

Generierung ID1-spezifischer Peptid-Aptamere und si/shRNAs zur Unterdrückung der onkogenen Wirkung von ID1

vorgelegt von
Diplom-Ingenieur
Demissew Sheneglegn Mern

Von der Fakultät III - Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Ingenieurwissenschaften
- Dr.-Ing. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. U. Szewzyk

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. H. Görisch

Prof. Dr. rer. nat. R. Lauster

Dr. med. J. Hasskarl

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 13.02.2007

Berlin 2007

D 83

1	Einleitung	5
1.1	ID-Proteine als Mitglieder der Familie der Helix-Loop-Helix-Proteine	5 5
1.2	ID-Proteine und Tumorigenese	7
1.2.1	Zusammenhang zwischen ID-Proteinen und Tumorigenese.....	7
1.2.2	Phänotypische Veränderungen der Zelle durch ID-Proteine	11
1.2.3	Effekte der transgenen Expression von ID-Proteinen in Mäusen	12
1.2.4	Gezielte Inaktivierung der <i>ID</i> -Gene in Mäusen.....	13
1.3	ID-Proteine als attraktives Ziel für die Krebstherapie	16
1.3.1	Inhibition der ID-Proteine mittels Peptid-Aptamere.....	16
1.3.1.1	Screening von ID-spezifischen Peptid-Aptameren mittels des Yeast- Two-Hybrid-Systems.....	17
1.3.1.2	Charakterisierung von Peptid-Aptameren mittels des Mammalian-Two-Hybrid-Systems	20
1.3.2	siRNA als spezifischer Inhibitor der <i>ID</i> -Genexpression.....	22
1.4	Aufgabenstellung	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Chemikalien	25
2.2	Geräte	27
2.3	Verbrauchsmaterialien	28
2.4	Enzyme.....	29
2.5	Kits zur Bearbeitung von DNA und Protein	29
2.6	Proteine, Proteaseinhibitoren und Proteinstandards.....	30
2.7	Mikroorganismen	30
2.7.1	<i>Escherichia coli</i>	30
2.7.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
2.7.3	Zelllinien.....	31
2.8	Oligonukleotide	31
2.8.1	Primer	31
2.8.2	siRNA- und shRNA-Oligonukleotide.....	33
2.9	Vektoren und Plasmidkonstrukte	34
2.9.1	Vektoren und DNA-Standards.....	34
2.9.2	Plasmidkonstrukte	35
2.10	Antiseren	37
2.11	Molekularbiologische Methoden.....	38
2.11.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> -Stämmen.....	38
2.11.2	Präparation elektrokompenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	39
2.11.3	Präparation CaCl ₂ -kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	39
2.11.4	Transformation elektrokompenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	39
2.11.5	Transformation von CaCl ₂ -kompetenten <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	40
2.11.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	40
2.11.7	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	41
2.11.8	Agarose-Gelelektrophorese	41

2.11.9	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	41
2.11.10	Alkalische Phosphatase-Behandlung	42
2.11.11	Kinase-Reaktion	42
2.11.12	Annealing von Oligonukleotiden (si/shRNA)	42
2.11.13	Ligation von DNA-Fragmenten	43
2.11.14	Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels PCR	43
2.11.15	TOPO TA PCR-Klonierung und Blunt TOPO PCR-Klonierung	44
2.11.16	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	44
2.11.17	Sequenzierung von Plasmid-DNA	44
2.12	Yeast-Two-Hybrid-Methoden	45
2.12.1	Medien und Wachstumsbedingungen von <i>S. cerevisiae</i>	45
2.12.2	Präparation LiAc-kompetenter Hefe und Plasmidtransformation	46
2.12.3	Transformation der Peptid-Aptamer-Library in <i>S. cerevisiae</i>	47
2.12.4	Wachstumstest der Two-Hybrid-Transformanten	48
2.12.5	X-Gal-Assay der Two-Hybrid-Transformanten	48
2.12.6	Zellaufschluss nach Yaffe und Schatz	49
2.12.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	49
2.13	Zellbiologische Methoden	50
2.13.1	Medien und Wachstumsbedingungen	50
2.13.2	Zellzählung mit dem Trypanblau-Ausschlusstest	50
2.13.3	Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen	51
2.13.4	Transfektion von Plasmid-DNA oder siRNA in Eukaryoten-Zellen	51
2.13.4.1	Transfektion von Zelllinien nach der Lipofektamin-Methode	52
2.13.4.2	Transfektion von Zelllinien nach der Calcium-Phosphat-Methode	52
2.13.5	Fluoreszenz-Mikroskopie	53
2.13.6	Herstellung von Zellextrakten für Western-Blot	53
2.13.7	Herstellung von Zellextrakten für β -Gal- und Luciferase-Assay	54
2.14	Proteinbiochemische Methoden	55
2.14.1	Proteinbestimmung nach Bradford	55
2.14.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
2.14.3	Anfärbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Blue	56
2.14.4	Western-Blot-Analyse	57
2.14.5	„Strippen“ von Nitrocellulosemembranen	58
2.14.6	Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität in Zellextrakten	58
2.14.7	Bestimmung der Luciferase-Aktivität in Zellextrakten	59
3	Ergebnisse	60
3.1	Screening von mit ID1 interagierenden Peptid-Aptameren mittels des Yeast-Two-Hybrid-Systems	60
3.1.1	Klonierung der cDNAs von <i>ID1-4</i> in Hefe-Expressionsvektoren	60
3.1.2	Transformation der Fusionsplasmide und Untersuchung der autonomen Aktivierung der Reportergene	61
3.1.3	Transformation der Peptid-Aptamer-Expressionsbanken und Isolierung von positiven Klonen	63
3.1.4	Verifizierung der Interaktion der Peptid-Aptamere mit ID1	65
3.1.5	Interaktionsanalyse der isolierten Peptid-Aptamere mit ID2 und ID3	68
3.1.6	Zusammenfassung des Yeast-Two-Hybrid-Library-Screenings	71
3.2	Verifizierung der Peptid-Aptamer/ID-Protein-Interaktion mittels des Mammalian-Two-Hybrid-Systems	72
3.2.1	Klonierung der cDNAs von <i>ID1-4</i> in den Vektor pBIND	72
3.2.2	Klonierung der cDNAs der Peptid-Aptamere in den Vektor pACT	73
3.2.3	Nachweis der Interaktionen zwischen ID1 und Peptid-Aptameren in humanen Zellen	75
3.2.4	Nachweis der Interaktionen zwischen ID3 und Peptid-Aptameren	76
3.2.5	Nachweis der Interaktionen zwischen ID2 und Peptid-Aptameren	77
3.2.6	Nachweis der Interaktionen zwischen ID4 und Peptid-Aptameren	79

3.2.7	Zusammenfassung der Mammalian-Two-Hybrid-Untersuchungen.....	81
3.3	Gezielte Expression und funktionelle Untersuchungen der Peptid-Aptamere in humanen Zellen	82
3.3.1	Generierung der Peptid-Aptamer-Fusionskonstrukte	82
3.3.2	Expression von rekombinanten Peptid-Aptameren mit der Proteintransduktionsdomäne VP22 in <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	85
3.4	Inhibition der ID1-Expression mittels siRNA.....	86
3.4.1	Verminderung der ID1-Expression durch siRNA/shRNA.....	86
3.5	Überexpression von S5A und Untersuchung der endogenen ID1-Expression	88
3.6	Analyse von Interaktionen der Peptid-Aptamere mit S5A.....	89
4	Diskussion	91
4.1	Isolierung der mit ID-Proteinen interagierenden Peptid-Aptamere	91
4.2	Interaktionen zwischen den Peptid-Aptameren und ID-Proteinen in humanen Zellen	93
4.3	Zelluläre Lokalisation der Peptid-Aptamere zur funktionalen Analyse in	95
4.3.1	Einschleusung der Peptid-Aptamere in humane Zellen durch Proteintransduktion.....	95
4.3.2	Expression der selektierten Peptid-Aptamere in humanen Zellen	99
4.4	siRNA-induzierte Verminderung der <i>ID1</i> -Genexpression.....	100
4.5	Ektopische Expression von S5A und Untersuchung der endogenen ID1-Expression.....	101
4.6	Interaktionsanalyse zwischen den Peptid-Aptameren und S5A in humanen Zellen	102
4.7	Ausblick	103
5	Zusammenfassung	105
6	Summary	107
7	Literaturverzeichnis	109
8	Abkürzungsverzeichnis	120
9	Anhang	124
9.1	Danksagung.....	124
9.2	Eidesstattliche Erklärung.....	125

1 Einleitung

1.1 ID-Proteine als Mitglieder der Familie der Helix-Loop-Helix-Proteine

Zahlreiche Proteine, die in zelluläre Proliferation, Differenzierung und Onkogenese involviert sind, enthalten eine Helix-Loop-Helix (HLH)-Domäne. Diese wurde zuerst als eine hochgradig konservierte homologe Region im muskelspezifischen Transkriptionsfaktor MyoD, im Onkoprotein c-Myc und im Produkt des proneuralen Gens „*achaete-scute*“ der *Drosophila* identifiziert.¹⁻² Die hochkonservierte HLH-Region bildet zwei amphipathische α -Helices, jede ca. 15-20 Aminosäuren lang, getrennt durch einen kurzen Loop, variabel in Länge und Sequenz. Die HLH-Region ist für die Dimerisierung verantwortlich und erlaubt die Bildung von homodimeren oder heterodimeren Komplexen zwischen den verschiedenen Mitgliedern der Familie der HLH-Proteine. Die HLH-Domäne ist einer Region mit vielen basischen Aminosäuren (DNA-Bindung-Erkennungssequenz) benachbart, die die Bindung an eine spezifische Hexanukleotid-Sequenz der DNA (E-Box: CANNTG) ermöglicht. Die E-Box ist ein Motiv, das in Promotoren zahlreicher Gene, deren Transkription von HLH-Proteinen reguliert wird, vorhanden ist.³⁻⁸ Nach der Dimerisierung binden die HLH-Proteine mit ihren basischen Erkennungssequenzen an eine spezifische E-Box.

Basierend auf ihren Strukturen, Interaktionseigenschaften und Expressionsmustern sind HLH-Proteine in vier Gruppen (Klasse A-D) klassifiziert.¹ Die positiv wirkenden HLH-Transkriptionsfaktoren der Klassen A-C, die basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)-Proteine, verfügen über eine N-terminale und eine zentrale Transkriptions-Aktivierungsdomäne (AD1 und AD2), eine Helix-Loop-Helix-Domäne, die für die Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich sind, und über eine C-terminale basische DNA-Bindungsdomäne.

Die ubiquitär exprimierten bHLH-Proteine der Klasse A, bekannt als E-Protein-Transkriptionsfaktoren (E2A, E2-2, E2-5, E12), sind in der Lage zu homodimerisieren und mit anderen bHLH-Proteinen der Klasse A oder mit gewebespezifisch exprimierten bHLH-Proteinen der Klasse B [MYOD (in Muskeln) und NEUROD (in Nerven)] zu heterodimerisieren, um die Transkription eines Gens zu aktivieren (s. Abb.1). Die bHLH-Proteine der Klasse B können keine Homodimere bilden. Sie benötigen zur Bildung eines aktiven Heterodimers die Anwesenheit der bHLH-Proteine der Klasse A.¹⁻⁵ Zu den bHLH-Proteinen der Klasse C, die angrenzend an ihrer HLH-Domäne Leucizipper-Domänen enthalten⁷, gehören Proteine des MYC-Netzwerks⁸⁻¹³, USF, TFE3 und TFEB.¹⁴⁻¹⁶

Die Leucizzipper-Domäne ist wie die HLH-Domäne an der Dimerisierung beteiligt. Die zu den HLH-Proteinen der Klasse D gehörenden ID-Proteine (ID: Inhibitor der DNA-Bindung/Differenzierung) sind Inhibitoren der bHLH-Transkriptionsfaktoren, die die Entwicklung und Differenzierung vieler Gewebe regulieren.

In Wirbeltieren gibt es vier bekannte ID-Proteine (ID1-4) mit einem Molekulargewicht zwischen 13-18 kDa. ID-Proteine verfügen über vergleichbare Bindungsaffinitäten zu den verschiedenen bHLH-Transkriptionsaktivatoren. Sie enthalten innerhalb ihrer HLH-Domänen hohe, außerhalb ihrer HLH-Domänen jedoch nur geringe Sequenzhomologien und zeigen unterschiedliche, zum Teil überlappende Expressionsmuster. Im Gegensatz zu den bHLH-Proteinen besitzen die negativ wirkenden ID-Proteine keine basische DNA-Bindungsdomäne. Sie bilden mit den bHLH-Proteinen der Klassen A und B DNA-bindungsinkompetente Heterodimere und verhindern damit die Bildung transkriptionsaktiver Homo- oder Heterodimere von bHLH-Proteinen und deren Bindung an ihre Promotor-Erkennungssequenzen CANNTG (E-Box).¹⁻⁵ Deshalb werden ID-Proteine auch als dominant negative Regulatoren bezeichnet. Von den vielen mit ID-Proteinen interagierenden Proteinen sind die Interaktionen mit den ubiquitär exprimierten bHLH-Proteinen der Klasse A am besten charakterisiert. So wird beispielsweise der funktionelle Verlust von bHLH-Proteinen der Klasse A partiell durch den Verlust von ID1 kompensiert.⁶ ID-Proteine können weder mit bHLH-Proteinen der Klasse C noch mit sich selbst dimerisieren.¹⁷⁻¹⁹

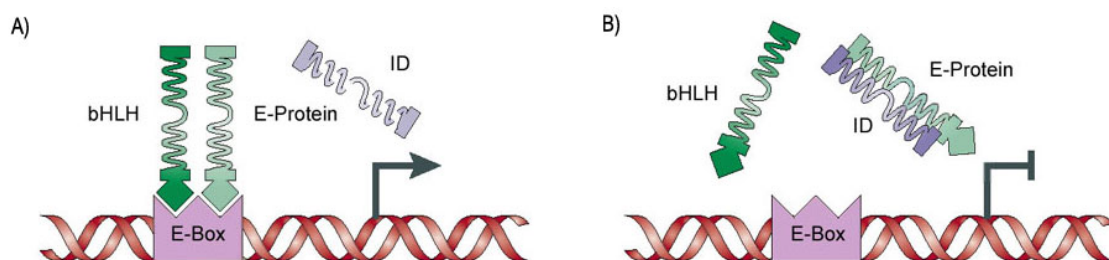


Abb. 1.1 Transkriptionelle Repression durch ID-Proteine

A) Die ubiquitär exprimierten basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)-E-Protein-Transkriptionsfaktoren aktivieren die Transkription durch die Bindung am Promotor E-Box als E-Protein-E-Protein-Homodimere (in Abb. nicht gezeigt) oder als Heterodimere zwischen E-Proteinen und gewebespezifischen bHLH-Proteinen. B) Die Helix-Loop-Helix (HLH)-ID-Proteine (ID: Inhibitor der DNA-Bindung), die keine basische DNA-Bindungsdomäne besitzen, inhibieren die Aktivierung der Transkription. Die Bildung der ID-Protein-E-Protein-Heterodimere verhindert, dass die E-Proteine einen DNA-bindenden transkriptionsaktiven Komplex bilden. Um den Übergang von A zu B zu verhindern, ist die Inhibition oder verminderte Expression der ID-Proteine notwendig. (Die Abbildung ist modifiziert nach Perk, J. *et al.*²⁰)

Als regulatorische Proteine spielen die ID-Proteine in mehreren Entwicklungs- und Zellvorgängen eine wichtige Rolle. Sie inhibieren neben den bHLH-Proteinen auch andere Transkriptionsfaktoren, die nicht zu den bHLH-Proteinen gehören. Die Daten der genetischen Experimente zeigen, dass ID-Proteine mit ETS-Transkriptionsfaktoren (ETS1, ETS2)

assoziiieren und deren Transkriptionsaktivitäten entgegenwirken können.²¹ Die Interaktion der ID-Proteine mit den ETS-Proteinen führt durch Inhibition der ETS-induzierten Expression des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors INK4a (p16/CDKN2A) zu einer erhöhten Phosphorylierung des Retinoblastoma-Tumorsuppressorproteins (pRB) und zur Zellproliferation.²¹ Die direkte Interaktion von ID2 mit pRB und die Daten der genetischen Analyse zeigen, dass pRB die Aktivität von ID2 inhibiert. Infolge dieser Interaktion wird ID2 von der Wechselwirkung mit seinen Zielproteinen zurückgehalten. Der Verlust von pRB erhöht die Aktivitäten von ID2 und führt damit zu einer ungeeigneten Zwangsverwaltung der E-Proteine. Dies weist daraufhin, dass pRB ein möglicher Regulator von ID2 ist. Außerdem kann der funktionelle Verlust von pRB partiell durch den Verlust von ID2 kompensiert werden.²² Es wurde gezeigt, dass die embryonale Letalität der *RB*-Knockout-Mäuse, die auf Grund der massiven Proliferation, defekten Differenzierung und Apoptose in neuronalen Zellen und in hämatopoetischen Vorläuferzellen sterben, durch einen *ID2/RB*-Doppel-Knockout verhindert werden kann. Die Embryonen der *ID2/RB*-Doppel-Knockout-Mäuse leben mit minimalem bzw. ohne Defekt in der Neurogenese und Hämatopoese. Nach der Geburt sterben die *ID2/RB*-Doppel-Knockout-Mäuse jedoch auf Grund des massiven Verlusts an Muskelgewebe.²²

1.2 ID-Proteine und Tumorigenese

Der Zusammenhang zwischen ID-Proteinen und Tumorigenese zeigt sich durch die Interaktionen der ID-Proteine mit verschiedenen regulatorischen Proteinen des Zellzyklus und durch die Onkoprotein-vermittelte Induktion der *ID*-Genexpression. ID-Proteine spielen in der Tumorigenese eine wichtige Rolle als Inhibitoren der Zelldifferenzierung und Stimulatoren der Zellproliferation, der Tumor-Neoangiogenese und der Tumordinvasion.

1.2.1 Zusammenhang zwischen ID-Proteinen und Tumorigenese

Die Interaktionen der ID-Proteine mit den E-Proteinen, pRB und ETS-Proteinen, die Induktion der *ID*-Genexpression durch die klassischen Onkoproteine wie BMP, MYC und RAS und die Expressionskontrolle des Tumorsuppressors INK4a durch die ID- und ETS-Proteine sind detaillierte Indizien, die die Wichtigkeit der ID-Proteine in der Tumorbilogie beweisen. Deshalb wird noch nach neuen biologischen Daten gesucht, die die

Schlüsselfunktionen der ID-Proteine in der Tumorigenese eindeutig belegen. Onkogene sind Gene, die in der Lage sind, Wachstum von Tumoren im tierischen Organismus auszulösen. Die Tumorentwicklung beruht in erster Linie auf einer Entartung des Zellwachstums, d.h. auf einer Veränderung von Genen, die für die Synthese bestimmter Proteine mit Schlüsselfunktionen bei der Wachstumskontrolle verantwortlich sind. Die bisherigen Ergebnisse deuten daraufhin, dass *ID*-Gene keine gewöhnlichen Onkogene sind. Die Sequenzierung des Gens *ID1* von 13 Patientenfamilien mit Melanomen und die Sequenzierung von *ID3* in einer Reihe von 94 Ovarialkarzinomen zeigten keine Mutation dieser Gene.²³⁻²⁴ Nur in einem Fall wurde eine Überexpression von *ID4* auf Grund der t(6;14)(p22;q32)-chromosomalen Translokation in B-Zell-Leukämie gefunden.²⁵ Dennoch bedarf es noch weiterer Studien zur eindeutigen Beantwortung der Frage, ob *ID*-Gene Onkogene sind. In einigen Fällen vermitteln klassische Onkoproteine jedoch die Überexpression von *ID*-Genen und beeinflussen so wichtige onkogene Signalübertragungswege (s. Tab.1.1).

Tab. 1.1 Onkoprotein-vermittelte Induktion der ID-Proteine

Onkoprotein	Zielgen	Gewebe/Zelle	Signalweg-Vermittler	Wirkung	Referenz
BMP4	<i>ID1, 3</i>	Maus embryonale Stammzellen	SMAD	Selbsterneuerung	26 27
BMP2	<i>ID1, 3</i>	neuronale Vorläuferzellen	SMAD	Inhibition der neuronalen Differenzierung	29
BMP2	<i>ID1</i>	Muskel- und Knochen-Vorläuferzellen	SMAD	Regulation der Muskel- und Knochen-Differenzierung	30 31 32
BMP7	<i>ID2, 3</i>	Epithelzellen	SMAD	Proliferation	33
TGFβ	<i>ID1</i>	Endothelzellen	TGFβ/ALK1/SMAD	Migration und Proliferation	34
TGFβ	<i>ID3</i>	Lymphozyten	TGFβ-Rezeptor	Regulation der Lymphozyten	35
VEGF	<i>ID1, 3</i>	Knochenmark	unbekannt	Angiogenese	36
MYC	<i>ID2</i>	Neuroblastom		Tumorigenese	22
TCR	<i>ID3</i>	Thymozyten	RAS Kaskade, EGFR1	Reifung der Thymozyten	37 38
FSH	<i>ID2</i>	Sertoli-Zellen	cAMP	Regulation der Spermatogenese	39
β-Katenin	<i>ID2</i>	Kolonkarzinom	APC/β-Katenin/TCF	Tumorigenese	40
IGF1R	<i>ID1</i>	Maus embryonale Fibroblasten			41
IGF1R	<i>ID2</i>	32D Murine hämatopoetische Zellen	IRS1/P13K Signalweg	Inhibition der Differenzierung	42

In den meisten normalen adulten Geweben werden ID-Proteine nur in geringen Mengen exprimiert. Deregulationen von *ID*-Genen sind in unterschiedlichen Tumoren durch erhöhte

Expression der *ID*-mRNA und *ID*-Proteine bestätigt (z.B. erhöhte *ID*-Expression in Karzinomen von Prostata, Brust, Ovarien, Kolon, Rektum, Pankreas, Leber, Endometrium, Gebärmutterhals, Schilddrüse und in Melanomen, im Ewings-Sarkom, Magen-Adenokarzinom⁴³⁻⁴⁴ und Leukämien⁴⁵). In einigen dieser Fälle korreliert die Höhe der Überexpression mit der Schwere der Krankheit und einer ungünstigen klinischen Prognose. Obwohl *ID*-Gene keine gewöhnlichen Onkogene sind, wird ihre Hochregulation durch die klassischen Onkoproteine RAS, MYC und das Chimären-Ewings-Sarkom-Protein (EWS) vermittelt. Die Aktivierung des RAS-Signalwegs führt zur Aktivierung der Expression von EGR1, wodurch die Expression von ID1⁴⁶ und ID3³⁷ induziert wird (s. Abb. 1.2). Die Inhibition der ETS-Proteine durch *ID*-Proteine führt zur verminderten Expression von INK4a und damit zur Phosphorylierung von pRB durch Cyclin D-CDK4²¹ (s. Abb. 1.2)

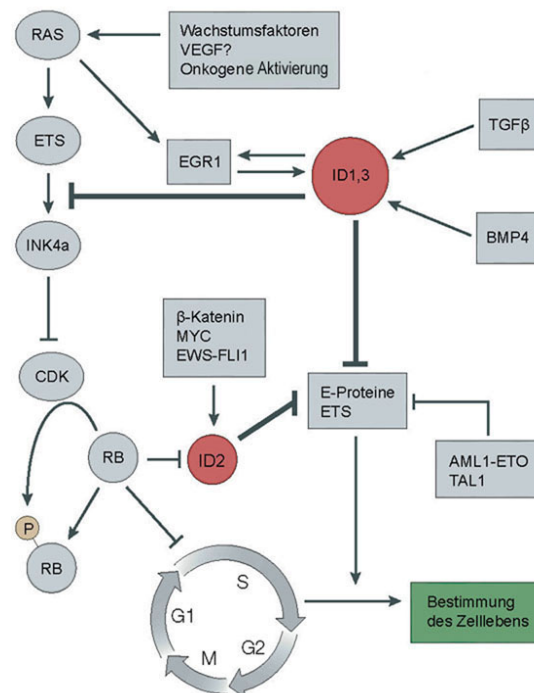


Abb. 1.2 Einfluss der *ID*-Proteine auf die Zellzyklus-Regulation

Die Inhibitoren der DNA-Bindung ID1, ID2 und ID3 behindern E-Proteine, ETS-Proteine und wahrscheinlich auch andere Proteine bei der Förderung des Zellzyklus. ID1 und ID3 fördern indirekt durch Herabsetzung der Konzentration des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors INK4a die Inaktivierung des Retinoblastoma-Tumorsuppressors (pRB), was zur Phosphorylierung von pRB führt. Da ID2 mit pRB direkt interagiert, führt diese Inhibition von pRB zur weiteren Konfiskation von ID-Zielproteinen: Cyclin-abhängige Kinase (CDK), Wachstumsantwort 1 (EGR1), Transformierender Wachstumsfaktor β (TGF- β), Knochenmorphogeneseprotein (BMP4), vaskulärer Endothel-Wachstumsfaktor 1 (VEGF1), Fried-Leukämie-Virusintegration 1 (FLI1), akutes Myeloid-Leukämie1-ETO (AML1-ETO), T-Zell-akute-lymphatische Leukämie 1 (TAL1). (Die Abbildung ist modifiziert nach Perk, J. *et al.*²⁰)

Dieser Signalweg zeigt, dass *ID*-Gene wichtige Vermittler der RAS-induzierten Transformation sind. Allerdings gibt es in Mausmodellen noch keinen direkten Test zum

Beweis dieser Hypothese. Es wurde gezeigt, dass MYC-Onkoproteine die Transkription von *ID2* durch die direkte Bindung an zwei konservierte E-Boxen des *ID2*-Promotors/Enhancers induzieren. Diese *ID2*-Induktion befähigt MYC, den pRB-vermittelten Zellzyklus-Stillstand zu überwinden und in Kooperation mit RAS Maus-Fibroblasten zu transformieren.²² Darüber hinaus wurden vor Kurzem *ID1* und *ID3* als Ziel von MYC identifiziert. In Zellkulturen beeinflusst die durch MYC vermittelte Induktion von *ID1* wahrscheinlich den Übergang der Brusttumorzellen von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus.⁴⁷ Bei der Entwicklung der Neuralleiste im Embryo von *Xenopus laevis* erwies sich ein Zusammenhang zwischen MYC und *ID3*.⁴⁸ In diesem System ist MYC für die Erhaltung der Neuralleiste-Vorläuferzellen im unreifen Zustand wichtig. Durch die Überexpression von *ID3* kann der durch C-MYC-Verminderung induzierte Phänotyp des Embryos rückgängig gemacht werden. Wie bei *ID2* beobachtet, bindet MYC direkt an die E-Box des *ID3*-Promotors/Enhancers. Chimären-Proteine von EWS und ETS (EWS-ETS), die durch chromosomale Translokation im Ewings-Sarkom entstehen, induzieren *ID2* durch die direkte Aktivierung des *ID2*-Promotors. Die retrovirale Transduktion von EWS-ETS in Fibrosarkomzellen führt zur transkriptionellen Aktivierung von *ID2*.⁴⁹⁻⁵⁰ Die Deregulation von *ID*-Genen fördert die Aktivitäten des onkogenen Fusionsproteins AML1-ETO, das auf Grund der chromosomalen Translokation t(8;21) gebildet wird und in 15% der Fälle der akuten myeloischen Leukämie (AML) zu finden ist. Dieses Protein induziert hämatopoetische Zellproliferation, fördert die Selbsterneuerung der humanen hämatopoetischen Stammzellen und inhibiert die Ausreifung der multiplen lymphohämatopoetischen „Lineage“. Es wurde gezeigt, dass AML1-ETO mit E-Proteinen interagiert und deren Aktivitäten inhibiert.⁵¹ Dies deutet darauf hin, dass die Überexpression von *ID*-Proteinen die Aktivitäten von AML1-ETO fördert und damit bei der Tumorigenese mitwirkt. Anhand der Mikroarray-Analyse wurde gezeigt, dass AML1-ETO *ID1* direkt induziert.⁵² Dieses zeigt den Beitrag von AML1-ETO zur Erhöhung eigener onkogener Aktivität. Die genetischen Veränderungen (Deletion oder Translokation) des Gens T-Zell-akute-lymphatische Leukämie 1 (*TAL1*) sind mit der T-Zell-akuten-lymphoblastischen Leukämie (T-ALL) assoziiert und führen zur Inhibition von E2A.⁵³⁻⁵⁵ Daher kann die Überexpression von *ID*-Proteinen die Interaktion zwischen *TAL1* und E2A hemmen und damit bei der Leukämieentstehung mitwirken.

1.2.2 Phänotypische Veränderungen der Zelle durch ID-Proteine

ID-Proteine wirken durch Inhibition der Zelldifferenzierung, Stimulierung der Zellproliferation und Begünstigung der Tumor-Neoangiogenese und der Tumordinvasion an der Tumorigenese mit. Die durch die Überexpression der ID-Proteine vermittelten Phänotypen der neoplastischen Zellen zeigen sich in gestörter Differenzierung, erhöhter Proliferation und Tumordinvasion. Ektopische Expression von ID-Proteinen *in vitro* führt zur Inhibition der Differenzierung von mehreren Zelltypen wie Muskelzellen⁵⁶, myeloischen Zellen⁵⁷ und murinen Erythroleukämiezellen⁵⁸. Die Überexpression von ID-Proteinen kann die Differenzierung von Zellen auch *in vivo* inhibieren. Die Expression von ID1 mittels retroviralen Gentransfers in embryonales Mausgehirn beeinträchtigt die neuronale Differenzierung wesentlich.⁵⁹ Die Überexpression von ID2 in Küken dirigiert die ektodermalen Vorläuferzellen in neuronale statt in epidermale Differenzierungsrichtung.⁶⁰ Transgene Mäuse, die ID1 in lymphatischen Vorläuferzellen überexprimieren, zeigen eine Hemmung der Pro-B-Zellentwicklung.⁶¹ Eine konstitutive Expression von ID3 in bipotenten T/NK-(natürlichen Killer)-Vorläuferzellen leitet die Differenzierung nur in Richtung NK. Daher ist anzunehmen, dass die Differenzierung der Zellen entscheidend durch die Überexpression der ID-Proteine beeinflusst wird.

Für die Steuerung der Zellzyklus-Progression sind ID-Proteine von sehr großer Bedeutung. Die Verminderung der durch den Mitogen-Signalweg induzierten *ID1*- und *ID2*-mRNA unter Verwendung der *ID1*- und *ID2*-spezifischen Antisense-Oligonukleotide in Fibroblasten führt zum Arrest der G1-S-Phase des Zellzyklus.⁶²⁻⁶³ Überexpression von ID-Proteinen in humanen Keratinozyten und Endothelzellen verzögert die replikative Seneszenz. Eine Überexpression von ID-Proteinen reicht jedoch nicht zur Immortalisierung der Zelle aus. Dazu ist eine kombinierte Expression von antiapoptotischen Genen notwendig.⁶⁴⁻⁶⁷ Durch Mitogen-aktivierte RAS-Signalübertragungswege inhibiert ID1 nicht nur die Expression von INK4a, sondern auch die E2A-abhängige Expression vom Cyclin-A und -E abhängigen Kinase 2 (CDK2)-Inhibitor p21, was zur pRB-Phosphorylierung und -Inaktivierung führt.⁶⁸⁻⁶⁹ Vor Kurzem wurde eine erhöhte Expression von ID1 und ID3 in Zellen, die latentes Membranprotein 1 (LMP1) vom Epstein-Barr-Virus exprimieren, bestätigt.⁷⁰⁻⁷¹ Diese erhöhte Expression von ID1 ist mit der Herunterregulation vom CDK2-Inhibitor p27 und INK4a assoziiert und korreliert mit der erhöhten Phosphorylierung von pRB.

Der Zusammenhang zwischen ID-Proteinen und Tumordinvasion in humanen Epithelzellen ist gut beschrieben.⁷²⁻⁷⁴ Die Überexpression von ID1 in Kulturen der humanen Epithelzellen SCp2 macht die Zellen partiell gegen Differenzierungssignale widerstandsfähig und induziert

rasche Proliferation. Die Reduktion der ID1-Überexpression mittels Antisense-RNA verlangsamt die Proliferation, fördert die Differenzierung⁷² und inhibiert die Invasion und Metastasierung.⁷³ SCp2-Zellen, die ID1 überexprimieren, sind durch Sekretion von Gelatinase in der Lage, Basallamine anzugreifen.⁷⁴ Es ist davon auszugehen, dass die Überexpression von ID1 in humanem Brustkrebs zur Metastasierung beiträgt, da bei Mäusen die Injektion mit ID1 überexprimierenden Brustkrebs-Zelllinien zu Metastasen führt.⁷⁵

Darüber hinaus induziert die Überexpression von ID1 eine abnormale Zentrosomenduplikation, die durch genomische Instabilität malignes Wachstum fördern kann. Ektopische Expression von ID1 in Primärzellen und Tumor-Zelllinien resultiert in der Akkumulation von Zellen mit abnormalen Zentrosomenzahlen.⁷⁶ ID1 induziert Zentrosomenabnormalitäten durch Interferenz mit einer Untereinheit des 26S-Proteasoms S5A (Rpn10) [Hasskarl J. et al., unveröffentlichte Daten].

Das Zentrosom ist ein Mikrotubuli-organisierendes Zentrum, das in den meisten tierischen Zellen ein Zentriolenpaar enthält. Es liegt normalerweise in der Nähe des Zellkerns und dient der Verankerung der Minus-Enden der Mikrotubuli; die Plus-Enden sind in der Regel zur Zellmembran hin orientiert. Das Zentrosom teilt sich während der S-Phase des Zellzyklus. Die beiden Tochter-Zentrosomen wandern in der Prophase der Mitose als Spindelpole zu den gegenüberliegenden Polen der sich teilenden Zelle. Sie organisieren die Teilungsspindel und sorgen damit für eine geordnete Trennung der Chromosomen. Abnormale Zentrosomen können schon in frühen Stadien der Tumorigenese nachgewiesen werden und zur Generierung atypischer Mitosen führen, was in einer ungleichen Verteilung des Erbmaterials resultieren kann. Diese Aneuploidie ist Ausdruck der genomischen Instabilität und Kennzeichen von malignen Tumorerkrankungen.¹³⁵⁻¹³⁶

1.2.3 Effekte der transgenen Expression von ID-Proteinen in Mäusen

Zum direkten Nachweis der ID-Beteiligung in der Tumorigenese wurden in Mausmodellen transgene Überexpressionen von ID-Proteinen durchgeführt. Drei von siebzehn Mäusen, bei denen ID1 in Epithelzellen des Dünndarms überexprimiert wurde, entwickelten Darmadenome.⁷⁷ Da dies aber das einzige Beispiel ist, in dem die direkte Assoziation von ID-Proteinen mit der epithelialen Karzinogenese beschrieben ist, sind Versuche an weiteren Modellen von großer Wichtigkeit. In anderen transgenen Modellen führte die gezielte Überexpression von ID-Proteinen in Lymphozyten zur Deregulation der Ausreifung und zur Entwicklung von Lymphomen.⁷⁸⁻⁷⁹ Die transgene Überexpression von ID1 bzw. ID2 führt zur

gestörten Entwicklung der B-Zellen.⁶¹ In T-Zell-Defekt-Mäusen führte die transgene Überexpression von ID1 zur massiven Apoptose von Thymozyten.⁷⁸

1.2.4 Gezielte Inaktivierung der *ID*-Gene in Mäusen

Die genetischen Analysen der *ID*-Knockout-Mäuse weisen darauf hin, dass die gezielte gleichzeitige Inaktivierung von *ID1* und *ID3* für die Initiierung und Progression von einigen Tumoren entbehrlich ist.⁸⁰⁻⁸² *ID1/ID3*-defekte Mäuse, denen ein bis drei Kopien der vier Allele von *ID1* und *ID3* fehlten, wurden mit drei tumoranfälligen Stämmen gekreuzt: *Pten*^{+/-}-Mäuse, die multiple Tumoren entwickelten⁸⁰, transgene Mäuse, die auf Grund der konstitutiven Expression von aktiviertem ERBB2 (Tyrosin-Kinase-Rezeptor) Brusttumore entwickelten⁸¹ und transgene Mäuse, die auf Grund der Überexpression von SV40TAG in Prostata-Epithelzellen Prostatatumore entwickelten.⁸² In diesen Modellen hatte der partielle Verlust von *ID1* und *ID3* keinen starken Effekt auf die Tumor-Initiierung. Dieser Verlust der *ID1/ID3*-Gene hatte jedoch eine negative Wirkung auf die Tumervaskularisation, was zu einem deutlichen Fortschritt in der Tumorbilogie führt. Es besteht die Hoffnung, hier einen Ansatzpunkt für die Krebstherapie zu finden.

Die Ursachenstudien der embryonalen Letalität der *ID1/ID3*-Doppel-Knockout-Mäuse zeigten, dass alle Embryonen unter Hämorrhagie im Vorderhirn litten.⁸³ Außerhalb dieser Region waren die Vaskularisation und Angiogenese normal. Dies war der erste Hinweis, dass ID-Proteine in die Angiogenese involviert sind. Auf Grund der Kompensation durch ID2 in den Blutgefäßen außerhalb des Gehirns trat dieser Effekt bei *ID1/ID3*-Doppel-Knockout-Mäusen nur im Gehirn auf, da *ID1/ID2/ID3*-Dreifach-Knockout-Mäuse unter weit ausgedehnter Hämorrhagie im gesamten Embryo litten.⁸⁴

Im Laufe der Immunitätstests mit drei verschiedenen Tumor-Xenotransplantaten in *ID1/ID3*-Knockout-Mäusen zeigten die Tumore einen starken Verlust der vaskulären Integrität, wobei der Effekt dieses Anti-Angiogenesestresses von der Tumorart und dem Tumorgrad abhing.

Bei der Angiogenese ist der vaskuläre Endothel-Wachstumsfaktor (VEGF) ein wichtiger Kontrollpunkt der ID-Regulation, da VEGF im Blutkreislauf zur starken Hochregulation von ID1 und ID3 im Knochenmark (vermutlich in zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen) führt (s. Abb. 1.3). Die durch die Stimulation des vaskulären Endothel-Wachstumsfaktor (VEGF)-Rezeptors vermittelte Aktivierung des Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK)-Signalwegs kann sich, wie in anderen Zelltypen gezeigt⁸⁵⁻⁸⁶, auf die Endothel-Wachstumsantwort 1-Site der Promotoren von *ID1* und *ID3* auswirken. *ID1/ID3*-Doppel-

Knockout in Mäusen führt zur Inhibition der Mobilität von Endothel-Vorläuferzellen (EPC) des Knochenmarks und Inhibition der Etablierung eines funktionsfähigen vaskulären Netzwerks. Dieser Defekt konnte durch Transplantation von ID-Wildtyp-Knochenmark behoben werden.³⁶ Die Mikroarray-Expressionsanalyse von Endothelzellen der *ID1*-Knockout-Mäuse zeigte eine verminderte Expression von fünf am Integrin-Signalübertragungsweg beteiligten Proteinen: $\alpha 6$ - und $\beta 4$ -Integrin, Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF)-Rezeptor 1, Matrix-Metalloprotease 2 (MMP2) und Laminin 5 (s. Abb. 1.3). In einigen Zelltypen führt die Bindung von Fibroblasten-Wachstumsfaktorresponse 1 (FGFR1) an Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF2) zur erhöhten Expression von Matrix-Metalloprotease 2. MMP2 spaltet Laminin 5 in promigratorische proteolytische Fragmente, die an $\alpha 6\beta 4$ -Integrin binden.⁸⁸ Es wird vermutet, dass die verminderte Expression der fünf Komponenten durch den Verlust der ID-Proteine die normale Migration der Endothelzellen inhibiert. Die genetischen Analysen zeigten, dass hypomorphe Mutationen in $\beta 4$ -Integrin die Angiogenese inhibieren.⁸⁹ Im Knochenmark werden ID-Proteine für die Migration und Proliferation der Endothel-Vorläuferzellen (EPC) benötigt. Als zirkulierende Endothel-Vorläuferzellen (CEP) dringen die EPC in Blutgefäße ein und migrieren zu Tumorzellen (s. Abb. 1.3). Der Chemokin-Stromazell-derivierte Faktor 1 (SDF1) wird als Antwort auf Ischämie durch Endothelzellen hochreguliert, was zur Mobilisierung von EPC führt.⁹⁰ Ließe sich die Regulation des SDF1-Rezeptors CXCR4 durch ID1 in T-Zellen auch für EPC im Knochenmark anwenden, könnte die VEGF-vermittelte Induktion des Gens *ID1* die EPC zum Empfang eines SDF1-Signals von der Peripherie kompetent machen. Eine gründliche Expressionsanalyse von CXCR4 in EPC wäre der nächste wichtige Schritt zur Bestätigung dieser interessanten Möglichkeit.

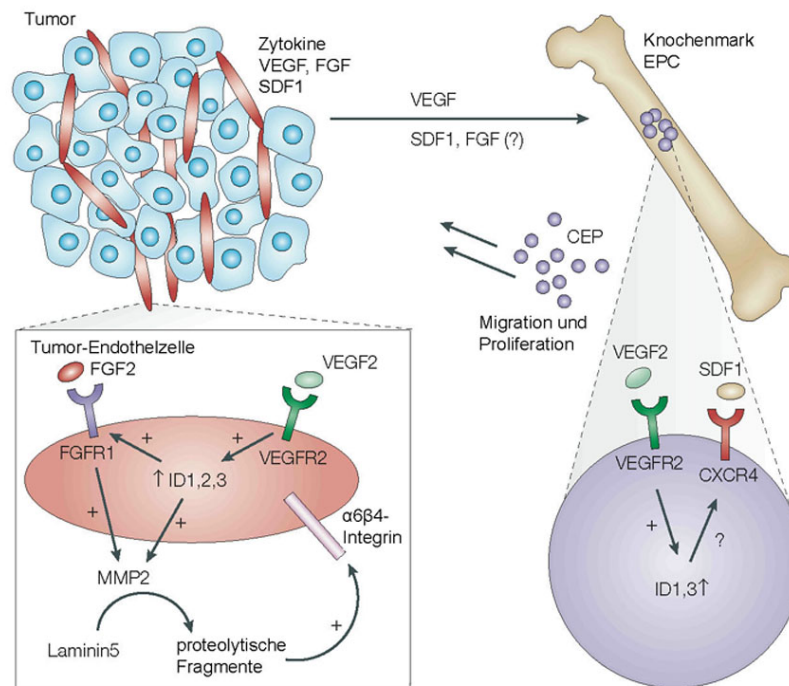


Abb. 1.3 Die Rolle der ID-Proteine in peripheren und in von Knochenmark abgeleiteten Endothelzellen
An der Peripherie werden ID-Proteine zur Aufrechterhaltung der Expression von Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF)-Rezeptor 1, Matrix-Metalloprotease 2 (MMP2), Laminin 5 und $\alpha 6 \beta 4$ -Integrin, die ein promigratorisches Netzwerk bilden, benötigt. Dieses Netzwerk hängt von der Bindung der $\alpha 6 \beta 4$ -Integrine an das MMP2-Spaltprodukt von Laminin 5 ab. Im Knochenmark werden ID-Proteine zur Mobilisierung und Proliferation der Endothel-Vorläuferzellen (EPC) benötigt. Als zirkulierende Endothel-Vorläuferzellen (CEP) dringen EPC in Blutgefäße ein und migrieren zu Tumorzellen. ID1 und ID3 sind im Knochenmark als Antwort auf VEGF hochreguliert, was wahrscheinlich zur Hochregulation von CXCR4 führt. Diese Zellen können dann am Chemokin-Stromazell-derivierten Faktor 1 (SDF1) des Tumors bzw. der Tumor-assoziierten Stromazellen binden, wodurch deren Mobilisierung erleichtert wird.²⁰ (Die Abbildung ist modifiziert nach Perk, J. *et al.*²⁰)

Außer bei ID2 führt der Knockout der einzelnen *ID*-Gene nur zu gemäßigten phänotypischen Veränderungen (s. Tab. 1.2).

