

**Inhibition der Signaltransduktion des epidermalen
Wachstumsfaktorrezeptors (EGF-Rezeptor)
durch Peptid-Aptamere
- Ein neuer Ansatz zur Krebstherapie -**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Claudia Bürger
aus Hilden

Frankfurt im September 2002
(DF1)

vom Fachbereich 14 (chemische und pharmazeutische Wissenschaften) der Johann
Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Walter E. Müller

Gutachter: Prof. Dr. Bernd Groner; Prof. Dr. Robert Tampé

Datum der Disputation: 17. Dezember 2002

Zusammenfassung

Die Mitglieder der Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren - EGFR (epidermal growth factor receptor), ErbB2, ErbB3 und ErbB4 - sind in vielen Krebsarten dereguliert und ursächlich an der malignen Transformation beteiligt. Diese hervorgehobene Rolle macht vor allem den EGF- und ErbB2-Rezeptor zu einem präferierten Angriffspunkt im Rahmen der Krebstherapie. Durch Bindung eines Liganden, wie z.B. EGF, dimerisiert der Rezeptor, wodurch die intrinsische Kinaseaktivität aktiviert wird. Dadurch kommt es zur Autophosphorylierung C-terminaler Tyrosinreste, die Bindungsstellen für weitere Signalproteine, wie z.B. Shc, Grb, PLC γ oder die PI3-Kinase, darstellen. Die Aktivierung nachgeschalteter Signaltransduktionswege (z.B. MAPK-Weg, STAT-Signalweg) induziert die Transkription von Genen, welche für den Fortgang des Zellzyklus und damit für die Proliferation verantwortlich sind. Da die Aktivierung dieser Signaltransduktionswege auf Protein-Protein-Interaktionen basiert, kann durch gezielte Interferenz mit diesen Interaktionen das proliferative Signal ausgeschaltet und das Tumorwachstum letztendlich angehalten werden.

Für diese gezielte Interferenz wurde in der vorliegenden Arbeit das Peptid-Aptamer-System eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine intrazelluläre Selektionsmethode, mittels derer Peptide, die in ein Gerüstprotein, wie z.B. Thioredoxin, inseriert sind, aufgrund ihrer Affinität zu einem Baitprotein selektiert werden können. In einem Hefe-Zwei-Hybrid-Screen mit dem N-terminalen Teil der Kinasedomäne des EGF-Rezeptors (aa 688 bis 821) wurden drei Peptid-Aptamere (KDI1, KDI3 und KDI4) isoliert. In GST-Pulldown-Experimenten und Ko-Immunopräzipitationen konnte die Interaktion zwischen dem EGF-Rezeptor und den isolierten Aptameren bestätigt werden.

Um die Aptamere in Zielzellen einzubringen und ihre Funktion zu überprüfen, wurden zwei Ansätze gewählt. Zum einen wurden Zelllinien generiert, die die Aptamere stabil exprimieren. Zum anderen wurden die Peptid-Aptamere mit einer Proteintransduktionsdomäne (PTD), bestehend aus neun L-Argininresten, fusioniert, die eine schnelle und effiziente Aufnahme der rekombinanten Peptid-Aptamere in die Zellen erlaubt. KDI1-exprimierende Herc-Zellen zeigten eine reduzierte EGF-abhängige Proliferation und hatten eine deutlich geringere Fähigkeit, Kolonien in Weichagar zu bilden. Durch die Bindung des Aptamers an die Kinasedomäne des

EGF-Rezeptors war die Phosphorylierung an Tyrosin 845, 1068 und 1148 reduziert. Dies hatte auch Einfluss auf nachgeschaltete Signalwege, da Shc (p46) und STAT3 in Gegenwart des Aptamers nur geringfügig durch EGF aktiviert werden konnten. Wie in Reporteranalysen gezeigt werden konnte, war dadurch auch die Fähigkeit von STAT3 zur Transkriptionsinitiation inhibiert. Diese Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass das Aptamer die EGF-abhängige Rekrutierung der zytosolischen Kinase c-Src an den Rezeptor beeinflusst und somit der Zugang zu den Substraten Shc und STAT3 versperrt wird. Da auch die Verstärkung der Kinaseaktivität des EGF-Rezeptors durch Phosphorylierung an Tyrosinrest 845 unterbleibt, werden auch weitere Tyrosine wie 1068 und 1148 nicht mehr vollständig aktiviert. Interessanterweise war der MAPK-Signalweg trotzdem nicht beeinflusst. Daher muss angenommen werden, dass der wachstumsinhibierte Phänotyp KDI1 exprimierender Zellen vor allem auf der Inhibition von STAT3 beruht. Somit wurde mit KDI1 ein Peptid-Aptamer isoliert, das die EGF-induzierte Aktivierung proliferativer Signalwege inhibieren kann und sich damit potentiell für den Einsatz in der Tumorthherapie eignet.

Um den Aptameren, die zwar mit dem Rezeptor interagieren, aber nicht mit dessen Aktivität interferieren, eine zusätzliche Funktion zu geben, wurden die Aptamere mit einer SOCS-Box-Domäne fusioniert. Hierbei handelt es sich um eine Domäne der SOCS-Proteine, die spezifisch Kontakt mit E3-Ubiquitin-Ligasen aufbauen kann. Es konnte gezeigt werden, dass durch Transduktion eines solchen Peptid-Aptamers der Rezeptor spezifisch ubiquitinyliert und damit degradiert wird. Somit eröffnet die Fusion der SOCS-Box-Domäne an ein Peptid-Aptamer die Möglichkeit, die Konzentration des Zielproteins spezifisch abzusenken und den transformierten Phänotyp zu reverteren.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich das Peptid-Aptamer-System dazu eignet, Inhibitoren für vorgegebene Zielmoleküle zu isolieren. Solche Inhibitoren können sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der Tumorthherapie Anwendung finden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Einführung in die Krebshematik	1
1.2	Die EGF-Rezeptorfamilie: Funktionen in normalem und neoplastischem Gewebe	2
1.2.1	Überblick über die Rezeptortyrosinkinasen	2
1.2.2	Die Struktur der EGF-Rezeptorfamilie.....	3
1.2.3	Die Liganden der EGF-Rezeptorfamilie.....	4
1.2.4	Durch den EGF-Rezeptor aktivierte Substrate und Signalwege	5
1.2.5	Die Funktionen des EGF-Rezeptors in normalem Gewebe.....	8
1.2.6	Der EGF-Rezeptor und Krebs	9
1.2.7	Der EGF-Rezeptor als Angriffspunkt für die Krebstherapie10	
1.2.7.1	Inhibitoren der Kinaseaktivität (Small molecule inhibitors)	11
1.2.7.2	Antikörper in der Tumorthherapie.....	11
1.2.7.3	Peptid-Aptamere als neuartige Modellstrukturen zur Tumorthherapie.....	12
1.3	Einbringung therapeutischer Proteine in Säugerzellen durch Proteintransduktion	15
1.4	Degradierung zellulärer Proteine	18
1.5	Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit.....	20

2	Material und Methoden.....	23
2.1	Materialien.....	23
2.1.1	Plasmide.....	23
2.1.2	Antikörper.....	24
2.1.3	Primer.....	25
2.1.4	<i>E.coli</i> Stämme und Anzuchtbedingungen.....	25
2.1.5	Zelllinien und Medien.....	25
2.1.6	Hefestamm und Anzuchtbedingungen.....	26
2.1.7	Lösungen und Puffer.....	26
2.1.8	Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....	26
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	27
2.2.1	Polymerase-Chain-Reaction (PCR).....	27
2.2.2	Enzymatische Behandlung der DNA.....	27
2.2.2.1	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen.....	27
2.2.2.2	Dephosphorylierung von 5´Enden.....	28
2.2.2.3	Ligation von DNA-Fragmenten.....	28
2.2.3	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gel-Elektrophorese.....	28
2.2.4	Transformation von Plasmiden in <i>E.coli</i>	28
2.2.4.1	Herstellung transformationskompetenter <i>E.coli</i> -Zellen.....	29
2.2.4.2	Transformation in chemokompetente Bakterien.....	29
2.2.4.3	Transformation in elektrokompente Bakterien.....	30
2.2.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	30
2.2.5.1	Plasmidisolierung in analytischem Maßstab (Mini-Präparation).....	30
2.2.5.2	Plasmidisolierung in präparativem Maßstab (Maxi-Präparation).....	30
2.2.6	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	30

2.3	Proteinbiochemische Methoden	31
2.3.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	31
2.3.2	Verifikation von Proteininteraktionen <i>in vitro</i> mittels GST-Pulldown	31
2.3.2.1	Proteinexpression und Zellyse unter nativen Bedingungen	31
2.3.2.2	GST-Reinigung.....	31
2.3.2.3	GST-Pulldown.....	32
2.3.3	Reinigung von rekombinanten Proteinen aus <i>E.coli</i> unter denaturierenden Bedingungen.....	32
2.3.3.1	Zellyse	32
2.3.3.2	Reinigung durch Ni ²⁺ -Affinitätschromatographie.....	32
2.3.3.3	Renaturierung des gereinigten Proteins mittels Dialyse.....	33
2.3.4	Kolorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford	33
2.3.5	SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese	33
2.3.6	Coomassieblau-Färbung von Polyacrylamidgelen	33
2.3.7	Immunoblot (Western Blot)	34
2.3.8	Ponceau-Färbung von Nitrocellulosemembranen.....	34
2.3.9	“Strippen“ von Nitrocellulosemembranen	34
2.3.10	Immunopräzipitation (IP).....	35
2.4	Methoden der Zellkultur	35
2.4.1	Transfektion von Säugerzellen.....	35
2.4.2	Zellernte und Zellaufschluß.....	36
2.4.3	Proliferationsassay	36
2.4.4	Untersuchung des Zellwachstums in semisoliden Medium (Soft Agar Assay)	37
2.4.5	Immunofluoreszenzanalyse	37
2.4.6	Messung der Luziferase-Aktivität.....	37

2.5	Methoden im Hefe-Zwei-Hybrid-System	38
2.5.1	Lösungen und Medien.....	39
2.5.2	Transformation von Plasmiden in <i>S. cerevisiae</i>	39
2.5.3	Transformation der Library-Vektoren in <i>S. cerevisiae</i>	40
2.5.4	Herstellung von Proteinextrakten aus Hefezellen.....	40
2.5.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	41
2.5.6	Verifikation des Interaktionsphänotyps mittels Mating	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Screening von Peptid-Aptameren, die mit der Kinasedomäne des EGF-Rezeptors interagieren	42
3.2	Verifikation der spezifischen Interaktion zwischen den isolierten selektierten Peptid-Aptameren und dem EGF- Rezeptor <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	44
3.2.1	Verifikation der Interaktion in <i>S. cerevisiae</i> mittels Mating	44
3.2.2	Verifikation der Interaktion <i>in vitro</i> durch GST-Pulldown- Experimente.....	45
3.2.3	Verifikation der Peptid-Aptamer/Rezeptor-Interaktion <i>in vivo</i> mittels Ko-Immunitätspräzipitation.....	48
3.3	Einbringung der Peptid-Aptamere in Zielzellen	50
3.3.1	Stabile Transfektion der selektierten Peptid-Aptamere in Herc-Zellen	50
3.3.2	Transduktion von rekombinant exprimierten Peptid- Aptameren mittels einer basischen Protein- transduktionsdomäne.....	51

3.3.2.1	Expression und Reinigung von rekombinanten Peptid-Aptameren mit einer Proteintransduktionsdomäne.....	51
3.3.2.2	Effizienz der Proteintransduktion zur Einbringung von Peptid-Aptameren in Zielzellen.....	53
3.3.2.3	Untersuchung der intrazellulären Stabilität transduzierter Peptid-Aptamere.....	56
3.4	Untersuchung der funktionellen Interferenz der isolierten Peptid-Aptamere mit dem EGF-Rezeptor	59
3.4.1	Untersuchung der Peptid-Aptamer-Wirkung auf die Proliferation und Transformation von Zellen.....	59
3.4.2	Einfluss des Aptamers KDI 1 auf die EGF-vermittelte Signaltransduktion	63
3.4.2.1	Untersuchung des Aktivierungsmusters des EGF-Rezeptors in Gegenwart des Aptamers KDI 1.....	63
3.4.2.2	Untersuchung der Aktivierung nachgeschalteter Signalwege.....	67
3.5	Gezielte Degradierung des EGF-Rezeptors durch ein rekombinantes Aptamer/SOCS-Box-Protein	72
4	Diskussion	81
4.1	Isolierung von Peptid-Aptameren, die mit der Kinasedomäne des EGF-Rezeptors interagieren	81
4.2	Einbringung von Peptid-Aptameren in eukaryontische Zellen.....	83
4.3	Peptid-Aptamer KDI 1 interferiert mit den Funktionen des EGF-Rezeptors	85
4.3.1	Peptid-Aptamer KDI 1 inhibiert die EGF-abhängige Proliferation und Transformation von Zellen.....	85
4.3.2	Peptid-Aptamer KDI 1 interferiert mit der c-Src-abhängigen Signaltransduktion des EGF-Rezeptors.....	87

4.4	Gezielte Degradierung des EGF-Rezeptors durch ein Peptid-Aptamer/SOCS-Box-Protein.....	93
4.5	Einsatz von Peptid-Aptameren in der Grundlagenforschung und der Tumorthherapie	97
5	Literatur	99
6	Abkürzungsverzeichnis.....	113
7	Anhänge	116

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Krebsthematik

Eine präzise Regulation der Proliferation und Differenzierung von Zellen ist eine grundlegende Voraussetzung für die Homöostase in vielzelligen, hochorganisierten Lebewesen. Um einen Zustand der kontinuierlichen Erneuerung und Differenzierung von Zellen aufrecht zu erhalten, ist ein großes Maß an koordinierten Vorgängen zwischen einer Vielzahl verschiedenartiger Zellen notwendig. Dazu bedarf es, dass biologische Signale von einer Zelle zur nächsten, über Zellmembranen hinweg, übermittelt werden und in intrazelluläre Signalkaskaden übersetzt werden, so dass die Zelle durch die Expression entsprechender Zielgene auf die externen Stimuli reagieren kann. Eine Störung dieser Signaltransduktion kann zur malignen Transformation von normalen Zellen beitragen. Normale, nicht-transformierte Zellen benötigen Signale, um in einen aktiven proliferativen Status überzugehen. Transformierte Zellen zeigen dagegen eine deutlich reduzierte Abhängigkeit von externen Wachstumsreizen. Ein Grund hierfür stellt die Synthese von eigenen Wachstumssignalen vieler Tumorzellen dar. So sekretieren einige Zellen Wachstumsfaktoren oder exprimieren die entsprechenden Wachstumsfaktorrezeptoren verstärkt. Auch im Rahmen der intrazellulären Signaltransduktionswege wurden verschiedene Mutationen gefunden. Das Ras-Protein ist beispielsweise in vielen Krebsarten strukturell verändert, so dass es ohne exogene Aktivierung Signale weiter leiten kann (Hanahan and Weinberg, 2000).

Die epidermale Wachstumsfaktorrezeptor-Familie (EGFR Familie; epidermal growth factor) von Rezeptortyrosinkinasen spielt eine große Rolle in gesunden und aberanten Zellen und leitet Signale weiter, die schließlich zur Zellproliferation führen. Störungen dieser Signalkaskade können daher leicht zur Hyperaktivierung der Zelle und damit zu malignem Wachstum führen.

1.2 Die EGF-Rezeptorfamilie: Funktionen in normalem und neoplastischem Gewebe

1.2.1 Überblick über die Rezeptortyrosinkinasen

Im eukaryontischen Organismus sind eine Vielzahl von Rezeptoren auf der Zelloberfläche repräsentiert, die aufgrund ihrer Liganden, ihrer biologischen Funktion und ihrer Primärstruktur in verschiedene Gruppen eingeteilt werden können. Eine große Familie dieser Rezeptoren besitzt in ihrem zytoplasmatischen Teil eine intrinsische Kinasedomäne, welche die γ -Phosphorylgruppe des ATP auf die Hydroxylgruppe von Tyrosinen der Zielproteine überträgt. Aufgrund der Struktur und biologischen Funktion dieser Proteinen werden sie in der Familie der Rezeptortyrosinkinasen (RTK) zusammengefasst (Hunter, 1998). Diese Rezeptoren können aufgrund ihrer Strukturunterschiede in Typ I und Typ II RTKs unterteilt werden (Abbildung 1.1).

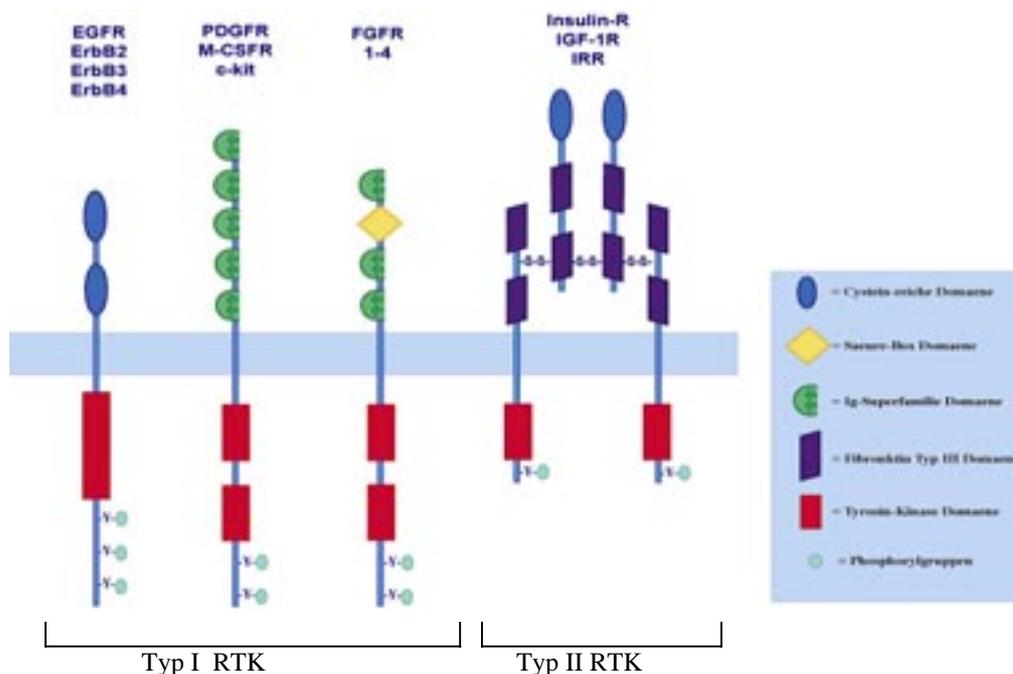


Abb. 1.1: Struktur einiger Mitglieder der Rezeptortyrosinkinasen (RTK)-Genfamilie:

Die Übersicht zeigt die unterschiedlichen Vertreter der RTKs. Die EGFR-Familie besitzt in ihrem extrazellulären Teil zwei cysteinreiche Domänen, die für die Ligandenbindung verantwortlich sind. Im intrazellulären Teil befinden sich die Tyrosinkinasedomänen und spezifische Tyrosinreste in der C-terminalen Region, die bei Aktivierung des Rezeptors phosphoryliert werden. Die Familie der PDGFR (Platelet-derived growth factor receptor) besitzt im extrazellulären Teil fünf Domänen der Ig-Superfamilie und in ihrem zytoplasmatischen Teil zwei Tyrosinkinasedomänen und phosphorylierbare Tyrosine. Die FGFR-Familie (Fibroblast growth factor receptor) besitzt ebenfalls Ig-Superfamilie Domänen im extrazellulären Teil und des Weiteren eine Säure-Box Domäne. Im zytoplasmatischen Teil sind wie bei der PDGFR-Familie zwei Tyrosinkinasedomänen vorhanden. Die Vertreter der IR (Insulin-Rezeptor)-Familie sind bereits im nichtaktivierten Zustand dimerisiert und gehören damit zum Typ II. (Abb. Michals Biochemical Pathways).

Typ-II-RTKs, wie z.B. der Insulin-Rezeptor, werden als ein einzelnes Peptid synthetisiert, welches glykosiliert und in eine α - und β -Kette gespalten wird. Die α -Kette stellt den extrazellulären Teil des Rezeptors dar, die β -Kette umfaßt die Transmembrandomäne und die Tyrosinkinase im zytoplasmatischen Teil. Sowohl die α - und β -Kette, als auch die beide Monomere sind über Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Somit liegen sie in der Zelle als Rezeptordimere vor.

Die Rezeptoren des Typ I hingegen kommen als Monomere in der Zellmembran vor und werden durch liganden-induzierte Dimerisierung aktiviert. Die Familie der EGF-Rezeptoren wird diesem Typ zugeordnet und soll im folgenden genauer beschrieben werden.

1.2.2 Die Struktur der EGF-Rezeptorfamilie

In Säugern konnten bisher vier Mitglieder der EGFR-Familie identifiziert werden: der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (epidermal growth factor receptor, EGFR), auch ErbB1 oder HER1 genannt, sowie die Rezeptoren ErbB2/Neu/Her2, ErbB3/HER3 und ErbB4/HER4.

Sie alle besitzen zwei cysteinreiche Regionen in der extrazellulären Domäne, eine Transmembrandomäne und eine Tyrosin-Kinasedomäne im zytoplasmatischen Teil. Die cysteinreichen Regionen stabilisieren die extrazelluläre Domäne des Rezeptors und unterstützen die Bindung des Liganden. Die Transmembrandomäne besitzt eine α -helikale Struktur. Eine Punktmutation in dieser Domäne (Val659Glu) führt zu einem konstitutiv aktiven Rezeptor (Akiyama, Matsuda *et al.*, 1991), da dieser durch signifikante intramolekulare Reorganisation dauerhaft dimerisiert vorliegt, wodurch die Zellen unreguliert proliferieren (Sharpe, Barber *et al.*, 2000). Die Kinasedomäne ist innerhalb der Familienmitglieder sehr homolog. Nur ErbB3 besitzt eine nicht funktionsfähige Kinasedomäne, so dass dieser Rezeptor nur als Heterodimer aktiviert werden kann (Sierke, Cheng *et al.*, 1997). Im C-terminalen Teil des Rezeptors befinden sich spezifische Tyrosinreste, die bei liganden-induzierter Rezeptordimerisierung von der aktivierten Kinase des Korezeptors phosphoryliert werden und somit als Bindungsstellen für Effektormoleküle dienen. Diese Domäne besitzt die größte Variabilität innerhalb der Rezeptorfamilie. Dies zeigt, dass diese Rezeptorfamilie ein hohes Maß an Signaldiversität erlaubt, da durch die Bildung

verschiedener Heterodimere eine Vielzahl unterschiedlicher Signalkaskaden induziert werden können.

1.2.3 Die Liganden der EGF-Rezeptorfamilie

Die EGF-Rezeptoren werden durch eine Vielzahl von Liganden, genannt „EGF-related peptide growth factors“, aktiviert (Riese and Stern, 1998). Sie werden als transmembrane Peptidvorläufer produziert, prozessiert und durch Proteolyse in den extrazellulären Raum entlassen. Diese Liganden besitzen alle eine EGF-ähnliche Domäne und zeigen sehr spezifische Bindungseigenschaften: EGF, Amphiregulin (AR) und transforming growth factor α (TGF α) binden vor allem an den EGFR, während Betacellulin (BTC), heparin-binding EGF (HB-EGF) und Epiregulin (EPR) gleichermaßen an EGFR und ErbB4 binden (Hynes, Horsch *et al.*, 2001). Die Neureguline (NRG) stellen eine dritte Ligandenfamilie dar, wobei NRG-1 und 2 an ErbB3 und 4 binden, während NRG-3 und NRG-4 nur an ErbB4 binden, jedoch nicht an ErbB3 (Zhang, Sliwkowski *et al.*, 1997) (Harari, Tzahar *et al.*, 1999). Ein direkter Ligand für ErbB2 konnte bisher nicht isoliert werden. Die Hauptfunktion dieses Rezeptors ist es vermutlich, als Korezeptor für die übrigen Rezeptoren zu dienen. So ist ErbB2 der favorisierte Heterodimerisierungspartner für alle EGF-Rezeptoren (Graus-Porta, Beerli *et al.*, 1997) und spielt eine Rolle bei der Potenzierung des liganden-induzierten Signals (Graus-Porta, Beerli *et al.*, 1995) und der daraus folgenden biologischen Aktivität (Spencer, Graus-Porta *et al.*, 2000).

1.2.4 Durch den EGF-Rezeptor aktivierte Substrate und Signalwege

Liganden-induzierte Rezeptordimerisierung und anschließende Autophosphorylierung spezifischer Tyrosinreste kreieren Bindungsstellen für Src-Homologie (SH2)- oder Phosphotyrosine-binding (PTB)-Domänen enthaltende Signalmoleküle. Dabei kann es sich entweder um Adapterproteine, wie z.B. Shc, Grb2, Gab1 oder Crk, welche Signalplattformen aufbauen, an die weitere Effektormoleküle binden können oder direkt um Enzyme, wie z.B. Phospholipase C (PLC γ), c-Src Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3-K) oder Phosphatasen wie SHP1 und SHP2 handeln.

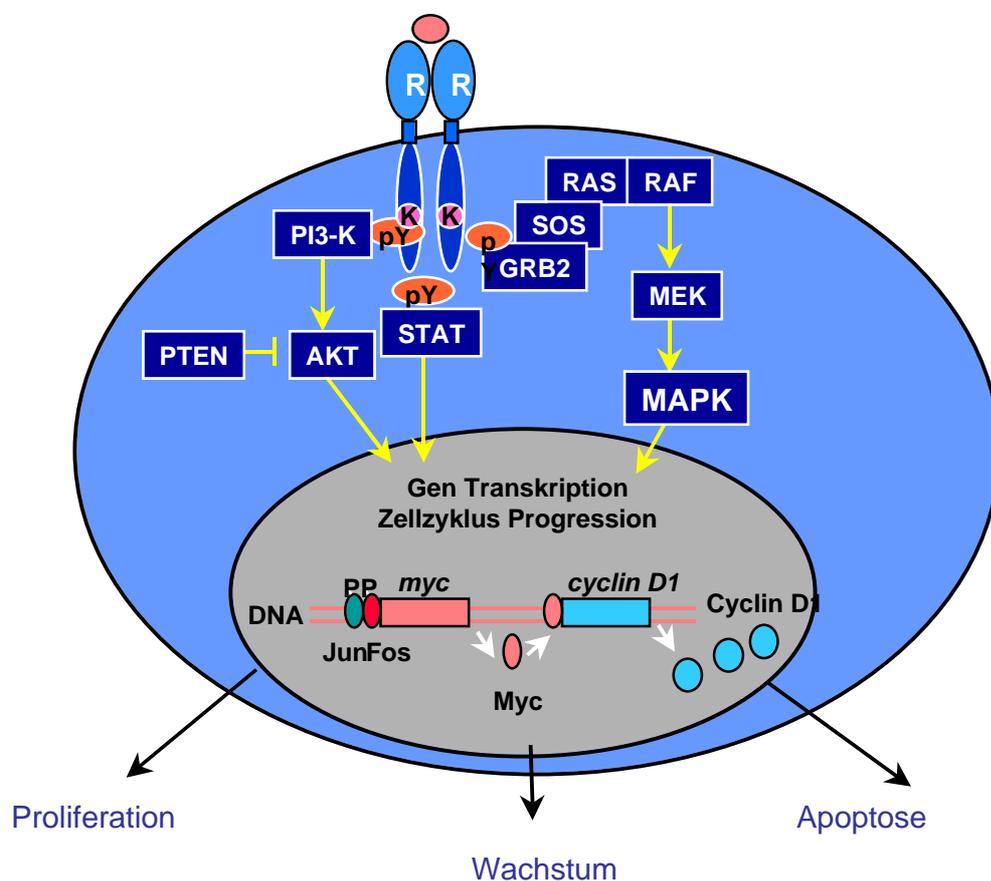


Abb. 1.2: Durch Rezeptortyrosinkinase aktivierte Signalwege

Durch Phosphorylierung verschiedener Tyrosinreste des Rezeptors können SH2-Domänen enthaltende Effektorproteine an den Rezeptor binden und dadurch aktiviert werden. Diese aktivieren verschiedene Signalwege, wie den MAP-Kinase-Weg, den Jak/STAT-Signalweg oder den anti-apoptotischen PI3-Kinase-Weg. Dies führt zum einen zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die die Expression von Proteinen wie z.B. Zyklinen aktivieren, die den Zellzyklus vorantreiben und damit zu einer proliferativen Reaktion der Zelle führen. Andererseits wird durch die Aktivierung von Akt ein anti-apoptotisches Signal ausgelöst, wobei NF- κ B involviert ist.

Jedes Mitglied der EGFR-Familie weist ein typisches C-terminales Phosphorylierungsmuster auf, welches verschiedene Signalproteine rekrutiert und aktiviert, so dass ein hoch diverses Signalnetzwerk entsteht. Unter den vielen vom EGFR aktivierten Signalwegen ist der MAP-Kinase-Weg der am Besten untersucht. Nach der Rekrutierung von Shc und Grb2 zum phosphorylierten Rezeptor, wird das G-Protein Ras, über den Grb2-gebundenen Austauschfaktor Sos, aktiviert. Dieses G-Protein aktiviert die Serin/Threonin-Kinase Raf, welche über MEK1 schließlich Erk1/2 induziert, die Transkriptionsfaktoren wie Elk-1 und c-fos phosphorylieren. Die Aktivierung dieses Signalweges führt vor allem zu proliferativen Antworten auf eine EGF-Stimulation. Des Weiteren führt EGF-Stimulation zur Aktivierung der Lipidkinase Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K), welche PIP₂ (Phosphoinositol 4,5-bisphosphat) zum „second messenger“ PIP₃ phosphoryliert. Da der EGFR keine direkte Bindungsstelle für die SH2-Domäne von PI3-K enthält, wird Gab1 als Adapterprotein vorgeschlagen. Ein wichtiges Target der PI3-K ist PKB/Akt, die durch die Aktivierung von NF-κB zu anti-apoptotischen Effekten führt. Akt inhibiert gleichzeitig aber auch durch die Phosphorylierung von Raf, den MAPK Signalweg (Zimmermann and Moelling, 1999). Phospholipase Cγ(PLCγ), bindet an das phosphorylierte Tyrosin 1173 des EGFR und wird durch Phosphorylierung aktiviert. Aktivierte PLC γ hydrolysiert PIP₂ zu IP₃ (Inositol 1,4,5-triphosphat) und DAG (Diacylglycerol), welche als „second messenger“ wirken. IP₃ mobilisiert das intrazelluläre Ca²⁺, während DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert (Yi, Chung *et al.*, 2001). Die zytosmatische Tyrosinkinase c-Src wird nach EGF-Stimulation an den Rezeptor rekrutiert, wo sie schon mit Rezeptor prä-assozierte Signalmoleküle wie Jak2, STAT3 (Olayioye, Beuvink *et al.*, 1999), Shc, Komponenten des Zytoskeletts und der endozytotischen Maschinerie (Wilde, Beattie *et al.*, 1999) phosphoryliert. Src kann aber auch den EGF-Rezeptor direkt binden und den Rezeptor an zwei weiteren Tyrosinresten (Y845 und Y1101) phosphorylieren, die nicht der Autophosphorylierung unterliegen (Biscardi, Maa *et al.*, 1999). Die Phosphorylierung an Tyrosin 845 soll dabei die Tyrosinkinase-Aktivität des Rezeptors steigern. Stover *et al.* haben außerdem Y891 und Y920 als zusätzliche Phosphorylierungsstellen für c-Src identifiziert (Stover, Becker *et al.*, 1995). Des Weiteren wurde gezeigt, dass der EGFR auch via Src den MAP-Kinase-Signalweg aktivieren kann (Olayioye, Badache *et al.*, 2001).

Bei Eps15 und Cbl handelt es sich um zwei EGFR-spezifische Substrate, die an der negativen Regulierung des Rezeptor beteiligt sind. Eps15 bindet an den Clathrin-Adapterkomplex AP-2 und partizipiert an der coated pit-vermittelten Endozytose des Rezeptors. Da der EGF-Rezeptor im Gegensatz zu anderen Rezeptoren der EGFR-Familie nach Aktivierung rasch durch coated pit-vermittelte Endozytose von der Oberfläche entfernt wird, liegt es nahe, dass dieser Prozess durch die Spezifität des Rezeptors für Eps15 vermittelt wird. Als einziger Rezeptor dieser Familie besitzt der EGF-Rezeptor Bindungsstellen für c-Cbl. Cbl ist ein RING-Finger-Domäne enthaltendes Protein mit E3-Ubiquitin-Proteinligase-Aktivität. Diese wird nach EGF-Stimulation an Tyrosin 1045 des Rezeptor rekrutiert und überträgt Ubiquitinmoleküle auf den EGF-Rezeptor, so dass er zur Degradierung markiert wird (Levkowitz, Waterman *et al.*, 1999). Neben dieser direkten Bindung von Cbl, kann diese auch durch indirekte Bindung über Grb2 aktiviert werden. Damit hat Grb2 eine duale Rolle als Transmitter. Einerseits können über die Aktivierung des MAPK-Signalweges positive Signale weitergeleitet werden, andererseits kann die Signaltransduktion durch den Cbl-abhängigen Abbau des Rezeptors gleichzeitig anhalten werden (Waterman, Katz *et al.*, 2002). Eine aktuelle Studie weist des Weiteren nach, dass durch Proteinkinase A (PKA) Aktivität, der Rezeptor an der Membran gehalten wird, bis er stimuliert und anschließend internalisiert wird. Eine PKA-Inhibition führt zu einer Internalisierung des Rezeptors und anschließendem Abbau. Gleichzeitig führt EGF-Stimulation zur Inhibition der PKA-Aktivität. Dieser Mechanismus weist damit eine neue Dimension der Feinregulierung der Rezeptoraktivität auf (Salazar and Gonzalez, 2002).

Eine außergewöhnliche Funktion konnten Lin *et al.* dem EGFR zuordnen. Sie wiesen den Rezeptor im Nukleus verschiedener Zelllinien und Geweben nach, was mit einer hohen proliferativen Aktivität dieser Zellen korrelierte. Des Weiteren konnten sie zeigen, dass der C-Terminus des Rezeptor fusioniert mit einer Gal4-DNA-Bindungsdomäne, Transkription auslösen kann und an den Zyklin D1 Promotor *in vivo* bindet (Lin, Makino *et al.*, 2001).

All diese Beispiele zeigen, dass der EGFR und seine Familienmitglieder eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion der Zelle einnehmen und daher eine hervorgehobene physiologische Funktion ausfüllen, so dass dessen Deregulation dramatische Effekte hat.

1.2.5 Die Funktionen des EGF-Rezeptors in normalem Gewebe

Die EGF-Rezeptoren werden in unterschiedlichen Konzentrationen und Kombinationen in einer Vielzahl von Geweben epithelialen, mesenchymalen und neuronalen Ursprungs exprimiert, wobei sie eine fundamentale Rolle in der Entwicklung, Proliferation und Differenzierung spielen. Nur die Zellen des hämatopoetischen Systems zeigen keine EGFR-Expression.

Die Wichtigkeit der EGF-Rezeptoren während der Entwicklung konnte anhand der Analyse EGFR-defizienter Mäusen gezeigt werden. Obwohl der Phänotyp dieser Mäuse je nach genetischem Hintergrund der Mäuse variiert, sind alle Nullmutationen dieser Rezeptoren lethal. Der Verlust des EGFR-Gens führt zu embryonaler oder perinataler Lethalität, wobei die Tiere Abnormalitäten in der epithelialen Entwicklung vieler Organen, vor allem im Gehirn, Haut, Lunge und im Gastrointestinaltrakt zeigten (Miettinen, Berger *et al.*, 1995). Der ErbB2-Rezeptor spielt eine große Rolle während der embryonalen Herzentwicklung (Lee, Simon *et al.*, 1995); ein Phänotyp, den auch ErbB4 Knock-out Mäuse zeigten (Gassmann, Casagrande *et al.*, 1995). ErbB3 defiziente Mäuse sterben an Tag E13.5. Sie zeigen zwar eine normale Struktur der Herzmuskulatur, haben aber Defekte in der Herzklappenbildung. Außerdem weisen diese Tiere generelle Defekte in der neuronalen Kruste auf und die Vorläufer der Schwann'schen Zellen fehlen völlig (Erickson, O'Shea *et al.*, 1997)). Diese Daten machen deutlich, dass die EGFR-Familie eine kritische Rolle in der Modulation der Embryogenese von Säugern spielt.

Auch im adulten Organismus haben diese Rezeptoren essentielle Aufgaben bei der Proliferation und Aufrechterhaltung verschiedenster Zellen in epithelialen und neuronalen Geweben, wie z.B. im Gastrointestinal-, Genital- und Respirationstrakt. Die am besten beschriebene Funktion dieser Rezeptoren ist ihre Rolle während der Brustdrüsenentwicklung. Die Brustdrüse zeigt das höchste Maß an Proliferation und Differenzierung erst postnatal. Bei der Geburt ist diese Drüse nur rudimentär ausgebildet und entwickelt sich erst während der Pubertät unter dem Einfluss von Steroid- und Peptidhormonen. In der Schwangerschaft kommt es zu lobulo-alveolarer Proliferation und schließlich zur Laktation (Hennighausen and Robinson, 1998) . In der Brustdrüse sind alle vier EGF-Rezeptoren in einem Zelltyp- und Entwicklungsstufen-spezifischen Muster exprimiert (Darcy, Zangani *et al.*, 2000).

Die Hauptrolle des EGFR während der Brustdrüsenentwicklung liegt in der Förderung des Wachstums der Milchdrüsengänge (Xie, Paterson *et al.*, 1997) (Wiesen, Young *et al.*, 1999), während ErbB2 und ErbB4 eine Schlüsselrolle in der lobulo-alveolaren Differenzierung und der Laktation spielen (Jones, Welte *et al.*, 1999).

1.2.6 Der EGF-Rezeptor und Krebs

Unter normalen Bedingungen unterliegt der EGFR einer strikten Kontrolle. Die Deregulation dieses eng kontrollierten Systems durch Überexpression, Genamplifikation oder Mutationen und/oder Aufhebung der regulatorischen Einschränkungen kann zur Hyperproliferation führen. Diese Zellen erlangen somit Wachstumsvorteile, so dass sich neoplastisches Gewebe und schließlich ein Tumor manifestieren kann. Den ersten Hinweis, dass der EGFR als ein Proto-Onkogen fungieren kann, war der Nachweis, dass er das zelluläre Homolog des „avian erythroblastosis virus“ v-erb-Onkogen darstellt. V-erb codiert für eine C-terminal verkürzte Version des Rezeptors, dem die extrazelluläre Domäne fehlt und zahlreiche Mutationen besitzt, so dass der Rezeptor ligandenunabhängig dimerisiert und aktiviert wird (Downward, Yarden *et al.*, 1984). Die Transfektion hoher Konzentrationen des EGF-Rezeptors und des Liganden TGF α kann die Transformation von Zellen *in vitro* induzieren (Yarden and Sliwkowski, 2001). *In vivo* führt die Überexpression des EGFR-Liganden TGF α im Mammaepithel von Mäusen zu epithelialen Hyperplasien und Mammakarzinomen (Matsui, Halter *et al.*, 1990). Es konnte gezeigt werden, dass die Mitglieder der EGFR-Familie auf einer Vielzahl von humanen Tumoren bis zu 100fach überexprimiert sind. Zwischen 80 und 100% der Kopf- und Nackentumore, ein sehr hoher Teil der Mammakarzinome, sowohl ein hoher Anteil an Karzinomen des Kolons, des Pankreas, der Ovarien, sowie Gliome zeigen eine stark erhöhte EGFR-Expression (Nagane, Lin *et al.*, 2001) (Hynes, 2000). Neben der Überexpression des Rezeptors wurden verschiedene Deletionen in der extra- und intrazellulären Domäne des EGFR in den verschiedensten Karzinomen gefunden. Eine häufig gefundene Mutation in humanen Tumoren ist EGFRvIII. Dabei handelt es sich um einen verkürzten Rezeptor, dem die Domänen I und II der extrazellulären Domäne (AS 6-273) fehlen und daher nicht zur Ligandenbindung fähig ist. Allerdings besitzt er eine konstitutiv aktive Kinasedomäne, welche Zellproliferation unabhängig von Ligandenbindung induziert (Tang, Gong *et al.*, 2000).

