuchen die humanen Trx Aptamere in Hefe GAL4-DBD-Vektoren kloniert. Anschließend wurden die Aptamere in einem Hefe Zwei-Hybrid System auf Interaktion mit dem ErbB2 Rezeptor überprüft.

Die Interaktion der Aptamere im humanen Trx mit den entsprechenden Domänen des ErbB2 Rezeptors konnte nicht gezeigt werden (*Abb. 3.25*). Sowohl für Aptamer KDII 7 als auch KD₉ 11 konnte keine Interaktion mit ErbB2 nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle wurde Aptamer KDII 7 in bakteriellem Trx verwendet. Auch für ein Aptamer gegen die DNA-Bindedomäne von STAT3 war die Interaktion nach Austausch des Gerüstproteins im Hefe Zwei-Hybrid System

nicht mehr nach zu weisen. Auch hier wurde das Aptamer in bakteriellem Trx als Postivkontrolle verwendet.

Allerdings wurde von Dr. Corina Heinz (persönliche Korrespondenz) gezeigt, dass die Umsetzung der Aptamere von bakteriellem Trx in das analoge humane Gerüstprotein nicht zwangsläufig mit dem Bindungsverlust der Aptamere am Zielprotein einhergeht. Sie konnte erfolgreich verschiedene Aptamere die mit Stat3 interagieren ohne Bindungsverlust umsetzen.

Aus dieser Beobachtung ergeben sich zwei Interpretationsmöglichkeiten. Einerseits könnte die Konformation der Aptamere durch strukturelle Unterschiede der beiden Trx-Varianten verändert werden, die in einigen Fällen zum Bindungsverlust der Aptamere führen. Andererseits könnten Aminosäuren des bakteriellen Trx-Gerüstproteins an der ErbB2-Bindung beteiligt sein. Das humane Trx besitzt eine andere Aminosäuresequenz. Der Austausch der beiden Gerüstproteine würde damit zum Bindungsverlust führen.

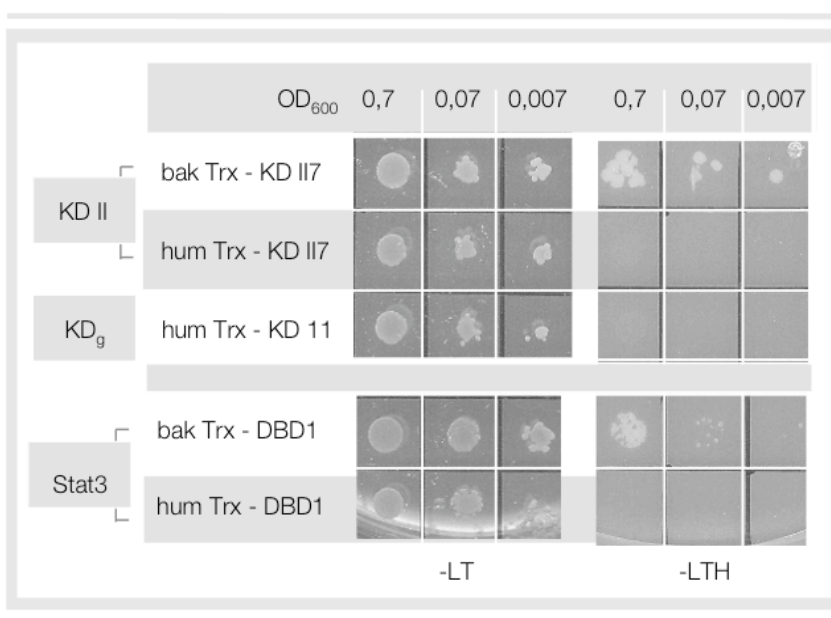


Abb. 3.25 | Hefe Zwei-Hybrid System mit humanem Trx

Zur Interaktionskontrolle wurden humanes Trx-KDII-7 und KD_g-11 mit ErbB2-KDII und KD_g in KF1 Hefe Zellen transformiert und die Reportergen Aktivierung auf -LTH überprüft; als Positivkontrolle diente bakterielles Trx II7; Stat3 und DBD dienen als weitere Kontrolle. Es wurden Verdünnungen der Hefe Klone ausplattiert, um einen Eindruck über die Stärke der Interaktion zu erhalten

Auf Grund dieser Ergebnisse konnten die isolierten Peptid-Aptamere nicht im humanen Trx verwendet werden. Die besseren eukaryotischen Expressionsspiegel des humanen Trx zeigten, dass die Verwendung dieses Gerüstproteins sinnvoll erscheint. Allerdings müssten die Aptamere bereits vor dem Hefe Zwei-Hybrid Screen zur Präsentation in dieses Gerüstprotein eingefügt werden.

3.3.2 Peptid-Aptamer Applikation durch Protein-Transduktion

Bei der Proteintransduktion (PT) handelt es sich um einen Mechanismus, dessen Funktionsweise noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte. Proteine, die eine Proteintransduktionsdomäne (PTD) besitzen, können über eine Form der Macropinozytose in die Zelle gelangen⁷¹ (siehe Kap. 1.5.3). Der Endozytoseweg der Macropinozytose ist ein

rascher Prozess, der in jeglichen eukaryotischen Zellen stattfindet und durch Aktin-vermittelte Vesikelbildung gekennzeichnet ist. Er ermöglicht der Zelle unspezifisch Wasser und Proteine aufzunehmen. Es konnte gezeigt werden, dass die Effizienz der PT durch Behandlung der Zellen mit Chloroquin, welches endozytostische Vesikel zerstört, erhöht werden kann ⁷².

In dieser Arbeit wurde eine optimierte PTD, bestehend aus neun Argininen, mit Aptameren fusioniert ⁷³. Diese Fusionskonstrukte wurden anschließend rekombinant in Bakterien exprimiert und nach Aufreinigung und Rückfaltung zur PT in das Medium von Tumorzellen gegeben. Um die Effizienz der PT zu steigern, wurde in diesen Versuchen Chloroquin verwendet, um die Aptamere im Zytoplasma der Zelle besser anzureichern.

3.3.2.1 Expression mittels T7-Promotor im pET-Expressionsvektor

Die Proteine müssen für die Proteintransduktion in einem geeigneten System exprimiert und aufgereinigt werden. Hierfür wurden die Aptamere mit einer Proteintransduktionsdomäne und His-Tags fusioniert und bakteriell exprimiert. Nach der Expression wurden die Proteine denaturierend aufgereinigt und durch Rückfaltung in eine funktionale Konformation gebracht. Als bakterieller Expressionsvektor diente der pET-30a+ Vektor (Abb. 3.26).

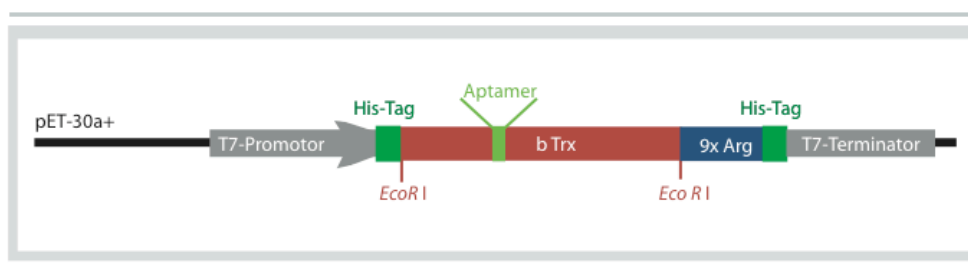


Abb. 3.26 | **Bakterieller Expressionsvektor pET-30a+**

Als funktionale Domäne wurden neun facher Arginin-Rest (9xArg) C-terminal an das Thioredoxin fusioniert. Diese 9xArg erlauben die Proteintransduktion in Säugerzellen. Der Vektor wurde verwendet, um Aptamere unter der Kontrolle des T7-Promotors bakteriell zu exprimieren und die exprimierten Proteine über die N- und C-terminalen His-Tags aufzureinigen.

Der pET-30a+ Vektor besitzt einen starken, IPTG-induzierbaren T7-Promotor, N- und C-terminale His-Tags für die Aufreinigung und einen neunfachen Arginin Rest als PTD am C-Terminus des Thioredoxin.

Diese Konstrukte wurden zur Expression in BL21 LysS transformiert und die Expression bei einer für 4 h bei 30°C durchgeführt. Die exprimierten Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen über Nickel-Sepharose-Säulen aufgereinigt. Die Rückfaltung der denaturierten Aptamere erfolgte nach Dialyse gegen Arginin in PBS, wobei das Arginin schrittweise wieder entfernt wurde.

Anschließend sollten die aufgereinigten Aptamere für die Proteintransduktion experimentell eingesetzt werden. Die Aptameraufnahme wurde in SKBr3 Zellen mittels CLSM (Confocal Laser-Scanning Microscopy) untersucht. Hierfür wurden die Zellen nach 4 h Proteintransduktion

fixiert und der ErbB2 Rezeptor wurde über einen spezifischen Antikörper detektiert und mit einem TRITC-gekoppelten Zweitantikörper markiert. Die Aptamere wurden analog mit einem Thioeredoxin Antikörper und einem FITC-gekoppelten Zweitantikörper markiert (Abb. 3.27).

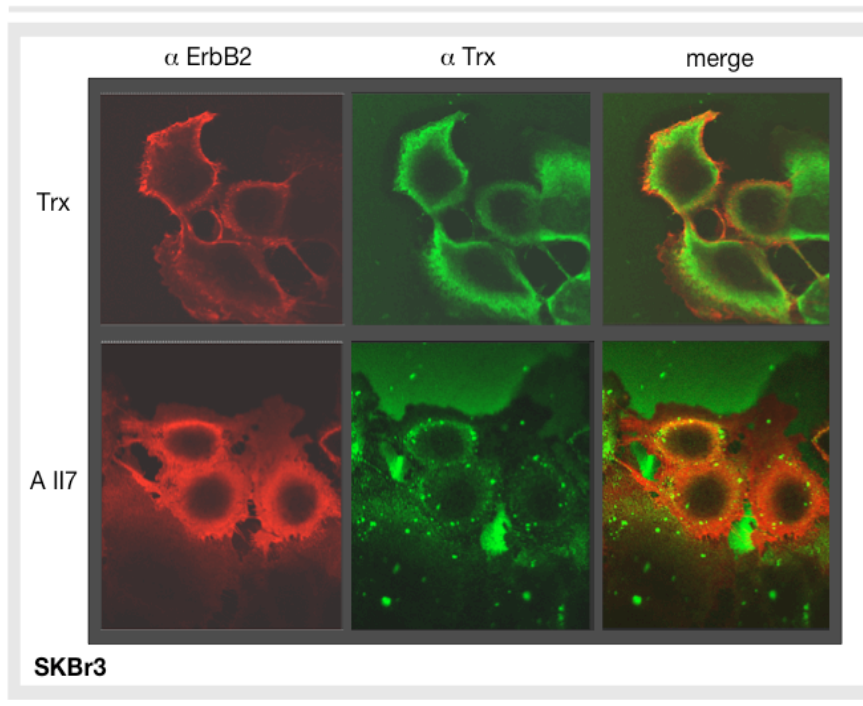


Abb. 3.27 | Konfokale Laser-Scanning Aufnahmen des Aptamers I17 nach PT in SKBr3 Zellen

Die Zellen wurden nach 4 h der PT fixiert. ErbB2 wurde mit einem spezifischen α ErbB2 Antikörper detektiert und mittels TRITC-gekoppelten Zweitantikörper markiert (rot). Analog wurden die Aptamere über einen Trx Antikörper detektiert und mittels FITC-gekoppelten Zweitantikörper markiert (grün). Die PT erfolgte mit Thioeredoxin als Negativkontrolle.

In der Abb. 3.27 lässt sich erkennen, dass das Thioeredoxin ohne Aptamerinsert in die Zellen transduziert wurde. Die Aufnahmen wurden mit dem CLSM gemacht und auf diese Weise ein optischer Schnitt durch die Zelle durchgeführt, knapp oberhalb des Deckglases auf welchem die Zellen ausplattiert sind. Dadurch wurde sicherstellt, dass sich das detektierte Thioeredoxin tatsächlich in den Zellen befand. Weiterhin lässt sich bei den Thioeredoxin-Aufnahmen deutlich erkennen, dass es zu keiner Co-Lokalisation mit dem ErbB2 Rezeptor kommt. Die zytoplasmatische Lokalisation des Trx (grün) überlagert nicht mit der Membranfärbung des Rezeptors (rot). Im Fall des Aptamers I17 kommt es zu Proteinaggregaten, die unspezifisch mit der Oberfläche der Zelle interagieren. Dieses Phänomen wurde auch bei anderen Aptameren beobachtet. Es wurde davon ausgegangen, dass die Aggregat-Bildung bei der Rückfaltung der Proteine auftritt. Aus diesem Grund wurde versucht die native Faltung der Proteine nach der Rückfaltung zu erleichtern. Hierfür wurde der Proteinlösung ein chemische Chaparon TMAO (Trimethylamin-N-oxid) in verschiedenen Konzentrationen zugegeben⁷⁴. Es zeigte sich, dass eine Endkonzentration von 1 M TMAO toxisch auf die Zellen wirkt, diese aber eine Konzentration von 500 mM tolerieren. Dies konnte sowohl für SKBr3, als auch für NIH#3.7 Zellen gezeigt werden.

In Abb. 3.28 sind Aptamer-Proteintransduktionen in NIH#3.7 Zellen dargestellt. Wie bereits für SKBr3 Zellen gezeigt, konnten die Proteine bei nativer Faltung, wie im Fall des Trx ohne Aptamerinsert, mit Hilfe des neunfach Arginin Rest in die Zellen transduzieren. Die CLSM

Analyse ergab jedoch auch hier, dass die Proteine als Aggregate unspezifisch auf der Zelloberfläche binden. Durch TMAO Zugabe (500 mM) sollte die Rückfaltung des Aptamers unterstützt werden. Allerdings konnte mit dem Chaparon nicht der gewünschte Effekt der nativen Faltung der Aptamere erzielt werden. Es galt nun, die optimalen Konditionen für Expression und Rückfaltung der Proteine zu finden.

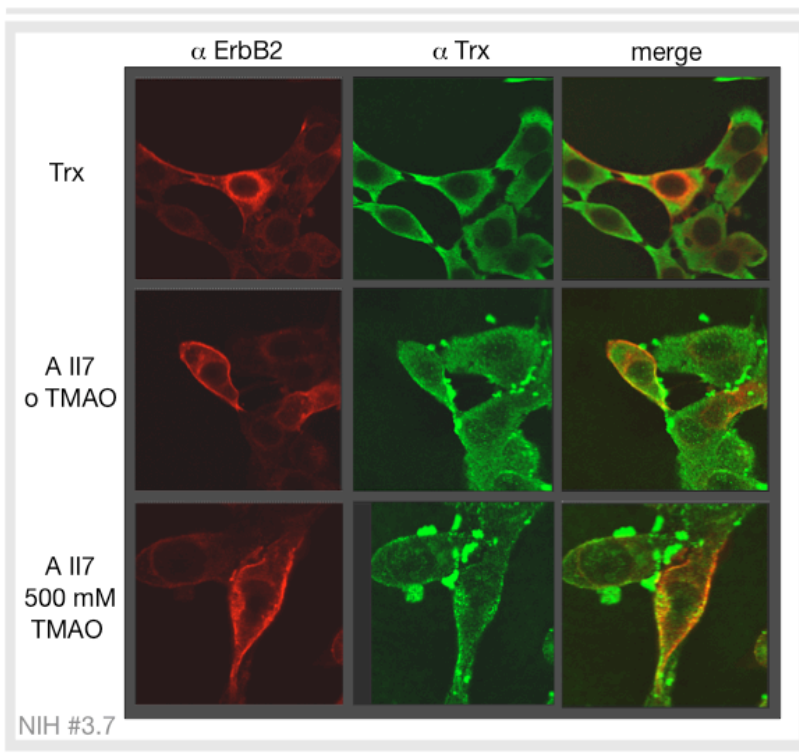


Abb. 3.28 | **Laser-Scanning Aufnahmen der transduzierten Aptamere**

Die NIH#3.7 Zellen wurden nach 4 Stunden Proteintransduktion fixiert. Der Rezeptor wurde mit einem ErbB2 Antikörper detektiert und mittels TRITC-Zweitantikörper Fluoreszenz markiert (rot). Analog wurden die Aptamere über einen Thioredoxin Antikörper detektiert und mittels FITC-Zweitantikörper markiert (grün). Die Proteintransduktion erfolgte mit leeren Thioredoxin als negativ Kontrolle für die Co-Lokalisation mit Aptamer I12 ohne bzw. mit TMAO

Zunächst wurde die Expressionstemperatur variiert. Durch die starke Expression des T7-Promotors können die Proteine schon während der Translation Proteinaggregate bilden, welche sich nach Zellaufschluss nicht mehr lösen lassen. Durch niedrigere Expressionstemperaturen wird der Bakterienzelle mehr Zeit für die korrekte Faltung der Proteine gegeben, wodurch sie sich nach Denaturierung leichter zurückfalten lassen. Allerdings zeigte sich bei einer niedrigeren Expressionstemperatur (18 °C anstatt bisher 30 °C) keine Verbesserung der Rückfaltung und Proteintransduktion der getesteten Aptamere.

Eine weitere Möglichkeit, die Expression der Proteine „physiologischer“ zu gestalten, ist die Verwendung eines anderen induzierbaren Promotors. Hierfür wurden die Aptamere in den pFLAG-2 Expressionsvektor kloniert, der einen Taq-Promotor enthielt.

3.3.2.2 Aptamer-Expression mittels Taq-Promotor im pFLAG-Expressionsvektor

Der pFLAG-2 Expressionsvektor (Abb. 3.29) besitzt einen Taq-Promotor und einen N-terminalen Flag-Tag zur Detektion. Der Taq-Promotor ist schwächer als der T7-Promotor. Dadurch können die Proteine nach der Expression Sekundärstrukturen ausbilden, die nach der Denaturierung die

Rückfaltung der Proteine erleichtern. Beim T7-Promotor ist dies wahrscheinlich nur eingeschränkt möglich, da die Aptamere aufgrund der hohen Expressionsspiegel Proteinaggregate in der Bakterienzelle bilden, die sich auch durch Denaturierung nicht mehr vollständig lösen lassen. Der Flag-Tag wurde verwendet, um die Aptamere besser detektieren zu können. Die Detektion durch den Trx Antikörper war wegen starker unspezifischer Bindung des Antikörpers nicht uneingeschränkt möglich. Die Aptamer-DNA wurde als Kasette mit 9x Argininen und C-terminalen His-Tag für die Aufreinigung aus dem pET-30a+ Vektor kloniert.

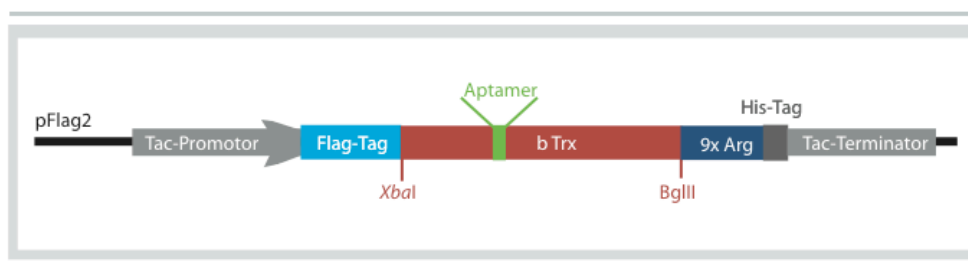


Abb. 3.29 | **Bakterieller Expressionsvektor pFLAG-2**

Dieser Vektor wurde verwendet, um Aptamere unter der Kontrolle des Taq-Promotors bakteriell zu exprimieren und über den C-terminalen His-Tag aufzureinigen. Als weitere funktionale Domäne wurde neunfacher Arginin-Rest (9x Arg) C-terminal an das Thioredoxin fusioniert. Diese 9x Arg erlauben die Proteintransduktion in Säugerzellen. Der N-terminale Flag-Tag ermöglicht die Detektion der Aptamere im Western Blot bzw. Immunfluoreszenz.

Die ersten Expressionsversuche wurden bei 37 °C durchgeführt, um die Expressionsspiegel der Aptamere zu überprüfen. Wie in der *Abb. 3.30 A* | und *B* | deutlich wird, zeigen die BL21 lysS Bakterien mit dem neuen Expressionsvektor die Aptamer-Expression bereits eine Stunde nach der IPTG-Induktion. Das Expressionsoptimum wird bei 30 °C, im Vergleich zu 37 °C, jedoch eine Stunde später erreicht. Dennoch wurde die niedrigere Temperatur für die Expression gewählt, um den exprimierten Proteinen die Möglichkeit zu geben, in den Bakterien Sekundärstrukturen auszubilden, welche die spätere Rückfaltung erleichtern sollten.

In der *Abb. 3.30* sind in *C* | die unterschiedlichen Proteineluate nach FPLC-Aufreinigung dargestellt. Die Elutions-Fractionen 2 und 3 wurden für Dialyse und Rückfaltung verwendet, wobei das Aptamer KD I1 generell schwächer exprimiert wurde als Thioredoxin und Aptamer KD II7. In *D* | sind die unterschiedlichen Proteine nach Rückfaltung und Zentrifugation zur Mengenabschätzung gegen einen BSA-Standard aufgetragen. Die Aptamere konnten gut aufgereinigt und rückgefaltet werden, so dass am Ende der Aufreinigung Proteine in Konzentrationen von 200 ng/μl gewonnen werden konnten. Trx ohne Aptamer lies sich in allen Fällen wesentlich besser exprimieren und rückfalten.

Mit Hilfe des pFLAG-2 Expressionsvektors ließen sich im Vergleich zum pET-Vektor, trotz schwächerem Promotor ausreichend hohe Expressionsspiegel erreichen.

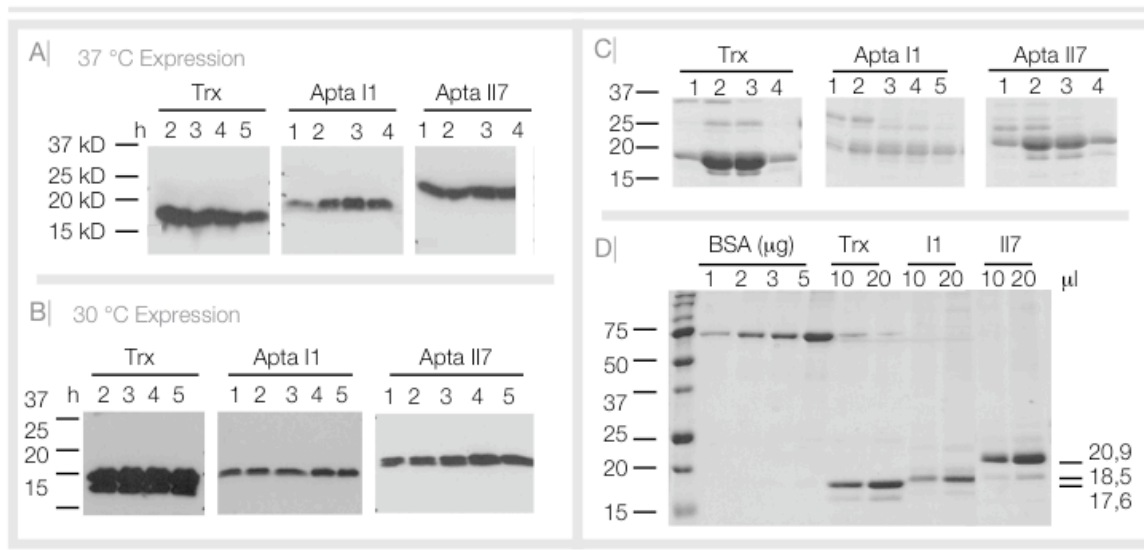


Abb. 3.30 | Aptamer-Expression und -Eluate nach Aufreinigung und Rückfaltung

- A | Expression der Aptamere bei 37 °C; das Expressionsoptimum ist nach 3 h IPTG Induktion erreicht.
 B | Expression der Aptamere bei 30 °C. Das Expressionsoptimum wird im Vergleich zu 37 °C, eine Stunde später erreicht, nach 4 h IPTG Induktion
 C | Verschiedene Aptamer Eluate nach Aufreinigung über die Nickel-Sepharose Säule. Die Fraktionen 2 und 3 wurden jeweils dialysiert und über Arg/PBS rückgefaltet
 D | Coomassie-Gel zur Mengenabschätzung nach Rückfaltung der Proteine; zur Mengenabschätzung wurden 10 bzw. 20 μl aufgetragen und mit einem BSA-Mengenstandard verglichen.

Die Proteine konnten gut aufgereinigt und rückgefaltet werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde sie auf ihre Qualität und Funktionalität in *in vitro* Co-IPs (Kap. 3.4.1) und Co-Lokalisationsstudien (Kap. 3.4.2) untersucht. Nachdem die korrekte Faltung und Funktion der Aptamere in diesen Versuchen sichergestellt wurde, konnten sie für funktionale Studien (Kap. 3.5) eingesetzt werden.

3.4 Charakterisierung der Aptamer-Rezeptor Interaktion

Die Funktion der aufgereinigten Peptid-Aptamere sollte auf zwei verschiedenen Wegen verifiziert werden. Im ersten Schritt wurde die Interaktion von Aptamer und ErbB2 *in vitro*, durch Co-IP Experimente mit dem ErbB2-Rezeptor aus Zellextrakten überprüft (Kap. 3.4.1). Hierfür wurden die aufgereinigten Aptamere mit Zellextrakten von SKBr3 Zellen inkubiert, der Rezeptor über α ErbB2 Antikörper isoliert und die Aptamere mit α Flag Antikörper detektiert. Im zweiten Schritt erfolgte die Interaktionsanalyse *in vivo* durch Co-IP und Co-Lokalisationsstudien (Kap. 3.4.2).

3.4.1 Bindungsanalyse der aufgereinigten Peptid-Aptamere mit ErbB2 durch *in vitro* Co-IP

Die *in vitro* Co-IP Experimente sollten sicherstellen, dass die Aptamere funktional rückgefaltet werden konnten. Um die Bindung der aufgereinigten Peptid-Aptamere an den ErbB2-Rezeptor bestimmen zu können, wurden sie nach der Aufreinigung (siehe Kap. 3.3.2.2) in einer Endkonzentration von 250 nM mit MCF7 Gesamt-Zellextrakt inkubiert. Die Aptamer-Rezeptor-Komplexe wurden durch einen spezifischen ErbB2-Rezeptor Antikörper, der an Protein-A magnetischen Dynabeads gebunden war, isoliert. Im anschließenden Western Blot sollten die isolierten Aptamere durch einen Flag-Antikörper detektiert werden.

In *Abb. 3.31* sind die ersten *in vitro* Co-IP Versuche dargestellt und zeigen eine schwache Interaktion von Aptamer KD_g 11 mit dem Rezeptor und eine etwas stärkere Interaktion bei Aptamer KD II7.

