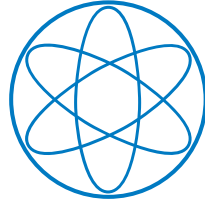


PHYSIK-DEPARTMENT



**Zeitaufgelöste Interaktionsanalyse des  
humanen Transkriptionsfaktors FOXP2**

Dissertation von

**Katharina Häußermann**



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN





Physik-Department der Technischen Universität München  
Labor für Biomolekulare Nanotechnologie

Zeitaufgelöste Interaktionsanalyse des humanen  
Transkriptionsfaktors FOXP2

Katharina Häußermann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin Zacharias

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Hendrik Dietz

2. Prof. Dr. Friedrich Simmel

Die Dissertation wurde am 29.03.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 07.05.2018 angenommen.



# Abstract

The human transcription factor forkhead box protein P2 (FOXP2) plays an important role in the development of human language and speech. A mutation (R553H) in its eponymic forkhead domain destroys the function of the transcription factor and triggers a genetic speech and language disorder.

As a regulatory protein, FOXP2 is part of a large network of different transcription factors that control thousands of genes. Direct interaction with genomic DNA and interaction with other proteins is a prerequisite for FOXP2's correct function. These interactions are mediated by the DNA-binding forkhead domain, the C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-zinc finger and the leucine zipper. Although some information about the forkhead domain of FOXP2 is available, little is known about the other DNA-binding elements.

The aim of this work was to investigate the motifs and domains of FOXP2 regarding their DNA-binding ability without interfering influences of cellular binding partners. To this end, a protocol was established that allows the generation and purification of the transcription factor. Activity and functionality of the purified FOXP2 constructs were then tested in EMSA experiments. In order to characterize DNA-binding in terms of the contribution of motifs and domains, time-resolved interaction analyses were performed using the biochip-based switchSENSE<sup>®</sup> technology.

In the DNA interaction studies association rates ( $k_{\text{on}}$ ) of  $4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  to  $22 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  and dissociation rates ( $k_{\text{off}}$ ) of  $5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  to  $144 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  were measured for the protein constructs. The time-resolved experiments showed that the forkhead domain of FOXP2 is necessary for the binding and sequence-specific recognition of DNA. If only the forkhead domain was available for DNA-binding, a dissociation constant of 360 nM was measured. In presence of the zinc finger the affinity to DNA was increased by one order of magnitude (16 nM). The leucine zipper was found to be required for high-affinity DNA-binding. For the construct that contained a leucine zipper in addition to the forkhead domain a dissociation constant of 2 nM was measured. The additional zinc finger in turn did not further increase the affinity towards DNA, so that the dissociation constant measured was in the nano molar range as well (4 nM). The amino acid substitution A539P, which prevents domain swapping in the forkhead domain, showed no effect on the DNA-binding behavior of FOXP2 at the protein concentrations we used. Furthermore, the interaction of FOXP2 with itself was visualized in concentration- and time-dependent DNA biochip studies.



# Zusammenfassung

Der humane Transkriptionsfaktor Forkhead Box Protein P2 (FOXP2) spielt in der Entwicklung menschlicher Sprache eine bedeutende Rolle. Durch eine Mutation (R553H) in seiner namensgebenden Forkhead-Domäne wird die Funktionsfähigkeit des Transkriptionsfaktors zerstört und eine genetisch bedingte Sprach- und Sprechstörung ausgelöst.

Als regulatorisches Protein ist FOXP2 in ein großes Netzwerk verschiedener Transkriptionsfaktoren eingebunden, die tausende Gene kontrollieren. Die direkte Interaktion mit genomischer DNA sowie die Interaktion mit anderen Proteinen ist Voraussetzung für die korrekte Wirkungsweise von FOXP2. Vermittelt werden diese Interaktionen durch die DNA-bindende Forkhead-Domäne, den C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger und den Leucin-Zipper. Obwohl über die Forkhead-Domäne von FOXP2 einiges bekannt ist, so gibt es nur wenig Information zu den anderen DNA-bindenden Elementen.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Motive und Domänen von FOXP2 hinsichtlich ihrer DNA-Bindefähigkeit ohne den störenden Einfluss zellulärer Bindungspartner. Dafür wurde ein Protokoll etabliert, das die Herstellung und Aufreinigung des Transkriptionsfaktors erlaubt. Aktivität und Funktionalität der aufgereinigten FOXP2-Konstrukte wurden in EMSA-Experimenten überprüft. Mit Hilfe der biochipbasierten switchSENSE®-Technologie wurden zeitaufgelöste Interaktionsanalysen durchgeführt, um die DNA-Bindung hinsichtlich der geleisteten Beiträge der Motive und Domänen zu charakterisieren.

In den DNA-Interaktionsstudien konnten für die Proteinkonstrukte Assoziationsraten ( $k_{\text{on}}$ ) von  $4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  bis  $22 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und Dissoziationsraten ( $k_{\text{off}}$ ) von  $5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  bis  $144 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  gemessen werden. Die zeitaufgelösten Experimente zeigten, dass die Forkhead-Domäne von FOXP2 für die Bindung und sequenzspezifische Erkennung der DNA notwendig ist. Stand FOXP2 nur die Forkhead-Domäne zur DNA-Bindung zur Verfügung, so wurde eine Dissoziationskonstante von 360 nM gemessen. Durch den Zinkfinger konnte die Affinität zur DNA um eine Größenordnung gesteigert werden (16 nM). Der Leucin-Zipper war für hochaffine DNA-Bindung unabdingbar. Für das Konstrukt, das neben der Forkhead-Domäne noch einen Leucin-Zipper enthielt, wurde eine Dissoziationskonstante von 2 nM gemessen. Der Zinkfinger wiederum verstärkte diese bereits hochaffine DNA-Bindung nicht weiter, sodass ebenfalls eine Dissoziationskonstante im nanomolaren Bereich gemessen wurde (4 nM). Die Aminosäuresubstitution A539P, die *Domain Swapping* in der Forkhead-Domäne unterbindet, zeigte bei den von uns verwendeten Proteinkonzentrationen keinen Effekt auf das DNA-Bindevverhalten von FOXP2. In konzentrations- und zeitabhängigen DNA-Biochipstudien konnte außerdem Interaktion von FOXP2 mit sich selbst sichtbar gemacht werden.





# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Entdeckung des „Sprachgens“ <i>FOXP2</i> . . . . .	1
1.2	Evolutionsbiologischer Hintergrund von <i>FOXP2</i> . . . . .	2
1.3	Motive und Domänen von humanem <i>FOXP2</i> . . . . .	3
1.3.1	Polyglutaminreiche Region . . . . .	3
1.3.2	Zinkfinger . . . . .	5
1.3.3	Leucin-Zipper . . . . .	6
1.3.4	Forkhead-Domäne . . . . .	7
1.4	Motivation und Zielsetzung . . . . .	10
<b>2</b>	<b>Herstellung, Aufreinigung und Funktionsanalyse von humanem <i>FOXP2</i></b>	<b>13</b>
2.1	Expression von humanem <i>FOXP2</i> in einem bakteriellen System . . . . .	13
2.2	Aufreinigung von <i>FOXP2</i> unter nativen Bedingungen . . . . .	17
2.2.1	Strategie der dualen Affinitätschromatographie . . . . .	17
2.2.2	Spezifität und Selektivität der DNA-Bindung . . . . .	27
2.2.3	Sterische Hinderung durch GFP bei der DNA-Bindung . . . . .	29
2.3	Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen . . . . .	31
2.3.1	Spezifität der DNA-Bindung rückgefalteter Proteine . . . . .	34
2.4	Proteinkurzkonstrukte von humanem <i>FOXP2</i> . . . . .	37
2.4.1	Interaktionsanalyse mittels EMSA . . . . .	38
2.5	Zusammenfassung Kapitel 2 . . . . .	40
<b>3</b>	<b>DNA-biochipbasierte Interaktionsstudien</b>	<b>41</b>
3.1	Das switchSENSE®-Prinzip . . . . .	41
3.1.1	Switching Mode . . . . .	43
3.1.2	Fluorescence Proximity Sensing Mode . . . . .	46
3.1.3	Theorie der Bindung von gelösten Analyten an oberflächengebundene Liganden . . . . .	47
3.1.4	Versuchsablauf einer switchSENSE®-Messung . . . . .	52
3.2	Initiale Messungen auf dem switchSENSE®-Biochip . . . . .	54
3.2.1	Optimierung der Experimentbedingungen . . . . .	54

3.2.2	Zweifarbmessungen zeigen Sensitivität auf . . . . .	57
3.2.3	Spezifität der DNA-Bindung im FPS-Modus . . . . .	59
3.2.4	Reproduzierbarkeit von Messungen verschiedener Proteinpräparationen . . . . .	60
3.2.5	Sind die Messungen durch Massentransport limitiert? . . . . .	61
3.3	Beitrag von Motiven und Domänen von FOXP2 zur DNA-Bindung . . . . .	62
3.3.1	Charakterisierung der FOXP2-DNA Interaktion . . . . .	62
3.3.2	Konzentrationsabhängige Bindung und Analyse der Bindungsaffinität . . . . .	68
3.4	Serielle Konzentrationsmessung von K271 . . . . .	72
3.5	Konzentrations- und zeitabhängige Messreihen . . . . .	74
3.5.1	K271-Konstrukt . . . . .	76
3.5.2	LZK-Konstrukt . . . . .	85
3.5.3	V503-Konstrukt . . . . .	87
3.6	Zusammenfassung Kapitel 3 . . . . .	88
<b>4</b>	<b>Diskussion und Ausblick</b>	<b>89</b>
<b>A</b>	<b>Ergänzende Daten</b>	<b>95</b>
A.1	Kurzprotokoll zur Herstellung von humanem FOXP2 (engl.) . . . . .	95
A.2	DNA-biochipbasierte Interaktionsstudien . . . . .	100
<b>B</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>105</b>
B.1	Puffer und Stocklösungen . . . . .	105
B.2	Methoden . . . . .	109
<b>C</b>	<b>Sequenzen</b>	<b>113</b>
C.1	DNA-Sequenzen . . . . .	114
C.2	Protein-Sequenzen . . . . .	118
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>119</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>135</b>

# Kapitel 1

## Einleitung

Das menschliche Genom im Zellkern umfasst mehr als 3.2 Milliarden DNA-Basenpaare, aufgeteilt auf 24 Chromosomen, die selbst wiederum 50 Millionen bis 260 Millionen DNA-Basenpaare umfassen und für insgesamt ungefähr 20.000 humane Proteine kodieren [1, 2]. Regulatorische Proteine, auch Transkriptionsfaktoren (TFs) genannt, sind in der Lage aus dieser großen Vielfalt an DNA-Sequenzen ihre potenziell richtige Bindestelle auszuwählen und ortsspezifisch die transkriptionelle Aktivität von RNA-Polymerasen zu beeinflussen [3–6]. Das Verständnis molekularer Mechanismen mit denen regulatorische Proteine ihre spezifischen Bindestellen, die in genomischer DNA kodiert und auf der transkriptionelle Regulationswege aufgebaut sind, selektiv erkennen, stellt eines der zentralen, seit langem bestehenden Probleme der molekularen Biophysik dar [7, 8].

### 1.1 Entdeckung des „Sprachgens“ *FOXP2*

Forkhead Box Protein P2 (*FOXP2*) ist einer dieser humanen Transkriptionsfaktoren. *FOXP2* ist an der Regulierung der Genexpression wichtiger entwicklungsbiologischer Prozesse beteiligt [9–15]. Besonderes Interesse an humanem *FOXP2* wurde im Jahr 1989 geweckt, als in Großbritannien eine Familie mit genetisch bedingter Sprach- und Sprechstörung entdeckt wurde [16, 17].

Die Hälfte der 32 Familienmitglieder hatte Schwierigkeiten sich zu artikulieren und Probleme beim Formulieren und Verstehen von Sprache [16–21]. Betroffene Individuen (männlich und weiblich) bei denen die schwere Sprach- und Sprechstörung, genannt Verbale Entwicklungsdyspraxie (VED), diagnostiziert wurde, zeigten zusätzlich Symptome einer Orofazialen Dyspraxie [18], mit defiziten im Sprachverständnis und einer Beeinträchtigung der willkürlichen Steuerung der Gesichtsmuskulatur, die für eine korrekte Artikulation unerlässlich ist.

In den betroffenen Individuen ist nur ein einziges Gen, das autosomal-dominant vererbt wird, verändert [20–22]. Dabei handelt es sich um eine Punktmutation in einer kleinen Region des Chromosoms 7 (7q31). Das betroffene Gen wurde ursprünglich, wegen seiner Beteiligung in der Entwicklung menschlicher Sprache, mit dem Kürzel *SPCH1* (von

*Speech 1*) versehen [23]. Nachdem ersichtlich wurde, dass Teile der kodierenden Sequenz starke Ähnlichkeit mit der charakteristischen DNA-bindenden Domäne der Forkhead-Box (FOX)-Transkriptionsfaktoren aufweist [24, 25], wurde das Gen gemäß der für die schnell wachsende Genfamilie vorgeschlagenen Standardnomenklatur in *FOXP2* umbenannt [21]. Die die Sprach- und Sprechstörung auslösende Punktmutation zerstört die Funktionsfähigkeit des humanen Transkriptionsfaktors offensichtlich dermaßen, dass schwere Veränderungen in Großhirnrinde, Thalamus und Striatum, die an der Bildung von Sprache beteiligt sind, die Konsequenz sind [15, 26–28].

## 1.2 Evolutionsbiologischer Hintergrund von FOXP2

Obwohl die Fähigkeit zu sprechen als ein besonderes Merkmal des modernen Menschen *Homo sapiens sapiens* angesehen wird, ist das *FOXP2*-Gen jedoch auch evolutionsbiologisch von großer Relevanz. Tatsächlich gehört *FOXP2* zu den 5% am höchsten konservierten Genen bei Säugetieren, weshalb sich das menschliche FOXP2-Protein nur minimal von denen anderer Säugetiere unterscheidet. Die starke Konservierung und die hohe Expressionsrate in einigen Regionen des fetalen Gehirns weisen auf eine wichtige Rolle in der Entwicklung hin [9, 10, 21, 29].

Humanes FOXP2-Protein weist im Vergleich zu FoxP2-Proteinen von Menschenaffen (Rhesusaffe, Schimpanse und Gorilla), die untereinander identisch sind, nur zwei Aminosäuresubstitutionen (T303N und N325S) auf [9, 10, 30]. Veränderungen zwischen FOXP2 im Menschen und Foxp2 in Mäusen summieren sich auf gerade einmal drei Aminosäuresubstitutionen (D80E, T303N, N325S)<sup>1</sup>. Ferner konnten auch in Wirbeltieren wie Reptilien, Fischen, Fledermäusen und Singvögeln Orthologe FoxP2-Proteine nachgewiesen werden [31–33]. Das FOXP2 nicht nur im *Homo sapiens sapiens* in der Entwicklung neuronaler Mechanismen erlernter Sprachkommunikation involviert ist, zeigt eine Studie an Zebrafinken. Zebrafinken gehören zur Gattung der Singvögel, die normalerweise das Singen von adulten Tutorvögeln erlernen. Doch nach Knockdown des *FoxP2*-Gens waren sie nicht mehr in der Lage den Gesang der Erwachsenen zu imitieren bzw. korrekt wiederzugeben [31, 34, 35].

Im Jahr 2009 erschien eine prominente Studie zu FOXP2 in der Wolfgang Enard und seine Kollegen zeigen konnten, dass transgene Mäuse (*Foxp*<sup>hum/hum</sup>), die die menschliche Kopie des *FOXP2*-Gens exprimierten, eine Veränderung der Rufe im Ultraschallbereich aufwiesen, nachdem sie aus dem elterlichen Nest entfernt wurden [15]. Interessanterweise konnte in einer Folgestudie gezeigt werden, dass die „humanisierten“ Mäuse hinsichtlich der prozeduralen Lernfähigkeit (umfasst Fertigkeiten, die automatisch, ohne Nachdenken eingesetzt werden) ihren Wildtyp-Artgenossen stark überlegen waren [36].

Mittlerweile ist bekannt, dass der humane Transkriptionsfaktor FOXP2 jedoch nicht nur an neuronaler Entwicklung beteiligt ist, sondern auch während der Embryonalentwicklung in definierten Regionen anderer Gewebe wie Lunge, Darm und Herz exprimiert wird [11]. FOXP2 ist dort jeweils in ein großes Netzwerk verschiedener Transkriptionsfaktoren eingebunden, die das Ablesen von Genen kontrollieren [29, 37–40]. Es wird angenommen, dass

<sup>1</sup>Der Polyglutamintrakt wird hierbei nicht berücksichtigt, da dieser in verschiedenen Spezies generell stark variiert.

FOXP2 so in die transkriptionelle Regulation tausender Gene direkt involviert ist [12, 13]. In den meisten Fällen dient FOXP2 dabei als Repressor, aber in einigen Fällen konnte auch gezeigt werden, dass FOXP2 die Genexpression hochreguliert [12–14, 41].

Zum Interaktom von FOXP2 zählen unter anderem auch dessen Paraloge FOXP1 und FOXP4, die zusammen mit FOXP3 zur Subfamilie der FOXP-Proteine gehören und konserviert sind. FOXP1, FOXP2 und FOXP4 weisen eine Sequenzidentität von 55–65% auf und können sowohl Homo- als auch Heterodimere ausbilden. Räumliche und zeitliche Überlappung der Expressionsmuster von FOXP-Proteinen zeugen überdies davon, dass sie bei der Regulation bestimmter Gruppen von Zielgenen zusammenarbeiten können [39, 41–44]. Strukturell divergent ist hingegen ein weiterer Vertreter der FOXP-Familie, FOXP3. Seine Expression beschränkt sich auf regulatorische T-Lymphozyten während der Immunantwort [44].

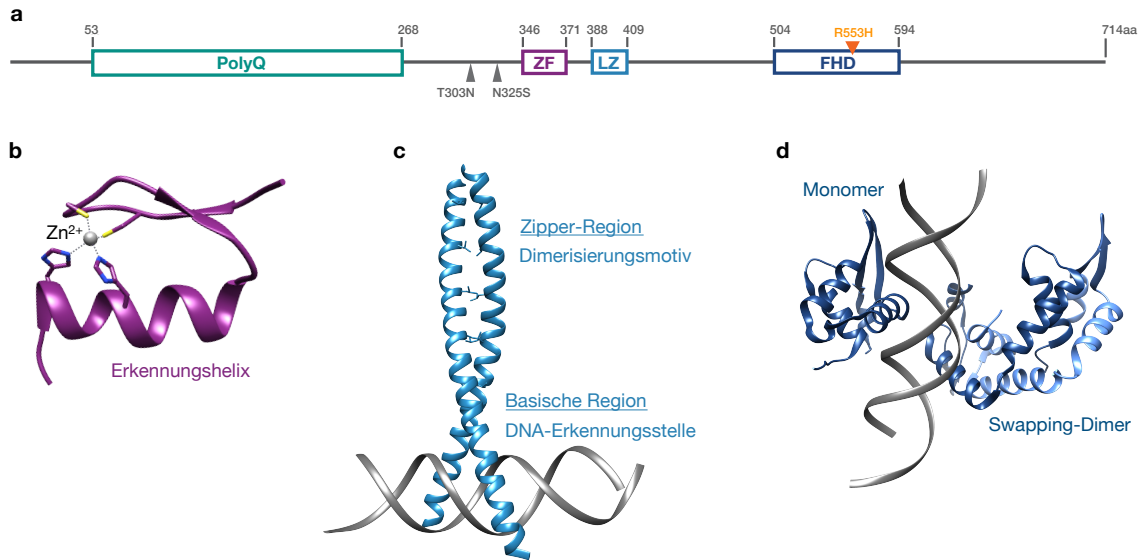
### 1.3 Motive und Domänen von humanem FOXP2

Das *FOXP2*-Gen kodiert im Menschen für ein 714 Aminosäuren langes Protein, das neben der Forkhead-Domäne noch mehrere anhand seiner Primärstruktur klar erkennbare Motive und Domänen aufweist. So lassen sich eine polyglutaminreiche Region, ein C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger und ein Leucin-Zipper identifizieren (Abb. 1.1). Die einzelnen Motive und Domänen, die der humane Transkriptionsfaktor FOXP2 enthält, sollen im Folgenden hinsichtlich des derzeitigen Forschungsstands von FOXP2 speziell betrachtet werden.

#### 1.3.1 Polyglutaminreiche Region

Die polyglutaminreiche Region von humanem FOXP2 zieht sich von Aminosäure 53 bis 268 (Abb. 1.1a) und enthält einen Abschnitt der 40 Glutamine aufweist, die ununterbrochen hintereinander liegen. Das macht FOXP2 in Bezug auf die natürlich vorkommende Länge der Polyglutamininkette zum absoluten Spitzenreiter unter den Polyglutamin (PolyQ)-proteinen im menschlichen Proteom (vgl. Huntingtin (HTT) mit 23 natürlich vorkommenden Qs) [45, 46].

PolyQ-Proteine sind nach dem Stand des Wissens auf Funktionen im Zusammenhang mit transkriptioneller Regulation und nuklearer Lokalisation ausgerichtet. Gut untersuchte Transkriptionsfaktoren wie TBP (TATA-Box-Bindeprotein) oder CREB (*cAMP Response Element Binding Protein*) gehören zur Familie der PolyQ-Proteine, aber die wohl prominentesten Vertreter sind im Menschen in die Entstehung erblicher, neurodegenerativer Erkrankungen des Gehirns involviert und rufen in Folge dessen negative Assoziationen hervor [50–52]. Zu den bekanntesten Genen, welche Polyglutamin-bzw. Trinukleotid-Repeat-Erkrankungen verantworten, zählen neben *Huntingtin (HTT)* noch verschiedene Ataxine (*ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3* und *ATXN7*). Als Auslöser der durch sie verursachten neurodegenerativen Erkrankungen gilt eine unnatürliche Verlängerung des Glutamintraktes bis hin zu einem pathogenen Schwellenwert, der von Gen zu Gen unterschiedlich ist [45]. Zum Problem für den Organismus werden die pathogenen Proteine, da sie falsch falten und aufgrund dessen aggregieren können. Veränderte subzelluläre Lokalisierung und



**Abbildung 1.1 – Humanes Forkhead Box Protein P2.** (a) Schematische Darstellung der Primärstruktur von humanem FOXP2. Information hinsichtlich der Proteinsequenz sind der Datenbank UniProt Knowledgebase (<http://www.uniprot.org>) entnommen [Eingang O15409-1; FOXP2\_HUMAN]. Erkennbar sind die polyglutaminreiche Region (polyQ, petrol), der C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger (ZF, lila), der Leucin-Zipper (LZ, hellblau) sowie die Forkhead-Domäne (FHD, nachtblau). Aminosäuresubstitutionen der humanen Abstammungslinie sind in grau (T303N und N325S) und die mit der Verbalen Entwicklungsdyspraxie verknüpfte Punktmutation (R553H) in orange angegeben. (b) Struktur eines repräsentativen C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfingers (Zif268, 1a11.pdb [47]). (c) Struktur einer repräsentativen bZIP-Domäne (1FOS, 1fos.pdb [48]), auch Leucin-Zipper genannt. (d) Kristallstruktur der Forkhead-Domäne von FOXP2 (2a07.pdb [49]). Übernommen und adaptiert mit Genehmigung von [47–49].

abnorme Interaktionen mit anderen zellulären Proteinen sind die Folge. Die Zelle versucht die fehlerhaft gefalteten Proteine abzubauen, sobald dies nicht mehr gelingt, kommt es zu Einschlüssen der Aggregate (*Inclusion Bodies*) im Zytoplasma oder Zellkern [53]. Ist die Erkrankung weiter fortgeschritten kommt es zu Ablagerungen, sogenannten Plaques, die die Funktion des Gehirns massiv beeinträchtigen. Organismen, denen es an Abbaumechanismen für Proteinaggregate mangelt, vertragen keine Polyglutamin-Proteine. Dies könnte erklären, warum die Proteome von Bakterien und Archaea typischerweise keine Proteine mit Polyglutamintrakt (PolyQ-Trakt) enthalten [54].

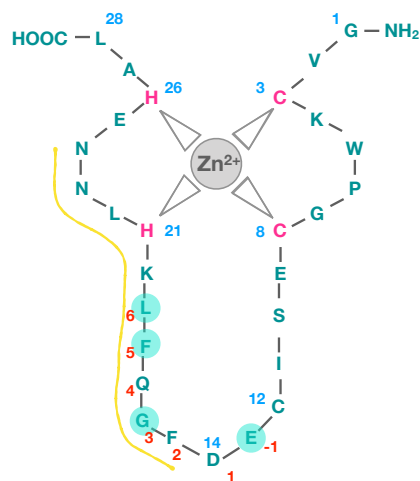
Trotz seines langen PolyQ-Trakts gibt es keine neurodegenerative Erkrankung, die mit FOXP2 selbst in Verbindung gebracht wird. Tatsächlich weist der Polyglutaminstretch von FOXP2 eine geringe Varianz auf, da die Wiederholung der CAG-Triplets durch einzelne CAA-Codons unterbrochen ist [45, 54].

Obwohl FOXP2 selbst keine neurodegenerative Trinukleotid-Repeat-Erkrankung verursacht, konnte gezeigt werden, dass sich in Mäusen mit mutiertem *Huntingtin* (*mHTT*), die also Chorea Huntington (Huntington's Disease, HD) entwickeln, *Foxp2* verstärkt in unlöslichen *mHTT*-Aggregaten ansammelt. Die Überexpression von *Foxp2* hingegen konnte die HD-assoziierten Verhaltensdefizite der Mäuse heilen, wohingegen eine Reduzierung von *Foxp2* HD-assoziierte Verhaltensphänotypen in den Mäusen gefördert hat. Auch in

Proben, die post-mortem aus HD-Patienten entnommen wurden, konnte ein verringertes Level an löslichem FOXP2 im Vergleich zu gesunden Patienten detektiert werden [55]. War man früher der Meinung, dass es sich bei Polyglutamintrakten um Regionen mit geringer Komplexität (d.h. unstrukturierte Regionen) handelt, so ist man sich mittlerweile sicher, dass die Polyglutaminketten vielmehr  $\alpha$ -helikale Strukturen ausbilden. Diese können wiederum durch die Bildung von Coiled-Coil-Domänen Protein-Protein-Interaktionen und Multimerisierung vermitteln [54, 56–58].

### 1.3.2 Zinkfinger

Zinkfinger sind kleine strukturelle Elemente in Proteinen, die Interaktion zwischen Proteinen und DNA, RNA oder anderen Proteinen vermitteln [59–61]. Der in humanem FOXP2 enthaltene Zinkfinger (Abb. 1.1a) gehört zur Klasse der  $C_2H_2$ -Zinkfinger, die auch als „*classic zincfinger*“ bezeichnet werden und das häufigste Proteinmotiv im Proteom von Säugetieren sind [47, 59, 62–64]. Fast die Hälfte aller im menschlichen Genom vorkommenden Transkriptionsfaktoren gehören dieser Klasse an. Im Genom von *Escherichia coli* hingegen sind keine Gene enthalten, die für Zinkfingerproteine kodieren [62].



**Abbildung 1.2 –  $C_2H_2$ -Zinkfinger des humanen FOXP2-Proteins.** Aminosäuresequenz des  $C_2H_2$ -Zinkfingers zur Illustration des Fingermotivs. Aminosäuren, die die Erkennungshelix ausbilden sind gelb gekennzeichnet. Die zur Interaktion mit den DNA-Basen wichtigen Aminosäuren in Position -1, 3, 5 und 6 sind grün unterlegt.

Im eukaryontischen Transkriptionsfaktoren zählt der  $C_2H_2$ -Zinkfinger zum am häufigsten vorkommenden DNA-Bindemotiv [63].  $C_2H_2$ -Zinkfingerproteine sind somit an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt, darunter Entwicklung, Rekombination und Chromatinregulation [65]. Designte Zinkfinger haben sich außerdem als wirkungsvolle Werkzeuge zur gezielten Regulation und Modifikation von Genen erwiesen, was sie interessant für die Entwicklung von Gentherapeutika macht [61, 66–73].

Im  $C_2H_2$ -Zinkfinger koordinieren je zwei Cysteine und zwei Histidine ein zweiwertiges Zink-Kation (Abb. 1.1b und Abb. 1.2). Das tetraedrisch koordinierte Zink-Ion stabilisiert dabei die ausgebildete, konservierte Tertiärstruktur aus zwei anti-parallelen  $\beta$ -Faltblättern und einer  $\alpha$ -Helix. Das Zink-Ion ist also für die Integrität der Raumstruktur verantwortlich und in der Regel nicht direkt an der Interaktion mit Bindungspartnern beteiligt.

Die  $\alpha$ -Helix, auch Erkennungshelix genannt, vermittelt die Bindung an DNA durch an ihrer Oberfläche befindliche Aminosäuren. Die  $\alpha$ -Helix legt sich so in die große Furche der DNA, dass ihre Aminosäuren, die in vier Schlüsselpositionen (-1, 3, 5 und 6) sitzen, mit den dort verfügbaren Nucleobasen interagieren (Abb. 1.2). Kontakte werden vorwiegend durch Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Kräfte ermöglicht. Die DNA-Bindung von Zinkfingern ist laut Literatur generell nur sehr schwach, dafür aber sequenzspezifisch [59, 62, 65, 74–76]. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass die

Dissoziationskonstante eines einzelnen Zinkfingers bei spezifischer Interaktion im Bereich von  $10^{-6}$  M liegt [76]. Typischerweise enthalten Proteine deshalb mehrere Zinkfinger, die linear miteinander verknüpft sind [59, 62, 65, 74, 75]. FOXP2 hingegen weist nur einen Zinkfinger auf.

Interessanterweise enthalten Zinkfinger nur eine sehr kleine Anzahl an voll konservierten Aminosäuren, zu denen die koordinierenden Reste Cystein und Histidin zählen. Die übrigen Positionen in der Konsensussequenz  $CX_{2-6}CX_{12}HX_{2-6}H$  können durch jegliche Aminosäure besetzt werden (dargestellt durch X). Durch die große Freiheit und Variabilität dieser Aminosäuren kann eine vielfältige Reihe an DNA-Sequenzen abgedeckt werden, die durch Zinkfinger erkannt und gebunden werden können. Obwohl es mit Hilfe von Online-Tools möglich ist anhand bekannter DNA-Sequenzen spezifisch-bindende Zinkfinger rational zu designen, so ist die umgekehrte Vorhersage der zu bindenden DNA-Sequenz beruhend auf der Aminosäuresequenz bisher nicht möglich [72, 77–79]. Über den Zinkfinger in humanem FOXP2 ist bis auf seine Aminosäuresequenz bisher nur sehr wenig bekannt (Abb. 1.2). Weder gibt es Informationen über die DNA-Sequenz, die er bindet, noch ob er Protein-Protein-Interaktionen vermittelt [60]. Einzig wurde in einem *in vivo* Hefe-Zwei-Hybrid-System gezeigt, dass die Entfernung des konservierten Zinkfingermotivs in Foxp2 keine nennenswerte Auswirkung auf die transkriptionelle Repression hatte und deshalb nicht zwingend erforderlich war [41].

### 1.3.3 Leucin-Zipper

Leucin-Zipper sind Proteindomänen, die ein Dimerisierungsmotiv (Zipper-Region) und eine stark geladene, basische DNA-Erkennungsstelle besitzen (Abb. 1.1c). Die Zipper-Region besteht aus jeweils zwei  $\alpha$ -Helices, die an jeder vierten und siebten Position (*Heptad Repeat*) eine hydrophobe Aminosäure besetzen. In den meisten Fällen bilden Leucine somit hydrophobe Bereiche aus, die dazu führen, dass sich die  $\alpha$ -Helices umeinander winden und Coiled-Coil-Strukturen ausbilden in denen die hydrophoben Interfaces im Inneren begraben werden [56, 80–82]. Leucin-Zipper sind folglich in der Lage durch Coiled-Coil-Motive homo- und heterotypische Protein-Protein-Interaktionen zu vermitteln.

Die Literatur zeigt indes für verschiedene Leucin-Zipper, dass die stark geladene basische Region hauptsächlich ungeordnet vorliegt und erst durch Kontakte mit der DNA eine  $\alpha$ -Helix ausgebildet wird [83–90]. Typischerweise binden so Homodimere eine aneinander grenzende palindromische DNA-Sequenz, Heterodimere hingegen können jegliche Kombination von DNA-Sequenzen binden [48, 82, 88, 91–95].

Inzwischen gibt es auch Hinweise darauf, dass die Assoziation von Leucin-Zippern an DNA nicht nur als Dimer sondern auch als Monomer möglich ist. Welcher Pfad der DNA-Anbindung eingeschlagen wird, hängt wie immer von den Konzentrationen der Bindungspartner ab. Ist die Dissoziationskonstante der Zipper-Dimerisierung eher hoch, so erkennen Zipper-Monomere die zu bindende DNA-Sequenz sequentiell, wobei die Dimerisierung anschließend an der DNA stattfindet. Leucin-Zipper können aber auch zuerst in Lösung dimerisieren und danach an DNA assoziieren [96, 97]. Für die Homo- und Heterodimerisierung verschiedener natürlicher Zipper-Motive in Abwesenheit von DNA liegen die



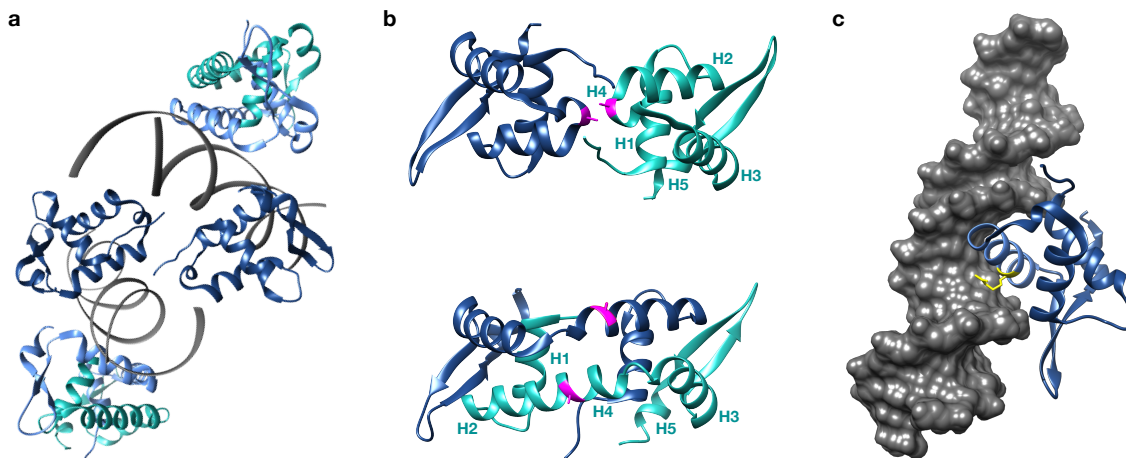
Dissoziationskonstanten bei ungefähr  $10^{-8}$  M [88, 90, 98, 99].

Über die genaue Funktion des Leucin-Zippers in humanem FOXP2 ist nicht viel bekannt. Trotzdem wird ihm eine bedeutende Rolle in der transkriptionellen Regulierung von Zielgenen zugeschrieben. Shanru Li und Kollegen konnten in der zuvor schon genannten *in vivo*-Studie im Hefe-Zwei-Hybrid-System nachweisen, dass der Leucin-Zipper von FOXP2 unentbehrlich für die Aktivität des Transkriptionsfaktors ist. Sie vermuteten außerdem, dass FOXP2 zur erfolgreichen DNA-Bindung dimerisieren muss [41]. Die FOXP-Proteine sind konserviert und so konnte in zellulärer Umgebung gezeigt werden, dass die co-exprimierten Paraloge FOXP1, FOXP2 und FOXP4 sowohl mit sich selbst als auch untereinander interagieren können [39–41, 58, 100, 101]. Tatsächlich wurden diese homo- und heterotypischen Interaktionen zerstört, sobald die konservierten Glutaminsäuren  $\Delta E388$ ,  $\Delta E399$  und  $\Delta E367$  in den Zipper-Regionen von FOXP1, FOXP2 bzw. FOXP4 eliminiert wurden [41]. Erst kürzlich wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen, dass die FoxP-Paraloge von Zebrafinken nicht nur Heterodimere, sondern auch Hetero-Oligomere ausbilden können [58]. Ferner konnte für aufgereinigtes FOXP3 gezeigt werden, dass es sich durch Zinkfinger und Leucin-Zipper unter anderem auch zu Homotetrameren zusammenschlagen kann. Die Deletion der konservierten Glutaminsäure  $\Delta E251$  in der Zipper-Region wiederum zerstörte dessen Fähigkeit zur Protein-Protein-Interaktion. FOXP3 lag nach Eliminierung der Aminosäure ausschließlich in monomerischer Form vor [102, 103].

#### 1.3.4 Forkhead-Domäne

Das am Besten untersuchte Segment von humanen FOXP2 und den FOXP-Paralogen ist ihre namensgebende Forkhead-Domäne [104]. Forkhead-Domänen sind Proteindomänen, deren Aufgabe die Vermittlung von DNA-Erkennung und Assoziation ist, weshalb sie häufig in Transkriptionsfaktoren existieren. Die Familie der Forkhead-Box (FOX)-Transkriptionsfaktoren reicht über ein breites Spektrum von Spezies (u. a. *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *D. melanogaster* etc.) bis hin zum *Homo sapiens sapiens* [105]. Dabei eint sie alle die hochkonservierte DNA-Bindedomäne, die ungefähr 90 Aminosäuren umfasst und in ein Helix-Turn-Helix-Motiv faltet [49]. Die meisten Forkhead-Transkriptionsfaktoren sind im Menschen zu finden (FOXA bis FOXR), wo sie an Prozessen wie Entwicklung, Stoffwechsel, Immunantwort, Krebs und Zellzykluskontrolle beteiligt sind [24, 25].

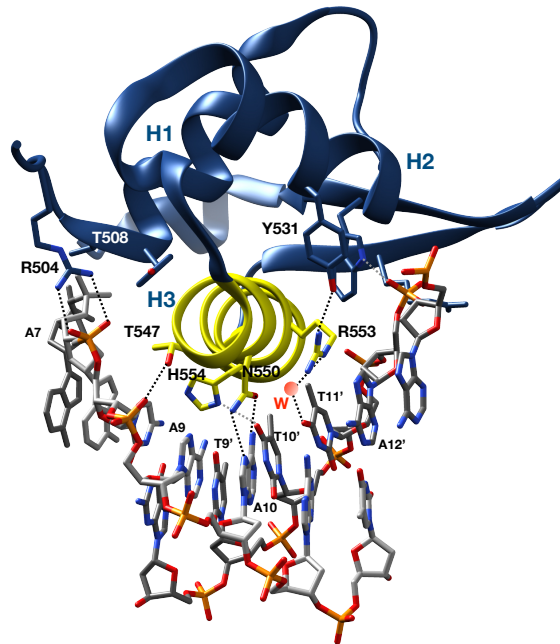
Im Jahr 2006 publizierten James Stroud und seine Kollegen eine Kristallstruktur, die die Forkhead-Domäne (FHD) von FOXP2 an DNA gebunden zeigt [49]. In der asymmetrischen Einheitszelle des Kristallgitters zeigten sich je zwei Kopien von identischen DNA-Segmenten und sechs FOXP2-FHDs. Zwei der FOXP2-Proteine lagen als Monomer vor und assoziierten jeweils fest an die doppelsträngige DNA, wohingegen vier weitere FHD-Monomere jeweils domänengetauschte Dimere (*Swapping Dimer*) ausbildeten (Abb. 1.3a). Obwohl Domänenumlagerung oftmals Artefakte in Proteinkristallen darstellen, scheint es sich im Falle von FOXP2 dennoch um ein adaptives Strukturmerkmal zu handeln. Indiz dafür ist, dass auch die FOXP2-Paraloge FOXP1, FOXP3 und FOXP4 zum *Domain Swapping* in der Forkhead-Domäne befähigt sind [49, 106, 107]. Die Fähigkeit der Forkhead-Domäne zu dimerisieren wird deshalb heute als charakteristische Besonderheit des FOXP-Zweigs anerkannt und grenzt diese von den übrigen FOX-Proteinen ab [49, 108, 109].



**Abbildung 1.3 – Struktur der Forkhead-Domäne von FOXP2.** 3D-Modelle basierend auf der Kristallstruktur (FOXP2, 2A07.pdb [49]). Moleküle sind in der Bänderdarstellung gezeigt. **(a)** Asymmetrische Einheitszelle mit sechs Kopien der FOXP2-FHD und zwei identischen Kopien der DNA-Segmente (grau). FHD-Monomere (dunkelblau) und domänengetauschte Dimere (grün und hellblau). **(b)** Domänen austausch von FOXP2-Monomeren wird durch Aminosäure Alanin in Position 539 (A539, pink) ermöglicht. Einzelne FHD-Monomere (oben) sind so positioniert, dass die erforderlichen Umlagerungen in den getauschten Dimeren (unten) der FHD illustriert werden konnten. **(c)** Das FHD-Monomer bindet via  $\alpha$ -Helix (hellblau) in die große Furche der DNA (grau, Oberflächendarstellung). Die in Patienten mit Sprech- und Sprachstörung mutierte Aminosäure Arginin in Position 553 (R553H), ist gelb angefärbt. Übernommen und adaptiert mit Genehmigung von [49].

Basierend auf Erkenntnissen aus der Kristallstruktur wurde außerdem vorgeschlagen, dass es humanem FOXP2 durch *Domain Swapping* in zellulärer Umgebung erlaubt sein könnte zwei entfernte Segmente auf einem DNA-Strang durch Schleifenbildung (*DNA Looping*) zusammen zu bringen [110]. Denkbar wäre aber auch die Verknüpfung von zwei DNA-Strängen, um interchromosomale Interaktionen oder sogar höhergeordnete Assemblierungen zu vermitteln [49]. Hinsichtlich dieses Aspekts wurde erst kürzlich eine Studie veröffentlicht, in der gezeigt wurde, dass die konservierten Homologe der Bäckerhefe *S. cerevisiae* Forkhead 1 (Fkh1) und Forkhead 2 (Fkh2) durch *Domain Swapping* in ihrer Forkhead-Domäne dimerisieren können und somit den Zeitpunkt der DNA-Replikation bzw. die räumliche Organisation der Chromosomen steuern [111].

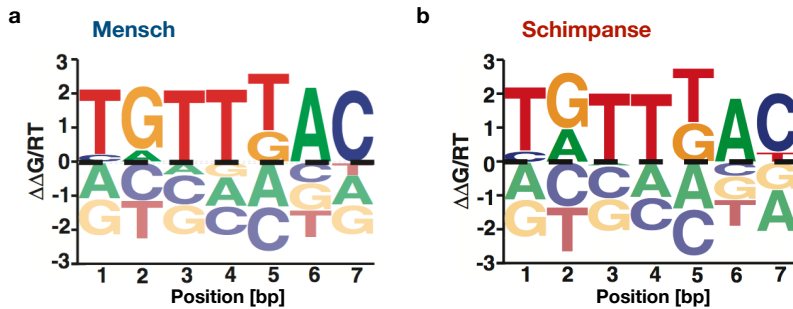
Ermöglicht wird *Domain Swapping* in der Forkhead-Domäne durch eine Substitution von Prolin (in den übrigen FOX-Proteinen) zu Alanin. Proline werden auch als „Helixbrecher“ bezeichnet, da sie sich häufig am Übergang einer  $\alpha$ -Helix zu einer anderen Sekundärstruktur befinden [112]. Die FOXP2-Monomere verzahnen sich also, indem Helix H2 zum jeweiligen Gegenüber verlängert wird (Abb. 1.3b) [49]. Die A539P-Mutante der FOXP2-FHD liegt ausschließlich als Monomer vor, wohingegen die Forkhead-Domäne von Wildtyp-FOXP2 in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht vorliegt, das sich nach Auftrennung mittels SEC (*Size Exclusion Chromatography*) erneut einstellt. Die Gleichgewichtseinstellung dauert dabei 24 Stunden bei Raumtemperatur und ungefähr 10 Stunden bei 37°C [49]. Indes wurde für die Forkhead-Domäne von FOXP1 gezeigt, dass die Dimerisierung nur bei mikromolaren Proteinkonzentrationen auftritt [108].



**Abbildung 1.4 – DNA-Erkennung von FOXP2.** Detaillierte Darstellung der Interaktionen der Forkhead-Domäne von humanem FOXP2 (dunkelblau) mit der Consensus-Sequenz der DNA (grau). Wichtige Aminosäuren und DNA sind im Stäbchen-Modell mit eingefärbten Heteroatomen dargestellt. Die Erkennungshelix (H3) ist gelb eingefärbt. Die für die DNA-Assoziation hoch konservierte Aminosäure Arginin (R553) bildet eine durch ein Wassermolekül (rote Kugel) vermittelte Wasserstoffbrückenbindung zur Base Thymin 11' aus. Übernommen und adaptiert mit Genehmigung von [49].

Die Entdeckung von humanem FOXP2 beruht auf seiner essentiellen Rolle in der Entwicklung menschlicher Sprache und lässt sich auf eine Missense-Mutation zurückführen, die im FOXP2-Protein eine Substitution von Arginin zu Histidin (R553H) verursacht [20,21,113]. Die Kristallstruktur zeigt, dass die betroffene Stelle in der Erkennungshelix der DNA-Bindedomäne liegt. Diese bindet in die große Furche der DNA (Abb. 1.3c). Die DNA-Erkennung und Bindung der FOXP2-FHD wird hauptsächlich durch schwache van-der-Waals-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen vermittelt (Abb. 1.4). Durch die R553H-Mutation wird die elektrostatische Ladungsverteilung auf der vorwiegend positiv-geladenen Oberfläche der DNA-bindenden Helix derart verändert, dass die Funktionsfähigkeit der Forkhead-Domäne zerstört ist [49,113,114].

Die relativ schwachen Wechselwirkungen, die die Forkhead-Domäne zur DNA-Bindung ausbildet, ermöglichen es FOXP2 eine Vielzahl unterschiedlicher DNA-Sequenzen spezifisch zu erkennen. FOXP2 besitzt somit kein einzelnes idealisiertes DNA-Bindemotiv (Consensus-Sequenz), sondern erkennt ein degeneriertes Muster von 7-mer Nukleotidmotiven [13,49,113,115,116]. Christopher Nelson und Kollegen konnten basierend auf Daten von MITOMI (*Mechanically-Induced Trapping of Molecular Interactions*)-Mikrofluidexperimenten dieses degenerierte Bindungsmuster in Form eines Affinitätslogos sichtbar machen [113,117,118]. Für die Experimente generierten sie in einem *in vitro*-Translationskit FOXP2-Proteine, die neben der Forkhead-Domäne sowohl Zinkfinger als auch



**Abbildung 1.5 – Affinitätslogos für DNA-Motive für FOXP2 von Mensch und Schimpanse.** Basierend auf Daten von MITOMI-Interaktionsanalysen erstelltes MatrixREDUCE 7-mer Affinitätslogo für (a) Mensch und (b) Schimpanse [113, 117, 118]. Im Affinitätslogo stehen die an der jeweiligen Stelle im Motiv hinzugefügten Nukleotidbasen den gemessenen energetischen Kosten bzw. Nutzen gegenüber. Die Höhe jeder der vier Nukleotidbasen stellt die Energie in Bezug auf eine Startsequenz dar. Die Mittellinie zeigt an, dass keine energetische Veränderung vorliegt. Übernommen und adaptiert von [113]; Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Lizenz (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

Leucin-Zipper umfassten, und anschließend unaufgereinigt gegen eine Bibliothek von 740 Oligonukleotiden auf DNA-Bindung getestet wurden. Auf diese Weise konnten sie feststellen, dass die Aminosäuren in FOXP2, die sich in Mensch und Schimpanse unterscheiden, keinen Einfluss auf die Erkennung der Consensus-Sequenz haben. Die DNA-Bindungsprofile und die sich daraus ergebenden Affinitätslogos sind nahezu identisch (Abb. 1.5) [113].

## 1.4 Motivation und Zielsetzung

Forkhead Box Protein P2 wird in der Entwicklung menschlicher Sprache eine bedeutende Rolle zugeschrieben, dies macht den humanen Transkriptionsfaktor zu einem interessanten Forschungsobjekt. Obwohl bisher einiges über das Wirken von humanem FOXP2 *in vivo* bzw. in zellulärer Umgebung herausgefunden wurde, so zeigt die Literaturrecherche allerdings auch, dass der molekulare Funktionsweise des regulatorischen Proteins bis dato nur wenig Aufmerksamkeit gewidmet wurde. Dass der Einfluss der Motive und Domänen, die FOXP2 zur DNA-Bindung zur Verfügung stehen, bisher nicht untersucht wurde, kann sicherlich zum Teil der anspruchsvollen Herstellung des humanen Transkriptionsfaktors zugeschrieben werden. Tatsächlich spielen aber auch technische Herausforderungen, die die Erforschung derartiger molekularer Interaktionen mit sich bringen, eine wesentliche Rolle. Neuartige experimentelle Methoden, wie die biochipbasierte switchSENSE<sup>®</sup>-Technologie, erlauben es Interaktionen von Protein und DNA mit hoher Sensitivität direkt zu beobachten und bieten somit die Möglichkeit bisher nicht beantwortbare Fragestellungen zu adressieren.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb mit Hilfe der elektrisch schaltbaren DNA-Biochips die DNA-bindenden Motive und Domänen von FOXP2 hinsichtlich ihrer molekularen Wechselwirkungen mit DNA zeitaufgelöst zu untersuchen (Kapitel 3). Anhand verschiedener FOXP2-Konstrukte sollte herausgefunden werden, welchen Beitrag Zinkfinger,

---

Leucin-Zipper und Forkhead-Domäne zur DNA-Bindung leisten. Eventuelle kooperative Effekte sollten außerdem studiert werden. Die Charakterisierung der Kinetik der Protein-DNA-Interaktion sollte ohne den störenden Einfluss zellulärer Bindungspartner von FOXP2 vorgenommen werden, weshalb zunächst ein Protokoll etabliert werden musste, dass die Generierung, Extraktion und Anreicherung des humanen Transkriptionsfaktors ermöglicht (Kapitel 2).



## Kapitel 2

# Herstellung, Aufreinigung und Funktionsanalyse von humanem FOXP2

Zu Beginn dieser Arbeit stand eine Reihe von Veröffentlichungen, die sich mit humanem Forkhead Box Protein P2 befassen, zur Verfügung [13, 15, 41, 49, 115]. Obwohl auch einige Studien mit aufgereinigtem Protein durchgeführt wurden, ließen sich dennoch keinerlei detaillierte Angaben zur Expression und Aufreinigung des kompletten humanen Transkriptionsfaktors finden. In diesem Kapitel soll deshalb auf die Herausforderungen bei der Generierung von humanem FOXP2 eingegangen werden. Die hier beschriebenen Experimente von Expression und Aufreinigung wurden initial mit rekombinanten Fusionsproteinen mit C-terminalem GFP (Grün fluoreszierendes Protein) durchgeführt. EMSA-Experimente zeigten jedoch, dass die GFP-Fusionsproteine eine verminderte Bindungsfähigkeit an DNA gegenüber den Varianten ohne GFP aufweisen. Somit wurde auf den C-terminalen Anhang verzichtet. Das endgültig erarbeitete Protokoll (siehe Anhang A.1) zur Herstellung von FOXP2 wurde dann hauptsächlich anhand des Kurzkonstruktes K271 (siehe Abb. 2.9a) optimiert.

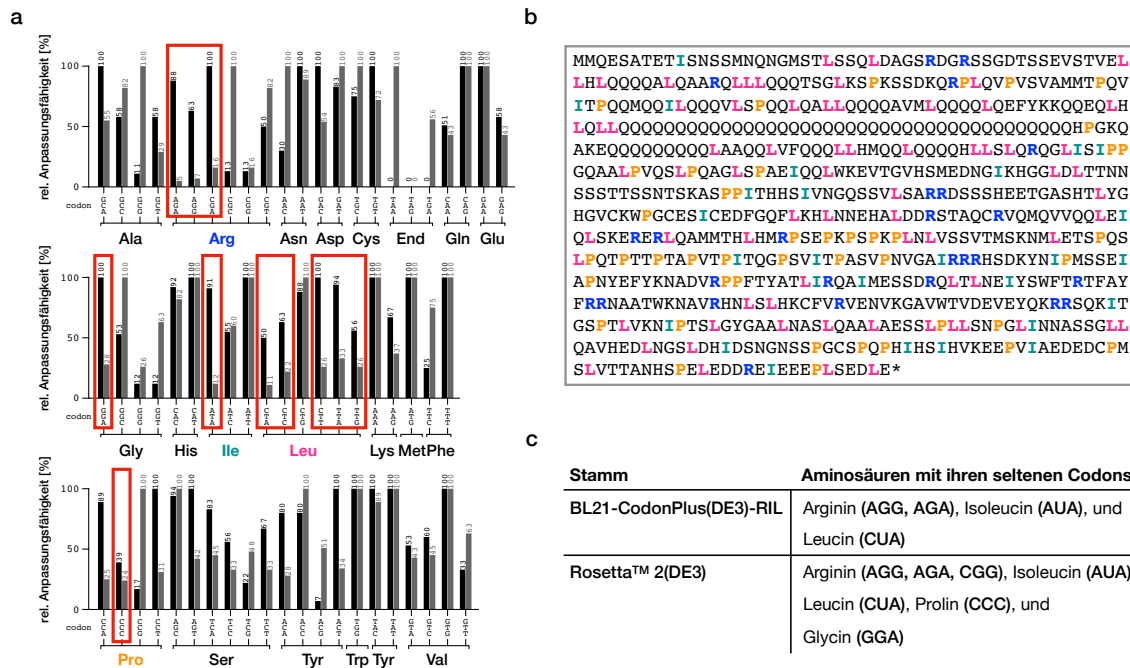
### 2.1 Expression von humanem FOXP2 in einem bakteriellen System

#### Bei menschlichen Genen ist auf den Codon-Gebrauch zu Achten

Mehrere Möglichkeiten humanes Protein zu erzeugen stehen zur Verfügung: (1) humane Zellen, (2) humane *In-vitro*-Translationskits oder (3) bakterielle Expressionssysteme. Die Kultivierung und Erhaltung humaner Zelllinien ist aufwendig und kostspielig, der Ertrag ist eher gering, weshalb die Herstellung von FOXP2 in humanen *In-vitro*-Translationskits getestet wurde. Doch war es mit dieser Methode nicht möglich ausreichende Mengen an Protein für DNA-Bindestudien zu generieren. Aus diesem Grund wurde ein bakterielles Expressionssystem verwendet.

*FOXP2* als menschliches Gen unterliegt einer anderen Codonnutzung als bakterielle Gene. Der sogenannte *Codon Bias* sagt aus, dass Codons des universellen genetischen Codes von

verschiedenen Spezies in unterschiedlichem Maße genutzt werden. Das bedeutet, dass nicht für jedes Codon im humanen Gen eine entsprechende Transfer-RNA (tRNA) im Bakterium vorhanden ist. Aufgrund dieser Unterrepräsentation an tRNAs kann es durch fehlende Aminosäuren in der naszierenden Peptidkette zu vorzeitigen Translationsabbrüchen kommen.



**Abbildung 2.1 – Analyse der Codon-Nutzung von humanen versus bakteriellen Genen** mit dem Online-Tool *Graphical Codon Usage Analyzer* ([www.gcu.de](http://www.gcu.de)). **(a)** Direkte Gegenüberstellung benötigter Codons für das humane *FOXP2*-Gen (schwarze Balken) und den vorhandenen Codons des *E.coli*-Sicherheitsstammes K-12 (graue Balken). Angegeben sind die Werte der relativen Anpassungsfähigkeit pro Codon. Die im humanen *FOXP2*-Gen als selten gegebenen Codons sind mit einem roten Kasten gekennzeichnet. **(b)** Aminosäuresequenz von humanem FOXP2 (Isoform 1) entnommen von UniProt Knowledgebase (<http://www.uniprot.org>) [Eingang O15409-1; FOXP2\_HUMAN]. Farblich hervorgehoben sind die Aminosäuren Arginin (blau), Isoleucin (grün), Leucin (rot) und Prolin (orange), die zu Teilen durch seltene Codons verschlüsselt werden. **(c)** Vergleich des erweiterten tRNA-Repertoires der *E.coli*-Stämme BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Agilent) und Rosetta™ 2(DE3) von Novagen.

Im Falle von humanem FOXP2 spiegelt sich der *Codon Bias* speziell im Fehlen von Codons für die Aminosäuren Arginin, Isoleucin, Leucin und Prolin wider (Abb. 2.1). Analysiert man den Codon-Gebrauch des humanen *FOXP2*-Gens im Vergleich zu den genutzten Codons des *E.coli*-Sicherheitsstammes K-12 mit Hilfe des Online-Tools *Graphical Codon Usage Analyzer* (<http://gcu.schoedl.de>), so erhält man ein Diagramm, das die relative Anpassungsfähigkeit jedes Codons im *E.coli* dem im humanen Gen enthaltenen Codon gegenüberstellt. Die Analyse des *FOXP2*-Gens ergibt im Mittel eine Diskrepanz von 34% für den unterschiedlichen Codon-Gebrauch von Mensch und Bakterium (Abb. 2.1a). Das Einfärben der Aminosäuren Arginin (R), Isoleucin (I), Leucin (L) und Prolin (P) in der kanonischen Aminosäuresequenz von humanem FOXP2 (Isoform 1) verdeutlicht,



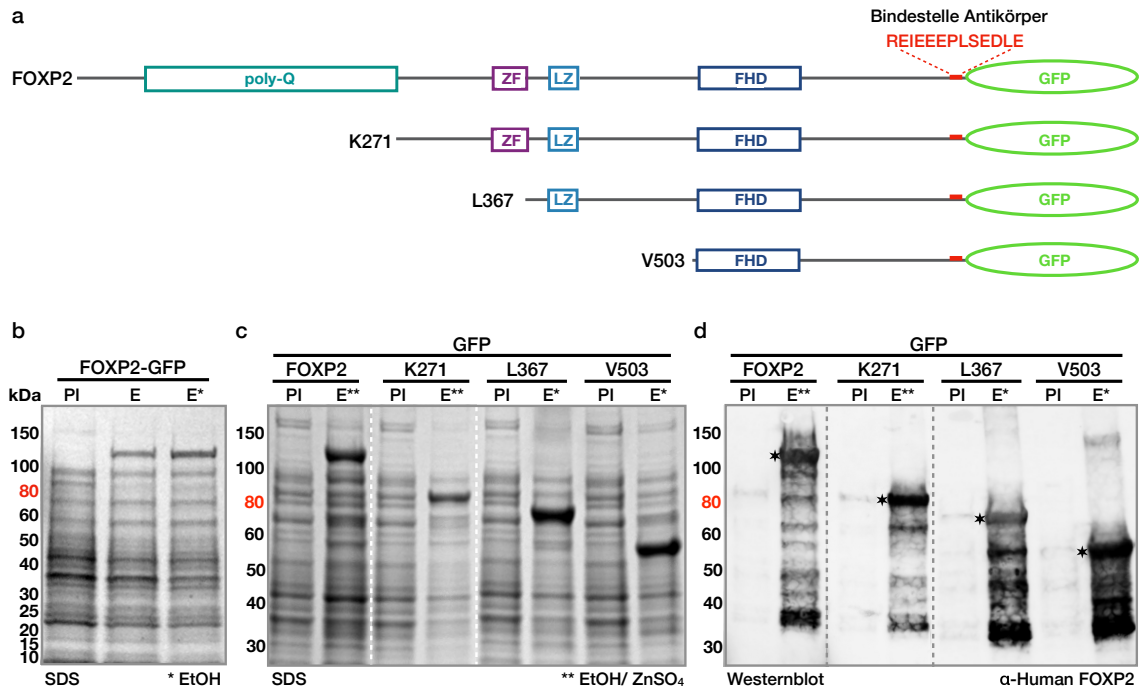
warum dieser *Codon Bias* sich drastisch auf die Expression von humanen Genen in bakteriellen Systemen auswirken und die Ausbeute merklich verringern kann (Abb. 2.1b). Die vier Aminosäuren verteilen sich über die gesamte Länge des Zielproteins und auch wenn nicht jedes ihrer Codons unterrepräsentiert ist, so kann es doch hin und wieder zu einem vorzeitigen Translationsabbruch kommen. Eine geringe Proteinausbeute wäre die Folge. Um das Problem der zu geringen Ausbeute zu umgehen, wurde auf gentechnisch veränderte *E.coli*-Stämme zurückgegriffen. Diese, vom *E.coli* K-12 abgeleiteten Derivatstämme, sind mit einem erweiterten Satz an tRNA-Genen versehen, die für seltene Codons (*Rare Codons*) kodieren und somit den *Codon Bias* ausgleichen. Getestet wurden unter anderem die Stämme BL21-CodonPlus(DE3)-RIL und Rosetta<sup>TM</sup>2(DE3) (Abb. 2.1c). Obwohl in ersten Expressionstests im direkten Vergleich kein merklicher Unterschied in den Expressionsleveln von FOXP2 in BL21-CodonPlus(DE3)-RIL- und Rosetta<sup>TM</sup>2(DE3)-Zellen ausgemacht werden konnte, wurden für weitere Expressionsversuche Rosetta-Zellen verwendet. Neben den Extra-Codons für Arginin, Isoleucin und Leucin sind im Rosetta-Stamm noch zusätzliche tRNA-Gene für die Kodierung von Glycin und Prolin enthalten. Diese sollten gewährleisten, dass weniger Translationsabbrüche erfolgen und der Anteil an verkürzten Produkten möglichst klein gehalten wird.