1.2.7 Der EGFR als Angriffspunkt für die Krebstherapie

Die bisher etablierten Tumorthérapien basieren, neben der operativen Entfernung des malignen Gewebes, auf der unselektiven Zerstörung sich stark teilender Zellen. Dies führt zu einer Reihe unerwünschter Nebenwirkungen. Aus diesem Grund wird in verschiedenen Ansätzen versucht, hochspezifische Therapien zu entwickeln, die die molekularen Ursachen der unregulierten Proliferation berücksichtigen. Es gibt mehrere Argumente, den EGFR als Angriffspunkt für eine gerichtete Tumorthérapie auszuwählen. Die häufige Überexpression und Korrelation mit einer schlechten Prognose für den Patienten, die gute Diagnostizierung in Patientenmaterial, aber auch die Abwesenheit einer physiologischen Rolle im erwachsenen Organismus machen den EGFR zu einem relevanten Target der Tumorthérapie. Zwei therapeutische Ansätze zeigten sich bisher als sehr viel versprechend: Chemische Inhibitoren der Kinaseaktivität des Rezeptors („small molecule inhibitors“) und monoklonale Antikörper oder deren Derivate. Weitere Ansätze beinhalten die Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden zur EGFR mRNA, die Verwendung von rekombinanten Proteinen aus EGF oder TGF α und einem Toxin (Abb. 1.3).

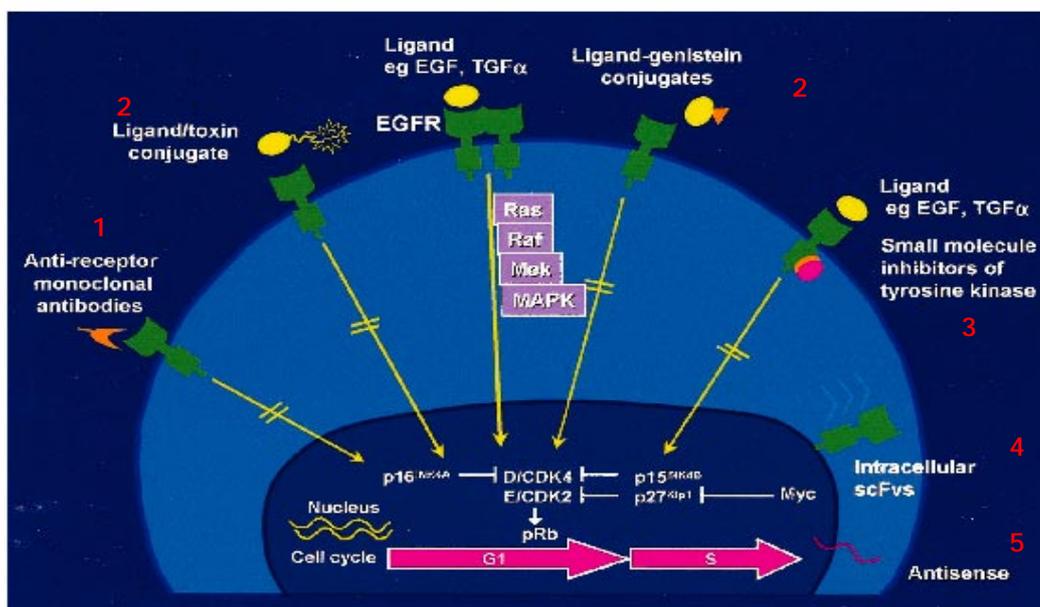


Abb.1.3: Der EGFR Signalweg und Ansätze zu dessen Inhibition.

Verschiedene Strategien zur Inhibition der EGFR-Expression oder -Aktivität werden gezeigt: Monoklonale Antikörper gegen die extrazelluläre Liganden-Bindungsdomäne (1), Liganden-Toxin Konjugate (2), „small molecule“ Tyrosinkinase-Inhibitoren (3), intrazelluläre Single-Chain-Antikörper (4) und Antisense-Oligonukleotide gegen die EGFR mRNA (5). Aus (Ciardiello and Tortora, 2001).

1.2.7.1 Inhibitoren der Kinaseaktivität (Small molecule inhibitors)

Durch Screening von kleinen Molekülen oder Strukturen aus natürlichen oder synthetisierten Banken von chemischen Verbindungen, konnten spezifische Inhibitoren der EGFR-Aktivität isoliert werden. Bei diesen Inhibitoren handelt es sich um reversible Kompetitoren für die ATP-Bindungsstelle in der Kinasedomäne des Rezeptors. Die gegenwärtig untersuchten Verbindungen lassen sich in drei Gruppen einteilen: 4-Anilinoquinazoline, 4-[ar(alk)ylamino]Pyridopyrimidine und 4-Phenylamino-pyrol-pyrimidine. Diese Verbindungen können die EGFR-Kinaseaktivität *in vitro* hochspezifisch bereits im nanomolaren Bereich hemmen. Einerseits erlaubt das niedrige Molekulargewicht dieser chemischen Substanzen eine gute Penetration in den Tumor, andererseits führt die minimale Größe zu einer geringeren Stabilität *in vivo*. Außerdem können sie oral appliziert werden, was die Inhibitoren für eine lang andauernde Therapie eignet.

Einige Verbindungen dieser Klasse wie z.B. ZD 1839 (Iressa) befinden sich bereits in klinischen Studien (Ranson, Hammond *et al.*, 2002). Eine anderer Inhibitor, PKI-166, ein reversibler Pyrolo-pyrimidin-Inhibitor wurde in der vorliegenden Arbeit als Positivkontrolle für die hier untersuchten Inhibitoren verwendet. Dieser inhibiert die Autophosphorylierung, c-fos mRNA Expression und Zellproliferation im submikromolaren Bereich. PKI-166 verringerte außerdem das Wachstum und die Metastasierung eines humanen Pankreaskrebs in Nacktmäusen (Bruns, Solorzano *et al.*, 2000).

1.2.7.2 Antikörper in der Tumorthherapie

Verschiedene monoklonale Antikörper gegen tumorspezifische Tumorantigene wurden entwickelt und auf ihre zytotoxischen oder wachstumshemmenden Eigenschaften getestet. Antikörper sind in der Regel gegen die extrazelluläre Domäne des Rezeptors gerichtet. Deren Wirkung beruht auf unterschiedlichen Mechanismen, wie komplement-vermittelter Lyse der Tumorzellen oder Antikörper-vermittelter zellulärer Zytotoxizität durch Effektorzellen. Weiterhin konnte die Induktion von Apoptose, die Hemmung autokriner Stimulation und die Bildung von Antitumor-Antikörpern durch das Anti-Idiotypnetzwerk gezeigt werden (Vitetta and Uhr, 1994). So wurden zwei Antikörper, mAb 528 und mAb 225 (Cetuximab) entdeckt, die mit der gleichen Affinität an den EGFR binden wie die natürlichen Liganden EGF und

TGF α und damit deren Bindung kompetitieren (Goldstein, Prewett *et al.*, 1995). Diese beiden Antikörper befinden sich bereits in der klinischen Testphase an Krebspatienten (Mendelsohn and Baselga, 2000). Um die Immunantwort des Patienten auf einen Maus-Antikörper zu verhindern, wurde eine chimäre humanisierte Version dieses Antikörpers (C225) generiert, der eine kontinuierliche Administration zur Erreichung eines anti-tumoralen Effekts, erlaubt. Ein weiterer bekannter Vertreter dieser Inhibitorenklasse, ist der gegen ErbB2 gerichtete monoklonale Antikörper Herceptin, der inzwischen als Medikament bei Mammakarzinomen zugelassen wurde und sich in klinischer Anwendung befindet (Baselga, Norton *et al.*, 1998).

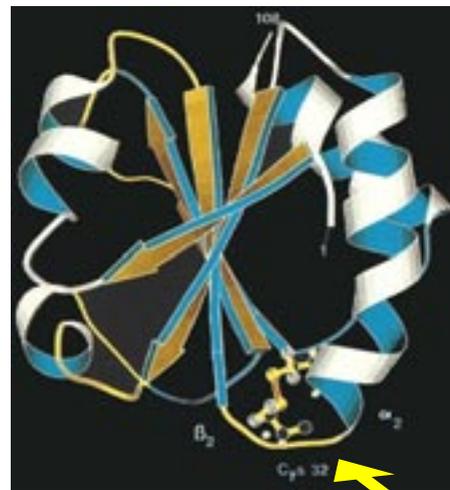
Ein weiterer Ansatz ist die Verwendung von rekombinanten Immuntoxinen. Dabei wird ein Single-Chain-Antikörper eines Rezeptor bindenden Antikörpers abgeleitet und mit einem Toxin fusioniert. Durch Liganden-vermittelte Endozytose gelangt das Immuntoxin in die Zelle und tötet diese ab (Azemar, Schmidt *et al.*, 2000). Auch intrazellulär ist die Verwendung von Single-Chain-Antikörpern möglich. So konnten Beerli *et al.* zeigen, dass ein intrazellulär exprimierter Single-Chain-Antikörper fusioniert mit einem Rückhaltesignal für das endoplasmatische Retikulum (ER retention signal) den gerade translatierten Rezeptor im endoplasmatischen Retikulum zurückhält und damit die Konzentration an der Zelloberfläche deutlich reduziert (Beerli, Wels *et al.*, 1994). Visintin *et al.* haben für solche Anwendungen einen Hefe-Zwei-Hybrid-Screen entwickelt, in welchem Single-Chain-Antikörper-Banken gegen ein beliebiges Zielprotein gescreent werden können (Visintin, Tse *et al.*, 1999). Ein gegen PhospholipaseC- γ 1 gerichteter Single-Chain-Antikörper führte zu intrazellulären Aggregaten von PLC. Dies verhinderte die EGF-induzierte Translokation von PLC- γ 1 in Membranruffles und damit deren Aktivierung (Yi, Chung *et al.*, 2001).

1.2.7.3 Peptid-Aptamere als neuartige Modellstrukturen zur Tumorthherapie

Peptid-Aptamere stellen eine neue Klasse von potentiell therapeutischen Molekülen dar, in denen eine variable Peptidomäne Affinität zu einem gegebenen Zielprotein aufweist. Ähnlich wie intrazelluläre Antikörper können diese Moleküle spezifisch mit einem gegebenem Zielprotein *in vitro* und *in vivo* interagieren, und haben das

Potential selektiv dessen Funktion zu inhibieren (Colas, Cohen *et al.*, 1996) (Cohen, Colas *et al.*, 1998).

Peptid-Aptamere sind kurze Oligopeptide und bestehen aus Aminosäuresequenzen zufälliger Reihenfolge, integriert in ein Gerüstprotein, wie z.B. das bakterielle Thioredoxinprotein (Abb. 1.4). Diese Integration veranlasst die Oligopeptide eine eingeschränkte, stabile Konformation einzunehmen. Diese verschiedenen Oligopeptide können aufgrund ihrer Interaktion mit einem spezifischen Partner in Hefezellen selektioniert werden.



Peptidinsert

Abb. 1.4: Dreidimensionale Struktur des Thioredoxinproteins,

In das katalytische Zentrum des Enzyms wurden eine 20mer randomisierte Peptidsequenz inseriert

Dieses System leitet sich aus der Zwei-Hybrid-Technologie ab (Abb.1.5), welche darauf basiert, dass eukaryontische Transkriptionsfaktoren einen modularen Aufbau besitzen.

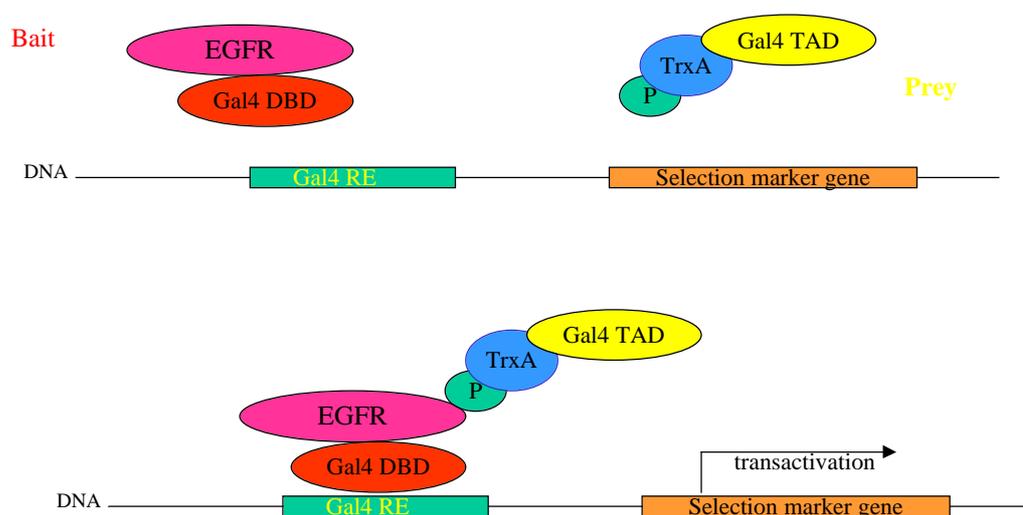


Abb.1.5 : Schema zur Selektion von Peptid-Aptameren im Hefe-Zwei-Hybrid-System

Durch Interaktion zwischen „Bait“ (Gal4-DNA-Bindungsdomäne (DBD) fusioniert mit dem Zielprotein) und dem „Prey“ (Gal4-Transaktivierungsdomäne (TAD) fusioniert mit der Peptid-Aptamer Library) wird ein funktionsfähiger Transkriptionsfaktor gebildet. Dadurch kommt es zur Expression von Markergenen, die das Wachstum der Hefe unter bestimmten Selektionsbedingungen sicherstellen.

Eukaryontische Transkriptionsfaktoren bestehen aus einer DNA-Bindungsdomäne und einer Transaktivierungsdomäne, die nicht notwendigerweise auf einer Polypeptidkette lokalisiert sein müssen, um ihre Funktion bei der Transkriptionsregulation zu erfüllen. Die unmittelbare physische Nachbarschaft reicht aus, um einen kompletten Transkriptionsfaktor zu regenerieren. Diese Tatsache hat die Möglichkeit geschaffen, durch funktionelle Komplementation, Proteindomänen zu identifizieren, die diese Nachbarschaft vermitteln.

Zu diesem Zweck wird ein Interaktionspartner mit der DNA-Bindungsdomäne des Gal4-Transkriptionsfaktors fusioniert, das als „Bait“ (=Köder) Konstrukt bezeichnet wird. Die Transaktivierungsdomäne von Gal4 wurde mit dem bakteriellen Thioredoxin fusioniert, in dessen aktivem Zentrum eine 20mer randomisierte Peptidsequenz inseriert wurde („prey“). Beide Plasmide werden in einen genetisch modifizierten Hefestamm eingebracht, der verschiedene Selektionsmarker enthält (ADE2, HIS3 und URA3). Nur wenn das Peptid an das Zielprotein bindet, wird ein vollständiger Gal4-Transkriptionsfaktor regeneriert und das Selektionsgen abgelesen. Die Selektion mit Markern verschiedener Stringenz erlaubt die Isolierung von Peptid-Aptameren mit hoher Affinität zum Zielprotein. Gleichzeitig wird die Zahl falsch positiv interagierender Klone reduziert.

Es gibt zunehmend Beispiele in der Literatur, dass Peptid-Aptamere, die auf diese Weise isoliert wurden, zelluläre Funktionen inhibieren können und somit in der Therapie eingesetzt werden können. Colas *et al.* konnten als Erste zeigen, dass solche Peptid-Aptamere spezifisch mit den Funktionen eines Zielproteins interferieren können. Diese Moleküle binden mit Dissoziationskonstanten zwischen 30 und 120 nM an die Zyklin-abhängige Kinase Cdk2 und blockieren dessen Kinaseaktivität (Colas, Cohen *et al.*, 1996), mit der Folge, dass der Zellzyklus in der G1-Phase arretiert wird (Cohen, Colas *et al.*, 1998). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass solche Moleküle auch *in vivo* ihre Funktion ausüben. Die Expression von Peptid-Aptameren, die gegen die Drosophila Zellzyklusproteine DmCdk 1 und 2 gerichtet sind, induzieren während der Organogenese Defekte im Fliegenauge, die typisch für Effekte nach Inhibition des Zellzyklus sind (Kolonin and Finley, 1998). Andere Studien konnten zeigen, dass durch Expression eines Aptamers, welches die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors E2F verhindert, ebenfalls ein Zellzyklusblock erreicht werden kann (Fabbrizio, Le Cam *et al.*, 1999). Auch nichtzelluläre wie z.B. virale Protein können mittels dieses Systems inhibiert werden. Ein Aptamer gegen das

humane Papillomavirus 16 (HPV16) E6-Onkoprotein konnte HPV16 positive Zellen in die Apoptose treiben, während nicht infizierte Zellen unbeeinflusst bleiben (Butz, Denk *et al.*, 2000). Eine andere Gruppe benutzte das E7-Onkoprotein als Zielprotein und konnte ähnliche Effekte erreichen (Nauenburg, Zwerschke *et al.*, 2001). Ein dritter Ansatz benutzte das Hepatitis B Virus-Core-Protein als Angriffspunkt. Die hierbei selektierten Aptamere inhibierten die virale Kapsidbildung und die HBV-Replikation (Butz, Denk *et al.*, 2001). Ein ähnlicher Ansatz wurde auch in Bakterien entwickelt, wobei die abgeleiteten Moleküle eine bakteriostatische Wirkung zeigten (Blum, Dove *et al.*, 2000).

Da Aptamere eine spezifische, intrazellulär inhibitorische Funktion auf Proteine und sogar auf zelluläre Prozesse haben können, haben sie offensichtlich ein großes therapeutisches Potential. Dabei sind prinzipiell drei Strategien für die therapeutische Applikation denkbar (Hoppe-Seyler and Butz, 2000): Zum einen können die kodierende Sequenzen in Form von Gentherapie-Vektoren in Zellen eingebracht werden, wo sie intrazellulär exprimiert werden. Die Entwicklung effektiver und sicherer Gentherapie-Delivery-Systeme ist jedoch zur Zeit noch nicht abgeschlossen. Zweitens ist es denkbar, Aptamere direkt als Therapeutika einzusetzen, was jedoch ebenfalls noch einige Probleme beinhaltet. So haben Proteine eine geringe metabolische Stabilität, können potentiell immunogen wirken und haben *per se* nicht die Eigenschaft Zellmembranen zu durchdringen. Dennoch gibt es inzwischen einige Fortschritte mittels derer Proteine in Zellen eingebracht werden können. Diese sollen in Kapitel 1.3 näher diskutiert werden. Als dritte Option, ermöglichen Aptamere die Entwicklung von synthetischen Verbindungen (drug design). Die geringe Größe der Peptide und ihre Präsentation durch strukturell bereits aufgeklärte Gerüstproteine (im vorliegenden Fall das bakterielle Thioredoxinprotein) sollte die Identifikation der drei-dimensionalen Struktur erleichtern. Diese könnte als Leitstruktur zur Herstellung peptido-mimetischer Verbindungen dienen, welche bessere pharmakologische Eigenschaften als Peptide oder Proteine besitzen.

1.3 Einbringung therapeutischer Proteine in Säugerzellen durch Proteintransduktion

Da die Zellmembran für die meisten Peptide und Proteine undurchlässig ist, war die Einbringung therapeutischer Proteine in Gewebe oder Organe bisher sehr schwierig

und durch die Größe und biochemischen Eigenschaften des Proteins limitiert. So war es bis vor kurzem nur möglich, bioaktive Peptide durch Zellmembranen zu bringen, wenn sie sehr klein oder hoch lipophil waren. In der Zellkultur ist es auch möglich exogene Proteine bzw. die für sie codierende DNA durch verschiedene Transfektionsmethoden in Zellen einzubringen. Dies bringt jedoch den Nachteil sehr diverser Effizienzen und verschiedener Expressionslevel mit sich.

Im Jahre 1988, entdeckten zwei Gruppen unabhängig von einander, dass das HIV TAT Protein in der Lage ist, Zellmembranen zu durchdringen (Green and Loewenstein, 1988) (Frankel and Pabo, 1988). Dieses Phänomen konnte 1994 von Fawell *et al.* dazu genutzt werden, ein heterologes Protein, das chemisch mit einem 38 Aminosäuren umfassenden Teil des TAT Proteins verbunden war, in Zellen zu transduzieren (Fawell, Seery *et al.*, 1994). Andere Transduktionsdomänen konnten identifiziert werden, wie z.B. das Antennapedia (Antp) von Drosophila (Joliot, Pernelle *et al.*, 1991) und das HSV VP22 Protein des Herpes Simplex Virus (Elliott and O'Hare, 1997).

PTD	Aminosäuresequenz
HIV-1 Tat	Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg
HSV VP22	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
ANTP	Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys

Abb. 1.6: Aminosäuresequenz, 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 VP22 Protein vermitteln. Im Antennapedia Protein (Antp) ist die dritte α -Helix (aa 43-58) für die Transduktion verantwortlich. Verändert nach (Schwarze and Dowdy, 2000).

Alle Proteintransduktionsdomänen (PTD) zeichnen sich durch das zahlreiche Vorkommen basischer Aminosäuren (Arginin und Lysin) aus, die für die Interaktion mit der Lipidbilayer verantwortlich sind (Abb. 1.6).

Neben den erwähnten natürlich vorkommenden PTDs gibt es zahlreiche Ansätze synthetische Sequenzen zu generieren, die optimale Transduktionseigenschaften aufweisen. So konnten Wender *et al.* zeigen, dass ein Peptid aus neun L-Argininen 20fach effizienter, ein D-Arginin Oligomer sogar 100fach besser, in Jurkat-Zellen transloziert als TAT. Für den Mechanismus der Transduktion wird angenommen, dass das Guanidium des Arginins eine größere Rolle spielt, als die Ladung oder die

„backbone“ Struktur des Proteins (Wender, Mitchell *et al.*, 2000). Mai *et al.* hingegen zeigen, dass die Effizienz der Transduktion sehr von der verwendeten Zelllinie abhängt, wobei sie gleichzeitig nachweisen konnten, dass im Durchschnitt Polylysins-Sequenzen effizienter die Transduktion vermitteln können als TAT und Argininreste (Mai, Shen *et al.*, 2002). Der Mechanismus mit Hilfe dessen diese Proteintransduktionsdomänen die Translokation durch die Zellmembran vermittelt, ist bisher noch nicht aufgeklärt. Da die Transduktion sowohl bei 37°C als auch bei 4°C erfolgen kann und nicht abzusättigen ist, erfolgt die Aufnahme wahrscheinlich nicht nach einem klassischem Rezeptor-, Transporter- oder Endozytose-vermittelten Mechanismus (Derossi, Calvet *et al.*, 1996). Tyagi *et al.* schlagen vor, dass Heparinsulfatproteoglykane auf der Zellmembran als Rezeptoren für die Aufnahme der Proteine dienen, da Zellen, die nicht in der Lage sind solche Moleküle zu synthetisieren oder mit entsprechenden Glycosaminoglykan-Lyasen behandelt sind, kaum TAT-Proteine aufnehmen können (Tyagi, Rusnati *et al.*, 2001). Die Frage des exakten Mechanismus bleibt weiterhin unklar und es ist auch denkbar, dass jede PTD einen anderen Mechanismus benutzt.

Es existieren diverse Beispiele, dass heterologe Peptide, Proteine oder DNA, die chemisch oder genetisch mit der PTD verknüpft wurden, in Zellen eingebracht werden können. Scheinbar gibt es keine limitierende Größe der zu transduzierenden Proteine, da ein kleines 20 kDa Protein sofort in die Zelle transloziert und dort unmittelbar biologisch aktiv ist, während Proteine mit einer Größe von 120 kDa innerhalb von 5 min transduzieren und erst nach einiger Zeit ihre Funktion entfalten (Schwarze, Ho *et al.*, 1999). Ein Fusionsprotein aus TAT und β -Galaktosidase wurde bakteriell denaturierend exprimiert und war nach 15 min in transduzierten Zellen nachweisbar, zeigte aber erst nach 2h enzymatische Aktivität. Dies wurde damit erklärt, dass das Protein erst durch die zelluläre Maschinerie wie z.B. Chaperone korrekt gefaltet werden muss (Schwarze, Ho *et al.*, 1999). Das gleiche Protein wurde intraperitoneal in Mäuse injiziert, wo es nahezu in allen Geweben wie Leber, Niere, Lunge, Herz und Milz nachweisbar war. Es gelangte ebenfalls durch die Blut-Hirn-Schranke und zeigte auch dort enzymatische Aktivität (Schwarze, Ho *et al.*, 1999). In weiteren Experimenten konnte dominant negatives I κ B (TAT-I κ B⁴⁶⁻³¹⁷) durch die TAT-PTD in Osteoclasten eingebracht werden und die Osteoclastengnese verhindern (Abu-Amer, Dowdy *et al.*, 2001). Dass Proteine, die mittels dieser Methode in Zellen

eingebraucht wurden, auch einen therapeutischen Effekt vermitteln können, zeigt eine Studie, in der ein TAT-Bcl-xL-Fusionsprotein in primäre Neuronenkulturen und in Mausmodelle eingebracht wurde. Mäuse, die eine cerebrale Ischämie aufwiesen, wurden intraperitoneal mit dem Fusionsprotein behandelt und zeigten einen geringeren Apoptosegrad im Gehirn als unbehandelte Tiere, was durch das rekombinante Bcl-xL-Protein vermittelt wurde (Cao, Pei *et al.*, 2002). Diese Beispiele zeigen, dass die Methode der Proteintransduktion gut geeignet ist, um einerseits Signalwege und den Einfluss von potentiellen Inhibitoren auf diese zu studieren, sich aber auch dazu eignet, diese Inhibitoren therapeutisch einzusetzen.

1.4 Degradierung zellulärer Proteine

Neben den oben beschriebenen Mechanismen können zelluläre Prozesse auch durch den Abbau der beteiligten Proteine reguliert werden. Dies ermöglicht eine schnelle Veränderung ihrer Konzentration und folglich ihrer Aktivität. So sind beispielsweise Zykline sehr stabil, bis sie zu einem spezifischen Zeitpunkt im Zellzyklus rasch degradiert werden. Ein kontrollierter Abbau ist auch zur Entfernung missgefalteter und anormaler Proteine wichtig (Ciechanover, Orian *et al.*, 2000).

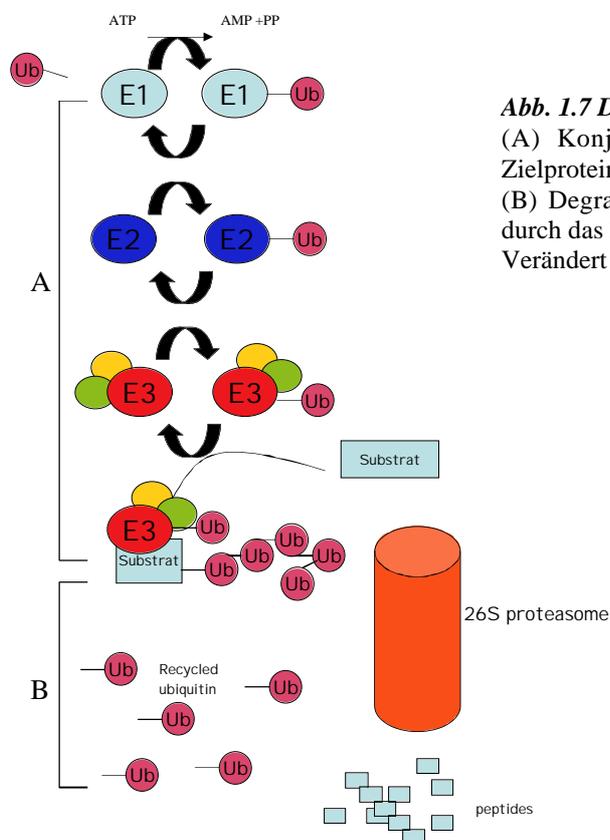


Abb. 1.7 Der Ubiquitin-Proteasom-Weg
 (A) Konjugation des Ubiquitin-Moleküls an das Zielprotein
 (B) Degradation des poly-ubiquitinylierten Substrats durch das 26S Proteasom
 Verändert nach (Ciechanover, 2000)

Dazu werden die Proteine durch kovalente Anheftung eines kleinen Proteins namens Ubiquitin markiert (Abb. 1.7 A). Dadurch nehmen die Proteine Kontakt mit dem 26S Proteasom auf, dessen Proteasen die so markierten Proteine abbauen (Abb. 1.7 B). Zunächst aktiviert das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 den C-terminalen Glycinrest des Ubiquitins durch Ausbildung eines Thioesters mit einem Cysteinrest des E1-Enzyms. Eines von verschiedenen E2-Enzymen (Ubiquitin-konjugierende Enzyme) transferiert dann das Ubiquitin über ein E2-Ubiquitin-Intermediat auf das Substrat. An das Substrat bindet spezifisch eine E3-Ligase. Dieses E3-Enzym katalysiert dabei die kovalente Bindung des Ubiquitins an einen Lysinrest des Substrats. In sukzessiven Reaktionen werden anschließend weitere aktivierte Ubiquitine an das bereits Vorhandene angeheftet (Abb. 1.7 A). Das 26S Proteasom setzt sich aus einem katalytischem 20S Partikel, sowie einer regulatorischen 19S Einheit zusammen. Erstere erkennt ubiquitinylierte Proteine und leitet sie in die fassförmige Struktur der proteolytischen Untereinheit. Hier erfolgt der Abbau zu kurzen Peptiden sowie freiem Ubiquitin, welches „recycled“ wird (Abb. 1.7 B).

Auch dieses System wird streng kontrolliert und muss hochspezifisch agieren. Während ein einziges E1-Enzym alle zellulären Ubiquitinreaktionen katalysiert und es nur wenige E2-Enzyme gibt, gibt es zahlreiche E3-Ligasen, die hochspezifisch direkt oder indirekt über ein weiteres Protein mit dem Substrat interagieren. E3-Enzyme wirken dabei als Plattformen für die Assemblierung sowohl des E2-Enzyms als auch der Substrate. Die Erkennung des Substrats durch die E3-Ligase kann dabei konstitutiv über bestimmte destabilisierende Aminosäuren im N-Terminus des Substrats erfolgen oder abhängig von sekundären Modifikationen oder des Substrats sein. So werden beispielsweise NF κ B und β -Catenin erst nach Phosphorylierung durch den SCF-E3-Ligase-Komplex gebunden und abgebaut (Yaron, Hatzubai *et al.*, 1998) (Kitagawa, Hatakeyama *et al.*, 1999). Bei anderen Proteinen wie z.B. p53 erfolgt die Erkennung erst nach Interaktion mit einem weiteren Protein. Das onkogene Papillomavirus (HPV) 16 und 18 degradiert gezielt das Tumorsupressorprotein p53. Das HPV E6-Protein interagiert zunächst mit E6-AP (E6 associated protein). Erst dieser Komplex interagiert spezifisch mit p53, was in einen raschen Ubiquitin-abhängigen Abbau von p53 resultiert (Scheffner, Huibregtse *et al.*, 1993).

Ein anderes Beispiel für eine solche Regulation über sekundäre Modifikationen stellt der Jak/STAT-Signalweg dar. Dieser Signalweg wird neben Dephosphorylierung auch

durch den Abbau durch das Ubiquitin/Proteasom-System reguliert. SOCS-Proteine (suppressors of cytokine signalling) binden über ihre SH2 Domäne an Jak und STAT-Proteine, während sie über die C-terminale SOCS-Box-Domäne mit dem Elongin B und Elongin C-Komplex interagieren. Dieser Komplex rekrutiert Cullin-2, Rbx1 und das E2-Ubiquitin-konjugierendem Enzym. Daher gehören die SOCS-Proteine zur Familie der E3-Ubiquitin-Ligasen (Kamizono, Hanada *et al.*, 2001). Die SOCS-Box ist eine aus 40 Aminosäuren bestehende Sequenz im C-Terminus der SOCS-Proteine. Auch in einer Reihe weiterer Proteine konnte diese Domäne identifiziert werden. Diese Proteine besitzen allerdings, anstatt einer SH2-Domäne wie die SOCS-Proteine, andere Motive zur Interaktion mit weiteren Molekülen, wie z.B. WD-40 oder ankyrin repeats (Hilton, Richardson *et al.*, 1998).

1.5 Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit

Es gibt zahlreiche Ansätze wie die individuellen Veränderungen in einer Tumorzelle in der Krebstherapie manipuliert werden können, z.B. durch chemische Kinaseinhibitoren, Single-Chain-Antikörper etc. (siehe Kapitel 1.2.7). Kleine Proteine und Peptide, wurden in den letzten Jahren vermehrt Gegenstand der angewandten Krebsforschung, da sie im Vergleich zur Chemo- oder Strahlentherapie eine hohe Spezifität für die Tumorzellen besitzen. Sie weisen eine geringere Toxizität auf und akkumulieren nicht in Organen (Sehgal, 2002). Des Weiteren können sehr große Peptidbanken generiert werden, so dass durch entsprechende Screeningsysteme, hochspezifische Interaktionspartner für komplexe Struktur, wie z.B. Wachstumsfaktorrezeptoren gefunden werden können. Somit ist es möglich, ein beliebiges Zielprotein, dessen Rolle in der Krebsentstehung zuvor evaluiert wurde, in einem solchen Screen einzusetzen, und ein spezifisch interagierendes Peptid abzuleiten. Ein solches System stellt auch das Peptid-Aptamer-System dar.

In der vorliegenden Arbeit sollte nachgewiesen werden, dass durch das Peptid-Aptamer-System, Moleküle isoliert werden können, welche hochaffin an das Zielprotein binden und dessen Funktion spezifisch beeinflussen können. Dazu wurde als Targetprotein der epidermale Wachstumsfaktor (EGF)-Rezeptor ausgewählt. Die Regulation des EGF-Rezeptor ist essentiell an der Entstehung zahlreicher Tumore beteiligt. In einem Drittel aller Tumore epithelialen Ursprungs ist der Rezeptor überexprimiert. Es gibt zahlreiche Beispiele, dass eine Inhibition des EGF-Rezeptors

als effektive Tumorthherapie Anwendung finden kann. Daher sollten in dieser Arbeit Peptid-Aptamere isoliert werden, die spezifisch mit essentiellen Domänen des Rezeptors interagieren. Als Angriffspunkt wurde die Kinasedomäne des Rezeptors ausgewählt, da die Funktionsweise des Rezeptors grundlegend von der Aktivität der Kinase abhängt. Es wurde davon ausgegangen, dass ein Aptamer, welches spezifisch mit der Kinasedomäne des Rezeptors interagiert, die Signalleitung des gesamten Rezeptors blockieren kann. Die Interaktion zwischen den so isolierten Peptiden und dem Rezeptor sollte *in vitro* und *in vivo* durch verschiedene Methoden verifiziert werden. Außerdem sollten Systeme entwickelt werden, mit denen die selektierten Peptide in Zielzellen eingebracht werden können. Zum einen sollten Zelllinien generiert werden, die die isolierten Peptid-Aptamere stabil exprimieren. Zum anderen können die Aptamere durch Fusion einer Proteintransduktionsdomäne sehr einfach, schnell und in hohen Konzentrationen in Zielzellen eingebracht werden. Dies erleichtert einerseits die Untersuchung der Wirkung der Aptamere und ist andererseits auch für den potentiellen Einsatz in der Tumorthherapie denkbar. Dass solche zellpermeablen Peptide krebsrelevante Moleküle spezifisch inhibieren können, wurde mit Peptiden gegen MAPK, sowie gegen eine Caspase gezeigt (Kelemen, Hsiao *et al.*, 2002) (Harada, Hiraoka *et al.*, 2002).

Darüber hinaus sollte evaluiert werden, ob die isolierten Peptid-Aptamere die Funktionen des EGF-Rezeptors inhibieren können. Zum einen sollte untersucht werden, ob der proliferative und transformierte Phänotyp von EGF-stimulierten Zellen durch die selektierten Aptamere beeinflusst wird. Des Weiteren sollten die biochemischen Auswirkungen der Aptamer/Rezeptor-Interaktion auf die Signalleitung des EGF-Rezeptors untersucht werden. Für diese Untersuchungen sollten beide Methoden zur Einbringung der Peptid-Aptamere in Zellen parallel angewandt werden, was zum einen die Ergebnisse einer Methode zusätzlich bestätigt. Zum anderen eignet sich die Proteintransduktion dazu, die genauen Parameter der Aptamer/Rezeptor-Interaktion näher zu charakterisieren, da die Aptamere zu definierten Zeitpunkten und in verschiedenen Konzentrationen in die Zielzellen eingebracht werden können.

Die Peptid-Aptamere wurden im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen lediglich aufgrund ihrer Fähigkeit mit dem Rezeptor zu interagieren, selektiert. Dies erlaubt jedoch keine Schlüsse auf ihre Fähigkeit, mit den Funktionen des Rezeptors zu interferieren oder im besten Fall die Rezeptoraktivität vollständig zu inhibieren. Daher sollte ein weiteres System etabliert werden, in dem über eine Bindung des Aptamers an das

Zielprotein eine zusätzliche Funktion vermittelt wird, so dass das Zielprotein vollständig inhibiert wird. Dazu ist es denkbar, das Zielprotein in ein Kompartiment zu verbringen, wo es seine Funktion nicht mehr ausüben kann. So wäre es denkbar Transkriptionsfaktoren, wie z.B. die STAT-Proteine über ein gebundenes Aptamer in der Membran zu verankern oder einen Membranrezeptor während des Transports vom endoplasmatischen Retikulum (ER) zur Membran in einer der Organellen fest zu verankern. Letzteres konnte bereits mit einem ErbB2-spezifischen Single-Chain-Antikörper gezeigt werden, welcher eine ER-Rückhaltesequenz („ER retention signal“) besitzt, so dass der Rezeptor nach der Synthese am ER verbleibt und die funktionelle Rezeptorkonzentration in der Membran deutlich reduziert wird (Beerli, Wels *et al.*, 1994). Des Weiteren wäre es für den therapeutischen Einsatz sinnvoll, dass onkogene Protein gezielt zu degradieren, so dass in einer überexprimierenden Zelle wieder physiologische Konzentrationen des Proteins erreicht werden können. Daher sollten, die selektierten Aptamere zusätzlich, mit einer funktionellen Domäne, wie z.B. der SOCS-Box versehen werden. Über die Bindung des SOCS-Box-Aptamers an den Rezeptor kommt dieser in engen Kontakt mit einem E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex, so dass er durch Ubiquitinylierung verstärkt für den Abbau markiert wird. Ist diese gezielte Degradation höher als die Neusynthese, kann die zelluläre Konzentration des EGF-Rezeptors verringert werden und es sollte sich wieder eine normale, regulierte Signaltransduktion einstellen. Durch ein solches System kann Aptameren, die spezifisch an ein Zielprotein binden, aber dessen Funktionen nicht beeinflussen, eine zusätzliche, inhibitorische Wirkung auf die Signaltransduktion des Zielproteins gegeben werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Plasmide

Hefe-Expressionsvektoren

Name	Insert	Referenz
pAD Trx Library	Peptid-Aptamer Library inseriert in das Thioredoxingen mit Gal4-Aktivierungsdomäne	F. Hoppe-Seyler, Heidelberg
pPC97 EGFR KDI	Bait-Konstrukt (Kinasedomäne 1 des EGFR) fusioniert mit Gal4 DNA-Bindungsdomäne	diese Arbeit
pTD1	Großes T-Antigen fusioniert mit Gal4-Aktivierungsdomäne	Matchmaker Yeast-Two-Hybrid Sytem, Clontech Inc.
pVA3	p53 fusioniert mit Gal4 DNA-Bindungsdomäne	Matchmaker Yeast-Two-Hybrid Sytem, Clontech Inc.
pLam5	Humanes LaminC fusioniert mit Gal4 DNA-Bindungsdomäne	Matchmaker Yeast-Two-Hybrid Sytem, Clontech Inc.