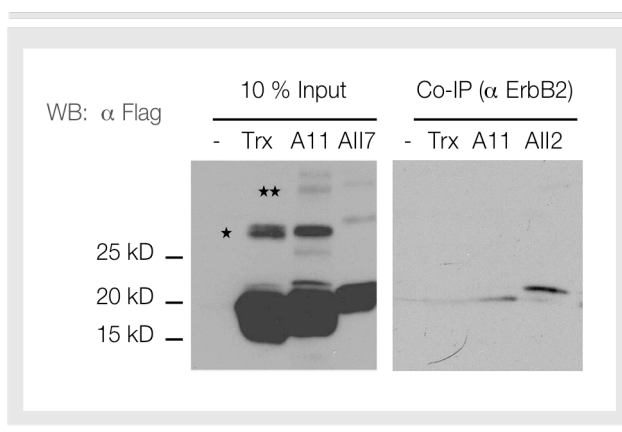


Abb. 3.31 | In vitro Co-IP mit aufgereinigten Peptid-Aptamer

Die Co-IP wurde mit MCF7 Zellextrakten durchgeführt, wobei ErbB2 durch IP mittels α ErbB2 Antikörper isoliert wurde. Im Western Blot wurden die Aptamere mit einem Flag-Antikörper detektiert. Sowohl Aptamer KD_g11 als auch KD II7 zeigen eine Bindung an ErbB2. Trx als Negativkontrolle hingegen bindet nicht den Rezeptor. Im Input treten trotz reduzierenden Bedingungen hoch-molekulare Banden auf; * = Trx-Dimere; ** = Trx-Multimere

Ferner lässt auf dem Blot erkennen, dass trotz Aufreinigung, und laden der Proben unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen (DTT und SDS im Ladepuffer), nicht nur die monomere Form des Thioredoxin, sondern auch Dimere, bzw. höher-molekulare Formen zu detektieren sind. Es ist möglich, dass durch die Multimerisierung des Trx die Aptamere nicht mehr in der Lage sind, mit ErbB2 zu interagieren. Aus diesem Grund wurde versucht, die Multimerisierung zu verhindern.

3.4.1.1 Optimierung der aufgereinigten Peptid-Aptamer Konstrukte

Im Folgenden wurde untersucht, ob es sich bei den hochmolekularen Banden tatsächlich, um Multimere des Thioredoxins handelt. Diese Multimere könnten durch sich durch intermolekulare Disulfidbrücken bilden und als Multimer die Interaktion mit dem Zielprotein verhindern, wodurch sich die schwache Interaktion mit dem Rezeptor in diesem Versuch erklären würde.

Die Aptamere liegen nach der Aufreinigung als Dimere (40 kD) und Multimere mit einem Molekulargewicht von bis zu 100 kD vor (siehe *Abb. 3.32: Input ohne DTT - X*). Nur ein geringer Teil liegt als Monomer vor (20 kD). Wird im Ladepuffer das Reduktionsmittel DTT verwendet,

lassen sich die Multimere zu Monomeren auftrennen (siehe *Abb. 3.32: Input mit DTT*), was darauf hindeutet, dass intermolekulare Disulfidbrücken für die Multimerisierung verantwortlich waren.

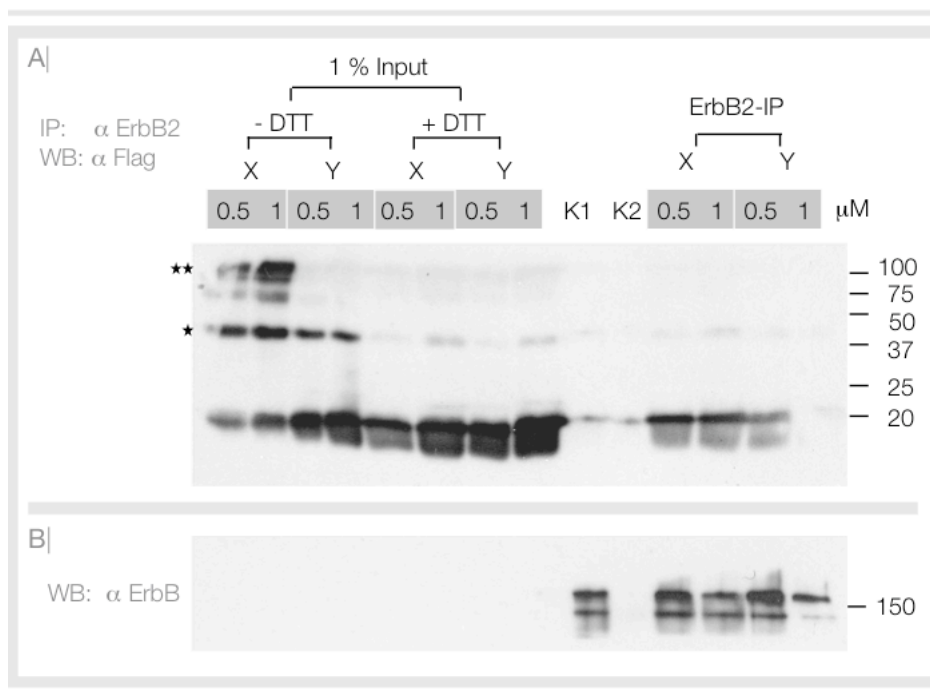


Abb. 3.32 | In vitro Co-IP mit Aptamer II2 mit bzw. ohne DTT Behandlung

- A | Der Western Blot wurde mit einem α Flag Antikörper durchgeführt und zeigt die in den Co-IP Experimenten eingesetzten Aptamer-mengen (Input) und die ErbB2-gebundenen Aptamere nach *in vitro* Co-IP. Auf der linken Seite der Abb. sind die eingesetzten Aptamer-mengen zu erkennen, jeweils in verschiedenen Konzentrationen und sowohl ohne (- DTT) als auch mit DTT (+ DTT) im Gelladepuffer. Ferner wurden die Aptamere direkt nach der Aufreinigung mit (Y) und ohne (X) DTT behandelt, um die Multimerisierung zu verhindern und nach der Rückfaltung in die Co-IP eingesetzt. Als Kontrollen dienten der Rezeptorextrakt mit Beads (K1) und die Beads mit aufgereinigtem Aptameren (K2). Die Trx-Dimere sind mit * und Multimere mit ** gekennzeichnet. Die rechte Seite der Abb. zeigt die mit ErbB2 co-präzipitierten Aptamere.
- B | Der Western-Blot wurde mit einem α ErbB2 Antikörper durchgeführt und diente der Kontrolle der IP.

Es wurde nun der Versuch unternommen, die Bildung intermolekularer Disulfidbrücken zu verhindern, indem die aufgereinigten Proteine nach Elution von der Sepharosesäule für 2 h mit 0,3 M DTT inkubiert wurden⁷⁵. Nach dieser Inkubation wurde die Proteinlösung auf 100 ng/ μ l verdünnt und die Proteine nach dem Standardprotokoll zurückgefaltet. Die DTT-Behandlung nach der FPLC diente der Aufspaltung der Disulfidbrücken, die Verdünnung sollte bewirken, dass durch Oxidation neu gebildeten Disulfidbrücken intramolekularer Natur sind. Es zeigte sich (siehe *Abb. 3.32: Input ohne DTT- Y*), dass dieses Verfahren zu einer erhöhten Ausbeute an funktionalen Thioredoxin Monomeren führte und sich keine Multimere detektieren ließen. Es wurde erwartet, dass die Anreicherung an Monomeren auch zu einer Erhöhung der Bindung der Aptamere am ErbB2 Rezeptor führte (siehe *Abb. 3.32: ErbB-IP - Y*). Die Co-IP zeigte allerdings eine schlechtere Interaktion von Aptameren mit ErbB2 nach der DTT-Behandlung. Es ließ sich

aber auch erkennen (*Abb. 3.32-B*), dass die IP des Rezeptors nach DTT-Behandlung reduziert war. Vermutlich konnte das eingesetzte DTT nicht vollständig aus dem Ansatz entfernt werden und behinderte so die Bindung der Aptamere an den Rezeptor und/oder die Interaktion des Rezeptors mit dem IP-Antikörper.

Es besteht nun die Möglichkeit die DTT-Konzentration zu titrieren, dass die Multimere aufgebrochen werden, die Bindung aber nicht gestört wird. Hierbei ist jedoch fraglich, ob sich das DTT nach der Behandlung durch Dialyse vollständig entfernen lässt. Ferner mussten die Proteine nach der DTT-Behandlung stark verdünnt werden, um bei der Rückfaltung die Bildung intramolekularer Disulfidbrücken zu erleichtern. Dadurch wurde eine spätere Aufkonzentrierung mit PEG 80.000 und eine erneute Dialyse notwendig, wodurch die Proteine weitere 2 Tage Abbauprozessen ausgesetzt waren und sich die Funktionalität reduzierte.

Diese Schwierigkeiten können jedoch umgangen werden, indem die für die Multimerisierung verantwortlichen Cysteine gegen Serine ausgetauscht werden. Serine besitzen eine ähnliche Struktur und Polarität wie Cysteine, sind allerdings nicht in der Lage Disulfidbrücken zu bilden. Eine solche Vorgehensweise ist allerdings nur möglich, wenn die Disulfidbrücken im Protein nicht für die Aufrechterhaltung der Proteinkonformation mitverantwortlich sind. Da das leere Trx keine Anzeichen der Multimerisierung aufweist, konnte angenommen werden, dass die Cysteine im aktiven Zentrum (Cys³²-Cys³⁵) nach Aptamer-Insertion nicht in der Lage sind, eine Disulfidbrücke auszubilden. Aus diesem Grund sollten diese Cysteine durch Serine ersetzt werden. Im Vergleich der Trx-Kristallstruktur im oxidierten und reduzierten Zustand wurde untersucht, ob die Disulfidbrücke für die konformationelle Stabilität des Proteins erforderlich ist (*Kap. 3.3.1.2 Abb. 3.23-B*). Die Kristallstrukturen des Trx in der oxidierten und reduzierten Form sind deckungsgleich, und damit wird durch Reduktion der Disulfidbrücke im aktiven Zentrum keine große Konformationsänderung in der Proteinstruktur induziert. Somit sollte die Präsentation der Aptamere im Thioredoxingerüst durch Mutation der Cysteine zu Serinen nicht verändert werden und die Bindungsaffinität an den ErbB2 Rezeptor erhalten bleiben.

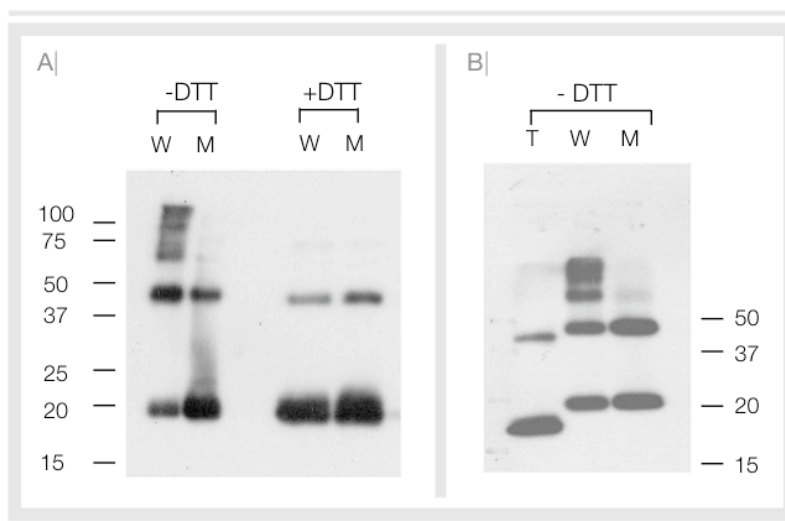


Abb. 3.33 | Effekt auf die Multimerbildung durch Ersetzen der Cysteinen im aktiven Zentrum durch Serine

A| Aptamer II7 im Trx Gerüst mit (W) und ohne (M) Cysteine im aktiven Zentrum, mit und ohne DTT im Ladepuffer;
B| Untersuchung der Multimerbildung aufgereinigter Proteine: Trx (T), Apta II7 mit (W) und ohne (M) Cysteine im aktiven Zentrum im Vergleich

Für diese Versuche wurde Aptamer II7 gewählt, da es zusätzlich zu den Cysteinen im aktiven Zentrum und einem Cystein im Gerüstprotein, ein weiteres Cystein in der Aptamer-Sequenz besitzt, wodurch die Multimerisierung besonders stark ausgeprägt war. Das Cystein in der Aptamer-Sequenz wurde nicht mutiert, da es für die ErbB2-Bindung mitverantwortlich sein könnte.

Im Western Blot wurde mit einem α Flag Antikörper überprüft, ob das Aptamer II7 mit Cysteinen (W) und ohne Cysteine (M) nach der Rückfaltung Multimere ausbildete (Abb. 3.33-A). Unter nicht-reduzierenden Bedingungen, (-DTT) zeigte unmodifiziertes Aptamer II7 eine deutliche Tendenz zur Multimerbildung, wohingegen Aptamer II7 mit Serinen im aktiven Zentrum nur Dimere bildet und einen erhöhten Anteil an monomerem Aptamer aufweist. Die Verwendung des Reduktionsmittels DTT zeigte, dass die hochmolekularen Aptamerformen durch Disulfidbrücken entstanden sind. Im Thioredoxin ohne Aptamerinsert (Trx), treten nur Dimere durch ein weiteres Cystein im Trx-Molekül, aber keine Multimere auf (Abb.3.33-B). In diesem Fall sind die Cysteine im aktiven Zentrum in der Lage, eine funktionale Disulfidbrücke zu bilden. Dies ist beim Trx nach Aptamerinsertion anscheinend nicht mehr möglich, so dass es bei der Rückfaltung der Proteine zur Multimer-Bildung kommt. Die Multimerisierung findet jedoch nicht generell statt und es hängt von der Sequenz der inserierten Aptamere ab, ob es zur Ausbildung der Disulfidbrücke kommt.

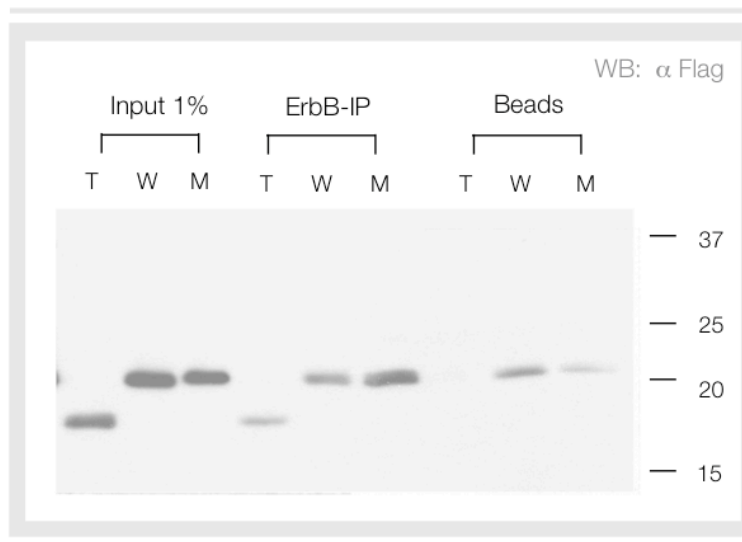


Abb. 3.34 | **In vitro Co-IP mit Aptamer II2 W und M**

Vergleich der Bindung von Thioredoxin (T), Aptamer II2 mit (W) und ohne (M) Cysteine im aktiven Zentrum des Thioredoxins an den ErbB2 Rezeptor. Der ErbB2 Rezeptor wurde durch IP aus 1 mg NIH#3.7 Extrakt isoliert und $0,5 \mu\text{M}$ der aufgereinigten Aptamere in den Pulldown eingesetzt.

Es wurde untersucht (Abb. 3.34), ob die reduzierte Multimer-Bildung bei den Serin Varianten auch zu einer erhöhten Aptamer-Bindung am Zielprotein führte. Hierfür wurden erneut die oben beschriebenen *in vitro* Co-IP Versuche durchgeführt, wobei Aptamere mit Serinen (M) eine bessere Bindung an den ErbB2 Rezeptor zeigten als die analogen Aptamere mit Cysteinen (W). Ferner lies sich eine reduzierte unspezifische Bindung an magnetische Protein-A-gekoppelte Beads erkennen, was ebenfalls auf eine erhöhte Konzentration an funktional-gefalteten Proteinen bei Aptameren mit Serinen spricht. In den folgenden PT-Versuchen wurde daher das

Aptamer ohne Cysteine verwendet, wobei weiterhin die Bezeichnung Aptamer KD II7 verwendet wurde.

3.4.1.2 Spezifitätskontrolle der Rezeptor-Aptamer Interaktion durch rekombinante Aptamer-Konstrukte

Die Spezifitätskontrolle der Peptid-Aptamere wurde durch *in vitro* Co-IP Versuche mit A431 Zellextrakten durchgeführt. Diese Zellen überexprimieren sowohl den EGFR als auch den ErbB2 Rezeptor. Parallel wurde in einem *in vitro* Co-IP Experiment Zellextrakt von SKBr3 Zellen verwendet, die nur den ErbB2 Rezeptor überexprimieren.

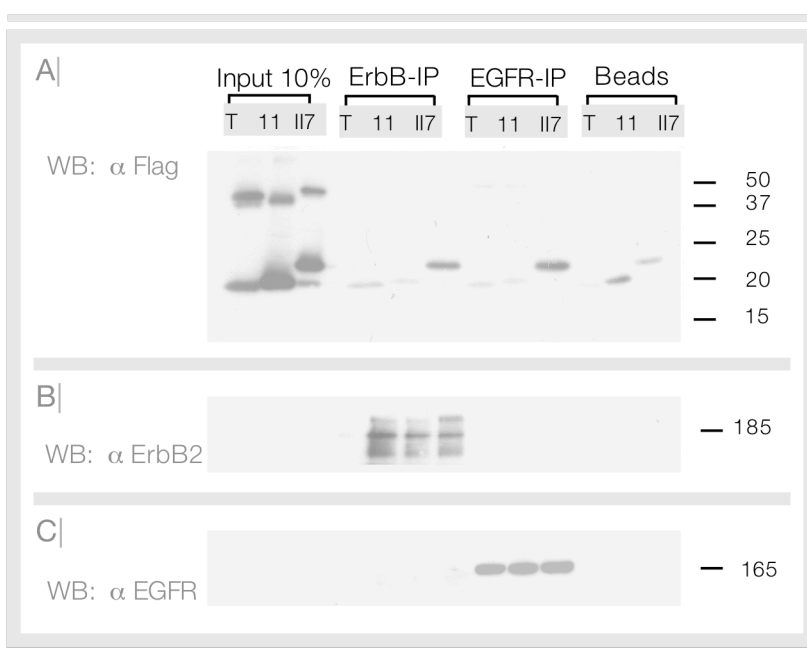


Abb. 3.35 | Spezifitätskontrolle durch *in vitro* Co-IP mit SKBr3 und A431 Zellextrakt

Western-Blot mit Flag AB nach IP mit ErbB2 bzw. EGFR Antikörper. Es wurden 0,5 mg Zellextrakt mit 0,25 μ M aufgereinigtem Aptamer-Eluat inkubiert. Der Western Blot zeigt eine schwache Interaktion von Aptamer KD_g 11 und eine stärkere Interaktion von KDII 7 mit ErbB2 und EGFR. Als IP Kontrolle wurde ein Western-Blot mit ErbB2 und EGFR Antikörper durchgeführt.

In den durchgeführten *in vitro* Co-IP Experimenten (Abb. 3.35) zeigten die Aptamere KD_g 11 und KD II7 vergleichbare Bindung an ErbB2 und EGFR. Dies steht im Widerspruch zu den bisher gezeigten Bindungsanalysen im Hefe Zwei-Hybrid System (Kap. 3.1.3.4) und GST-Pulldown Experimenten (Kap. 3.3.4), in welchen die Aptamere präferentiell mit ErbB2 interagierten. Die Immunopräzipitationskontrolle ließ erkennen, dass durch die EGFR-IP wesentlich mehr EGFR in die Co-IP eingesetzt wurde, als ErbB2 durch die ErbB2 Rezeptor-IP. Durch die größere Menge an EGFR in der Co-IP könnte also trotz geringerer Affinität der Aptamere zum EGFR, im Vergleich mit ErbB2, die gleiche Menge an Aptameren co-präzipitiert werden. Eine weitere Erklärung diese Ergebnisse, ist die Möglichkeit, dass der ErbB2-Rezeptor bei A431 Zellen, im aktiven Zustand als Dimer mit dem EGFR immunopräzipitiert wird. In diesem Fall sollte sich allerdings eine ErbB2 Rezeptorbande im A431 IP-Kontrollblot nachweisen lassen, die sich jedoch nicht detektieren ließ.

Durch die *in vitro* Co-IP Experimente ließ sich nicht eindeutig klären, ob Aptamer KDII 7 spezifisch mit ErbB2 interagiert, wie dies durch GST-Pulldown Experimente oder im Hefe Zwei-Hybrid System gezeigt werden konnte. Es ist durchaus möglich, dass A431 Zellen für diese Experimente nicht geeignet sind, da sie sowohl ErbB2 als auch EGFR überexprimieren. In den GST-Pulldown Experimenten wurden hingegen Renca EGFR Zellen verwendet, die nur den humanen EGFR exprimieren. In diesen Experimenten konnte keine Interaktion der Aptamere mit EGFR nachgewiesen werden. Nach *in vitro* Bindungsstudien wurde nun die Bindungseigenschaften der aufgereinigten Aptamere Krebszellen untersucht.

3.4.2 Bindungsanalyse der Peptid-Aptamere *in vivo*

Die ErbB2-Aptamer-Interaktionsversuche wurden in den bisherigen Experimenten *in vitro* durchgeführt. Hierbei konnte die Rückfaltung der Aptamere sichergestellt werden. In den folgenden Versuchen wurde untersucht, ob die Proteintransduktionsdomäne den aufgereinigten Aptameren ermöglicht in die humane Zellen zu gelangen, um dort mit dem ErbB2-Rezeptor zu interagieren.

3.4.2.1 Bindungsanalyse nach Aptamer Proteintransduktion mittels Co-IP

Die Bindungsanalyse der Aptamere an ErbB2 in humanen Zellen wurde mit einer weiteren Co-IP Technik durchgeführt. Hierfür wurden SKBr3 Zellen für 4 h mit 2 μ M Flag-Aptamer Fusionsproteinen Protein-transduziert und nach Zellyse eine IP mit einem ErbB2-Rezeptor Antikörper durchgeführt. Auf diese Weise werden die an den Rezeptor gebundenen Aptamer präzipitiert und können mittels Flag Antikörper detektiert werden. Für die Co-IP wurden Proteinproben aus zwei unterschiedlichen Aufreinigungsansätzen verwendet, um einerseits die Funktionalität der Proteine sicherzustellen, andererseits um zu zeigen, dass Proteintransduktion als reproduzierbare Technik der Proteinapplikation verwendet werden konnte. Die Ergebnisse sind in *Abb. 3.36* dargestellt.

Nach der Transduktion wurden 10 % des Zellysats im Western Blot aufgetragen, um die die Transduktionseffizienz und die Menge der eingesetzten Aptamere abschätzen zu können. Ferner diente die Input-Kontrolle der Abschätzung der Stärke der Rezeptor-Aptamer Interaktion. Im durchgeführten Experiment konnte jedes der transduzierten Aptamerkonstrukte im Zellysat nachgewiesen werden, was auf die erfolgreiche Transduktion der Konstrukte hinweist. Ferner konnte gezeigt werden, dass aufreinite und rückgefaltete Aptamere nach der Transduktion in der Lage sind, mit dem ErbB2-Rezeptor zu interagieren. Zusätzlich lässt sich durch den Versuchsansatz eine quantitative Aussage über die Bindungsstärke treffen. Nach der Aufreinigung der Proteine kommt es im Fall des Aptamers II7 zu einer Bindung an den Rezeptor, die über 10 % der eingesetzten Proteinmenge liegt (Intensitätsvergleich mit 10 % Input).

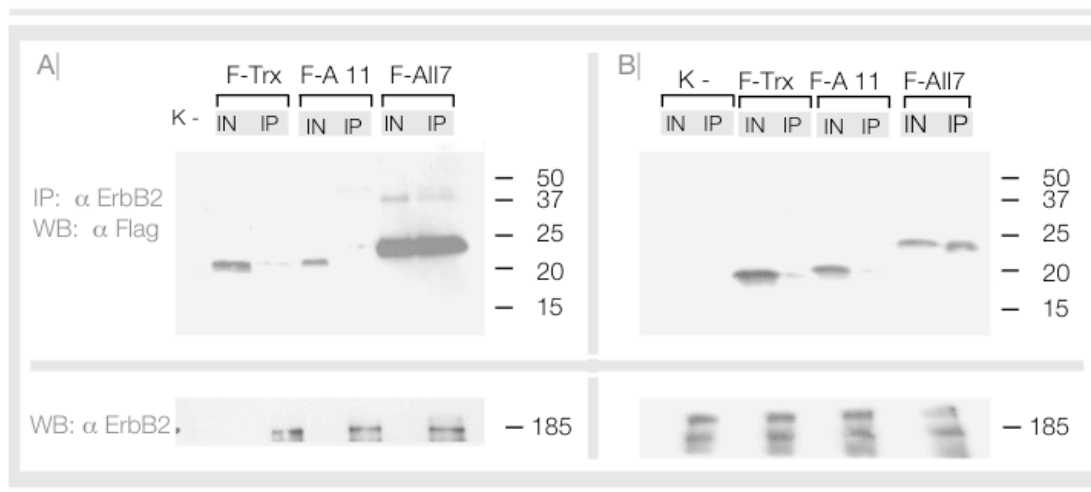


Abb. 3.36 | Co-IP nach Aptamer Proteintransduktion

Transduktion von verschiedenen Aptamer-Fusionsproteinen ($2 \mu\text{M}$) in SKBr3 Zellen; als Negativkontrolle wurde das leere Trx transduziert; es wurden 10 % des Zellextraktes als Kontrolle der PTD und zur Abschätzung der Bindungsstärke aufgetragen; die Co-IP wurde mit Aptamerproben aus zwei unterschiedlichen Proteinaufreinigungsansätzen durchgeführt (A | und B |); in beiden Ansätzen konnte eine deutliche Interaktion des Aptamers KD II7 mit dem Rezeptor nachgewiesen werden, jedoch keine Interaktion mit Trx ohne Aptamerinsert oder Aptamer KD_g 11.

3.4.2.2 Bindungsanalyse nach Aptamer Proteintransduktion mittels Co-Lokalisation im CSLM

Als weiterer *in vivo* Interaktionsnachweis der Aptamere mit ErbB2 wurden NIH#3.7 Zellen proteintransduziert und die Co-Lokalisation der Proteine mittels CLSM (confocal laser scanning microscopy) nachgewiesen. Mit diesem Experiment sollte die Aufnahme der Aptamere in die Zellen überprüft werden, wo sie in der Lage sein sollten, mit dem Zielprotein zu interagieren. NIH#3.7 Zellen sind murine NIH 3T3 Fibroblasten, die eine konstitutiv aktive Form des humanen ErbB2-Rezeptors exprimieren. Die Proteintransduktion erfolgte für 3 Stunden mit $1 \mu\text{M}$ aufgereinigten pFlag-Aptameren. Als Negativkontrolle wurden untransduzierte NIH#3.7 und Thioredoxin ohne Aptamerinsert verwendet. Nach 3 h Transduktion wurden die Zellen mit $0,2 \text{ M}$ Essigsäure in PBS behandelt. Durch diesen Arbeitsschritt werden Proteine entfernt, die sich auf der Oberfläche der Zellmembran befinden und dort nicht verankert sind. Auf diese Weise wurden u.a. Aptamere entfernt, die nicht in die Zelle transduziert sind. Nach der Fixierung der Zellen und ErbB2- und Aptamer-Färbung mit Fluoreszenz-markiertem Antikörpern wurden die Zellen mittels CLSM untersucht. Um sicher zu gehen, dass eine optische Ebene ausgewählt wurde, welche intrazelluläre Färbungen zeigt, wurde der optische Schnitt direkt über dem Deckglas, auf welchem die Zellen kultiviert wurden, vorgenommen.