### Sanfte Expressionsbedingungen und Additive steigern die Ausbeute

Schon aufgrund des sehr langen Polyglutamintrakts kann humanes FOXP2 im Vergleich zu anderen Proteinen als anspruchsvoll in der Herstellung bezeichnet werden. Polyglutamintrakte sind im bakteriellen Genom nicht kodiert, sie sind vorwiegend in eukaryotischen Regulationsproteinen, insbesondere Transkriptionsfaktoren, zu finden [46]. Aus diesem Grund war klar, dass mit standardisierten Expressionsprotokollen keine zufriedenstellende Ausbeute in *E.coli*-Zellen erzielt werden kann. Da der Polyglutamintrakt in Verdacht steht Aggregation zu begünstigen, sollte ein Verpacken in Einschlusskörperchen vermieden werden [119]. Die darauf folgende Extraktion des Proteins aus der Zelle und anschließende Aufreinigung ist nur unter denaturierenden Bedingungen möglich (siehe Abschnitt 2.3). Aus diesem Grund wurden zuallererst Expressionen bei verschiedenen Temperaturen (16 °C, 25 °C, 30 °C und 37 °C) mit angepassten Zeiten getestet. Unter Standardbedingungen bei 37 °C für vier Stunden konnte keinerlei Überexpression im SDS-Gel detektiert werden. Bessere Ergebnisse hingegen wurden bei tieferen Temperaturen beobachtet. Die größte Ausbeute wurde für die sehr sanfte Methode der Expression über Nacht für 16 Stunden bei 16 °C erzielt. Als vorteilhaft für die Expression hat sich unter anderem auch herausgestellt, dass vor den regulären offenen Leserahmen von FOXP2 ein N-terminaler His<sub>6</sub>-tag mit Thrombin-Schnittstelle kloniert wurde (vgl. FOXP2-GFP in Abb. 2.2a mit 2.2b). Vermutlich kann durch die einfache Nukleotidsequenz zu Beginn des Transkripts die Translationsmaschinerie stabilisiert und der im Anschluss befindliche lange Polyglutamintrakt besser translatiert werden [120].

In den nächsten Expressionstests wurde untersucht, ob die Zugabe von Ethanol zum Expressionsansatz die Ausbeute von korrekt gefaltetem Protein erhöht. Gibt man Ethanol in geringen Mengen zum Nährmedium, wird in den *E.coli*-Zellen eine Hitzeschockantwort aufgrund von induziertem Stress ausgelöst. Als Ergebnis dieser Hitzeschockantwort werden die zellulären Hitzeschockproteine (HSP) oberhalb ihres basalen Levels synthetisiert, um

dem Stress entgegenzuwirken und zelluläre Proteine vor Denaturierung zu schützen. Ein positiver Nebeneffekt ist hierbei, dass durch die Produktion der zusätzlichen Chaperone die Faltung mancher rekombinanter Proteine verbessert werden kann [121]. Im Fall der Expression von humanem Volllänge-FOXP2 konnte durch die Zugabe von 4% Ethanol (v/v) ein erhöhtes Expressionslevel erzielt werden (Abb. 2.2b). Eine Einschätzung bezüglich der Löslichkeit und verminderter Aggregation, die zu Einschlusskörperchen führt, kann frühestens bei der Extraktion festgestellt werden.



**Abbildung 2.2 – Expression des rekombinanten Fusionsproteins Volllänge-FOXP2-GFP und dessen N-terminal gekürzte Konstrukte.** (a) Schematische Darstellung der GFP-Fusionsproteine mit Polyglutamintrakt (Poly-Q), Zinkfinger (ZF), Leucin-Zipper (LZ) und Forkhead-Domäne (FHD). Die Bindestelle des FOXP2-spezifischen Antikörpers am C-Terminus ist in rot eingezeichnet. (b), (c) und (d) Laserscans von SDS-PAGE-Gelen und Westernblotanalysen. [PI] vor Induktion mit IPTG, [E] nach der Expression, [E\*] nach der Expression mit Zugabe von Ethanol und [E\*\*] nach der Expression mit Zugabe von Ethanol und  $ZnSO_4$ . SDS-Gele wurden mit Roti<sup>®</sup>-Blue quick Lösung angefärbt und der Westernblot wurde mit CF633-martkierem Sekundärantikörper detektiert. Beides wurde im Cy5-Kanal des Typhoon<sup>™</sup>-Scanners ausgelesen und digitalisiert. (b) Effekt von final 4% Ethanol im Nährmedium auf die Proteinausbeute. Analyse in 12%iger SDS-PAGE. (c) SDS-PAGE (4-20%iges Gradientengel) und (d) Westernblotanalyse der Expression von Volllänge-FOXP2-GFP und den Kurzkonstrukten K271-GFP, L367-GFP und V503-GFP. Die Expressionsbanden der Hauptprodukte sind im Westernblot mit einem Askerisk gekennzeichnet. FOXP2-Varianten wurde mit einem  $\alpha$ -Human FOXP2 Antikörper, der gegen den C-Terminus gerichtet ist, detektiert.

Da der Transkriptionsfaktor FOXP2 ein  $C_2H_2$ -Zinkfingermotiv enthält, wird er der Gruppe der Zinkfinger-Proteine zugeordnet. Für die korrekte Ausbildung eines Zinkfingermotivs müssen schon während der Expression Zink-Ionen zur Koordination (siehe Abschnitt 1.3.2) zur Verfügung stehen. Neben der Zugabe von 4% Ethanol wurde aus diesem Grund das Nährmedium kurz vor Induktion mit einer finalen Konzentration von  $100 \mu M ZnSO_4$

angereichert. Durch die Zugabe von  $Zn^{2+}$ -Ionen konnte eine weitere Steigerung der Expressionslevel von Volllänge-FOXP2-GFP erzielt werden (vgl. Spur 3 in Abb. 2.2b mit Spur 2 in Abb. 2.2c). Bei den Konstrukten L367-GFP und V503-GFP wurde auf die Zugabe von  $ZnSO_4$  verzichtet, da diese N-terminal gekürzt wurden und somit kein Zinkfingermotiv enthalten.

### **Abbauprodukte entstehen schon während der Expression**

Der Nachweis, dass es sich bei den überexprimierten Proteinen um Konstrukte von humanem FOXP2 handelt, wurde mittels Westernblot-Analyse erbracht (Abb. 2.2d). Der für die Detektion gewählte, polyklonale Antikörper ist gegen eine am C-Terminus von humanem FOXP2 gelegene Peptidsequenz gerichtet und kann somit auch zur Detektion der N-terminalen Kurzkonstrukte verwendet werden (Abb. 2.2a). Gut detektierbar sind die überexprimierten Proteinkonstrukte, wobei auch in den jeweiligen Spuren vor IPTG-Induktion (PI) ein schwaches Antikörpersignal zu erkennen ist. Dies spricht für ein nicht ganz dichtes (*leaky*) Expressionssystem, das aber im Fall von FOXP2 keine Probleme aufgrund von Toxizität zu bereiten scheint. Das stärkste Signal geben jeweils die Hauptexpressionsbanden der rekombinanten Proteinkonstrukte (Volllänge-FOXP2-GFP, K271-GFP, L367-GFP und V503-GFP), die im erwarteten Molekulargewichtsbereich liegen. Begleitet werden sie von weniger starken Banden mit geringerem Molekulargewicht, die durch Expressionsabbruch, interne Translationsinitiation oder Degradation entstanden sein können. Untersucht man die Stabilität des menschlichen FOXP2-Proteins anhand seiner Aminosäuresequenz in Hinsicht auf eine Herstellung in *E.coli*-Bakterien *in silico* (<http://web.expasy.org/protparam>), so erhält man eine geschätzte Halbwertszeit von unter zehn Stunden. Während der 16-stündigen Expression kann also signifikante Degradation stattfinden.

## **2.2 Aufreinigung von FOXP2 unter nativen Bedingungen**

Nach erfolgreicher Expression muss das Zielprotein aus der Zelle extrahiert werden. Für den Aufschluss und die Aufreinigung unter nativen Bedingungen wurden hier beschriebene Protokolle zum Teil auf Grundlage von Protokollen aus "The QIAexpressionist™" [122], der die Grundzüge von Zellaufschluss und Proteinaufreinigung via Polyhistidin-tag behandelt, weiterentwickelt und für FOXP2 optimiert.

Im Folgenden soll erst die Aufreinigungsstrategie erläutert, der Fokus auf die gewählten Pufferbedingungen und den Zellaufschluss gerichtet werden und dann auf die einzelnen Aufreinigungsschritte eingegangen werden.

### **2.2.1 Duale Affinitätschromatographie als Strategie zur Aufreinigung unter nativen Bedingungen**

Die Westernblotanalyse hat gezeigt, dass bei der Expression nicht nur intaktes Zielprotein, sondern auch dessen Bruchstücke entstehen (Abb. 2.2d). Der für die Expression

vorteilhafte N-terminale Polyhistidin-tag reicht somit nicht aus, um das Protein in gewünschtem Maße in einem Schritt aufzureinigen. Außerdem gibt es endogene *E.coli*-Proteine, die aufgrund (1) ihrer nativen Metallbindefunktion oder (2) von Histidinclustern auf ihrer Oberfläche (z.B. ArnA (YfbG) oder GlmS), an die Ni-NTA-Matrix binden und mit aufgereinigt werden können [123]. Um diese Verunreinigungen zu beseitigen, wurde zusätzlich zur Ni-NTA-Aufreinigung ein weiterer Affinitätsaufreinigungsschritt mittels C-terminal angebrachtem Strep-tag<sup>®</sup> II [124, 125] durchgeführt.

Der Strep-tag<sup>®</sup> bietet sich aus verschiedenen Gründen an. Erstens ist er sehr leicht anzubringen, da man aufgrund seiner aus nur acht Aminosäuren bestehenden Sequenz weder ein zusätzliches Plasmid erwerben muss, noch zusätzliche Gensynthese benötigt. Hier wurde ein neutraler SerAla-Linker genutzt, um die Flexibilität und Zugänglichkeit des Strep-tags<sup>®</sup> zu gewährleisten. Zweitens ist der Strep-tag<sup>®</sup> II mit nur 1.1 kDa ein sehr kleiner Protein-tag, der einen neutralen isoelektrischen Punkt besitzt und nicht proteolytisch entfernt werden muss. Durch seine geringe Größe ist er anderen Protein-tags, wie zum Beispiel Glutathion-S-Transferase (GST, 23 kDa) oder Maltose-Bindeprotein (MBP, 43 kDa), die verhältnismäßig groß sind, überlegen [126]. Ein weiterer Vorteil ist, dass es mit Strep-Tactin<sup>®</sup>-Sepharose vorgepackte kleine Säulchen (Fließ- oder Zentrifugensäulchen) gibt, die die Aufreinigung im kleinen Maßstab vereinfachen. Das Säulenmaterial kann regeneriert und mehrfach wiederverwendet werden [125].

### Optimierung der Pufferbedingungen

Ein besonders wichtiger Teilaspekt der Proteinaufreinigung unter nativen Bedingungen ist neben der gewählten Methodik auch die Zusammensetzung des Puffersystems. Die enthaltenen Komponenten und Agenzien sollten nicht nur auf die Eigenschaften des Zielproteins abgestimmt sein, sondern Nebeneffekte wie die Wechselwirkung mit anderen Komponenten oder die Vereinbarkeit mit Folgeexperimenten sollten bedacht werden. Ob die volle Funktionalität des aufgereinigten Proteins gewährleistet ist, lässt sich erst im Anschluss anhand von DNA-Bindestudien überprüfen (Abschnitt 2.2.2).

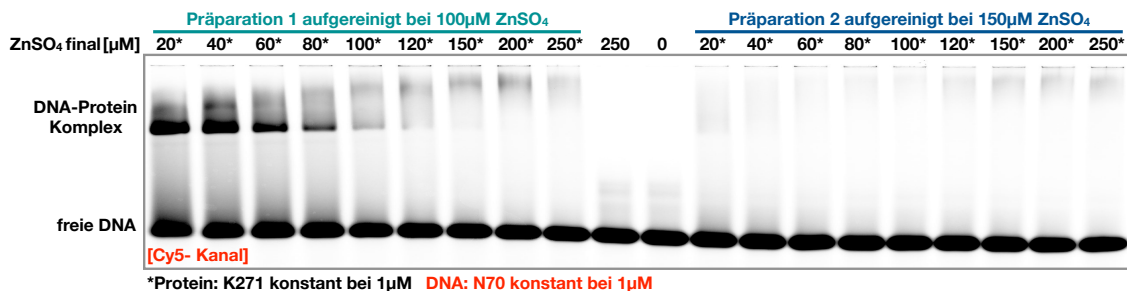
Im Folgenden soll die Zusammensetzung eines Grundpuffers erläutert werden, der sich sowohl durch Literaturrecherche als auch basierend auf eigenen Erfahrungen aus Experimenten ergeben hat. Hinsichtlich der verschiedenen Aufreinigungsschritte kann dieser Basispuffer angepasst bzw. um notwendige Agenzien erweitert werden. Er beinhaltet folgende Komponenten:

**HEPES** Die Puffersubstanz 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, die der Gruppe der Good-Puffer zugehörig ist, weist mit einem pKs von 7.55 (bei 20 °C) eine gute Pufferkapazität im neutralen Bereich (pH 6.8 bis 8.2) auf und ist somit optimal für humanes FOXP2, das einen isoelektrischen Punkt von 6.1 hat ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)). Im Gegensatz zu Tris-HCl, das bei unterschiedlichen Temperaturen starke Schwankungen des pH-Wertes zeigt, weist HEPES keine sonderlich starke Temperaturabhängigkeit auf [127]. Des Weiteren wird HEPES, im Gegensatz zum Phosphatpuffer, keine komplexierende Wirkung von zweiwertigen Magnesiumionen zugeschrieben. Dies

ist insbesondere in Hinsicht auf den Zellaufschluss von Vorteil, denn die hier verwendete Benzonase<sup>®</sup> Endonuklease benötigt eben diese für ihre Aktivität.

**Glycerol** Mit bis zu 40 Glutaminen in einer Reihe ist der Polyglutamintrakt von FOXP2 einer der längsten im humanen Genom [45]. Das bedeutet, dass die Pufferbedingungen auf diese Besonderheit angepasst werden müssen. Im Jahr 2006 veröffentlichten Michelle Chow und Kollegen einen Methodik-Artikel, der sich mit der Aufreinigung von Polyglutaminproteinen beschäftigt. Anhand von Ataxin-3-Varianten wird eine Aufreinigung von Proteinen, die zur Aggregation neigen, erläutert [128]. Hieraus wurde die Empfehlung entnommen, dass jeder Schritt der Aufreinigung Glycerol beinhalten sollte. Die Erhöhung der Viskosität durch chemische Agenzien wie Glycerol soll Aggregation verhindern, welche eines der Hauptprobleme von Polyglutaminen darstellt.

**Zinksulfat** Zinkfingerproteine wie FOXP2 benötigen Zink-Ionen für ihre Funktionalität. Ein Überschuss an freien Zink-Ionen kann aber zu irreversiblen Effekten wie z.B. Aggregation führen. Die Folge ist eine Funktionsstörung der Proteine [129]. Der zeitweisen Erhöhung der Zinkkonzentration (von 100  $\mu\text{M}$  auf 150  $\mu\text{M}$ ) in den Aufreinigungspuffern folgte eine verminderte Funktionalität von FOXP2, was sich durch schlechte bis gar keine Bindungsfähigkeit in EMSA-Experimenten ausgezeichnet hat. Obwohl die finalen Zinkkonzentrationen im Bindungsexperiment für beide Präparationen vergleichbar sind, scheint die Funktionalität von Präparation 2 durch die höhere Zinkkonzentration während der Aufreinigung irreversibel geschädigt (Abb. 2.3). Aus diesem Grund wurde  $\text{ZnSO}_4$  nicht jedem Reinigungsschritt beigefügt, wobei Konzentrationen im niedrigen mikromolekularen Bereich ausreichend sind.



**Abbildung 2.3 – Einfluss der Zinkkonzentration auf die DNA-Bindungsfähigkeit von FOXP2.** Laserscan eines 5%igen Agarosegels, in dem Gemische von Protein K271 und Substrat-DNA N70 aufgetrennt wurden. Das Gel wurde im Typhoon<sup>™</sup>-Scanner im Cy5-Kanal ausgelesen und digitalisiert. In Präparation 1 ist der Zinkgehalt an die niedrigste mögliche Konzentration (20  $\mu\text{M}$ ) von Präparation 2 angeglichen. Anschließend wurde die Zinkkonzentration titriert (40  $\mu\text{M}$ -250  $\mu\text{M}$ ).

**TCEP** Ein guter Puffer sollte zusätzlich Reduktionsmittel beinhalten, damit sich keine Disulfidbrücken ausbilden können. Problematisch sind hierbei Standardreduktionsmittel wie Dithiothreitol (DTT) oder 2-Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME), die zur Gruppe der Thiole gehören. Für die Anwendung in Kombination mit Nickel- oder Zink-Ionen sind sie nicht

geeignet, da sie chelatierend wirken bzw. Zink-bindende Agenzien sind [130, 131]. Als Ersatz bietet sich das milde Reduktionsmittel Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) an, das zur Gruppe der Phosphine gehört und ein niedriges Zinkbindungsvermögen besitzt [132]. Während der Findung der passenden Pufferbedingungen für FOXP2 wurde zwischenzeitlich ein Wechsel des Reduktionsmittels von  $\beta$ -ME zu TCEP vorgenommen. Folglich wurde durch den Verlust der chelatierenden Wirkung von  $\beta$ -ME die effektive Zinkkonzentration erhöht, was wiederum zu einer verminderten Bindungsfähigkeit bzw. gestörten Funktionalität des Proteins geführt hat (Abb. 2.3). TCEP weist beim Lösen in Wasser einen sehr sauren pH-Wert von 2.5 (bei 500 mM Konzentration) auf, weshalb wir auf TCEP zurückgegriffen haben, das bereits gelöst und auf einen neutralen pH-Wert eingestellt ist.

## Herstellen des klaren bakteriellen Lysats

Die Entwicklung eines Protokolls bedingt Experimente im kleinen Maßstab, weshalb der Zellaufschluss mit Pellets von 50 ml Expressionsansatz getestet wurde. Neben dem enzymatischen Aufschluss mit Lysozym und BugBuster<sup>®</sup>-Reagenz wurde auch die Methode der Behandlung mit Ultraschall getestet. Im Zuge der Experimente wurde festgestellt, dass frische Zellen, d.h. direkt nach der Expression, nur schlecht aufgeschlossen werden konnten. Dies hatte zur Folge, dass große Mengen des exprimierten Proteins mit dem Zelldebris abzentrifugiert wurden. Dabei war es egal mit welcher Aufschlussmethode die frischen Zellen behandelt wurden. Aus diesem Grund wurden die Zellpellets, auch wenn die Aufreinigung am selben Tag geplant war, in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bewährt hat sich nach dem Schockfrostern noch die kurzzeitige Lagerung (mind. ein Tag) bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Durch das drastische Kühlen wird die Zellstruktur spröde und brüchig, was eine Destabilisierung der Zellwand bewirkt [133]. Dies ist für jeglichen Aufschluss, mechanisch oder enzymatisch, von Vorteil.

### Zellaufschluss mit BugBuster<sup>®</sup>

Für den Aufschluss wurden die Pellets in BugBuster<sup>®</sup>-Mastermix resuspendiert und zur Lyse inkubiert. Die Zellmembran und Zelltrümmer wurden durch BugBuster<sup>®</sup> komplett verdaut, sodass fast kein Zellpellet übrig blieb. Das Zielprotein war vollständig in der löslichen Phase zu finden. Obwohl das Reagenz laut Hersteller Novagen<sup>®</sup> kompatibel mit der anschließenden Ni-NTA-Aufreinigung sein soll, konnten große Teile des His-getaggten Proteins nicht oder nur sehr schlecht an die Ni-NTA-Matrix binden und waren somit verloren. Der BugBuster<sup>®</sup>-Mastermix konnte deshalb trotz der sehr effektiven Lyse nicht überzeugen. Im Nachhinein lässt sich feststellen, dass das Protein wahrscheinlich an die Matrix gebunden hätte, wenn die bindungsmindernden Ingredienzien in der lysierten BugBuster<sup>®</sup>-Protein-Suspension durch Puffer verdünnt worden wären.

### **Löslichkeit des Proteins bestimmt das Probenvolumen**

Für die weiteren Zellaufschlussexperimente wurden die Zellpellets in Lysepuffer resuspendiert, zu dem neben den oben genannten Ingredienzen noch Proteaseinhibitor und Natriumchlorid hinzugefügt wurde (siehe Anhang B.1). Wichtig zu erwähnen ist hierbei, dass die Konzentration von Natriumchlorid nicht 100 mM übersteigen sollte, damit die später hinzugefügte Benzonase® Endonuklease nicht inaktiviert wird. Generell war hierbei darauf zu achten, dass das Zellpellet entsprechend seiner Masse in ausreichend Lysepuffer resuspendiert wurde. Vermutlich übersteigt bei zu geringem Probenvolumen die Konzentration des freigesetzten überexprimierten Proteins dessen Löslichkeitsgrenze, was direkt nach erfolgtem Zellaufschluss Aggregation auslöst. Die aggregierten Proteinklumpen würden dann mitsamt der unlöslichen Phase ausfallen und abzentrifugiert. Dieses Verhalten wurde vorwiegend beim Volllängekonstrukt von FOXP2 beobachtet, welches den Polyglutamintrakt besitzt. Die kürzeren Proteinkonstrukte machten dahingehend weniger Probleme. Durch Zugabe des Detergens Octoxinol-9, besser bekannt unter seinem Markennamen Triton X-100, im Lysepuffer, konnte zusätzlich eine bessere Proteinausbeute erzielt werden.

### **Kombination aus Ultraschall und enzymatischer Lyse bringt das gewünschte Ergebnis**

Für den traditionellen enzymatischen Aufschluss mit Hilfe von Lysozym konnte kein zufriedenstellendes Ergebnis beobachtet werden. Große Teile des Zielproteins wurden mitsamt der Zelltrümmer abzentrifugiert; eine komplette Lyse konnte trotz sehr langer Inkubation bei Raumtemperatur nicht bewerkstelligt werden.

Aus diesem Grund wurde auch noch die Methode der Behandlung mit Ultraschallhomogenisator getestet. Das im Labor verwendete Protokoll<sup>1</sup> ist für kleinere Volumina (bis 10 ml) Zellsuspension recht gut geeignet. Sobald die Volumina zu groß wurden, schien der Aufschluss nicht ausreichend gut zu funktionieren. Grund hierfür könnte sein, dass die Ultraschallintensität nicht ausreichend war, um die einzelnen Zellen in der dichten Suspension zu zerstören. Für die Ultraschallbehandlung wurde also die Zellsuspension immer auf mehrere Zellkulturröhrchen verteilt, um zu große Volumina zu vermeiden.

Abschließend ist zu sagen, dass sich der enzymatische Verdau mittels Lysozym in Kombination mit nachfolgender mechanischer Lyse durch Ultraschall als beste Option erwiesen hat (siehe Kapitel A.1). Die Ultraschallmethode hat überdies den Vorteil, dass nicht nur die *E. coli*-Zellwand, sondern auch die chromosomale DNA durch die Behandlung zerstört wird [134]. Dies ist insbesondere bei DNA-bindenden Proteinen wie FOXP2 notwendig.

### **Benzonase Endonuklease unterstützt den Abbau der genomischen DNA**

Da die Suspension trotz Ultraschallbehandlung nach der Zellyse durch die freigesetzte genomische DNA viskos wird, empfiehlt es sich Benzonase® hinzuzufügen. Die Endonuklease degradiert alle Formen von zellulären Nukleinsäuren. Problematisch ist nur ihre Abhängigkeit von der Natriumchloridkonzentration, wobei sich diese Eigenschaft auch zum Vorteil

<sup>1</sup>Entwickelt wurde das Protokoll zum Zellaufschluss mittels Ultraschall von Dr. Britta Coordes - Postdoktorandin in der AG Dietz im Jahr 2012.

nutzen lässt. Nach erfolgter DNA-Zersetzung (gut erkennbar an der abnehmenden Viskosität bzw. daran, dass die Suspension keine Fäden zieht) erhöht man die Salzkonzentration im Lysepuffer einfach, um die Benzonase zu inaktivieren. Dies ist in Bezug auf spätere DNA-Bindestudien (siehe Abschnitt 2.2.2) notwendig. Denn auch die darin genutzte Substrat-DNA könnte durch mögliche Benzonaseverunreinigungen attackiert werden. Nach erfolgreicher Zersetzung der genomischen DNA sollte die Salzkonzentration erhöht werden, da die Natriumchloridkonzentration eine entscheidende Rolle für die anschließende Affinitätschromatographie spielt. Ein erhöhter Salzgehalt kann die Wechselwirkung zwischen His-getaggttem Protein und Ni-NTA-Granulat positiv beeinflussen und unspezifische Anbindung reduzieren.

## Metallchelat-Affinitätschromatographie (IMAC) via Ni-NTA

Der erste Reinigungsschritt ist die immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC). Dabei koordiniert das Zielprotein über den N-terminalen Hexahistidin-tag an zweiwertige Ionen (etc.  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  oder  $\text{Co}^{2+}$ ), die wiederum einen Komplex mit Nitrilotriessigsäure (NTA) bilden. Es gibt Untersuchungen die besagen, dass man bei Proteinen mit Zinkfingerdomäne auf eine Ni-NTA-Aufreinigung verzichten sollte, da die im Zinkfinger koordinierten Zink-Ionen durch Nickel-Ionen ausgetauscht werden können [135]. Um diesen Austausch der Ionen zu vermeiden, wurde getestet, ob sich das His-getaggte Protein an Zn-NTA-Granulat binden lässt. Die Aufreinigung über Zn-NTA hat sich aber nicht bewährt, da nur wenig Protein an die Matrix assoziiert hat. Gründe hierfür könnten gewesen sein, dass Zink-Ionen im Vergleich zu Nickel-Ionen ein vermindertes Affinitätsvermögen gegenüber dem Polyhistidin-tag aufweisen, oder aber das Misslingen hängt mit dem zu dieser Zeit verwendeten BugBuster<sup>®</sup>-Reagenz zusammen.

Aufgrund der Tatsache, dass mit der Strep-Tactin<sup>®</sup>-Aufreinigung eine weitere Affinitätsreinigung angeschlossen wird, bei dem der Austausch der Ionen  $\text{Zn}^{2+}$  zu  $\text{Ni}^{2+}$  wieder rückgängig gemacht werden kann, wurde trotzdem mit Ni-NTA-Granulat gearbeitet.

## Große Waschvolumina und angepasste Pufferbedingungen

Nach Bindung des getaggtten Proteins an die Ni-NTA-Agarosekügelchen durch Inkubation auf dem Rotationsrad bei Raumtemperatur, wurde die Mixtur in leere Fließsäulchen überführt. Um während der Waschschriffe möglichst viel ungewollte Proteinverunreinigungen loszuwerden, hat sich ein großes Waschvolumen als notwendig gezeigt. Waschvolumina vom acht-bis zehnfachen des Säulenmaterialvolumens wurden mindestens gebraucht.

Wichtig bei der Aufreinigung von Proteinen ist die Zusammensetzung der Waschlösung. In unserem Fall hat sich bestätigt, dass verschiedene Komponenten gebraucht werden, um endogene *E. coli*-Proteine loszuwerden. Getestet wurden neben erhöhten Konzentrationen von Glycerol, das die hydrophobischen Wechselwirkungen reduzieren soll, auch Erhöhung der Salzkonzentration, sowie die Zugabe von Harnstoff. Das gegen unspezifische Wechselwirkungen mit der Ni-NTA-Matrix hinzugefügte Imidazol wird in den Waschlösungen



graduall in seiner Konzentration erhöht. Daraus hat sich nachstehende Abfolge der Puffer ergeben, die in ihrer kompletten Zusammensetzung in Anhang B.1 aufgelistet sind:

**Bindepuffer** Der Bindepuffer ist von seiner Komposition dem Lysepuffer sehr ähnlich. Verzichtet wird hierbei nur auf das Detergens Triton<sup>®</sup> X-100, da dieses nicht mit nachfolgenden Experimenten bzw. der Photospektroskopischen Bestimmung der Proteinkonzentration kompatibel ist. Zusätzlich wird dem Puffer Imidazol in niedriger Konzentration hinzugefügt und die Natriumkonzentration erhöht, um unspezifischen Wechselwirkungen von Proteinen mit der Ni-NTA-Matrix vorzubeugen.

**Hochsalzpuffer** Im Hochsalzpuffer wird die Natriumchloridkonzentration auf 1 M erhöht. Durch die Erhöhung sollen ionische Interaktionen zwischen dem Zielprotein und zellulären *E.coli*-Proteinen unterbunden werden. Ein solcher Waschschrift ist möglich, da FOXP2 die hohen Salzkonzentrationen zu vertragen und nicht zu aggregieren scheint.

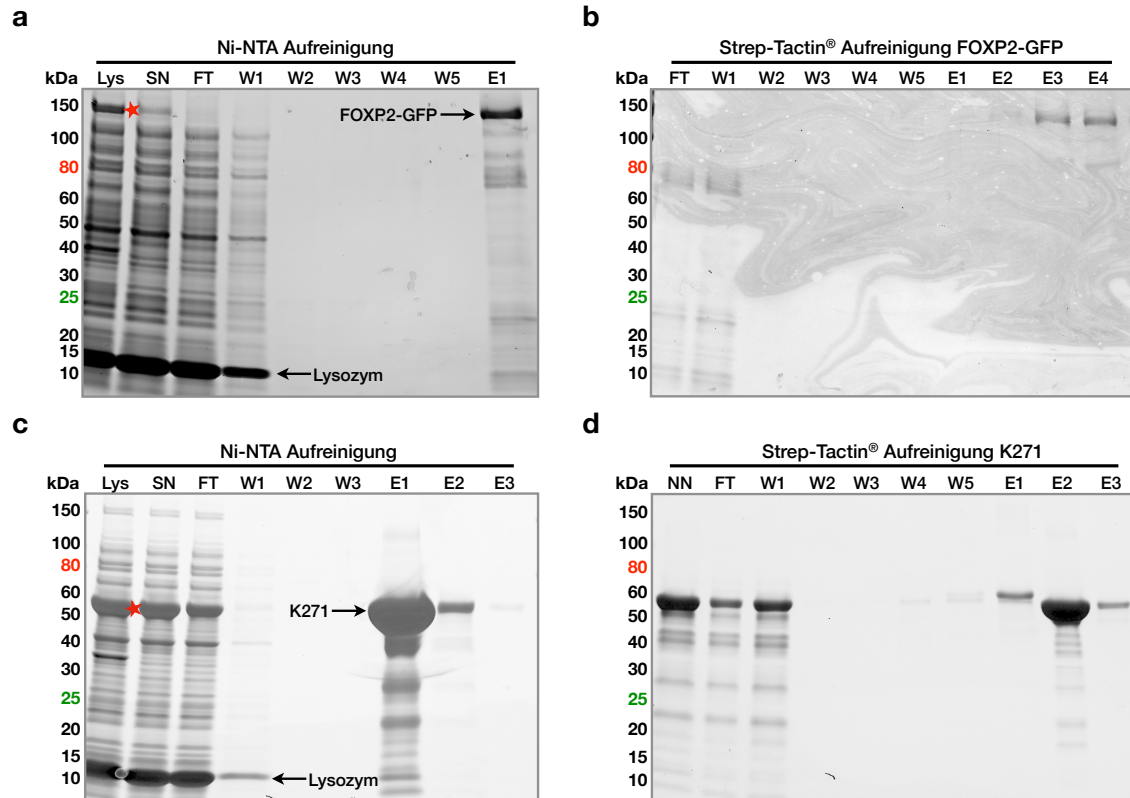
**Harnstoffpuffer** Urea, dass typischerweise in hohen Konzentrationen als Denaturierungsmittel verwendet wird, kann in niedrigeren Konzentrationen (bis 500 mM) den hydrophoben Effekt verstärken. Endogene Bakterienproteine, die an das His-getaggte Protein assoziieren, können somit zu Teilen entfernt werden. Positiver Nebeneffekt von Urea in niedrigen Konzentrationen ist, dass es sich stabilisierend auf die Proteinstruktur auswirken kann [136].

**Niedrigsalzpuffer** Im Niedrigsalzpuffer wird auf Zusätze wie Urea verzichtet. Der Puffer dient einzig dem Zweck die zuvor erhöhten Ingredienzen Natriumchlorid und Urea wieder auf ein normales Niveau zu bringen. Unter Umständen können aber auch noch Reste von gebundener genomische DNA vom Zielprotein freigesetzt werden.

**Magnesium-ATP** Eine MALDI (Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung)-Analyse von aufgereinigtem FOXP2 hat ergeben, dass neben His-getaggten Abbruchstücken auch Chaperone wie DnaK (auch Hsp70 genannt) als Kontaminanten mit aufgereinigt werden. Aus diesem Grund fügt man dem Niedrigsalzpuffer ATP hinzu, um unerwünschte Verunreinigungen durch molekulare Chaperone loszuwerden. Chaperone wurden während der Expression gezielt hochgeregelt, um die Faltung des Zielproteins zu unterstützen (siehe Abschnitt 2.1). Durch das ATP im Puffer wird die Freisetzung des Proteinsubstrates aus den molekularen Chaperonen stimuliert [137].

### Analyse der Proteinaufreinigung mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese

Zur Analyse einer Proteinaufreinigung eignet sich eine denaturierende SDS-Gelelektrophorese, bei der Proteine anhand ihrer Molekülmasse im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Ein repräsentatives Beispiel einer Ni-NTA-Aufreinigung von Volllänge-FOXP2-GFP



**Abbildung 2.4 – Zweistufige Aufreinigung von Volllänge-FOXP2 und K271 via Ni-NTA- und Strep-Tactin® unter nativen Bedingungen.** Laserscans von 4-20%igen Gradientengelen. SDS-PAGE-Gele wurden mit Roti®-Blue quick Lösung gefärbt und im Cy5-Kanal des Typhoon™-Scanners ausgelesen und digitalisiert. [Lys] Lysat, [SN] Überstand, [NN] gepoolte Ni-NTA-Elutionsfraktionen, [FT] Durchfluss, [W1-W5] Waschschritte, [E1-E4] Elutionsschritte. Zielproteine sind mit rotem Asterisk (\*) markiert. SDS-PAGE-Gele der (a) Ni-NTA-Aufreinigung bzw. (b) Strep-Tactin®-Aufreinigung des rekombinanten Volllänge-FOXP2-GFP-Konstruktes (110 kDa) und der (c) Ni-NTA-Aufreinigung bzw. (d) Strep-Tactin®-Aufreinigung der gekürzten K271-Variante ohne GFP (53 kDa).

ist in Abbildung 2.4a gezeigt. Die Proteinbande des Zielproteins, die in der ersten Spur (Lys) noch sehr prominent ist, verliert in der zweiten Spur (SN) stark an Intensität. Dies war zu erwarten, da das Volllängen-FOXP2-Proteinkonstrukt aufgrund seines langen Polyglutaminstretches zusammen mit anderen unlöslichen Zellbestandteilen abzentrifugiert wurde. Der größte Anteil des exprimierten Zielproteins ging somit schon vor der Aufreinigung verloren. Im darauffolgenden Durchfluss-Schritt (FT), der die Anbindung von FOXP2-GFP an das Ni-NTA Granulat widerspiegelt, sieht man hingegen, dass fast keine Proteinbande auf Höhe des Zielproteins detektiert werden kann. Die Anbindung des Hexahistidin-getaggtten Proteins schien somit sehr gut funktioniert zu haben und das Säulenmaterial wurde nicht überladen.

Im ersten Waschschritt (W1) sieht man, dass sehr viele Bakterienproteine und das für die Lyse zugegebene Lysozym von der Säule gewaschen werden. In den nächsten Spuren, die die Waschschritte W2 bis W5 beinhalten, lässt sich aufgrund der starken Verdün-

nung durch sehr große Waschvolumina kaum mehr Protein detektieren. Ob auch in diesen Waschschrritten zusätzliche Verunreinigungen abgelöst wurden, lässt sich also nicht aussagen. In der letzten Spur der SDS-PAGE, auf der die Elutionsfraktion E1 aufgetragen ist, ist die Bande des rekombinanten Fusionsproteins FOXP2-GFP mit Abstand die stärkste Bande. Vergleicht man die Proteinbande in der Spur des Überstandes (SN) mit der Spur der Elution (E1), so kann eine gute Anreicherung des Zielproteins erkannt werden. Es sind noch einige zusätzliche Proteinbanden zu erkennen, diese gehören entweder zu Proteinen, die aufgrund ihrer Metallbindefähigkeit an die Nickel-Ionen der NTA-Matrix koordinieren, oder direkt mit dem Zielprotein verbunden sind. Aufgrund des denaturierenden Charakters der SDS-PAGE werden im nativen Zustand bestehende Bindungen aufgebrochen und assoziierte Proteine kommen zum Vorschein. Und wie zuvor in der Westernblotanalyse in Abbildung 2.2c detektiert, kann es sich ausserdem auch um Degradationsprodukte von FOXP2 handeln, die während der Expression entstanden sind. Falls sie noch einen Polyhistidin-tag besitzen, können diese an die Matrix binden.

Abbildung 2.4c zeigt das Ergebnis der Ni-NTA-Affinitätschromatographie des gekürzten FOXP2-Konstruktes K271. Im Vergleich zur Aufreinigung des Volllänge-konstruktes (Abb. 2.4b) ist eine sehr gute Steigerung der Ausbeute zu erkennen. Dies ist schon allein der Tatsache geschuldet, dass die Expression des kürzeren Konstruktes besser funktioniert hat. Sehr gut zu erkennen ist die starke Überexpressionsbande in der ersten Spur, auf dem das Lysat (Lys) aufgetragen wurde. Im Vergleich zum Lysat zeigt die Hauptexpressionsbande im Überstand (SN) keinen merklichen Verlust an Zielprotein durch Zentrifugation. Der Großteil an Zielprotein K271 bleibt erhalten. Die Ursache hierfür ist, dass dem Kurzkonstrukt K271 der lange Polyglutamintrakt fehlt, es somit im Vergleich zur Volllängeversion nicht aggregiert bzw. nicht mit dem restlichen Zelldebris abzentrifugiert wird. Das Konstrukt ist gut löslich, Einschlusskörperchen haben sich während der Expression nicht gebildet.

In den Waschschrritten W1 bis W3 (Proben von W4 und W5 wurden diesmal nicht mit aufgetragen) ist, verursacht durch große Waschvolumina, fast kein Protein zu sehen. Durch anpassen des Elutionsvolumens konnte erreicht werden, dass fast das gesamte aufgereinigte Protein ausschließlich in einer Elutionsfraktion (E1) zu finden ist. Unübersahbar ist, dass zusätzliche Proteine bzw. Bruchstücke des Zielproteins mit aufgereinigt wurden, was einen weiteren Aufreinigungsschritt notwendig macht.

### **Affinitätschromatographie via *Strep-Tactin*<sup>®</sup>**

Mit nur einer Affinitätschromatographie alleine erhält man nur ungenügend aufgereinigtes Protein. Eine MALDI-Analyse von niedermolekularen Proteinbanden nach der Ni-NTA-Aufreinigung hat unter anderem gezeigt, dass neben Chaperonen wie DnaK auch andere endogene *E. coli*-Proteine und FOXP2-Abbruchstücke in der Präparation enthalten sind. Um also die Reinheit des Zielproteins zu erhöhen, wird der Ni-NTA-Aufreinigung eine *Strep-Tactin*<sup>®</sup>-Affinitätschromatographie angehängt. Neben den zuvor aufgezählten Vorzügen (siehe Abschnitt 2.2), hat der Strep-tag auch noch weitere Vorteile. Die Aufreinigung via Strep-tag<sup>®</sup> II findet komplett unter physiologischen Pufferbedingungen statt. Im Vergleich zur Ni-NTA-Aufreinigung muss nicht mit erhöhten Salzbedingungen oder

verändertem pH-Wert gearbeitet werden. Die Konstitution des Strep-tag II/ Strep-Tactin<sup>®</sup>-Systems ermöglicht das Arbeiten in einem Bereich zwischen pH 7 und pH 8, was für FOXP2 mit einem isoelektrischen Punkt von ungefähr 6.1 ideal ist. Die Pufferbedingungen können also auf die Anforderungen des Zielproteins angepasst werden, eine Umpufferung nach der Elution wird somit überflüssig. Durch die Bündelung des getaggtten Proteins in der immobilisierten Phase in Kombination mit einem geringen Elutionsvolumen kann das Protein weiter aufkonzentriert werden. Die Strep-Tactin<sup>®</sup>-Affinitätschromatographie gewährleistet somit nicht nur Aufreinigung, sondern auch Pufferaustausch und Aufkonzentration zugleich.

Die Elution vom Strep-Tactin<sup>®</sup>-Säulenmaterial folgt, genau wie bei Ni-NTA, einer kompetitiven Verdrängung des getaggtten Proteins durch ein bestimmtes Agens. Verwendet wird hierfür D-Desthiobiotin, welches anstelle des Strep-tag<sup>®</sup> II in der Biotinbindetasche des Strep-Tactins<sup>®</sup> anbindet. Im Gegensatz zu Imidazol zeigt das Verdrängungsagens D-Desthiobiotin keine Absorption bei 280 nm und behindert somit nicht die spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung. Dies hat den Vorteil, dass das aufgereinigte Protein direkt einsatzbereit ist und nicht noch umgepuffert werden muss. In der Regel wird zur Entfernung von unerwünschten Pufferkomponenten Dialyse als Methode erster Wahl verwendet. FOXP2 hat in durchgeführten Dialyseexperimenten ein gesteigertes Aggregationsverhalten im Dialyseschlauch gezeigt, weshalb auf den Dialyseschritt verzichtet werden sollte.

Für die Aufreinigung mittels Strep-Tactin<sup>®</sup> werden die Elutionen aus der Ni-NTA-Aufreinigung vereinigt und auf die mit Strep-Tactin<sup>®</sup>-Material gefüllten Fließsäulchen gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Vom Hersteller IBA GmbH werden anschließend fünf Waschschritte empfohlen. Für die Elutionsschritte ist es empfehlenswert die Puffermenge dem Bettvolumen des Säulenmaterials anzupassen.

### **Analyse der Strep-Tactin<sup>®</sup>-Aufreinigung mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese**

Wie schon bei der Metallchelate-Affinitätschromatographie soll auch hier je ein Beispiel einer SDS-PAGE-Analyse für das Volllänge-FOXP2-GFP und die Kurzversion K271 ohne GFP gezeigt werden. In Abbildung 2.4b sieht man die SDS-PAGE einer durchgeführten Strep-Tactin<sup>®</sup>-Aufreinigung anhand von FOXP2-GFP. Im Vergleich zur Ni-NTA-Elutionsfraktion lässt sich ein Aufreinigungseffekt gut erkennen. Vergleicht man die Probe E1 vor der Strep<sup>®</sup>-tag II-Aufreinigung (Abb. 2.4a) mit den Elutionen nachher (E3 und E4), so sieht man, dass zusätzliche Proteinbanden im niedermolekularen Bereich entfernt werden konnten. Besonders in den Spuren des Durchflusses (FT) und des ersten Waschschrittes (W1) sind Proteinbanden mit Molekulargewicht zwischen 10 kDa und 80 kDa zu sehen. Diese waren zuvor in der Elutionsfraktion der Metallchelate-Affinitätschromatographie enthalten.

Die Proteinbanden der SDS-Analyse sind insgesamt sehr schwach, die Ausbeute der gesamten Aufreinigung sehr gering. Dies hängt vor allem damit zusammen, dass die eingesetzte Menge an Protein aus der Ni-NTA-Aufreinigung sehr gering und die Strep-Tactin<sup>®</sup>-Aufreinigung an diesem Punkt noch nicht optimiert war.

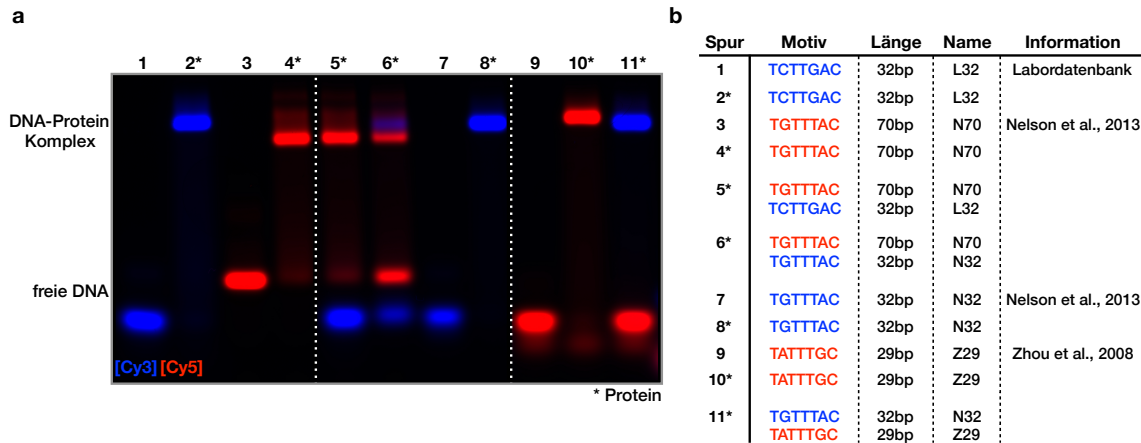
Nach Optimierung, das heißt durch Anpassen der Wasch- und Elutionsvolumina, hat die Affinitätsaufreinigung mittels Strep<sup>®</sup>-tag II besser funktioniert, zu sehen anhand des

gekürzten Konstruktes K271 (Abb. 2.4d). Die aus der Ni-NTA-Aufreinigung erhaltenen Elutionen des Zielproteins wurden vereinigt und eine Probe davon für die SDS-PAGE-Analyse aufbewahrt (NN). Man kann klar erkennen, dass das Strep-Tactin<sup>®</sup>-Säulchen überladen war, was sich im Verlust von Zielprotein schon direkt während des Beladens (FT) und auch im ersten Waschschrift (W1) zeigt. In den zwei letzten Waschschriften (W4 und W5) sieht man, dass etwas Zielprotein vom Säulchen gespült wird. Die Elutionsfraktionen wurden von fünf auf drei dezimiert und das Säulenvolumen so angepasst, dass möglichst viel des gewünschten Proteins mit der zweiten Elution (E2) herausgespült wird. Vergleicht man nun die Probe vor der Aufreinigung (NN) mit der Hauptelution (E2), so ist eine Verminderung der Proteinverunreinigungen zweifellos erkennbar. Analysiert man die Banden mit Hilfe von ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>), erhält man, trotz des Verlustes durch Überladung der Säule, eine Konzentrationssteigerung von 30% bei einer Verminderung der Verunreinigung von 43%.

### 2.2.2 Spezifität und Selektivität der DNA-Bindung

Um die Qualität des hergestellten Proteins zu verifizieren, wurden sowohl Aktivität als auch Spezifität mittels *Elektrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) mit verschiedenen DNA-Sequenzen untersucht (Abb. 2.5). Der traditionelle EMSA ist einfach, schnell und effektiv, um Interaktion von Protein und DNA zu visualisieren [138, 139]. Für die Bindestudien haben wir Sequenzen sowohl aus der Literatur als auch der DNA-Datenbank des Labors verwendet. Das in der Publikation von Nelson et al., 2013 als #175 angegebene Oligo gab die meisten Bindungsevents im MITOMI-Experiment und war somit ein guter Kandidat für die Bindungsstudien [113]. Es enthält als Consensus-Sequenz das 7-mer Bindemotiv mit der Basenabfolge TGTTTAC (N70 und gekürzte Version N32). Desweiteren wurde eine DNA-Sequenz gewählt, die von Zhou und Kollegen für Affinitätselektrophorese verwendet wurde und die Consensus-Sequenz TATTTGC (Z29) aufweist [115]. Um noch eine zusätzliche Sequenz auf Bindung zu untersuchen, wurde die DNA-Datenbank des Labors durchsucht. Das Oligonukleotid L32 weist mit TCTTGAC eine ähnliche Consensus-Sequenz auf. Die Bindemotive der DNA-Spezies (vollständige Sequenzen siehe Tabelle C.4 in Anhang C.1) sind in Abbildung 2.5b der Einfachheit halber in einer Tabelle angegeben, die auch beschreibt, welche Proben in den jeweiligen Gelspuren aufgetragen wurden.

Um die Laufweitenverschiebung (*Band Shift*) zwischen freier DNA und DNA-Proteinkomplex deutlich zu machen, wurde als Negativkontrolle jede der Oligonukleotidproben jeweils ohne Protein aufgetragen. Wie zu erwarten war, zeigen die freien DNA-Doppelstränge aufgrund ihrer unterschiedlichen Länge und dementsprechend negativer Ladung unterschiedliche Migrationsdistanzen. In der Gelmatrix wandern die kürzeren DNA-Doppelstränge L32, N32 und Z29 (Spur 1, 7 und 9) im elektrischen Feld weiter als die längere Substrat-DNA N70 (Spur 3). Durch die Interaktion mit Protein wird das proportionale Verhältnis von Molekulargewicht der Nukleinsäure zu negativer Ladung beeinflusst. Dies führt zu einer Verlangsamung ihrer Mobilität in der Gelmatrix. Folglich migrieren die sichtbar gemachten DNA-Doppelstränge im Komplex mit Protein im Gel weniger weit als ihr blankes Pendant [140–142]. Überdies kehrt sich für Protein-DNA-Komplexe das



**Abbildung 2.5 – Überprüfung der Spezifität der DNA-Bindung von humanem FOXP2.** Laserscan eines 5%igen Agarosegels in dem Gemische von Proteinkonstrukt K271 (finale Konzentration 4  $\mu$ M) mit verschiedenen DNA-Spezies (finale Konzentration 1  $\mu$ M) aufgetrennt wurden. Das Gel wurde im Typhoon<sup>TM</sup>-Scanner ausgelesen und digitalisiert. **(a)** Bild zeigt die Überlagerung der gescannten Kanäle Cy5 (rot) und Cy3 (blau). Gelspuren, die im Vergleich zum originalen Scan nicht dargestellt sind, werden durch gebrochene weiße Linien markiert. DNA-Spezies weisen unterschiedliche 7-mer Consensus-Bindemotive auf. Spuren, die DNA und Protein enthalten, sind mit Asterisk (\*) markiert. Informationen zur Beladung des Gels sind in Tabelle in **(b)** angegeben. **(b)** Tabelle gibt die 7-mer Bindemotive (**Motiv**), die Gesamtlänge (**Länge**), die zugewiesene Bezeichnung (**Name**) und die Herkunft bzw. zugehörige Literaturangabe (**Information**) der DNA-Spezies an. Die DNA-Spezies wurden entsprechend ihrer Fluoreszenzmarkierung in blau (Cy3-modifiziert) bzw. rot (Cy5-modifiziert) eingefärbt. Die vollständigen DNA-Sequenzen sind in Anhang C.1 in Tabelle C.4 angegeben

Migrationsverhalten im Gel um (Spur 2, 4, 8 und 10). Die kürzeren DNA-Doppelstränge im Komplex mit Protein wandern weniger weit als das längere Substrat N70. Größe und Ladung des Proteins haben einen stärkeren Einfluss auf kürzere DNA-Konstrukte, weshalb diese eine langsamere Mobilität aufweisen. Da in diesem Fall dasselbe Protein zur Verfügung steht, sollte die charakteristische Laufweitenverschiebung überwiegend durch die Größe und negative Ladung der DNA-Doppelstränge und weniger durch Änderung ihrer Konformation bestimmt sein.

Aussagen bezüglich der Spezifität und Selektivität lassen sich treffen, sobald dem Protein mehr als ein Bindungspartner zur Verfügung steht. Aus diesem Grund wurden DNA-Spezies mit verschiedenen Bindemotiven gemischt und anschließend mit Protein inkubiert. Kombiniert man L32 mit N70, so lässt sich erkennen, dass N70 mit der Consensus-Sequenz TGTTTAC vom Protein klar bevorzugt gebunden wird (Spur 5). Gleichmaßen verhält es sich bei der kürzeren Version der Substrat-DNA N32, die bevorzugt gebunden wird, wenn sie mit Z29 (rote Bande, Spur 11) konkurriert. Stellt man dem Protein DNA-Spezies mit identischem 7-mer Bindemotiv zur Verfügung, so werden diese gleichermaßen abgebunden, gut erkennbar anhand der unterschiedlichen Laufweitenverschiebung von Oligo N70 und N32 (Spur 6). Da von jedem dieser zwei DNA-Spezies nur die Hälfte vom Protein abgebunden wurde, bleibt die restliche DNA jeweils als ungebundene, freie DNA zurück.

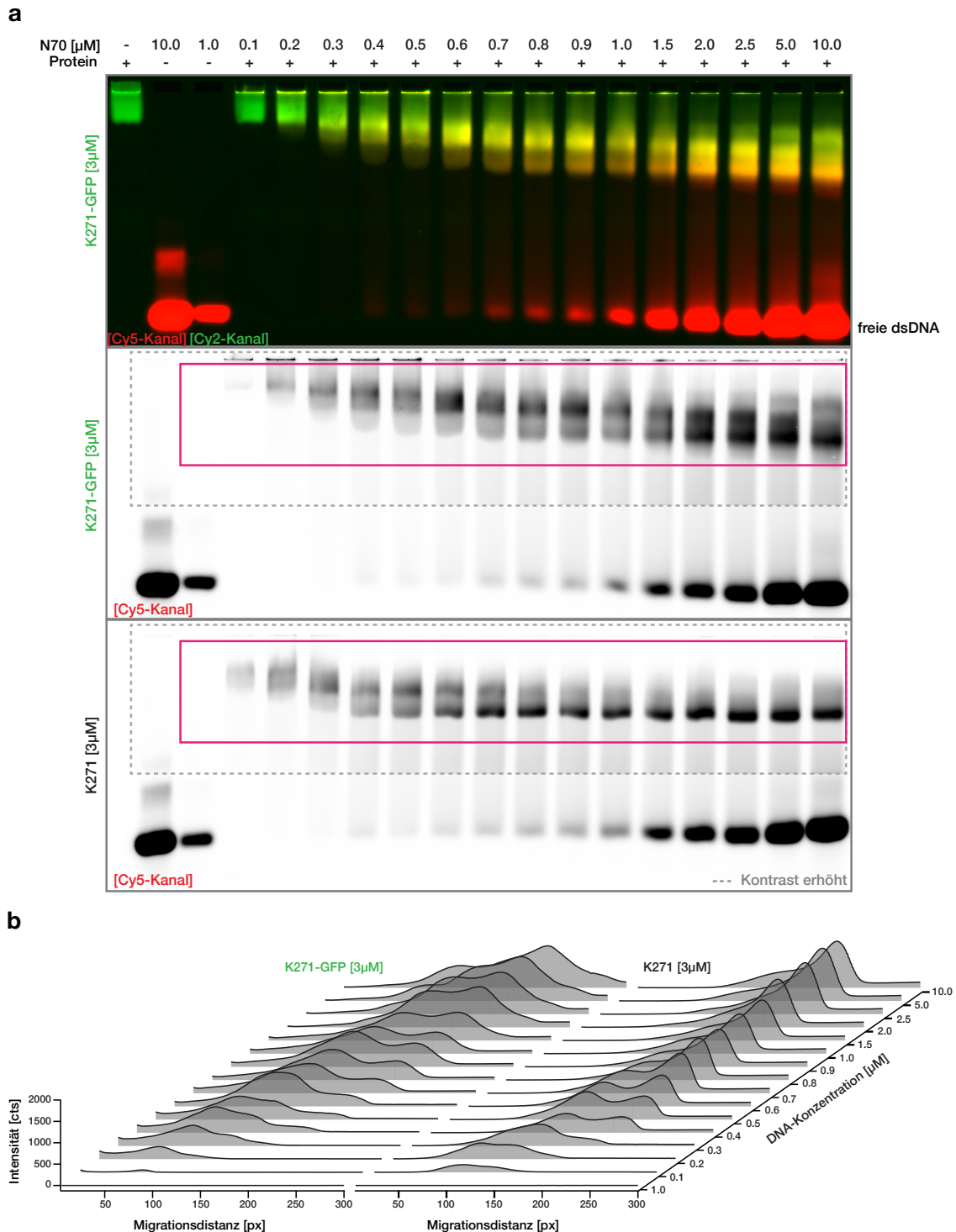
### 2.2.3 Verminderte DNA-Bindungsfähigkeit durch C-terminal angehängtes GFP?

Grün fluoreszierendes Protein (GFP), das die Löslichkeit des Proteins augenscheinlich verbessert, wurde hauptsächlich angehängt, um in späteren fluoreszenzbasierten Experimenten, wie z.B. TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence*)-Mikroskopie, eine Detektion des Proteins zu ermöglichen. Auch wenn der große Anhang für die Herstellung von FOXP2 in voller Länge von Vorteil ist, so kann GFP jedoch in Bezug auf spätere DNA-Bindeversuche zum Nachteil werden. Die Lage am C-Terminus und der damit verbundenen großen Nähe zur DNA-bindenden Forkhead-Domäne legt eine sterische Hinderung bei der Interaktion mit DNA nahe. Aus diesem Grund wurde die DNA-Bindfähigkeit des Proteinkonstruktes K271 mit C-terminalem GFP-Protein im Vergleich zu Protein ohne GFP-Anhängsel mittels EMSA untersucht (Abb. 2.6).