Tab. 1.2 *ID*-Knockout-Mäuse

Genotyp	Phänotyp	Referenzen
<i>ID1</i> ^{-/-}	normales Wachstum; Rettung von <i>E2A</i> ^{-/-} -Mäusen; Defekt in Migration der T-Zellen	6, 91
<i>ID2</i> ^{-/-}	25% perinatale Mortalität; Mangel an Lymphknoten und Peyerschen Plaques; weniger natürliche Killerzellen, Langerhans-Zellen und Milz-dendritische Zellen; Hydronephrose; Darmgeschwulst; Rettung der Neurogenese und Hämatopoese in <i>Rb</i> ^{-/-} -Mäusen; Defekt in Brustzellproliferation	22, 92, 93, 94, 95, 96, 97
<i>ID3</i> ^{-/-}	normales Wachstum; Defekt in humoraler Immunität; Defekt in Proliferation der B-Zellen; Defekt in Ausreifung der Thymozyten	98, 99
<i>ID4</i> ^{-/-}	Defekt in neuraler Proliferation; verfrühte Differenzierung	100, 101
<i>ID1</i> ^{-/-} / <i>ID3</i> ^{-/-}	embryonale Letalität (13,5 Tage); vaskuläre Missbildung und Gehirnblutung; verfrühte neurale Differenzierung; Entwicklungsabnormalität des Herzens;	83
<i>ID1</i> ^{-/-} / <i>ID2</i> ^{-/-} / <i>ID3</i> ^{-/-}	zusätzlicher Verlust von <i>ID</i> -Allelen verursacht einen früheren Phänotyp	84

1.3 ID-Proteine als attraktives Ziel für die Krebstherapie

Der Effekt der ID-Proteine auf die Vaskularisation von Tumoren hängt vom Tumortyp, Entwicklungsgrad des Tumors und von den Tumorzellen selbst ab. Eine kontrollierte Inaktivierung von ID-Proteinen in Tumoren und Tumorstroma verschiedener Zelltypen könnte zu großen Fortschritten in der Tumorbiologie und Krebstherapie führen. Bekanntermaßen sind Protein-Protein-Interaktionen, bei denen nukleäre Proteine beteiligt sind, schwer zu inhibieren; bisher ist noch keine komplette Inhibition der Protein-Protein-Interaktion *in vivo* gelungen. Dennoch zeigen die genetischen Analysen von *ID*-Knockout-Mäusen, dass ein partieller Verlust der ID-Funktionen für eine therapeutische Wirkung ausreichen könnte. In den letzten Jahren wurden ermutigende Fortschritte zur Inhibition der Protein-Protein-Interaktionen mittels kleiner Moleküle wie Peptid-Aptamere gemacht.¹⁰² So wurde zum Beispiel mittels Peptid-Aptamere die Interaktion zwischen dem Onkoprotein MYC und dem MYC-assoziierten Faktor X (MAX) effektiv inhibiert¹⁰³ und durch Inhibition der Interaktion zwischen dem Onkoprotein β -Katenin und dem cyclischen AMP-Response-Element-Bindungsprotein (CREB) die β -Katenin/TCF-vermittelte Transkription effektiv antagonisiert.¹⁰⁴ Die spezifische Interaktion von Peptid-Aptameren mit dem Zellzyklusregulator Cdk2 oder dem Zellzyklusregulator E2F führt zum Anhalten des Zellzyklus in der G1-Phase.¹⁰⁵⁻¹⁰⁶ Die spezifische Inhibition der Signaltransduktionsproteine wie RAS, Trio und EGFR durch Peptid-Aptamere resultiert in der Unterbrechung der Signaltransduktionen.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ Peptid-Aptamere, die virale Proteine wie humane Papilloviren (HPV) und Hepatitis-B-Viren (HBV) inhibieren, bewirken die apoptotische Eliminierung von HPV16-positiven Tumorzellen bzw. die Inhibition der viralen Kapsidbildung und HBV-Replikation.¹¹⁰⁻¹¹²

1.3.1 Inhibition der ID-Proteine mittels Peptid-Aptamere

Peptid-Aptamere sind Peptid-Agenzien, die auf Grund ihrer spezifischen Bindung an ein bestimmtes Zielprotein unter intrazellulären Bedingungen selektiert werden. Peptid-Aptamere bestehen aus kurzen Peptid-Domänen, die von einem Gerüstprotein präsentiert werden. Dementsprechend haben Peptid-Aptamere prinzipiell eine Ähnlichkeit mit Antikörpern, die aus kurzen, Antigen-bindenden Domänen bestehen und von einem starren Gerüstprotein präsentiert werden. In verschiedenen molekularbiologischen Experimenten wurde gezeigt, dass Peptid-Aptamere an ihre Ziel-Proteine *in vitro* und *in vivo* mit hoher Affinität und

Spezifität binden¹⁰⁴⁻¹¹² und die intrazellulären Funktionen ihrer Zielproteine blockieren können. Weder die Struktur noch die natürlichen Interaktionspartner des Zielproteins müssen bekannt sein, um inhibitorische Peptid-Aptamere zu generieren. Während des Screenings werden Peptid-Aptamere zusammen mit ihren kodierenden Sequenzen isoliert; dadurch sind diese Bindungsmoleküle unmittelbar in unbegrenzter Menge verfügbar. Auf Grund dieser Eigenschaften verfügen Peptid-Aptamere über ein signifikantes Potenzial in Hinsicht auf verschiedene Aspekte der Molekularmedizin: von der funktionalen Analyse eines bestimmten Zielproteins bis zur Entwicklung eines spezifischen therapeutischen Agens.

1.3.1.1 Screening von ID-spezifischen Peptid-Aptameren mittels des Yeast-Two-Hybrid-Systems

Peptid-Aptamere werden in der Regel aus kombinatorischen Expressionsbibliotheken mittels der Screeningsysteme, die auf Yeast-Two-Hybrid-Methoden basieren, isoliert.¹¹³⁻¹¹⁶ Das Peptid-Aptamer-Screeningsystem besteht im Grunde aus drei Komponenten (s. Abb. 1.4):

- o Ein Vektor, der das Zielprotein (Bait), fusioniert mit einer DNA-Bindungsdomäne (BD) eines Transkriptionsfaktors [z. B. die DNA-Bindungsdomäne des Hefe-Transkriptionsfaktors GAL4 (GAL4BD)], exprimiert;
- o ein Vektor, der die Expressionsbibliothek der verschiedenen Peptid-Aptamere (Prey), fusioniert mit einer Transkription-Aktivierungsdomäne (AD) eines Transkriptionsfaktors [z. B. die Transkriptions-Aktivierungsdomäne des Hefe-Transkriptionsfaktors GAL4 (GAL4AD)], exprimiert;
- o ein oder mehrere Reportergene, die unter der Transkriptionskontrolle der Erkennungssequenzen (BS) der DNA-Bindungsdomäne (BD) des Baits stehen.

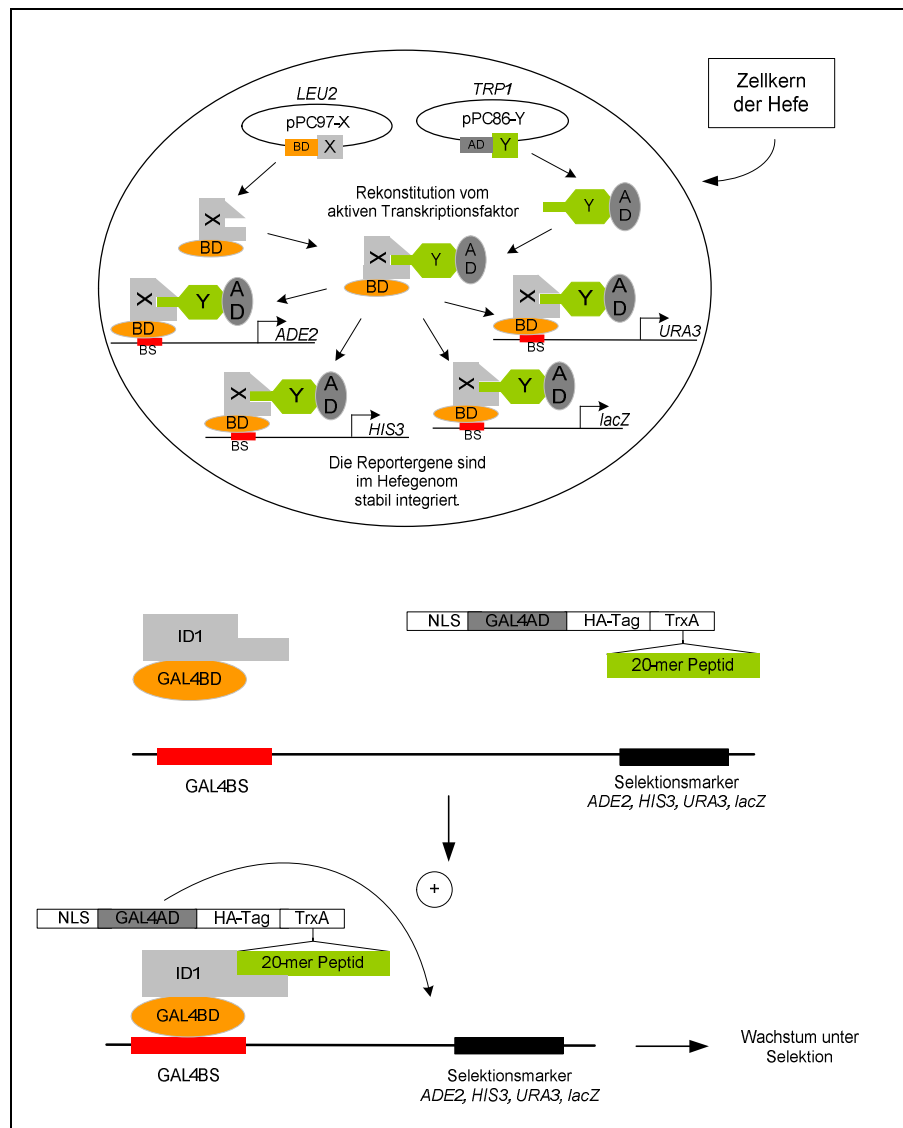


Abb. 1.4 Das Peptid-Aptamer-Screeningsystem

Das System besteht aus drei Komponenten: (1) Ein Expressionsvektor für das Zielprotein X, das mit der DNA-Bindungsdomäne (GAL4BD) des GAL4-Transkriptionsvektors fusioniert ist. (2) Ein Expressionsvektor für randomisierte Peptide (z. B. 20-mer), die in konstringierter Konformation von einem Gerüstprotein (z. B. TrxA) präsentiert werden. Das Gerüstprotein ist mit der Transkriptions-Aktivierungsdomäne (z. B. GAL4AD) mit einem nukleären Lokalisationssignal (NLS) und einer Tag-Sequenz (z. B. HA-Tag) gekoppelt. (3) Ein genetisch modifiziertes Hefe-System, das ein oder mehrere Selektionsmarker (*ADE2*, *HIS3*, *URA3* oder *lacZ*) besitzt, die unter der Transkriptionskontrolle der DNA-Bindungsstellen von BD (z. B. GAL4BD) stehen. Nur wenn ein Peptid-Aptamer an das Zielprotein bindet, wird ein Transkriptionsfaktor gebildet, in dem die BD und die AD in unmittelbare Nähe gebracht werden. Dies führt zur Aktivierung der Reportergene.

Wenn Bait und Prey interagieren, werden die GAL4BD und GAL4AD in unmittelbare Nähe zueinander gebracht. Dadurch wird ein synthetischer Transkriptionsfaktor gebildet, der die Transkription der Reportergene aktiviert (s. Abb. 1.4). Bei der Hefe sind diese Reportergene in der Regel autotrophe Marker wie *ADE2*, *HIS3* oder *URA3*, die durch das Wachstum der Hefe-Transformanten auf Medien ohne die entsprechenden Nährstoffe selektiert werden können. Zusätzlich werden im Yeast-Two-Hybrid-System Reportergene wie *lacZ* als enzymatische Marker, deren Aktivität quantifiziert werden kann, verwendet.

Während des Yeast-Two-Hybrid-Screenings können falsch positive Klone isoliert werden, d.h. Hefeklone, in denen das Reportergen ohne Interaktion zwischen Bait und Prey aktiviert wird. Diesem können verschiedene Ursachen zu Grunde liegen. Ein Peptid-Aptamer kann ohne Interaktion mit dem Bait beispielsweise zur Transkriptionsaktivierung des Promotors vom Reportergen führen, indem es z.B. die Hefe-Transkriptionsfaktoren moduliert. Ebenso kann ein Peptid-Aptamer, das das Produkt des Reportergens stabilisiert, eigene Aktivitäten über die phänotypische Schwelle erhöhen. Um solche falsch positiven Klone zu vermeiden, besitzen die Hefestämme, die für das Aptamer-Screening verwendet werden, in der Regel mehrere Reportergene, die unter der Kontrolle verschiedener Promotorsequenzen stehen.

Die cDNA-Bank der Peptid-Aptamere wird durch die Einführung von doppelsträngigen synthetischen Oligonukleotiden mit randomisierten Sequenzen in das für das Gerüstprotein kodierende Gen konstruiert. Auf Grund seiner relativ kleinen Größe (12 kDa), Stabilität, Löslichkeit und bekannten dreidimensionalen Struktur wird das Protein Thioredoxin A (TrxA) von *E. coli* in der Regel als Gerüstprotein für Peptid-Aptamere verwendet.^{105, 119} Im Idealfall muss das Gerüstprotein selbst funktionell inert sein. Im Fall von TrxA sind die Peptid-Aptamere in das biologisch aktive Zentrum von TrxA eingeführt, wodurch seine katalytische Aktivität zerstört wird. Alternativ zu TrxA werden das grüne Fluoreszenzprotein (GFP)¹²⁰ und das katalytisch inaktivierte Derivat der Staphylokokken-Nuklease (SNase)¹¹⁶ als Gerüstprotein verwendet.

Ein randomisiertes 60-Basenpaare-Oligonukleotid, das in die einzige *RstII*-Schnittstelle des Gens *TrxA* von *E. coli* eingeführt ist, wird - vorausgesetzt, dass keine Stopp-Codons innerhalb dieser Sequenzen existieren - als randomisiertes Peptid (20-mer) exprimiert und auf der Oberfläche des TrxA-Proteins präsentiert.¹⁰⁵ Gut geeignet sind Oligonukleotide, die aus sich wiederholenden Drillingen mit der Sequenz NNK bestehen. N steht für A, T, C oder G und K für G oder T. Diese Codons kodieren für alle 20 Aminosäuren, resultieren aber in nur einem Stopp-Codon. Die in der Mehrzahl der Studien benutzten Peptid-Aptamer-Domänen bestehen jeweils aus 16-20 Aminosäuren, da die variablen Domänen einerseits lang genug sein müssen, um verschiedene Konformationen annehmen zu können, andererseits kurz genug sein müssen, um mehrere Stopp-Codons zu verhindern.¹⁰⁵ Peptide, die mit ihren beiden Enden an einem Gerüstprotein verankert sind, zeigen häufig konstringierte Konformationen.¹¹⁷ Im Vergleich zu linearen und flexiblen Peptid-Aptameren, die nicht an einem Gerüstprotein verankert sind, haben die konstringierten Peptid-Aptamere folgenden Vorteil:

Sie besitzen höhere Bindungsaffinitäten zu ihren Zielproteinen, da die Peptid-Aptamere durch das Gerüstprotein nach außen präsentiert werden. Es ist davon auszugehen, dass dieser

Änderung der Bindungsaffinität die reduzierte Konformationsentropie des konstringierten Peptides im ungebundenen Zustand zu Grunde liegt. Tatsächlich geht die Affinität der Peptid-Aptamere zu ihren Zielproteinen um das 10- bis 1000fache verloren, wenn die Peptid-Aptamere von ihrem Stützprotein (TrxA) entfernt und als lineare Peptid-Aptamere getestet werden.^{106, 118} Zudem zeigen Peptide mit gefalteten Strukturen häufig eine höhere proteolytische Stabilität als lineare Peptide.¹¹⁹ Dies ist eine wichtige Voraussetzung, um die Peptid-Aptamere *in vivo* zur Inhibition der intrazellulären Funktionen des Zielproteins zu verwenden. Die reduzierte Konformationsflexibilität der konstringierten Peptid-Aptamere ist zur Aufklärung ihrer biologisch aktiven Strukturen hilfreich.¹¹⁷ Die biologisch aktive Konformation kann als Grundstruktur zur Entwicklung von therapeutischen Agenzien dienen.

1.3.1.2 Charakterisierung von Peptid-Aptameren mittels des Mammalian-Two-Hybrid-Systems

Alle Interaktionen, die im Yeast-Two-Hybrid-System detektiert werden können, lassen sich nicht unbedingt auf humane Zellen übertragen. Problematisch beim Yeast-Two-Hybrid-System ist, dass die Interaktion der zu untersuchenden Proteine im Zellkern der Hefe stattfinden muss, da die Transkription nur dort ablaufen kann. Es ist möglich, dass sich Proteine in diesem Milieu anders falten als in dem Bereich der Zelle, in dem sie üblicherweise auftreten. Auch die Modifikationen der Hefe unterscheiden sich teilweise von denen anderer eukaryotischer Organismen. Diese veränderte Faltung beeinflusst Struktur und Oberflächeneigenschaften der Proteine.

Zur Verifizierung der Interaktion zwischen dem Zielprotein und dem Peptid-Aptamer in humanen Zellen kann das Mammalian-Two-Hybrid-System verwendet werden. Hier können Mammalian-Expressionsvektoren für Bait und Prey, die entsprechend mit einer DNA-Bindungsdomäne (BD) und mit einer Transkriptions-Aktivierungsdomäne (AD) fusioniert sind, zur Transkriptionsaktivierung des kotransfizierten Reportergen-Plasmids führen. Das Reportergen-Plasmid enthält z.B. das *Photinus pyralis* (Firefly)-Luciferasegen, das unter der Transkriptionskontrolle einer BD-Erkennungsdomäne steht (s. Abb. 1.5).

Im CheckMate™-Mammalian-Two-Hybrid-System enthält der pBIND-Vektor die GAL4-DNA-Bindungsdomäne (BD) der Hefe, mit der das Zielgen als Fusionsprotein exprimiert wird, und der pACT-Vektor enthält die VP16-Transkriptions-Aktivierungsdomäne (AD) des Herpes-Simplex-Virus, mit der das Peptid-Aptamer als Fusionsprotein exprimiert wird. Der

pG5luc-Vektor enthält vor dem Firefly-Luciferasegen (*luc*⁺) fünf GAL4-Bindungsstellen (BS) und eine TATA-Box. Nur wenn ein Peptid-Aptamer an das Zielprotein bindet, wird ein Transkriptionsfaktor gebildet, in dem die BD und die AD in unmittelbare Nähe gebracht werden. Dies führt zur Aktivierung der Reportergene (s. Abb. 1.5).

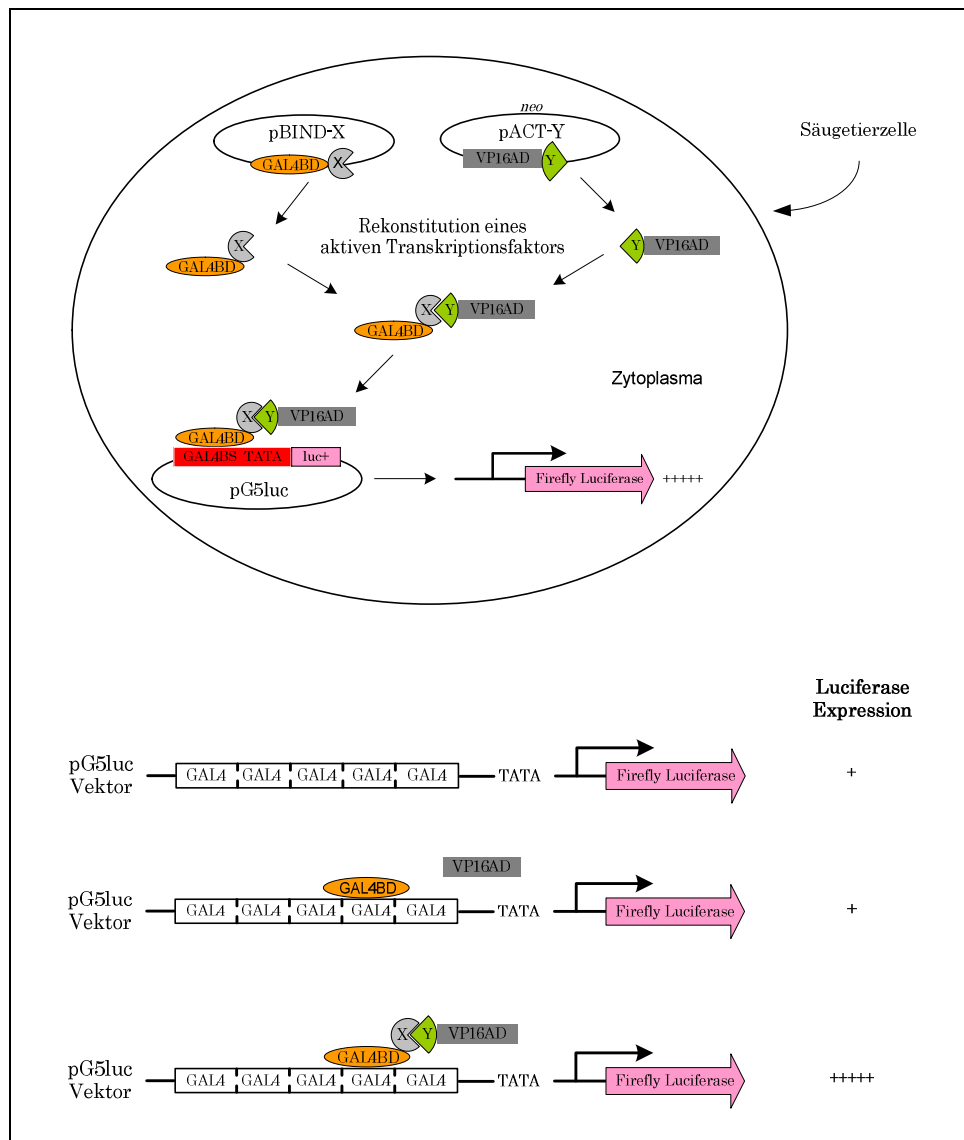


Abb. 1.5 Schematische Darstellung des Mammalian-Two-Hybrid-Systems

Die Interaktion zwischen dem Zielprotein und dem Peptid-Aptamer, die als Fusionsproteine GAL4-X bzw. VP16-Y exprimiert werden, erhöht die Expression der Luciferase über die negativen Kontrollen. In negativen Kontrollen wird die Hintergrundexpression der Luciferase bei Vorhandensein von GAL4 (von pBIND) und VP16 (von pACT) gemessen. Das Reportergen-Plasmid enthält vor dem Firefly-Luciferasegen fünf GAL4-Bindungsstellen (BS) und eine TATA-Box.

Ein großer Vorteil der Peptid-Aptamer-Technologie ist, dass das Screeningverfahren im Inneren eines eukaryotischen Organismus stattfindet. Daher ist diese Methode für die Selektion von Molekülen, die stabil sind und unter intrazellulären Bedingungen an ihre Zielproteine binden können, sehr gut geeignet. Dies ist ein wichtiger Gesichtspunkt, da viele

Peptid-Moleküle, die durch Bindungsuntersuchungen *in vitro* selektiert werden (z.B. Phagen-Display), nicht an ihre Zielproteine *in vivo* binden. Gründe dafür sind z.B. ein verändertes Faltungsmuster oder eine Instabilität der Peptid-Moleküle unter intrazellulären Bedingungen.¹²¹ Ein weiterer Vorteil der Peptid-Aptamer-Technologie gegenüber der RNA-Interferenz oder Knockout-Technik liegt darin, dass einzelne Proteindomänen spezifisch inhibiert werden können.

1.3.2 siRNA als spezifischer Inhibitor der *ID*-Genexpression

Um die Expression bestimmter Gene gezielt auszuschalten und neue Therapiekonzepte zu entwickeln, wird zunehmend die siRNA-Technologie verwendet. RNA-vermittelte Interferenz (RNAi) ist ein Mechanismus, der bei den meisten Eukaryoten zum Schutz der Zelle gegen eindringende virale Genome oder zur Beseitigung von anomalen Transkriptionsprodukten der Zelle verwendet wird.¹²²⁻¹²³ Obwohl der Mechanismus zur RNAi-vermittelten Unterdrückung der Genexpression noch nicht vollständig aufgeklärt ist, hat sich diese Methode als wichtiges Mittel für die Analyse der Genfunktionen und Zielvalidierung durchgesetzt. Erst im Jahr 2001 wurde gezeigt, dass kurze RNA-Duplexe (21-23 Basenpaare), die in Kulturen von Säugetierzellen eingeführt wurden, sequenzspezifische Inhibitionen der Ziel-mRNA verursachten, ohne Interferonantwort zu induzieren.¹²⁴ Diese kurze doppelsträngige RNA (dsRNA) wurde als „small interfering RNA“ (siRNA) bezeichnet. siRNA, die komplementär zur funktionellen Ziel-mRNA ist und deren Funktion durch Basenpaarung blockiert, wirkt in niedriger Konzentration katalytisch und kann bis zu 95% der Ziel-mRNA spalten.¹²⁴ Es wurde gezeigt, dass der durch siRNA vermittelte Effekt relativ stabil ist und die Unterdrückung der Genexpression über mehrere Zellgenerationen beobachtet werden kann.¹²⁴ Diese Eigenschaften machen die siRNA zur Inhibition der Zielgen-Expression deutlich effektiver als die Antisense-Technologie.

RNA-Interferenz wurde zuerst in niederen Eukaryoten als zelluläre Antwort auf die Einführung von langer dsRNA charakterisiert.¹²⁵⁻¹³¹ In Abb. 1.6 ist dies als „Natural Pathway“ gekennzeichnet. Das Enzym Dicer erkennt die lange dsRNA und verarbeitet sie zu 21-23 Nukleotid-Duplexen. In Säugetierzellen aktiviert die Einführung langer dsRNA eine Interferonantwort, die zur Stilllegung der Proteintranslation der Zellen führt. Diese Interferonantwort kann umgangen werden, wenn siRNA oder „short hairpin RNA“ (shRNA) in die Säugetierzellen eingeführt wird. Es wird vermutet, dass das Enzym Dicer die Schleife von der shRNA entfernt und siRNA erzeugt. Synthetische siRNA benötigt jedoch keine

weitere Verarbeitung. Die siRNA assoziiert mit verschiedenen Proteinen, um den RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC) zu bilden. Die doppelsträngige siRNA wird durch RISC unter ATP-Verbrauch entwunden; dadurch steuert der Antisense-Strang den aktivierten RISC-siRNA-Komplex zur Ziel-mRNA zur Hybridisierung und endgültigen Degradierung der mRNA (s. Abb. 1.6).

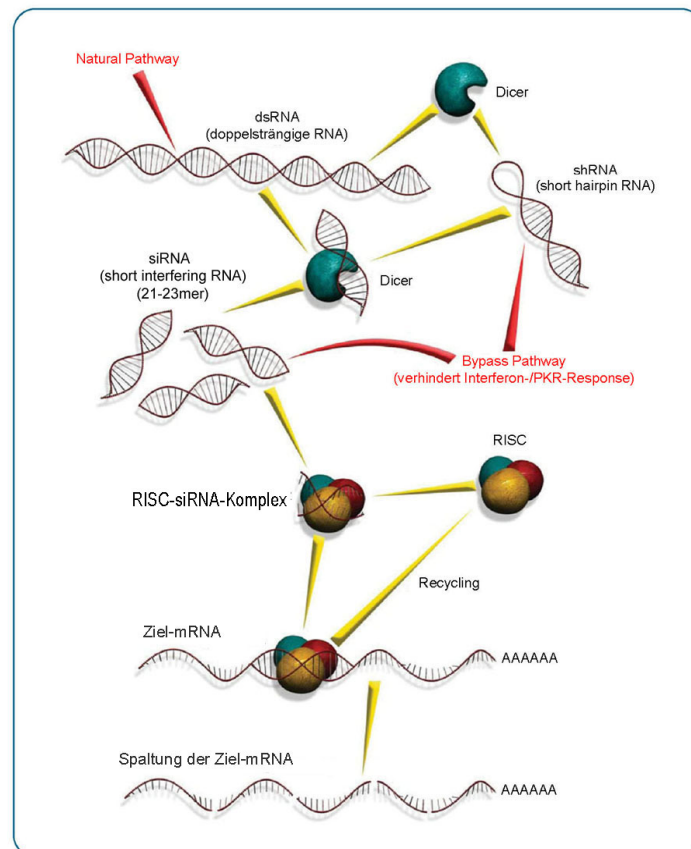


Abb. 1.6 Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi)

Das Enzym Dicer erkennt lange doppelsträngige (ds) RNA und bearbeitet sie zu 21-23 Nukleotid-Duplexen, die als „small interfering RNA“ (siRNA) bezeichnet werden. Synthetische siRNA benötigt keine weitere Verarbeitung; die „short hairpin RNA“ (shRNA) wird zu siRNA verarbeitet, indem das Enzym Dicer die Schleife der shRNA entfernt. Durch Assoziation der siRNA mit verschiedenen Proteinen wird der RNA-induzierte Silencing-Komplex (RISC) gebildet, der unter ATP-Verbrauch die ds-siRNA entwindet. Anschließend steuert der Antisense-Strang den aktivierten RISC-siRNA-Komplex zur Ziel-mRNA zur Hybridisierung und endgültigen Degradierung.¹³⁷

Es gibt mehrere Methoden zur Erzeugung von siRNA: chemische Synthese, *in-vitro*-Transkription, siRNA-Expressionsvektoren und PCR-Expressionskassetten. Unabhängig davon, welche Methode verwendet wird, ist der erste Schritt zum siRNA-Design die Selektion der siRNA-Ziel-Sequenz. Zum siRNA-Design sind mehrere Programme, die den siRNA-Design-Algorithmus verwenden, online verfügbar.

1.4 Aufgabenstellung

In vielen Tumoren werden ID-Proteine, vor allem ID1, überexprimiert. In einigen dieser Fälle korreliert die ID-Überexpression mit der Schwere der Krankheit und der schlechten klinischen Prognose.¹³²⁻¹³⁴

Auf Grund ihrer vielfältigen biologischen Effekte und ihrer Überexpression in Tumoren sind ID-Proteine mögliche Ziele der Tumorthherapie. Untersuchungen der Auswirkungen der funktionellen Inhibition der ID-Proteine können wichtige Informationen über die Rolle der ID-Proteine in Tumoren ergeben. Dabei kann eine zeitlich kontrollierte Inhibition der ID-Proteine bzw. eine konditionelle Inaktivierung der ID-Expressionen in verschiedenen Tumoren zu nützlichen Informationen für die Tumorthherapie führen.

Die Überexpression von ID1 in Primärzellen und Tumor-Zelllinien resultiert in der Akkumulation von Zellen mit abnormalen Zentrosomenzahlen.⁷⁶ Abnormale Zentrosomen können schon in frühen Stadien der Tumorigenese nachgewiesen werden und zur Generierung atypischer Mitosen führen, was in einer ungleichen Verteilung des Erbmaterials resultieren kann. Diese Aneuploidie ist Ausdruck der genomischen Instabilität und Kennzeichen von malignen Tumorerkrankungen.¹³⁵⁻¹³⁶

Im Rahmen dieser Arbeit werden ID1-spezifische Peptid-Aptamere aus randomisierten Peptid-Expressionsbanken mittels des Yeast-Two-Hybrid-Systems identifiziert und die isolierten Peptid-Aptamere auf ihre Interaktion mit ID1 in humanen Zellen charakterisiert.

Außerdem werden siRNAs, die die ID1-Expression spezifisch inaktivieren können, generiert.

Eine gezielte Peptid-Aptamer- oder si/shRNA-vermittelte Störung der intrazellulären ID1-Interaktion bzw. ID1-Expression könnte in Zukunft therapeutisch zur Reduzierung der ID1-induzierten Zentrosomenabnormalitäten genutzt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Tab. 2.1 Zusammenstellung der verwendeten Chemikalien mit Angabe der Bezugsquelle

Produkt	Firma
3-Amino-1,2,4-Triazol	Sigma, Deisenhofen
Acrylamid/bis-Acrylamid 37,5:1	Serva, Heidelberg
Agarose	Serva, Heidelberg
Aminosäuren	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumsulfat	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Serva, Heidelberg
APS	Serva, Heidelberg
ATP	Serva, Heidelberg
Bacto-Agar	Difco Lab., Detroit, Michigan (USA)
Bacto-Trypton	Difco Lab., Detroit, Michigan (USA)
Bradford Reagenz	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Caliumchloid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie R250-Färbelösung	Serva, Heidelberg
DAPI	Serva, Heidelberg
DCTA	Serva, Heidelberg
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMEM	GibcoBRL, Eggenstein
DMF	Merck, Darmstadt
DMSO	Merck, Darmstadt
dNTPs (Desoxynucleotidtriphosphate)	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
DTT	Serva, Heidelberg
EDTA	Merck, Darmstadt
Entwicklungsreagenzien	Adefo Chemie, Nürnberg
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formaldehydlösung	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS)	GibcoBRL, Eggenstein
FuGENE 6	Roche, Basel

Geneticin (G-418 Sulfat)	Sigma, Deisenhofen
Glucose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Glutamin	GibcoBRL, Eggenstein
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycerophosphat	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Merck, Darmstadt
Glycylglycin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Difco Lab., Detroit, Michigan (USA)
Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren	Difco Lab. Detroit, Michigan (USA)
HEPES	Sigma, Deisenhofen
Heringssperma-DNA	Sigma, Deisenhofen
IPTG	peQLab, Erlangen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
Lipofectamin™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Lithiumacetat	Sigma, Deisenhofen
Luciferin	Serva, Heidelberg
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma, Deisenhofen
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Merck, Darmstadt
ONPG	Merck, Darmstadt
Opti-MEM	GIBCO/BRL, Eggenstein
PEG (Polyethylenglycol)	Serva, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin	GIBCO/BRL, Eggenstein
Pepton aus Casein	Merck, Darmstadt
Phenol	Merck, Darmstadt
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
TCA	Merck, Darmstadt
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin)	Serva, Heidelberg
Tris	Merck, Darmstadt

Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	GibcoBRL, Eggenstein
Tween 20 (Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat)	Serva, Heidelberg
X-Gal	Serva, Heidelberg

2.2 Geräte

Die verwendeten Geräte wurden von folgenden Firmen bezogen:

Tab. 2.2 Zusammenstellung der verwendeten Geräte mit Angabe der Bezugsquelle

Gerät	Firma
Analysenwaage TE 214S	Sartorius, Göttingen
Autoklav Vakulab S3000	Medizin Mechanik, München
BioCapt Photo-Dokumentation, PeqLab	peqLab, Erlangen
BlueBlot WET/1000	Serva, Heidelberg
Brutschrank	Heraeus, Stuttgart
Brutschrank Typ 2771	Heraeus, Stuttgart
CO2 Brutschrank	Heraeus, Stuttgart
Elektrophoresekammern für Agarosegele	Bio-Rad, München
Elektrophoresekammern für Polyacrylamidgele	Hoefer Scientific Instruments, (USA)
Elektroporator, Gene Pulser	Bio-Rad, München
ELISA-Meßgerät	Autoimmun Diagnostika, Straßburg (Frankreich)
FastPrep® Instrument	Qbiogene, Carlsbad (USA)
Fluoreszenz-Mikroskop, Modell Axiovert 135	Zeiss, Oberkochen
Gefrierschrank -80 °C, Modell UF606	Heraeus, Stuttgart
Geltrockner, Modell 583 GEL DRYER	Biorad, Hercules, (USA)
GeneQuant	Amersham, Braunschweig
Inkubationsschüttler, Modell G25	New Brunswick Sc., Edison (USA)
Lichtmikroskop, Modell OLYMPUS Ck2	MICR-OPTIK NOSCH, Freiburg
Luminometer Lumat LB 9501	Boehringer, Mannheim
Magnetrührer	Ika-Combimag Ret Janke & Kunkel, Staufen
Megafuge 1.0R	Heraeus, Stuttgart
Megafuge 3.0R	Heraeus, Stuttgart
Mikrowelle AEG MICROMAT	Berlin Elektro Küche & Haushalt, Berlin
Mini Rocker MR-1	peqLab, Erlangen
Optimax X-Ray Film Processor	PROTEC Medizintechnik, Oberstenfeld
pH-Meter HI 9017 MICROPROCESSOR	HANNA Instruments, Lissabon (Portugal)
Reagenzschüttler Reax top/Reax	Heidolph Instruments, Buddeberg

Schüttelwasserbad, Typ 1083	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
SDS-Elektrophoresesysteme SE-250	Hoefer Scientific Instruments, (USA)
Spannungsgerät, CONSORT E831	peQLab, Erlangen
Spektralphotometer DU 640	Beckman, München
Sterilbank, HB 2448	Heraeus, Stuttgart
Stickstoff-Einfriertank, Typ Arpege 140	KGW ISOTHERM, Karlsruhe
Thermocycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
SONOPULUS Ultraschall-Homogenisator	Bandelin, Berlin
Ultrazentrifuge L7-65	Beckman, München
Waagen, Typ DA AI 600	Sartorius, Göttingen
Wärmeschrank	Heraeus, Stuttgart
Wasserbad, Typ julabo 8A	Heidolph Instruments, Buddeberg

2.3 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Tab. 2.3 Zusammenstellung der verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Angabe der Bezugsquelle

Verbrauchsmaterial	Firma
96-Loch-Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
ART® Aerosol Resistant Tips	Molecular BioProducts, Inc., San Diego (USA)
Combitips plus 5, 10, 25, 50 ml	Eppendorf, Hamburg
Cronex Film-Folien-Kassetten	CRONEX™, Mortsel (Belgien)
Cryoboxen	NALGENE®, Salt Lake City (USA)
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad, München
Gewebekulturflaschen 25 und 75 cm ²	Nuncclone™ DELTA Surface, Nunc (Dänemark)
Gewebekulturschalen 36, 60 und 100 mm Ø	Corning Inc., New York (USA)
GILSON Pipetten P2, P10, P20, P200, P1000	Gilson International B.V., Bad Camberg
Glaskolben 100 ml, 250 ml, 1000 ml	Schott, Mainz
Glasperlen (Ø = 425 - 600 µm), (Ø = 3,0 mm)	Sigma, Deisenhofen
Immersionsöl 518 C	Zeiss, Oberkochen
Konische Zentrifugenröhrchen 225 ml	Dickison Laborware, Franklin Lake (USA)
Multipette® plus,	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer und Deckglas	SUPERIOR Marienfeld, Lauda-Königshofen
Nitrozellulose Blotting Membranen 0,45 µm	Amersham, Braunschweig
Objektträger und Deckgläser	Menzel Gläser, Braunschweig
Parafilm®	American National Can™, Neenah (USA)

PIPETBOY acu	INTEGRA Biosciences, Fernbald
Plastik-Petrischalen Ø 92 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen SW-40	Beckman, München
Sterile Einmal-Pipetten 2, 5, 10, 25 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße:	
0,2 ml	Perkin Elmer Cetus, Norwalk (USA)
0,5 ml	peQLab, Erlangen
1,5 ml und 2,0 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Sterile Plastikröhrchen 10 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Sterile Plastikröhrchen 15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Sterile Plastikröhrchen 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Whatman GB002-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel

2.4 Enzyme

Die verwendeten Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen:

Tab. 2.4 Zusammenstellung der verwendeten Enzyme mit Angabe der Bezugsquelle

Enzym	Firma
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Ambion, Austin (USA)
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (NEB), Beverly (USA)
RNase A	Qiagen, Hilden
T4-DNA-Ligase	Promega, Madison (USA)
T4-Polynukleotid-Kinase	Ambion, Austin (USA)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.5 Kits zur Bearbeitung von DNA und Protein

Die verwendeten Kits wurden von folgenden Firmen bezogen:

Tab. 2.5 Zusammenstellung der verwendeten Kits mit Angabe der Bezugsquelle

Kits	Firma
Blunt TOPO PCR Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
ECL-Western-Blotting-Detection Kit	Amersham, Braunschweig
Gateway™ LR Clonase™ Enzyme Mix	Invitrogen, Karlsruhe

KinaseMax Kit	Ambion, Austin (USA)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAplasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAplasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

2.6 Proteine, Proteaseinhibitoren und Proteinstandards

Proteine, Proteaseinhibitoren und Proteinstandards wurden von folgenden Firmen bezogen:

Tab. 2.6 Zusammenstellung der verwendeten Proteine, Proteaseinhibitoren und Proteinstandards

Produkt	Firma
Aprotinin	Boehringer, Mannheim
Benzamidin	Sigma, Deisenhofen
BSA	Sigma, Deisenhofen
Leupeptin	Boehringer, Mannheim
Pepstatin A	Sigma, Deisenhofen
Rainbow TM -coloured protein MG-Standard	Amersham, Braunschweig

2.7 Mikroorganismen

2.7.1 Escherichia coli

Folgende *E. coli*-Stämme wurden verwendet:

Tab. 2.7 Zusammenstellung der verwendeten *E. coli*-Stämme mit Angabe der Bezugsquelle

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>DH5α</i>	F ⁻ , Φ80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> , <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_k⁻m_k⁺</i>), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ(<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169</i> , λ ⁻	Stratagene, San Diego (USA)
<i>TOP10</i>	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (<i>Str^R</i>) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>JM109</i>	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_k⁻m_k⁺</i>), <i>supE44</i> , Δ(<i>lac-proAB</i>), <i>relA1</i> , [<i>F'</i> , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> ⁺ , <i>lacIqZ</i> Δ <i>M15</i>], λ ⁻	Promega, Madison (USA)
<i>JM63</i>	F ⁻ <i>ara</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) <i>rpsL</i> (<i>Str^r</i>) [Φ80 <i>dlac</i> Δ (<i>lacZ</i>) <i>M15</i>]	Promega, Madison (USA)
<i>TG1</i>	F ⁺ <i>traD36</i> <i>lacI^q</i> Δ(<i>lacZ</i>) <i>M15</i> <i>proA⁺B⁺</i> / <i>supE</i> Δ (<i>hsdM-mcrB</i>) 5 (<i>r_k⁻m_k⁺</i> <i>McrB</i> ⁻) <i>thi</i> Δ(<i>lac-proAB</i>)	Promega, Madison (USA)
<i>DB3.1</i>	F ⁻ <i>gyrA462</i> <i>endA1</i> Δ (<i>sr1-recA</i>) <i>mcrB</i> <i>mrr</i> <i>hsdS20</i> (<i>r_B⁻</i> , <i>m_B⁻</i>) <i>supE44</i> <i>ara-14</i> <i>galK2</i> <i>lacY1</i> <i>proA2</i> <i>rpsL20</i> (<i>Sm^R</i>) <i>xyl-5λ</i> - <i>leu</i> <i>mtl1</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>BL21(DE3)</i>	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)	Invitrogen, Karlsruhe

2.7.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Folgende *S. cerevisiae*-Stämme wurden verwendet:

Tab. 2.8 Zusammenstellung der verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme mit Angabe der Bezugsquelle

Stamm	Genotyp	Quelle
KF1	<i>MATa; trp1-901; leu2-3,112; his3 Δ 200 gal4Δ; gal80Δ; LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ SPAL10-URA3</i>	Prof. Dr. rer. nat. K. Butz, DKFZ, Heidelberg
MaV203	<i>MATa; leu2-3,112; trp1-901; his3Δ200; ade2-101; cyh2R; can1R; gal4Δ; gal80Δ; GAL1::lacZ; HIS3UASGAL1::HIS3@LYS2; SPAL10::URA3</i>	Invitrogen, Karlsruhe

2.7.3 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden verwendet:

Tab. 2.9 Zusammenstellung der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Quelle
HeLa	menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs)	American Type Culture Collection
U2OS	menschliche Epithelzellen eines Osteosarkomas	American Type Culture Collection
293FT	Durch Simian Virus 40 (SV40) immortalisierte embryonale menschliche Nierenzellen	Invitrogen; Karlsruhe

2.8 Oligonukleotide

2.8.1 Primer

Die Klonierungsprimer wurden von Hermann GbR-Synthetische Biomoleküle, Denzlingen bzw. Biomers.net GmbH, Ulm erworben. Die Sequenzierungsprimer wurden von der DNA-Sequenzierungsfirma GATC Biotech AG, Konstanz hergestellt.