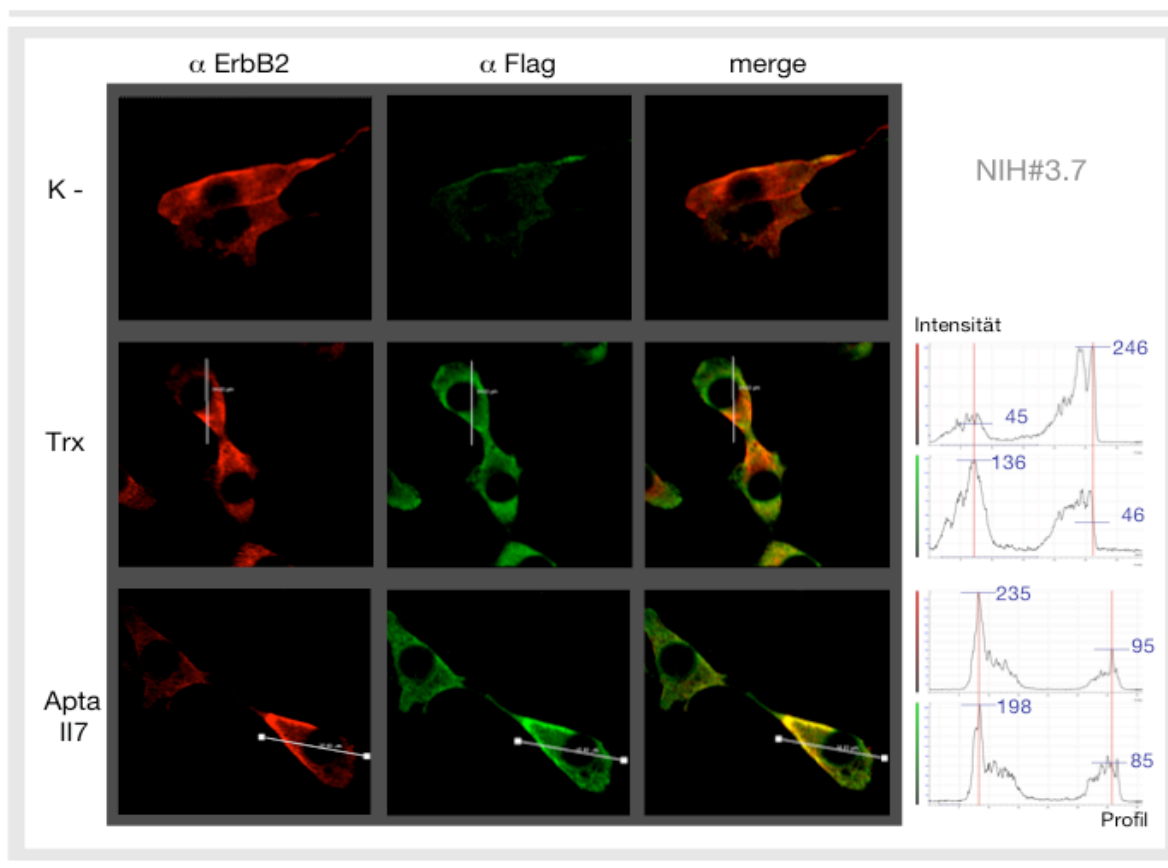


Abb. 3.37 | Mikroskopische Co-Lokalisationsstudien von Protein-transduzierten NIH#3.7 Zellen

Die NIH#3.7 Zellen wurden 3 h mit den jeweiligen Proteinen (Trx oder Trx mit Apta II7) transduziert. Vor dem Fixieren der Zellen für die Immunfluoreszenz wurden die nicht-transduzierten Proteine mit 0,2 M Essigsäure in PBS von der Zelloberfläche entfernt. Der ErbB2 Rezeptor wurde mit einem spezifischen Antikörper detektiert und mittels TRITC-Zweitantikörper Fluoreszenz markiert (rot). Analog wurden die Aptamere über einen Thioredoxin Antikörper detektiert und mittels FITC-Zweitantikörper markiert (grün). Durch Überlagerung der beiden Fluoreszenzen (overlay) lässt sich eine Interaktion der Proteine durch Gelbfärbung erkennen.

Die *Abb. 3.37* zeigt deutlich, dass die Aptamere im Thioredoxingerüst mittels PTD in die Zelle aufgenommen wurden. Der ErbB2 Rezeptor (rot) ist hauptsächlich an der Zellmembran zu finden. Das Trx Protein (grün) befandete sich im Zytoplasma der Zelle. Durch die Insertion der Peptidsequenzen von Aptamer KD II7 in das Trx Gerüst ist eine deutliche Veränderung der Lokalisation des Proteins zu erkennen, das nun hauptsächlich an der Zellmembran lokalisiert ist und eine Co-Lokalisation (gelb) mit ErbB2 erkennen lässt. Um die Co-Lokalisation noch stärker zu verdeutlichen, wurden die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten in einem Zellquerschnitt in der Z-Ebene (weiße Linie) bestimmt und in einem Intensitätsdiagramm aufgetragen (*Abb. rechte Spalte*). Auf diese Weise konnte der optische Eindruck der Gelbfärbung bei Co-Lokalisation quantifiziert werden und zeigt eine deutliche Interaktion des Aptamers II7 mit dem Rezeptor.

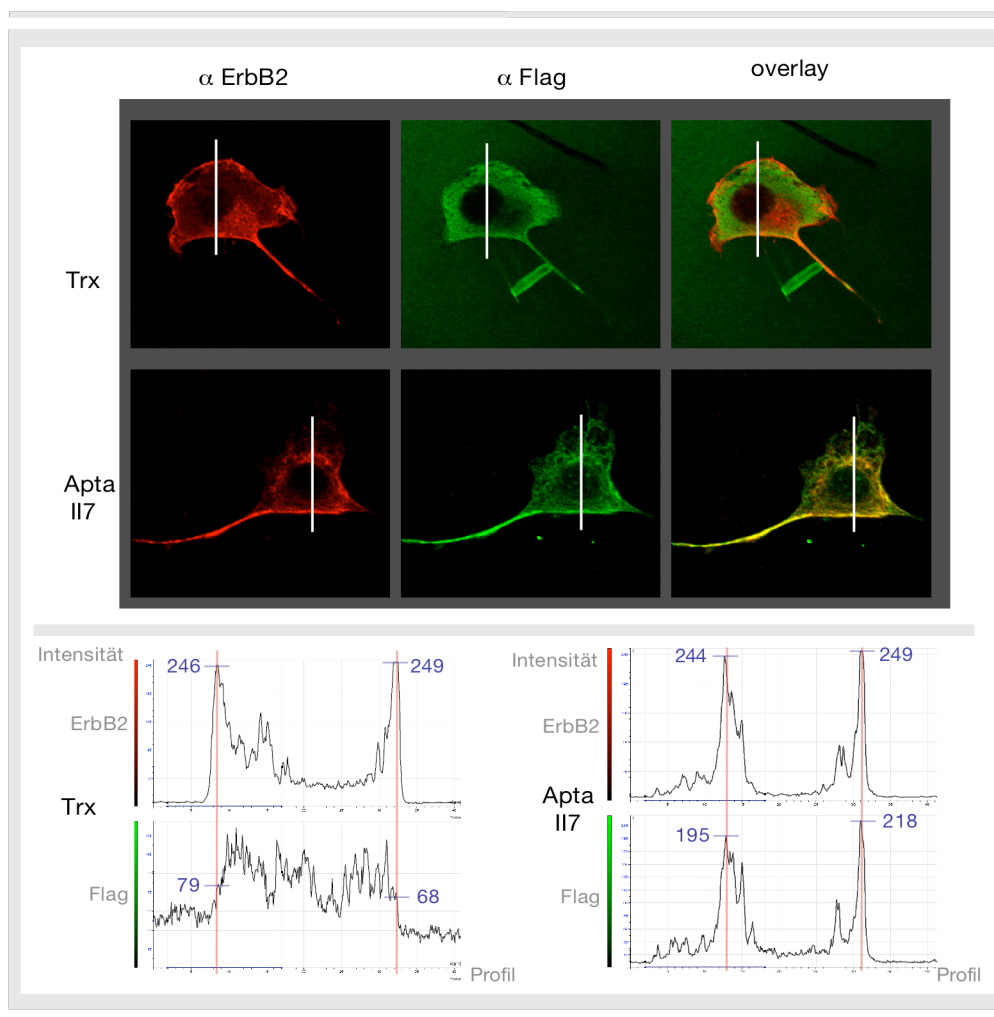


Abb. 3.38 | Co-Lokalisationsstudien im CLSM von transduzierten NIH#3.7

Die NIH#3.7 Zellen wurden 3 Stunden mit den jeweiligen Proteinen transduziert. Vor dem Fixieren der Zellen für die Immunfluoreszenz wurden die nicht-transduzierten Proteine mit 0,2 M Essigsäure in PBS von der Zelloberfläche entfernt. Der ErbB2-Rezeptor wurde mit einem spezifischen Antikörper detektiert und mittels TRITC-gekoppeltem Zweitantikörper markiert (rot). Analog wurden die Aptamere über einen Thioredoxin Antikörper detektiert und mittels FITC-gekoppeltem Zweitantikörper markiert (grün). Die Proteintransduktion erfolgte mit leeren Thioredoxin als negativ Kontrolle für die Co-Lokalisation und mit Aptamer II7. Durch Überlagerung der beiden Fluoreszenzen (overlay) lässt sich eine Interaktion der Proteine durch Gelbfärbung erkennen.

In Abb. 3.38 wurde eine weitere Proteincharge nach Aufreinigung analysiert. Die Ergebnisse (gezeigt in Abb. 3.37 und 3.38) verdeutlichen, dass die rekombinante Expression mit anschließender denaturierender Aufreinigung und Rückfaltung für das Transduktionsverfahren standardisiert angewendet werden konnte. In der Abb. 3.38 sind die Intensitätsverteilungen noch einmal deutlich hervorgehoben. Auch bei dieser Intensitätsquantifizierung wird deutlich, dass Aptamer II7 im Gegensatz zu Trx ohne Aptamer-Insert mit ErbB2 interagiert.

Die Co-Lokalisationsstudien sind essentiell, um eine Aussage über Transduktion der Aptamere in die Zelle und die darauf folgende Interaktion von ErbB2 in der Zelle treffen zu können. Ferner lässt diese Methodik eine Aussage über die Qualität der Rückfaltung zu. Bei einer

unzureichenden Rückfaltung sind stark fluoreszierende Proteinaggregate zu erkennen, die unspezifisch an Deckglas und Zelloberfläche binden und nicht durch Säurebehandlung entfernt werden können (Vgl. *Abb. 3.27* und *3.28*). Bei erfolgreicher Proteinfaltung treten diese Aggregate nicht auf und die nicht-transduzierten Proteine lassen sich nach Säurebehandlung entfernen, was in der deutlichen Rotfärbung des Rezeptors bei Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenz nach Trx-Transduktion deutlich wird.

Durch die Expression der Aptamere mit dem pFlag-Vektor und den Austausch der Cysteine ist es gelungen, die Proteine funktional aufzureinigen und rückzufalten, so dass diese in der Lage sind, mittels Proteintransduktion in eukaryotische Zellen zu gelangen, um mit ErbB2 zu interagieren.

3.5 Funktionale Analyse der isolierten Peptid-Aptamere

Eine Grundvoraussetzung für die Funktionsanalyse von potentiellen Protein-Inhibitoren in humanen Zellen ist das effiziente Einbringen der Inhibitoren in die humanen Zielzellen. Hierfür wurden die Peptid-Aptamere mit Hilfe verschiedener Transduktionsverfahren appliziert (Kap. 3.3). Für die Funktionsanalyse ist die spezifische Aktivierung des Zielproteins nach Einbringen der Inhibitoren eine weitere Voraussetzung. Auf diese Weise lässt sich die Aktivität des Zielproteins isoliert im zellulären Kontext erfassen und die Funktion der Inhibitoren analysieren. Im Fall von ErbB2 kann dieser Rezeptor nicht spezifisch aktiviert werden, weswegen verschiedene Modellsysteme verwendet werden mussten, um die Funktion der Peptid-Aptamere zu analysieren.

3.5.1 Interferenz mit ErbB2-induziertem transformierten Zellwachstum

Eines der oben genannten Modellsysteme ist die Wachstumsanalyse von ErbB2-transformierten NIH Zellen (NIH#3.7) in Weichagar. NIH 3T3 Zellen sind murine Fibroblasten, die einen nicht-transformierten Phänotyp aufweisen. Durch stabile Transfektion eines konstitutiv-aktiven ErbB2-Rezeptors werden diese Zellen transformiert, was sie zum Wachstum in Weichagar befähigt. Durch dieses Modellsystem lässt sich die Aktivität des ErbB2-Rezeptors isoliert von den anderen ErbB-Rezeptoren analysieren, die unter physiologischen Bedingungen ErbB2 durch Dimerbildung aktivieren. Wird der Rezeptor inhibiert, verlieren NIH#3.7 Zellen ihren transformierten Phänotyp, und das Wachstum im Weichagar ist nicht mehr möglich.

3.5.1.1 Interferenz durch virale Transduktion in NIH#3.7 Zellen

Für die Analyse der Rezeptor-Inhibition wurden NIH#3.7 Zellen mit lentiviralen Aptamerkonstrukten transduziert. Die Transduktionseffizienzen sind in Kap. 3.3.1 gezeigt.

Die NIH#3.7 Zellen und die parentalen NIH 3T3 als Negativkontrolle, wurden für 2 Wochen in 0,3 % Weichagar kultiviert. Durch Fluoreszenzmikroskopie wurde die Koloniengröße und Transduktionseffizienz optisch untersucht.

Wie erwartet sind die NIH 3T3 Zellen nicht in der Lage, im Weichagar Kolonien zu bilden (*Abb. 3.39*). Die NIH#3.7 Zellen waren in der Lage zu wachsen, allerdings ergaben sich in der Koloniengröße keine Unterschiede zwischen nicht-transduzierten NIH#3.7 und den Aptamer-transduzierten NIH#3.7. Als Aptamer-Konstrukte wurden hierbei die Aptamere 11 und II7 gewählt, und als Negativkontrolle wurde Trx ohne Aptamer-Insert verwendet. Die GFP-Expression diente als Kontrolle, um zu prüfen, ob die analysierten Kolonien erfolgreich transduziert wurden. Die GFP-Expression ist bei diesen Konstrukten über eine IRES mit der Expression der Aptamere verknüpft. Hierbei gilt es anzumerken, dass die GFP-Expression in den Zellen sehr schwach war und nur durch lange Belichtungszeiten (24 sek) zu beobachten waren. Um die Ergebnisse zu quantifizieren wurde eine Proliferationsanalyse der Zellen durch Zugabe von XTT durchgeführt.

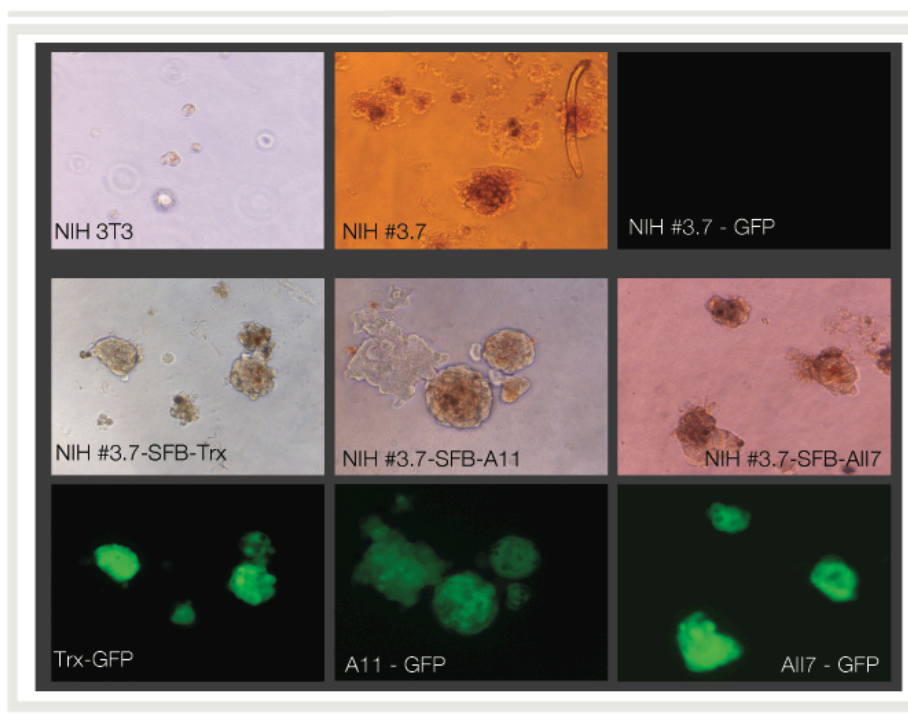


Abb. 3.39 | Wachstum im Weichagar von Aptamer-transduzierten NIH#3.7 Zellen

Für den Proliferationsnachweis wurden NIH#3.7 Zellen für 2 Wochen in 0,3 % Weichagar kultiviert, um die Koloniengröße und Transduktionseffizienz mittels Fluoreszenzmikroskop zu analysieren. Gezeigt sind Wildtyp NIH 3T3 Zellen, die kein Wachstum im Weichagar zeigten untransduzierte NIH#3.7 Zellen als Positivkontrolle, sowie lentiviral-transduzierte NIH#3.7 mit Trx als Negativkontrolle und den Aptameren 11 und II7. Durch die mikroskopische Analyse konnte kein Unterschied in der Größe der Kolonien detektiert werden, wobei durch die GFP-Fluoreszenz die Transduktion der Zellen kontrolliert wurde.

Die Proliferationsanalyse der NIH#3.7 Zellen im Weichagar ergab ein minimales Wachstum der untransformierten NIH 3T3 Zellen (16%). Die untransduzierten NIH#3.7 Zellen wurden als 100 % Wachstum definiert. Die Aptamer-transduzierten NIH#3.7 Zellen zeigten bis zu 85 % reduzierte Proliferationswerte (Aptamer II7), wobei diese auch bei der Negtivkontrolle (Trx = 84 %) zu beobachten waren und als unspezifische Reduktion durch die virale Transduktion erklärt werden können.

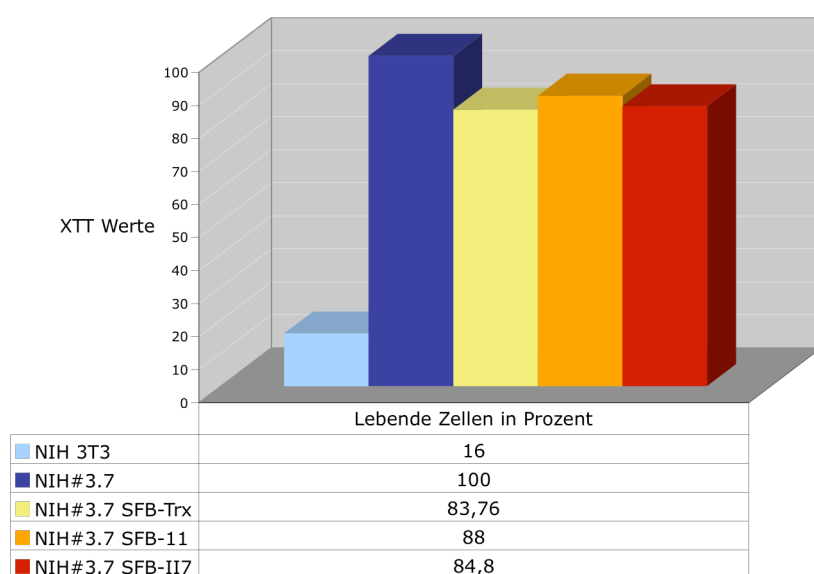


Abb. 3.40 | Proliferationsanalyse der Weichagar-Kolonien durch XTT

Die XTT Werte ergaben ein minimales Wachstum von NIH 3T3 (16 %), das Wachstum der NIH#3.7 Zellen wurde als 100 % definiert. Es konnte ein reduziertes Wachstum bei den Aptameren beobachtet werden (88 % für 11 und 85 % für II7), allerdings war diese Reduktion auch bei Trx (84 %) zu beobachten

Die lentivirale Transduktion der Aptamerkonstrukte in NIH#3.7 Zellen hatte keinen Einfluss auf die Größe der Kolonien. Der „optische Eindruck“ konnte durch XTT-Proliferationsversuche quantifiziert werden, in denen keine spezifische Reduktion der Proliferation zu erkennen war. Eine niedrige Expression der Aptamer-Konstrukte könnte hierfür eine mögliche Ursache sein.

3.5.1.2 Tet-induzierbare Aptamer Expression in NIH#3.7 Zellen

Die ineffiziente Expression der Aptamer-Konstrukte sollte durch stabile Transfektion der Aptamere in einem Tet-induzierbaren System verbessert werden. Dieses induzierbare System hätte den weiteren Vorteil die Aptamere in NIH#3.7 Zellen in einem Tiermodell testen zu können, da NIH#3.7 Zellen in der Lage sind, in Nacktmäusen Tumore zu bilden.

In *Abb. 3.41* ist das Tet-on System (Clontech) schematisch dargestellt. Im ersten Schritt wird ein Expressionsplasmid für den reversen Transaktivator (rTA) stabil in die NIH#3.7 Zellen transfiziert. Der rTA wird als Fusionsprotein mit VP16 konstitutiv von einem CMV Promotor (P_{CMV}) exprimiert. Der rTA ist in der Lage an spezifische Tet-Response Elemente (Tet-RE) zu binden und über die VP16 Untereinheit einen CMV-Minimalpromotor (P_{minCMV}) zu aktivieren. Die Bindung des rTA an die Tet-RE erfolgt nur durch die Zugabe von Doxocyclin (Dox) bzw. Tetracyclin (Tet), wodurch nachgeschaltete Zielgene reversibel an- und ausgeschaltet werden können.

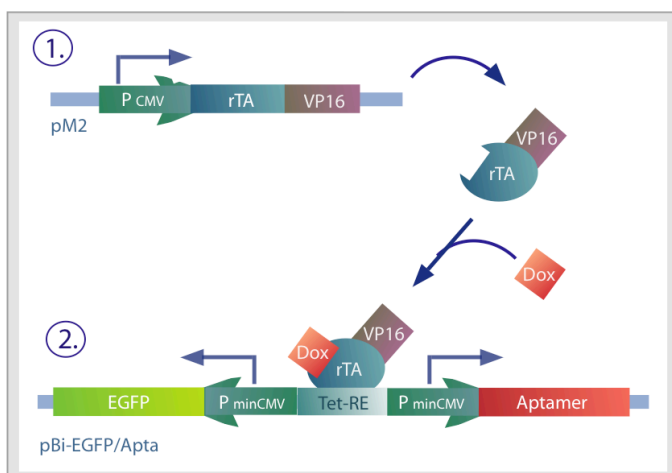


Abb. 3.41 | Schematische Darstellung des Tet-on Systems

Zwei Stufen der stabilen, induzierbaren Expression der Aptamere; im ersten Schritt wird der rTA als VP16 Fusionsprotein in die Zelle transfiziert und konstitutiv exprimiert. Der zweite Schritt besteht in der stabilen Transfektion der Aptamere in einem bicistronischen Vektor mit EGFP als Reporterprotein. Durch Zugabe von Doxocyclin wird der rTA aktiviert und löst durch VP16 die Transkription der Aptamere und EGFP aus.

Der zweite Schritt besteht in der Co-Transfektion von pBi-EGFP Vektoren. Hierbei handelt es sich um bicistronische Vektoren mit P_{minCMV} unter der Kontrolle von Tet-RE. Durch den bicistronischen Charakter der Vektoren, wird durch Doxocyclin-Induktion sowohl EGFP, als auch das zu untersuchende Zielgen im gleichen Verhältnis exprimiert.

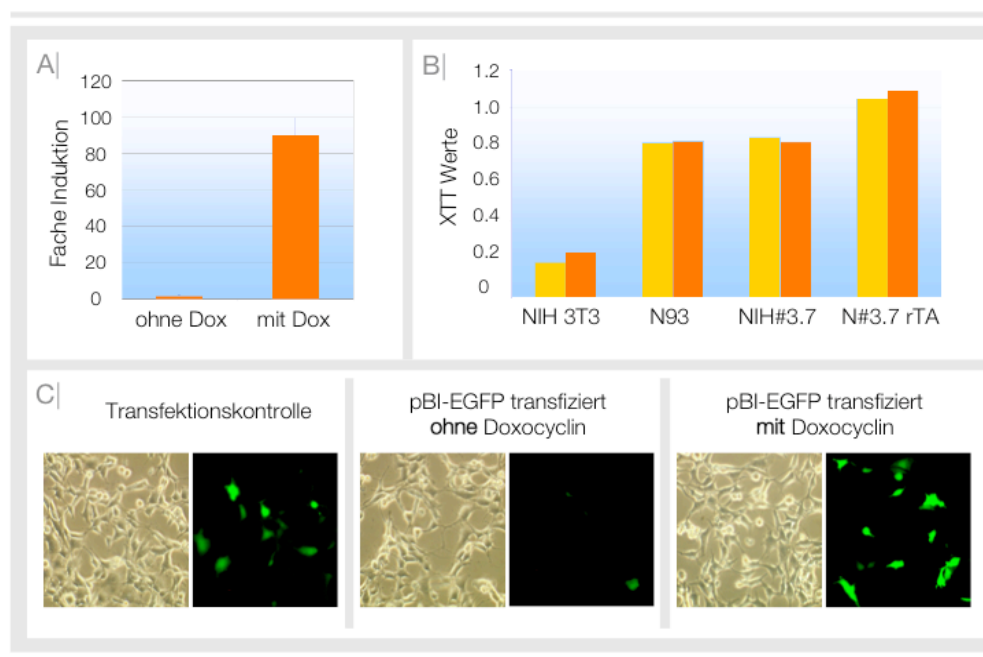


Abb. 3.42 | Induktionskontrolle von NIH#3.7 rTA Zellen und ihr Wachstumsverhalten in Weichagar

- A) Der Luciferase-Versuch diente der Expressionskontrolle der Dox-induzierten Luciferase-Expression. Mit den rTA-transfizierten NIH#3.7 konnte eine 80-fache Induktion der Luciferase-Aktivität nach Dox-Zugabe gemessen werden
- B) Weichagar-Versuch mit NIH 3T3 Zellen als Negativkontrolle, IGF-1R transformierte N93 und NIH#3.7 Zellen als Positivkontrolle und den stabil transfizierten NIH#3.7 rTA Zellen. durch die stabile rTA-Expression konnte kein Unterschied im Wachstum zu Wildtyp NIH#3.7 gezeigt werden.
- C) Optische Kontrolle der Induzierbarkeit im Fluoreszenzmikroskop nach transienter Transfektion der pBi-EGFP Plasmide.

Nach der ersten stabilen Transfektion des rTA wurden die NIH#3.7 rTA Zellen auf ihre Fähigkeit den rTA zu exprimieren und Reportergene nach Dox-Zugabe zu induzieren überprüft. Hierfür wurde ein Dox-abhängiges Luciferase Reporterkonstrukt mit einem β -Galaktosidase Expressionsplasmid transient co-transfiziert. In einem Luciferase-Versuch wurde so die Dox-induzierte Luciferase-Expression bestimmt. Die Expression der β -Galaktosidase wurde in einem β -Galaktosidase Versuch nachgewiesen und diente als Transfektionskontrolle, mit welcher die Luciferase-Werte abgeglichen wurden.

Wie in der *Abb. 3.42 A* zu erkennen ist, zeigen NIH#3.7 eine bis zu 80-fache Induktion der Proteinexpression nach Dox-Zugabe, wobei sich die Proteinexpression sich über einen Zeitraum von mehreren Tagen zu beobachten ließ. Die Expression des rTAs hatte keinen Einfluss auf das Wachstum dieser Zellen in Weichagar, es war, im Vergleich zu untransfizierten NIH#3.7 sogar stärker ausgeprägt (*Abb. 3.42 B*). Als weitere Positivkontrolle dienten in diesem Versuch IGF-1R-transformierte N93 Zellen. Als Negativkontrolle wurden Wildtyp NIH 3T3 Zellen verwendet, die nicht die Fähigkeit haben in Weich-Agar zu wachsen.