Anhand des GFP-Tags lässt sich die Laufweite des Proteins selbst im Gel detektieren (Abb. 2.6a, oben). Sobald DNA zum Protein gegeben wird, wird dieses durch Bildung eines Komplexes weiter ins Gel gezogen. Der Farbverlauf von grün über gelb, orange nach rot zeigt auf, wie sich durch Steigerung der DNA-Konzentration das Verhältnis von Protein zu DNA verändert. Weniger weit migrierende Protein-DNA-Komplexe enthalten überwiegend K271-GFP. Komplexe, die immer mehr DNA-Doppelstränge enthalten, werden durch die zusätzliche negative Ladung weiter in die Gelmatrix gezogen. Es entsteht ein Bild von mehreren semi-distinkten Banden, die sich aufgrund ähnlichem Verhältnis von Protein zu DNA abgrenzen. Jedoch wird die Protein-DNA-Bindung vermehrt durch Schmier dominiert, der einen fließenden Übergang zwischen den Protein-DNA-Komplexen vermuten lässt. Es entsteht der Eindruck, dass die Interaktion von Protein mit den DNA-Doppelsträngen wenig robust ist und stabile Komplexe deshalb nicht ausgebildet werden.

Vergleicht man die DNA-Bindung von K271-GFP mit K271 anhand der DNA-Mobilität, so kann man einen klaren Unterschied erkennen (Abb. 2.6a, mitte bzw. unten). Das Konstrukt ohne GFP bindet stärker an die DNA-Doppelstränge, was sich durch weniger Schmier und distinktere Banden darstellt. Schon niedrigere DNA-Konzentrationen verursachen klarere Banden von Protein-DNA-Komplexen. Bei einem Protein-DNA-Verhältnis von ungefähr 8:1 formieren sich bereits zwei schwache distinkte Banden, die mit steigender DNA-Konzentration konkreter werden. Ab einem Verhältnis von 4:1 von Protein zu DNA verstärkt sich die Bande mit der größeren relativen Mobilität weiter, wohingegen die langsamere Bande nach und nach an Intensität verliert. Nachdem die langsamere Bande verschwunden ist, manifestiert sich eine weitere Erhöhung der DNA-Konzentration nicht mehr merklich in einer Intensitätserhöhung der schnelleren Bande. Insgesamt lässt sich für die DNA-Bindung von K271 weniger Schmier detektieren, was für einen stabileren Protein-DNA-Komplex spricht. Besser zu erkennen ist dieser Effekt in der Darstellung der Bandenprofile als Wasserfall-Diagramm (Abb. 2.6b).

Das EMSA-Experiment zeigt sowohl für FOXP2-GFP als auch für FOXP2, dass es sich bei der DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors um keine einfache bimolekulare Reaktion handelt. Es können jeweils mehrere Banden mit unterschiedlichem Verhältnis von Protein zu DNA detektiert werden. Außerdem hat, wie bereits vermutet, das C-terminale GFP einen Einfluss auf die Ausbildung stabiler DNA-Protein-Komplexe. Das 27 kDa große GFP behindert sehr wahrscheinlich die Assoziation von FOXP2 an DNA. Die Ergebnisse legen nahe, dass für weitere DNA-Bindestudien auf das Anhängsel verzichtet werden sollte.





## 2.3 Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen

Die Aufreinigung von Proteinen ist ein essentieller erster Schritt auf dem Weg ihre Funktion zu verstehen. Doch nicht alle Proteine lassen sich auf natürlichem Wege, also nativ, aufreinen. Die Zielsetzung FOXP2 in voller Länge aufzureinigen hat als GFP-Fusionsprotein funktioniert. Die Ausbeute ist zwar gering, aber durch Hochskalieren sollte es möglich sein mehr Produkt zu erzielen. Die Volllängeversion von FOXP2 ohne C-terminales GFP ließ sich jedoch nicht erfolgreich herstellen. Ein Problem war unter anderem die misslungene Extraktion aus der Zelle. FOXP2 ist aufgrund seines langen Polyglutamintraktes schon während der Expression in *E. coli* anfällig für Aggregation. Die Folge: Die Bakterienzellen verpacken Protein, dass in großen Mengen synthetisiert wird, fehlgefaltet ist oder zur Aggregation neigt in Granuala, sogenannte Einschlusskörperchen (*Inclusion Bodies*), um den eigenen Organismus zu schützen [119,143]. Rekombinante Fusionsproteine, die größere Anhäufung wie GST, MBP, SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*) oder auch GFP enthalten, scheinen davor geschützt zu sein, da sie eine höhere Löslichkeit aufweisen [128,144,145].

### Kann FOXP2 erfolgreich rückgefaltet werden?

Als Möglichkeit FOXP2 in voller Länge herzustellen, sollte die Extraktion unter denaturierenden Bedingungen getestet werden. Das denaturierte Protein verliert dabei seine native Faltung und somit auch seine Funktionsfähigkeit. Nach der Aufreinigung muss es also wieder durch Rückfaltung in seine native, aktive Form gebracht werden. Diese Rückfaltung, auch Renaturierung genannt, funktioniert nicht mit allen Proteinen gleichermaßen gut. Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt, es wird aber vermutet, dass bei der Entfaltung durch die Wechselwirkungen mit dem Denaturierungsmittel eine neue, offenere Konformation stabilisiert wird. Nach Entfernung des Denaturierungsmittels wird diese offene Konformation wieder reversibel aufgelöst. Ob es möglich ist, FOXP2 nach der Denaturierung wieder in seine native Konformation zu bringen, sollte durch spezifische DNA-Bindung sichtbar gemacht werden können. Die denaturierende Aufreinigung und anschließende Renaturierung wurde anhand des K271-Kurzkonstruktes etabliert und dann am Volllängekonstrukt getestet.

### Unter denaturierenden Bedingungen fällt der Lyseschritt weg

Da bei der Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen die Zellpellets nach der Ernte mit hohen Konzentrationen denaturierender Agenzien, wie Harnstoff (8 M) oder Guanidiniumchlorid (6 M), behandelt werden, müssen die Zellen nicht mehr mechanisch oder enzymatisch aufgeschlossen werden. Auch der Einsatz von Proteaseinhibitoren oder Benzonase ist überflüssig, da Proteasen zerstört werden und die Bindung von Proteinen an DNA unterbunden wird. Starke Denaturierungsmittel lösen Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und bei Zugabe von Reduktionmittel auch Disulfid-Brücken, andere kovalente Bindungen werden nicht aufgebrochen. Dies geschieht nicht nur bei dem aufzureinigenden Zielprotein, sondern auch bei allen anderen Zellbestandteilen, was die

Bakterienzelle schlussendlich kollabieren lässt. Nach ausreichender Inkubation bei Raumtemperatur oder sogar höheren Temperaturen von 30 °C bzw. 37 °C erhält man eine klare Suspension. Diese wird nach einem Zentrifugationsschritt mit Ni-NTA-Granulat inkubiert. Umständliche Kühlung oder das Arbeiten auf Eis sind nicht notwendig.

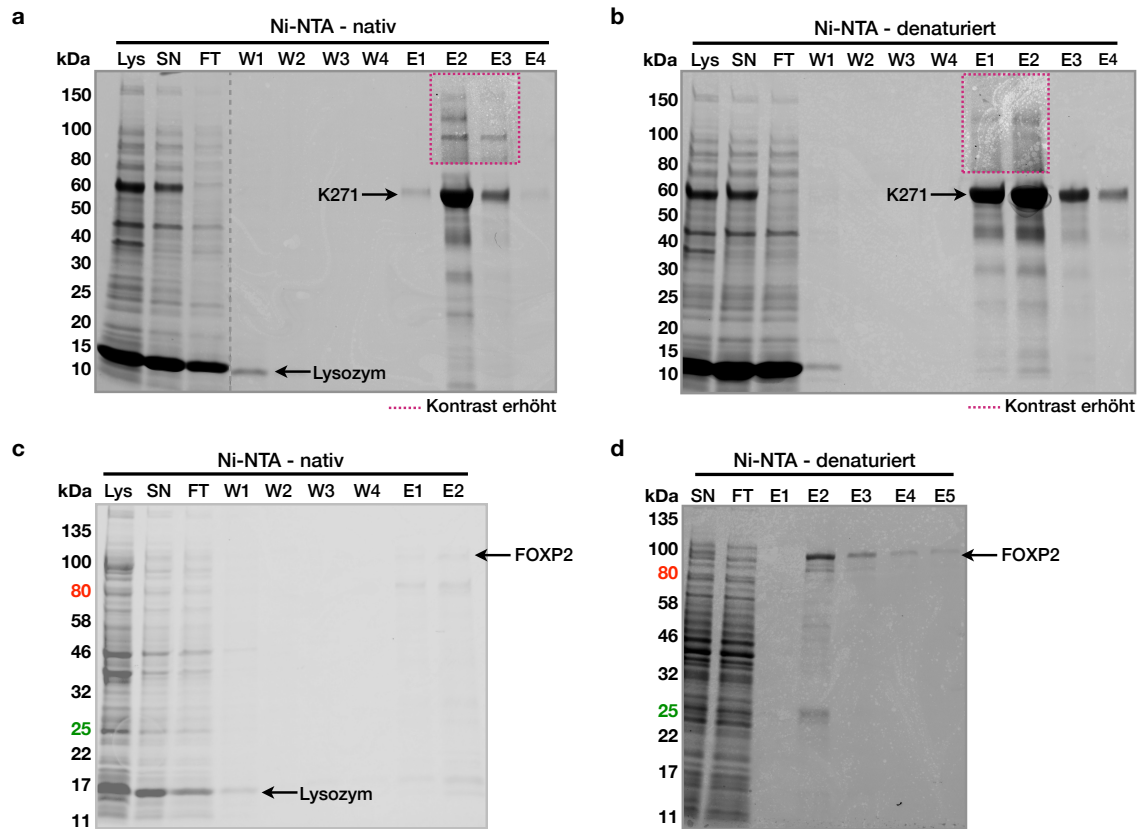
### **SDS-PAGE Analyse der denaturierenden im Vergleich zur nativen Aufreinigung**

In diesem Abschnitt soll nun auf die Ergebnisse der Ni-NTA-Aufreinigungen unter nativen Bedingungen im Vergleich zu denaturierenden Bedingungen eingegangen werden. Dies geschieht anhand von SDS-PAGE-Analysen von Aufreinigungen des Konstruktes K271 (Abb. 2.7a und 2.7b) und des Volllängekonstruktes FOXP2 (Abb. 2.7c und 2.7d).

Für die Aufreinigung von K271 wurde der selbe Expressionsansatz in gleich große Portionen aufgeteilt und die native bzw. denaturierende Reinigung wurden am selben Tag parallel durchgeführt. Während der Zellaufschluss unter nativen Bedingungen enzymatisch und mechanisch durchgeführt wurde (Kapitel 2.2.1), wurden die Zellen unter denaturierenden Bedingungen durch Inkubation in 8 M Urea aufgeschlossen.

Die einzelnen Aufreinigungsschritte in den Abbildungen 2.7a und 2.7b sollen direkt verglichen werden. In den Spuren, in denen Lysat (Lys) aufgetragen wurde, ist die Bande des Zielproteins vergleichbar stark. Doch schon in den beiden Spuren, die den Überstand (SN) enthalten, ändert sich dies. Die extrahierte Menge an Zielprotein K271 nach dem Aufschluss unter denaturierenden Bedingungen ist deutlich größer als die freigesetzte Menge unter nativen Bedingungen. Vergleicht man Lysat und Überstand des Aufschlusses unter denaturierenden Bedingungen direkt miteinander, so lässt sich vermuten, dass das gesamte exprimierte Protein auch extrahiert werden konnte (Abb. 2.7b). Unter nativen Bedingungen konnte nur ungefähr die Hälfte des Zielproteins aus den Zellen extrahiert werden (Abb. 2.7a). Dieser Sachverhalt schlägt sich natürlich auch auf die finale Ausbeute nieder. Da im selben Volumen eluiert wurde, lässt sich sehr gut erkennen, dass unter denaturierenden Bedingungen deutlich mehr Zielprotein von der Matrix gelöst werden konnte (E1 bis E4, Abb. 2.7a und b).

Die Reinheit der Elutionsproben ist auf den ersten Blick vergleichbar. Wird in beiden Scans aber der Kontrast gleichermaßen erhöht, so lässt sich eine verhältnismäßig stärkere Verunreinigung der Elutionsfraktionen der nativen Aufreinigung erkennen. Die klar erkennbaren höhermolekularen Banden gehören wahrscheinlich zu co-aufgereinigten Chaperonen. Bei der Volllängeversion von FOXP2 zeigt sich eine ähnliche Tendenz. Die native und denaturierende Aufreinigung wurden hier nicht wie im Fall von K271 synchronisiert, sondern sind aus unterschiedlichen Expressionsansätzen und an unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Trotz der nicht direkten Vergleichbarkeit, lassen sich Unterschiede in der Aufreinigungsqualität erkennen. Unter nativen Bedingungen geht schon während des Zellaufschlusses ein Großteil des Zielproteins verloren (Abb. 2.7c). Obwohl im Lysat (Lys), das lösliche als auch unlösliche Bestandteile enthält, noch deutlich eine Überexpressionsbande zu sehen ist, erkennt man in der Spur, die die löslichen Zellbestandteile (SN) enthält, auf der erwarteten Höhe des Zielproteins (83 kDa) keine Bande. In den Elutionen lässt sich eine leichte Bande des Zielproteins detektieren, sie fällt aber im Vergleich zu anderen Proteinbanden in der Probe deutlich schwächer aus. Diese Aufreinigung hat nicht funktioniert. Unter denaturierenden Bedingungen ist in der Spur des Überstandes (SN) eine sehr



**Abbildung 2.7 – Ni-NTA-Aufreinigung von K271 und Volllänge-FOXP2 unter nativen und denaturierenden Bedingungen.** Laserscans von 4-20%igen Gradientengelen. SDS-PAGE-Gele wurden mit Roti<sup>®</sup>-Blue quick Lösung gefärbt und im Cy5-Kanal des Typhoon<sup>™</sup>-Scanners ausgelesen und digitalisiert. [Lys] Ly-sat, [SN] Überstand, [FT] Durchfluss, [W1-W4] Waschschrirte, [E1-E5] Elutionsschritte. SDS-PAGE-Analyse der Aufreinigungen von K271 unter **(a)** nativen und unter **(b)** denaturierenden Bedingungen. Grauwerte der Scans für (a) und (b) sind vergleichbar, da die Aufreinigungen parallel durchgeführt und von den Proben jeweils das selbe Volumen aufgetragen wurden. Gelelektrophoresen wurden synchron in der selben Gel-apparatur durchgeführt, Färbezeit war identisch und Gele wurden in einem Scan digitalisiert. Box: Kontrast selektiv angepasst. **(c)** SDS-PAGE-Analyse der Aufreinigung von Volllänge-FOXP2 ohne GFP unter nativen und **(d)** denaturierenden Bedingungen.

schwache Bande des Zielproteins zu erkennen, die in der Spur des Durchflusses nicht mehr sichtbar ist. Das Protein hat vollständig an die Ni-NTA-Kügelchen gebunden. Im Vergleich zu der Menge im Überstand kann FOXP2 in der Elution (E2) etwas angereichert werden. (Abb. 2.7d). Die Aufreinigung lässt sich durch Hochskalieren und Anpassen der Elutionsvolumina noch weiter optimieren. Die Reinheit kann durch einen weiteren Aufreinigungsschritt (siehe Kapitel 2.2.1) verbessert werden.

### Aggregation bei der Rückfaltung soll vermieden werden

Die große Herausforderung bei der Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen ist die Rückfaltung des Zielproteins in seine native Konformation. Normalerweise wird diese Rückfaltung im Anschluss an die Aufreinigung durchgeführt und bedeutet im eigentlichen Sinne das Entfernen des Denaturierungsmittels. Dazu wird die Proteinlösung entweder gegen einen Rückfaltungspuffer dialysiert, oder das denaturierte Protein wird schlagartig um das 15- bis 60-fache seines Volumens verdünnt (*Flash Dilution*) [146, 147]. Bei beiden Methoden wird das Protein stark verdünnt, und muss anschließend aufkonzentriert werden.

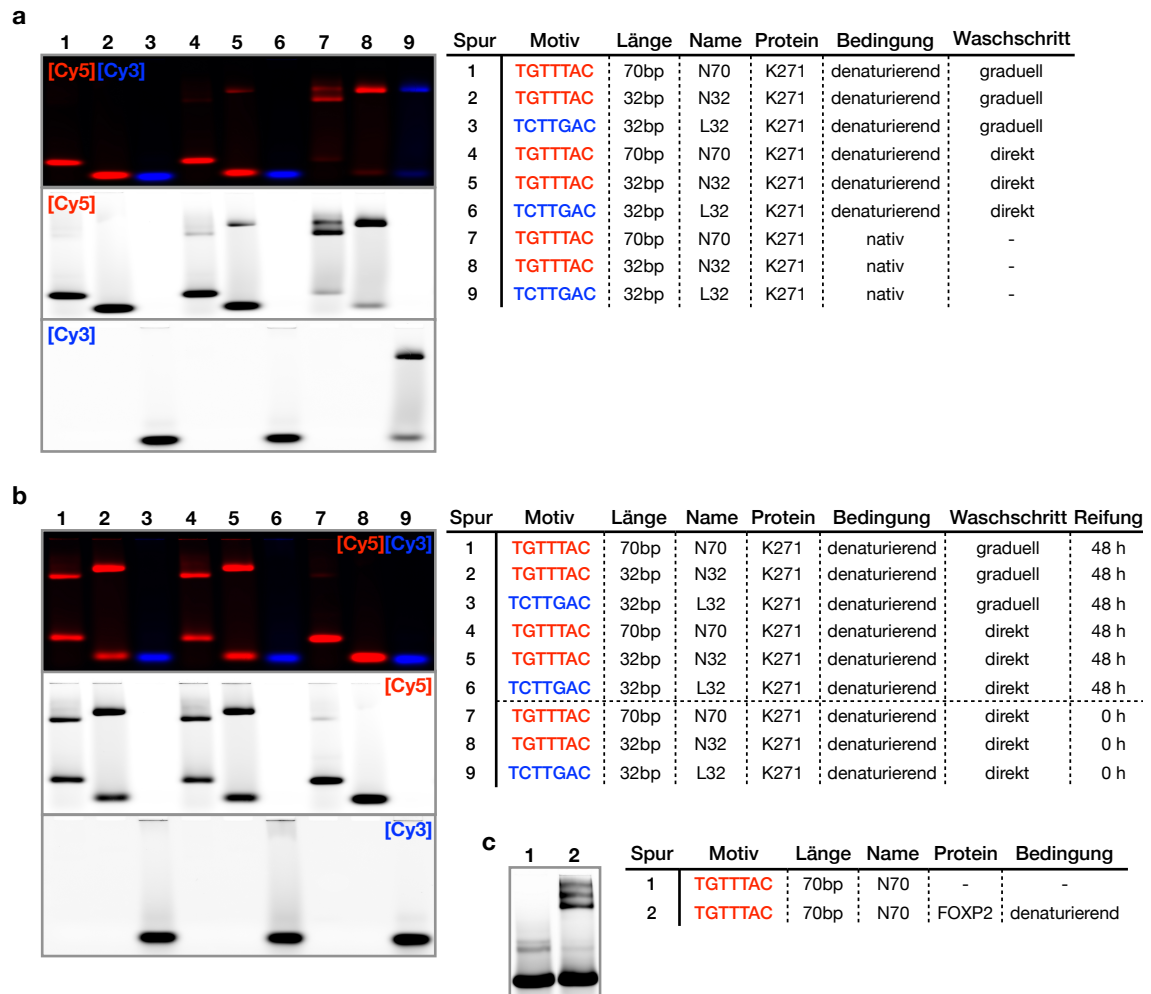
Bei denaturierten Proteinen liegen hydrophobe Abschnitte, die in nativer Konformation im Innern verborgen sind, frei und können mit Proteinen in unmittelbarer Nähe, die auch hydrophobe Regionen freigelegt haben, wechselwirken. Die denaturierten Proteine sollen deshalb rückgefaltet werden, solange sie an der Ni-NTA-Matrix immobilisiert sind. Die Strategie, Proteine auf diese Weise zurückzufalten, zielt darauf ab Proteinaggregation und Verdünnung während des Renaturierungsprozesses zu vermeiden und somit eine größere Ausbeute an aktivem Protein zu erzeugen [148–152]. Durch Fixierung an den Ni-NTA-Kügelchen ist der Abstand zwischen zwei Proteinen so groß, dass hydrophobe Abschnitte nicht mehr miteinander wechselwirken können. Ohne Störung durch benachbarte Proteine kann das Zielprotein in seinen nativen Ausgangszustand zurückgefaltet werden. Ein weiterer Vorteil der Immobilisierung auf den Agarose-Kügelchen ist, dass der Rückfaltungsprozess zeitlich variiert werden kann. Die Rückfaltung sollte durch Waschschriffe mit nativem Puffer initiiert werden, indem Urea entfernt wird. Es wurden zwei verschiedene Herangehensweisen getestet.

### Graduelle oder direkte Entfernung von Urea?

Für die Zerstörung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen sind denaturierende Agenzien in sehr hohen Konzentrationen notwendig. Die Denaturierung mittels Harnstoff verlangt eine Konzentration von 8 M. Diese und auch niedrigere Konzentrationen von Urea stören wiederum bei der Rückfaltung und müssen für die Stabilisierung der nativen Konformation fast vollständig entfernt werden. Es gibt zwei Möglichkeiten den Harnstoffanteil loszuwerden. Einerseits kann die Ureakonzentration durch eine schrittweise Reduzierung langsam runterverdünnt werden. Für diese graduelle Entfernung von Urea wurden mehrere Waschschriffe mit geringeren Konzentrationen (6 M, 4 M und 2 M) bis hin zu Puffer ganz ohne Urea durchgeführt. Andererseits wird der Harnstoff direkt in allen Waschschriffen weggelassen, was eine schlagartige Verdünnung entsprechend der *Flash Dilution* darstellt. Beide Methoden wurden getestet, für eine besserer Vergleichbarkeit wurden die Aufreinigungen parallel durchgeführt.

#### 2.3.1 DNA-Bindung gibt Auskunft über die Renaturierungsqualität

Die Rückfaltungsqualität des aufgereinigten Proteins wurde in DNA-Bindungsexperimenten getestet (Abb. 2.8). Bindet das aufgereinigte Protein an die Substrat-DNA, so bedeutet



**Abbildung 2.8 – Überprüfung der DNA-Bindfähigkeit von FOXP2-Konstrukten, die unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt wurden.** Laserscans von 5%igen Agarosegelen in denen Gemische von Protein und DNA aufgetrennt wurden. Gele wurden in Typhoon<sup>TM</sup>-Scanner ausgelesen und digitalisiert. Gezeigt sind jeweils die Überlagerung der Kanäle Cy5 (rot) und Cy3 (blau) sowie die Einzelscans. Beladungsschemata und Informationen bezüglich DNA-Spezies und Proteinherstellung sind in den Tabellen angegeben. **(a)** Qualitätskontrolle des unter denaturierenden und nativen Bedingungen aufgereinigten Proteins K271. Rückfaltungsqualität bei gradueller im Vergleich zu direkter Entfernung von Urea. **(b)** Qualitätskontrolle von renaturiertem K271 nach zweitägiger Lagerung im Kühlschrank im Vergleich zu frisch aufgereinigtem Protein. **(c)** Cy5-Scan zeigt die DNA-Bindfähigkeit von renaturiertem Volllänge-FOXP2.

dies im Umkehrschluss, dass das Protein erfolgreich in seine native Ausgangskonformation überführt und seine Funktionsfähigkeit wieder hergestellt werden konnte. Genau wie bei der nativen Aufreinigung (Abschnitt 2.2.2, Abb. 2.5) wurde die Proteinqualität anhand von Bindung verschiedener DNA-Spezies (N70, N32 und L32) in EMSA-Gelen untersucht. Die DNA-Bindung von denaturierend aufgereinigtem K271 im Vergleich zu nativ hergestelltem K271 wurde getestet (2.8a). In den Spuren 7 bis 9 lässt sich gut erkennen, dass das nativ aufgereinigte Protein die beiden Hauptsubstrate N70 und N32 bindet. Im

Vergleich dazu zeigt das denaturierend aufgereinigte Protein nur zu Teilen Aktivität (Spuren 1 bis 6). Hierbei muss allerdings zwischen den zwei Rückfaltungsmethoden unterschieden werden. Die Rückfaltung des Proteins durch direkte Entfernung von Urea funktioniert auf den ersten Blick besser als die graduelle Verdünnung. Dies wird im direkten Vergleich im Laserscan des Cy5-Kanals klar erkennbar (Abb. 2.8a). In den Spuren 4 und 5 ist Interaktion von Protein mit DNA detektierbar, in den Spuren 1 und 2 lässt sich fast keine DNA-Bindung erkennen. Das nativ aufgereinigte Protein hingegen bindet fast vollständig die zur Verfügung stehenden DNA-Doppelstränge (Spur 7 und 8).

Spezifische Interaktion mit L32 lässt sich im Cy3-Kanal nur für das nativ aufgereinigte Protein detektieren (Spur 9). Protein, das unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt wurde (Spur 3 und 6), zeigt keine DNA-Bindung (Abb. 2.8a).

Gibt man dem Protein nach der Elution jedoch etwas Zeit, so maturiert es und erlangt seine Aktivität langsam wieder zurück. Protein, das nach der Aufreinigung für ungefähr zwei Tage auf Eis im Kühlschrank gelagert wurde, zeigte eine bessere DNA-Bindfähigkeit als Protein, das direkt nach der Aufreinigung für Bindeversuche genutzt wurde (Abb. 2.8b). Die Ergebnisse der EMSA-Experimente lassen vermuten, dass die Renaturierung des Proteins direkt nach der Elution noch nicht vollständig abgeschlossen war. Dabei macht es offensichtlich keinen großen Unterschied, ob Urea während der Aufreinigung graduell oder direkt entfernt wurde (Spuren 1 und 2 bzw. 4 und 5).

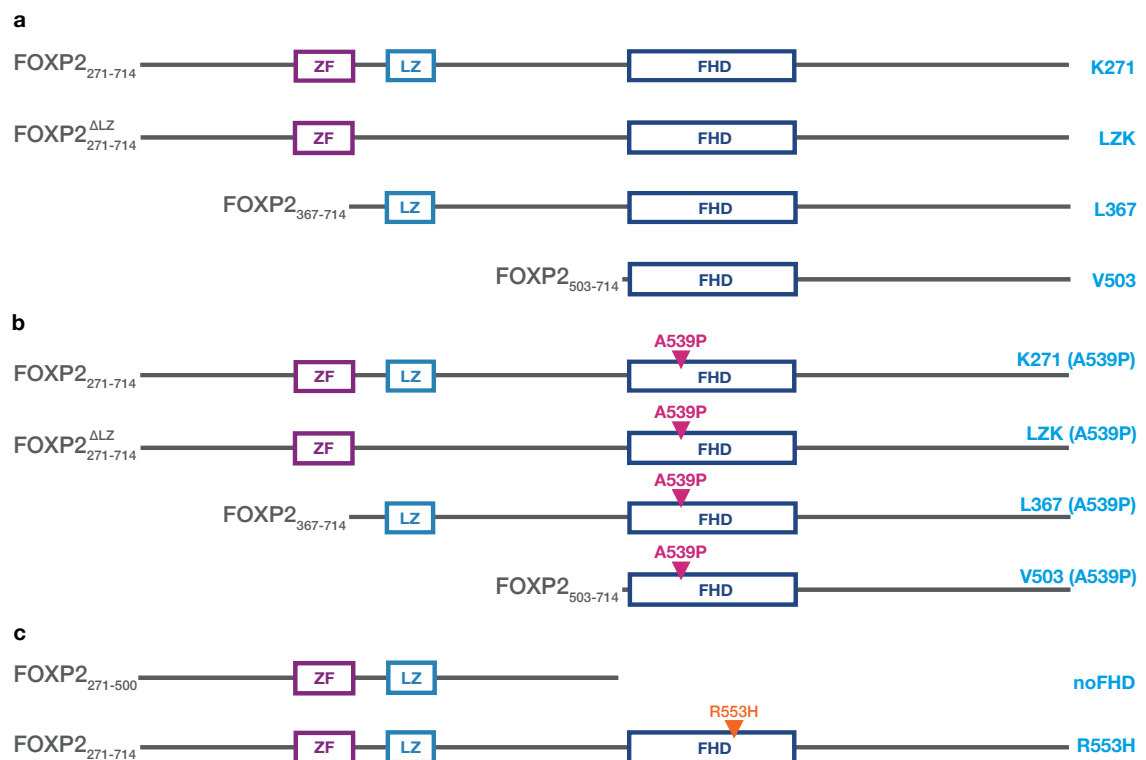
Betrachtet man die Spezifität der DNA-Bindung, so zeigt sich, dass die native Konformation von K271 auch nach längerer Maturierungszeit nicht vollständig wieder hergestellt werden konnte. Das renaturierte Protein bildet keine Komplexe mit der weniger affinen DNA-Sequenz L32 aus. Offensichtlich ist spezifische Interaktion des Proteins mit DNA nicht möglich. Für die Proben, die 48 Stunden maturierten, lässt sich im Gegensatz zu den frischen Proben ein Schmier detektieren (Spur 3, 6 und 9), der ein Hinweis darauf sein könnte, dass die Spezifität der DNA-Bindung durch vollständige Renaturierung wieder erreicht werden kann (Abb. 2.8b).

Die Ergebnisse der Bindestudien bestätigen, dass die Rückfaltung des Proteinkonstruktes in seine native Konformation noch nicht vollständig war. Die Vermutung liegt nahe, dass FOXP2 eine semi-aktive Zwischenkonformation eingenommen hat, die zwar das Hauptsubstrat spezifisch bindet, Sequenzen die von dessen Bindemotiv abweichen aber nicht erkennt. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Inkubation in Rückfaltungspuffer zu kurz war. Durch längere Einwirkzeit ließe sich die native Konformation wahrscheinlich wieder herstellen.

Die durch die Aufreinigungsexperimente von K271 erlangten Erkenntnisse konnten nun für die Reinigung von Volllänge-FOXP2 angewendet werden. Die Entfernung von Urea wurde nicht schrittweise sondern direkt durchgeführt und dem Protein wurde wesentlich länger Zeit für die Rückfaltung gegeben. FOXP2 wurde diesmal über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Rotationsrad inkubiert. Die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen und die Rückfaltung in eine aktive Form hat auch für das komplette FOXP2-Konstrukt funktioniert; es ist klar Interaktion mit dem Hauptsubstrat N70 detektierbar (Abb. 2.8c). Ob auch spezifische DNA-Bindung an andere Sequenzen möglich ist, wurde nicht getestet.

## 2.4 Proteinkurzkonstrukte von humanem FOXP2

Um die Motive und Domänen von FOXP2 und deren Einfluss auf die DNA-Bindung genauer zu charakterisieren, wurden Kurzkonstrukte mit der nativen Aufreinigungsmethode aus Kapitel 2.2 hergestellt. Hier soll nun zuerst auf die Proteinkonstrukte eingegangen werden und anschließend wird anhand von drei dieser Konstrukte (K271, L367 und V503) die DNA-Bindung in EMSA-Gelen gezeigt.



**Abbildung 2.9 – Proteinkonstrukte des Transkriptionsfaktors humanes FOXP2.** Schematische Darstellung der Primärstruktur der in dieser Arbeit verwendeten Kurzkonstrukte **(a)** des FOXP2-Wildtyps und **(b)** mit Alanin-Prolin-Substitution in Position 539 (A539P, pink), die im Verdacht steht Domänaustausch zu unterbinden. **(c)** Kontrollkonstrukte von FOXP2 ohne DNA-Bindedomäne (noFHD) und des K271-Konstruktes mit der R553H-Substitution (orange), die für die Sprech- und Sprachkrankheit verantwortlich ist (R553H). In Indizes ist der Umfang des jeweiligen Konstruktes angegeben in Bezug auf die volle Länge des humanen FOXP2 Transkriptionsfaktors (Isoform 1). Informationen hinsichtlich der Proteinsequenz wurden der Datenbank UniProt Knowledgebase (<http://www.uniprot.org>) entnommen [Eintrag O15409-1; FOXP2\_HUMAN]. Die den Konstrukten zugewiesenen Namen sind auf der rechten Seite in blau angegeben. Sie setzen sich zusammen aus der jeweils ersten Aminosäure (Einbuchstabencode) und deren Position im Protein. Einzige Konstrukte mit Leucin-Zipper-Knockout (LZK), ohne Forkhead-Domäne (noFHD) und mit Sprachmutation (R553H) entgehen dieser Notation. Dargestellt sind der C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger (ZF, lila), der Leucin-Zipper (LZ, hellblau) und die Forkhead-Domäne (FHD, dunkelblau).

Verschiedene N-terminal gekürzte Proteinkonstrukte von humanem FOXP2 wurden generiert (Abb. 2.9). Um den Beitrag der verschiedenen Motive und Domänen auf die

DNA-Bindefähigkeit zu untersuchen, wurde Konstrukt K271 hergestellt, das alle offensichtlichen DNA-bindungsfähigen Bestandteile Zinkfinger (ZF), Leucin-Zipper (LZ) und Forkhead-Domäne (FHD) enthält (Abb. 2.9a). Ausgehend von diesem Konstrukt wurden weitere Kurzkonstrukte mit ausgeknocktem Leucin-Zipper (LZK) bzw. entferntem Zinkfinger (L367) designt. Für den Leucin-Zipper-Knockout wurden die für die Dimerisierung verantwortlichen drei Leucine in heptatischer Position zu Alaninen mutiert. Die basische Region des Leucin-Zippers, die für die eigentliche DNA-Bindung zuständig ist, wurde nicht verändert. Desweiteren wurde ein Proteinkonstrukt generiert, welches nur noch die Forkhead-Domäne enthält (V503).

Von allen beschriebenen Konstrukten wurden außerdem Varianten mit der Aminosäuresubstitution Alanin zu Prolin (A539P) hergestellt (Abb. 2.9b), um den etwaigen Einfluss von Domänenaustausch in der Forkhead-Domäne auf die DNA-Bindung zu untersuchen. Für Kontrollexperimente wurden zwei weitere Proteinkonstrukte entworfen (Abb. 2.9c). Das Konstrukt mit dem Namen „noFHD“ enthält zwar sowohl Zinkfinger als auch Leucin-Zipper, dafür wurde es C-terminal gekürzt, um die Forkhead-Domäne zu entfernen. Des Weiteren wurde in das K271-Konstrukt die Sprech- und Sprachkrankheit verursachende Mutation R553H eingebracht [16, 21].

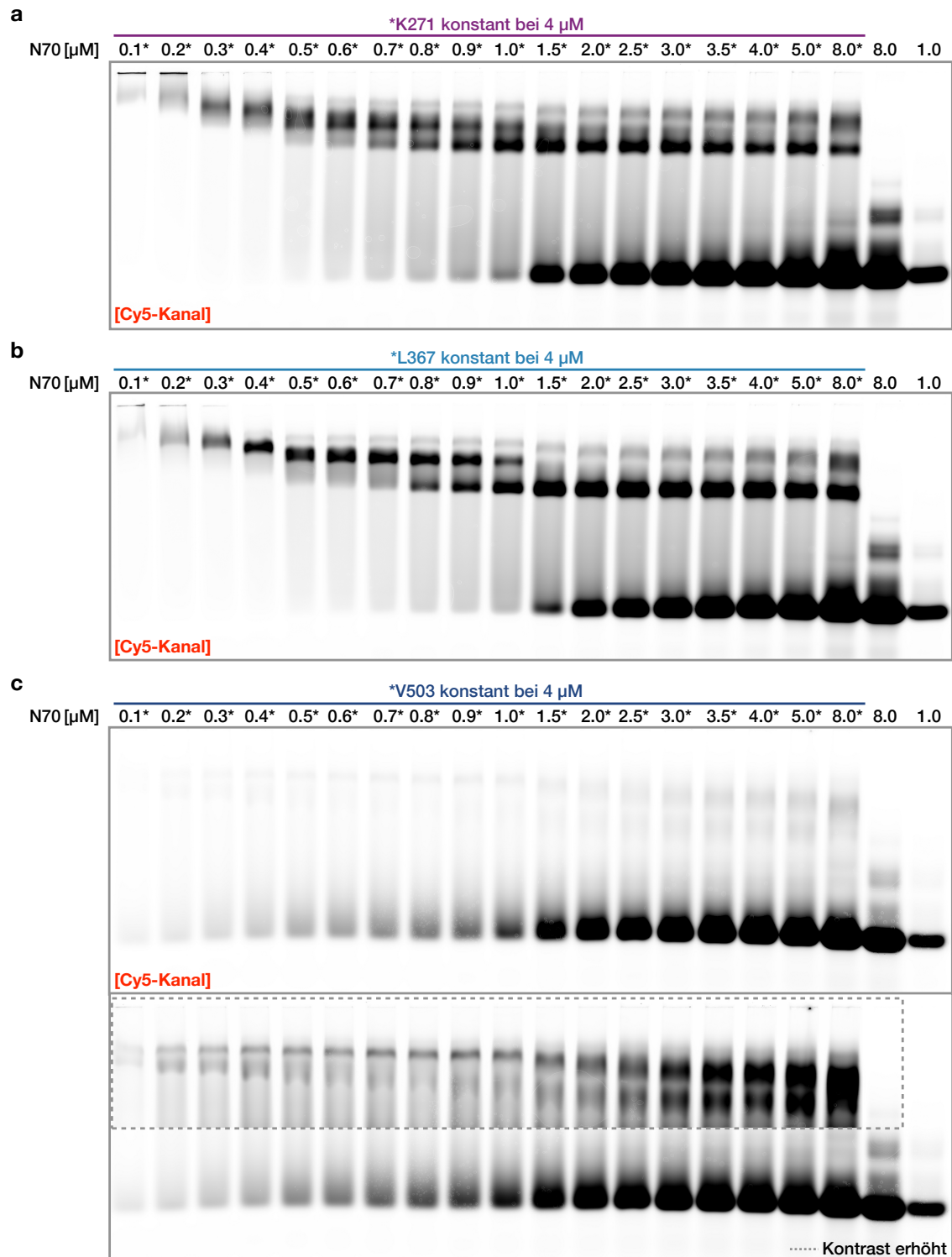
### 2.4.1 Interaktionsanalyse mittels EMSA

Im Zuge dieser Arbeit wurden viele EMSA-Gele durchgeführt, die verschiedene Fragestellungen adressieren sollten. Hier sollen dennoch nur drei repräsentative DNA-Bindegele für die Proteinkonstrukte K271 (ZF-LZ-FHD), L367 (LZ-FHD) und V503 (FHD) gezeigt werden (Abb. 2.10).

Wie auch schon bei dem zuvor gezeigten EMSA (Abb. 2.6) zu sehen ist, kann die DNA-Bindung von FOXP2 nicht durch eine einfache bimolekulare Reaktion beschrieben werden. Bei steigender DNA-Konzentration bilden sich sowohl für das K271-Konstrukt als auch für das L367-Konstrukt mehrere prominente Banden und Schmier aus. In beiden Fällen binden Protein und DNA in einem ungefähren Verhältnis von 4:1, sodass keine freie DNA mehr zu sehen ist. Nach weiterer Erhöhung der DNA-Konzentration lässt sich hingegen wieder freie DNA detektieren. Bei den dominierenden Banden handelt es sich um angereicherte Komplexe in der Gelmatrix mit gleichem oder ähnlichem Protein-DNA-Verhältnis [153]. Der Schmier hingegen spricht für Dissoziation der Komplexe und zeigt die Instabilität der Protein-DNA-Bindung im EMSA auf. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Bindungsreaktion während der Gelelektrophorese nicht im Gleichgewicht vorliegt [141]. Eine Quantifizierung der DNA-Bindung von FOXP2 anhand von Affinitätsgelelektrophorese ist aufgrund dieser Tatsache nicht möglich.

Die beiden längeren Proteinkonstrukte K271 und L367 weisen auf den ersten Blick eine ähnliche DNA-Bindungsaffinität auf (Abb. 2.10a und 2.10b). Bei genauerem Hinsehen aber erkennt man, dass das L367-Konstrukt stabilere Komplexe mit der DNA bildet. Die höhere Stabilität zeigt sich durch distinktere Banden, die weniger verschmieren und somit weniger dissoziierte Komplexe enthalten. Die Protein-DNA-Komplexe des L367-Konstruktes reichern sich je nach DNA-Konzentration in zwei klaren Banden an. Im Fall von K271 hingegen bilden sich mehr als zwei Banden aus, die dafür aber geringere Intensitäten





**Abbildung 2.10 – DNA-Interaktionsstudien von Kurzkonstrukten von humanem FOXP2.** Laserscans von 5%igen Agarosegelen in denen Gemische von Proteinkonstrukten **(a)** K271 (ZF-LZ-FHD), **(b)** L367 (LZ-FHD) und **(c)** V503 (FHD) und Cy5-modifizierter, doppelsträngiger DNA (N70) aufgetrennt wurden. DNA-Konzentration ist über den Spuren angegeben. Spuren, die DNA und Protein enthalten, sind mit einem Asterisk (\*) markiert. Gele wurden im Cy5-Kanal des Typhoon<sup>TM</sup>-Scanners ausgelesen und digitalisiert. Box: Kontrast selektiv angepasst.

aufweisen. Hinzu kommt, dass sich sich mehr Verschmierungen detektieren lassen, was auf dissoziierende Komplexe hinweist. Die zusätzlichen Banden migrieren langsamer und enthalten vermutlich mehr Protein. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass K271 zusätzlich zum Leucin-Zipper noch einen Zinkfinger enthält. Beide Proteinmotive können Protein-Protein-Interaktion vermitteln und das K271-Konstrukt wäre somit in der Lage höhergeordnete Komplexe als L367 ausbilden.

Für die Interaktion von V503 und N70 lassen sich keine konkreten Banden in der Agarosematrix detektieren. Dies spricht dafür, dass sich keine stabilen Komplex ausgebildet haben (Abb. 2.10c). Durch selektive Kontrasterhöhung im oberen Bereich des Gels lässt sich dennoch Protein-DNA-Bindung visualisieren. Trotz der schwachen Interaktion werden Proteine von der DNA in die Gelmatrix gezogen, bevor sie von ihr dissoziieren. Ab einem ungefähren Verhältnis 2:1 von Protein zu DNA bildet sich ein Protein-DNA-Komplex aus, der bei weiterer Erhöhung der DNA-Konzentration verstärkt wird. Die Assoziation von V503 an die DNA ist dennoch zu schwach, um bereits in Lösung ausgebildete Komplexe in der Gelelektrophorese aufrechtzuerhalten. Im Vergleich zu den Konstrukten K271 und L367 werden deshalb höhere Konzentrationen von Protein und DNA benötigt.

Die ersten Erkenntnisse aus den DNA-Bindestudien legen nahe, dass der Leucin-Zipper zur hochaffinen DNA-Bindung von FOXP2 beiträgt. Das Konstrukt, das zusätzlich den Zinkfinger enthält, bildet höhergeordnete Komplexe aus, die einem Verhältnis von 4:1 von Protein zu DNA folgen.

## 2.5 Zusammenfassung Kapitel 2

Ein Protokoll, das die Generierung in *E.coli*, Extraktion, Aufreinigung und Anreicherung des humanen Transkriptionsfaktors Forkhead Box Protein P2 (FOXP2) ermöglicht, wurde etabliert. Die Volllängeversion von humanem FOXP2 konnte generiert, unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt und rückgefaltet werden. In konventioneller Affinitätsgelelektrophorese wurde außerdem die Aktivität und Spezifität der nativ und denaturierend aufgereinigten Proteinkonstrukte getestet und erste Erkenntnisse zum Beitrag der DNA-bindenden Motiven und Domänen konnten mittels EMSA anhand verschiedener N-terminal gekürzter FOXP2-Varianten erhalten werden.

## Kapitel 3

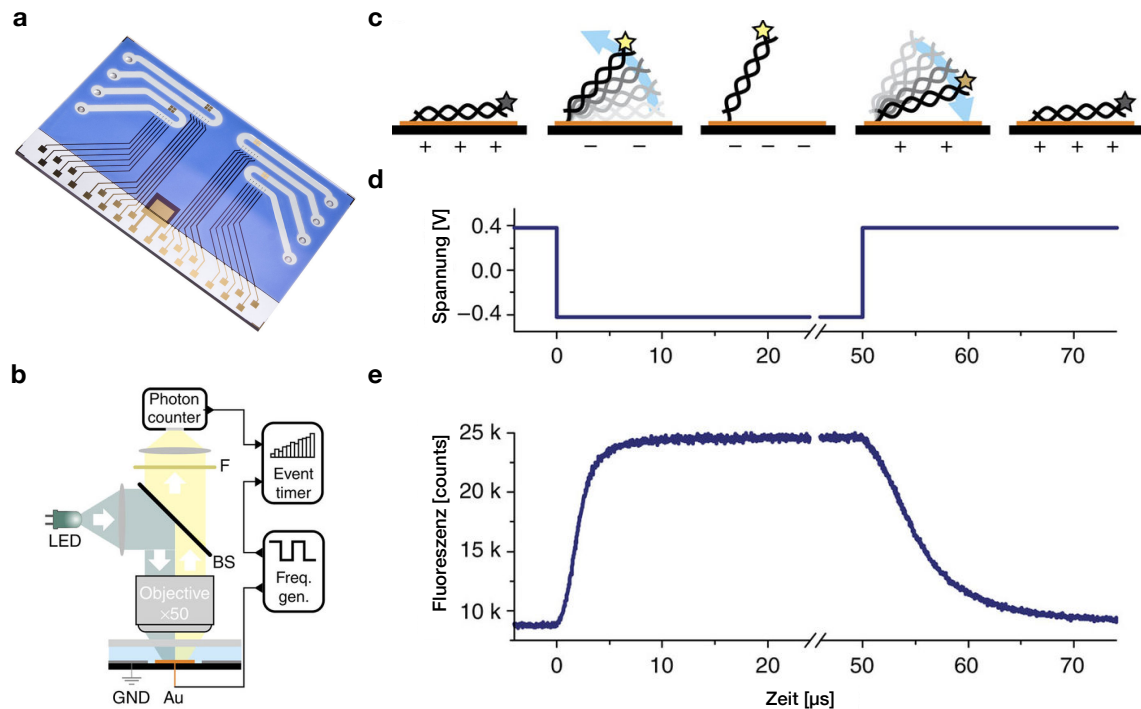
# DNA-biochipbasierte Interaktionsstudien

Die konventionelle EMSA-Methode gibt eine erste Vorstellung davon, welche Beiträge die Motive und Domänen von FOXP2 für die DNA-Bindung leisten. Um die DNA-Bindung genauer zu quantifizieren, sollte eine moderne biochipbasierte Technologie zur Charakterisierung von FOXP2 genutzt werden. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse dieser DNA-biochipbasierten Interaktionsstudien vorgestellt. Da es sich bei der von der Dynamic Biosensors GmbH entwickelten switchSENSE<sup>®</sup>-Technologie um eine neuartige Methode handelt, soll zuerst auf die für den Leser relevanten Hintergrundinformationen eingegangen werden. Die Messdaten und Interpretationen sollten für den Leser besser verständlich werden, wenn die physikalischen Zusammenhänge der verschiedenen Messmodi (Abschnitte 3.1.1 und 3.1.2), die Bindungstheorie von Analyten an oberflächengebundenen Liganden (Abschnitt 3.1.3) und nicht zuletzt der Ablauf (Abschnitt 3.1.4) einer solchen Messung schon vorher bekannt sind. Der Übersichtlichkeit halber werden deshalb sowohl theoretische Informationen, als auch Messdaten und deren Interpretation in einem durchlaufenden Kapitel zusammengefasst.

### 3.1 Das switchSENSE<sup>®</sup>-Prinzip

Das Unternehmen Dynamic Biosensors GmbH mit Sitz in Martinsried bietet eine Technologie an mit der molekulare Wechselwirkungen analysiert werden können. Das chipbasierte Biosensor-System switchSENSE<sup>®</sup> erlaubt es, die Bindungsraten der Assoziation  $k_{on}$  und Dissoziation  $k_{off}$  direkt zu beobachten. Mit Hilfe dieser Assoziations- und Dissoziationskurven lässt sich die Bindungskonstante  $K_D$  bestimmen, mit der sich eine Aussage über die Bindungsaffinität zwischen Proteinen oder Protein und DNA treffen lässt. Die Assoziation und Dissoziation kann direkt und mit hoher Sensitivität verfolgt werden und bietet damit Potential für die Interaktionsstudien von FOXP2 und DNA.

Die Dynamic Biosensors GmbH hat einen Chip entwickelt, der 24 Gold-Mikroelektroden besitzt und an deren Oberfläche einzelsträngige DNA-Moleküle gebunden sind (Abb. 3.1a).



**Abbildung 3.1 – Zeitaufgelöste DNA-Schaltmessung.** (a) Der Biochip verfügt über 24 Mikroelektroden aus Gold ( $\varnothing = 120 \mu\text{m}$ ), die in Reihen von jeweils sechs Mikroelektroden arrangiert sind [154]. Diese wiederum sind zusammen mit einer Gegenelektrode aus Platin in vier Durchflußkanälen angeordnet, die über acht Löcher im Glasträger verbunden sind. (b) Zur optischen Detektion der DNA-Orientierung in Echtzeit dient ein Epifluoreszenz-Aufbau. Ein Frequenzgenerator versorgt die Elektroden mit Wechselspannungen. Dadurch werden die DNA-Hebel betätigt und gleichzeitig ein Event-Timer ausgelöst, der einzelne Photonen der fluoreszenzmarkierten DNA aufzeichnet. (c) Schematische Darstellung der elektrisch induzierten DNA-Umschaltung. Die Fluorophor-Emission (als Stern dargestellt) wird in unmittelbarer Nähe der Oberfläche ausgelöscht. (d) Rechteckspannung, die an die Goldelektroden angelegt wird, im Vergleich zu Pt (10 kHz). (e) Die zeitaufgelöste Antwort der 48 bp fluoreszenzmarkierten DNA-Schicht wird in einem Fluoreszenzhistogramm dargestellt. Übernommen und adaptiert mit Genehmigung von [155]; ©(2013) Springer Nature.

Die DNA-Schichten werden mit niedriger Dichte präpariert, sodass sich die einzelnen Moleküle nicht durch sterische Wechselwirkungen behindern [156, 157]. Im Mittel befinden sich auf einer Elektrode  $10^6$  DNA-Moleküle, die eine Länge von 20 bis 100 Basen aufweisen können. Diese DNA-Moleküle, die im Folgenden als DNA-Hebel oder Anker bezeichnet werden, sind über ihr 5'-Ende kovalent an der Goldoberfläche befestigt und tragen am 3'-Ende ein Fluorophor<sup>1</sup>, dessen Lumineszenz als Signal ausgelesen wird. Für die Verwendung der Hebel als aktiver Oberflächensensor werden die Oligonukleotide doppelsträngig gemacht. Die switchSENSE<sup>®</sup>-Technologie nutzt alternierende Elektrodenpotentiale, um die DNA-Moleküle auf der Oberfläche aktiv zu bewegen [156, 158–160]. Durch das Anlegen von negativer bzw. positiver Spannung werden die stark negativ geladenen

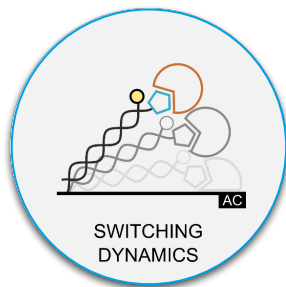
<sup>1</sup>Der als Yellow 1 (Y1) bezeichnete Fluoreszenzfarbstoff ist ein Derivat von Rhodamin B und Rhodamin 6G. In optischbasierten Biosensoren spielen die Eigenschaften der verwendeten Fluorophore eine signifikante Rolle, weswegen die genaue Molekülstruktur aufgrund von Geheimhaltung nicht öffentlich bekannt ist.

DNA-Hebel von der Goldoberfläche abgestoßen und aufgerichtet bzw. angezogen und hingelegt (Abb. 3.1c und Abb. 3.1d). Bei einer Frequenz von 10 kHz wird sichergestellt, dass die DNA genügend Zeit hat sich aufzurichten bzw. vollständig hinzulegen, bevor die Spannung wieder umgekehrt wird. Die Fluoreszenz der Farbstoffe, die an den oberen Enden der DNA angebracht sind, wird sukzessive ausgelöscht, sobald die Nanohebel in Richtung Goldoberfläche kippen [160]. Die daraus resultierende Fluoreszenzantwort verändert sich zeitaufgelöst je nach Ausrichtung der doppelsträngigen DNA-Moleküle (Abb. 3.1e). Mit Hilfe eines Epifluoreszenzaufbaus wird die Orientierung der DNA-Hebel zur Oberfläche bzw. deren Bewegung in Echtzeit durch zeitaufgelöste Einzelphotonenzählung detektiert (Abb. 3.1b) [155].

### 3.1.1 Dynamischer Schaltmodus (*Switching*)

Das Prinzip der switchSENSE®-Technologie DNA-Hebel hochfrequent auf und ab zu bewegen und diese Bewegung in Echtzeit durch eine Fluoreszenzantwort zu detektieren, kann nun genutzt werden, um Wechselwirkungen zwischen Bindungspartnern zu untersuchen. Profitiert wird dabei von der Veränderung des hydrodynamischen Reibungswiderstandes der DNA-Hebel nach Bindung eines Analyten. Im Vergleich zu ihrem blanken Pendant bewegen sich analytgebundene Nanohebel langsamer (Abb. 3.2). Dabei gilt die Regel, dass große Analyte die Bewegung wesentlich stärker verzögern als kleine Moleküle, stark geladene Analyte stärker als elektrisch neutrale [161].

Die verlangsamte Dynamik der DNA-Hebel spiegelt sich anschließend in einer Veränderung des Fluoreszenzhistogramms wider. Die Fluoreszenzkurve der analytgebundenen DNA



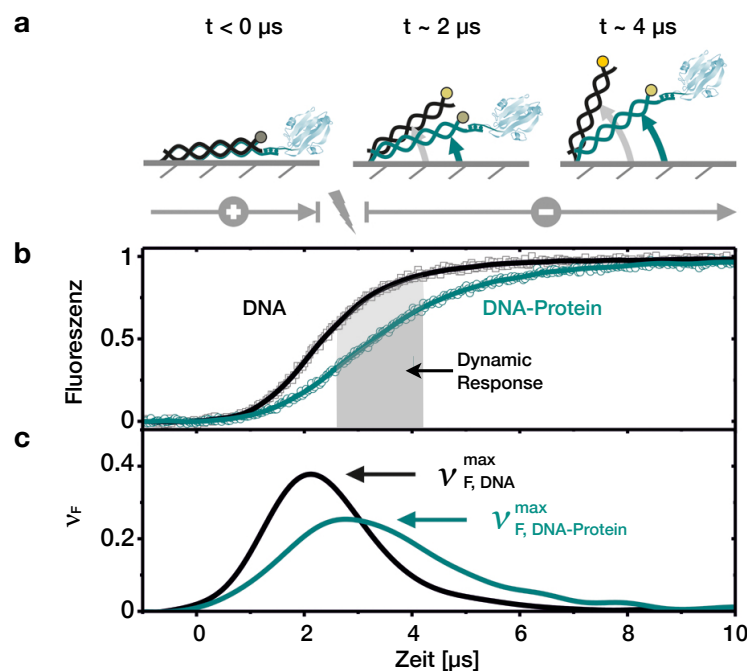
sieht im Vergleich zur Fluoreszenzkurve der nackten DNA verschieden aus (Abb. 3.2b). Diese Veränderung ist charakteristisch je nach Analyse der Interaktion. Nützliche Größen, um die Dynamik der Hebel und deren Veränderung zu beschreiben, sind dabei die Parameter *Dynamic Response* (DR) und die Maximalgeschwindigkeit  $v_{\max}$  (Abb. 3.2c). Die *Dynamic Response* entspricht dem Bereich unter der Fluoreszenzkurve beim Aufwärtsschalten bzw. dem Bereich über der Kurve beim Abwärtsschalten (Abb. 3.2b). Mit dieser Definition entspricht DR der Höhenänderung (in Fluoreszenzeinheiten), die vom oberen Ende

des DNA-Hebels innerhalb eines bestimmten Zeitraums abgedeckt wird. Hohe DR-Werte deuten auf schnelles Schalten hin, niedrige spiegeln langsamere Dynamik der Hebel wider. Erwartungsgemäß hängt die Schaltdynamik auch mit der Länge der DNA-Hebel zusammen, die DR nimmt mit zunehmender DNA-Länge ab [155, 162].

Die Detektion der Proteinanbindung in Echtzeit erlaubt es mit Hilfe der switchAnalysis-Software kinetische Ratenkonstanten ( $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$ ) zu ermitteln und daraus die Dissoziationskonstante  $K_D$  zu berechnen. Anhand der charakteristischen Änderung der Dynamik lassen sich aber neben der Kinetik beispielsweise auch die Größe von Molekülen aufdecken [155].

Im Fall von DNA- bzw. RNA-bindenden Proteinen können die DNA-Hebel bzw. deren Verlängerung mit DNA oder RNA direkt zur Interaktionsanalyse verwendet werden

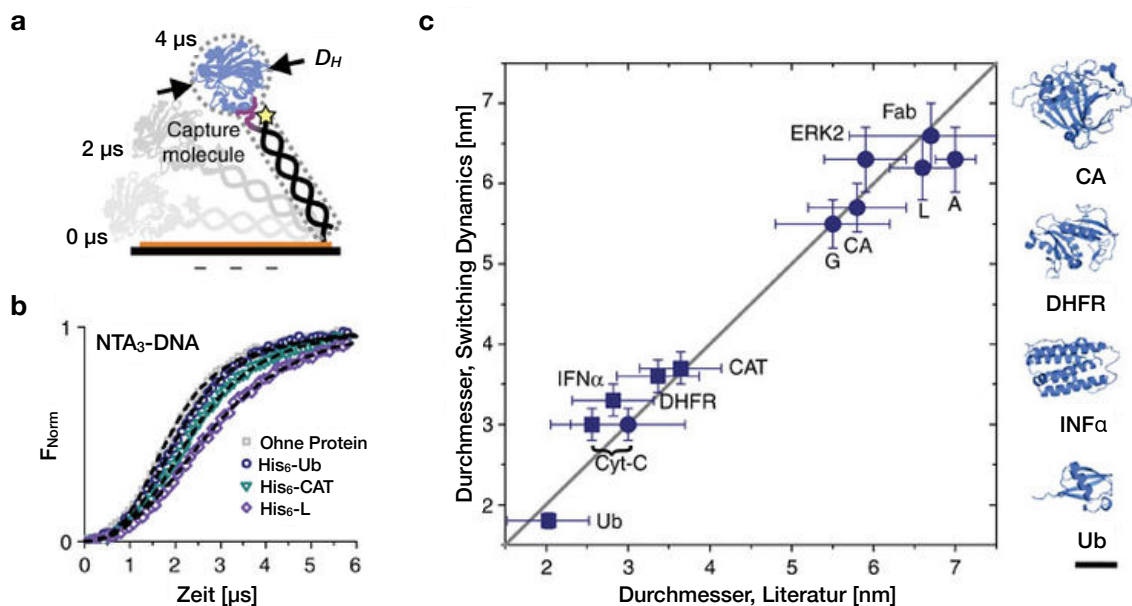
[154, 163–166]. Soll hingegen die Wechselwirkung zwischen Molekülen untersucht werden, die keine DNA-Binder sind, so lässt sich die zum Anker komplementäre Sequenz mit einer reaktiven Gruppe modifizieren, um am oberen Ende ein Fängermolekül zu konjugieren. Typische Modifikationen für kovalente Bindungen sind hierbei Maleimide und NHS-Ester, die Thiol- bzw. Amin-Gruppen von Proteinen attackieren, aber auch His-getaggte und Strep-getaggte Proteine lassen sich durch das passende Pendant (NTA<sub>3</sub> bzw. Streptavidin) an der modifizierten DNA befestigen [155, 167–169]. Auf diese Weise lassen sich Protein-Protein-Interaktionen wie z.B. Bindungsaffinitäten von Antikörpern mit Antigenen oder auch kleinen Molekülen (wie z.B. medizinischen Wirkstoffen) an deren makromolekulare Bindungspartner detektieren.