Tab. 2.10 Verwendete Klonierungsprimer mit Angabe der Annealing-Temperatur (T_a) und Enzyme der eingebauten Schnittstellen

Primer	Nukleotidsequenz (5'-3')	T_a (°C)	Enzym
ID1-Y2HF ID1-Y2HR	GACGCGTCGACTTAAAGTCGCCAGTGGCAG GTAAAGCGGCCGCTCAGCGACACAAGATGC	66,0°C	<i>SaII</i> <i>NotI</i>

ID2-Y2HF ID2-Y2HR	CGGACTAGTACAAAGCCTTCAGTCCCGTGAGGTCC GTCCCCGCGGTACGCCACACAGTGCTTTGCTGTC	58,1°C	<i>SpeI</i> <i>SacII</i>
ID3-Y2HF ID3-Y2HR	GGACTAGTACAAGGCGCTGAGCCCGGTG GTCCCCGCGGTACAGTGGCAAAAGCTCC	58,1°C	<i>SpeI</i> <i>SacII</i>
ID4-Y2HF ID4-Y2HR	GGACTAGTACAAGGCGGTGAGCCCGGTG GGACGTCTCAGCGGCACAGAATGCTGTC	53,2°C	<i>SpeI</i> <i>AatII</i>
ID1-M2HF ID1-M2HR	GACGCGTCGACTTAAAGTCGCCAGTGGCAG GTAAAGCGGCCGCTCAGCGACACAAGATGC	66,0°C	<i>Sall</i> <i>NotI</i>
ID2-M2HF ID2-M2HR	GACGCGTCGACTTAAAGCCTTCAGTCCCGTGAGGTCC GTAAAGCGGCCGCTCAGGCCACACAGTGCTTTGCTGTC	58,1°C	<i>Sall</i> <i>NotI</i>
ID3-M2HF ID3-M2HR	GACGCGTCGACTTAAAGCGCTGAGCCCGGTG GTAAAGCGGCCGCTCAGTGGCAAAAGCTCCTTTTG	58,1°C	<i>Sall</i> <i>NotI</i>
ID4-M2HF ID4-M2HR	GACGCGTCGACTTAAAGCGGTGAGCCCGGTG GTAAAGCGGCCGCTCAGCGGCACAGAATGCTGTC	53,2°C	<i>Sall</i> <i>NotI</i>
VP22/NES-TRX-Apt.5F VP22/NES-TRX-Apt.5R	CGATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGAC TCCAGAATCGGGGCGATCATTTTGACGGACCC	58,1°C	
VP22/NES-TRX-Apt.7F VP22/NES-TRX-Apt.7R	CGATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGAC AAAATCACATCCAGCCTCACATAAACTCCAAAGCTG	58,1°C	
VP22/NES-TRX-Apt.10F VP22/NES-TRX-Apt.10R	CGATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGAC CCTCCCCGCAAAATTAGCAATAACCCACGACG	58,1°C	
VP22/NES-TRX-Apt.-13F VP22/NES-TRX-Apt.-13R	CGATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGAC GGCCAGGTTAGCGTCGAGGAACCTTTCAACTG	58,1°C	
VP22/NES-TRX-Apt.-17F VP22/NES-TRX-Apt.-17R	CGATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGAC ATTCAGAATCCACGTAAAATTGCAACCCAAACGCAG	58,1°C	
VP22/NES-TRXF VP22/NES-TRXR	CGATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGAC GGCCAGGTTAGCGTCGAGGAACCTTTCAACTG	58,1°C	
VP22-2-Apt.-TRX5F VP22-2-Apt.-TRX5R	CGATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGAC TCCAGAATCGGGGCGATCATTTTGACGGACCC	58,1°C	
VP22-2-Apt.-TRX-7F VP22-2-Apt.-TRX-7R	CGATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGAC AAAATCACATCCAGCCTCACATAAACTCCAAAGCTG	58,1°C	
VP22-2-Apt.-TRX-10F VP22-2-Apt.-TRX-10R	CGATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGAC CCTCCCCGCAAAATTAGCAATAACCCACGACG	58,1°C	
VP22-2-Apt.-TRX-13F VP22-2-Apt.-TRX-13R	CGATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGAC GGCCAGGTTAGCGTCGAGGAACCTTTCAACTG	58,1°C	
VP22-2-Apt.-TRX-17F VP22-2-Apt.-TRX-17R	CGATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGAC ATTCAGAATCCACGTAAAATTGCAACCCAAACGCAG	58,1°C	
VP22-2-TRXF VP22-2-TRXR	CGATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGAC GGCCAGGTTAGCGTCGAGGAACCTTTCAACTG	58,1°C	
pCMV/myc/nuc-cyto-Apt.5F pCMV/myc/nuc-cyto-Apt.5R	GCCGCTCGAGATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGAC GTAAAGCGGCCGCTCCAGAATCGGGGCGATCATTTTG	63,5°C	<i>Sall</i> <i>NotI</i>
pCMV/myc/nuc- cyto-Apt.7F pCMV/myc/nuc- cyto-Apt.7R	GCCGCTCGAGATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGAC GTAAAGCGGCCGCAAAATCACATCCAGCCTCACATAAAC	63,5°C	<i>Sall</i> <i>NotI</i>
pCMV/myc/nuc-cyto-Apt.10F pCMV/myc/nuc-cyto-Apt.10R	GCCGCTCGAGATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGAC GTAAAGCGGCCGCCCTCCCCGCAAAATTAGCAATAAC	63,5°C	<i>Sall</i> <i>NotI</i>
pCMV/myc/nuc-cyto-Apt.13F pCMV/myc/nuc-cyto-Apt.13R	GCCGCTCGAGATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGAC GTAAAGCGGCCGCGGCCAGGTTAGCGTCGAGGAAC	63,5°C	<i>Sall</i> <i>NotI</i>
pCMV/myc/nuc-cyto-Apt.17F pCMV/myc/nuc-cyto-Apt.17R	GCCGCTCGAGATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGAC GTAAAGCGGCCGCATTGAGAATCCACGTAAAATTGCAAC	63,5°C	<i>Sall</i> <i>NotI</i>
pCMV/myc/nuc-cyto-TRXF pCMV/myc/nuc-cyto-TRXR	GCCGCTCGAGATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGAC GTAAAGCGGCCGCGGCCAGGTTAGCGTCGAGGAAC	63,5°C	<i>Sall</i> <i>NotI</i>

Lumio-DEST-Apt.5F Lumio-DEST-Apt.5R	CACCATGGGCGATAAAATTATTCACCTGACTGAC TCCAGAATCGGGGCGATCATTTTGACGGACCC	55,5°C	
Lumio-DEST-Apt.7F Lumio-DEST-Apt.7R	CACCATGGGCGATAAAATTATTCACCTGACTGAC AAAATCACATCCAGCCTCACATAAACTCCAAAGCTG	55,5°C	
Lumio-DEST-Apt.10F Lumio-DEST-Apt.10R	CACCATGGGCGATAAAATTATTCACCTGACTGAC CCTCCCCGAAAATTAGCAATAACCCACGACG	55,5°C	
Lumio-DEST-Apt.13F Lumio-DEST-Apt.13R	CACCATGGGCGATAAAATTATTCACCTGACTGAC GGCCAGGTTAGCGTCGAGGAACCTTTCAACTG	55,5°C	
Lumio-DEST-Apt.17F Lumio-DEST-Apt.17R	CACCATGGGCGATAAAATTATTCACCTGACTGAC ATTCAGAATCCACGTAATAATCGAACCCAAACGCAG	55,5°C	
Lumio-DEST-TRXF Lumio-DEST-TRXR	CACCATGGGCGATAAAATTATTCACCTGACTGAC GGCCAGGTTAGCGTCGAGGAACCTTTCAACTG	55,5°C	

Tab. 2.11 Verwendete Sequenzierungsprimer

Primer	Nukleotidsequenz (5'-3')
M13 Forward	GTAAACGACGGCCAG
M13 Revers	CAGGAAACAGCTATGAC
pPC97 Forward	GAATAAGTGCGACATCATCATC
pPC97 Revers	CATTTAAAGACCGTTCCATCTG
pPC86 Forward	TATAACGCGTTTGGAACTCACT
pPC86 Revers	CATTTAAAGACCGTTCCATCTG
T7 Promoter Primer	TAATACGACTCACTATAGGG
GATC T7-981079 (T7 EEV)	TAATACGACTCACTATAG
GATC 1-79620	TGACGCAAATGGGCGGTAGG

2.8.2 siRNA- und shRNA-Oligonukleotide

Die siRNA- und shRNA-Oligonukleotide für die Inaktivierung der ID-Genexpression wurden von Hermann GbR-Synthetische Biomoleküle, Denzlingen bzw. Biomers.net GmbH, Ulm erworben.

Tab. 2.12 Verwendete siRNA- und shRNA-Oligonukleotide für die Inaktivierung der *ID1*-Genexpression

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'-3')
ID1-siRNA-1	Die Sequenz liegt wegen Patentierungsabsichten nur den Gutachtern vor.
ID1-siRNA-2	GCGGCCACUGCGCCCUAAUU UUAAGGGCGCAGUGGCCGCUU
ID1-siRNA-3	GCUCCUCUCUGCACACCUAAU UAGGUGUGCAGAGAGGAGCUU
ID1-siRNA-4	GAACUCGGAAUCCGAAGUUUU AACUUCGGAUUCCGAGUUCUU

ID1-siRNA-A	AACUCGGAUCCGAAGUUGGGUU CCCAACUUCGGAUCCGAGUUUU
ID1-siRNA-B	AAGAGGAAUUACGUGCUCUGUUU ACAGAGCACGUAAUCCUCUUUU
ID1-siRNA-C	AACUCGGAUCCGAAGUUGGAUU UCCAACUUCGGAUCCGAGUUUU
ID1-shRNA-1	GATCCCCGCGCGCTGAAGGCCGGAATTCAAGAGATTGCCGGCCTTCAGCGCGCTTTTTGGAAA AGCTTTTCCAAAAAGCGCGCTGAAGGCCGGAATCTCTTGAATTGCCGGCCTTCAGCGCGCGGG
ID1-shRNA-2	GATCCCCGCGGCCACTGCGCCCTTAATTCAAGAGATTAAGGGCGCAGTGGCCGCTTTTTGGAAA AGCTTTTCCAAAAAGCGGCCACTGCGCCCTTAATCTCTTGAATTAAGGGCGCAGTGGCCGCGGG
ID1-shRNA-3	GATCCCCGCTCCTCTCTGCACACCTATTCAAGAGATAGGTGTGCAGAGAGGAGCTTTTTGGAAA AGCTTTTCCAAAAAGCTCCTCTCTGCACACCTATCTCTTGAATAGGTGTGCAGAGAGGAGCGGG
ID1-shRNA-4	GATCCCCAAGAGGAATTACGTGCTCTTTCAAGAGAAGAGCACGTAATTCCTCTTTTTTTGGAAA AGCTTTTCCAAAAAAGAGGAATTACGTGCTCTTCTCTTGAAGAGCACGTAATTCCTCTTGGG
ID1-shRNA-A	GATCCCCAAGAGGAATTACGTGCTCTTTCAAGAGAAGAGCACGTAATTCCTCTTTTTTTGGAAA AGCTTTTCCAAAAAAGAGGAATTACGTGCTCTTCTCTTGAACCAACTTCGGATTCCGAGTTGGG
ID1-shRNA-B	GATCCCCAAGAGGAATTACGTGCTCTGTTTCAAGAGAACAGAGCACGTAATTCCTCTTTTTTTGGAAA AGCTTTTCCAAAAAAGAGGAATTACGTGCTCTGTTCTCTTGAACAGAGCACGTAATTCCTCTTGGG
ID1-shRNA-C	Die Sequenz liegt wegen Patentierungsabsichten nur den Gutachtern vor.
ID1-shRNA-Scr	GATCCCCCATCTTACCGAGCATGACGTTCAAGAGACGTCATGCTCGGTAAGATGTTTTTGGAA AGCTTTTCCAAAAACATCTTACCGAGCATGACGTTCTTGAACGTCATGCTCGGTAAGATGGG

2.9 Vektoren und Plasmidkonstrukte

2.9.1 Vektoren und DNA-Standards

Folgende vorhandene Vektoren wurden verwendet:

Tab. 2.13 Vorhandene Vektoren

Vektoren	Quelle	Vektorgroße
pCMV-ID1 (p1121)	Israel Laboratory, Dartmouth Medical School, USA	7,3 kb
pCMV-ID2 (p1122)	Israel Laboratory, Dartmouth Medical School, USA	7,2 kb
pCMV-ID3 (p1123)	Israel Laboratory, Dartmouth Medical School, USA	7,2 kb
pcDNA3-ID4 (p1124)	Israel Laboratory, Dartmouth Medical School, USA	5,9 kb
PCR [®] 2.1 Topo [®]	Invitrogen, Karlsruhe	3,9 kb
pPC97	Prof. Dr. rer. nat. K. Butz, DKFZ, Heidelberg	8,3 kb
pPC86	Prof. Dr. rer. nat. K. Butz, DKFZ, Heidelberg	7,0 kb

pADTRX-Peptid-Aptamere	Prof. Dr. rer. nat. K. Butz, DKFZ, Heidelberg	7,4 kb
pADpep2-Peptid-Aptamere	Prof. Dr. rer. nat. K. Butz, DKFZ, Heidelberg	7,1 kb
pBIND	Promega, Madison (USA)	6,4 kb
pACT	Promega, Madison (USA)	5,5 kb
pACT2	Prof. Dr. rer. nat. K. Butz, DKFZ, Heidelberg	5,5 kb
pACTTRX	Prof. Dr. rer. nat. K. Butz, DKFZ, Heidelberg	5,9 kb
pRC [®] T7/VP22/NES-2-TOPO [®]	Invitrogen, Karlsruhe	4,9 kb
pRC [®] T7/VP22-2-TOPO [®]	Invitrogen, Karlsruhe	4,9 kb
pRC/CMV-VP22-2-TRX	Prof. Dr. rer. nat. K. Butz, DKFZ, Heidelberg	6,5 kb
pCMV/myc/nuc	Invitrogen, Karlsruhe	5,0 kb
pCMV/myc/cyto	Invitrogen, Karlsruhe	4,9 kb
pCMV/myc/nuc-GFP	Invitrogen, Karlsruhe	5,7 kb
pCMV/myc/cyto-GFP	Invitrogen, Karlsruhe	5,6 kb
pENTR/D-TOPO [®]	Invitrogen, Karlsruhe	2,6 kb
pcDNA [™] 6.2/cLumio [™] -DEST	Invitrogen, Karlsruhe	6,8 kb
pcDNA [™] 6.2/nLumio [™] -DEST	Invitrogen, Karlsruhe	6,8 kb
pSUPER.retro.	OligoEngine, Seattle (USA)	6,3 kb
pcDNA3-ID1-FLAG	Dr. J. Hasskarl, Universitätsklinikum, Freiburg	5,9 kb
pcDNA3-S5A-HA	Dr. J. Hasskarl, Universitätsklinikum, Freiburg	6,5 kb
GeneRuler [™] 1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot	
GeneRuler [™] 100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot	
TrackIt. [™] 100 bp DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe	
TrackIt. [™] 1 Kb DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe	

2.9.2 Plasmidkonstrukte

Die im Folgenden aufgelisteten Plasmidkonstrukte wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt:

Tab. 2.14 Im Rahmen dieser Arbeit erstellte Plasmidkonstrukte

Name des Subklons	Name des Zielvektors	sense	antisense	Insertgröße
PCR [®] 2.1 Topo [®] -ID1	PCR [®] 2.1 Topo [®]	<i>Sall</i>	<i>NotI</i>	468 bp
PCR [®] 2.1 Topo [®] -ID2	PCR [®] 2.1 Topo [®]	<i>SpeI</i>	<i>SacII</i>	405 bp
PCR [®] 2.1 Topo [®] -ID3	PCR [®] 2.1 Topo [®]	<i>SpeI</i>	<i>SacII</i>	360 bp
PCR [®] 2.1 Topo [®] -ID4	PCR [®] 2.1 Topo [®]	<i>SpeI</i>	<i>AatII</i>	485 bp
pPC97-ID1	pPC97	<i>Sall</i>	<i>NotI</i>	468 bp
pPC97-ID2	pPC97	<i>SpeI</i>	<i>SacII</i>	405 bp
pPC97-ID3	pPC97	<i>SpeI</i>	<i>SacII</i>	360 bp
pPC97-ID4	pPC97	<i>SpeI</i>	<i>AatII</i>	485 bp

pPC86-ID1	pPC86	<i>SalI</i>	<i>NotI</i>	468 bp
pBIND-ID1	pBIND	<i>SalI</i>	<i>NotI</i>	468 bp
pBIND-ID2	pBIND	<i>SalI</i>	<i>NotI</i>	405 bp
pBIND-ID3	pBIND	<i>SalI</i>	<i>NotI</i>	360 bp
pBIND-ID4	pBIND	<i>SalI</i>	<i>NotI</i>	485 bp
pBIND-S5A	pBIND	<i>SalI</i>	<i>NotI</i>	1,1 kb
pACT-S5A	pACT	<i>SalI</i>	<i>NotI</i>	1,1 kb
pACT2-Peptid-Aptamere 1 bis 4	pACT2	<i>EcoRI</i>	<i>BamHI</i>	60 bp
pACTTRX- Peptid-Aptamer 5	pACTTRX	<i>NdeI</i>	<i>XbaI</i>	520 bp
pACTTRX- Peptid-Aptamere 6 bis 9	pACTTRX	<i>NdeI</i>	<i>XbaI</i>	460 bp
pACTTRX- Peptid-Aptamere 10 bis 30	pACTTRX	<i>NdeI</i>	<i>XbaI</i>	400 bp
pRC [®] T7/VP22/NES-2-TOPO [®] -TRX-Apt.-5	pRC [®] T7/VP22/NES-2-TOPO [®]			201 bp
pRC [®] T7/VP22/NES-2-TOPO [®] -TRX-Apt.-7	pRC [®] T7/VP22/NES-2-TOPO [®]			144 bp
pRC [®] T7/VP22/NES-2-TOPO [®] -TRX-Apt.-10	pRC [®] T7/VP22/NES-2-TOPO [®]			159 bp
pRC [®] T7/VP22/NES-2-TOPO [®] -TRX-Apt.-13	pRC [®] T7/VP22/NES-2-TOPO [®]			390 bp
pRC [®] T7/VP22/NES-2-TOPO [®] -TRX-Apt.-17	pRC [®] T7/VP22/NES-2-TOPO [®]			159 bp
pRC [®] T7/VP22/NES-2-TOPO [®] -TRX	pRC [®] T7/VP22/NES-2-TOPO [®]			330 bp
pRC [®] T7/VP22-2-TOPO [®] -TRX-Apt.-5	pRC [®] T7/VP22-2-TOPO [®]			201 bp
pRC [®] T7/VP22-2-TOPO [®] -TRX-Apt.-7	pRC [®] T7/VP22-2-TOPO [®]			144 bp
pRC [®] T7/VP22-2-TOPO [®] -TRX-Apt.-10	pRC [®] T7/VP22-2-TOPO [®]			159 bp
pRC [®] T7/VP22-2-TOPO [®] -TRX-Apt.-13	pRC [®] T7/VP22-2-TOPO [®]			390 bp
pRC [®] T7/VP22-2-TOPO [®] -TRX-Apt.-17	pRC [®] T7/VP22-2-TOPO [®]			159 bp
pRC [®] T7/VP22-2-TOPO [®] -TRX	pRC [®] T7/VP22-2-TOPO [®]			330 bp
pRC/CMV-VP22-2-TRXApt.-5	pRC/CMV-VP22-2-TRX	<i>NdeI</i>	<i>XbaI</i>	201 bp
pRC/CMV-VP22-2-TRXApt.-7	pRC/CMV-VP22-2-TRX	<i>NdeI</i>	<i>XbaI</i>	144 bp
pRC/CMV-VP22-2-TRXApt.-10	pRC/CMV-VP22-2-TRX	<i>NdeI</i>	<i>XbaI</i>	159 bp
pRC/CMV-VP22-2-TRXApt.-13	pRC/CMV-VP22-2-TRX	<i>NdeI</i>	<i>XbaI</i>	390 bp
pRC/CMV-VP22-2-TRXApt.-17	pRC/CMV-VP22-2-TRX	<i>NdeI</i>	<i>XbaI</i>	159 bp
pCMV/myc/nuc-Apt.-5	pCMV/myc/nuc	<i>SalI</i>	<i>NotI</i>	201 bp
pCMV/myc/nuc-Apt.-7	pCMV/myc/nuc	<i>SalI</i>	<i>NotI</i>	144 bp
pCMV/myc/nuc-Apt.-10	pCMV/myc/nuc	<i>SalI</i>	<i>NotI</i>	159 bp
pCMV/myc/nuc-Apt.-13	pCMV/myc/nuc	<i>SalI</i>	<i>NotI</i>	390 bp
pCMV/myc/nuc-Apt.-17	pCMV/myc/nuc	<i>SalI</i>	<i>NotI</i>	159 bp
pCMV/myc/nuc-TRX	pCMV/myc/nuc	<i>SalI</i>	<i>NotI</i>	330 bp
pCMV/myc/cyto-Apt.-5	pCMV/myc/cyto	<i>SalI</i>	<i>NotI</i>	201 bp
pCMV/myc/cyto-Apt.-7	pCMV/myc/cyto	<i>SalI</i>	<i>NotI</i>	144 bp
pCMV/myc/cyto-Apt.-10	pCMV/myc/cyto	<i>SalI</i>	<i>NotI</i>	159 bp
pCMV/myc/cyto-Apt.-13	pCMV/myc/cyto	<i>SalI</i>	<i>NotI</i>	390 bp
pCMV/myc/cyto-Apt.-17	pCMV/myc/cyto	<i>SalI</i>	<i>NotI</i>	159 bp
pCMV/myc/cyto-TRX	pCMV/myc/cyto	<i>SalI</i>	<i>NotI</i>	330 bp
pENTR/D-TOPO [®] -Apt-5	pENTR/D-TOPO [®]			201 bp

pENTR/D-TOPO [®] -Apt-7	pENTR/D-TOPO [®]			144 bp
pENTR/D-TOPO [®] -Apt-10	pENTR/D-TOPO [®]			159 bp
pENTR/D-TOPO [®] -Apt-13	pENTR/D-TOPO [®]			390 bp
pENTR/D-TOPO [®] -Apt-17	pENTR/D-TOPO [®]			159 bp
pENTR/D-TOPO [®] -TRX	pENTR/D-TOPO [®]			330 bp
pcDNA TM 6.2/cLumio TM -DEST-Apt.-5	pcDNA TM 6.2/cLumio TM -DEST			201 bp
pcDNA TM 6.2/cLumio TM -DEST-Apt.-7	pcDNA TM 6.2/cLumio TM -DEST			144 bp
pcDNA TM 6.2/cLumio TM -DEST-Apt.-10	pcDNA TM 6.2/cLumio TM -DEST			159 bp
pcDNA TM 6.2/cLumio TM -DEST-Apt.-13	pcDNA TM 6.2/cLumio TM -DEST			390 bp
pcDNA TM 6.2/cLumio TM -DEST-Apt.-17	pcDNA TM 6.2/cLumio TM -DEST			159 bp
pcDNA TM 6.2/cLumio TM -DEST-TRX	pcDNA TM 6.2/cLumio TM -DEST			330 bp
pcDNA TM 6.2/nLumio TM -DEST-Apt.-5	pcDNA TM 6.2/nLumio TM -DEST			201 bp
pcDNA TM 6.2/nLumio TM -DEST-Apt.-7	pcDNA TM 6.2/nLumio TM -DEST			144 bp
pcDNA TM 6.2/nLumio TM -DEST-Apt.-10	pcDNA TM 6.2/nLumio TM -DEST			159 bp
pcDNA TM 6.2/nLumio TM -DEST-Apt.-13	pcDNA TM 6.2/nLumio TM -DEST			390 bp
pcDNA TM 6.2/nLumio TM -DEST-Apt.-17	pcDNA TM 6.2/nLumio TM -DEST			159 bp
pcDNA TM 6.2/nLumio TM -DEST-TRX	pcDNA TM 6.2/nLumio TM -DEST			330 bp
pSUPER.retro.- ID1-shRNA-1	pSUPER.retro.	<i>Bgl</i> II	<i>Hind</i> III	60 bp
pSUPER.retro.- ID1-shRNA-2	pSUPER.retro.	<i>Bgl</i> II	<i>Hind</i> III	60 bp
pSUPER.retro.- ID1-shRNA-3	pSUPER.retro.	<i>Bgl</i> II	<i>Hind</i> III	60 bp
pSUPER.retro.- ID1-shRNA-4	pSUPER.retro.	<i>Bgl</i> II	<i>Hind</i> III	60 bp
pSUPER.retro.- ID1-shRNA-A	pSUPER.retro.	<i>Bgl</i> II	<i>Hind</i> III	60 bp
pSUPER.retro.- ID1-shRNA-B	pSUPER.retro.	<i>Bgl</i> II	<i>Hind</i> III	60 bp
pSUPER.retro.- ID1-shRNA-C	pSUPER.retro.	<i>Bgl</i> II	<i>Hind</i> III	60 bp
pSUPER.retro.- ID1-shRNA-Scr.	pSUPER.retro.	<i>Bgl</i> II	<i>Hind</i> III	60 bp

2.10 Antiseren

Die im Folgenden aufgelisteten Antikörper wurden verwendet:

Tab. 2.15 Verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Katalog Nr.	Isotyp	Verdünnung	Quelle
ID1 (C-20)	SC-488	Kaninchen IgG,	1:200	Santacruz, Heidelberg
ID2 (C-20)	SC-489	Kaninchen IgG	1:200	Santacruz, Heidelberg
ID3 (H-70)	SC-13046	Kaninchen IgG	1:200	Santacruz, Heidelberg
ID4 (H-70)	SC-13047	Kaninchen IgG	1:200	Santacruz, Heidelberg
Anti-Rpn10 (S5a)	PW9250	Maus IgG	1:1000	Biomol, Hamburg
Anti- α -Tubulin	T9026	Maus IgG	1:1000	Sigma, Deisenhofen
Anti-VP22	R999-25	Maus IgG	1:5000	Invitrogen, Karlsruhe

Anti-myc	R950-25	Maus IgG	1:5000	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-myc-HRP	R951-25	Maus IgG	1:5000	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-His (C-term)	R930-25	Maus IgG	1:5000	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-His (C-term)-HRP	R931-25	Maus IgG	1:5000	Invitrogen, Karlsruhe

Tab. 2.16 Verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Quelle
Ziege anti Kaninchen IgG, Meerettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelt	Santa Cruz, Heidelberg
Ziege anti Maus IgG, Meerettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelt	Santa Cruz, Heidelberg

2.11 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Methoden wurden, soweit nicht anders angegeben, nach Standardprotokollen durchgeführt.¹³⁸

2.11.1 Kultivierung von *Escherichia coli*-Stämmen

Die *E. coli*-Stämme wurden in LB-Vollmedium mit dem jeweils notwendigen Antibiotikum auf einem Schüttler bei 37°C kultiviert. Sowohl die Anzucht in Flüssigkulturen als auch auf Festagarplatten erfolgte über Nacht. Zur Herstellung von Festagarplatten wurde 1,5% (w/v) Agar zugefügt. LB-Vollmedium und Festagarplatten enthielten Ampicillin (Endkonzentration 150 µg/ml) oder Kanamycin (Endkonzentration 50 µg/ml).

LB-Medium, pH 7,0

Bacto-Trypton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	10 g

ad 1 Liter Bidest.; die Lösung wurde 25 min bei 121°C autoklaviert.

Um *E. coli*-Stämme über einen längeren Zeitraum zu lagern, wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurden Zellen aus einer stationär gewachsenen Flüssigkultur im Verhältnis 1:1 mit 40%igem Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

2.11.2 Präparation elektrokompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Die Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach Standardprotokoll (Bio-Rad, München). 50 ml LB-Medium wurden mit einer einzelnen *E. coli*-Kolonie beimpft (300 rpm, ü.N., 37°C). 500 ml LB-Medium wurden mit 1/100 Volumen der Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,5-0,6 kultiviert. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden für 20 min auf Eis inkubiert, anschließend in ein kaltes Zentrifugengefäß überführt und sedimentiert (4000 × g, 15 min, 4°C). Das Pellet wurde zunächst in 500 ml, dann in 250 ml und anschließend in 20 ml eiskaltem, 10%igem Glycerin resuspendiert und wiederholt sedimentiert. Abschließend wurde das Pellet in 2 ml eiskaltem, 10%igem Glycerin resuspendiert, in 50 µl Aliquots unterteilt und bei -80°C gelagert.

2.11.3 Präparation CaCl₂-kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Zur Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 5 ml LB Medium mit einer einzelnen *E. coli*-Kolonie beimpft (300 rpm, ü.N., 37°C). 50 ml LB Medium wurden mit 1/100 Volumen der Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,5-0,6 kultiviert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen sedimentiert (4000 × g, 15 min, 4°C), anschließend in 4 ml 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 2,5 h auf Eis inkubiert. Die 4 ml Zellsuspension wurden mit 1 ml 100%igem Glycerin gemischt, in 50 µl Aliquots unterteilt und bei -80°C gelagert.

2.11.4 Transformation elektrokompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte wie oben beschrieben (s. 2.11.2). 50 µl Aliquots wurden auf Eis aufgetaut, mit 10-50 ng Plasmid-DNA versetzt und in eine eiskalte Elektroporationsküvette (0,2 cm) transferiert. Die Elektroporation erfolgte bei 200 Ω, 25 µF und 2,5 kV (Micropulser, Bio-Rad, München). Nach erfolgter Elektroporation wurden die Zellen sofort in 1 ml eiskaltem SOC-Medium resuspendiert, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und 1 h bei 37°C und 3000 rpm inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen sedimentiert (13000 rpm, 1 min), das Pellet in 100-150 µl SOC-Medium resuspendiert und auf LB-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation fand über Nacht bei 37°C statt.

SOC Medium, pH 7,0

Bacto-Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,58 g
KCl	0,19 g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	2,46 g

ad 1 Liter Bidest.; die Lösung wurde 25 min bei 121°C autoklaviert.

ad 18 ml 1 M Glucose (steril filtriert)

2.11.5 Transformation von CaCl₂-kompetenten *Escherichia coli*-Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte wie oben beschrieben (s. 2.11.3). 50 µl Aliquots wurden auf Eis aufgetaut, mit 10-50 ng Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 s. Die Zellen wurden in 250 µl SOC-Medium aufgenommen, für 60 min bei 37°C inkubiert und danach auf Selektivagarplatten ausplattiert. Um eine blau/weiss-Selektion durchführen zu können, wurde den Platten je 40 µl 0,1 M IPTG und 1% X-Gal (in DMF) zugesetzt. Die Inkubation fand über Nacht bei 37°C statt.

2.11.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

5 ml LB-Medium wurden mit einer *E. coli*-Kolonie mit dem entsprechenden Plasmid angeimpft und unter Schütteln bei 37°C über Nacht in Anwesenheit des entsprechenden Antibiotikums inkubiert. Die Plasmidpräparation erfolgte mit dem Minipräp Kit (Qiagen, Hilden). Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu gewinnen, wurden 5 ml LB-Medium mit einer Kolonie mit dem entsprechenden Plasmid angeimpft und in Anwesenheit des entsprechenden Antibiotikums ca. 8 h inkubiert. 1 ml der 5-ml-Kultur wurde entnommen und zu 150 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum gegeben. Diese Kultur wurde unter Schütteln bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Plasmidpräparation erfolgte mit dem Maxipräp Kit (Qiagen, Hilden).

2.11.7 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Reaktionsansatz

0,5-2 µg DNA

2 µl geeigneter 10× Puffer (nach Herstellerangabe)

1-5 U Restriktionsendonuklease

ad 20 µl Bidest. (steril)

Der Ansatz wurde unter den vom Hersteller [New England Biolabs (NEB), Beverly, USA] angegebenen Bedingungen inkubiert und anschließend im Agarosegel analysiert. Als Reaktionspuffer wurde das NEB-Puffer-System verwendet. Diese Puffer werden vom Hersteller als 10× Konzentrate zusammen mit den Enzymen geliefert.

2.11.8 Agarose-Gelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung von DNA wurden horizontale Agarosegele mit Agarose-Konzentrationen zwischen 0,5% und 2% (w/v) in 1× TAE-Puffer gelöst verwendet. Die zu analysierende DNA wurde mit 1/5 Volumen 6× konzentriertem DNA-Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese fand bei 100-150 V für 1-2 h bei RT statt. Die Agarose wurde in 0,5 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung 10-20 min inkubiert. Nach Anregung mit UV-Licht (254 nm) wurde der Ethidiumbromid-DNA-Komplex im sichtbaren Bereich (500-590 nm) als rot-orange leuchtende Bande sichtbar gemacht und dokumentiert.

50× TAE-Puffer

0,5 M EDTA pH 8	100 ml
Essigsäure	57,1 ml
Tris/Base	242 g
ad 1 Liter Bidest.	

6× DNA Probenpuffer

0,25% (w/v) Bromphenolblau
5 mM EDTA
30% (v/v) Glycerin

2.11.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die DNA-Fragmente wurden zunächst elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die weiteren Schritte

erfolgten nach Angaben des Herstellers. Die Elution der DNA erfolgte mit 30 µl autoklaviertem Bidest. oder TE-Puffer. Die Eluate wurden bei -20°C gelagert.

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl, pH 7,5

1 mM EDTA

Die Lösung wurde 25 min bei 121°C autoklaviert.

2.11.10 Alkalische Phosphatase-Behandlung

Vektor-DNA wurde nach der Restriktion für 30 min bei 37°C mit alkalischer Phosphatase (Calf Intestine Phosphatase, CIAP) behandelt. Dabei wurden die 5'-Phosphat-Reste beseitigt, um die Religation des linearisierten Vektors zu vermeiden. Die 5'-Dephosphorylierungsansätze enthielten in einem Endvolumen von 10 µl 50 ng Vektor-DNA, 0,1 U CIAP und 1 µl 10× Dephosphorylierungspuffer.

2.11.11 Kinase-Reaktion

DNA-Oligonukleotide wurden für 30 min bei 37°C mit T4-Polynukleotid-Kinase behandelt. Dabei wurden die 5'-Enden phosphoryliert, um die Ligation der Oligonukleotide in den entsprechenden Vektoren zu erleichtern. Die Kinase-Reaktionsansätze enthielten in einem Endvolumen von 10 µl 20-100 ng Oligonukleotide, 10 U T4-Polynukleotid-Kinase, 1 µl 10mM ATP und 1 µl 10× Kinase-Puffer.

2.11.12 Annealing von Oligonukleotiden (si/shRNA)

Je 1 µl der beiden komplementären DNA-Oligonukleotide [3 µg/µl], die zur Synthese der shRNA entwickelt wurden, wurden mit 48 µl 5× Annealing-Puffer gemischt und im Hitzeblock auf 90°C für 4 min erwärmt; dann wurde die Reaktionsmischung auf dem Labortisch 45-60 min auf RT abgekühlt.

Zum Annealing von siRNA-Oligonukleotiden wurden je 30 µl der beiden komplementären siRNA-Oligonukleotide [50 µM] mit 15 µl 5× Annealing-Puffer gemischt und im Hitzeblock

auf 90°C für 1-2 min erwärmt; dann wurde die Reaktionsmischung auf dem Labortisch 45-60 min auf RT abgekühlt.

5× Annealing-Puffer

50 mM Tris/HCl, pH 7,5–8,0

100 mM NaCl

Die Lösung wurde 25 min bei 121°C autoklaviert.

2.11.13 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligationsansätze enthielten in einem Endvolumen von 20 µl 50 ng Vektor-DNA, die 3-5fache Menge einzuklonierendes Fragment, 2 µl 10× Ligase-Puffer und 1 U T4-DNA-Ligase. Die Ligation erfolgte 2 h bei RT oder über Nacht bei 16°C.

2.11.14 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels PCR

Die Standard-PCR wurde für die zu amplifizierenden Sequenzen verwendet. Die Reaktion erfolgte in einem Endvolumen von 25 µl in einem Gradienten-Thermocycler (Eppendorf, Hamburg) nach folgender Zusammensetzung:

Zusammensetzung der PCR-Reaktion

10× PCR-Puffer der jeweiligen DNA-Polymerase	2,5 µl
10 mM dNTP	2,5 µl
10 mM MgCl ₂	2,5 µl
10× Q-Solution	2,5 µl
10 µM spezifisches Oligonukleotid (sense)	2,5 µl
10 µM spezifisches Oligonukleotid (antisense)	2,5 µl
40 ng DNA-Matrize	2,5 µl
2,5 U/µl Taq/Pfu-Polymerase	0,5 µl
	ad 25 µl Bidest. (autoklaviert)

PCR-Programm

Reaktion	Temperatur	Zeit
1 initiale Denaturierung	94°C	5 min
2 Denaturierung	94°C	1 min
3 Primerhybridisierung	Primer-abhängig	1 min

4	Amplifikation Wiederholung der Schritte 2-4: 29-mal	72°C	größenabhängig
5	anschließende Amplifikation	72°C	10 min
6	Ende	4°C	unendlich

Das PCR-Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung aus dem Agarose-Gel gereinigt und zur TOPO TA PCR-Klonierung oder Blunt TOPO PCR-Klonierung eingesetzt.

2.11.15 TOPO TA PCR-Klonierung und Blunt TOPO PCR-Klonierung

Die Amplifikate der Taq-Polymerase wurden mit Hilfe des TOPO TA PCR Cloning Kits und die Amplifikate der Pfu-Polymerase mit Hilfe des Blunt TOPO PCR Cloning Kits in die entsprechenden PCR-TOPO-TA-Vektoren oder PCR-Blunt-TOPO-Vektoren nach Anleitung des TOPO[®] Cloning Manual (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert. Die weitere Klonierung der Amplifikate erfolgte mit Hilfe der angegebenen Restriktionsendonukleasen in die vorgesehenen Zielvektoren.

2.11.16 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die photometrische Messung von DNA erfolgte bei 260 nm in einer Glaskapillare gegen TE bzw. H₂O. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 31 µg/ml Oligonukleotiden.

2.11.17 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Doppelstrang-DNA wurde bei der DNA-Sequenzierungsfirma GATC Biotech AG (Konstanz) mit dem DNA-Sequenzierungsgerät (Modell 373A, ABI) durchgeführt. Es wurde die Taq-Cycle-Sequencing-Methode, die auf der Methode nach Sanger et al. (1977) aufbaut, verwendet. Zum Kettenabbruch wurden Fluorochrom-gekoppelte Didesoxynukleotide eingesetzt. Dazu wurde der ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix verwendet, der neben dem Puffer für die Sequenzierungsreaktion und der AmpliTaq-DNA-Polymerase auch den dNTP-Mix und

Fluorochrom-gekoppelte Terminatoren im richtigen Verhältnis enthält. Die computergestützt ausgewerteten Sequenzen wurden elektronisch geliefert.

2.12 Yeast-Two-Hybrid-Methoden

2.12.1 Medien und Wachstumsbedingungen von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* (Stamm-KF1 und Stamm-MaV203) auf Agarplatten und in Submerskulturen erfolgte bei 30°C. Aminosäurezusammensetzungen variierten je nach Fragestellung. Der pH-Wert wurde immer auf 6,0 eingestellt. Festagarplatten wurden durch Hinzufügen von 2% (w/v) Agar zu den Medien hergestellt. Die Medien wurden bei 121°C für 25 min autoklaviert. Die Herstellung der Medien für Two-Hybrid-Stämme erfolgte nach Angaben des PROQUEST™ Two-Hybrid System (GibcoBRL, Eggenstein).

YPD-Medium

Hefeextrakt	10 g
Pepton	20 g
Glucose	20 g

ad 1 Liter Bidest.; die Lösung wurde 25 min bei 121°C autoklaviert.

Aminosäure-Mix (ohne L-Leucin, L-Tryptophan und L-Histidin)

L-Alanin	L-Glutaminsäure	L-Prolin
L-Arginin	L-Glutamin	L-Serin
L-Asparaginsäure	L-Isoleucin	L-Threonin
L-Asparagin	L-Lysin	L-Tyrosin
L-Cystein	L-Methionin	
L-Glycin	L-Phenylalanin	

je 10 g in 500-ml-Flasche gut mischen

SC-Medium

Hefe-Stickstoff-Basis (ohne Aminosäuren)	5 g
Ammoniumsulfat	15 g
Aminosäure-Mix	4 g

ad 1 Liter Bidest., pH 6,0 mit NaOH; die Lösung wurde 25 min bei 121°C autoklaviert.

SC-Agar-Medium

Hefe-Stickstoff-Basis (ohne Aminosäuren)	5 g
Ammoniumsulfat	15 g
Aminosäure-Mix	4 g

ad 500 ml Bidest., pH 6,0 mit NaOH; die Lösung wurde 25 min bei 121°C autoklaviert. Zur Herstellung von Festagarplatten wurde 20 g Agar in 500 ml Bidest. autoklaviert und zu 500 ml SC-Medium gegeben.

Markerlösungen für Yeast-Two-Hybrid-Medien

Marker	Konzentration der Stammlösung	Anteil in 1 L SC-Medium
100 mM L-Leucin	2,6 g/200 ml	8 ml
100 mM L-Tryptophan	2,6 g/200 ml	8 ml
100 mM L-Histidin	2,6 g/200 ml	8 ml
20 mM Uracil	2,6 g/200 ml	8 ml
0,5% Adenin	1,0 g/200 ml	20 ml

Die Stammlösungen wurden steril filtriert. Zur Herstellung der Selektionsmedien wurde 1 Liter SC-Medium mit den jeweils entsprechenden Markerlösungen vermischt.

Um Hefestämme über einen längeren Zeitraum zu lagern, wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurden Zellen aus einer stationär gewachsenen Flüssigkultur im Verhältnis 1:1 mit 40%igem Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

2.12.2 Präparation LiAc-kompetenter Hefe und Plasmidtransformation

Zur Herstellung kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen (KF1 und MaV203) wurde die Lithium-Acetat-Methode nach Gietz eingesetzt (Gietz *et al.*, 1992). 5 ml YPD-Medium bzw. selektives SC-Medium wurden mit einer einzelnen *S. cerevisiae*-Kolonie beimpft (300 rpm, ü.N., 30°C). 300 ml YPD- bzw. entsprechendes SC-Medium wurden mit einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes so angeimpft, dass sich eine OD_{600nm} von 0,3 ergab. Die Kultur wurde bei 30°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 geschüttelt und die Zellen anschließend durch Zentrifugation (4000 rpm, 10 min, 4°C) geerntet. Nach einem Waschschriff in sterilem Wasser wurde das Zellpellet in 1,5 ml eiskalter LiAc-TE-Lösung auf Eis resuspendiert, anschließend wurden die Zellen sofort zur Transformation verwendet.

Für eine Hefetransformation wurde zunächst gescherte Heringssperma-DNA (10 mg/ml) durch 5-minütiges Kochen denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. 50 µg dieser DNA-Lösung wurden dann zu 100 µl kompetenten Hefezellen gegeben. Anschließend wurden 1 µg Plasmid-DNA und 600 µl LiAc-TE-PEG-Lösung hinzugefügt. Der Transformationsansatz

wurde dann 30 min bei 30°C geschüttelt. Danach erfolgte ein 15-minütiger Hitzeschock bei 42°C. Die Zellen wurden dann ca. 10 s bei 13000 rpm und RT pelletiert, in 100 µl sterilem H₂O aufgenommen und auf entsprechenden SC-Agar-Platten ausplattiert.

10× TE	10× LiAc	LiAc-TE-Lösung	LiAc-TE-PEG-Lösung
100 mM Tris-HCl, pH 8,0	1 M Li-Acetat, pH 8,0	1 ml 10× LiAc	1 ml 10× LiAc
10 mM EDTA		1 ml 10× TE	1 ml 10× TE
		8 ml Bidest.	8 ml 50 % (w/v) PEG4000

Die Lösungen wurden 25 min bei 121°C autoklaviert.

2.12.3 Transformation der Peptid-Aptamer-Library in *S. cerevisiae*

Zum Screening von ID1-spezifischen Peptid-Aptameren wurde die Hefe, die das Bait-Protein ID1 exprimiert, mit den Peptid-Aptamer-Expressionsbanken (Prof. Dr. rer. nat. K. Butz, DKFZ, Heidelberg) transformiert. 5 ml YPD-Medium wurden mit einer einzelnen *S. cerevisiae*-Kolonie einer Selektionsplatte (SC-Leu⁻-Agar-Platte) beimpft (300 rpm, ü.N., 30°C). 2 × 500 ml YPD-Medium wurden mit einer Übernachtskultur so angeimpft, dass sich eine OD_{600nm} von 0,2 ergab. Die Kultur wurde bei 30°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,8 geschüttelt und die Zellen anschließend in 4 × 250-ml-Portionen durch Zentrifugation (3500 rpm, 10 min, RT) geerntet. Nach zwei Waschschritten in 4 × 50-ml-Falkonröhrchen (2000 rpm, 5 min, RT) in je 50 ml Bidest. wurde das Zellpellet in je 10 ml LiAc-TE-Lösung resuspendiert und zentrifugiert (2000 rpm, 5 min, RT). Die Zellpellets wurden in einem 15-ml-Falkonröhrchen vereint und anschließend mit gleichem Volumen einer LiAc-TE-Lösung versetzt (Endvolumen mindestens 4 ml).