In *Abb. 3.42 C* wurden die leeren bicistronischen pBi-EGFP Vektoren transfiziert. Durch die transiente Transfektion der Konstrukte war eine geringe Expression von EGFP ohne Dox-Zugabe detektierbar. Nach Dox-Zugabe wurde die EGFP-Expression jedoch stark induziert.

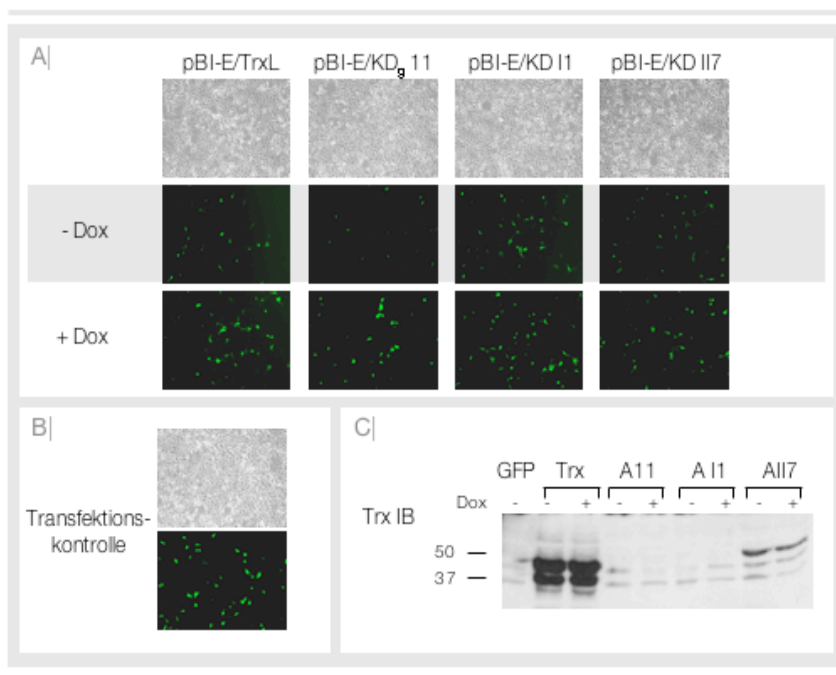


Abb. 3.43 | **Induktionskontrolle und Aptamer-Expression in NIH#3.7 rTA Zellen nach Dox-Zugabe**

A | Die NIH#3.7 rTA Zellen wurden mit verschiedenen Aptamerkonstrukten transfiziert und ohne bzw. mit Dox behandelt. Bei Trx und Aptamer KD_g 11 lässt sich eine Induzierbarkeit der EGFP-Expression nach Dox-Zugabe erkennen, bei Aptamer KD I1 und KD I17 ist dies weniger deutlich zu sehen.

B | Transfektionskontrolle mit konstitutiv exprimiertem EGFP;

C | Thioredoxin Western Blot der verschiedenen Aptamer-transfizierten NIH#3.7 rTA; Expression von Trx und Aptamer I17 sind detektierbar, die Expression der Aptamere I1 und 11 lassen sich nicht nachweisen. Ferner ist im Western Blot keine Induktion der Expression erkennbar

Als Vorversuche für die zweite stabile Transfektion wurden die pBi-EGFP Vektoren in NIH#3.7 rTA Zellen transfiziert und die Induzierbarkeit der Expression überprüft.

Die *Abb. 3.43 A* zeigt mit unterschiedlichen Aptamerkonstrukten transfizierte NIH#3.7 Zellen und die Induktion der EGFP-Expression durch Dox-Zugabe. Alle Zellen zeigen eine EGFP-Expression nach Dox-Zugabe, besitzen aber durch die transiente Transfektion der Konstrukte eine EGFP-Expression im nicht induzierten Zustand. Diese Hintergrundexpression des EGFP sollte nach der stabilen Transfektion durch die Analyse verschiedener Klone reduziert werden.

In *Abb. 3.43 B* ist die Transfektionseffizienz der konstitutiv exprimiertem EGFP dargestellt, welche sich nicht von der Effizienz der pBi-Vektoren unterscheidet. Daraus lässt sich schließen, dass der rTA über den CMV-Minimalpromotor die Zielgenexpression in gleichem Maße aktivieren kann, wie der CMV-Promotor des konstitutiv exprimierten EGFP.

In *Abb. 3.43 C* ist ein Western Blot der Aptamerexpression der transfizierten Zellen gezeigt. Hierbei ließ sich eine starke Expression für Thioredoxin und Aptamer II7 erkennen, allerdings nur eine sehr schwache Expression der beiden anderen Aptamere.

Die Induzierbarkeit der Konstrukte konnte nur im Fall von Trx und Aptamer KD₉ 11 optisch durch EGFP-Expression eindeutig gezeigt werden. Es ist jedoch bekannt, dass im Tet-System die Induzierbarkeit bei transienten Transfektionen nicht generell sichergestellt werden kann. Die Induzierbarkeit kann aber nach stabiler Transfektion der induzierbaren pBi-Plasmide durch die Analyse verschiedener Klone erreicht werden. Ferner konnten über das wesentlich sensitivere und quantitativere System des Luciferase-Versuchs, die Induzierbarkeit der NIH#3.7 rTA-Zellen deutlich unter Beweis gestellt werden.

Schon bei den transienten Transfektionen zeigte sich allerdings, dass die NIH#3.7 rTA Zellen wesentlich schwieriger zu transfizieren waren als NIH#3.7 Wildtyp Zellen. Auch durch die Verwendung unterschiedlicher Transfektionsmethoden ließ sich die geringe Transfektionseffizienz nicht steigern. Es wurden drei Klone die mit Aptamer II7 transfiziert wurden, isoliert und auf Induktion der EGFP und Aptamer Expression zu überprüft. Die drei isolierten Klone zeigten eine äußerst verlangsamte Proliferation und ließen sich nicht konfluent kultivieren. Die Zellen besaßen im nicht-induzierten Zustand eine geringe EGFP Expression, die durch Dox nicht gesteigert werden konnte. So konnte auch die Aptamer-Expression in diesen Zellen nicht detektiert und durch Dox-Zugabe nicht induziert werden. Trotz mehrmaliger Wiederholung dieses Versuchs gelang es nicht, Zellen zu isolieren, die induzierbar die Zielgene exprimieren.

Es wurde mit Hilfe der NIH#3.7 Zellen versucht den ErbB2-transformierten Phänotyp der Zellen durch Aptamer-Expression zu revertieren. Die Reversion des Phänotyps lässt sich in Weichagar-Experimenten und im Maus-Tumormodell untersuchen. Für beide Versuchsmodelle ist eine stabile Aptamer-Expression über mehrere Wochen notwendig. Die stabile Expression der Aptamere ist nur über die virale Transduktion bzw. stabile Transfektion möglich. Beide

Verfahren wurden untersucht, konnten aber wegen geringer Aptamer-Expressionspegel nicht zur Evaluation der Aptamer-Funktion verwendet werden. So wurden alternative Versuchmodelle verwendet, um die Funktion der Aptamere evaluieren zu können.

3.5.2 AKT-Phosphorylierungsversuch

Zur Evaluation der Aptamer-Funktion wurde ein weiteres Modellsystem verwendet, um die Signaleigenschaften des ErbB2-Rezeptors im zellulären Kontext isoliert zu betrachten.

Der ErbB2-Rezeptor besitzt keinen Liganden und befindet sich stets in einer offenen Konformation. Er benötigt jedoch für die Aktivierung der Signalkaskaden einen Heterodimerpartner, welcher erst durch einen spezifischen Liganden in die offene Konformation übergehen kann. Dieser Heterodimerpartner ist allerdings im Fall des EGFR und ErbB4, in der Lage Homodimere zu bilden, die ebenfalls Signale in die Zelle weiterleiten. Um die spezifische Signaltransduktion des ErbB2-Rezeptors untersuchen zu können, wurde sich die Eigenschaft eines speziellen Heterodimerpaares zu Nutze gemacht.

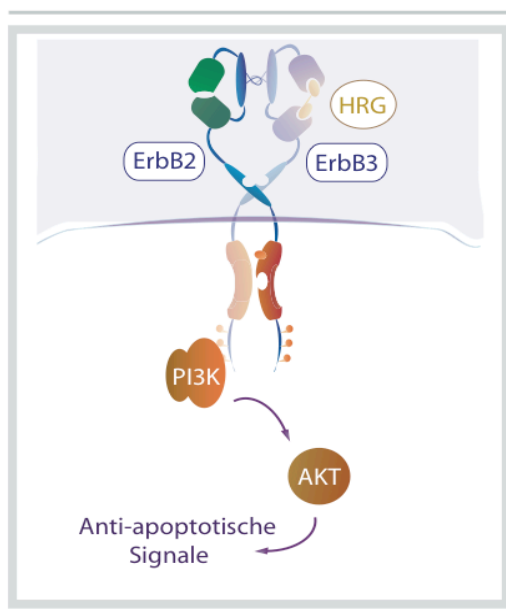


Abb. 3.44 | **ErbB2/ErbB3-Heterodimer induzierte AKT-Aktivierung**

Durch Heregulin-Zugabe (HRG) wird der ErbB3-Rezeptor aktiviert und kann mit ErbB2 Heterodimere bilden. ErbB3 besitzt eine inaktivierte Kinasedomäne. Somit resultiert die zu beobachtende Signalaktivität des Dimerpaares durch die aktive ErbB2-Tyrosinkinase. Der am stärksten aktivierte Signalweg von ErbB2/ErbB3 Heterodimeren ist der PI3K/AKT-Signalweg. PI3K wird direkt durch Phospho-tyrosinbindung am ErbB3-Rezeptor aktiviert, was zur Aktivierung von PKB/AKT und u.a. durch Phosphorylierung von Bad zu anti-apoptotischen Signalen in der Zelle führt.

Der ErbB3-Rezeptor ist der bevorzugte Heterodimerpartner von ErbB2 und lässt sich spezifisch von Heregulin (HRG) aktivieren. Die Besonderheit des ErbB3-Rezeptors in der ErbB-Rezeptorfamilie ist seine inaktive Tyrosinkinase. Somit können die Signale, welche nach HRG-Induktion in die Zelle weitergegeben werden, nur von der aktiven Kinase des ErbB2-Rezeptors stammen. Der ErbB3-Rezeptor besitzt sechs verschiedene Phosphorylierungsstellen über welche PI3K (Phospho-Isonitol-3-Phosphat Kinase) binden und aktiviert werden kann. Diese aktiviert wiederum AKT, was zu anti-apoptotischen Signalen in der Zelle führt. Aufgrund der starken Induktion dieses Signalweges durch HRG, lässt sich anhand der AKT-Phosphorylierung die Wirkung von ErbB2-Inhibitoren testen.

3.5.2.1 AKT-Inhibition nach Transfektion der Petid-Aptamere

Für die Untersuchung der AKT-Inhibition wurden MCF7 Zellen verwendet, die sowohl ErbB2 als auch ErbB3 exprimieren und eine deutliche AKT-Phosphorylierung nach 10 minütiger HRG-1 β Induktion zeigten. Zunächst wurden die Zellen transient mit pRC-CMV/VP22-Aptamer Vektoren transfiziert.

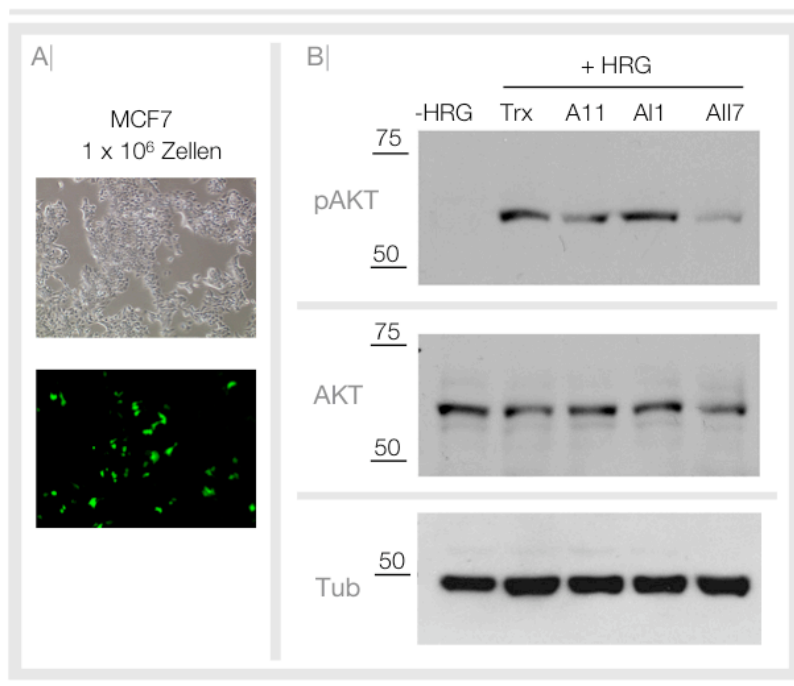


Abb. 3.45 | Reduktion der AKT Phosphorylierung nach Aptamer Transfektion

A| Es wurden Transfektionseffizienzen von 30 % nach Lipofectamin-Transfektion mit GFP-Kontrollplasmid detektiert. B| Western Blot Analyse der phospho-AKT- und gesamt-AKT-Spiegel nach Aptamer-Transfektion, kultivieren der Zellen über Nacht ohne Serum und ErbB2/ErbB3-Induktion mit HRG für 15 min. Trx ohne Aptamer-Insert und Apta KD 11 zeigten keinen Effekt auf die AKT Phosphorylierung, für Apta KD_g 11 hingegen war eine moderate und für Apta KD 117 war eine starke Reduzierung von pAKT zu beobachten.

Die in *Abb. 3.45* dargestellten Western Blot Analysen zeigten deutlich, dass Aptamer KD_g 11 und Aptamer KD 117 in der Lage sind, die durch HRG-1 β induzierte AKT-Phosphorylierung zu reduzieren. Die Reduktion der AKT-Phosphorylierung war bei Aptamer 11 schwächer, bei Aptamer 117 stärker ausgeprägt. Als Ladekontrolle dienten die Expressionsspiegel von AKT und Tubulin in der Zelle. Die Transfektionseffizienzen zeigten, dass dieser Effekt auch bei relativ niedrigen Effizienzen zu erkennen ist und es möglich sein sollte, durch größere Transfektionseffizienzen einen stärkeren inhibitorischen Effekt zu erreichen.

3.5.2.2 AKT-Inhibition durch lentivirale Transduktion

Die durch transiente Transfektion gezeigte Reduzierung der AKT-Phosphorylierung sollte durch Verwendung von Lentiviren, die MCF7 Zellen mit 89-93 Prozent Effizienz transduzierten, verifiziert werden. Der Versuchsansatz erfolgte analog zur transienten Transfektion durch Aushungern der Zellen über Nacht und einer nachfolgenden 15 min HRG-Induktion. Die Induktion der Signaltransduktion wurde durch eiskaltes PBS abgestoppt.

Im Western Blot (*Abb. 3.46*) konnte die AKT-Phosphorylierung nach HRG-Induktion durch Verwendung des ErbB2-Tyrosinkinase-Inhibitors PKI 166 (1 μ M Endkonz.; Novartis) bis zu ihrem Ausgangswert reduziert werden (K-: ohne HRG-1 β). Dies konnte durch die lentivirale Transduktion der Zellen mit Aptamer II7 ebenfalls erreicht werden. Die lentivirale Transduktion von Trx ohne Aptamer und Aptamer 11 hingegen hatte nur geringen Einfluss auf die AKT-Phosphorylierung im Vergleich zur Positivkontrolle (K+). Mit einem Gesamt-AKT und einem Tubulin Antikörper konnte sichergestellt werden, dass gleiche Proteinmengen geladen wurden.

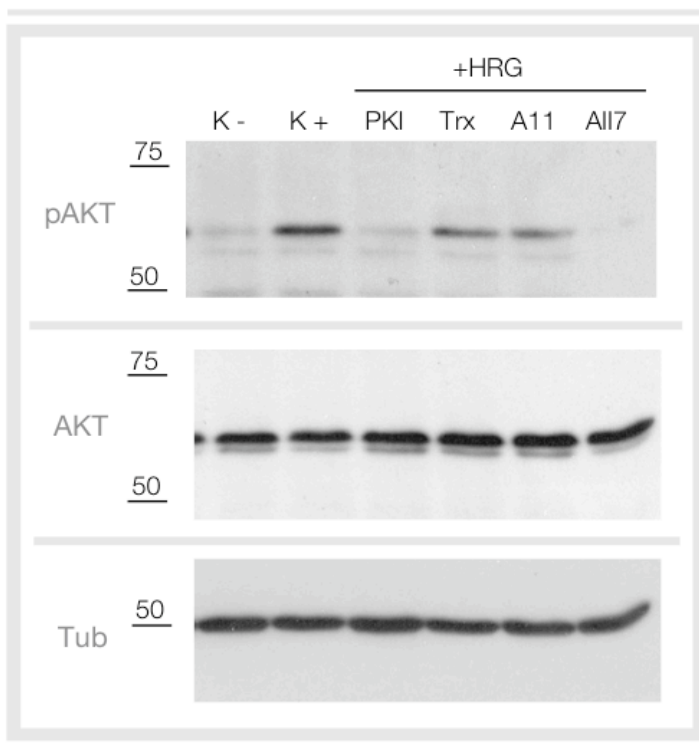


Abb. 3.46 | **Western Blot zur Analyse der AKT-Phosphorylierung nach lentiviraler Aptamertransduktion**

MCF7 Zellen wurden mit Viren, die Thioredoxin, Aptamer 11 bzw. Aptamer II7 exprimieren, transduziert und nach Aushungern über Nacht mit HRG für 15 min induziert. Gezeigt sind die AKT Phosphorylierung (pAKT), der Gesamtspiegel an AKT und der Tubulin-Spiegel im Zellextrakt; Als Negativkontrolle dienen nicht-induzierte MCF7 (K-); als Positivkontrolle für die Induktion dienen HRG-induzierte MCF7 Wildtyp Zellen (K+); als Positivkontrolle für die pAKT Inhibition wurde der ErbB2-Inhibitor PKI 166 (Novartis) verwendet; pAKT-Proteinlevel wurden mit Gesamt-AKT und Tubulin Expressionsspiegeln abgeglichen.

Im Folgenden wurde die Reduktion der AKT-Phosphorylierung durch den Einsatz von rekombinant exprimierten Aptameren durch Proteintransduktion überprüft.

3.5.2.3 AKT-Inhibition durch Proteintransduktion

Durch Verwendung der aufgereinigten Aptamer-Fusionsproteine (Kap. 3.3.2.2) sollten die Ergebnisse der transienten Transfektions- und lentiviralen Transduktionsversuche bestätigt werden. Mit Hilfe der Protein-Transduktion (PT) sollte die Funktionalität der aufgereinigten Aptamerproteinen im AKT-Phosphorylierungsversuch getestet werden.

Die verwendeten MCF-7 Zellen wurden über Nacht ohne Serum kultiviert und für 3 h mit aufgereinigten Aptameren und Chloroquin transduziert. Die spezifische Induktion von ErbB2/ErbB3-Heterodimeren erfolgte für 15 min mit HRG-1 β .

Die Western Blot Analyse in *Abb. 3.47 C* | zeigt die in die Zelle transduzierten Aptamere. Aptamer II7 ist ein 40mer Peptid in Trx und befindet sich aus diesem Grund über Trx und Aptamer 11. *Abb. 3.47 A* | zeigt die Zunahme der AKT-Phosphorylierung nach HRG-Induktion.

Als Positivkontrolle für die ErbB2-Inhibition diente der ErbB2-Inhibitor PKI-166 (1 μ M Endkonz.; Novartis), der vollständig die AKT-Phosphorylierung hemmt. Die Transduktion von Trx in unterschiedlichen Konzentrationen besitzt keinen Einfluss auf die AKT-Phosphorylierung. Allerdings ist deutlich eine konzentrationsabhängige Abnahme der AKT-Phosphorylierung nach Transduktion von Aptamer KD₉ 11 und KD II7 zuerkennen, wobei die Effekte bei KD II7 stärker ausgeprägt sind. Allerdings sind nach der Aptamertransduktion etwas niedrigere Gesamt-AKT Spiegel (Abb. 3.47 B |) zu erkennen.

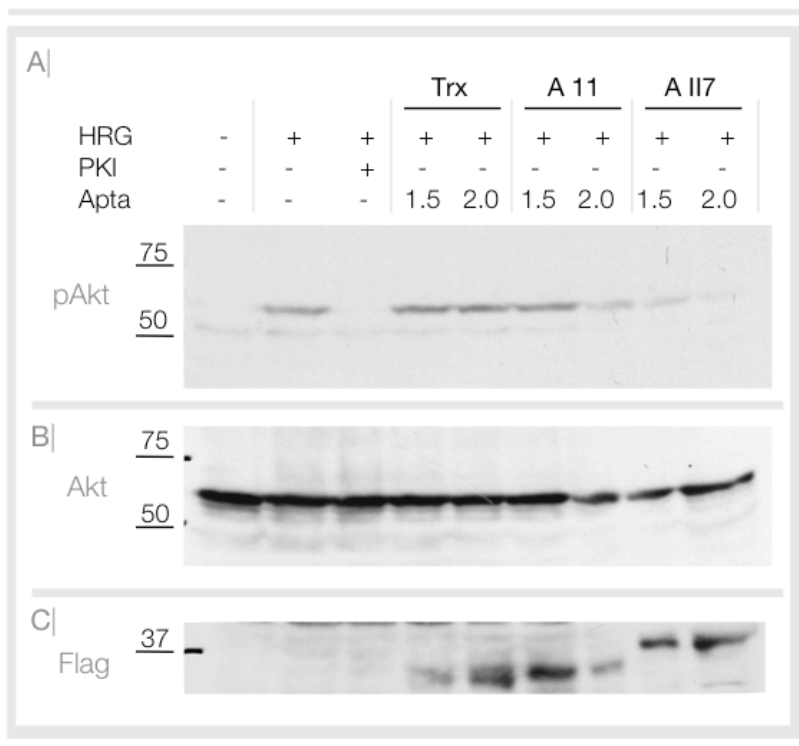


Abb. 3.47 | **AKT-Phosphorylierung nach Aptamer-PT**

A | pAkt WB von MCF-7 Zellen, die über Nacht ohne Serum gehalten wurden, um sie nach 3 h PT für 15 min mit HRG zu stimulieren. Es wurden Aptamer-Konzentrationen von 1,5 und 2 μ M verwendet. Als Positivkontrolle wurden nicht transduzierte und PKI-166 behandelte MCF-7 eingesetzt. B | WB mit Akt als Ladekontrolle für die Akt Phosphorylierung. C | WB mit Flag Antikörper, um die Transduktion der Aptamere nachzuweisen.

Durch verschiedene Aptamer-Applikationen konnte konsistent eine Reduktion der AKT-Phosphorylierung nach spezifischer ErbB2/ErbB3-Aktivierung nachgewiesen werden.

Die Induktion der PI3K/AKT-Signalkaskade durch den ErbB2-Rezeptor ist eng mit Chemoresistenz bei ErbB2-exprimierenden Zellen verknüpft und kann durch Inhibition des Rezeptors aufgehoben werden. In den folgenden Versuchen wurde untersucht, ob durch die Aptamere KD₉ 11 und KDII 7 induzierte Reduktion der AKT-Phosphorylierung chemoresistente Zellen für cytotoxische Therapeutika sensitiviert werden können.

3.5.3 Zytotoxizitätsversuche in humanen Krebszellen

Durch die Reduktion der AKT-Phosphorylierung nach Aptamer-Applikation besteht die Möglichkeit, dass sich Aptamer-behandelte Zellen gegenüber Apoptose Induktion sensitivieren lassen. In einem Versuchsmodell mit Hilfe von MCF7 her2 Zellen sollte diese Vermutung bestätigt werden. MCF7 Zellen sind sensitiv gegenüber Zytostatika Behandlung, wie Taxol oder

Doxorubicin. Knuefermann *et al.* ⁴⁵ konnten zeigen, dass durch die stabile Transfektion und Überexpression des ErbB2-Rezeptors in diesen Zellen eine erhöhte Chemoresistenz der Zellen zu beobachten ist. Diese induzierte Chemoresistenz ist mit einer erhöhten Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges verbunden. In dieser Arbeit wurden die MCF7 Zellen aus der Veröffentlichung verwendet, die mit einem Vektor für die ErbB2-Expression (MCF7 her2) und dem leeren Vektor (MCF7 neo) stabil transfiziert worden waren (erhalten von ⁴⁵).

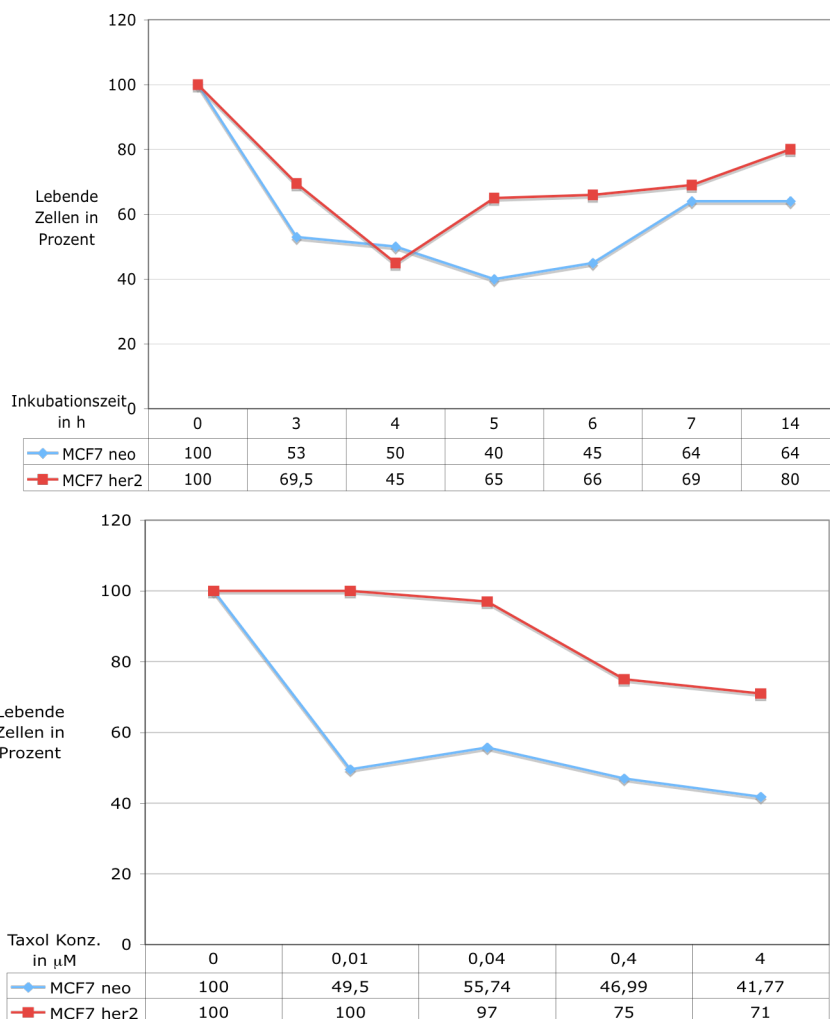
In diesem Modellsystem ließ sich testen, ob die reduzierte AKT-Phosphorylierung nach Aptamer Applikation zu einer Sensitivierung von MCF7 her2 Zellen führt. Hierfür wurden die Aptamere sowohl über Lentiviren als auch durch Proteintransduktion in MCF7 neo und MCF7 her2 Zellen eingebracht.

3.5.3.1 Analyse der Chemoresistenz von MCF7 her2 Zellen

In einem Zytotoxizitätsversuch wurden MCF7 neo (M7n) und MCF7 her2 (M7h2) Zellen mit verschiedenen Taxol-Konzentrationen in Aktivkohle-gereinigtem DMEM Medium behandelt. Die Aktivkohle filtert Steroide aus dem Medium. MCF7 Zellen zeigen eine Reaktion auf Steroidbehandlung wie Östrogen, was u.a. zur Chemoresistenz dieser Zellen beiträgt. Diese Effekte könnten die Analyse der ErbB2-vermittelten Chemoresistenz beeinträchtigen. Die Zellen wurden nach der Taxol-Behandlung für 3 Tage in DMEM Medium kultiviert und mit Hilfe eines XTT Versuchs die Anzahl an lebenden Zellen bestimmt.

