

BestMasters

Lisa Oelschläger

Untersuchung des tumorrelevanten Proteins Survivin

Charakterisierung der Effekte
supramolekularer Liganden



Springer Spektrum

BestMasters

Mit „**BestMasters**“ zeichnet Springer die besten Masterarbeiten aus, die an renommierten Hochschulen in Deutschland, Österreich und der Schweiz entstanden sind. Die mit Höchstnote ausgezeichneten Arbeiten wurden durch Gutachter zur Veröffentlichung empfohlen und behandeln aktuelle Themen aus unterschiedlichen Fachgebieten der Naturwissenschaften, Psychologie, Technik und Wirtschaftswissenschaften. Die Reihe wendet sich an Praktiker und Wissenschaftler gleichermaßen und soll insbesondere auch Nachwuchswissenschaftlern Orientierung geben.

Springer awards “**BestMasters**” to the best master’s theses which have been completed at renowned Universities in Germany, Austria, and Switzerland. The studies received highest marks and were recommended for publication by supervisors. They address current issues from various fields of research in natural sciences, psychology, technology, and economics. The series addresses practitioners as well as scientists and, in particular, offers guidance for early stage researchers.

Weitere Bände in der Reihe <http://www.springer.com/series/13198>

Lisa Oelschläger

Untersuchung des tumorrelevanten Proteins Survivin

Charakterisierung der Effekte
supramolekularer Liganden

 Springer Spektrum

Lisa Oelschläger
Essen, Deutschland

ISSN 2625-3577

ISSN 2625-3615 (electronic)

BestMasters

ISBN 978-3-658-27191-6

ISBN 978-3-658-27192-3 (eBook)

<https://doi.org/10.1007/978-3-658-27192-3>

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Springer Spektrum

© Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH, ein Teil von Springer Nature 2019

Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsgesetz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlags. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Die Wiedergabe von allgemein beschreibenden Bezeichnungen, Marken, Unternehmensnamen etc. in diesem Werk bedeutet nicht, dass diese frei durch jedermann benutzt werden dürfen. Die Berechtigung zur Benutzung unterliegt, auch ohne gesonderten Hinweis hierzu, den Regeln des Markenrechts. Die Rechte des jeweiligen Zeicheninhabers sind zu beachten.

Der Verlag, die Autoren und die Herausgeber gehen davon aus, dass die Angaben und Informationen in diesem Werk zum Zeitpunkt der Veröffentlichung vollständig und korrekt sind. Weder der Verlag, noch die Autoren oder die Herausgeber übernehmen, ausdrücklich oder implizit, Gewähr für den Inhalt des Werkes, etwaige Fehler oder Äußerungen. Der Verlag bleibt im Hinblick auf geografische Zuordnungen und Gebietsbezeichnungen in veröffentlichten Karten und Institutionsadressen neutral.

Springer Spektrum ist ein Imprint der eingetragenen Gesellschaft Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH und ist ein Teil von Springer Nature

Die Anschrift der Gesellschaft ist: Abraham-Lincoln-Str. 46, 65189 Wiesbaden, Germany

Vorwort

Nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist Krebs die häufigste Todesursache weltweit. Liegt in Geweben ein Ungleichgewicht zwischen Zellproliferation und Apoptose vor, führt dies zum Tumorwachstum. Eine mögliche Ursache für die Störung der Homöostase ist die vermehrte Expression zytoprotektiver Proteine, wie z.B. die Apoptose-Inhibitor-Proteine (*inhibitor of apoptosis protein*, IAP), was meist mit Resistenzen gegenüber zytotoxischen Tumorthérapien und schlechteren Prognosen verbunden ist. Survivin ist in nahezu allen malignen Tumorerkrankungen überexprimiert. Die Überexpression von Survivin wird mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemo- und Bestrahlungstherapie, einem schnelleren Fortschreiten der Erkrankung und einer geringeren Überlebensrate assoziiert. Als IAP hemmt Survivin den Zelltod und als Teil des CPCs (*chromosomal passenger complex*) ist es an der Regulation der Mitose beteiligt. Für beide biologischen Funktionen ist eine Interaktion des Kernexportrezeptors Crm1 (*chromosome maintenance region 1*) mit dem Kernexportsignal (*nuclear export signal*, NES) von Survivin essentiell. Eine gezielte Inhibition der Survivin-Crm1-Interaktion stellt einen neuen Ansatz für die Krebstherapie dar und soll zum Funktionsverlust von Survivin und damit zur Hemmung der Proliferation von Krebszellen führen. Es wurden bereits Inhibitoren des Exportrezeptors Crm1 identifiziert, jedoch sind diese zwar selektiv, aber nicht spezifisch für Survivin, da sie ebenfalls die Interaktion zwischen Crm1 und anderen Frachtproteinen stören. Supramolekulare Liganden stellen aufgrund ihrer hohen Affinität gegenüber oberflächenexponierten Lysin- und Arginin-Seitenketten einen neuen Ansatzpunkt dar, um das NES von Survivin zu binden und so die Interaktion mit Crm1 zu verhindern.