Für die Hefetransformation mit der linearen bzw. der konstringierten Peptid-Aptamer-Library wurde gescherte Heringssperma-DNA (10 mg/ml) durch 5-minütiges Kochen denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Jeweils 180 µl dieser DNA-Lösung wurden dann zu je 20 µl Library-DNA [1µg/µl] gegeben. Die jeweiligen Master-Mixe wurden in 20-µl-Portionen in 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen verteilt und jeweils mit 200 µl kompetenten Hefezellen und 1,2 ml LiAc-TE-PEG-Lösung gemischt. Der Transformationsansatz wurde dann 30 min bei 30°C geschüttelt. Danach erfolgte ein 15-minütiger Hitzeschock bei 42°C. Die Zellen wurden dann kurz auf Eis inkubiert, ca. 10 s bei 15000 rpm (Tischzentrifuge) pelletiert und in je 500 µl sterilem Wasser aufgenommen. Das Zellpellet des jeweiligen Library-Transformationsansatzes wurde in je einem 50-ml-Falkonröhrchen vereint (Endvolumen 5

ml). Je 250 µl wurden auf einer Selektionsplatte, die kein Leucin, Tryptophan und Histidin enthielten (SC-Leu⁻-Trp⁻-His⁻-Agar-Platten), ausplattiert.

2.12.4 Wachstumstest der Two-Hybrid-Transformanten

Für den Wachstumstest der Two-Hybrid-Transformanten wurden die Hefekolonien auf entsprechende Selektivplatten gestempelt und 3 Tage bei 30°C inkubiert.

Zur Untersuchung der Hefekolonien auf physiologische Merkmale wurde die „Mutterplatte“ (master plate) aus SC-Agar-Medium, das kein Leucin und Tryptophan enthielt, hergestellt. Die Hefekolonien wurden mittels der Stempeltechnik nach Lederberg auf Selektivnährböden, „Tochterplatten“ (replica plates), die weder Leucin und Tryptophan noch einen der Selektionsmarker Histidin, Adenin oder Uracil enthielten, übertragen. Entsprechend der verwendeten Selektivmedien wurden nach der Inkubation der Agarplatten Aussagen über physiologische Merkmale der einzelnen Kolonien gemacht.

2.12.5 X-Gal-Assay der Two-Hybrid-Transformanten

Der β-Galaktosidase-Filtertest erfolgte nach PROQUEST™ Two-Hybrid-System (GibcoBRL, Eggenstein). Mit Filterpapier wurden Filterabzüge von frischen Hefekolonien hergestellt. Die Filter wurden mit den Kolonien nach oben in flüssigen Stickstoff gelegt und nach ca. 10 s bei RT aufgetaut. Anschließend wurden die Filter mit den Kolonien nach oben auf Whatmanpapier gelegt, das mit Z-Puffer/X-Gal-Lösung getränkt wurde. Die Inkubation der Filter erfolgte bei 37°C bis zu 8 Stunden.

Z-Puffer pH 7,0

Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O	16,10 g/l
NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	5,50 g/l
KCl	0,75 g/l
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,246 g/l

Die Lösung wurde 25 min bei 121°C autoklaviert.

X-Gal Stocklösung

10 mg 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid in 100 µl DMF lösen; dunkle Lagerung bei -20°C.

Z-Puffer/X-Gal-Lösung für eine Membran

Z-Puffer	10 ml
β -Mercaptoethanol	60 μ l
X-Gal-Stocklösung	100 μ l

2.12.6 Zellaufschluss nach Yaffe und Schatz

Um denaturierte Hefe-Rohlysate zu erhalten, wurden diese nach Yaffe und Schatz¹³⁹ aufgeschlossen. Nach der Anzucht der Zellen wurden 30 mg Zellmaterial mit 148 μ l 2 M NaOH und 12 μ l β -Mercaptoethanol versetzt und auf 1 ml mit Bidest. aufgefüllt. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurde der Ansatz mit 160 μ l einer 50%igen Trichloressigsäure (TCA) versetzt, für weitere 10 min auf Eis inkubiert und anschließend sedimentiert (2 min, 13.000 rpm, 4°C). Das Sediment wurde mit 1 M Tris-Base gewaschen, erneut sedimentiert und in SDS Probenpuffer resuspendiert, für 5 min bei 95°C erhitzt und anschließend für die SDS-Gelelektrophorese (s. 2.14.2) verwendet.

SDS-Probenpuffer

1 M Tris-Base in 12,5% SDS	140 μ l
50% (v/v) Glycerin	160 μ l
1 M DTT	90 μ l
0,1% (w/v) Bromphenolblau	10 μ l

2.12.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Hefekulturen (15 ml) wurden über Nacht (300 rpm, 30°C) im Selektionsmedium (SC-Leu⁻Trp⁻) zu einer hohen Zelldichte angezogen. Die Kulturen wurden durch Zentrifugation (2 min, 2000 rpm, RT) pelletiert. Nach vollständiger Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 50 μ l Puffer I resuspendiert und zentrifugiert (2 min, 2000 rpm, RT). Das Pellet wurde in 200 μ l Puffer II resuspendiert und in ein Schraubdeckelgefäß mit vorgelegten, säuregewaschenen Glass-Beads (425-600 μ m) überführt. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Rüttelgerätes (FastPrep® Instrument der Firma Qbiogene, USA) lysiert (20 s, Geschw. 4,5 m/s). Der lysierte Ansatz wurde kurz auf Eis gestellt und zentrifugiert (5 min, 1500 rpm, RT), der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen

Volumen Phenol versetzt und für 15 s gevortext. Nach anschließender Zentrifugation (15 s 1500 rpm, RT) wurden 2 µl Überstand für die Transformation in *E. coli* TG2 verwendet.

Puffer I

100 mM Tris-HCl pH 7,4
100 mM EDTA

Puffer II

2 % Triton X-100
1 % SDS
100 mM NaCl
10 mM Tris-HCl pH 7,4
1 mM EDTA

Die Lösungen wurden 25 min bei 121°C autoklaviert.

2.13 Zellbiologische Methoden

2.13.1 Medien und Wachstumsbedingungen

Das für die Kultivierung von adhärent wachsenden Zelllinien verwendete Zellkulturmedium DMEM [Dulbecco's Modified Essential Medium, GibcoBRL, Eggenstein] wurde mit 1% Penicillin/Streptomycin, 2 mM Glutamin und 10% fötalem Kälberserum (FCS) angesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C im CO₂-Brutschrank (Heraeus Instruments GmbH, Stuttgart) bei 95% relativer Luftfeuchte und 5% CO₂. Je nach Teilungsrate und Dichte der Zellen wurden die Zellverbände alle 3-4 Tage mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA gelöst und die vereinzelter Zellen wurden auf neue Gewebekulturflaschen im Verhältnis 1:5 ausplattiert.

Zellkultur-PBS pH 7,2

8 mM Na₂HPO₄
1,5 mM KH₂PO₄
140 mM NaCl
3 mM KCl

Trypsin/EDTA-Lösung

0,05% (w/v) Trypsin
0,02% (w/v) EDTA in modifizierter Puck's Salzlösung

2.13.2 Zellzählung mit dem Trypanblau-Ausschlusstest

Die Zellzahlbestimmung erfolgte durch Färbung mit Trypanblau. Die Zellsuspension wurde mit Trypanblau (0,5%) 1:2 verdünnt. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde die mit Trypanblau verdünnte Zellsuspension 5-10 min bei RT inkubiert. Ein Aliquot wurde unter ein

Deckglas auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Auszählung von vier Quadraten (je 16 Einzelquadrate) erfolgte lichtmikroskopisch. Ein Quadrat enthält 0,1 µl Zellsuspension. Während vitale Zellen in der Lage sind den Farbstoff auszuschließen und im mikroskopischen Bild hell erscheinen, nehmen tote Zellen Trypanblau auf und sind tiefblau gefärbt.

2.13.3 Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen

Zur Konservierung wurden konfluent wachsende Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert, in Medium aufgenommen und für 5 min bei $1000 \times g$ sedimentiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 3 ml Einfriermedium aufgenommen (3×10^6 Zellen/ml) und auf drei Cryoröhrchen verteilt. Die Zellen wurden zunächst bei -80°C über Nacht eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Revitalisierung wurde das Cryoröhrchen aus dem Stickstofftank genommen, zunächst für ca. 1 min bei RT angewärmt und anschließend im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen war. Die Zellsuspension wurde entnommen und in eine Zellkulturflasche mit 14 ml Medium ohne Selektionsantibiotika überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um DMSO-Reste, tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen sowie gegebenenfalls Selektionsantibiotika einzuführen.

Einfriermedium

3 ml DMSO

6 ml FCS

11 ml DMEM mit 1% Pen/Strep, 2 mM Glutamin und 10% FCS

2.13.4 Transfektion von Plasmid-DNA oder siRNA in Eukaryoten-Zellen

Das Einschleusen von Plasmid-DNA oder siRNA in Zellen wurde entweder mit der Lipofektamin-Methode (Invitrogen, Karlsruhe) oder mit der Calcium-Phosphat-Methode (Chen und Okayama, 1987)¹⁴⁰ durchgeführt.

2.13.4.1 Transfektion von Zelllinien nach der Lipofektamin-Methode

Bei der Lipofektamin-Methode bindet die DNA an kationische Lipide in Liposomen. Diese Komplexe werden von der Zellmembran aufgenommen. Zur Transfektion der Zelle mit Plasmid-DNA wurden $1,5 \times 10^6$ HeLa-, U2OS- oder 293FT-Zellen auf einer 60-mm-Gewebeschale in Medium ohne Antibiotikum ausplattiert und kultiviert, bis 90% Konfluenz erreicht war. Zur Transfektion wurden 20 μ l Lipofectamine™ 2000 und 8 μ g DNA in jeweils 500 μ l Opti-MEM-Medium (GibcoBRL) gelöst und getrennt für 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden beide Ansätze gemischt und für 20 min zur Bildung der DNA-Lipid-Komplexe inkubiert. Der Mix wurde dann direkt auf die Zellen gegeben. Nach 5 h wurden die Zellen gewaschen und das Medium gewechselt. Die Zellen wurden 24-96 h kultiviert und die Proteinexpression mittels Immunoblot-Analyse überprüft.

Die Klonierung der transfizierten Zellen erfolgte durch limitierte Verdünnung in 96-Loch-Mikrotiterplatten. Die Zellen wurden soweit verdünnt, dass sich rein statistisch je eine Zelle in 200 μ l bzw. in 400 μ l Selektionsmedium befand. Aus der Zellsuspension wurden 200 μ l pro Loch ausplattiert. Die Zellen wuchsen im Zeitraum von einigen Tagen zu einer Population heran, wurden in größere Kulturschalen überführt und die Proteinexpression mittels Immunoblot-Analyse überprüft.

Zur Transfektion der Zellen mit siRNA wurden $1,5 \times 10^5$ HeLa-, U2OS- oder 293FT-Zellen auf einer 60-mm-Gewebeschale in Medium ohne Antibiotikum ausplattiert und kultiviert, bis 30-50% Konfluenz erreicht war. Zur Transfektion wurden 10 μ l Lipofectamine™ 2000 und 200 pmol siRNA in jeweils 500 μ l Opti-MEM-Medium gelöst und getrennt für 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden beide Ansätze gemischt und für 20 min zur Bildung der DNA-Lipid-Komplexe inkubiert. Der Mix wurde dann direkt auf die Zellen gegeben. Nach 5 h wurden die Zellen gewaschen und das Medium wurde gewechselt. Die Zellen wurden 24-96 h kultiviert und die Proteinexpression mittels Immunoblot-Analyse überprüft.

2.13.4.2 Transfektion von Zelllinien nach der Calcium-Phosphat-Methode

Für die Transfektionen nach der Calcium-Phosphat-Methode (Chen & Okayama, 1987) wurden die HeLa-Zellen am Vortag in einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen auf einer 60-mm-Gewebeschale ausplattiert. Vier Stunden vor Zugabe der DNA wurde das Medium gewechselt. Zur Herstellung des Präzipitats wurden 6 μ g der zu transfizierenden Plasmide (Qiagen-Präparation) sowie 25 μ l 2,5 M CaCl_2 in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt,

mit Bidest. auf 250 µl aufgefüllt und gemischt. Diese DNA-Mischung wurde in 250 µl HBS eingetropft. Das dabei entstandene Präzipitat blieb 15 min erschütterungsfrei bei RT stehen, um anschließend auf die Zellen gegeben zu werden. Nach 16- bis 18-stündiger Kultivierung (35 °C, 3 % CO₂) wurde das Medium abgesaugt, die Zellen 2 × mit PBS gewaschen und in 3 ml Medium 24 h kultiviert (37°C, 5% CO₂). Anschließend wurden die Zellen lysiert und für β-Gal- und Luciferase-Assay verwendet.

2× HBS-Lösung

2,5 M CaCl₂

50 mM HEPES, pH 7,1

1,5 mM Na₂HPO₄

0,28 M NaCl

Die Lösung wurde 25 min bei 121°C autoklaviert.

2.13.5 Fluoreszenz-Mikroskopie

Zur Optimierung der Transfektionseffizienzen wurden die Zellen mit dem Reporter-Plasmid kotransfiziert. Als Reportergen wurde das grün-fluoreszierende Protein (GFP) verwendet.

Bei erfolgreicher Transfektion und Expression des Plasmids wird das stark fluoreszierende GFP gebildet, das bei einer Anregung von 460 nm Licht im Bereich über 500 nm emittiert. Zur Fixierung wurden die auf Deckgläsern kultivierten Zellen 3 × mit PBS gewaschen und mit 1ml 4%igem Formaldehyd (verdünnt in PBS) für 10-30 min bei RT überschichtet. Nach 5-maligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläser luftgetrocknet und auf Objektträger aufgeklebt. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenz-Mikroskopie (Modell Axiovert 135 Zeiss, Oberkochen).

2.13.6 Herstellung von Zellextrakten für Western-Blot

Nach der Lipofektamin-Methode transfizierte Zellen wurden in Gewebekulturschalen mit 60 mm Durchmesser für 24-96 h kultiviert und danach 2 × mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach der sorgfältigen Entfernung von PBS wurden die Zellen für 30 min auf Eis in 200 µl Proteinextraktionspuffer inkubiert. Nach dem Abschaben der Zellen mit zuvor in Ethanol und PBS gespülten und getrockneten Schabern wurden die Zell-Lysate in Eppendorf-Reaktionsgefäße (auf Eis) überführt. Membran- und DNA-Reste wurden danach durch

Zentrifugation ($14000 \times g$, 10 min, 4°C) entfernt. Die Überstände wurden in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße (auf Eis) überführt. Der Gesamtproteingehalt wurde mit der Proteinbestimmung nach Bradford (2.14.1) ermittelt und die Menge zum Auftragen auf ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamid-Gel wurde auf 20 μg berechnet. Der Proteinextrakt wurde am gleichen Tag für die SDS-PAGE und die anschließende Western-Blot-Analyse verwendet bzw. bei -80°C eingefroren.

Proteinextraktionspuffer

0,5% Triton X-100	10 mM p-Nitrophenylphosphat
25 mM HEPES pH 7,6	0,3 mM Natriumorthovanadat
300 mM NaCl	10 mM Benzamidin
10% Glycerin	2 mM DTT
0,2 mM EDTA	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin
1,5 mM MgCl_2	2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin
20 mM β -Glycerophosphat	1,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pepstatin

2.13.7 Herstellung von Zellextrakten für β -Gal- und Luciferase-Assay

Nach der Calcium-Phosphat-Methode transfizierte Zellen wurden in Gewebekulturschalen mit 60 mm Durchmesser für 36-42 h kultiviert und danach $2 \times$ mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach der sorgfältigen Entfernung von PBS wurden die Zellen für 30 min auf Eis in 200 μl Tris-Phosphat-Lysepuffer inkubiert. Nach dem Abschaben der Zellen mit zuvor in Ethanol und PBS gespülten und getrockneten Schabern wurden die Zell-Lysate in Eppendorf-Reaktionsgefäße (auf Eis) überführt. Membran- und DNA-Reste wurden danach durch Zentrifugation ($12000 \times g$, 5 min, 4°C) entfernt. Die Überstände wurden in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße (auf Eis) überführt. Der Proteinextrakt wurde am gleichen Tag für die Messung der β -Galaktosidase- und Luciferase-Aktivität verwendet bzw. bei -80°C eingefroren.

Tris-Phosphat-Lyse-Puffer

25 mM Tris- H_3PO_4 pH 7,8
2 mM DTT
2 mM DCTA
10% Glycerin
1% Triton X-100

2.14 Proteinbiochemische Methoden

2.14.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 5 µl Proteinextrakt mit 795 µl Bidest. verdünnt und mit 200 µl Bradford-Reagenz vermischt. Die Mischung wurde 10 min bei RT inkubiert. Für den leeren Wert wurden statt 5 µl Proteinextrakt 5 µl Proteinextraktionspuffer verwendet. Nach der Messung der Absorption bei 595 nm in Küvetten im Spektralphotometer DU 640 wurde die Proteinkonzentration mittels einer Eichgerade bestimmt.

Vorher wurde für das Gerät eine Standardkurve erstellt. Ausgehend von einer BSA-Lösung (100 µg/ml) wurde nach obigem Schema eine Konzentrationsreihe (0 µg, 1 µg, 2 µg, 5 µg, 10 µg, 12 µg, 15 µg, 20 µg in 800 µl Bidest.) erstellt und mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt. Die gemessenen OD-Werte wurden in einem Diagramm gegen die jeweilige Proteinmenge aufgetragen und es wurde eine Eichgerade erstellt, mit der die Proteinkonzentration der Proben berechnet wurde.

2.14.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach Lämmli (1970) modifiziert. Mit dieser Methode wurden Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse unter denaturierenden Bedingungen in SDS-Gelen aufgetrennt. Zur Herstellung eines 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgels wurde zunächst das Trenngel aus 10 ml Bidest., 12,5 ml Acrylamid/bis-Acrylamid 37,5:1 Mix, 7,5 ml 4× Trenngelpuffer, 600 µl APS und 10 µl TEMED vorbereitet. Dieses wurde zwischen zwei Glasplatten, die in einem Gießgestell fixiert waren, bis zur Markierung gegossen und mit 2-3 ml Bidest. überschichtet. Das Sammelgel wurde aus 6,1 ml Bidest., 1,3 ml Acrylamid/bis-Acrylamid 37,5:1 Mix, 2,5 ml 4× Sammelgelpuffer, 150 µl APS und 20 µl TEMED vorbereitet. Nach der Aushärtung des Trenngels wurde das Bidest. entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Kamm zwischen die beiden Glasplatten gesteckt. Die Proben wurden im Verhältnis 5:1 mit 5fach konzentriertem Probenpuffer gemischt, 5 min bei 95°C gekocht und auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte in 1× Laemmli-Puffer bei 120 V für 1-2,5 h.

Acrylamidlösung

30 % Acrylamid (w/v)
 0,8 % Bisacrylamid (w/v)
 in Bidest.

4× Trenngelpuffer

1,5 M Tris-HCl pH 8,8
 0,4 % SDS (w/v)
 ad 1 Liter Bidest.

1× Probenpuffer

10 ml Glycerin
 10 ml 10% SDS
 12,5 ml 4× Sammelgelpuffer
 5 ml β -Mercaptoethanol
 1,25 mg Bromphenolblau
 ad 50 ml Bidest.

4× Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-HCl pH 6,8
 0,4 % SDS (w/v)
 0,001 % Bromphenolblau

10× Laemmli-Puffer

150 g Tris-HCl
 720 g Glycin
 500 ml 10% SDS
 ad 5 Liter Bidest.

APS

10 % Ammoniumperoxodisulfat in Bidest. (w/v)

2.14.3 Anfärbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Blue

Nach Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE wurden nicht genutzte Spuren des Gels abgeschnitten, das Gel 10 min bei RT in 20%iger TCA-Lösung fixiert, 10 min mit 7,5%iger Essigsäure zwischengewässert und anschließend in 50 ml Färbelösung unter leichtem Schütteln 45 min bei RT inkubiert. Nach dem Abgießen der Färbelösung wurde das blau eingefärbte Gel mit Entfärbelösung bis zur gewünschten Verringerung des Hintergrundes entfärbt; die Entfärbelösung wurde dabei mehrmals gewechselt. Anschließend wurde das Gel für 20 min gewässert und getrocknet.

Fixierungslösung

20% (v/v) Trichloressigsäure (TCA); 7,5% (v/v) Essigsäure

Färbelösung

0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250
 45,5% (v/v) Methanol
 9,2% (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung

30% (v/v) Ethanol

10% (v/v) Essigsäure

2.14.4 Western-Blot-Analyse

Nach der Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE wurden nicht genutzte Spuren des Gels abgeschnitten und das Gel in 1× Blotting-Puffer für ca. 30 min äquilibriert. Anschließend wurde die Nitrozellulose Blotting Membran 0,45 µm und 6 Lagen Whatman-GB002-Papier auf Gelgröße geschnitten. Die Membran wurde für 2 s in Methanol, dann für 2 min unter Bidest. und danach für ca. 15 min in 1× Blotting-Puffer äquilibriert. Das Whatman-Papier wurde in 1× Blotting-Puffer angefeuchtet. Der Transfer erfolgte in einer BlueBlot WET/1000-Transfer-Kammer nach folgendem Schema: Das Gel wurde auf drei Lagen Whatman-Papier gelegt, darauf folgte die Membran. Das wurde wiederum mit drei Lagen Whatman-Papier überschichtet. Der Aufbau erfolgte möglichst luftblasenfrei. Geblottet wurde bei 50-100 V und 200-400 mA für 1 h. Nach dem Blotten wurde die Membran 1-2 h in Blocking-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran kurz mit TNET gespült und danach mit dem Primerantikörper in TNET über Nacht bei 4°C schaukelnd inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Primerantikörper wurde die Membran dreimal für ca. 20 min mit TNET gewaschen und für 1-2 h mit dem an Meerettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper in TNET bei RT rollend inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal je für 20 min und zweimal je für 5 min mit TNET gewaschen. Die Detektion der Signale erfolgte mit dem ECL-Western-Blotting-Detektionssystem.

10× Transferpuffer pH 8,3 – 8,7

250 mM Tris

1,25 M Glycin

10 % Methanol

10× TNE

100 mM Tris-HCl

25 mM EDTA

500 mM NaCl

Blocking-Puffer

5% (w/v) entfettete Trockenmilch in TNET

1× TNET

1 ml Tween 20 in 1 Liter 1× TNE

2.14.5 „Strippen“ von Nitrocellulosemembranen

Das Strippen der Membran dient dazu, bereits gebundene Antikörper zu entfernen, so dass ein Nachweis mit einem anderen primären Antikörper möglich wird. Die Membran wurde 30 min bei 60°C mit Stripping-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran in Bidest. gewaschen bis kein β -Mercaptoethanol-Geruch mehr wahrnehmbar war. Die Membran wurde in Bidest. und TNET für jeweils 30 min gewaschen, anschließend geblockt und eine erneute Immunodetektion durchgeführt.

Stripping-Puffer

2% SDS

62,5 mM Tris-HCl pH 6,7

100 mM β -Mercaptoethanol

2.14.6 Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität in Zellextrakten

Die Messung der β -Galactosidase-Aktivität in Zellextrakten wurde zum Erfassen und Abgleichen von Schwankungen der Transfektionseffizienzen verwendet. Zur Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität wurden Zellextrakte aus transfizierten HeLa-Zellen hergestellt (s. 2.9.4). Für die Messung wurden 30 μ l Extrakt in eine auf Eis stehende 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert; dabei wurde die erste Kolonne mit Lysepuffer (s. 2.9.4) als Referenzwert beschickt. Nach der Zugabe von je 200 μ l β -Gal-Reaktionspuffer wurde der Ansatz bei RT bzw. 37°C 30-60 min bis zum Eintritt einer leichten Gelbfärbung inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 130 μ l 1 M Na_2CO_3 -Lösung gestoppt und die β -Galactosidase-Aktivität im ELISA-Meßgerät (Autoimmun Diagnostika, Straßburg) bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

β -Gal-Reaktionspuffer

ONPG-Stammlösung	12,5 ml
Puffer A	12,5 ml
Bidest.	25,0 ml

Puffer A pH 7,0

0,5 M Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O	60 ml
0,5 M NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	40 ml
2,5 M KCl	2 ml
1 M MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,5 ml
ad 500 ml Bidest.; die Lösung wurde 25 min bei 121°C autoklaviert.	
β-Mercaptoethanol	1,53 ml

ONPG-Stammlösung pH 7,5

4 mg ONPG pro ml in 100 mM Natriumphosphat-Puffer
Lösung bei -20°C lagern

100 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,5

0,2 M Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O	82 ml
0,2 M NaH ₂ PO ₄ • 2H ₂ O	18 ml
mit 100 ml Bidest. mischen	
Die Lösung wurde 25 min bei 121°C autoklaviert.	

2.14.7 Bestimmung der Luciferase-Aktivität in Zellextrakten

Die Luciferase wandelt das Substrat Luciferin in Gegenwart von molekularem O₂, ATP und Mg²⁺ in Oxylluciferin und CO₂ um. Das dabei emittierte Licht (562 nm) wird in einem Luminometer detektiert und die enzymatische Aktivität in relativer Lichteinheit (rlu × s⁻¹) ausgedrückt. Zur Bestimmung der Luciferaseaktivität wurden Zellextrakte aus transfizierten HeLa-Zellen hergestellt (s. 2.9.4). Für die Messung im Luminometer Lumat LB 9501 wurden 100 µl Extrakt zu 360 µl Luciferase-Reaktionspuffer in Plastik-Messröhrchen pipettiert und kurz luftblasenfrei gemischt. Nach der automatischen Injektion von 100 µl Luciferin-Lösung wurde die Messung über den Zeitraum von 20 s durchgeführt.

Luciferase-Reaktionspuffer	2× Glycylglycin	Luciferin-Lösung
1× Glycylglycin	50 mM Glycylglycin pH 7,8	0,5 mM Luziferin
5 mM ATP	30 mM MgSO ₄	

Die gemessenen Luciferase-Aktivitäten wurden durch Erfassen und Abgleichen von Schwankungen der Transfektionseffizienz mittels der β-Galactosidase-Aktivität als interner Kontrolle normalisiert. Die Luciferase-Aktivität wurde als relative Einheit in % ausgedrückt.

3 Ergebnisse

3.1 Screening von mit ID1 interagierenden Peptid-Aptameren mittels des Yeast-Two-Hybrid-Systems

Das Yeast-Two-Hybrid-System wurde angewendet, um nach ID1-spezifischen Peptid-Aptameren zu screenen. Da die zu den HLH-Proteinen der Klasse D gehörenden ID-Proteine (ID1-4) über vergleichbare Bindungsaffinitäten zu den bHLH-Transkriptionsaktivatoren der Klasse A und B verfügen und innerhalb ihrer HLH-Domänen hohe Sequenzhomologien zeigen, wurden im Rahmen dieser Arbeit auch ID2, ID3 und ID4 analysiert. Als Voraussetzung für die Isolierung der Peptide aus den Peptid-Aptamer-Expressionsbanken mussten die cDNAs von ID1-4 in Hefeexpressionsvektoren kloniert werden.

3.1.1 Klonierung der cDNAs von *ID1-4* in Hefe-Expressionsvektoren

Die cDNAs von *ID1-4* wurden aus den Vektoren p1121, p1122, p1123 und p1124 mit den Primern ID1-Y2HF/R, ID2-Y2HF/R, ID3-Y2HF/R und ID4-Y2HF/R mittels PCR amplifiziert (s. Abb. 3.1). Bei der Amplifizierung wurden gleichzeitig Restriktionsschnittstellen (s. 2.8.1) eingefügt, so dass die cDNA nach dem Restriktionsverdau im richtigen Leserahmen in den Hefe-Expressionsvektor pPC97 kloniert werden konnte und als Fusionsprotein mit der DNA-Bindungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors exprimiert wurde (Bait). Um zu prüfen, ob ID1 mit sich selbst interagiert, wurde die cDNA von ID1 im richtigen Leserahmen in den Hefe-Expressionsvektor pPC86 kloniert, so dass ID1 als Fusionsprotein mit der Transkriptions-Aktivierungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors exprimiert werden konnte (Prey).

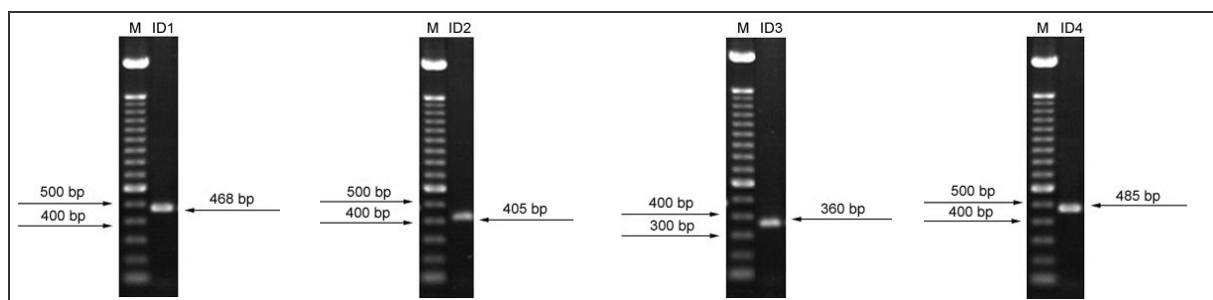


Abb. 3.1 PCR-Produkte der cDNAs von *ID1-4* für Yeast-Two-Hybrid-Experimente. Die cDNAs von *ID1-4* wurden aus den Vektoren p1121, p1122, p1123 und p1124 mit den Primern ID1-Y2HF/R, ID2-Y2HF/R, ID3-Y2HF/R und ID4-Y2HF/R amplifiziert.

Die cDNA-Amplifikate wurden mit Hilfe des TOPO-TA PCR Cloning Kits in den Vektor PCR®2.1 Topo® kloniert. Nach der Blau-Weiß-Selektion auf LB-Agarplatten mit X-Gal und Kanamycin wurden die positiven Klone durch Restriktionsverdau und Sequenzanalyse auf ihre Größe, Orientierung und korrekte Sequenz hin überprüft. Anschließend wurden die cDNAs im richtigen Leserahmen in den Hefe-Expressionsvektor pPC97 bzw. pPC86 kloniert und die richtige Größe, Orientierung und der Vektor/Insert-Übergang durch Restriktionsverdau und Sequenzanalyse überprüft (s. Abb. 3.2).

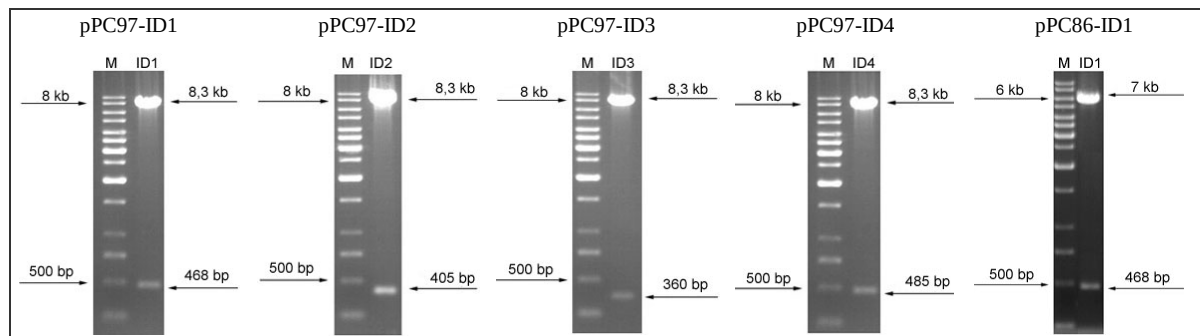


Abb. 3.2 Restriktionsanalyse der Fusionsplasmide pPC97-ID1-4 und pPC86-ID1. Zur Überprüfung der Insertgröße wurden pPC97-ID1 und pPC86-ID1 mit *Sall/NotI*, pPC97-ID2 und pPC97-ID3 mit *SpeI/SacII* und pPC97-ID4 mit *SpeI/AatII* verdaut.

3.1.2 Transformation der Fusionsplasmide und Untersuchung der autonomen Aktivierung der Reportergene

Die Fusionsplasmide wurden in den *S. cerevisiae*-Stamm MaV203 transformiert und die Klone auf SC-Selektionsmedien (s. Tab. 3.1) selektiert.

Tab. 3.1 Transformation der Fusionsplasmide in MaV203 und Selektion der Klone auf SC-Selektionsmedien (SC-Leu⁻, SC-Trp⁻ und SC-Leu⁻-Trp⁻).

Transformation	Plasmid 1	Plasmid 2	Selektion	Zweck
1	pPC97	-	SC-Leu ⁻	Transformationskontrolle
2	-	pPC86	SC-Trp ⁻	Transformationskontrolle
3	-	-	SC-Leu ⁻	Transformationskontrolle
4	pPC97	pPC86	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻	autonome Aktivierungskontrolle
5	pPC97-ID1	-	SC-Leu ⁻	Screening der Peptid-Aptamer-Library
6	pPC97-ID2	-	SC-Leu ⁻	Screening der Peptid-Aptamer-Library
7	pPC97-ID3	-	SC-Leu ⁻	Screening der Peptid-Aptamer-Library
8	pPC97-ID4	-	SC-Leu ⁻	Screening der Peptid-Aptamer-Library
9	pPC97-ID1	pPC86	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻	autonome Aktivierungskontrolle
10	pPC97-ID2	pPC86	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻	autonome Aktivierungskontrolle

11	pPC97-ID3	pPC86	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻	autonome Aktivierungskontrolle
12	pPC97	pPC86-ID1	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻	autonome Aktivierungskontrolle
13	pPC97-ID1	pPC86-ID1	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻	Selbst-Interaktionstest

Die Expression der Fusionsproteine wurde durch Herstellung von Proteinextrakten und anschließendem Western-Blot mit den entsprechenden Antikörpern gegen die einzelnen ID-Proteine überprüft. Die Expression von ID1-3 wurde nachgewiesen (s. Abb. 3.3). Da ID4 in MaV203 nicht exprimiert werden konnte, wurde ID4 in den nachfolgenden Yeast-Two-Hybrid-Experimenten nicht verwendet.

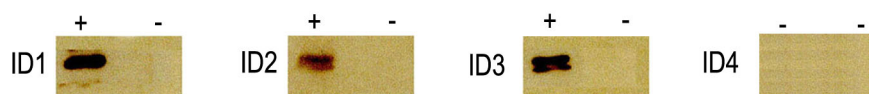


Abb. 3.3 Expression der Fusionsproteine GAL4-IDs in *S. cerevisiae* MaV203. Die Expression von ID1-3 wurde in *S. cerevisiae* MaV203 durch Western-Blot-Analysen mittels der anti-ID1-3-Antikörper (ID1 C-20, ID2 C-20 und ID3 H-70) nachgewiesen. ID4 konnte in MaV203 nicht exprimiert werden. Für die negative Kontrolle wurde das Expressionplasmid pPC97 ohne IDs verwendet.

Diese Klone wurden auf die autonome Aktivierung der Reportergene untersucht, indem die Kolonien auf entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen wurden. Keiner der Klone zeigte Wachstum unter diesen Selektionsbedingungen. Der Selbst-Interaktionstest von ID1 resultierte ebenso in keiner Aktivierung der Reportergene (s. Tab. 3.2).

Tab. 3.2 Untersuchung der autonomen Aktivierung der Reportergene auf Selektionsplatten (SC-Leu⁻-Trp⁻-His⁻ + 3AT, SC-Leu⁻-Trp⁻-Ura⁻ und YPD + X-Gal). Die Klone zeigten keine autonome Aktivierung und der Selbst-Interaktionstest von ID1 resultierte in keiner Aktivierung der Reportergene. Jede Untersuchung wurde in drei unabhängigen Ansätzen wiederholt.

Fusionsplasmide in MaV203	autonome Aktivierung		
	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -His ⁻ + 3AT [0 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM and 100 mM]	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -Ura ⁻	YPD + X-Gal
pPC97-ID1	-	-	-
pPC97-ID2	-	-	-
pPC97-ID3	-	-	-
pPC86-ID1	-	-	-
pPC97-ID1 und pPC86	-	-	-
pPC97-ID2 und pPC86	-	-	-
pPC97-ID3 und pPC86	-	-	-
pPC86-ID1 und pPC97	-	-	-
pPC97-ID1 und pPC86-ID1	-	-	-

3.1.3 Transformation der Peptid-Aptamer-Expressionsbanken und Isolierung von positiven Klonen

Zwei cDNA-Banken aus randomisierten Peptid-Aptameren lagen in den Vektoren pADTRX (konstringierte Form) und pADpep2 (lineare Form) kloniert vor und die einzelnen Klone wurden somit als Fusionsproteine mit der Transkriptions-Aktivierungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors exprimiert (Prey). Bait-Plasmid pPC97-ID1, das ID1 als Fusionsprotein mit der DNA-Bindungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors exprimiert, und Prey-Plasmide wurden in den Hefestamm MaV203 kotransformiert.

Insgesamt wurden mit den jeweiligen Peptid-Aptamer-Expressionsbanken ca. $1,5 \times 10^6$ Klone gescreent. Eine Peptid-Aptamer-Expressionsbank besitzt eine theoretische Diversität von ca. 5×10^7 exprimierten Aptameren. Damit wurde nicht die gesamte Library mit dem durchgeführten Screening erfasst. Es ist jedoch sehr schwierig, eine derart hohe Transformationseffizienz mit Hefezellen zu erreichen. Erfahrungsgemäß wird mit 10^6 gescreenten Klonen eine ausreichende Menge an verschiedenen Klonen erfasst, so dass sich Peptid-Aptamere mit hoher Spezifität und Affinität als Bindungspartner ableiten lassen.

Die Transformationseffizienz mit dem zuerst verwendeten Hefestamm KF1 war trotz mehrfach geänderter Transformationsprotokolle sehr gering und variierte erheblich. Erst mit dem kommerziell erhältlichen Hefestamm MaV203 (Invitrogen) wurde eine hohe und reproduzierbare Transformationseffizienz erreicht. Der Hefestamm MaV203 besitzt mehrere Reportergene unter dem Einfluss des GAL-4-Promotors. Basierend auf der Interaktion zwischen ID1 und der Peptid-Aptamer-Expressionsbank erlauben die Reportergene eine Selektion von Hefeklonen. Zur Selektion dienen drei Reportergene: *HIS3* ermöglicht der Hefe ein Überleben auf Histidin-Mangelmedium; *URA3* ermöglicht der Hefe ein Überleben auf Uracil-Mangelmedium. Besonders die Aktivierung des Uracil-Markers weist auf eine hochaffine Bindung zwischen Aptamer und Bait hin, da der vor dem Uracil-Selektionsmarker inserierte SPO1-Promotor ein negatives Regulationselement enthält, so dass dieser Promotor nur durch einen sehr stabilen Gal4-Transkriptionsfaktor aktiviert werden kann; *lacZ* kodiert für β -Galaktosidase, die in Tests mittels des Umsatzes des Substrats X-Gal nachgewiesen werden kann.

In Tab. 3.3 sind die einzelnen Selektionsschritte zur Ermittlung von positiven Klonen gezeigt. Die durch die Kotransformation erhaltenen Klone, die auf dem Histidin-Mangelmedium wuchsen, wurden auf das Uracil-Mangelmedium übertragen. Die Klone, die auf dem Uracil-Mangelmedium wuchsen, wurden mit β -Galactosidase-Assays überprüft. 17 Klone aus der

Kotransformation mit der konstringierten Peptid-Aptamer-Expressionsbank und vier Klone aus der Transformation mit der linearen Peptid-Aptamer-Expressionsbank, die die stärkste Blaufärbung in β -Galactosidase-Assays zeigten und somit die stärksten Interaktionen aufwiesen, wurden selektiert und weiter charakterisiert.

Tab. 3.3 Library-Screening von mit ID1 interagierenden Peptid-Aptameren. Es wurden 21 Klone aus der Kotransformationen mit Peptid-Aptamer-Expressionsbanken, bei denen alle Reportergene induziert waren, isoliert: 17 Klone aus der Kotransformation mit der konstringierten Peptid-Aptamer-Expressionsbank und vier Klone aus der Kotransformation mit der linearen Peptid-Aptamer-Expressionsbank.

Bait- und Prey-Plasmide in MaV203	Selektion	Anzahl der positiven Klone
pPC97-ID1 und pADTRX-Peptid-Aptamer	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻	$1,5 \times 10^6$
	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -His ⁻	$2,1 \times 10^3$
	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -Ura ⁻	210
	YPD mit X-Gal	17
pPC97-ID1 und pADpep2-Peptid-Aptamer	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻	$1,5 \times 10^6$
	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -His ⁻	$3,4 \times 10^3$
	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -Ura ⁻	418
	YPD mit X-Gal	4

Zur weiteren Charakterisierung der 21 selektierten Klone wurden die Plasmide aus der Hefe isoliert und in *E. coli* (Stamm TG2) amplifiziert. Hier wurde die Tatsache genutzt, dass es sich bei den Prey-Vektoren (Library-Vektoren), im Gegensatz zu den Bait-Vektoren, um „high copy“-Plasmide handelt, so dass sich diese während der Amplifikation in Bakterien anreichern. Bakterielle Kolonien wurden gepickt und durch Restriktionsverdau und Sequenzanalyse überprüft. Die Restriktionsanalyse durch *Hind*III zeigte, dass von den 17 isolierten pADTRX-Peptid-Aptameren 14 Monomere, eins Dimer und zwei Trimere waren. Dies zeigt, dass zwei oder mehr Peptid-Aptamere bei der Herstellung der Peptid-Aptamer-Expressionsbank in das Gerüstprotein TRX integriert waren. Die vier linearen pADpep2-Peptid-Aptamere waren Monomere (s. Abb. 3.4).

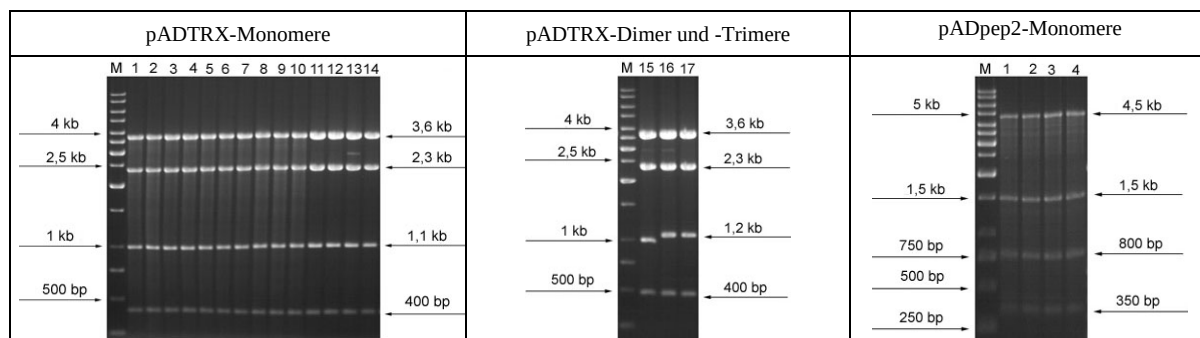


Abb. 3.4 Restriktionsanalyse der aus dem Hefestamm MaV203 isolierten Library-Plasmide. Zur Überprüfung der Insertgröße wurden die 21 isolierten Library-Plasmide durch *HindIII*-Verdau untersucht. Von 17 isolierten pADTRX-Peptid-Aptameren waren 14 Monomere (Spur 1-14), eins Dimer (Spur 15) und zwei Trimere (Spur 16-17). Vier lineare pADpep2-Peptid-Aptamere waren Monomere.

Zur Sequenzanalyse wurden insgesamt 105 Kolonien, d.h. je Hefe-Klon fünf bakterielle Kolonien, gepickt und durch Sequenzanalyse überprüft. Die Sequenzanalyse ergab 35 verschiedene Sequenzen von Peptid-Aptameren. Zwei Hefeklonpaare enthielten jeweils identische Peptid-Aptamere, d.h. insgesamt 37 Peptid-Aptamere. Dies zeigt, dass eine Hefezelle bei der Library-Transformation mehr als ein Prey-Plasmid aufgenommen hat und dasselbe Prey-Plasmid von mehreren Hefezellen aufgenommen wurde.