Die M7n bzw. M7h2 Zellen wurden in verschiedenen Zeitintervallen (3-14 h) mit 4 μ M Taxol behandelt (*Abb. 3.48 oberes Diagramm*). Bei 5 h Taxol-Behandlung zeigte sich der größte Unterschied an lebenden Zellen zwischen ErbB2-transfizierten (65 %) und Vektor-transfizierten MCF7 (40 %). Die lebenden Zellen wurden mit Hilfe eines XTT-Versuchs 3 Tage nach Taxol-Inkubation bestimmt. Der Wert der M7h2-Zellen bei 4 h passte nicht in den Kurvenverlauf, so dass angenommen wurde, dass es sich um einen Fehler in der Versuchsdurchführung handelte. Bei längeren Inkubationszeiten erhöhte sich die Anzahl an lebenden Zellen nachdem sie bei 5 h ein Minimum durchschritten hatte. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass sich die Zellen während der Taxol-Behandlung in Aktivkohle-gereinigtem DMEM Medium befinden. Dieses Medium ist nicht optimal für die Proliferation der Zellen, welche für die Taxol-induzierte Apoptose essentiell ist.

Im Folgenden wurden die beiden Zelllinien mit unterschiedlichen Taxol-Konzentrationen (0,01; 0,04; 0,4; 4 μ M) für 5 h inkubiert (*Abb. 3.48 unteres Diagramm*). Diese Taxol-Konzentrationen wurden im gleichen Bereich in der Veröffentlichung verwendet und auch in dieser Arbeit für die weiteren Versuche eingesetzt.



3.5.3.2 Sensitivierung von Taxol-resistenten MCF7 her2 Zellen durch lentivirale Aptamer-Transduktion

Die M7n und M7h2 Zellen wurden für den Zytotoxizitätsversuch mit Trx, Aptamer KD₉ 11 und KD II7 lentiviral transduziert, wobei Transduktionseffizienzen von 67-81 % bei M7n und 93-97 % bei M7h2 (Kap. 3.3.1.1) erreicht wurden.

Der Zytotoxizitätsversuch wurde wie in Kap. 3.5.3.1 beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen für 5 h mit verschiedenen Taxol-Konzentrationen (0,01; 0,04; 0,4; 4 μM) behandelt wurden. Die Taxol-behandelten M7h2 WT Zellen (w/o) wiesen nur eine geringe Sensitivität gegenüber steigenden Taxolkonzentrationen auf (Reduktion von 100 % auf 76,8 % bei 4 μM Taxol in *Abb. 3.49*). Der verwendete ErbB2-Inhibitor (1 μM PKI 166) zeigte in diesem Versuchsansatz eine geringe Taxol Sensitivierung. Dies kann mit der Versuchsdurchführung erklärt werden, da der Inhibitor parallel zur Taxol Therapie eingesetzt wurde und eine Vor-Inkubation des Inhibitors eine stärkere Sensitivierung zeigen könnte. Dies wurde in den folgenden Versuchen untersucht.

Trx-transduzierte M7h2 Zellen zeigten trotz hoher Trx Expressionslevel (siehe Kap. 3.3.1.1) nur eine geringe Sensitivierung bei Taxol Inkubation (Reduktion von 100% auf 66,3 % bei 4 μM Taxol). Die Transduktion des Aptamers 11 führte zu einer moderaten Sensitivierung durch Taxol (von 100 % auf 50 % bei 4 μM Taxol), wobei dieses Aptamer nur schwach an den Rezeptor bindet und dadurch eine starke Sensitivierung der Zellen unwahrscheinlich macht. Die gezeigte Inhibition der AKT-Phosphorylierung durch Aptamer II7, führte hingegen dazu, dass M7h2 Zellen sensitiv auf eine Taxol Behandlung reagieren und die Apoptose in einem überwiegenden Teil der Zellen induziert wird (von 100% auf 39 % bei 4 μM Taxol). Somit konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der AKT-Phosphorylierung einen direkten Einfluss auf ErbB2-vermittelte Inhibition der Apoptose-Induktion durch Chemotherapeutika besitzt.

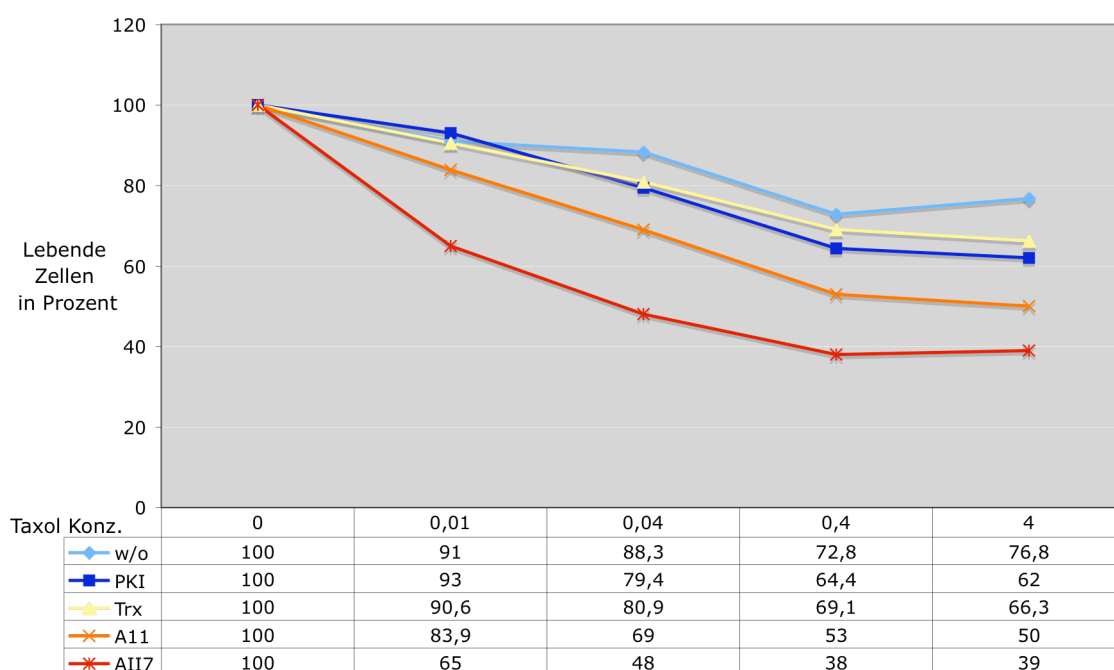


Abb. 3.49 | Zytotoxizitätsversuch mit lentiviral transduzierten MCF7 her2

MCF7 her2 Zellen wurden mit unterschiedlichen Taxol-Konzentrationen (0,01 - 4 μM) behandelt. Zusätzlich zu nicht-transduzierten Zellen (w/o) wurden auch Trx, A12.1 und AII2 Zellen in diesem Versuch verwendet. Die Taxol-Inkubation erfolgte für 5 h in AKG-DMEM Medium. Nach 3 Tagen der Proliferation wurde die Anzahl der überlebenden Zellen mit einem XTT-Versuch bestimmt.

Um unspezifische Effekte der Lentiviren bzw. Aptamere auf MCF7 Zellen auszuschließen, wurden MCF7 neo Zellen in einem Kontrollversuch mit steigenden Taxol-Konzentrationen behandelt (Abb. 3.50). Die Zellen gleichen phänotypisch Wildtyp MCF7 und weisen auch eine vergleichbare Taxol-Sensitivität auf.

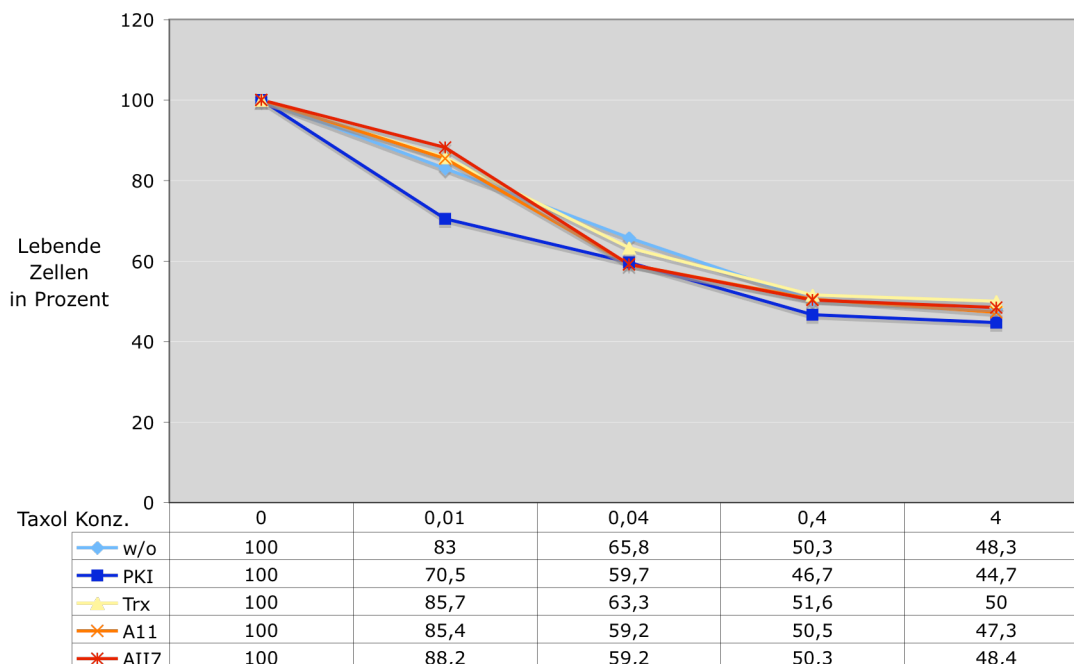


Abb. 3.50 | Zytotoxizitätsversuch mit lentiviral transduzierten MCF7 neo

MCF7 neo Zellen wurden mit steigenden Taxol-Konzentrationen (0,01 - 4 μ M) behandelt. Zusätzlich zu nicht-transduzierten Zellen (w/o) wurden auch Trx, A11 und AII7 Zellen in diesem Versuch verwendet. Die Taxol-Inkubation erfolgte für 5 h in AKG-DMEM Medium; die Zahl an lebenden Zellen wurden nach 3 Tagen Proliferation mit Hilfe eines XTT-Versuchs bestimmt

Die hier verwendeten MCF7 neo Zellen zeigten keine Unterschiede in der Taxol-Sensitivität im Vergleich zu den Aptamer transduzierten Zellen (w/o: 48 %, PKI: 44,7 %, Trx: 50 %, A12.1: 47 %, AII2: 48,4 % bei 4 μ M Taxol). Auch der PKI 166 Inhibitor zeigte keine Effekte. Durch die Inhibition des ErbB2-Rezeptors in MCF7 neo Zellen ließ sich deren Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika nicht weiter steigern. Dies bedeutet auch, dass keine unspezifischen Effekte von Lentiviren bzw. Aptamere in MCF7 Zellen ausgelöst wurden. Diese Aussage wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass Aptamer-transduzierte bzw. nicht-transduzierten MCF7 her2 Zellen nach 3 Tagen Wachstum nur geringe Differenzen in den XTT Werten der unbehandelten Zellen zeigten. Dies ließ darauf schließen, dass die Transduktion der Aptamere keinen Einfluss auf das generelle Wachstumsverhalten der Zellen hatte.

Die Überexpression des ErbB2 Rezeptors in Taxol-sensitiven MCF7 Zellen vermittelt eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika. Diese Resistenz wird über den PI3K/AKT-Signalweg induziert und kann durch die lentivirale Transduktion der Aptamere 11 und II7 ErbB2-spezifisch inhibiert werden kann. Die Aptamere zeigten hierbei keine unspezifischen zytotoxischen Effekte bei MCF7 Wildtyp Zellen, bzw. bei untransduzierten MCF7 her2 Zellen.

Die hier beschriebenen Versuche wurden mit lentiviral-tranduzierten Aptameren durchgeführt. Der gleiche Versuchsablauf wurde mit aufgereinigten Aptameren wiederholt, um die Effekte der rekombinanten Proteine zu analysieren.

3.5.3.3 Sensitivierung von Taxol-resistenten MCF7 her2 Zellen durch Aptamer-Proteintransduktion

MCF7 neo/her2 Zellen wurden vor Taxol Behandlung für 2 h mit 2 μM Aptamer Konstrukten inkubiert, wobei die Inkubation während der Taxol Behandlung weiter fortgeführt wurde. Als Kontrolle wurden die Zellen parallel mit dem ErbB2-Inhibitor PKI 166 Inhibitor behandelt.

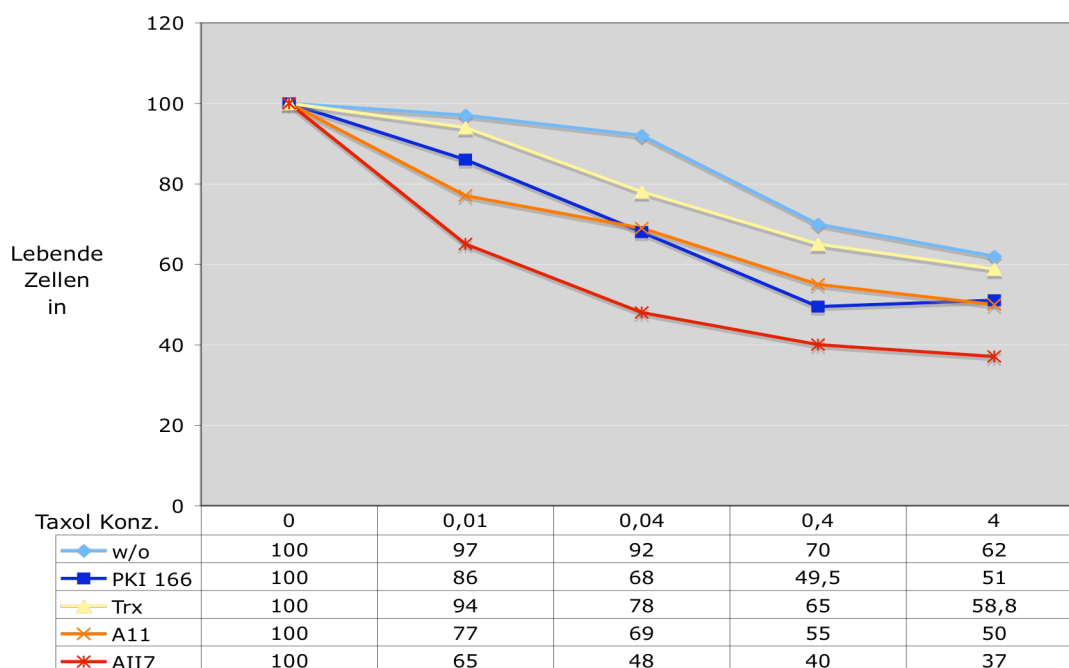


Abb. 3.51 | Zytotoxizitätsversuch nach PT der aufgereinigten Aptamere in MCF7 her2 Zellen

MCF7-Zellen wurden mit aufgereinigten Aptameren (Trx, Apta 11; Apta II7) für 2 h vor und während der 4-stündigen Taxolbehandlung mit einer Konzentration von 2 μM transduziert; die PKI 166 Behandlung erfolgte parallel zur Aptamer Inkubation; die Zellen wurden mit Taxol-Konzentrationen von 0,01 μM bis 5 μM behandelt und nach 3 Tagen die Anzahl der überlebenden Zellen durch einen XTT-Versuch bestimmt

Der Zytotoxizitätsversuch zeigte eine relativ geringe Sensitivität der nicht-transduzierten MCF7 her2 Zellen gegenüber steigenden Taxol-Konzentrationen (Reduktion von 100 % auf 62 %). Bei MCF7 her2 Zellen, die mit aufgereinigtem Trx behandelt wurden, konnte eine geringe Verstärkung des Taxol Effektes beobachtet werden (Reduktion auf 58,8 % bei 4 μM Taxol). Eine moderate Sensitivierung lässt sich bei Aptamer 11 beobachten (Reduktion auf 50 % bei 4 μM Taxol), welches auch eine niedrigere Bindungsaffinität an den Rezeptor besitzt. Im gleichen Bereich liegt auch der Effekt des PKI 166 Inhibitors (Reduktion auf 51 % bei 4 μM Taxol). Somit konnte durch die Inkubation des Inhibitors vor und während der Taxol-Behandlung eine bessere Sensitivierung beobachtet werden, als bei einer Inkubation während der Taxol-Behandlung (siehe Kap. 3.5.3.1). Die deutlichste Sensitivierung ließ sich bei Aptamer II7 erkennen, welches in den bisherigen Versuchen auch die beste Bindung an den Rezeptor und Inhibition der AKT Phosphorylierung zeigte.

Um auszuschliessen, dass die beobachtete Sensitivierung auf unspezifische Effekte der Aptamer Inkubation zurückzuführen ist, wurden die aufgereinigten Aptamere auch in Zytotoxizitätsversuchen bei MCF7 neo verwendet.

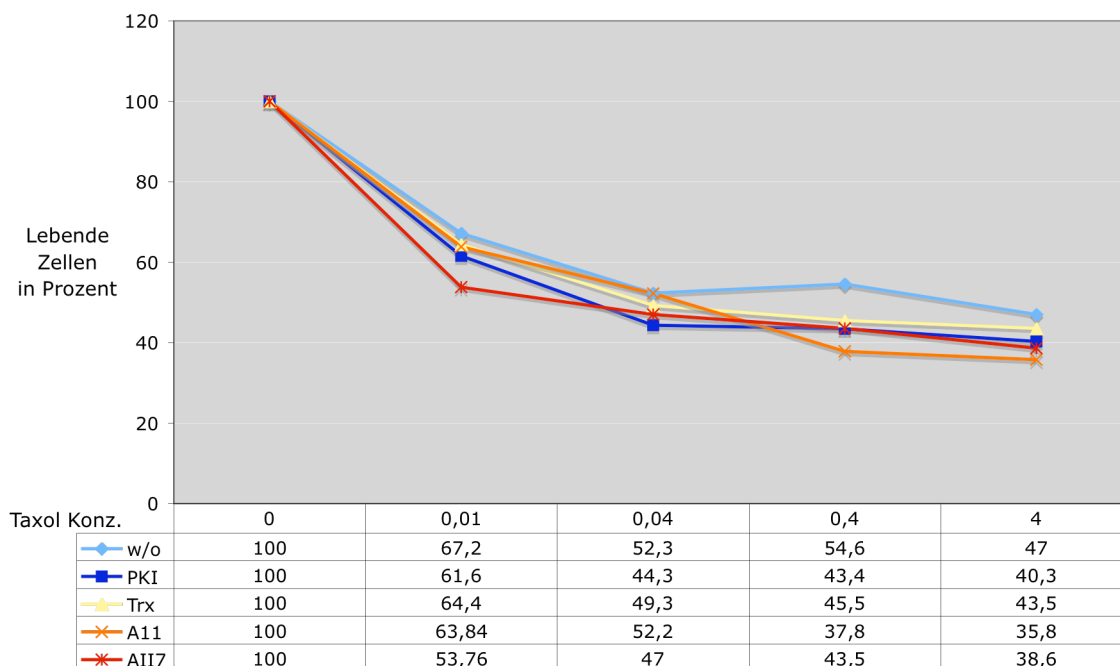


Abb. 3.52 | Zytotoxizitätsversuch nach PT der aufgereinigten Aptamerkonstrukte in MCF7 neo Zellen
MCF7 her2 Zellen wurden mit steigenden Taxol-Konzentrationen (0,01 - 4 μ M) behandelt. Zusätzlich zu nicht-transduzierten Zellen (w/o) wurden auch Zellen verwendet, die mit Trx, A11 bzw. AII7 transduziert worden waren; die Taxol-Inkubation erfolgte für 4 h in AKG-DMEM Medium; die aufgereinigten Aptamere wurden 2 h vor und während der Taxolbehandlung in 2 μ M Konzentrationen verwendet; die PKI 166 Behandlung erfolgte parallel zur Aptamer Inkubation

Die in *Abb. 3.52* dargestellten Effekte der Taxol Behandlung von MCF7 neo Zellen nach und während der Aptamer Proteintransduktion zeigen nur geringe Unterschiede in den XTT Werten (w/o: 47 %, PKI: 40,3 %, Trx: 43,5 %, A12.1: 35 %, AII2 38,6 % bei 4 μ M Taxol). Somit liegen die Werte im gleichen Bereich wie nach lentiviraler Transduktion der Aptamere. Es wurden jedoch Schwankungen in den XTT-Werten der verschiedenen Kontrukte bei unterschiedlichen Taxol Konzentrationen beobachtet, die durchaus mit der Verwendung von rekombinanten Proteinen, im Vergleich zu viral transduzierten Aptameren, zu erklären sind.

Das hier eingesetzte Modellsystem erlaubte die parallele Analyse der Auswirkungen von Aptamer-induzierter ErbB2-Inhibition und Chemotherapeutika-Behandlung in M7h2 bzw. M7n Zellen. Die in den letzten beiden Kapiteln gezeigten Ergebnisse sind in *Abb. 3.53* zusammengefasst. Hierbei wurden die Werte der lebenden Zellen bei 0,4 μ M Taxol-Behandlung verwendet. Es ist zu erkennen, dass beiden Verfahren der Transduktion in den Zytotoxizitätsversuchen zu vergleichbaren Ergebnissen führten. Die Aptamer-Behandlung von M7n Zellen im Cytotoxizitätsversuch zeigte keine unspezifischen Aptamer-Effekte. Ferner war nur geringe Reduktion der Anzahl an überlebenden M7h2 Zellen bei Trx-Behandlung zu

beobachten. Die M7h2 Zellen ließen sich jedoch durch Aptamer II7 für die Taxolbehandlung sensitivieren, so dass im Vergleich zu den behandelten M7n Zellen, ähnliche Prozentzahlen an lebenden Zellen erreicht wurden.

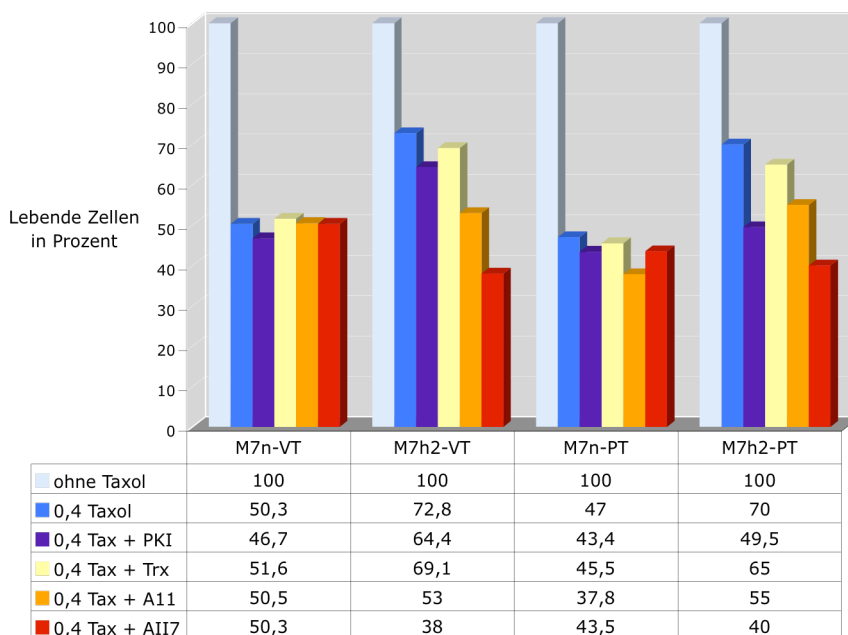


Abb. 3.53 | Aptamerapplikation durch virale und Protein-Transduktion im Zyto-toxizitätsversuch

Die M7n bzw. M7h2 Zellen wurden mit 0,4 μ M Taxol für 5 h behandelt. Parallel wurden Aptameren über virale Transduktion (VT) oder Protein-Transduktion (PT) appliziert. Der XTT-Versuch wurde 3 Tage nach der Taxol-Behandlung durchgeführt

Durch die Konstruktion einer randomisierten Peptid-Aptamer Bank konnten ErbB2-spezifische Peptid-Aptamere im Hefe Zwei-Hybrid System isoliert werden. Die Peptid-Aptamere wurden mittels viraler und Protein-Transduktion zur Funktionsanalyse in humane Krebszellen eingebracht. Durch diese Verfahren gelang, es die Interaktion der Aptamere mit ErbB2 in Krebszellen nachzuweisen. In weiteren Experimenten konnte die Aptamer-abhängige Inhibition des PI3K/AKT-Signalweges als Funktion der Aptamere beschrieben werden. Diese Funktion wurde nicht wie im Fall von etablierten TKIs durch die Inhibition des aktiven Zentrums der Tyrosinkinase erreicht, sondern durch Bindung im C-terminalen Teil der Kinasedomäne. Durch die Inhibition des PI3K/AKT Signalweges konnte eine ErbB2-induzierte Chemoresistenz in Krebszellen aufgehoben werden. Derart behandelte Zellen wurden hierdurch sensitiv für die Behandlung mit Zytostatika. Diese Ergebnisse konnten sowohl durch virale, als auch durch Protein-Transduktion verifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass über das Hefe Zwei-Hybrid System Peptid-Aptamere als ErbB2-spezifische Inhibitoren isolieren werden können. Es konnte in Zellkultursystem gezeigt werden, dass diese Peptid-Aptamere eine wirkungsvolle Alternative zum Einsatz von TKI darstellen und als Proteintherapeutikum über PT einsetzbar sind. In weiterführenden Untersuchungen muss geklärt werden, ob sich diese Ergebnisse auch in Modellorganismen wie der Maus nachvollziehen lassen.

4 Diskussion

Das Auftreten von Brustkrebs ist die häufigste Krebsursache bei Frauen weltweit. In der westlichen Welt gilt Brustkrebs bei Frauen zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr als die häufigste Todesursache. In etwa 25-30 Prozent dieser Brustkrebspatienten korreliert das Auftreten des Krebses mit einer Überexpression des ErbB2-Rezeptors ⁷⁶. Die Überexpression des Rezeptors führt zu stark wachsenden Brusttumoren, so dass nur 5 % dieser Patienten die ersten 5 Jahre nach Diagnose des Krebses überleben ². Eine effektive ErbB2-spezifische Krebstherapie ist daher dringend erforderlich. Die Inhibition von ErbB-Rezeptoren hat sich als erfolgreiches therapeutisches Konzept erwiesen, was im klinischen Einsatz von ErbB2-spezifischen Antikörpern (Herceptin[®]) oder Tyrosinkinase-Inhibitoren deutlich wird. Obwohl das Wachstum der Tumore in manchen Fällen aufgehalten werden kann, führen diese Therapien keineswegs zur Krebsheilung, so dass weiterhin bedarf an der Optimierung der ErbB2-Inhibition besteht.

Die Erkenntnisse der translatorischen Forschung auf diesem Gebiet wurden als Grundlage für die Analyse von Peptid-Aptamere, einer neuen Inhibitor-Klasse, genutzt. Als Ziel der vorliegenden Doktorarbeit, sollten Peptid-Aptamere isoliert werden, die spezifisch an die Tyrosinkinase Domäne des ErbB2-Rezeptors binden und diese in ihrer Funktion inhibieren. Hierbei sollte durch die Evaluation neuer ErbB2-Inhibitions-punkte eine weitere Variationsmöglichkeit der spezifischen ErbB2-Tumorthherapie geschaffen werden, um diese effizienter gestalten zu können. Die einzelnen Schritte, die in dieser Arbeit angewandt wurden um ErbB2-spezifische Peptid-Aptamere zu isolieren, sind in *Abb. 4.1* zusammengefasst.

