
**Qualitätskontrolle von Membranproteinen im
endoplasmatischen Retikulum und
endoplasmatischen Retikulum-Golgi-
Intermediärkompartiment**

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) im Fach Pharmazie

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Morad Oueslati
aus Bielefeld

Berlin, 2005

Diese Arbeit wurde von April 2002 bis März 2005 am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie in Berlin unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. Ralf Schülein und Prof. Dr. Walter Rosenthal angefertigt.

Dissertation eingereicht am: 28.04.2005

Tag der Disputation: 23.06.2005

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig

2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Ralf Schülein

Freie Universität Berlin, 2005

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben und alle Hilfsmittel und Inhalte aus anderen Quellen als solche kenntlich gemacht zu haben. Des weiteren versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war.

Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den 25. April 2005

Morad Oueslati

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungen	6
1 Einleitung	9
1.1 Die Bedeutung des „ERGIC“ für die zelluläre Qualitätskontrolle	10
1.2 Der frühe sekretorische Transportweg und seine Bedeutung bei Erbkrankheiten.....	12
1.3 Die Eigenschaften molekularer Chaperone	13
1.4 Der Vasopressin-V2-Rezeptor (V2R)	15
1.4.1 Physiologische Bedeutung des V2R.....	16
1.4.2 Häufigkeit und Klinik des nephrogenen Diabetes insipidus (NDI)	18
1.5 Pharmakologische Strategien für die Wiederherstellung des Transports fehlgefalteter Membranproteine	18
1.6 Zellpenetrierende Peptide	20
1.6.1 Herkunft und Klassierung	20
1.6.2 Physikochemische Eigenschaften.....	21
1.6.3 Interaktion mit Zellen.....	22
1.7 Zielsetzung.....	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Material 25	
2.1.1 Zelllinien	25
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien	25
2.1.3 Geräte	27
2.1.3.1 Geräte in der Zellkultur	27
2.1.3.2 Geräte für Elektrophoresen und Transfertechniken.....	27
2.1.4 Desoxyribonukleinsäuren.....	28
2.2 Methoden	29
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	29
2.2.1.1 Spezifische DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen und Plasmidkonstruktion	29
2.2.1.2 Horizontale Agarosegelelektrophorese.....	29
2.2.1.3 Ligation von DNA-Fragmenten.....	30
2.2.2 Säugerzellkultur.....	30
2.2.2.1 Transiente Transfektion von HEK 293-Zellen	31
2.2.2.2 Stabile Transfektion von HEK 293-Zellen	31
2.2.3 Zellbiologische Methoden.....	32
2.2.3.1 Präparation von nativen Membranen aus Säugerzellen.....	32
2.2.4 Mikroskopische Methoden	33
2.2.4.1 Trypanblaufärbung	33
2.2.4.2 Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten	33
2.2.5 Organisch-chemische Methoden	34
2.2.5.1 Peptidsynthese und Carboxyfluoreszin-Markierung	34

2.2.5.2	Peptidbehandlung der Zellen.....	34
2.2.5.3	Behandlung der Zellen mit BafilomyzinA1	34
2.2.6	Proteinchemische Methoden	35
2.2.6.1	Bestimmung des Gesamtproteingehalts präparierter Zellen.....	35
2.2.6.2	Limitierte Proteolyse von Rezeptoren mit Trypsin	35
2.2.6.3	Biotinylierungsexperiment zum Nachweis der Anwesenheit von Rezeptoren an der Zelloberfläche.....	35
2.2.6.4	Proteintrennung durch Gelelektrophorese	36
2.2.6.5	Transfer und Immobilisierung elektrophoretisch getrennter Proteine auf Membranen	37
2.2.7	Immunologische Methoden.....	37
2.2.7.1	Immunfluoreszenz	37
2.2.7.2	Western-Blot.....	38
2.2.7.3	Immun- und Koimmunpräzipitationsuntersuchungen	38
2.2.8	Pharmakologische Methoden	39
2.2.8.1	Spezifische Bindung des radioaktiv markierten Agonisten [³ H]AVP an die Zelloberfläche	39
2.2.9	Statistische Auswertungen	40
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Analyse der intrazellulären Lokalisation und der Faltungszustände transportdefekter V2R-Mutanten.....	43
3.1.1	Mikroskopische Untersuchungen.....	43
3.1.1.1	Die Y205C-Mutante des V2R erreicht das ERGIC.....	45
3.1.1.2	Fehlender Einfluß unterschiedlicher Expressionsniveaus auf die intrazelluläre Lokalisation der V2R-Mutanten.....	47
3.1.1.3	Andere NDI-verursachende V2R-Mutanten erreichen ebenfalls das ERGIC	48
3.1.2	Biochemische Analyse der Faltungszustände der Rezeptormutanten.....	51
3.2	Wiederherstellung des Transports der V2R-Mutante Y205C zur Plasmamembran („Rescue“).....	54
3.2.1	Kontrolle der Plasmamembranintegrität unter Peptidbehandlung	55
3.2.2	Rescue der Y205C-Mutante durch Peptidbehandlung: Mikroskopische Untersuchungen.....	57
3.2.3	Quantifizierung des „Rescue“-Effekts	59
3.2.4	Biochemischer Nachweis des „Rescue“-Effekts.....	61
3.3	Analyse der Assoziation von V2R-Mutanten mit Qualitätskontrollkomponenten	63
3.3.1	Koimmunpräzipitationsuntersuchungen.....	64
3.3.2	Penetratin und KLAL führen zur Dissoziation von BiP und der Y205C-Mutante.....	65
3.4	Intrazelluläre Lokalisation der eingesetzten Zellpenetrierenden Peptide.....	67
3.4.1	Penetratin / KLAL und Y205C kolokalisieren nach BafilomyzinA1-Behandlung	70
3.5	Ein „Rescue“ der V2R-Mutanten führt nicht zu funktionellen Rezeptoren	72
3.5.1	Bindungsexperiment mit radioaktiv markiertem Agonisten an intakten Zellen.....	72