3.1.4 Verifizierung der Interaktion der Peptid-Aptamere mit ID1

Mehrere unterschiedliche falsch positive Klone können Phänotypen verursachen, die den Phänotypen der „echt“ positiven Klone ähnlich sind. Beispielsweise kann eine Mutation des Bait- oder Prey-Plasmids in der Hefe das Plasmid zum Selbst-Aktivator umwandeln, so dass ein falsch positiver Klon autonom ohne eine ID1/Aptamer-Interaktion auf Selektivmedien wachsen kann. Mehrere Hefezellen haben mehr als ein Library-Plasmid aufgenommen, das falsch oder echt sein konnte. Aus diesen Gründen wurden alle 37 isolierten Peptid-Aptamere auf ihre echte Interaktion mit ID1 untersucht. Hierfür wurden Bait- und Prey-Plasmide in MaV203 retransformiert, um die Phänotypen der Reportergene zu prüfen (s. Tab. 3.4).

Tab. 3.4 Retransformation der 37 isolierten Peptid-Aptamere in MaV203 und Selektion der Klone auf dem SC-Selektionsmedium SC-Leu⁻Trp⁻ zur Verifikation ihrer echten Interaktion mit ID1.

Transformation	Plasmid 1	Plasmid 2	Selektion	Zweck
1	pPC86	pPC97	SC-Leu ⁻ Trp ⁻	positive Transformationskontrolle
2	-	-	SC-Leu ⁻ Trp ⁻	negative Transformationskontrolle
3-6	pADpep2-Peptid-Aptamer ₁₋₄	pPC97	SC-Leu ⁻ Trp ⁻	autonome Aktivierungskontrolle
7-10	pADpep2-Peptid-Aptamer ₁₋₄	pPC97-ID1	SC-Leu ⁻ Trp ⁻	Phänotyp-Verifikation
11-43	pADTRX-Peptid-Aptamer ₅₋₃₇	pPC97	SC-Leu ⁻ Trp ⁻	autonome Aktivierungskontrolle
44-76	pADTRX-Peptid-Aptamer ₅₋₃₇	pPC97-ID1	SC-Leu ⁻ Trp ⁻	Phänotyp-Verifikation

Zur Verifikation der echten Interaktion der isolierten Peptid-Aptamere mit ID1 wurden insgesamt 148 Kolonien, d.h. je Hefeklon vier Kolonien, auf SC-Leu⁻-Trp⁻-Platten ausplattiert. Hefekolonien wurden mittels der Stempeltechnik nach Lederberg auf Histidin-Mangelnährböden übertragen. Klone, die auf Histidin-Mangelnährböden wuchsen, wurden auf Uracil-Mangelnährböden übertragen. Die Klone, die auf Uracil-Mangelnährböden wuchsen, wurden mit β -Galactosidase-Assays überprüft.

Die Untersuchung der autonomen Aktivierung der Reportergene zeigte keine autonome Aktivierung der Reportergene (s. Tab. 3.5). Bei 26 der 33 Klone aus der konstringierten Peptid-Aptamer-Expressionsbank (pADTRX-Peptid-Aptamer) wurden die Phänotypen aller Reportergene verifiziert. Bei allen vier Klonen aus der linearen Peptid-Aptamer-Expressionsbank (pADpep2-Peptid-Aptamer) wurde ebenfalls die echte Aptamer/ID1-Interaktion bestätigt (s. Tab. 3.6). Da zwei Hefeklonpaare jeweils identische Peptid-Aptamere enthielten, wurden insgesamt 28 Peptid-Aptamere mit unterschiedlichen Sequenzen in 30 Hefeklonen identifiziert.

Tab. 3.5 Untersuchung der autonomen Reportergen-Aktivierung der retransformierten Peptid-Aptamere auf Selektionsplatten (SC-Leu⁻-Trp⁻-His⁻, SC-Leu⁻-Trp⁻-Ura⁻ und YPD + X-Gal). Die Klone zeigten keine autonome Aktivierung der Reportergene. Jede Untersuchung wurde in drei unabhängigen Ansätzen wiederholt.

Prey- und Bait-Plasmide in MaV203	Selektion	autonome Aktivierung
pADpep2-Peptid-Aptamer ₁₋₄ und pPC97	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -His ⁻ SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -Ura ⁻ YPD mit X-Gal	keine
pADTRX-Peptid-Aptamer ₅₋₃₇ und pPC97	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -His ⁻ SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -Ura ⁻ YPD mit X-Gal	keine

Tab. 3.6 Verifikation der Aptamer/ID1-Interaktion nach der Retransformation der isolierten Peptid-Aptamere in MaV203. Bei 26 der 33 Klone aus der konstringierten und den vier Klonen aus der linearen Peptid-Aptamer-Expressionsbank wurden die echten Aptamer/ID1-Interaktionen durch die Phänotypen aller Reportergene verifiziert.

Prey- und Bait-Plasmide in MaV203	Selektion	Phänotyp-Verifikation
pADpep2-Peptid-Aptamer ₁₋₄ und pPC97-ID1	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -His ⁻ SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -Ura ⁻ YPD mit X-Gal	positiv: 4 Klone
pADTRX-Peptid-Aptamer ₅₋₃₇ und pPC97-ID1	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -His ⁻ SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -Ura ⁻ YPD mit X-Gal	positiv: 26 Klone negativ: 7 Klone

Bei 30 Hefeklonen war die Transkription aller Reportergene durch die echte Interaktion zwischen ID1 und Peptid-Aptameren aktiviert und die Phänotypen der Reportergene wurden verifiziert (s. Abb. 3.5).

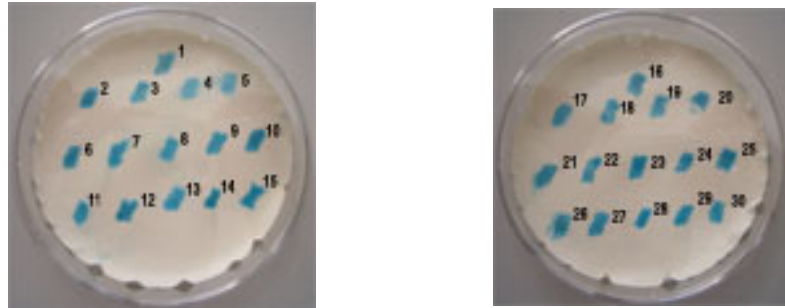


Abb. 3.5 Durch Peptid-Aptamer/ID1-Interaktion isolierte MaV203-Hefeklone. Bei 30 Hefeklonen wurden die Transkriptionen aller Reportergene durch die echte Interaktion zwischen ID1 und Peptid-Aptameren induziert und die Phänotypen der Reportergene verifiziert (His⁺, Ura⁺ and β-Gal⁺).

Die Aminosäuresequenzen der Peptid-Aptamere, die aus „echt“ positiven Klonen isoliert wurden, sind in Tab. 3.7 aufgeführt. Neun pADTRX-Monomere, ein pADTRX-Dimer und zwei pADTRX-Trimere enthalten Stoppcodons innerhalb der Peptid-Aptamere. Zwei Hefeklonpaare, die Klone 5 und 11 und die Klone 13 und 30, enthalten jeweils identische Peptid-Aptamere. Keine der Peptid-Aptamersequenzen zeigen Homologien mit bekannten Proteinen oder Proteindomänen. Dies lässt sich damit erklären, dass es sich bei Peptid-Aptameren nicht um aus der Evolution abgeleitete Motive handelt, sondern um artifizielle, randomisierte Sequenzen, die aufgrund ihrer Aminosäurezusammensetzung eine Konformation einnehmen, die es ihnen ermöglicht, mit ID1 zu interagieren.

Tab.3.7 Aminosäuresequenzen der mit ID1 interagierenden Peptid-Aptamere, die mittels des Yeast-Two-Hybrid-Systems isoliert wurden. Die Peptid-Aptamere 1-4 wurden aus der linearen Peptid-Aptamer-Expressionsbank (pADpep2-Peptid-Aptamer) und die Peptid-Aptamere 5-30 aus der konstringierten Peptid-Aptamer-Expressionsbank (pADTRX-Peptid-Aptamer) gescreent.

Klon-Nr.	Sequenzen der pADpep2-Peptid-Aptamere
1	G W S L G I N D S R A P A S W C G S S C
2	S R Y I G L V I M L D D D K W F D A R W
3	T R R P T P R R R R T R V I N T Q R P T
4	L L F E L V D Y S S F H P Y C A L S N S
Klon-Nr.	Sequenzen der pADTRX-Peptid-Aptamere
5	Die Sequenz liegt wegen Patentierungsabsichten nur den Gutachtern vor.
6	R L A Y G L V P R R Y Y R C R N V T L R
7	Die Sequenz liegt wegen Patentierungsabsichten nur den Gutachtern vor.
8	C F L I T C W W L T R Y G F N T L R L R

9	F M C R L V L R L P F F C L V R S
10	Die Sequenz liegt wegen Patentierungsabsichten nur den Gutachtern vor.
11	P R F I P W R G I S R C P S N S M S I W
12	G L W V L M T R V R L R R G V G R R
13	Die Sequenz liegt wegen Patentierungsabsichten nur den Gutachtern vor.
14	S I A L L R V T S L R R T P F R R F F L
15	V I C L G V L R K A V V R
16	S H S C M Q P F G V L W R G W G W F V M
17	Die Sequenz liegt wegen Patentierungsabsichten nur den Gutachtern vor.
18	P L D F V A Y G L R Y V S W R W W G W S
19	R L P A V D L F S P L S A V V V F V F L V R A K
20	I F R G W L V T R V N
21	Q L W S L C E A G C D F
22	I L V P M S P F L L P T V S G L V G R M
23	S H S C M Q P F G V L
24	I F A V P Y R L V G F C R F V L V G F G
25	C F F L S P E N L A A G F L R F D G A L G P G W F H W A N R A D V H T G
26	A V S V A S G Y Y A F S L G L C G G F V
27	H D D P H H D A G A R E S L I P K D Q M
28	G K L L R Q V T A A E H C T L R
29	W G M L W R R R G V I A N F A G R
30	Die Sequenz liegt wegen Patentierungsabsichten nur den Gutachtern vor.

3.1.5 Interaktionsanalyse der isolierten Peptid-Aptamere mit ID2 und ID3

Zur Interaktionsanalyse der 30 isolierten Peptid-Aptamere mit ID2 und ID3 wurden Bait-Plasmide (pPC97-ID2 und pPC97-ID3), die ID2 bzw. ID3 als Fusionsprotein mit der DNA-Bindungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors exprimieren, und die isolierten Prey-Plasmide, die die Peptid-Aptamere als Fusionsproteine mit der Transkriptions-Aktivierungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors exprimieren, in den Hefestamm MaV203 kotransformiert (s. Tab. 3.8 und Abb. 3.3).

Tab. 3.8 Retransformation der 30 isolierten Peptid-Aptamere in MaV203 und Selektion der Klone auf dem SC-Selektionsmedium (SC-Leu⁻-Trp⁻) zur Verifikation ihrer echten Interaktion mit ID2 und ID3.

Transformation	Plasmid 1	Plasmid 2	Selektion	Zweck
1	pPC86	pPC97	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻	positive Transformationskontrolle
2	-	-	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻	negative Transformationskontrolle
3-6	pADpep2–Peptid-Aptamer ₁₋₄	pPC97	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻	autonome Aktivierungskontrolle
7-10	pADpep2–Peptid-Aptamer ₁₋₄	pPC97-ID2	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻	Interaktionsscreening
11-36	pADTRX–Peptid-Aptamer ₅₋₃₀	pPC97	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻	autonome Aktivierungskontrolle
37-72	pADTRX–Peptid-Aptamer ₅₋₃₀	pPC97-ID2	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻	Interaktionsscreening
73-76	pADpep2–Peptid-Aptamer ₁₋₄	pPC97-ID3	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻	Interaktionsscreening
77-112	pADTRX–Peptid-Aptamer ₅₋₃₀	pPC97-ID3	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻	Interaktionsscreening

Zur Verifikation der Interaktion der isolierten Peptid-Aptamere mit ID2 und ID3 wurden insgesamt 240 Kolonien, je Hefeklon vier Kolonien, auf SC-Leu⁻-Trp⁻-Platten ausplattiert. Die Hefekolonien wurden mittels der Stempeltechnik nach Lederberg auf Histidin-Mangelnährböden übertragen. Klone, die auf Histidin-Mangelnährböden wuchsen, wurden auf Uracil-Mangelnährböden übertragen. Die Klone, die auf Uracil-Mangelnährböden wuchsen, wurden mit β -Galactosidase-Assays überprüft.

Die Untersuchung der autonomen Aktivierung der Reportergene ergab keine autonome Aktivierung der Reportergene (s. Tab. 3.9). In diesen Experimenten konnte die Interaktion der Peptid-Aptamere 6, 7, 8, 9, 10 und 13 bzw. 30 mit ID3 und des Peptid-Aptamers 13 bzw. 30 mit ID2 und ID3 nachgewiesen werden (s. Tab. 3.10). Bei keinem der vier Klone der linearen Peptid-Aptamer-Expressionsbank (pADpep2–Peptid-Aptamer) konnte eine Interaktion mit ID2 oder ID3 nachgewiesen werden.

Tab. 3.9 Untersuchung der autonomen Reportergen-Aktivierung der 30 retransformierten Peptid-Aptamere auf Selektionsplatten (SC-Leu⁻-Trp⁻-His⁻, SC-Leu⁻-Trp⁻-Ura⁻ und YPD + X-Gal). Die Klone zeigten keine autonome Aktivierung der Reportergene. Jede Untersuchung wurde in drei unabhängigen Experimenten wiederholt.

Prey- und Bait-Plasmide in MaV203	Selektion	autonome Aktivierung
pADpep2–Peptid-Aptamer ₁₋₄ und pPC97	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -His ⁻ SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -Ura ⁻ YPD mit X-Gal	keine
pADTRX–Peptid-Aptamer ₅₋₃₀ und pPC97	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -His ⁻ SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -Ura ⁻ YPD mit X-Gal	keine

Tab. 3.10 Verifikation der Aptamer/ID3- bzw. Aptamer/ID2-Interaktionen nach der Retransformation der isolierten Peptid-Aptamere in MaV203. Bei sechs der 26 Klone aus der konstringierten Peptid-Aptamer-Expressionsbank wurden die echten Aptamer/ID3-Interaktionen durch die Phänotypen aller Reportergene verifiziert; einer der sechs Klone interagierte zusätzlich mit ID2. Keiner der vier Klone der linearen Peptid-Aptamer-Expressionsbank interagierte mit ID2 oder ID3.

Prey- und Bait-Plasmide in MaV203	Selektion	Interaktion
pADpep2-Peptid-Aptamer ₁₋₄ und pPC97-ID3	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -His ⁻ SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -Ura ⁻ YPD mit X-Gal	keine
pADTRX-Peptid-Aptamer ₅₋₃₀ und pPC97-ID3	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -His ⁻ SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -Ura ⁻ YPD mit X-Gal	6 Klone
pADpep2-Peptid-Aptamer ₁₋₄ und pPC97-ID2	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -His ⁻ SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -Ura ⁻ YPD mit X-Gal	keine
pADTRX-Peptid-Aptamer ₅₋₃₀ und pPC97-ID2	SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -His ⁻ SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -Ura ⁻ YPD mit X-Gal	1 Klon

Bei sieben Hefeklonen wurde die Transkription der Reportergene durch die Interaktion zwischen ID3 und den Peptid-Aptameren 6, 7, 8, 9, 10 und 13 bzw. 30 aktiviert; bei einem der sechs Klone wurde die Transkription der Reportergene durch die Interaktion zwischen ID2 und dem Peptid-Aptamer 13 bzw.30 aktiviert. Die Aktivierung aller Reportergene wurde verifiziert (s. Abb. 3.6).

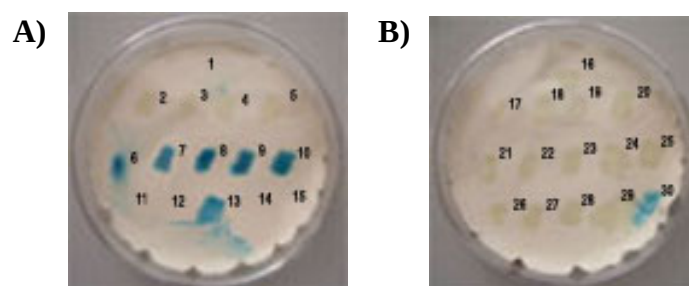


Abb. 3.6 Durch Aptamer/ID3- bzw. Aptamer/ID2-Interaktionen isolierte MaV203-Hefeklone. A) Bei sechs der 26 Klone aus der konstringierten Peptid-Aptamer-Expressionsbank wurden die echten Aptamer/ID3-Interaktionen verifiziert (Peptid-Aptamere 6, 7, 8, 9, 10 und 13 bzw. 30). B) Bei einem der sechs Klone wurde zusätzlich die Aptamer/ID2-Interaktion verifiziert (Peptid-Aptamer 13 bzw. 30).

3.1.6 Zusammenfassung des Yeast-Two-Hybrid-Library-Screenings

Die Selektionsstufen und die Ergebnisse des Yeast-Two-Hybrid-Screenings mit der linearen Peptid-Aptamer-Expressionsbank (pADpep2-Peptid-Aptamer) und der konstringierten Peptid-Aptamer-Expressionsbank (pADTRX-Peptid-Aptamer) sind in Abb. 3.7 und Tab. 3.11 schematisch dargestellt.

ID4 wurde in Yeast-Two-Hybrid-Experimenten nicht untersucht, da es in MaV203 nicht exprimiert wurde.

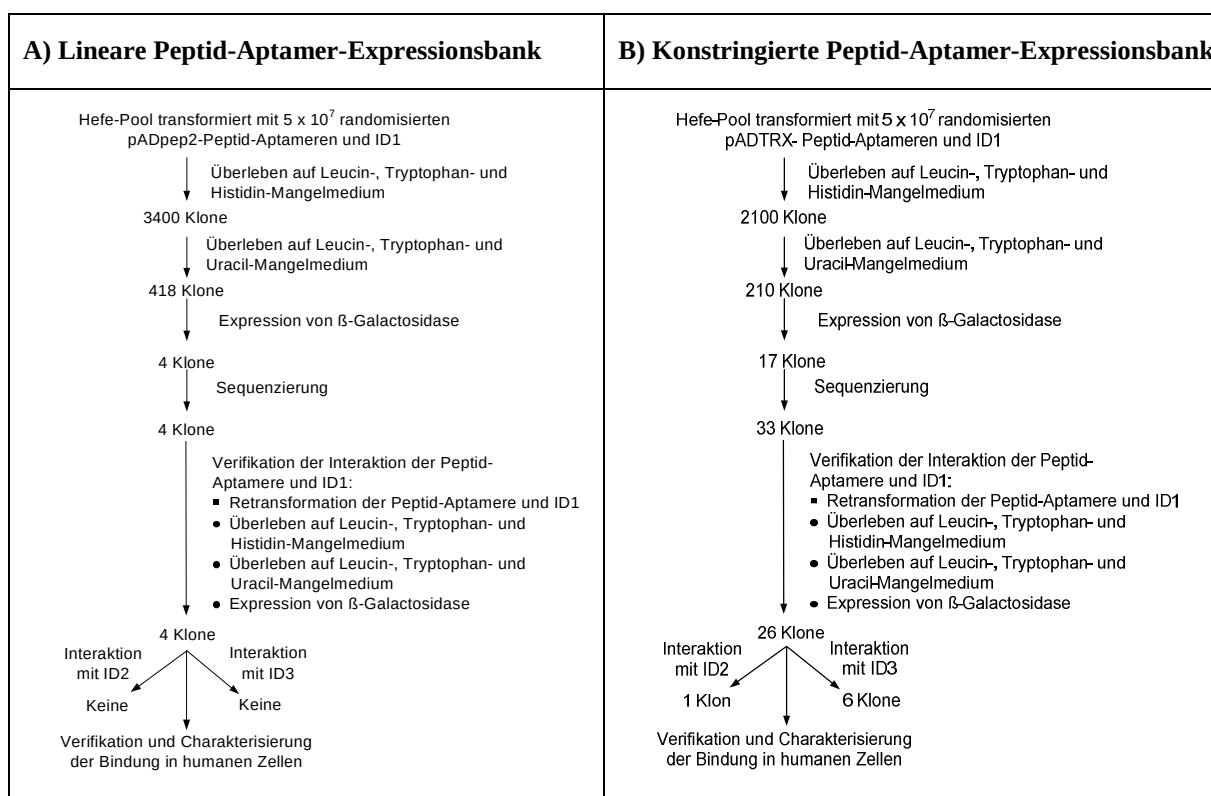


Abb. 3.7 Schematische Darstellung von Selektionsstufen und Ergebnissen des im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Yeast-Two-Hybrid-Screenings. A) Yeast-Two-Hybrid-Screening mit der linearen Peptid-Aptamer-Expressionsbank (pADpep2-Peptid-Aptamer): Vier mit ID1 interagierende Peptid-Aptamere wurden isoliert. B) Yeast-Two-Hybrid-Screening mit der konstringierten Peptid-Aptamer-Expressionsbank (pADTRX-Peptid-Aptamer): 26 mit ID1 interagierende Peptid-Aptamere wurden isoliert. Sechs der 26 Peptid-Aptamere interagierten mit ID1 und ID 3; eins dieser Peptid-Aptamere interagierte zusätzlich mit ID2.

Tab. 3.11 Aus dem Yeast-Two-Hybrid-Screening hervorgegangene positive Interaktionen zwischen ID-Proteinen und isolierten Peptid-Aptameren.

Peptide-Aptamere	Interaktionen mit		
	ID1	ID2	ID3
lineare Peptid-Aptamere	Aptamere 1-4	-	-
konstringierte Peptid-Aptamere	Aptamere 5-30	Aptamere 13 bzw. 30	Aptamere 6-10 und 13 bzw. 30

3.2 Verifizierung der Peptid-Aptamer/ID-Protein-Interaktion mittels des Mammalian-Two-Hybrid-Systems

Das Mammalian-Two-Hybrid-System wurde angewendet, um die Interaktionen zwischen ID-Proteinen und den im Yeast-Two-Hybrid-System isolierten Peptid-Aptameren in humanen Zellen zu verifizieren.

Als Voraussetzung für die Durchführung der Mammalian-Two-Hybrid-Experimente mussten sowohl die aus der pADpep2- und pADTRX-Peptid-Aptamer-Expressionsbank stammenden Klone als auch die cDNAs von *ID1-4* in Säugetierexpressionsvektoren umklontiert werden.

3.2.1 Klonierung der cDNAs von *ID1-4* in den Vektor pBIND

Die cDNAs von *ID1-4* wurden aus den Vektoren pPC97-ID1, pPC97-ID2, pPC97-ID3 und pPC97-ID4 mit den Primern ID1-M2HF/R, ID2-M2HF/R, ID3-M2HF/R und ID4-M2HF/R mittels PCR amplifiziert (s. Abb. 3.8). Hierbei wurden gleichzeitig die Restriktionsschnittstellen *SalI/NotI* eingefügt, so dass die cDNA nach dem Restriktionsverdau im richtigen Leserahmen in den Säugetierexpressionsvektor pBIND (Promega) kloniert werden konnte und als Fusionsprotein mit der DNA-Bindungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors exprimiert wurde (Bait).

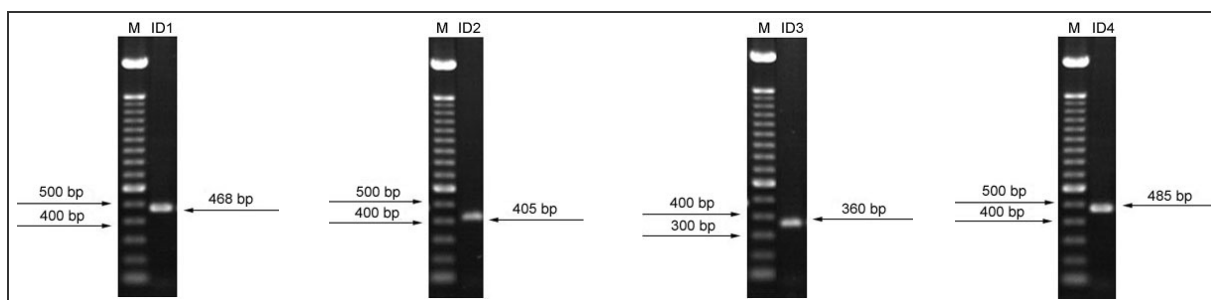


Abb. 3.8 PCR-Produkte der cDNAs von *ID1-4* für Mammalian-Two-Hybrid-Experimente. Die cDNAs von *ID1-4* wurden aus den Vektoren (pPC97-ID1, pPC97-ID2, pPC97-ID3 und pPC97-ID4) mit den Primern (ID1-M2HF/R, ID2-M2HF/R, ID3-M2HF/R und ID4-M2HF/R) mittels PCR amplifiziert.

Die cDNA-Amplifikate wurden mit Hilfe des TOPO-TA PCR Cloning Kits in den Vektor PCR[®] 2.1 Topo[®] kloniert. Die positiven Klone wurden nach der Blau-Weiß-Selektion auf LB-Agarplatten mit X-Gal und Kanamycin durch Restriktionsverdau und Sequenzanalyse auf ihre Größe, Orientierung und korrekte Sequenz hin überprüft. Anschließend wurden die cDNAs

im richtigen Leserahmen in den Säugetierexpressionsvektor pBIND kloniert und die richtige Größe, Orientierung und der Vektor/Insert-Übergang überprüft (s. Abb. 3.9).

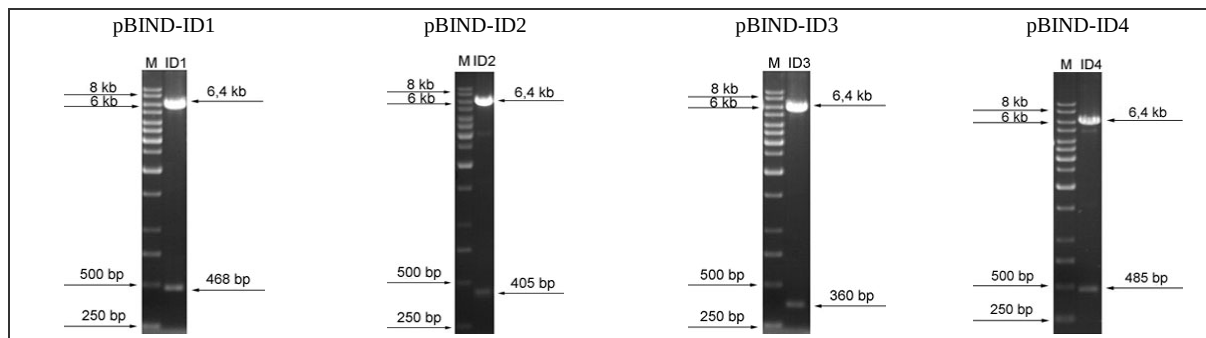


Abb. 3.9 Restriktionsanalyse der Expressionsplasmide pBIND-ID1-4. Zur Überprüfung der Insertgröße wurden pBIND-ID1-4 mit *Sall/NotI* verdaut.

3.2.2 Klonierung der cDNAs der Peptid-Aptamere in den Vektor pACT

Die cDNAs der Peptid-Aptamere 1-30 wurden nach dem Einfügen neuer Schnittstellen im richtigen Leserahmen in den Säugetierexpressionsvektor pACT (Promega) kloniert, so dass die Peptid-Aptamere als Fusionsproteine mit der Transkriptions-Aktivierungsdomäne des Herpes-Simplex-Virus16-Transkriptionsfaktors (VP16-Transkriptionsfaktor) exprimiert wurden (Prey). Hierbei wurde eine Schnittstelle für *EcoRI* in den Vektor pACT eingefügt und der neue Vektor wurde pACT2 genannt. Die linearen Peptid-Aptamere wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BglII* aus den pADpep2-Konstrukten geschnitten und in den mit *EcoRI* und *BamHI* geschnittenen Vektor pACT2 kloniert (s. Abb. 3.10 A). Weiterhin wurde eine Schnittstelle für *NdeI* in den Vektor pACT eingefügt und der neue Vektor wurde pACTTRX genannt. Die konstringierten Peptid-Aptamere wurden mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XbaI* aus den pADTRX-Konstrukten geschnitten und in den mit *NdeI* und *XbaI* geschnittenen pACTTRX-Vektor kloniert (s. Abb. 3.10 B).

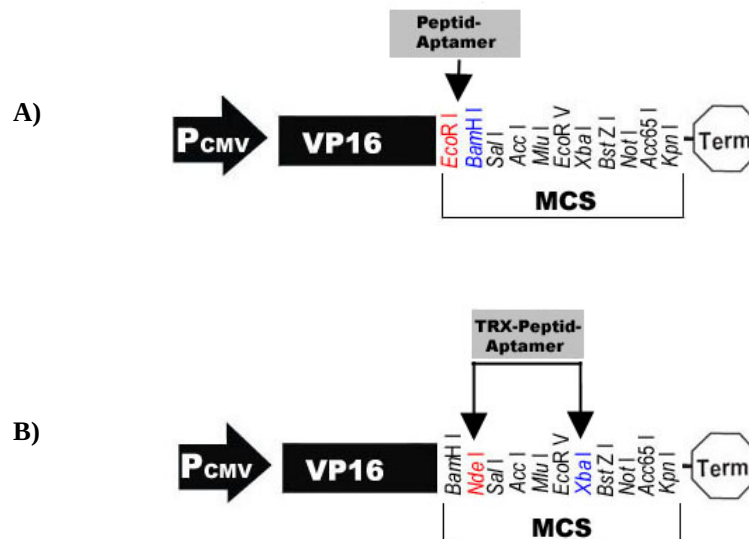


Abb. 3.10 pACT-Konstrukte zur Herstellung von Fusionsproteinen der Peptid-Aptamere mit der Transkriptions-Aktivierungsdomäne des Herpes-Simplex-Virus16-Transkriptionsfaktors (VP16). A) Das pACT2-Konstrukt mit der neu eingefügten Schnittstelle für *EcoRI* wurde zur Klonierung der linearen Peptid-Aptamere verwendet. B) Das pACTTRX-Konstrukt mit der neu eingefügten Schnittstelle für *NdeI* wurde zur Klonierung der konstringierten Peptid-Aptamere verwendet.

Nach dem Restriktionsverdau wurden die linearen bzw. konstringierten Peptid-Aptamere im richtigen Leserahmen in den Säugetierexpressionsvektor pACT2 bzw. pACTTRX kloniert und die richtige Größe, Orientierung und der Vektor/Insert-Übergang durch Restriktionsverdau (s. Abb. 3.11) und Sequenzanalyse überprüft.

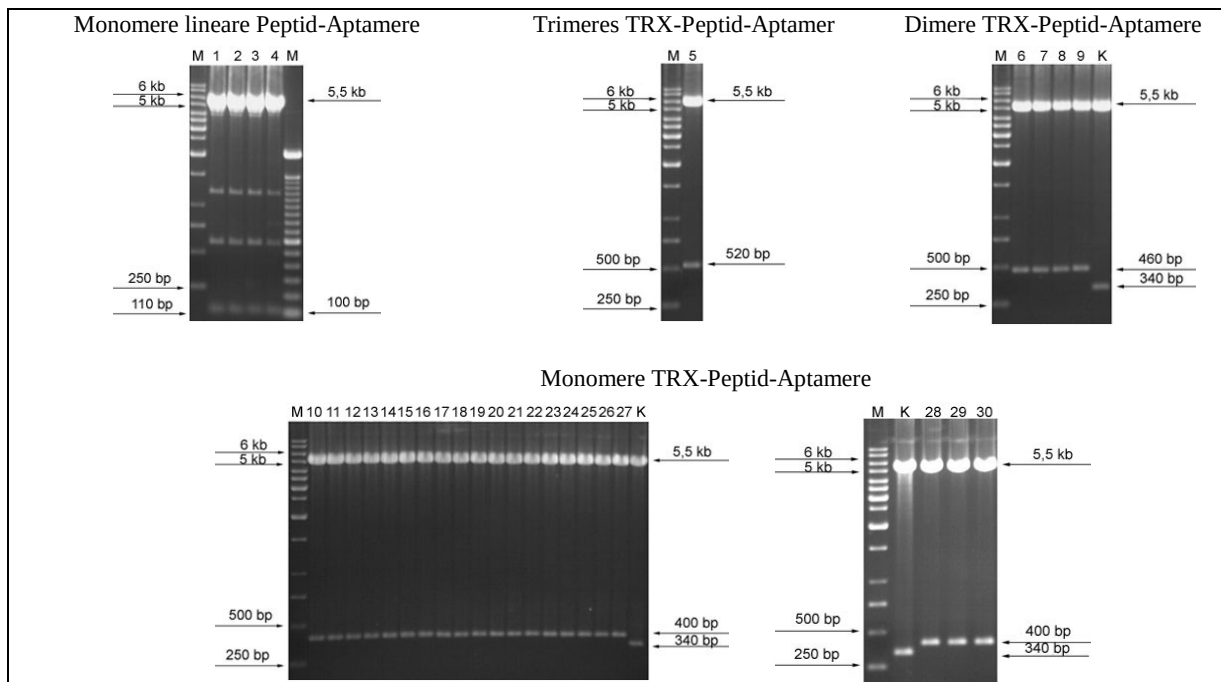


Abb. 3.11 Restriktionsanalyse der Fusionsplasmide pACT2-Peptid-Aptamer und pACTTRX-Peptid-Aptamer. Zur Überprüfung der Insertgröße wurden die Fusionsplasmide pACT2-Peptid-Aptamer (Spur 1-4) mit den Enzymen *EcoRI*/*BamHI* und die Fusionsplasmide pACTTRX-Peptid-Aptamer (Spur 5-30) mit den Enzymen *NdeI*/*XbaI* verdaut. M: DNA-Marker; K: Kontrolle (pACTTRX ohne Insert).

3.2.3 Nachweis der Interaktionen zwischen ID1 und Peptid-Aptameren in humanen Zellen

Zur Verifizierung der Interaktionen zwischen ID1 und Peptid-Aptameren in humanen Zellen wurden HeLa-Zellen in einem molaren Verhältnis 1:1:1 mit 2 µg pBIND-, 2 µg pACT2- bzw. 2 µg pACTTRX- und 2 µg pG5luc-Konstrukten mittels der Calcium-Phosphat-Methode transient transfiziert. Um die Luciferase-Aktivität mit der Transfektionseffizienz zu normalisieren, wurden die HeLa-Zellen zusätzlich mit 0,5 µg pCMV-gal-Konstrukt kotransfiziert.

Tab. 3.12 Calcium-Phosphat-Transfektion zur Verifizierung der Interaktionen zwischen Peptid-Aptameren und ID1 in HeLa-Zellen mittels des CheckMate Mammalian-Two-Hybrid-Systems. Jede Transfektion wurde im Duplikat ausgeführt und in mindestens drei unabhängigen Ansätzen wiederholt.

Transfektion	2µg pBIND-Konstrukt	2µg pACT-Konstrukt	2µg pG5luc-Konstrukt	0,5µg pCMV-gal-Konstrukt	Bemerkung
1	pBIND-Id	pACT-MyoD	pG5luc	pCMV-gal	positive Kontrolle
2	pBIND-ID1	pACT2	pG5luc	pCMV-gal	negative Kontrolle
3-6	pBIND-ID1	pACT2-Peptid-Aptamere 1-4	pG5luc	pCMV-gal	lineare Peptid-Aptamere
7	pBIND-ID1	pACT-TRX	pG5luc	pCMV-gal	negative Kontrolle
8-33	pBIND-ID1	pACTTRX-Peptid-Aptamere 5-30	pG5luc	pCMV-gal	konstringierte Peptid-Aptamere

Die gemessenen Luciferase-Aktivitäten wurden durch Erfassen und Abgleichen von Schwankungen der Transfektionseffizienz mittels der β-Galactosidase-Aktivität als interner Kontrolle normalisiert. Die Luciferase-Aktivität wurde als relative Einheit in % ausgedrückt:

$$\left[\left(\frac{\text{Luci.} - \text{Aktivität}}{\beta - \text{Gal.} - \text{Aktivität}} \right) \div \left(\frac{\text{Luci.} - \text{Aktivität der neg. Kontrolle}}{\beta - \text{Gal.} - \text{Aktivität neg. Kontrolle}} \right) \right] \times 100 = \text{relative Luciferase} - \text{Aktivität (\%)}$$

Die Kotransfektionen der vier TRX-Peptid-Aptamere 5, 7, 13 und 17 mit ID1 resultierten im Vergleich zur Luciferase-Aktivität der negativen Kontrolle in hohen Luciferase-Aktivitäten (s. Tab. 3.13 und Abb. 3.12). Die Kotransfektionen der übrigen 26 Peptid-Aptamere resultierten im Vergleich zur Luciferase-Aktivität der negativen Kontrolle in keinen hohen Luciferase-Aktivitäten und somit interagieren sie nicht mit ID1.

Tab. 3.13 Transfektionsansätze und relative Luciferase-Aktivitäten der ID1/Peptid-Aptamer-Interaktionen. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen im Duplikat.

mit ID1-interagierende Aptamere	Aptamer 5	Aptamer 7	Aptamer 13	Aptamer 17	Kontrolle
Transfizierte Plasmide	pBIND-ID1	pBIND-ID1	pBIND-ID1	pBIND-ID1	pBIND-ID1
	pACTTRX-Aptamer 5	pACTTRX-Aptamer 7	pACTTRX-Aptamer 13	pACTTRX-Aptamer 17	pACTTRX
	pG5luc	pG5luc	G5luc	pG5luc	pG5luc
	pCMV-gal	pCMV-gal	pCMV-gal	pCMV-gal	pCMV-gal
Relative Luci.-Aktivität	787 ± 50,49	549 ± 28,41	285 ± 22,43	682 ± 22,55	100 ± 6,37

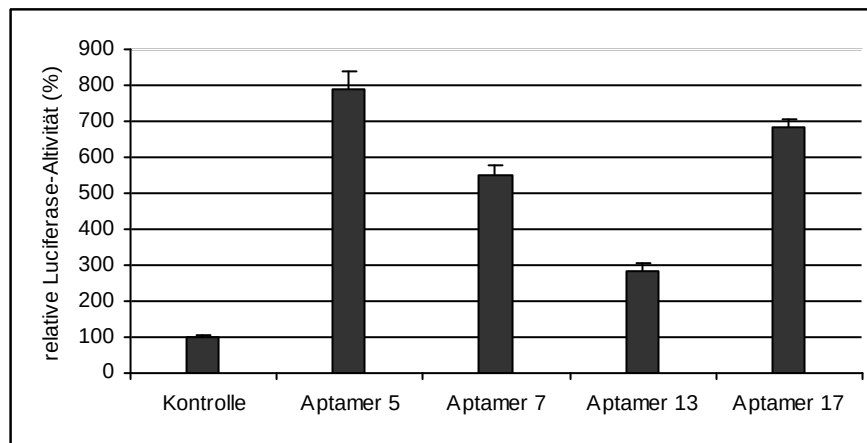


Abb. 3.12 Graphische Darstellung der Mammalian-Two-Hybrid-Experimente zur Verifizierung der Interaktionen zwischen ID1 und Peptid-Aptameren. Die Kotretransfektionen von ID1 mit den TRX-Peptid-Aptameren 5, 7, 13 und 17 in HeLa-Zellen resultierten im Vergleich zur Luciferase-Aktivität der negativen Kontrolle in hohen Luciferase-Aktivitäten. Als negative Kontrolle wurde ein pACTTRX-Vektor ohne Insert verwendet. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen im Duplikat.

3.2.4 Nachweis der Interaktionen zwischen ID3 und Peptid-Aptameren

Die Verifizierung der Interaktionen zwischen ID3 und Peptid-Aptameren wurde wie die Verifizierung der Interaktionen zwischen ID1 und Peptid-Aptameren durchgeführt (s. 3.2.3).

Tab. 3.14 Calcium-Phosphat-Transfektion zur Verifizierung der Interaktionen zwischen Peptid-Aptameren und ID3 in HeLa-Zellen mittels des CheckMate Mammalian-Two-Hybrid-Systems. Jede Transfektion wurde im Duplikat ausgeführt und in mindestens drei unabhängigen Ansätzen wiederholt.

Transfektion	2µg pBIND-Konstrukt	2µg pACT-Konstrukt	2µg pG5luc-Konstrukt	0,5µg pCMV-gal-Konstrukt	Bemerkung
1	pBIND-Id	pACT-MyoD	pG5luc	pCMV-gal	positive Kontrolle
2	pBIND-ID3	pACT2	pG5luc	pCMV-gal	negative Kontrolle
3-6	pBIND-ID3	pACT2-Peptid-Aptamere 1-4	pG5luc	pCMV-gal	lineare Peptid-Aptamere
7	pBIND-ID3	pACT-TRX	pG5luc	pCMV-gal	negative Kontrolle
8-33	pBIND-ID3	pACTTRX-Peptid-Aptamere 5-30	pG5luc	pCMV-gal	konstringierte Peptid-Aptamere

Die Kotransfektionen der drei TRX-Peptid-Aptamere 7, 10 und 13 mit ID3 resultierten im Vergleich zur Luciferase-Aktivität der negativen Kontrolle in hohen Luciferase-Aktivitäten (s. Tab. 3.15 und Abb. 3.13). Die Peptid-Aptamere 7 und 13 interagieren sowohl mit ID1 als auch mit ID3. Das Peptid-Aptamer 10 interagiert nur mit ID3.

Die Kotransfektionen der übrigen 27 Peptide-Aptamere resultierten im Vergleich zur Luciferase-Aktivität der negativen Kontrolle in keinen hohen Luciferase-Aktivitäten und somit interagieren sie nicht mit ID1.

Tab. 3.15 Transfektionsansätze und relative Luciferase-Aktivität der ID3/Peptid-Aptamer-Interaktionen. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen im Duplikat.

mit ID1-interagierende Aptamere	Aptamer 7	Aptamer 10	Aptamer 13	Kontrolle
Transfizierte Plasmide	pBIND-ID3	pBIND-ID3	pBIND-ID3	pBIND-ID3
	pACTTRX-Aptamer 7	pACTTRX-Aptamer 10	pACTTRX-Aptamer 13	pACTTRX
	pG5luc	pG5luc	G5luc	pG5luc
	pCMV-gal	pCMV-gal	pCMV-gal	pCMV-gal
Relative Luci.-Aktivität	532 ± 102,31	215 ± 83,14	221 ± 53,60	100 ± 2,26

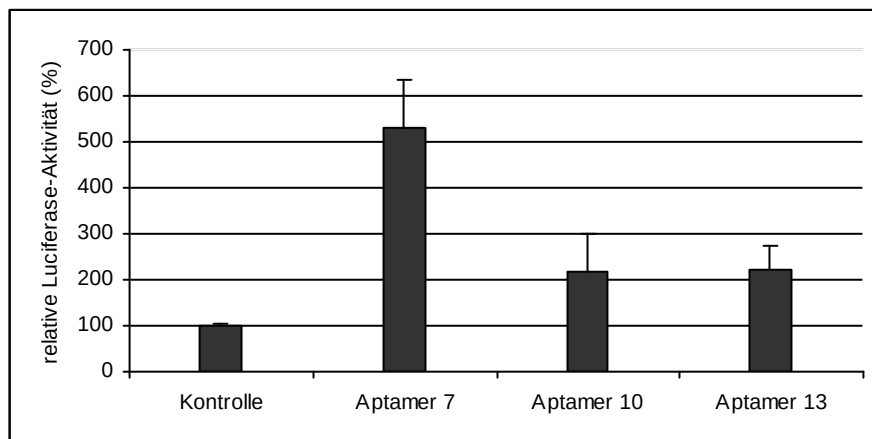


Abb. 3.13 Graphische Darstellung der Mammalian-Two-Hybrid-Experimente zur Verifizierung der Interaktionen zwischen ID3 und den Peptid-Aptameren. Die Kotransfektionen von ID3 und den TRX-Peptid-Aptameren 7, 10 und 13 in HeLa-Zellen resultierten im Vergleich zur Luciferase-Aktivität der negativen Kontrolle in hohen Luciferase-Aktivitäten. Als negative Kontrolle wurde ein pACTTRX-Vektor ohne Insert verwendet. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

3.2.5 Nachweis der Interaktionen zwischen ID2 und Peptid-Aptameren

Die Verifizierung der Interaktionen zwischen ID2 und Peptid-Aptameren wurde wie die Verifizierung der Interaktionen zwischen ID1 und Peptid-Aptameren durchgeführt (s. 3.2.3).