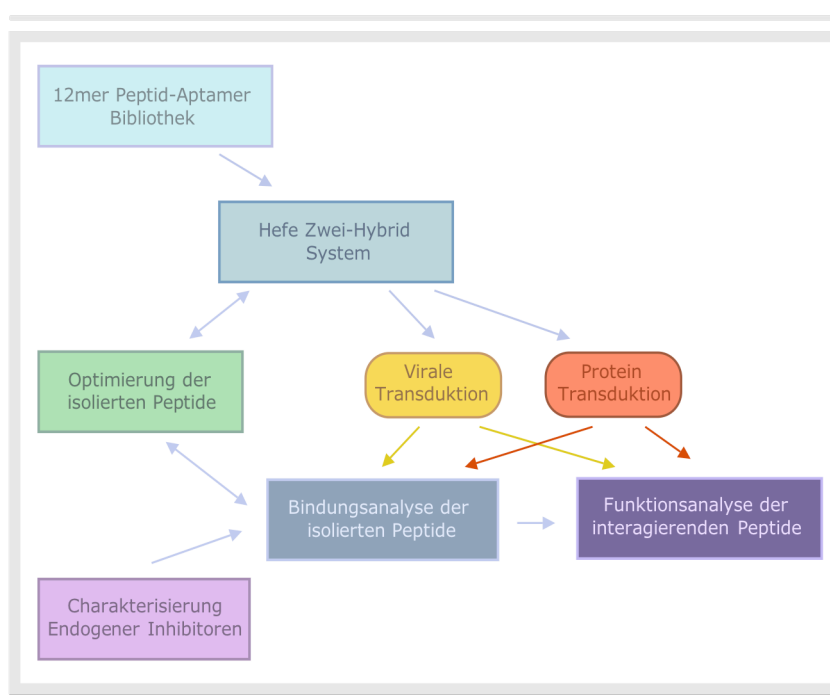


Abb. 4.1 | Arbeitsschritte zur Isolation ErbB2-spezifischer Aptamere

Die konstruierte 12mer Peptid-Bibliothek wurde in einem Hefe Zwei-Hybrid System auf Interaktionspartner mit der ErbB2-Tyrosinkinase Domäne untersucht. Es wurden verschiedene Verfahren angewandt, um die Bindungsaffinität der Aptamere zu erhöhen. Ein endogener ErbB2-Inhibitor diente als alternativer Ansatz zur Aptamer-Applikation. Die Bindungs- und Funktionsanalyse der Aptamere erfolgte in humanen Krebszellen durch lentivirale und Protein-Transduktion.

Für die vorliegende Arbeit wurde eine randomisierte Peptid-Aptamer Bibliothek konstruiert. Aus dieser Bibliothek konnten Peptid-Aptamere in einem Hefe Zwei-Hybrid System isoliert werden, die spezifisch mit der Tyrosinkinasedomäne des ErbB2-Rezeptors interagierten. Die weitere Funktionsanalyse erfolgte in humanen Krebszellen durch das effiziente Einbringen der Aptamere durch lentivirale und Protein-Transduktion. Diese Funktionsanalysen ergaben, dass besonders Aptamer KD 117 den Apoptose-protectiven PI3K/AKT-Signalweg inhibierte. Durch diese Inhibition konnte die ErbB2-induzierte Chemoresistenz in Brustkrebszellen aufgehoben werden, wodurch der Einsatz von konventionellen Zytostatika wieder einen pro-apoptotischen Effekt zeigte. Ferner zeigten die Peptid-Aptamere in den ersten funktionalen Untersuchungen bessere chemo-sensitivierende Effekte, als der in der klinischen Phase befindliche Tyrosinkinaseinhibitor PKI 166.

4.1 Peptid-Aptamere als neue Inhibitor-Klasse

Die in dieser Arbeit verwendeten Aptamere wurden als randomisierte 12mer Peptidsequenzen in das Gerüstprotein Trx inseriert und können für eine Interaktion mit jeder Domäne eines Proteins selektioniert werden (Abb. 4.2). Dadurch ergeben sich völlig neue Zielstrukturen für die Interferenz der unterschiedlichen Signalkaskaden in der Zelle.

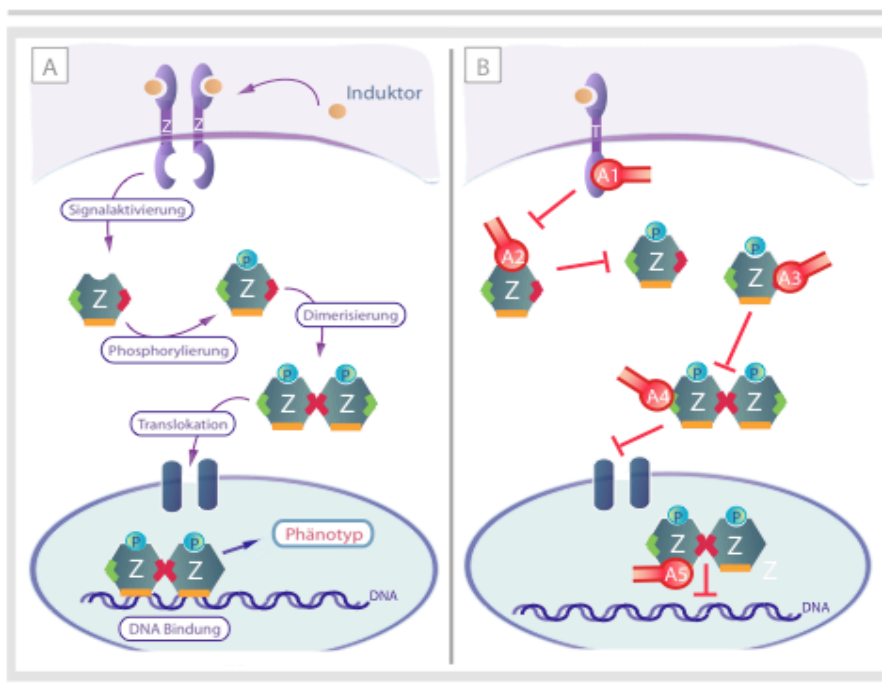


Abb. 4.2 | **Möglichkeiten der Aptamer Interferenz**

Das Zielprotein (Z) kann durch unterschiedliche Aptamere in seiner Signalaktivierung (A1), in der Phosphorylierung (A2), in der Dimerisierung (A3), in der Trans-lokation in den Nukleus (A4) oder in der DNA-Bindung (A5) gehemmt werden. Dadurch ergeben sich neue Zielstrukturen für mögliche therapeutische Ansätze

Aptamere bieten die Möglichkeit die aktivierte Signalkaskade direkt an ihrem Ausgangspunkt bei der Rezeptoraktivierung durch Bindung an die Kinasedomäne zu inhibieren. Signalkaskaden werden u.a. durch die Phosphorylierung der unterschiedlichen Interaktionsproteine

weitergeleitet, wodurch auch dieser Schritt durch Aptamer-Bindung beeinflusst werden kann. Ein weiterer Angriffspunkt bietet sich bei Zielproteinen deren Aktivität von ihrer Dimerisierung abhängig ist. Ebenso besteht die Möglichkeit durch das Maskieren einer Translokationsdomäne, aktivierte Proteine von ihrem Wirkort fern zu halten, oder bei Transkriptionsfaktoren mit der Bindung an die DNA zu interferieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Aptamere potentiell jeden Schritt der Signalweiterleitung durch Imitation der physiologischen Protein-Protein Interaktion blockieren können. Dadurch kann das bisherige Wirkungsspektrum der Proteininhibition, welches sich bislang hauptsächlich auf der Blockade enzymatischer Aktivität beschränkt, um ein Vielfaches erweitert werden.

4.1.1 Aptamer-Präsentation im Gerüstprotein Thioredoxin

Bei Peptid-Aptamere handelt es sich um variable Peptidsequenzen, die in einem Proteingerüst präsentiert werden und sich als Inhibitor-Klasse mit Antikörpern vergleichen lassen.

Antikörper können mit Hilfe ihrer vier variablen Proteindomänen über je zwei variable Peptidregionen mit einem bestimmten Antigen interagieren. Diesen variablen Peptidregionen wird durch ein Proteingerüst eine definierte Struktur gegeben, die für die Bindung am Antigen entscheidend ist. Im Fall der Antikörper wurde das Gerüstprotein evolutionär für die Interaktion mit extrazellulären Antigenen optimiert. Die Struktur der Antikörper wird über Disulfidbrücken stabilisiert. Diese Disulfidbrücken werden innerhalb der Zelle durch Reduktion aufgebrochen, wodurch die Antikörper ihr zentrales Element zur Proteinstabilisierung verlieren. Ohne stabiles Proteingerüst kann somit die Bindung am Zielprotein nicht mehr gewährleistet werden.

Für die in dieser Arbeit verwendeten Peptid-Aptamere wurde daher ein Proteingerüst gewählt, welches einen flexiblen Einsatz der Aptamere ermöglicht. Als Gerüstprotein diente hierbei das intrazelluläre Protein Thioredoxin. Damit wird sichergestellt, dass die Stabilität des Proteins an die intrazellulären Bedingungen angepasst ist. Auf diese Weise können Peptid-Aptamere nicht nur gegen extrazelluläre Zielproteine gerichtet sein, wie im Fall der Antikörper, sondern sie machen es auch möglich intrazelluläre Zielproteine anzugreifen.

Die Verwendung eines Gerüstproteins ist generell von entscheidender Bedeutung für die Bindungsaffinität variabler Peptidsequenzen an Zielproteinen. Die bei der Bindung eines rigiden Peptids, im Vergleich zum analogen flexiblen Peptid, freiwerdende Bindungsenergie ist höher, da bei der Bindung weniger Entropie verloren geht. Diese Aussage basiert auf dem zweiten Hauptsatz der Thermodynamik, indem sich die freie Bindungsenthalpie (H) wie folgt definiert: $\Delta H = \Delta U - T\Delta S$; wobei U die freie Energie des Moleküls, T die Temperatur und S die Entropie ist. Durch den geringeren Entropieverlust bei der Bindung kann auf diese Weise eine höhere Bindungsaffinität erreicht werden ⁷⁷.

Eine gewisse Peptid-Flexibilität ist jedoch Voraussetzung für die Anlagerung des Aptamers an das Zielprotein, vergleichbar eines „induced-fit“ Mechanismus bei der Enzym-Substrat Interaktion. Aus diesem Grund wurden bei der in dieser Arbeit erstellten 12mer Peptid-Bank die randomisierten Aptamer-Sequenzen von je zwei flexiblen Glycin-Resten umgeben sind.

Bei der Verwendung des Trx als Gerüstprotein wurde versucht, das erfolgreiche inhibitorische Prinzip von Antikörper an eine intrazelluläre Umgebung zu adaptieren. Es bleibt jedoch anzumerken, dass Antikörper über zwei mal zwei variable Peptidregionen mit dem Antigen interagieren und Aptamere ihr volles inhibitorisches Potential über eine Interaktionsdomäne vermitteln müssen. Eine wichtige Voraussetzung eines effektiven Inhibitors konnte jedoch durch die Verwendung eines intrazellulär-stabilen Gerüstproteins sichergestellt werden. Das Gerüstprotein wurde hierbei nicht willkürlich gewählt. Der Einsatz von Trx als Gerüstprotein ist weit verbreitet, wobei Trx in vielen Fällen erfolgreich verwendet werden konnte, um Protein-Inhibitoren zu präsentieren⁶⁰.

4.1.2 Die Konstruktion der optimierten 12mer Aptamer-Bank

Die randomisierten Peptid-Aptamere wurden in das aktive Zentrum des Gerüstprotein Trx inseriert, wodurch sich 2 wichtige Anforderungen an ein potentielles Proteitherapeutikum erfüllen ließen. Einerseits wurde dadurch die physiologische Funktion des Trx ausgeschaltet, so dass das Protein nur der Präsentation der randomisierten Sequenzen diene. Andererseits ist das aktive Zentrum als β -Faltblattschleife an der Oberfläche exponiert und erlaubt so die optimale Interaktion der inserierten Aptamere mit dem Zielprotein.

Die ursprüngliche 20mer-Peptidbank wurde in verschiedenen Punkten optimiert, da ihre Qualität wie im folgenden Abschnitt aufgezeigt, nicht für ausreichend erachtet wurde (Kap. 3.1.2.2).

Die ursprüngliche Peptidbank⁶⁶ beinhaltete randomisierte 20mer Peptide, die als 60-bp Oligonukleotide mit NNK-Kodondefinition in das aktive Zentrum des Trx inseriert wurden. Die spezielle Kodondefinition der randomisierten Sequenzen erlaubt die Minimierung der Anzahl der Stopp-Kodons von 4,7 %, pro Basen-Triplett ohne Kodondefinition, auf 3,1 % bei NNK, wobei die Kodierung aller 20 möglichen Aminosäuren erhalten bleibt. In der ursprünglichen Peptidbank wurden diese randomisierten Peptidsequenzen über eine einzelne Restriktionsschnittstelle *RsrII* in das aktive Zentrum des Thioredoxins inseriert. Auf diese Weise konnte die randomisierten Oligonukleotid-Sequenzen in „sense“ oder „anti-sense“ Orientierung mit dem Trx-Vektor ligiert werden. Nur die Insertion der „sense“-Orientierung garantiert die Kodierung aller 20 Aminosäuren in der Peptid-Bank. Bei der Insertion in „anti-sense“ Orientierung, die stochastisch zu 50 % in der Originalbank auftrat, ist die Kodonverwendung als KNN definiert. Bei dieser Kodondefinition können zwar keine Stopp-Kodons auftreten, allerdings werden bei dieser Kodonverwendung nur noch zehn der zwanzig möglichen Aminosäuren kodiert, was zu einem erheblichen Diversitätsverlust führt. Ferner bestand die Gefahr durch Konkatamer-Bildung

mehrere der randomisierte Oligonukleotid-Sequenzen in den Vektor zu inserieren und somit nicht nur ein Aptamer für die Zielprotein-Interaktion zu präsentieren. Die Konkatamer-Bildung könnte die physiologische Faltung des Gerüstproteins erheblich stören und würde damit zum proteasomalen Abbau des Trx führen. Ferner kann durch die Insertion von längeren Peptidsequenzen die exponierte Ausbildung der β -Faltblattschleife und damit die optimale Zielprotein-Interaktion nicht mehr garantiert werden.

Um die Qualität der Aptamer-Bibliothek zu verbessern und die Effizienz der Klonierung zu steigern, wurde ein Linker mit den Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *XhoI* in das aktive Zentrum von Trx kloniert. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass die randomisierten Sequenzen nur in der „sense“ Orientierung inseriert wurden. Somit tritt in der optimierten Peptid-Bank ein Diversitätsverlust durch anti-sense Orientierung der inserierten Sequenzen nicht mehr auf. Zusätzlich wird dadurch die Konkatamer-Bildung stark reduziert, da nur noch drei der randomisierten Oligonukleotid-Sequenzen gleichzeitig inseriert werden können und nicht zwei bis vier, wie im Fall der ursprünglichen Bibliothek.

Ein weiterer Optimierungsschritt bestand in der Verwendung von 12 statt 20 randomisierten Aminosäuren. Auf diese Weise ist die Wahrscheinlichkeit geringer, dass in „sense“ Orientierung Stopp-Kodons in den randomisierten Sequenzen auftreten (37,5 % bei 12mer statt 62,5 % bei 20mer). Ein weiterer Vorteil der 12mer Bibliothek besteht darin, dass weniger Klone untersucht werden müssen, um die gesamte Diversität der Bibliothek im Screening System zu analysieren. Im letzten Optimierungsschritt wurden über den *NcoI/XhoI*-Linker zwei mal zwei Glycine kodiert, um den randomisierten Peptiden den in Kap. 4.1.1 beschriebenen „induced-fit“ Mechanismus zu ermöglichen. Somit konnte bei eingeschränkter Gesamtflexibilität die für die Anpassung an das Zielprotein benötigte Flexibilität des Peptids zu gegeben werden.

Mit dieser Linker-Sequenz und den randomisierten 12mer Peptiden, addierten sich die inserierten Peptid-Sequenzen zu 20 Aminosäuren. Bereits mit der 20mer Bank konnte gezeigt werden, dass bei dieser Insertionsgröße die Konformation des Thioredoxin meistens nicht beeinflusst wird.

Durch die Optimierung der Peptidbank konnte die Qualität im Bezug auf die Diversität und das Auftreten von Stopp-Kodons, im Vergleich mit der Originalbank, deutlich gesteigert werden. Dies spiegelte sich auch in den 96 sequenzierten Einzelklonen wider, die mit 26 % sogar weniger Stopp-Kodons enthielten, als der berechnete Wert von 38 %.

Für das Screening randomisierten Peptide-Bibliotheken stehen verschiedene Systemen zur Verfügung, welche im Folgenden diskutiert werden.

4.1.3 Das Hefe Zwei-Hybrid System als Screening-System zur Isolation von Peptid-Aptamere

Zur Isolation von Peptid-Aptameren, die in der Lage sind, mit ErbB2 zu interagieren, wurde das Hefe Zwei-Hybrid System verwendet, um die Screening-Bedingungen dem Milieu der Protein-Protein Interaktion im menschlichen Organismus anzupassen (Kap. 3.1.3).

Alternativ besteht die Möglichkeit einer Peptid-Interferenzanalyse in humanen Zellen, wodurch die Situation der Protein-Protein Interaktion im menschlichen Organismus direkt widerspiegelt wird⁷⁸. Allerdings benötigt das Etablieren eines solchen Systems einen hohen Zeitaufwand, und die Verwendungsmöglichkeiten beschränken sich meist auf einen Signalweg, der bei Inhibition einen bestimmten Phänotyp hervorruft. So gelang es zwar Xu *et al.* retroviral-transduzierte Peptide aus humanen Zellen zu isolieren, die mit Taxol-induzierter Apoptose interferierten. Allerdings musste auch hier der Mechanismus der Inhibition im Folgenden durch ein Hefe Zwei-Hybrid System näher charakterisiert werden. Dieses System bietet sich auch nur an, wenn eine geeignete Stelle der Inhibition in einem Signalweg zu finden ist, die eine phänotypische Auswirkung hat.

In der vorliegenden Arbeit war dies jedoch nicht notwendig, da die Inhibition der ErbB2-Tyrosinkinase Domäne sich bereits als erfolgreicher therapeutischer Ansatz erwiesen hatte. Die Evaluation neuer Inhibitionspunkte im ErbB2 Rezeptor durch Peptid-Aptamere sollte lediglich die Effizienz dieses therapeutischen Ansatzes steigern. Ein enormer Vorteil bei der Verwendung des Hefe Zwei-Hybrid Systems ist die kurze Vorbereitungszeit und Analysedauer, die es ermöglicht Interaktionspartner in 4-6 Wochen zu isolieren. Der Hauptnachteil dieser Methodik besteht in der relativ geringen Anzahl von Peptiden, die pro Screen untersucht werden können. So konnten bei der verwendeten Transformationsmethode ca. 10^7 unterschiedliche Peptide pro Ansatz gescreent werden, obwohl die Peptid-Bank eine Diversität von 2×10^8 aufweist. Dennoch bietet das Hefe Zwei-Hybrid System die physiologische Analyse der Protein-Protein Interaktionen in einem Kontext, der den Bedingungen in humanen Zellen ähnelt und auch sekundäre Modifikationen des Proteins mit einschließt. Ferner lassen sich qualitative Unterschiede in den Bindungsstärken der einzelnen interagierenden Peptide über die Titration von 3-AT auf His-Mangelmedium und dem damit verbundenen Wachstum der Hefen, ermitteln. Dies wurde auch bei den isolierten Peptid-Aptameren gegen die ErbB2 Rezeptortyrosinkinase angewendet, wodurch sich in einem ersten Test die Bindungsstärken der Aptamere an ErbB2 abschätzen ließen.

Die Interaktionsanalyse im Zwei-Hybrid System findet im Zellkern der Hefen statt, einem Milieu, welches sich vom Zytoplasma der Zelle unterscheidet. Für die Untersuchung der membranständigen Rezeptortyrosinkinase ist die Verwendung dieses System aus diesem Grund nicht optimal. Um das Screening-System besser an die Umgebung der jeweiligen Protein-Protein Interaktionen anzupassen, sollten daher ein Hefe Zwei-Hybrid System verwendet werden, das die Aptamer-ErbB2 Interaktion im Zytoplasma der Zelle untersucht.

Diese Anpassung des Screening Systems wäre im Fall der Rezeptortyrosinkinase ErbB2 durch die Verwendung von CytoTrap (Stratagene) möglich gewesen. Mit diesem System können Protein-Protein Interaktionen an der Zellmembran der Hefen und somit am Ort des physiologischen Auftretens des ErbB2 Rezeptors analysiert werden. Durch die Verwendung von CytoTrap könnte der Screening Prozess also effizienter gestaltet werden. Dieses System stand jedoch bei der Durchführung der Screening-Versuche nicht zur Verfügung.

Wie wichtig die Anpassung der Screening-Umgebung an die Protein-Protein Interaktion ist, wird in der relativ geringen Anzahl an isolierten Aptamere deutlich. Die Anzahl der isolierten Klone konnte durch die Verwendung von Zielproteinen aus dem Zellkern, wie Stat5 (Arbeit von Dr. Ilka Wittig) oder Stat3 ⁷⁹ deutlich gesteigert werden. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die Analyse von Peptid-Aptameren im Hefe Zwei-Hybrid System generell für jedes Zielprotein möglich ist, durch eine Anpassung des Screening Systems an den Ort der Protein-Protein Interaktion in der Zelle, die Effizienz des Screenings jedoch gesteigert werden kann.

Mit Hilfe des Hefe Zwei-Hybrid Systems konnten Peptid-Aptamere isoliert werden, die spezifisch mit ErbB2 interagierten und in der Lage waren seine Funktion zu inhibieren. Es besteht ein kausaler Zusammenhang zwischen der Affinitätssteigerung der Aptamere und ihrer Funktionssteigerung. Aus diesem Grund wurden verschiedene Verfahren angewandt, um die Bindungsaffinität der Aptamere zu steigern.

4.2 Möglichkeiten der Affinitätssteigerung von Aptameren

Die Stärke von Protein-Protein Interaktionen wird durch die Passform der Interaktionsfläche zwischen Proteinen bestimmt. Die Interaktionsstärke ist jedoch nicht nur durch die Aminosäuren, die direkt miteinander interagieren bestimmt, sondern auch durch umliegende Aminosäuren, welche die Struktur und damit die Präsentation der Interaktionsdomäne definieren. Es ist also unerlässlich für jeden Interaktionspartner ein passenden Interaktionsplattform oder Gerüst zu wählen. Es ist jedoch bisher nicht möglich die Voraussetzungen zu definieren, mit welchen eine optimale Interaktion der Bindungsflächen garantiert werden könnten. Die Natur hat dieses Problem bei Antikörpern durch die Verwendung von zwei variablen Peptidregionen innerhalb einer variablen Domäne gelöst. Im Zusammenspiel mit der zweiten variablen Domäne gelingt es so, über vier variable Peptidsequenzen, Interaktionspartner für jedes Protein zu generieren. Durch die Verwendung des Aptamer-Systems werden voraussichtlich bestimmte Zielproteine besser mit den Aptameren interagieren können als andere, da für die Interaktion mit dem Zielprotein nur eine variable Peptidomäne zur Verfügung steht. Es können jedoch verschiedene Verfahren herangezogen werden, um die Aptamer-Bindung am Zielprotein zu optimieren.

4.2.1 Ansatzpunkte zur Optimierung des Screening-Systems

Eine Möglichkeit die Affinität von Aptameren zu steigern ist die Anzahl an potentiellen Interaktionspartnern während des Screening-Versuchs zu erhöhen. Damit steigert sich die Wahrscheinlichkeit, die optimale Passform für die Protein-Protein Interaktion zu finden. Um das Screening von einer größeren Peptid-Bibliothek zu erleichtern, kann ein Phage-Display Biopanning dem Hefe Zwei-Hybrid System vorgeschaltet werden, wodurch es möglich wird 10^9 unterschiedliche Verbindungen pro Screen zu untersuchen. Die Vielzahl von Interaktionspartnern die mit Hilfe der Phage-Display Methode isoliert werden, können im Hefe Zwei-Hybrid Screen näher charakterisiert werden. Auf diese Weise lässt sich das Screenen einer grossen Anzahl an potentiellen Interaktionspartnern mittels Phage-Display Biopanning, mit der physiologischen Interaktionsanalyse im Hefe Zwei-Hybrid System verbinden.

Im Phage Display Biopanning wird das Zielprotein rekombinant exprimiert und auf magnetischen Beads immobilisiert. Die randomisierte Peptid-Bibliothek wird auf dem Hüllprotein III des Bakteriophagen M13 präsentiert. Durch Inkubation der Bakteriophagen mit dem immobilisierten Zielprotein können die bindenden Peptide isoliert und in ein Hefe Zwei-Hybrid System umkloniert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Phage Display Biopanning parallel zum Hefe Zwei-Hybrid System verwendet, jedoch gelang es nicht die ErbB2-Kinasedomäne in ausreichenden Konzentrationen in *E. coli* zu exprimieren, um sie auf magnetischen Beads zu immobilisieren. In einem zweiten Versuch wurde der ErbB2 Rezeptor aus SKBr3 Zellextrakten mittels Antikörper isoliert und auf Beads immobilisiert. Dies führte jedoch dazu, dass die Bakteriophagen bevorzugt mit dem Antikörper interagierten.

Prinzipiell lässt sich dieses System für Tyrosinkinase Domänen anwenden wie bereits von Hyland *et al.* für die EGFR Tyrosinkinasedomäne gezeigt werden konnte⁸⁰. In dieser Arbeit wurde eine single-chain Antikörper Bibliothek auf den Phagen präsentiert. Hier traten auch Probleme auf, da sich die single-chain Antikörper nicht als geeignetes Gerüstprotein für die intrazelluläre Applikation erwiesen. Sie werden über eine Disulfid-Brücke stabilisiert, die intrazellulär reduziert und damit aufgebrochen wird. Dennoch gelang es durch Kombination aus Phage-Display und Hefe Zwei-Hybrid System Interaktionspartner für die EGFR TK zu isolieren, die mit einer hohen Affinität mit der Kinase interagieren.

Die Verwendung einer Kombination von verschiedenen Screening Systemen erhöht die Screening-Dauer allerdings erheblich, da nach den Biopanning Versuchen die vorselektierte Library umkloniert und in das Hefe System übertragen werden muss. Eine Möglichkeit dieses zeitintensive Screening zu umgehen, liegt in der Verwendung von Minimalbindungssequenzen in Kombination mit randomisierten Sequenzen. Diese Minimalbindungssequenz bindet mit einer niedrigen Affinität an das Zielprotein. Durch die Verwendung von randomisierten Sequenzen, welche die Minimalbindungssequenz am 3'- und/oder 5'-Ende umgebend, kann diese Bindungsaffinität durch die Selektion in einem Hefe Zwei-Hybrid Screen erhöht werden. Die

Minimalbindungssequenzen können von Proteinen abgeleitet werden, von denen bekannt ist, dass sie mit dem Zielprotein interagieren (siehe Abschnitt 4.2.2). Wenn die Bindungssequenz in ein Gerüstprotein integriert wird, muss die Bindung am Zielprotein erneut verifiziert werden. Ein Nachteil von Minimalbindungssequenzen in Kombination von randomisierten Sequenzen, besteht darin, dass die konstruierte Peptid-Bank nur für ein Zielprotein angewendet werden kann und somit bei der Untersuchung neuer Zielproteine eine neue Bank generiert werden muss.