3.5.2	Konzentrationsmessung des „second messengers“ cAMP mittels Radioimmunoassay	74
3.6	Peptidvermittelter „Rescue“ zusätzlicher Klasse B-Mutanten	74
4	Diskussion	79
4.1	Retention verschiedener Mutanten des V2R in unterschiedlichen Kompartimenten	79
4.2	„Rescue“ von Klasse B-Mutanten durch zellpenetrierende Peptide.....	86
5	Zusammenfassung	91
6	Summary	93
7	Literaturverzeichnis	94
8	Publikationen	101
9	Lebenslauf	102
10	Danksagungen	103

Abkürzungen

[³ H]AVP	[³ H]-markiertes 8-Arginin-Vasopressin
λ _{em}	Emissionswellenlänge
λ _{exc}	Anregungswellenlänge
AC	Adenylatzyklase (adenylyl cyclase)
ADH	antidiuretisches Hormon
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP2	Aquaporin 2
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin 5'-triphosphat
AVP	Arginin-Vasopressin
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyhydrogenphosphat-p-toluidin
BFA	Brefeldin A
BiP	immunoglobulin G heavy chain binding protein
B _{max}	maximale Bindung
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
cAMP	zyklisches Adenosin-3', 5'-Monophosphat
CBB	Coomassie-Brillantblau G
CD	Zirkulardichroismus (circular dichroism)
CFP	zyan fluoreszierendes Protein (cyan fluorescent protein)
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Ci	Maßeinheit Curie
CMV	Zytomegalievirus (cytomegalovirus)
ColE1	E. coli replication origin
COP	coat protein coatomers
CPP	zellpenetrierendes Peptid (cell-penetrating peptide)
cy3 TM	Fuoreszenzfarbstoff
DABCO	1,4-Diazabicyklo[2.2.2.]oktan
DAG	Diacylglycerol
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
BPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
dpm	Zerfall pro Minute (disintegration per minute)
DTT	Dithiothreitol
ECL	extrazelluläre Schlaufe (extracellular loop)
EDTA	Ethylenediamintetraessigsäure (-Natriumsalz)
EKG	Elektrokardiogramm
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-associated degradation
ERGIC	ER-Golgi-Intermediärkompartiment (-intermediate compartment)
ERp57	ER Thiol-disulfid-Oxidoreduktase

FKS	fetales Kälberserum
Fluos	6-Carboxyfluoreszin
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-
FSH	follikelstimulierendes Hormon
g	Maßeinheit für die Erdbeschleunigung
G-Protein	guanylnukleotidbindendes Protein
GABA	γ -Aminobuttersäure (γ -aminobutanoic acid)
GDP	Guanosin 5'-diphosphat
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GFP	grün fluoreszierendes Protein aus <i>Aequorea victoria</i>
GPCR	G protein-coupled receptor
GRP 78	glukosereguliertes Protein 78
G _s	stimulatorisches heterotrimeres G-Protein vom Subtyp S
HA	Haemagglutinin
hCT	humanes Kalzitoin (human calcitonine)
HEK 293	human embryonic kidney 293-Zellen
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure))
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
ICL	intrazelluläre Schlaufe (intracellular loop)
IE	internationale Einheiten
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IGPal C 630	(Oktylphenoxy)-polyethoxyethanol
IZ	intrazellulär
K _D	Dissoziationskonstante
K-FGF	Kaposi's sarcoma fibroblast growth factor 1
LSM	Laser Scanning Mikroskop(ie)
m	Masse
M13	calmodulinbindendes Peptid M13
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NDI	nephrogener <i>Diabetes insipidus</i>
NHS	N-Hydroxy-Succinimid
NP-40	Ethylphenyl-Polyethylenglycol
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer in physiologischer Kochsalzlösung (phosphate-buffered saline)
PBSI	PBS mit Proteaseinhibitoren
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDI	Proteindisulfidisomerase
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A (cAMP abhängig)
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNGaseF	Peptidoglykosidase F
PTD	Proteintransduktionsdomäne (protein transduction domain)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
QT	Zeitdauer der mechanischen Systole

RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
S	Siemens (Maßeinheit für die elektrische Leitfähigkeit)
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SV40	simian vacuolating virus 40
TAE	Puffer mit Tris-Acetat und EDTA
Tat	transcriptional trans-activator
TBS	Puffer mit Tris-HCl und Natriumchlorid
TBST	TBS-Puffer mit Triton X-100 [®]
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluorborat
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TM	transmembranäre Domäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TX	Triton X-100 [®]
v	Volumen
WT	Wildtyp
x/y-scan	mikroskopisches Bild nur einer flachen Ebene im Raum