In dieser Arbeit wurden die Effekte der unmodifizierten Diphosphat-Pinzette sowie der Peptid-modifizierten Pinzetten (ELTL- und ELTLGEFL-Pinzette) auf die Bildung des Exportkomplexes aus Survivin und Crm1 analysiert. Mittels Pulldown-Experimenten konnten inhibitorische Effekte der molekularen Pinzetten *in vitro* nachgewiesen werden. Der Stärke der Inhibition stieg mit Zunahme der Peptid-Länge, was zeigte, dass die Peptid-Modifikationen die Affinität und Spezifität der molekularen Pinzetten gegenüber Survivin erhöhen. Zusätzlich konnte die zelluläre Aufnahme der TAMRA-gekoppelten Diphosphat-Pinzetten, die in Vesikel-ähnlichen Strukturen akkumulieren, bestätigt werden. Die erfolgreiche Etablierung eines zellbasierten Biosensor-Assay dient als Grundlage für weiterführende *in vivo* Analysen der molekularen Pinzetten.

Durch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass zwar die Affinität und Spezifität sowie die zelluläre Verfügbarkeit der molekularen Pinzetten noch weiter verbessert werden müssen, die supramolekularen Liganden aber bereits jetzt einen äußerst wirksamen inhibitorischen Effekt auf die Survivin-Crm1-Interaktion aufweisen und somit einen vielversprechenden neuen Ansatz in der Krebstherapie darstellen.

Lisa Oelschläger

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Krebs	1
1.2	Survivin.....	2
1.2.1	Struktur und Funktion.....	3
1.3	Kern-Zytoplasma-Transport.....	5
1.3.1	GTPase Ran-abhängiger Kern-Zytoplasma-Transport	6
1.3.2	Crm1-abhängiger Kernexport.....	7
1.4	Molekulare Pinzetten – Lysin- und Arginin-spezifische supramolekulare Liganden.....	8
1.5	Ziel der Arbeit	11
2	Material	13
2.1	Zelllinien	13
2.2	Zellkulturmedium	13
2.3	<i>E. coli</i> Bakterien.....	13
2.4	Bakterienmedien.....	13
2.5	Antibiotika	14
2.6	Plasmide.....	14
2.7	Primer.....	15
2.8	Größenstandards.....	15
2.9	Antikörper	16
2.10	Kits	16
2.11	Chemikalien.....	16
2.12	Enzyme und Puffer	17
2.13	Geräte	19
2.14	Verbrauchsmaterialien.....	21
2.15	Software	22
3	Methoden	23
3.1	Molekularbiologische Methoden	23
3.1.1	Polymerasekettenreaktion.....	23
3.1.2	Agarosegelelektrophorese	23
3.1.3	Reinigung von DNA-Fragmenten.....	24
3.1.4	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	24

3.1.5	Restriktion	24
3.1.6	Ligation	25
3.1.7	Sequenzierung.....	25
3.2	Mikrobiologische Methoden.....	25
3.2.1	Transformation in chemisch kompetente <i>E. coli</i> Bakterien.....	25
3.2.2	Langfristige Lagerung transformierter <i>E. coli</i> Bakterien	25
3.2.3	Proteinexpression in <i>E. coli</i> Bakterien.....	26
3.2.4	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> Bakterien	26
3.2.5	Photometrische Bestimmung der optischen Dichte.....	26
3.3	Proteinbiochemische Methoden	26
3.3.1	Reinigung von rekombinanten His-Fusionsproteinen.....	26
3.3.2	Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration	28
3.3.3	SDS-PAGE	28
3.3.4	Coomassie-Färbung der Polyacrylamidgele	29
3.3.5	Western Blot	30
3.3.6	His-Tag Pulldown-Assay.....	31
3.4	Zellbiologische Methoden.....	31
3.4.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	31
3.4.2	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen	32
3.4.3	Herstellung von Zelllysaten.....	32
3.4.4	Immunfluoreszenzfärbung.....	33
3.4.5	Biosensor Assay	33
3.4.6	Behandlung von eukaryotischen Zellen mit den TAMRA-gekoppelten Pinzetten.....	34
3.4.7	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	34
4	Ergebnisse	35
4.1	Analyse der Bildung des Exportkomplexes <i>in vitro</i>	35
4.1.1	Reinigung von rekombinantem His-Survivin	35
4.1.2	Effekte der supramolekularen Liganden auf die Bildung des Export- komplexes.....	37
4.2	Untersuchung der zellulären Exportaktivität von Survivin.....	38
4.2.1	Biosensor-Assay	38
4.2.2	Zelluläre Aufnahme der supramolekularen Liganden.....	43