Bakterielle Expressionsvektoren

Name	Insert	Referenz
pGex 4T3-Trx	GST fusioniert mit TrxA	F. Hoppe-Seyler, Heidelberg
pGex 4T3-KDI1 pGex 4T3-KDI3 pGex 4T3-KDI4	GST fusioniert mit verschiedenen Peptid-Aptameren	diese Arbeit
pET30-Trx-9R	Thioredoxin A mit 9 Arginin-PTD und His-Tag	diese Arbeit
pET30-KDI1-9R pET30-KDI3-9R pET30-KDI4-9R	Verschiedene Peptid-Aptamere mit 9 Arginin-PTD und His-Tag	diese Arbeit
pET30-KD1-9R-SOCS pET30-KD3-9R-SOCS pET30-KD4-9R-SOCS	Verschiedene Peptid-Aptamere mit 9 Arginin-PTD, His-Tag und SOCS-Box -Domäne	diese Arbeit

Eukaryontische Expressionsvektoren

Name	Insert	Referenz
pRC/CMV-VP22-Trx	VP22-PTD fusioniert mit Thioredoxingen	F. Hoppe-Seyler, Heidelberg
pRC/CMV-VP22-KDI1 pRC/CMV-VP22-KDI3 pRC/CMV-VP22-KDI4	Verschiedene Peptid-Aptamere fusioniert mit VP22-PTD	diese Arbeit
p β -Gal	β -Galaktosidase-Expressionsvektor	AG Groner
p α MG	STAT3- Reporterkonstrukt: α -Macroglobulin Promotor fusioniert mit Luziferasegen	AG Groner

2.1.2 Antikörper

Spezifität	Ursprung	Hersteller
ErbB2	Maus, monoklonal	Santa Cruz
EGFR, extrazelluläre Domäne (Sc-120)	Maus, monoklonal	Santa Cruz
EGFR (Sc-03)	Kaninchen, polyclonal	Santa Cruz
EGFR PY 845, EGFR PY 1068 EGFR PY 1086, EGFR PY 1148 EGFR PY 1173 Phospho-Tyrosin spezifisch	Kaninchen, polyklonal,	Biosource
EGFR PY 845, EGFR PY 992 Phospho-Tyrosin spezifisch	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling, NEB
Gal4-DNA-Bindungsdomäne	Maus, monoklonal	Clontech
p42/p44 P-S/T Phospho-Serin/Threonin spezifisch	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling, NEB
p42/p44 (Erk1/2)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling, NEB
Shc PY 317 Phospho-Tyrosin spezifisch	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling, NEB
STAT3 PY 705 Phospho-Tyrosin spezifisch	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling, NEB
STAT3	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz
Aktin (C-11)	Ziege, polyklonal	Santa Cruz
Ubiquitin	Kaninchen, polyklonal	Sigma

2.1.3 Primer

EGFR KDI Sal I 5'-ATCTCGTCGACCTTCAAAAAGATCAAAGTGCTGGGC-3'

EGFR KDI NotI 5'-AAGGAAAAAGCGGCCGCTCACCAGTACGTTTCCTGGCCTGC-3'

2.1.4 *E. coli* Stämme und Anzuchtbedingungen

Stamm	Genotyp	Referenz
BL-21 (DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS (cam ^R)	Navagen Inc.
DH10B	F ⁻ <i>mcrA(mrr-hsdRMS-mcrBC)φ80d lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA endA1 araD139 Δ(ara,leu)7697 galU galK λ⁻ rpsL nupG</i>	Life Technologies
XL-1 blue	SupE44, <i>hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lac⁻, F'(proAB⁺, lac I^q, lac Z,Δ M15, Tn110 (tet^r)</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989

Plasmidhaltige Bakterien wurden über Nacht bei 37°C und 200 rpm in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angezogen. Die langfristige Lagerung der plasmidhaltigen Stämme erfolgte bei -80°C in LB-Medium mit 50% Glycerin.

2.1.5 Zelllinien und Medien

Zelllinie	Herkunft/Eigenschaften	ATCC-Nr./ Referenz
A431	Humanes Vulvakarzinom, hohe EGFR Expression	CRL-1555
Herc	NIH 3T3 stabil transfiziert mit humanem EGFR	(Di Fiore, Pierce <i>et al.</i> , 1987)
MDA-MB 468	Humanes Mammakarzinom	
Renca EGFR	Murines renales Karzinom Stabil transfiziert mit humanem EGF Rezeptor	(Schmidt, Maurer-Gebhard <i>et al.</i> , 1999)
Renca ErbB2	Murines renales Karzinom Stabil transfiziert mit humanem ErbB2 Rezeptor	(Schmidt, Maurer-Gebhard <i>et al.</i> , 1999)
SKBR3	Humane Brustkarzinom- Zelllinie, hohe ErbB2 Expression	HTB-30

Die verwendeten Säugerzelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, zweimal wöchentlich mit frischem Medium versorgt und mindestens einmal pro Woche mit Trypsin (5 min, 37°C) abgelöst und verdünnt wieder ausgesät. Dem Medium wurde 10% hitzeinaktiviertes FCS, 2mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin zugegeben. Die Langzeitaufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff in einem Medium aus FCS/10% DMSO.

2.1.6 Hefestamm und Anzuchtbedingungen

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>KF1</i>	<i>MATa trp1-901 leu2-3,112 his 3-200 gal4D gal80D LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ SPAL10-URA3</i>	(Butz, Denk <i>et al.</i> , 2000)

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

2.1.7 Lösungen und Puffer

DNA-Gel Ladepuffer (6x):	Ficoll	15%
	EDTA	25 mM
	Bromphenolblau	
PBS (1x):	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	4,3 mM
	KH ₂ PO ₄	1,4 mM
SOB-Medium	Trypton/Pepton	20g
	Hefeextrakt	5g
	NaCl	0,5g
	KCl	600 ml 4M
	Ad 990 ml H ₂ O	
	pH 7,0	autoklavieren
SOC-Medium	MgCl ₂	10 ml 1M
	SOB-Medium + Glukose (steril)	20 ml /l 1M
TE (1x)	Tris-HCl pH 7,4	10 mM
	EDTA	1 mM
TAE (1x)	Tris-Acetat	40 mM
	EDTA	1mM

2.1.8 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Grundchemikalien wurden von den Firmen Roth, Merck, Fluka und Sigma bezogen. Restriktionsenzyme sowie weitere Enzyme der Molekularbiologie, als auch Größenstandards für DNA-Fragmente stammen von New England BioLabs. Molekulargewichtsmarker für Proteine, sowie der Protein Assay Kit zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurden bei BioRad bezogen. Bestandteile von Nährmedien zur Anzucht von Hefen wurden bei BIO101 gekauft. Plastikwaren für die

Zellkultur wurden von den Firmen Greiner, Costar, Beckton Dickinson oder Schleicher&Schuell bezogen.

2.2 Molekularbiologische Methoden

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

2.2.1 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Spezifische DNA-Segmente wurden mit einem GeneAmp 9600 amplifiziert. Die Reaktion wurde in einem 50 µl Ansatz bestehend aus DNA-Template, DNA-Polymerase-Puffer, je 50 pmol der entsprechenden Primer (3' und 5' Primer), 40 pmol des dNTP-Mix und 2 U DNA- Polymerase durchgeführt. Die Denaturierung der DNA-Matrize erfolgte für eine Minute bei 95°C, während für die 0,5 minütige Hybridisierung der Primer eine Temperatur ca. 5°C unter des T_m -Wertes gewählt wurde. Die Polymerasereaktion wurde bei 72°C mit einer Minute pro Kilobasenpaar durchgeführt. Es erfolgten 25-35 Zyklen, die durch eine abschließende 10 minütige Synthesephase bei 72°C abgeschlossen wurden. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, analysiert und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel eluiert.

2.2.2 Enzymatische Behandlung der DNA

2.2.2.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

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

2.2.2.2 Dephosphorylierung von 5´Enden

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

2.2.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation wurden verschiedene molare Verhältnisse von dephosphoryliertem Vektor und einzufügendem Insert eingesetzt (1:2 bis 1:10). Die Ligation erfolgte mit 1 µl T4-DNA-Ligase (New England BioLabs: 40 U/µl) in 1xLigase-Puffer in einem 20-50 µl Gesamtansatz bei 16°C für 4-16 h. Die Hälfte des Ligationsansatzes wurde anschließend für die Transformation von *E.coli* eingesetzt.

2.2.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten und zur Reinigung von PCR-Produkten eingesetzt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente zur Anode ist dabei proportional zur Größe, welche anhand eines DNA-Längenstandards abgeschätzt werden kann. Es wurden in der Regel 1%ige TAE-Gele verwendet (Auftrennungsbereich 0,5-6 kb), die mit 0,002 % (v/v) Ethidiumbromid versetzt wurden, welches in die DNA interkaliert und unter UV-Bestrahlung Licht emittiert. Der Gellauf erfolgte in 1xTAE-Puffer bei einer kontinuierlichen Spannung von 10 mV/cm Gellänge. Anschließend wurden die Fragmente unter UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht und mit einer Videokamera photographiert.

2.2.4 Transformation von Plasmiden in *E.coli*

Um neuklonierte Plasmide zu selektieren und zu vervielfältigen mußten sie in Bakterien eingebracht werden.

2.2.4.1 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

A.) Chemokompetente Bakterien (XL-1 blue):

Lösung 1: 100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 30 mM KaAc, 10 mM CaCl₂, 13% Glycerol(v/v) pH 5,8; sterilfiltrieren

Lösung 2: 10 mM MOPS (pH 7,0), 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 13 % Glycerol (v/v) pH 7,0; sterilfiltrieren

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

B.) Elektrokompente Bakterien (DH10B):

Eine Einzelkolonie der Bakterien wurde über Nacht in 5 ml LB-Medium angezogen und am nächsten Tag in 500 ml LB bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 wachsen gelassen. Die Zellen wurden anschließend für 10-15 min auf Eis gekühlt und 20 min bei 5.000xg und 2 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden in 5 ml Eiswasser resuspendiert und 500 ml Eiswasser hinzugegeben. Es erfolgte erneut eine Zentrifugation und die Zugabe von 5 und 500 ml Eiswasser. Die Zellen wurden wie oben zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in der verbleibenden Flüssigkeit gelöst. Die Zellen wurden frisch verwendet oder zur Lagerung mit 10 % Glycerol versetzt, aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt. Die Transformationseffizienz dieser Zellen beträgt $\geq 10^9$ pro µg DNA.

2.2.4.2 Transformation in chemokompetente Bakterien

Die Hälfte eines Ligationsansatzes wurde zu 50 µl chemokompetenten Zellen (XL1-blue) gegeben, welche auf Eis aufgetaut wurden. Die Aufnahme der Fremd-DNA in die Zellen wurde durch Kältestreß (30 min auf Eis) und anschließendem Hitzeschock (90 s, 42°C) forciert. Die Zellen wurden kurz auf Eis abgekühlt und dann mit 500 µl LB-Medium (ohne Antibiotika) 0,5 h bei 37°C vorkultiviert. Das Ansatzvolumen wurde durch Zentrifugation halbiert, auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden

Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit den angewachsenen Kolonien konnten dann Flüssigkulturen inokuliert werden.

2.2.4.3 Transformation in elektrokompetente Bakterien

Die Transformation in elektrokompetente Zellen (DH10B) wurde zur Amplifikation von gering-konzentrierten Plasmidpräparationen, z.B. solchen aus Hefezellen, verwendet. Die Elektroporations-Apparatur wird auf 2,5 kV und 25 µF eingestellt mit einem Pulse-Kontroller von 200 Ω. Es wurden 5 µl der Hefe-Plasmid Präparation zu 70 µl eisgekühlten elektrokompetenten Zellen gegeben und für 1min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in vorgekühlte Elektroküvetten gegeben und wie oben beschrieben gepulst. Die Zellen wurden in 700 µl SOC-Medium aufgenommen und 30-60 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in 80 µl SOC-Medium aufgenommen und auf LB-Platten ausplattiert.

2.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

2.2.5.1 Plasmidisolierung in analytischem Maßstab (Mini-Präparation)

Für analytische Zwecke wurde Plasmid-DNA mit dem NucleoleoSpin Plasmid Kit der Firma Macherey-Nagel isoliert. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.

2.2.5.2 Plasmidisolierung in präparativem Maßstab (Maxi-Präparation)

Größere Mengen Plasmid-DNA wurden aus 500 ml Kulturen mittels des Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen präpariert. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.

2.2.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Messung der Extinktion von DNA-Lösungen bei 260 und 280 nm gibt Auskunft über deren Konzentration und Reinheit. Eine OD_{260} entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Da aber auch aromatische Aminosäuren bei dieser Wellenlänge absorbieren wird zusätzlich die Extinktion bei 280 nm bestimmt, bei der

Proteine stärker als DNA absorbieren. Ist der Quotient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ kleiner als 1,8, so deutet dies auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenol hin.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Proteinexpression in *E. coli*

Zur Proteinproduktion wurden die entsprechenden Expressionsvektoren in den *E.coli* Stamm BL21 (DE3) pLysS transformiert und in 0,5 bis 1l LB- Medium bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5-0,7 angezogen. Da die Multiple Cloning Site dieser Vektoren unter der Kontrolle eines vom Laktose-Operon abgeleiteten Promotor steht, kann die Expression durch Glukose reprimiert und durch IPTG induziert werden. Die Induktion erfolgte mit 0,5 bis 1 mM IPTG für 1h bei 37°C oder für 5h bei RT.

2.3.2 Verifikation von Proteininteraktionen *in vitro* mittels GST-Pulldown

2.3.2.1 Proteinexpression und Zellyse unter nativen Bedingungen

Lysispuffer: 50 mM Tris pH 7,9, 250 mM NaCl, 1% Triton-X100, 1mM DTT, 1:1000 Protease-Inhibitoren-Mix
Bindungspuffer: 50 mM Tris pH 7,9, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10% Glycerol, 0,1% NP40, 0,3 mM DTT, 1:1000 Protease-Inhibitoren-Mix

Nach Induktion (0,5 mM IPTG) und Expression (1h 37°C) wurden die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert und in Lysispuffer resuspendiert. Die Zellyse wurde durch mehrmaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen im Wasserbad bei 37 °C forciert. Die Lysate wurden auf Eis für 30 sek mit Ultraschall behandelt. Nach 30 minütiger Zentrifugation mit 10.000 xg bei 4 °C, wurde der Überstand bei -80 °C eingefroren.

2.3.2.2 GST-Reinigung

50 µl Glutathion-Sepharose-Beads wurden 3mal mit PBS gewaschen und dabei jeweils durch Zentrifugation (2500 rpm, 5min) pelletiert. Gleiche Mengen an Bakterienlysat wurden mit den Beads versetzt und für 0,5-1h bei 4°C unter Rotation an die Beads gebunden. Nicht gebundene Proteine wurden durch Waschen mit Lysispuffer (zweimal) bzw. mit Bindungspuffer (einmal) entfernt.

2.3.2.3 GST-Pulldown

Zur Bindung des möglichen Interaktionspartner wurden 0,5 mg Zellysate einer Zelllinie, welche das entsprechende Protein überexprimiert zugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Beads wurden am nächsten Tag dreimal mit 1 ml Bindungspuffer gewaschen und in 20 µl SDS-Ladepuffer resuspendiert. Nach 5 minütigem Aufkochen der Proben bei 95°C und 3 minütigem Abzentrifugieren bei 14.000 upm, wurden 2/3 des Ansatzes auf ein 6 prozentiges und 1/3 des Ansatzes auf ein 12 prozentiges Gel aufgetragen.

Im niedrigprozentigen Gel wurde die Präsenz des Bindungspartners im gebundenen Komplex mittels Western Blot detektiert, und das hochprozentige Gel diente der Kontrolle der gleichen Mengen an GST-Protein durch Coomassie-Färbung.

2.3.3 Reinigung von rekombinanten Proteinen aus *E.coli* unter denaturierenden Bedingungen

2.3.3.1 Zellyse

Da die in *E.coli* exprimierten Proteine ein Histidin-Tag besitzen, konnten sie über eine Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Dazu wurde die Bakterien in 30 ml 8 M Urea/PBS aufgenommen, die Zellen mit 2x3 min Ultraschall aufgeschlossen und für 30 min auf einem Rollenschüttler inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (30 min, 20000xg, 4°C) entfernt und der Überstand zusätzlich filtriert.

2.3.3.2 Reinigung durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie

Eine entsprechende Säule wurde mit 4ml chelatierender Sepharose gefüllt und an eine Pumpe angeschlossen. Die Säule wurde mit 10 ml Wasser gewaschen, mit 6 ml 2% NiSO₄ beladen und wieder mit Wasser gewaschen. Es wurde mit 8 M Urea /PBS äquilibriert. Dann wurde das Bakterienlysat auf die Säule aufgetragen und mit je 20 ml 8 M Urea /PBS und 40 mM Imidazol/8 M Urea /PBS gewaschen. Die Elution erfolgte mit 6x2ml 250 mM Imidazol/ 4M Urea /PBS, wobei Fraktionen von je 2 ml gesammelt wurden, die dann im Coomassie-gefärbten Gel auf das gereinigte Protein überprüft wurden. Die das Protein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und einem Renaturierungsschritt unterworfen.

2.3.3.3 Renaturierung des gereinigten Proteins mittels Dialyse

Der gereinigte Proteinextrakt wurde in einen Dialyseschlauch überführt und 1M L-Arginin/PBS bis zu einer Endkonzentration von 400 mM Arginin zugegeben. Die Dialyse zur Entfernung des denaturierenden Harnstoffes erfolgte gegen 400mM Arginin/PBS über Nacht bei 4°C. Der umgebende Puffer wurde schrittweise durch PBS (nach Bedarf mit 10% Glycerol) ersetzt. Ausgefallene Proteine wurden durch Zentrifugation entfernt. Die Proteinkonzentration und Reinheit des so erhaltenen Extrakts wurden im Coomassie-Gel bestimmt.

2.3.4 Kolorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellysaten erfolgte mit dem Protein Assay Kit der Firma Biorad, welcher auf der Methode von Bradford basiert.

2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese

SDS-PAGE Laufpuffer: 25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1 % SDS

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist ein kontinuierliches Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht. Die Proben wurden für 5min bei 95°C in 4xSDS-Ladepuffer (Roth) inkubiert und durch das SDS mit einer kontinuierlichen negativen Ladung versetzt. Der Gellauf erfolgte in Form von vertikalen Plattengelen mit 6 bis 12%igen Trenn- und 5%igen Sammelgelen in SDS-Laufpuffer. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 40 mA pro Gel.

2.3.6 Coomassieblau-Färbung von Polyacrylamidgelen

Coomassie-Färbelösung: 0,1% Coomassie G250, 40% Ethanol, 10% Eisessig
Entfärbelösung: 25% Ethanol, 10 % Eisessig

Zur Sichtbarmachung aller im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurde das Gel für 30 min in Coomassie-Färbelösung auf einem Schüttler gefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch mehrfaches Wechseln der Entfärberlösung aus dem Gel entfernt. Das Gel wurde zur Dokumentation auf einem Whatman-Papier getrocknet.

2.3.7 Immunoblot (Western Blot)

Anodenbuffer I:	300 mM Tris-HCl (pH 10,4), 20 % Methanol (v/v)
Anodenpuffer II:	25 mM Tris-HCl (pH 10,4), 20% Methanol (v/v)
Kathoden-Puffer:	25 mM Tris-HCl (pH 10,4), 20 % Methanol (v/v), 40 mM ϵ -Aminocapronsäure
TBS (1x):	10 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl
TBS-T:	TBS mit 0,05% Tween 20

Der Western Blot dient dem qualitativen und quantitativen Nachweis von Proteine durch Antikörper. Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden in Halbtrockenkammern auf Nitrocellulose-Membranen bei 1 mA/cm² Membranfläche für 1-2h übertragen. Dazu wurde ein "Sandwich" aus 3 Lagen Whatmann 3MM Papier in Anodenpuffer1, 3 Lagen Whatmann 3MM Papier in Anodenpuffer2, Nitrocellulosemembran, SDS-Gel und 6 Lagen Whatmann 3MM Papier in Kathodenpuffer aufgebaut. Nach dem Blotten wurde die Membran für 30 min in 5% Milchpulver in TBS-T geblockt. Es erfolgten 3 Waschschrte je 5 min mit 15 ml TBS-T und die Inkubation des 1. Antikörper für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Die Membran wurde wie oben dreimal mit TBS-T gewaschen und mit dem 2. Antikörper an den eine Peroxidase gekoppelt ist für 45 min bei RT inkubiert. Nach drei erneuten Waschschrten erfolgte die Detektion der Peroxidase-Aktivität mit dem ECL-System der Firma Amersham und Nachweis der Lichtemission mit einem Röntgenfilm .

2.3.8 Ponceau-Färbung von Nitrocellulosemembranen

Zum Nachweis der erfolgreichen Blottingprozedur, sowie der Überprüfung gleicher Proteinmengen in den einzelnen Spuren, wurde die Membran für 5 min in Ponceau S-Lösung (Sigma) gefärbt und durch Waschen mit 10%iger Essigsäure entfärbt.

2.3.9 "Strippen" von Nitrocellulosemembranen

Stripping-Puffer: 2% SDS; 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7, 100 mM β -Mercaptoethanol

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 0,5h bei 60°C mit Stripping-Puffer inkubiert. Anschließend wurde

die Membran in Leitungswasser gewaschen bis kein β -Mercaptoethanol-Geruch mehr wahrnehmbar war. Die Membran wurde in dest. Wasser und TBS-T für jeweils 0,5h gewaschen, und anschließend geblockt und eine erneute Immunodetektion durchgeführt.

2.3.10 Immunopräzipitation (IP)

TNE: 50mM Tris ,140 mM NaCl, 5mM EDTA
TNE-T: TNE mit 1% Triton

Bei der Immunopräzipitation kann ein spezifisches Protein aus einem Totallysat isoliert werden. Dabei wird das Protein an einen spezifischen Antikörper gebunden, welcher wiederum über den F_c -Teil an Protein A bindet. Protein A ist an Sepharose-Beads fixiert, die durch Zentrifugation gewonnen werden können. Zum Zellextrakt wird 1 μ g des spezifischen Antikörpers gegeben und für 2h auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe von 50 μ l der Protein-A Sepharose-Beads und eine erneute Inkubation für eine Stunde bei 4 °C auf einem Rotator. Die Beads wurden zweimal mit X100-Zellextraktionspuffer und einmal mit TNE-T gewaschen und dabei jeweils für 3 min bei 2.000 rpm zentrifugiert. Das gebundene Protein wurde durch Zugabe von SDS-Gelladepuffer eluiert und der Überstand auf ein SDS-PAGE aufgetragen.

2.4 Methoden der Zellkultur

2.4.1 Transfektion von Säugerzellen

Säugerzellen können unter bestimmten Bedingungen von außen zugesetzte Fremd-DNA aufnehmen (Transfektion) und die von dieser DNA kodierten Gene exprimieren.

Dazu wurden $2 \cdot 10^5$ Zellen in einer 12well-Plate ausgesät und nach dem Absetzen, mit Medium ohne FCS versetzt. 2 μ g DNA wurden in 100 μ l DMEM Medium (ohne FCS) resuspendiert, während 4 μ l Lipofectamine 2000 (LifeTechnologies) mit 100 μ l Medium (ohne FCS) gemischt. Beide Lösungen wurden vereinigt und zur Bildung von DNA-Lipofectamine-Komplexen 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Für eine transiente Transfektion wurden die Zellen nach 48h geerntet und die Expression des transfizierten Gens im Immunoblot untersucht. Für die Herstellung stabil exprimierender Zellen, wurden die Zellen verdünnt ausgesät und nach zwei Tagen

mit 1 mg/ml G418 selektiert, wobei das Medium alle zwei Tage erneuert wurde. Nach zwei Wochen wurden Einzelkolonien gepickt, die dann auf Expression des Konstruktes untersucht wurden.

2.4.2 Zellernte und Zellaufschluß

Triton-X 100 Puffer:

50 mM Tris pH 7,5	frisch hinzugeben
5 mM EGTA	20 µM PAO, 2 mM NaVO ₃ , 1 mM Pefabloc, 50 mM NaF,
150 mM NaCl	10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Aprotinin
150 mM NaCl	

Um Membranproteine aus der Membran zu extrahieren wurden Gesamtzellextrakte mit einem Detergenz (hier Triton X-100) hergestellt. Das Medium wurde von den Zellen abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen in 1 ml PBS-Puffer aus der Kulturschale gekratzt und der Puffer durch Zentrifugation (2500 rpm, 5min, 4°C) entfernt. Das Pellet wurde in 20 bis 50 µl Triton X100-Puffer resuspendiert und 15 min zur Zellyse auf Eis inkubiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (14000 rpm, 10min, 4°C) entfernt. Der Gesamtproteingehalt wurde mittels der Bradford-Methode bestimmt. Die Extrakte wurden bei -80°C gelagert.

2.4.3 Proliferationsassay

Das Wachstum von Zellen kann mittels des Tetrazoliumsalzes XTT quantifiziert werden, welches von stoffwechselaktiven Zellen zu einem Formazan metabolisiert wird und dadurch einen Farbumschlag zeigt. 5×10^3 Herc-Zellen wurden pro well in einer Multiwellplatte ausgesäht. Nach Absetzen der Zellen wurden die Zellen in Medium ohne Serum für 15h gehungert. Das Wachstum wurde durch Zugabe von EGF induziert und die Proliferationsrate nach verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Dafür wurden 50 µl XTT/PMS (50:1) zugeben und für 3h bei 37°C, 5%CO₂ inkubiert. Das Zellwachstum wurde durch Messung der Extinktion bei 595 und 690 nm quantifiziert.

2.4.4 Untersuchung des Zellwachstums in semisoliden Medium (Soft Agar Assay)

Auf einer Bodenschicht von 0,5% Agarose in Medium, wurden 2500 Zellen in 0,3% Agarose in Medium in einer Multiwellplate ausgesät. Diese wurde mit Medium überschichtet, welches 30ng/ml EGF enthielt. Nach 5 bzw. 7 Tagen Inkubation wurde die Bildung von Kolonien im Weichagar mittels XTT quantifiziert.

2.4.5 Immunfluoreszenzanalyse

Färbung zellulärer und transduzierter Proteine erfolgte mittels Immunfluoreszenz. Dazu wurden die Zellen auf Deckgläser in einer Zellkulturschale ausgesät und zum gegebenen Zeitpunkt mit 95% Methanol für 10 min bei -20°C fixiert. Das Methanol wurde abgesaugt, und nach Trocknung des Glases der Ort der Färbung mit einem Wachsstift eingegrenzt. Um die Zellmembran für die Aufnahme der Antikörper zu permeabilisieren, wurde das Präparat mit PBS/0.05% Tween 20 Minuten inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Nach 30 min Blockieren (0,5% Fischgelatine, 0,1 % Ovalalbumin in PBS) erfolgte die Inkubation mit Primärantikörper (verdünnt in Blockierungslösung) bei 4°C über Nacht. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörper (1:400) 1,5h bei RT im Dunkeln gefärbt. Nach erneutem Waschen wurden die Salze mit Aqua dest. gewaschen, das Präparat getrocknet und mit Mowiol/DAPI auf einem Objektträger aufgebracht. Nach Trocknen des Mowioles konnten Bilder mit einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen werden.

2.4.6 Messung der Luziferase-Aktivität

Luziferase-Lysispuffer:	1% Triton X-100, 25mM Glycylglycin, 15 mM MgSO_4 , 4mM EGTA, 1mM DTT (frisch hinzugeben)
Luziferin-Substrat:	2,97g Glycylglycin, 2,7g ATP (pH 7,8); 50 mg Beetle Luziferin; ad 900 ml H_2O
Reaktionspuffer:	100 mM N_2HPO_4 , 1 mM MgCl_2 , 1x Galacton (Tropix)
Amplifierlösung:	10% Emerald, 0,2 M NaOH

Zur Messung der Transaktivierungsaktivität von Transkriptionsfaktoren wurde ein Reporterkonstrukt bestehend aus einem Promotor mit Bindungsstellen für den

entsprechenden Transkriptionsfaktor und dem Luziferase-Gen transfiziert. Wenn der Faktor die Transkription von diesem Promotor aus aktivieren kann, wird das aktive Enzym Luziferase exprimiert. Dieses katalysiert nach Zugabe des Luziferinsubstrats eine Reaktion bei der Licht emittiert wird, welches durch einen Photoelektronenvervielfacher detektiert werden kann. Das emittierte Licht ist somit proportional zur Transaktivierungsaktivität des Faktors.

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, in PBS aus der Zellkulturschale gekratzt und der Puffer durch Zentrifugation (5 min, 2500 rpm, 4°C) entfernt. Das Pellet wurde in 70 µl Luziferase-Lysispuffer (pro 12well) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt und der Überstand weiterverwendet. 20µl des Zelllysats wurden in einer Luziferaseplatte vorgelegt. Die Messung der Chemolumineszenz erfolgte automatisch durch Zugabe von 50 µl Luziferin-Substrat für 20s. Um die Luziferase-Aktivität mit der Transfektionseffizienz abzugleichen, wurden ein konstitutiv exprimiertes β-Galaktosidase-Konstrukt transfiziert. Die Messung der Galaktosidase-Aktivität wird von 3 µl Lysat unter Zugabe von 33 µl Reaktionsbuffer nach 30 minütiger Inkubation für 10 sec gemessen, wobei der Amplifier automatisch zugegeben wird.

2.5 Methoden im Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System ermöglichte es, Protein-Protein-Interaktionen in zellulären Systemen zu untersuchen. Das zentrale Element des Hefe-Zwei-Hybrid-System ist das Protein GAL4, ein Hefe-Transkriptionsfaktor, der aus einer DNA-Bindungsdomäne und einer Aktivierungsdomäne besteht. Um die Transkription auszulösen, bedarf es lediglich der räumliche Nähe der beiden Domänen. Diese Tatsache macht man sich in einem Zwei-Hybrid-Screen zu nutze, indem man miteinander interagierende Proteine mit den beiden Domänen fusioniert und über die Wechselwirkungen der Fusionsproteine einen vollständigen Transkriptionsfaktor regeneriert. Dieser ermöglicht dann die Transkription von Selektionsmarkergenen. Im verwendeten Hefestamm KF1 kodieren diese Reportergene jeweils für ein Protein der Adenin-, Histidin- und Uracil-Biosynthese (ADE2, HIS3, URA3) und stellen bei Transkription von “Gal4-response-Elementen” das Wachstum auf den jeweiligen Selektivmedien sicher. Über die Stärke der Promotoren läßt sich die Stärke der Protein-Protein-Wechselwirkung bestimmen. Im vorliegenden Fall besitzt *ade2* einen

starken, *his3* und *ura3* einen schwachen Promotor. *Ura3* wird durch den SPO13-Promotor reguliert, der ein negativ-regulatorisches Element enthält und nur durch starke Protein-Protein-Interaktionen aktiviert werden kann. Das *his3*-Gen wird basal transkribiert. Diese basale Transkription kann durch kompetitive Hemmung mit 3-Aminotriazol (3-AT) verhindert werden, was gleichzeitig eine Titration der Bindungsstärke ermöglicht.

2.5.1 Lösungen und Medien

SD (Synthetic Dropout)-Medium (Flüssig-Selektionsmedium):	1,7g YNB (Yeast Nitrogen Base) 5 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,59 g CSM-Aminosäuremix
YPDA-Medium (Vollmedium):	YPD-Medium der Firma Bio101 mit 50 mM Adenin
DOBA (Dropout base agar) Medium zur Herstellung von Selektionsagarplatten)	DOBA Basis der Firma Bio101 mit entsprechendem CSM-Aminosäuremix

2.5.2 Transformation von Plasmiden in *S. cerevisiae*

LiAc/TE :	100mM LiAc pH7,5, 10 mM Tris, 1 mM EDTA
LiAc/TE/PEG:	100mM LiAc pH7,5, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 40% PEG 4000

Für die Transformation von Plasmiden in Hefe wurde eine Streichholzkopf-große Kolonie des KF1-Stammes in 300µl LiAc/TE-Puffer resuspendiert und für eine Minute bei Raumtemperatur mit 14000rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in LiAc/TE-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Der Transformationsansatz aus

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

wurde 30 Minuten bei 30 °C und 15 Minuten bei 42 °C inkubiert und anschließend 2 min bei 3.000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 120 µl Wasser resuspendiert und davon 70 µl auf Selektionsplatten ausplattiert. Die Hefen wurden 2 Tage bei 30°C inkubiert.

2.5.3 Transformation der Library-Vektoren in *S. cerevisiae*

Die Hefekolonien, die das Baitprotein exprimierten, wurden für die Transformation der Library-Vektoren in 30 ml SD –L über Nacht kultiviert. Die Hefen wurden mit 250 ml YPDA bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 ± 0,1 angezogen, 2 min bei 2.000 rpm zentrifugiert und das Pellet zweimal mit Wasser und einmal mit LiAc/TE-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in 2 ml LiAc/TE aufgenommen.

Der Transformationsansatz (verteilt auf 10 Ansätze a 2ml):

20 µg Library-DNA
180 µl Träger-DNA (Salmon Sperm DNA: 10 mg/ml)
2 ml Hefesuspension
12 ml LiAc/TE/PEG-Puffer

wurde 30 min bei 30 °C und 15 min bei 42 °C inkubiert. Die Zellen wurden 5 min bei 3.500 rpm zentrifugiert, die Einzelansätze vereinigt und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10,5 ml Wasser resuspendiert und je 700 µl auf große DOBA –LTA Platten ausplattiert. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe (10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵) der Zellen, die auf DOBA –LT Platten ausplattiert wurden, konnte die Transformationseffizienz berechnet werden.

2.5.4 Herstellung von Proteinextrakten aus Hefezellen

Lysispuffer: 8M Urea, 5% SDS, 40 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 mM EDTA,
0,4 g/ml Bromphenolblau, 0,7% β-Mercaptoethanol, Protease-
Inhibitoren

Die Bait-Proteinextrakte aus Hefe wurden zum Nachweis der Expression des Baitproteins benötigt. Die transformierten Klone wurden in 5 ml SD –L über Nacht kultiviert und am nächsten Tag in 50 ml YPDA angezogen bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht wurde. Für den weiteren Versuch wurden 20 OD-Einheiten verwendet, welche mit Eis 5 min bei 1000 xg bei 4 °C zentrifugiert wurden. Das Pellet wurde mit kaltem Wasser gewaschen und der Ansatz erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert.

Der Hefelysispuffer wurde auf 60 °C vorgewärmt und je 200 µl zu den gefrorenen Zellen gegeben. Ebenfalls vorgewärmte Glas-Beads (400 µl) wurden dem Ansatz beigefügt und dieser für 10 min bei 70°C inkubiert. Da die Protease-Inhibitoren bei

diesen Temperaturen nicht stabil sind, wurden nach jedem Schritt 25 µl Pefabloc (100x) hinzugegeben. Nach 10 min wurden die Ansätze auf Eis gekühlt und einzeln für 1 min gevortext. Die lysierten Zellen wurden bei 4 °C für 5 min mit 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, auf Eis gelagert und das Pellet mit 100 µl Lysispuffer erneut bei 95 °C für 5 min inkubiert.

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

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

Die DNA-Isolierung aus Hefezellen wurde mit Hilfe des Yeast plasmid extraction Kit der Firma BIO 101 durchgeführt.

2.5.6 Verifikation des Interaktionsphänotyps mittels Mating

Die Methode diente dazu, die Interaktion der gescreenten Aptamere mit dem Targetprotein zu verifizieren. Die beiden haploiden Mating-Typen α bzw. a von *S. cerevisiae* KF1 wurden mit dem Bait- bzw. den isolierten Prey-Konstrukten transformiert. Klone, der so transformierten Mating-Typen wurden gemeinsam über Nacht bei 30 °C in YPDA Medium inkubiert und am folgenden Tag auf DOBA-LT (DOBA ohne Leucin/Threonin) ausplattiert. Die gewachsenen diploiden Kolonien wurden auf den entsprechenden Selektivmedien ausgestrichen und das Wachstum überwacht.

3 Ergebnisse

3.1 Screening von Peptid-Aptameren, die mit der Kinasedomäne des EGF-Rezeptors interagieren

Ziel dieser Arbeit war es, Peptid-Aptamere zu isolieren, welche die Funktionen des EGF-Rezeptors inhibieren können. Da eine funktionsfähige Kinasedomäne für die Aktivität des Rezeptors essentiell ist, können Peptid-Aptamere, die an diese Domäne binden, potentiell die Rezeptorfunktionen hemmen. Als ATP-Bindungsstelle in der Kinasedomäne wurde das Lysin 721 identifiziert, das den γ -Phosphatrest des ATPs für den Transfer der Phosphorylgruppe korrekt positioniert. Des Weiteren konnte dem Lysin 782 eine Rolle bei der Bindung der Ribose zugeschrieben werden (Klingbeil and Gill, 1999). Außerdem werden weitere Positionen in dieser Region wie z.B. Asparaginsäure 813 diskutiert, die für die ATP-Bindung entscheidend sind (Ewald, Coker *et al.*, 2001). Aus diesen Gründen wurde ein 130 Aminosäuren großes Fragment der Kinasedomäne, das die Aminosäurereste 688 bis 821 umfaßt, als „Bait“ abgeleitet (Abb. 3.1). Dies hat zugleich den Vorteil, dass sich ein kleineres Fusionsprotein zusammen mit der Gal4 DNA-Bindungsdomäne ergibt, das eine bessere Expression in Hefen erlaubt.

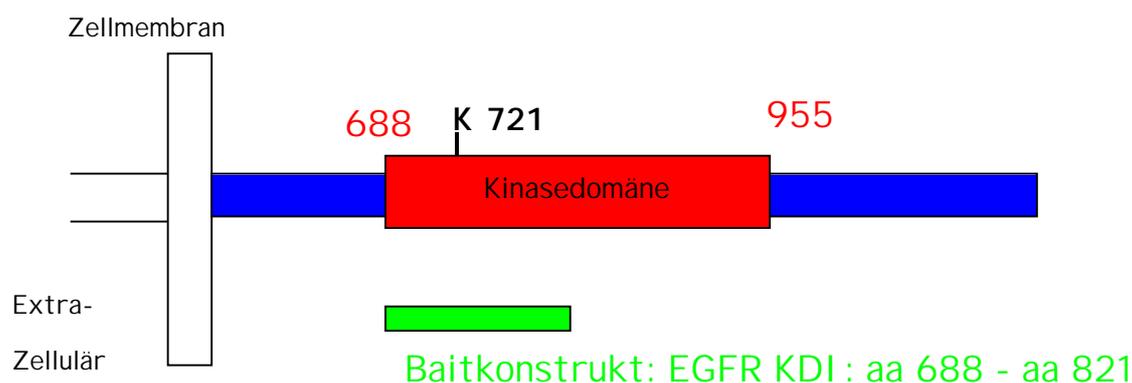


Abb. 3.1 Zielstruktur zur Isolierung eines Peptid-Aptamers mit spezifischer Affinität zur Kinasedomäne des EGF-Rezeptors

Als Baitkonstrukt wurde die Region zwischen aa 688 und aa 821 verwendet und das Konstrukt als EGFR KDI (Kinasedomäne I) bezeichnet. Das Baitkonstrukt umfaßt das kritische Lysin 721, das für die ATP-Bindung und -Positionierung wichtig ist.

Das entsprechende Fragment wurde aus einer humanen EGFR cDNA mittels PCR amplifiziert. Hierbei wurden gleichzeitig Restriktionsschnittstellen eingefügt, so dass nach Restriktionsverdau das Fragment in den Hefe-Expressionsvektor pPC97 eingefügt werden konnte. Dieser Vektor wurde in den *S. cerevisiae* Stamm KF1 (Butz, Denk *et al.*, 2000) transformiert und Klone auf Selektionsmedium (DOBA-L) selektiert. 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 Bedingungen, so dass das Baitkonstrukt für einen Zwei-Hybrid-Screen verwendet werden konnte. Des Weiteren wurde die Expression des Konstrukts durch Herstellung von Proteinextrakten und anschließendem Western Blot mit einem Antikörper gegen die Gal4-DNA-Bindungsdomäne überprüft. Der Klon, der die beste Expression zeigte, wurde im nachfolgenden Screen verwendet.

Die Peptid-Aptamer-Library wurde in diesen Klon transformiert und Klone, die jeweils interagierende Peptid-Aptamere enthalten, auf DOBA-LTA Platten selektiert. Nach einer Woche konnten vier Kolonien isoliert werden, die außerdem Wachstum auf DOBA-LTU und DOBA-LTH Platten zeigten. Vor allem die Aktivierung des Uracil-Markers wies auf eine hochaffine Bindung zwischen Aptamer und Bait hin. Denn der vor dem Uracil-Selektionsmarker inserierte SPO1 Promotor enthält ein negatives Regulationselement, so dass dieser Promotor nur durch einen sehr stabilen Gal4-Transkriptionsfaktor aktiviert werden kann. Durch die Verwendung von drei Selektionsmarkern mit unterschiedlicher Stringenz konnte somit die Zahl falsch positiver Klone erheblich reduziert werden.