**Abbildung 3.2 – Veränderung der Dynamischen Antwort der DNA-Hebel im *Switching-Modus* nach Bindung von Protein.** (a) Schematische Darstellung des DNA-Hebels ohne Protein (schwarz), überlagert mit DNA-Hebel mit Protein (grün), der bei positiven Potentialen auf der Oberfläche liegt. Nach dem Umschalten auf negatives Potential wird der DNA-Hebel abgestoßen. Ist am DNA-Hebel über einen Liganden am oberen Ende ein Protein befestigt, so wird die Aufwärtsbewegung verlangsamt und verzögert sich im Vergleich zum blanken Hebel. Der schattierte gelbe Kreis symbolisiert den Fluorophor, dessen Emission oberflächennah ausgelöscht wird. (b) Zeitaufgelöste normierte Fluoreszenzantwort einer 48-bp fluoreszenzmarkierten DNA vor (schwarz) und nach (grün) dem Binden von Protein A (39 kDa). Der graue Bereich unter den Kurven bezeichnet die Dynamische Antwort (*Dynamic Response*, DR) zwischen 0 und 3 µs. Die DR ist ein Parameter, der die Geschwindigkeit der Bewegung misst. (c) Zeitableitung  $\nu_F = dF/dt$  der normierten Fluoreszenz. Übernommen und adaptiert mit Genehmigung von [168]; ©(2012) American Chemical Society.

### Größenbestimmung von Proteinen (Sizing)

In einer im Jahr 2013 publizierten Studie wird gezeigt, dass sich mit Hilfe der aktiven Oberflächensensoren die Größen von Proteinen bestimmen lassen. Zu Nutze wird sich hierbei die Beobachtung gemacht, dass sich die Schaltdynamik der DNA-Proteinkomplexe mit zunehmender Proteingröße verlangsamt (Abb. 3.3). In der Studie werden elf Proteine mit Molekulargewicht von 8 bis 50 kDa im *Switching*-Modus untersucht und anschließend mit Daten aus DLS-Experimenten und Röntgenstrukturanalyse verglichen [155].



**Abbildung 3.3 – Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers von Proteinen mit der SwitchSENSE®-Methode.** Der hydrodynamische Durchmesser von Proteinen lässt sich durch Befestigung am oberen Ende der doppelsträngigen DNA-Hebel ermitteln. **(a)** Schematische Darstellung eines DNA-Hebels mit einem Protein (effektiver Proteindurchmesser  $D_H$ ), das über ein Fängermolekül (violett) gebunden ist. Das Fängermolekül ist kovalent an einen Einzelstrang gebunden. Die gestrichelten Linien zeigen die Silhouette des Lollipop-Modells, die für die Berechnung verwendet wurde. **(b)** Fluoreszenzantwort der Aufwärtsschaltung für blanke DNA im Vergleich zu drei Protein-DNA-Komplexen. Die His<sub>6</sub>-markierten Proteine Ubiquitin (Ub, 8,5 kDa), Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT, 29 kDa) und Protein L (43 kDa) wurden mittels NTA<sub>3</sub>-markierter DNA untersucht. Gestrichelte Linien stellen die Fluoreszenzantwort dar, die mit dem theoretischen Lollipop-Modell berechnet wurde. **(c)** Vergleich mittels dynamischer Schaltexperimente ermittelter hydrodynamischer Durchmesser verschiedener Proteine mit Ergebnissen aus DLS-Messungen (Kreise) oder Literaturwerten aus Röntgenstrukturanalysen (Quadrate). Cytochrom-C (Cyt-C, 12 kDa), Interferon- $\alpha$  (IFN $\alpha$ , 18 kDa), Carbonanhydrase (CA, 29 kDa), IgG-bindende rekombinante Proteine A (42 kDa) und G (26 kDa), Proteinkinase ERK2 (42 kDa) und Fab-Fragment (50 kDa). Repräsentative Strukturen von vier Proteinen mit  $D_H \approx 2-6$  nm sind rechts skaliert dargestellt. Schwarzer Skalenbalken, 2 nm. Übernommen und adaptiert mit Genehmigung von [155]; ©(2013) Springer Nature.

Für die Größenbestimmung eines Proteins wird dieses am oberen Ende der doppelsträngigen DNA-Anker befestigt und die veränderte Dynamik der DNA-Hebel in Lösung in

Umschaltexperimenten gemessen. Für die anschließende Auswertung wird das Protein, vereinfacht globulär, als harte (potentiell geladene) Kugel und die doppelsträngige DNA als negativ geladener Stab betrachtet (Abb. 3.3a). Die imaginäre Kugel, die hierbei einen hydrodynamischen Radius  $R_0$ , auch Stokes Radius genannt, aufweist, wird vom Stab durch die Flüssigkeit bewegt. Makromolekular gesehen, verhält sich die Flüssigkeit, durch die die Kugel gezogen wird, wie Honig. Durch die Kugel am oberen Ende des Stabes verändert sich dessen Diffusionskoeffizient und folglich auch dessen Dynamik.

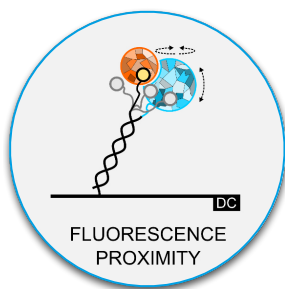
Langer und seine Kollegen haben basierend auf diesen Annahmen ein Modell entwickelt, das den plastischen Namen „Lollipop“-Modell trägt. Mit Hilfe dieses theoretischen Modells lässt sich anhand experimenteller Daten die dynamische Bewegung der DNA-Hebel zurück verfolgen (Abb. 3.3). Nimmt man nun an, dass Kugel und Protein den selben Diffusionskoeffizienten besitzen, lässt sich über die Wahrscheinlichkeit der gemittelten Winkel der DNA-Hebel und die detektierte Fluoreszenz auf den hydrodynamischen Durchmesser  $D_H$  des Proteins rückschließen. Die Genauigkeit mit der der hydrodynamische Durchmesser von Proteinen hierbei bestimmt werden kann, liegt im Ångströmbereich. Auf diese Weise lassen sich neben Konformationsänderungen sogar posttranslationale Modifikationen eines Proteins detektieren [155, 170].

In der switchANALYSIS-Software ist eine Bibliothek bereits gelöster hydrodynamischer Durchmesser von Proteinen als Referenz hinterlegt, mit der experimentelle Daten neu zu bestimmender Proteine verglichen werden. Die Referenzproteine wurden dabei an einem 48 Basen langen DNA-Doppelstrang unter salzarmen Bedingungen vermessen. Abweichungen von diesen Experimentbedingungen durch z.B. längere DNA-Hebel oder veränderte Puffer- und Salzbedingungen haben zur Folge, dass sich der hydrodynamische Durchmesser nicht durch direkten Vergleich mit der Referenz ermitteln lässt.

### 3.1.2 Fluoreszenz-Näherungsabtastrmodus (*Fluorescence Proximity Sensing*)

Die switchSENSE<sup>®</sup>-Technologie bietet nicht nur die Möglichkeit Kinetiken über den Umschaltmodus zu bestimmen, sondern hat auch noch einen zweiten Messmodus, den Fluoreszenz-Näherungsabtastrmodus, genannt *Fluorescence Proximity Sensing* (FPS), integriert. Bei diesem Messmodus wird, im Gegensatz zum *Switching*-Modus, Gleichspannung angelegt. Durch die negativ geladene Elektrodenoberfläche werden die ebenfalls negativ geladenen DNA-Hebel abgestoßen und aufgestellt. Sie verharren in einem festen Winkel von ungefähr  $60^\circ$ <sup>2</sup>. Sobald Protein an die DNA-Hebel assoziiert, ändert sich deren Masse und Gesamtladung. Dies hat zur Folge, dass sich die DNA-Hebel entsprechend dieser Änderungen neu ausrichten und die Assoziation des Proteins sich direkt durch eine Signaländerung im Fluoreszenzhistogramm verfolgen lässt.

Nicht nur die Ausrichtung der DNA-Hebel hat einen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes, sondern vielmehr wird die Veränderung in dessen direkter näherer Umgebung im FPS-Modus detektiert. Es gibt keine einfache bzw. eindeutige Erklärung,



<sup>2</sup>Persönliche Kommunikation mit Dr. Wolfgang Kaiser, Dynamic Biosensors GmbH.



welche Faktoren ausschlaggebend für die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes sind, vielmehr handelt es sich um ein Zusammenspiel aus mehreren Faktoren, das die physikalischen Eigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffes beeinflussen kann.

Verschiedene Umgebungsfaktoren wie z.B. der pH-Wert einer Lösung oder deren Temperatur beeinflussen unter anderem den Fluoreszenzfarbstoff und wirken sich auf dessen Emission aus. Aber auch ein veränderter Brechungsindex, verursacht durch die Analytlösung, in der Nähe des Fluoreszenzfarbstoffes kann einen Effekt auf dessen Fluoreszenz haben. Ferner spielt die direkte Interaktion des Farbstoffmoleküls mit Komponenten in Lösung oder dem Analyten (Protein) selbst auch eine entscheidende Rolle. Teile des gebundenen Proteins „klopfen“ den Farbstoff ab und verursachen dadurch Erhöhung (*Anti-quenching*) oder Löschung (*Quenching*) der Fluoreszenzintensität. Mögliche Interaktionsmechanismen sind hierbei dynamische Fluoreszenzlöschung (*Collisional Quenching*) und statische Fluoreszenzlöschung (*Static Quenching*). Beim *Collisional Quenching* wird die Energie des angeregten Fluorophors durch den Zusammenstoß mit einem Quenchermolekül auf eben dieses übertragen, beim *Static Quenching* hingegen bilden Fluorophor und Quencher einen Komplex, dessen Fluoreszenz vermindert oder ganz ausgelöscht ist [171]. Komplexbildung kann durch die Aufeinanderstaplung (*Stacking*) von aromatischen Ringen des Fluoreszenzfarbstoffes mit den aromatischen Ringen von hydrophoben Aminosäuren (e.g. Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin) des Proteins verursacht werden [171–174].

Feste Regeln, mit denen sich die Änderung der Farbstoffintensität erklären bzw. bestimmen lassen, gibt es aufgrund der vielen Interaktionsmechanismen nicht. Jedes Protein verhält sich und beeinflusst den Fluoreszenzfarbstoff anders. Manche Proteine erhöhen die Intensität, manche verringern sie und sehr wenige haben nahezu keinen Einfluss<sup>3</sup>. Die Unberechenbarkeit wird durch chemisch heterogene Proteinoberflächen verursacht, die unterschiedliche Neigungen zur Bildung hydrophober und ladungsübertragender Komplexe aufweisen, was zu einem einzigartigen Quenchprofil führt.

### 3.1.3 Theorie der Bindung von gelösten Analyten an oberflächengebundene Liganden

Die nachfolgenden Gleichungen und Herleitungen, die der Theorie der Bindung von gelösten Analyten an oberflächengebundenen Liganden zugrunde liegen, wurden aus [175] entnommen.

Betrachtet man A und B als zwei Spezies in Lösung, die miteinander interagieren und das Produkt AB bilden können, so ergibt sich als Reaktionsgleichung



Die Reaktanten und das Produkt weisen die Konzentrationen  $c_A$ ,  $c_B$  und  $c_{AB}$  in  $\text{mol} \cdot \text{liter}^{-1} = \text{M}$  auf.

Die zeitabhängigen Ratengleichung für die Bildung und den Zerfall des Produkts  $c_{AB}$  sind

$$\frac{dc_{AB}}{dt} = k_{on} \cdot c_A \cdot c_B - k_{off} \cdot c_{AB} \quad (3.2)$$

<sup>3</sup>Persönliche Kommunikation mit Dr. Wolfgang Kaiser, Dynamic Biosensors GmbH.

mit den Raten  $k_{on}$  und  $k_{off}$  für die Hin- bzw. Rückreaktion. Die Raten werden auch als Assoziations- oder On-Raten ( $[k_{on}] = M^{-1}s^{-1}$ ) bzw. Dissoziations- oder Off-Raten ( $[k_{off}] = s^{-1}$ ) bezeichnet.

### Gleichgewicht

Im Gleichgewicht wird Ableitung nach der Zeit gleich Null gesetzt

$$\frac{dc_{AB}}{dt} = 0 \implies k_{on}c_Ac_B = k_{off}c_{AB}$$

wodurch sich die fundamentale chemische Gleichung, das Massenwirkungsgesetz in Lösungen ergibt<sup>4</sup>:

$$K_A = \frac{1}{K_D} \equiv \frac{k_{on}}{k_{off}} = \frac{c_{AB}}{c_A \cdot c_B} \quad \text{oder} \quad c_{AB} = K_A \cdot c_A \cdot c_B \quad (3.3)$$

Die Affinitätskonstante  $K_A$  verbindet hier die Konzentration der gebundenen Moleküle ( $c_{AB}$ ) mit der Konzentration der freien Reaktanten ( $c_A$  und  $c_B$ ) und misst somit die Stärke der Wechselwirkung. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist es sinnvoll, die Dissoziationskonstante  $K_D$  zu nutzen, da sie die Einheit der Konzentration besitzt und somit besser mit den Konzentrationen der Reaktanten verglichen werden kann.

$$[K_A] = M^{-1} \qquad [K_D] = M$$

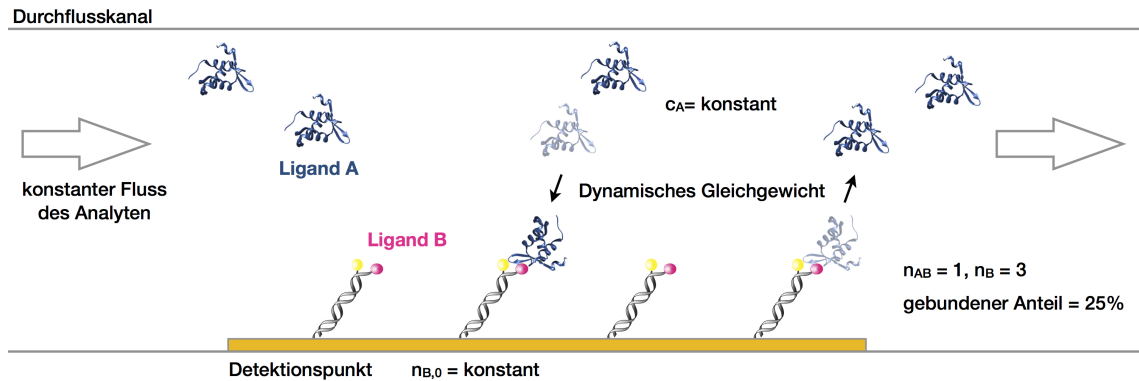
Bei Interaktionsstudien hängt  $c_{AB}$  von den Konzentrationen beider Reaktanten  $c_A$  und  $c_B$  ab. Für Oberflächenbiosensoren vereinfacht sich das Massenwirkungsgesetz jedoch, da die Gesamtzahl (Oberflächendichte) an Fängermolekülen ( $n_{B,0}$ ), die auf der Biosensoroberfläche immobilisiert sind, konstant ist.

$$n_{B,0} = n_B + n_{AB} = \textit{konstant} \qquad n_B \sim c_B \qquad n_{AB} \sim c_{AB} \quad (3.4)$$

In Gleichung 3.4 bezeichnet  $n_B$  die Anzahl der freien Bindestellen auf der Oberfläche und  $n_{AB}$  die Anzahl der Bindungsstellen, die mit dem Analyten A besetzt sind. Während in der Lösung  $n_B$  und  $n_{AB}$  den Konzentrationen  $c_B$  und  $c_{AB}$  entsprechen, werden für Oberflächensensoren andere Notationen genutzt, um die unterschiedliche Natur von gelösten Reaktanten ( $c$ ) und oberflächengebundenen Reaktanten ( $n$ ) hervorzuheben.

In einem idealen Biosensorik-Experiment sollte die Anzahl der gelösten Reaktanten in großem Überschuss zu der Anzahl der Bindungsstellen auf der Oberfläche sein, so dass sich  $c$  effektiv nicht verändert, wenn Moleküle aus der Lösung auf der Oberfläche adsorbieren. Dies vereinfacht die Sache erheblich und wird im Experiment durch einen konstanten Fluss frischer Analytlösung erreicht.

<sup>4</sup>Anmerkung: Entsprechend der Massenerhaltung gilt  $c_A^{tot} = c_A + c_{AB}$  bzw.  $c_B^{tot} = c_B + c_{AB}$ ; aus Gründen der Einfachheit werden hier nur  $c_A$  bzw.  $c_B$  angegeben.



**Abbildung 3.4 – Dynamisches Gleichgewicht auf einem switchSENSE®-Biosensor.** Das Beispiel zeigt einen gebundenen Anteil „fraction bound“ an Protein (FOXP2, 2a07.pdb [49]) von 25%.

Eine wesentliche Größe in einem Biosensorik-Experiment ist der Anteil gebundener Analyte „fraction bound“ ( $f_{eq}$ ), da er proportional zum Signal des Biosensors ist.

$$fraction\ bound \equiv \frac{n_{AB}}{n_{B,0}} \propto Signal \quad (3.5)$$

Der gebundene Anteil ist definiert als die Anzahl der belegten Bindungsstellen am Detektionspunkt dividiert durch die Gesamtzahl der Bindungsstellen. Der gebundene Anteil beträgt 0% für einen reinen Sensor und erreicht 100%, wenn die Sensoroberfläche vollständig mit Analytmolekülen gesättigt ist.

Setzt man nun Gleichung 3.4 in Gleichung 3.3 ein und stellt entsprechend Gleichung 3.5 um, so erhält man das Äquivalent zum Massenwirkungsgesetz für Oberflächenbiosensoren.

$$f_{eq}(c) = \frac{c}{c + K_D} \quad (3.6)$$

Gleichung 3.6 bezieht sich auf den Gleichgewichtszustand ( $t \rightarrow \infty$ ). Sie entspricht der Langmuir-Isotherme, die für die Adsorption von Gasmolekülen an Oberflächen abgeleitet wurde [176]. Die Gleichung ist einfacher als das Gesetz der Massenwirkung in der Lösung; sie hängt nur von der Analytenkonzentration  $c$  und der Dissoziationskonstante im Gleichgewicht  $K_D$  ab. (Anmerkung: Im Folgenden wird der Einfachheit wegen auf den Index A verzichtet, es gilt weiterhin  $c = c_A$ .)

### Bindungskinetik

Ändert sich die Konzentration der Analytmoleküle über dem Sensor, so stellt sich an der Oberfläche ein neues Gleichgewicht zwischen gebundenen und ungebundenen Liganden ein. Die Bindungskinetik kann dann aus den Echtzeitdaten analysiert werden, indem die Ratengleichungen 3.2 integriert werden.

Für die **Assoziationsphase** bei einer gegebenen Analytkonzentration  $c$  ist die Lösung von 3.2

$$f(t, c) = f_{eq}(c) \cdot [1 - \exp\{-k_{on}^{obs} \cdot t\}] \quad (3.7)$$

mit der apparenten On-Rate  $k_{obs}^{on}$ .

$$k_{on}^{obs} = c \cdot k_{on} + k_{off} \quad (3.8)$$

Das Signal nähert sich exponentiell seinem Endwert  $f_{eq}$  mit der charakteristischen Zeitkonstante  $\tau_{on}^{obs}$ .  $k_{on}^{obs}$  und  $\tau_{on}^{obs}$  stehen in folgendem Verhältnis:

$$\tau_{on}^{obs} = \frac{1}{k_{on}^{obs}} \quad (3.9)$$

Da der gebundene Anteil  $f_{eq}$  von der Analytkonzentration abhängig ist, ändert sich auch das beobachtete Signal dementsprechend. Dies erschwert Messungen bei niedrigen Konzentrationen ( $c \ll K_D$ ), da die Assoziationskinetik langsam und die erreichbare Signaländerung gering ist.

Hier ist zu bemerken, dass die beobachtbare Ratenkonstante  $k_{on}^{obs}$  nicht nur von  $c$  und der intrinsischen Assoziationsrate  $k_{on}$ , sondern auch von der Off-Rate  $k_{off}$  abhängt. Dies hat die (etwas kontraintuitive) Konsequenz, dass die Kinetik während der Assoziationsphase durch die Dissoziationsrate beeinflusst wird, insbesondere wenn die Dissoziationsrate sehr hoch ist. Bei niedrigen Dissoziationsraten oder hohen Analytkonzentrationen ( $c \cdot k_{on} \gg k_{off}$ ) kann die Dissoziationsrate jedoch während der Assoziationsphase vernachlässigt werden und  $k_{on}^{obs} \approx c \cdot k_{on}$ .

Die **Dissoziationsphase** wird gemessen, indem die Analytlösung über dem Sensor entfernt wird und gegen reinen Laufpuffer ( $c=0$ ) ausgetauscht wird.

$$f(t) = a \cdot \exp\{-k_{off} \cdot t\} \quad (3.10)$$

Sie wird ausschließlich durch die Dissoziationskonstante  $k_{off}$  bzw. die Dissoziationszeitkonstante  $\tau_{off}$  beeinflusst.

$$\tau_{off} = \frac{1}{k_{off}} \quad (3.11)$$

Die beobachtbare Zeitkonstante der Dissoziation  $\tau_{off}$  ist unabhängig von den Bedingungen während der Assoziationsphase. Ungeachtet der verwendeten Analytkonzentration und der Dauer der Assoziationsphase (dem tatsächlichen Sättigungszustand des Sensors) weist die Dissoziationsphase immer den gleichen  $k_{off}$ -Wert auf. Der Vorfaktor  $a$  (Amplitude) entspricht dem Anteil, der unmittelbar bevor die Analytlösung durch den reinen Laufpuffer ausgetauscht wird, gebunden ist.

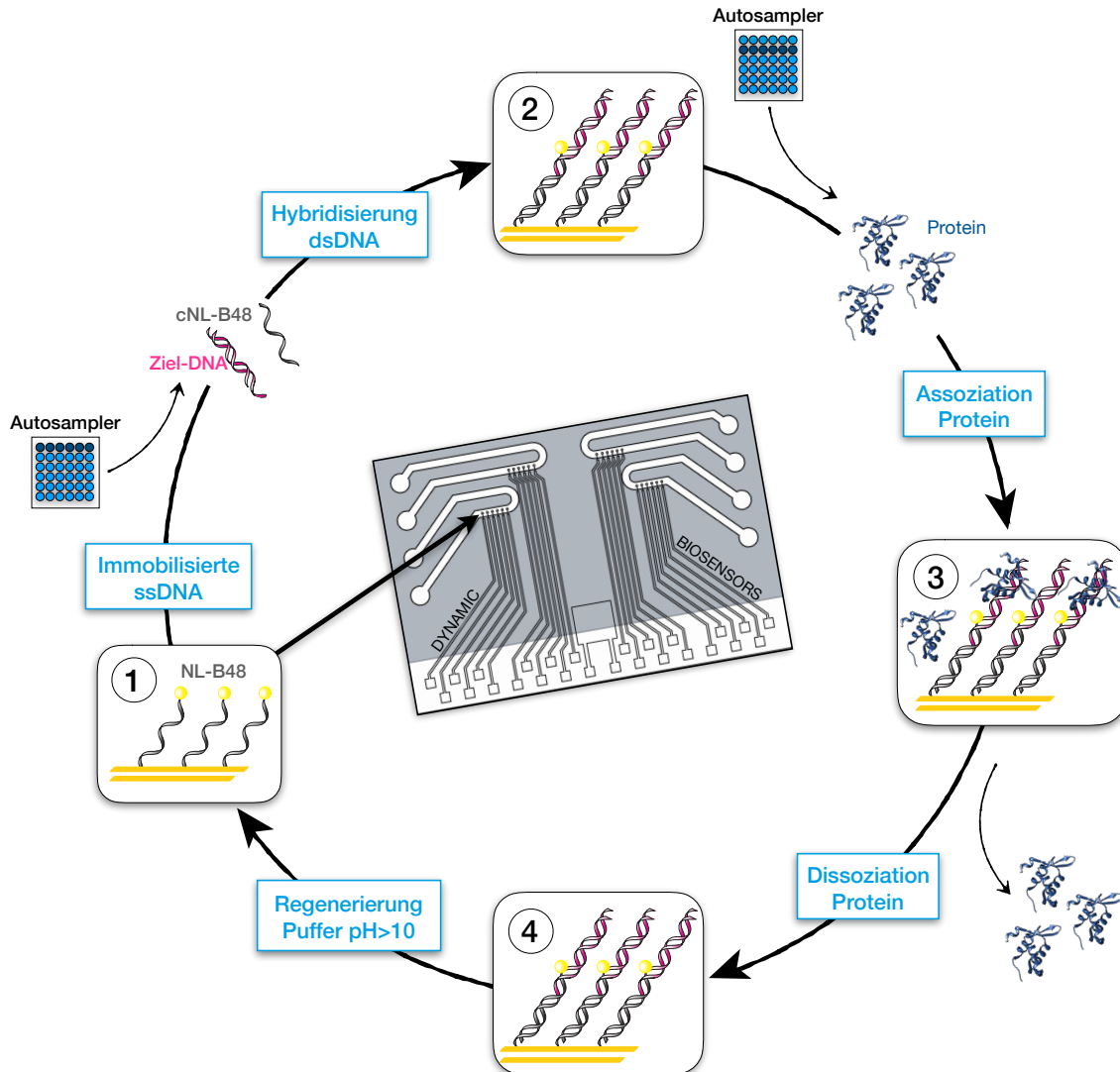
### Die switchANALYSIS-Software

Für die Auswertung fittet die switchANALYSIS-Software zunächst eine exponentiell abklingende Phase in die experimentelle Dissoziationskurve. Über den erhaltenen  $k_{off}$ -Wert lässt sich im nächsten Schritt die Assoziationsrate  $k_{on}$  anhand der experimentellen Assoziationskurve ermitteln. Für die Fits wird das 1:1 Langmuir-Bindungsmodell verwendet. In dem sehr einfachen Modell wird angenommen, dass die Kinetik des sich formenden Komplexes (aus Analyt und Sensormolekül) einer Reaktion pseudo-erster Ordnung folgt.

---

Desweiteren wird angenommen, dass die Bindung für alle Bindungsstellen gleichwertig bzw. unabhängig ist, also keine Kooperativität möglich ist. Assoziations- und Dissoziationsraten können dann zur Berechnung der Dissoziationskonstante  $K_D$  verwendet werden. Je nach Experimentaufbau lässt sich in der Software einstellen, ob die Daten global oder individuell gefittet werden sollen.

### 3.1.4 Versuchsablauf einer switchSENSE®-Messung

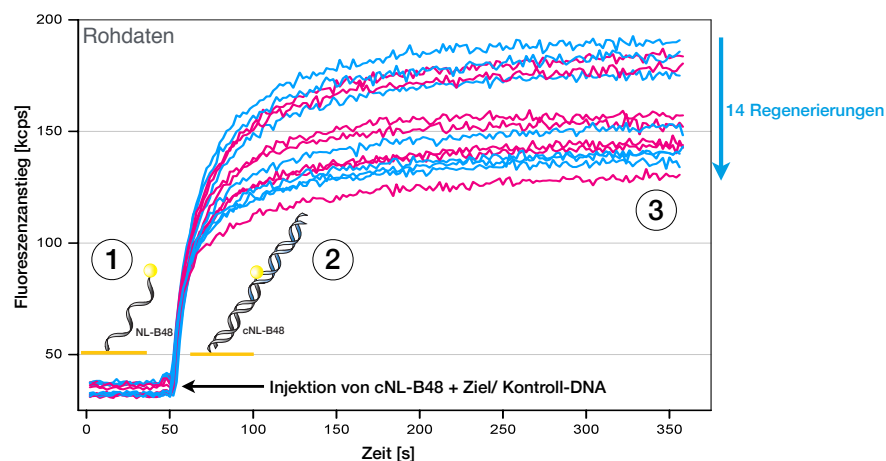


**Abbildung 3.5 – Schematische Darstellung des Versuchsablaufs auf einer Messelektrode des switchSENSE® Biochips.** Die mit Fluoreszenzfarbstoff modifizierte, einzelsträngige Ankersequenz (NL-B48) ist auf dem Biochip [177] immobilisiert (1). Der funktionalisierte Chip wird mit einem Gemisch aus komplementärer ssDNA (cNL-B48) und zu verlängernder dsDNA (Ziel-DNA) überspült und hybridisiert (2). Nach vollständiger Hybridisierung wird überschüssige freie DNA mit Puffer abgewaschen und die Assoziation des Proteins (FOXP2, 2a07.pdb [49]) kann durchgeführt werden (3). Durch Einspülen von Laufpuffer in die Chipkammer wird die Messung der Dissoziation initiiert (4). Sind die Assoziations- und Dissoziationsmessungen beendet, wird der Chip mit basischem Puffer (pH > 10) regeneriert. Regenerierte Biochips sind weiterhin mit einzelsträngiger Ankersequenz (NL-B48) funktionalisiert und wiederverwendbar. Die selbe Elektrode kann somit erneut für Messungen genutzt werden.

Der Zyklus eines typischen switchSENSE®-Experiments ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Die via Thiolchemie kovalent auf der Goldoberfläche immobilisierte 48 Basen lange

DNA-Sequenz NL-B48 trägt einen Fluoreszenzfarbstoff und dient als Anker für etwaige Modifikationen. Vor dem eigentlichen Bindungsexperiment steht die Funktionalisierung der Chipoberfläche. Hierfür wird der Chip mit einzelsträngiger cNL-B48 DNA, die komplementär zur Ankersequenz ist und eine Erweiterung mit Ziel- bzw. Kontroll-DNA-Sequenz trägt, überspült. Die Hybridisierungsreaktion an die DNA-Hebel kann durch einen starken Anstieg der Fluoreszenz verfolgt werden (Abb. 3.6).

Die einzelsträngige Ankersequenz, die den Fluoreszenzfarbstoff trägt, verhält sich wie eine wurmartige Kette, durch die sich der Farbstoff sehr nah an der Chipoberfläche befindet. Die Nähe des Fluoreszenzfarbstoffes zur Chipoberfläche verringert dessen Intensität durch Quenching. Durch die Hybridisierung mit komplementärer DNA-Sequenz cNL-B48 werden die DNA-Hebel doppelsträngig und richten sich infolgedessen auf. Die doppelsträngigen DNA-Hebel verhalten sich nun nicht mehr wie eine wurmartige Kette, sondern wie ein steifer Zylinder. Dieses Aufstellen hat zur Folge, dass der Fluoreszenzfarbstoff weiter von der Chipoberfläche entfernt ist und nicht mehr gequenchet wird. Das Fluoreszenzsignal steigt also nach Injektion von cNL-B48 stark an. Die Hybridisierung ist abgeschlossen, sobald alle einzelsträngigen Ankersequenzen abgesättigt sind und sich das Fluoreszenzsignal nicht mehr weiter ändert (Abb. 3.6).



**Abbildung 3.6 – Fluoreszenzsignal der Hybridisierungs- und Regenerierungszyklen auf einer Chipoberfläche.** Rohdaten der Hybridisierungskurven von vierzehn Regenerierungen der funktionalisierten Chipoberfläche. Fluoreszenzanstieg während der Hybridisierung ist in *kilo counts per second* (kcps) angegeben. Für die Funktionalisierung wird die Ankersequenz NL-B48 mit komplementärem Oligonukleotid cNL-B48 doppelsträngig gemacht und mit Kontroll- bzw. Ziel-DNA verlängert (blaue bzw. pinke Kurven). (1) Niedriges Fluoreszenzsignal der einzelsträngigen Ankersequenz NL-B48. (2) Fluoreszenzanstieg während der Hybridisierung. (3) Nach Absättigung der Anker wird ein festes Fluoreszenzendlevel erreicht.

Sobald der Hybridisierungsschritt abgeschlossen ist, wird überschüssige DNA vom Chip gewaschen und die Assoziation der Interaktionsanalyse kann beginnen. Dafür wird über den Autosampler in den Durchflusskanal Proteinlösung injiziert, die die Elektrode in konstantem Fluss mit Protein versorgt. Die Assoziation der Proteine an die DNA-Hebel wird durch eine Signaländerung in Echtzeit detektiert. Nachdem die Assoziationsreaktion abgeschlossen ist, wird die Dissoziation durch Einspritzen von reinem Probenpuffer eingeleitet.

Durch die Verminderung der Proteinkonzentration wird die Bindung aus Lösung reduziert, sodass nur noch Abbindevorgänge stattfinden und das Fluoreszenzsignal ändert sich dementsprechend.

Der Biochip kann mehrfach regeneriert und somit wieder verwendet werden (Abb. 3.6). Bei der Regenerierung wird die Chipoberfläche mit einem stark alkalischen Puffer überspült, sodass die doppelsträngige DNA aufgetrennt und Proteinreste vom Chip gewaschen werden. Durch die Regenerierung kann es zum Verlust von Anker-DNA kommen, was eine verringerte Fluoreszenz nach sich zieht. Desweiteren können Fluoreszenzfarbstoffe bei jeder Messung und Regenerierung bleichen (*Photobleaching*). Eine Faustregel besagt, dass sich mit jeder Messung bei 25 °C und anschließender Regenerierung die Intensität des ursprünglichen Fluoreszenzsignals im Durchschnitt um etwa 1% verringert. Je nach Versuchsanordnung kann ein Experiment auf einer Elektrode somit bis zu 40 Mal wiederholt werden [178]. Die durch die Signalverminderung unterschiedlichen Endniveaus haben keinen Einfluss auf die anschließende Interaktionsanalyse. Kinetikmessungen sind von der Abnahme der absoluten Fluoreszenz nicht beeinflusst, da vor jeder Messung die absolute Fluoreszenzintensität über die Autoregulierungsfunktion (*Auto Excitation Power*) angepasst und auf den selben Ausgangswert gebracht wird.

## 3.2 Initiale Messungen auf dem **switchSENSE®** Biochip

Hinsichtlich der geplanten Interaktionsstudien musste zuerst herausgefunden werden, ob sich die switchSENSE®-Methode eignet, um Wechselwirkung zwischen FOXP2 und DNA zu detektieren. Die beschriebenen Versuche in den Abschnitten 3.2.1 und 3.2.2 dieses Kapitels wurden im dynamischen Schaltmodus (Abschnitt 3.1.1) durchgeführt. Nachfolgende Interaktionsanalysen hingegen wurden im Fluoreszenz-Näherungsabtastmodus (Abschnitt 3.1.2) durchgeführt und sind somit nicht direkt mit den dynamischen Schaltmessungen vergleichbar.

### 3.2.1 Optimierung der Experimentbedingungen

Die ersten Experimente im dynamischen Schaltmodus sollten Hinweise darauf geben, wie sich FOXP2 auf dem Biochip verhält. Zunächst sollte herausgefunden werden, ob überhaupt Bindung detektiert werden kann und welche Pufferbedingungen bzw. Proteinkonzentrationen notwendig sind. Für die Optimierung der Experimentbedingungen wurde die Ankersequenz NL-B48 um die Sequenz N32 verlängert (siehe Tabelle C.5 in Anhang C.1). Die doppelsträngige DNA konnte schon in der konventionellen Affinitätsgelelektrophorese als Substrat für FOXP2-Bindung bestätigt werden (siehe Abb. 2.5 in Abschnitt 2.2.2). Als Kontrolle diente die immobilisierte Ankersequenz NL-B48, die für diesen Zweck doppelsträngig gemacht wurde. Für die Versuche wurde sich auf die Konstrukte K271 (ZF-LZ-FHD) und L367 (LZ-FHD) (siehe Kapitel 2 Abb. 2.9a) beschränkt und diese bei den Proteinkonzentrationen 16 nM, 50 nM und 150 nM getestet.



### Physiologische Salzbedingungen verhindern unspezifische Interaktion

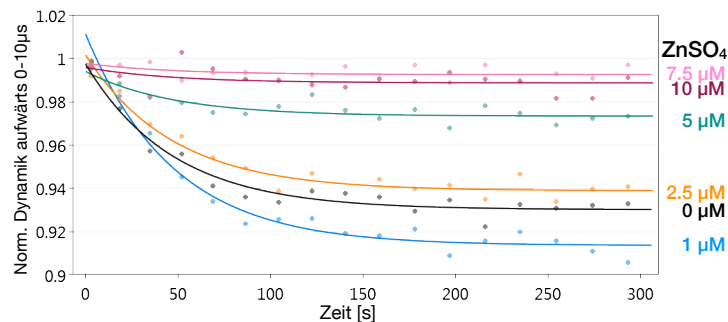
Zuerst sollte die Assoziation und Dissoziation von FOXP2 in Minimalpuffer unter physiologischen und niedrigen Salzkonzentrationen untersucht werden. Ein Puffer mit 140 mM Natriumchlorid (H140), der das natürliche Milieu im Zellkern nachahmen soll, und ein Puffer mit verringerter Salzkonzentration (40 mM Natriumchlorid) wurden getestet.

Für beide Proteinkonstrukte K271 (ZF-LZ-FHD) und L367 (LZ-FHD) konnte spezifische Interaktion mit der Ziel-DNA N32 sowohl im physiologischen als auch im salzarmen Milieu beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte bei niedrigen Proteinkonzentrationen von 16 nM und 50 nM keine Interaktion der Proteine mit der doppelsträngigen Ankersequenz NL-B48 detektiert werden. Die Dynamik der DNA-Hebel blieb unverändert beim Überspülen mit Protein. Für die Messungen mit erhöhter Proteinkonzentration (150 nM) unter salzarmen Bedingungen hingegen konnte sowohl für K271 als auch für L367 eine Interaktion mit der Anker-DNA (NL-B48) beobachtet werden. Diese nicht-spezifische Bindung wiederum ließ sich aber nur im salzarmen Milieu beobachten, unter physiologischen Pufferbedingungen wurde die Bindung an die Ankersequenz unterdrückt. Generell hat der Unterschied im Natriumgehalt einen größeren Einfluss auf das L367-Proteinkonstrukt. Unter salzarmen Bedingungen erhöht sich die Dissoziationsrate von L367 (H140:  $8.7 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  und H40:  $1.6 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ). Im Vergleich dazu ist die Dissoziationsrate des K271-Konstrukts bei den verschiedenen Salzkonzentrationen ähnlich (H140:  $3.0 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  und H40:  $1.4 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ). Betrachtet man die Messungen unter physiologischen Bedingungen genauer, lässt sich ein Trend erkennen. Das L367-Konstrukt zeigt eine vermeintlich höhere Stabilität der Bindung an DNA als das längere K271-Konstrukt. Dies wird durch eine um eine Größenordnung langsamere Dissoziationsrate von L367 verursacht ( $8.7 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  vs.  $3.0 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ). Die Tatsache, dass die Bindung des L367-Konstruktes, das im Vergleich zum K271-Konstrukt um ein Zinkfinger-Bindemotiv kürzer ist, stabiler sein soll, erscheint erst einmal nicht intuitiv. Eine mögliche Erklärung wäre, dass der Zinkfinger des K271-Konstrukts nicht zum Einsatz kommt. Dafür könnte es zwei denkbare Ursachen geben.

Erstens wurden die initialen Messungen in einem minimalen Puffer durchgeführt, der nur die Grundanforderungen an das System stellt. Das bedeutet, dass auf Zusätze wie zum Beispiel Zink-Ionen verzichtet wurde. Diese werden vom Zinkfingermotiv zur Ausbildung seiner charakteristischen Form und somit Aktivität in Bezug auf DNA-Bindung benötigt. Desweiteren könnte eine Rolle spielen, dass durch das Kürzen der Sequenz im Vergleich zur vollen N70-Sequenz, die ortsspezifische DNA-Bindestelle des Zinkfingers unwissentlich abgeschnitten wurde. Da in der Literatur bis dato keine Informationen zur DNA-Bindestequequenz des Zinkfingers von humanem FOXP2 zu finden sind, lässt sich diese Tatsache nicht ausschließen.

### Zink-Ionen können Bindefähigkeit erhöhen

Im nächsten Schritt sollte der Einfluss von Zink-Ionen auf die DNA-Bindung des Zinkfingerkonstruktes K271 (ZF-LZ-FHD) untersucht werden. Hierfür wurde dem physiologischen Puffer H140 verschiedene Konzentrationen an Zinksulfat beigefügt. Getestet wurden unter anderem Puffer mit einem Zinkgehalt von 1  $\mu\text{M}$ , 2.5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 7.5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  im Vergleich zu einem Puffer, der kein Zink enthält. Wieder diente die doppelsträngige Ankersequenz NL-B48 mit der N32-Verlängerung als Ziel-Substrat. Gemessen wurde im Umschaltmodus bei einer Proteinkonzentration von 50 nM.



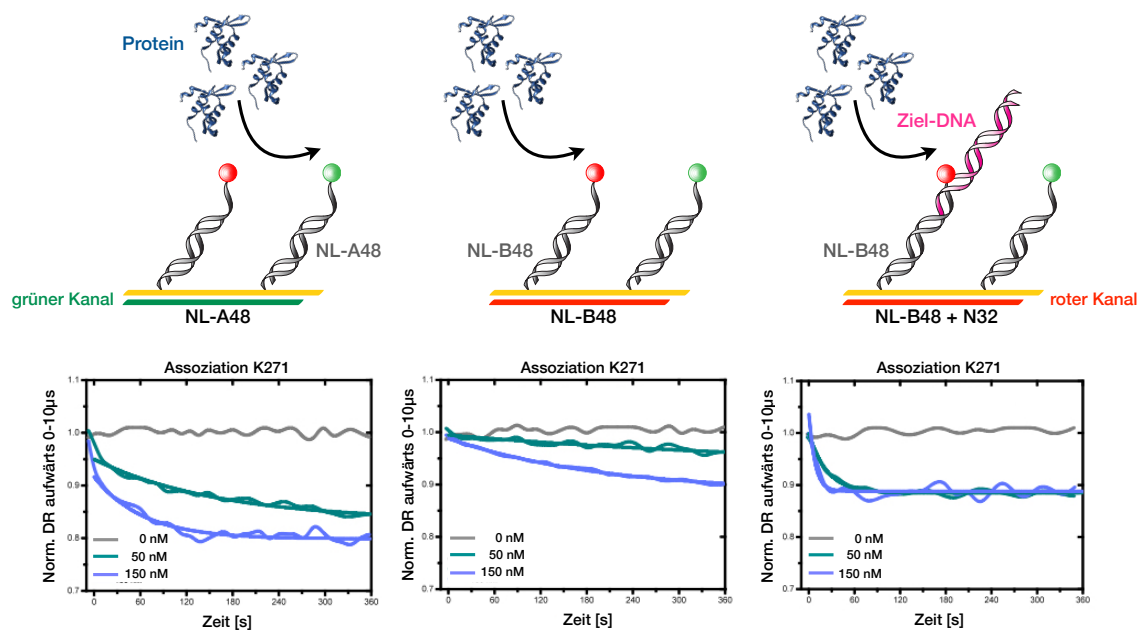
**Abbildung 3.7 – Abhängigkeit der DNA-Bindefähigkeit des Zinkfingerkonstruktes K271 von der im Puffer enthaltenen Zinkkonzentration.** Messkurven der Assoziation von K271 an die Ziel-DNA (NL-B48 mit N32-Verlängerung) bei verschiedenen Zinkkonzentrationen im Vergleich zur Kontrolle ohne Zink. Messungen wurden im dynamischen Schaltmodus (Frequenz 10 kHz) durchgeführt. Die normierte Dynamische Antwort der Aufwärtsbewegung der DNA-Hebel ist gegen die Zeit aufgetragen. Daten wurden mit der switchANALYSIS-Software ausgewertet. Daten sind als Punkte, individuelle Fits als durchgehende Linien dargestellt.

Für die verschiedenen Zinkkonzentrationen ist ein klarer Trend erkennbar (Abb. 3.7). Die Bindungseffizienz des K271-Konstruktes wird gesteigert, sobald Zink-Ionen für die Bindung zur Verfügung stehen. Genauer gesagt stellt sich ein positiver Effekt für die Bindungsfähigkeit im Vergleich zur Messung ohne Zink-Ionen ein, sobald Zinksulfat mit einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  zugegeben wurde. Die Zink-Ionen liegen hier in einem 20-fachen Überschuss im Verhältnis zur Proteinkonzentration vor. Erhöht man nun den Zinkgehalt auf einen 50-fachen Überschuss (2.5  $\mu\text{M}$ ), nimmt die Bindefähigkeit von FOXP2 langsam ab und fällt unter die Bindungseffizienz von Anbindungen ohne zusätzliches Zink. Bei weiterer Erhöhung des Zinkgehaltes auf einen 100-fachen Überschuss (5  $\mu\text{M}$ ) lässt die Bindungsfähigkeit immer weiter nach, bis schließlich keine Bindung mehr detektiert werden kann. Bei Zinkkonzentrationen, die über dem Hundertfachen der Proteinkonzentration liegen (> 5  $\mu\text{M}$ ), ist die DNA-Bindung von FOXP2 komplett inhibiert.

Nachfolgende Messungen wurden bei einer Zinkkonzentration von 500 nM durchgeführt. Dies erlaubt es über einen weiten Bereich von Proteinkonzentrationen (5 nM bis 200 nM) einerseits einen ausreichenden Zinkgehalt im Puffer zu garantieren und andererseits keine durch zu hohe Zinkkonzentrationen induzierte Inhibierung der DNA-Bindung zu riskieren.

### 3.2.2 Zweifarbmessungen zeigen Sensitivität auf

Das DRX<sup>2</sup> erlaubt es die Assoziation von Protein simultan an zwei verschiedene DNA-Konstrukte in zwei Fluoreszenzkanälen zur selben Zeit zu detektieren. Speziell dafür angefertigte Biochips mit *Same Spot Control* ermöglichen es, die durch Regenerierung und Re-Hybridisierung induzierten Fehler zu minimieren. *Same Spot Control* bedeutet hierbei, dass auf ein und derselben Elektrode des Biochips sowohl Kontroll-DNA als auch Ziel-DNA in einer zufälligen Verteilung vorliegen. Es werden also zwei verschiedene, zueinander orthologe Ankersequenzen benötigt. Die zu immobilisierenden, einzelsträngigen DNAs müssen derart konzipiert sein, dass sie nicht schon in Lösung aneinander binden oder Sekundärstrukturen ausbilden.



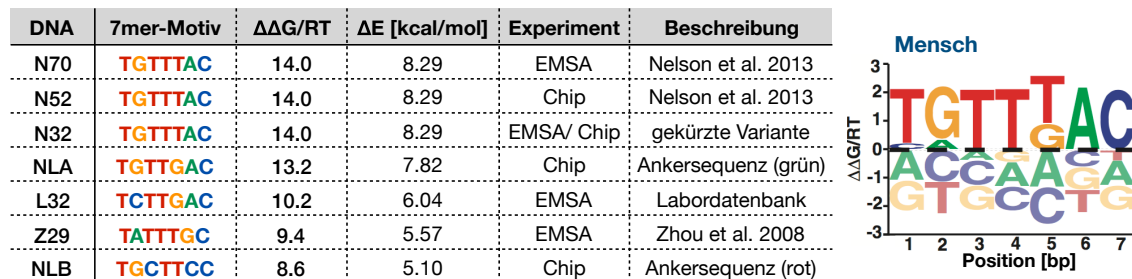
**Abbildung 3.8 – Zweifarbmessungen auf einer Elektrode des DualColor-Biochips.** Assoziation von verschiedenen Konzentrationen K271 an die doppelsträngigen Ankersequenzen NL-A48, NL-B48 und das Ziel-Konstrukt (NL-B48 mit N32-Verlängerung) wurden im dynamischen Schaltmodus (Frequenz 10 kHz) gemessen. Anbindung von Protein (FOXP2, 2a07.pdb [49]) an NL-A48 wurde im grünen Kanal, an NL-B48 und Ziel-DNA im roten Kanal detektiert. Die normierte Dynamische Antwort der Aufwärtsbewegung der DNA-Helices ist gegen die Zeit aufgetragen. Daten wurden mit Hilfe der switchANALYSIS-Software gefittet.

Die von der Dynamic Biosensors GmbH für diesen Zweck designten, je 48 Basen umfassenden Sequenzen (NL-A48 und NL-B48), sind wiederum mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen modifiziert, um im späteren Experiment die Dynamik der verschiedenen doppelsträngigen DNAs getrennt von einander zu beobachten. Da Kontrolle und Messung auf ein und der selben Elektrode synchron ablaufen, können Unterschiede in den Biochips (e.g. DNA-Dichte), der Proteinpräparation, Konzentration, Salzbedingungen im Puffer, sowie jegliche andere Abweichungen in den Messungen ausgeschlossen werden.

Die 48 Basen langen Ankersequenzen NL-A48 und NL-B48 sind jeweils mit einem grünen

bzw. roten Fluoreszenzfarbstoff modifiziert. Die stark affine Zielsequenz N32 ist an den Anker NL-B48 hybridisiert und wird im roten Kanal detektiert. Zusätzlich wurde noch die Anbindung von K271 (ZF-LZ-FHD) an die Ankersequenzen NL-B48 und NL-A48 ohne verlängerte Ziel-DNA im roten Kanal bzw. im grünen Kanal untersucht (Abb. 3.8).

Für alle drei DNA-Konstrukte kann Proteinassoziation beobachtet werden. Anhand der Assoziationskurven lässt sich erkennen, dass die Bindung unterschiedlich stark ist. Die Affinitätsunterschiede lassen sich anhand der DNA-Sequenzen erklären. Beide Ankerstränge beinhalten 7-mer Bindemotive für die Forkhead-Domäne von FOXP2 (Abb. 3.9). Die unterschiedlichen Geschwindigkeiten und Stärken der Assoziation spiegeln ähnliche Tendenzen zu den anhand des Affinitätslogos berechneten Energien für die sequenzspezifische DNA-Bindung von FOXP2 wider. Erstellt man eine Reihenfolge der Affinitäten der DNA-Konstrukte in Bezug auf die experimentellen Daten auf, so zeigt sich eine Übereinstimmung zu den anhand des Affinitätslogos ermittelten Energien (N32 > NL-A48 > NL-B48).

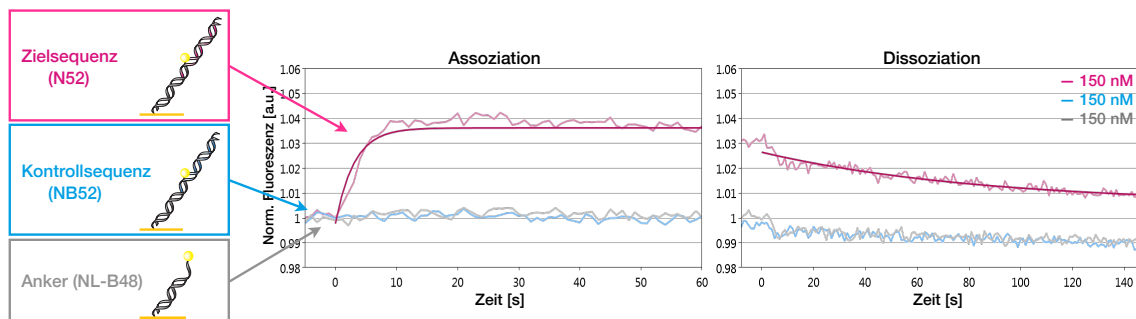


**Abbildung 3.9 – DNA-Konstrukte, die 7-mer Motive zur Bindung der Forkhead-Domäne von FOXP2 enthalten.** In der Tabelle sind die in EMSA- und Biochipexperimenten verwendeten DNA-Konstrukte aufgelistet. Die in ihnen enthaltenen 7-mer-Nukleotidmotive zur Bindung der Forkhead-Domäne von FOXP2 wurden anhand des rechts stehenden Affinitätslogos eingefärbt und die entsprechenden Affinitäten bzw. Energien ermittelt. Die vollständigen DNA-Sequenzen der Konstrukte sind in Anhang C.1 angegeben. Affinitätslogo übernommen und adaptiert von [113]; Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Lizenz (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

Nur ein Nukleotid in der 7-mer Bindesequenz unterscheidet NL-A48 von N32, was die hohe Sensitivität der switchSENSE<sup>®</sup>-Methode widerspiegelt. Die Tatsache, dass sich auf beiden von Dynamic Biosensors designten Ankersequenzen Bindungsmotive für FOXP2 befinden, ist für die Charakterisierung der DNA-Bindung natürlich von Nachteil. Aus diesem Grund wurden die nachfolgenden Experimente zur Charakterisierung der FOXP2-DNA-Bindung im Einfarbmodus durchgeführt, da die Dateninterpretation der Messungen auf dem DualColor-Chip durch zwei mögliche Bindungspartner erschwert wäre.

### 3.2.3 Spezifität der DNA-Bindung im FPS-Modus

Bevor die Experimente zur Charakterisierung von FOXP2 geplant wurden, sollte zunächst geklärt werden, wie sich die Anbindung von FOXP2 im FPS-Modus (siehe Abschnitt 3.1.2) verhält. Da bei FOXP2 im dynamischen Umschaltmodus Bindung an beide Ankersequenzen (NL-A48 und NL-B48) detektiert wurde, musste in einem nächsten Experiment getestet werden, ob auch im FPS-Modus Anbindung an den geringer affinen Anker NL-B48 detektiert wird. Die Assoziation des Proteinkonstrukts K271 (ZF-LZ-FHD) sowohl an den blanken NL-B48-Anker als auch an den Anker mit Zielsequenz N52 und an die Kontrollsequenz NB52 wurde untersucht. Die Sequenz NB52 wurde aus [113] entnommen und entspricht dort Sequenz Seq\_53, für die keine Anbindung von FOXP2 detektiert werden konnte.

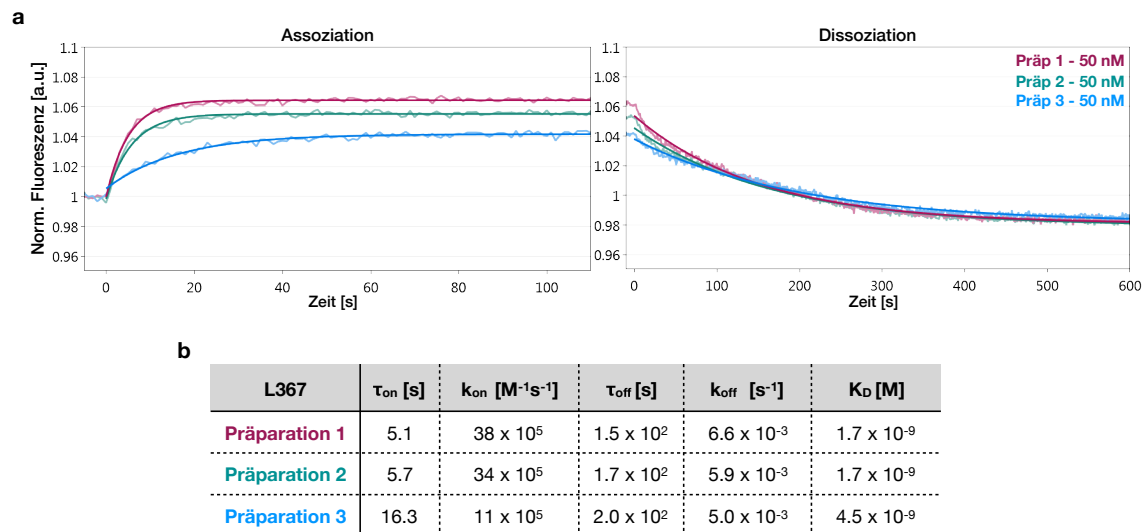


**Abbildung 3.10 – Sequenzspezifische DNA-Bindung von FOXP2 im FPS-Modus.** Die Assoziation und Dissoziation von K271 an doppelsträngige Ankersequenz (NL-B48) alleine und jeweils mit Verlängerung der Zielsequenz (N52) bzw. Kontrollsequenz (NB52) wurde im FPS-Modus gemessen. Das normierte Fluoreszenzsignal ist gegen die Zeit aufgetragen. Daten wurden mit Hilfe der switchANALYSIS-Software ausgewertet.

Im FPS-Modus lässt sich keinerlei Bindung des Proteins an die Ankersequenz NL-B48 beobachten. Das Fluoreszenzsignal bleibt unverändert, die Ankersequenz ist demnach „blind“. Wird der Chip zusätzlich zur Ankersequenz mit doppelsträngiger Kontrollsequenz funktionalisiert, kann weiterhin keine Bindung von FOXP2 detektiert werden. Die Protein-DNA-Wechselwirkung an NL-B48 mit verlängerter N52-Zielsequenz hingegen ist durch eine Erhöhung der absoluten Fluoreszenzintensität eindeutig nachweisbar (Abb. 3.10). Der Fluoreszenzfarbstoff, am oberen Ende des oberflächengebundenen DNA-Nanohebels, reagiert empfindlich auf Veränderungen in der lokalen Umgebung. Es ist ein offensichtlicher Vorteil, dass die Ankersequenz unsichtbar ist, aber die Zielsequenz trotzdem mit hoher Spezifität gebunden wird. Aus diesem Grund wurden die nachfolgenden Experimente zur Charakterisierung von FOXP2 im FPS-Modus durchgeführt.

### 3.2.4 Reproduzierbarkeit von Messungen verschiedener Proteinpräparationen

Da der Reinigungsgrad verschiedener Proteinpräparationen variieren kann, sollte zunächst die Reproduzierbarkeit von Messergebnissen des gleichen Konstrukts untersucht werden. Anhand des N-terminal gekürzten Konstruktes L367 (LZ-FHD) wurden drei Proteinherstellungen, Präparationen 1 bis 3 (Juli 2016, November 2016 und Januar 2017), auf einer Elektrode nacheinander im FPS-Modus vermessen. Als Substrat wurde wieder die Ziel-DNA (NL-B48 mit N52-Verlängerung) verwendet, die Proteinkonzentration lag jeweils bei 50 nM.



**Abbildung 3.11 – Vergleichbarkeit verschiedener Proteinpräparationen des L367-Konstrukts.** Verschiedene Proteinaufreinigungen (Juli 2016, November 2016 und Januar 2017) wurden nacheinander auf einer Elektrode im FPS-Modus gemessen. **(a)** Assoziations- und Dissoziationskurven der Messungen. Normierter Fluoreszenzanstieg ist gegen die Zeit aufgetragen. Daten wurden mit Hilfe der switchANALYSIS-Software ausgewertet. **(b)** Tabelle gibt die für die verschiedenen Proteinaufreinigungen gemessenen Werte an.