Tab. 3.16 Calcium-Phosphat-Transfektion zur Verifizierung der Interaktionen zwischen Peptid-Aptameren und ID2 in HeLa-Zellen mittels des CheckMate Mammalian-Two-Hybrid-Systems. Es wurden mindestens drei unabhängige Calcium-Phosphat-Transfektionsversuche durchgeführt.

Transfektion	2µg pBIND-Konstrukt	2µg pACT-Konstrukt	2µg pG5luc-Konstrukt	0,5µg pCMV-gal-Konstrukt	Bemerkung
1	pBIND-Id	pACT-MyoD	pG5luc	pCMV-gal	positive Kontrolle
2	pBIND-ID2	pACT-TRX	pG5luc	pCMV-gal	negative Kontrolle
3-7	pBIND-ID2	pACTTRX-Peptid-Aptamere 5, 7, 10, 13, 17	pG5luc	pCMV-gal	konstringierte Peptid-Aptamere

Die Kotransfektion vom TRX-Peptid-Aptamer 13 mit ID2 resultierte im Vergleich zur Luciferase-Aktivität der negativen Kontrolle in hohen Luciferase-Aktivitäten. Die Kotransfektionen der TRX-Peptid-Aptamere 5, 7, 10 und 17 resultierten im Vergleich zur Luciferase-Aktivität der negativen Kontrollen in keinen hohen Luciferase-Aktivitäten und somit interagieren sie nicht mit ID2 (s. Tab. 3.17 und Abb. 3.14).

Tab. 3.17 Transfektionsansätze und relative Luciferase-Aktivität der ID2/Peptid-Aptamer-Interaktionen. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen im Duplikat.

Peptid-Aptamere	Aptamer 5	Aptamer 7	Aptamer 10	Aptamer 13	Aptamer 17	Kontrolle
Transfizierte Plasmide	pBIND-ID2	pBIND-ID2	pBIND-ID2	pBIND-ID2	pBIND-ID2	pBIND-ID2
	pACTTRX-Aptamer 5	pACTTRX-Aptamer 7	pACTTRX-Aptamer 10	pACTTRX-Aptamer 13	pACTTRX-Aptamer 17	pACTTRX
	pG5luc	pG5luc	pG5luc	G5luc	pG5luc	pG5luc
	pCMV-gal	pCMV-gal	pCMV-gal	pCMV-gal	pCMV-gal	pCMV-gal
Relative Luci.-Aktivität	114 ± 27,24	97 ± 20,52	98 ± 15,03	614 ± 25,32	94 ± 14,22	100 ± 8,39

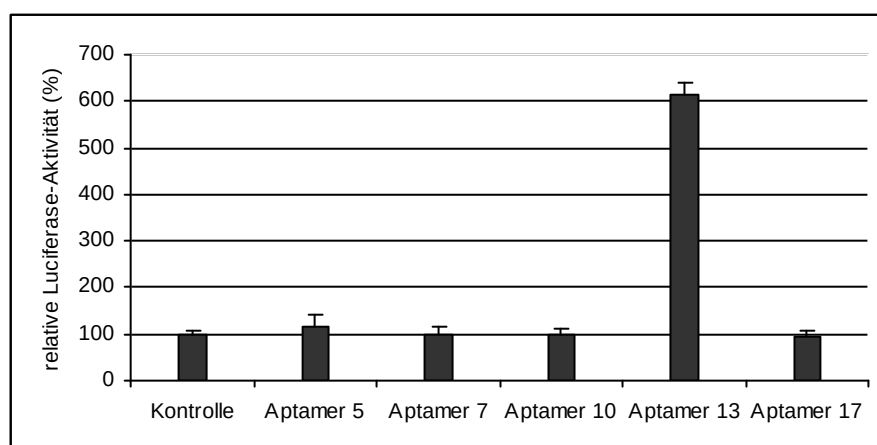


Abb. 3.14 Graphische Darstellung der Mammalian-Two-Hybrid-Experimente zur Verifizierung der Interaktionen zwischen ID2 und den Peptid-Aptameren. Die Kotransfektion vom TRX-Peptid-Aptamer 13 resultierte im Vergleich zur Luciferase-Aktivität der negativen Kontrolle in hohen Luciferase-Aktivitäten. Die Kotransfektionen der TRX-Peptid-Aptamere 5, 7, 10 und 17 resultierten im Vergleich zur Luciferase-Aktivität der negativen Kontrolle in keinen hohen Luciferase-Aktivitäten und somit interagieren sie nicht mit ID2. Als negative Kontrolle wurde ein pACTTRX-Vektor ohne Insert verwendet. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

3.2.6 Nachweis der Interaktionen zwischen ID4 und Peptid-Aptameren

Die Verifizierung der Interaktionen zwischen ID4 und Peptid-Aptameren wurde wie die Verifizierung der Interaktionen zwischen ID1 und Peptid-Aptameren durchgeführt (s. 3.2.3).

Tab. 3.18 Calcium-Phosphat-Transfektion zur Verifizierung der Interaktionen zwischen Peptid-Aptameren und ID4 in HeLa-Zellen mittels des CheckMate Mammalian-Two-Hybrid-Systems. Es wurden mindestens drei unabhängige Calcium-Phosphat-Transfektionsversuche durchgeführt.

Transfektion	2µg pBIND-Konstrukt	2µg pACT-Konstrukt	2µg pG5luc-Konstrukt	0,5µg pCMV-gal-Konstrukt	Bemerkung
1	pBIND-Id	pACT-MyoD	pG5luc	pCMV-gal	positive Kontrolle
2	pBIND-ID4	pACT-TRX	pG5luc	pCMV-gal	negative Kontrolle
3-7	pBIND-ID4	pACTTRX-Peptid-Aptamere 5, 7, 10, 13, 17	pG5luc	pCMV-gal	konstringierte Peptid-Aptamere

Die Kotransfektion vom TRX-Peptid-Aptamer 13 mit ID4 resultierte im Vergleich zur Luciferase-Aktivität der negativen Kontrolle in hohen Luciferase-Aktivitäten. Die Kotransfektionen von den TRX-Peptid-Aptameren 5, 7, 10 und 17 resultierten im Vergleich zur Luciferase-Aktivität der negativen Kontrollen in keinen hohen Luciferase-Aktivitäten und somit interagieren sie nicht mit ID4 (s. Tab.3.19 und Abb. 3.15).

Tab. 3.19 Transfektionsansätze und relative Luciferase-Aktivität der ID4/Peptid-Aptamer-Interaktionen. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen im Duplikat.

Peptid-Aptamere	Aptamer 5	Aptamer 7	Aptamer 10	Aptamer 13	Aptamer 17	Kontrolle
Transfizierte Plasmide	pBIND-ID4	pBIND-ID4	pBIND-ID4	pBIND-ID4	pBIND-ID4	pBIND-ID4
	pACTTRX-Aptamer 5	pACTTRX-Aptamer 7	pACTTRX-Aptamer 10	pACTTRX-Aptamer 13	pACTTRX-Aptamer 17	pACTTRX
	pG5luc	pG5luc	pG5luc	G5luc	pG5luc	pG5luc
	pCMV-gal	pCMV-gal	pCMV-gal	pCMV-gal	pCMV-gal	pCMV-gal
Relative Luci.-Aktivität	96 ± 13,07	88 ± 15,59	119 ± 38,55	310 ± 36,82	86 ± 4,50	100 ± 10,95

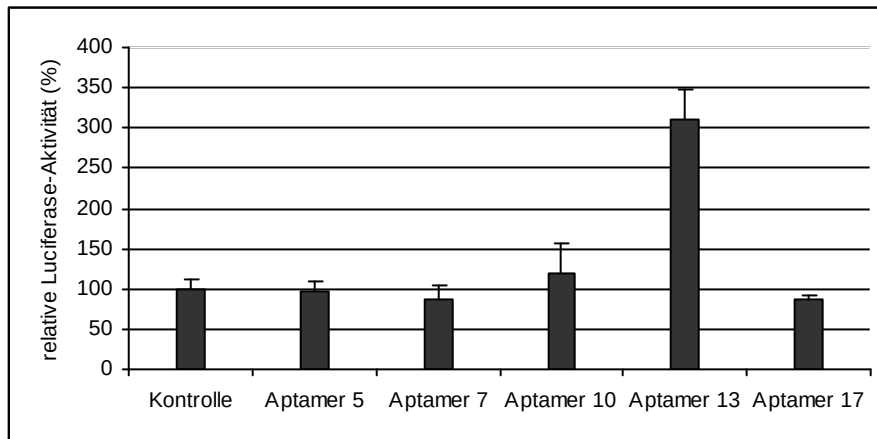


Abb. 3.15 Graphische Darstellung der Mammalian-Two-Hybrid-Experimente zur Verifizierung der Interaktionen zwischen ID4 und den Peptid-Aptameren. Die Kotransfektion vom TRX-Peptid-Aptamer 13 resultierte im Vergleich zur Luciferase-Aktivität der negativen Kontrolle in hohen Luciferase-Aktivitäten. Die Kotransfektionen der TRX-Peptid-Aptamere 5, 7, 10 und 17 resultierten im Vergleich zur Luciferase-Aktivität der negativen Kontrollen in keinen hohen Luciferase-Aktivitäten und somit interagieren sie nicht mit ID2. Als negative Kontrolle wurde ein pACTTRX-Vektor ohne Insert verwendet. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

3.2.7 Zusammenfassung der Mammalian-Two-Hybrid-Untersuchungen

Die Mammalian-Two-Hybrid-Experimente zeigen deutlich, dass die Koexpression von den fünf im Yeast-Two-Hybrid-System isolierten Peptid-Aptameren mit den jeweiligen ID-Proteinen in HeLa-Zellen zu einer signifikanten Expressionszunahme des Reportergens Luciferase führt. Es lässt sich somit feststellen, dass die Interaktionen der fünf Peptid-Aptamere mit den jeweiligen ID-Proteinen, die im Yeast-Two-Hybrid-System gescreent wurden, im Mammalian-Two-Hybrid-System reproduzierbar sind. Die Interaktionsspezifität der einzelnen Peptid-Aptamere mit den jeweiligen ID-Proteinen ist in Abb. 3.16 zusammengefasst dargestellt. Die Peptid-Aptamere 5 und 17 interagieren spezifisch mit ID1; Peptid-Aptamer 10 interagiert spezifisch mit ID3; Peptid-Aptamer 7 interagiert sowohl mit ID1 als auch mit ID3, und Peptid-Aptamer 13 interagiert mit allen ID-Proteinen (ID1-4).

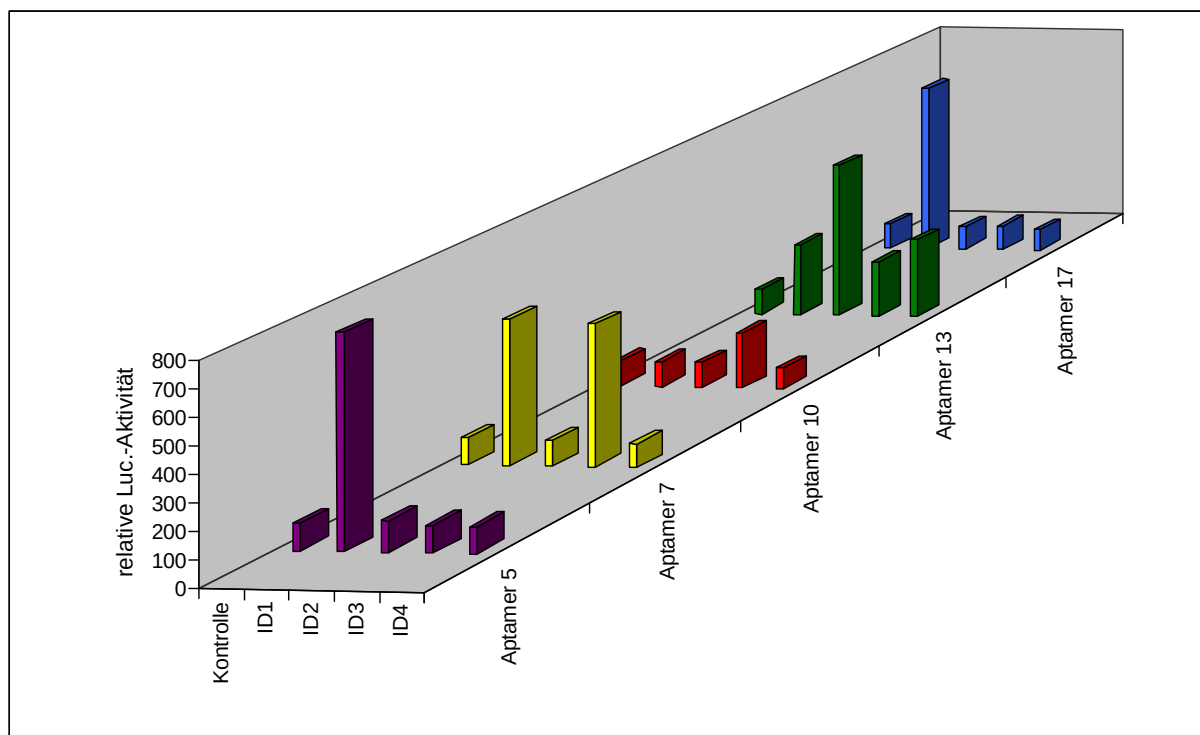


Abb. 3.16 Zusammengefasste graphische Darstellung der Mammalian-Two-Hybrid-Experimente zur Verifizierung der Interaktion zwischen ID-Proteinen und Peptid-Aptameren. Die Koexpression der fünf im Yeast-Two-Hybrid-System isolierten Peptid-Aptamere mit den jeweiligen ID-Proteinen in HeLa-Zellen führte zu einer signifikanten Expressionszunahme des Reportergens Luciferase. Peptid-Aptamer 5 und 17 interagierten spezifisch mit ID1; Peptid-Aptamer 10 interagierte spezifisch mit ID3; Peptid-Aptamer 7 interagierte sowohl mit ID1 als auch mit ID3, und Peptid-Aptamer 13 interagierte mit allen ID-Proteinen ID1-4. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen

3.3 Gezielte Expression und funktionelle Untersuchungen der Peptid-Aptamere in humanen Zellen

Zur zellulären Lokalisation und funktionalen Analyse der Peptid-Aptamere wurden die kompletten Leserahmen der fünf TRX-Peptid-Aptamere 5, 7, 10, 13 und 17 an den N-Terminus oder C-Terminus eines nukleären Lokalisationssignals (NLS) oder eines nukleären Exportsignals (NES) und einer Protein-Transduktionsdomäne des Herpes-Simplex-Virus VP22 (HSV-VP22)¹⁴¹ in verschiedene Vektoren kloniert. Somit können Peptid-Aptamere sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma gezielt akkumuliert werden. Damit haben sie die Möglichkeit mit ihren Zielproteinen, unabhängig von deren zellulärer Lokalisation, zu interagieren und die intrazellulären Funktionen der ID-Proteine zu blockieren. ID Proteine sind im Zytoplasma (perinukleäre Region), im Nukleus und an Zentrosomen lokalisiert.^{142, 76}

3.3.1 Generierung der Peptid-Aptamer-Fusionskonstrukte

Zur Expression der VP22-Fusionsproteine in *E. coli* wurden bakterielle Expressionsplasmide konstruiert. Das VP22-Fusionsprotein kann in *E. coli* exprimiert werden und nach der Reinigung zur Transduktion von Säugetierzellen verwendet werden. Mit diesem System können höhere Konzentrationen der Peptid-Aptamere produziert und die Peptid-Aptamere spezifisch zu einem bestimmten Zeitpunkt in die Zellen eingebracht werden.

Zur Akkumulation der Peptid-Aptamere im Nukleus wurde der Vektor pCR[®]T7/VP22-2-TOPO[®], der eine Proteintransduktionsdomäne VP22, ein C-Myc-Epitop und ein C-terminales Polyhistidin-Tag (6×His) enthält, verwendet. Zur Akkumulation der Peptid-Aptamere im Zytoplasma wurde der Vektor pRC[®]T7/VP22/NES-2-TOPO[®], der zusätzlich ein nukleäres Exportsignal (NES) besitzt, verwendet. Hierbei wurden die cDNAs der fünf TRX-Peptid-Aptamere und das TRX ohne Peptid-Aptamere aus den Vektoren pACT-5, pACT-7, pACT-10, pACT-13, pACT-17 und pACT-TRX mit den Primern VP22/NES-TRX-Apt.5F/R, VP22/NES-TRX-Apt.7F/R, VP22/NES-TRX-Apt.10F/R, VP22/NES-TRX-Apt.13F/R, VP22/NES-TRX-Apt.17F/R und VP22/NES-TRX-Apt.TRXF/R mittels PCR amplifiziert. Die cDNA-Amplifikate wurden mit Hilfe des pRC[®]T7/VP22-2-TOPO-TA Cloning[®] Kits bzw. des pRC[®]T7/VP22/NES TOPO-TA Cloning[®] Kits in den Vektor pCR[®]T7/VP22-2-TOPO[®] bzw. pRC[®]T7/VP22/NES-2-TOPO[®] als N-terminale Fusion kloniert (s. Abb. 3.17 A und B).

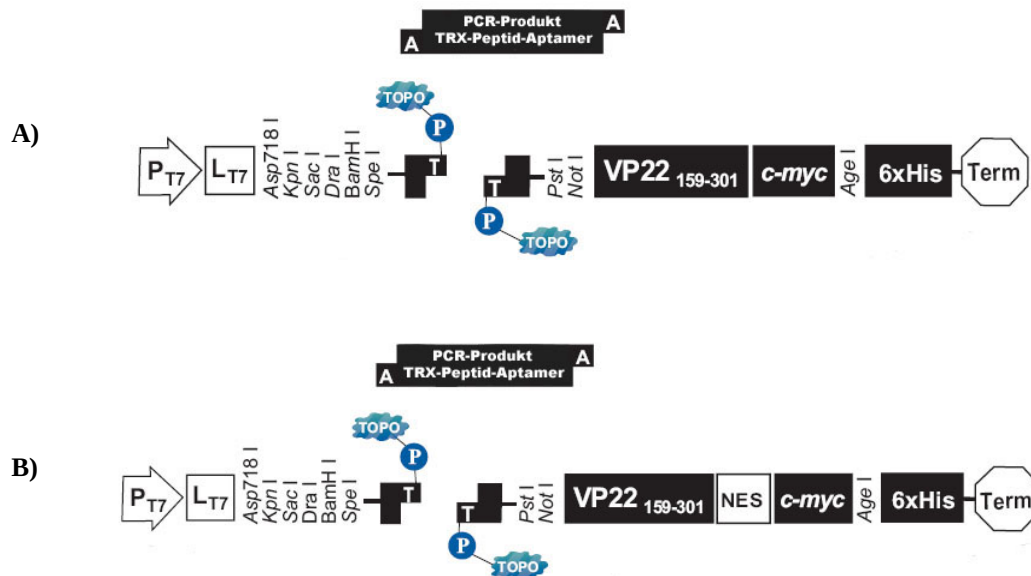


Abb. 3.17 Bakterielle Expressionskonstrukte zur Expression von VP22-Fusionsproteinen in *E. coli* und Transduktion von Säugetierzellen. A) Konstrukt pCR^{T7}/VP22-2-TOPO[®]-Peptid-Aptamer zur Expression von VP22-Fusionsproteinen in *E. coli*, zur Proteintransduktion und nukleären Lokalisation der Peptid-Aptamere. B) Konstrukt pRC^{T7}/VP22/NES-2-TOPO[®]-Peptid-Aptamer zur Expression von VP22-Fusionsproteinen in *E. coli*, zur Proteintransduktion und zytoplasmatischen Lokalisation der Peptid-Aptamere.

Zum Generieren von Zelllinien, die die verschiedenen TRX-Peptid-Aptamere stabil exprimieren, wurde der eukaryotische Expressionsvektor pRC/CMV-VP22-TRX verwendet. Da das bakterielle Thioredoxinprotein (TRX) nur als Fusionsprotein in Säugetierzellen stabil exprimiert werden kann, wurde das Transduktionsprotein VP22 N-terminal an TRX fusioniert. VP22 dient als Proteintransduktionsdomäne und kann daher das VP22-Fusionsprotein von transfizierten Zellen auch in benachbarte Zellen transduzieren und es somit in allen Zellen verteilen. Hierfür wurden die cDNAs der fünf TRX-Peptid-Aptamere aus den Hefe-Library-Konstrukten mit *Nde*I und *Xba*I geschnitten und als C-terminale Fusion in den mit *Nde*I und *Xba*I geschnittenen Vektor pRC/CMV-VP22-TRX kloniert (s. Abb. 3.18).



Abb. 3.18 Konstrukt pRC/CMV-VP22-TRX zum Generieren von Zelllinien, die die verschiedenen TRX-Peptid-Aptamere in Säugetierzellen stabil exprimieren. Die TRX-Peptid-Aptamere aus den Hefe-Library-Konstrukten wurden mit *Nde*I und *Xba*I geschnitten und in den mit *Nde*I und *Xba*I geschnittenen Vektor pRC/CMV-VP22-TRX als C-terminale Fusionen mit dem Transduktionsprotein VP22 kloniert.

Da die ektopische Expression der Peptid-Aptamere von den verwendeten Vektoren abhängig sein kann, wurden hier zusätzlich zu dem eukaryotischen Expressionsvektor pRC/CMV-VP22-TRX die pShooter-Vektoren (pCMV/myc© vectors) benutzt, die häufig zur gezielten

intrazellulären Lokalisation rekombinanter Proteine und Antikörper verwendet werden. Zur nukleären Lokalisation der Peptid-Aptamere wurde der Vektor pCMV/*myc*/nuc, der das NLS von „SV40 Large T antigen“ dreifach enthält, verwendet. Zur zytoplasmatischen Lokalisation der Peptid-Aptamere wurde der Vektor pCMV/*myc*/cyto benutzt. Hierbei wurden die cDNAs der fünf TRX-Peptid-Aptamere und das TRX ohne Peptid-Aptamer aus den Vektoren pACT-5, pACT-7, pACT-10, pACT-13, pACT-17 und pACT-TRX mit den Primern pCMV/*myc*/nuc-Apt.5F/R, pCMV/*myc*/nuc-cyto-Apt.7F/R, pCMV/*myc*/nuc-cyto-Apt.10F/R, pCMV/*myc*/nuc-cyto-Apt.13F/R, pCMV/*myc*/nuc-cyto-Apt.17F/R und pCMV/*myc*/nuc-cyto-TRXF/R mittels PCR amplifiziert. Die cDNA-Amplifikate wurden mit Hilfe des TOPO-TA PCR Cloning Kits in den Vektor PCR[®] 2.1 Topo[®] kloniert und die positiven Klone wurden nach der Blau-Weiß-Selektion auf LB-Agarplatten mit X-Gal und Kanamycin durch Restriktionsverdau (*NotI*/*SalI*) und Sequenzanalyse auf ihre Größe, Orientierung und korrekte Sequenz hin überprüft. Nach dem Restriktionsverdau wurden die cDNAs im richtigen Leserahmen in den Säugetierexpressionsvektor pCMV/*myc*/nuc bzw. pCMV/*myc*/cyto zwischen die Schnittstellen *NotI* und *SalI* kloniert (s. Abb. 3.19 A und B).

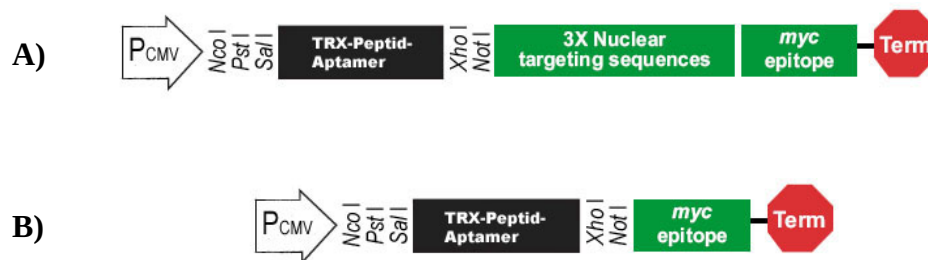


Abb. 3.19 pShooter-Vektoren (pCMV/*myc*© vectors) zur gezielten intrazellulären Lokalisation von rekombinanten Peptid-Aptameren. Die cDNAs der Peptid-Aptamere wurden im richtigen Leserahmen in den Vektor pCMV/*myc*/nuc bzw. pCMV/*myc*/cyto zwischen die Schnittstellen *NotI* und *SalI* kloniert A) Zur nukleären Lokalisation der Peptid-Aptamere wurde der Vektor pCMV/*myc*/nuc, der das NLS von „SV40 Large T antigen“ dreifach enthält, verwendet. B) Zur zytoplasmatischen Lokalisation der Peptid-Aptamere wurde der Vektor pCMV/*myc*/cyto verwendet.

Zur site-spezifischen Fluoreszenz-Markierung und Detektion der Peptid-Aptamere in lebenden Säugetierzellen unter Verwendung von „Mammalian Lumio[™] Gateway® Vectors with Lumio[™] In-Cell Labeling Kits“ (Invitrogen) wurden die cDNAs der Peptid-Aptamere in den Lumio[™]-Tag (Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys)-Expressionsvektor pcDNA[™]6.2/cLumio[™]-DEST bzw. pcDNA[™]6.2/nLumio[™]-DEST kloniert. Hierbei wurden die cDNAs der fünf TRX-Peptid-Aptamere und das TRX ohne Peptid-Aptamer aus den Vektoren pACT-5, pACT-7, pACT-10, pACT-13, pACT-17 und pACT-TRX mit den Primern Lumio-DEST-Apt.5F/R, Lumio-DEST-Apt.7F/R, Lumio-DEST-Apt.10F/R, Lumio-DEST-Apt.13F/R, Lumio-DEST-Apt.17F/R und Lumio-DEST-TRXF/R mittels PCR amplifiziert. Die cDNA-Amplifikate

wurden mit Hilfe des pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits in den Vektor pENTR/D-TOPO® kloniert. Die positiven Klone wurden nach der Selektion auf LB-Agarplatten mit Kanamycin durch Restriktionsverdau (*NotI/AscI*) und Sequenzanalyse auf ihre Größe, Orientierung und korrekte Sequenz hin überprüft. Die cDNAs der Peptid-Aptamere wurden von den Konstrukten pENTR/D-TOPO®-Peptid-Aptamer unter Verwendung des Kits „LR Clonase™ II Enzyme Mix“ (Invitrogen) in den Expressionsvektor pcDNA™6.2/cLumio™-DEST (zur C-terminalen Fusion von Lumio™-Tag) bzw. pcDNA™6.2/nLumio™-DEST (zur N-terminalen Fusion von Lumio™-Tag) transferiert (s. Abb. 3.20 A und B).



Abb. 3.20 Plasmidkonstrukte Fluoreszenz-Markierung und Detektion der Peptid-Aptamere in lebenden Säugetierzellen. A) Konstrukt pcDNA™6.2/cLumio™-Peptid-Aptamer zur C-terminalen Fusion von Lumio™-Tag an Peptid-Aptamere; B) Konstrukt pcDNA™6.2/nLumio™-DEST zur N-terminalen Fusion von Lumio™-Tag an Peptid-Aptamere.

3.3.2 Expression von rekombinanten Peptid-Aptameren mit der Proteintransduktionsdomäne VP22 in *E. coli* BL21(DE3)

Zur Expression von rekombinanten Peptid-Aptameren mit der Proteintransduktionsdomäne VP22 in *E. coli* [BL21(DE3)] wurden bakterielle Expressionsplasmide konstruiert. Zur gezielten Akkumulation der Peptid-Aptamere im Nukleus wurde der Vektor pCR®T7/VP22-2-TOPO® (s. Abb. 3.17 A), der eine Proteintransduktionsdomäne VP22, ein C-Myc-Epitop und ein C-terminales Polyhistidin-Tag (6×His) enthält, verwendet. Zur gezielten Akkumulation der Peptid-Aptamere im Zytoplasma wurde der Vektor pRC®T7/VP22/NES-2-TOPO® (s. Abb. 3.17 B), der zusätzlich ein nukleäres Exportsignal (NES) besitzt, verwendet. Die Expression der rekombinanten Proteine wurde durch IPTG induziert. In Vorversuchen wurde als ideale Bedingung zur Proteinexpression eine IPTG-Konzentration von 1 mM bei 37 °C für 4 h bestimmt. Die Expression der rekombinanten Peptid-Aptamere wurde mittels der Coomassie-Färbung analysiert und durch Western-Blot-Analyse mit dem Anti-myc-Antikörper bestätigt (s. Abb. 3.21A und B).

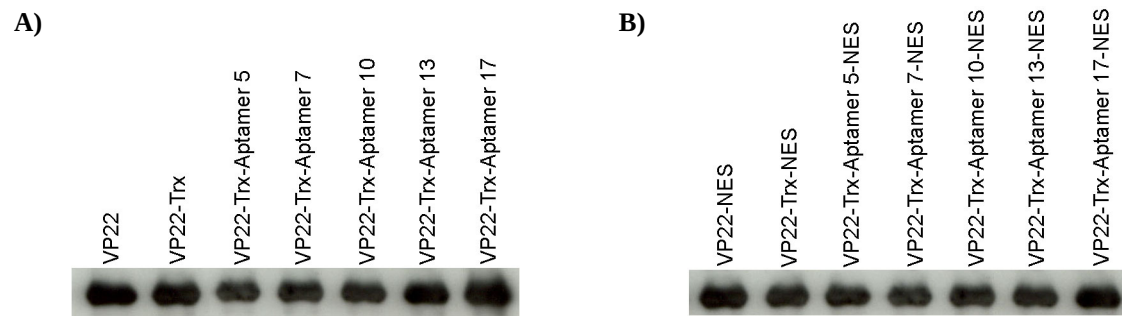


Abb. 3.21 Expression der rekombinanten Peptid-Aptamere mit der Proteintransduktionsdomäne VP22 in *E. coli*. Der *E. coli* -Stamm *BL21(DE3)* wurde mit den Expressionsvektoren transformiert. Die Expression der rekombinanten Peptid-Aptamere wurde mit 1mM IPTG für 4h bei 37 °C induziert und durch Western-Blot-Analyse mit dem Anti-myc-Antikörper bestätigt. A) Zur gezielten Akkumulation der Peptid-Aptamere im Nukleus wurde der Expressionsvektor pCR[®]T7/VP22-2-TOPO[®] (s. Abb. 3.17 A) verwendet. B) Zur gezielten Akkumulation der Peptid-Aptamere im Zytoplasma wurde der Expressionsvektor pRC[®]T7/VP22/NES-2-TOPO[®] (s. Abb. 3.17 B) verwendet. Als Kontrolle wurde die Expression der Proteintransduktionsdomäne VP22 und die Expression des rekombinanten Proteins TrxA mit VP22 durchgeführt.

3.4 Inhibition der ID1-Expression mittels siRNA

Neben der Isolierung ID1-spezifischer Peptid-Aptamere war die Generierung ID1-spezifischer Antisense-Moleküle ein weiteres Ziel, um die Expression von ID1 gezielt zu hemmen. Die spezifische Hemmung der Genexpression durch Anwendung von RNAi beruht auf der Watson-Crick-Basenpaarung des Antisense-Moleküls mit seiner Komplementärsequenz auf der Ziel-RNA. Antisense-Moleküle wirken, anders als die Peptid-Aptamere, auf der Ebene der RNA statt auf der Proteinebene.

3.4.1 Verminderung der ID1-Expression durch siRNA/shRNA

Zahlreiche ID1-spezifische siRNAs wurden mit Hilfe verschiedener Programme zur Herstellung von siRNAs ausgesucht und miteinander verglichen. Es wurden sieben ID1-mRNA-spezifische siRNA hergestellt (ID1-siRNA 1-4 und ID1-siRNA A-C). Zur Kontrolle wurde eine GAPDH-mRNA-spezifische siRNA verwendet (Santa Cruz, Heidelberg). Diese siRNA wurde durch Zusammenlagerung zweier Einzelstränge nach Angaben des Herstellers generiert. HeLa-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion ausplattiert (je $0,5 \times 10^5$ Zellen pro Gewebekulturschalen 60 mm Ø). Zur Transfektion wurde die kommerziell erhältliche Reagenz Lipofectamine 2000[™] nach Angaben des Herstellers verwendet. Anschließend wurde versucht, ID1-Expression durch die Auslösung von siRNA-induzierter RNA-Interferenz (RNAi) zu vermindern. Dazu wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen gegen die

ID1-mRNA gerichteten siRNA transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 24, 36, 48, 60, 72 und 96 h wurde die ID1-Expression durch Westernblot-Analyse mittels anti-ID1-Antikörper (ID1 C-20) überprüft. Die Expression von ID1 wurde von der siRNA ID1-siRNA 1 nach 60 h vermindert (s. Abb. 3.22).

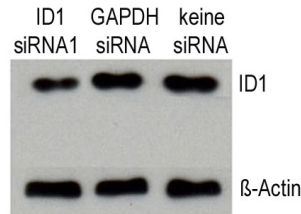


Abb. 3.22 Transiente Hemmung der ID1-Expression mittels siRNA. HeLa-Zellen wurden mit verschiedenen gegen die ID1-mRNA gerichteten siRNA mittels Lipofectamine 2000™ transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 60 h wurde die Verminderung der ID1-Expression durch Westernblot-Analyse mittels anti-ID1-Antikörper (ID1 C-20) bestätigt. Die Expression von ID1 wurde von der ID1-siRNA 1 nach 60 h vermindert. Zur Kontrolle wurde eine siRNA gegen die mRNA von GAPDH verwendet.

siRNAs können nicht nur exogen hinzugegeben werden, sondern auch innerhalb der Zelle von Vektoren exprimiert werden. Zur Herstellung von shRNAs wurden mehrere Oligonukleotide hergestellt (ID1-shRNA 1-4 und ID1-shRNA A-C), durch Zusammenlagerung zweier Einzelstränge nach Angaben des Herstellers generiert und in den Vektor pSUPER.retro zwischen die Schnittstellen *Bgl*II und *Hind*III kloniert, um die siRNAs vom Polymerase III-Promotor H1 aus zu transkribieren (s. Abb. 3.23).

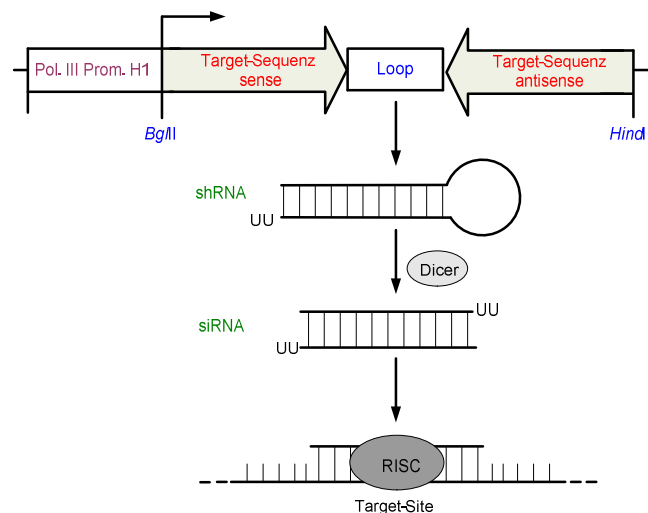


Abb. 3.23 Expression von ID1-shRNA-Konstrukten. ID1-shRNAs wurden in den Vektor pSUPER.retro zwischen die Schnittstellen *Bgl*II und *Hind*III kloniert, um die shRNAs vom Polymerase III-Promotor H1 aus zu transkribieren. Hier wird ein durchgehendes selbst-komplementäres ID1-shRNA-Molekül transkribiert. Nach der Transkription nimmt das shRNA-Molekül eine Haarnadelkonformation an, indem es interne Basenpaarungen ausbildet. Im Zytoplasma wird diese Struktur vom Enzym Dicer weiterverarbeitet, so dass eine reife ID1-siRNA entsteht.

Nach der Selektion auf LB-Agarplatten mit Ampicillin wurden die positiven Klone durch Restriktionsverdau und Sequenzanalyse auf ihre Größe, Orientierung und korrekte Sequenz

hin überprüft. HeLa-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion ausplattiert (je 1×10^5 Zellen pro Gewebekulturschalen 60 mm Ø). Zur Transfektion wurde die kommerziell erhältliche Reagenz Lipofectamine 2000™ nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden elf Klone unter Verwendung von Puromycin isoliert, von denen vier Klone kultiviert werden konnten. Nach einer Kultivierung von 2,5 Wochen wurde die ID1-Expression durch Westernblot-Analyse mittels anti-ID1-Antikörper (ID1 C-20) überprüft. Die Expression von ID1 wurde durch die shRNA ID1-shRNA C vermindert (s. Abb. 3.24).

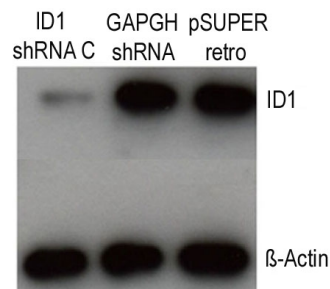


Abb. 3.24 Stabile Hemmung der ID1-Expression mittels shRNA. HeLa-Zellen wurden mit verschiedenen Konstrukten pSUPER.retro.-ID1-shRNA mittels Lipofectamine 2000™ transfiziert. Nach der Isolierung von stabilen Klonen unter Verwendung von Puromycin und einer Kultivierung von 2,5 Wochen wurde die Expression von ID1 durch Westernblot-Analyse mittels anti-ID1-Antikörper (ID1 C-20) überprüft. Die Expression von ID1 wurde durch die ID1-shRNA C signifikant vermindert (2,5-Wochen-Werte). Zur Kontrolle wurde eine shRNA gegen die mRNA von GAPDH verwendet.

3.5 Überexpression von S5A und Untersuchung der endogenen ID1-Expression

Das Protein S5A/Rpn10 ist eine Untereinheit des 26S-Proteasoms, das selektiv multiubiquitinierte Proteine bindet und als Transportprotein zum Proteasom dient. S5A wurde durch Yeast-Two-Hybrid-Screening als Bindungspartner von ID1 identifiziert und seine starke Interaktion mit ID1 auch in humanen Zellen verifiziert.¹²⁷ S5A revertiert ID1-vermittelte Repression des Muskelkreatinkinase-Promotors während der Muskel-Differenzierung.¹²⁷ Verminderung der S5A-Expression in *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* mittels RNAi resultiert in letalen Phänotypen und abnormalen Mitosen.¹²⁸⁻¹²⁹ Darüber hinaus induziert ID1 Zentrosomenabnormalitäten durch Interferenz mit S5A (Hasskarl J. et al., unveröffentlichte Daten). Um den Mechanismus aufzuklären, wie ID1 die Deregulation des Zentrosomenhaushalts verursacht, wurde untersucht, ob die Überexpression von S5A zur Veränderung der endogenen ID1-Expression führt. Hierfür wurden U2OS-Zellen einen Tag vor der Transfektion ausplattiert (je $0,5 \times 10^5$ Zellen pro Gewebekulturschalen 36 mm Ø). Zur Transfektion wurde die kommerziell erhältliche Reagenz FuGENE 6 nach Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden U2OS-Zellen

mit 0,5, 1 und 2 µg pcDNA3-S5A-HA-Konstrukt transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde die endogene ID1-Expression und die Expression von S5A durch Westernblot-Analyse mittels anti-ID1-Antikörper bzw. anti-S5A-Antikörper überprüft. Die Überexpression von S5A führte zu keiner Veränderung der endogenen ID1-Expression (s. Abb. 3.25).

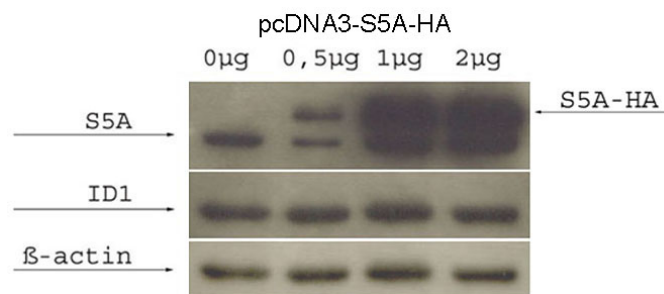


Abb. 3.25 Die Überexpression von S5A führte zu keiner Veränderung der endogenen ID1-Expression. U2OS-Zellen wurden mit 0,5, 1 und 2 µg pcDNA3-S5A-HA-Konstrukt transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde die endogene ID1-Expression und die Expression von S5A durch Westernblot-Analyse mittels anti-ID1-Antikörper bzw. anti-S5A-Antikörper überprüft.

Zusätzlich wurde überprüft, ob die Überexpression von ID1 zur Veränderung der endogenen S5A-Expression führt. Dazu wurden U2OS-Zellen mit 0,5, 1 und 2 µg pcDNA3-ID1-FLAG-Konstrukt transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde die endogene S5A-Expression überprüft. Die Überexpression von ID1 führte zu keiner Veränderung der endogenen S5A-Expression (s. Abb. 3.26).

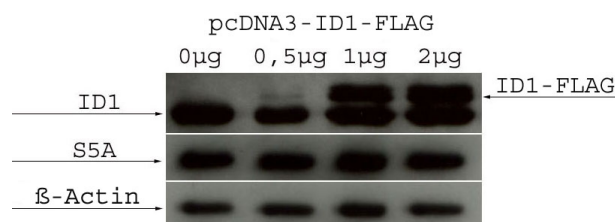


Abb. 3.26 Die Überexpression von ID1 führte zu keiner Veränderung der endogenen S5A-Expression. U2OS-Zellen wurden mit 0,5, 1 und 2 µg pcDNA3-ID1-FLAG-Konstrukt transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde die endogene S5A-Expression und die Expression von ID1 durch Westernblot-Analyse mittels anti-S5A-Antikörper bzw. anti-ID1-Antikörper überprüft.

3.6 Analyse von Interaktionen der Peptid-Aptamere mit S5A

Um zu untersuchen, ob die im Yeast-Two-Hybrid- und im Mammalian-Two-Hybrid-System isolierten ID1-spezifischen Peptid-Aptamere mit dem ID1-Bindungspartner S5A interagieren, wurde das CheckMate Mammalian-Two-Hybrid-System angewendet.

Die Untersuchung der Interaktionen zwischen den Peptid-Aptameren und S5A wurde wie die Verifizierung der Interaktionen zwischen ID1 und Peptid-Aptameren durchgeführt (s. 3.2.3).

Tab. 3.20 Calcium-Phosphat-Transfektion zur Verifizierung der Interaktionen zwischen Peptid-Aptameren und S5A in HeLa-Zellen mittels des CheckMate Mammalian-Two-Hybrid-Systems. Es wurden zwei unabhängige Calcium-Phosphat-Transfektionsversuche durchgeführt.

Transfektion	2µg pBIND-Konstrukt	2µg pACT-Konstrukt	2µg pG5luc-Konstrukt	0,5µg pCMV-gal-Konstrukt	Bemerkung
1	pBIND-Id	pACT-MyoD	pG5luc	pCMV-gal	positive Kontrolle
2	pBIND-S5A	pACT-TRX	pG5luc	pCMV-gal	negative Kontrolle
3-7	pBIND-S5A	pACTTRX-Peptid-Aptamere 5, 7, 10, 13, 17	pG5luc	pCMV-gal	konstringierte Peptid-Aptamere

Die Kotransfektionen der TRX-Peptid-Aptamere 5, 7, 10, 13 und 17 mit S5A resultierten im Vergleich zur Luciferase-Aktivität der negativen Kontrolle in keinen hohen Luciferase-Aktivitäten und somit interagieren sie nicht mit S5A (s. Tab. 3.22 und Abb. 3.27).