Insgesamt wurden ca. 10^7 Klone gescreent. Die Library besitzt eine theoretische Diversität von ca. 5×10^7 exprimierten Aptameren. Damit wurde durch den durchgeführten Screen nicht die gesamte Library erfasst. Es ist jedoch schwierig, hohe Transformationseffizienzen mit Hefezellen zu erreichen. Die Erfahrung hat gezeigt, dass ab einer Zahl von 10^7 gescreenten Klonen eine ausreichende Menge an verschiedenen Klonen erfasst wird, so dass sich hochaffine Bindungspartner ableiten lassen. Somit war dieser Screen als erfolgreich zu bewerten und die isolierten Klone wurden weiter charakterisiert.

Dazu wurden die Plasmide aus der Hefe isoliert und in *E.coli* amplifiziert. Hier wurde die Tatsache genutzt, dass es sich bei den Library-Vektoren, im Gegensatz zu den Bait-Konstrukten, um „high copy“-Plasmide handelt, so dass sich diese während der

Amplifikation in Bakterien anreichern. Aus einem Klon (KDI 2) lies sich trotz mehrerer Versuche keine Plasmid-DNA isolieren, so dass angenommen werden musste, dass es sich hier um einen falsch positiven Klon handelt, der autonom ohne eine Aptamer/EGFR Interaktion wachsen konnte. Anschließend wurden die isolierten Plasmide im Restriktionsverdau überprüft und die eingefügte Sequenz des Peptid-Inserts durch Sequenzierung ermittelt (Abb. 3.2).

KDI 1 ---Trx--- VFGVSWVVGFWCQMHRRLVC---Trx---

KDI 3 ---Trx---TFSPVLLYRLFLATVLIWA ---Trx---

KDI 4 ---Trx--- LSFQLSPLSLVHRWGTTVDV ---Trx---

Abb. 3.2: Aminosäuresequenz der isolierten Peptid-Aptamere

Keine der Peptidsequenzen zeigte Homologien zu bekannten Proteinen oder Proteindomänen. Dies lässt sich damit erklären, dass es sich bei Peptid-Aptameren nicht um evolutiv abgeleitete Motive handelt, wie die Natur sie verwendet. Stattdessen sind dies artifizielle, randomisierte Sequenzen, die aufgrund ihrer Aminosäurezusammensetzung eine Konformation einnehmen, die es ihnen ermöglicht mit dem EGF-Rezeptor zu interagieren.

3.2 Verifikation der spezifischen Interaktion zwischen den isolierten selektierten Peptid-Aptameren und dem EGF-Rezeptor *in vitro* und *in vivo*

3.2.1 Verifikation der Interaktion in *S. cerevisiae* mittels Mating

Um die spezifische Interaktion zwischen den isolierten Aptameren und dem EGF-Rezeptoren zu verifizieren, wurde ein Mating-Experiment durchgeführt. Dazu wurden die isolierten Preyplasmide in Hefezellen des haploiden α -Mating-Typs eingebracht, während die Baitkonstrukte, sowie der leere pPC97 Vektor in den a-Typ transformiert wurden. Klone wurden selektiert und jeweils eine Kolonie der beiden Mating-Typen vermischt. Diploide Klone wurden auf entsprechendem Selektionsmedium selektiert

(DOBA-LT) und die Interaktion durch Wachstum auf DOBA-LTA Medium überprüft (Abb. 3.3)

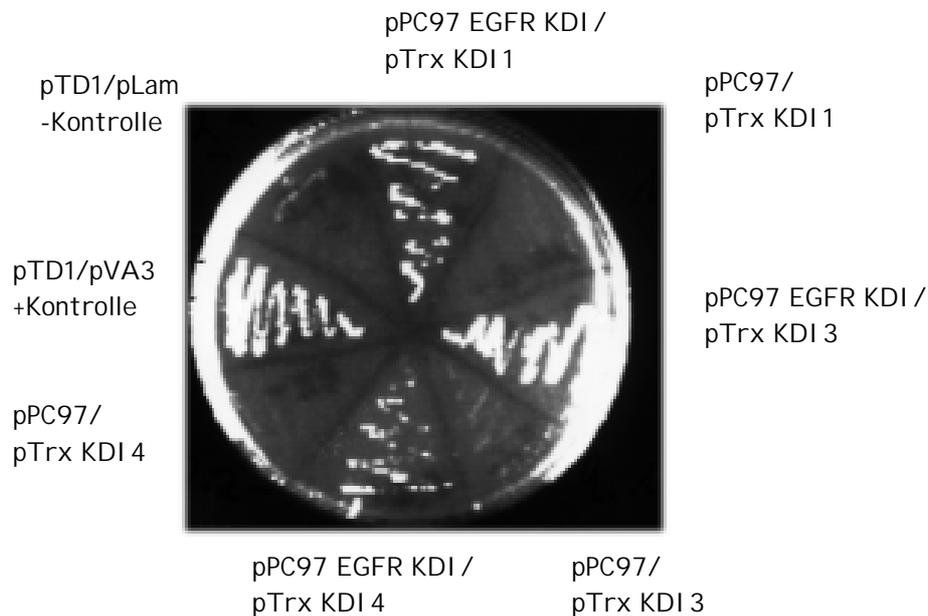


Abb. 3.3: Die isolierten Peptid-Aptamere interagieren im Mating-Experiment spezifisch mit dem Baitprotein EGFR KDI

Hefezellen des α - bzw. α -Mating-Typs wurden mit den gekennzeichneten Plasmiden transformiert, je eine Kolonien der unterschiedlichen Typen gemischt und diploide Zellen auf DOBA-LT Medium selektiert. Die Interaktion wurde durch Wachstum auf DOBA-LTA Platten verifiziert. Als Positivkontrolle wurde pTD1 verwendet, welcher für das große T-Antigen kodiert und mit der Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniert ist. Es ist bekannt, dass das große T-Antigen mit p53 interagiert, welches durch pVA3 codiert wird. Humanes Lamin C (pLam) hingegen interagiert nicht mit dem T-Antigen und kann daher als Negativkontrolle verwendet werden

Alle Hefeklone, die das Baitkonstrukt enthalten, zeigten Wachstum unter den vorgegebenen Selektionsbedingungen, während die Klone, die nur mit dem leeren Baitvektor (pPC97) transformiert wurden, unter diesen Bedingungen nicht wuchsen (Abb.3.3). Das zeigt, dass die isolierten Peptid-Aptamere spezifisch mit dem Baitprotein interagieren, während sie nicht unspezifisch an die GAL4-DNA-Bindungsdomäne binden, die vom leeren pPC97 Vektor codiert wird.

3.2.2 Verifikation der Interaktion *in vitro* durch GST-Pulldown-Experimente

Um die spezifische Interaktion zwischen den isolierten Peptid-Aptameren und dem EGFR näher zu charakterisieren, wurden sie als GST-Fusionsproteine exprimiert, auf Glutathion-Beads immobilisiert und mit verschiedenen Zelllysaten inkubiert. Der Komplex wurde im SDS-Gel aufgetrennt und der gebundene Rezeptor im Western

Blot bzw. das eingesetzte GST-Fusionsaptamer durch Coomassie-Färbung visualisiert.

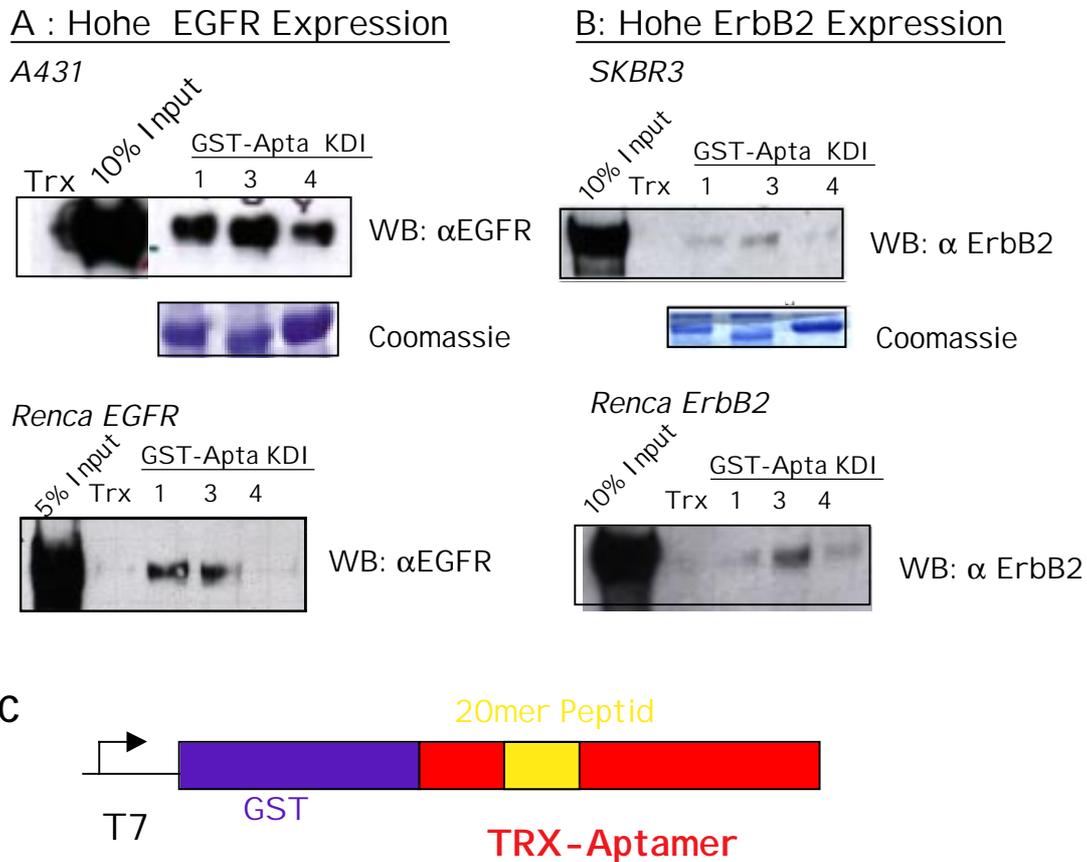


Fig. 3.4: KDI1 und 3 interagieren im GST-Pulldown-Experiment mit dem EGF-Rezeptor

Peptid-Aptamere wurden mit einer GST-Domäne fusioniert (C), in *E.coli* exprimiert und an Glutathion-Beads gebunden. 500 μ g Zellysate von Zellen mit hoher EGFR Expression (A) bzw. hoher ErbB2 Expression (B) wurden mit den Glutathion-Beads inkubiert. 2/3 des Komplexes wurden in einem niedrig-prozentigen SDS-PAGE aufgetrennt und die Menge des gebundenen Rezeptors im Western Blot mit einem α EGFR- bzw. α ErbB2-Antikörper detektiert. Der restliche Komplex wurde in einem hochprozentigen Gel aufgetrennt und mit Hilfe einer Coomassie-Färbung wurde sichtbar, dass gleiche Mengen an GST-Aptamer-Protein eingesetzt wurden. 5% bzw. 10% des eingesetzten Lysats wurden als Input-Kontrolle aufgetragen.

Die isolierten Aptamere zeigten *in vitro* eine spezifische Bindung an den EGF-Rezeptor (Abb. 3.4 A). Aptamer KDI4 zeigt mit Lysaten von A431-Zellen eine schwächere Bindung, die mit Renca/EGFR-Lysaten, welche weniger Rezeptor exprimieren (Abb. 3.4 A unten), kaum zu detektieren war. Bei längerer Belichtung des Film wurde jedoch eine schwache Bande mit Lysaten aus Renca/EGFR-Zellen sichtbar. Das Thioredoxinprotein ohne Peptidinsert bindet nicht unspezifisch an den EGF- oder ErbB2-Rezeptor. Die isolierten Aptamere binden präferentiell an den

EGFR, da der ErbB2-Rezeptor durch die Aptamere nicht aus entsprechenden Zelllysaten (Abb.3.4 B) präzipitiert werden konnte. Lediglich Aptamer KDI3 zeigte eine schwache Bindung an diesen Rezeptor. Das Coomassie-Gel zeigte, dass in alle Ansätze gleiche Mengen des GST-fusionierten Aptamers eingesetzt wurden. Dabei zeigte sich, dass Aptamer KDI3 etwas kleiner ist. Die Sequenzierung des Konstrukt gab jedoch keinen Hinweis auf Mutationen, so dass nicht geklärt werden konnte, warum dieses Aptamer nur verkürzt exprimiert wurde.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Aptamere auch mit dem aktivierten, d.h. phosphorylierten Rezeptor interagierten. Hefen besitzen zwar einige Kinasen, so dass eine Phosphorylierung des Baitproteins prinzipiell möglich ist. Es ist jedoch nicht völlig klar, inwieweit homologe Kinasen der Hefe ähnliche Reaktionen, wie in Säugerzellen ausführen können. Daher wurde analog zu dem oben ausgeführten Experiment ein GST-Pulldown mit Lysaten von EGF-induzierten bzw. nicht induzierten Zellen durchgeführt.

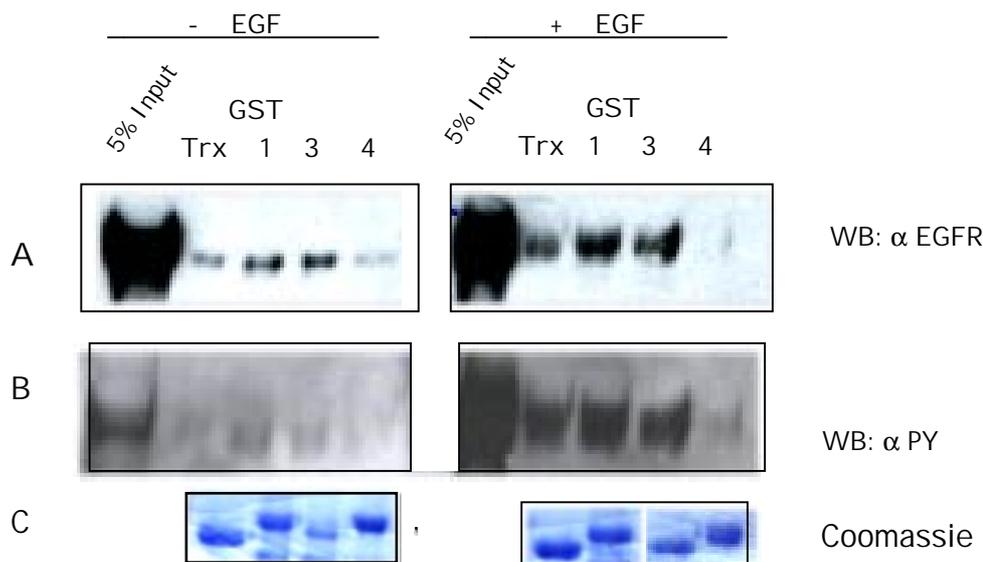


Abb. 3.5: Die isolierten Peptid-Aptamere interagieren präferentiell mit dem phosphorylierten Rezeptor

A431-Zellen wurden über Nacht in Medium ohne Serum kultiviert, mit 50 ng/ml EGF für 30 min stimuliert und Zellextrakte hergestellt. 500 µg der Lysate wurden in den Pulldown eingesetzt und der präzipitierte Rezeptor wurde im Western Blot mit einem α EGFR-Antikörper detektiert (A). Zur Kontrolle der Induktion wurde der Blot gestrippt und mit einem Phosphotyrosin spezifischen Antikörper inkubiert (B). Das Coomassie Gel zeigt die eingesetzten Mengen GST-Aptamer (C).

Der Pulldown zeigte, dass die Peptid-Aptamere präferenziell an den aktivierten Rezeptor binden (Abb.3.5 A +EGF). Der Phosphotyrosin-Blot bestätigte, dass eine

Phosphorylierung des EGF-Rezeptors nach Stimulation stattgefunden hat (Abb. 3.5 B). In diesem Experiment interagierte das Thioredoxinprotein leicht unspezifisch mit dem Rezeptor. Da die Bindung der Aptamere KDI1 und 3 jedoch deutlich stärker war, kann hier von einem Hintergrundsignal ausgegangen werden. Auch hier wiederholte sich, dass Aptamer KDI4 nur schwach an den Rezeptor bindet. Die Bindung an den nicht aktivierten Rezeptor war bei allen Aptameren sehr schwach (Abb. 3.5 A –EGF) und es kann angenommen werden, dass diese leichte Bindung durch verbliebene phosphorylierte Teile der Rezeptorpopulation vermittelt wurde, da sowohl der Input des unstimulierten Lysats als auch der durch die Aptamere präzipitierte Rezeptor ein schwaches Signal im Tyrosin-Blot ergab (Abb. 3.5 B –EGF). Somit kann gefolgert werden, dass die Aptamere fast ausschließlich an den aktivierten, d.h. phosphorylierten Rezeptor binden, jedoch nicht oder nur mit sehr geringer Affinität an den unstimulierten Rezeptor.

3.2.3 Verifikation der Peptid-Aptamer/Rezeptor-Interaktion *in vivo* mittels Ko-Immunpräzipitation

Um die Interaktion zwischen den isolierten Peptid-Aptameren und dem EGF-Rezeptor *in vivo* in Zielzellen zu verifizieren, wurden sie in einen eukaryontischen Expressionsvektor (pRC/CMV-VP22) inseriert. Es hat sich gezeigt, dass das bakterielle Thioredoxinprotein nur als Fusionsprotein in Säugerzellen stabil exprimiert werden kann. Aus diesem Grund wurde das Herpes Simplex Virus-Protein VP22 N-terminal an das Thioredoxinprotein fusioniert (Abb. 3.6 C). VP22 kann als Proteintransduktionsdomäne dienen. Deshalb wurde angenommen, dass das VP22-Fusionsprotein von transfizierten Zellen auch in benachbarte Zellen transduzieren kann und es somit verteilen kann. Dieser Effekt konnte aber im vorliegenden System nicht beobachtet werden, so dass die VP22-Domäne hier nur der Stabilisierung diene. Die Peptid-Aptamere wurden in Herc-Zellen (NIH3T3 stabil mit dem humanen EGFR transfiziert) transfiziert, eine Immunpräzipitation mit einem α EGFR-Antikörper durchgeführt und die Komplexe im SDS-PAGE aufgetrennt. Das an den Rezeptor gebundene Aptamer wurde mit einem gegen das Thioredoxinprotein gerichteten Antikörper detektiert (Abb.3.6).

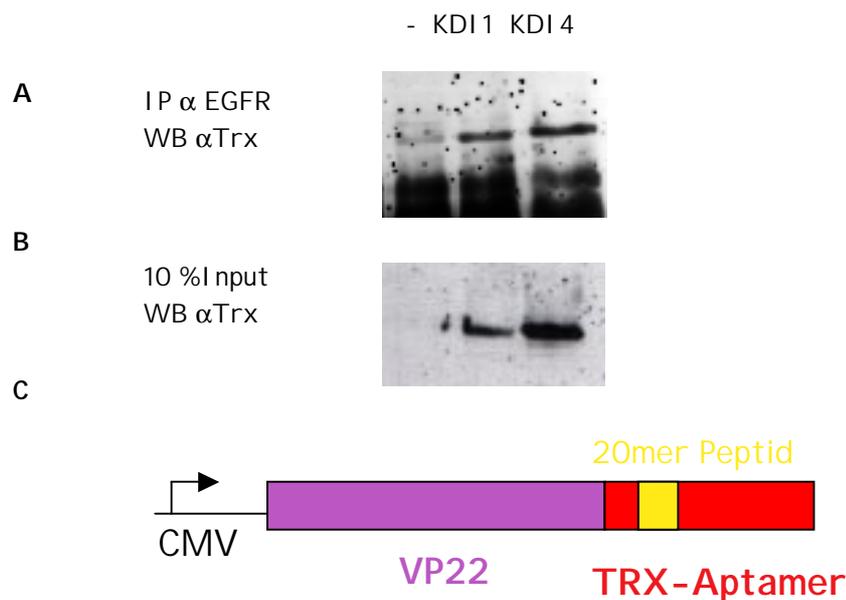


Abb.3.6: KDI1 und 4 interagieren *in vivo* mit dem EGF-Rezeptor

Herc-Zellen wurden transient transfiziert und nach 48h Proteinextrakte hergestellt. 500 μg Proteinextrakt wurden mit 1 μg m α EGFR-Antikörper präzipitiert und gebundene Aptamere im Western Blot mit einem α Trx Antikörper detektiert (A). Als Expressionskontrolle wurden 10% des Inputs aufgetragen (B). Zur Stabilisierung wurde das Peptid-Aptamer mit einer VP22-Domäne versehen (C).

Aptamer KDI1 und KDI4 konnten mit dem Rezeptor präzipitiert werden (Abb. 3.6), so dass auch *in vivo* von einer spezifischen Interaktion zwischen Rezeptor und den isolierten Aptameren ausgegangen werden kann. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Fusion mit VP22 die Konformation des Peptid-Aptamers stabilisiert und nicht negativ beeinflusst. Aptamer KDI3 konnte nur sehr schlecht transient exprimiert werden, so dass eine Ko-Immunpräzipitation nicht durchgeführt werden konnte.

Somit konnte bestätigt werden, dass die selektierten Peptid-Aptamere sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit dem EGF-Rezeptor interagieren und für funktionelle Untersuchungen zur Verfügung stehen.

3.3 Einbringung der Peptid-Aptamere in Zielzellen

Bisher konnte gezeigt werden, dass die selektierten Peptid-Aptamere spezifisch mit dem EGF-Rezeptor interagieren. Um nun zu untersuchen, inwieweit sie auch mit der Funktion des EGFR interferieren, wurden zwei verschiedene Methoden etabliert, die Aptamere in Zielzellen einzubringen.

Zum einen wurden Zelllinien generiert, welche die verschiedenen Peptid-Aptamere stabil exprimieren. Um jedoch auch höhere Konzentrationen der Peptid-Aptamere zu erreichen, oder die Aptamere spezifisch zu einem bestimmten Zeitpunkt in die Zellen einzubringen, wurde das Aptamer als rekombinantes Protein mittels einer Proteintransduktionsdomäne in Zielzellen eingebracht.

3.3.1 Stabile Transfektion der selektierten Peptid-Aptamere in Herc-Zellen

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 ein Hintergrundsignal von schwach oder gar nicht exprimierenden Zellen, das Ergebnis verfälscht und somit die inhibitorische Wirkung des Aptamers überdeckt wird.

Auch für die Ableitung stabiler Zelllinien wurde der VP22-PTD enthaltende Expressionsvektor verwendet (siehe Kapitel 3.2.3) und in Herc-Zellen mittels Lipofectamine 2000 (LifeTechnologies) transfiziert. Einzelklone wurden mit 1 mg/ml G418 selektiert, expandiert und die Expression der Aptamere im Western Blot verifiziert. Abb.3.7 zeigt die Expressionstärken, der für die nachfolgenden Experimente verwendeten Klone.



Abb. 3.7: Stabile Expression der Aptamere in Herc-Zellen

100 µg Lysat der stabil transfizierten Zellen wurden in einem 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt und die Menge an exprimierten Peptid-Aptamer bzw. Thioredoxin im Western Blot mit einem α Trx-Antikörper detektiert.

Alle Aptamer-Konstrukte, sowie das Thioredoxinprotein, konnten in Herc-Zellen stabil transfiziert werden und wurden gut exprimiert, so dass die isolierten Klone in nachfolgenden Experimenten eingesetzt werden konnten.

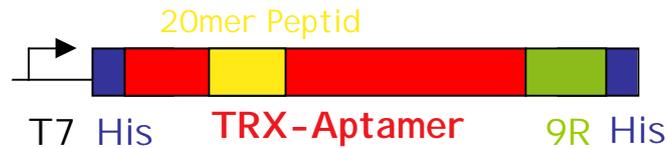
3.3.2 Transduktion von rekombinant exprimierten Peptid-Aptameren mittels einer basischen Proteintransduktionsdomäne

3.3.2.1 Expression und Reinigung von rekombinanten Peptid-Aptameren mit einer Proteintransduktionsdomäne

Für die Proteintransduktion wurde ein bakterieller Expressionsvektor konstruiert (pET30-9R), welcher für das Aptamer, eine Proteintransduktionsdomäne aus neun Argininresten (9R), sowie ein Histidin-Tag zur Reinigung codiert (Abb. 3.8 A)

Die Expression der rekombinanten Proteine wurde im pET30-9R Expressionsvektor durch IPTG induziert. In Vorversuchen wurden als ideale Bedingungen zur Proteinexpression eine IPTG-Konzentration von 0,5 mM bei Raumtemperatur für 4-5 h bestimmt. Da das rekombinante Protein in den Bakterien vor allem in „inclusion bodies“ abgelagert wurde, musste die Lyse der Bakterien unter denaturierenden Bedingungen, d.h. 8M Urea, erfolgen. Anschließend wurde das rekombinante Protein, mittels des Histidin-Tags durch Ni^{2+} - Affinitätschromatographie gereinigt. Die Elution erfolgte dabei in 5 Fraktionen zu je 2 ml mit 250 mM Imidazol/4M Urea/ PBS. 10ml der Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und nachfolgender Coomassie-Färbung analysiert. Abb.3.8 B zeigt exemplarisch das Ergebnis einer solchen Analyse.

A pET 30 Trx-9R



B

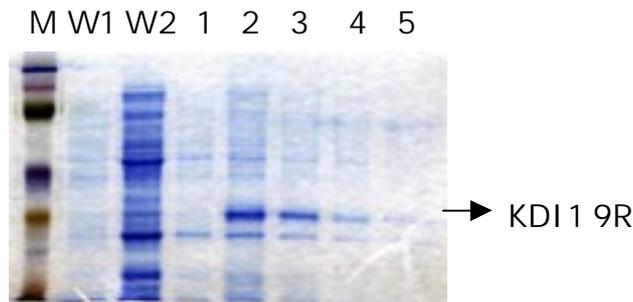


Abb. 3.8: Reinigung der rekombinant exprimierten Peptid-Aptamere mittels Affinitätschromatographie

(A) In einem bakteriellen Expressionsvektor wurde die codierende Sequenz der Peptid-Aptamere C-terminal mit einer Proteintransduktionsdomäne aus neun Argininresten (9R) fusioniert.

(B) Mit den entsprechenden bakteriellen Expressionsvektoren (pET30-Trx-9R) transformierte Bakterien wurden mit 0,5mM IPTG für 4h bei RT induziert. Die Bakterien wurden unter denaturierenden Bedingungen lysiert und über eine Ni²⁺-Affinitätssäule gereinigt. Es wurden fünf Elutionsfraktionen entnommen, von denen jeweils 10µl in einem 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt wurden und mittels Coomassiefärbung sichtbar gemacht wurden.

M: Molekulargewichtsmarker; W1,W2: Waschfraktion 1 und 2; 1 bis 5: Elutionsfraktionen 1 bis 5

Die meisten der gereinigten Peptid-Aptamere wurden gut exprimiert und eluierten vor allem in Fraktion 2 und 3. Diese Fraktionen wurden vereinigt und mittels Dialyse renaturiert. Dazu wurde die Proteinlösung auf 400 mM L-Arginin eingestellt und gegen 400 mM L-Arginin/PBS dialysiert, da hohe Mengen an Arginin die Präzipitation des Proteins während der Dialyse verhindern können. Anschließend wurde durch mehrfache Dialyse gegen PBS das Arginin schrittweise entfernt. Die Konzentrationsbestimmung der renaturierten Proteine erfolgte sowohl densitometrisch nach erneuter SDS-PAGE und Coomassie-Färbung im Vergleich mit einem BSA-Standard (siehe Abb. 3.9), als auch durch Absorptionsmessung mit Bradfordreagenz.

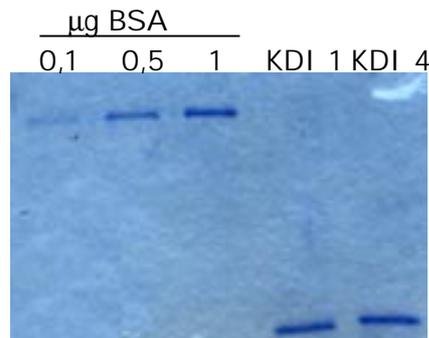


Abb. 3.9: Densitometrische Konzentrationsbestimmung der gereinigten Aptamere nach Renaturierung

In einem 12%igen SDS-PAGE wurden 10 µl der dialysierten Proteinlösungen, sowie verschiedene BSA-Mengen aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie Blue gefärbt und die Konzentration der Proteinlösung durch Vergleich der Intensität der Banden abgeschätzt.

Durch Vergleich der Bandenstärke mit der des BSA-Standards konnte die Konzentration der Proteinextrakte nach der Dialyse bestimmt werden. So wurde für die hier aufgereinigten Aptamere eine Konzentration von 0,1 mg/ml (KDI1) bzw. 0,2 mg/ml (KDI4) festgestellt. Wie im Gel zu sehen ist, ist der Extrakt sehr sauber und zeigt keinerlei Verunreinigungen. Insgesamt erwies sich die Renaturierung der Peptid-Aptamere aber als sehr schwierig, da sie dazu neigten, während der Dialyse zu präzipitieren. Dies führte zu einer stark verminderten Ausbeute. Daher betrug die Ausbeute an Aptamer häufig nur 0,5 bis 0,6 mg/l Bakterienkultur. Das Thioredoxin Wildtypprotein hingegen war stets gut löslich, so dass ca. 5-6 mg/l Bakterienkultur gereinigt werden konnten.

3.3.2.2 Effizienz der Proteintransduktion zur Einbringung von Peptid-Aptameren in Zielzellen

Zunächst wurde untersucht, ob die gereinigten Peptid-Aptamere in die Zellen aufgenommen werden. Dazu wurden aufsteigende Konzentrationen des Aptamers KDI1 bzw. Thioredoxin für 12h zu A431-Zellen in das Medium gegeben. Anschließend wurden die Zellen fixiert und eine Immunofluoreszenz färbung mit einem α Thioredoxin-Antikörper durchgeführt. Gleichzeitig wurde mit einem Antikörper gegen den Rezeptor gefärbt.

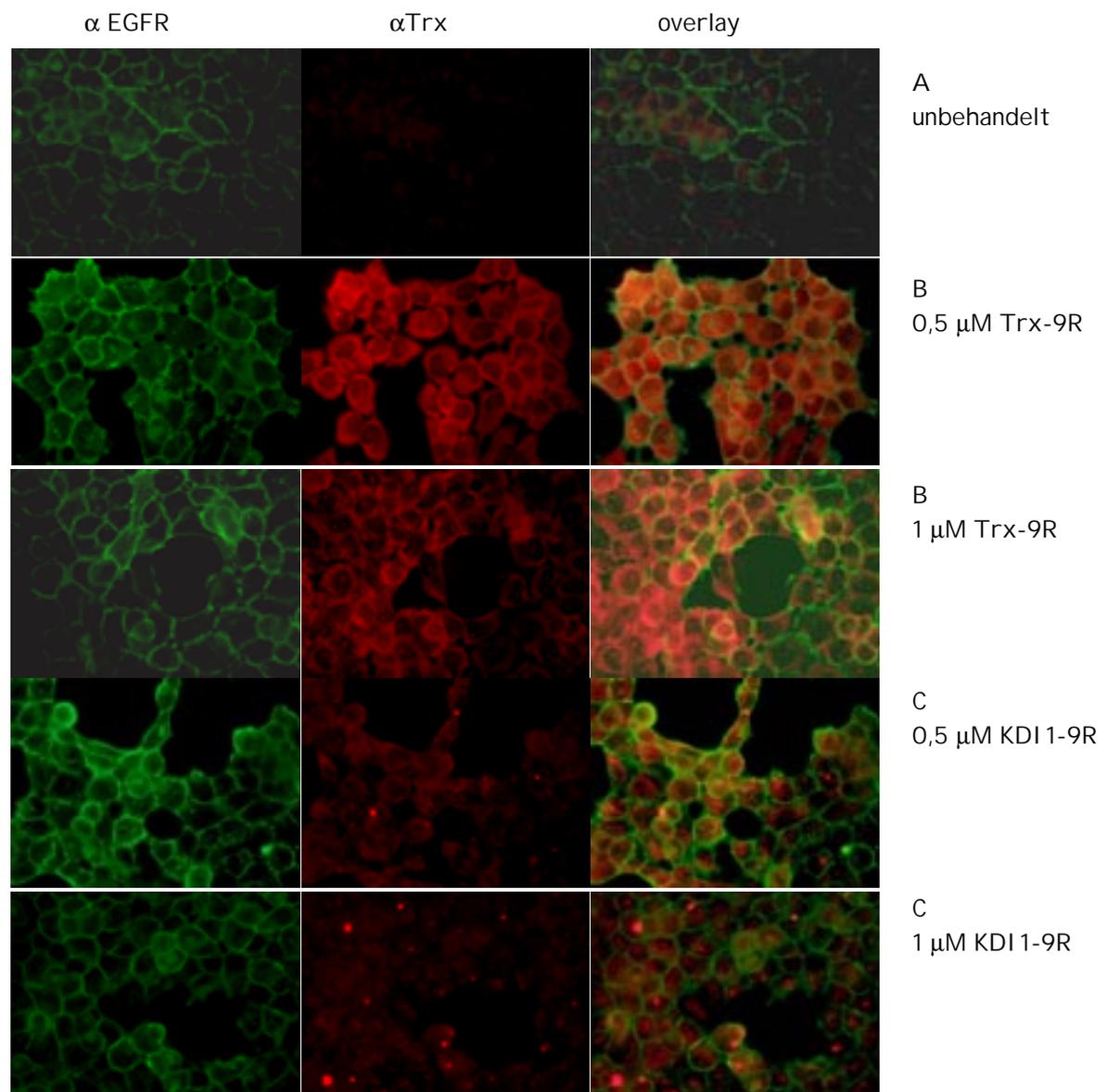


Abb. 3.10: Peptid-Aptamere, fusioniert mit einer 9R-PTD transduzieren schnell und effizient in Zielzellen

Auf Deckgläsern ausgesäte A431-Zellen wurden mit den entsprechenden Mengen Aptamer (A: unbehandelt; B: Thioredoxin-9R; C: KDI1-9R) transduziert, nach 12h fixiert und mit α Trx- und α EGFR-Antikörpern gefärbt. Nach Inkubation mit α -Kaninchen-Rhodamin- und α -Maus-FITC-gekoppelten Sekundärantikörpern wurden die Zellen mit Mowiol/DAPI auf Objektträger aufgebracht. Es wurden Bilder mit einer 100xVergrößerung an einem inversen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen.

Die grüne Färbung der Zellmembran unbehandelter Zellen (Abb.3.10 A) zeigte die gleichmäßige Expression des EGFR in diesem Kompartiment an. Durch die rote Färbung transduzierter Zellen, konnte deutlich gezeigt werden, dass die Zellen die rekombinanten Proteine aufgenommen haben (Abb.3.10 B und C). Die Aufnahme ist

dosisabhängig, da mit 1 μM Protein behandelte Zellen mehr Aptamer aufgenommen haben, als Zellen, die mit einer geringeren Konzentration behandelt wurden. Es ist aus der Literatur bekannt, dass dieser Prozess nicht abzusättigen ist, was darauf hindeutet, dass es sich nicht um einen rezeptorvermittelten Mechanismus handelt (Derossi, Calvet *et al.*, 1996). Es wurde ein Unterschied zwischen Zellen, die mit Thioredoxin transduziert wurden und solchen, die mit dem Aptamer behandelt wurden, deutlich. Mit Thioredoxin transduzierte Zellen zeigten eine gleichmäßige rote Färbung des gesamten Zytoplasmas (Abb.3.10 B), was darauf hindeutete, dass Thioredoxin in kein spezifisches Kompartiment rekrutiert wurde. In Zellen, die mit KDI1-9R behandelt wurden, kommt es zu einer gelblichen Färbung der Zellmembran (Abb. 3.10 C). Diese wurde durch eine Übereinanderlagerung des rot angefärbten Aptamers und des grün markierten Rezeptors verursacht. Daraus lässt sich folgern, dass das Aptamer, auch wenn es mittels Proteintransduktion in Zielzellen eingebracht wurde, spezifisch mit dem Rezeptor interagiert. Um dies näher zu untersuchen, wurden A431 und Herc-Zellen erneut mit Aptamer behandelt, eine Immunfluoreszenz färbung durchgeführt und das Präparat mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop untersucht. Das konfokale Mikroskop erlaubt es, optische Schnitte durch die gesamte Zelle durchzuführen, so dass das Aptamer genauer lokalisiert werden kann.

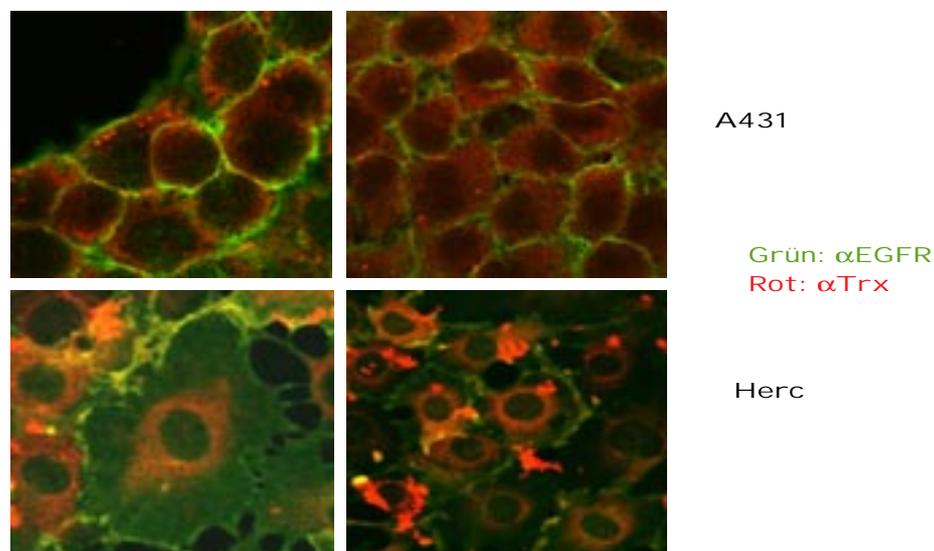


Abb. 3.11: Transduzierte Peptid-Aptamere kolokalisieren mit dem EGF-Rezeptor in verschiedenen Zelllinien

Auf Deckgläsern ausgesäte Zellen wurden mit 1 μM Aptamer KDI4-9R transduziert, nach 12h fixiert und eine Färbung mit αTrx - und αEGFR -Antikörpern durchgeführt. Nach Inkubation mit α -Kaninchen-Rhodamin-gekoppelten und α -Maus-FITC-gekoppelten Sekundärantikörpern wurden die Zellen mit Mowiol/DAPI auf Objektträger aufgebracht und Bilder mit konfokalen Laserscanning Mikroskop aufgenommen.

Das Durchfokussieren des Präparats (Abb. 3.11) ergab, dass das Aptamer in die Zelle aufgenommen wurde und dort deutlich an die Membran rekrutiert wurde. Herc-Zellen zeigten zusätzlich eine rote Färbung im perinuklearen Bereich, deren Ursache jedoch nicht aufgeklärt werden konnte. Die Färbung des Kerns mit DAPI machte jedoch deutlich, dass das Aptamer nicht in den Kern gelangte (UV Bild hier nicht gezeigt). Diese Aufnahmen bestätigen, dass die Methode der Proteintransduktion dazu geeignet ist, Peptid-Aptamere in die Zelle einzubringen und aufgrund der spezifischen Interaktion zwischen Aptamer und EGF-Rezeptor, für die Untersuchung der funktionellen Interferenz verwendet werden kann.

3.3.2.3 Untersuchung der intrazellulären Stabilität transduzierter Peptid-Aptamere

Für die funktionellen Untersuchungen spielte die Stabilität der eingebrachten Peptid-Aptamere in der Zellen eine große Rolle. Besonders für langfristige Versuche, wie Proliferationsassays ist es nötig, die Halbwertszeit der Proteine zu bestimmen, um durch weitere Zugabe des Aptamers stets eine funktionelle intrazelluläre Konzentration aufrechtzuerhalten. Für die Bestimmung der Halbwertszeit der Aptamere, wurden Zellen mit einem Peptid-Aptamer behandelt und die Menge an intrazellulär vorhandenem Protein nach verschiedenen Zeitpunkten im Western Blot und in der Immunofluoreszenz bestimmt.