4.2.2 Optimierung der Bindungsaffinität der isolierten Peptid-Aptamere

Eine Affinitätssteigerung der Peptid-Aptamere kann auch nach der Isolation aus dem Screening System erfolgen. Eine Möglichkeit besteht darin, durch Kombination der bereits isolierten ErbB2-bindenden Aptamere, mit flankierenden randomisierten Sequenzen in einem weiteren Hefe Zwei-Hybrid Screen, die Affinität zu erhöhen.

Eine weitere Alternative bietet ein sequenzieller Alanin-Austausch. Hierbei werden verschiedene Peptide erstellt, wobei jeweils einzelne Aminosäuren der Aptamere gegen Alanin ausgetauscht sind. Auf diese Weise kann ermittelt werden, welche Aminosäure für die Zielprotein-Interaktion essentiell ist. Diese essentiellen Aminosäuren können dann durch in ihren Eigenschaften ähnliche Aminosäuren ersetzt werden, um zu analysieren, ob dadurch die Bindungsstärke erhöht werden kann. Dieses Verfahren sollte auch in dieser Arbeit angewendet werden, um die Affinität von Aptamer KD 117 zu steigern (Kap. 3.2.2). Allerdings handelt es sich bei diesem Aptamer um ein 40mer Peptid. Für die Ala-Austausch-Analyse können allerdings maximal zwanzig Aminosäuren synthetisiert werden. Daher war es erforderlich, die Grösse des Aptamers zu reduzieren, ohne die Bindungseigenschaften zu verlieren. Die Reduktion auf 5 unterschiedliche 12mer Aminosäuren brachte einen starken Verlust der Bindungsaffinität mit sich, so dass dieses Analyseverfahren nicht mit diesem Aptamer angewendet werden konnte.

Für das Aptamer KD_g 11 stand ein anderes Optimierungsverfahren zur Verfügung. Das Aptamer wurde auf Konsensussequenzen mit bereits bekannten ErbB2-Interaktionspartnern untersucht. Die gefunden Sequenzen wurden dann durch *in silico* Optimierung mit Hilfe des ScanSite Programms in eine optimale Konsensussequenz umgewandelt (Kap. 3.2.1). Dieses Verfahren besitzt allerdings den Nachteil, dass Interaktionspeptide immer im Kontext mit den Proteinen zu sehen sind, in denen sie sich befinden. Die optimierte Konsensussequenz zeigte nach Übertragung in das Trx-Gerüstprotein keine Interaktion mit ErbB2 oder EGFR, so dass auch dieses Verfahren nicht verwendet werden konnte, um die Bindungsaffinität der Aptamere zu erhöhen.

Generell ist es schwer im Voraus abzuschätzen, ob die Optimierung einer Protein-Protein Interaktion mit den oben beschriebenen Verfahren umzusetzen ist, so dass dies nur durch „Trial and Error“ überprüft werden kann. Eine verfeinerte Bindungsoptimierung lässt sich über die Analyse der Interaktionsschnittstellen der Bindungspartner mit Hilfe der Kristallstruktur der Proteine bewerkstelligen. Sind diese strukturellen Informationen vorhanden, lassen sich durch mathematische Algorithmen die idealen Bindungsvoraussetzungen ermitteln. Für dieses Verfahren wäre jedoch die Kristallisation der Aptamere im Bindungskomplex mit ErbB2 erforderlich, was sich über mehrere Jahre hinziehen kann. Allerdings ist auch hier eine experimentelle Verifikation der Ergebnisse erforderlich und eine Verbesserung der Interaktion nicht kausal gegeben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Optimierung der Aptamer-Bindungsaffinität kristallographische Untersuchungen benötigt, um die genauen Interaktionsflächen der Proteine zu charakterisieren. Zusätzlich ist es wichtig, die Stringenz bereits beim verwendeten Screening-System so zu erhöhen, dass die Bindungsaffinitäten der isolierten Aptamere keiner großen Optimierung mehr bedürfen. Daher ist es von Nöten eine möglichst grosse Anzahl an Interaktionspartnern zu analysieren und gegebenenfalls die Aptamer-Library an das Ziel-Protein anzupassen, wie es in Kap 4.2.1 beschrieben wurde.

4.2.3 Analyse endogener Inhibitoren

Durch die Verwendung von endogenen Inhibitoren (wie des RALT Proteins) könnten verschiedene problematische Schritte der Inhibitor-Isolierung im Aptamer-System umgangen werden (Kap. 3.3). So wurde die Interaktion dieser Proteine mit dem Zielprotein durch die Evolution optimiert. Unter physiologischen Bedingungen müssen endogene Inhibitoren eine ausreichend hohe Affinität aufweisen, um die Funktion des Zielproteins vollständig zu hemmen. Es gibt jedoch bei der Verwendung von endogenen Inhibitoren als Therapeutikum verschiedene Aspekte die beachtet werden müssen. Diese Inhibitoren unterliegen oft Regulationsmechanismen, die ihre Überaktivität verhindern und möglicherweise die therapeutische Wirkung reduzieren, wie Inaktivierung durch Phosphorylierung⁸¹ oder Degradation⁸². Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass Mutationen im Zielprotein, bei Onkoproteinen beispielsweise, die Bindung des Inhibitors stören oder sogar verhindern⁸³. Eine weitere Problematik stellt die Spezifität der Inhibitoren dar. Oft hemmen endogene Inhibitoren verschiedene Proteine, wodurch es zu Nebenwirkungen in nicht-transformierten Zellen kommen kann. Eine Möglichkeit dies zu verhindern, ist die alleinige Verwendung der Inhibitionsdomäne. Auf diese Weise sollten potentielle Regulationsmechanismen, welche mit der Funktion des Inhibitors interferieren ausgeschaltet werden. Ferner könnten damit mögliche Nebenwirkungen durch die Interaktion des Gesamtproteins mit anderen Proteinen in der Zelle minimiert und die Grösse des potentiellen Proteintherapeutikums verringert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der endogene ErbB2 Inhibitor RALT verwendet, um alternativ zum Aptamer-System die Funktion des ErbB2 Rezeptors zu inhibieren. Auch hier wurde nicht das gesamte Protein eingesetzt, sondern nur die postulierte ErbB2-Interaktionsdomäne. Allerdings lies sich in den durchgeführten Interaktionsversuchen zur Verifikation der RALT/ErbB2-Bindung nur die Bindung des ganzen Proteins mit dem Rezeptor nachweisen. Die postulierte Interaktionsdomäne ergab keine Interaktion. Durch Input-Vergleich in Co-IP Experimenten konnte gezeigt werden, dass die nur etwa 1 % der gesamten RALT-Menge in der Zelle mit dem Rezeptor interagiert, was für eine niedrige Affinität dieses Inhibitors spricht. Es ist möglich, dass eine relativ niedrige Affinität zum Rezeptor dennoch ausreichend ist, ErbB2 unter physiologischen Bedingungen zu inhibieren. Allerdings würde eine Verwendung des Inhibitors als Therapeutikum eine Optimierung der Affinität erfordern, um die therapeutische Dosis zu vermindern. Dies ist aus den oben genannten Argumenten (Abschnitt 4.1.2) jedoch am ehesten mit der Kenntnis der genauen Interaktionsstruktur möglich.

4.3 Verschiedene Applikationsformen zur Verwendung von Peptid-Aptameren

Die isolierten Aptamere wurden aufgrund ihrer physiologischen Interaktion mit dem ErbB2-Rezeptor identifiziert. Allerdings lässt das Screening-System keine Analyse über die Funktion der Peptid-Aptamere zu. Aus diesem Grund sollte die Funktionsweise der Aptamere in verschiedenen eukaryotischen Zellsystemen überprüft werden. Hierfür galt es Methoden zu wählen, die einen effizienten Gen- bzw. Proteintransfer in die Zelle ermöglichen. Der Einsatz von transienten und stabilen Transfektionsmethoden ließ sich in Krebszelllinien nicht mit ausreichend hoher Effizienz durchführen, so dass durch lentivirale- und Protein-Transduktion das effiziente Einbringen der Aptamerkonstrukte in Zielzellen sichergestellt werden sollte. Ferner kommen beide Transduktionsansätze als mögliche Applikationsformen für den Einsatz von Peptid-Aptameren als Therapeutikum in Frage.

4.3.1 Einsatz der lentiviralen-Transduktionstechnik zur Evaluation der Aptamer-Funktion

Der Gentransfer der Aptamere über Lentiviren (Kap. 3.4.1) ermöglichte die intrazelluläre Expression der Konstrukte durch die Zielzelle, wodurch von einer korrekten Faltung des Aptamer-Thioredoxin Proteins ausgegangen werden konnte. Die Aptamer-Konstrukte wurden für die lentivirale Transduktion in den pSiEW-Vektor kloniert, einem Vektor der über einen SFFV-Promotor die Expression der Aptamere induziert, welche über eine IRES mit der EGFP-Expression verknüpft ist. In dieser Arbeit konnte durch die lentivirale Aptamer-Transduktion die

Infektion verschiedener Krebszelllinien, wie MCF7 oder SKBr3, mit einer Effizienz von 70-99 % erreicht werden. Dadurch gelang es Effekte von nicht-infizierten Zellen zu minimieren. Die Expression der Aptamere stand im lentiviralen Vektor unter der Kontrolle des SFFV Promotors. Im eukaryotischen Expressionsvektor für Transfektionen stand die Aptamerexpression unter Kontrolle des CMV Promotors. Im Vergleich der beiden Promotoren waren die Aptamer-Expressionsspiegel im lentiviralen Vektor reduziert. Trotzdem wurde dieses Verfahren verwendet, da zusätzlich zu den hohen Transduktionseffizienzen, die Aptamerkonstrukte durch die viralen LTR Sequenzen stabil in das Genom der Zielzellen inseriert wurden. Hierbei konnte die Expression der Konstrukte über EGFP-Expression sichergestellt werden.

Die Expression der Aptamere durch lentivirale Transduktion erfüllte somit wichtige Voraussetzungen für die Evaluation der Aptamer-Funktion. Die hohe Transduktionseffizienz ermöglicht die Aptamerexpression in annähernd jeder zu untersuchenden Zelle. Durch die stabile Expression der Konstrukte können Aptamer -Effekte über einen längeren Zeitraum analysieren werden.

Die Verwendung von Viren als therapeutisches Vehikel birgt jedoch Risiken, die im Rahmen der Gentherapie vielfach diskutiert wurden. Durch die Insertion viraler DNA in das humane Genom kann es zum einen zur Transformation der Zellen kommen, falls starke virale Promotoren vor Proto-Onkogenen inseriert werden. Zum anderen kann es zum Expressionsverlust bestimmter Gene kommen, sollte die virale DNA in den Leserahmen oder den Promotor-Bereich dieser Gene inseriert werden. Diese Probleme können durch den Gebrauch schwächerer Promotoren und der Verwendung von niedrigen Viruskonzentrationen in *ex vivo* Transduktionen bei gentherapeutischen Ansätzen, teilweise reduziert werden. Bei *ex vivo* Transduktionen werden die Zielzellen dem menschlichen Körper entnommen, transduziert und bevor sie dem Körper wieder eingesetzt werden, analysiert. Die *ex vivo* Transduktion ermöglicht ferner das Transformationsrisiko zu reduzieren, da nur eine begrenzte Anzahl an Zellen transduziert wird.

Diese Optimierungsmaßnahmen sind jedoch für einen krebstherapeutischen Ansatz nicht möglich, da die Transduktion *in vivo* erfolgen muss. Damit jede Krebszelle transduziert wird, müssten hohe Virusmengen verwendet werden. Daher stellt diese Applikationsform vielmehr eine Möglichkeit dar die Aptamer-Funktion in der Zellkultur oder im Tiermodell zu verifizieren und ist nicht für die klinische Anwendung von Nutzen. Sollte es jedoch in Zukunft gelingen, spezifisch Krebszellen viral zu infizieren, kann auf diese Methodik zurückgegriffen werden. Es wurde bereits mit der Erforschung solcher Ansätze begonnen ^{84, 85}, wobei gezeigt werden konnte, dass diese Vorgehensweise prinzipiell möglich ist.

4.3.2 Einsatz der Protein-Transduktionstechnik zur Evaluation der Aptamer-Funktion

Das Verfahren der Protein-Transduktion ermöglicht es die Peptid-Aptamere rekombinant zu exprimieren und diese als therapeutisches Protein (detailliert in Kap. 4.5 diskutiert) zu applizieren. Allerdings ist dieses System nicht optimiert und bietet verschiedene Ansatzpunkte der Verbesserung. Einige dieser Optimierungspunkte konnten in der vorliegenden Arbeit erfolgreich umgesetzt werden (Kap. 3.4.2). So war es wichtig sicher zu stellen, dass die rekombinanten Peptid-Aptamere, welche für Funktionsanalysen verwendet wurden, nach der Aufreinigung funktional rückgefaltet werden konnten. Die funktionale Rückfaltung konnte zum einen durch die Wahl eines geeigneten Expressionsvektors und zum anderen durch den Austausch der Cysteine im aktiven Zentrum des Trx verbessert werden.

Ein starker Promotor führt dazu, dass die rekombinanten Proteine schnell exprimiert werden. Dadurch können sich intermolekulare Bindungen in nicht vollständig exprimierten Proteinen ausgebildet, welche sich auch durch Denaturierung nicht trennen lassen (persönliche Korrespondenz mit I. Benhar, ⁸⁶). Auf diese Weise wird die funktionale Rückfaltung der Aptamer-Konstrukte während der Dialyse erheblich erschwert. Durch die Verwendung eines Expressionsvektors mit Taq-Promotor wurden die Aptamere im Vergleich zum ursprünglich verwendeten T7-Promotor, langsamer exprimiert. Dies garantierte, dass die Proteine in den Bakterien schon teilweise Sekundär- und Tertiärstrukturen ausbilden konnten und intermolekulare Wechselwirkungen vermieden wurden. Auf diese Weise wird die Rückfaltung während der Dialyse erheblich erleichtert.

Ein weiteres Faltungshindernis stellt die Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken während der Rückfaltung dar. Im leeren Trx Protein können die beiden Cysteine im aktiven Zentrum während der Rückfaltung eine Disulfidbrücke bilden. Dies ist durch die Insertion der 12 bzw. 20 randomisierten Peptide nicht mehr möglich. Die ungebundenen Proteine gehen unter den oxidativen Bedingungen während der Rückfaltung bevorzugt intermolekulare Disulfidbrücken mit anderen Trx-Molekülen ein. Die Folge ist die Bildung hoch-molekularer Proteine, die aggregieren und ausfallen. Durch den Austausch der Cysteine im aktiven Zentrum gegen Serine, konnte der polare Charakter der Aminosäure beibehalten und die Aggregation der Aptamere vermieden werden. Auf diese Weise gelang es einen erhöhten Prozentsatz an funktionalen Aptamer-Monomeren in der aufgereinigten Proteinlösung zu erzielen, wodurch geringere Aptamer-Konzentrationen für die Funktionsanalysen benötigt werden.

Die Insertion von randomisierten Peptiden in das aktive Zentrum des Trx führte dennoch zu einem Expressionsrückgang, im Vergleich zum Trx ohne Aptamere. Dies lässt sich möglicherweise mit dem Abbau der Proteine durch Faltungsschwierigkeiten, oder einer nicht optimalen Kodon-Verwendung der randomisierten Sequenzen erklären. Trotz der auftretenden Schwierigkeiten konnten funktionale Aptamere in ausreichend hohen Konzentrationen für die Funktionsanalyse gewonnen werden.

Nach erfolgreicher Expression und Rückfaltung erfolgte die Protein-Transduktion in Zielzellen mit einer Effizienz von 100%, wie u.a durch Immunofluoreszenzfärbung im CLSM gezeigt wurde. Allerdings müssen die Proteine, um ihren Wirkort im Zytoplasma zu erreichen aus den endozytotischen Vesikeln gelangen. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Vorgang nicht sehr effizient ist, wodurch ein hoher Prozentsatz an transduzierten Proteinen in den Vesikeln verbleibt und lysosomal abgebaut wird. Durch die Zugabe von Chloroquin, einem Inhibitor der vesikulären ATPase, der die Acidifizierung der Vesikel verhindert und schließlich zu deren osmotischem Kollaps führt⁸⁷, kann die Freisetzung der Proteine ins Zytoplasma erhöht werden. Chloroquin wird bereits als Malariamedikament eingesetzt, wobei den Patienten aus Toxizitätsgründen allerdings nur sehr geringe Mengen verabreicht werden. Für eine effektive PT ist jedoch eine tausendfach höhere Dosierung erforderlich als bei der Malariabehandlung verwendet wurde. Somit eignet sich diese Substanz nur um die Effizienz der PT in Versuchen der Zellkultur zu steigern.

Virale Proteine, wie das Influenza Virus Hämagglutinin Protein (HA2) besitzen eine N-terminale Sequenz aus 20 Aminosäuren, die durch pH Werten-Erniedrigung im frühen Endosom aktiviert werden und die Lipidmembran der Vesikel destabilisieren. Diese Peptidsequenz könnte somit als weitere funktionale Domäne in Kombination mit den rekombinanten Aptamer-PTD Proteinen, die Effizienz der Proteinfreisetzung aus endozytotischen Vesikel erhöhen. Dieses Verfahren stellt im Gegensatz zu Chloroquin, eine anwendbare Alternative zur PT-Effizienzsteigerung dar⁷¹.

Die Methodik der Protein-Transduktion wurde bisher hauptsächlich in Zellkulturversuchen verwendet. Es konnte jedoch bereits *in vivo* gezeigt werden, dass sich nach intravenöser Applikation von rekombinanten Proteinen mit PTD in Mäusen, die Proteine in jeglichen Geweben nachweisen lassen⁸⁸. Dadurch können rekombinante Inhibitoren gegen intrazelluläre Zielproteine prinzipiell als Therapeutikum eingesetzt werden. Es sollte jedoch angemerkt werden, dass bei dieser Verwendungsweise grosse Mengen an rekombinatem Protein eingesetzt werden müssen, um am Wirkort eine ausreichend hohe therapeutische Konzentration zu erreichen. Auch hier kann, analog zur viralen Applikationsform, ein spezifisches Erkennungsprotein für Krebszellen verwendet werden, um die Krebszellen bevorzugt zu transduzieren⁸⁹. Generell wird es jedoch eine Herausforderung der Zukunft bleiben jegliche Protein-Therapeutika spezifisch in Krebszellen zu transduzieren, ohne normale Zellen zu beeinflussen. Das Ziel hierbei ist es ein Protein zu identifizieren, welches ausschließlich auf Krebszellen exprimiert wird, unabhängig von der Art des Tumors. Eine mit diesem Protein interagierende Domäne, könnte somit Tumorzellen von gesunden Zellen unterscheiden. Mit einer weiteren Domäne, wie der PTD, wäre es dann möglich in die Tumorzelle zu gelangen, um mit einer dritten Domäne, wie den Peptid-Aptameren, die Tumorzelle in ihrem Wachstum zu inhibieren, oder die Apoptose auszulösen.

Sollte dieses Ziel erreicht werden, lässt sich die Anwendung von Protein-Inhibitoren gegen intrazelluläre Zielstrukturen mit einer wesentlich höheren Effizienz gestalten. Dadurch lässt sich auch die applizierte therapeutische Dosis und die damit entstehenden Nebenwirkungen stark

reduzieren. Hier liegt der grosse Vorteil der rekombinanten Krebstherapie, die es möglich werden lässt, durch die Kombination verschiedener funktionaler Domänen, das Therapeutikum spezifisch an unterschiedlichen Krebsarten anzupassen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit die ersten Schritte auf dem Weg zu einem anwendbaren Protein-Therapeutikum erfolgreich abgeschlossen werden konnten. Es ist gelungen Peptid-Aptamere in ausreichenden Mengen zu exprimieren und aufzureinigen. Diese aufgereinigten Proteine waren nach ihrer Rückfaltung in der Lage durch Protein-Transduktion an ihren Wirkort zu gelangen, um dort mit ErbB2 zu interagieren, was mit Co-Lokalisations- und Co-IP-Studien nachgewiesen werden konnte. Mit dieser Basis konnte die Wirkung der Peptid-Aptamere in Funktionsanalysen untersucht werden.

4.4 Analyse der Aptamer Funktionalitätsuntersuchungen

Mit Hilfe von Funktionsanalysen sollte die Fähigkeit der Peptid-Aptamere überprüft werden, verschiedene Signalkaskaden des ErbB2-Rezeptors zu inaktivieren. Die Problematik hierbei besteht darin, dass ErbB2 nicht einen spezifischen Ligand aktiviert werden kann. Die spezifische ErbB2-abhängige Induktion der Signalkaskaden kann jedoch indirekt durch die Aktivierung eines anderen Mitglieds der ErbB-Familie erfolgen. Diese sind jedoch, wie beispielsweise der EGFR auch in der Lage Homodimere zu bilden, welche die gleichen Signalkaskaden aktivieren wie ErbB2, und somit eine isolierte Betrachtung des ErbB2-Signalweges nicht ermöglichen. Diese Problematik konnte durch zwei Modellsysteme umgangen werden.

Einerseits wurden NIH#3.7 Zellen verwendet die einen konstitutivaktiven ErbB2-Rezeptor exprimieren (Kap. 3.6.1). Die konstitutive Aktivierung von ErbB2 wird mit Hilfe einer Mutation in der Transmembrandomäne erreicht, wodurch ErbB2 in der Lage ist Homodimere zu bilden. Da der ErbB2-Rezeptor sich in einer offenen Konformation auf der Zelloberfläche befindet, führt diese Mutation und die damit verbundene Rezeptor-Dimerisierung, zu einer konstitutiven Aktivierung der ErbB2-spezifischen Signalkaskaden.

Die konstitutive Aktivierung des ErbB2-Rezeptors in diesen Zellen führt zur Transformation der Zellen, wodurch diese ErbB2-abhängig beispielsweise in Weichagar wachsen können. Durch Blockade des ErbB2-Rezeptors lässt sich dieser Phänotyp revertieren. In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft ob durch stabile Aptamer-Expression das Wachstum in Weichagar gehemmt werden kann. Die NIH#3.7 Zellen besitzen außerdem den Vorteil in Nacktmäusen solide Tumore zu bilden, wodurch sich die Möglichkeit bietet die Wirkung der Aptamere in einem ErbB2-spezifischen Tumormodell zu überprüfen. Zu Beginn sollte jedoch die Aptamer-Funktion durch virale Transduktion im Weichagar Versuch analysiert werden. Hierbei zeigte sich, dass sich die NIH#3.7 Zellen nur mit einer 70 prozentigen Effizienz transduzieren ließen. Möglicherweise war aufgrund der relativ geringen Aptamer-Expressionsspiegel kein

wachstumshemmender Effekt der Aptamere im Weichagar zu erkennen. Daher wurde ein Tet-induzierbares Expressionssystem für die stabile Aptamerexpression verwendet, um die Aptamerexpression in jeder Zelle zu ermöglichen und die Aptamer-Expressionsspiegel zu steigern. Hierbei gelang es, Tet-induzierbare NIH#3.7 Zellen durch die stabile Expression des rTA zu generieren. Allerdings konnten in mehrfach modifizierten Ansätzen keine Zellklone isoliert werden, welche die Aptamere stabil und induzierbar exprimierten. Daher war es auch in diesem Versuchssystem nicht möglich eine Aussage über die Funktion der Aptamere zu treffen.

Mittlerweile stehen Tet-induzierbare Vektoren für die lentivirale Transduktion zur Verfügung, wobei sich die virale Transduktion als effiziente Methodik der Aptamer-Applikation bereits bewährt hat. Die induzierbaren NIH#3.7 rTA Zellen könnten damit in Zukunft für Evaluation der Aptamer-Funktion in Mausmodell verwendet werden, sollte es gelingen durch die Induktion eine ausreichend hohe Aptamerexpression zu erreichen.

Für die Versuche in der vorliegenden Arbeit wurde dann ein anderes Modellsystem gewählt, um die Funktion der Aptamere zu evaluieren. Hierbei wurden MCF7 Zellen verwendet, die moderate ErbB2- und ErbB3-Expressionsspiegel aufweisen (Kap. 3.6.2). Der ErbB3-Rezeptor ist aufgrund einer Mutation in der Kinase Domäne nicht in der Lage Tyrosinreste zu phosphorylieren. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass er nach Aktivierung bevorzugt mit ErbB2 interagiert, wodurch es zu einem starken proliferativen und anti-apoptischen Signal über den PI3K/AKT Signalweg in der Zelle kommt. Diese Signalaktivierung kann nur durch die aktive Kinasedomäne von ErbB2 erfolgen. Somit bieten auch MCF7 Zellen eine ideale Voraussetzung zur Analyse der ErbB2-Tyrosinkinase Aktivität. Der ErbB3-Rezeptor kann über Heregulin-1 β spezifisch aktiviert werden, was zu einer starken Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges führt. Auf diese Weise kann über die AKT-Phosphorylierung die ErbB2-Tyrosinkinase Aktivität überprüft werden. Eine deutliche Reduktion ihrer Aktivität konnte sowohl nach Aptamer Transfektion, als auch nach lentiviraler- und Protein-Transduktion nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass Peptid-Aptamere nicht nur nach viraler Transduktion in der Lage sind die Funktion des Rezeptors zu inhibieren, sondern auch funktional aufgereinigt werden können und durch Protein-Transduktion dieser Effekt in der Zelle erreicht werden kann. Dies ist eine wichtige Erkenntnis im Hinblick auf die mögliche therapeutische Verwendung der Aptamere.

In einem weiteren Modellsystem sollte analysiert werden, ob die ErbB2-Inhibition ausreichend ist, um therapeutische Effekte in Krebszellen zu erzielen. MCF7 Zellen sind chemosensitiv gegenüber Zytostatikabehandlung wie Taxol oder Doxorubicin. Durch die stabile Transfektion des ErbB2-Rezeptors und einer daraus resultierenden Überexpression des Rezeptors, werden die Zellen (MCF7 her2) resistent gegenüber der Taxol-Behandlung (Kap. 3.6.3). Die Entwicklung der Taxol-Resistenz ist abhängig von der starken Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges.

Aus diesem Grund stellen die MCF7 her2 Zellen als ideales Zellsystem dar, um zu überprüfen, ob die Transduktion der Peptid-Aptamere eine Resensitivierung dieser Zellen gegenüber der

Taxol-Behandlung hervorruft. So konnte sowohl durch die lentivirale Expression der Aptamere, als auch durch Protein-Transduktion gezeigt werden, dass die isolierten Aptamere in der Lage sind eine Sensitivierung gegenüber Zytostatikabehandlung hervorzurufen.