Tab. 3.22 Transfektionsansätze und relative Luciferase-Aktivität der S5A/Peptid-Aptamer-Interaktionen. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Peptid-Aptamere	Aptamer 5	Aptamer 7	Aptamer 10	Aptamer 13	Aptamer 17	Kontrolle
Transfizierte Plasmide	pBIND-S5A	pBIND-S5A	pBIND-S5A	pBIND-S5A	pBIND-S5A	pBIND-S5A
	pACTTRX-Aptamer 5	pACTTRX-Aptamer 7	pACTTRX-Aptamer 10	pACTTRX-Aptamer 13	pACTTRX-Aptamer 17	pACTTRX
	pG5luc	pG5luc	pG5luc	G5luc	pG5luc	pG5luc
	pCMV-gal	pCMV-gal	pCMV-gal	pCMV-gal	pCMV-gal	pCMV-gal
Relative Luci.-Aktivität	97 ± 5,01	100 ± 8,27	98 ± 1,62	102 ± 11,10	96 ± 4,65	100 ± 8,07

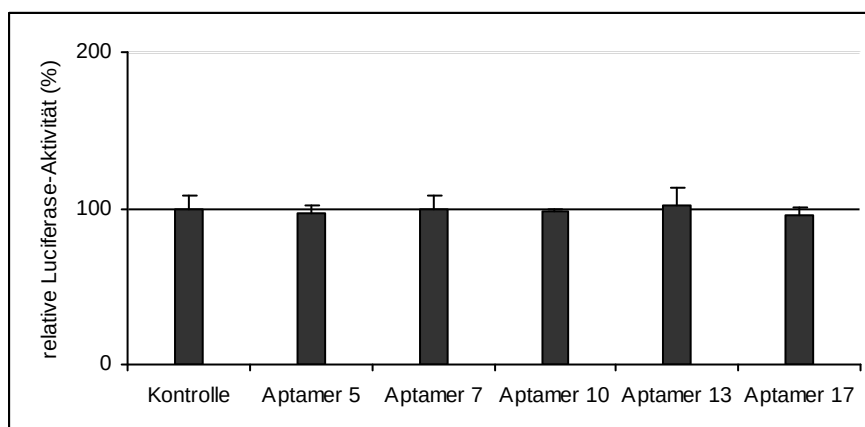


Abb. 3.27 Graphische Darstellung der Mammalian-Two-Hybrid-Experimente zur Verifizierung der Interaktionen zwischen S5A und den Peptid-Aptameren. Die Kotransfektionen der TRX-Peptid-Aptamere 5, 7, 10, 13 und 17 resultierten im Vergleich zur Luciferase-Aktivität der negativen Kontrollen in keinen hohen Luciferase-Aktivitäten und somit interagieren sie nicht mit S5A. Als negative Kontrolle wurde ein pACTTRX-Vektor ohne Insert verwendet. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Peptid-Aptamere isoliert werden, die hoch affin mit ID1 interagieren und daher mit den Funktionen von ID1 interferieren können. Die isolierten Peptid-Aptamere sollten dazu benutzt werden, die onkogenen Eigenschaften von ID1 zu inhibieren. Eine erfolgreiche Inhibition der onkogenen Wirkung von ID1 durch derartige Peptide könnte bei der Entwicklung einer neuartigen Therapie von Krebserkrankungen bedeutend werden. Da die zu den HLH-Proteinen der Klasse D gehörenden ID-Proteine (ID1-4) über vergleichbare Bindungsaffinitäten zu den bHLH-Proteinen der Klasse A und B verfügen, hohe Sequenzhomologien innerhalb ihrer HLH-Domänen aufweisen und in einer Vielzahl von Tumoren zum Teil parallel überexprimiert werden, wurden im Rahmen dieser Arbeit auch ID2, ID3 und ID4 analysiert.

Neben der Isolierung ID1-spezifischer Peptid-Aptamere war die Generierung ID1-spezifischer si/shRNAs ein weiteres Ziel, um die Expression von ID1 gezielt zu hemmen und neue Therapiekonzepte zu entwickeln.

4.1 Isolierung der mit ID-Proteinen interagierenden Peptid-Aptamere

In zwei verschiedenen Yeast-Two-Hybrid-Screenings mit ID1 als Bait konnten 30 Peptid-Aptamere isoliert werden (s. Tab. 3.6, Abb. 3.5). Trotz gleicher Transformationseffizienzen der beiden Peptid-Aptamer-Expressionsbanken konnten aus der linearen Peptid-Aptamer-Expressionsbank, in der die Peptid-Aptamere nicht an einem Gerüstprotein verankert sind und daher flexible Konformationen annehmen, nur vier Peptid-Aptamere (Peptid-Aptamer 1-4) isoliert werden. Aus der konstringierten Peptid-Aptamer-Expressionsbank, in der die Peptid-Aptamere mit ihren beiden Enden an dem Gerüstprotein Thioredoxin A (TrxA) von *E. coli* verankert sind, wurden 26 Peptid-Aptamere isoliert. Die hohe Anzahl von isolierten konstringierten Peptid-Aptameren begründet sich durch die Vorteile, die die konstringierten Peptid-Aptamere im Vergleich zu den linearen und flexiblen Peptid-Aptameren haben:

Konstringierte Peptid-Aptamere besitzen höhere Bindungsaffinitäten zu ihren Zielproteinen, da diese Peptid-Aptamere, ähnlich wie Antikörper, die aus kurzen, variablen Antigen-bindenden Domänen bestehen und vom starren Gerüstprotein präsentiert werden, durch das Gerüstprotein TrxA nach außen präsentiert werden. Es ist davon auszugehen, dass dieser

Änderung der Bindungsaffinität die reduzierte Konformationsentropie des konstringierten Peptides im ungebundenen Zustand zu Grunde liegt. Tatsächlich geht die Affinität der Peptid-Aptamere zu ihren Zielproteinen um das 10- bis 1000fache verloren, wenn die Peptid-Aptamere von ihrem Stützprotein (TrxA) entfernt und als lineare Peptid-Aptamere getestet werden.^{106, 118}

Die konstringierte Konformation kann z.B. hydrophobe Aminosäuren innerhalb eines Peptid-Aptamers zur Oberfläche hin ausrichten, die möglicherweise innerhalb eines linearen Peptid-Aptamers unter den wässrigen Umgebungsbedingungen der Zelle nach innen versteckt bleiben. Die hydrophobe Wechselwirkung ist neben elektrostatischen Wechselwirkungen, Wasserstoff-Brückenbindungen und van der Waals-Kräften ein wesentliches Element, das für die korrekte Faltung und Assoziation von Proteinen verantwortlich ist.

Peptide mit gefalteten Strukturen zeigen häufig eine höhere proteolytische Stabilität als lineare Peptide.¹¹⁹ Diese Stabilität ist eine wichtige Voraussetzung für die *in vivo*-Interaktion mit den Zielproteinen und für die Inhibition ihrer intrazellulären Funktionen.

In Yeast-Two-Hybrid-Experimenten konnten Interaktionen zwischen ID3 und den Peptid-Aptameren 6, 7, 8, 9, 10 und 13 aus der konstringierten Peptid-Aptamer-Expressionsbank nachgewiesen werden (s. Tab. 3.10 und Abb. 3.6 A); nur das Peptid-Aptamer 13 interagiert zusätzlich mit ID2 (s. Tab. 3.10 und Abb. 3.6 B). Innerhalb der ID-Proteine liegt eine hohe Sequenzhomologie, besonders zwischen ID1 und ID3, und genetische Analysen zeigen, dass sowohl ID1 als auch ID3 in verschiedenen Tumoren parallel induziert werden und zum Teil überlappende Funktionen haben.²⁰ Deshalb war zu erwarten, dass ID1 und ID3 zum Teil ähnliche Bindungsaffinitäten zu den Peptid-Aptameren zeigen. Da ID-Proteine innerhalb ihrer HLH-Domänen hohe, außerhalb ihrer HLH-Domänen jedoch nur geringe Sequenzhomologien enthalten, ist die HLH-Domäne vermutlich der Bindungsort für das Peptid-Aptamer 13, das mit ID1, ID2 und ID3 in der Hefe interagiert. Bei keinem der vier Peptid-Aptamere der linearen Peptid-Aptamer-Expressionsbank konnte eine Interaktion mit ID2 oder ID3 nachgewiesen werden. Dieses könnte der Grund dafür sein, dass die linearen Peptid-Aptamere in der Hefe nur mit ID1 interagieren. Lineare Peptide besitzen häufig eine niedrigere Bindungsaffinität und niedrigere proteolytische Stabilität als gefaltete Peptide. Da ID4 in MaV203 nicht exprimiert werden konnte, wurde ID4 in den Yeast-Two-Hybrid-Experimenten nicht untersucht.

Die BLAST-Analyse mit den isolierten Peptid-Aptameren gegen Proteinsequenzen aus den biologischen Datenbanken zeigt, dass keine der Peptid-Aptamer-Sequenzen Homologien mit

bekannten Proteinen oder Proteindomänen aufweisen. Dies lässt sich damit erklären, dass es sich bei Peptid-Aptameren nicht um aus der Evolution abgeleitete Motive handelt. Sie sind artifizielle, randomisierte Sequenzen, die aufgrund ihrer Aminosäurezusammensetzung eine Konformation einnehmen, die es ihnen ermöglicht, mit ihren Zielproteinen zu interagieren.

4.2 Interaktionen zwischen den Peptid-Aptameren und ID-Proteinen in humanen Zellen

Um einerseits die Interaktionen der Peptid-Aptamere mit ID-Proteinen in humanen Zellen zu bestätigen und andererseits die Bindungsspezifität und Bindungsintensität zu bestimmen, wurden Mammalian-Two-Hybrid-Experimente durchgeführt. Dazu wurden die aus der linearen sowie der konstringierten Peptid-Aptamer-Expressionsbank stammenden Peptid-Aptamere und die cDNAs von *ID1-4* in Säugetierexpressionsvektoren kloniert.

Die Mammalian-Two-Hybrid-Experimente zeigten deutlich, dass die Koexpression der im Yeast-Two-Hybrid-System isolierten konstringierten Peptid-Aptamere (Peptid-Aptamere 5, 7, 10, 13 und 17) mit den jeweiligen ID-Proteinen in HeLa-Zellen zu einer signifikanten Expressionszunahme des Reportergens Luciferase führt. Es lässt sich somit feststellen, dass die Interaktionen und die Interaktionsspezifitäten der fünf Peptid-Aptamere mit den jeweiligen ID-Proteinen, die im Yeast-Two-Hybrid-System verifiziert wurden, im Mammalian-Two-Hybrid-System reproduzierbar sind.

Die Peptid-Aptamere 5 und 17 interagieren spezifisch mit ID1, Peptid-Aptamer 7 interagiert sowohl mit ID1 als auch mit ID3, und Peptid-Aptamer 13 interagiert mit allen ID-Proteinen (ID1-4) (s. Abb. 3.16). Das Peptid-Aptamer 10, das im Yeast-Two-Hybrid-System mit ID1 und ID3 interagiert, interagiert im Mammalian-Two-Hybrid-System spezifisch nur mit ID3. Bei keinem der weiteren 20 Peptid-Aptamere der konstringierten Peptid-Aptamer-Expressionsbank und der vier Peptid-Aptamere der linearen Peptid-Aptamer-Expressionsbank konnte eine Interaktion im Mammalian-Two-Hybrid-System mit ID-Proteinen nachgewiesen werden.

Interaktionen, die im Yeast-Two-Hybrid-System detektiert werden können, lassen sich teilweise nur bedingt in humanen Zellen bestätigen. Problematisch beim Yeast-Two-Hybrid-System ist, dass die Interaktion der zu untersuchenden Proteine im Zellkern der Hefe stattfinden muss, da die Transkription nur dort ablaufen kann. Es ist möglich, dass sich Proteine in diesem Milieu anders falten als in dem Bereich der Zelle, in dem sie üblicherweise

auftreten. Eine Bait/Prey-Interaktion im Yeast-Two-Hybrid-System kann beispielsweise durch einen Brückenfaktor, der nicht in humanen Zellen existiert, vermittelt werden. Auch die posttranslationalen Modifikationen der Hefe unterscheiden sich teilweise von denen anderer eukaryotischer Organismen.¹¹⁸⁻¹¹⁹ Diese veränderte Faltung beeinflusst die Struktur und die Oberflächeneigenschaften der Proteine. Daher können Bait/Prey-Interaktionen, die im Yeast-Two-Hybrid-System detektiert werden, auf Grund der veränderten Modifikationen in humanen Zellen nicht mehr auftreten.

Die Ergebnisse dieser Experimente erlauben eine erste Qualitätsbeurteilung der Peptid-Aptamere. Die Peptid-Aptamere 5 und 17 binden hoch affin an ID1, während das Peptid-Aptamer 7 etwas schwächer und Peptid-Aptamer 13 erheblich schwächer an ID1 binden (s. Abb. 3.12). Peptid-Aptamer 7 zeigt neben der hohen Affinität zu ID1 eine ebenso hohe Affinität zu ID3 (s. Abb. 3.12 und 3.13). Peptid-Aptamer 10 bindet nur an ID3 (s. Abb. 3.13). Somit zeigen die Peptid-Aptamere 5, 17 und 10 eine hohe Bindungsspezifität, da sie trotz der hohen Sequenzhomologie zwischen ID1 und ID3 und der zum Teil überlappenden Funktionen der beiden ID-Proteine spezifisch an ID1 oder ID3 binden. Aus diesem Grund ist es sehr unwahrscheinlich, dass diese Peptid-Aptamere mit ID1- oder ID3-Bindungspartnern wie z.B. den E-Proteinen und ETS-Proteinen interagieren und dort unerwünschte Effekte bewirken.

Die Peptid-Aptamere 5 und 17, die spezifisch mit ID1 interagieren, können gezielt zur Inhibition der ID1-induzierten abnormalen Zentrosomenduplikation, die durch genomische Instabilität malignes Wachstum fördern kann, eingesetzt werden, da nur die ektopische Expression von ID1, nicht aber die von ID2, ID3 oder ID4 eine abnormale Zentrosomenduplikation induziert.⁷⁶

Weil ID1 und ID3 in verschiedenen Tumoren parallel induziert werden und zum Teil überlappende Funktionen haben²⁰, kann eine gezielte Inhibition der einzelnen ID-Proteine (ID1 oder ID3) je nach Zelltyp nur zu gemäßigten phänotypischen Veränderungen führen. Deshalb kann die Interaktion von Peptid-Aptamer 7 mit ID1 und ID3 vorteilhaft sein. Eine gleichzeitige Inhibition von ID1 und ID3 könnte, wie bei *ID1/ID3*-Knockout-Mäusen beobachtet, eine negative Wirkung auf die Tumervaskularisation haben. Eine erfolgreiche, gleichzeitige Inhibition der onkogenen Wirkung von ID1 und ID3 durch Peptid-Aptamer 7 könnte einen ausgeprägten Effekt auf das Tumorwachstum und die Tumorneoangiogenese haben. Peptid-Aptamer 13 bindet hoch affin an ID2 (Abb. 3.14) und erheblich schwächer an ID1, ID3 und ID4 (Abb. 3.12, 3.13 und 3.15). Trotz seiner hohen Affinität zu ID2 zeigt Peptid-Aptamer 13 eine geringe Bindungsspezifität zu den anderen ID-Proteinen. Die vier ID-

Proteine zeigen unterschiedliche, aber auch zum Teil überlappende Expressionsmuster in verschiedenen Tumorzellen. Daher kann ein Peptid-Aptamer, das an alle ID-Proteine bindet, in solchen Zellen potenziell eine höhere inhibitorische Wirkung haben als Peptid-Aptamere, die nur spezifisch an ein oder zwei ID-Proteine binden.

Die Interaktionen der ID-Proteine mit den E-Proteinen, ETS-Proteinen und pRB, die Induktion der *ID*-Genexpression durch die klassischen Onkoproteine wie RAS, MYC und BMP und die Expressionskontrolle des Tumorsuppressors INK4a durch die ID- und ETS-Proteine beweisen die Wichtigkeit der ID-Proteine in der Tumorigenese. In Mausmodellen wurde gezeigt, dass der partielle Verlust von *ID1* und *ID3* eine negative Wirkung auf die Tumervaskularisation hat. Der Effekt der ID-Reduktion auf die Vaskularisation von Tumoren hängt vom Tumortyp, Tumorgrad und von den Tumorzellen selbst ab. Deshalb besteht hier die Möglichkeit, die isolierten Peptid-Aptamere, die diverse Bindungsintensitäten und Bindungsspezifitäten mit den entsprechenden ID-Proteinen besitzen, therapeutisch nutzbar zu machen. Eine Peptid-Aptamer-vermittelte, kontrollierte Inhibition von ID-Proteinen in Tumoren, Tumorstroma und anderen Zellen kann zu großen Fortschritten in der Tumorbilogie und Krebstherapie führen. Die isolierten Peptid-Aptamere könnten zur Repression der onkogenen Wirkungen der ID-Proteine wie Inhibition der Zelldifferenzierung, Stimulierung der Zellproliferation und Begünstigung der Tumor-Neoangiogenese und der Tumordinvasion verwendet werden.

4.3 Zelluläre Lokalisation der Peptid-Aptamere zur funktionalen Analyse in humanen Zellen

4.3.1 Einschleusung der Peptid-Aptamere in humane Zellen durch Proteintransduktion

Die transiente Transfektion von Zellen mit der DNA, die für ein exogenes Protein codiert, bringt den Nachteil sehr diverser Transfektionseffizienzen und verschiedener Expressionsniveaus mit sich. Zur Einführung der isolierten Peptid-Aptamere in Zielzellen wurde die neuartige Methode der Proteintransduktion verwendet. Mit diesem System können höhere Konzentrationen der Peptid-Aptamere in *E. coli* exprimiert und nach der Reinigung zur Transduktion von Säugetierzellen verwendet werden. Bei untersuchten Zellen kann eine 100%ige Transduktionseffizienz mit diesem System erreicht werden. Außerdem können die

Peptid-Aptamere spezifisch zu einem bestimmten Zeitpunkt und in definierten Dosen in die Zellen eingebracht werden.

Die Einführung therapeutischer Peptide und Proteine in Gewebe oder Organe war bisher sehr schwierig, da die Zellmembran für die meisten Peptide und Proteine undurchlässig ist und die Einführung durch die Größe und biochemischen Eigenschaften des Proteins limitiert ist. Es war nur möglich, bioaktive Peptide durch Zellmembranen zu bringen, wenn sie sehr klein oder hoch lipophil waren. Vor kurzem wurde entdeckt, dass bestimmte Proteine wie das Protein HIV TAT, das Drosophila-Protein Antennapedia (ANTP) und das Protein HSV VP22 des Herpes-Simplex-Virus in der Lage sind, Zellmembranen zu durchdringen.¹⁴³⁻¹⁴⁶ Dieses Phänomen konnte dazu genutzt werden, ein heterologes Protein, das chemisch mit einem bestimmte Aminosäuren umfassenden Teil eines dieser Proteine fusioniert war, in Zellen zu transduzieren.¹⁴⁹ Alle Proteintransduktionsdomänen (PTD) zeichnen sich durch das zahlreiche Vorkommen basischer Aminosäuren (Arginin und Lysin) aus, die für die Interaktion mit der Lipid-Doppelschicht verantwortlich sind (Tab. 4.1). Der Mechanismus, mit dem diese Proteintransduktionsdomänen die Translokation durch die Zellmembran vermitteln, ist allerdings noch nicht aufgeklärt.

Tab. 4.1 Aminosäuresequenzen der bisher charakterisierten Proteintransduktionsdomänen (PTD)

Alle PTDs bestehen vor allem aus basischen Aminosäuren wie Arginin und Lysin, die den Kontakt mit der Zellmembran aufbauen. Die minimale TAT-Transduktionsdomäne sind die basischen Reste 47-55, während die Reste 267 bis 300 die Transduktion durch das Protein VP22 vermitteln. Im Protein Antennapedia (ANTP) ist die dritte α -Helix (aa 43-58) für die Transduktion verantwortlich (modifiziert nach Schwarze and Dowdy, 2000).

PTD	Aminosäuresequenz
HIV-1 TAT	46-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-56
HSV VP22	266-Asp-Ala-Ala-Thr-Ala-Thr-Arg-Gly-Arg-Ser-Ala-Ala-Ser-Arg-Pro-Thr-Glu-Arg-Pro-Arg-Ala-Pro-Ala-Arg-Ser-Ala-Ser-Arg-Pro-Arg-Arg-Pro-Val-Glu-301
ANTP	42-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-59

ID-Proteine sind im Zytoplasma (perinukleäre Region), an Zentrosomen und im Zellkern lokalisiert.¹⁴² Damit die isolierten Peptid-Aptamere sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus mit ID-Proteinen interagieren und deren intrazelluläre Funktionen blockieren können, wurden bakterielle VP22-Fusionsprotein-Expressionsplasmide pCR[®]T7/VP22-2-TOPO[®]-Peptid-Aptamer (zur nukleären Lokalisierung der Peptid-Aptamere) und pRC[®]T7/VP22/NES-2-TOPO[®]-Peptid-Aptamer (zur zytoplasmatischen Lokalisierung der Peptid-Aptamere) konstruiert (s. Abb. 3.17). Die erfolgreiche Expression der rekombinanten Proteine in *E. coli* [BL21(DE3)] wurde durch Western-Blot-Analyse bestätigt (s. Abb. 3.21)

In den folgenden Experimenten werden die rekombinanten Proteine mittels des Histidin-Tags durch Ni^{2+} -Affinitätschromatographie gereinigt. Nach der Transduktion in die Zielzellen kann mittels Immunofluoreszenz- und Western-Blot-Analysen gezeigt werden, ob die Peptid-Aptamere durch die Protein-Transduktionsdomäne in die Zielzellen gelangen und dort spezifisch mit den entsprechenden ID-Proteinen interagieren. Da die Stabilität transduzierter Proteine entscheidend von der Art des transduzierten Proteins abhängig sein kann, wird die Stabilität der transduzierten Peptid-Aptamere in den Zellen mittels Immunofluoreszenz- und Western-Blot-Analysen untersucht. Nach der Verifizierung der spezifischen Interaktionen der isolierten Peptid-Aptamere mit den ID-Proteinen wird untersucht, inwieweit die Bindungen mit den Funktionen der ID-Proteine interferieren. ID-Proteine wirken durch Inhibition der Zelldifferenzierung, Stimulierung der Zellproliferation und Begünstigung der Tumor-Neoangiogenese und der Tumordinvasion an der Tumorigenese mit.²⁰ Darüber hinaus induziert die Überexpression von ID1 eine abnormale Zentrosomenduplikation, die durch genomische Instabilität malignes Wachstum fördern kann.⁷⁶ Aus diesem Grund wird untersucht, ob die isolierten Peptid-Aptamere diese Phänotypen beeinflussen. Hierbei werden Durchflusszytometrie zur Untersuchung der Zellproliferation und des Zellzyklus, Immunofluoreszenz-Analysen zur Untersuchung der abnormalen Zentrosomenduplikation unter Verwendung von γ -Tubulin als Zentrosomenmarker, Expressionsanalyse verschiedener Zellzyklus-Regulatoren wie dem Tumorsuppressor INK4a mittels Western-Blot, RNA-Microarray, quantitativer PCR oder Northern-Blot und Konfokalmikroskopie zur Analyse der zellulären Kolo-kalisation der Peptid-Aptamere und ID-Proteine durchgeführt.

Die Peptid-Aptamere wurden nur aufgrund ihrer Bindungsaffinität und nicht aufgrund ihrer inhibitorischen Wirkung auf ID-Proteine selektiert. Daher kann die Intensität ihrer inhibitorischen Wirkung sehr unterschiedlich sein. Außerdem kann den Peptid-Aptameren eine zusätzliche Funktion zugewiesen werden, mit der die ID-Proteine schneller degradiert werden können. In den letzten Jahren wurden einige Domänen identifiziert, die spezifisch mit dem Proteindegradations-Signalweg der Zellen interagieren. So konnte gezeigt werden, dass die SOCS-Box der SOCS-Proteine (suppressors of cytokine signaling) für die Ubiquitinierung von Jak und STAT-Proteinen verantwortlich ist.¹⁴⁷ Die SOCS-Box ist eine aus 40 Aminosäuren bestehende Sequenz im C-Terminus der SOCS-Proteine. SOCS-Proteine interagieren über ihre SH2-Domäne mit Signalproteinen, wie z.B. STAT- und Jak-Molekülen. Eine SH2-Domäne ist eine Proteindomäne, die spezifische Proteininteraktionen vermittelt. Die Region ist ca. 100 Aminosäuren lang und erkennt insbesondere Peptide mit phosphoryliertem Tyrosin. SH2-Domänen sind an vielen Proteinkomplexen beteiligt,

insbesondere bei Gerüstproteinen. Zudem spielen SH2-Domänen eine wichtige Rolle bei einigen Signalwegen. Außerdem bauen die SOCS-Proteine mit ihrer SOCS-Box Kontakt spezifisch zu E3-Ubiquitin-Ligasen auf. Daher gehören die SOCS-Proteine zur Familie der E3-Ubiquitin-Ligasen.¹⁴⁸⁻¹⁴⁹ Auch bei einer Reihe weiterer Proteine konnte die SOCS-Box-Domäne identifiziert werden. Diese Proteine besitzen allerdings, statt einer SH2-Domäne wie die SOCS-Proteine, andere Motive zur Interaktion mit weiteren Molekülen.¹⁵⁰ E3-Ubiquitin-Ligasen übertragen spezifisch Ubiquitineinheiten auf die gebundenen Moleküle und markieren sie damit für den Abbau im 26S-Proteasom (s. Abb 4.1). So stellt die SOCS-Box eine spezifische Domäne dar, die gebundene Moleküle für den Abbau markiert. Daher können die selektierten Peptid-Aptamere mit einer SOCS-Box fusioniert werden, so dass die entsprechenden ID-Proteine durch die Bindung der Peptid-Aptamere selektiv degradiert werden können. So können sogar Peptid-Aptamere, die zwar mit ID-Proteinen interagieren, nicht aber mit deren Aktivitäten interferieren, die zellulären Funktionen von ID-Proteinen durch den schnellen Abbau der ID-Proteine regulieren. Dies ermöglicht, die Konzentration der ID-Proteine spezifisch abzusenken und den transformierten Phänotyp zu revertieren. Die Peptid-Aptamere 5 und 17, die eine hohe Bindungsaffinität zu ID1 besitzen, das Peptid-Aptamer 7, das hoch affin an ID1 und ID3 bindet, und das Peptid-Aptamer 13, das hoch affin an ID2 bindet, können einen starken Kontakt zwischen den entsprechenden ID-Proteinen und der zellulären Degradierungsmaschinerie aufbauen und damit einen großen Effekt auf die Reduzierung der hohen Konzentrationen der ID-Proteine in Tumoren haben.

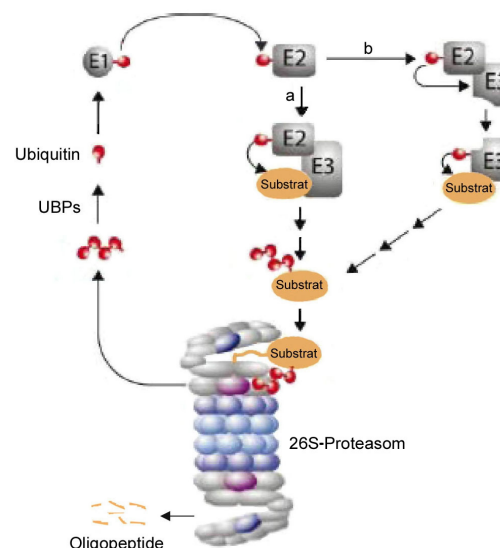


Abb. 4.1 Der Ubiquitin-Proteasom-Weg

Ubiquitin-prozessierende Hydrolasen setzen Ubiquitin (rot) frei. Das Substratprotein (orange) wird unter der Mitwirkung des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms E1, des Ubiquitin-konjugierenden Proteins E2 und der Ubiquitin-Ligase E3 polyubiquitiniert. Das polyubiquitinierte Substrat wird vom 26S-Proteasom erkannt und als entfaltete Polypeptidkette den katalytisch aktiven Seitenketten im Inneren des 20S-Proteasoms zugeführt. Das Substrat wird zu kurzen Oligopeptiden hydrolysiert, während Ubiquitin recyclet wird. (Die Abbildung ist modifiziert nach Kostova and Wolf, 2003).

Die Peptid-Aptamere, vor allem in Kombination mit einer SOCS-Box-Domäne, ermöglichen eine gezielte Inhibition und/oder Degradation der ID-Proteine.

Außerdem kann die inhibitorische Wirkung der Aptamere durch die Erhöhung der Affinität des Aptamers zu ID-Proteinen noch gesteigert werden. Durch randomisierte Mutagenese kann ein Peptid-Aptamer generiert werden, das eine deutlich höhere Affinität zum Zielprotein aufweist, so dass stabilere Zielprotein/Inhibitor-Komplexe gebildet werden.¹⁰⁵

4.3.2 Expression der selektierten Peptid-Aptamere in humanen Zellen

Für die transiente and stabile Expression der isolierten Peptid-Aptamere in humanen Zellen wurde der VP22-PTD enthaltende Expressionsvektor pRC/CMV-VP22-TRX verwendet (s. Abb. 3.18). Der Vorteil dieses Konstrukts besteht darin, dass das VP22-Fusionsprotein von transfizierten Zellen aus auch in benachbarte Zellen transduzieren und sich somit in allen Zellen verteilen kann. Da die ektopische Expression der Peptid-Aptamere von den verwendeten Vektoren abhängig sein kann, wurden zusätzlich zum eukaryotischen Expressionsvektor pRC/CMV-VP22-TRX die pShooter-Vektoren (pCMV/myc© vectors) benutzt, die häufig zur gezielten intrazellulären Lokalisation rekombinanter Proteine und Antikörper verwendet werden. Zur nukleären Lokalisation der Peptid-Aptamere wurde der Vektor pCMV/myc/nuc, der das NLS von „SV40 Large T antigen“ enthält, verwendet (s. Abb. 3.19A). Zur zytoplasmatischen Lokalisation der Peptid-Aptamere wurde der Vektor pCMV/myc/cyto benutzt (s. Abb. 3.19B). Zur site-spezifischen Fluoreszenz-Markierung und Detektion der Peptid-Aptamere in lebenden Säugetierzellen wurden die Peptid-Aptamere in den Lumio™-Tag-Vektor pcDNA™6.2/cLumio™-DEST (s. Abb. 3.20A) bzw. pcDNA™6.2/nLumio™-DEST kloniert (s. Abb. 3.20B).

Eine stabile Expression der Peptid-Aptamere in humanen Zellen vermittelt eine persistente Inhibition der ID-Proteine und erlaubt eine Analyse der phänotypischen Veränderungen der Zielzellen, die sich über eine lange Periode entwickeln können. Die Selektion von stabil exprimierenden Einzelklonen ist gegenüber der transienten Transfektion von Vorteil, da auf diese Weise alle Zellen innerhalb eines Versuchsansatzes gleiche Mengen des Peptid-Aptamers exprimieren. Damit kann ausgeschlossen werden, dass das Ergebnis der inhibitorischen Wirkung der Peptid-Aptamere durch schwach oder nicht exprimierende Zellen verfälscht wird. Hierbei werden, wie oben beschrieben, Untersuchungen der Zellproliferation, des Zellzyklus, der abnormalen Zentrosomenduplikation, Expressionsanalyse von Zellzyklus-

Regulatoren und der zellulären Kolo-kalisation der Peptid-Aptamere und ID-Proteine durchgeführt.

4.4 siRNA-induzierte Verminderung der *ID1*-Genexpression

Die Anwendung von siRNAs ist die neue Methode der RNA-Interferenz (RNAi), mit der Gene spezifisch ausgeschaltet werden können. Sie ist die Hoffnung auf dem Gebiet der therapeutischen Anwendung der Antisense-Strategien.

Die Spezifität eines Antisense-Oligonukleotids ist unmittelbar durch seine Sequenz gegeben. Statistisch betrachtet ist eine Sequenz von 15-17 Nukleotiden ausreichend, um eine Stelle im menschlichen Genom eindeutig zu definieren. Eine Datenbank-Recherche ist in jedem Falle notwendig, um ungewollte Homologien mit anderen Genen auszuschließen.

Zahlreiche *ID1*-spezifische siRNAs wurden mit Hilfe verschiedener Programme zur Herstellung von siRNAs ausgesucht und miteinander verglichen. Zum Ausschluss ungewollter Homologien wurden diese siRNAs mittels Datenbank-Recherche analysiert. Zur transienten Hemmung der *ID1*-Expression wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen gegen die *ID1*-mRNA gerichteten siRNAs transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 60 h wurde die *ID1*-siRNA 1-vermittelte Verminderung der *ID1*-Expression durch Western-Blot-Analyse bestätigt (s. Abb. 3.21).

Obwohl siRNAs eine starke und spezifische Suppression der Genexpression vermitteln können, ist ihre Reduktion der Genexpression transient, was ihre Anwendung zur Analyse der phänotypischen Veränderungen der Zielzellen, die sich über eine lange Periode entwickeln können, stark limitiert. Um diese Limitierung der exogenen Zugabe von siRNAs zu umgehen, wurden siRNAs innerhalb der Zelle vom Vektor pSUPER.retro.puro exprimiert.

Zur Herstellung von shRNAs wurden die Oligonukleotide *ID1*-shRNA 1-4 und *ID1*-shRNA A-C synthetisiert und in den Vektor pSUPER.retro. zwischen die Schnittstellen *Bgl*II und *Hind*III kloniert, um die siRNAs vom Polymerase III-Promotor H1 aus zu transkribieren (s. Abb. 3.22). HeLa-Zellen wurden mit verschiedenen Konstrukten pSUPER.retro.-*ID1*-shRNA transfiziert. Nach der Isolierung von stabilen Klonen unter Verwendung von Puromycin und einer Kultivierung von 2,5 Wochen wurde die Expression von *ID1* durch Western-Blot-Analyse überprüft. Die Expression von *ID1* wurde durch die *ID1*-shRNA C signifikant vermindert (s. Abb. 3.23).

Die Selektion von stabil exprimierenden Einzelklonen ist gegenüber der transienten Transfektion von Vorteil, da auf diese Weise die Verminderung der ID1-Expression bei allen Zellen innerhalb eines Versuchsansatzes gleich stark ist. Damit wird ausgeschlossen, dass das Ergebnis durch Zellen, bei denen die Verminderung der ID1-Expression schwach oder nicht vorhanden ist, verfälscht und somit die inhibitorische Wirkung der shRNA überdeckt wird.

Die ID1-siRNA 1- und die ID1-shRNA C-vermittelte Verminderung der ID1-Expression und die damit verbundene spezifische Absenkung der ID1-Konzentration in Tumorzellen wird zur Reversion ID1-transformierter Phänotypen eine Anwendung finden. Hierbei werden, wie oben beschrieben, Untersuchungen der Zellproliferation, des Zellzyklus, der abnormalen Zentrosomenduplikation und Expressionsanalysen verschiedener Zellzyklus-Regulatoren durchgeführt. Diese neu isolierten si/shRNAs, mit denen Genfunktionen von ID1 analysiert werden können, können auf dem Gebiet der therapeutischen Anwendung der Antisense-Strategien eine Bedeutung erlangen.

4.5 Ektopische Expression von S5A und Untersuchung der endogenen ID1-Expression

Das Protein S5A/Rpn10, das als Bindungspartner von ID1 durch Yeast-Two-Hybrid-Screening identifiziert wurde, ist eine Untereinheit des 26S-Proteasoms, das selektiv multiubiquitinierte Proteine bindet und als Transportprotein zum Proteasom dient. S5A interagiert stark mit ID1, weniger stark mit den bHLH-Proteinen der Klasse A (E12) und der Klasse B (MyoD). Außer mit ID1 interagiert S5A mit keinem der anderen Mitglieder der HLH-Proteine der Klasse D (ID2-4). S5A kann die DNA-Bindung von MyoD-ID1 und E12-ID1-Heterodimeren wiederherstellen, die DNA-Bindung von MyoD- und E12-Homodimeren verbessern und die ID1-vermittelte Repression des Muskelkreatinkinase-Promotors während myogenetischer Differenzierung revertieren.¹²⁷

Mutagenese-Experimente zeigen, dass die Aminosäuren, die die Helix-Loop-Helix-Domäne von ID1 flankieren, und die drei Aminosäuren, die innerhalb der ersten Helix von ID1 liegen, für die Interaktion zwischen ID1 und S5A verantwortlich sind und der N-Terminus von S5A (etwa die Hälfte von S5A) für diese Interaktion ausreicht.¹²⁷ Experimentielle Daten zeigen, dass die Interaktion zwischen HLH-Proteinen und S5A keine Ubiquitinierung der HLH-Proteine benötigt und S5A nur einen minimalen und unspezifischen Effekt auf die Degradierungsrate von ID1 ausübt.¹²⁷

Die Verminderung der S5A-Expression in *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* mittels RNAi resultiert in letalen Phänotypen und abnormalen Mitosen.¹²⁸⁻¹²⁹ Darüber hinaus induziert ID1 Zentrosomenabnormalitäten durch Interferenz mit S5A (Hasskarl J. et al., unveröffentlichte Daten).

Um den Mechanismus aufzuklären, wie ID1 die Deregulation des Zentrosomenhaushalts verursacht, wurde untersucht, ob die Überexpression von S5A zur Veränderung der endogenen ID1-Expression führt. Dazu wurden U2OS-Zellen mit 0,5, 1 und 2 µg pcDNA3-S5A-HA-Konstrukt transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde die endogene ID1-Expression und die Expression von S5A durch Western-Blot-Analyse mittels anti-ID1-Antikörper bzw. anti-S5A-Antikörper überprüft. Die Überexpression von S5A führte zu keiner Veränderung der endogenen ID1-Expression (s. Abb. 3.24).

Da S5A für seine Interaktion mit ID1 keine Ubiquitinierung von ID1 benötigt, nur einen minimalen und unspezifischen Effekt auf die Degradierungsrate von ID1 ausübt¹²⁷ und keinen Einfluss auf die Expression von ID1 hat, ist davon auszugehen, dass S5A nur durch seine direkte funktionale Interaktion mit ID1 an der ID1-induzierten Deregulation des Zentrosomenhaushalts beteiligt ist.

4.6 Interaktionsanalyse zwischen den Peptid-Aptameren und S5A in humanen Zellen

Da S5A an der ID1-induzierten Deregulation des Zentrosomenhaushalts durch seine direkte funktionale Interaktion mit ID1 beteiligt ist, könnten die isolierten Peptid-Aptamere zur gezielten Störung der Interaktion zwischen ID1 und S5A verwendet werden, um ID1-induzierte Zentrosomenabnormalitäten zu revertieren.

Um zu prüfen, ob die isolierten Peptid-Aptamere mit S5A interagieren und daher mit den Funktionen von S5A interferieren und dort unerwünschte Effekte bewirken können, wurde das CheckMate Mammalian-Two-Hybrid-System angewendet. Die Untersuchung der Interaktionen der Peptid-Aptamere 5, 7, 10, 13 und 17 mit S5A resultierten im Vergleich zur Luciferase-Aktivität der negativen Kontrolle in keinen hohen Luciferase-Aktivitäten. Somit interagieren die isolierten Peptid-Aptamere nicht mit S5A (s. Tab. 3.21 und Abb. 3.26).

Da S5A außer mit ID1 nicht mit ID2, ID3 oder ID4 interagiert¹²⁷ und nur die ektopische Expression von ID1, nicht aber von ID2, ID3 oder ID4, eine abnormale Zentrosomenduplikation induziert⁷⁶, könnten die Peptid-Aptamere 5 und 17, die spezifisch nur mit ID1 interagieren, potenziell eine höhere inhibitorische Wirkung auf die ID1-induzierte

Deregulation des Zentrosomenhaushalts haben als das Peptid-Aptamer 7, das sowohl mit ID1 als auch mit ID3 interagiert, und das Peptid-Aptamer 13, das mit allen ID-Proteinen (ID1-4) interagiert.

4.7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde am Modell von ID1 gezeigt, dass es mit dem Peptid-Aptamer-Library-Screening-System möglich ist, Peptide mit potenziell inhibitorischer Wirkung gegen ID-Proteine zu isolieren. Bisher wurden die Funktionen von ID-Proteinen durch Interferenz auf DNA-Ebene (Knockout-Modelle) oder auf RNA-Ebene (Antisense-Strategien) manipuliert. Nunmehr stellen die isolierten Peptid-Aptamere eine weitere Ebene der gezielten Interferenz mit ID-Proteinen dar. Die Peptid-Aptamere, vor allem in Kombination mit einer SOCS-Box-Domäne, ermöglichen die gezielte Inhibition und/oder Degradation auf Proteinebene. Die isolierten Peptid-Aptamere sind Werkzeuge, mit denen die Funktionen der ID-Proteine weiter untersucht werden können. Sie können vor allem wegen der hohen Spezifität und der niedrigen molekularen Masse Anwendungen bei der „Targeted therapy“ finden. Hier steht die Entwicklung von Peptiden oder Peptid-Mimetika im Vordergrund: Sie könnten als Wirksubstanzen zur Behandlung von Tumoren, bei denen die ID-Proteine überexprimiert sind, eingesetzt werden.

Eines der wichtigsten Probleme ist die Bioverfügbarkeit der zu verabreichenden Peptid-Aptamere, da vor allem die zu erreichende Konzentration und die Halbwertszeit der Peptid-Aptamere für den therapeutischen Wert eine entscheidende Rolle spielen.¹⁵¹

Zur Verbesserung ihrer Stabilität wurden in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht. Peptide können durch chemische Modifikationen ihrer Seitenketten oder durch Komplexierung mit einer weiteren Trägersubstanz resistenter gegen ihre Degradation gemacht werden.¹⁵²⁻¹⁵³ Neuere Studien weisen einer Proteintransduktionsdomäne des Proteins HSV VP22 mit neun D-Argininresten bessere Eigenschaften zu als einer mit neun L-Argininresten. Diese Domäne hat gleichzeitig den Vorteil, dass sie die Degradation des rekombinanten Proteins reduziert, da die zelluläre Degradationsmaschinerie nur natürliche L-Aminosäuren abbauen kann.¹⁵⁴ Allerdings kann ein solches Fusionsprotein nicht exprimiert werden, sondern muss synthetisch hergestellt werden. Eine andere Möglichkeit ist der Einsatz des amphipatischen Peptidcarriers Pep-1. Dieses Peptid besteht aus einer Protein-Transduktionsdomäne und einer hydrophoben Sequenz, die die Interaktion mit dem

Zielprotein ermöglicht.¹⁵⁵ Dieses Peptid kann synthetisch hergestellt werden und mit einem beliebigen Protein, wie z.B. einem Peptid-Aptamer,₁ gemischt werden, so dass beide interagieren und ein transduktionsfähiges Protein bilden.

Eine weitere Strategie zur Verbesserung der Stabilität der Peptide basiert darauf, dass sie in Liposomen verpackt und vor dem Abbau geschützt werden. Dabei könnten diese Liposomen über hydrophile Polymere mit Antikörpern ausgestattet werden, die eine spezifische Bindung der peptidbeladenen Liposomen an einen bestimmten Zelltyp ermöglichen.¹⁵⁶⁻¹⁵⁷ Außerdem werden Liposomen als „delivery system“ für DNA-Vektoren in der Gentherapie angewendet. So kann eine Peptid-Aptamer-codierende Sequenz in einen geeigneten Gentherapie-Vektor kloniert und liposomal verpackt in die Zelle eingeführt werden. Damit ist es möglich, eine intrazelluläre Expression des Peptid-Aptamers und eine zielgerichtete Inhibition des Zielproteins zu erreichen. Allerdings ist die Etablierung eines sicheren und effizienten „gene delivery system“ noch eines der wichtigsten Probleme der Gentherapie.

Aus einem biologisch wirksamen und interessanten Peptid-Aptamer kann ein entsprechendes Peptidmimetikum abgeleitet werden. Zum einen kann es sich dabei um peptidische Strukturmimetika handeln, bei denen die biochemischen und biophysikalischen Nachteile der natürlichen Peptid-Aptamere durch chemische Modifikationen überwunden werden. Zum anderen kann es sich um nicht-peptidische Mimetika handeln, die die dreidimensionale Struktur des nativen Peptides nachahmen und so beispielsweise wichtige katalytische Domänen des Zielproteins inhibieren.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰ In diesem Fall können die Peptidsequenzen als Leitstrukturen zur Etablierung ganzer niedermolekularer Bibliotheken dienen. Diese niedermolekularen chemischen Substanzen haben zusätzliche Vorteile aufgrund ihrer höheren Stabilität und ihrer Bioverfügbarkeit.^{158, 161-162}

Das Ziel ist die Entwicklung derartiger Peptid-Mimetika mit der Hoffnung, diese auf dem Gebiet der „Targeted therapy“ anzuwenden. Es gibt bereits eine ganze Anzahl von gut charakterisierten, oral verfügbaren Peptid-Mimetika, die allerdings zu anderen Zwecken als der Krebstherapie eingesetzt werden. Hierzu zählen vor allem die Gruppe der β -Lactam-Antibiotika (z.B. Ampicillin, Cefadroxil) und die Gruppe der ACE-Inhibitoren („angiotensin-converting enzyme“), wobei letztere zur Behandlung von Bluthochdruck eingesetzt werden.¹⁶³⁻¹⁶⁵

5 Zusammenfassung

Verschiedene Funktionen der ID-Proteine wurden bisher beschrieben: Inhibition der DNA-Bindung und Differenzierung durch die Interferenz mit bHLH-Transkriptionsfaktoren, Interferenz mit anderen Transkriptionsfaktoren, die nicht zur bHLH-Familie gehören, Apoptoseinduktion, Kooperation mit dem Retinoblastoma-Tumorsuppressorprotein (pRb) und die Verlängerung der Lebensspanne primärer Zellen. Von großer Signifikanz ist vor allem, dass hohe Expressionslevel der ID-Proteine, vor allem von ID1, in einer Vielzahl von epithelialen humanen Tumoren beschrieben worden sind und in einigen dieser Fälle die hohe Expression von ID1 mit einer ungünstigen klinischen Prognose einhergeht. Angesichts ihrer breiten biologischen Wirkung und ihrer pro-onkogenen Eigenschaften gelten die ID-Proteine als mögliche therapeutische Ziele in der Tumorthherapie.