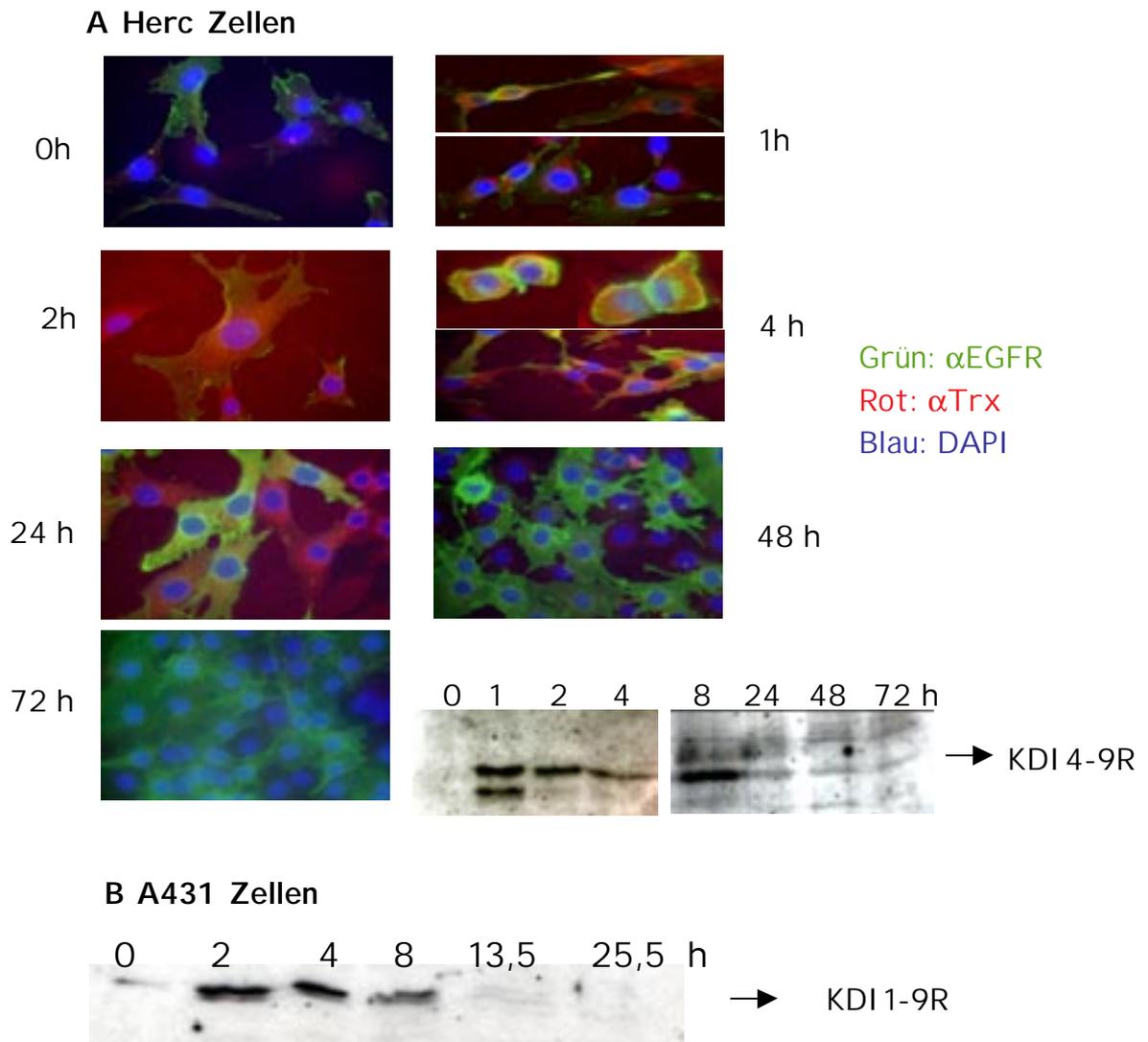


Abb.3.12: Peptid-Aptamere sind 8 bis 12h nach Transduktion in Zielzellen nachweisbar

(A) Herc-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und mit 0,5 μ M Aptamer KDI4-9R behandelt. Nach den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert und einer Immunfluoreszenz färbung unterzogen (Rot: α Trx; Grün: α EGFR). Ein Teil der Zellen wurde lysiert und in einem Western Blot die Menge des Aptamers mit einem α Trx Antikörper detektiert.

(B) A431-Zellen wurden mit 1 μ M Aptamer KDI1-9R behandelt, nach den gekennzeichneten Zeitpunkten Zelllysate hergestellt, welche im SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Die Präsenz des Aptamers wurde mit einem α Trx-Antikörper detektiert.

Sowohl die Immunfluoreszenz - als auch die Western Blot-Analysen zeigten, dass das Aptamer nach einer Stunde in Herc-Zellen nachweisbar war (Abb. 3.12 A). Die Immunfluoreszenz färbung zeigte gleichzeitig, dass nahezu 100% der Zellen transduziert wurden. Im Western Blot ließen sich beide Aptamere (KDI1 und 4) bis zu 8 Stunden nachweisen. Auch zwischen den verschiedenen Konzentrationen (0,5 μ M und 1 μ M) und Zelllinien (A431- und Herc-Zellen) gab es keine Unterschiede in

der intrazellulären Stabilität der Proteine. In der Immunofluoreszenz konnte das Peptid-Aptamer noch nach 24 Stunden in geringer Menge detektiert werden. Bei dieser Methode handelt es sich gegenüber dem Western Blot um eine erheblich sensitivere Methode, da bereits die Präsenz des Proteins in einer einzelnen Zelle nachgewiesen werden kann, während die Nachweisgrenze im Western Blot erheblich höher liegt. Nach 48 Stunden ist das Aptamer auch in der Immunofluoreszenz nicht mehr in den Zellen nachweisbar. Um die gewünschte Aptamer-Konzentration aufrechtzuerhalten, sollten Zellen folglich ca. alle 12 Stunden transduziert werden.

3.4 Untersuchung der funktionellen Interferenz der isolierten Peptid-Aptamere mit dem EGF-Rezeptor

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl durch endogene Expression als auch durch Proteintransduktion eingebrachte Aptamere *in vivo* mit dem EGFR interagierten. Es sollte nun untersucht werden, inwieweit die Bindung des Aptamers an den Rezeptor mit dessen Funktion interferiert.

3.4.1 Untersuchung der Peptid-Aptamer-Wirkung auf die Proliferation und Transformation von Zellen

Vom EGF-Rezeptor ausgehende Signale induzieren Proliferation und Wachstum von Zellen. Daher wurde zunächst untersucht, ob die Expression der Aptamere, die Proliferation der Zellen beeinflusst. Dazu wurde die Proliferation der stabil transfizierten Zellen über mehrere Tage verfolgt.

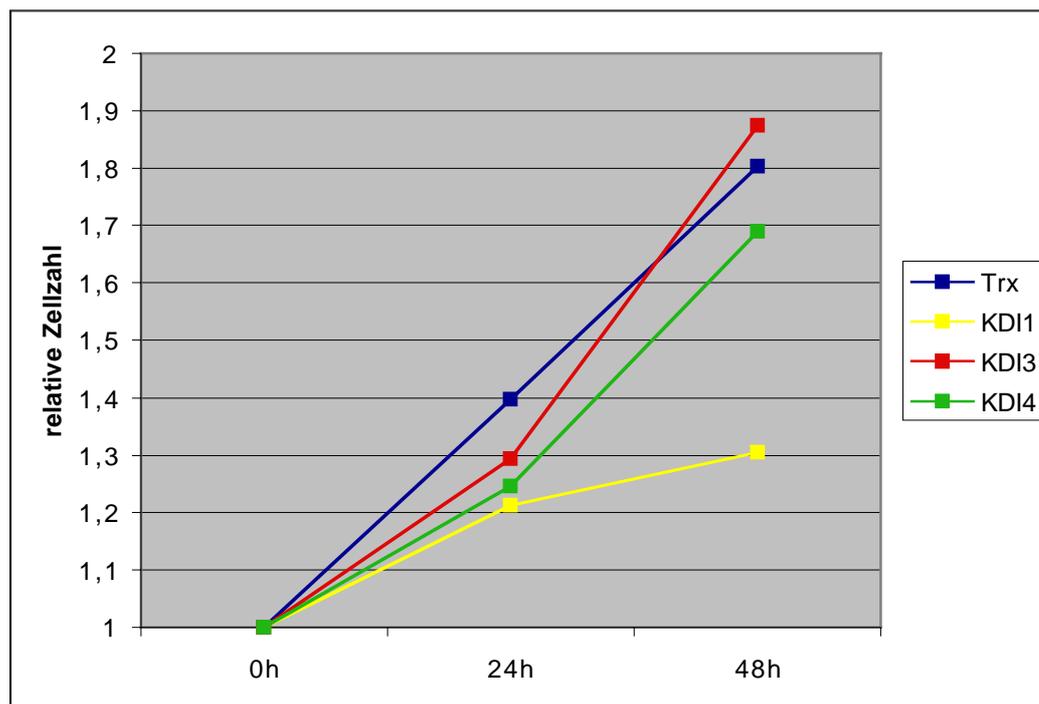


Abb.3.13: Expression von KDI1 in Herc-Zellen verlangsamt deren Proliferation

5×10^3 Zellen wurden in einer Multititerplatte ausgesät und die Proliferation der Zellen über zwei Tage mit XTT quantifiziert. Die Abbildung repräsentiert drei unabhängige Experimente.

Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, welche nur das Trx Protein ohne Peptidinsert exprimieren. Wie aus den Wachstumskurven (Abb. 3.13) zuerkennen ist, beeinflusste die Expression der Aptamere KDI3 und 4 die proliferativen Eigenschaften der Zellen

kaum. Dagegen wurde jedoch deutlich, dass die Expression von KDI1 das Zellwachstum erheblich beeinflusste. Die mit diesem Aptamer stabil transfizierten Zellen wuchsen im Vergleich zu Kontrollzellen viel langsamer. Diese Beobachtung deutete darauf hin, dass die Interaktion von KDI1 mit dem EGFR, die von ihm ausgehenden proliferativen Signale inhibiert. Um diesen veränderten Phänotyp der Herc KDI1 Zellen näher zu untersuchen, wurde die EGF-induzierte Proliferation untersucht. Dazu wurden Herc-Zellen, die Aptamere stabil exprimieren, über Nacht ohne Serum kultiviert, so dass die Stimulation durch exogene Signale ausgeschaltet wurde. Dann wurden die Zellen mit 30 ng/ml EGF induziert und die Proliferation mittels XTT über einen Zeitraum von drei Tage quantifiziert.

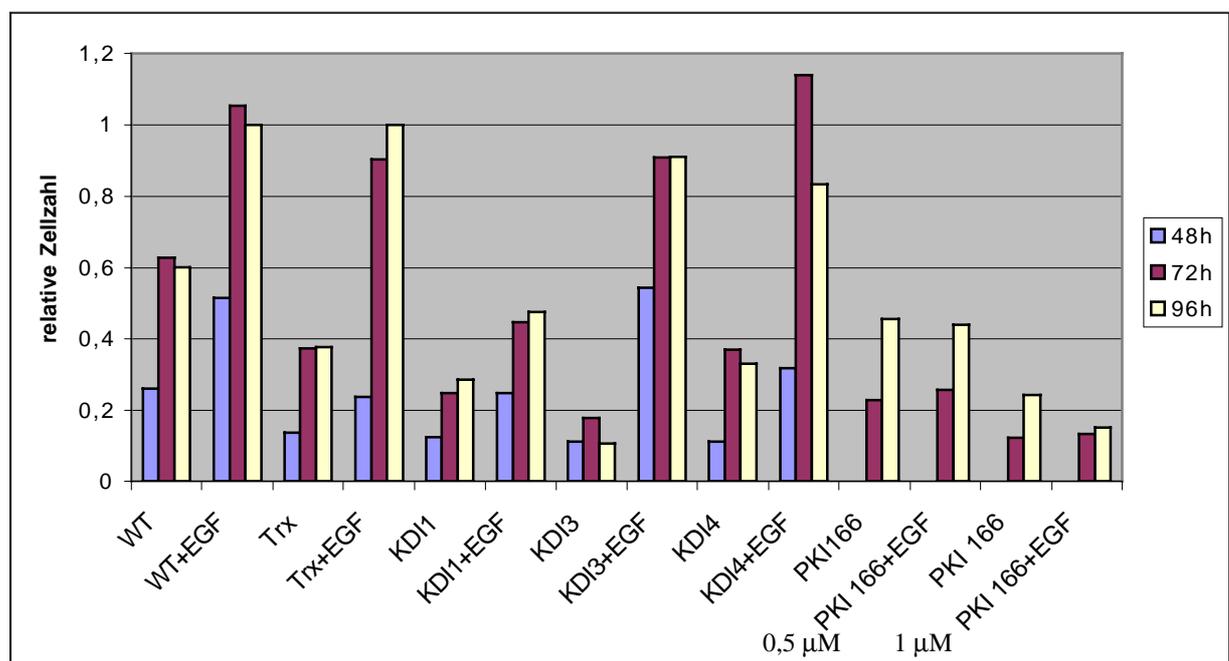


Abb. 3.14: KDI1 inhibiert die EGF-induzierte Proliferation von Herc-Zellen

5×10^3 Zellen wurden in einer 96well-Platte ausgesät, über Nacht ohne Serum kultiviert und mit 30 ng/ml EGF induziert. Ein Teil der Wildtypzellen wurde außerdem mit dem chemischen EGFR-Inhibitor PKI-166 behandelt. Über 2 bis 4 Tagen wurden alle 24h das Zellwachstum mit XTT quantifiziert. Es wurde gegen das Wachstum unbehandelter Wildtypzellen nach 96h normalisiert. Die Abbildung repräsentiert drei unabhängige Experimente.

EGF-Stimulation bewirkte in Wildtypzellen eine erhebliche Steigerung der Proliferation (Abb. 3.14). Dieser Zuwachs ist nach 72 Stunden am signifikantesten, während nach 96 Stunden keine zusätzliche Zellvermehrung eingetreten war. Eine mögliche Ursache mag der Verbrauch des Wachstumsfaktors EGF sein. Als Kontrolle wurden Wildtypzellen mit dem chemischen EGFR-Inhibitor PKI-166 behandelt. Dieser blockiert die Kinaseaktivität des Rezeptors, so dass die Proliferation durch

EGF-Zugabe nicht mehr verstärkt werden kann. Eine basale Proliferation, welche nicht durch EGF induziert wird, findet jedoch noch statt. Trx exprimierende Zellen verhielten sich ähnlich wie Wildtypzellen, was bedeutet, dass die Präsenz des funktionsfähigen Redox-Enzyms nicht in den Stoffwechsel der Zellen eingreift. In Zellen hingegen, die Aptamer KDI1 exprimierten, war die EGF-induzierte Proliferation im Vergleich zu den Kontrollzellen zu 50% inhibiert. Die Aptamere KDI3 und 4 hingegen hatten keinen Einfluss auf die EGF-induzierte Proliferation der Zellen. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass die Interaktion zwischen Aptamer und dem EGFR zur Folge hat, dass keine oder nur eingeschränkte Proliferationssignale vom Rezeptor ausgehen können. Der EGFR ist ursächlich an der zellulären Transformation von Zellen beteiligt. Transformierte Zellen können unabhängig von einer Matrix wachsen (anchorage independant growth) und daher in Weichagar zu Kolonien auswachsen. Es konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Herc-Zellen durch Zugabe von EGF einen drastischen Anstieg der Kolonienformation in Weichagar zeigen (Di Fiore, Pierce *et al.*, 1987). Daher wurden die stabilen Zelllinien in semisolidem Medium ausgesät und die Bildung von Foci nach EGF-Stimulation mikroskopisch verfolgt. Die Anzahl der Kolonien wurde mittels XTT quantifiziert.

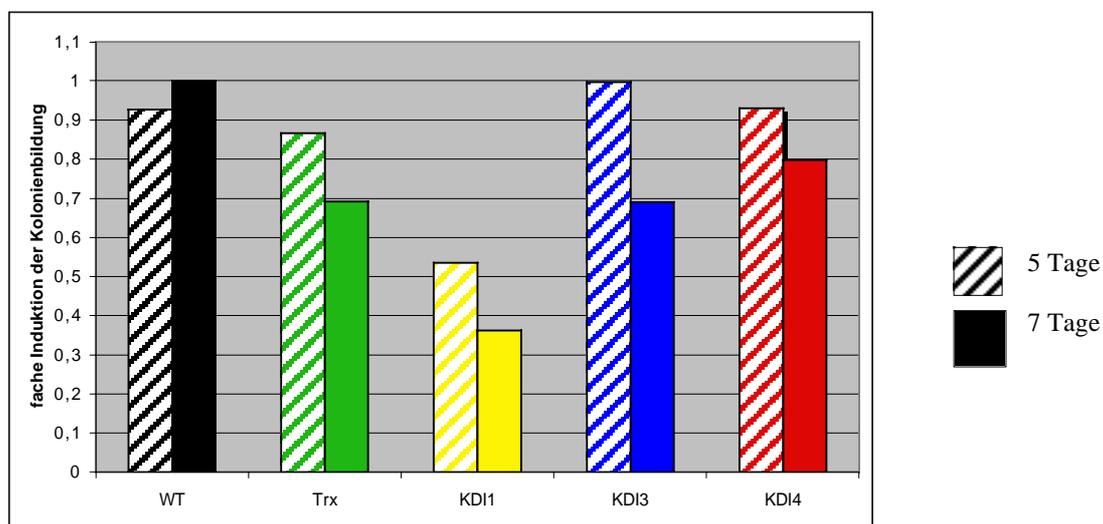


Abb. 3.15: KDI1 exprimierende Herc-Zellen bilden weniger EGF-abhängige Kolonien in Weichagar
 Auf einer Bodenschicht, bestehend aus 0,5%igen Agar, wurden $2,5 \times 10^3$ Zellen in 0,3%igem Agar in einer Multititerplatte ausgesät. Anschließend wurden sie mit 30 ng/ml EGF in Medium überschichtet und die Bildung von Kolonien nach 5 und 7 Tagen mittels XTT quantifiziert. Die x-fache Induktion der Kolonienbildung im Vergleich zwischen nicht stimulierten und stimulierten Zellen wurde aufgetragen. Dabei wurde jeweils gegen die Kolonienbildung der Wildtypzellen nach 7 Tagen normalisiert. Die gezeigte Abbildung repräsentiert drei unabhängige Experimente.

In Zellen, die Thioredoxin exprimierten, war die Induktion der Kolonienbildung im Vergleich zu Wildtypzellen kaum beeinflusst (Abb.3.15). Dies bestätigt erneut, dass das funktionelle Thioredoxinenzym nicht in die EGF-Signaltransduktion eingreift. Auch Aptamer KDI3 und 4 beeinflussten den Grad der Transformation der Zellen nicht. Durch die Expression des Aptamers KDI1 war die Fähigkeit dieser Zellen, Kolonien in Weichagar zu bilden, zu 45 bis 65 % inhibiert. Es fällt auf, dass nach längerer Inkubation (7 Tage) die Fähigkeit, Kolonien zu bilden geringer wird. Dies trifft auf alle stabil transfizierten Zelllinien zu. Wahrscheinlich war auch hier der Wachstumsfaktor verbraucht und die Zellen begannen aufgrund des Nahrungsmangels zu sterben, so dass im XTT-Test weniger lebende Zellen detektiert werden konnten. Somit lässt sich zusammenfassen, dass das Aptamer KDI1 mit der EGF-induzierten Proliferation (Abb. 3.14) und Transformation (Abb. 3.15) von Fibroblasten interferierte und diese signifikant inhibierte. Ein vergleichbarer Effekt wurde weder durch das Thioredoxinprotein noch durch die beiden übrigen Aptamere KDI3 und 4 vermittelt. In weiteren Experimenten sollten nun die genauen biochemischen Vorgänge untersucht werden, durch die Aptamer KDI1 in diese Vorgänge eingreift.

3.4.2 Einfluss des Aptamers KDI 1 auf die EGF-vermittelte Signaltransduktion

Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) stimuliert Proliferation und garantiert das Überleben in einer Reihe von normalen und malignen Zellen. Die Bindung des Liganden an den EGFR aktiviert die intrinsische Kinaseaktivität des Rezeptors, was zur Autophosphorylierung spezifischer Tyrosinreste im C-Terminus des Rezeptors führt. An diese Tyrosine binden verschiedene SH2-Domänen enthaltende Signalmoleküle, die unterschiedliche Signaltransduktionswege anschalten. Da gezeigt werden konnte, dass Aptamer KDI1 vom EGFR ausgehende proliferative Signalwege inhibieren kann, sollte nun genau untersucht werden, mit welchem Signalweg das Aptamer interferiert.

3.4.2.1 Untersuchung des Aktivierungsmusters des EGF-Rezeptors in Gegenwart des Aptamers KDI 1

Um zu untersuchen, welcher Signalweg durch die Gegenwart des Aptamers KDI1 beeinflusst wird, wurde die Phosphorylierung des EGFR an spezifischen Tyrosinresten nach EGF-Stimulation in Gegenwart des Aptamers bzw. des Kontrollproteins untersucht. Innerhalb des C-Terminus wurden die Tyrosinreste Y 992, Y1068, Y 1086, Y 1148 und Y1173 als Autophosphorylierungsstellen identifiziert (Xia, Wang *et al.*, 2002). Diese Tyrosinreste stellen spezifische Bindungsstellen für SH2-Domänen enthaltende Proteine dar, welche nachfolgende Signalwege aktivieren. Des Weiteren existieren Phosphorylierungsstellen, welche durch die zytoplasmatische Kinase c-Src phosphoryliert werden und damit die Rezeptoraktivierung verstärken (Abb. 3.16).

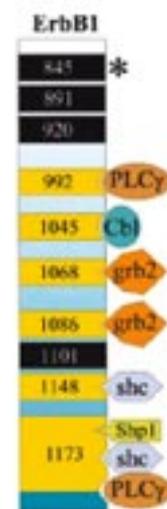


Abb. 3.16: *Spezifisches Phosphorylierungsmuster der Tyrosinreste im C-Terminus des EGFR und die damit interagierende Signalproteine*

In gelb sind die Reste markiert, welche der Autophosphorylierung unterliegen, während in schwarz die durch c-Src phosphorylierten Tyrosinreste gekennzeichnet sind.

Für einige dieser Phosphorylierungsstellen existieren Antikörper, welche spezifisch nur die phosphorylierte Sequenz erkennen. Mittels dieser Antikörper konnte untersucht werden, an welchen Stellen die Phosphorylierung durch das Aptamer beeinflusst wird.

Stabil exprimierende Herc-Zellen wurden über Nacht ohne Serum inkubiert und dann mit EGF induziert. Im Western Blot konnte daraufhin die Phosphorylierung der einzelnen Tyrosinreste detektiert werden (Abb. 3.17).



Abb. 3.17: Die stabile Expression von KDI1 in Herc-Zellen reduziert die EGF-induzierte Phosphorylierung des EGF-Rezeptors an Tyrosin 1068 und 1148

Stabil transfizierte Herc-Zellen wurden über Nacht in serumfreien Medium kultiviert, zu verschiedenen Zeitpunkten mit 50ng/ml EGF stimuliert und Zelllysate hergestellt. 20 µg Totallysat wurden im 6%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western Blot konnte durch Inkubation mit den Antikörpern, spezifisch für die einzelnen Tyrosinreste, die Phosphorylierung des EGFR detektiert werden. Zum Vergleich der geladenen Mengen des EGFR wurden die Blots gestrippt und mit einem EGFR-Antikörper inkubiert.

Zellen, die nicht mit EGF stimuliert wurden, zeigten keine Phosphorylierung an den untersuchten Tyrosinresten. Bereits nach 10 Minuten zeigte der Rezeptor in den Thio-redoxin-exprimierenden Zellen eine starke Phosphorylierung, die auch nach 30 Minuten noch vorhanden war. Nur die Aktivierung des Tyrosinrestes 1068 ist

transient und hat nach 30 min bereits abgenommen. In Zellen, die Aptamer KDII exprimieren, ist die Phosphorylierung jedoch an einigen Resten schwächer. So ist die Phosphorylierung an Tyrosin 1068 und Tyrosin 1148 deutlich reduziert, während die Phosphorylierung an Tyrosin 992, 1086 und 1173 nicht beeinflusst ist, wobei jeweils gleiche Mengen des Rezeptors geladen wurden. Um die Ergebnisse weiter zu bestätigen, wurde das gleiche Experiment mit Zellen durchgeführt, die vor EGF-Stimulation mit Aptameren transduziert wurden (Abb. 3.18). Auf diese Weise konnte kurz vor der Aktivierung des Rezeptors eine höhere intrazelluläre Aptamerkonzentration als in stabil transfizierten Zellen erreicht werden, so dass die inhibitorische Wirkung deutlicher sichtbar werden sollte.

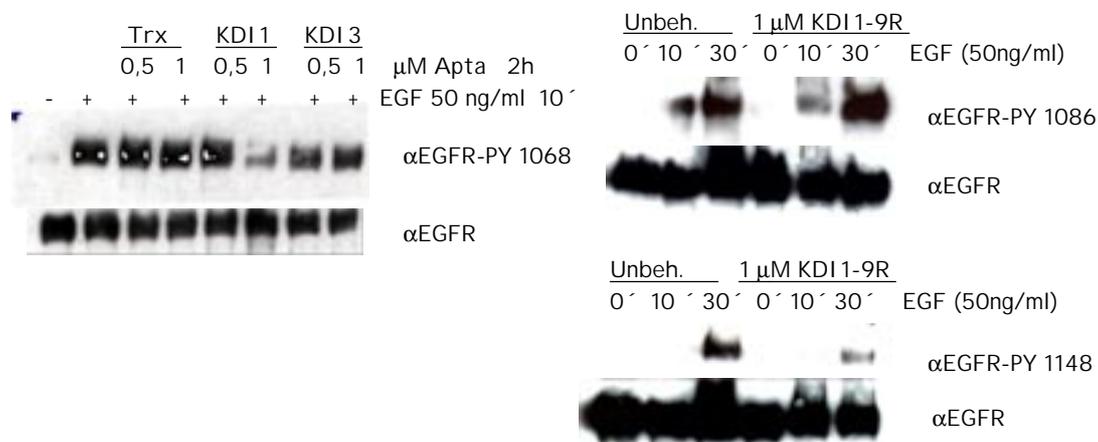


Abb. 3.18: Transduktion von 1 μ M KDII-9R inhibiert die EGF-abhängige Phosphorylierung des EGF-Rezeptors an den Tyrosinresten 1068 und 1148

Renca/EGFR-Zellen wurden über Nacht in serumfreien Medium kultiviert und anschließend mit verschiedenen Mengen der Aptamere transduziert. Nach zwei Stunden wurden die Zellen für 10 min und 30 min mit 50 ng/ml EGF induziert. Es wurden Zelllysate hergestellt, welche im SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Die Phosphorylierung der einzelnen Tyrosinreste wurde im Western Blot mit den entsprechenden Antikörpern detektiert. Zum Abgleich der gleichen Mengen des EGFR wurden die Blots gestrippt und mit einem EGFR-Antikörper inkubiert.

Durch 1 μ M des Aptamers KDII-9R kann die Phosphorylierung des Tyrosinrestes 1068 erheblich reduziert werden, während 0,5 μ M des Aptamers bzw. Aptamer KDII-9R oder das Thioredoxinprotein nicht einen solchen Effekt auslösen können (Abb. 3.18). Auch die Untersuchung der Aktivierung weiterer Tyrosinreste nach Transduktion von 1 μ M KDII-9R bestätigte die Ergebnisse, die mit den stabil transfizierten Herc-Zellen gezeigt wurden (Abb. 3.17). Transduktion von 1 μ M des Aptamers KDII inhibierte deutlich die Phosphorylierung an Tyrosin 1148, während die Aktivierung von Tyrosin 1086 kaum beeinflusst wurde (Abb. 3.18).

Es konnte gezeigt werden, dass der EGF-Rezeptor außerdem durch die zytoplasmatische Kinase c-Src phosphoryliert wird (Stover, Becker *et al.*, 1995). Vor allem die Phosphorylierung des Tyrosinrestes 845, welcher in der Kinasedomäne liegt, aktiviert den Rezeptor zusätzlich und steigert dessen Kinaseaktivität. Daher sollte untersucht werden, ob die Gegenwart des Aptamers auch die Phosphorylierung an diesem Tyrosinrest beeinflusst (Abb. 3.19)

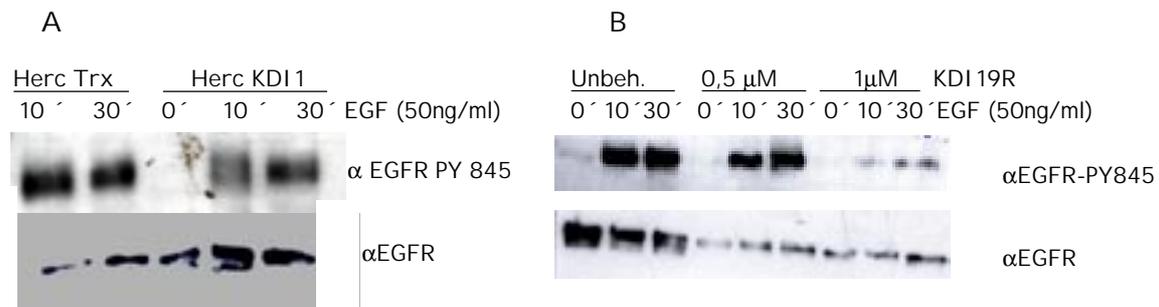


Abb. 3.19: Die Interaktion von KDI1 mit dem EGF-Rezeptor inhibiert dessen Phosphorylierung an Tyrosin 845 durch c-Src

(A) Stabil transfizierte Herc-Zellen wurden über Nacht ohne Serum kultiviert. Die Zellen wurden für verschiedene Zeiten mit 50ng/ml EGF stimuliert und Zellysate hergestellt. 20 μg Totallysat wurden im 6%igen SDS-PAGE aufgetrennt.

(B) Renca/EGFR-Zellen wurden über Nacht ohne Serum kultiviert und für 2h mit den gekennzeichneten Mengen des gereinigten Aptamers KDI1-9R behandelt. Die Zellen wurden für verschiedene Zeiten mit 50ng/ml EGF stimuliert und Zellysate hergestellt. 50 μg Totallysat wurden im 6%igen SDS-PAGE aufgetrennt.

Im Western Blot konnte durch Inkubation mit einem Antikörper spezifisch für die Phosphorylierung des Tyrosinrestes 845, die Aktivierung des EGFR durch c-Src detektiert werden. Zum Mengenvergleich des EGFR wurde der Blot gestrippt und mit einem EGFR-Antikörper inkubiert.

In Kontrollzellen, die das Thioredoxinprotein stabil exprimierten (Herc Trx) konnte durch EGF-Stimulation die Phosphorylierung an Tyrosin 845 induziert werden. In Zellen hingegen, welche Aptamer KDI1 stabil exprimieren, war die Phosphorylierung dieses Tyrosinrestes etwas geringer (Abb. 3.19 A). Unbehandelte Renca/EGFR-Zellen zeigten ebenfalls eine starke Induktion der Phosphorylierung nach 10 und 30 min EGF-Stimulation. Durch Transduktion von 0,5 μM KDI1-9R war die Phosphorylierung dieses Restes etwas schwächer. Wurden die Zellen jedoch mit 1 μM Aptamer behandelt, konnte nahezu keine Induktion der Phosphorylierung an Tyrosin 845 mehr festgestellt werden (Abb. 3.19 B). Auch hier zeigte sich erneut, dass die inhibitorische Wirkung des Aptamers durch Transduktion erheblich deutlicher war, als durch stabile Expression der Aptamere.

3.4.2.2 Untersuchung der Aktivierung nachgeschalteter Signalwege

a.) Der MAP-Kinase-Signalweg

Es konnte gezeigt werden, dass EGF-Stimulation zur Aktivierung des MAPK-Signalweges führt. Nach der Rekrutierung von Shc und Grb2 zum phosphorylierten Rezeptor, wird das G-Protein Ras über den Grb2-gebundenen Austauschfaktor Sos, aktiviert. Dieses G-Protein aktiviert die Serin/Threonin-Kinase Raf, welche über MEK1 schließlich Erk1/2 induziert. Die Aktivierung dieses Signalwegs resultiert in aktive Transkriptionsfaktoren, die schließlich für die Proliferation verantwortliche Gene transkribieren. Da gezeigt werden konnte, dass in Zellen, die Aptamer KDI1 exprimieren, die Phosphorylierung an einigen Tyrosinresten reduziert ist, sollte nun untersucht werden, ob dies auch zu einer reduzierten Aktivität der nachgeschalteten Signalmoleküle wie z.B. dem MAPK-Weg führt. Hierfür wurden Herc-Zellen, wie bereits beschrieben mit EGF stimuliert und die Aktivierung von Shc und der MAP-Kinasen p42/p44 mit entsprechenden phosphospezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert.



Abb. 3.20: KDI1 inhibiert die EGF-induzierte Aktivierung von p46 Shc

(A) Stabil transfizierte Herc-Zellen wurden über Nacht in serumfreien Medium gehalten und mit 50ng/ml EGF für die gekennzeichneten Zeitpunkte induziert.

(B) Renca/EGFR-Zellen wurden über Nacht in serumfreien Medium gehalten, für 2h mit 1 μ M KDI1-9R behandelt und für die gekennzeichneten Zeitpunkte mit 50 ng/ml EGF induziert.

Zellysate wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot die Phosphorylierung mit einem Antikörper, der spezifisch die Phosphorylierung des Tyrosin 317 erkennt, nachgewiesen. Ein Vergleich der Proteinmengen wurde durch Ponceau-Färbung nachgewiesen.

Das Adapterprotein Shc liegt in drei Splicevarianten in der Zelle vor (p66, p52, p46). In den vorliegenden Blots (Abb. 3.20) konnten nur die beiden kleineren Formen (Abb. 3.20 A) bzw. in Renca-Zellen nur die kleinste Variante (Abb. 3.20 B) detektiert werden, da die beiden größeren nur schwach exprimiert werden. Shc kann an drei verschiedenen Tyrosinresten phosphoryliert werden: Y239, Y240 und Y317. An den

phosphorylierten Tyrosinrest 317 bindet der Grb/Sos Komplex und aktiviert so den MAPK-Weg. Daher konnte mit dem hier verwendeten Antikörper gegen diesen Rest auch auf die Aktivierung des MAPK Signalwegs geschlossen werden. p46 zeigte auch in unstimulierten Zellen eine basale Aktivierung. Durch EGF-Stimulation wurde die Phosphorylierung von Shc jedoch erheblich verstärkt. Im Vergleich zu den Kontrollzellen war der Grad der Phosphorylierung von p46 Shc in Herc-Zellen, die Aptamer KDI1 stabil exprimieren, jedoch etwas geringer, während p52 Shc nicht beeinflusst war (Abb. 3.20 A). Ein ähnliches Ergebnis wurde auch durch Transduktion von 1 μ M KDI1-9R Protein erreicht. In den transduzierten Renca-Zellen ist die Phosphorylierung von p46 im Vergleich zu unbehandelten Zellen erheblich reduziert (Abb. 3.20 B). Die Färbung des Blots mit Ponceau S zeigte, dass in allen Spuren gleiche Mengen des Zelllysats geladen wurden. Daher kann angenommen, dass durch die Bindung des Aptamer KDI1 an den EGF-Rezeptor auch die Aktivierung des Shc-Proteins quantitativ inhibiert wurde. Des Weiteren wurde untersucht, ob Aptamer KDI1 die Aktivierung der MAP-Kinasen p42/p44 beeinflusst.

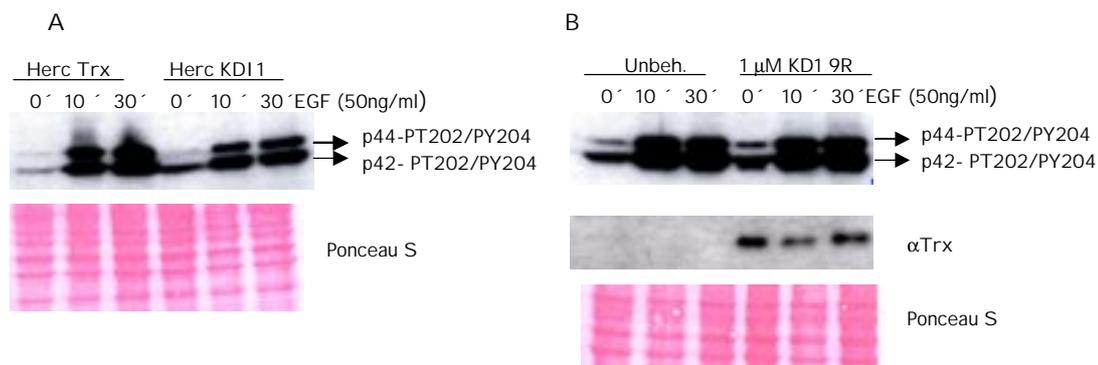


Abb. 3.21: Die EGF-abhängige Aktivierung der MAP-Kinasen p42 und p44 (Erk 1 und 2) wird durch KDI1 nicht beeinflusst

(A) Stabil transfizierte Herc-Zellen wurden über Nacht in serumfreien Medium gehalten und mit 50ng/ml EGF für die gekennzeichneten Zeitpunkte induziert. Zelllysate wurden im 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt.

(B) Renca/EGFR-Zellen wurden über Nacht in serumfreien Medium gehalten und für 2 h mit 1 μ M KDI1-9R transduziert. Die Zellen wurden mit 50ng/ml EGF für die gekennzeichneten Zeitpunkte induziert und die Zelllysate im 12 %igen SDS-PAGE aufgetrennt.

Im Western Blot wurde die Phosphorylierung von Threonin 202 und Tyrosin 204 mit einem entsprechenden Antikörper detektiert. Die Ponceau-Färbung der Membran nach dem Blotting zeigte, dass gleiche Proteinmengen geladen wurden. Der Blot, der die Lysate transduzierter Renca-Zellen zeigt, wurde zum Nachweis der erfolgreichen Proteintransduktion noch mit einem α Thioredoxin-Antikörper inkubiert.

Die MAP Kinaseformen p42 und p44, auch Erk 1 und 2 genannt, werden durch Phosphorylierung an Threonin 202 und Tyrosin 204 durch die MAP-Kinase-Kinasen MEK 1/2 aktiviert. In Abwesenheit von EGF zeigten beide Formen nur eine schwache basale Aktivität. Durch EGF konnten sie jedoch rasch aktiviert werden (Abb. 3.21 A und B). Weder in Zellen, welche das Aptamer stabil exprimieren (Abb. 3.21 A) noch in Zellen, die mit 1 μM Aptamer KDI1-9R transduziert wurden (Abb. 3.21 B), war die Phosphorylierung der beiden MAP-Kinaseformen im Vergleich zu den Kontrollzellen verändert. Daher lässt sich schlußfolgern, dass das Aptamer keinen Einfluss auf die Aktivierung des MAPK-Signalwegs hatte. Der Thioredoxin-Blot zeigte gleichzeitig, dass das Aptamer durch Proteintransduktion in die Zellen aufgenommen wurde und dort nach zwei Stunden nachweisbar war (Abb. 3.21 B).

b.) Der STAT-Signalweg

In zahlreichen Publikationen konnte gezeigt werden, dass durch EGF-Stimulierung STAT 1, 3 und 5 aktiviert werden (Grandis, Drenning *et al.*, 1998). Vor allem das aktivierte STAT3 Protein ist dabei ein wichtiger Transmitter in stark proliferierenden Tumoren (Grandis, Drenning *et al.*, 2000). Daher sollte untersucht werden, inwieweit die Präsenz des Aptamers die Aktivierung von STAT3 beeinflusst. Auch dieses Experiment wurde parallel mit stabil transfizierten Herc-Zellen und mit Renca/EGFR-Zellen, die mit dem Aptamer transduziert wurden, durchgeführt.

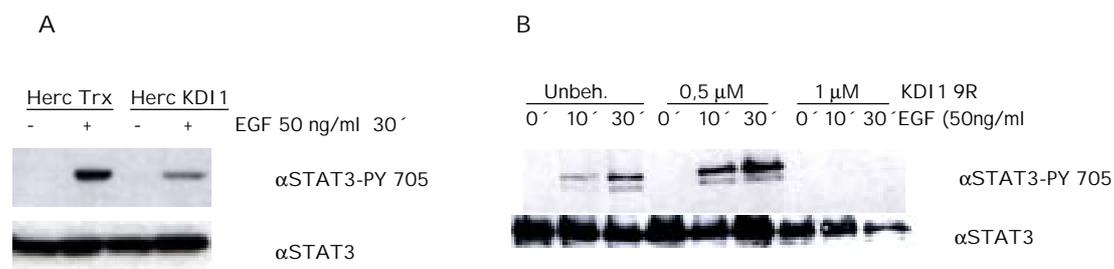


Abb. 3.22: Die EGF-induzierte Phosphorylierung von STAT3 wird durch KDI1 stark inhibiert

(A) Stabil transfizierte Zelllinien wurden über Nacht ohne Serum kultiviert und dann mit 50ng/ml EGF für 30 min induziert. Es wurden Zelllysate hergestellt und 100 μg in einem 6%igen SDS-PAGE aufgetrennt.