Anhand der Assoziationskurven erkennt man eine verlangsamte Anbindung des Proteins aus Präparation 3 im Vergleich zu den beiden anderen Präparationen. In der Dissoziationsphase hingegen verhalten sich alle drei Proteinpräparationen gleich. Schon während der spektrophotometrischen Konzentrationsbestimmung im NanoDrop<sup>TM</sup> hat Proteinpräparation 3 erkennbare DNA-Verunreinigungen gezeigt. In den Ergebnissen der Chip-Messungen spiegelt sich dies wider (Abb. 3.11). Durch die DNA-Verunreinigung sind die Bindestellen in den Proteinen bereits besetzt, sodass die DNA-Hebel um die Anbindung mit der bereits gebundenen zellulären DNA konkurrieren. Präsentieren die DNA-Hebel ein Bindemotiv für FOXP2, das eine höhere Affinität als die zelluläre DNA aufweist, so wird diese verdrängt. Daraus ergibt sich eine Verzögerung, die in einem langsameren  $k_{\text{on}}$ -Wert resultiert. Im Vergleich dazu sind die Assoziationsraten der Präparationen 1 und 2 schneller. Diese beiden Präparationen sind untereinander vergleichbar und zeigen einen sehr ähnlichen Messkurvenverlauf. Für die Dissoziation und die daraus erhaltenen Off-Raten zeigt

sich bei allen drei Präparationen ein sehr ähnliches Verhalten ( $5.0 \cdot 10^{-3}$ ,  $5.9 \cdot 10^{-3}$  bzw.  $6.6 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ). Während der Dissoziation sollte die Verunreinigung durch zelluläre DNA keine Rolle mehr spielen, da nur die Änderung der DNA-Hebel nach Abbinden des Proteins beobachtet wird. Durch die langsamere Assoziationsrate von Präparation 3 im Vergleich zu den beiden anderen Präparationen ergibt sich somit ein höherer  $K_D$  von 4.5 nM.

### 3.2.5 Sind die Messungen durch Massentransport limitiert?

Der Massentransfer über reaktive Oberflächen in mikrofluidischen Geräten ist von zentraler Bedeutung für die Quantifizierung biochemischer Reaktionen wie der Interaktion zwischen Protein und DNA [179]. Die geringen Ausmaße der Durchflusskanäle und das damit verbundene Verhältnis von Oberfläche zu Volumen lassen laminare Strömungen in der Analytlösung entstehen [180, 181]. Bei schnellen Bindungsreaktionen, bei denen oberflächennahe Analyte schneller adsorbieren als sie durch den Massenfluss wieder zugeführt werden, kann es aufgrund dessen zu Depletionszonen an der Oberfläche des Sensors kommen [179, 182, 183]. Massentransportlimitierte Reaktionen täuschen folglich niedrigere kinetische Raten vor als tatsächlich vorliegen.

Um Limitierung durch Massentransport auszuschließen, wurden die Biochips mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ziel-DNA funktionalisiert. Die Oberflächendichte an Ziel-DNA wird verringert, indem bei einem Teil der gekoppelten Anker (NL-B48) der Fluoreszenzfarbstoff „ausgeschaltet“ wird. Dies geschieht während der Hybridisierung durch komplementäre Sequenzen (cNL-B48), die mit einem Quencher-molekül (*Black Hole Quencher*, BHQ) modifiziert sind. Das Mischungsverhältnis von cNL-B48-BHQ und cNL-B48 mit N52-Verlängerung gibt letztendlich die Oberflächendichte an Ziel-DNA (0%, 3%, 5%, 10% und 100%) vor.

Im FPS-Modus wurde die Assoziation des Konstrukts K271 (ZF-LZ-FHD) bei 100 nM Konzentration an verschiedene Dichten an Ziel-DNA auf der Oberfläche gemessen. Im Fall von begrenztem Massentransport sollte eine Verringerung an Oberflächenliganden veränderte On-Raten zur Folge haben. Für die verschiedenen DNA-Dichten konnten keine veränderten Assoziationsraten für FOXP2 beobachtet und Massentransport kann somit ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Für alle weiteren FOXP2-Interaktionsstudien wurden deshalb Biochips mit standardisierten DNA-Dichten ( $10^6$  DNA-Moleküle pro Elektrode) verwendet.

### 3.3 Beitrag von Motiven und Domänen von FOXP2 zur DNA-Bindung

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass mit der switchSENSE<sup>®</sup>-Methode die Interaktion von FOXP2 mit DNA mit hoher Sensitivität direkt beobachtet werden kann. Nachdem die Puffer- und Versuchsbedingungen optimiert wurden, sollten also nun die verschiedenen Proteinkonstrukte (siehe Kapitel 2 Abb. 2.9) auf Unterschiede in Bezug auf ihre DNA-Bindungsfähigkeit untersucht werden. Die Interaktionsanalyse wurde wieder mit den DNA-Konstrukten N52-Sequenz an Anker NL-B48 (**Ziel**) und NB52-Sequenz an Anker NL-B48 (**Kontrolle**) unter physiologischen Bedingungen im FPS-Modus durchgeführt.

#### 3.3.1 Charakterisierung der FOXP2-DNA Interaktion

**Wildtyp** Zuerst sollten die Konstrukte des FOXP2-Wildtyps (siehe Abb. 2.9a) auf ihre Bindungsfähigkeit untersucht werden. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 3.12 dargestellt. Initial wurde mit einer Proteinkonzentration von 150 nM gemessen. Für die Proteinkonstrukte K271 (ZF-LZ-FHD), L367 (LZ-FHD) und LZK (ZF-X-FHD) kann eindeutig Bindung an die Ziel-DNA detektiert werden. Die Proteinbindung wird in Echtzeit durch eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität beobachtet. Bei der Kontroll-DNA hingegen bleibt dieser Fluoreszenzanstieg wie erwartet aus. Die gemessenen Amplituden für die Assoziation an Ziel-DNA liegen für das K271-Konstrukt bei über 10%, die Fluoreszenzänderung bei L367 und LZK liegt immernoch bei 7% bzw. 4%. Für das Konstrukt V503 (FHD), das nur die Forkhead-Domäne zur DNA-Bindung besitzt, lässt sich bei 150 nM keine Interaktion mit der Ziel-DNA beobachten. Dies ändert sich aber, nachdem die Konzentration auf 900 nM erhöht wurde. Wie auch bei den anderen Konstrukten zuvor, lässt sich nun eine eindeutige Fluoreszenzerhöhung detektieren. Wieder ist die DNA-Bindung sequenzspezifisch, denn für die Kontroll-DNA lässt sich auch bei 900 nM keine Signaländerung detektieren. Durch die sehr hohe Proteinkonzentration von 900 nM beim V503-Konstrukt stellt sich sofort eine Sättigung ein, die Amplitude steigt auf ungefähr 6% an.

Erwartungsgemäß lassen sich für die verschiedenen Proteinvarianten Unterschiede in der Geschwindigkeit der Assoziation beobachten. Die Konstrukte K271 und L367 zeigen ähnliche Assoziationsraten, wohingegen das LZK-Konstrukt, bei dem der Leucin-Zipper ausgeknockt wurde, langsamer an die Ziel-DNA anbindet. Für die Konstrukte K271 und L367 erhält man Assoziationsraten  $k_{\text{on}}$  von  $2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  bzw.  $4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Bei LZK hingegen verläuft die Assoziationskurve flacher und es ergibt sich eine Assoziationsrate von  $5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Nach weniger als 10 Sekunden stellt sich für die Konstrukte K271 und L367 das Endlevel des Fluoreszenzsignals ein, bei LZK hingegen stellt sich dies erst nach ungefähr 30 Sekunden ein.

Betrachtet man die Dissoziationskurven der verschiedenen Messungen, so lässt sich feststellen, dass die Bindung des K271-Konstruktes an DNA am stabilsten ist. Diese Stabilität wird durch sehr langsamen Off-Raten verursacht. Nach 10 Minuten beobachteter Dissoziation ist immer noch ein Restsignal detektierbar. Das Protein ist nicht vollständig von der DNA abgelöst, es ergibt sich somit eine Dissoziationskonstante  $k_{\text{off}}$  von  $3.9 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . Für das Konstrukt L367 ist nach knapp vier Minuten keine Fluoreszenz mehr zu erkennen ist



( $5.8 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ). Auch das LZK-Konstrukt zeigt in der Dissoziation eine ähnliche Tendenz wie L367, nach knapp vier Minuten ist keine Bindung mehr zu detektieren ( $8.7 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ). Anders verhält es sich mit dem Konstrukt V503, weniger als eine Minute nach Initiation der Dissoziation durch Einspülen des reinen Puffers lässt sich kein Fluoreszenzsignal mehr erkennen ( $5.5 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

**A539P-Substitution** Um zu untersuchen, wie sich die Aminosäuresubstitution von Alanin zu Prolin auf die Kinetik der DNA-Bindung von FOXP2 auswirkt, sollten die gleichen Proteinkonstrukte, diesmal versehen mit A539P-Mutation, in gleicher Weise untersucht werden (siehe Abb. 2.9b). Die in der Forkhead-Domäne von FOXP2 an Position 539 befindliche Aminosäure Alanin steht im Verdacht Domänenaustausch zu ermöglichen [49]. Die Ergebnisse der Interaktionsanalysen sind in Abbildung 3.13 gezeigt. Wie schon auch bei den Wildtyp-Konstrukten zuvor lässt sich für alle Konstrukte Anbindung an die Ziel-DNA aber nicht an die Kontroll-DNA beobachten. Allerdings lässt sich für das Konstrukt V503(A539P), das nur die Forkhead-Domäne besitzt, bei 150 nM Konzentration ein leichter Fluoreszenzanstieg (1% Amplitude) für die Assoziation an Ziel-DNA detektieren. Der Anstieg der Fluoreszenz ist für das K271(A539P)-Konstrukt nicht so stark wie der seines Pendant ohne Aminosäuresubstitution (8% bzw. 12%), wobei sich für die Konstrukte L367(A539P) und LZK(A539P) vergleichbare Amplituden ergeben (7% bzw. 4%). Auch das V503(A539P)-Konstrukt scheint sich bei 900 nM in Bezug auf eine Amplitudenänderung von 6% ähnlich zum Wildtyp-Konstrukt zu verhalten.

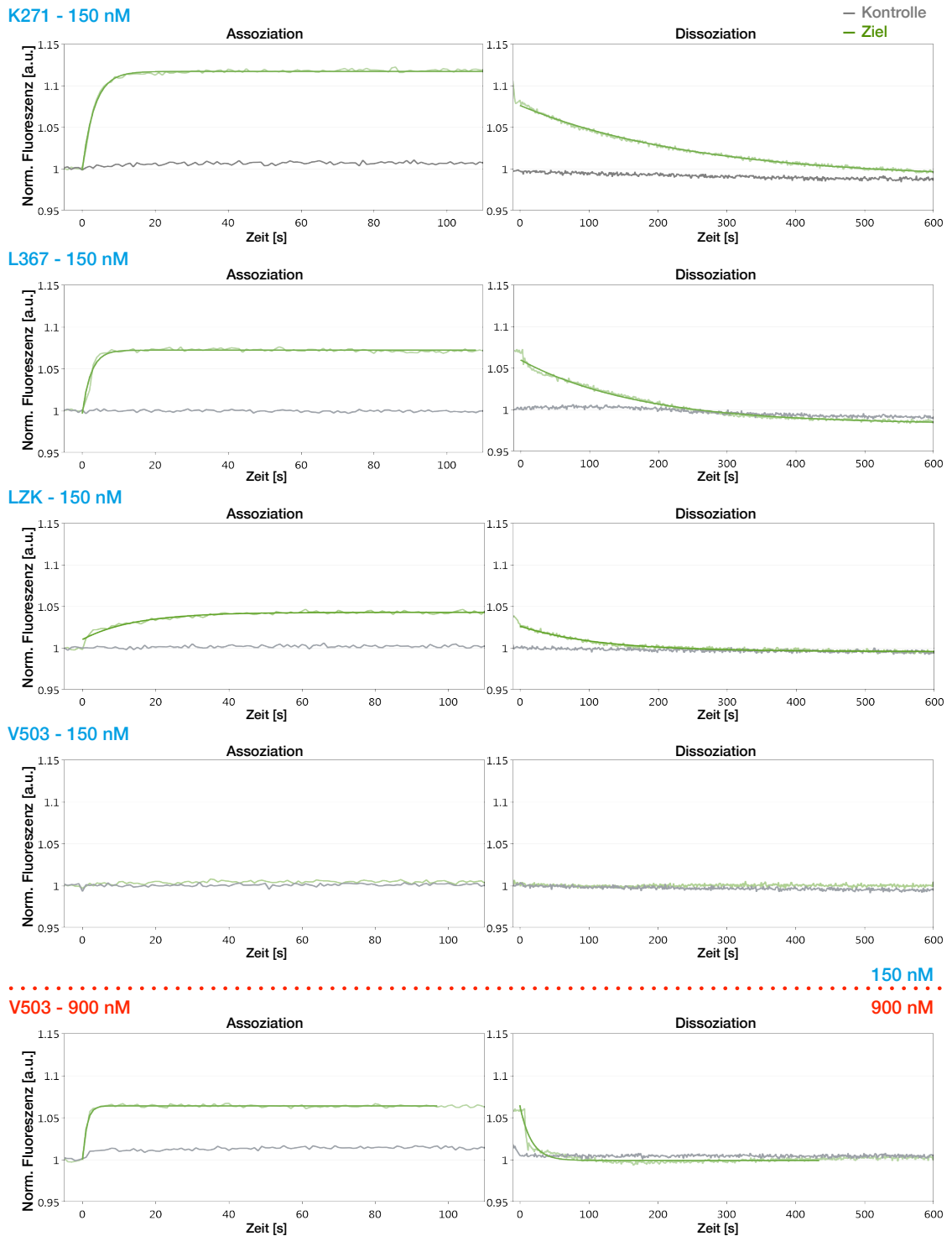
Betrachtet man die Kinetiken der A539P-Substitutionskonstrukte, so lässt sich beobachten, dass diese sehr vergleichbar mit denen der Wildtyp-Konstrukte erscheinen. Einzig im direkten Vergleich der Dissoziationen von K271 und K271(A539P) lassen sich Unterschiede ausmachen. Das K271(A539P)-Konstrukt scheint weniger lang an der DNA zu verweilen, was sich durch vollständiges Ablösen nach knapp 7 Minuten zeigt ( $5.9 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ). Das K271-Konstrukt hingegen zeigt nach mehr als 10 Minuten noch Signal, was für eine stabilere DNA-Bindung spricht.

**Kontrollkonstrukte** Anhand von Kontrollkonstrukten sollte überprüft werden, ob DNA-Bindung auch ohne Forkhead-Domäne nur durch die Bindemotive Zinkfinger und Leucin-Zipper vermittelt werden kann. Außerdem wurde noch ein Konstrukt, dessen Mutation R553H in der Forkhead-Domäne die Sprech- und Sprachkrankheit (VED) auslöst, auf DNA-Bindungsfähigkeit untersucht (siehe Abb. 2.9c).

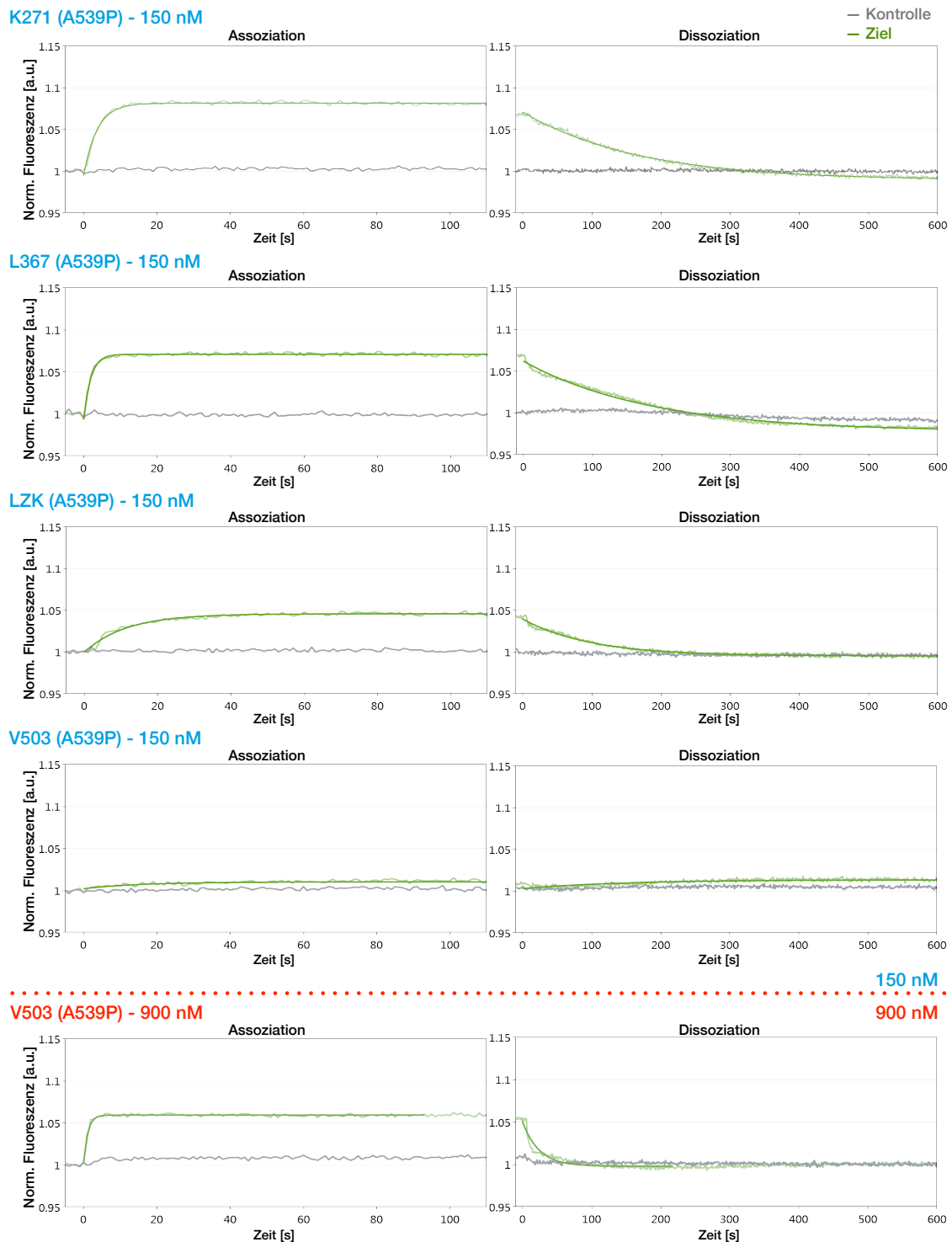
Beide Konstrukte, noFHD und R553H, zeigen sowohl bei 150 nM als auch 900 nM Proteinkonzentration keinerlei Interaktion mit den DNA-Hebeln. Die Fluoreszenzintensität der Ziel-DNA bleibt genauso wie die der Kontroll-DNA unverändert (Abb. 3.14). Für das R553H-Mutationskonstrukt wurde unter anderem noch mit Konzentrationen bis 1200 nM gemessen, aber auch bei diesen sehr hohen Konzentrationen konnte keine Anbindung an die Ziel-DNA detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine sequenzspezifische Bindung an die Ziel-DNA für alle FOXP2-Konstrukte, die die DNA-Bindungsdomäne FHD enthalten, nachgewiesen werden konnte. In Bezug auf die Affinität der Konstrukte lässt sich eine erste Tendenz erkennen. Der Einfluss des Zinkfingers auf die Bindungsaffinität scheint

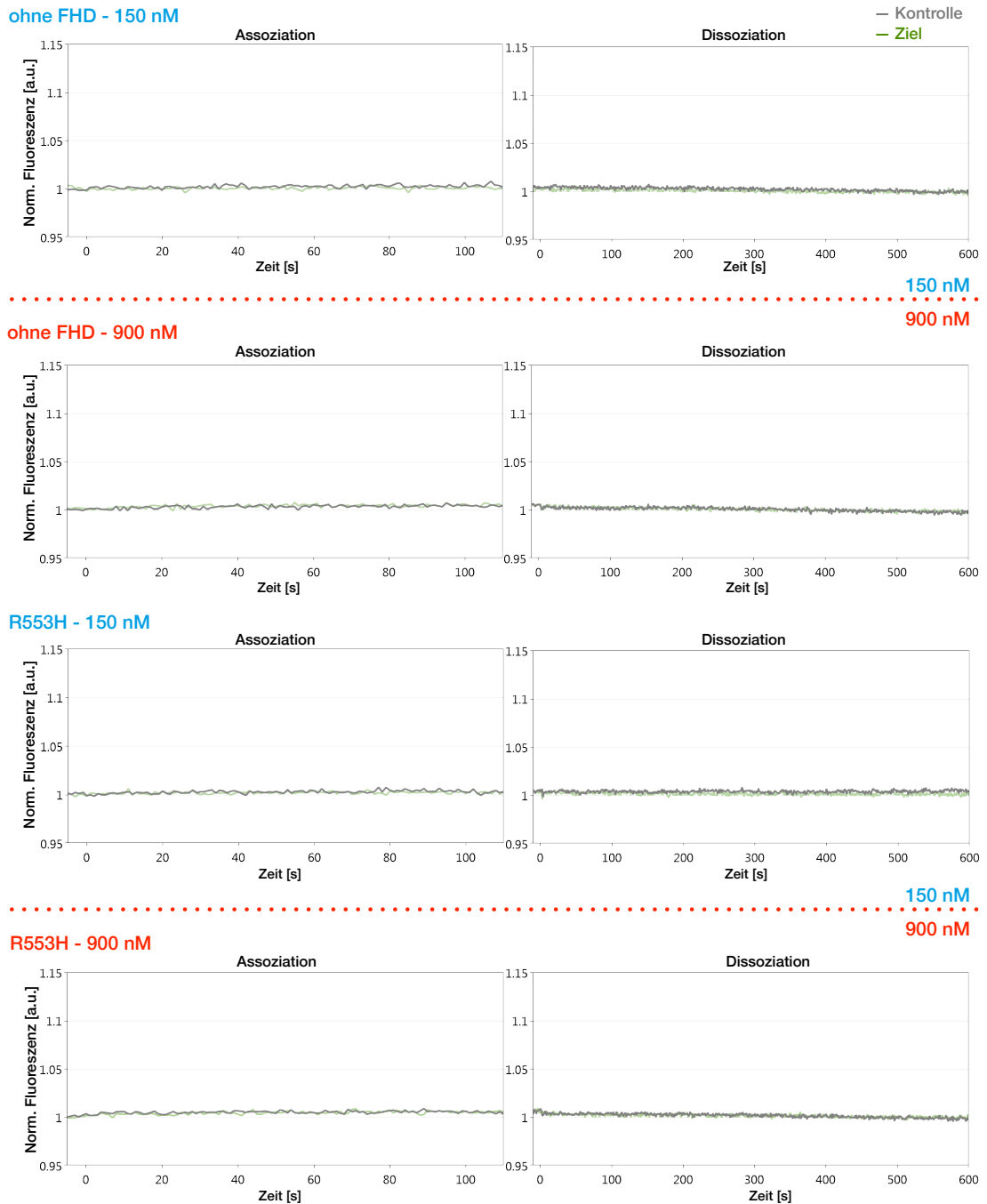
vernachlässigbar gering zu sein, sobald der Leucin-Zipper vorhanden ist (ähnliche Affinität von K271 und L367). Eine Knockout-Mutation des Leucin-Zippers reduziert hingegen die Bindungsaffinität signifikant (geringere Affinität von LZK im Vergleich zu K271). Für das V503-Konstrukt, das neben der Forkhead-Domäne keine weiteren Bindedomänen besitzt, lässt sich bei 150 nM Konzentration keine Bindung an die Zielsequenz beobachten. Ohne Leucin-Zipper reduziert das Fehlen eines Zinkfingers die Affinitätsbindung weiter (geringere Affinität von V503 im Vergleich zu LZK). Die Konstrukte mit A539P-Substitution zeigen ähnliches DNA-Bindevverhalten wie die Wildtyp-Konstrukte. Jedoch ist die Forkhead-Domäne notwendig, damit eine Bindung von FOXP2 an DNA überhaupt erst zustande kommen kann.



**Abbildung 3.12 – Assoziations- und Dissoziationsmessungen verschiedener Wildtyp-FOXP2-Konstrukte.** Im FPS-Modus wurden Assoziation und Dissoziation der Proteinkonstrukte K271, L367, LZK und V503 an Kontroll-DNA (graue Datenpunkte) und Ziel-DNA (grüne Datenpunkte) gemessen. Normierte Fluoreszenz ist gegen Zeit aufgetragen. Proteinkonzentrationen 150 nM (blau) und 900 nM (rot) sind gekennzeichnet. Daten wurden mit Hilfe der switchANALYSIS-Software ausgewertet.



**Abbildung 3.13 – Assoziations- und Dissoziationsmessungen verschiedener FOXP2-Konstrukte mit A539P-Substitution.** Im FPS-Modus wurden Assoziation und Dissoziation der Proteinkonstrukte K271 (A539P), L367 (A539P), LZK (A539P) und V503 (A539P) an Kontroll-DNA (graue Datenpunkte) und Ziel-DNA (grüne Datenpunkte) gemessen. Normierte Fluoreszenz ist gegen Zeit aufgetragen. Proteinkonzentrationen 150 nM (blau) und 900 nM (rot) sind gekennzeichnet. Daten wurden mit Hilfe der switchANALYSIS-Software ausgewertet.



**Abbildung 3.14 – Assoziations- und Dissoziationsmessungen der FOXP2-Kontrollkonstrukte.** Im FPS-Modus wurden Assoziation und Dissoziation der Proteinkonstrukte noFHD (K271, das C-terminal gekürzt wurde, sodass es keine Forkhead-Domäne besitzt) und R553H (K271, das in der Forkhead-Domäne eine Aminosäuresubstitution, die die Sprech- und Sprachkrankheit verantwortet, aufweist) an Kontroll-DNA (graue Datenpunkte) und Ziel-DNA (grüne Datenpunkte) gemessen. Normierte Fluoreszenz ist gegen Zeit aufgetragen. Proteinkonzentrationen 150 nM (blau) und 900 nM (rot) sind gekennzeichnet. Daten wurden mit Hilfe der switchANALYSIS-Software ausgewertet.

### 3.3.2 Konzentrationsabhängige Bindung und Analyse der Bindungsaffinität

Um die bisher gesehenen Tendenzen durch  $K_D$ -Werte zu beschreiben, wurden konzentrationsabhängige Interaktionsanalysen der Wildtyp-FOXP2-Konstrukte K271 (ZF-LZ-FHD), LZK (ZF-X-FHD), L367 (LZ-FHD) und V503 (FHD) im FPS-Modus durchgeführt (Abb. 3.15). Die Assoziation und Dissoziation von K271, L367 und LZK an Ziel-DNA (NL-B48 mit N52-Verlängerung) wurde bei Konzentrationen 16 nM, 50 nM und 150 nM, V503 wurde bei Konzentrationen 150 nM, 450 nM und 900 nM untersucht.

Für alle FOXP2-Konstrukte lässt sich eine konzentrationsabhängige DNA-Bindung erkennen, diese ist durch eine Erhöhung der absoluten Fluoreszenzintensität eindeutig nachweisbar. Die hochaffinen Konstrukte K271 und L367 zeigen hierbei über alle gemessenen Konzentrationen Assoziation an die Ziel-DNA, wohingegen eindeutige Anbindung für das LZK-Konstrukt nur bei der höchsten Konzentration von 150 nM detektierbar ist.

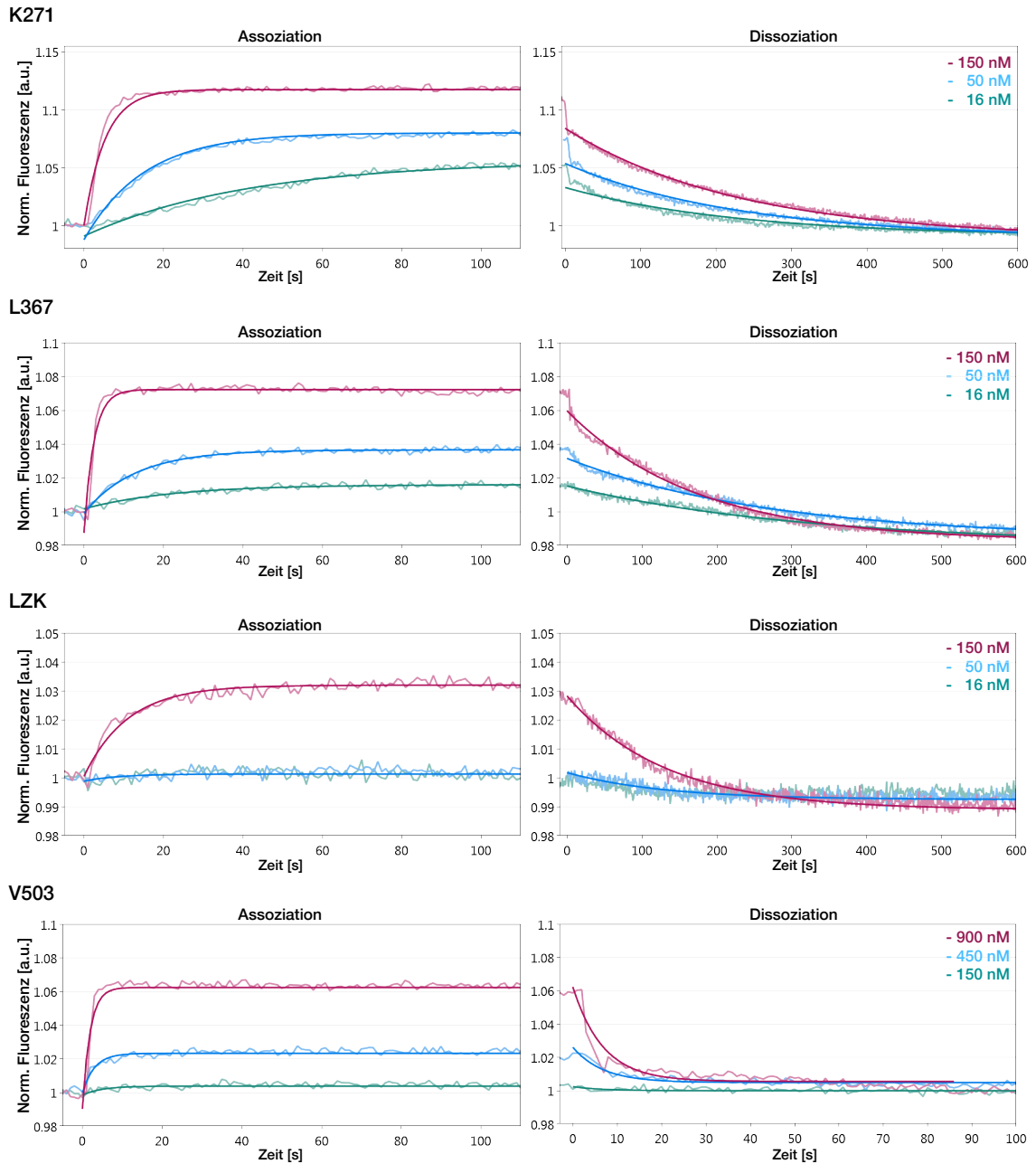
Mit Hilfe der switchANALYSIS-Software wurden die Daten eines Konstruktes sowohl global als auch individuell gefittet. In Abbildung 3.15 sind die Datenkurven der Wildtyp-Messung und ihre globalen Fits gezeigt. Die durch die individuellen Fits erhaltenen Raten und  $K_D$ -Werte sind vergleichbar zu den aus globalen Fits erhaltenen Raten und  $K_D$ -Werten. So erhalten wir zum Beispiel für das K271-Konstrukt einen  $K_D$  von 3.54 nM für den globalen Fit und 3.97 nM für individuell gefittete Kurven. Einzig für das V503-Konstrukt ergibt sich eine Diskrepanz zwischen global und individuell gefitteten Daten (355 nM bzw. 150 nM). Da die Interaktionsanalyse von V503 aber bei sehr hohen Proteinkonzentrationen durchgeführt wurde, erscheint der durch den globalen Fit erhaltene  $K_D$ -Wert glaubwürdiger. Die für die verschiedenen Konstrukte des FOXP2-Wildtyps bestimmten globalen Werte für  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  und  $K_D$  sind in Tabelle 3.1a aufgelistet.

In gleicher Art und Weise wurden die FOXP2-Konstrukte mit A539P-Substitution untersucht. Auf die Darstellung der Datenkurven wurde aufgrund der großen Ähnlichkeit zu den Wildtyp-Daten verzichtet. Die globalen Raten und Dissoziationskonstanten hingegen sind in Tabelle 3.1b denen des Wildtyps gegenübergestellt.

#### Diskrepanz zwischen experimentell und theoretisch ermittelten Verlaufskurven

Die der Kinetikanalyse der switchANALYSIS-Software zugrundeliegende Theorie zur Bindung von gelösten Analyten zu oberflächengebundenen Liganden basiert vereinfacht auf der Langmuir-Isotherme und sieht somit eine 1:1-Interaktion von Protein zu DNA vor (für Bindungstheorie siehe Abschnitt 3.1.3). Aus der Literatur ist bekannt, dass FOXP2 in Lösung nicht nur als Monomer, sondern auch als Dimer vorliegt [49, 109, 184]. Es wird sogar vermutet, dass FOXP2 nur als Dimer zur DNA-Bindung befähigt ist [41]. Das monphasische Assoziationsverhalten in den Biochipmessungen könnte immerhin ein Hinweis darauf sein, dass DNA-gebundene Proteine nicht mit Proteinen in Lösung interagieren (keine "Dimerisierung auf der Oberfläche").

Um zu untersuchen, wie eine Interaktion im Verhältnis 1:1 auszusehen hätte, wurden mit Hilfe der switchBUILD-Software theoretische Verlaufskurven basierend auf den experimentell ermittelten Assoziations- und Dissoziationsraten berechnet (Abb. 3.16). Man erhält Graphen in denen die Anteile an gebundenem Protein gegen die Zeit aufgetragen



**Abbildung 3.15 – Konzentrationsabhängige Interaktionsstudie von Wildtyp-FOXP2-Konstrukten.** Im FPS-Modus wurde die konzentrationsabhängige Assoziation und Dissoziation der Konstrukte K271, L367, LZK und V503 untersucht. Normierte Fluoreszenz ist gegen Zeit aufgetragen. Datenkurven wurden mit Hilfe der switchANALYSIS-Software ausgewertet. Durchgehende Linien stellen globale Fits dar, erhaltene Raten und Dissoziationskonstanten sind in Tabelle 3.1 angegeben.

**Tabelle 3.1 – Vergleich der aus den konzentrationsabhängigen Interaktionsanalysen erhaltenen Assoziations- und Dissoziationsraten sowie Dissoziationskonstanten für die verschiedenen FOXP2-Konstrukte.** Werte wurden aus globalen Fits erhalten. **(a)** Kurzkonstrukte von Wildtyp-FOXP2. **(b)** Konstrukte mit A539P-Substitution in der Forkhead-Domäne.

**a**

Konstrukt	$k_{\text{on}}$ [ $\times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	$k_{\text{off}}$ [ $\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ]	$K_D$ [ $\times 10^9 \text{ M}$ ]
K271	$12 \pm 0.2$	$5 \pm 0.02$	$4 \pm 0.05$
L367	$22 \pm 0.8$	$5 \pm 0.05$	$2 \pm 0.08$
LZK	$5 \pm 0.3$	$8 \pm 0.09$	$16 \pm 0.9$
V503	$4 \pm 0.3$	$144 \pm 7.0$	$360 \pm 28$

**b**

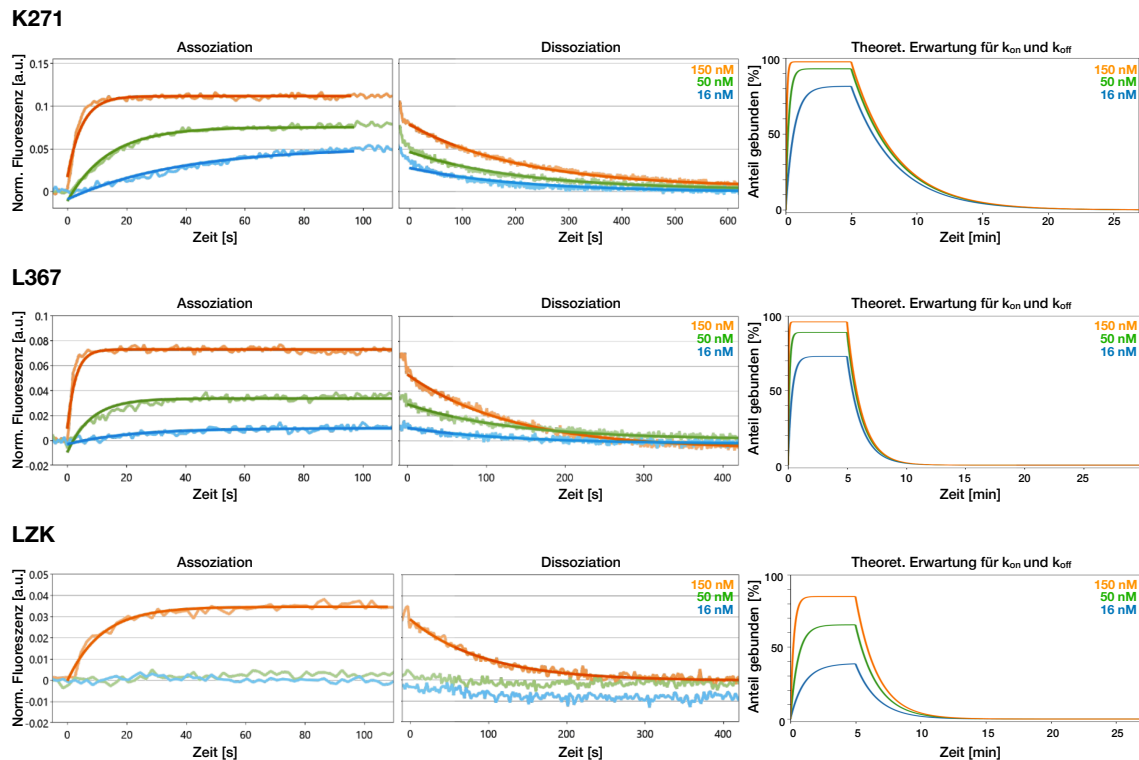
Konstrukt	$k_{\text{on}}$ [ $\times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	$k_{\text{off}}$ [ $\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ]	$K_D$ [ $\times 10^9 \text{ M}$ ]
K271 (A539P)	$9 \pm 0.2$	$6 \pm 0.03$	$7 \pm 0.2$
L367 (A539P)	$17 \pm 0.6$	$5 \pm 0.04$	$3 \pm 0.1$
LZK (A539P)	$5 \pm 0.2$	$10 \pm 0.1$	$20 \pm 0.8$
V503 (A539P)	$3 \pm 0.2$	$78 \pm 3.0$	$260 \pm 18$

sind. Die Software nimmt für die Berechnung der theoretischen Verlaufskurven das gleiche 1:1-Interaktionsmodell an, das auch der switchANALYSIS-Software zur Analyse der Protein-DNA-Bindung hinterlegt ist. Ergo sollte sich im direkten Vergleich zu den experimentellen Messkurven anhand von Übereinstimmungen oder Diskrepanzen erkennen lassen, ob es sich bei der realen Interaktion um ein 1:1-Verhältnis handelt.

Die Analyse zeigt eine deutliche Diskrepanz zwischen den experimentellen und theoretischen Verlaufskurven (Abb. 3.16). Die Abstände zwischen den absoluten Fluoreszenzniveaus der einzelnen Konzentrationen innerhalb eines Konstruktes sind in den experimentellen Verlaufskurven im Vergleich zu den berechneten theoretischen Verlaufskurven unterschiedlich weit auseinander. Für K271 (ZF-LZ-FHD) werden die Abstände der Fluoreszenzniveaus mit steigender Konzentration im Experiment größer, wohingegen sie in den theoretischen Verlaufskurven eher kleiner werden. Vergleichbar sieht es im Fall von L367 aus, auch hier sind Diskrepanzen zwischen Experiment und Voraussage zu erkennen. Besonders auffällig sind die Unterschiede jedoch für das LZK (ZF-X-FHD)-Konstrukt. Die theoretischen Kurven prognostizieren, dass bei allen drei Konzentrationen DNA-Bindung stattfinden sollte. In den experimentellen Daten ist aber nur für die höchste Konzentration von 150 nM DNA-Bindung detektierbar. Die Bindung von FOXP2 an DNA auf dem Biochip folgt wie erwartet keinem einfachen 1:1-Verhältnis. Kooperativität oder Oligomerisierung können nicht ausgeschlossen werden, die ermittelten  $K_D$ -Werte stellen dementsprechend nur eine ungefähre Abschätzung dar.

Obwohl die DNA-Bindung von FOXP2 keinem einfachen 1:1 Modell folgt, können wir dennoch anhand der Biochipmessungen eine Einschätzung der Beitragsleistung der Motive und Domänen angeben und deren Bindungsaffinitäten durch  $K_D$ -Werte untermauern (Tabelle 3.1a). Sowohl in EMSA als auch in Biochipmessungen zeigen die Proteinkonstrukte K271 und L367 ähnliches Bindeverhalten und weisen die größte Affinität zur DNA auf.





**Abbildung 3.16 – Vergleich der experimentellen und theoretischen Verlaufskurven.** Gezeigt sind die experimentellen Assoziations- und Dissoziationskurven (links) der Wildtyp-FOXP2-Konstrukte K271, L367 und LZK und die theoretischen Verlaufskurven (rechts). Datenkurven zeigen die normierte Fluoreszenz gegen Zeit aufgetragen. Die theoretischen Verlaufskurven wurden mit der switchBUILD-Software anhand der zuvor experimentell ermittelten Raten  $k_{on}$  und  $k_{off}$  erstellt und zeigen den Anteil des gebundenen Proteins in Prozent über die Zeit. Ein 1:1-Verhältnis wird für die Berechnung angenommen.

Der Leucin-Zipper ist für hochaffines Anbinden notwendig, ein Knockout dessen Dimerisierungsinterfaces im LZK-Konstrukt setzt die Affinität und somit den  $K_D$  um etwa eine Zehnerpotenz herab. Der Zinkfinger verstärkt, im Vergleich zur Forkhead-Domäne alleine, wiederum die Bindungsaffinität. Dessen Dissoziationskonstante zeigt, dass das LZK-Konstrukt eine deutlich höhere Affinität besitzt als das V503-Konstrukt.

Die Substitution von Alanin zu Prolin in Position 539 in der Forkhead-Domäne zeigt hingegen keinen Einfluss auf das DNA-Bindungsverhalten und die Bindungsaffinität. Bei den gemessenen Affinitätswerten lassen sich dementsprechend nur geringfügige bzw. vernachlässigbare Unterschiede ausmachen (Tabelle 3.1b). Zusätzlich bestätigt wird dieser Eindruck in einem Experiment, bei dem die Konstrukte K271 und K271(A539P) bzw. V503 und V503(A539P) alternierend auf einer Elektrode, d.h. bei vergleichbaren Bedingungen, untersucht wurden. Sowohl bei den Assoziationsraten, als auch den gemessenen Signalamplituden lassen sich, zumindest bei unseren Proteinkonzentrationen, keine Unterschiede zwischen Wildtyp und A539P-Substitution erkennen (Daten nicht gezeigt). Die nachfolgenden Experimente wurden aus diesem Grund nur noch mit Konstrukten des FOXP2-Wildtyps durchgeführt.

### 3.4 Serielle Konzentrationsmessung von K271

In Anbetracht der Tatsache, dass die FOXP2-DNA-Interaktion keinem einfachen 1:1 Verhältnis folgt, sollte als nächstes eine konzentrationsabhängige Messung des Proteinkonstrukts K271 (ZF-LZ-FHD) durchgeführt werden. Hier zeigt die switchSENSE®-Methode den Vorteil, dass sich die Chips regenerieren lassen und somit die Möglichkeit besteht die Kinetik von 20 verschiedenen Konzentrationen direkt hintereinander auf der selben Elektrode zu messen. Die bisherigen Messungen der einzelnen Konstrukte wurden nicht immer konsekutiv auf einem Chip bzw. einer Elektrode gemessen. Die Proteine konnten somit verschiedene Inkubationszeiten aufweisen und je nach Chip, Versuchstag bzw. Versuchsablauf konnten Diskrepanzen in Raten und absoluten Fluoreszenzintensitäten beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde nun eine kontinuierliche, serielle Messung des K271-Konstrukts bei aufsteigender Konzentration auf einer Elektrode durchgeführt (Abb. 3.17a).

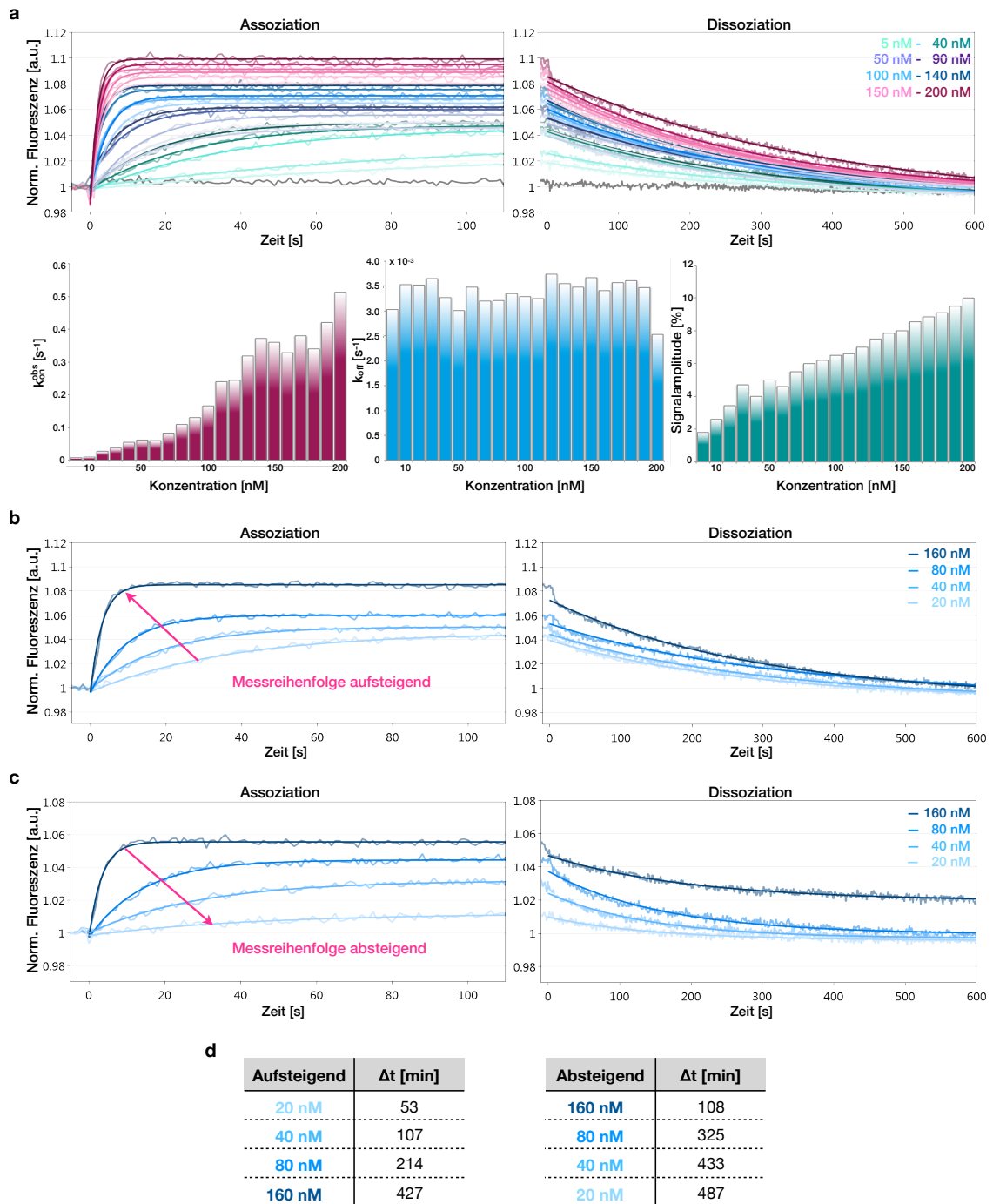
Gemessen wurde wie zuvor die Anbindung an die Ziel-DNA (NL-B48 mit N52-Überhang) im FPS-Modus mit aufsteigenden Proteinkonzentrationen. In einem Zeitraum von ungefähr neun Stunden wurde, angefangen mit einer Konzentration von 5 nM, ab 10 nM jeweils in Schritten von 10 nM bis zur höchsten Konzentration von 200 nM gemessen. Zwischen jeder Konzentrationsmessung wurde ein Regenerierungs- und Hybridisierungsschritt durchgeführt, weshalb zwischen den einzelnen Messungen jeweils 26 Minuten lagen. Die Messkurven wurden individuell gefittet, um konzentrationsabhängige Unterschiede in den Raten von Assoziation und Dissoziation zu sehen.

Anhand der Datenkurven lässt sich eine konzentrationsabhängige DNA-Bindung von FOXP2 erkennen. Die Konzentrationsabhängigkeit spiegelt sich sowohl in den apparenten Assoziationsraten  $k_{\text{on}}^{\text{obs}}$ , die mit steigender Konzentration schneller werden, als auch in dem kontinuierlichen Anstieg der absoluten Fluoreszenzintensität, wider. Der schon in den Verlaufskurven der Messung ersichtliche Trend wird durch die Balkendiagramme noch einmal verdeutlicht. Die Dissoziation hingegen zeigt erwartungsgemäß keine Konzentrationsabhängigkeit.

#### Inverse Messanordnung offenbart Zeitabhängigkeit

Die seriellen Konzentrationsmessungen von K271 (ZF-LZ-FHD) zeigen, dass sowohl die Assoziationsraten als auch die Fluoreszenzintensität mit steigender Konzentration kontinuierlich ansteigen. Ein Unterschied in der Proteinkonzentration von 40 nM zieht einen Anstieg der Fluoreszenzintensität von 2% nach sich. Dieser Anstieg impliziert nicht nur Konzentrationsabhängigkeit, sondern lässt auch eine zeitabhängige Komponente der FOXP2-DNA-Bindung vermuten. Um zu untersuchen, ob sich bei unseren Messungen eine Zeitabhängigkeit der DNA-Assoziation beobachten lässt, wurde die serielle Konzentrationsmessung in inverser Reihenfolge wiederholt.

Angefangen mit der höchsten Proteinkonzentration von 200 nM wurde absteigend bis 5 nM die Assoziation an Ziel-DNA im FPS-Modus gemessen. Die kompletten Verlaufskurven der kontinuierlichen Messungen in aufsteigender und absteigender Reihenfolge sind in Anhang A vergleichend gegenüber gestellt (siehe Abb. A.1). Zur besseren Übersicht sind hier nur ausgedünnte Darstellungen mit vier Konzentrationen gezeigt (Abb. 3.17b und c).



**Abbildung 3.17 – In Serie gemessene konzentrationsabhängige Interaktionsanalyse von K271.** Im FPS-Modus wurde die konzentrationsabhängige Assoziation und Dissoziation von K271 an Ziel-DNA (NL-B48 mit N52) untersucht. Normierte Fluoreszenz ist gegen die Zeit aufgetragen. Datenkurven wurden mit der switchANALYSIS-Software individuell gefittet. **(a)** Kontinuierliche Messung mit aufsteigender Konzentration. Graue Datenreihe zeigt die Messung von 200 nM K271 an Kontroll-DNA (NL-B48 mit NB52). Balkendiagramme zeigen  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  und Signalamplitude über gemessene Konzentration. **(b)** Ausgedünnte Darstellung mit vier Konzentrationen. **(c)** Ausgedünnte Darstellung der inversen Messreihe mit absteigender Konzentration. **(d)** Messzeiten der aufsteigenden (b) und absteigenden (c) Messreihenfolge. Zeitdifferenz  $\Delta t$  bezieht sich auf den Startpunkt der Messung in Bezug auf die jeweils erste Messung des Experiments (Inkubationszeit im Autosampler).

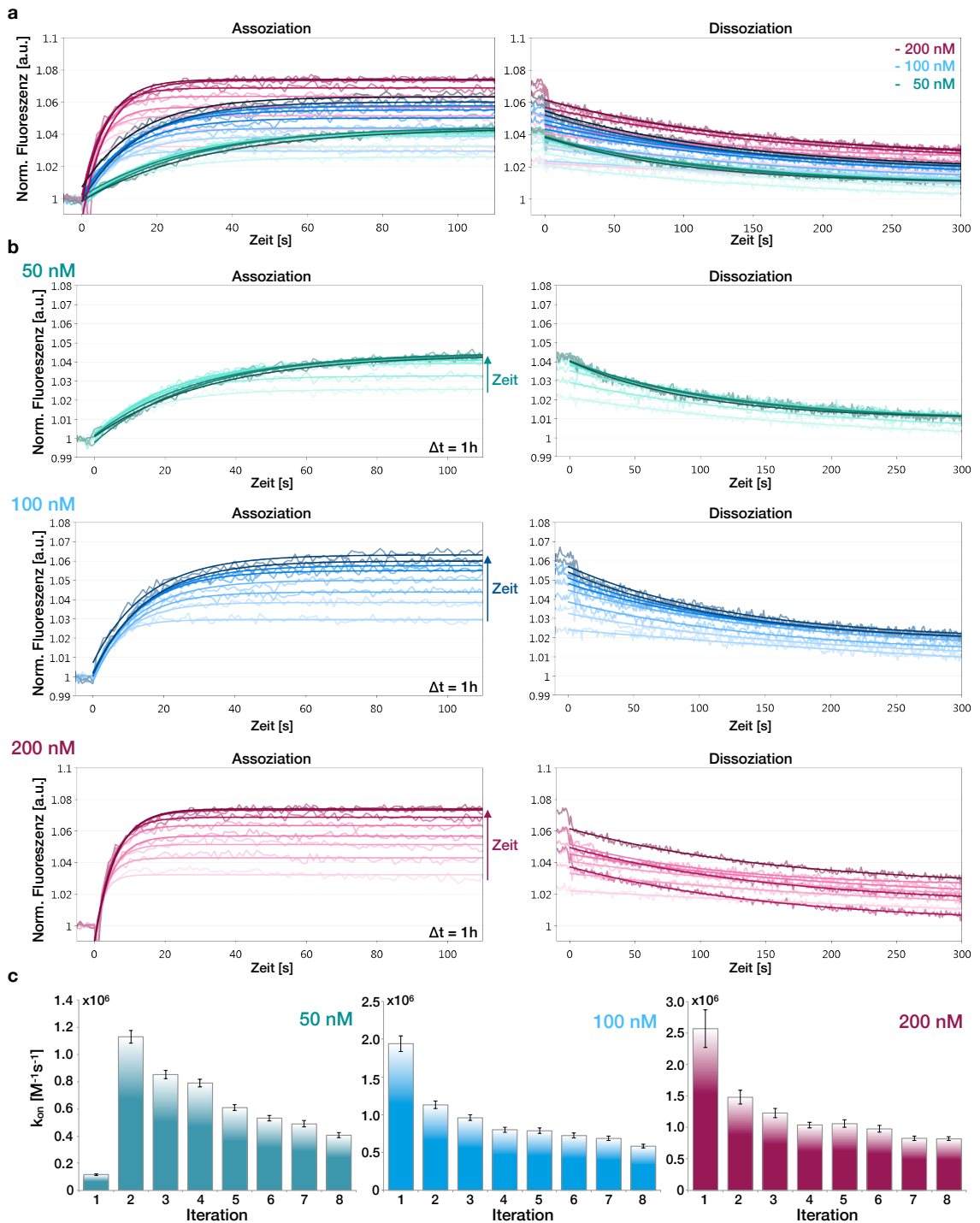
Vergleicht man die beiden Messreihen miteinander, so lassen sich Gemeinsamkeiten und Abweichungen erkennen. Für beide Messrichtungen nehmen die Signalamplituden mit zunehmender Proteinkonzentration zu. Generell liegen die Signalamplituden der inversen Messungen niedriger, was nicht unbedingt nur auf die Messanordnung, sondern auch auf die Nutzung von verschiedenen Chips zurückzuführen sein kann. Ein Hinweis auf zeitabhängige Effekte hingegen könnten die relativen Abstände zwischen den Signalamplituden innerhalb einer Messung sein. Die Abstände zwischen den Fluoreszenzendeniveaus werden in beiden Fällen, aufsteigender genau wie bei absteigender Messreihenfolge, immer größer. Je nach Messabfolge inkubieren Proteinlösungen mit vergleichbarer Konzentration unterschiedlich lange im Autosampler bevor die eigentliche DNA-Interaktionsanalyse durchgeführt wird (Abb. 3.17d). Die Umkehr der Messreihenfolge für 160 nM Proteinlösung zum Beispiel hat eine Differenz der Inkubationszeit von fünfeinhalb Stunden zur Folge. Die unterschiedlichen absoluten Fluoreszenzintensitäten könnten durch diese Zeitdifferenzen verursacht sein.

Die Unterschiede im Anstieg der Fluoreszenzintensität könnten zwei unterschiedliche Ursachen haben. Einerseits besteht die Möglichkeit, dass Lösungseffekte auftreten bei denen mit der Zeit Proteinaggregate zerfallen und eine Erhöhung der effektiven Konzentration zur Folge haben und andererseits kann es zu Protein-Protein-Interaktion in Lösung kommen. Größere Proteinkomplexe könnten eine veränderte Auswirkung auf die Fluoreszenzfarbstoffe haben und somit eine Fluoreszenzsteigerung nach sich ziehen.

Die Datenreihen der inversen Messreihenfolge legen nahe, dass es sich zumindest in der ersten Zeit der Messung um Aggregatauflösung bzw. Equilibration handeln könnte (siehe Abb. A.1 in Anhang A). Dies würde erklären, warum zeitlich zuerst gemessene Konzentrationen (200 nM bis 160 nM) steigende Signalamplituden bei abfallender Konzentration aufweisen. Die Anstiege der Fluoreszenzintensität liegen dabei unterhalb des absoluten Fluoreszenzlevels der 140 nM-Proteinlösung, die zum Zeitpunkt ihrer Messung schon drei Stunden im Autosampler inkubiert hat. Nach diesem Zeitpunkt liegen die Signalamplituden wieder für niedrigere Konzentrationen erwartungsgemäß niedriger.

### 3.5 Konzentrations- und zeitabhängige Messreihen

Um zeitabhängige Veränderungen in der Proteinlösung zu untersuchen, wurden als nächstes fortlaufende Interaktionsmessungen auf einem Detektionspunkt durchgeführt. Da sich zeit- und konzentrationsabhängige Effekte nur schwer bis gar nicht voneinander trennen lassen, wurde jeweils bei drei verschiedenen Konzentrationen alternierend zeitabhängig gemessen. Gestartet wurde immer mit der niedrigsten Konzentration, anschließend wurden die nächsthöheren Konzentrationen vermessen. Wie auch schon zuvor wurde der Biochip zwischen den einzelnen Messungen regeneriert und neu hybridisiert. Jeder Messzyklus dauerte somit zwanzig Minuten, wobei zwischen den Messungen der selben Konzentration jeweils eine Stunde lag. Im FPS-Modus wurden in dieser Weise die drei Proteinkonstrukte K271, LZK und V503 untersucht.