Für eine gezielte Interferenz mit ID-Proteinen wurde in der vorliegenden Arbeit das Peptid-Aptamer-System eingesetzt. Peptid-Aptamere sind Peptid-Agenzien, die auf Grund ihrer spezifischen Bindung an ein bestimmtes Zielprotein unter intrazellulären Bedingungen selektiert werden. Zur Isolierung von ID1-spezifischen Peptid-Aptameren wurden zwei Peptid-Aptamer-Expressionsbanken verwendet. Dabei handelt es sich um eine lineare Peptid-Aptamer-Expressionsbank, in der die Peptid-Aptamere nicht an einem Gerüstprotein verankert sind und daher flexible Konformationen annehmen, und um eine konstringierte Peptid-Aptamer-Expressionsbank, in der die Peptid-Aptamere mit ihren beiden Enden an dem Gerüstprotein Thioredoxin A (TrxA) von *E. coli* verankert sind und durch das Gerüstprotein TrxA nach außen präsentiert werden.

In zwei Yeast-Two-Hybrid-Screenings mit ID1 als Bait wurden vier Peptid-Aptamere aus der linearen Peptid-Aptamer-Expressionsbank und 26 Peptid-Aptamere aus der konstringierten Peptid-Aptamer-Expressionsbank isoliert. Zusätzlich wurden die isolierten Peptid-Aptamere auf ihre Interaktion mit ID2 und ID3 mittels der Yeast-Two-Hybrid-Experimente überprüft. In diesen Experimenten konnte die Interaktion von sechs Peptid-Aptameren mit ID3 und einem Peptid-Aptamer mit ID2 und ID3 nachgewiesen werden. Um einerseits die Interaktionen der isolierten Peptid-Aptamere mit ID-Proteinen in humanen Zellen zu bestätigen und andererseits die Bindungsspezifität und Bindungsintensität zu bestimmen, wurde das CheckMate™ Mammalian-Two-Hybrid-System angewendet. In diesen Experimenten konnte die spezifische Interaktion von zwei Peptid-Aptameren mit ID1, einem Peptid-Aptamer mit ID3, einem Peptid-Aptamer sowohl mit ID1 als auch mit ID3 und einem Peptid-Aptamer mit allen IDs (ID1-4) nachgewiesen werden.

Um höhere Konzentrationen der Peptid-Aptamere zu erreichen und die Peptid-Aptamere spezifisch zu einem bestimmten Zeitpunkt in die Zielzellen einzubringen, wurde die neuartige Methode der Proteintransduktion verwendet. Hierbei wurde eine Proteintransduktionsdomäne aus neun Argininresten C-terminal mit den Peptid-Aptameren fusioniert. Zur Ableitung von Zelllinien, die die isolierten Peptid-Aptamere stabil exprimieren, wurden die Peptid-Aptamere in den VP22-PTD enthaltenden Expressionsvektor pRC/CMV-VP22-TRX, in die pShooter-Vektoren (pCMV/myc© vectors), die häufig zur gezielten intrazellulären Lokalisation rekombinanter Proteine und Antikörper verwendet werden, und zur Fluoreszenz-Markierung und Detektion der Peptid-Aptamere in lebenden Säugetierzellen in die Lumio™-Tag-Expressionsvektoren kloniert.

In der vorliegenden Arbeit wurde am Modell von ID1 gezeigt, dass es mit dem Peptid-Aptamer-Library-Screening-System möglich ist, Peptide mit potenziell inhibitorischer Wirkung gegen ID-Proteine zu isolieren. Bisher wurden die Funktionen von ID-Proteinen durch Interferenz auf DNA-Ebene (Knockout-Modelle) oder auf RNA-Ebene (Antisense-Strategien) manipuliert. Nunmehr stellen die neuen isolierten Peptid-Aptamere eine weitere Ebene der gezielten Interferenz mit ID-Proteinen dar. Die Peptid-Aptamere ermöglichen die gezielte Inhibition oder SOCS-Box-vermittelte Degradation auf Proteinebene. Die isolierten Peptid-Aptamere sind Werkzeuge, mit denen die Funktionen der ID-Proteine weiter untersucht werden können. Sie können wegen der hohen Spezifität und der niedrigen molekularen Masse Anwendung bei der „Targeted therapy“ finden. Hier steht die Entwicklung von peptidischen oder nicht-peptidischen Mimetika im Vordergrund: Sie könnten als Wirksubstanzen zur Behandlung von Tumoren, bei denen die ID-Proteine überexprimiert sind, eingesetzt werden.

Außerdem wurde die siRNA-Technik im Rahmen dieser Arbeit für eine gezielte Suppression der ID1-Genexpression eingesetzt. Zur transienten Hemmung der ID1-Expression wurden zahlreiche ID1-spezifische siRNAs entwickelt, und die Verminderung der ID1-Expression in HeLa-Zellen wurde durch Western-Blot-Analyse bestätigt. Zur intrazellulären Synthese von siRNAs wurden zahlreiche ID1-spezifische shRNAs entwickelt und in den Vektor pSUPER.retro kloniert, um die siRNAs vom Polymerase-III-Promotor H1 aus zu transkribieren. HeLa-Zellen wurden mit den Konstrukten transfiziert. Nach der Isolierung von stabilen Klonen wurde die signifikante Verminderung der ID1-Expression durch Western-Blot-Analyse bestätigt. Diese neuen isolierten si/shRNAs, mit denen Genfunktionen von ID1 analysiert werden können, sind für eine therapeutische Anwendung der Antisense-Strategie von Bedeutung.

6 Summary

ID proteins exert various functions: Inhibition of DNA binding and differentiation through interference with bHLH transcription factors, interference with non-bHLH proteins, induction of apoptosis, cooperation with the retinoblastoma tumour suppressor protein (pRB) and delay of replicative senescence. Diverse human tumour types have been analyzed for ID mRNA and protein levels and elevated levels of ID expressions, specially of ID1, have been reported in various carcinomas. In some cases, high levels of ID1 are associated with disease severity and poor prognosis.

The low postnatal expression of the IDs and their roles in tumorigenesis and tumour neoangiogenesis mark them as attractive targets for anti-cancer therapy.

In the present study a peptide aptamer system was used to identify peptide aptamers interacting selectively with ID1. Peptide aptamers are proteinaceous agents that are selected for specific binding to a given target protein, under intracellular conditions. For this purpose, two different peptide aptamer expression libraries were used: a linear peptide aptamer expression library, where peptide aptamers are not anchored in a scaffold protein and are flexible with free ends, and a constrained peptide aptamer expression library, where peptide aptamers are anchored with both ends in the scaffold protein thioredoxin A (TrxA) of the *E. coli* and displayed from the scaffold protein in a constrained conformation.

The yeast two-hybrid selection system was used to isolate peptide aptamers interacting with ID1. Four peptide aptamers of the linear peptide aptamer expression library and 26 peptide aptamers of the constrained peptide aptamer expression library were isolated. Using the yeast two-hybrid selection system, the interaction of the isolated peptide aptamers with ID2 and ID3 was analyzed and the interaction of six peptide aptamers with ID3 and one peptide aptamer with ID2 and ID3 was verified. The CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System was applied to confirm on one hand the interactions of the isolated peptide aptamers with ID proteins and on the other hand to determine their binding specificity and interaction strength in human cells. The Mammalian Two-Hybrid experiments showed interactions of two peptide aptamers with ID1, one peptide aptamer with ID3, one peptide aptamer with ID1 as well as with ID3 and one peptide aptamer with all the IDs (ID1-4).

In order to gain high concentrations of peptide aptamers and introduce them at specific time points into target cells, the new method of protein transduction was applied. Hereby a protein transduction domain (VP22-PTD) consisting of nine arginin residues was cloned as C-terminal fusions with the peptide aptamers. For the creation of stable cell lines expressing peptide aptamers, the peptide aptamers were cloned into the pRC/CMV-VP22 vector containing VP22-PTD, into pShooter vectors designed to target recombinant protein and antibodies to specific intracellular locations and into Lumino-Tag expression vectors for fluorescence labeling and detection of peptide aptamers in living mammalian cells.

The present study using ID1 demonstrates that the peptide aptamer library screening system can be used to isolate peptide aptamers, which have the potential to selectively block the intracellular functions of ID proteins.

So far the functions of ID proteins were manipulated through interference at DNA level (knockout models) or at RNA level (antisense strategies). Now the new isolated peptide aptamers allow specific interference with ID proteins at additional level. They could be used for specific inhibition and/or degradation of the IDs at the protein level. They could be new powerful tools for the functional analysis of ID proteins. The peptide aptamers, specially due to their specificity and low molecular mass, could be used for targeted therapy. Here the major goals are the development of peptide mimetics and nonpeptide mimetics, which could be used for the treatment of tumours with deregulated functions of ID proteins.

Additionally, the siRNA technology was applied for the targeted suppression of *ID1* gene expression in human cells. Several *ID1* specific synthetic siRNAs were designed for the transient depletion and the depletion of *ID1* gene expression in HeLa cells was confirmed by western blot analysis. Several *ID1* specific shRNAs were designed for the intracellular synthesis of siRNAs. The shRNAs were cloned into the vector pSuper.retro to transcribe the siRNAs using the polymerase-III H1 promoter. HeLa cells were transfected with shRNA constructs for the creation of stable cell lines expressing *ID1* specific siRNAs and a significant depletion of *ID1* gene expression was confirmed by western blot analysis. These new isolated *ID1* specific si/shRNAs can be used for the functional analysis of ID1 and they could have therapeutic potential in antisense based targeted therapy, where the functions of ID1 are deregulated.

7 Literaturverzeichnis

1. Murre, C., McCaw, P. S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Cabrera, C. V., Buskin, J. N., Hauschka, S. D., Lassar, A. B., Weintraub, H., and Baltimore, D. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* **58**, 537-544 (1989).
2. Benezra, R., et al. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* **61**, 49-59 (1990).
3. Ruzinova, M. B. and Benezra, R. Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends Cell Biol.* **13**, 410-418 (2003).
4. Norton, J. D. ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J. Cell Sci.* **113**, 3897-3905 (2000).
5. Yokota, Y. and Mori, S. Role of Id family proteins in growth control. *J. Cell Physiol.* **190**, 21-28 (2002).
6. Yan, W. *et al.* High incidence of T-cell tumors in *E2A*-null mice and *E2A/Id1* double-knockout mice. *Mol. Cell Biol.* **17**, 7317-7327 (1997).
7. Landschulz, W. H., Johnson, P. F., and McKnight, S. L. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**, 1759-1764 (1988).
8. Dang, C. V., McGuire, M., Buckmire, M., and Lee, W. M. F. Frequent activation of *N-myc* genes by hepadnavirus insertion in woodchuck liver tumours. *Nature* **337**, 664-666 (1990).
9. Blackwood, E. M., and Eisenman, R. N. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* **251**, 1211-1217 (1991).
10. Prendergast, G. C., Lawe, D., and Ziff, E. B. Association of Myn, the murine homolog of Max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. *Cell* **65**, 395-407 (1991).
11. Ayer, D. E., Kretzner, L., and Eisenman, R. N. Mad: A heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* **72**, 211-222 (1993).
12. Zervos, A., Gyuris, J., and Brent, R. Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell* **72**, 223-232 (1993).
13. Hurlin, P. J., Queva, C., Koskinen, P. J., Steingrimsson, E., Ayer, D. E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Eisenman, R. N. Mad3 and Mad4: novel Max-interacting transcriptional repressors that suppress c-myc dependent transformation and are expressed during neural and epidermal differentiation. *EMBO J.* **14**, 5646-59 (1995).
14. Beckman, H., Su, L., and Kadesch, T. TFE3: a helix-loop-helix protein that activates transcription through the immunoglobulin enhancer muE3 motif. *Genes Dev.* **4**, 167-179 (1990).
15. Gregor, P. D., Sawadogo, M., and Roeder, R. G. The adenovirus major late transcription factor USF is a member of the helix-loop-helix group of regulatory proteins and binds to DNA as a dimer. *Genes Dev.* **4**, 1730-1740 (1990).

16. Fisher, D. E., Carr, C. S., Parent, L. A., and Sharp, P. A. TFEB has DNA-binding and oligomerization properties of a unique helix- loop-helix/leucine-zipper family. *Genes Dev.* **5**, 2342-2352 (1991).
17. Benezra, R., Davis, R. L., Lockshon, D., Turner, D. L., and Weintraub, H. The protein Id: A negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* **61**, 49-59 (1990).
18. Kadesch, T. The V(D)J recombinational and transcriptional activities of the immunoglobulin heavy-chain intronic enhancer can be mediated through distinct protein-binding sites in a transgenic substrate. *Immunol. Today* **13**, 31-36 (1992).
19. Sun, X. H., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Baltimore, D. Id proteins in cell cycle control and cellular senescence. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5603-5611 (1991).
20. Perk, J., Iavarone, A., and Benezra, R. ID Family of Helix-Loop-Helix Proteins in Cancer. *Nature Reviews Cancer* | AOP, published online 20 July 2005; oi:10.1038/nrc1673
21. Ohtani, N. *et al.* Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* **409**, 1067-1070 (2001).
22. Lasorella, A., Nosedà, M., Beyna, M., Yokota, Y. and Iavarone, A. Id2 is a Retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. *Nature* **407**, 592-598 (2000).
23. Casula, M. *et al.* Mutation analysis of candidate genes in melanoma-prone families: evidence of different pathogenetic mechanisms at chromosome 9P21. *Melanoma Res.* **13**, 571-579 (2003).
24. Arnold, J. M., Mok, S. C., Purdie, D. and Chenevix-Trench, G. Decreased expression of the Id3 gene at 1p36. 1 in ovarian adenocarcinomas. *Br. J. Cancer* **84**, 352-359 (2001).
25. Bellido, M. *et al.* Id4 is deregulated by a t(6;14)(p22;q32) chromosomal translocation in a B-cell lineage acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **88**, 994-1001 (2003).
26. Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I. and Smith, A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* **115**, 281-292 (2003).
27. Hollnagel, A., Oehlmann, V., Heymer, J., Ruther, U. and Nordheim, A. Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 19838-19845 (1999).
28. Samanta, J. and Kessler, J. A. Interactions between ID and OLIG proteins mediate the inhibitory effects of BMP4 on oligodendroglial differentiation. *Development* **131**, 4131-4142 (2004).
29. Nakashima, K. *et al.* BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 5868-5873 (2001).
30. Katagiri, T. *et al.* Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J. Cell Biol.* **127**, 1755-1766 (1994).

31. Lopez-Rovira, T., Chalaux, E., Massague, J., Rosa, J. L. and Ventura, F. Direct binding of Smad1 and Smad4 to two distinct motifs mediates bone morphogenetic proteinspecific transcriptional activation of *Id1* gene. *J. Biol. Chem.* **277**, 3176-3185 (2002).
32. Ogata, T., Wozney, J. M., Benezra, R. and Noda, M. Bone morphogenetic protein 2 transiently enhances expression of a gene, *Id* (inhibitor of differentiation), encoding a helix-loop-helix molecule in osteoblast-like cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 9219-9222 (1993).
33. Kowanetz, M., Valcourt, U., Bergstrom, R., Heldin, C. H. and Moustakas, A. *Id2* and *Id3* define the potency of cell proliferation and differentiation responses to transforming growth factor β and bone morphogenetic protein. *Mol. Cell Biol.* **24**, 4241-4254 (2004).
34. Goumans, M. J. *et al.* Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- β type I receptors. *EMBO J.* **21**, 1743-1753 (2002).
35. Kee, B. L., Rivera, R. R. and Murre, C. *Id3* inhibits B lymphocyte progenitor growth and survival in response to TGF- β . *Nature Immunol.* **2**, 242-247 (2001).
36. Lyden, D. *et al.* Impaired recruitment of bone-marrow derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nature Med.* **7**, 1194-1201 (2001).
37. Bain, G. *et al.* Regulation of the helix-loop-helix proteins, *E2A* and *Id3*, by the Ras-ERK MAPK cascade. *Nature Immunol.* **2**, 165-171 (2001).
38. Bettini, M., Xi, H., Milbrandt, J. and Kersh, G. J. Thymocyte development in early growth response gene 1-deficient mice. *J. Immunol.* **169**, 1713-1720 (2002).
39. Scobey, M. J., Fix, C. A. and Walker, W. H. The *Id2* transcriptional repressor is induced by follicle-stimulating hormone and cAMP. *J. Biol. Chem.* **279**, 16064-16070 (2004).
40. Rockman, S. P. *et al.* *Id2* is a target of the β -catenin/T cell factor pathway in colon carcinoma. *J. Biol. Chem.* **276**, 45113-45119 (2001).
41. Belletti, B. *et al.* Regulation of *Id1* protein expression in mouse embryo fibroblasts by the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Exp. Cell Res.* **277**, 107-118 (2002).
42. Belletti, B. *et al.* Regulation of *Id2* gene expression by the insulin-like growth factor I receptor requires signaling by phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 13867-13874 (2001).
43. Han, S. *et al.* Expression and significances of *Id1* helix-loop- helix protein overexpression in gastric cancer. *Cancer Lett.* **216**, 63-71 (2004).
44. Wang, Q. *et al.* Overexpression of *Id-1* in gastric adenocarcinoma: implication for a novel diagnostic marker. *Anticancer Res.* **24**, 881-886 (2004).
45. Ishiguro, A. *et al.* Expression of *Id2* and *Id3* mRNA in human lymphocytes. *Leuk. Res.* **19**, 989-996 (1995).

46. Tournay, O. and Benezra, R. Transcription of the dominant negative helix-loop-helix protein Id1 is regulated by a protein complex containing the immediate-early response gene Egr-1. *Mol. Cell Biol.* **16**, 2418-2430 (1996).
47. Swarbrick, A. *et al.* Regulation of cyclin expression and cell cycle progression in breast epithelial cells by the helix-loop-helix protein Id1. *Oncogene* **24**, 381-389 (2005).
48. Light, W., Vernon, A. E., Lasorella, A., Iavarone, A. and Labonne, C. Xenopus Id3 is required downstream of Myc for the formation of multipotent neural crest progenitor cells. *Development* **132**, 1831-1841 (2005).
49. Nishimori, H. *et al.* The Id2 gene is a novel target of transcriptional activation by EWS-ETS fusion proteins in Ewing family tumors. *Oncogene* **21**, 8302-8309 (2002).
50. Fukuma, M., Okita, H., Hata, J. and Umezawa, A. Upregulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is mediated by the chimeric EWS/Ets protein in Ewing sarcoma. *Oncogene* **22**, 1-9 (2003).
51. Zhang, J., Kalkum, M., Yamamura, S., Chait, B. T. and Roeder, R. G. E protein silencing by the leukemogenic AML1-ETO fusion protein. *Science* **305**, 1286-1289 (2004).
52. Mulloy, J. C. *et al.* AML1-ETO fusion protein up-regulates TRKA mRNA expression in human CD34+ cells, allowing nerve growth factor-induced expansion. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 4016-4021 (2005).
53. Aplan, P. D. *et al.* An *scl* gene product lacking the transactivation domain induces bony abnormalities and cooperates with LMO1 to generate T-cell malignancies in transgenic mice. *EMBO J.* **16**, 2408-2419 (1997).
54. Chervinsky, D. S. *et al.* Disordered T-cell development and T-cell malignancies in SCL LMO1 double-transgenic mice: parallels with E2A-deficient mice. *Mol. Cell Biol.* **19**, 5025-5035 (1999).
55. O'Neil, J., Billa, M., Oikemus, S. and Kelliher, M. The DNA binding activity of TAL-1 is not required to induce leukemia/lymphoma in mice. *Oncogene* **20**, 3897-3905 (2001).
56. Jen, Y., Weintraub, H. and Benezra, R. Overexpression of Id protein inhibits the muscle differentiation program: *in vivo* association of Id with E2A proteins. *Genes Dev.* **6**, 1466-1479 (1992).
57. Kreider, B. L., Benezra, R., Rovera, G. and Kadesch, T. Inhibition of myeloid differentiation by the helix-loop-helix protein Id. *Science* **255**, 1700-1702 (1992).
58. Shoji, W., Yamamoto, T. and Obinata, M. The helix-loop-helix protein Id inhibits differentiation of murine erythroleukemia cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 5078-5084 (1994).
59. Cai, L., Morrow, E. M. and Cepko, C. L. Misexpression of basic helix-loop-helix genes in the murine cerebral cortex affects cell fate choices and neuronal survival. *Development* **127**, 3021-3030 (2000).
60. Martinsen, B. J. and Bronner-Fraser, M. Neural crest specification regulated by the helix-loop-helix repressor Id2. *Science* **281**, 988-991 (1998).

61. Sun, X. H. Constitutive expression of the Id1 gene impairs mouse B cell development. *Cell* **79**, 893-900 (1994).
62. Hara, E. *et al.* Id-related genes encoding helix-loop-helix proteins are required for G1 progression and are repressed in senescent human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **269**, 2139-2145 (1994).
63. Barone, M. V., Pepperkok, R., Peverali, F. A. and Philipson, L. Id proteins control growth induction in mammalian cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 4985-4988 (1994).
64. Norton, J. D. and Atherton, G. T. Coupling of cell growth control and apoptosis functions of Id proteins. *Mol. Cell Biol.* **18**, 2371-2381 (1998).
65. Alani, R. M. *et al.* immortalization of primary human keratinocytes by the helix-loop-helix protein, Id-1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 9637-9641 (1999).
66. Nickoloff, B. J. *et al.* Id-1 delays senescence but does not immortalize keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **275**, 27501-27504 (2000).
67. Tang, J., Gordon, G. M., Nickoloff, B. J. and Foreman, K. E. The helix-loop-helix protein Id-1 delays onset of replicative senescence in human endothelial cells. *Lab Invest.* **82**, 1073-1079 (2002).
68. Weinberg, R. A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330 (1995).
69. Prabhu, S., Ignatova, A., Park, S. T. and Sun, X. H. Regulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 by E2A and Id proteins. *Mol. Cell Biol.* **17**, 5888-5896 (1997).
70. Everly, D. N., Mainou, B. A. and Raab-Traub, N. Induction of Id1 and Id3 by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus and regulation of p27/Kip and cyclin-dependent kinase 2 in rodent fibroblast transformation. *J. Virol.* **78**, 13470-13478 (2004).
71. Li, H. M. *et al.* Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) upregulates Id1 expression in nasopharyngeal epithelial cells. *Oncogene* **23**, 4488-4494 (2004).
72. Desprez, P. Y., Hara, E., Bissell, M. J. and Campisi, J. Suppression of mammary epithelial cell differentiation by the helix-loop-helix protein Id-1. *Mol. Cell Biol.* **15**, 3398-3404 (1995).
73. Fong, S. *et al.* Id-1 as a molecular target in therapy for breast cancer cell invasion and metastasis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 13543-13548 (2003).
74. Desprez, P. Y. *et al.* A novel pathway for mammary epithelial cell invasion induced by the helix-loop-helix protein Id-1. *Mol. Cell Biol.* **18**, 4577-4588 (1998).
75. Andy, J. M., Gaorav, P. G., Peter, M. S., Paula, D. B., Weiping, S., Dilip D. G., Agnes, V., Adam, B. O., William, L. G. and Joan, M. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* **436**, 518-524 (2005).
76. Hasskarl, J., Duensing, S., Manuel, E. and Munger, K. The helix-loop-helix protein ID1 localizes to centrosomes and rapidly induces abnormal centrosome numbers. *Oncogene* **23**, 1930-1938 (2004).

77. Wice, B. M. and Gordon, J. I. Forced expression of Id-1 in the adult mouse small intestinal epithelium is associated with development of adenomas. *J. Biol. Chem.* **273**, 25310-25319 (1998).
78. Kim, D., Peng, X. C. and Sun, X. H. Massive apoptosis of thymocytes in T-cell-deficient Id1 transgenic mice. *Mol. Cell Biol.* **19**, 8240-8253 (1999).
79. Morrow, M. A., Mayer, E. W., Perez, C. A., Adlam, M. and Siu, G. Overexpression of the Helix-Loop-Helix protein Id2 blocks T cell development at multiple stages. *Mol. Immunol.* **36**, 491-503 (1999).
80. Ruzinova, M. B. *et al.* Effect of angiogenesis inhibition by Id loss and the contribution of bone-marrow-derived endothelial cells in spontaneous murine tumors. *Cancer Cell* **4**, 277-289 (2003).
81. de Candia, P. *et al.* Angiogenesis impairment in Id-deficient mice cooperates with an Hsp90 inhibitor to completely suppress HER2/neu-dependent breast tumors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 12337-12342 (2003).
82. Li, H., Gerald, W. L. and Benezra, R. Utilization of bone marrow-derived endothelial cell precursors in spontaneous prostate tumors varies with tumor grade. *Cancer Res.* **64**, 6137-6143 (2004).
83. Lyden, D. *et al.* Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature* **401**, 670-677 (1999).
84. Fraidenraich, D. *et al.* Rescue of cardiac defects in *Id* knockout embryos by injection of embryonic stem cells. *Science* **306**, 247-252 (2004).
85. Mechtcheriakova, D., Wlachos, A., Holzmüller, H., Binder, B. R. and Hofer, E. Vascular endothelial cell growth factor-induced tissue factor expression in endothelial cells is mediated by EGR-1. *Blood* **93**, 3811-3823 (1999).
86. Mechtcheriakova, D. *et al.* Specificity, diversity, and convergence in VEGF and TNF- α signaling events leading to tissue factor up-regulation via EGR-1 in endothelial cells. *FASEB J.* **15**, 230-242 (2001).
87. Lasorella, A., Rothschild, G., Yokota, Y., Russell, R. G. and Iavarone, A. Id2 mediates tumor initiation, proliferation, and angiogenesis in Rb mutant mice. *Mol. Cell Biol.* **25**, 3563-3574 (2005).
88. Benezra, R. Role of Id proteins in embryonic and tumor angiogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* **11**, 237-241 (2001).
89. Nikolopoulos, S. N., Blaikie, P., Yoshioka, T., Guo, W. and Giancotti, F. G. Integrin $\beta 4$ signaling promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell* **6**, 471-483 (2004).
90. Ceradini, D. J. *et al.* Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature Med.* **10**, 858-864 (2004).
91. Sikder, H. *et al.* Disruption of Id1 reveals major differences in angiogenesis between transplanted and autochthonous tumors. *Cancer Cell* **4**, 291-299 (2003).
92. Mori, S., Nishikawa, S. I. and Yokota, Y. Lactation defect in mice lacking the helix-loop-helix inhibitor Id2. *EMBO J.* **19**, 5772-5781 (2000).

93. Russell, R. G., Lasorella, A., Dettin, L. E. and Iavarone, A. Id2 drives differentiation and suppresses tumor formation in the intestinal epithelium. *Cancer Res.* **64**, 7220-7225 (2004).
94. Yokota, Y. *et al.* Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature* **397**, 702-706 (1999).
95. Hacker, C. *et al.* Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nature Immunol.* **4**, 380-386 (2003).
96. Kusunoki, T. *et al.* TH2 dominance and defective development of a CD8⁺ dendritic cell subset in Id2-deficient mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**, 136-142 (2003).
97. Aoki, Y. *et al.* Id2 haploinsufficiency in mice leads to congenital hydronephrosis resembling that in humans. *Genes Cells* **9**, 1287-1296 (2004).
98. Pan, L., Sato, S., Frederick, J. P., Sun, X. H. and Zhuang, Y. Impaired immune responses and B-cell proliferation in mice lacking the Id3 gene. *Mol. Cell Biol.* **19**, 5969-5980 (1999).
99. Rivera, R. R., Johns, C. P., Quan, J., Johnson, R. S. and Murre, C. Thymocyte selection is regulated by the helix-loop-helix inhibitor protein, Id3. *Immunity* **12**, 17-26 (2000).
100. Yun, K., Mantani, A., Garel, S., Rubenstein, J. and Israel, M. A. Id4 regulates neural progenitor proliferation and differentiation *in vivo*. *Development* **131**, 5441-5448 (2004).
101. Bedford, L. *et al.* Id4 is required for the correct timing of neural differentiation. *Dev. Biol.* **280**, 386-395 (2005).
102. Berg, T. Modulation of protein-protein interactions with small organic molecules. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42**, 2462-2481 (2003).
103. Berg, T. *et al.* Small-molecule antagonists of Myc/Max dimerization inhibit Myc-induced transformation of chicken embryo fibroblasts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 3830-3835 (2002).
104. Emami, K. H. *et al.* A small molecule inhibitor of β -catenin/CREB-binding protein transcription [corrected]. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 12682-12687 (2004).
105. Colas, P., Cohen, B., Jessen, T., Grishina, I., McCoy, J. and Brent, R. Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. *Nature* **380**, 548-550 (1996).
106. Fabrizio, E., Le Cam, L., Polanowska, J., Kaczorek, M., Lamb, N., Brent, R. and Sardet, C. Inhibition of mammalian cell proliferation by genetically selected peptide aptamers that functionally antagonize E2F activity. *Oncogene* **18**, 4357-4363 (1999).
107. Downward, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 11-22 (2003).
108. Schmidt, S., Diriong, S., Mery, J., Fabrizio, E. and Debant, A. Identification of the first Rho-GEF inhibitor, TRIPalpha, which targets the RhoA-specific GEF domain of Trio. *FEBS Lett.* **523**, 35-42 (2002).

109. Nagel-Wolfrum, K., Kunz, C., Wittig, I., Butz, K., Hoppe-Seyler, F. and Groner, B. 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 cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 37610-21 (2003).
110. Butz, K., Denk, C., Ullmann, A., Scheffner, M. and Hoppe-Seyler, F. Induction of apoptosis in human papillomavirus-positive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 6693-6697 (2000).
111. Nassal, M. Hepatitis B virus morphogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* **214**, 297-337 (1996).
112. Schneider, S., Buchert, M., Georgiev, O., Catimel, B., Halford, M., Stacker, SA., Baechi, T., Moelling, K. and Hovens, CM. Mutagenesis and selection of PDZ domains that bind new protein targets. *Nature Biotechnology* **17**, 132-3 (1999).
113. Fields, S. and Sternglanz, R. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.* **10**, 286-292 (1994).
114. Phizicky, E. M. and Fields S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev* **59**, 94-123 (1995).
115. Yang, M., Wu, Z. and Fields, S. Protein-peptide interactions analyzed with the yeast two-hybrid system. *Nucleic Acids Res.* **23**, 1152-1156 (1995).
116. Norman, T. C., Smith, D. L., Sorger, P. K., Drees, B. L., O'Rourke, S. M., Hughes, T. R., Roberts, C. J., Friend, S. H., Fields, S. and Murray, A. E. Genetic selection of peptide inhibitors of biological pathways. *Science* **285**, 591-595 (2000).
117. Ladner, R. C. Constrained peptides as binding entities. *Trends Biotechnol.* **3**, 426-430 (1995).
118. Cohen, B. A., Colas, P. and Brent, R. An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 14272-14277 (1998).
119. Geyer, C. R. and Brent, R. Selection of genetic agents from random peptide aptamer expression libraries. *Methods Enzymol.* **328**, 171-208 (2000).
120. Abedi, M. R., Capinogro, G. and Kamb, A. Green fluorescent protein as a scaffold for intracellular presentation of peptides. *Nucleic Acids Res.* **26**, 623-630 (1998).
121. Cattaneo, A. and Biocca, S. The selection of intracellular antibodies. *Trends Biotechnol.* **17**, 115-120 (1999).
122. Hamilton, A. J. and D. C. Baulcombe. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**, 950-952 (1999).
123. Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H. and Fire, A. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell.* **107**, 465-761 (2001).
124. Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* **411**, 494-498 (2001).

125. Cogoni, C., Romano, N. and Macino, G. Suppression of gene expression by homologous transgenes. *Antonie Van Leeuwenhoek* **65**, 205-9 (1994).
126. Kennerdell, J. R. and Carthew, R. W. Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nature Biotechnology* **18**, 896-8 (2000).
127. Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*. **2**, 279-289 (1990).
128. Parrish, S., Fleenor, J., Xu, S., Mello, C. and Fire, A. Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Molecular Cell*. **6**, 1077-87 (2000).
129. Romano, N. and Macino, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology* **6**, 3343-53 (1992).
130. Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W. G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A. and Mello, C.C. The *rde-1* gene RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* **99**, 123-32 (1999).
131. Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., and Hannon, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. **409**, 363-366 (2001).
132. Schindl, M., Oberhuber, G., Obermair, A., Schoppmann, S. F., Karner, B. and Birner, P. Overexpression of Id-1 protein is a marker for unfavorable prognosis in early-stage cervical cancer. *Cancer Res.*, **61**, 5703-6 (2001).
133. Schoppmann, S. F. *et al.* Overexpression of Id-1 is associated with poor clinical outcome in node negative breast cancer. *Int. J. Cancer* **104**, 677-682 (2003).
134. Schindl, M., Schoppmann, S. F., Strobel, T., Heinzl, H., Leisser, C., Horvat, R. and Birner, P. Level of Id-1 protein expression correlates with poor differentiation, enhanced malignant potential, and more aggressive clinical behavior of epithelial ovarian tumors. *Clin. Cancer Res.* **9**, 779-85 (2003).
135. D'Assoro, A. B., Lingue, W. L. and Salisbury, J. L. Centrosome amplification and the development of cancer. *Oncogene* **21**, 6146-53 (2002).
136. D'Assoro, A. B., Barrett, S. L., Folk, C., Negron, V. C., Boeneman, K., Busby, R., Whitehead, C., Stivala, F., Lingle, W.L. and Salisbury, J.L. Amplified centrosomes in breast cancer: a potential indicator of tumor aggressiveness. *Breast Cancer Res Treat.* **75**, 25-34 (2002).
137. siIMPORTER™ from Upstate. siIMPORTER Transfection Protocol (2005).
138. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor, NY* (1989).
139. Yang, M., Jensen, R. E., Yaffe, M. P., Oppliger, W., and Schatz, G. Import of proteins into yeast mitochondria: the purified matrix processing protease contains two subunits which are encoded by the nuclear MAS1 and MAS2 genes. *EMBO J.* **7**, 3857-3862 (1988).

140. Chen, C. and Okayama, H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol.* **7**, 2745-2752 (1987).
141. Elliott, G. and O'Hare, P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* **88**, 223-33 (1997).
142. Richard, W. D., Armitage, S. and John, D. N. Nuclear Localization and Regulation of Id Protein through an E Protein-mediated Chaperone Mechanism. *The Am Soc Bioch and Mol Biology* **27**, 23603-23606 (1996).
143. Green, M. and Loewenstein, P. M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* **55**, 1179-88 ((1988)).
144. Frankel, A. D. and Pabo, C. O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **55**, 1189-93 (1988).
145. Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H. and Prochiantz, A. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 1864-8 (1991).
146. Elliott, G. and O'Hare, P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* **88**, 223-33 (1997).
147. Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., Moore, C., Chen, L. L., Pepinsky, B. and Barsoum, J. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 664-8 (1994).
148. Kamizono, S., Hanada, T., Yasukawa, H., Minoguchi, S., Kato, R., Minoguchi, M., Hattori, K., Hatakeyama, S., Yada, M., Morita, S., Kitamura, T., Kato, H., Nakayama, K. and Yoshimura, A. The SOCS box of SOCS-1 accelerates ubiquitin-dependent proteolysis of TEL-JAK2. *J Biol Chem* **276**, 12530-8 (2001).
149. Ungureanu, D., Saharinen, P., Junttila, I., Hilton, D. J. and Silvennoinen O. Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1. *Mol Cell Biol* **22**, 3316-26 (2002).
150. Hilton, D. J., Richardson, R. T., Alexander, W. S., Viney, E. M., Willson, T. A., Sprigg, N. S. Starr, R., Nicholson, S. E., Metcalf, D. and Nicola, N. A. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 114-9 (1998).
151. Amidon, G. L. and Lee, H. J. Absorption of peptide and peptidomimetic drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **34**, 321-41 (1994).
152. Langer, R. Drug delivery and targeting. *Nature Review* **392**, 5-10 (1998).
153. Putney, S. D. and Burke, P. A. Improving protein therapeutics with sustained-release formulations. *Nature Biotechnol Review* **16**, 153-7 (1998).
154. Niesner, U., Halin, C., Lozzi, L., Gunthert, M. P., Wunderli-Allenspach, H., Zardi, L. and Neri, D. Quantitation of the Tumor-Targeting Properties of Antibody Fragments Conjugated to Cell-Permeating HIV-1 TAT Peptides. *Bioconjug Chem* **13**, 729-736 (2002).

155. Morris, M. C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F. and Divita, G. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nature Biotechnology* **19**, 1173-6 (2001).
156. Spear, M. A., Breakefield, X. O., Beltzer, J., Schuback, D., Weissleder, R., Pardo, F. S. and Ladner, R. Isolation, characterization, and recovery of small peptide phage display epitopes selected against viable malignant glioma cells. *Cancer Gene Ther.* **8**, 506-11 (2001).
157. Zhang, J., Spring, H. and Schwab, M. Neuroblastoma tumor cell-binding peptides identified through random peptide phage display. *Cancer Lett.* **171**, 153-64 (2001).
158. Breinbauer, R., Vetter, I. R. and Waldmann, H. From protein domains to drug candidates-natural products as guiding principles in the design and synthesis of compound libraries. *Angew Chem Int Ed Engl. Review* **41**, 2879-90 (2002).
159. Liu, R., Marik, J. and Lam, K. S. A novel peptide-based encoding system for "one-bead one compound" peptidomimetic and small molecule combinatorial libraries. *J Am Chem Soc.* **124**, 7678-80 (2002).
160. Rich, D. H., Bursavich, M. G. and Estiarte, M. A. Discovery of nonpeptide, peptidomimetic peptidase inhibitors that target alternate enzyme active site conformations. *Biopolymers* **66**, 115-25 (2002).
161. Klebe, G. Recent developments in structure-based drug design. *J Mol Med. Review* **78**, 269-81 (2000).
162. Leung, D., Abbenante, G. and Fairlie, D. P. Protease inhibitors: current status and future prospects. *J Med Chem. Review* **43**, 305-41 (2000).
163. Rubio-Aliaga, I. and Daniel, H. Mammalian peptide transporters as targets for drug delivery. *Trends Pharmacol Sci. Review* **23**, 434-40 (2002).
164. Latham, P. W. Therapeutic peptides revisited. *Nature Biotechnol.* **17**, 755-7 (1999).
165. Amidon, G. L. and Lee, H. J. Absorption of peptide and peptidomimetic drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol. Review* **34**, 321-41 (1994).

8 Abkürzungsverzeichnis

μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
3AT	3-Amino-1,2,4-Triazol
aa	amino acid
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting Enzyme
AD	Aktivierungsdomäne
Ade	Adenin
ALK-1	Activin receptor-like kinase 1
AML1	Acute myeloid leukaemia 1
AMP	Adenosin-Mono-Phosphat
ANTP	Antennapedia Protein
APC	Adenomatosis polyposis coli
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenin Triphosphat
BD	Bindungsdomäne
bHLH	basische Helix-Loop-Helix
Bidest.	Bidestilliertes Wasser
BMP	Bone morphogenic protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	Cyclisches Adenosin-Mono-Phosphat
CDK	Cycline dependent kinase
CEP	Circulating endothelial progenitors
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
cm	Zentimeter
CREB	cyclic AMP response element-binding protein
DMEM	Dulbecco's Modified Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGR1	Early growth response 1
EPC	endothelial progenitor cells
FCS	Fetal calf serum
FGFR1	Fibroblast growth factor (FGF) receptor 1
FLI1	Friend leukaemia virus integration 1
g	Gramm
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HA	Hemagglutinin
HBV	Hepatitis-B-Viren
His ⁻	Histidin
HNF4 α	Hepatocyte nuclear factor 4 α
HPV	Humane Papilloviren
HRP	Horse raddish peroxidase
HSV	Herpes simplex virus
Ig	Immunglobulin
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
IPTG	Isopropyl-1-thio-D-galactosid
IRS1	Insulin receptor substrate 1
Jak	Janus Kinase
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
LB	Luria-Bertani-Medium
Leu	Leucin
LiAc	Lithium-Acetat
LMP1	Latentes Membranprotein 1
M	Molar
m/s	Meter pro Sekunde
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter

mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP2	Matrix metalloprotease 2
mRNA	messenger RNA
NES	Nuclear export signal
ng	Nanogramm
NLS	Nuclear localization signal
OD _{ynm}	Optische Dichte bei y nm
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid
p	Plasmid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglycol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pmol	Picomol
pRB	Retinoblastoma-Tumorsuppressorprotein
PTD	Proteintransduktionsdomäne
RISC	RNA-induced silencing complex
rlu	relative light unit
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	RNA-mediated interference
rpm	rounds per minute
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC-His	SC-Medium ohne Histidin
SC-Leu ⁻	SC-Medium ohne Leucin
SC-Leu ⁻ -Trp ⁻	SC-Medium ohne Leucin, Tryptophan
SC-Leu ⁻ -Trp ⁻ -His ⁻	SC-Medium ohne Leucin, Tryptophan, Histidin
SC-Medium	Synthetic Complete Medium
SC-Trp ⁻	SC-Medium ohne Tryptophan
SDF1	Stromal cell derived factor 1
SDS	Sodium dodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH2	Src Homologie-Domäne

shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SOCS	Suppressors of cytokine signalling
STAT	Signal transducers and activators of transcription
SV40	Simian virus 40
T _a	Annealing-Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAL1	T-cell acute lymphocytic leukaemia 1
TCR	T-cell receptor
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- β	Transforming growth factor- β
Trp	Tryptophan
TrxA	Thioredoxin A
U	Unit
ü.N.	über Nacht
Ura	Uracil
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor Response
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Western-Blot
x-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
y x g	y fache Erdbeschleunigung (Schleuderziffer)
YPD	Hefe-Pepton-Dextrose-Medium
β -gal	β -Galaktosidase-Gen
Ω	Ohm

9 Anhang

9.1 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Universitätsklinikum Freiburg in der Abteilung Innere Medizin I (Hämatologie/Onkologie) unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Mertelsmann in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. J. Hasskarl angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. J. Hasskarl für die Möglichkeit zur Bearbeitung des interessanten Themas und die Betreuung der Arbeit. Die Diskussionsbereitschaft, aber auch die Möglichkeit, eigene Ideen zu verwirklichen, haben dazu beigetragen, dass sich das Projekt im Rahmen dieser Promotion gut entwickeln konnte und meine Selbstständigkeit im wissenschaftlichen Arbeiten gefördert wurde.

Herrn Prof. Dr. H. Görisch danke ich sehr für die freundliche Betreuung dieser Arbeit im Fachgebiet Technische Biochemie am Institut für Biotechnologie der Technischen Universität Berlin.

Frau Prof. Dr. K. Butz und Herrn Prof. Dr. F. Hoppe-Seyler vom DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg) danke ich besonders für die gute Kooperation und die Bereitstellung der Peptid-Aptamer-Expressionsbanken.

Allen Mitarbeitern des Labors, insbesondere allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Hasskarl, danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft. Bedanken möchte ich mich auch bei Frau N. Bourgeois für ihre freundliche Mitarbeit als technische Assistentin.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Frau V. Khodaverdi und meinen Freunden nochmals herzlich.

Diese Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

9.2 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation in allen Teilen von mir selbstständig angefertigt wurde und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben worden sind.

Berlin, 22.12.2006

Demissew Sheneglegn Mern