(B) Renca/EGFR-Zellen wurden über Nacht ohne Serum kultiviert, für zwei Stunden mit den gekennzeichneten Mengen Aptamer behandelt und für 10 bzw. 30 min mit 50 ng/ml EGF induziert. Die Zelllysate wurden im 8%igen SDS-PAGE aufgetrennt

Im Western Blot wurde die Phosphorylierung der STAT3 Proteine mit einem Antikörper detektiert, welcher spezifisch Phospho-Tyrosin 705 erkennt. Der Blot wurde „gestrippt“ und mit einem Antikörper inkubiert, welcher alle STAT3 Proteine unabhängig ihres Phosphorylierungsgrades erkennt.

STAT3 wird durch Phosphorylierung des Tyrosinrestes 705 aktiviert. Dadurch kommt es über die jeweilige SH2-Domäne des Partnermoleküls zur Dimerisierung und Translokation in den Kern, wo es die Transkription bestimmter Zielgene induziert.

Während in nicht stimulierten Zellen STAT3 nicht phosphoryliert vorlag, konnte es durch EGF-Zugabe aktiviert werden (Abb. 3.22 A und B). In Zellen, welche KDI1 stabil exprimierten, war diese Phosphorylierung jedoch erheblich schwächer (Abb. 3.22 A). Die erneute Inkubation des Blots mit einem STAT3 spezifischen Antikörper zeigte, dass in allen Spuren gleiche Proteinmengen geladen wurden (Abb. 3.22 A). Ein ähnliches Ergebnis konnte auch durch Proteintransduktion des Aptamers erreicht werden. Zellen, welche mit 1 μM KDI1-9R transduziert wurden, zeigten keinerlei Phosphorylierung von STAT3, während 0,5 μM des Aptamers nicht ausreichten, diesen Effekt auszulösen (Abb. 3.22 B). Die STAT3-Ladungskontrolle zeigte zwar, dass in den letzten drei Spuren auch etwas weniger STAT3 geladen wurden, aber das relative Verhältnis zeigt immer noch deutlich, dass STAT3 nach Transduktion von 1 μM KDI1-9R deutlich weniger phosphoryliert war. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Aptamer KDI1 die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von STAT3 quantitativ inhibieren kann.

STAT-Moleküle sind, wie ihr Name schon sagt, nicht nur Signalmoleküle, sondern wirken auch als Transkriptionsfaktoren. Da gezeigt werden konnte, dass die Gegenwart von Aptamer KDI1 die Phosphorylierung von STAT3 reduziert, sollte auch untersucht werden, ob Aptamer KDI1 auch die Fähigkeit von STAT3 beeinflusst, die Transkription spezifischer Gene zu aktivieren. Dazu wurde ein Luziferase-Reporter-Experiment durchgeführt. Das Luziferasegen, das unter der Kontrolle des STAT3 induzierbaren α -Macroglobulin-Promotors steht, wurde in Herc-Zellen, welche die gleiche Menge des Thioredoxins bzw. des Aptamers exprimieren, transfiziert. Nach Induktion mit EGF konnte die STAT3 abhängige Transkriptionsinitiation mittels der Umsetzung des Luziferin-Substrat durch die Luziferase quantifiziert werden.

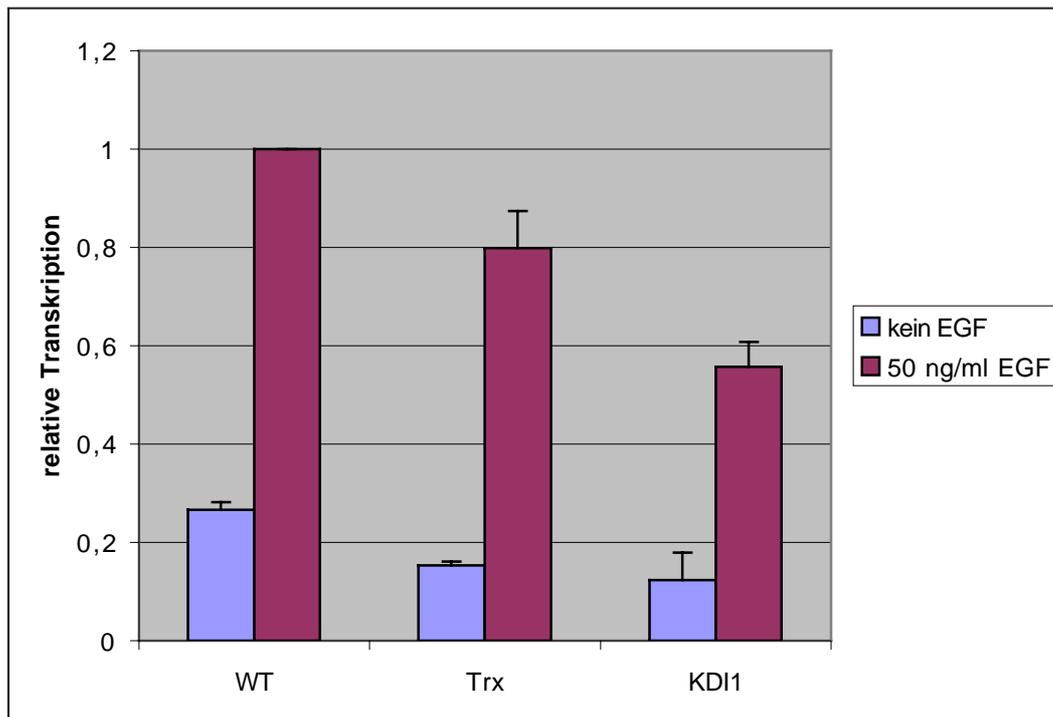


Abb.3.23: Die stabile Expression von KDI1 inhibiert die EGF-abhängige Transaktivierungsaktivität von STAT3

Herc-Zellen, die das Aptamer bzw. das Thioredoxinprotein exprimieren, wurden mit 1 µg des STAT3-Luciferasereportergens, sowie 20 ng des β-Galaktosidase-Plasmids transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden den Zellen für 8 Stunden das Serum entzogen, über Nacht mit 50 ng/ml EGF induziert und die Luziferase-Aktivität der Lysate bestimmt. Es wurde gegen die β-Galaktosidase-Aktivität normalisiert. Die gezeigte Abbildung repräsentiert drei unabhängige Experimente.

In WT-Zellen lässt sich die Transaktivierungsaktivität von STAT3 durch EGF-Stimulation sehr stark induzieren (Abb.3.23). In Thioredoxin-exprimierenden Zellen, ist diese Aktivität etwas geringer. Vergleicht man mit diesen Zellen, jedoch Herc-Zellen, die Aptamer KDI1 exprimieren, so kann die EGF-induzierte Transkription nur zu 60-70% aktiviert werden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass durch die Bindung des Aptamers KDI1 an den EGF-Rezeptor, dessen Funktionen inhibiert werden, so dass einige Tyrosinreste des Rezeptors selbst, das Adaptorprotein Shc, vor allem aber der Transkriptionsfaktor STAT3 nicht mehr vollständig aktiviert wird. Dadurch ist die STAT3-abhängige Expression proliferativer Gene reduziert, so dass es zu dem gezeigten wachstumsinhibierten Phänotyp kommt.

3.5 Gezielte Degradierung des EGF-Rezeptors durch ein rekombinantes Aptamer/SOCS-Box-Protein

Die Untersuchung der drei isolierten Peptid-Aptamere hat gezeigt, dass nur eines der drei Aptamere in der Lage war, die Funktionen des EGF-Rezeptor zu inhibieren. Dies könnte darin begründet sein, dass die Peptid-Aptamere nur aufgrund ihrer Bindungsaffinität zum Rezeptor selektiert wurden, nicht jedoch aufgrund einer inhibitorischen Wirkung. Um daher die Wirkung der Peptid-Aptamere zu verstärken, sollte den Aptameren zusätzlich noch eine Funktion gegeben werden, mit der das Zielprotein ausgeschaltet werden kann. 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 für die Ubiquitylierung von Jak und STAT-Proteinen verantwortlich ist (Ungureanu, Saharinen *et al.*, 2002). SOCS-Proteine interagieren einerseits über ihre SH2-Domäne mit weiteren Signalproteinen, wie z.B. STAT- und Jak-Molekülen, und andererseits baut die SOCS-Box Kontakt zu E3-Ubiquitin-Ligasen auf (Zhang, Farley *et al.*, 1999). Diese Ligasen übertragen spezifisch Ubiquitineinheiten auf die gebundenen Moleküle und markieren sie damit für den Abbau im 26S Proteasom. Damit stellt die SOCS-Box eine spezifische Domäne dar, die gebundene Moleküle für den Abbau markiert. Daher wurden die selektierten Aptamere mit einer solchen Domäne fusioniert, so dass durch die Bindung eines Aptamers die entsprechenden Interaktionspartner selektiv degradiert werden können.

An den C-Terminus der Peptid-Aptamere wurde die SOCS-Box-Sequenz des humanen SOCS1 kloniert (Abb. 3.24 A). Dieses Konstrukt wurde in *E.coli* exprimiert und aufgereinigt. Zunächst sollte untersucht werden, ob auch diese Aptamere in Zellen transduziert werden können und dort mit dem Rezeptor interagieren. Dazu wurden A431-Zellen auf Deckgläser ausgesät, mit verschiedenen Mengen SOCS-Box-Aptamer transduziert und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt.

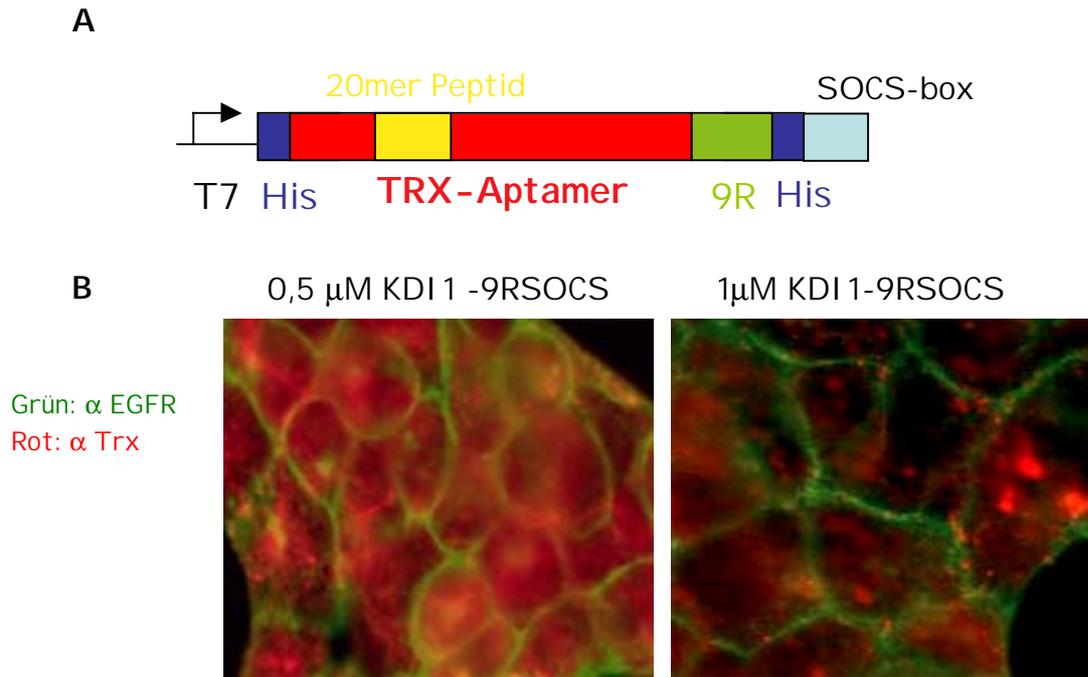


Abb. 3.24: Ein Peptid-Aptamer mit einer SOCS-Box-Domäne transduziert in Zielzellen und interagiert dort mit dem EGF-Rezeptor

(A) An das Aptamerkonstrukt mit einer 9R-Proteintransduktionsdomäne wurde C-terminal eine SOCS-Box-Domäne fusioniert.

(B) Auf Deckgläser kultivierte A431-Zellen wurden mit verschiedenen Mengen des Aptamers KDI1-9R SOCS für 4h transduziert, fixiert und mit α Trx- und α EGFR-Antikörpern markiert. Nach Inkubation mit α -Kaninchen-Rhodamin-gekoppelten und α -Maus-FITC-gekoppelten Sekundäntikörpern wurden die Zellen mit Mowiol/DAPI auf Objektträger aufgebracht und Bilder mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen.

Auch Aptamere, die eine zusätzliche SOCS-Box Domäne tragen, transduzierten in Zellen und konnten dort mit dem Rezeptor kolokalisiert werden (Abb. 3.24). Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass die zusätzliche Domäne die Bindungsaffinität zum EGF-Rezeptor nicht negativ beeinflusst. Folglich ist die Methode der Proteintransduktion hinreichend geeignet, um zu untersuchen, ob die Bindung eines SOCS-Box tragenden Aptamers die Rezeptorkonzentration verringern kann. Dazu wurden A431-Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen an SOCS-Box Aptamer KDI1 und KDI4 behandelt. Anschließend wurde die Rezeptormenge im Western Blot bestimmt.

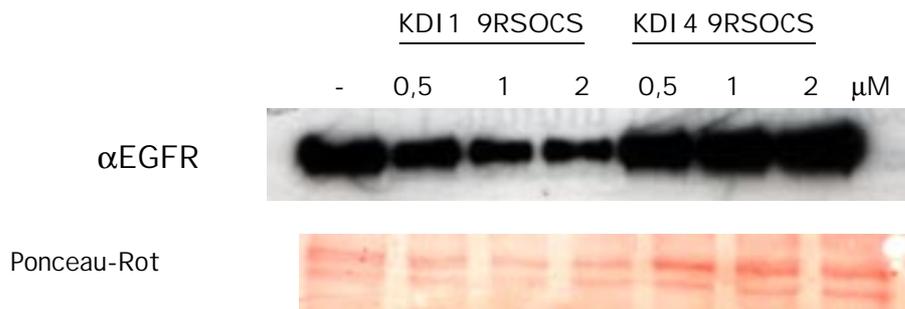


Abb.3.25: Durch Transduktion von KDI1-9RSOCS kann die EGFR-Konzentration in Zielzellen reduziert werden

A431-Zellen wurden mit den angegebenen Mengen an Aptamer behandelt. Nach 3,5h wurde mit 50 ng/ml EGF induziert und zusätzlich zur Hemmung der Translation 25 μg/ml Cycloheximid zugegeben. Nach weiteren 0,5 h wurden Zelllysate hergestellt und im SDS-PAGE aufgetrennt. Der anschließende Western Blot wurde mit einem αEGFR-Antikörper inkubiert. Um die gleiche Proteinladung in den einzelnen Spuren zu überprüfen, wurde der Blot mit Ponceau-Rot gefärbt.

Der Western Blot zeigte, dass durch aufsteigende Mengen von Aptamer KDI1-9RSOCS, der Rezeptorgehalt in den Zellen geringer wurde. Aptamer KDI4-9RSOCS hatte dagegen keinen Einfluss auf die Rezeptorkonzentration (Abb. 3.25). Dieser erste Versuch lässt die Vermutung zu, dass Aptamer KDI1-9RSOCS spezifisch einen Kontakt zwischen dem EGFR und der Degradierungsmaschinerie der Zellen aufbauen kann, so dass der Rezeptor abgebaut wird. Interessanterweise zeigte nur dasjenige Aptamer (KDI1) einen Effekt, welches auch ohne die zusätzliche SOCS-Box-Domäne bereits einen Effekt auf die Rezeptoraktivierung hatte und damit zu einem wachstumsinhibierten Phänotyp führte.

Um die genauen Parameter für die gezielte Degradierung des EGF-Rezeptors durch KDI1-9RSOCS zu bestimmen, wurde sowohl die Zeit- als auch die Dosisabhängigkeit des Effekts bestimmt. Hierfür wurden Renca/EGFR-Zellen verwendet, die weniger EGF-Rezeptor als A431-Zellen exprimieren, so daß für eine vollständige Degradation des Rezeptors bereits geringere Mengen des Aptamers ausreichend sein sollten. Außerdem sollte dieser Prozess direkt in Zellen verfolgt werden, daher wurden die Zellen nach der Proteintransduktion einer Immunfluoreszenzfärbung mit einem αEGFR und αTrx –Antikörper unterzogen (Abb. 3.26).

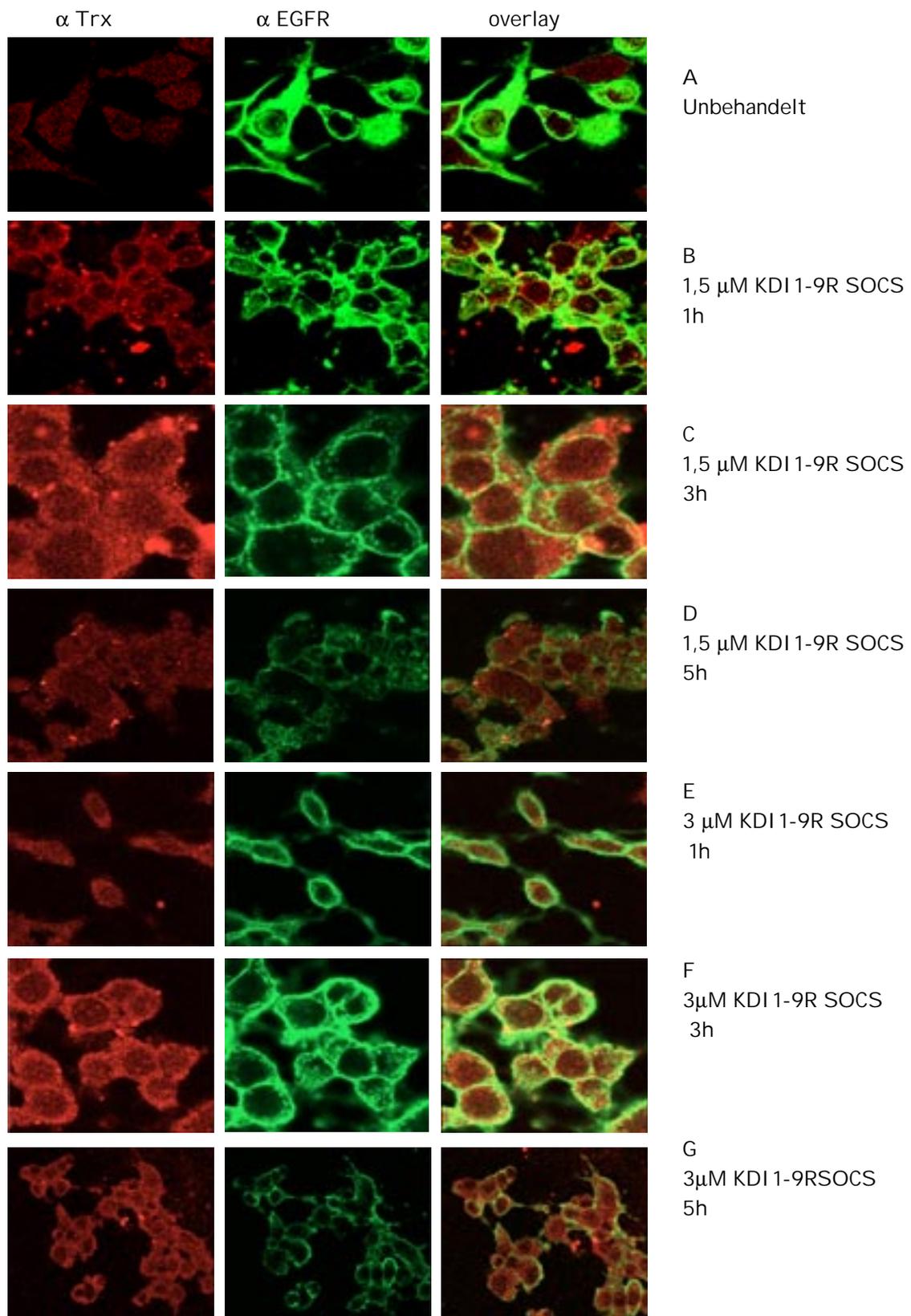


Abb. 3.26: Internalisierung und Degradierung des EGFR durch KDI1-9R SOCS

Auf Deckgläser kultivierte Renca/EGFR-Zellen wurden mit verschiedenen Mengen des Aptamers KDI1-9RSOCS für 1, 3 bzw. 5h transduziert, fixiert und mit α Trx- und α EGFR-Antikörpern markiert. Nach Inkubation mit α -Kaninchen-Rhodamin-gekoppelten und α -Maus-FITC-gekoppelten Sekundärantikörpern wurden die Zellen mit Mowiol/DAPI auf Objektträger aufgebracht und Bilder mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop aufgenommen.

Unbehandelte Zellen zeigten eine starke Färbung des EGF-Rezeptors in der Zellmembran. Durch unspezifische Bindung des sekundären α -Kaninchen-Rhodamin-gekoppelten Antikörpers kam es auch in unbehandelten Zellen zu einer schwachen roten Hintergrundfärbung des Zytoplasmas (Abb. 3.26 A). In Zellen, die mit Aptamer behandelt wurden, war die rote Färbung jedoch deutlich stärker, so dass davon ausgegangen werden kann, dass das Aptamer in die Zellen transduzierte (Abb. 3.26 B-G). Eine Stunde nach Transduktion des Aptamers war die Rezeptorkonzentration noch nicht beeinflusst (Abb. 3.26 B und E), während sich in Zellen, welche für 3h mit 1,5 bzw. 3 μ M KDI1-9RSOCS behandelt wurden, eine grüne, punktierte Färbung des Zytoplasmas zeigte. Gleichzeitig war die grüne Färbung der Zellmembran etwas schwächer (Abb. 3.26 C und F). Nach fünf Stunden war die punktierte Färbung im Zytoplasma verschwunden und auch die Färbung der Membran war erheblich reduziert (Abb. 3.26 D und G). Dieser Effekt war bei Transduktion von 3 μ M des Aptamers noch deutlicher sichtbar (Abb. 3.26 G). Daher kann davon ausgegangen werden, dass durch die Transduktion des SOCS-Box-Aptamers, der Rezeptor internalisiert und im Zytoplasma degradiert wurde und es daher zu einer Färbung des EGFR im Zytoplasma kam. Nach 5h war der Rezeptor dann vollständig degradiert, so dass die Färbung im Zytoplasma verschwunden war und die Konzentration des Rezeptors in der Membran erheblich reduziert war.

Diese Experimente gaben erste Hinweise, dass ein rekombinantes SOCS-Box-Aptamer in der Lage ist, die Rezeptorkonzentration quantitativ abzusenken. Ungureanu *et al.* konnten zeigen, dass Jak2 durch die Bindung des SOCS-Proteins über den Ubiquitin-Proteasom-Weg reguliert wird (Ungureanu, Saharinen *et al.*, 2002). Daher sollte zum einen untersucht werden, ob es sich bei dem Aptamer-vermittelten Vorgang um einen Proteasomen-abhängigen Prozeß handelt. Dazu wurden Inhibitoren eingesetzt, welche diesem Vorgang spezifisch blockieren können. Zum anderen wurde überprüft, ob mit dem Rezeptor assoziierte Signalproteine ebenfalls degradiert werden.

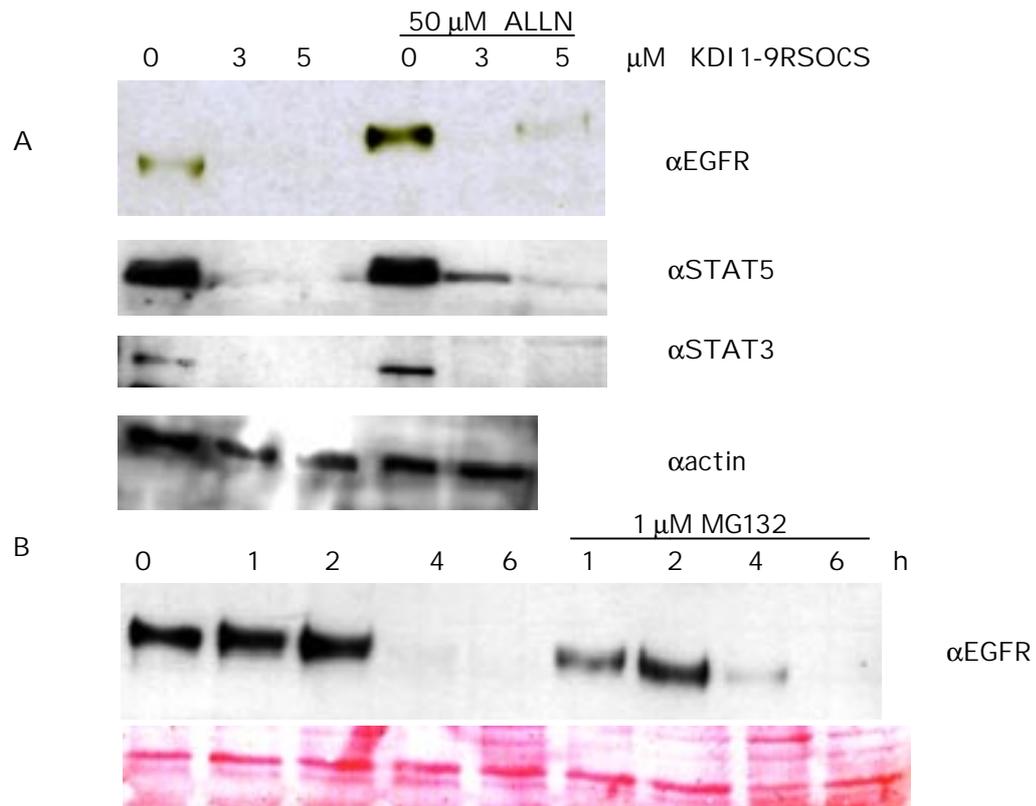


Abb.3.27: Zeit- und Dosisabhängigkeit der Aptamer-vermittelten Degradierung des EGF-Rezeptors und assoziierter Proteine

(A) Renca/EGFR-Zellen wurden für 4h mit verschiedenen Mengen an Aptamer KDI1-9RSOCS behandelt. Dabei wurde bei einem Teil die proteasomale Degradierung mit 50 μM ALLN inhibiert. Der Blot wurde gestrippt und mit einem STAT3- sowie einem STAT5-spezifischen Antikörper inkubiert. Zum Abgleich der geladenen Proteinmengen wurde ein Teil der Zellysate in einem 12%igen Gel aufgetrennt und mit einem Aktin-Antikörper inkubiert.

(B) Renca/EGFR-Zellen wurden für verschiedene Zeiten mit 5 μM KDI1 9RSOCS behandelt. In einem Teil der Ansätze wurden die Zellen mit 10 μM des Proteasomen-Inhibitors MG132 behandelt. Die Lysate wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit einem αEGFR -Antikörper detektiert. Der Blot wurde zum Abgleich der geladenen Proteinmengen mit Ponceau S Lösung gefärbt. Eine gefärbte Bande wurde zufällig ausgewählt und ist hier gezeigt.

Der mit einem αEGFR -Antikörper inkubierte Western Blot zeigt, dass mit 3 μM Aptamer der Rezeptor vollständig in die Degradation gedrängt werden kann (Abb.3.27 A). Dieser Prozess ist erst nach 4 Stunden abgeschlossen (Abb. 3.27 B). Diese Ergebnisse stimmen mit den in der Immunofluoreszenz gezeigten Daten überein (Abb. 3.26). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass sowohl STAT3 als auch STAT5 durch das Aptamer degradiert werden. Daher ist es wahrscheinlich, dass nicht nur der Rezeptor degradiert wird, sondern gleichzeitig alle mit ihm assoziierten Proteine. Die gleiche Menge an Aktin in allen Zellysaten (Abb. 3.27 A) zeigte jedoch, dass es sich hierbei um einen spezifischen Prozess handelt, da nicht mit dem Rezeptor assoziierte Proteine, wie das Zytoskelettprotein Aktin nicht degradiert

werden. Auch der Ponceau-gefärbte Blot zeigte ein definiertes Bandenmuster, was bedeutet, dass stark exprimierte Proteine, wie z.B. die Bestandteile des Zytoskeletts, die vor allem in der Ponceau-Färbung sichtbar werden, nicht degradiert wurden.

Interessanterweise wurde der Rezeptor und die mit ihm assoziierten Proteine auch degradiert, wenn das Proteasom durch MG 132 oder ALLN inhibiert wurde (Abb. 3.27 A und B). Dieses Ergebnis erlaubt zwei verschiedene Interpretationen. Entweder ist der durch das SOCS-Box-Aptamer ausgelöste Prozess unabhängig vom Proteasom, so dass dessen Inhibition keinen Einfluss auf den Abbau des Rezeptors nimmt oder die Wirkungsweise des Inhibitors war unter den hier gewählten Bedingungen nicht ideal. So ist die Konzentration des MG132 für die hier sehr kurz gewählte Wirkungsdauer sehr gering. Daher wurde in folgenden Versuchen die Wirkungsdauer des Proteasomen-Inhibitors variiert und die Inhibitorkonzentration erhöht.

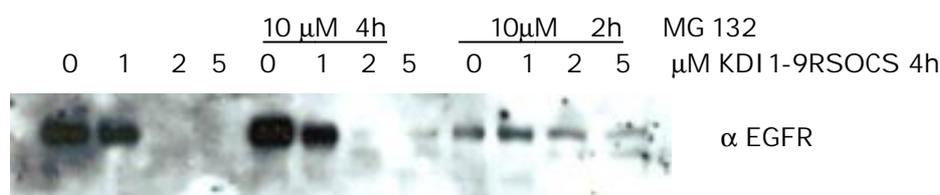


Abb.3.28: Durch Inhibition des Proteasoms mit MG132 kann die Aptamer-vermittelte Degradation des Rezeptors nur schwach inhibiert werden

Herc-Zellen wurden für 4h mit den gekennzeichneten Mengen KDI1-9RSOCS behandelt. Gleichzeitig (4h) bzw. 2h später (2h) wurden das Proteasom durch Zugabe von 10 μ M MG 132 inhibiert. Die Zellen wurden 4h nach der Proteintransduktion geerntet und die Zelllysate im SDS-PAGE aufgetrennt. Der EGFR wurde im Western Blot mit einem α EGFR-Antikörper detektiert.

Durch Transduktion von 2 μ M des Aptamers kann auch hier der Rezeptor vollständig entfernt werden (Abb. 3.28). Wurde der Proteasomen-Inhibitor gleichzeitig mit dem Aptamer zu den Zellen gegeben, so ergab sich das gleiche Bild. Durch 1 μ M Aptamer war die Rezeptorkonzentration bereits reduziert, mit der doppelten Menge konnte der Rezeptor nicht mehr detektiert werden. Wurde der Inhibitor jedoch zwei Stunden nach der Proteintransduktion zu den Zellen gegeben, so zeigte er eine schwache Wirkung auf den Abbau des EGF-Rezeptors, da auch in Gegenwart von 2 μ M und 5 μ M KDI1-9RSOCS der Rezeptor, wenn auch nur schwach, detektiert werden konnte. Dieses Ergebnis zeigte, dass das Aptamer KDI1-9RSOCS den Rezeptor in die Degradation drängen kann, dieser Prozeß aber nicht durch einen proteasomalen Inhibitor blockiert werden kann. Es wurde jedoch gezeigt, dass die Bindung von SOCS1 die

Ubiquitinierung der gebundenen STAT- und Jak-Proteine verstärkt (Ungureanu, Saharinen *et al.*, 2002). Daher sollte nachgewiesen werden, ob auch die Bindung des rekombinanten SOCS-Box-Aptamers die Ubiquitinierung des Rezeptors induzieren kann. Erst in Gegenwart eines proteasomalen Inhibitors kann die Ubiquitinierung detektiert werden, da die ubiquitinierten Zwischenprodukte rasch abgebaut werden. Die Zellen wurden transduziert und aus den Lysaten der Rezeptor immunopräzipiziert. Die Ubiquitinierung des Rezeptors konnte dann mit einem Ubiquitin-spezifischen Antikörper detektiert werden.

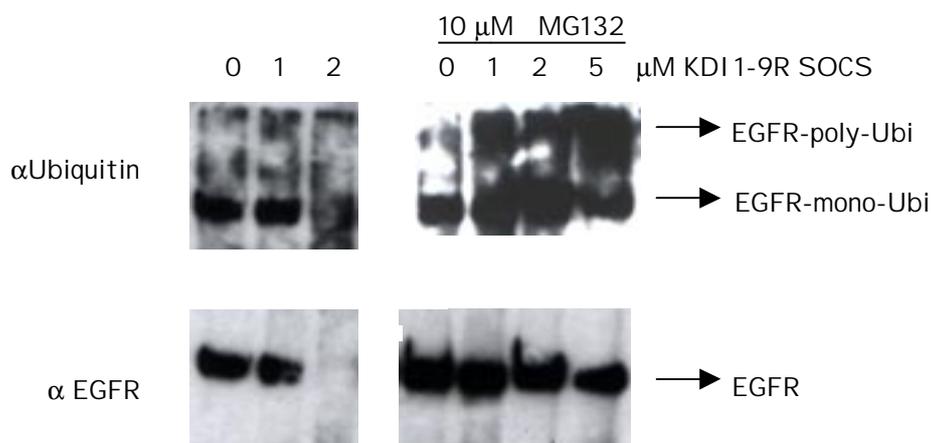


Abb. 3.29: KDI1-9R SOCS verstärkt die Ubiquitinierung des EGF-Rezeptors

A431-Zellen wurden für vier Stunden mit den angegebenen Mengen des Aptamers transduziert. In einem Teil der Zellen wurde das Proteasom nach 2h durch 10 μ M MG132 inhibiert. Nach Präzipitation des Rezeptors mit einem EGFR spezifischen Antikörper wurden die Lysate im SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot die Ubiquitinierung detektiert. Der Blot wurde gestrippt und mit einem EGFR-Antikörper inkubiert.

Auch hier konnte gezeigt werden, dass durch Transduktion von 2 μ M des Aptamers KDI1-9R SOCS der EGF-Rezeptor vollständig degradiert werden konnte (Abb. 3.29 unten). In Gegenwart des proteasomalen Inhibitors MG132 hingegen konnte die Degradation des Rezeptors etwas unterbunden werden. Die Detektion mit einem Ubiquitin-spezifischen Antikörper zeigte, dass der Rezeptor auch in Abwesenheit des Aptamers eine basale Ubiquitinierung zeigt (Abb. 3.29 oben). Da dieses Molekül nicht viel größer als der Rezeptor ist, handelt es sich hierbei wahrscheinlich um eine Mono-Ubiquitinierung des Rezeptors. Es ist anzunehmen, dass diese für den kontinuierlichen Abbau des Rezeptors verantwortlich ist und durch c-Cbl verursacht wird. In Gegenwart des Inhibitors und durch aufsteigende Mengen des Aptamers können jedoch auch größere ubiquitinierte Formen des Rezeptors detektiert werden.

Dabei handelt es sich um verschiedene poly-ubiquitinylierte Moleküle. Vor allem durch 5 μ M KDI1-9R SOCS wird der Rezeptor sehr stark ubiquitinyliert. Diese Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass der Rezeptor durch die Bindung des Peptid-Aptamers spezifisch ubiquitinyliert und anschließend abgebaut wird.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, Peptid-Aptamere zu isolieren, die hochaffin mit dem EGF-Rezeptor interagieren und daher mit den Funktionen des Rezeptors interferieren können. Diese Peptid-Aptamere sollten dann als Werkzeuge dienen, um die mitogene Wirkung des Rezeptors zu inhibieren. Aus diesem Grund können solche Peptide eine mögliche Anwendung in der Therapie von EGFR-überexprimierenden Tumoren finden.

4.1 Isolierung von Peptid-Aptameren, die mit der Kinasedomäne des EGF-Rezeptors interagieren

In einem Hefe-Zwei-Hybrid-Screen konnten drei Peptid-Aptamere- KDI1, KDI3 und KDI4 - isoliert werden, die mit der Kinasedomäne I des EGF-Rezeptors interagieren. In verschiedenen Studien wurde anschließend die Interaktion zwischen den isolierten Peptid-Aptameren und dem EGF-Rezeptor *in vitro* und *in vivo* verifiziert. In Mating-Experimenten konnte die Interaktion von Kinasedomäne und Peptid-Aptameren bestätigt werden. Dagegen konnte keine Interaktion mit der isolierten Gal4-DNA-Bindungsdomäne festgestellt werden (Abb. 3.3).

Um die Interaktion einerseits zu bestätigen und andererseits die Bindungsspezifität zu bestimmen, wurde ein GST-Pulldown-Experiment durchgeführt. Dazu wurden die Peptid-Aptamere mit einer GST-Domäne fusioniert, bakteriell exprimiert und an Glutathionbeads gebunden. Extrakte verschiedener Zelllinien wurden hinzugegeben und im Western Blot die präzipitierten Bindungspartner detektiert. Diese GST-Pulldown-Studien zeigten, dass alle isolierten Peptid-Aptamere auch *in vitro* mit dem Rezeptor interagieren (Abb. 3.4). Diese Interaktion konnte mit Zelllysaten verschiedener EGFR-überexprimierender Zelllinien bestätigt werden (Abb. 3.4). Dieses Experiment zeigte gleichzeitig, dass Peptid-Aptamer KDI4 nur schwach mit dem Rezeptor interagiert, da der Rezeptor aus Renca-Lysaten, die den EGFR schwächer exprimieren, kaum präzipitiert werden konnte (Abb. 3.4 unten). Die Bindung der Peptid-Aptamere an den Rezeptor ist hochspezifisch, da bis auf Peptid-Aptamer KDI3 die Peptid-Aptamere nicht mit dem sehr homologen ErbB2-Rezeptor interagierten (Abb. 3.4 B). Die Ergebnisse dieses Experiments erlauben eine erste Qualitätsbeurteilung der Peptid-Aptamere. KDI1 und KDI3 binden sehr affin an den

EGF-Rezeptors, während Peptid-Aptamer KDI4 erheblich schwächer an den Rezeptor bindet. Aptamer KDI3 zeigt neben der Affinität für den EGF-Rezeptor auch eine schwache Affinität zum ErbB2-Rezeptor. Somit zeigen Peptid-Aptamer KDI1 und 4 eine hohe Bindungsspezifität, da sie trotz der hohen Homologie der beiden Rezeptoren in der Kinasedomäne von 83% (Klapper, Kirschbaum *et al.*, 2000), präferentiell an das Targetprotein EGFR binden. Aus diesem Grund ist es sehr unwahrscheinlich, dass die Peptid-Aptamere mit weiteren Rezeptoren wie z.B. dem IGF1-Rezeptor oder dem FGF-Rezeptor interagieren und dort unerwünschte Effekte bewirken. Aber auch eine Bindung von Peptid-Aptamer KDI3 an den ErbB2-Rezeptor kann vorteilhaft sein, da ErbB2 als Dimerisierungspartner für die übrigen Rezeptoren dieser Familie dienen kann. Darüber hinaus spielen EGFR/ErbB2-Heterodimere eine essentielle Rolle in einigen humanen Tumorzelllinien (Jannot, Beerli *et al.*, 1996). Daher kann ein Peptid-Aptamer, das an beide Rezeptoren bindet, in solchen Zellen potentiell eine höhere inhibitorische Wirkung haben, als Peptid-Aptamere, die nur spezifisch an den EGF-Rezeptor binden.

In weiteren Versuchen wurde untersucht, ob die Bindung der Peptid-Aptamere an den EGF-Rezeptor von dessen Phosphorylierungs- d.h. Aktivierungsstatus abhängig ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Peptid-Aptamere präferentiell an den phosphorylierten Rezeptor binden (Abb. 3.5 A). Die schwache Interaktion mit unstimulierten Zellextrakten wurde durch noch verbliebene phosphorylierte Rezeptoren im Zellysate verursacht, da sowohl der Input als auch die präzipitierten Rezeptoren phosphoryliert waren (Abb. 3.5 B). Auch in diesem Experiment konnte bestätigt werden, dass Peptid-Aptamer KDI4 die geringste Affinität für den Rezeptor besitzt.