**Abbildung 3.18 – In Serie gemessene konzentrations- und zeitabhängige Interaktionsanalyse von K271.** Im FPS-Modus wurde die konzentrations- und zeitabhängige Assoziation und Dissoziation von K271 an Ziel-DNA (NL-B48 mit N52) in acht Iterationen untersucht. Normierte Fluoreszenz ist gegen die Zeit aufgetragen. Datenkurven wurden mit der switchANALYSIS-Software individuell gefittet. **(a)** Komplettmessung von Assoziation und Dissoziation in einem Graph. **(b)** Assoziations- und Dissoziationsmessungen nach Konzentrationen getrennt. **(c)** Balkendiagramme zeigen Assoziationsraten  $k_{on}$  der einzelnen Interaktionsanalysen. Fehlerbalken repräsentieren Fitfehler der switchANALYSIS-Software.

### 3.5.1 K271-Konstrukt

Um die zeitabhängigen Effekte des K271 (ZF-LZ-FHD)-Konstrukts genauer zu untersuchen, wurden die Konzentrationen 50 nM, 100 nM und 200 nM alternierend auf einem Detektionspunkt gemessen. Insgesamt wurden acht Iterationen durchgeführt (Abb. 3.18). Im Graphen der die komplette Messreihe zeigt, fällt auf den ersten Blick auf, dass die Signalamplituden erwartungsgemäß abhängig von der jeweils gemessenen Konzentration sind (Abb. 3.18a). Die niedrigsten Anstiege der Fluoreszenzintensität werden bei der niedrigsten Konzentration beobachtet, die höchste Konzentration hat dementsprechend auch die höheren Signalamplituden. Erstaunlicherweise lassen sich für alle Proteinkonzentrationen über die Zeit Erhöhungen der Fluoreszenzendlevel beobachten. Dies hingegen geschieht in unterschiedlichem Maße für die unterschiedlichen Konzentrationen. Besser erkennbar wird dies, wenn man die Konzentrationen getrennt voneinander darstellt (Abb. 3.18b).

Betrachtet man die Einzelgraphen, so hat es im Fall der 50 nM-Konzentration den Anschein, dass ab einem gewissen Zeitpunkt die Fluoreszenzintensitäten nicht weiter steigen. Sie nähern sich nach ungefähr der dritten bzw. vierten Iteration einer Obergrenze von 4% an. Wahrscheinlich hat die Proteinlösung zu diesem Zeitpunkt eine Art Gleichgewichtszustand erreicht. Auch für die höheren Konzentrationen werden die Abstände zwischen den Signalamplituden mit zunehmender Zeit geringer, wenn auch der Effekt nicht so auffällig ist wie bei der niedrigsten Konzentration von 50 nM.

Neben der Amplitudenerhöhung fällt desweiteren auf, dass die Assoziationskurven innerhalb einer Konzentrationsmessung mit der Zeit einen flacheren Verlauf haben, folglich die Assoziationsraten  $k_{on}$  langsamer werden. Stellt man die Assoziationsraten der einzelnen Interaktionsanalysen als Balkendiagramm über die jeweilige Iteration dar, wird der Trend noch offensichtlicher (Abb. 3.18c).

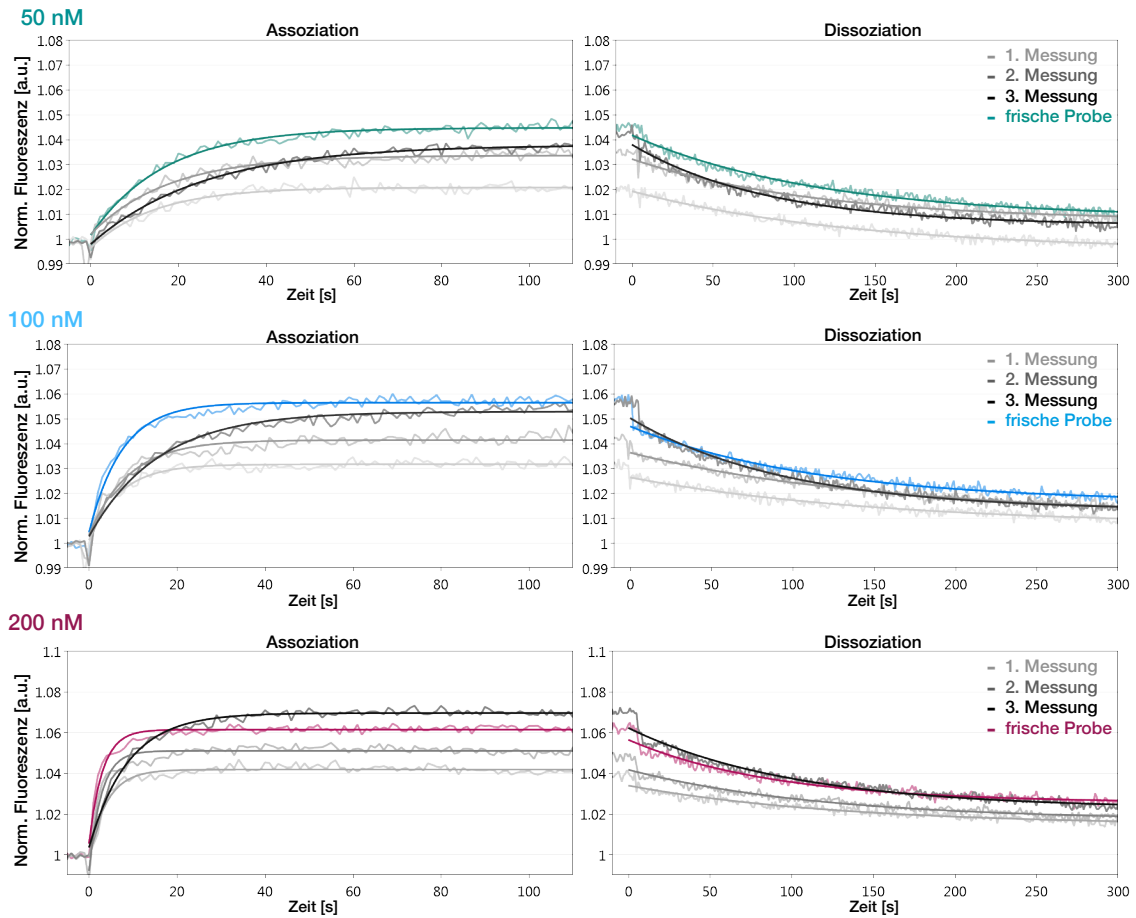
#### Ist die Erhöhung der Signalamplitude ein Messartefakt?

Die auffällige Erhöhung der Signalamplitude über die Zeit könnte wertvolle Informationen über das Bindeverhalten von FOXP2 bzw. Effekte in der Proteinlösung enthalten. Eine derartige Amplitudenerhöhung konnte bis dato von der Dynamic Biosensors GmbH bei der Messung anderer DNA-bindenden Proteine nicht beobachtet werden<sup>5</sup>. Bei der Steigerung der Fluoreszenzintensität könnte es sich also auch um ein Messartefakt handeln. Zum Beispiel könnten Proteinreste auf der Chipoberfläche dafür verantwortlich sein, wenn diese bei der Regenerierung nicht vollkommen entfernt wurden.

Um diesen Fall auszuschließen, wurde eine konzentrations- und zeitabhängige Messung mit K271 durchgeführt, bei der direkt im Anschluss am nächsten Morgen eine frische Proteinprobe aufgetaut, verdünnt und auf dem selben Detektionspunkt gemessen wurde. Sollte die Erhöhung der Signalamplitude durch Proteinrückstände auf dem Chip verursacht worden sein, so würde man auch bei der frischen Probe eine höhere Signalamplitude erwarten.

---

<sup>5</sup>Persönliche Kommunikation mit Dr. Wolfgang Kaiser, Dynamic Biosensors GmbH.



**Abbildung 3.19 – Vergleichbarkeit der Assoziationsraten verschiedener Proben.** Im FPS-Modus wurde die konzentrations- und zeitabhängige Assoziation und Dissoziation von K271 an Ziel-DNA (NL-B48 mit N52) untersucht. Normierte Fluoreszenz ist gegen die Zeit aufgetragen. Datenkurven wurden mit der switchANALYSIS-Software individuell gefittet. Drei Iterationen der Messung (graue Datenreihen), bei denen der Abstand zwischen Messung 1 und 2 eine Stunde und zwischen Messung 2 und 3 fünf Stunden beträgt. Messung der frischen Proben auf dem selben Chip am nächsten Morgen (farbige Kurven).

Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass sich im Vergleich zu den jeweils letzten Messungen keine Regelmäßigkeiten für die absoluten Signalamplituden der frischen Proben erkennen lassen. So liegen die Amplituden der frischen Proben bei der 50 nM Messung höher, bei der 100 nM Konzentration wird ein vergleichbarer Anstieg der Fluoreszenzintensität detektiert und im Fall der 200 nM Messung wird für die frische Probe eine niedrigere Signalamplitude im Vergleich zur letzten Messung beobachtet (Abb. 3.19). Dieses Ergebnis gibt einen Hinweis darauf, dass die gemessenen Erhöhungen der Fluoreszenzintensität nicht durch Proteinrückstände auf der Chipoberfläche verursacht worden sind. Abweichende Signalamplituden bei den frischen Proben verursacht durch Verdünnungsfehler, sollten dennoch nicht ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zu den Signalamplituden lassen sich bei den Assoziationsraten  $k_{on}$  Übereinstimmungen für die frischen Proben und die jeweils ersten Messungen entdecken. Diese





die Forkhead-Domäne, TGTTGAC, besitzt die NL-A48-Sequenz noch zusätzliche 7-mer Motive, die dem Affinitätslogo entsprechend einen niedrigeren Energiegewinn bewirken (Abb. 3.20b). Es liegt also die Vermutung nahe, dass der biphasische Kurvenverlauf durch die Bindemotive, die verschiedene Affinitäten zur Forkhead-Domäne aufweisen, zustande kommt. Die zuerst steil ansteigende Kurve bei der Assoziation spiegelt schnelle Anbindung des Proteins an die Hauptbindestelle wider, der flachere Teil der Kurve hingegen langsamere Assoziation an die restlichen Bindestellen mit geringerer Affinität.

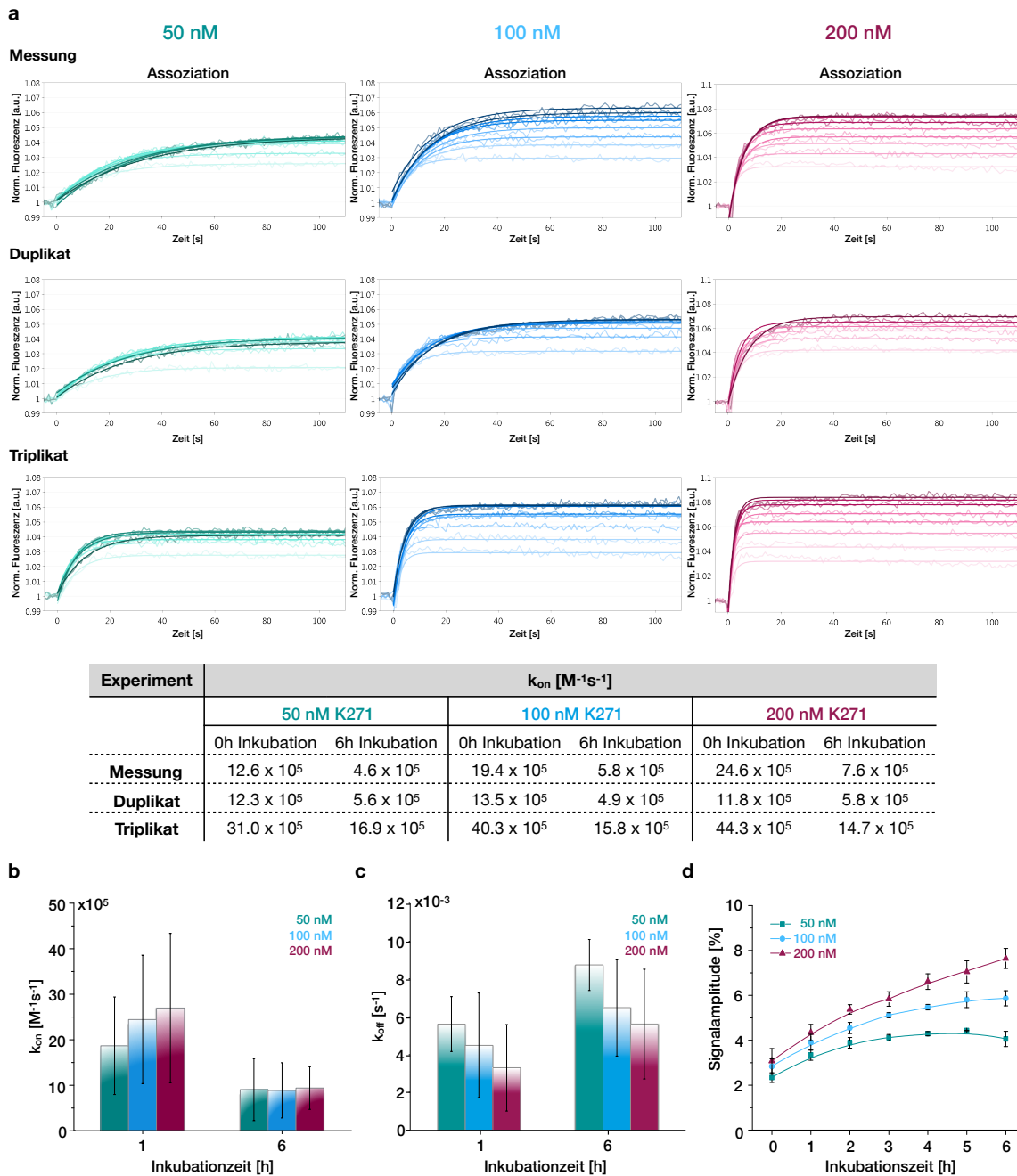
Das in der NL-A48-Ankersequenz enthaltene 7-mer Motiv zur Bindung der Forkhead-Domäne unterscheidet sich entsprechend des Affinitätslogos nur in einer Position zum etwas höher affinen 7-mer Motiv der DNA-Sequenz des N52-Konstrukts. Zusätzlich besitzt auch N52 weitere DNA-Bindestellen, die in Anzahl und Bindungsenergie vergleichbar zu Bindemotiven in der Sequenz von NL-A48 sind (Abb. 3.20b und c). In den vorherigen Interaktionsanalysen konnte dennoch keine derartige biphasische Assoziation und Dissoziation erkannt werden. Mögliche Erklärungen könnten sein, dass die Anbindung des Proteins im Fall von NL-A48 besser zeitlich aufgelöst wird, da der Anker nur 48 bp lang ist. Außerdem erfolgt die Anbindung unterhalb des Fluoreszenzfarbstoffes was eine höhere Sensitivität zur Folge haben könnte. Hingegen umfasst das DNA-Konstrukt aus NL-B48 mit Verlängerung durch N52-Sequenz 100 bp, wobei sich die Zielsequenz mit Hauptbindestelle oberhalb des Fluoreszenzfarbstoffes befindet. Zusätzlich liegt an der Stelle des Fluoreszenzfarbstoffes ein Bruch im DNA-Rückgrat vor, der bei der Ausrichtung des DNA-Konstrukts nach Anbinden des Proteins ein Abknicken und folglich eine Verzögerung im Fluoreszenzsignal hervorrufen könnte. Die unterschiedlichen Anbindungsgeschwindigkeiten ließen sich somit nicht zeitlich auflösen bzw. detektieren.

### Triplikattmessungen

Die Experimente mit der im Anschluss gemessenen frischen Probe und der Bindung an eine andere DNA-Sequenz manifestieren, dass die Erhöhung der Signalamplituden und einhergehende Verlangsamung der Assoziationsraten keine Messartefakte sind. Die Reproduzierbarkeit der konzentrations- und zeitabhängigen Effekte in der Interaktionsanalyse von K271 (ZF-LZ-FHD) mit Ziel-DNA (NL-B48 mit N52) sollte dennoch in Triplikattmessungen gezeigt werden (Abb. 3.21).

Bei allen drei Messungen lassen sich mit zunehmender Inkubationszeit abnehmende Assoziationsraten  $k_{on}$  und stetig ansteigende Amplituden beobachten. Dies gilt wie zuvor schon gesehen für alle Konzentrationen gleichermaßen. Die Triplikattmessungen zeigen, dass Messartefakte definitiv ausgeschlossen und durch die zunehmende Fluoreszenzintensität Effekte in der Proteinlösung detektiert werden können.

Die gemessenen Assoziationsraten  $k_{on}$  der jeweils ersten Messung (0 Stunden Inkubation) sind denen nach sechs Stunden Inkubation vergleichend in einer Tabelle gegenübergestellt (Abb. 3.21a). Der direkte Vergleich zeigt die Abhängigkeit der Assoziationsraten von der Inkubationszeit der Proteinlösung sehr deutlich. Schon anhand der Messkurven sieht man, dass die Duplikattmessreihe der ersten Messreihe stark ähnelt. Dies schlägt sich auch in den gemessenen Assoziationsraten nieder. Das Triplikatt hingegen zeigt schon zu Beginn schnellere Raten. Diese werden aber in gleichem Maße um das zwei- bis dreifache



**Abbildung 3.21 – Drei in Serie gemessene konzentrations- und zeitabhängige Interaktionsanalysen von K271.** Im FPS-Modus wurde die konzentrations- und zeitabhängige Assoziation und Dissoziation von K271 an Ziel-DNA (NL-B48 mit N52) untersucht. Normierte Fluoreszenz ist gegen die Zeit aufgetragen. Datenkurven wurden mit der switchANALYSIS-Software individuell gefittet. **(a)** Nach Konzentrationen aufgetrennte Triplikatmessungen. Tabelle gibt die Assoziationsraten  $k_{on}$  zu Beginn der Messung (0h Inkubation) und nach 6h Inkubation an. Triplikatmessungen wurden gemittelt und **(b)** Assoziationsraten  $k_{on}$ , **(c)** Dissoziationsraten  $k_{off}$  bzw. **(d)** absoluten Fluoreszenzendlevel wurden gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Linien sind ein Leitfaden für das Auge. Fehlerbalken geben die Standardabweichung der drei unabhängigen Messungen an.

verlangsamt wie bei den beiden anderen Messungen und liegen somit im Bereich der Abweichungen, die man für Sensormessungen erwarten würde.

Die Assoziations- und Dissoziationsraten  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  sowie die Fluoreszenzendlevel der einzelnen Konzentrationen der Triplikatmessungen wurden gemittelt und gegen die Inkubationszeit aufgetragen (Abb. 3.21b-d). Man sieht, dass sich die für die Konzentrationen zuerst unterschiedlichen  $k_{\text{on}}$ -Werte über die Zeit angleichen. Nach ungefähr sechs Stunden pendeln sich die Assoziationsraten bei einem mittleren Wert von  $1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  ein. Die Dissoziationsraten werden minimal schneller, wobei dies im Rahmen der Messungenauigkeit vernachlässigt werden kann. Die Signalamplituden, deren Anstieg der Fluoreszenzintensität für die drei Konzentrationen zu Beginn in einem ähnlichen Bereich von 2% und 3% (50 nM bzw. 100 nM und 200 nM) liegen, entwickeln sich mit der Zeit auseinander. Gegen Ende der Messreihe steigt die gemittelte Signalamplitude für die 200 nM-Proteinlösung auf fast 8% an, wohingegen die Amplitude der 50 nM-Lösung sich bei 4% einem Plateau annähert. Somit ergeben sich ungefähre Sättigungszeiten hinsichtlich der Signalamplitude von drei Stunden für die 50 nM-Proteinlösung, fünf Stunden für Protein bei 100 nM und für die höchste Konzentration von 200 nM sieht es so aus als ob innerhalb der Messzeit keine Sättigung erreicht werden konnte.

### Welche Information enthält die Erhöhung der Signalamplituden?

Die Informationen, die in der Signalamplitude und ihrer zeitlichen Erhöhung stecken, setzen sich vermutlich aus verschiedenen Beiträgen zusammen. Einerseits folgt die Interaktion von FOXP2 mit DNA wie zuvor gezeigt keinem einfachen 1:1-Verhältnis, andererseits müssen die switchSENSE<sup>®</sup>-Experimente als Ensemblemessungen betrachtet werden, da mehr als eine Million DNA-Moleküle an einem Detektionspunkt verfolgt werden. Wie zuvor erläutert, beeinflussen verschiedene Effekte die Intensität der Fluoreszenzfarbstoffe bei Messungen im FPS-Modus (Abschnitt 3.1.2). Nicht nur die Ausrichtung der DNA-Hebel nach Anbinden von Protein kann die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes beeinflussen, auch direkte Interaktion des Proteins mit dem Farbstoffmolekül kann Effekte auf dessen Fluoreszenzeigenschaften haben. Wie in den bisherigen Experimenten gesehen, verursacht die Assoziation von FOXP2 an die DNA-Hebel eine Fluoreszenzerhöhung, die sowohl durch die Änderung der effektiven Konzentration (siehe Abb. 3.17) als auch durch zeitabhängige Effekte (siehe Abb. 3.18) beeinflusst wird. Zwei mögliche Hypothesen zur Erklärung dieser zeitabhängigen Effekte sind einerseits die Auflösung von Aggregaten und andererseits die Bildung von Dimeren.

**Hypothese 1: Auflösung von Aggregaten** Beim Einfrieren der Proteinproben könnten Aggregate entstanden sein, die sich nach dem Auftauen mit der Zeit langsam auflösen. Durch den Zerfall der Aggregate würde sich die effektive Konzentration an bindungsfähigem Protein erhöhen und folglich würde eine Erhöhung der Signalamplitude über die Zeit beobachtet werden.

Die Hypothese, dass sich Proteinaggregaten mit der Zeit lösen, sollte mit *Dynamic Light Scattering* (DLS) untersucht werden. Mit der DLS-Methode lässt sich durch dynamische Lichtstreuung die Verteilung der Partikelgröße in Lösung über die Zeit verfolgen.

Um eine ungefähre Vergleichbarkeit zu den switchSENSE<sup>®</sup>-Messungen zu gewährleisten, wurden die DLS-Messungen bei 20°C durchgeführt, auf die auch der Autosampler des DRX-Messgerätes eingestellt war. Eine Proteinprobe von K271 wurde aufgetaut, kurz durchgemischt und in eine Messkuvette überführt. Zuvor wurde die Hintergrundbasislinie der Pufferlösung ohne Protein bestimmt. Es konnten nur unverdünnte Proteinlösung (Konzentration 20 µM) untersucht werden, da das Signal der Streuung im Vergleich zu Puffer ohne Protein nur sehr schwach war. Die Proteinkonzentration lag also bei den DLS-Messungen hundertfach höher als bei den switchSENSE<sup>®</sup>-Studien. Dies macht eine direkte Vergleichbarkeit etwas schwierig, da Effekte wie Lösung von Aggregaten oder Protein-Protein-Interaktion konzentrationsabhängig sind. Trotzdem implizieren die Ergebnisse der DLS-Messungen (siehe Abb. A.2 in Anhang A.2), dass Lösungseffekte in der Proteinsuspension zumindest zu Beginn der DNA-Interaktionsstudien eine Rolle spielen könnten.

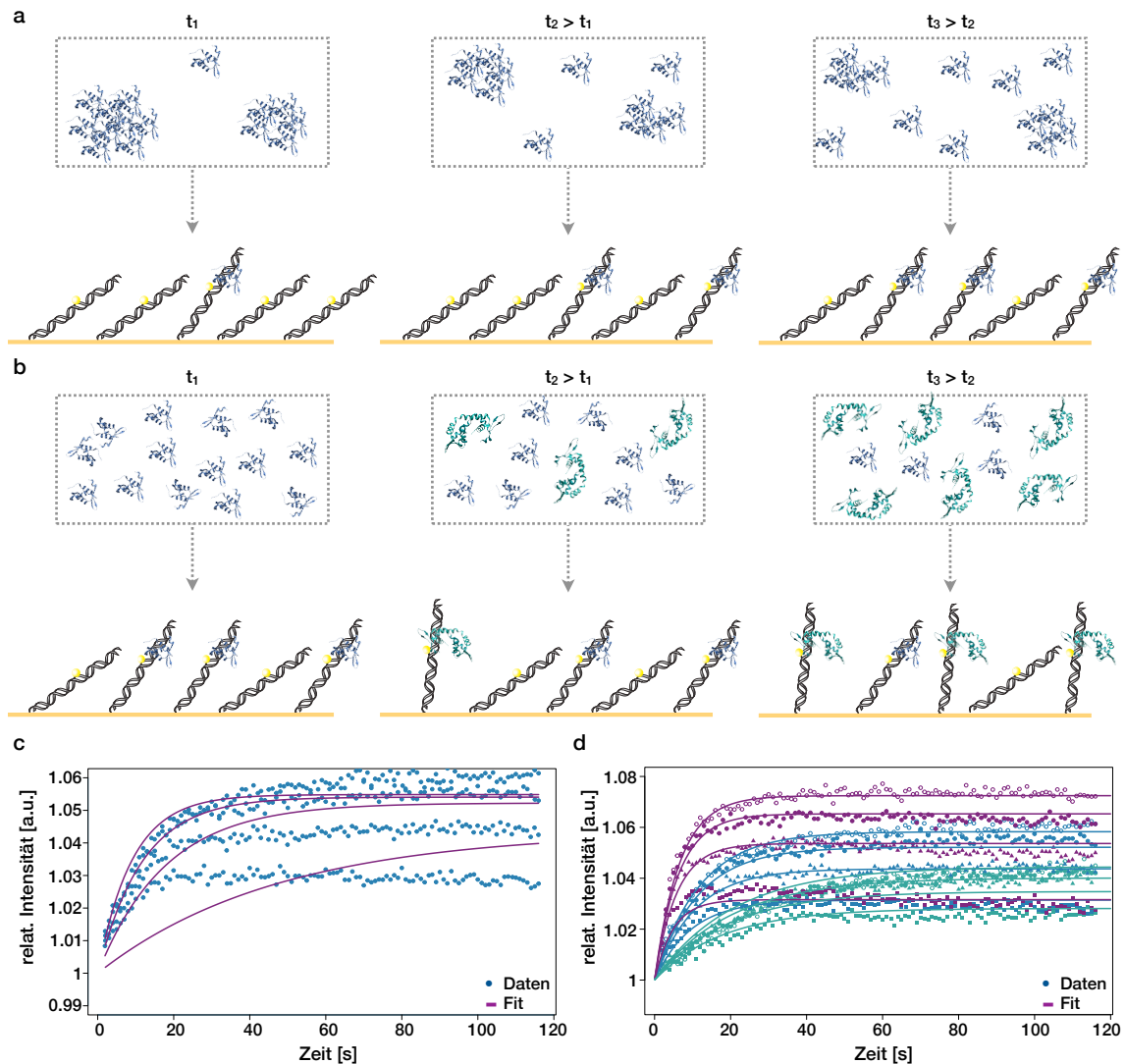
Ein Versuch, die zeitabhängigen Effekte mit Hilfe von Negativkontrast-Transmissionselektronenmikroskopie (*Negative Staining TEM*) sichtbar zu machen, blieb erfolglos. Das Experiment, in dem TEM-Grids mit verschiedenen Konzentrationen (100 nM, 250 nM und 500 nM) Protein, zu unterschiedlichen Inkubationszeiten (direkt, eine Stunde oder zwei Stunden nach dem Auftauen) präpariert wurden, lieferte keine klaren Resultate. Generell zeigte die Negativkontrast-Transmissionselektronenmikroskopie sehr heterogene Ergebnisse. Die sehr schlechte Qualität der Grids zeichnete sich nicht nur durch positives Einfärben und gebrochene Kohlenstoffoberflächen aus, sondern insbesondere durch eine große Heterogenität des Proteins. Oftmals korrelierte die Proteinmenge auf der Oberfläche nicht mit der eingesetzten Konzentration (dichter Proteinrasen bzw. kein Protein detektierbar), eine homogene Proteinverteilung war nicht möglich. Beobachtet wurden vermeintlich einzelne Proteine, aber auch kleinere Aggregate bis hin zu großen Proteinnetzwerken. Diese Beobachtungen standen jedoch in keiner direkten Korrelation mit den Inkubationszeiten (Daten nicht gezeigt). Die Resultate der TEM-Experimente konnten somit nicht zur Klärung der in den switchSENSE<sup>®</sup>-Messungen beobachteten Effekte beitragen.

Eine weitere Möglichkeit die Hypothese der Aggregatauflösung zu untersuchen, ist ein Modell zu erstellen und dieses an die experimentellen Daten anzufitten. Anhand der bisherigen Beobachtungen wurden Annahmen getroffen und in Zusammenarbeit mit Christian Wachauf<sup>6</sup> herausgearbeitet. Die diskutierten Aspekte wurden anschließend von ihm in einem Modell umgesetzt (siehe Abb. A.3 in Anhang A). Folgende Annahmen wurden für das sehr einfache Modell der Aggregatauflösung (graphische Darstellung in Abb. 3.22a) getroffen:

- (i) Bestehende Aggregate lösen sich mit der Zeit auf.
- (ii) Der Zerfall der Aggregate ist eine Reaktion erster Ordnung.
- (iii) Die Konzentration an freien Monomeren steigt deshalb mit der Zeit an.
- (iv) Nur Monomere sind befähigt die DNA-Hebel zu binden.
- (v) Die Assoziation eines Monomers erhöht die relative Fluoreszenzintensität.

---

<sup>6</sup>Seit 2011 Doktorand in der AG Dietz.



**Abbildung 3.22 – Modelle zur Erklärung der im Experiment beobachteten Amplitudenerhöhung.** Modelle der Hypothesen (a) Auflösung von Proteinaggregaten und (b) Dimerisierung von Proteinen sind vergleichend dargestellt. Monomere (blau) bzw. Dimere (grün) von FOXP2 (2a07.pdb [49]) binden an die DNA-Hebel. Höhere Fluoreszenzintensität durch Bindung eines Dimers in Modellannahme (b) ist durch steiler gestellte DNA-Hebel dargestellt. (c) Modell aus (a) an vier Datenkurven (100 nM) des Experiments aus Abb. 3.18a angefitet. (d) Modell aus (b) an vier Datenkurven (50 nM, 100 nM und 200 nM) des Experiments aus Abb. 3.18a angefitet. Experimentdaten sind als Punkte, Fits als durchgehende Linien dargestellt.

**Hypothese 2: Dimerisierung über Zeit** In der Literatur wird gezeigt, dass FOXP2 mit sich selbst interagieren kann [41,49,58,184,184,185]. Die Vermutung, dass durch die steigenden Signalamplituden Interaktion von Protein mit Protein in Lösung sichtbar gemacht werden könnte, liegt also nahe. Um diese Hypothese zu testen, sollte die, sich mit der Zeit ändernde durchschnittliche Größe der Proteinkomplexe z.B. durch Dimerisierung oder Oligomerisierung, mit Hilfe des switchSENSE® *Sizing*-Modus (siehe Abschnitt 3.1.1) untersucht werden. Die DNA-Anker (NL-B48) wurden also mit NTA<sub>3</sub>-modifizierten komplementären

Oligonukleotiden doppelsträngig gemacht und mit His<sub>6</sub>-getaggttem K271 abgesättigt. Durch die Anbindung des Proteins an die oberen Enden der DNA-Hebel konnte eine Verlangsamung in deren Aufwärtsbewegung beobachtet werden. Für die Größenbestimmung wurden dann stündlich über acht Stunden hinweg die DNA-Hebel in stehender Proteinlösung (100 nM) auf- und abwärts bewegt. Es wurden zwei verschiedene Arten der Durchführung zur Inkubation der Proteinlösung getestet. Einerseits wurde die Proteinlösung direkt im Durchflusskanal und andererseits im Autosampler inkubiert. Das eigentliche *Sizing*-Experiment wurde unter physiologischen Salzbedingungen durchgeführt. Ein Grund dafür war, wie auch schon zuvor (siehe Abschnitt 3.2.1) beobachtet, dass unter salzarmen Bedingungen unspezifische Interaktion zwischen FOXP2 und den DNA-Hebeln stattfindet. Der hydrodynamische Durchmesser  $D_H$  konnte somit nicht ermittelt werden (siehe Abb. 3.3). Sowohl für die zeitabhängige DNA-Aufwärtsbewegung als auch die Fluoreszenzintensität konnten nur vernachlässigbare Änderungen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Eine klare Aussage bezüglich der Änderung der Proteingrößen war hinsichtlich der Resultate nicht möglich. Obwohl die Ergebnisse unsere Hypothese nicht unterstützen, so widerlegen sie sie auch nicht. Sterische Effekte könnten zum Beispiel eine Zusammenlagerung der Zinkfinger und Leucin-Zipper zweier Proteine verhindern, da sich diese in nächster Nähe zur NTA<sub>3</sub>-Modifikation der DNA und dem His<sub>6</sub>-Tag befinden. Dies wäre nur eine mögliche Erklärung, weshalb die Größenbestimmung nicht funktioniert hat.

Aus diesem Grund wurden wieder in Zusammenarbeit mit Christian Wachauf<sup>5</sup> mögliche Aspekte der DNA-Bindung herausgearbeitet, die er anschließend in einem Modell umgesetzt hat (siehe Abb. A.4 in Anhang A). Folgende Annahmen wurden für das Modell der Dimerisierung (graphische Darstellung in Abb. 3.22b) getroffen:

- (i) Monomere werden über die Zeit zu Dimeren (langsamer Prozess).
- (ii) Monomere und Dimere sind befähigt die DNA-Hebel zu binden.
- (iii) Dimere assoziieren nur mit einer von zwei möglichen Monomerseiten, weshalb sich die effektive Konzentration nicht ändert.
- (iv) Biphase Dissoziation wird nicht beobachtet, die Dissoziationsraten werden deshalb konstant gehalten.
- (v) Assoziation eines Dimers hat eine höhere relative Fluoreszenzintensität zur Folge als die eines Monomers.

### Übereinstimmung der Modelle mit den Experimentdaten

Wie gut sich die beiden Modelle an die experimentellen Daten anfitzen lassen, soll durch die Überlagerung der gemessenen und gefitteten Kurven untersucht werden (Abb. 3.22c und Abb. 3.22d).

Für Hypothese 1 (Auflösung von Aggregaten) lässt sich sehr gut erkennen, dass sowohl der Verlauf der Fits als auch deren Anstieg die experimentellen Datenkurven nicht gut beschreibt. Durch den Zerfall der Aggregate steigt die effektive Konzentration an bindungsfähigen Monomeren derart schnell an, dass die Assoziationsraten schneller werden und die Amplituden stark ansteigen. Jedoch nähern sich sowohl Assoziationsraten als auch

Signalamplituden im Modell recht schnell einem Maximum. Bei den experimentellen Datenkurven bleiben die Assoziationsraten fast konstant, die Amplituden hingegen steigen mit der Zeit stark an. Im Experiment nähern sich die Signalamplituden einem Maximalwert an, dennoch liegen sie höher als die Amplituden der Fits (Abb. 3.22c).

Anders sieht es im Fall des Modells für Hypothese 2 (Dimerisierung) aus. Auch hier beschreiben die Fits die experimentelle Datenkurven nicht perfekt. Jedoch erscheint das zweite Modell wesentlich passender als Modell 1. Durch die Annahme, dass die relative Fluoreszenzintensität abhängig von der Assoziation eines Monomers bzw. Dimers ist, steigen die Signalamplituden stärker an und die Assoziationsraten bleiben relativ stabil. Die Assoziationsraten werden nicht stark beeinflusst, da sich die effektive Konzentration in unserem Modell nicht ändert. Dies geschieht infolge der Annahme, dass Dimere nur über eines ihrer Monomere an die DNA binden und somit zwei Bindungsmodi aufweisen. Assoziationsraten und Signalamplituden werden also von Modell 2 gleichermaßen gut beschrieben, wobei es bei den verschiedenen Konzentrationen Unterschiede in der Passgenauigkeit gibt. Die Fits der 50 nM Konzentration sagen schnellere Assoziationsraten als die Experimentdaten voraus. Für die Konzentrationen 100 nM und 200 nM werden zumindest die späteren Messungen durch das Modell sehr gut beschrieben (Abb. 3.22d).

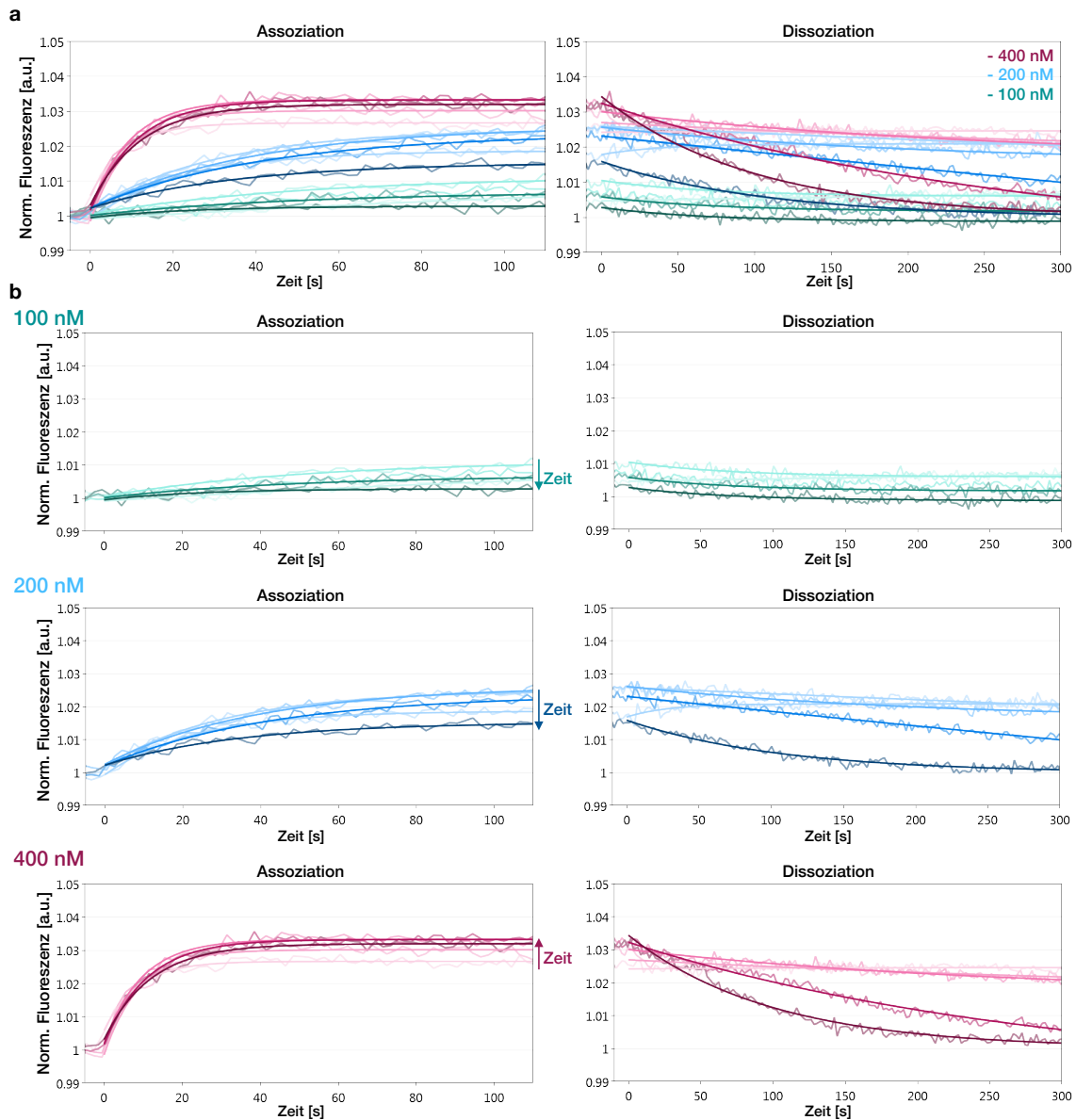
**Schlussfolgerung** Modell 1 zeigt sowohl in den Assoziationsraten als auch den Signalamplituden starke Abweichungen zu den gemessenen Daten. Modell 2 hingegen beschreibt die Assoziationsraten und Signalamplituden der Messungen mit großer Übereinstimmung, wobei bei den zeitlich ersten Messungen noch größere Abweichungen zu sehen sind als bei späteren Messzyklen. Es könnte also sein, dass beide Effekte in unseren Experimenten beobachtet werden. Zu Beginn der Messungen kommt es zu Lösungseffekten in der Proteinlösung, weshalb die ersten gemessenen Assoziationsraten oftmals noch Ausreißer sind. Bei weiterem Fortschreiten der Messungen kann es zu Protein-Protein-Interaktion kommen, die sich folglich auf die Ausrichtung der DNA-Hebel und die Fluoreszenzintensität der Farbstoffe auswirkt.

### 3.5.2 LZK-Konstrukt

Da Protein-Protein-Interaktion in Lösung als Ursache für den Anstieg der Signalamplitude vermutet wird, sollte nun das Proteinkonstrukt LZK (ZF-X-FHD) in konzentrations- und zeitabhängigen Interaktionsanalysen an Ziel-DNA (N52-Sequenz an NL-B48 Anker) untersucht werden. Zuerst wurde die Messung bei Konzentrationen von 50 nM, 100 nM und 200 nM im FPS-Modus durchgeführt. Für die niedrigste Konzentration konnte keine Assoziation an die DNA-Hebel detektiert werden, die nächst höheren Konzentrationen zeigten Interaktion mit der DNA. Bei beiden Konzentrationen (100 nM und 200 nM) fielen die Signalamplituden jedoch im Verlauf der Messung ab (Daten nicht gezeigt). Da zunächst ein Fehler im Experiment vermutet wurde, wurde die Messung noch einmal mit höheren Konzentrationen (100 nM, 200 nM und 400 nM) über einen Zeitraum von fünf Stunden wiederholt (Abb. 3.23a).

Bei der Wiederholungsmessung ließ sich jedoch wieder beobachten, dass die Signalamplituden bei Konzentrationen von 100 nM bzw. 200 nM über die Zeit abfallen. Die

Assoziationsraten allerdings sind konstant, wohingegen die Dissoziationsraten mit der Zeit schneller werden (Abb. 3.23b). Auffällig ist, dass sich das Assoziationsverhalten bei der höchsten Konzentration von 400 nM verändert. Die Signalamplituden steigen mit der Zeit leicht an, bevor sie sich einem Maximum nähern. Dieser Kurvenverlauf ähnelt dem von



**Abbildung 3.23 – In Serie gemessene konzentrations- und zeitabhängige Interaktionsanalyse von LZK.** Im FPS-Modus wurde die konzentrations- und zeitabhängige Assoziation und Dissoziation von LZK an Ziel-DNA (NL-B48 mit N52) in fünf Iterationen untersucht. Normierte Fluoreszenz ist gegen die Zeit aufgetragen. Datenkurven wurden mit der switchANALYSIS-Software individuell gefittet. **(a)** Komplette Messung von Assoziation und Dissoziation in einem Graphen. **(b)** Assoziations- und Dissoziationsmessungen nach Konzentrationen getrennt.



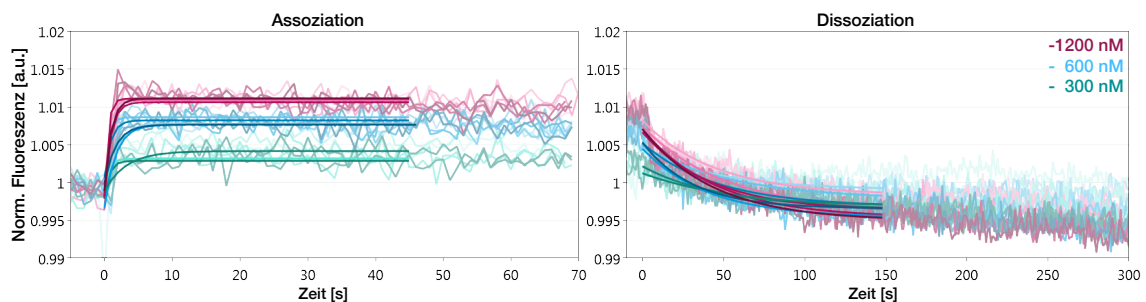
K271, wobei die Amplitudenerhöhung LZK bei Weitem nicht so drastisch ausfällt (vgl. 400 nM in Abb. 3.23b mit 200 nM in Abb. 3.18b).

Dass die Amplituden im Fall von LZK bei den Konzentrationen 100 nM und 200 nM über die Zeit abfallen, die Dissoziationsraten jedoch schneller werden, könnte ein Hinweis auf fortschreitende Proteinaggregation sein. Durch die Bildung von Aggregaten steht weniger bindungsfähiges Protein zur Verfügung und die relative Fluoreszenzänderung fällt kleiner aus. Warum aber bei der 400 nM-Messung eine solide Assoziation detektiert werden kann, könnte zwei verschiedene Gründe haben. Einerseits wäre es möglich, dass durch die sehr hohe Konzentration trotz Aggregation noch genug Protein zur DNA-Bindung zur Verfügung steht. Andererseits wäre es auch möglich, dass wir uns mit der Konzentration schon in einem Bereich befinden, der für eine zinkfingervermittelte Dimerisierung ausreicht.

### 3.5.3 V503-Konstrukt

Als letztes wurden noch konzentrations- und zeitabhängige Interaktionsanalysen von V503 (FHD) mit Ziel-DNA (N52-Sequenz an NL-B48 Anker) durchgeführt. Zuvor wurde gezeigt, dass die Dissoziationskonstante von V503 mit ungefähr 360 nM recht hoch liegt, weshalb bei Konzentrationen von 300 nM, 600 nM und 1200 nM gemessen wurde (Abb. 3.24).

Wieder lässt sich gut erkennen, dass die Signalamplitude konzentrationsabhängig ist. Die höchste Konzentration zeigt somit auch die höchste relative Fluoreszenz. Obwohl die Messung ein sehr schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufweist, lässt sich jedoch keine Erhöhung der Signalamplituden mit der Zeit beobachten. Das schlechte Signal-zu-Rausch-Verhältnis wird wahrscheinlich durch die sehr hohe Proteinkonzentration verursacht. In der dichten Proteinlösung könnte es zur Interaktion von Proteinen mit den Fluoreszenzfarbstoffen kommen, die dann auch ohne Assoziation an die DNA-Hebel deren Fluoreszenzintensität beeinflussen.



**Abbildung 3.24 – In Serie gemessene konzentrations- und zeitabhängige Interaktionsanalyse von V503.** Im FPS-Modus wurde die konzentrations- und zeitabhängige Assoziation und Dissoziation von V503 an Ziel-DNA (NL-B48 mit N52) in fünf Iterationen untersucht. Normierte Fluoreszenz ist gegen die Zeit aufgetragen. Datenkurven wurden mit der switchANALYSIS-Software individuell gefittet.

### 3.6 Zusammenfassung Kapitel 3

Die DNA-Interaktion des humanen Transkriptionsfaktors FOXP2 wurde mit Hilfe der switchSENSE<sup>®</sup>-Technologie untersucht. Für das Datenverständnis wurden zuerst wichtige Hintergrundinformationen, wie z.B. das Prinzip der Technologie, die verschiedenen Messmodi und der Versuchsablauf der biochipbasierten Methode, erläutert.

Die für die Protein-DNA-Interaktion wesentlichen Bedingungen während der Messungen wurden optimiert und die Spezifität der DNA-Bindung wurde untersucht. Nach Optimierung der Versuchsbedingungen wurden die verschiedenen Motive und Domänen, die zur DNA-Bindung von FOXP2 beitragen, anhand verschiedener Proteinkurzkonstrukte charakterisiert. Für die Konstrukte wurden Assoziationsraten ( $k_{\text{on}}$ ) von  $4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  bis  $22 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und Dissoziationsraten ( $k_{\text{off}}$ ) von  $5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  bis  $144 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  gemessen. Die Forkhead-Domäne von FOXP2 ist sowohl für die Assoziation als auch für sequenzspezifische Erkennung der DNA notwendig. Mit einer Dissoziationskonstante von 360 nM ist die DNA-Bindung jedoch eher schwach. Steht FOXP2 zusätzlich zur Forkhead-Domäne der Zinkfinger zur Verfügung, so wird eine Dissoziationskonstante von 16 nM erhalten. Der Leucin-Zipper von FOXP2 ist für hochaffine Bindung an DNA unabdingbar, durch ihn ergibt sich eine Dissoziationskonstante von 2 nM. Ist der Zinkfinger zusätzlich zum Leucin-Zipper anwesend, bringt dies keine weitere Steigerung der Affinität, die Dissoziationskonstante ist mit 4 nM ebenfalls im einstelligen nanomolaren Bereich. Die Dissoziationskonstanten der Wildtyp-Konstrukte, bei denen *Domain Swapping* in der Forkhead-Domäne möglich ist, und Konstrukte mit A539P-Substitution zeigen keine Unterschiede. Das DNA-Bindevverhalten ist zumindest bei den verwendeten Konzentrationen übereinstimmend.

Von einigen Proteinkonstrukten wurden außerdem konzentrations- und zeitabhängige Interaktionsstudien durchgeführt. Für die Erklärung beobachteter Effekte, wie der Erhöhung der Signalamplituden über die Zeit, wurden zwei Hypothesen (Aggregatauflösung bzw. Protein-Protein-Interaktion in Lösung) aufgestellt, die mit Hilfe von Modellen überprüft wurden.

## Kapitel 4

# Diskussion und Ausblick

Der humane Transkriptionsfaktor FOXP2, der in der Entwicklung menschlicher Sprache eine bedeutende Rolle spielt, ist seit seiner Entdeckung vor fast 20 Jahren ein gefragtes Forschungsobjekt [12, 15, 16, 20, 21, 27, 32, 49, 58, 185–187]. Obwohl einige Informationen zu FOXP2 im zellulären Kontext bekannt sind, z.B. mögliche Promotersequenzen [13, 113], nachgeschaltete Zielgene [12], Protein-Interaktionspartner [40, 41], oder der direkte Einfluss von Knockouts bzw. Veränderungen des *FOXP2*-Gens in lebenden Tiermodellen wie Mäusen und Singvögeln [15, 32, 188], so blieben molekulare Grundlagen der biologischen Aktivität von humanem FOXP2 bisher weitestgehend im Verborgenen. Große Aufmerksamkeit auf molekularer Ebene wurde bisher hauptsächlich der DNA-bindenden Forkhead-Domäne (FHD) von FOXP2 (und der FOXP-Familie) gewidmet, die im Verdacht steht durch internen Domänentausch Dimere auszubilden [49, 106, 107]. Andere Motive und Domänen, wie der Zinkfinger (ZF) und Leucin-Zipper (LZ), die humanem FOXP2 zum Binden von DNA und zur Protein-Protein-Interaktion zur Verfügung stehen, wurden bisher eher vernachlässigt. Dies kann zu Teilen auch der herausfordernden Herstellung des Proteins zugeschrieben werden.

Der Fokus dieser Arbeit lag also auf der Generierung des humanen Transkriptionsfaktors FOXP2 (Kapitel 2) und der biophysikalischen Charakterisierung seiner DNA-bindenden Motive und Domänen (Kapitel 3.3). Mit Hilfe der Biosensor-Technik switchSENSE® ist es uns außerdem gelungen Protein-Protein-Interaktion von humanem FOXP2 mit sich selbst sichtbar zu machen (Kapitel 3.5).

In Übereinstimmung mit [41, 113] konnte gezeigt werden, dass die Forkhead-Domäne von FOXP2 für die DNA-Assoziation unentbehrlich ist. Es wurde beobachtet, dass es hierbei keinen Unterschied macht, ob die FHD komplett entfernt oder nur die Aminosäuresubstitution R553H, die die Sprachkrankheit Verbale Entwicklungsdyspraxie (VED) verursacht, eingebracht wurde. Die Funktionsfähigkeit von FOXP2 wurde durch die Punktmutation nicht nur beeinträchtigt oder abgeschwächt, sondern komplett zerstört. Selbst bei sehr hohen Konzentrationen von bis zu 1.2  $\mu\text{M}$  Protein konnte keine Interaktion mit DNA detektiert werden.

Obwohl die Forkhead-Domäne für die Aktivität von FOXP2 unabdinglich ist, geht sie selbst nur sehr schwache Interaktionen mit der DNA ein. Die von FOXP2 erkannte

Consensus-Sequenz ist degeneriert und wird mit unterschiedlicher Affinität von diesem gebunden [49,113,115,116]. Christopher Nelson und seine Kollegen konnten dies in einem Affinitätslogo zusammenfassen [113]. Uns war es möglich die Bindung von aufgereinigtem FOXP2 an drei dieser Consensus-Sequenzen simultan auf einem Chip zu messen und Unterschiede in den Assoziationsgeschwindigkeiten bzw. Affinitäten zu detektieren (siehe Kapitel 3.2.2). Für die drei DNA-Sequenzen wurde eine Reihenfolge für die Assoziation erhalten, die dem Affinitätslogo und den bisherigen Erkenntnissen entspricht [113]. Für die Consensus-Sequenz TGTTTAC, die die höchste Affinität zur Forkhead-Domäne aufweist, wurde eine Dissoziationskonstante im mittleren dreistelligen Nanomolarbereich erhalten. Der gemessene Wert liegt im Bereich der in der Literatur angegebenen Werte (Tabelle 4.1). In unseren Assoziations- und Dissoziationsmessungen konnte in Übereinstimmung mit der Literatur beobachtet werden, dass die Kinetik der Wildtyp-FOXP2 Forkhead-Domäne im Vergleich zur FHD mit A539P-Substitution keine Unterschiede zeigt, obwohl die Wildtyp-FHD dimerisieren kann [49,109]. Gründe, warum keine FHD-Dimerbildung detektiert werden konnte, könnten zu geringe Proteinkonzentrationen (mikromolarer Konzentrationsbereich notwendig), zu kurze Inkubation der Proben oder zu niedrige Inkubationstemperaturen (10 Stunden bei 37°C bzw. 24 Stunden bei Raumtemperatur) sein [108]. Laut [49] liegt die FHD von FOXP2 in einem Gleichgewicht aus Monomeren und Dimeren vor, welches sich nach SEC (*Size Exclusion Chromatography*)-Auftrennung der selbigen erneut einstellt, wobei keine Angaben zur Proteinkonzentration angegeben wurden. Die Kristallstruktur jedoch deutet darauf hin, dass die FHD trotz Dimerbildung nur über eine Monomerseite an die DNA assoziiert [49]. Es besteht somit auch die Möglichkeit, dass bei der Kinetik der FHD nicht zwischen Monomeren und Dimeren differenziert werden konnte (Tabelle 4.1).

**Tabelle 4.1 – Vergleich der ermittelten Dissoziationskonstanten mit in der Literatur angegebenen Werten.** Die für die Forkhead-Domäne von FOXP2 mit der switchSENSE-Methode ermittelten  $K_D$ -Werte für die Bindung an DNA im Vergleich zu in der Literatur angegebenen  $K_D$ -Werten. Die  $K_D$ -Werte, die durch verschiedene Methoden ermittelt wurden, sind alle anhand von Bindung an DNA mit der Consensus-Sequenz TGTTTAC aus [113] entstanden.

Forkhead Domäne	Dissoziationskonstante	Methode	Literatur
FOXP2	360 ± 28 nM	switchSENSE	Kap. 3.3.2
FOXP2	892 ± 50 nM	Fluoreszenzanisotropie	Morris et al., 2016
FOXP2	67 ± 4.34 nM	Isotherme Titrationskalorimetrie	Morris et al., 2016
FOXP2	162.8 ± 6.2 nM	Isotherme Titrationskalorimetrie	Blane et al., 2017
FOXP2 (A539P)	260 ± 18 nM	switchSENSE	Kap. 3.3.2
FOXP2 (A539P)	878 ± 66.2 nM	Fluoreszenzanisotropie	Morris et al., 2016
FOXP2 (A539P)	102.3 ± 4.97 nM	Isotherme Titrationskalorimetrie	Morris et al., 2016

Sowohl mittels Affinitätsgelelektrophorese als auch in unseren biochipbasierten Bindestudien wurde beobachtet, dass der Leucin-Zipper maßgeblich die Affinität von FOXP2 zur DNA beeinflusst. Starke DNA-Bindung kann nur in Konstrukten mit dem Leucin-Zipper erreicht werden (Abb. 4.1). Dies ist in Übereinstimmung zu Beobachtungen, die



**Abbildung 4.1 – Beitrag der DNA-bindenden Motive und Domänen (a)** Tabelle gibt die erhaltenen Werte für die mit der switchSENSE<sup>®</sup>-Methode gemessenen Dissoziationskonstanten  $K_D$  wieder. **(b)** Reihenfolge der Affinitäten, der an der DNA-Bindung von FOXP2 beteiligten Motive und Domänen.

Shanru Li und Kollegen in einem *in vivo* Hefe-Zwei-Hybrid-System machen; auch da ist der Leucin-Zipper für die transkriptionelle Aktivität von FOXP2 notwendig [41]. Wird der Leucin-Zipper deaktiviert, verstärkt der zusätzliche C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger die DNA-Bindung der Forkhead-Domäne von FOXP2 in unseren Messungen um eine Größenordnung (Abb. 4.1). Zinkfinger vermitteln laut Literatur generell nur sehr schwache, dafür aber sequenzspezifische DNA-Bindung [59, 62, 65, 74–76]. Die Dissoziationskonstante eines einzelnen Zinkfingers bei spezifischer Interaktion liegt im Bereich von 10<sup>-6</sup> M [76]. Kooperative Effekte sollten also berücksichtigt werden, da die Forkhead-Domäne in erster Linie die DNA-Bindung vermittelt und in Folge dessen die lokale Konzentration des Zinkfingers an der DNA stark erhöht. Ob die Affinitätssteigerung nach Deaktivierung des Leucin-Zippers dennoch allein dem Zinkfinger zugeschrieben werden kann, lässt sich anhand unserer Ergebnisse nicht mit absoluter Sicherheit sagen.

Leucin-Zipper sind Proteindomänen, die neben einer basischen DNA-Erkennungsstelle auch ein Dimerisierungsmotiv besitzen (siehe Abb. 1.1c). In unserem Konstrukt bedeutet die Deaktivierung des Leucin-Zippers, dass die heptatischen Leucine im Dimerisierungsinterface durch Alanine ausgetauscht wurden. Die basische DNA-Erkennungsstelle ist also weiterhin intakt und könnte für DNA-Kontakte verfügbar sein. Die Literatur zeigt indes auch, dass die stark geladene basische Region verschiedener Leucin-Zipper ungeordnet vorliegt und erst durch die Anwesenheit von DNA veranlasst wird eine  $\alpha$ -Helix auszubilden [83–90]. Wie sich der Leucin-Zipper im Fall von FOXP2 verhält, ist nicht bekannt. Ob also die DNA-Erkennungsstelle des Leucin-Zippers zusätzlich zum Zinkfinger einen Beitrag zur DNA-Bindung leistet, lässt sich weder bestätigen noch ausschließen. Es wäre notwendig ein weiteres Proteinkonstrukt, bei dem der Leucin-Zipper komplett entfernt ist, auf DNA-Bindung zu untersuchen.