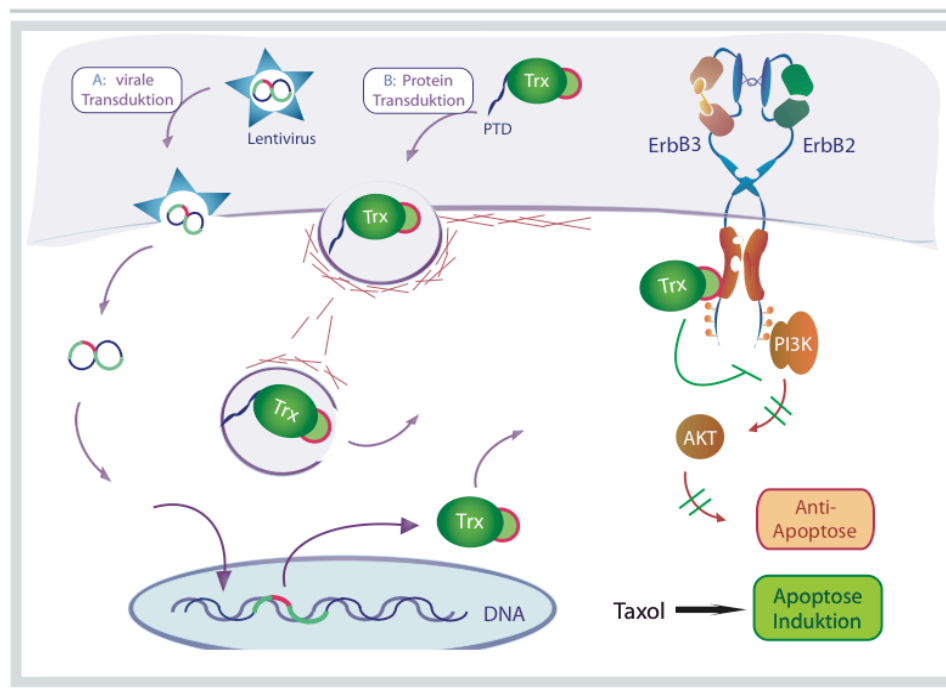


Abb. 4.3 | Wirkungsweise der isolierten Peptid-Aptamere in MCF7 her2 Zellen

Die Peptid-Aptamere werden im Trx-Gerüst präsentiert und können kodiert als DNA mit Hilfe von Lentiviren in die Krebszelle (A) gelangen. Dort wird die Aptamer-DNA stabil in das Genom der Krebszelle integriert, was zur Expression der Aptamere führt. Es besteht auch die Möglichkeit rekombinante Aptamere mit Protein-Transduktionsdomäne (PTD) zu applizieren (B). Die PTD erlaubt es den Aptamern über Macropinozytose an den Wirkort in der Zelle zu gelangen. Dort sind sie in der Lage, die ErbB2-Tyrosinkinasedomäne zu inhibieren, wodurch der PI3K/AKT Signalweges gehemmt wird. Auf diese Weise ist ErbB2 nicht mehr in der Lage die Apoptose-Induktion durch Taxol zu verhindern, und es kommt zum Absterben der Krebszelle.

Der Hauptgrund der schlechten Überlebensprognosen von Patienten mit ErbB2-überexprimierendem Brustkrebs ist die Unwirksamkeit der konventionellen Chemotherapie, welche über Zytostatika-Applikation Apoptose in den Krebszellen auslöst. Wie auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, führt die ErbB2-Überexpression zur Chemoresistenz über Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs. Durch diese Chemoresistenz kann sich der Tumor trotz Chemotherapie ungehindert entwickeln und über Metastasen im ganzen Körper verteilen. Die isolierten Aptamere und im besonderen Aptamer KD II7, ermöglichten durch ErbB2-Inhibition, die Chemoresistenz zu überwinden und die Tumorzellen durch Taxol-Behandlung abzutöten (Abb. 4.3). Sie bieten auf diese Weise einen alternativen therapeutischen Ansatz zu anderen spezifischen ErbB2-Inhibitoren, wie Herceptin und TKIs.

4.5 Weiterführende Überlegungen zur Aptamer-Applikation

Die Untersuchungen der Aptamere in dieser Arbeit wurden in Zellkultursystemen durchgeführt. Es stellt sich nun die Frage, ob ein solches Proteintherapeutikum in einem Organismus verwendet zu werden kann. Modellsysteme, die hierfür als nächsten Schritt verwendet werden könnten, sind ErbB2-abhängige Tumormodelle in der Maus. Obwohl diese Versuche noch nicht durchgeführt wurden, lassen sich Aussagen über pharmakokinetische Parameter wie Halbwertszeit und Gewebepenetration, treffen, indem Ergebnisse der rekombinanten Antikörper Applikation analysiert werden. Antikörper besitzen ein Molekulargewicht von 150 kD und eine hohe Halbwertszeit im Körper. Allerdings konnte gezeigt werden, dass ihre Grösse die Penetration im Gewebe behindert. Für den Einsatz in der gerichteten Tumorthherapie ist eine gute Penetration allerdings von entscheidender Bedeutung. Es wurde untersucht, ob kleinere Antikörperfragmente bessere pharmakokinetische Eigenschaften aufweisen. Antikörper sind aus mehreren Ig-Domänen aufgebaut. Diese Domänen-Struktur erlaubt die Unterteilung der Antikörper in verschiedene Konstrukte unterschiedlicher Grösse, ohne den Antigen-bindenden Charakter zu verlieren^{90, 91}. Die unterschiedlichen Antikörper-Konstrukte wurden radioaktiv markiert und in Mäusen auf ihre Plasmahalbwertszeiten und Tumorkonzentrationen überprüft. Diese Untersuchungen ergaben, dass Proteine mit einer Grösse von 15-20 kD die beste Gewebepenetration besitzen⁹². Bei diesen Antikörperkonstrukten handelt es sich um Nanobodies, die aus der variablen Domäne der schweren Antikörper-Kette bestehen. Die Kopplung dieser Nanobodies mit einem Albumin-bindenden Peptid konnte die Halbwertszeit im Körper stark erhöhen, ohne die guten Werte der Gewebepenetration zu reduzieren. Albumin zirkuliert im Blutkreislauf des Organismus und wird nicht durch die Nieren ausgeschieden, wodurch es eine hohe Halbwertszeit besitzt.

Peptid-Aptamere im Thioedoxingerüst erfüllen mit ihrer Grösse von 20 kD die Anforderungen für eine optimale Gewebepenetration und bilden aus pharmakokinetischen Gesichtspunkten somit eine gute Grundlage für die Applikation in der spezifischen Krebstherapie.

Die Aptamer-Untersuchungen in Zellkultursystemen zeigten, dass trotz des Apoptose-sensitivierendem Effekts der Aptamere, bei einer Kombinationstherapie mit Taxol, nicht alle Tumorzellen abgetötet werden. Es konnte jedoch durch eine Kombinationstherapie verschiedener ErbB2-Inhibitoren, wie z.B. TKI in Kombination mit Herceptin®, gezeigt werden, dass sich additive Effekte der Therapeutika ergeben, obwohl sie das gleiche Onkoprotein als Angriffspunkt haben. Eine Erklärung hierfür bieten die unterschiedlichen Inhibitionspunkte von Herceptin®, der zur Herunterregulation von ErbB2 auf der Zelloberfläche führt und der TKIs, die direkt das aktive Zentrum der ErbB2-Kinasedomäne inhibieren. Mit Aptamer KD II7 konnte dieses Spektrum der ErbB2-Inhibitionspunkte erweitern werden, da es die Kinasedomäne außerhalb des aktiven Zentrums bindet. In weiterführenden Versuchen ist nun zu zeigen, ob sich auch durch die Kombination von TKI, Antikörpern und Aptameren, bessere ErbB2-inhibitorische

Effekte erzielen lassen. Ist dies der Fall, könnte eine ErbB2-spezifische Tumorbehandlung effizienter gestalten werden.

Die Effizienz der Aptamere könnte jedoch auch durch eine zusätzliche funktionale Domäne erhöht werden. Als weitere funktionale Domäne wurde in ersten weiterführenden Versuchen die SOCS-Box von SOCS-1 verwendet. SOCS-Proteine sind für die Degradierung von Jak- und Stat-Proteinen verantwortlich. Sie binden über ihre SH2-Domäne an das Zielprotein und rekrutieren über die SOCS-Box im C-terminalen Teil, den Proteinkomplex ECS (Elongin-B/C, Cullin-5, SOCS-Box) ⁹³. Der ECS-Komplex führt zur Poly-Ubiquitylierung der SOCS-gebundenen Zielproteine und damit zu ihrem proteasomalen Abbau. In weiterführenden Versuchen soll nun gezeigt werden, ob es möglich ist, durch Austausch der SH2-Domäne von SOCS-1 gegen Peptid-Aptamere, die Poly-Ubiquitylierung von Aptamer-Zielproteinen, wie ErbB2, zu initiieren. Ist dies der Fall, wird der ErbB2-Rezeptor durch das Aptamer KD 117 inhibiert und durch die SOCS-Box induzierte Poly-Ubiquitylierung abgebaut. Auf diese Weise wird dem Tumor sein Onkoprotein und damit die Wachstumsgrundlage entzogen.

Im Rahmen der Aufgabenstellung der Doktorarbeit konnten Peptid-Aptamere isoliert werden, die spezifisch mit der Funktion der ErbB2-Tyrosinkinasedomäne interferieren. Hierfür war es notwendig, eine neue Aptamer-Bibliothek zu konstruieren und das Hefe Zwei-Hybrid Screening-System zu optimieren. Die im Screening-System isolierten Aptamere konnten sowohl mit Hilfe lentiviraler Transduktionsmethoden, als auch durch Protein-Transduktion rekombinanter Proteine, effizient in humane Krebszellen eingebracht werden. Diese Verfahren ermöglichten die Interaktion der Aptamere mit ErbB2 *in vivo* zu bestätigen und durch Funktionsanalysen den Wirkungsmechanismus der Aptamere zu evaluieren. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass insbesondere Aptamer KD 117 in der Lage ist, den PI3K/AKT-Signalweg effizient zu inhibieren. Durch die Inhibition dieses Signalweges, war es möglich, chemoresistente Brustkrebszellen für eine Taxol-Behandlung zu sensitivieren und damit den induzierten Zelltod auszulösen. In weiteren Analysen sollte durch die Kombination der Aptamere mit verschiedenen ErbB2-Inhibitoren untersucht werden, ob additive therapeutische Effekte zu beobachten sind. Ferner könnte die inhibitorische Wirkung der Aptamere durch eine zusätzliche Domäne wie der SOCS-Box gesteigert werden.

Literaturverzeichnis

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70. (2000).
2. Klapper, L. N., Kirschbaum, M. H., Sela, M. & Yarden, Y. Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. *Adv Cancer Res* 77, 25-79 (2000).
3. Riese, D. J. & Stern, D. F. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* 20, 41-8. (1998).
4. Singh, A. B. & Harris, R. C. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal* 17, 1183-93 (2005).
5. Ogiso, H. et al. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 110, 775-87. (2002).
6. Garrett, T. P. et al. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell* 11, 495-505. (2003).
7. Burgess, A. W. et al. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 12, 541-52 (2003).
8. Ferguson, K. M., Darling, P. J., Mohan, M. J., Macatee, T. L. & Lemmon, M. A. Extracellular domains drive homo- but not hetero-dimerization of erbB receptors. *Embo J* 19, 4632-43 (2000).
9. Citri, A., Skaria, K. B. & Yarden, Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res* 284, 54-65 (2003).
10. Huse, M. & Kuriyan, J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 109, 275-82 (2002).
11. Stamos, J., Sliwkowski, M. X. & Eigenbrot, C. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J Biol Chem* 277, 46265-72 (2002).
12. Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A. & Hynes, N. E. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Embo J* 19, 3159-67. (2000).
13. Yang, H. Y., Zhou, B. P., Hung, M. C. & Lee, M. H. Oncogenic signals of HER-2/neu in regulating the stability of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *J Biol Chem* 275, 24735-9. (2000).
14. Cheng, M., Sexl, V., Sherr, C. J. & Roussel, M. F. Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1091-6. (1998).
15. Olayioye, M. A., Beuvink, I., Horsch, K., Daly, J. M. & Hynes, N. E. ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *J Biol Chem* 274, 17209-18. (1999).
16. Toker, A. Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Mol Pharmacol* 57, 652-8. (2000).
17. Harari, D. & Yarden, Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* 19, 6102-14. (2000).
18. Jang, I. H. et al. Localization of phospholipase C-gamma signaling in caveolae: importance in EGF-induced phosphoinositide hydrolysis but not in tyrosine phosphorylation. *FEBS Lett* 491, 4-8. (2001).
19. Ohta, T. & Fukuda, M. Ubiquitin and breast cancer. *Oncogene* 23, 2079-88 (2004).
20. De Melker, A. A., Van Der Horst, G. & Borst, J. c-Cbl directs EGF receptors into an endocytic pathway that involves the ubiquitin-interacting motif of Eps15. *J Cell Sci* 117, 5001-12 (2004).
21. Haglund, K., Shimokawa, N., Szymkiewicz, I. & Dikic, I. Cbl-directed monoubiquitination of CIN85 is involved in regulation of ligand-induced degradation of EGF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12191-6 (2002).
22. Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-25. (2000).
23. Xu, W. et al. Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c-ErbB2/Neu. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12847-52 (2002).
24. Jiang, J. et al. CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation. *J Biol Chem* 276, 42938-44 (2001).
25. Cyr, D. M., Hohfeld, J. & Patterson, C. Protein quality control: U-box-containing E3 ubiquitin ligases join the fold. *Trends Biochem Sci* 27, 368-75 (2002).
26. Nikolay, R. et al. Dimerization of the human E3 ligase CHIP via a coiled-coil domain is essential for its activity. *J Biol Chem* 279, 2673-8 (2004).
27. Fiorentino, L. et al. Inhibition of ErbB-2 mitogenic and transforming activity by RALT, a mitogen-induced signal transducer which binds to the ErbB-2 kinase domain. *Mol Cell Biol* 20, 7735-50. (2000).
28. Anastasi, S. et al. Loss of RALT/MIG-6 expression in ERBB2-amplified breast carcinomas enhances ErbB-2 oncogenic potency and favors resistance to Herceptin. *Oncogene* 24, 4540-8 (2005).
29. Lee, K. F. et al. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 378, 394-8 (1995).
30. Gassmann, M. et al. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* 378, 390-4 (1995).

31. Hynes, N. E. & Stern, D. F. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1198, 165-84 (1994).
32. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-57 (2000).
33. Downward, J. et al. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 307, 521-7. (1984).
34. Porter, A. C. & Vaillancourt, R. R. Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis. *Oncogene* 17, 1343-52. (1998).
35. Slamon, D. J. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177-82. (1987).
36. Hoffmann, M., Schmidt, M. & Wels, W. Activation of EGF receptor family members suppresses the cytotoxic effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cancer Immunol Immunother* 47, 167-75 (1998).
37. Yamauchi, T. et al. Constitutive tyrosine phosphorylation of ErbB-2 via Jak2 by autocrine secretion of prolactin in human breast cancer. *J Biol Chem* 275, 33937-44 (2000).
38. Samanta, A., LeVea, C. M., Dougall, W. C., Qian, X. & Greene, M. I. Ligand and p185c-neu density govern receptor interactions and tyrosine kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1711-5 (1994).
39. Dowdy, S. C., Mariani, A. & Janknecht, R. HER2/Neu- and TAK1-mediated up-regulation of the transforming growth factor beta inhibitor Smad7 via the ETS protein ER81. *J Biol Chem* 278, 44377-84 (2003).
40. Shi, Y. & Massague, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685-700 (2003).
41. Downward, J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* 10, 262-7. (1998).
42. Vasudevan, K. M., Gurumurthy, S. & Rangnekar, V. M. Suppression of PTEN expression by NF-kappa B prevents apoptosis. *Mol Cell Biol* 24, 1007-21 (2004).
43. Feng, B. et al. NF-kappaB inducible genes BCL-X and cyclin E promote immature B-cell proliferation and survival. *Cell Immunol* 232, 9-20 (2004).
44. Burgering, B. M. & Kops, G. J. Cell cycle and death control: long live Forkheads. *Trends Biochem Sci* 27, 352-60 (2002).
45. Knuefermann, C. et al. HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncogene* 22, 3205-12 (2003).
46. Goueli, B. S. & Janknecht, R. Upregulation of the Catalytic Telomerase Subunit by the Transcription Factor ER81 and Oncogenic HER2/Neu, Ras, or Raf. *Mol Cell Biol* 24, 25-35 (2004).
47. Saucier, C. et al. The Shc adaptor protein is critical for VEGF induction by Met/HGF and ErbB2 receptors and for early onset of tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004).
48. Lai, K. M. & Pawson, T. The ShcA phosphotyrosine docking protein sensitizes cardiovascular signaling in the mouse embryo. *Genes Dev* 14, 1132-45 (2000).
49. Zhong, X. S., Zheng, J. Z., Reed, E. & Jiang, B. H. SU5416 inhibited VEGF and HIF-1alpha expression through the PI3K/AKT/p70S6K1 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 324, 471-80 (2004).
50. Rosen, L. S. Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. *Cancer Control* 9, 36-44 (2002).
51. Marone, R. et al. Memo mediates ErbB2-driven cell motility. *Nat Cell Biol* 6, 515-22 (2004).
52. Bosc, D. G., Goueli, B. S. & Janknecht, R. HER2/Neu-mediated activation of the ETS transcription factor ER81 and its target gene MMP-1. *Oncogene* 20, 6215-24 (2001).
53. Shepard, H. M. et al. Monoclonal antibody therapy of human cancer: taking the HER2 protooncogene to the clinic. *J Clin Immunol* 11, 117-27. (1991).
54. Klapper, L. N., Waterman, H., Sela, M. & Yarden, Y. Tumor-inhibitory antibodies to HER-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2. *Cancer Res* 60, 3384-8 (2000).
55. Pietras, R. J., Pegram, M. D., Finn, R. S., Maneval, D. A. & Slamon, D. J. Remission of human breast cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 receptor and DNA-reactive drugs. *Oncogene* 17, 2235-49. (1998).
56. Baselga, J. et al. Future options with trastuzumab for primary systemic and adjuvant therapy. *Semin Oncol* 31, 51-7 (2004).
57. Repka, T. et al. Trastuzumab and interleukin-2 in HER2-positive metastatic breast cancer: a pilot study. *Clin Cancer Res* 9, 2440-6 (2003).
58. Sordella, R., Bell, D. W., Haber, D. A. & Settleman, J. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* 305, 1163-7 (2004).
59. Citri, A. et al. Drug-induced ubiquitylation and degradation of ErbB receptor tyrosine kinases: implications for cancer therapy. *Embo J* 21, 2407-17 (2002).
60. Hoppe-Seyler, F. & Butz, K. Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine. *J Mol Med* 78, 426-30 (2000).

61. Smith, A. D., Arnold, E. & Arnold, G. F. Protein engineering to create biologically active peptides: recombinant human rhinoviruses that display peptide sequences. *Behring Inst Mitt*, 229-39. (1997).
62. Holmgren, A., Soderberg, B. O., Eklund, H. & Branden, C. I. Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 2305-9. (1975).
63. Holmgren, A. Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure* 3, 239-43. (1995).
64. Wadia, J. S., Stan, R. V. & Dowdy, S. F. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med* 10, 310-5 (2004).
65. Butz, K., Denk, C., Ullmann, A., Scheffner, M. & Hoppe-Seyler, F. Induction of apoptosis in human papillomaviruspositive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6693-7. (2000).
66. Colas, P. & Brent, R. The impact of two-hybrid and related methods on biotechnology. *Trends Biotechnol* 16, 355-63. (1998).
67. Hackel, P. O., Gishizky, M. & Ullrich, A. Mig-6 is a negative regulator of the epidermal growth factor receptor signal. *Biol Chem* 382, 1649-62. (2001).
68. Makkinje, A. et al. Gene 33/Mig-6, a transcriptionally inducible adapter protein that binds GTP-Cdc42 and activates SAPK/JNK. A potential marker transcript for chronic pathologic conditions, such as diabetic nephropathy. Possible role in the response to persistent stress. *J Biol Chem* 275, 17838-47 (2000).
69. Fiorini, M. et al. Expression of RALT, a feedback inhibitor of ErbB receptors, is subjected to an integrated transcriptional and post-translational control. *Oncogene* 21, 6530-9. (2002).
70. Jin, J. et al. Crystal structure of the catalytic domain of a human thioredoxin-like protein. *Eur J Biochem* 269, 2060-8 (2002).
71. Wadia, J. S. & Dowdy, S. F. Modulation of cellular function by TAT mediated transduction of full length proteins. *Curr Protein Pept Sci* 4, 97-104 (2003).
72. Wadia, J. S. & Dowdy, S. F. Protein transduction technology. *Curr Opin Biotechnol* 13, 52-6 (2002).
73. Ho, A., Schwarze, S. R., Mermelstein, S. J., Waksman, G. & Dowdy, S. F. Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential in vitro and in vivo. *Cancer Res* 61, 474-7 (2001).
74. Ishibashi, M., Sakashita, K., Tokunaga, H., Arakawa, T. & Tokunaga, M. Activation of halophilic nucleoside diphosphate kinase by a non-ionic osmolyte, trimethylamine N-oxide. *J Protein Chem* 22, 345-51 (2003).
75. Uherek, C., Fominaya, J. & Wels, W. A modular DNA carrier protein based on the structure of diphtheria toxin mediates target cell-specific gene delivery. *J Biol Chem* 273, 8835-41 (1998).
76. Salido, M. et al. Polysomy of chromosome 17 in breast cancer tumors showing an overexpression of ERBB2: a study of 175 cases using fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Breast Cancer Res* 7, R267-73 (2005).
77. Chene, P. Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 102-9 (2003).
78. Xu, X. et al. Dominant effector genetics in mammalian cells. *Nat Genet* 27, 23-9. (2001).
79. Nagel-Wolfrum, K. et al. The interaction of specific peptide aptamers with the DNA binding domain and the dimerization domain of the transcription factor Stat3 inhibits transactivation and induces apoptosis in tumor cells. *Mol Cancer Res* 2, 170-82 (2004).
80. Hyland, S., Beerli, R. R., Barbas, C. F., Hynes, N. E. & Wels, W. Generation and functional characterization of intracellular antibodies interacting with the kinase domain of human EGF receptor. *Oncogene* 22, 1557-67 (2003).
81. Parker, L. L., Walter, S. A., Young, P. G. & Piwnicka-Worms, H. Phosphorylation and inactivation of the mitotic inhibitor Wee1 by the nim1/cdr1 kinase. *Nature* 363, 736-8 (1993).
82. Li, C. C., Dai, R. M. & Longo, D. L. Inactivation of NF-kappa B inhibitor I kappa B alpha: ubiquitin-dependent proteolysis and its degradation product. *Biochem Biophys Res Commun* 215, 292-301 (1995).
83. Pandolfi, P. P. Breast cancer--loss of PTEN predicts resistance to treatment. *N Engl J Med* 351, 2337-8 (2004).
84. Haynes, C. & Schnierle, B. S. Retroviral vector targeting through insertion of epidermal growth factor into receptor binding deficient influenza A hemagglutinin results in fusion defective particles. *J Virol Methods* 120, 189-99 (2004).
85. Thaler, S., Burger, A. M., Schulz, T. & Schnierle, B. S. MLV/HIV-pseudotyped vectors: a new treatment option for cutaneous T cell lymphomas. *Mol Ther* 8, 756-61 (2003).
86. Shaki-Loewenstein, S., Zfania, R., Hyland, S., Wels, W. S. & Benhar, I. A universal strategy for stable intracellular antibodies. *J Immunol Methods* 303, 19-39 (2005).

87. Erbacher, P., Roche, A. C., Monsigny, M. & Midoux, P. Putative role of chloroquine in gene transfer into a human hepatoma cell line by DNA/lactosylated polylysine complexes. *Exp Cell Res* 225, 186-94 (1996).
88. Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A. & Dowdy, S. F. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285, 1569-72 (1999).
89. Maurer-Gebhard, M. et al. Systemic treatment with a recombinant erbB-2 receptor-specific tumor toxin efficiently reduces pulmonary metastases in mice injected with genetically modified carcinoma cells. *Cancer Res* 58, 2661-6 (1998).
90. Kenanova, V. et al. Tailoring the pharmacokinetics and positron emission tomography imaging properties of anti-carcinoembryonic antigen single-chain Fv-Fc antibody fragments. *Cancer Res* 65, 622-31 (2005).
91. Sundaresan, G. et al. ¹²⁴I-labeled engineered anti-CEA minibodies and diabodies allow high-contrast, antigen-specific small-animal PET imaging of xenografts in athymic mice. *J Nucl Med* 44, 1962-9 (2003).
92. Cortez-Retamozo, V. et al. Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. *Cancer Res* 64, 2853-7 (2004).
93. Kile, B. T. et al. The SOCS box: a tale of destruction and degradation. *Trends Biochem Sci* 27, 235-41 (2002).

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und dass keine weiteren Hilfsmittel und Quellen als die hier aufgeführten verwendet worden sind. Die Arbeit hat in gleicher Weise noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Frankfurt am Main, Oktober 2005

(Christian Kunz)

Curriculum Vitae

Christian Kunz
Kleyerstrasse 120
60326 Frankfurt am Main

Tel. 0176/23220432
Christian.Kunz@gmx.at

Date of Birth: at 31.12.1975 in Ludwigshafen a. Rh., Germany
unmarried



Education

1.12.2001-1.12.2002	PhD-student speaker at the Georg-Speyer-Haus	
since May 2001	PhD student at the Georg-Speyer-Haus in Frankfurt in group of Prof. Dr. Bernd Groner; title of the thesis: „Peptide Aptamers as potential inhibitors of the ErbB2 Receptor tyrosine kinase“	
1.10.2001-1.4.2002	Master thesis (Diplomarbeit) at the Georg-Speyer-Haus in Frankfurt in the group of Bernd Groner: „Peptide Aptamers: Specific Interaction partners of the EGFR Family“	
	Degree of study: Diplom-Biochemiker	Mark: 1
06.04.2001	Master (Diplomprüfungen): Biochemistry	Mark: 1
	Biophysical Chemistry	Mark: 1
	Pharmacology	Mark: 1
01.10.1998	Bachelor (Vordiplom): Biochemistry	Mark: 1
	Biophysical Chemistry	Mark: 2
	Organic Chemistry	Mark: 1
01.10.1996	Study of Biochemistry at the Johann-Wolfgang-Goethe University in Frankfurt am Main, Germany	
1986-1995	„Abitur“ at the Paul von Denis Gymnasium, Schifferstadt	Mark: 2,5

Languages

German: native
English: fluent
French: basic knowledge

Other abilities

Handling of Apple and Microsoft operating systems, MS Office
Illustration und Picture processing with Adobe Photoshop and Illustrator

Personal activities and interests

Sports: soccer, tennis/badminton, running
 Hobbies: drawing, reading, listening to music, traveling

Publications

Buerger, Nagel-Wolfrum, Kunz, Wittig, Butz, Hoppe-Seyler, Groner: Sequence-specific peptide aptamers, interacting with the intracellular domain of the epidermal growth factor receptor, interfere with Stat3 activation and inhibit the growth of tumor cell; JBC, 2003 Sep. 26, Vol. 278(39): 37610-21

Kunz, Borghouts, Groner: Peptide Aptamers: Recent Developments for Cancer Therapy; Exp.Op.Mol.Biol., 2005 Jun; 5(6): 783-97

Borghouts, Kunz, Groner: Current strategies for the development of peptide-based anti-cancer therapeutics; J Pept Sci; 2005 Sep; 11(11): 713-726

Kunz, Borghouts, Buerger, Groner: Peptide Aptamers sensitize chemo-resistant breast cancer cells for Taxol therapy by inhibiting the ErbB2 receptor; Mol Cancer Res; 2005, submitted

Congresses and Conferences

08.11.-10.11.2001	Signal-Transduction-Society Meeting, Weimar: "Signal Transduction, Receptors, Mediators and Genes"
20.04-23.04.2002	EMBL/Salk/FEBS Conference, Heidelberg: " Signaling and Cancer"
25.03.-28.03.2003	Deutsche Krebshilfe e.V., Würzburg: "12 th International AEK Cancer Congress"
18.08-29.08.2003	FEBS/ EMBO advanced lecture courses, Spetses, Greece: "Molecular Mechanisms in Signal Transduction"
17.04-20.4.2004	EMBL/Salk/EMBO Conference, Heidelberg: "Oncogenes and Growth Control"
17.02.-22.02.2005	Keystone Meeting, Santa Fe, USA: „Antibody-based Therapeutics for Cancer“
13.03.-16.03.2005	Deutsche Krebshilfe e.V., Würzburg: „13 th International AEK Cancer Congress"

Additional Education

09.09.-10.09.2002	Carles River Laboratories, Workshop in Frankfurt: "Basic techniques for mouse model experiments"
31.03.-01.04.2002	Carles River Laboratories, Workshop in Frankfurt: "Continuation course for mouse model experiments"
03.02.-04.02.2003	Leica Microsystems, Workshop in Bensheim: "Basic course of confocal microscopy"

Frankfurt am Main, 11.10.05