In Ko-Immunopräzipitations-Experimenten mit Herc-Zellen, die mit den Peptid-Aptameren KDI1 und 4 transient transfiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass die Peptid-Aptamere nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* mit dem Rezeptor interagieren können (Abb. 3.6). Während im GST-Pulldown nur eine schwache Interaktion zwischen KDI4 und dem EGF-Rezeptor gezeigt werden konnte, konnte hier der Rezeptor nicht nur mit KDI1, sondern auch mit Peptid-Aptamer KDI4 präzipitiert werden. Ein Unterschied zwischen diesen beiden Experimenten liegt darin, dass im GST-Pulldown, das Peptid-Aptamer an die Beads gekoppelt wurde und den Rezeptor dann aus dem Lysat präzipitieren musste. Hierfür ist eine sehr hohe Affinität zwischen Peptid-Aptamer und Target nötig, so dass der Rezeptor aus der

großen Anzahl an zellulären Proteinen spezifisch gebunden werden kann. In der Ko-Immunopräzipitation hingegen, wurde das Peptid-Aptamer zunächst in den Zellen exprimiert, wo es ausreichend Zeit und Raum hat auch bei einer geringeren Affinität mit dem EGF-Rezeptor zu interagieren. In der folgenden Immunopräzipitation wurde dann der Rezeptor präzipitiert, so dass das gebundenen Peptid-Aptamer im Komplex gebunden blieb und im Western Blot detektiert werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen drei Peptid-Aptamere aufgrund ihrer Interaktion mit der Kinasedomäne des EGFR aus einer Peptid-Aptamer-Library isoliert werden konnten, von denen zwei (KDI1 und 3) eine hohe Spezifität für den EGF-Rezeptor zeigen. Das dritte Aptamer (KDI4) hingegen interagiert nur schwach mit dem Rezeptor. KDI3 hingegen besitzt auch eine Affinität zum ErbB2-Rezeptor. Alle Peptide eignen sich somit potentiell als Inhibitoren der Kinaseaktivität des EGF-Rezeptors, so dass alle auf ihre Interferenz mit der Rezeptoraktivität des Rezeptors untersucht wurden.

4.2 Einbringung von Peptid-Aptameren in eukaryontische Zellen

Neben der Ableitung von Zelllinien, die die isolierten Peptid-Aptamere stabil exprimieren (Abb. 3.7), wurde die neuartige Methode der Proteintransduktion zur Einbringung der Peptid-Aptamere in Zielzellen verwendet. Diese Methode beruht darauf, dass ein Peptid, welches aus basischen Aminosäuren besteht (wie z.B. HIV TAT), mit der Zellmembran interagiert und anschließend nach einem noch nicht geklärten Mechanismus unspezifisch durch die Membran in die Zelle gelangt. Um diese Methode zu etablieren, wurde eine Proteintransduktionsdomäne aus neun Argininresten C-terminal mit der Peptid-Aptamer-Sequenz fusioniert, das Konstrukt in *E.coli* exprimiert und anschließend denaturierend gereinigt. Die denaturierende Reinigung des Proteins war nötig, da das Fusionsprotein in den Bakterien vor allem in „inclusion bodies“ abgelagert wurde. Das Protein wurde durch Dialyse renaturiert. In Immunofluoreszenz - und Western Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Peptid-Aptamere durch die Proteintransduktionsdomäne in die Zellen gelangten und dort spezifisch mit dem EGF-Rezeptor interagierten (Abb. 3.10 C, Abb. 3.11, Abb. 3.12), während das Thioredoxinprotein gleichmäßig im Zytoplasma verteilt war (Abb. 3.10 B). Die Transduktion der Peptid-Aptamere ist dabei unabhängig von der

verwendeten Zelllinie (Vgl. Abb. 3.11). Des Weiteren wurde die Stabilität der transduzierten Peptid-Aptamere in den Zellen untersucht. In Western Blot-Analysen waren die Peptid-Aptamere bis zu acht Stunden nachweisbar, während sie in Immunofluoreszenzstudien bis zu 24h detektiert werden konnten (Abb. 3.12). Nach zwei Tagen waren die Aptamere intrazellulär jedoch nicht mehr nachweisbar. Daher scheint die Stabilität transduzierter Proteine entscheidend von Art des transduzierten Proteins abhängig zu sein, da ein Fusionsprotein aus TAT und IκB noch nach zwei Tagen im Western Blot nachgewiesen werden konnte (Abu-Amer, Dowdy *et al.*, 2001). Die Stabilität des bakteriellen Thioredoxin scheint daher in eukaryontischen Zellen nicht sehr hoch zu sein, so dass für zukünftige Experimente die Verwendung eines anderen Gerüstproteins, wie z.B. des Green fluorescent protein (GFP), von Vorteil sein könnte, da eventuell eine größere Stabilität des Peptid-Aptamers erreicht werden könnte (Abedi, Caponigro *et al.*, 1998). Andererseits kann die geringe Stabilität durch die Affinität des Peptid-Aptamers zum EGF-Rezeptor begründet sein. Der EGF-Rezeptor wird nach Ligandenbindung internalisiert, wobei das Signal auf die nachgeschalteten Signalwege weitergeleitet wird. Je nach Aktivierungsstatus und gebundenen Proteinen wird der Rezeptor degradiert oder an die Zelloberfläche zurück gebracht (Barbieri, Roberts *et al.*, 2000). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Rezeptorkonzentration durch die Aptamerbindung nicht beeinflusst wird (Daten nicht gezeigt). Daher wäre es nur denkbar, dass nach Rezeptorinternalisierung das Aptamer abgebaut wird, während der Rezeptor an die Zelloberfläche zurückgebracht wird. Neuere Studien weisen einer Proteintransduktionsdomäne (PTD) von neun D-Argininresten bessere Eigenschaften zu, als neun L-Argininen. Diese Domäne hat gleichzeitig den Vorteil, dass sie die Degradation des rekombinanten Proteins reduziert, da die zelluläre Degradationsmaschinerie nur natürliche L-Aminosäuren abbauen kann (Niesner, Halin *et al.*, 2002). Allerdings kann ein solches Fusionsprotein nicht bakteriell exprimiert werden, sondern muss synthetisiert werden. Da die Synthese eines solch großen Fusionsproteins sehr kompliziert ist, wäre es denkbar den amphipatischen Peptidcarrier Pep-1 einzusetzen. Dieses Peptid besteht aus einer PTD und einer hydrophoben Sequenz, welche die Interaktion mit dem Zielprotein ermöglicht. (Morris, Depollier *et al.*, 2001). Dieses Peptid muss nur einmal synthetisiert werden und kann dann mit einem beliebigen Protein, wie z.B. einem Peptid-Aptamer gemischt werden, so dass beide interagieren und ein

transduktionsfähiges Protein bilden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Lysinreste in einigen Zelllinien bessere Transduktionseffekte erzielen als Arginine (Mai, Shen *et al.*, 2002). Insgesamt scheint die Kapazität der Proteintransduktion entscheidend von den Bedingungen, wie z.B. dem zu transduzierenden Protein und der Art der Zielzelle abzuhängen. Mit der hier verwendeten Proteintransduktionsdomäne konnte bereits eine 100%ige Transduktionseffizienz bei den untersuchten Zelllinien erreicht werden, so dass eine Modifikation des Systems nicht unbedingt nötig erscheint. Bei Verwendung anderer Zielzellen oder Gerüstproteine, sollte die Proteintransduktionsdomäne jedoch immer auf das verwendete System abgestimmt werden, so dass eine optimale Transduktionsrate sichergestellt werden kann.

4.3 Peptid-Aptamer KDI 1 interferiert mit den Funktionen des EGF-Rezeptors

Da gezeigt konnte werden, dass die isolierten Peptid-Aptamere spezifisch mit dem EGF-Rezeptor interagierten, wurde anschließend untersucht, inwieweit die Bindung mit den Funktionen des Rezeptors interferiert.

4.3.1 Peptid-Aptamer KDI 1 inhibiert die EGF-abhängige Proliferation und Transformation von Zellen

Der EGF-Rezeptor ist ursächlich an der Weiterleitung proliferativer und mitogener Signale beteiligt. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob die Gegenwart der isolierten Peptid-Aptamere, diesen Phänotyp beeinflusst. In Proliferationsassays konnte gezeigt werden, dass Zellen, die Peptid-Aptamer KDI1 exprimieren, im Gegensatz zu Kontrollzellen oder Zellen, die Peptid-Aptamer KDI3 und 4 exprimieren, langsamer wachsen (Abb. 3.13). Dieses Ergebnis ist äußerst interessant und zeigt, die stark transformierende Wirkung des EGF-Rezeptors. NIH3T3-Fibroblasten können auch ohne den EGF-Rezeptor proliferieren. Zellen, hingegen, die stabil mit dem Rezeptor transfiziert sind (Herc-Zellen), proliferieren langsamer, wenn der EGF-Rezeptor durch das Peptid-Aptamer inhibiert wird (Abb. 3.13). Damit verhalten sich Herc-Zellen wie EGFR-überexprimierende Tumorzelllinien, bei denen gezeigt werden konnte, dass sie in Gegenwart eines Rezeptorinhibitors (PKI-166) langsamer proliferieren (Lydon, Mett *et al.*, 1998).

Während durch dieses Experiment nur die allgemeine Proliferation erfasst wurde, wurde in einem weiteren Experiment die EGF-induzierte Proliferation untersucht (Abb. 3.14). Dazu wurden die stabil transfizierten Zelllinien zunächst ohne Serum kultiviert, so dass alle übrigen exogenen Signale ausgeschaltet werden konnten. Durch EGF-Stimulation konnte dann die Proliferation induziert werden und die Vermehrung der Zellen im XTT-Test verfolgt werden. Durch EGF-Zugabe konnte die Proliferation von Kontrollzellen, die entweder kein Peptid-Aptamer oder das Thioredoxinprotein ohne Peptidinsert exprimieren, stark induziert werden (Abb. 3.14). In KDI1-exprimierenden Zellen konnte die Proliferation durch EGF-Stimulation dagegen nur zu 50% induziert werden. Ein chemischer EGFR-Inhibitor PKI-166 hemmt die Induktion der Proliferation durch EGF völlig (Abb. 3.14). Damit stellt PKI-166 einen sehr guten Inhibitor dar. Im Vergleich mit diesem, bereits in der klinischen Phase befindlichen Inhibitor, ist die durch KDI1 ausgeübte Inhibition der EGF-vermittelten Proliferation bereits sehr hoch. Somit ist es denkbar, dass durch Optimierung des Peptid-Aptamers, ebenfalls eine mit der von PKI-166 vergleichbare Hemmung erreicht werden kann.

Der EGF-Rezeptor kann neben der Proliferation der Zellen, auch das Matrix-unabhängige Wachstum von Zellen in Weichagar induzieren. Dieses typische Verhalten von Krebszellen zeigt, dass der EGF-Rezeptor ursächlich an der Transformation beteiligt ist. Um zu untersuchen, ob die Peptid-Aptamere auch diese Eigenschaften des EGF-Rezeptors beeinflussen, wurde das Wachstum der stabil transfizierten Zellen in Weichagar untersucht (Abb. 3.15). Es zeigte sich, dass Zellen, die Peptid-Aptamer KDI1 exprimieren im Vergleich zu Kontrollzellen nur 35% bis 55% der Kolonien in Weichagar bildeten, während Peptid-Aptamer KDI3 und 4 das Wachstum nicht beeinflussten.

Aufgrund der gezeigten Ergebnisse lässt sich folgern, dass Peptid-Aptamer KDI1 in einem Bereich der Kinasedomäne des Rezeptors bindet, so dass dessen Fähigkeit, Wachstum und Transformation von Zellen zu induzieren, deutlich gehemmt wird. Peptid-Aptamer KDI3 und KDI4 konnten nicht einen solchen Effekt auslösen. Dies könnte darin begründet sein, dass diese Peptid-Aptamere entweder in einer Region des Rezeptors binden, ohne dass dessen Funktionsweise beeinflusst wird. Andererseits kann auch die Affinität zum Rezeptor zu gering sein, so dass es nicht zu einer stabilen und damit inhibitorischen Interaktion kommen kann. Für Peptid-Aptamer KDI4 konnte im GST-Pulldown bereits eine geringere Bindungsaffinität zum EGF-

Rezeptor nachgewiesen werden (Abb. 3.4 und 3.5). Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass mit Peptid-Aptamer KDI1 ein potentieller Inhibitor der EGFR-Signaltransduktion isoliert wurde, dessen Einfluss auf die Aktivierung des EGF-Rezeptors und nachgeschalteter Signaltransduktionswege näher untersucht wurde.

4.3.2 Peptid-Aptamer KDI1 interferiert mit der c-Src-abhängigen Signaltransduktion des EGF-Rezeptors

Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Gegenwart des Peptid-Aptamers KDI1 die EGF-induzierte Proliferation und Transformation von Fibroblasten inhibiert, muss man annehmen, dass das Aptamer, einen Effekt auf die Aktivierung des EGF-Rezeptors und/oder der nachgeschalteten Signalwege hat. Die Bindung des Liganden EGF an den Rezeptor forciert dessen Dimerisierung, was zu einer Konformationsänderung des intrazellulären Teils führt. Dadurch wird die Aktivität der Kinasedomäne induziert, so dass es zur Auto-Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste im Rezeptor kommt. Diese stellen Bindungsstellen für SH2- und PTB-Domänen enthaltende Proteine dar. Diese Effektorproteine aktivieren wiederum Signaltransduktionswege, wie z.B. den MAPK-Weg, den STAT-Signalweg oder den PI3K-Weg, was einerseits die Zellen in die Proliferation treibt und sie andererseits vor Apoptose schützt.

Zur Untersuchung der biochemischen Grundlagen der Peptid-Aptamer-Wirkung, wurden zum einen Herc-Zellen verwendet, die die Aptamere stabil exprimieren. Zum anderen wurden Renca/EGFR-Zellen mit dem Peptid-Aptamer (KDI1-9R) transduziert. Dabei waren die Effekte, welche durch Proteintransduktion erreicht werden konnten, erheblich stärker als in stabil transfizierten Zellen. Dies liegt daran, dass durch Proteintransduktion höhere intrazelluläre Konzentrationen erzielt werden können, als durch stabile Expression der Peptid-Aptamere. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die EGF-induzierte Phosphorylierung der Tyrosinreste 1068 und 1148 in Herc-Zellen, welche Peptid-Aptamer KDI1 exprimieren etwas schwächer ist (Abb. 3.17). Durch Transduktion hoher Mengen des Peptid-Aptamers (1 μM) konnte dieser Effekt noch deutlicher gezeigt werden (Abb. 3.18). Eine deutliche Reduktion der Phosphorylierung konnte auch an Tyrosin 845 gezeigt werden (Abb. 3.19). Dieser Tyrosinrest unterliegt nicht der Autophosphorylierung, sondern wird

durch c-Src phosphoryliert (Biscardi, Maa *et al.*, 1999). Die Phosphorylierung dieses Tyrosinrestes des Rezeptors erfolgt dabei wahrscheinlich direkt durch c-Src, da die Autophosphorylierungsstelle Tyrosin 416 im C-Terminus von Src, zu der Sequenz um das Tyrosin 845 des EGF-Rezeptors homolog ist (Cooper and Howell, 1993).

Die Gegenwart des Peptid-Aptamers hatte ebenfalls einen negativen Effekt auf die Phosphorylierung des Adapterproteins Shc, vor allem auf die p46-Isoform (Abb. 3.20). Shc interagiert vor allem mit den Tyrosinresten 1148 und 1173 des Rezeptors und wird anschließend durch dessen Kinaseaktivität phosphoryliert (Tice, Biscardi *et al.*, 1999). Da Tyrosin 1148 durch Expression des Peptid-Aptamers geringer phosphoryliert wird, wird das Adapterproteins Shc weniger an den Rezeptor rekrutiert, so dass es wiederum nur in einem geringeren Ausmaß phosphoryliert werden kann.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergaben, dass die Aktivität der MAP-Kinasen p42/p44 nicht durch das Peptid-Aptamer beeinflusst wurde (Abb. 3.21). Der MAPK-Signalweg wird durch die Bindung von Grb/SOS-Komplexen an die phosphorylierten Reste Y1068, Y1086 und Y1173 aktiviert. Die geringere Phosphorylierung von Y1068, kann durch die Bindung der Signalproteine an Y1086 und Y1173 kompensiert werden. Des Weiteren wird der MAPK-Signalweg durch die Bindung von Grb/SOS an den phosphorylierten Tyrosinrest 317 des Shc-Proteins aktiviert. Obwohl gezeigt werden konnte, dass Y317 zumindest in p46 Shc geringer phosphoryliert ist (Abb. 3.20), hat dies keinen Einfluss auf die Aktivierung von p42/p44. Dies lässt sich damit begründen, dass die Aktivierung auch über die beiden übrigen Shc-Isoformen erfolgen kann. Außerdem stehen die untersuchten Kinasen p42/p44 sehr weit unten in der Signalübertragungskaskade, so dass sie auch von anderen Signalwegen induziert werden können. Die reduzierte Phosphorylierung des Rezeptors ist daher nicht ausreichend, den MAPK-Signalweg vollständig zu inhibieren.

Außerdem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Gegenwart des Peptid-Aptamers die EGF-induzierte Phosphorylierung von STAT3 inhibiert (Abb. 3.22). Durch Transduktion von 1 μ M des Peptid-Aptamers konnte die Phosphorylierung von STAT3 durch EGF vollständig gehemmt werden (Abb. 3.22 B). Durch Phosphorylierung an Tyrosin 705 können STAT-Moleküle dimerisieren und wandern in den Kern, wo sie die Transkription von Zielgenen induzieren. Daher wurde in

Reporterassays untersucht, ob die Inhibition der STAT3-Aktivierung ausreichend ist, um dessen Transaktivierungsaktivität zu beeinflussen. In Zelllinien, die das Peptid-Aptamer stabil exprimieren, war die Transaktivierungsaktivität von STAT3 zu 45% inhibiert (Abb.3.23). Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass das Peptid-Aptamer KDI1 die Phosphorylierung von STAT3 in einem Maße inhibiert, so dass dessen Transaktivierungsaktivität deutlich reduziert ist. Da dieser Effekt erheblich stärker war, als die Effekte auf den MAPK-Signalweg, muss angenommen werden, dass vor allem die Hemmung des STAT3-Signalweges für den wachstumsinhibierten Phänotyp KDI1 exprimierender Zellen verantwortlich ist.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass Peptid-Aptamer KDI1 die Aktivierung von Proteinen, wie EGFR, Shc und STAT3 inhibiert. Diese Proteine werden gleichzeitig von der zytoplasmatischen Kinase c-Src reguliert oder wirken synergistisch mit dieser. C-Src ist das zelluläre, nicht transformierende Homolog von v-Src, einem Onkoprotein welches vom Hühner-Rous-Sarkoma-Virus codiert wird. Src-Kinasen spielen eine wichtige Rolle bei der Übertragung mitogener Signale von Rezeptortyrosinkinasen (Belsches, Haskell *et al.*, 1997). So wurde eine hohe Aktivität sowohl des EGF-Rezeptors, als auch von c-Src in vielen Tumoren gefunden. Biscardi *et al.* konnten zeigen, dass durch Phosphorylierung von Tyrosin 845, das innerhalb der Kinasedomäne liegt, die aktive Konformation der Kinasedomäne stabilisiert wird, so dass deren Aktivität erheblich gesteigert wird (Biscardi, Maa *et al.*, 1999). Die Tatsache, dass die Aktivierung dieses Restes in Gegenwart des Aptamers deutlich reduziert ist, ist ein erster Hinweis, dass die Funktion von c-Src durch das Aptamer beeinflusst wird.

Auch Shc ist nicht nur ein Substrat des Rezeptors, sondern wird ebenfalls durch Src phosphoryliert. Shc wird zwar auch in Gegenwart des Aptamers KDI1 über Y1173 an den Rezeptor rekrutiert, kann aber dann eventuell nicht mehr in einem vollen Ausmaß durch Src phosphoryliert werden. Allerdings konnte in früheren Publikationen gezeigt werden, dass vor allem die Tyrosine 239 und 240 des Shc-Proteins durch Src phosphoryliert werden (Sato, Kimoto *et al.*, 2000). In Abb. 3.20 wurde jedoch gezeigt, dass die Phosphorylierung an Tyrosin 317 in Gegenwart des Peptid-Aptamers reduziert ist. Dies schließt jedoch nicht aus, dass die Phosphorylierung von Tyrosin 239 und 240 nicht ebenfalls durch die inhibitorische Wirkung des Peptid-Aptamers auf die Funktion von Src, verringert ist. Des Weiteren wurde gezeigt, dass zwar alle

drei Isoformen mit dem EGF-Rezeptor interagieren, aber nur die beiden größeren durch Src aktiviert werden (Sato, Kimoto *et al.*, 2000; Sato, Nagao *et al.*, 2002). Da in dieser Arbeit jedoch gezeigt wurde, dass vor allem die Phosphorylierung von p46 durch die Expression des Peptid-Aptamers inhibiert wird, muss gefolgert werden, dass dieser Effekt wahrscheinlich nicht durch die Inhibition von c-Src vermittelt wird. Stattdessen wird die geringere Aktivierung von Shc eher durch die reduzierte Kinaseaktivität, aufgrund der mangelnden Phosphorylierung an Y 845, verursacht.

Aber auch STAT3 wird entscheidend durch c-Src reguliert. Fibroblasten, die stabil mit c-Src transfiziert sind, zeigen eine konstitutive STAT3-Aktivierung (Yu, Meyer *et al.*, 1995). Es gibt zwar Hinweise, dass STAT3 direkt durch den EGF-Rezeptor phosphoryliert werden kann, was bisher allerdings nur *in vitro* nachgewiesen werden konnte (Park, Schaefer *et al.*, 1996). Andererseits kann STAT3 durch die zytoplasmatische Kinase c-Src phosphoryliert werden. Dabei sind STAT3/JAK Komplexe wahrscheinlich bereits mit dem Rezeptor prä-assoziert. Durch EGFR-Aktivierung wird c-Src an den Rezeptor rekrutiert, das sowohl STAT- als auch Jak-Moleküle phosphoryliert (Olayioye, Beuvink *et al.*, 1999). Coffey *et al.* konnten die Tyrosinreste 1068 und 1086 als Bindungsstellen für STAT-Proteine identifizieren (Coffey and Kruijer, 1995). Da auch die Phosphorylierung des Tyrosinrestes 1068 durch die Bindung des Peptid-Aptamers beeinflusst ist, ist es wahrscheinlich, dass gleichzeitig auch weniger STAT-Moleküle an den Rezeptor gebunden werden. Diese Hinweise sprechen dafür, dass die Bindung von KDI1 an den EGF-Rezeptor mit der Aktivierung von c-Src interferiert.

Interessanterweise konnten Olayioye *et al.* zeigen, dass ein chemischer Src-Inhibitor auch die Aktivierung des MAPK-Weges durch EGF inhibieren kann. Dies konnte allerdings nur bei Stimulation mit niedrigen EGF-Konzentrationen gezeigt werden. Bei hohen Konzentrationen von EGF wird vermehrt Shc an den aktivierten Rezeptor rekrutiert, was den MAPK-Signalweg aktiviert (Olayioye, Badache *et al.*, 2001). In den hier beschriebenen Versuchen wurde stets mit hohen EGF-Konzentrationen induziert, so dass eine MAPK-Aktivierung durch Shc erreicht wurde. Daher wäre es interessant zu untersuchen, ob Peptid-Aptamer KDI1 die Aktivierung des MAPK-Signalweges blockieren kann, wenn mit einer geringen Dosis EGF induziert wird.

Somit lassen die gezeigten Daten die Schlussfolgerung zu, dass das Peptid-Aptamer KDI1 durch Bindung an die Kinasedomäne des EGF-Rezeptors mit den Funktionen der zytosplasmatischen Kinase c-Src interferiert. Dies lässt sich in folgendem Schema zusammenfassen (Abb. 4.1).

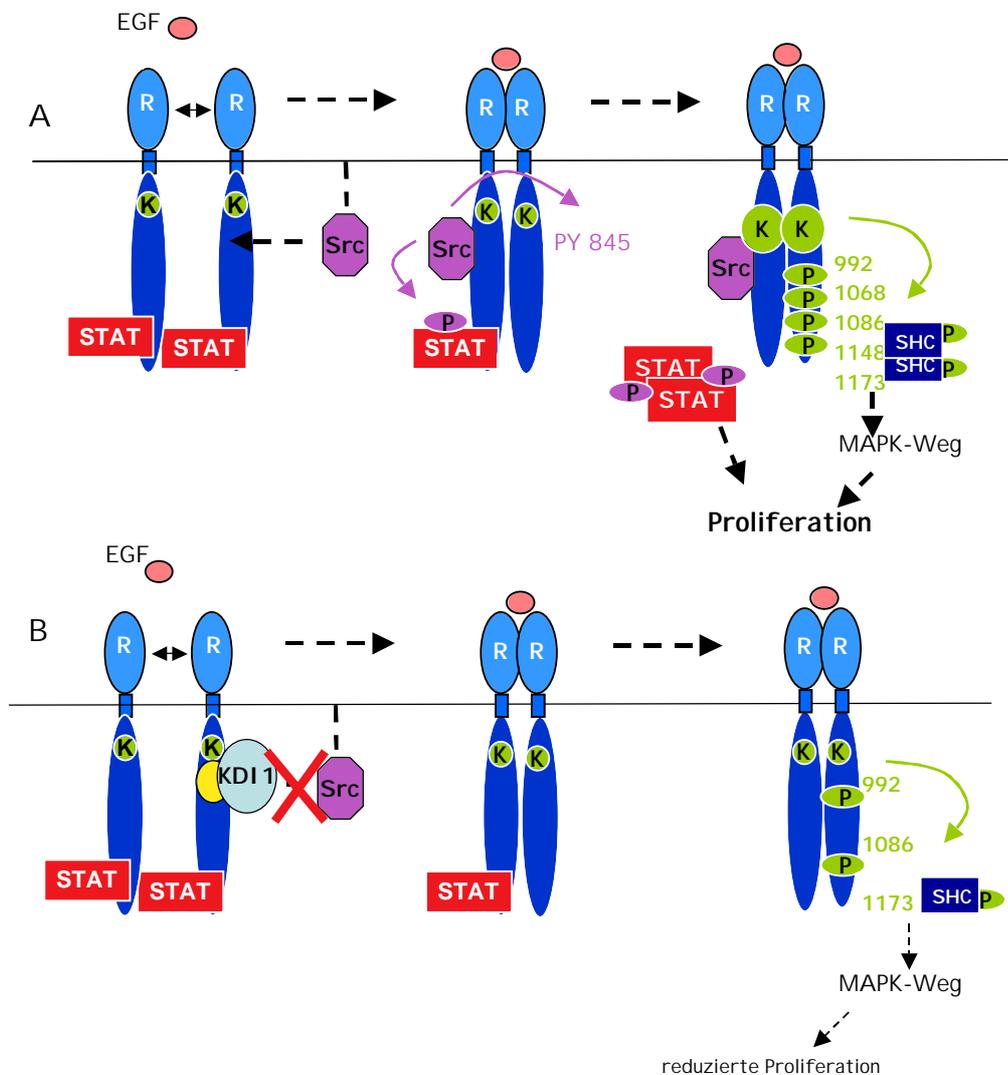


Abb. 4.1: Die Bindung des Peptid-Aptamers KDI1 inhibiert die EGF-induzierte Rekrutierung von c-Src an den EGF-Rezeptor

(A) Durch EGF-Bindung kommt es zur Dimerisierung des EGF-Rezeptors, wodurch die intrinsische Kinasedomäne des Rezeptors basal aktiviert wird. Gleichzeitig wird die zytosplasmatische Kinase c-Src an den Rezeptor rekrutiert, die den EGF-Rezeptor an Tyrosin 845 phosphoryliert, wodurch es zu einer Verstärkung der Kinaseaktivität kommt. Auch STAT3 wird durch Src phosphoryliert, so dass STAT-Dimere gebildet werden. Die intrinsische Kinaseaktivität des Rezeptors phosphoryliert C-terminale Tyrosinreste, die Bindungsstellen für Signalmoleküle darstellen, die unter anderem den MAPK-Signalweg aktivieren.

(B) Das Peptid-Aptamer KDI1 bindet in einer Region der Kinasedomäne, so dass c-Src nach Aktivierung des EGF-Rezeptors nicht mehr an diesen rekrutiert werden kann. Durch diesen Effekt wird nicht nur die Kinaseaktivität des Rezeptors reduziert, da keine zusätzliche Erhöhung der Kinaseaktivität durch die Phosphorylierung des Tyrosinrestes 845 erfolgt, sondern gleichzeitig die Aktivierung von STAT3 inhibiert.

Das Peptid-Aptamer KDI1 wurde für eine Bindung an den ersten Teil der Kinasedomäne (aa 688 bis aa 821) selektiert. Es ist bisher noch nicht bekannt an welche Region des Rezeptors c-Src bindet. Der Tyrosinrest 845, der ein Substrat für c-Src darstellt, liegt gerade außerhalb der Bindungsregion des Peptid-Aptamers. Daher wäre es denkbar, dass aufgrund der Größe des gebundenen Peptid-Aptamers die Rekrutierung von c-Src an den Rezeptorkomplex blockiert wird, so dass c-Src der Zugang zum Substrat blockiert wird. Durch diesen Effekt wird nicht nur die Aktivierung von STAT3 inhibiert, sondern gleichzeitig die Kinaseaktivität des Rezeptors reduziert, da keine zusätzliche Erhöhung der Kinaseaktivität durch die Phosphorylierung des Tyrosinrestes 845 erfolgen kann. Die daraus resultierende geringere Kinaseaktivität ist vermutlich dann auch für die geringere Phosphorylierung der Tyrosinreste 1068 und 1148 verantwortlich. Um diese Hypothese der Peptid-Aptamer-Wirkung zu bestätigen, muss untersucht werden, ob durch die Bindung des Peptid-Aptamers KDI1 mit der Rekrutierung von c-Src an den Rezeptor und/oder mit dessen Aktivierung durch Phosphorylierung interferiert.

Insgesamt wurde mit dem Peptid-Aptamer KDI1 ein Inhibitor isoliert, der die EGF-abhängige Signaltransduktion inhibiert, was zu einem wachstumsinhibierten Phänotyp führt. Die genaue Funktionsweise des Peptid-Aptamers konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass einzelne Teile der EGF-Signaltransduktion durch das Peptid-Aptamer inhibiert werden. Es gibt zunehmend Hinweise, dass Signaltransduktion nicht in linearen Ketten abläuft, sondern vielmehr komplexe Signalosomen gebildet werden. Daher ist es denkbar, dass durch Interferenz des Peptid-Aptamers viele einzelne Bestandteile dieses Komplexes auf verschiedene Weise beeinflusst werden, und die Signaltransduktion gestört wird. Daher eignet sich das hier isolierte Peptid-Aptamer aufgrund seiner verschiedenen wachstumsinhibierenden Effekte potentiell für den Einsatz in der Tumorthherapie. Auch wenn die inhibitorische Wirkung des Peptid-Aptamers den transformierten Phänotyp nicht vollständig revertieren konnte, kann es dennoch eine therapeutische Anwendung finden. Der chemische EGFR-Inhibitor IRESSA (ZD 1839) zeigte in Kombination mit Taxanen (Paclitaxel und Docetaxel) einen synergistischen Effekt auf Brustkrebszelllinien, die ansonsten gegen die Taxan-Behandlung resistent waren (Ciardiello, Caputo *et al.*, 2002). Somit könnte das Peptid-Aptamer zusammen mit anderen Therapien vor allem in Tumoren, welche

neben einer Deregulation der EGFR-Signaltransduktion auch oder gerade deswegen eine Hyperaktivierung von STAT3 oder c-Src zeigen, angewendet werden.

4.4 Gezielte Degradierung des EGF-Rezeptors durch ein Peptid-Aptamer/SOCS-Box-Protein

Da nur eines der drei isolierten Peptid-Aptamere in der Lage war, mit den Funktionen des EGF-Rezeptors zu interferieren, sollte den Peptid-Aptameren durch Fusion einer weiteren Domäne eine zusätzliche, inhibitorische Funktion gegeben werden. Dazu wurde die SOCS-Box-Domäne der SOCS-Proteine (suppressors of cytokine signalling) verwendet. SOCS-Proteine interagieren über ihre SH2-Domäne einerseits mit Partnermolekülen, wie STAT und Jak und bauen andererseits durch die SOCS-Box Kontakt zu E3-Ubiquitin-Ligasen auf. Dadurch werden Ubiquitineinheiten auf das Partnermolekül übertragen, so dass dieses spezifisch für den Abbau im 26S Proteasom markiert wird (Abb. 4.2 A). Dieser Vorgang trägt zur negativen Regulierung der Zytokin-Signalübertragung bei (Ungureanu, Saharinen *et al.*, 2002). Dieser Prozess wurde auf das Peptid-Aptamer-System übertragen, in dem die SOCS-Box an die Peptid-Aptamer-Sequenz fusioniert wurde. Das Peptid-Aptamer vermittelt in diesem System die spezifische Interaktion mit dem Zielmolekül (hier dem EGF-Rezeptor), während die SOCS-Box den Kontakt mit dem Ubiquitinylierungssystem der Zelle herstellt, so dass der Rezeptor ubiquitinyliert und dadurch in die Degradation getrieben wird (Abb. 4.2 B).

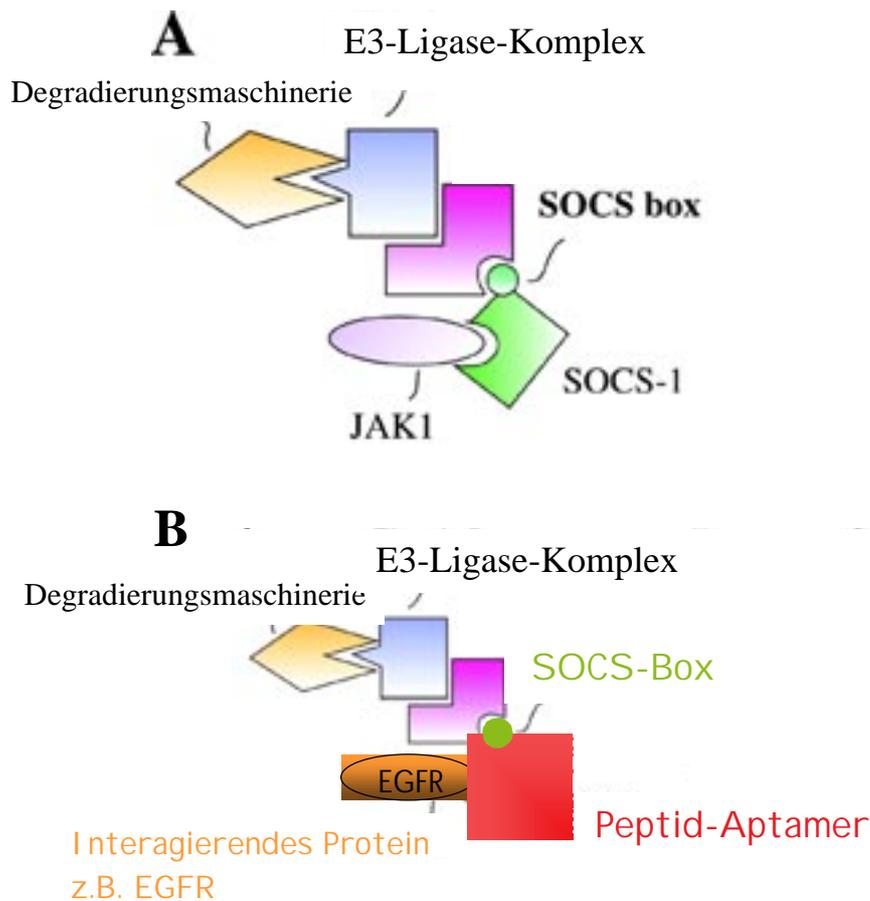


Abb. 4.2: Übertragung der Adapterfunktion der SOCS-Proteine auf das Aptamer-System

(A) SOCS-Proteine interagieren über die SOCS-Box-Domäne mit dem E3-Ligase-Komplex. Dadurch kommen die, über die SH2-Domäne gebundenen Jak- und STAT-Proteine in die Nähe des E3-Komplexes, so dass sie durch die Übertragung von Ubiquitineinheiten zum Abbau im Proteasom gekennzeichnet werden.

(B) Die Fusion einer SOCS-Box-Domäne an ein Peptid-Aptamer, das spezifisch ein Zielprotein (wie z.B. den EGFR) erkennt, bringt es in engen Kontakt mit dem E3-Ligase-Komplex, so dass das Zielprotein ubiquitinyliert und damit für die Degradation markiert wird.

Auch die rekombinanten SOCS-Box-Aptamere (KDI1-9RSOCS und KDI4-9RSOCS) konnten bakteriell exprimiert und gereinigt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch diese Proteine in Zielzellen transduzieren und dort mit dem EGF-Rezeptor interagieren (Abb. 3.24). Dieses Ergebnis zeigte, dass durch die Fusion der zusätzlichen Domäne weder die Transduktions- noch die Bindungseigenschaften der Peptid-Aptamere negativ beeinflusst wurden. Damit waren diese rekombinanten Peptid-Aptamere für die Untersuchungen der gezielten Degradation des Rezeptors einsetzbar. Durch Transduktion von KDI1-9RSOCS konnte die Konzentration des EGF-Rezeptors deutlich reduziert werden (Abb. 3.25), während Peptid-Aptamer KDI4-9RSOCS keinen Effekt auf die Rezeptorkonzentration hatte. Dies könnte daran

liegen, dass dieses Peptid-Aptamer- wie im GST-Pulldown nachgewiesen wurde- im Vergleich zu KDI1 eine sehr niedrige Bindungsaffinität zum Rezeptor hat. Die Bindung des Peptid-Aptamers war somit möglicherweise zu schwach, um den Kontakt zwischen dem Rezeptor und der zellulären Degradierungsmaschinerie aufzubauen.

Sowohl in Immunofluoreszenz- (Abb. 3.26) als auch in Western Blot-Analysen (Abb. 3.28) konnte gezeigt werden, dass durch Transduktion von 3 μ M KDI1-9RSOCS der Rezeptor quantitativ degradiert werden konnte. Dieser Prozess war nach 4 Stunden vollständig abgeschlossen. In der Immunofluoreszenzstudie wurde gleichzeitig deutlich, dass mit zunehmender Zeit der Rezeptor von der Membran ins Zytoplasma gelangt (Abb. 3.26). Dort war er in Vesikeln lokalisiert, wo er anschließend degradiert wurde. Dadurch kommt es zu einer deutlich geringeren Rezeptorkonzentration in der Membran, mit der Folge, dass die Menge des aktivierbaren und damit funktionellen Rezeptors deutlich abgesenkt wurde. Gleichzeitig konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass weitere Signalproteine wie STAT 3 und 5 ebenfalls abgebaut wurden, während das Zytoskelettprotein Aktin nicht degradiert wurde (Abb. 3.27). Es gibt Hinweise in der Literatur, dass STAT3 und 5 auch im nicht aktivierten Zustand prä-assoziert mit dem EGF-Rezeptor vorliegen (Olayioye, Beuvink *et al.*, 1999). Aus diesem Grund ist es denkbar, dass durch die Bindung des Peptid-Aptamers alle mit dem Rezeptor assoziierten Signalproteine degradiert werden. Dies kann sehr vorteilhaft sein, da dadurch das gesamte Signalosom in die Degradation getrieben werden kann, so dass die vom EGF-Rezeptor ausgehende Signaltransduktion vollständig inhibiert wird.