In unseren zeit- und konzentrationsabhängigen Experimenten wird darüber hinaus offensichtlich, dass die Veränderung des Zipper-Interfaces sinkende Assoziationsraten und Signalamplituden zur Folge hat (siehe Kapitel 3.5.2). Vermutlich wird die gerichtete Interaktion der Helices, die die Dimerisierung vermittelt, zerstört und Aggregation durch die Coiled-Coil-Region begünstigt [189].

Im Fall des FOXP2-Konstrukts, das sowohl Zinkfinger als auch Leucin-Zipper umfasst, wird allerdings inverses Verhalten detektiert. Im Gegensatz zum Konstrukt ohne ZF und LZ, werden über die Zeit steigende Signalamplituden, die konzentrationsabhängig sind, beobachtet. Es wird vermutet, dass die Amplitudenerhöhung durch Interaktion von FOXP2 mit sich selbst in Lösung verursacht und anschließend durch die Anbindung an die



stoff (Abb. 4.2). Die Forkhead-Domäne in der Kristallstruktur umfasst 80 Aminosäuren [49], unser Konstrukt mit Zinkfinger und Leucin-Zipper enthält mehr als fünfmal so viele Aminosäuren und hat dementsprechend eine größere Reichweite. Wenn auch über die dreidimensionale Struktur dieser Motive und Domänen bzw. deren DNA-Bindesequenzen keine Informationen in der Literatur zu finden sind, so erscheint es dennoch denkbar, dass unser Protein durch direkte Interaktion mit dem Farbstoffmolekül dessen Fluoreszenzintensität beeinflusst. Größere Proteinassamblierungen wiederum reichen noch näher an das Farbstoffmolekül heran und könnten in Folge dessen zum Beispiel eine Änderung des Brechungsindex in dessen Umgebung bewirken, sodass die Fluoreszenzintensität weiter beeinflusst und noch mehr verstärkt wird (Theorie FPS-Modus, siehe Kapitel 3.1.2).

Dies könnte auch erklären, warum im Fall unseres kürzesten Konstrukts, das nur die FHD enthält, keine Fluoreszenzerhöhung detektiert werden konnte, selbst wenn dieses über die Zeit dimerisieren würde. In Übereinstimmung mit der von [49] aufgestellten Hypothese, dass die domänengetauschten FHD-Dimere eine große Rigidität aufweisen und eher interchromosomale Assoziationen vermitteln [111], wäre es vorstellbar, dass selbst das Dimer-Protein nach DNA-Assoziation nicht nah genug an den Farbstoff heranreicht, um diesen im Vergleich zum Monomer für uns sichtbar zu beeinflussen.

Klarheit, welche Information letztlich in der Erhöhung der Signalamplitude steckt, könnten weitere konzentrations- und zeitabhängige switchSENSE<sup>®</sup>-Experimente bringen. So wäre es z.B. interessant zu sehen, ob immer noch DNA-Bindung und eine Erhöhung der Fluoreszenzniveaus detektiert werden könnte, sobald die Glutaminsäure E399 entfernt wäre, die für die Funktionsfähigkeit des Leucin-Zippers zur Protein-Protein-Interaktion essentiell ist [41]. Aufschlussreich könnte unter anderem auch sein, wie sich die Konstrukte K271 (ZF-LZ-FHD) und L367 (LZ-FHD) im direkten Vergleich verhalten. Könnte auch für L367 eine vergleichbare Erhöhung der Signalamplitude beobachtet werden? Die anhand unserer Beobachtungen aufgestellte Hypothese der zeitabhängigen Zusammenlagerung von FOXP2-Proteinen in Lösung könnte außerdem mit Hilfe zusätzlicher Methoden wie z.B. SAXS (*Small Angle X-ray Scattering*) oder des kürzlich veröffentlichten iSCAMS (*Interferometric Scattering Mass Spectrometry*) weiter untersucht werden [191–194].

Die Erforschung des hoch konservierten Transkriptionsfaktors FOXP2 bietet weiterhin viele Fragestellungen, die adressiert werden könnten. So postulierten James Stroud und seine Kollegen, dass die Bildung der domänengetauschten Dimere und die dadurch entstehende Rigidität der DNA-Bindungsdomäne den Transkriptionsfaktor FOXP2 dazu befähigt entfernte Regionen auf einem DNA-Strang durch Schleifenbildung (*DNA Looping*) zusammen zu bringen [49,110]. Die Theorie der FOXP2-vermittelten Schleifenbildung könnte in einem Experiment, basierend auf dem Konzept von [106], auf dem switchSENSE<sup>®</sup>-Biochip getestet werden. Die DNA-Anker würden diesbezüglich mit einem Oligonukleotid verlängert, das zwei FOXP2-Bindestellen in ausreichendem Abstand beinhaltet. Diese Bindestellen wären doppelsträngig, wohingegen die restliche DNA einzelsträngig, flexibel und somit ungeordnet wäre. Am oberen Ende des Oligonukleotids wäre ein *Black Hole Quencher* (BHQ) befestigt. Durch die Assoziation von FOXP2-Dimeren an die doppelsträngigen Consensus-Sequenzen sollten sich DNA-Schleifen ausbilden, die das Konstrukt stabilisieren und dadurch den BHQ näher an den Fluoreszenzfarbstoff des Ankers bringen. Die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffs sollte in Folge dessen verringert oder komplett ausgelöscht werden.

Weitere Fragestellungen würden auf die Unterschiede und Gemeinsamkeiten von FOXP2-Orthologen verschiedener Spezies abzielen. Wie verhalten sich die orthologen Proteine z.B. bezüglich der DNA-Bindung bzw. Protein-Protein-Interaktion? Die menschliche Abstammungslinie unterscheidet sich von FOXP2-Orthologen in Menschenaffen nur in zwei Aminosäuresubstitutionen (T303N und N325S) [9] und anhand von MITOMI-Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass FOXP2 von Mensch und Schimpanse ähnliche Consensus-DNA-Motive bindet [113]. Könnten diese Ergebnisse mit Hilfe der switchSENSE<sup>®</sup>-Technologie reproduziert oder vielleicht sogar Unterschiede aufgezeigt werden?

Die Aminosäuresubstitutionen T303N und N325S liegen N-terminal zum Zinkfinger und somit außerhalb offensichtlicher DNA-Bindedomänen (siehe Abb. 1.1a). Die Vermutung, dass sie weniger an der DNA-Bindung als vielmehr an der Interaktion mit anderen Proteinpartnern beteiligt sind, liegt also nahe. Einige Interaktionspartner von humanem FOXP2 sind seit längerem bekannt (z.B. CtBP1 und TBR1) [41, 195, 196] und erst kürzlich wurden weitere Transkriptionsfaktoren entdeckt, mit denen FOXP2 interagiert [40]. Anhand dieser Interaktionspartner könnte mit Hilfe der switchSENSE<sup>®</sup>-Technologie untersucht werden, ob sich die Interaktome von Mensch und Affe durch die Aminosäuresubstitutionen unterscheiden. Im Gegensatz zum *in vivo* Hefe-Zwei-Hybrid-System sollte es möglich sein im *Switching*-Modus nicht nur die Interaktion zu detektieren, sondern kleinste Diskrepanzen in den molekularen Wechselwirkungen bzw. Affinitäten zu ermitteln.



# Anhang A

## Ergänzende Daten

### A.1 Protocol for expression, purification and enrichment of human FOXP2 under native and denaturing conditions

#### I. Expression

1. Prepare overnight culture either from single colony of freshly transformed bacteria or from glycerol stock stored in the -80 °C freezer
2. inoculate LB medium (10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract, 10 g/l NaCl, supplemented with appropriate antibiotics) 1:250 with overnight culture
3. shake incubate culture at 37 °C with 250 rpm and let grow till OD 0.4
4. let grow till OD ~ 0.4
5. when at OD 0.4, relocate the culture to a shaker set to 16 °C
6. let the culture gently adjust to the temperature
7. alternatively cool down the culture by incubation on ice
8. let culture grow till OD 0.7
9. when at OD 0.7, add ZnSO<sub>4</sub> to a final of 100 μM
10. also add Ethanol (p.a. grade) to a final of 4%

*Take 1 ml sample of the pre-induced E.coli suspension culture for SDS PAGE analysis (PI). Determine the OD and pellet the cells down. Freeze the cell pellet until cells are needed for SDS PAGE analysis.*

11. induce protein expression with 1 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)
12. let expression run for approximately 16 hours

*When expression is finished take 1 ml sample of the E.coli suspension culture for SDS PAGE analysis (E). Determine the OD and prepare for SDS PAGE analysis.*

13. harvest the cells by centrifugation at 4000 rcf and 4 °C for 20 minutes
14. decant the clear LB medium
15. snap freeze the cell pellets in liquid nitrogen (store them at -80 °C)

After harvesting the cells it is possible to either extract and purify protein under native conditions (continuous steps) or denaturing conditions (see below).

## **Extraction and Ni-NTA purification under native conditions**

### **II. Cell lysis**

16. thaw pellet on ice for 30 minutes
17. add native lysis buffer (supplemented with protease inhibitor (1:100) and 5 mM TCEP)  
⇒ 10 ml for 100 ml cell pellet
18. add lysozyme to 1 mg/ml final
19. incubate on ice for 30-60 minutes
20. transfer sample to fresh 15 ml cell culture tube in order to perform sonication  
⇒ max. volume 10 ml

*Important: Sonication steps always have to be performed on ice !!!*

21. sonication using a Bandelin Sonoplus equipped with an MS 2.5 microtip operated at 3 W
22. burst 6 x for 10 seconds (between sonication steps cool culture and tip for 20 sec)

*Take 10 µl of lysate for SDS PAGE analysis (Lys)*

23. add benzonase (3 units/ml of original cell culture) and incubate on ice (or at RT) until suspension is less viscous  
⇒ check for viscosity from time to time
24. centrifugation for 60 minutes at 16.000 rcf at 4 °C

*Meanwhile prepare Ni-NTA beads by washing 3 x with ddH<sub>2</sub>O*

25. transfer supernatant to fresh falcon tube

*Take 10 µl sample of supernatant for SDS PAGE analysis (SN)*

26. add 400 mM NaCl to a final concentration of 500 mM after centrifugation, but before applying protein solution to the Ni-NTA beads

### III. Binding target protein to Ni-NTA beads

27. add supernatant to washed Ni-NTA beads
28. incubate on rotation wheel for 1 hour at room temperature
29. transfer bead-protein-mixture to gravity flow column
30. collect flow-through

*Take 10  $\mu$ l sample of flow-through for SDS PAGE analysis (FT)*

### IV. Washing steps (native conditions)

Washing steps should be performed with large volumes of buffer in order to remove most of impurities.

*Take 10  $\mu$ l sample of each washing step for SDS PAGE analysis (W1-W5)*

31. wash with of binding buffer (W1)
32. wash with high salt buffer (W2)
33. wash with urea buffer (W3)
34. wash with low salt buffer supplemented with 5 mM Mg-ATP (W4)
35. wash with low salt buffer (without Mg-ATP) (W5)

### V. Elution

Volume for elution of protein is adjusted so that most of it elutes in elution step 2.

36. elute with 0.8 BV of elution buffer (E1)
37. add 1.6 BV of elution buffer (E2)
38. add 1 BV of elution buffer (E3)
39. add 0.8 BV of elution buffer (E4)

Analyze the Ni-NTA purification by SDS-PAGE.

## Extraction and Ni-NTA purification under denaturing conditions

### II. Cell lysis

16. thaw pellets on ice
17. resuspend pellets in denaturing lysis buffer (supplemented with 5 mM TCEP)

18. incubate on rotation wheel until suspension gets clear for (approx. 30 minutes)

### III. Binding target protein to Ni-NTA beads

19. add supernatant to washed Ni-NTA beads
20. incubate on rotation wheel for 1 hour at room temperature
21. transfer bead-protein-mixture to gravity flow column
22. collect flow-through

*Take 10 µl sample of flow-through for SDS PAGE analysis (FT)*

### IV. Washing steps (denaturing conditions)

Washing steps should be performed with large volumes of buffer in order to remove most of impurities.

*Take 10 µl sample of each washing step for SDS PAGE analysis (W1-W4)*

20. wash with 6 M urea buffer (W1)
21. wash with renaturing buffer supplemented with 0.5 mM TCEP (W2)
22. wash with renaturing buffer supplemented with 0.5 mM TCEP (W3)
23. wash with renaturing buffer supplemented with 0.5 mM TCEP (W4)
24. incubate protein bound to Ni-NTA beads in renaturing buffer overnight at room temperature on rotation wheel

### V. Elution

Volume for elution of protein is adjusted so that most of it elutes in elution step 2.

25. elute with 0.8 BV of elution buffer (E1)
26. add 1.6 BV of elution buffer (E2)
27. add 1 BV of elution buffer (E3)
28. add 0.8 BV of elution buffer (E4)

Analyze the Ni-NTA purification by SDS-PAGE.

### **Strep-Tactin<sup>®</sup> purification**

*Pool the elution fractions from the Ni-NTA purification that contain the desired protein. Take 10µl sample of the pooled fraction for SDS-PAGE analysis (NN)*

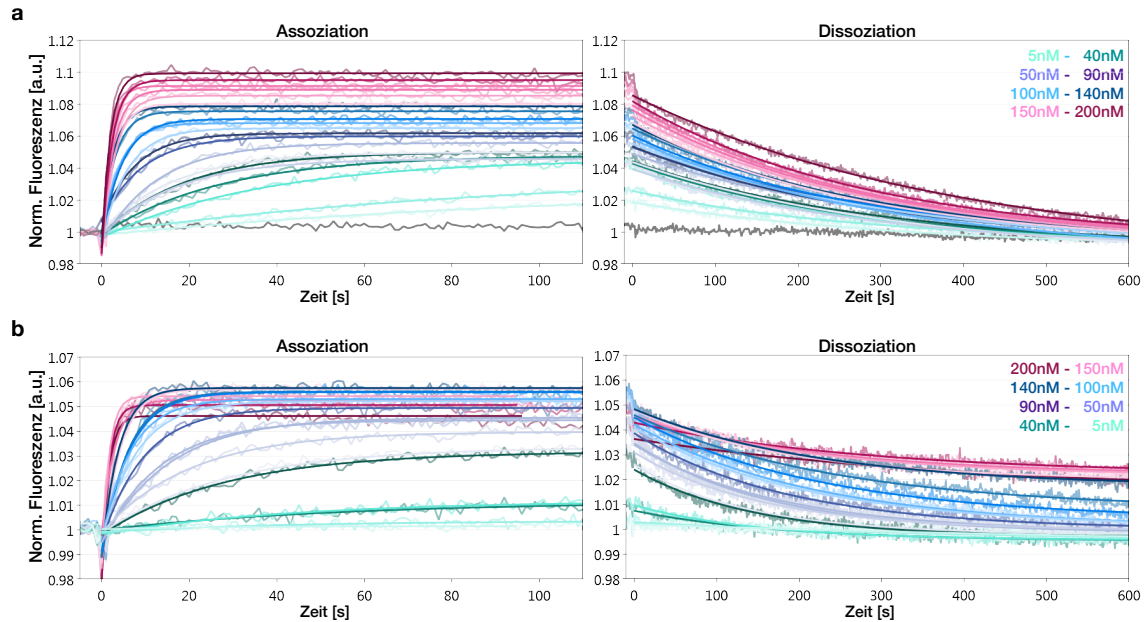
### **VI. Strep-tag purification**

*Take 10µl sample of flow-through (FT) and washing steps (W1-W5) for SDS PAGE analysis*

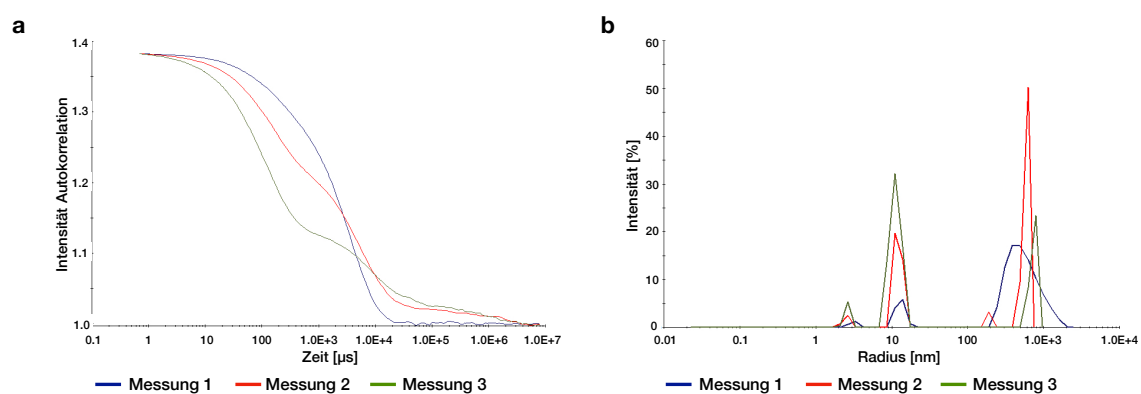
1. apply pooled Ni-NTA fractions to the Strep-Tactin column
2. wash five times with 1 BV of Strep-tag washing buffer
3. elute with 0.7 BV of Strep-tag elution buffer (E1)
4. add 1.6 BV of Strep-tag elution buffer (E2)
5. add 0.7 BV of Strep-tag elution buffer (E3)

Analyze the Strep-Tactin<sup>®</sup> purification by SDS-PAGE.

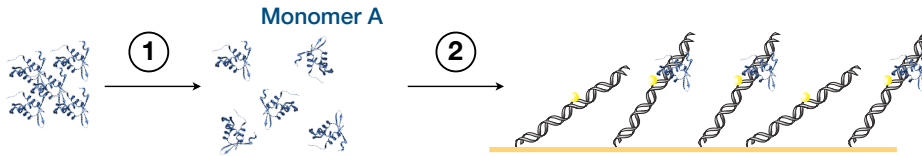
## A.2 DNA-biochipbasierte Interaktionsstudien



**Abbildung A.1 – Serielle Konzentrationsmessungen mit regulärer und inverser Messreihenfolge.** Die Experimente wurden im FPS-Modus durchgeführt. Die Assoziations- und Dissoziationskurven sind graphisch dargestellt. Die Daten wurden mit der SwitchANALYSIS Software ausgewertet und die Graphen erstellt. **(a)** Das Protein K271 wurde mit aufsteigenden Konzentrationen von 5 nM, ab 10 nM in 10 nM-Schritten bis 200 nM vermessen, graue Datenreihe 200 nM K271 und Kontroll-DNA. Zwischen den Messungen wurde der Chip regeneriert und neu funktionalisiert. **(b)** Messung wurde in inverser Reihenfolge (200 nM nach 5 nM) wiederholt.



**Abbildung A.2 – Ergebnisse des Lichtstreuungsexperiments (DLS) des K271-Konstruktes** Graphische Darstellung der **(a)** Verteilung der gemittelten Partikelgröße über die gemessene Zeit und **(b)** die Verteilung der Anteile an Partikelgröße während der drei Messzeiträume. Die Messungen sind in einem Gesamtzeitraum von über acht Stunden aufgenommen worden. Messung 1 (blaue Kurve) direkt nach Start für ungefähr vier Minuten, Messung 2 (rote Kurve) für 280 min (4.45 h) und Messung 3 (grüne Kurve) für 220 min (3.6 h).

**Modell: Aggregatauflösung****1. Monomerkonzentration als Funktion der Zeit:**

$$A(t) = (A^T - A_0)[1 - \exp(-kt)] + A_0$$

**2. Modellierung des switchSENSE-Experiments:**

$$k'_{on}(t_i) = k_{on} \cdot A(t_i)$$

$t_i$  = Zeit seit Beginn des Experiments bis zur i-ten Messung

Annahme:  $A(t_i)$  ist während des Bindungsexperiments konstant

Differentialgleichungen für gebundenen (A) und ungebundenen (U) Zustand

$$\frac{dp_A}{dt} = k'_{on} p_U - k_{off} p_A \quad \text{und} \quad \frac{dp_U}{dt} = -k'_{on} p_U + k_{off} p_A$$

Zeitabhängige Besetzungswahrscheinlichkeiten in diesem System ergeben sich zu:

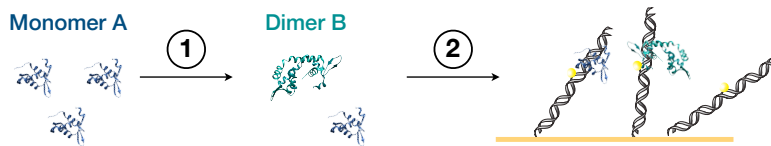
$$p_A(t^*) = \frac{k'_{on}}{k_{off} + k'_{on}} \left[ 1 - \exp(-(k_{off} + k'_{on})t^*) \right] \quad t^* = \text{Zeit während der Messung}$$

$$p_U(t^*) = 1 - p_A(t^*) \quad r_A = \text{relativer Intensitätsfaktor für Monomere}$$

In diesem Modell ergibt sich die Intensität durch:

$$I(t^*) = 1 \cdot p_U(t^*) + p_A(t^*) \cdot r_A$$

**Abbildung A.3 – Aggregatauflösung.** Modellierung der Intensität im switchSENSE-Experiment unter der Annahme, dass sich die Proteine anfänglich in Aggregaten befinden, welche sich mit langsamer Kinetik über die Zeit auflösen. Die Zunahme in der Signalamplitude ist durch den Anstieg der Monomerkonzentration bedingt. Das Modell wurde von Christian Wachauf aufgestellt.

**Modell: Dimerisierung****1. Monomer- und Dimerkonzentration als Funktion der Zeit:**

$$A(t) = \frac{(K + \alpha) \exp(-2k_{\text{on,dim}} \alpha t) z + \alpha - K}{2 - 2 \exp(-2k_{\text{on,dim}} \alpha t) z} \quad \text{und} \quad B(t) = \frac{A^\top - A(t)}{2}$$

Die Dimerisierung eines Proteins kann beschrieben werden mit:

$$\frac{dA}{dt} = -2k_{\text{on,dim}} A^2 + 2k_{\text{off,dim}} B \quad \text{und} \quad \frac{dB}{dt} = k_{\text{on,dim}} A^2 - k_{\text{off,dim}} B$$

Setzt man  $\frac{dA}{dt}$  gleich 0, ergibt sich:

$$A_{\text{eq}}^2 = \frac{k_{\text{off,dim}}}{2k_{\text{on,dim}}} (A^\top - A_{\text{eq}}) \quad \text{mit} \quad K = \frac{k_{\text{off,dim}}}{2k_{\text{on,dim}}}$$

$$\frac{dA}{dt} \text{ lässt sich umschreiben zu: } \frac{dA}{dt} = -2k_{\text{on,dim}} A^2 + 2k_{\text{off,dim}} \frac{(A^\top - A)}{2}$$

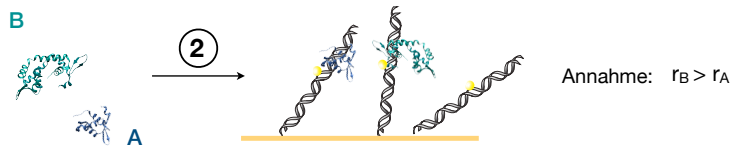
$$\text{mit } \alpha = \sqrt{4K \cdot A^\top + K^2} \quad \text{und} \quad z = \frac{2A_0 + K - \alpha}{2A_0 + K + \alpha}$$

lassen sich die zeitabhängigen Konzentrationen für A und B berechnen.

FORTSETZUNG NÄCHSTE SEITE!



## 2. Modellierung des switchSENSE-Experiments:



Differentialgleichungen für Monomer-gebundenen (A), Dimer-gebundenen (B) und ungebundenen (U) Zustand

$$\frac{dp_A}{dt} = k'_{on,A} p_U - k_{off} p_A \quad \frac{dp_B}{dt} = k'_{on,B} p_U - k_{off,B} p_B \quad \frac{dp_U}{dt} = k_{off} p_A + k_{off} p_B - (k'_{on,A} + k'_{on,B}) p_U$$

Jeder DNA-Strang muss in einem dieser Zustände sein:  $p_A + p_U + p_B = 1$

$$k'_{on,A} = k_{on,A} A(t_i) \quad \text{und} \quad k'_{on,B} = k_{on,B} B(t_i) \quad t_i = \text{Zeit seit Beginn des Experiments bis zur } i\text{-ten Messung}$$

Zeitabhängige Entwicklung der Besetzungswahrscheinlichkeiten

$$p_A(t^*) = \frac{k'_{on,A}}{k_t} [1 - \exp(-k_t t^*)]$$

$$p_B(t^*) = \frac{k'_{on,B}}{k_t} [1 - \exp(-k_t t^*)]$$

$$p_U(t^*) = \frac{k_{off}}{k_t} + \frac{k_t - k_{off}}{k_t} \exp(-k_t t^*)$$

mit  $k_t = k'_{on,A} + k'_{on,B} + k_{off}$

$p_j$  = Wahrscheinlichkeit, dass ein Anker ein Monomer ( $j=A$ ), Dimer ( $j=B$ ) oder kein Protein ( $j=U$ ) gebunden hat

In diesem Modell ergibt sich die Intensität durch:

$$I(t^*) = 1 \cdot p_U(t^*) + p_A(t^*) \cdot r_A + p_B(t^*) \cdot r_B \quad r_j = \text{relativer Intensitätsfaktor für gebundene Monomere (j=A) und Dimere (j=B)}$$

**Abbildung A.4 – Dimerisierung.** Modellierung der Intensität im switchSENSE-Experiment unter der Annahme, dass die Proteine dimerisieren. Die Zunahme in der Signalamplitude kann innerhalb dieses Modells durch den Anstieg der Dimerkonzentration, bei gleichzeitig höherem relativen Intensitätsfaktor ( $r_B > r_A$ ) für gebundene Dimere erklärt werden. Das Modell wurde von Christian Wachauf aufgestellt.



## **Anhang B**

# **Material und Methoden**

### **B.1 Puffer und Stocklösungen**

Für das in Anhang A.1 aufgeführte Protokoll zur Expression, Extraktion und Aufreinigung von FOXP2-Proteinkonstrukten unter nativen bzw. denaturierenden Bedingungen sind die verwendeten Puffer und Lösungen in Tabellen zusammengefasst. Chemikalien und Reagenzien wurden von AppliChem, Carl Roth, Merck Millipore, Sigma-Aldrich und VWR bezogen.

#### **Proteaseinhibitor**

Für eine 100-fache Stocklösung wurden folgende Substanzen in 50 ml 100%igem Ethanol gelöst:

- Pepstatin A (6.85 mg)
- Leupeptin (1.42 mg)
- PMSF (0.85 mg)
- Benzamidin HCl (1.65 g)

## Puffer für Herstellung der FOXP2-Proteinkonstrukte

Tabelle B.1 – Puffer zur Proteinherstellung unter nativen Bedingungen

Name	Beschreibung
Lysepuffer (Ni-NTA)	25 mM HEPES pH 8.0 (angepasst mit KOH) 100 mM NaCl 10% Glycerol 0.1% Triton X-100 1 mM MgCl <sub>2</sub> 20 μM ZnSO <sub>4</sub> 10 mM Imidazol 5 mM TCEP (frisch zugegeben)
Bindepuffer (Ni-NTA)	25 mM HEPES pH 8.0 (eingestellt mit KOH) 500 mM NaCl 10% Glycerol 1 mM MgCl <sub>2</sub> 20 μM ZnSO <sub>4</sub> 10 mM Imidazol 0.5 mM TCEP (frisch zugegeben)
Hochsalzpuffer (Ni-NTA)	25 mM HEPES pH 8.0 (eingestellt mit KOH) 1 M NaCl 10% Glycerol 0.5 mM TCEP (frisch zugegeben)
Ureapuffer (Ni-NTA)	25 mM HEPES pH 8.0 (eingestellt mit KOH) 100 mM NaCl 500 mM Urea 10% Glycerol 20 mM Imidazol 0.5 mM TCEP (frisch zugegeben)
Niedrigsalzpuffer (Ni-NTA)	25 mM HEPES pH 8.0 (eingestellt mit KOH) 100 mM NaCl 10% Glycerol 30 mM Imidazol 0.5 mM TCEP (frisch zugegeben)
Elutionspuffer (Ni-NTA)	25 mM HEPES pH 8.0 (eingestellt mit KOH) 300 mM NaCl 1 mM MgCl <sub>2</sub> 10% Glycerol 500 mM Imidazol 0.5 mM TCEP (frisch zugegeben)
Waschpuffer (Strep-tag)	25 mM HEPES pH 7.6 (eingestellt mit KOH) 150 mM NaCl 1 mM MgCl <sub>2</sub> 10% Glycerol 0.5 mM TCEP (frisch zugegeben)
Elutionspuffer (Strep-tag) und Aufbewahrungspuffer	25 mM HEPES pH 7.6 (eingestellt mit KOH) 150 mM NaCl 1 mM MgCl <sub>2</sub> 10% Glycerol 10 mM d-Desthiobiotin 0.5 mM TCEP (frisch zugegeben)

Tabelle B.2 – Puffer für denaturierende Ni-NTA-Aufreinigung

Name	Beschreibung
Lysepuffer (Ni-NTA) <i>denaturierend</i>	25 mM HEPES pH 8.0 (angepasst mit KOH) 8 M Urea 150 mM NaCl 10 mM Imidazol 5 mM TCEP (frisch zugegeben)
Bindepuffer (Ni-NTA) <i>denaturierend</i>	25 mM HEPES pH 8.0 (angepasst mit KOH) 8 M Urea 500 mM NaCl 10 mM Imidazol 5 mM TCEP (frisch zugegeben)
Renaturierungspuffer (Ni-NTA) <i>- GRADIENT</i>	25 mM HEPES pH 8.0 (eingestellt mit KOH) 6 M - 2 M Urea 150 mM NaCl 100 mM KCl 1 mM MgCl <sub>2</sub> 20 µM ZnSO <sub>4</sub> 20 mM Imidazol 10% Glycerol 0.5 mM TCEP (frisch zugegeben)
Renaturierungspuffer (Ni-NTA) <i>- DIREKT</i>	25 mM HEPES pH 8.0 (eingestellt mit KOH) 150 mM NaCl 100 mM KCl 1 mM MgCl <sub>2</sub> 20 µM ZnSO <sub>4</sub> 20 mM Imidazol 10% Glycerol 0.5 mM TCEP (frisch zugegeben)
Elutionspuffer (Ni-NTA)	25 mM HEPES pH 8.0 (eingestellt mit KOH) 150 mM NaCl 100 mM KCl 1 mM MgCl <sub>2</sub> 500 mM Imidazol 10% Glycerol 0.5 mM TCEP (frisch zugegeben)

Tabelle B.3 – Puffer für Westernblot-Analyse

Name	Beschreibung
Transferpuffer	24 mM Tris 192 mM Glycin 0.02% SDS 20% Methanol
1x TBS	20 mM Tris pH 7.4 (angepasst mit 10 N HCl) 150 mM NaCl
1x TBS-T	20 mM Tris pH 7.4 (angepasst mit 10 N HCl) 150 mM NaCl 0.05% Tween-20

### Puffer für Interaktionsstudien von Protein mit DNA

Tabelle B.4 – Puffer für Affinitätsgelelektrophorese (EMSA)

Name	Beschreibung
1x TA (Elektrophoresepuffer)	40 mM Tris pH 8.0 20 mM Eisessig
1x TN50 (Probenpuffer)	5 mM Tris pH 8.0 50 mM NaCl
6x Gelprobenpuffer	5 mM Tris-HCl pH 8.5 15% Ficoll® 400 0.15% Bromphenolblau

**Tabelle B.5 – Puffer für switchSENSE®-Interaktionsanalyse**

Name	Beschreibung
H140 (minimal)	10 mM HEPES pH 7.4 140 mM NaCl 1 mM MgCl <sub>2</sub> 10% Glycerol 0.05% Tween-20 0.5 mM TCEP (frisch zugegeben)
H40 (minimal)	10 mM HEPES pH 7.4 140 mM NaCl 1 mM MgCl <sub>2</sub> 10% Glycerol 0.05% Tween-20 0.5 mM TCEP (frisch zugegeben)
FOXP2-Puffer	10 mM HEPES pH 7.4 140 mM NaCl 1 mM MgCl <sub>2</sub> 0.5 μM ZnSO <sub>4</sub> 10% Glycerol 0.05% Tween-20 0.5 mM TCEP (frisch zugegeben)

## B.2 Methoden

### Klonierung

Die kodierenden Nukleotidsequenzen von FOXP2 (siehe Abb. C.1) und GFP (siehe Abb. C.1) wurden, getrennt durch einen flexiblen Linker, von Eurofins (Ebersberg, Deutschland) als gesamtes Gen (KH\_G0001) synthetisiert und anschließend vom Synthesevektor pBS II SK(+) in den pET28b-Vektor (Novagen) subklontiert. Plasmide für die Proteinexpression wurde mit Hilfe der Klonierungsmethode *Circular Polymerase Extension Cloning* (CPEC) hergestellt [197]. Die verwendeten Primer sind in Tabelle C.1 angegeben. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) wurde mit Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase (NEB) entsprechend der Anleitung durchgeführt.

Im ersten Schritt der CPEC-Klonierung wurde der pET28b-Vektor linearisiert und die kodierende FOXP2-Sequenz mit Überhängen, die für den Strep-tag® II kodieren und komplementär zum linearisierten pET28b-Zielvektor sind, versehen. Linearisierte PCR-Produkte wurden anschließend in einem präpartativen Agarosegel aufgereinigt (QIAquick Gel Extraction Kits, QIAGEN). Im zweiten Schritt der CPEC-Klonierung wurden linearisierter pET28b-Vektor und Insert-DNA in einem molekularen Verhältnis von 1:1 mittels Fusions-PCR zusammengefügt.

Ortsspezifische Mutationen wurden mit Hilfe des QuikChange Lightning Site-Directed

Mutagenesis Kits (Agilent) eingefügt. Informationen zu Primern für Mutagenese sind in Tabelle C.3 angegeben.

## Proteinherstellung und Aufreinigung

Die Generierung und Aufreinigung der FOXP2-Konstrukte ist ausführlich in Kapitel 2 beschrieben. Das etablierte Protokoll in englischer Sprache und Pufferrezepte sind in Anhang A (Ergänzende Daten) Abschnitt A.1 bzw. in Abschnitt B.1 zu finden.

## SDS-PAGE

Die SDS-PAGE-Analysen der Expression und Proteinaufreinigungen wurden mit vorgefertigten 12% bzw. 4 - 20% Polyacrylamidgelen (Mini-PROTEAN TGX, Bio-Rad) durchgeführt. Die Proben wurden 1:1 mit 2x Laemmli-Puffer (Sigma-Aldrich) gemischt und vor dem Beladen 6 Minuten lang auf 95°C erhitzt. Die Gele wurden im 1x SDS-Puffer (verdünnt von 10x SDS-Puffer Rotiphorese, Carl Roth, Deutschland) bei 300 V für 18 bis 22 Minuten betrieben. SDS-PAGE-Gele wurden mit Roti®-Blue quick Lösung eingefärbt. SDS-Gele wurden anschließend mit Hilfe eines Laserscanners (Typhoon™ FLA 9500, GE Healthcare) bei einer Auflösung von 25 µm oder 50 µm im Cy5-Kanal gescannt.

## Westernblot

Das SDS-PAGE-Gel wurde für 10 bis 15 Minuten in Transferpuffer eingeweicht (siehe Tabelle B.3). Die PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran (Immobilon®-FL Transfer Membran, Merck Millipore) wurde zuerst für 15 Sekunden in 100%igem Methanol und danach für 5 Minuten in Transferpuffer eingeweicht. Absorptionsfilterpapier (Extra Thick Blot Filter Paper, Bio-Rad) wurde kurz in Transferpuffer eingeweicht. Anschließend wurden für den Transfer alle Komponenten im Elektrobloetter (PerfectBlue™ 'Semi-Dry'-Blotter, Sedec™ von Peqlab) zusammengefügt (von unten nach oben: Filter, PVDF-Membran, SDS-PAGE, Filter). Die Apparatur wurde für ein Bio-Rad Minigel bei 50 mA für 60 Minuten bei Raumtemperatur betrieben.

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran kurz mit ddH<sub>2</sub>O gespült um Gelreste zu entfernen. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C unter sanftem Schütteln in Blockierlösung (5% BSA in 1x TBS-T) inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit 1x TBS-T gewaschen (siehe Tabelle B.3). Inkubation mit Primärantikörper  $\alpha$ -Human FOXP2 erfolgte entweder für 60 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Primärantikörper wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in 1x TBS-T gewaschen. Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper erfolgte für 60 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Hersteller sowie Verdünnungen der Antikörper können Tabelle B.6 entnommen werden. Danach wurde die Membran zweimal für je 10 Minuten mit 1x TBS-T und einmal für 10 Minuten mit TBS gewaschen (siehe Tabelle B.3). Der



Westernblot wurde mittels Laserscanner (Typhoon<sup>TM</sup> FLA 9500, GE Healthcare) bei einer Auflösung von 10 µm im Cy5-Kanal gescannt.

**Tabelle B.6 – Antikörper zur Detektion von FOXP2-Konstrukten**

Antikörper	Verdünnung	Anmerkung	Hersteller
α-Human FOXP2	1:1000	AHP20202 hergestellt in Ziege	Bio-Rad AbD Serotec®
α-Goat IgG (H+L) (Sekundärantikörper)	1:10000	Fluoreszenzlabel CF <sup>TM</sup> 633, hergestellt in Kaninchen	Sigma-Aldrich

### **Elektrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)**

Für die Interaktionsanalyse mittels EMSA wurden die Reaktionen jeweils in einem finalen Probenvolumen von 10 µl vorbereitet. Dafür wurden je 2 µl DNA mit der fünffachen Konzentration hinsichtlich der finalen Konzentration und entsprechende Volumina der Proteinlösung (je nach Konzentration der Stocklösung) auf 10 µl aufgefüllt. Differenzen zum finalen Probenvolumen wurden mit 1x TN50-Probenpuffer angepasst. Die Proben wurden anschließend bei Raumtemperatur 30-60 Minuten inkubiert und kurz vor Beladung des Gels mit 2 µl sechsfachem Gelprobenpuffer gemischt (siehe Tabelle B.4).

Die Analyse der DNA-Bindung von FOXP2-Konstrukten erfolgte in 5% (w/v)-igen Agarosegelen (UltraPure-Agarose, Invitrogen), die mit 1x TA-Elektrophoresepuffer hergestellt wurden (siehe Tabelle B.4). Das Agarosegel wurde ohne Proben für 30 Minuten bei 100V in der eiswassergekühlten Gelkammer, die mit Elektrophoresepuffer gefüllt war, vorequiliibriert. Danach wurden die Proben für 45 Minuten bei 150 V in der Gelkammer, die mit frischem Eis gekühlt wurde, aufgetrennt. Alle Gele wurden direkt im Anschluß mit einem Laserscanner (Typhoon<sup>TM</sup> FLA 9500, GE Healthcare) bei einer Auflösung von 25 µm oder 50 µm im Cy3- bzw. Cy5-Kanal gescannt. Überlagerung von Gelbildern, die in zwei verschiedenen Kanälen gescannt wurden, wurde mit Hilfe von ImageJ vorgenommen. Auswertung der Bandenprofile für die Wasserfall-Diagramme wurde mit IGOR Pro (Version 6.37, WaveMetrics, Oregon, USA) durchgeführt.

### **switchSENSE<sup>®</sup>-Interaktionsanalyse**

Die DNA-biochipbasierten Interaktionsanalysen von FOXP2 wurden von Hanna Müller-Landau von der Dynamic Biosensors GmbH (Martinsried, Deutschland) durchgeführt.

Die Interaktionsanalysen wurden hauptsächlich am switchSENSE<sup>®</sup>-Instrument DRX auf einem Multifunktions-Biochip (*Multi-Purpose-Biochip*, MPC) MPC-48-1-Y1 durchgeführt. Interaktionsstudien, bei denen mehrere DNA-Sequenzen synchron auf dem DualColor-Chip (MPC-48-2-G1/R1) gemessen wurden, wurden mit Hilfe des switchSENSE<sup>®</sup>-Instruments DRX<sup>2</sup> detektiert. In allen Fällen handelte es sich um Standard-Biochips mit einer Dichte von 10<sup>6</sup> DNA-Moleküle pro Elektrode. Während der Experimente wurden der Autosampler auf 20°C und der Biochip auf 25°C temperiert. Proteinkonzentrationen wurden spektrophotometrisch bestimmt und Proteinlösungen wurden anschließend in den Autosampler geladen. Bei allen Interaktionsanalysen wurde die jeweilige Proteinlösung für die

Assoziationsreaktion mit einer Flussrate von 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  durch den Durchflusskanal gepumpt. Die Flussrate des Probenpuffers für die Dissoziationsreaktionen betrug 200  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Initiale Experimente, in denen die DNA-Bindung von FOXP2 hinsichtlich der Salzkonzentration getestet wurde, wurden im *Switching*-Modus mit minimalen Puffern H40 bzw. H140 durchgeführt (siehe Tabelle B.5). Dabei wurden die DNA-Hebel mit einer Frequenz von 10 kHz auf der Goldoberfläche auf- und abbewegt. Die weiteren Experimente wurden dann in spezifischem FOXP2-Puffer im FPS-Modus durchgeführt (siehe Tabelle B.5). Vor der ersten Verwendung und nach jeder Assoziations- und Dissoziationsreaktion wurde der Biochip mit einer 100 mM NaOH-Lösung (pH 13) von DNA und Proteinresten befreit. Nach jedem Regenerierungsprozess wurde komplementäre Anker-DNA (cNL-A48 bzw. cNL-B48) mit funktionaler Verlängerung (Ziel- bzw. Kontroll-DNA) hybridisiert (Sequenzen siehe Tabelle C.5).

**Konzentrationsabhängige Interaktionsanalyse** Für die in Serie gemessene konzentrationsabhängige Interaktionsanalyse wurde ein Aliquot der Proteinstocklösung aufgetaut und auf 1  $\mu\text{M}$  verdünnt. Nach spektrophotometrischer Konzentrationsbestimmung wurde eine Verdünnungsreihe (5 nM bis 200 nM) hergestellt und die Proben wurden in den Autosampler geladen. Nach Messung jeder Assoziations- und Dissoziationsreaktion wurde ein Regenerierungs- und Hybridisierungsschritt durchgeführt, sodass zwischen den einzelnen Interaktionsanalysen 26 Minuten lagen und die Messreihe fast neun Stunden dauerte. Die inverse Messreihe wurde in gleicher Weise an einem anderen Tag durchgeführt.

**Konzentrations- und zeitabhängige Interaktionsanalyse** Für die in Serie gemessene Interaktionsanalyse wurde wie schon zuvor beschrieben, die Proteinstocklösung auf 50 nM, 100 nM und 200 nM verdünnt und in den Autosampler geladen. Die Menge der Proteinlösungen musste ausreichend für die Anzahl der Iterationen sein. Die Konzentrationen wurden alternierend gemessen, wobei mit der niedrigsten Konzentration begonnen wurde. Zwischen den Assoziations- und Dissoziationsreaktionen wurde ein Regenerierungs- und Hybridisierungsschritt durchgeführt, sodass zwischen den einzelnen Interaktionsanalysen 20 Minuten lagen und zwischen zwei Interaktionsanalysen einer Konzentration 60 Minuten. Für die Triplikatmessung wurde das Experiment in gleicher Weise an anderen Tagen wiederholt.

Daten wurden mit Hilfe des von der Dynamic Biosensors GmbH bereitgestellten Software-Pakets switchANALYSIS (<https://www.dynamic-biosensors.com/software/>) ausgewertet.



## Anhang C

# Sequenzen

### C.1 DNA-Sequenzen

#### Gensequenzen

```
>ENA|AF337817|AF337817.1 Homo sapiens putative forkhead/
winged-helix transcription factor (FOXP2) mRNA, complete cds.
AGTGAGCTAGCTTCTGAGTTTTCCCTTCTTTTTATACTGTTTTCTGTGCTGGCTTTTTTG
AATCTTCTAATTTTTTCATCTCTTTAACAACTCCTATGAAGTTGAAACCGGAAGTTTG
CTCTAACATTTCCAGAGAAGGTATTAAGTCATGATGCAGGAATCTGCGACAGACAATA
AGCAACAGTTCAATGAATCAAAATGGAATGAGCACTTAAGCAGCAATTAGATGCTGGC
AGCAGAGATGGAAGATCAAGTGGTGACACCAGCTCTGAAGTAAGCACAGTAGAACTGCTG
CATCTGCAACAACAGCAGGCTCTCCAGGCAGCAAGACAACCTTTTACAGCAGCAACA
AGTGGATTGAAATCTCCTAAGAGCAGTGATAAACAGAGACCCTGCAGGTGCCTGTGTCA
GTGGCCATGATGACTCCCCAGGTGATCACCCCTCAGCAAATGCAGCAGATCCTTCAGCAA
CAAGTCTGTCTCCTCAGCAGCTACAAGCCCTTCTCCAACAACAGCAGGCTGTCTATGCTG
CAGCAGCAACAACACAGAGGTTTACAAAGAAACAGCAAGAGCAGTTACATCTTCAGCTT
TTGCAGCAGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAACAACAGCAGCAACAACAGCAGCAGCAA
CAACAACAACAACAGCAGCAACAACAGCAGCAGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGCAA
CAGCATCTGGAAAGCAAGCGAAAGAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAGCAATTG
GCAGCCAGCAGCTTGTCTTCCAGCAGCAGCTTCTCCAGATGCAACAACCTCCAGCAGCAG
CAGCATCTGCTCAGCCTTCAGCGTCAGGGACTCATCTCCATTCACCTGGCCAGGCAGCA
CTTCTGTCCAATCGCTGCCTCAAGCTGGCTTAAGTCTGCTGAGATTCAGCAGTTATGG
AAAGAAGTGACTGGAGTTCACAGTATGGAAGACAATGGCATTAAACATGGAGGGCTAGAC
CTCACTACTAACAAATTCCTCCTCGACTACCTCCTCCAACACTTCCAAGCATCACACCA
ATAACTCATCATTCATAGTGAATGGACAGTCTTCAGTTCTAAGTGAAGCAGAGCAGCAG
TCGTACATGAGGAGACTGGGGCCTTCACACTCTCTATGGCCATGGAGTTTGCAATGG
CCAGGCTGTGAAAGCATTTGTGAAGATTTTGGACAGTTTTTAAAGCACCTTAACAATGAA
CAGCATTTGGATGACCGAAGCACTGCTCAGTGTGAGTGCAGTGCAGGTTGGTGCAACAG
TTAGAAATACAGCTTTCTAAGAAGCGAAGCTTCTCAAGCAATGATGACCACTTGCAC
ATGCGACCCCTCAGAGCCAAACCATCTCCAAACCTCTAAATCTGGTGTCTAGTGTACC
ATGTCGAAGAAATATGTTGGAGACATCCCCACAGAGCTTACCTCAAACCCCTACCACACCA
ACGGCCCACTCAGCCGATTACCCAGGGACCTCAGTAATCACCCAGCCAGTGTGCC
AATGTGGGAGCCATACGAAGGCGACATTCAGACAAAATACAACATTCCTCATGCAGAA
ATTGCCCAAACTATGAATTTTATAAAAATGCAGATGTCAGACCTCCATTTACTTATGCA
ACTCTCATAAGGCAGGCTATCATGGAGTCACTGACAGGCAGTTAACACTTAATGAAAT
TACAGTGGTTTACACGGACATTTGCTTACTTCAGGCCTAATGCAGCAACTTGAAGAAT
GCAGTACGTATAATCTTAGCCTGCACAAGTGTGTTGTCGAGTAGAAAATGTTAAAGGA
GCAGTATGGACTGTGGATGAAGTAGAATACCAGAAGCGAAGTCACAAAAAGATAACAGGA
AGTCCAACCTTAGTAAAAAATATACCTACCAGTTTAGGCTATGGAGCAGCTCTTAATGCC
AGTTTGAGAGCTGCCTTGGCAGAGAGCAGTTTACCTTTGCTAAGTAATCTGGAGTATA
AATAATGCATCCAGTGGCCTACTGCAGGCCGCTCCAGCAAGCCTCAATGGTTCTCTGGAT
CACATTGACAGCAATGGAACAGTAGTCCGGGCTGCTCAGCTCAGCCGCACATACATTC
ATCCAGCTCAAGGAAGAGCAGTGTGTCAGAGGATGAAGACTGCCCAATGTCTTACTG
ACAACAGCTAATCACAGTCCAGAAATAGAAGACGACAGAGATTGAAGAAGAGCCTTTA
TCTGAAGATCTGGAATGAGAACAGTACTTGTGAAACCTCAGCGTGAAGGGACATACACTG
ACCTTCATAACCACTCCACAACCATGAATTTTGAACAATTTTACTGTGACTATTTATT
AAGCATGGATAAAGGAGACAGCCCTAAGGAACCTTACTAAGCCAGCCCTTTGGGATTTCAG
TACCAACAGGCA
```

**Abbildung C.1 – Kodierende DNA-Sequenz von humanem FOXP2.** Informationen zur Gensequenz des humanen Transkriptionsfaktors FOXP2 (Isoform 1) wurden dem European Nucleotide Archive, kurz ENA, entnommen (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/AF337817>).

```
> green fluorescent protein (GFP)/cycle-3 mutant
ATGGGTAAAGGAGAAGAACTTTCACTGGAGTTGTCCCAATCTTGTGAATTAGATGGT
GATGTTAATGGGCACAAATTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGA
AAACTTACCCTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTGTTCCGTGGCCAAACACTT
GTCACTACTTCTCTTATGGTGTCAATGCTTTCCCGTTATCCGGATCATATGAAACGG
CATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAACGCACATATCTTTTC
AAAGATGACGGGAAC TACAAGACGCGTGTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCCTGTT
AATCGTATCGAGTTAAAGGTATGATTTTAAAGAAGATGGAACATTCTCGGACACAAA
CTCGAGTACAAC TATAACTCACACAATGTATACATCACGGCAGACAAAACAAAAGATGGA
ATCAAAGCTAACTTCAAAATTCGCCACAACATGGAAGATGGATCCGTTCAACTAGCAGAC
CATTATCAACAAAATACTCCAATGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTTAC
CTGTCCACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAATGAAAAGAGAGACCACATGGTCTT
CTTGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAGGGT
```

**Abbildung C.2 – Kodierende DNA-Sequenz von Cycle 3 GFP.** Nukleotidsequenz der GFP-Mutante (Cycle 3) für verbesserte Faltung in Zellen [198, 199].

## Oligonukleotide zur Klonierung, Mutagenese und Sequenzierung

**Tabelle C.1 – Primer zur Klonierung der FOXP2-Konstrukte.** Kleinbuchstaben geben Sequenzen komplementär zum pET28b-Vektor (Novagen) an. Sequenzen die für Inserts kodieren sind in Großbuchstaben angeben.

Name	Sequenz	Beschreibung
1210_KH	tgagatccggctgctaac	Vorwärts-Primer, Linearisierung pET28b
1211_KH	catatggctgcccgcg	Rückwärts-Primer, Linearisierung pET28b
1338_KH	cgcgccagcccatatgCAGGAATCTGCGACAGAG	Vorwärts-Primer Volllänge-FOXP2
1212_KH	cgcgccagcccatatgAAAGAAGTGACTGGAGTTCACAG	Vorwärts-Primer K271
1214_KH	cgcgccagcccatatgCTTAACAATGAACACGCATTG	Vorwärts-Primer L367
1215_KH	cgcgccagcccatatgCTTAACAATGAACACGCATTG	Vorwärts-Primer V503
1217_KH	gtagcagccgatctcatta <b>ACCCTTGATAGTTCATCCATGC</b>	Rückwärts-Primer C-terminaler <b>GFP-Tag</b>
1469_KH	gtagcagccgatctcaTT <b>ATTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAAG</b> CGCT <b>ACCCTTGATAGTTCATCCATGC</b>	Rückwärts-Primer C-terminaler <b>GFP-Tag + Strep-Tag®</b>
1470_KH	gtagcagccgatctcaTT <b>ATTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAAG</b> CGCT <b>TCCAGATCTTCAGATAAAGGC</b>	Rückwärts-Primer <b>FOXP2</b> -Konstrukte + <b>Strep-Tag®</b>
4600_KH	gtagcagccgatctcaTT <b>ATTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAAG</b> CGCTATTTTATAAAATTCATAGTTTGGGG	Rückwärts-Primer noFHD-Konstrukt + <b>Strep-Tag®</b>

**Tabelle C.2 – Primer zur Mutagenese der FOXP2-Konstrukte.** Sequenzen für die Mutation der FOXP2-Konstrukte wurden mit Hilfe des Online-Tools *QuikChange Primer Design* (<https://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>) entworfen.

Name	Sequenz	Beschreibung
4348_KH	GTGCAACAGTTAGAAATACAGGCTTCTAAAGAACGCGAACGTCT	Vorwärts-Primer (L413A)
4349_KH	AGACGTTTCGCGTTCCTTTAGAACGCTGTATTTCTAACTGTTGCAC	Rückwärts-Primer L413A
4350_KH	CTTTCTAAAGAACGCGAACGTGCTCAAGCAATGATGACCCA	Vorwärts-Primer L420A
4351_KH	TGGGTCATCATTGCTTGAGCAGCTTCGCGTTCCTTAGAAAG	Rückwärts-Primer L420A
4352_KH	AAGCAATGATGACCCACGCGCACATGCGACCTCAG	Vorwärts-Primer L427A
4353_KH	CTGAGGGTCGCATGTGCGCGTGGGTCATCATTGCTT	Rückwärts-Primer L427A
1816_KH	CAGCTGGTTTACACGGACATTTCTTACTTCAGGCG	Vorwärts-Primer A539P
1817_KH	CGCCTGAAGTAAGGAAATGTCCGTGTAAACCAGCTG	Rückwärts-Primer A539P
4598_KH	ACTTGAAGAATGCAGTACATCATAATCTTAGCCTGCAC	Vorwärts-Primer R553H
4599_KH	GTGCAGGCTAAGATTATGATGTACTGCATTCTTCCAAGT	Rückwärts-Primer R553H

**Tabelle C.3 – Primer zur Überprüfung der klonierten Sequenzen.** Primer 1096 und 1234 binden auf dem pET28b-Rückgrat 144 Nukleotide vor dem Promotor bzw. innerhalb des Terminators für die T7-Polymerase. Sie wurden sowohl zum Screenen von Bakterienkolonien als auch zur Sequenzierung genutzt. Sequenzierprimer 001, 002 und 003 decken zusammen mit 1096 und 1234 den gesamten Leserahmen von *FOXP2-GFP* ab.

Name	Sequenz	Beschreibung
1096_KH	caccataccacgcccgaacaa	Vorwärts-Primer, Sequenzierung und Colony-PCR-Screen
1234_KH	gccccaaaggggttatgctag	Rückwärts-Primer, Sequenzierung und Colony-PCR-Screen
001_KH	TGGAAGCAAGCGAAAGAGCA	Vorwärts-Primer, bindet innerhalb des <i>FOXP2</i> -Gens
002_KH	TGCCCAATGTGGGAGCCATA	Vorwärts-Primer, bindet innerhalb des <i>FOXP2</i> -Gens
003_KH	TTAATGGGCACAAATTTCTGTCA	Vorwärts-Primer, bindet innerhalb des <i>GFP</i> -Gens

## DNA-Sequenzen für Protein-Interaktionsanalysen

**Tabelle C.4 – In EMSA-Experimenten genutzte DNA-Sequenzen.** Sequenzen sind von 5' nach 3' angegeben. 7-mer Bindestellen mit jeweils höchster Affinität für die Forkhead-Bindedomäne sind fettgedruckt.

Name	Sequenz	Beschreibung
N70	CGCCTGTTACGGCATCAGGGCTTTGGTTTGGGCGGGCTGCT <b>TGTTTACCA</b> ATTGTCTCCGGCGGTAT	Seq_175 aus Nelson et al., 2013
cN70	ATACCGCCGGAGACAATTGGTAAACAAGCAGCCCGCCAAACCAAGCCCTGATGCCGTAACAGGCG	komplementär zu N70
N32	GGCGGGCTGCT <b>TGTTTACCA</b> ATTGTCTCCGGC	gekürzte N70-Sequenz
cN32	GCCGGAGACAATTGGTAAACAAGCAGCCCGCC	komplementär zu N32
L32	AGTCTCGTGAACCGACA <b>ACTCTTACT</b> CACTG	Labordatenbank
cL32	CAGTGAAGTCAAGAGTTGTCCGGTTCACGAGACT	komplementär zu L32
Z29	TTGCCCCCTTAA <b>ATATTG</b> CCTAAGCCTC	Zhou et al., 2008
cZ29	GAGGCTTAGGCAATATTTAAGGGGGCAA	komplementär zu Z29

**Tabelle C.5 – DNA-Sequenzen, die in switchSENSE<sup>®</sup>-Experimenten genutzt wurden.** Sequenzen sind von 5' nach 3' angegeben. Ankersequenzen NL-A48 und NL-B48 sind am 5'-Ende an die Goldoberfläche gekoppelt und tragen gelben [Y1], grünen [G1] bzw. roten [R1] Fluoreszenzfarbstoff. Sequenzen aus Anker und Verlängerung sind aus zwei einzelne Strängen, die durch den Farbstoff getrennt werden. Komplementärstränge hingegen sind durchgängig. 7-mer Bindestellen mit jeweils höchster Affinität für die Forkhead-Bindedomäne sind fettgedruckt.