Der genaue Mechanismus der durch das SOCS-Box-Aptamer vermittelten Degradation konnte nicht aufgeklärt werden. Es konnte gezeigt werden, dass durch Transduktion hoher Mengen des Peptid-Aptamers der EGF-Rezeptor verstärkt ubiquitinyliert wird (Abb. 3.29). Ubiquitinylierte Protein werden normalerweise vom 26S Proteasom erkannt und durch die entsprechenden Proteasen abgebaut. Inhibitoren des Proteasoms wie MG 135 und ALLN, konnten die Degradation des Rezeptors und assoziierter Proteine jedoch nicht oder nur schwach inhibieren (Abb. 3.27 und 3.28). Ungureanu *et al.* (Ungureanu, Saharinen *et al.*, 2002) hingegen zeigten, dass die durch die Bindung von SOCS-Proteinen ausgelöste Degradation von STAT- und Jak-Proteinen durch Proteasom-Inhibitoren verhindert werden kann. Ein

Transmembranprotein wie der EGF-Rezeptor hingegen wird nach Ligandenbindung endozytiert, so dass ein so genanntes frühes Endosom entsteht. Je nach Aktivierungs- und Ubiquitylierungsstatus wird der Rezeptor für eine erneute Aktivierung an die Zelloberfläche zurückgebracht oder es entsteht ein spätes Endosomen, das mit Lysosomen fusioniert, wo der Rezeptor abgebaut wird (Waterman, Katz *et al.*, 2002). Aus diesem Grund ist es denkbar, dass der Rezeptor auch nach der SOCS-Box-vermittelten Ubiquitylierung nicht wie SOCS-Proteine im 26S Proteasom, sondern in Lysosomen degradiert wird. Für diese Annahme spricht, dass Longva *et al.* (Longva, Blystad *et al.*, 2002) zeigen konnten, dass der Rezeptor nach liganden-induzierter Internalisierung ubiquityliert wird, jedoch anschließend nicht durch das Proteasom abgebaut wird. Vielmehr ist die Ubiquitylierung des Rezeptors die entscheidende Voraussetzung für den Transport vom frühen zum späten Endosom. Daher kann angenommen werden, dass durch die Bindung des SOCS-Box-Aptamers die Ubiquitylierung des Rezeptors verstärkt wird, so dass es anschließend zu einem verstärkten Transport des Rezeptors in die Lysosomen und damit zu einem verstärkten Abbau des Rezeptors kommt. Diese Hypothese wird dadurch untermauert, dass in Immunofluoreszenzaufnahmen der EGF-Rezeptor nach Transduktion des SOCS-Box-Peptid-Aptamers in intrazellulären Vesikeln lokalisiert werden konnte, während die Konzentration des Rezeptors in der Membran deutlich abnahm (Abb. 3.26). Daher muss geklärt werden, ob es sich bei diesen Vesikeln um späte Endosomen bzw. Lysosomen handelt, deren Proteasen den Rezeptor abbauen.

Die beschriebenen Ergebnisse beweisen, dass sich ein rekombinantes SOCS-Box-Aptamer dazu eignet, ein interagierendes Protein gezielt für die Degradation zu markieren und die zelluläre Konzentration des Proteins abzusenken. Einen ähnlichen Ansatz wählten Colas *et al.* (Colas, Cohen *et al.*, 2000), sie fusionierten die katalytische Hect-Domäne einer Ubiquitin-Ligase aus der Hefe mit einem Aptamer. Sie konnten jedoch lediglich in der Hefe zeigen, dass das Zielprotein, Cdk2, verstärkt ubiquityliert wird. Dem gegenüber ist das hier vorgestellte System erheblich weiter fortgeschritten, da einerseits die Wirkung der rekombinanten Aptamere in Zielzellen nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus wurde durch die Methode der Proteintransduktion, ein System zu Verabreichung der therapeutischen Peptid-Aptamere etabliert.

4.5 Einsatz von Peptid-Aptameren in der Grundlagenforschung und der Tumorthherapie

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eines von drei isolierten Peptid-Aptameren die EGFR-Aktivität quantitativ hemmen kann. Gleichzeitig wurde deutlich, dass die Methode der Proteintransduktion dazu geeignet ist, ein solches Aptamer in Zielzellen einzubringen. Durch Fusion der Peptid-Aptamere mit einer zusätzlichen funktionellen Domäne wie der SOCS-Box konnte die Funktionsweise von Peptid-Aptameren zusätzlich verstärkt werden. Außerdem kann die inhibitorische Wirkung der Aptamere durch Erhöhung der Affinität des Aptamers zum Rezeptor noch gesteigert werden. Durch randomisierte Mutagenese kann ein Peptid generiert werden, das eine deutlich höhere Affinität zum Zielprotein aufweist, so dass stabilere Rezeptor/Inhibitor-Komplexe gebildet werden (Colas, Cohen *et al.*, 2000).

Ein auf diese Weise isoliertes Peptid-Aptamer eignet sich somit für den Einsatz in der Grundlagenforschung, aber auch in der Therapie von Tumoren, die eine Deregulation der EGFR-Signaltransduktion zeigen. Dafür sind mehrere Ansätze denkbar. Zunächst wäre es denkbar, das gesamte Protein zu applizieren. Proteine sind jedoch potentiell immunogen, so dass sie rasch durch das Immunsystem abgebaut werden. Daher wäre es von Vorteil, nur das Peptidinsert zu synthetisieren und zu applizieren. In Studien wurde jedoch gezeigt, dass das lineare Peptid eine bis zu 1000fach geringere Bindungsaffinität und inhibitorische Aktivität aufweist, als das gesamte Peptid-Aptamer (Cohen, Colas *et al.*, 1998). Ein anderes Peptid-Aptamer hingegen zeigte nur eine 10fach geringere Aktivität (Fabbrizio, Le Cam *et al.*, 1999). Dies zeigt, dass die Aktivität des Peptid-Aptamers entscheidend von dessen Konformation abhängt. Das Peptid-Aptamer wird zwar mit einer durch das Gerüstprotein vorgegeben Konformation selektiert, dennoch scheint die Konformation darüber hinaus entscheidend von der Peptidsequenz selber bestimmt zu werden. Darüber hinaus ist die hier verwendete Peptid-Aptamer-Library in das aktive Zentrum des Thioredoxins inseriert. Dadurch liegt das Peptid zwischen zwei Cysteinresten, so dass es durch Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den beiden Cysteinen nach außen präsentiert wird. Wenn diese Disulfidbrücke auch im linearen Peptid ausgebildet wird, ist es möglich, dass das Peptid die gleiche Konformation und damit die gleiche Bindungsaffinität aufweist, wie das gesamte Peptid-Aptamer. Aus diesen Gründen muss untersucht werden, ob das isolierte Peptid-Aptamer (KDI1) auch als

lineares 20mer Peptid, versehen mit einer Proteintransduktionsdomäne, eine hohe Affinität zum Rezeptor zeigt, so dass es eine ähnliche inhibitorische Aktivität entfalten kann. Ein solches Peptid kann dann beispielsweise durch Verpackung in Liposomen oder chemische Modifikation vor Degradation im Organismus geschützt werden. Des Weiteren eignen sich Peptid-Aptamere zur Herstellung peptidomimetischer Verbindungen. Die dreidimensionale Peptidstruktur kann leicht aufgeklärt werden, da sie aufgrund der Insertion in das Thioredoxingerüst eine stabile, leicht zu kristallisierende Konformation haben sollte. Aufgrund dieser Struktur können dann chemische Verbindungen synthetisiert werden, welche bessere pharmakologische Eigenschaften aufweisen als Proteine oder Peptide.

In der vorliegenden Arbeit konnte am Model des EGF-Rezeptors gezeigt werden, dass es mit dem vorgestellten System möglich ist, Inhibitoren gegen ein Zielprotein zu isolieren. Peptid-Aptamere stellen somit eine weitere Ebene der gezielten Interferenz mit Signaltransduktionskaskaden dar. Bisher konnte durch Interferenz auf DNA-Ebene (Knock-out-Systeme) oder auf RNA-Ebene (anti-sense- oder siRNA-Ansätze) die Funktion von Genen manipuliert werden. Das Peptid-Aptamer-System, vor allem in Kombination mit einer SOCS-Box-Domäne, erlaubt nun die gezielte Inhibition und/oder Degradation auf Proteinebene. Somit stellen Peptid-Aptamere Werkzeuge dar, mit denen zum einen die Funktionen unbekannter Proteine studiert werden können. Zum anderen können sie aber auch Anwendungen in der Therapie von Erkrankungen finden, bei denen diese Zielproteine deregulierte Funktionen aufweisen.

5 Literatur

Abedi, M. R., G. Caponigro and A. Kamb (1998). "Green fluorescent protein as a scaffold for intracellular presentation of peptides." Nucleic Acids Res **26**(2): 623-30.

Abu-Amer, Y., S. F. Dowdy, F. P. Ross, J. C. Clohisy and S. L. Teitelbaum (2001). "Tat fusion proteins containing tyrosine 42-deleted ikappa balpha arrest osteoclastogenesis." J Biol Chem **276**(32): 30499-503.

Akiyama, T., S. Matsuda, Y. Namba, T. Saito, K. Toyoshima and T. Yamamoto (1991). "The transforming potential of the c-erbB-2 protein is regulated by its autophosphorylation at the carboxyl-terminal domain." Mol Cell Biol **11**(2): 833-42.

Azemar, M., M. Schmidt, F. Arlt, P. Kennel, B. Brandt, A. Papadimitriou, B. Groner and W. Wels (2000). "Recombinant antibody toxins specific for ErbB2 and EGF receptor inhibit the in vitro growth of human head and neck cancer cells and cause rapid tumor regression in vivo." Int J Cancer **86**(2): 269-75.

Barbieri, M. A., R. L. Roberts, A. Gumusboga, H. Highfield, C. Alvarez-Dominguez, A. Wells and P. D. Stahl (2000). "Epidermal growth factor and membrane trafficking. EGF receptor activation of endocytosis requires Rab5a." J Cell Biol **151**(3): 539-50.

Baselga, J., L. Norton, J. Albanell, Y. M. Kim and J. Mendelsohn (1998). "Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts." Cancer Res **58**(13): 2825-31.

Beerli, R. R., W. Wels and N. E. Hynes (1994). "Intracellular expression of single chain antibodies reverts ErbB-2 transformation." J Biol Chem **269**(39): 23931-6.

- Belsches, A. P., M. D. Haskell and S. J. Parsons (1997). "Role of c-Src tyrosine kinase in EGF-induced mitogenesis." Front Biosci **2**: d501-18.
- Biscardi, J. S., M. C. Maa, D. A. Tice, M. E. Cox, T. H. Leu and S. J. Parsons (1999). "c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function." J Biol Chem **274**(12): 8335-43.
- Blum, J. H., S. L. Dove, A. Hochschild and J. J. Mekalanos (2000). "Isolation of peptide aptamers that inhibit intracellular processes." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(5): 2241-6.
- Bruns, C. J., C. C. Solorzano, M. T. Harbison, S. Ozawa, R. Tsan, D. Fan, J. Abbruzzese, P. Traxler, E. Buchdunger, R. Radinsky and I. J. Fidler (2000). "Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling by a novel tyrosine kinase inhibitor leads to apoptosis of endothelial cells and therapy of human pancreatic carcinoma." Cancer Res **60**(11): 2926-35.
- Butz, K., C. Denk, B. Fitscher, I. Crnkovic-Mertens, A. Ullmann, C. H. Schroder and F. Hoppe-Seyler (2001). "Peptide aptamers targeting the hepatitis B virus core protein: a new class of molecules with antiviral activity." Oncogene **20**(45): 6579-86.
- Butz, K., C. Denk, A. Ullmann, M. Scheffner and F. Hoppe-Seyler (2000). "Induction of apoptosis in human papillomaviruspositive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein [In Process Citation]." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6693-7.
- Cao, G., W. Pei, H. Ge, Q. Liang, Y. Luo, F. R. Sharp, A. Lu, R. Ran, S. H. Graham and J. Chen (2002). "In Vivo Delivery of a Bcl-xL Fusion Protein Containing the TAT Protein Transduction Domain Protects against Ischemic Brain Injury and Neuronal Apoptosis." J Neurosci **22**(13): 5423-31.

- Ciardiello, F., R. Caputo, G. Borriello, D. Del Bufalo, A. Biroccio, G. Zupi, A. R. Bianco and G. Tortora (2002). "ZD1839 (IRESSA), an EGFR-selective tyrosine kinase inhibitor, enhances taxane activity in bcl-2 overexpressing, multidrug-resistant MCF-7 ADR human breast cancer cells." Int J Cancer **98**(3): 463-9.
- Ciardiello, F. and G. Tortora (2001). "A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor." Clin Cancer Res **7**(10): 2958-70.
- Ciechanover, A., A. Orian and A. L. Schwartz (2000). "Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction." Bioessays **22**(5): 442-51.
- Coffer, P. J. and W. Kruijer (1995). "EGF receptor deletions define a region specifically mediating STAT transcription factor activation." Biochem Biophys Res Commun **210**(1): 74-81.
- Cohen, B. A., P. Colas and R. Brent (1998). "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14272-7.
- Colas, P., B. Cohen, P. K. Ferrigno, P. A. Silver and R. Brent (2000). "Targeted modification and transportation of cellular proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13720-5.
- Colas, P., B. Cohen, T. Jessen, I. Grishina, J. McCoy and R. Brent (1996). "Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin- dependent kinase 2." Nature **380**(6574): 548-50.
- Cooper, J. A. and B. Howell (1993). "The when and how of Src regulation." Cell **73**(6): 1051-4.

- Darcy, K. M., D. Zangani, A. L. Wohlhueter, R. Y. Huang, M. M. Vaughan, J. A. Russell and M. M. Ip (2000). "Changes in ErbB2 (her-2/neu), ErbB3, and ErbB4 during growth, differentiation, and apoptosis of normal rat mammary epithelial cells." J Histochem Cytochem **48**(1): 63-80.
- Derossi, D., S. Calvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing and A. Prochiantz (1996). "Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent." J Biol Chem **271**(30): 18188-93.
- Di Fiore, P. P., J. H. Pierce, T. P. Fleming, R. Hazan, A. Ullrich, C. R. King, J. Schlessinger and S. A. Aaronson (1987). "Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells." Cell **51**(6): 1063-70.
- Downward, J., Y. Yarden, E. Mayes, G. Scrace, N. Totty, P. Stockwell, A. Ullrich, J. Schlessinger and M. D. Waterfield (1984). "Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences." Nature **307**(5951): 521-7.
- Elliott, G. and P. O'Hare (1997). "Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein." Cell **88**(2): 223-33.
- Erickson, S. L., K. S. O'Shea, N. Ghaboosi, L. Loverro, G. Frantz, M. Bauer, L. H. Lu and M. W. Moore (1997). "ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2-and heregulin-deficient mice." Development **124**(24): 4999-5011.
- Ewald, J. A., K. J. Coker, J. O. Price, J. V. Staros and C. A. Guyer (2001). "Stimulation of mitogenic pathways through kinase-impaired mutants of the epidermal growth factor receptor." Exp Cell Res **268**(2): 262-73.

- Fabbrizio, E., L. Le Cam, J. Polanowska, M. Kaczorek, N. Lamb, R. Brent and C. Sardet (1999). "Inhibition of mammalian cell proliferation by genetically selected peptide aptamers that functionally antagonize E2F activity." Oncogene **18**(30): 4357-63.
- Fawell, S., J. Seery, Y. Daikh, C. Moore, L. L. Chen, B. Pepinsky and J. Barsoum (1994). "Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(2): 664-8.
- Frankel, A. D. and C. O. Pabo (1988). "Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus." Cell **55**(6): 1189-93.
- Gassmann, M., F. Casagrande, D. Orioli, H. Simon, C. Lai, R. Klein and G. Lemke (1995). "Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor." Nature **378**(6555): 390-4.
- Goldstein, N. I., M. Prewett, K. Zuklys, P. Rockwell and J. Mendelsohn (1995). "Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model." Clin Cancer Res **1**(11): 1311-8.
- Grandis, J. R., S. D. Drenning, A. Chakraborty, M. Y. Zhou, Q. Zeng, A. S. Pitt and D. J. Tweardy (1998). "Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor- mediated cell growth In vitro." J Clin Invest **102**(7): 1385-92.
- Grandis, J. R., S. D. Drenning, Q. Zeng, S. C. Watkins, M. F. Melhem, S. Endo, D. E. Johnson, L. Huang, Y. He and J. D. Kim (2000). "Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4227-32.
- Graus-Porta, D., R. R. Beerli, J. M. Daly and N. E. Hynes (1997). "ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling." Embo J **16**(7): 1647-55.

- Graus-Porta, D., R. R. Beerli and N. E. Hynes (1995). "Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling." Mol Cell Biol **15**(3): 1182-91.
- Green, M. and P. M. Loewenstein (1988). "Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein." Cell **55**(6): 1179-88.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Harada, H., M. Hiraoka and S. Kizaka-Kondoh (2002). "Antitumor effect of TAT-oxygen-dependent degradation-caspase-3 fusion protein specifically stabilized and activated in hypoxic tumor cells." Cancer Res **62**(7): 2013-8.
- Harari, D., E. Tzahar, J. Romano, M. Shelly, J. H. Pierce, G. C. Andrews and Y. Yarden (1999). "Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase." Oncogene **18**(17): 2681-9.
- Hennighausen, L. and G. W. Robinson (1998). "Think globally, act locally: the making of a mouse mammary gland." Genes Dev **12**(4): 449-55.
- Hilton, D. J., R. T. Richardson, W. S. Alexander, E. M. Viney, T. A. Willson, N. S. Sprigg, R. Starr, S. E. Nicholson, D. Metcalf and N. A. Nicola (1998). "Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(1): 114-9.
- Hoppe-Seyler, F. and K. Butz (2000). "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine [In Process Citation]." J Mol Med **78**(8): 426-30.
- Hunter, T. (1998). "The role of tyrosine phosphorylation in cell growth and disease." Harvey Lect **94**: 81-119.

- Hynes, N. E. (2000). "Tyrosine kinase signalling in breast cancer." Breast Cancer Res **2**(3): 154-7.
- Hynes, N. E., K. Horsch, M. A. Olayioye and A. Badache (2001). "The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators." Endocr Relat Cancer **8**(3): 151-9.
- Jannot, C. B., R. R. Beerli, S. Mason, W. J. Gullick and N. E. Hynes (1996). "Intracellular expression of a single-chain antibody directed to the EGFR leads to growth inhibition of tumor cells." Oncogene **13**(2): 275-82.
- Joliot, A., C. Pernelle, H. Deagostini-Bazin and A. Prochiantz (1991). "Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(5): 1864-8.
- Jones, F. E., T. Welte, X. Y. Fu and D. F. Stern (1999). "ErbB4 signaling in the mammary gland is required for lobuloalveolar development and Stat5 activation during lactation." J Cell Biol **147**(1): 77-88.
- Kamizono, S., T. Hanada, H. Yasukawa, S. Minoguchi, R. Kato, M. Minoguchi, K. Hattori, S. Hatakeyama, M. Yada, S. Morita, T. Kitamura, H. Kato, K. Nakayama and A. Yoshimura (2001). "The SOCS box of SOCS-1 accelerates ubiquitin-dependent proteolysis of TEL-JAK2." J Biol Chem **276**(16): 12530-8.
- Kelemen, B. R., K. Hsiao and S. A. Goueli (2002). "Selective in Vivo Inhibition of Mitogen-activated Protein Kinase Activation Using Cell-permeable Peptides." J Biol Chem **277**(10): 8741-8748.
- Kitagawa, M., S. Hatakeyama, M. Shirane, M. Matsumoto, N. Ishida, K. Hattori, I. Nakamichi, A. Kikuchi and K. Nakayama (1999). "An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin." Embo J **18**(9): 2401-10.

- Klapper, L. N., M. H. Kirschbaum, M. Sela and Y. Yarden (2000). "Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors." Adv Cancer Res **77**: 25-79.
- Klingbeil, C. K. and G. N. Gill (1999). "A basic residue, Lys 782, composes part of the ATP-binding site on the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase." Arch Biochem Biophys **363**(1): 27-32.
- Kolonin, M. G. and R. L. Finley, Jr. (1998). "Targeting cyclin-dependent kinases in Drosophila with peptide aptamers." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14266-71.
- Lee, K. F., H. Simon, H. Chen, B. Bates, M. C. Hung and C. Hauser (1995). "Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development." Nature **378**(6555): 394-8.
- Levkowitz, G., H. Waterman, S. A. Ettenberg, M. Katz, A. Y. Tsygankov, I. Alroy, S. Lavi, K. Iwai, Y. Reiss, A. Ciechanover, S. Lipkowitz and Y. Yarden (1999). "Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1." Mol Cell **4**(6): 1029-40.
- Lin, S. Y., K. Makino, W. Xia, A. Matin, Y. Wen, K. Y. Kwong, L. Bourguignon and M. C. Hung (2001). "Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor." Nat Cell Biol **3**(9): 802-8.
- Longva, K. E., F. D. Blystad, E. Stang, A. M. Larsen, L. E. Johannessen and I. H. Madshus (2002). "Ubiquitination and proteasomal activity is required for transport of the EGF receptor to inner membranes of multivesicular bodies." J Cell Biol **156**(5): 843-54.

- Lydon, N. B., H. Mett, M. Mueller, M. Becker, R. M. Cozens, D. Stover, D. Daniels, P. Traxler and E. Buchdunger (1998). "A potent protein-tyrosine kinase inhibitor which selectively blocks proliferation of epidermal growth factor receptor-expressing tumor cells in vitro and in vivo." Int J Cancer **76**(1): 154-63.
- Mai, J. C., H. Shen, S. C. Watkins, T. Cheng and P. D. Robbins (2002). "Efficiency of Protein Transduction Is Cell Type-dependent and Is Enhanced by Dextran Sulfate." J Biol Chem **277**(33): 30208-30218.
- Matsui, Y., S. A. Halter, J. T. Holt, B. L. Hogan and R. J. Coffey (1990). "Development of mammary hyperplasia and neoplasia in MMTV-TGF alpha transgenic mice." Cell **61**(6): 1147-55.
- Mendelsohn, J. and J. Baselga (2000). "The EGF receptor family as targets for cancer therapy." Oncogene **19**(56): 6550-65.
- Michals (1998) Biochemical Pathways
- Miettinen, P. J., J. E. Berger, J. Meneses, Y. Phung, R. A. Pedersen, Z. Werb and R. Derynck (1995). "Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor." Nature **376**(6538): 337-41.
- Morris, M. C., J. Depollier, J. Mery, F. Heitz and G. Divita (2001). "A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells." Nat Biotechnol **19**(12): 1173-6.
- Nagane, M., H. Lin, W. K. Cavenee and H. J. Huang (2001). "Aberrant receptor signaling in human malignant gliomas: mechanisms and therapeutic implications." Cancer Lett **162 Suppl**: S17-S21.
- Nauenburg, S., W. Zwerschke and P. Jansen-Durr (2001). "Induction of apoptosis in cervical carcinoma cells by peptide aptamers that bind to the HPV-16 E7 oncoprotein." Faseb J **15**(3): 592-4.

- Niesner, U., C. Halin, L. Lozzi, M. Gunthert, P. Neri, H. Wunderli-Allenspach, L. Zardi and D. Neri (2002). "Quantitation of the Tumor-Targeting Properties of Antibody Fragments Conjugated to Cell-Permeating HIV-1 TAT Peptides." Bioconjug Chem **13**(4): 729-736.
- Olayioye, M. A., A. Badache, J. M. Daly and N. E. Hynes (2001). "An essential role for Src kinase in ErbB receptor signaling through the MAPK pathway." Exp Cell Res **267**(1): 81-7.
- Olayioye, M. A., I. Beuvink, K. Horsch, J. M. Daly and N. E. Hynes (1999). "ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases." J Biol Chem **274**(24): 17209-18.
- Park, O. K., T. S. Schaefer and D. Nathans (1996). "In vitro activation of Stat3 by epidermal growth factor receptor kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 13704-8.
- Ranson, M., L. A. Hammond, D. Ferry, M. Kris, A. Tullo, P. I. Murray, V. Miller, S. Averbuch, J. Ochs, C. Morris, A. Feyereislova, H. Swaisland and E. K. Rowinsky (2002). "ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, is well tolerated and active in patients with solid, malignant tumors: results of a phase I trial." J Clin Oncol **20**(9): 2240-50.
- Riese, D. J., 2nd and D. F. Stern (1998). "Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network." Bioessays **20**(1): 41-8.
- Salazar, G. and A. Gonzalez (2002). "Novel Mechanism for Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Endocytosis Revealed by Protein Kinase A Inhibition." Mol Biol Cell **13**(5): 1677-1693.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual 2nd edition, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y.

- Sato, K., M. Kimoto, M. Kakumoto, D. Horiuchi, T. Iwasaki, A. A. Tokmakov and Y. Fukami (2000). "Adaptor protein Shc undergoes translocation and mediates up-regulation of the tyrosine kinase c-Src in EGF-stimulated A431 cells." Genes Cells **5**(9): 749-64.
- Sato, K. I., T. Nagao, M. Kakumoto, M. Kimoto, T. Otsuki, T. Iwasaki, A. A. Tokmakov, K. Owada and Y. Fukami (2002). "Adaptor protein Shc is an isoform-specific direct activator of the tyrosine kinase c-Src." J Biol Chem **4**: 4.
- Scheffner, M., J. M. Huibregtse, R. D. Vierstra and P. M. Howley (1993). "The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53." Cell **75**(3): 495-505.
- Schmidt, M., M. Maurer-Gebhard, B. Groner, G. Kohler, G. Brochmann-Santos and W. Wels (1999). "Suppression of metastasis formation by a recombinant single chain antibody-toxin targeted to full-length and oncogenic variant EGF receptors." Oncogene **18**(9): 1711-21.
- Schwarze, S. R. and S. F. Dowdy (2000). "In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA." Trends Pharmacol Sci **21**(2): 45-8.
- Schwarze, S. R., A. Ho, A. Vocero-Akbani and S. F. Dowdy (1999). "In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse [see comments]." Science **285**(5433): 1569-72.
- Sehgal, A. (2002). "Recent developments in peptide-based cancer therapeutics." Curr Opin Drug Discov Devel **5**(2): 245-50.
- Sharpe, S., K. R. Barber and C. W. Grant (2000). "Val(659)-->Glu mutation within the transmembrane domain of ErbB-2: effects measured by (2)H NMR in fluid phospholipid bilayers." Biochemistry **39**(21): 6572-80.

- Sierke, S. L., K. Cheng, H. H. Kim and J. G. Koland (1997). "Biochemical characterization of the protein tyrosine kinase homology domain of the ErbB3 (HER3) receptor protein." Biochem J **322**(Pt 3): 757-63.
- Spencer, K. S., D. Graus-Porta, J. Leng, N. E. Hynes and R. L. Klemke (2000). "ErbB2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by ErbB family receptor tyrosine kinases." J Cell Biol **148**(2): 385-97.
- Stover, D. R., M. Becker, J. Liebetanz and N. B. Lydon (1995). "Src phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at novel sites mediates receptor interaction with Src and P85 alpha." J Biol Chem **270**(26): 15591-7.
- Tang, C. K., X. Q. Gong, D. K. Moscatello, A. J. Wong and M. E. Lippman (2000). "Epidermal growth factor receptor vIII enhances tumorigenicity in human breast cancer." Cancer Res **60**(11): 3081-7.
- Tice, D. A., J. S. Biscardi, A. L. Nickles and S. J. Parsons (1999). "Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(4): 1415-20.
- Tyagi, M., M. Rusnati, M. Presta and M. Giacca (2001). "Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans." J Biol Chem **276**(5): 3254-61.
- Ungureanu, D., P. Saharinen, I. Juntila, D. J. Hilton and O. Silvennoinen (2002). "Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1." Mol Cell Biol **22**(10): 3316-26.
- Visintin, M., E. Tse, H. Axelson, T. H. Rabbitts and A. Cattaneo (1999). "Selection of antibodies for intracellular function using a two-hybrid in vivo system." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(21): 11723-8.

- Vitetta, E. S. and J. W. Uhr (1994). "Monoclonal antibodies as agonists: an expanded role for their use in cancer therapy." Cancer Res **54**(20): 5301-9.
- Waterman, H., M. Katz, C. Rubin, K. Shtiegman, S. Lavi, A. Elson, T. Jovin and Y. Yarden (2002). "A mutant EGF-receptor defective in ubiquitylation and endocytosis unveils a role for Grb2 in negative signaling." Embo J **21**(3): 303-13.
- Wender, P. A., D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman and J. B. Rothbard (2000). "The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(24): 13003-13008.
- Wiesen, J. F., P. Young, Z. Werb and G. R. Cunha (1999). "Signaling through the stromal epidermal growth factor receptor is necessary for mammary ductal development." Development **126**(2): 335-44.
- Wilde, A., E. C. Beattie, L. Lem, D. A. Riethof, S. H. Liu, W. C. Mobley, P. Soriano and F. M. Brodsky (1999). "EGF receptor signaling stimulates SRC kinase phosphorylation of clathrin, influencing clathrin redistribution and EGF uptake." Cell **96**(5): 677-87.
- Xia, L., L. Wang, A. S. Chung, S. S. Ivanov, M. Y. Ling, A. M. Dragoi, A. Platt, T. M. Gilmer, X. Y. Fu and Y. E. Chin (2002). "Identification of both positive and negative domains within EGF receptor COOH-terminal region for STAT activation." J Biol Chem **17**: 17.
- Xie, W., A. J. Paterson, E. Chin, L. M. Nabell and J. E. Kudlow (1997). "Targeted expression of a dominant negative epidermal growth factor receptor in the mammary gland of transgenic mice inhibits pubertal mammary duct development." Mol Endocrinol **11**(12): 1766-81.
- Yarden, Y. and M. X. Sliwkowski (2001). "Untangling the ErbB signalling network." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 127-37.

- Yaron, A., A. Hatzubai, M. Davis, I. Lavon, S. Amit, A. M. Manning, J. S. Andersen, M. Mann, F. Mercurio and Y. Ben-Neriah (1998). "Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase." Nature **396**(6711): 590-4.
- Yi, K. S., J. H. Chung, Y. H. Lee, H. G. Chung, I. J. Kim, B. C. Suh, E. Kim, L. Cocco, S. H. Ryu and P. G. Suh (2001). "Inhibition of the EGF-induced activation of phospholipase C-gamma1 by a single chain antibody fragment." Oncogene **20**(55): 7954-64.
- Yu, C. L., D. J. Meyer, G. S. Campbell, A. C. Lerner, C. Carter-Su, J. Schwartz and R. Jove (1995). "Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein." Science **269**(5220): 81-3.
- Zhang, D., M. X. Sliwkowski, M. Mark, G. Frantz, R. Akita, Y. Sun, K. Hillan, C. Crowley, J. Brush and P. J. Godowski (1997). "Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(18): 9562-7.
- Zhang, J. G., A. Farley, S. E. Nicholson, T. A. Willson, L. M. Zugaro, R. J. Simpson, R. L. Moritz, D. Cary, R. Richardson, G. Hausmann, B. J. Kile, S. B. Kent, W. S. Alexander, D. Metcalf, D. J. Hilton, N. A. Nicola and M. Baca (1999). "The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 2071-6.
- Zimmermann, S. and K. Moelling (1999). "Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B)." Science **286**(5445): 1741-4.

6 Abkürzungsverzeichnis

3-AT	3-Amino-1, 2, 4-triazol
aa	amino acid (Aminosäure)
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenin Triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine serum albumine)
BTC	Betacellulin
CDK	Cycline dependent kinase
CIP	Calf Intestine Phosphatase
DMEM	Dublecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOBA	Dropout Medium
DOBA-LTA	Dropout ohne Leucin, Tryptophan, Adenin
DOBA-LTH	Dropout ohne Leucin, Tryptophan, Histidin
DOBA-LTU	Dropout ohne Leucin, Tryptophan, Uracil
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ErbB	Erythroblastosis retrovirus
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GRB-2	Growth factor receptor bound protein-2
GST	Glutathion-S-transferase
h	Stunde
Herc	Human EGFR cells
HRP	horse raddish peroxidase

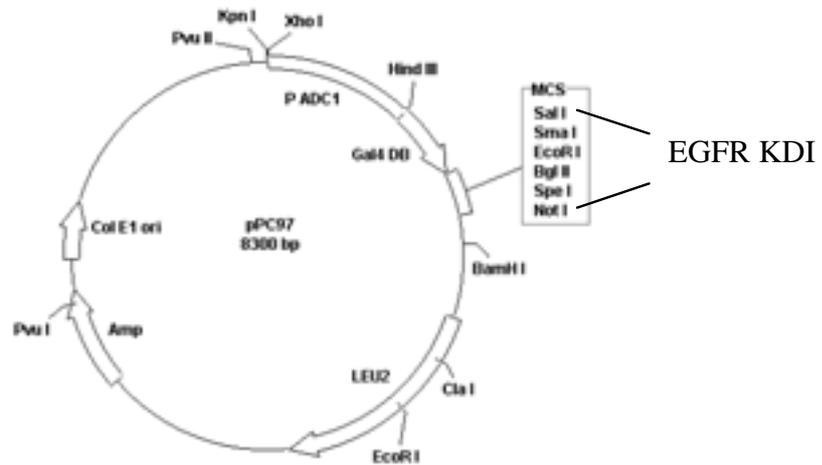
Ig	Immunglobulin
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl-1-thio-D-galactosid
Jak	Janus Kinase
KD	Kinasedomäne
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani-Medium
m	mouse
M	Molar
MAPK	Mitogen activating protein kinase
mM	Millimolar
NDF	Neu differentiation factor
NGF	Neuronal growth factor
NRG	Neuregulin
OD ₍₂₆₀₎	Optische Dichte bei 260 nm Wellenlänge
p	Plasmid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAO	Phenylarsinoxid
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglycol
PI-3K	Phosphoinositol-3 kinase
PKA	Protein kinase A
PKB	Protein kinase B
PKC	Protein kinase C
PLC- γ	Phospholipase C
PMS	N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate
PY	Phosphotyrosin
r	rabbit
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
PTD	Proteintransduktionsdomäne

RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecylsulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH2	Src homology domain
SOCS	suppressors of cytokine signalling
SOS	Son of Sevenless
STAT	Signal transducers and activators of transcription
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGF α	Transforming growth factor
Trx	Thioredoxin
v/v	Volumen/ Volumen
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
w/v	Masse/Volumen
XTT	Sodium 3'-(1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium)-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene sulfonic acid

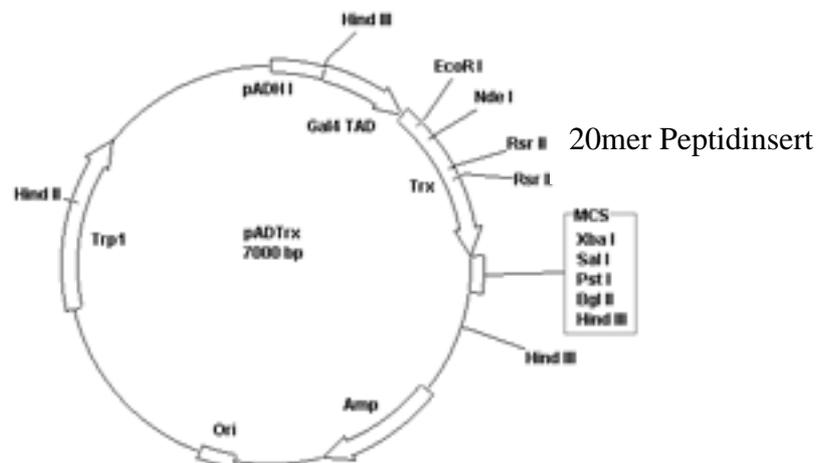
7 Anhänge

Vektorkarten

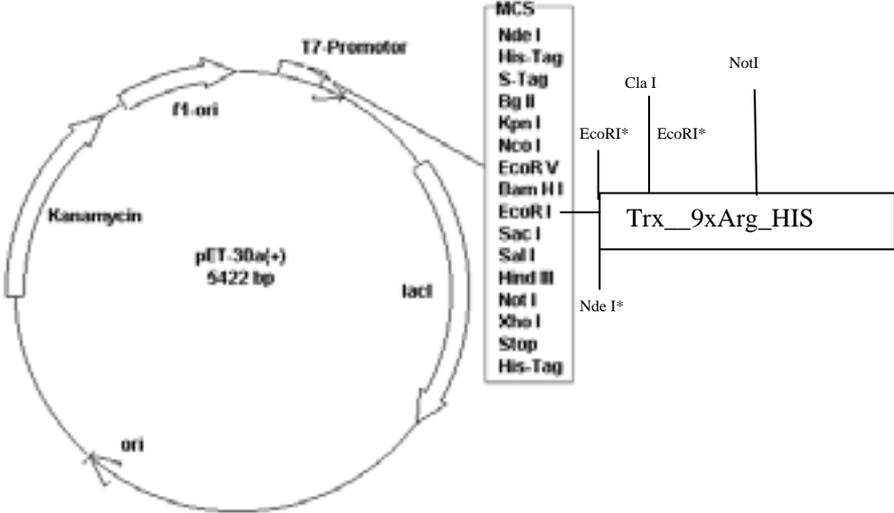
Baitvektor: pPC97 EGFR KDI



Preyvektor pAD Trx-Pep-Library



pET 30 Trx-9R



Lebenslauf

Name	Claudia Bürger
Geburtsdatum und –ort	23. November 1973, Hilden
Familienstand	Ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch
<hr/>	
Schulausbildung	Katholische Grundschule Zur Verlach, Hilden Städtisches Helmholtz Gymnasium, Hilden Juni 1993 Abitur
<hr/>	
Studium	Grundstudium Biologie an der Eberhardt-Karls-Universität Tübingen August 1995 Vordiplom Hauptstudium Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg November 1998 Diplom
<hr/>	
Diplomarbeit	Jan 1998-Okt 1998 Diplomarbeit in der Klinik für Tumorbiologie, Freiburg bei Prof.Dr. B. Groner „Charakterisierung der DNA-Bindungsdomäne von STAT5 und Ableitung einer dominant-negativ wirkenden Variante“
Doktorarbeit	Seit Dez 1998 am Georg-Speyer-Haus, Frankfurt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. B. Groner „Inhibition der Signaltransduktion des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) durch Peptid-Aptamere - Ein neuer Ansatz zur Krebstherapie“

Veröffentlichungen

Poster

Claudia Bürger, Kerstin Nagel-Wolfrum, Christian Kunz, Corinna Bähr, Ilka Wittig, Karin Butz, Felix Hoppe-Seyler and Bernd Groner (2002)
Inhibition of signal transduction with peptide aptamers- a new tool for cancer therapy
NGFN Meeting, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt

Claudia Bürger, Kerstin Nagel-Wolfrum, Christian Kunz, Ilka Wittig, Karin Butz, Felix Hoppe-Seyler and Bernd Groner (2002)
Screening of peptide aptamers specifically binding to the EGF receptor and their delivery into cancer cells – a potential for tumor therapy
Signal Transduction Meeting, EMBL, Heidelberg, Germany

Claudia Bürger, Kerstin Nagel-Wolfrum, Christian Kunz, Karin Butz, Felix Hoppe-Seyler and Bernd Groner (2001)
Screening of peptide aptamers specifically binding to the EGF receptor and their delivery into cancer cells – a potential for tumor therapy
STS-Meeting, Weimar, Germany

Claudia Bürger and Bernd Groner
Inhibition of ligand-induced activation of the EGF receptors by single chain antibody/laminin fusion proteins (1999)
FEBS summer school, Spetses, Greece

Vorträge

Juni 2002
Inhibition of signal transduction with peptide aptamers- a new tool for cancer therapy
NGFN Meeting, Frankfurt

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernd Groner für die Vergabe des interessanten Themas und für die Betreuung dieser Arbeit. Die hohe Diskussionsbereitschaft einerseits aber auch die Möglichkeit eigene Ideen zu verwirklichen, haben dazu beigetragen, dass sich eine im Labor neue Methode zu einem vielversprechenden Projekt entwickeln konnte.

Herrn Prof. Dr. Robert Tampé danke ich für die Betreuung der Arbeit von Seiten der Fakultät für Biochemie der Universität Frankfurt.

Corinna Bähr, Andrea Belaus, Nadine Böcher, Boris Brill, Christina Gewinner, Christian Kunz, Kerstin Nagel-Wolfrum und Carrie Shemanko danke ich für die nette und herzliche Atmosphäre im Labor. Die mittäglichen Italienerbesuche, sowie das abendliche Sekttrinken haben den Laborfrust sehr viel erträglicher gemacht. Ich habe mich in unserem Labor immer sehr wohlfühlt und ich werde Euch alle sehr vermissen.

Allen- auch den hier nicht persönlich genannten- gegenwärtigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Groner, sowie Mitarbeitern des gesamten Instituts, möchte ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die große Hilfs- und Diskussionsbereitschaft danken.

Vor allem Kerstin möchte ich für die perfekte Zusammenarbeit danken. Wer hätte gedacht, dass wir das Aptamer-Projekt doch noch einmal so gut ans Laufen bringen??!

Last but not least gilt mein Dank meiner Familie, meinen Freunden und Gunther. Ihr habt mich immer wieder aufgebaut, wenn der Frust mich gepackt hatte und mir gezeigt, dass es doch immer weiter geht.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Frankfurt am Main, den 24. September 2002

Claudia Bürger