Name	Sequenz	Beschreibung
NL-A48	TAGTGCTGTAGGAGAATATACGGGCTGCTCG <b>TGTTGACA</b> AGTACTGAT [Y1/G1]	Chip-Anker/ DualColor (G1)
cNL-A48	ATCAGTACTTGTCAACACGAGCAGCCCGTATATTCCTCTACAGCACTA	komplementär zu NL-A48
NL-B48	TAGTCGTAAGCTGATATGGCTGATTAGTC <b>GGAAGCA</b> TCGAACGCTGAT [Y1/R1]	Chip-Anker/ DualColor (R1)
cNL-B48	ATCAGCGTTTCGATGCTTCCGACTAATCAGCCATATCAGCTTACGACTA	komplementär zu NL-B48
N32	GGCGGGCTGCT <b>TGTTTACCA</b> ATTGTCTCCGGC	gekürzte N52-Sequenz
cN32	GCCGGAGACAATTGGTAAACAAGCAGCCCGCC	komplementär zu N32
N52	CTGTTACGGCATCAGGGCTTTGGTTTGGGCGGGCTGCT <b>TGTTTACCA</b> ATTGT	Seq_175, Nelson et al., 2013
cN52	ACAATTGGTAAACAAGCAGCCCGCCAAACCAAGCCCTGATGCCGTAACAG	komplementär zu N52
NB52	ATCCGTGGAGCCGCTTAAGGCCTTAGCGACTTCATCCGACTAGAGAAACAA	Seq_53, Nelson et al., 2013
cNB52	TTGTTTCTCTAGTCGGATGAAGTCGCTAAGGCCTTAAGGCGGCTCCACGGAT	komplementär zu NB52
NL-B48 + cN32	TAGTCGTAAGCTGATATGGCTGATTAGTCGGAAGCATCGAACGCTGAT [Y1]GCCGGAGACAATTGGTAAACAAGCAGCCCGCC	Anker, verlängert mit cN32 (Kapitel 3.2.1 & 3.2.2)
cNL-B48 + N32	GGCGGGCTGCT <b>TGTTTACCA</b> ATTGTCTCCGGCATCAGCGTTCGATGCTTCCGACTAATCAGCCATATCAGCTTACGACTA	Chip/ Ziel-DNA (Kapitel 3.2.1 & 3.2.2)
NL-B48 + cN52	TAGTCGTAAGCTGATATGGCTGATTAGTCGGAAGCATCGAACGCTGAT [Y1]ACAATTGGTAAACAA GCAGCCCGCCAAACCAAGCCCTGATGCCGTAACAG	Anker, verlängert mit cN52 (Kapitel 3.2.3 bis Kapitel 3.5)
cNL-B48 + N52	CTGTTACGGCATCAGGGCTTTGGTTTGGGCGGGCTGCT <b>TGTTTACCA</b> ATTGTATCAGCGTTCGATGCTTCCGACTAATCAGCCATATCAGCTTACGACTA	Chip/ Ziel-DNA (Kapitel 3.2.3 bis Kapitel 3.5)
NL-B48 + cNB52	TAGTCGTAAGCTGATATGGCTGATTAGTCGGAAGCATCGAACGCTGAT [Y1]TTGTTTCTCTAGTCG GATGAAGTCGCTAAGGCCTTAAGGCGGCTCCACGGAT	Anker, verlängert mit cNB52 (Kapitel 3.2.3 bis Kapitel 3.5)
cNL-B48 + NB52	ATCCGTGGAGCCGCTTAAGGCCTTAGCGACTTCATCCGACTAGAGAAACAAATCAGCGTTCGATGCTTCCGACTAATCAGCCATATCAGCTTACGACTA	Chip/ Kontroll-DNA (Kapitel 3.2.3 bis Kapitel 3.5)

## C.2 Protein-Sequenzen

**a**

```
>sp|O15409|FOXP2_HUMAN Forkhead box protein P2 (isoform I)
MMQESATETI SNSSMNQNGM STLSSQLDAG SRDGRSSGDT SSEVSTVELL 50
HLQQQQALQA ARQLLLQQQT SGLKSPKSSD KQRPLQVPVS VAMMTPQVIT 100
PQQMQQILQQ QVLSPQQLQA LLQQQQAVML QQQQLQEFYK KQQEQLHLQL 150
LQQQQQQQQQ QQQQQQQQQQ QQQQQQQQQQ QQQQQQQQQQ QHPGKQAKEQ 200
QQQQQQQQQL AAQQLVFQQQ LLOMQQLQQQ QHLLSLQRQG LISIPPGQAA 250
LPVQSLPQAG LSPAETIQLW → KEVTGVHSME DNGIKHGGLD LTTNNSSTT 300
SSNTSKASPP ITHHSIVNGQ SSVLSARRDS SSHEETGASH TLYGHGVCKW 350
PGCESICEDF GQFLKHLNNE → HALDDRSTAQ CRVQMQVVQQ LEIQLSKERE 400
RLQAMMTHLH MRPSEPKPSP KPLNLVSSVT MSKNMLETSP QSLPQTPTTP 450
TAPVTPITQG PSVITPASVP NVGAIRRRHS DKYNIPMSSE IAPNYEFYKN 500
→ ADVRPPFTYA TLIRQAIMES SDRQLTLNEI YSWFTRTFAY FRRNAATWKN 550
AVRHNLSLHK CFVRVENVKG AVWTVDEVEY QKRRSQKITG SPTLVKNIPT 600
SLGYGAALNA SLQAALAESS LPLLSNPGLI NNASSGLLQA VHEDLNGSLD 650
HIDSNGNSSP GCSPQPHIHS IHVKEEPVIA EDEDCPMSLV TTANHSPELE 700
DDREIEEEPL SEDLE*
```

**b**

```
>ACP30366.1 soluble-modified green fluorescent protein
MSKGEEELFTG VVPILVELDG DVNGHKFSVS GEGEGDATYG KLTLKFICTT 50
GKLPVPWPTL VTTFYSGVQC FSRYPDHMKR H+DFFKSAMPE GYVQERTISF 100
KDDGNYKTRA EVKFEGDTLV NRIELKGIDF KEDGNILGHK LEYNYNSHNV 150
YITADKQKNG IKANFKIRHN IEDGSVQLAD HYQONTPIGD GPVLLPDNHY 200
LSTQSALSKD PNEKRDHMLV LEFVTAAGIT HGMDELYKG*
```

**Abbildung C.3 – Aminosäuresequenz von humanem FOXP2 und GFP. (a)** Informationen hinsichtlich der Proteinsequenz wurden der Datenbank UniProt Knowledgebase (<http://www.uniprot.org>) entnommen [Eintrag O15409-1; FOXP2\_HUMAN]. Polyglutamintrakt (petrol), Zinkfinger (lila), Leucin-Zipper (hellblau), Forkhead-Domäne (dunkelblau), Aminosäuresubstitution A539P (pink) und für Sprachentwicklung essentielle Aminosäure R553 (orange) sind entsprechend Abb. 1.1a eingefärbt. Jeweils erste Aminosäure der Kurzkonstrukte K271, L367 und V503 ist durch einen Pfeil markiert. **(b)** Aminosäuresequenz des Grün fluoreszierenden Proteins (GFP) für rekombinante FOXP2-Fusionsproteine.



# Literaturverzeichnis

- [1] Brown, T. A. (2002) The Human Genome. In *Genomes* chapter 1 Wiley-Liss Oxford 2 edition <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21134/>.
- [2] Ezkurdia, I., Juan, D., Rodriguez, J. M., Frankish, A., Diekhans, M., Harrow, J., Vazquez, J., Valencia, A., and Tress, M. L. (November, 2014) Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19,000 human protein-coding genes. *Human molecular genetics*, **23**(22), 5866–5878.
- [3] Spitz, F. and Furlong, E. E. M. (September, 2012) Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nature reviews. Genetics*, **13**(9), 613–626.
- [4] Stampfel, G., Kazmar, T., Frank, O., Wienerroither, S., Reiter, F., and Stark, A. (November, 2015) Transcriptional regulators form diverse groups with context-dependent regulatory functions. *Nature*, **124**, 1851.
- [5] Jolma, A., Yin, Y., Nitta, K. R., Dave, K., Popov, A., Taipale, M., Enge, M., Kivioja, T., Morgunova, E., and Taipale, J. (November, 2015) DNA-dependent formation of transcription factor pairs alters their binding specificity. *Nature*, **527**(7578), 384–388.
- [6] Lambert, S. A., Jolma, A., Campitelli, L. F., Das, P. K., Yin, Y., Albu, M., Chen, X., Taipale, J., Hughes, T. R., and Weirauch, M. T. (February, 2018) The Human Transcription Factors. *Cell*, **172**(4), 650–665.
- [7] Garvie, C. W. and Wolberger, C. (November, 2001) Recognition of specific DNA sequences. *Molecular cell*, **8**(5), 937–946.
- [8] Afek, A., Schipper, J. L., Horton, J., Gordân, R., and Lukatsky, D. B. (December, 2014) Protein-DNA binding in the absence of specific base-pair recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**(48), 17140–17145.
- [9] Enard, W., Przeworski, M., Fisher, S. E., Lai, C. S. L., Wiebe, V., Kitano, T., Monaco, A. P., and PAAbo, S. (August, 2002) Molecular evolution of FOXP2, a gene involved in speech and language. *Nature*, **418**(6900), 869–872.
- [10] Zhang, J., Webb, D. M., and Podlaha, O. (December, 2002) Accelerated protein evolution and origins of human-specific features: Foxp2 as an example. *Genetics*, **162**(4), 1825–1835.

- [11] Marcus, G. F. and Fisher, S. E. (June, 2003) FOXP2 in focus: what can genes tell us about speech and language?. *Trends in cognitive sciences*, **7**(6), 257–262.
- [12] Spiteri, E., Konopka, G., Coppola, G., Bomar, J., Oldham, M., Ou, J., Vernes, S. C., Fisher, S. E., Ren, B., and Geschwind, D. H. (December, 2007) Identification of the transcriptional targets of FOXP2, a gene linked to speech and language, in developing human brain. *American journal of human genetics*, **81**(6), 1144–1157.
- [13] Vernes, S. C., Spiteri, E., Nicod, J., Groszer, M., Taylor, J. M., Davies, K. E., Geschwind, D. H., and Fisher, S. E. (December, 2007) High-throughput analysis of promoter occupancy reveals direct neural targets of FOXP2, a gene mutated in speech and language disorders. *American journal of human genetics*, **81**(6), 1232–1250.
- [14] Konopka, G., Bomar, J. M., Winden, K., Coppola, G., Jonsson, Z. O., Gao, F., Peng, S., Preuss, T. M., Wohlschlegel, J. A., and Geschwind, D. H. (November, 2009) Human-specific transcriptional regulation of CNS development genes by FOXP2. *Nature*, **462**(7270), 213–217.
- [15] Enard, W., Gehre, S., Hammerschmidt, K., Holter, S. M., Blass, T., Somel, M., Brückner, M. K., Schreiweis, C., Winter, C., Sohr, R., Becker, L., Wiebe, V., Nickel, B., Giger, T., Müller, U., Groszer, M., Adler, T., Aguilar, A., Bolle, I., Calzadawack, J., Dalke, C., Ehrhardt, N., Favor, J., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Hans, W., Holzlwimmer, G., Javaheri, A., Kalaydjiev, S., Kallnik, M., Kling, E., Kunder, S., Mossbrugger, I., Naton, B., Racz, I., Rathkolb, B., Rozman, J., Schrewe, A., Busch, D. H., Graw, J., Ivandic, B., Klingenspor, M., Klopstock, T., Ollert, M., Quintanilla-Martinez, L., Schulz, H., Wolf, E., Wurst, W., Zimmer, A., Fisher, S. E., Morgenstern, R., Arendt, T., de Angelis, M. H., Fischer, J., Schwarz, J., and Pääbo, S. (May, 2009) A humanized version of Foxp2 affects cortico-basal ganglia circuits in mice. *Cell*, **137**(5), 961–971.
- [16] Hurst, J. A., Baraitser, M., Auger, E., Graham, F., and Norell, S. (April, 1990) An extended family with a dominantly inherited speech disorder. *Developmental medicine and child neurology*, **32**(4), 352–355.
- [17] Gopnik, M. and Crago, M. B. (April, 1991) Familial aggregation of a developmental language disorder. *Cognition*, **39**(1), 1–50.
- [18] Vargha-Khadem, F., Watkins, K., Alcock, K., Fletcher, P., and Passingham, R. (January, 1995) Praxic and nonverbal cognitive deficits in a large family with a genetically transmitted speech and language disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**(3), 930–933.
- [19] Vargha-Khadem, F., Watkins, K. E., Price, C. J., Ashburner, J., Alcock, K. J., Connelly, A., Frackowiak, R., Friston, K. J., Pembrey, M. E., Mishkin, M., Gadian, D. G., and Passingham, R. E. (1998) Neural basis of an inherited speech and language disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**(21), 12695–12700.

- [20] Fisher, S. E., Vargha-Khadem, F., Watkins, K. E., Monaco, A. P., and Pembrey, M. E. (February, 1998) Localisation of a gene implicated in a severe speech and language disorder. *Nature genetics*, **18**(2), 168–170.
- [21] Lai, C. S., Fisher, S. E., Hurst, J. A., Vargha-Khadem, F., and Monaco, A. P. (October, 2001) A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. *Nature*, **413**(6855), 519–523.
- [22] Vernes, S. C., Nicod, J., Elahi, F. M., Coventry, J. A., Kenny, N., Coupe, A.-M., Bird, L. E., Davies, K. E., and Fisher, S. E. (November, 2006) Functional genetic analysis of mutations implicated in a human speech and language disorder. *Human molecular genetics*, **15**(21), 3154–3167.
- [23] Lai, C. S., Fisher, S. E., Hurst, J. A., Levy, E. R., Hodgson, S., Fox, M., Jeremiah, S., Povey, S., Jamison, D. C., Green, E. D., Vargha-Khadem, F., and Monaco, A. P. (August, 2000) The SPCH1 region on human 7q31: genomic characterization of the critical interval and localization of translocations associated with speech and language disorder. *American journal of human genetics*, **67**(2), 357–368.
- [24] Tuteja, G. and Kaestner, K. H. (September, 2007) SnapShot: forkhead transcription factors I. *Cell*, **130**(6), 1160.
- [25] Tuteja, G. and Kaestner, K. H. (October, 2007) Forkhead transcription factors II. *Cell*, **131**(1), 192.
- [26] Liégeois, F., Baldeweg, T., Connelly, A., Gadian, D. G., Mishkin, M., and Vargha-Khadem, F. (November, 2003) Language fMRI abnormalities associated with FOXP2 gene mutation. *Nature neuroscience*, **6**(11), 1230–1237.
- [27] Vernes, S. C., Oliver, P. L., Spiteri, E., Lockstone, H. E., Puliyadi, R., Taylor, J. M., Ho, J., Mombereau, C., Brewer, A., Lowy, E., Nicod, J., Groszer, M., Baban, D., Sahgal, N., Cazier, J.-B., Ragoussis, J., Davies, K. E., Geschwind, D. H., and Fisher, S. E. (July, 2011) Foxp2 regulates gene networks implicated in neurite outgrowth in the developing brain. *PLoS Genetics*, **7**(7), e1002145.
- [28] Reimers-Kipping, S., Hevers, W., Paabo, S., and Enard, W. (February, 2011) Humanized Foxp2 specifically affects cortico-basal ganglia circuits. *Neuroscience*, **175**, 75–84.
- [29] Shu, W., Yang, H., Zhang, L., Lu, M. M., and Morrissey, E. E. (July, 2001) Characterization of a new subfamily of winged-helix/forkhead (Fox) genes that are expressed in the lung and act as transcriptional repressors. *The Journal of biological chemistry*, **276**(29), 27488–27497.
- [30] Staes, N., Sherwood, C. C., Wright, K., de Manuel, M., Guevara, E. E., Marques-Bonet, T., Krützen, M., Massiah, M., Hopkins, W. D., Ely, J. J., and Bradley, B. J. (December, 2017) FOXP2 variation in great ape populations offers insight into the evolution of communication skills. *Scientific reports*, **7**(1), 16866.
- [31] Scharff, C. and Haesler, S. (December, 2005) An evolutionary perspective on FoxP2: strictly for the birds?. *Current opinion in neurobiology*, **15**(6), 694–703.

- [32] White, S. A., Fisher, S. E., Geschwind, D. H., Scharff, C., and Holy, T. E. (October, 2006) Singing mice, songbirds, and more: models for FOXP2 function and dysfunction in human speech and language. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **26**(41), 10376–10379.
- [33] Li, G., Wang, J., Rossiter, S. J., Jones, G., and Zhang, S. (2007) Accelerated FoxP2 Evolution in Echolocating Bats. *PloS one*, **2**(9).
- [34] Haesler, S., Rochefort, C., Georgi, B., Licznarski, P., Osten, P., and Scharff, C. (December, 2007) Incomplete and inaccurate vocal imitation after knockdown of FoxP2 in songbird basal ganglia nucleus Area X. *PLoS Biology*, **5**(12), e321.
- [35] Wohlgemuth, S., Adam, I., and Scharff, C. (July, 2014) FoxP2 in songbirds. *Current opinion in neurobiology*, **28C**, 86–93.
- [36] Schreiweis, C., Bornschein, U., Burguière, E., Kerimoglu, C., Schreiter, S., Danneemann, M., Goyal, S., Rea, E., French, C. A., Puliyadi, R., Groszer, M., Fisher, S. E., Mundry, R., Winter, C., Hevers, W., PAAbo, S., Enard, W., and Graybiel, A. M. (September, 2014) Humanized Foxp2 accelerates learning by enhancing transitions from declarative to procedural performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**(39), 14253–14258.
- [37] Myatt, S. S. and Lam, E. W. F. (November, 2007) The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nature reviews. Cancer*, **7**(11), 847–859.
- [38] Yang, Z., Hikosaka, K., Sharkar, M. T. K., Tamakoshi, T., Chandra, A., Wang, B., Itakura, T., Xue, X., Uezato, T., Kimura, W., and Miura, N. (July, 2010) The mouse forkhead gene Foxp2 modulates expression of the lung genes. *Life sciences*, **87**(1-2), 17–25.
- [39] Estruch, S. B., Graham, S. A., Deriziotis, P., and Fisher, S. E. (2016) The language-related transcription factor FOXP2 is post-translationally modified with small ubiquitin-like modifiers. *Scientific reports*, **6**, 20911.
- [40] Estruch, S. B., Graham, S. A., Quevedo, M., Vino, A., Dekkers, D. H. W., Deriziotis, P., Sollis, E., Demmers, J., Poot, R. A., and Fisher, S. E. (January, 2018) Proteomic analysis of FOXP proteins reveals interactions between cortical transcription factors associated with neurodevelopmental disorders. *Human molecular genetics*,.
- [41] Li, S., Weidenfeld, J., and Morrissey, E. E. (January, 2004) Transcriptional and DNA binding activity of the Foxp1/2/4 family is modulated by heterotypic and homotypic protein interactions. *Molecular and cellular biology*, **24**(2), 809–822.
- [42] Lu, M. M., Li, S., Yang, H., and Morrissey, E. E. (December, 2002) Foxp4: a novel member of the Foxp subfamily of winged-helix genes co-expressed with Foxp1 and Foxp2 in pulmonary and gut tissues. *Gene expression patterns : GEP*, **2**(3-4), 223–228.
- [43] Ferland, R. J., Cherry, T. J., Preware, P. O., Morrissey, E. E., and Walsh, C. A. (May, 2003) Characterization of Foxp2 and Foxp1 mRNA and protein in the developing and mature brain. *The Journal of comparative neurology*, **460**(2), 266–279.

- [44] Fontenot, J. D., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y. (April, 2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology*, **4**(4), 330–336.
- [45] Butland, S. L., Devon, R. S., Huang, Y., Mead, C.-L., Meynert, A. M., Neal, S. J., Lee, S. S., Wilkinson, A., Yang, G. S., Yuen, M. M. S., Hayden, M. R., Holt, R. A., Leavitt, B. R., and Ouellette, B. F. F. (2007) CAG-encoded polyglutamine length polymorphism in the human genome. *BMC genomics*, **8**, 126.
- [46] Atanesyan, L., Günther, V., Dichtl, B., Georgiev, O., and Schaffner, W. (January, 2012) Polyglutamine tracts as modulators of transcriptional activation from yeast to mammals. *Biological chemistry*, **393**(1-2), 63–70.
- [47] Elrod-Erickson, M., Benson, T. E., and Pabo, C. O. (April, 1998) High-resolution structures of variant Zif268–DNA complexes: implications for understanding zinc finger–DNA recognition. *Structure (London, England : 1993)*, **6**(4), 451–464.
- [48] Glover, J. N. and Harrison, S. C. (January, 1995) Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature*, **373**(6511), 257–261.
- [49] Stroud, J. C., Wu, Y., Bates, D. L., Han, A., Nowick, K., Paabo, S., Tong, H., and Chen, L. (January, 2006) Structure of the Forkhead Domain of FOXP2 Bound to DNA. *Structure*, **14**(1), 159–166 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969212605004338?via%3Dihub>.
- [50] Montminy, M. R., Gonzalez, G. A., and Yamamoto, K. K. (May, 1990) Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. *Trends in neurosciences*, **13**(5), 184–188.
- [51] Pugh, B. F. (2000) Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein. *Gene*, **255**(1), 1–14.
- [52] Riley, B. E. and Orr, H. T. (August, 2006) Polyglutamine neurodegenerative diseases and regulation of transcription: assembling the puzzle. *Genes & development*, **20**(16), 2183–2192.
- [53] Labbadia, J. and Morimoto, R. I. (August, 2013) Huntington’s disease: underlying molecular mechanisms and emerging concepts. *Trends in biochemical sciences*, **38**(8), 378–385.
- [54] Schaefer, M. H., Wanker, E. E., and Andrade-Navarro, M. A. (May, 2012) Evolution and function of CAG/polyglutamine repeats in protein-protein interaction networks. *Nucleic acids research*, **40**(10), 4273–4287.
- [55] Hachigian, L. J., Carmona, V., Fenster, R. J., Kulicke, R., Heilbut, A., Sittler, A., Pereira de Almeida, L., Mesirov, J. P., Gao, F., Kolaczyk, E. D., and Heiman, M. (December, 2017) Control of Huntington’s Disease-Associated Phenotypes by the Striatum-Enriched Transcription Factor Foxp2. *Cell reports*, **21**(10), 2688–2695.
- [56] Yu, Y. B. (October, 2002) Coiled-coils: stability, specificity, and drug delivery potential. *Advanced drug delivery reviews*, **54**(8), 1113–1129.

- [57] Fiumara, F., Fioriti, L., Kandel, E. R., and Hendrickson, W. A. (December, 2010) Essential role of coiled coils for aggregation and activity of Q/N-rich prions and PolyQ proteins. *Cell*, **143**(7), 1121–1135.
- [58] Mendoza, E. and Scharff, C. (2017) Protein-Protein Interaction Among the FoxP Family Members and their Regulation of Two Target Genes, VLDLR and CNTNAP2 in the Zebra Finch Song System. *Frontiers in molecular neuroscience*, **10**, 112.
- [59] Hanas, J. S., Hazuda, D. J., Bogenhagen, D. F., Wu, F. Y., and Wu, C. W. (December, 1983) Xenopus transcription factor A requires zinc for binding to the 5 S RNA gene. *The Journal of biological chemistry*, **258**(23), 14120–14125.
- [60] McCarty, A. S., Kleiger, G., Eisenberg, D., and Smale, S. T. (February, 2003) Selective dimerization of a C2H2 zinc finger subfamily. *Molecular cell*, **11**(2), 459–470.
- [61] Klug, A. (2010) The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annual review of biochemistry*, **79**, 213–231.
- [62] Wolfe, S. A., Nekludova, L., and Pabo, C. O. (2000) DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, **29**(1), 183–212.
- [63] McCarty, A. S., Kleiger, G., Eisenberg, D., and Smale, S. T. (2003) Selective Dimerization of a C2H2 Zinc Finger Subfamily. *Molecular cell*, **11**(2), 459–470.
- [64] NYBORG, J. K. and PEERSEN, O. B. (August, 2004) That zincing feeling: the effects of EDTA on the behaviour of zinc-binding transcriptional regulators. *The Biochemical journal*, **381**(Pt 3), e3–4.
- [65] Persikov, A. V., Wetzell, J. L., Rowland, E. F., Oakes, B. L., Xu, D. J., Singh, M., and Noyes, M. B. (February, 2015) A systematic survey of the Cys2His2 zinc finger DNA-binding landscape. *Nucleic Acids Research*, **43**(3), 1965–1984.
- [66] Kang, J. S. and Kim, J. S. (March, 2000) Zinc finger proteins as designer transcription factors. *The Journal of biological chemistry*, **275**(12), 8742–8748.
- [67] Pabo, C. O., Peisach, E., and Grant, R. A. (2001) Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins. *Annual review of biochemistry*, **70**(1), 313–340.
- [68] Yaghamai, R. and Cutting, G. R. (June, 2002) Optimized regulation of gene expression using artificial transcription factors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, **5**(6), 685–694.
- [69] Sera, T. and Uranga, C. (June, 2002) Rational Design of Artificial Zinc-Finger Proteins Using a Nondegenerate Recognition Code Table. *Biochemistry*, **41**(22), 7074–7081.
- [70] Dhanasekaran, M., Negi, S., and Sugiura, Y. (January, 2006) Designer Zinc Finger Proteins: Tools for Creating Artificial DNA-Binding Functional Proteins. *Accounts of Chemical Research*, **39**(1), 45–52.

- [71] Papworth, M., Kolasinska, P., and Minczuk, M. (January, 2006) Designer zinc-finger proteins and their applications. *Gene*, **366**(1), 27–38.
- [72] Jantz, D. and Berg, J. M. (March, 2010) Probing the DNA-binding affinity and specificity of designed zinc finger proteins. *Biophysical journal*, **98**(5), 852–860.
- [73] Lam, K. N., van Bakel, H., Cote, A. G., van der Ven, A., and Hughes, T. R. (June, 2011) Sequence specificity is obtained from the majority of modular C2H2 zinc-finger arrays. *Nucleic acids research*, **39**(11), 4680–4690.
- [74] Pavletich, N. P. and Pabo, C. O. (May, 1991) Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science (New York, N.Y.)*, **252**(5007), 809–817.
- [75] Nunez, N., Clifton, M. M. K., Funnell, A. P. W., Artuz, C., Hallal, S., Quinlan, K. G. R., Font, J., Vandevenne, M., Setiyaputra, S., Pearson, R. C. M., Mackay, J. P., and Crossley, M. (November, 2011) The multi-zinc finger protein ZNF217 contacts DNA through a two-finger domain. *The Journal of biological chemistry*, **286**(44), 38190–38201.
- [76] Chou, C.-C., Wei, S.-Y., Lou, Y.-C., and Chen, C. (2017) In-depth study of DNA binding of Cys2His2 finger domains in testis zinc-finger proteins. *PloS one*, **12**(4), e0175051.
- [77] Dhanasekaran, M., Negi, S., and Sugiura, Y. (May, 2006) Designer Zinc Finger Proteins: Tools for Creating Artificial DNA-Binding Functional Proteins. *ChemInform*, **37**(19), 45.
- [78] Mandell, J. G. and Barbas, C. F. (July, 2006) Zinc Finger Tools: custom DNA-binding domains for transcription factors and nucleases. *Nucleic acids research*, **34**(Web Server issue), W516–23.
- [79] Roy, S., Dutta, S., Khanna, K., Singla, S., and Sundar, D. (June, 2012) Prediction of DNA-binding specificity in zinc finger proteins. *Journal of Biosciences*, **37**(3), 483–491.
- [80] Pauling, L., Corey, R. B., and Branson, H. R. (1951) The structure of proteins: Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **37**(4), 205–211.
- [81] Tropsha, A., Bowen, J. P., Brown, F. K., and Kizer, J. S. (1991) Do interhelical side chain-backbone hydrogen bonds participate in formation of leucine zipper coiled coils?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **88**(21), 9488–9492.
- [82] Krylov, D. and Vinson, C. R. *Leucine Zipper*. John Wiley & Sons, Ltd Chichester, UK (2001).
- [83] O’Neil, K., Hoess, R., and DeGrado, W. (1990) Design of DNA-binding peptides based on the leucine zipper motif. *Science (New York, N.Y.)*, **249**(4970), 774–778.
- [84] Patel, L., Abate, C., and Curran, T. (1990) Altered protein conformation on DNA binding by Fos and Jun. *Nature*, **347**(6293), 572–575.

- [85] Talanian, R. V., McKnight, C. J., and Kim, P. S. (1990) Sequence-Specific Dna-Binding by a Short Peptide Dimer. *Science (New York, N.Y.)*, **249**(4970), 769–771.
- [86] Weiss, M. A. (1990) Thermal Unfolding Studies of a Leucine Zipper Domain and Its Specific Dna Complex - Implications for Scissors Grip Recognition. *Biochemistry*, **29**(35), 8020–8024.
- [87] Weiss, M. A., Ellenberger, T., Wobbe, C. R., Lee, J. P., Harrison, S. C., and Struhl, K. (1990) Folding Transition in the Dna-Binding Domain of Gcn4 on Specific Binding to Dna. *Nature*, **347**(6293), 575–578.
- [88] Krylov, D., Olive, M., and VINSON, C. (1995) Extending Dimerization Interfaces - the Bzip Basic Region Can Form a Coiled-Coil. *The EMBO journal*, **14**(21), 5329–5337.
- [89] Talanian, R. V., McKnight, C. J., Rutkowski, R., and Kim, P. S. (May, 2002) Minimum length of a sequence-specific DNA binding peptide. *Biochemistry*, **31**(30), 6871–6875.
- [90] Hollenbeck, J. J., McClain, D. L., and Oakley, M. G. (November, 2002) The role of helix stabilizing residues in GCN4 basic region folding and DNA binding. *Protein science : a publication of the Protein Society*, **11**(11), 2740–2747.
- [91] Landschulz, W. H., Johnson, P. F., and McKnight, S. L. (June, 1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science (New York, N.Y.)*, **240**(4860), 1759–1764.
- [92] O’Shea, E. K., Rutkowski, R., STAFFORD, W. F., and Kim, P. S. (1989) Preferential Heterodimer Formation by Isolated Leucine Zippers From Fos and Jun. *Science (New York, N.Y.)*, **245**(4918), 646–648.
- [93] Busch, S. J. and SASSONECORSI, P. (February, 1990) Dimers, Leucine Zippers and Dna-Binding Domains. *Trends in genetics : TIG*, **6**(2), 36–40.
- [94] Ellenberger, T. E., Brandl, C. J., Struhl, K., and Harrison, S. C. (December, 1992) The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell*, **71**(7), 1223–1237.
- [95] König, P. and Richmond, T. J. (September, 1993) The X-ray structure of the GCN4-bZIP bound to ATF/CREB site DNA shows the complex depends on DNA flexibility. *Journal of molecular biology*, **233**(1), 139–154.
- [96] Park, C., Campbell, J. L., and Goddard, W. A. (1996) Can the monomer of the leucine zipper proteins recognize the dimer binding site without dimerization?. *Journal of the American Chemical Society*, **118**(18), 4235–4239.
- [97] Cranz, S., Berger, C., Baici, A., Jelesarov, I., and Bosshard, H. R. (January, 2004) Monomeric and dimeric bZIP transcription factor GCN4 bind at the same rate to their target DNA site. *Biochemistry*, **43**(3), 718–727.



- [98] Patel, L. R., Curran, T., and Kerppola, T. K. (1994) Energy-Transfer Analysis of Fos-Jun Dimerization and Dna-Binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**(15), 7360–7364.
- [99] Moll, J. R., Ruvinov, S. B., Pastan, I., and VINSON, C. (March, 2001) Designed heterodimerizing leucine zippers with a range of pIs and stabilities up to 10<sup>(-15)</sup> M. *Protein science : a publication of the Protein Society*, **10**(3), 649–655.
- [100] Zhao, H., Zhou, W., Yao, Z., Wan, Y., Cao, J., Zhang, L., Zhao, J., Li, H., Zhou, R., Li, B., Wei, G., Zhang, Z., French, C. A., Dekker, J. D., Yang, Y., Fisher, S. E., Tucker, H. O., and Guo, X. (December, 2014) Foxp1/2/4 regulate endochondral ossification as a suppresser complex. *Developmental biology*, **398**(2), 242–254.
- [101] Sin, C., Li, H., and Crawford, D. A. (February, 2015) Transcriptional regulation by FOXP1, FOXP2, and FOXP4 dimerization. *Journal of molecular neuroscience : MN*, **55**(2), 437–448.
- [102] Li, B., Samanta, A., Song, X., Iacono, K. T., Brennan, P., Chatila, T. A., Roncador, G., Banham, A. H., Riley, J. L., Wang, Q., Shen, Y., Saouaf, S. J., and Greene, M. I. (July, 2007) FOXP3 is a homo-oligomer and a component of a supramolecular regulatory complex disabled in the human XLAAD/IPEX autoimmune disease. *International immunology*, **19**(7), 825–835.
- [103] Song, X., Li, B., Xiao, Y., Chen, C., Wang, Q., Liu, Y., Berezov, A., Xu, C., Gao, Y., Li, Z., Wu, S.-L., Cai, Z., Zhang, H., Karger, B. L., Hancock, W. W., Wells, A. D., Zhou, Z., and Greene, M. I. (June, 2012) Structural and biological features of FOXP3 dimerization relevant to regulatory T cell function. *Cell reports*, **1**(6), 665–675.
- [104] Weigel, D. and Jäckle, H. (1990) The Fork Head Domain - a Novel Dna-Binding Motif of Eukaryotic Transcription Factors. *Cell*, **63**(3), 455–456.
- [105] Nakagawa, S., Gisselbrecht, S. S., Rogers, J. M., Hartl, D. L., and Bulyk, M. L. (2013) DNA-binding specificity changes in the evolution of forkhead transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**(30), 12349–12354.
- [106] Bandukwala, H. S., Wu, Y., Feuerer, M., Chen, Y., Barboza, B., Ghosh, S., Stroud, J. C., Benoist, C., Mathis, D., Rao, A., and Chen, L. (April, 2011) Structure of a domain-swapped FOXP3 dimer on DNA and its function in regulatory T cells. *Immunity*, **34**(4), 479–491.
- [107] Chu, Y.-P., Chang, C.-H., Shiu, J.-H., Chang, Y.-T., Chen, C.-Y., and Chuang, W.-J. (April, 2011) Solution structure and backbone dynamics of the DNA-binding domain of FOXP1: insight into its domain swapping and DNA binding. *Protein science : a publication of the Protein Society*, **20**(5), 908–924.
- [108] Medina, E., Córdova, C., Villalobos, P., Reyes, J., Komives, E. A., Ramírez-Sarmiento, C. A., and Babul, J. (June, 2016) Three-Dimensional Domain Swapping Changes the Folding Mechanism of the Forkhead Domain of FoxP1. *Biophysical journal*, **110**(11), 2349–2360.

- [109] Morris, G. and Fanucchi, S. (April, 2016) A Key Evolutionary Mutation Enhances DNA Binding of the FOXP2 Forkhead Domain. *Biochemistry*, **55**(13), 1959–1967.
- [110] Schleif, R. (1992) DNA looping. *Annual review of biochemistry*, **61**(1), 199–223.
- [111] Ostrow, A. Z., Kalhor, R., Gan, Y., Villwock, S. K., Linke, C., Barberis, M., Chen, L., and Aparicio, O. M. (March, 2017) Conserved forkhead dimerization motif controls DNA replication timing and spatial organization of chromosomes in *S. cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,.
- [112] Li, S. C., Goto, N. K., Williams, K. A., and Deber, C. M. (1996) Alpha-helical, but not beta-sheet, propensity of proline is determined by peptide environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**(13), 6676–6681.
- [113] Nelson, C. S., Fuller, C. K., Fordyce, P. M., Greninger, A. L., Li, H., and Derisi, J. L. (July, 2013) Microfluidic affinity and ChIP-seq analyses converge on a conserved FOXP2-binding motif in chimp and human, which enables the detection of evolutionarily novel targets. *Nucleic acids research*, **41**(12), 5991–6004.
- [114] Banerjee-Basu, S. and Baxevanis, A. D. (March, 2004) Structural analysis of disease-causing mutations in the P-subfamily of forkhead transcription factors. *Proteins*, **54**(4), 639–647.
- [115] Zhou, B., Zhong, Q., Minoo, P., Li, C., Ann, D. K., Frenkel, B., Morrisey, E. E., Crandall, E. D., and Borok, Z. (June, 2008) Foxp2 inhibits Nkx2.1-mediated transcription of SP-C via interactions with the Nkx2.1 homeodomain. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, **38**(6), 750–758.
- [116] Webb, H., Steeb, O., Blane, A., Rotherham, L., Aron, S., Machanick, P., Dirr, H., and Fanucchi, S. (July, 2017) The FOXP2 forkhead domain binds to a variety of DNA sequences with different rates and affinities. *Journal of Biochemistry*, **162**(1), 45–54.
- [117] Maerkl, S. J. and Quake, S. R. (2007) A systems approach to measuring the binding energy landscapes of transcription factors. *Science (New York, N.Y.)*, **315**(5809), 233–237.
- [118] Fordyce, P. M., Gerber, D., Tran, D., Zheng, J., Li, H., Derisi, J. L., and Quake, S. R. (September, 2010) De novo identification and biophysical characterization of transcription-factor binding sites with microfluidic affinity analysis. *Nature biotechnology*, **28**(9), 970–976.
- [119] Prouty, W. F. and Goldberg, A. L. (November, 1972) Fate of abnormal proteins in *E. coli* accumulation in intracellular granules before catabolism. *Nature: New biology*, **240**(100), 147–150.
- [120] Structural Genomics Consortium, China Structural Genomics Consortium, Northeast Structural Genomics Consortium, Gräslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B. M., Bray, J., Gileadi, O., Knapp, S., Oppermann, U., Arrowsmith, C., Hui, R., Ming, J., dhe Paganon, S., Park, H.-w., Savchenko, A., Yee, A., Edwards, A., Vincentelli, R., Cambillau, C., Kim, R., Kim, S.-H., Rao, Z., Shi, Y., Terwilliger,

- T. C., Kim, C.-Y., Hung, L.-W., Waldo, G. S., Peleg, Y., Albeck, S., Unger, T., Dym, O., Prilusky, J., Sussman, J. L., Stevens, R. C., Lesley, S. A., Wilson, I. A., Joachimiak, A., Collart, F., Dementieva, I., Donnelly, M. I., Eschenfeldt, W. H., Kim, Y., Stols, L., Wu, R., Zhou, M., Burley, S. K., Emtage, J. S., Sauder, J. M., Thompson, D., Bain, K., Luz, J., Gheyi, T., Zhang, F., Atwell, S., Almo, S. C., Bonanno, J. B., Fiser, A., Swaminathan, S., Studier, F. W., Chance, M. R., Sali, A., Acton, T. B., Xiao, R., Zhao, L., Ma, L. C., Hunt, J. F., Tong, L., Cunningham, K., Inouye, M., Anderson, S., Janjua, H., Shastry, R., Ho, C. K., Wang, D., Wang, H., Jiang, M., Montelione, G. T., Stuart, D. I., Owens, R. J., Daenke, S., Schütz, A., Heinemann, U., Yokoyama, S., Büssov, K., and Gunsalus, K. C. (February, 2008) Protein production and purification. *Nature methods*, **5**(2), 135–146.
- [121] Oganessian, N., Ankoudinova, I., Kim, S.-H., and Kim, R. (April, 2007) Effect of osmotic stress and heat shock in recombinant protein overexpression and crystallization. *Protein expression and purification*, **52**(2), 280–285.
- [122] QIAGEN The QIAexpressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins 5th edition (June, 2003).
- [123] Bolanos-Garcia, V. M. and Davies, O. R. (December, 2005) Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1760**(9), 1304–1313.
- [124] Korndörfer, I. P. and Skerra, A. (April, 2002) Improved affinity of engineered streptavidin for the Strep-tag II peptide is due to a fixed open conformation of the lid-like loop at the binding site. *Protein science : a publication of the Protein Society*, **11**(4), 883–893.
- [125] Schmidt, T. G. M. and Skerra, A. (2007) The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nature protocols*, **2**(6), 1528–1535.
- [126] Lichty, J. J., Malecki, J. L., Agnew, H. D., Michelson-Horowitz, D. J., and Tan, S. (May, 2005) Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein expression and purification*, **41**(1), 98–105.
- [127] Good, N. E., Winget, G. D., Winter, W., Connolly, T. N., Izawa, S., and Singh, R. M. M. (February, 1966) Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. *Biochemistry*, **5**(2), 467–477.
- [128] Chow, M. K. M., Ellisdon, A. M., Cabrita, L. D., and Bottomley, S. P. (2006) Purification of polyglutamine proteins. *Methods in enzymology*, **413**, 1–19.
- [129] Kočańczyk, T., Drozd, A., and Krężel, A. (September, 2014) Relationship between the architecture of zinc coordination and zinc binding affinity in proteins - insights into zinc regulation. *Metallomics : integrated biometal science*, **7**(2), 244–257.

- [130] De Brabander, H. F., Van Poucke, L. C., and Eeckhaut, Z. (1971) Polynuclear complex formation between zinc (II) and 2-mercaptoethanol and 3-mercapto-1, 2-propanediol. *Inorganica Chimica Acta*, **5**, 473–476.
- [131] Krężel, A., Leśniak, W., Jeżowska-Bojczuk, M., Młynarz, P., Brasuñ, J., Kozłowski, H., and Bal, W. (December, 2000) Coordination of heavy metals by dithiothreitol, a commonly used thiol group protectant. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **84**(1), 77–88.
- [132] Krężel, A., Latajka, R., Bujacz, G. D., and Bal, W. (March, 2003) Coordination properties of tris(2-carboxyethyl)phosphine, a newly introduced thiol reductant, and its oxide. *Inorganic chemistry*, **42**(6), 1994–2003.
- [133] Smucker, R. A. and Pfister, R. M. (September, 1975) Liquid nitrogen cryo-impacting: a new concept for cell disruption. *Applied microbiology*, **30**(3), 445–449.
- [134] Elsner, H. I. and Lindblad, E. B. (December, 1989) Ultrasonic degradation of DNA. *DNA (Mary Ann Liebert, Inc.)*, **8**(10), 697–701.
- [135] Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J., and Schäfer, F. (2009) Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods in enzymology*, **463**, 439–473.
- [136] Bhuyan, A. K. (November, 2002) Protein Stabilization by Urea and Guanidine Hydrochloride. *Biochemistry*, **41**(45), 13386–13394.
- [137] Rial, D. V. and Ceccarelli, E. A. (August, 2002) Removal of DnaK contamination during fusion protein purifications. *Protein expression and purification*, **25**(3), 503–507.
- [138] Fried, M. and Crothers, D. M. (December, 1981) Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic acids research*, **9**(23), 6505–6525.
- [139] Garner, M. M. and Revzin, A. (July, 1981) A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system. *Nucleic acids research*, **9**(13), 3047–3060.
- [140] Lane, D., Prentki, P., and Chandler, M. (December, 1992) Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. *Microbiological Reviews*, **56**(4), 509–528.
- [141] Hellman, L. M. and Fried, M. G. (2007) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nature protocols*, **2**(8), 1849–1861.
- [142] Alves, C. and Cunh, C. (April, 2012) Electrophoretic Mobility Shift Assay: Analyzing Protein - Nucleic Acid Interactions. In *Electrophoretic Mobility Shift Assay: Analyzing Protein-Nucleic Acid Interactions* InTech.
- [143] Demain, A. L. and Vaishnav, P. (May, 2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances*, **27**(3), 297–306.

- [144] Alfasi, S., Sevastyanovich, Y., Zaffaroni, L., Griffiths, L., Hall, R., and Cole, J. (October, 2011) Use of GFP fusions for the isolation of *Escherichia coli* strains for improved production of different target recombinant proteins. *Journal of biotechnology*, **156**(1), 11–21.
- [145] Waldo, G. S., Standish, B. M., Berendzen, J., and Terwilliger, T. C. (July, 1999) Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nature biotechnology*, **17**(7), 691–695.
- [146] Burgess, R. R. (2009) Refolding solubilized inclusion body proteins. *Methods in enzymology*, **463**, 259–282.
- [147] Yamaguchi, H. and Miyazaki, M. (December, 2013) Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules*, **4**(1), 235–251.
- [148] Matsumoto, M., Misawa, S., Tsumoto, K., Kumagai, I., Hayashi, H., and Kobayashi, Y. (September, 2003) On-column refolding and characterization of soluble human interleukin-15 receptor alpha-chain produced in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, **31**(1), 64–71.
- [149] Lemercier, G., Bakalara, N., and Santarelli, X. (March, 2003) On-column refolding of an insoluble histidine tag recombinant exopolyphosphatase from *Trypanosoma brucei* overexpressed in *Escherichia coli*. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, **786**(1-2), 305–309.
- [150] ZHU, X.-Q., LI, S.-X., HE, H.-J., and YUAN, Q.-S. (April, 2005) On-column Refolding of an Insoluble His6-tagged Recombinant EC-SOD Overexpressed in *Escherichia coli*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **37**(4), 265–269.
- [151] Ahmed, N., Zafar, A. U., Khan, M. A., Tahir, S., Khan, M. I., Bashir, H., Khan, F., Sarwar, S., Ilyas, S., and Husnain, T. (September, 2014) Matrix-assisted refolding and purification of placenta-derived recombinant human interleukin-6 produced in *Escherichia coli*. *Biotechnology and applied biochemistry*, **61**(5), 541–548.
- [152] Oganessian, N., Kim, S.-H., and Kim, R. (2005) On-column protein refolding for crystallization. *Journal of structural and functional genomics*, **6**(2-3), 177–182.
- [153] Fried, M. G. and Garner, M. M. (1998) The Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) for Detection and Analysis of Protein-DNA Interactions. In *Nucleic Acid Electrophoresis* Springer Lab Manual chapter 10, pp. 239–271 Tietz D. (eds) Springer, Berlin, Heidelberg.
- [154] Langer, A., Schröml, M., Strasser, R., Daub, H., Myers, T., Heindl, D., and Rant, U. (July, 2015) Polymerase/DNA interactions and enzymatic activity: multi-parameter analysis with electro-switchable biosurfaces. *Scientific reports*, **5**(1), 12066.
- [155] Langer, A., Hampel, P. A., Kaiser, W., Knezevic, J., Welte, T., Villa, V., Maruyama, M., Svejda, M., Jähner, S., Fischer, F., Strasser, R., and Rant, U. (July, 2013) Protein analysis by time-resolved measurements with an electro-switchable DNA chip. *Nature communications*, **4**, 2099–2099.

- [156] Rant, U., Arinaga, K., Fujita, S., Yokoyama, N., Abstreiter, G., and Tornow, M. (December, 2004) Dynamic Electrical Switching of DNA Layers on a Metal Surface. *Nano letters*, **4**(12), 2441–2445.
- [157] Arinaga, K., Rant, U., Knezevic, J., Pringsheim, E., Tornow, M., Fujita, S., Abstreiter, G., and Yokoyama, N. (October, 2007) Controlling the surface density of DNA on gold by electrically induced desorption. *Biosensors & bioelectronics*, **23**(3), 326–331.
- [158] Rant, U., Arinaga, K., Tornow, M., Kim, Y. W., Netz, R. R., Fujita, S., Yokoyama, N., and Abstreiter, G. (May, 2006) Dissimilar kinetic behavior of electrically manipulated single- and double-stranded DNA tethered to a gold surface. *Biophysical journal*, **90**(10), 3666–3671.
- [159] Rant, U., Arinaga, K., Scherer, S., Pringsheim, E., Fujita, S., Yokoyama, N., Tornow, M., and Abstreiter, G. (2007) Switchable DNA interfaces for the highly sensitive detection of label-free DNA targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**(44), 17364–17369.
- [160] Kaiser, W. and Rant, U. (June, 2010) Conformations of end-tethered DNA molecules on gold surfaces: influences of applied electric potential, electrolyte screening, and temperature. *Journal of the American Chemical Society*, **132**(23), 7935–7945.
- [161] Strasser, R., Scholl, D., Hampel, P., Langer, A., and Rant, U. (November, 2012) Messung molekularer Interaktion mit dynamischen Oberflächensensoren. *BIOspektrum*, **18**(7), 724–726.
- [162] Langer, A., Kaiser, W., Svejda, M., Schwertler, P., and Rant, U. (January, 2014) Molecular dynamics of DNA-protein conjugates on electrified surfaces: solutions to the drift-diffusion equation. *The journal of physical chemistry. B*, **118**(2), 597–607.
- [163] Cléry, A., Sohier, T. J. M., Welte, T., Langer, A., and Allain, F. H. T. (April, 2017) switchSENSE: A new technology to study protein-RNA interactions. *Methods (San Diego, Calif.)*, **118-119**, 137–145.
- [164] Krepl, M., Blatter, M., Cléry, A., Damberger, F. F., Allain, F. H. T., and Sponer, J. (July, 2017) Structural study of the Fox-1 RRM protein hydration reveals a role for key water molecules in RRM-RNA recognition. *Nucleic Acids Research*, **45**(13), 8046–8063.
- [165] Rueda, F. O., Bista, M., Newton, M. D., Goeppert, A. U., Cuomo, M. E., Gordon, E., Kröner, F., Read, J. A., Wrigley, J. D., Rueda, D., and Taylor, B. J. M. (November, 2017) Mapping the sugar dependency for rational generation of a DNA-RNA hybrid-guided Cas9 endonuclease. *Nature communications*, **8**(1), 1610.
- [166] Striedner, Y., Schwarz, T., Welte, T., Futschik, A., Rant, U., and Tiemann-Boege, I. (June, 2017) The long zinc finger domain of PRDM9 forms a highly stable and long-lived complex with its DNA recognition sequence. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*, **25**(2), 155–172.

- [167] Strasser, R., Technology Note: Chip functionalization, DNA-encoded addressing and chip configuration. Technical report, Dynamic Biosensors GmbH (November, 2016).
- [168] Knezevic, J., Langer, A., Hampel, P. A., Kaiser, W., Strasser, R., and Rant, U. (September, 2012) Quantitation of Affinity, Avidity, and Binding Kinetics of Protein Analytes with a Dynamically Switchable Biosurface. *Journal of the American Chemical Society*, **134**(37), 15225–15228.
- [169] Franz-Oberdorf, K., Langer, A., Strasser, R., Isono, E., Ranftl, Q. L., Wunschel, C., and Schwab, W. (October, 2017) Physical interaction between the strawberry allergen Fra a 1 and an associated partner FaAP: Interaction of Fra a 1 proteins and FaAP. *Proteins*, **85**(10), 1891–1901.
- [170] Blocquel, D., Li, S., Wei, N., Daub, H., Sajish, M., Erfurth, M.-L., Kooi, G., Zhou, J., Bai, G., Schimmel, P., Jordanova, A., and Yang, X.-L. (July, 2017) Alternative stable conformation capable of protein misinteraction links tRNA synthetase to peripheral neuropathy. *Nucleic Acids Research*, **45**(13), 8091–8104.
- [171] Lakowicz, J. R. (2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy, Springer US, Boston (MA) 3rd edition.
- [172] Marmé, N., Knemeyer, J.-P., Sauer, M., and Wolfrum, J. (November, 2003) Inter- and intramolecular fluorescence quenching of organic dyes by tryptophan. *Bioconjugate chemistry*, **14**(6), 1133–1139.
- [173] Vaiana, A. C., Neuweiler, H., Schulz, A., Wolfrum, J., Sauer, M., and Smith, J. C. (November, 2003) Fluorescence quenching of dyes by tryptophan: interactions at atomic detail from combination of experiment and computer simulation. *Journal of the American Chemical Society*, **125**(47), 14564–14572.
- [174] Doose, S., Neuweiler, H., and Sauer, M. (November, 2005) A close look at fluorescence quenching of organic dyes by tryptophan. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*, **6**(11), 2277–2285.
- [175] Rant, U., Technology Note: Binding Theory Equations for Affinity and Kinetics Analysis. Technical report, Dynamic Biosensors GmbH (December, 2016).
- [176] Langmuir, I. (September, 1918) The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *Journal of the American Chemical Society*, **40**(9), 1361–1403.
- [177] Welte, T. and Rant, U. The switchSENSE<sup>®</sup> MP3 multi-purpose chip with 3 nano-lever densities. Ligand density control made easy. [https://www.dynamic-biosensors.com/project/mp3\\_chip/](https://www.dynamic-biosensors.com/project/mp3_chip/) (January, 2014).
- [178] Wörner, K., Rant, U., and Kaiser, W., Application Note: Repeatability of binding kinetics measurements and regeneration performance of a switchSENSE<sup>®</sup> sensor. Technical report, Dynamic Biosensors GmbH (November, 2016).
- [179] Gervais, T. and Jensen, K. F. (February, 2006) Mass transport and surface reactions in microfluidic systems. *Chemical Engineering Science*, **61**(4), 1102–1121.

- [180] Stone, H. A. and Kim, S. (2001) Microfluidics: Basic issues, applications, and challenges. *AIChE Journal*, **47**(6), 1250–1254.
- [181] Stone, H. A., Stroock, A. D., and Ajdari, A. (January, 2004) Engineering Flows in Small Devices: Microfluidics Toward a Lab-on-a-Chip. *doi.org*, **36**(1), 381–411.
- [182] Walter, S., Malmberg, S., Schmidt, B., and Liauw, M. A. (December, 2005) Mass transfer limitations in microchannel reactors. *Catalysis Today*, **110**(1-2), 15–25.
- [183] Schuck, P. and Zhao, H. (2010) The role of mass transport limitation and surface heterogeneity in the biophysical characterization of macromolecular binding processes by SPR biosensing. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **627**, 15–54.
- [184] Perumal, K., Dirr, H. W., and Fanucchi, S. (April, 2015) A Single Amino Acid in the Hinge Loop Region of the FOXP Forkhead Domain is Significant for Dimerisation. *The protein journal*, **34**(2), 111–121.
- [185] Sin, C., Li, H., and Crawford, D. A. (July, 2014) Transcriptional Regulation by FOXP1, FOXP2, and FOXP4 Dimerization. *Journal of molecular neuroscience : MN*, **55**(2), 437–448.
- [186] MacDermot, K. D., Bonora, E., Sykes, N., Coupe, A.-M., Lai, C. S. L., Vernes, S. C., Vargha-Khadem, F., McKenzie, F., Smith, R. L., Monaco, A. P., and Fisher, S. E. (June, 2005) Identification of FOXP2 truncation as a novel cause of developmental speech and language deficits. *American journal of human genetics*, **76**(6), 1074–1080.
- [187] Krause, J., Lalueza-Fox, C., Orlando, L., Enard, W., Green, R. E., Burbano, H. A., Hublin, J.-J., Hänni, C., Fortea, J., de la Rasilla, M., Bertranpetit, J., Rosas, A., and PAAbo, S. (November, 2007) The derived FOXP2 variant of modern humans was shared with Neandertals. *Current biology : CB*, **17**(21), 1908–1912.
- [188] Schreiweis, C., Bornschein, U., Burguière, E., Kerimoglu, C., Schreiter, S., Danneemann, M., Goyal, S., Rea, E., French, C. A., Puliyadi, R., Groszer, M., Fisher, S. E., Mundry, R., Winter, C., Hevers, W., PAAbo, S., Enard, W., and Graybiel, A. M. (September, 2014) Humanized Foxp2 accelerates learning by enhancing transitions from declarative to procedural performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**(39), 14253–14258.
- [189] Luo, Z., Matthews, A. M., and Weiss, S. R. (October, 1999) Amino acid substitutions within the leucine zipper domain of the murine coronavirus spike protein cause defects in oligomerization and the ability to induce cell-to-cell fusion. *Journal of virology*, **73**(10), 8152–8159.
- [190] Wang, B., Lin, D., Li, C., and Tucker, P. (July, 2003) Multiple domains define the expression and regulatory properties of Foxp1 forkhead transcriptional repressors. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(27), 24259–24268.
- [191] Glatter, O. and Kratky, O. (1982) Small Angle X-ray Scattering, Academic Press, .



- [192] Mertens, H. D. T. and Svergun, D. I. (October, 2010) Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. *Journal of structural biology*, **172**(1), 128–141.
- [193] Skou, S., Gillilan, R. E., and Ando, N. (July, 2014) Synchrotron-based small-angle X-ray scattering of proteins in solution. *Nature protocols*, **9**(7), 1727–1739.
- [194] Young, G., Hundt, N., Cole, D., Fineberg, A., Andrecka, J., Tyler, A., Olerinyova, A., Ansari, A., Marklund, E. G., Collier, M. P., Chandler, S. A., Tkachenko, O., Allen, J., Crispin, M., Billington, N., Takagi, Y., Sellers, J. R., Eichmann, C., Selenko, P., Frey, L., Riek, R., Galpin, M. R., Struwe, W. B., Benesch, J. L. P., and Kukura, P. (2017) Quantitative mass imaging of single molecules in solution. *bioRxiv*.
- [195] Chinnadurai, G. (February, 2009) The transcriptional corepressor CtBP: a foe of multiple tumor suppressors. *Cancer research*, **69**(3), 731–734.
- [196] Deriziotis, P., O’Roak, B. J., Graham, S. A., Estruch, S. B., Dimitropoulou, D., Bernier, R. A., Gerds, J., Shendure, J., Eichler, E. E., and Fisher, S. E. (December, 2013) De novo TBR1 mutations in sporadic autism disrupt protein functions. *Nature communications*, **5**, 4954–4954.
- [197] Quan, J. and Tian, J. (2009) Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways.. *PloS one*, **4**(7), e6441.
- [198] Patterson, G. H., Knobel, S. M., Sharif, W. D., Kain, S. R., and Piston, D. W. (November, 1997) Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophysical journal*, **73**(5), 2782–2790.
- [199] Fukuda, H., Arai, M., and Kuwajima, K. (October, 2000) Folding of Green Fluorescent Protein and the Cycle3 Mutant †. *Biochemistry*, **39**(39), 12025–12032.



# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Hendrik Dietz für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit im Labor für Biomolekulares Design *formerly known as* Labor für Biomolekulare Nanotechnologie anzufertigen.

Lieber Hendrik, vielen Dank für das sehr interessante Forschungsprojekt und die (aus unserer Sicht) unerschöpflichen Mittel. Sie machen das Dietzlab zu einem riesigen Spielplatz für Forscher, der es ermöglicht kreativ und frei zu arbeiten.

*Jetzt versteh ich auch den Begriff Doktorvater.*

Besonderer Dank gilt dem FOXP2-Team bei Dynamic Biosensors, Dr. Wolfgang Kaiser und Hanna Müller-Landau. Dank der hervorragenden Zusammenarbeit mit euch konnte die Arbeit in dieser Form erst verwirklicht werden. Lieber Wolfi, vielen Dank für die immer ausführlichen und interessanten Informationen zur switchSENSE®-Technologie, die es erst ermöglicht haben, die Daten entsprechend zu deuten, zu verstehen und auch zu hinterfragen. Vielen Dank Hanna, dass du immer Zeit hattest mich in die Tiefen der switchSENSE®-Software einzuweisen.

Immenser Dank gilt auch Christian Wachauf, der in das Projekt eingestiegen ist, als die Not am Mann (oder besser Physiker) am größten war. Für die langen und hilfreichen Gespräche danke ich dir sehr, oder um es mit Hendriks Worten zu sagen:

*Der Christian ist ne Perle.*

Herzlicher Dank gilt den Korrekturlesern dieser Arbeit: Nina, Evi, Flo, und Jonas. Vielen Dank, dass ihr die Welt der DNA-Nanostrukturen kurz verlassen habt, um in die Welt des Sprachproteins einzutauchen.

Dem gesamten Dietzlab sei gedankt für die tolle Arbeitsatmosphäre, große Hilfsbereitschaft und Kaffeepausen mit wissenschaftlichen Diskussionen und weniger wissenschaftlichen Gesprächen. Vielen Dank für all die Labhikes, Pubcrawls, Weihnachtsfeiern, Paperparties, Winterschulen und natürlich für die körperlichen Ertüchtigungen zum Ausgleich für die Laborarbeit.

*Team Tough Mudder # Performance*

Außerdem möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung bei meinen Bachelorstudenten, HiWis und Praktikanten bedanken. Vielen Dank Michael, Maxi, Johanna, Massimo, Ali und Sebastian.

*Who the fuck is Sebastian Grün?*

Vielen Dank auch an Erika, Sonja, Susanne und Petra für die Hilfe bei organisatorischen Angelegenheiten.

Auch der AG Simmel gebührt Dank für gute Nachbarschaft und Zusammenarbeit. Vielen Dank vor allem Helene, Andrea und Matthäus für die Unterstützung im Bakterienlabor.

Dank gilt auch der International Graduate School *Material Science for Complex Interfaces* (CompInt) für die Förderung und den Computer, an dem diese Dissertation entstanden ist.

Ich danke meinen Freunden für die Freizeitgestaltung, in der ich Kraft für weitere Tage, Stunden, Monate und Jahre im Labor sammeln konnte.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern Hans Martin und Loni bedanken. Während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit habt ihr mich voll und ganz unterstützt und mir diesen Werdegang erst ermöglicht.

Dank gebührt auch meinem (großen) kleinen Bruder Johannes für jegliche Unterstützung und das Korrekturlesen. Es freut mich, dass du jetzt auch verstanden hast, was ich die letzten Jahre so gemacht habe.

Mein allergrößter Dank gebührt meiner Schwester Claudia. *Thank you for everything.*